

PHÂN LẬP, TUYỂN CHỌN *Bacillus thuringiensis* TỪ MỘT SỐ MẪU ĐẤT TẠI XÃ TIỀN CẢNH, TỈNH QUẢNG NAM

Nhận bài:

21 – 12 – 2018

Chấp nhận đăng:

25 – 03 – 2019

<http://jshe.ued.udn.vn/>

Võ Văn Minh^a, Lê Thị Mai^{a*}, Lê Vũ Khánh Trang^a, Phan Nguyễn Gia Linh^a

Tóm tắt: Từ các mẫu đất thu nhận tại xã Tiên Cảnh tỉnh Quảng Nam, chúng tôi đã tuyển chọn được 6 chủng vi khuẩn (VK) có tính thể độc. Sau khi tiến hành nghiên cứu các đặc điểm sinh học, khả năng sinh enzyme ngoại bào và khả năng sinh chất kháng sinh của chủng VK3 được tuyển chọn. Chúng tôi đã định danh bằng cách giải trình tự 16S rRNA, kết quả cho thấy chủng VK3 thuộc loài *Bacillus thuringiensis*.

Từ khóa: *Bacillus thuringiensis*; kháng khuẩn; tính thể độc; enzyme.

1. Giới thiệu

Vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* được sử dụng rộng rãi để kiểm soát các loài gây hại khác nhau của nông nghiệp trên toàn thế giới, chiếm khoảng 53% thị trường toàn cầu thuốc trừ sâu sinh học, tạo ra doanh thu hàng năm là 210 triệu đô la [5]. Trong những năm gần đây, các nhà khoa học đã có rất nhiều cố gắng để phân lập vi khuẩn này từ môi trường của nhiều nước trên thế giới với hi vọng tìm ra những chủng *B. thuringiensis* có phổ gây bệnh mới và khoảng vật chủ rộng hoặc nâng cao hoạt tính các chủng *B. thuringiensis* đối với các nhóm côn trùng mới, hay tìm kiếm nguồn gen từ những chủng phân lập cho các kỹ thuật di truyền tiếp theo.

Tiên Cảnh là một xã thuộc huyện Tiên Phước, tỉnh Quảng Nam có điều kiện tự nhiên đa dạng. Với hi vọng tìm ra những chủng *Bacillus thuringiensis* mới có hoạt tính sinh học cao ứng dụng trong nông nghiệp chúng tôi tiến hành nghiên cứu tuyển chọn chủng *Bacillus thuringiensis* từ một số mẫu đất tại xã Tiên Cảnh, tỉnh Quảng Nam.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Phương pháp lấy mẫu

Tiến hành lấy mẫu theo TCVN6663-1:2001. Các mẫu phải mang tính đại diện và đảm bảo không bị biến đổi trong suốt quá trình từ khi lấy mẫu tới khi phân tích.

2.2. Phương pháp phân lập vi khuẩn

Tiến hành pha loãng mẫu bằng nước muối sinh lý NaCl 0,9% đến 10^{-10} . Loại bỏ tế bào sinh dưỡng và các vi sinh vật khác bằng cách tiến hành gia nhiệt trong bể ổn nhiệt ở 80°C trong 10 phút. Hút 100µl dịch pha loãng cấy trải trên môi trường LB - agar.

Ủ ở 37°C trong 24 giờ. Chọn khuẩn lạc đặc trưng cho *Bacillus* sp. tiến hành: nhuộm Gram, nhuộm Coomassie brilliant blue trong 3 phút để quan sát hình dạng tế bào, tính thể và bào tử [1].

2.3. Phương pháp xác định số lượng bào tử của chủng vi khuẩn có tính thể độc

Bằng cách đếm số lượng bào tử, ta có thể ước tính số lượng tính thể độc có trong dịch lên men, cũng như theo dõi được tốc độ sinh trưởng của chủng vi khuẩn. Để xác định số lượng bào tử chúng tôi tiến hành xử lý mẫu ở 70°C trong 10 phút rồi pha loãng mẫu. Lấy 0,1ml cấy gạt vào các đĩa thạch vô trùng chứa môi trường. Để vào tủ ẩm ở 28°C trong 24 giờ rồi đếm số lượng khuẩn lạc mọc trên mỗi đĩa [1].

2.4. Phương pháp nghiên cứu đặc điểm sinh học, khảo sát khả năng sinh enzyme ngoại bào cellulase, amylase và protease và khả năng sinh kháng sinh của vi khuẩn

^aTrường Đại học Sư phạm – Đại học Đà Nẵng

* Tác giả liên hệ

Lê Thị Mai

Email: maile610@gmail.com

* Nghiên cứu đặc điểm sinh học của chủng vi khuẩn tuyển chọn được tiến hành theo phương pháp của theo Claus và Berkeley với các phép thử sinh hóa như Oxidase, Catalase, Voges Proskauer (VP), Citrate Utilization, Gelatin Hydrolysis, khả năng sử dụng các loại đường Glucose, Sucrose; đặc điểm sinh trưởng ở 5°C, 42°C và nồng độ 10% NaCl [4]. * Khả năng sinh enzyme ngoại bào được khảo sát theo phương pháp của Harley et al. (2001) có cải tiến như sau: Tế bào của chủng vi khuẩn tuyển chọn được nuôi cấy trong môi trường LB lỏng ở 37°C trong 24 giờ. Hút 1ml dịch li tâm và nhỏ vào lỗ thạch (đường kính d= 1,3cm) môi trường LB có bổ sung 1% tinh bột cho phản ứng khảo sát khả năng sinh enzyme amylase, 1% gelatin cho phản ứng khảo sát khả năng sinh enzyme protease; bổ sung 0,5% CMC đối với khảo sát cellulase. Đọc kết quả bằng cách nhỏ thuốc thử Lugol đối với amylase, cellulase, HgCl₂ đối với protease, quan sát các vòng đục xung quanh lỗ thạch. Mỗi phản ứng lặp lại 3 lần [5].

* Khả năng sinh chất kháng sinh theo phương pháp khuếch tán trên thạch. Chủng vi khuẩn hoạt hóa được cấy vạch trên môi trường TSA (Becton Dickinson). Sau 30 giờ nuôi cấy ở 28°C, dịch nuôi cấy vi khuẩn được cho vào lỗ thạch (đường kính d= 1,3cm) trên môi trường NA đã cấy sẵn các vi khuẩn kiểm định là *E. coli*, *Salmonella* sp, *Pseudomonas*, *B.cereus*. Sau 24 giờ nuôi cấy đối với vi khuẩn ở 37°C, hoạt tính kháng sinh được xác định dựa trên sự xuất hiện vòng ức chế xung quanh lỗ thạch [3].

2.5. Phương pháp định danh *Bacillus* sp

Chọn ra chủng vi khuẩn có hoạt tính enzyme cao nhất để tiến hành định danh bằng phương pháp giải trình tự vùng gen 16S rRNA [2].

Nuôi cấy thu sinh khối vi khuẩn trong môi trường LB ở máy lắc 180 vòng/phút trong 16 giờ. Tách chiết DNA tổng số, khuếch đại vùng gen 16S rRNA bằng phản ứng PCR với cặp mồi:

27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')

1492R (5'-TACCTGTTACGACTT-3')

Sản phẩm PCR được tinh chế và gửi giải trình tự tại Công ty TNHH MTV Sinh hóa Phù Sa (Cần Thơ). Sử dụng công cụ BLAST trên website NCBI để tìm kiếm trình tự tương đồng cho kết quả.

2.6. Phương pháp xử lý số liệu

Các số liệu thực nghiệm được xử lý thống kê theo phương pháp thống kê sinh học, sử dụng công cụ phân tích số liệu (data analysis) của Microsoft excel. Kết quả thí nghiệm được biểu thị bằng (M ± SD) & (M ± SE).


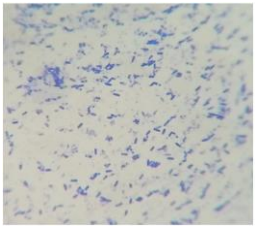
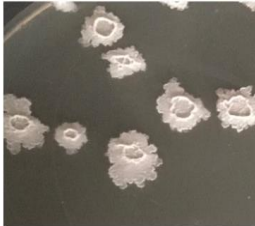
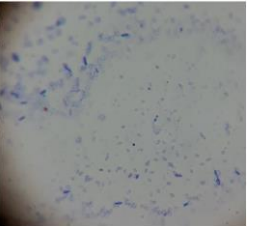

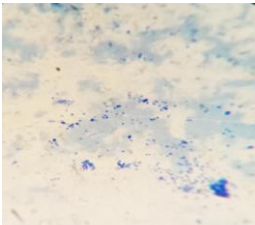

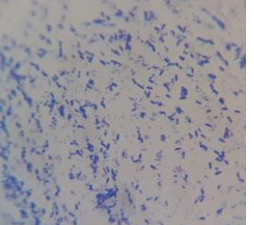

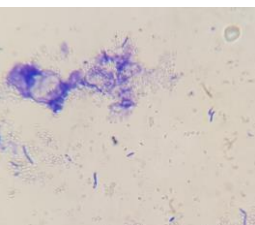

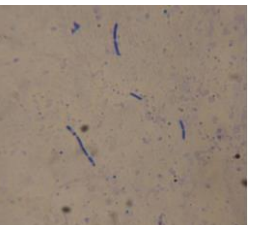
3. Kết quả và đánh giá

3.1. Kết quả phân lập của vi khuẩn *Bacillus* sp. có tính thể độc phân lập từ đất tại xã Tiên Cảnh

Từ 60 mẫu đất được lấy ở những khu vực khác nhau tại Tiên Cảnh, chúng tôi tiến hành phân lập theo phương pháp của Traves, 1987 (sử dụng tác nhân chọn lọc là natri acetate). Trước khi phân lập, các mẫu được gia nhiệt ở 80°C trong 30 phút. Sau đó, tiến hành nuôi cấy các chủng trên môi trường LB ở 42°C. Sau 48 giờ, tiến hành quan sát hình thái khuẩn lạc, làm tiêu bản nhuộm với thuốc nhuộm Coomassie brilliant blue trong 3 phút để quan sát hình dạng tế bào, tinh thể và bào tử. Kết quả đã phân lập được 6 chủng vi khuẩn (kí hiệu VK1 →VK6) thể hiện ở Bảng 1 và Hình 1.

Bảng 1. Các hình thái khuẩn lạc của các chủng phân lập giống *B. thuringiensis* giả định

Kí hiệu chủng	Hình thái khuẩn lạc	Tính thể
VK1, VK3	KL có màu trắng kem, viền nhẵn, có núm ở tâm, nhìn nghiêng bề mặt hơi sần sùi	+
VK2	KL màu trắng kem, có ria to tròn, lõm ở giữa	+
VK4	KL màu trắng kem, có ria nhỏ tròn, có nhân ở giữa	+
VK5	KL tròn đều trắng kem, có ria mịn, có nhân ở giữa	+
VK6	Giống KL của VK3 nhưng nhỏ hơn và không sần sùi trên bề mặt	+

Kí hiệu chủng	Hình thái khuẩn lạc	Hình thái tế bào	Kí hiệu chủng	Hình thái khuẩn lạc	Hình thái tế bào
VK1			VK2		
VK3			VK4		
VK5			VK6		

Qua kết quả cho thấy có 6 chủng *Bacillus* sp có sự hiện diện của tinh thể độc bắt màu xanh của thuốc nhuộm. Các chủng vi khuẩn sinh tinh thể mới phân lập được có độ đa dạng cao về dạng tinh thể, bao gồm: dạng lưỡng tháp và dạng hình cầu với các kích thước khác nhau. Sự khác nhau về cấu trúc cũng như hình dạng tinh thể độc là do các thành phần protein cấu tạo nên. Sự phong phú về hình dạng tinh thể có thể dẫn tới sự đa dạng về gene độc tố, là cơ sở tạo nên phổ diệt côn trùng rộng cho các chủng *Bacillus thuringiensis* nghiên cứu [7]. Nếu so sánh với kết quả của Nguyễn Thiên Phú và cộng sự khi tuyển chọn *Bacillus thuringiensis* tại rừng ngập mặn Cần Giờ thì số lượng chủng *Bacillus* sp có tinh thể độc tại Tiên Cảnh đa dạng hơn [1].

3.2. Kết quả xác định số lượng bào tử

Mỗi tế bào của các chủng *Bacillus thuringiensis* khi bị phá vỡ giải phóng ra một bào tử và một tinh thể độc. Vì vậy bằng cách đếm số lượng bào tử, ta có thể ước tính số lượng tinh thể độc có trong dịch lên men, cũng

như theo dõi được tốc độ sinh trưởng của chủng vi khuẩn [1]. Kết quả được thể hiện ở Bảng 2.

Bảng 2. Số lượng bào tử /ml dịch lên men

Kí hiệu chủng	Số lượng bào tử ($\times 10^9$)/ml dịch lên men
VK1	$1,2 \pm 0,13$
VK2	$0,8 \pm 0,1$
VK3	$1,7 \pm 0,04$
VK4	$1,0 \pm 0,01$
VK5	$1,4 \pm 0,1$
VK6	$1,3 \pm 0,14$
VK7	$1,4 \pm 0,15$

Kết quả cho thấy, trong 6 chủng vi khuẩn nghiên cứu, chủng VK3 có tốc độ sinh trưởng nhanh cho số lượng bào tử và tinh thể cao nhất so với các chủng còn

lại nên chúng tôi chọn chủng VK3 cho những nghiên cứu tiếp theo.

3.3. Kết quả nghiên cứu một số đặc điểm sinh học của chủng VK3 tuyển chọn

3.3.1. Đặc điểm nuôi cấy và sinh hóa của chủng VK3

Đặc điểm sinh học của chủng vi khuẩn tuyển chọn được tiến hành theo phương pháp theo Claus và Berkeley (1986) [4]. Kết quả được thể hiện ở Bảng 3.

Bảng 3. Kết quả thử nghiệm sinh hóa của chủng VK3

Các chỉ tiêu	Chủng vi khuẩn VK3	Các chỉ tiêu	Chủng vi khuẩn VK3
Oxidasa	+	Nuôi cấy 42°C	+
Catalaza	+	NaCl 10%	-
S. citrate	+	Glucose	+
Gelatin	+	Sucrose	+
Voges Proskauer (VP)	+	Di động	+
Nuôi cấy 5°C	-		

Qua kết quả cho thấy VK3 có các phản ứng tích cực liên quan đến xét nghiệm catalase, phản ứng VP, thủy phân gelatin, khử nitrat. Vi khuẩn VK3 tăng trưởng ở 42°C nhưng không sinh trưởng ở 5°C và cũng không thể phát triển trong môi trường có chứa NaCl 10%, đây là một những đặc điểm để phân biệt giữa loài *B. thuringiensis* với loài *B. cereus*. Như vậy, với những đặc điểm sinh hóa của chủng VK3, dựa vào khóa phân loại của Claus và Berkeley, có thể khẳng định được VK3 thuộc chi *Bacillus* [4].

3.3.2. Khả năng sinh enzyme ngoại bào của vi khuẩn

Hoạt tính enzyme do vi khuẩn sinh ra được xác định gián tiếp qua kích thước vòng phân giải trên các môi trường thử hoạt tính. Kết quả thu được ở các Bảng 4.

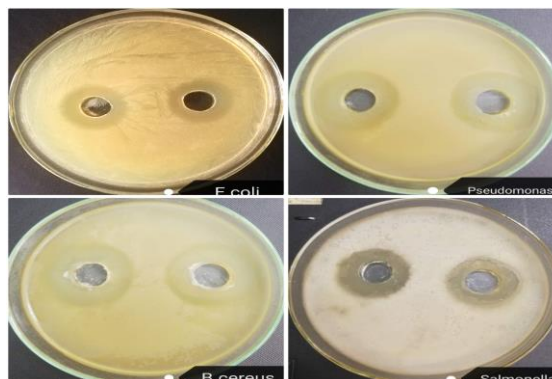
Bảng 4. Đường kính vòng phân giải của enzyme ngoại bào

Chủng	Đường kính vòng phân giải (D – d, cm)		
	amylase	protease	cellulase
VK3	1,7 ± 0,2	2,1 ± 0,2	1,5 ± 0,1

Từ kết quả trên cho thấy rằng chủng VK3 có khả năng sinh enzyme ngoại bào. Enzyme từ *Bacillus* như amylase, cellulase, protease có nhiều đặc tính quý như khả năng hoạt động tốt trong dải pH rộng và bền nhiệt [3].

3.3.3. Khả năng sinh chất kháng sinh

Chủng VK3 có khả năng sinh chất kháng sinh kháng lại các loại vi khuẩn Gram (-) *Slamonella* sp, *E. coli*, *Pseudomonas* sp. và vi khuẩn Gram (+) với *B. cereus*. Kết quả được thể hiện ở hình 2.



Hình 2. Đường kính vòng kháng khuẩn của VK3 với *Slamonella*, *E. coli*, *Pseudomonas* sp và *B. cereus*

Chất kháng sinh từ *Bacillus* có bản chất là các peptide được tổng hợp qua ribosome (còn gọi là bacteriocin hoặc lantibiotics). Lantibiotics có phổ kháng khuẩn hẹp và thường ứng dụng trong bảo quản thực phẩm [3].

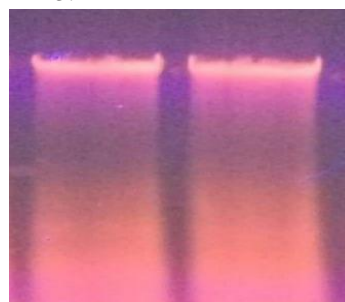
Từ các kết quả nghiên cứu trên, chủng VK3 được chọn để định danh và sử dụng cho các ứng dụng tiếp theo.

3.3.4. Kết quả định danh bằng phương pháp khuếch đại vùng gen 16S rRNA

Tiến hành định danh chủng VK3 bằng cách khuếch đại vùng gen 16S rRNA bằng phản ứng PCR. Sản phẩm PCR được tinh chế và gửi giải trình tự tại Công ty TNHH MTV Sinh hóa Phù Sa (Cần Thơ). Kết quả như sau:

Tách chiết DNA tổng số

DNA tổng số sau khi tách chiết được kiểm tra bằng kỹ thuật điện di sử dụng gel agarose 0,8%. Kết quả được trình bày ở Hình 3.

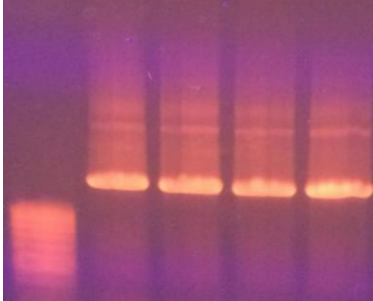


Hình 3. DNA tổng số của *Bacillus* sp

Lượng DNA tổng số thu được có chất lượng khá tốt (sạch và ít bị đứt gãy) được sử dụng làm DNA khuôn mẫu để khuếch đại vùng gen 16S rRNA.

Khuếch đại vùng gen 16S rRNA

Sản phẩm khuếch đại vùng gen 16S rRNA được kiểm tra bằng kỹ thuật điện di sử dụng gel agarose 0,8%. Kết quả được trình bày ở Hình 4.



Hình 4. Khuếch đại vùng gen 16S rRNA (*Bacillus* sp.)

Sản phẩm khuếch đại có kích thước khoảng 1500bp, không có sản phẩm phụ được sử dụng để đi đọc trình tự.

Đọc trình tự sản phẩm PCR

Sản phẩm khuếch đại được đọc trình tự tại Công ty TNHH MTV Sinh hóa Phù Sa (Cần Thơ) gồm 1438 bp. So sánh với ngân hàng gen NCBI, trình tự gen 16S rRNA của chủng VK3 có độ tương đồng 99% với loài *Bacillus thuringiensis*.

4. Kết luận

Qua quá trình tiến hành nghiên cứu, chúng tôi đã thu được những kết quả sau:

- Đã tuyển chọn được 6 chủng vi khuẩn có sự hiện diện của tinh thể độc.
- Đã chọn được chủng VK3 dựa trên khả năng hình thành bào tử, đặc điểm sinh học và khả năng sinh enzyme ngoại bào.

- Kết quả định danh chủng VK 3 bằng việc giải trình tự gen 16S rRNA cho thấy chủng này thuộc loài *Bacillus thuringiensis*.

Tài liệu tham khảo

- [1] Nguyễn Thiện Phú, Trần Thanh Thủy (2013). Phân lập, tuyển chọn chủng *Bacillus thuringiensis* từ rừng ngập mặn Cần giờ có hoạt tính diệt sâu. *Tạp chí Khoa học ĐHSP TP.HCM*, 51, 49-58.
- [2] Nguyễn Văn Phúc, Phan Thị Phương Trang (2014). Phân lập, định danh và xác định các đặc tính có lợi của chủng *Bacillus* ssp. từ ao nuôi tôm tỉnh Bến Tre. *Tạp chí Khoa học ĐHSP TPHCM*, 64.
- [3] Trịnh Thành Trung, Phan Lạc Dũng, Trần Thị Lệ Quyên, Dương Văn Hợp, Đào Thị Lương (2013). Đặc điểm sinh học và tiềm năng ứng dụng của chủng vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* sp 1901 phân lập tại Rừng Quốc gia Hoàng Liên. *Tạp chí Khoa học ĐHQGHN, Khoa học Tự nhiên và Công nghệ*, 29, 3, 59-70.
- [4] Claus D. and Berkeley, R.C.W. (1986). Genus *Bacillus* In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. *Sneath P.H.A.* (ed) 2, 1110-1137.
- [5] Harley J. P. and L. M. Prescott (2001). *Laboratory exercises in microbiology*.
- [6] Shahram Aramideh, Mohammad Hassan Saferalizadeh, Ali Asghar Pourmirza, Mahmud Rezazadeh Bari, Mansureh Keshavarzi and Mahdi Mohseniazar (2010). Characterization and pathogenic evaluation of *Bacillus thuringiensis* isolates from West Azerbaijan province-Iran. *African Journal of Microbiology Research*, 4(12), 1224-1229.
- [7] Uribe, D., Martinez, W., and Cerón, J. (2003). Distribution and diversity of cry genes in native strains of *Bacillus thuringiensis* obtained from different ecosystems from Columbia. *Journal of Invertebrate Pathology*, 82, 119-127.

ISOLATED AND SELECTION *Bacillus thuringiensis* FROM OF SOME SOIL IN TIEN CANH COMMUNE, QUANG NAM PROVINCE

Abstract: From the soil samples collected in Tien Canh commune, Quang Nam province, we selected 6 bacterial strains that contain toxic crystal. After a research on biological characteristics, extracellular enzyme production capacity and antibiotic bioavailability of VK3 strains were selected. Based on 16S rRNA sequence, the results showed that the VK3 strain was identified in/ belonged the *Bacillus thuringiensis*.

Key words: *Bacillus thuringiensis*; antibacterial; crystal; enzyme.