

## KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP CHITINAZA CỦA CHŨNG VI KHUẨN *Bacillus* Q<sub>3</sub> CÓ HOẠT TÍNH KHÁNG NẤM CAO

NGUYỄN THỊ THU TRANG, NGUYỄN LÂN DŨNG

*Trung tâm Công nghệ sinh học, ĐHQG HN*

Nấm là nhóm vi sinh vật vô cùng đa dạng, có tới hơn 250000 loài đã được xác định. Chúng khu trú trên bề mặt của hầu hết các vật thể, kể cả các cơ thể sống như thực vật, động vật và con người. Chitinaza là một enzym có triển vọng trong việc phòng chống nấm bệnh [5] vì có khả năng phân giải thành tế bào của nấm và ức chế sự sinh trưởng của nấm.

Trên thế giới, ngày càng có nhiều công trình nghiên cứu về chitinaza để sử dụng trong bảo vệ thực vật và y tế. Trong bối cảnh nền nông nghiệp Việt Nam đang phải đối mặt với những vấn đề như sự ô nhiễm môi trường đất, môi trường nước; sự tàn phá mùa màng của sâu bệnh do sử dụng tràn lan phân bón và thuốc bảo vệ thực vật hóa học. Việc nghiên cứu chitinaza ở Việt Nam nhằm mục tiêu tạo được chế phẩm trừ nấm bệnh, giúp sử dụng an toàn nông phẩm và làm giảm sự ô nhiễm môi trường, hướng tới một nền nông nghiệp sạch và bền vững.

### I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 1. Nguyên liệu

Sử dụng 22 chủng vi khuẩn được phân lập từ đất của các vùng Hà Nội, Thái Bình và Hòa Bình có hoạt tính chitinaza. Các chủng nấm được lấy từ Bảo tàng giống chuẩn Việt Nam, Trung tâm Công nghệ sinh học, ĐHQGHN. Sử dụng chitin được tách chiết từ vỏ tôm, vỏ cua và chitin tinh khiết (Sigma).

#### 2. Phương pháp

Xác định sơ bộ hoạt tính chitinaza và hoạt tính kháng nấm của các chủng vi khuẩn lựa chọn được bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch.

### II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 1. Chọn lọc chủng vi khuẩn có hoạt tính chitinaza cao

Các chủng vi khuẩn phân lập được từ các mẫu đất thu thập trên địa bàn của các vùng Hà Nội, Thái Bình và Hòa Bình được nuôi cấy lắc ổn nhiệt trên môi trường MS [2] chứa 0,1% chitin trong 24 giờ ở nhiệt độ 37°C. Sau đó, các mẫu được pha loãng tới các nồng độ thích hợp (từ 10<sup>-3</sup>-10<sup>-6</sup>), nhỏ trên môi trường thạch chitin. Dựa vào vòng trong suốt quanh khuẩn lạc, chúng tôi đã tuyển chọn được 22 chủng vi khuẩn có khả năng sinh chitinaza.

Từ 22 chủng vi khuẩn, chúng tôi lựa chọn được chủng Q<sub>3</sub> có hoạt tính chitinaza cao nhất để nghiên cứu tiếp. Căn cứ vào đặc điểm hình thái, sinh lý và sinh hóa, chúng tôi xác định chủng Q<sub>3</sub> thuộc chi *Bacillus*.

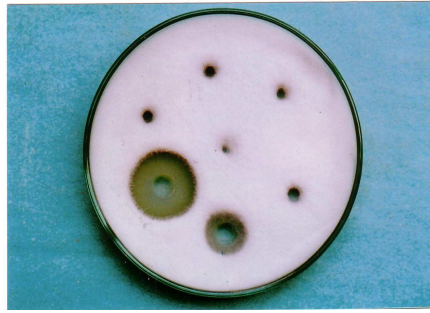
#### 2. Tính kháng nấm của chủng vi khuẩn *Bacillus* Q<sub>3</sub>

Kết quả trình bày ở bảng dưới đây cho thấy chủng Q<sub>3</sub> do sản sinh chitinaza nên đã ức chế mạnh mẽ sự phát triển của nhiều chủng nấm bệnh khác nhau.

*Bảng*

**Khả năng kháng nấm của chủng *Bacillus* Q<sub>3</sub> có hoạt tính chitinaza**

Các chủng nấm	Hoạt tính kháng nấm (D-d, mm)
<i>Aspergillus</i> VN04-460	22
<i>Trichoderma</i> VN04-412	15
<i>Eurotium amstelodami</i>	5
<i>Eurotium chevalieri</i>	20
<i>Fusarium oxysporum</i>	20



Hình 1. Hoạt tính kháng nấm *Fusarium oxysporum* của chủng vi khuẩn *Bacillus Q<sub>3</sub>*

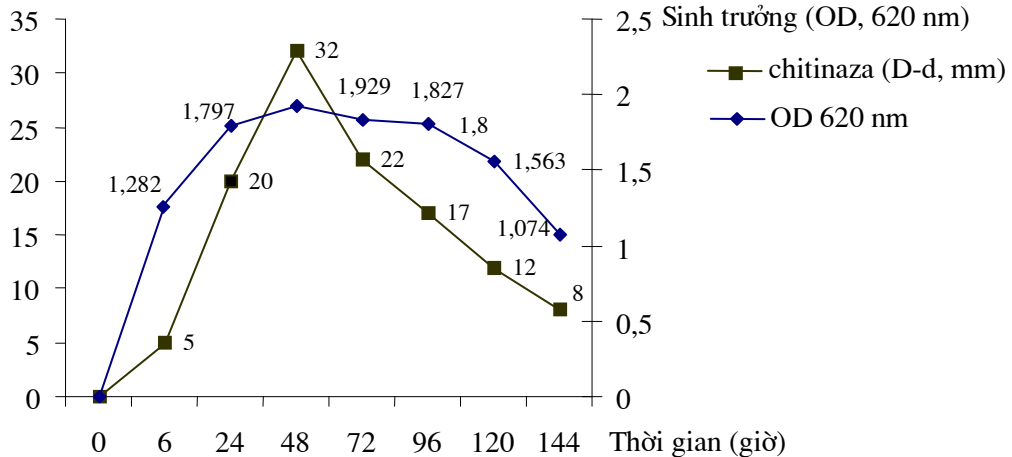
**3. Xác định các điều kiện nuôi cấy chủng *Bacillus Q<sub>3</sub>* cho việc sinh tổng hợp chitinaza**

a. *Động thái sinh trưởng và ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy thích hợp cho việc sinh tổng hợp chitinaza (hình 2)*

Khi nuôi cấy trên máy lắc ở nhiệt độ 27°C,

220 rpm, trong môi trường MS có chứa 0,1% chitin, chúng tôi nhận thấy tại thời điểm 48 h sinh khối của vi khuẩn và hoạt tính chitinaza đạt đến giá trị cực đại. Kết quả cho thấy khả năng sinh trưởng của chủng *Q<sub>3</sub>* tăng theo pha logarit, thời gian thế hệ ngắn, lượng enzym sinh ra nhiều vào cuối pha sinh trưởng đầu pha cân bằng. Sau thời gian đó, mật độ của tế bào và hoạt tính của chitinaza trong dịch nuôi đều giảm.

Hoạt độ của enzym (D-d, mm)



Hình 2. Hoạt độ tương ứng của chitinaza ở các thời điểm nuôi cấy khác nhau

b. *Ảnh hưởng của nhiệt độ thích hợp đến khả năng sinh tổng hợp chitinaza*

Nuôi cấy lắc chủng vi khuẩn *Q<sub>3</sub>* ở các nhiệt độ khác nhau: 25, 30, 35, 37, 45, 50°C trong 48 giờ, ly tâm lạnh để lấy dịch enzym nhỏ vào các lỗ thạch. Kết quả được biểu thị ở hình 3.

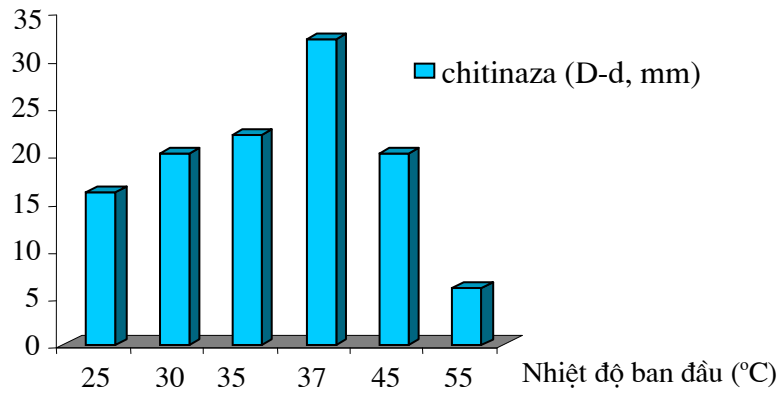
Kết quả thu được cho thấy chủng vi khuẩn *Q<sub>3</sub>* sinh trưởng và sinh tổng hợp chitinaza mạnh mẽ nhất ở 37°C. Ở nhiệt độ thấp 25°C hay cao 55°C, chitinaza vẫn được tiết vào dịch nuôi

nhưng với hoạt tính thấp hơn.

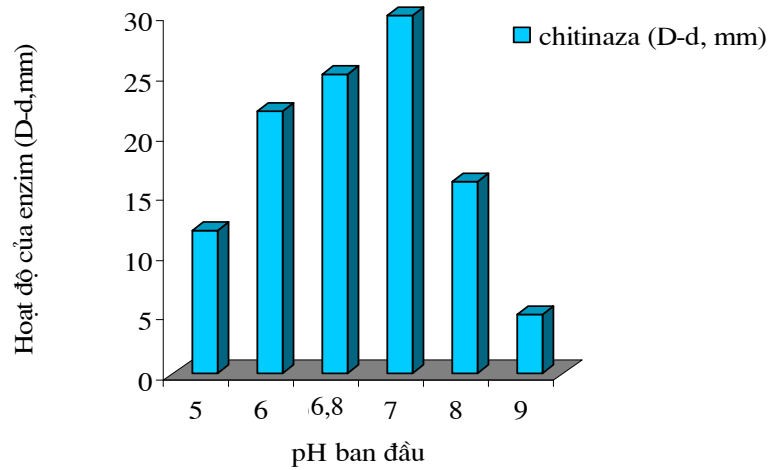
c. *Ảnh hưởng của pH thích hợp đến khả năng sinh tổng hợp chitinaza*

Môi trường ban đầu được điều chỉnh với các giá trị pH là 5,0; 6,0; 6,8; 7,0; 8,0; 9,0. Sau đó, cấy lượng giống vi khuẩn như nhau và nuôi cấy lắc trong 48 giờ ở 37°C. Kết quả thí nghiệm được trình bày ở hình 4. Chủng vi khuẩn *Q<sub>3</sub>* cho hoạt tính chitinaza cao nhất trong môi trường nuôi cấy với giá trị pH ban đầu là 7,0.

Hoạt độ của enzym (D-d, mm)



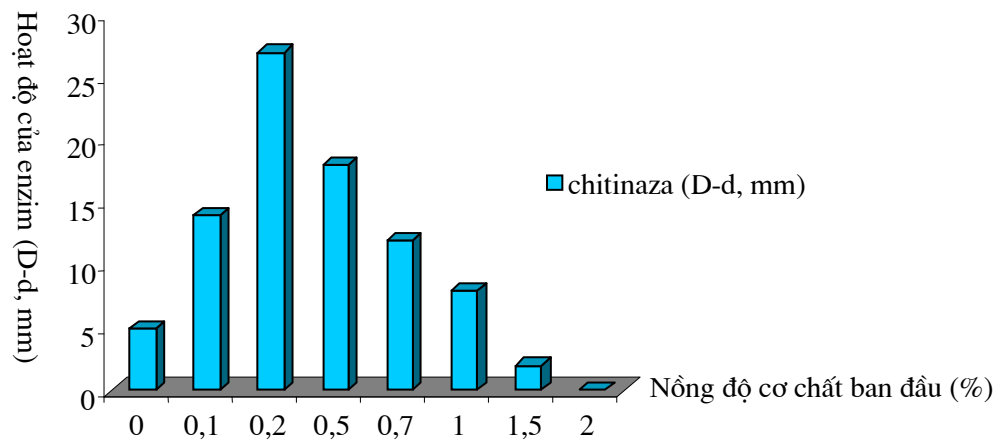
**Hình 3.** Ảnh hưởng của nhiệt độ ban đầu đến khả năng sinh tổng hợp chitinaza



**Hình 4.** Ảnh hưởng của pH ban đầu đến khả năng sinh tổng hợp chitinaza

d. Ảnh hưởng của nồng độ nguồn cơ chất chitin thích hợp đến khả năng sinh tổng hợp chitinaza

Chúng tôi nhận thấy nồng độ 0,2% chitin thích hợp cho khả năng sinh tổng hợp chitinaza của chủng vi khuẩn *Bacillus Q<sub>3</sub>*.



**Hình 5.** Ảnh hưởng của nồng độ chitin ban đầu đến khả năng sinh tổng hợp chitinaza

### III. KẾT LUẬN

Từ 22 chủng vi khuẩn phân lập được có hoạt tính chitinaza, chúng tôi lựa chọn 1 chủng có hoạt tính chitinaza cao nhất để nghiên cứu tiếp. Đó là chủng vi khuẩn *Bacillus* Q<sub>3</sub>.

Chủng *Bacillus* Q<sub>3</sub> có khả năng sử dụng chitinaza để ức chế mạnh mẽ nhiều chủng nấm gây bệnh thực vật (*Aspergillus* VN04-460; *Trichoderma* VN04-412; *Eurotium amstelodami*; *Eurotium chevalieri*; *Fusarium oxysporum*).

Các điều kiện thích hợp nhất để sản sinh chitinaza của chủng *Bacillus* Q<sub>3</sub> là nuôi cấy trên môi trường MS có pH ban đầu 7,0; nồng độ cơ chất ban đầu thích hợp là 0,2% ở nhiệt độ 37°C, trong thời gian 48 giờ.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Nguyễn Thị Tuyết Nhung và cs.**, 2003: Tạp chí Sinh-Y học, 1: 125-128.
2. **Selitrennikoff C. P.**, 2001: Applied & Environmental Microbiology, 67: 2883-2894.
3. **Naoto Mabuchi, Ichiro Hashizume and Yoshio Araki**, 2000: Can. J. Microbiol., 46: 370-375.
4. **Shimahara K. and Takiguchi Y.**, 1988: Methods Enzymol., 161: 417-423.
5. **Henrissat B., Davies G. J.**, 2000: Advances in chitin science. Jacques Andre Publisher, Lyon, France.

## THE CHITINASE BIO-PRODUCTION ABILITY OF THE *BACILLUS* STRAIN Q<sub>3</sub> HAVING THE HIGH ANTAGONISM TOWARD FUNGI

NGUYEN THI THU TRANG, NGUYEN LAN DUNG

### SUMMARY

In a trial study for the isolation of chitin-degrading bacteria from soil samples of agricultural fields from Hanoi city and Thaibinh, Hoabinh provinces, we have isolated 22 bacterial strains. Among these 22 strains, there was the *Bacillus* strain Q<sub>3</sub> having the highest antagonism toward Fungi (*Aspergillus* VN04-460; *Trichoderma* VN04-412; *Eurotium amstelodami*; *Eurotium chevalieri*; *Fusarium oxysporum*) and the highest chitin hydrolysis. On the MS medium with 0,2% colloidal chitin, the chitinase activity of the *Bacillus* strain Q<sub>3</sub> culture reached the highest value after 48 hours, at 37°C and with pH 7.0.

Ngày nhận bài: 18-7-2005