

PHÂN LẬP, TUYỂN CHỌN CHỦNG *BACILLUS THURINGIENSIS* TỪ RỪNG NGẬP MẶN CẦN GIỜ CÓ HOẠT TÍNH DIỆT SÂU

NGUYỄN THIỆN PHÚ*, TRẦN THANH THỦY**

TÓM TẮT

Từ các mẫu đất thu nhận tại rừng ngập mặn (RNM) Cần Giờ, chúng tôi đã tuyển chọn được 4 chủng vi khuẩn (VK) có tính thể độc và tiến hành thử hoạt lực diệt sâu tơ (*Plutella xylostella*) gây hại cải. Chủng VK có hoạt lực mạnh được định danh bằng cách giải trình tự 16S rRNA. Kết quả cho thấy chủng thuộc loài *Bacillus thuringiensis* var. *kustaki*.

Từ khóa: *Bacillus thuringiensis*, thuốc trừ sâu vi sinh, phân lập.

ABSTRACT

The isolation and selection of *Bacillus thuringiensis* species with insecticidal activeness against diamondback moth (*Plutella xylostella*) from Can Gio swamp

From the soil samples collected in Can Gio swamp, 4 bacterial strains having toxic crystal were selected and tested for insecticidal activeness against diamondback moth (*Plutella xylostella*). Based on 16S rRNA, a species which has the best insecticidal activeness was classified in the *Bacillus thuringiensis* var. *kustaki* family.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, biopesticide, isolate.

1. Mở đầu

Ngày nay các chế phẩm sinh học (có nguồn gốc từ sinh vật) an toàn cho phòng trừ sâu hại cây trồng và bảo quản nông sản đã được khuyến khích ứng dụng để thay thế dần các thuốc trừ sâu hóa học. Trong đó, VK là đối tượng được chú ý hơn cả. [1]

Trong số hàng loạt những VK có khả năng tiêu diệt sâu hại, *Bacillus thuringiensis* (Bt) là tác nhân sinh học đầu tiên được nghiên cứu và sản xuất thành thuốc trừ sâu vi sinh trên thế giới, đồng thời là sản phẩm nổi tiếng nhất hiện nay. Các chế phẩm sinh học từ Bt đã được ứng dụng nhiều trong nông nghiệp, mang lại hiệu quả cao. [3]

RNM Cần Giờ có hệ sinh thái đa dạng phong phú, độ đa dạng sinh học được đánh giá cao trong khu vực Đông Nam Á. Ngoài hệ động thực vật, RNM Cần Giờ còn chứa đựng một tài nguyên sinh vật khác – đó là thành phần vi sinh vật (VSV). Các chủng VSV phân lập từ RNM được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực, đặc biệt là nông nghiệp.

* HVCH, Trường Đại học Sư phạm TPHCM

** TS, Trường Đại học Sư phạm TPHCM

Trong những năm gần đây, các nhà khoa học thuộc Trung tâm nghiên cứu hệ sinh thái RNM Cần Giờ đã phát hiện trong đất RNM có VK *B. thuringiensis* (Bt) có khả năng diệt sâu gây hại. Người ta đã tiến hành phân lập từ RNM các VK Bt với hi vọng từ hệ sinh thái đặc biệt này có thể tìm ra những chủng mới có hoạt tính cao, ứng dụng trong công tác phòng trừ côn trùng gây hại, nâng cao năng suất cây trồng.

Từ những lí do trên, chúng tôi tiến hành nghiên cứu với nội dung: “Phân lập, tuyển chọn chủng *Bacillus thuringiensis* từ rừng ngập mặn Cần Giờ có hoạt tính diệt sâu”.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

2.1.1. Đối tượng

Nghiên cứu được thực hiện trên các đối tượng:

- Các chủng *B. thuringiensis* phân lập từ RNM Cần Giờ.
- Sâu tơ (*Plutella xylostella*) gây hại bắp cải, nhận từ Công ti thuốc sát trùng Việt Nam (Vipesco).

2.1.2. Các môi trường nghiên cứu đã sử dụng

Để thực hiện các nội dung nghiên cứu, chúng tôi tiến hành sử dụng các loại môi trường sau:

* **Môi trường T3 đặc (môi trường phân lập):** tryptone 3g/l, dịch chiết nấm men 1,5g/l, tryptose 2g/l, MnCl₂ 0,005g/l, NaH₂PO₄ 6,9 g/l, Na₂HPO₄ 8,9g/l, agar 15g/l. [8]

* **Môi trường T3 lỏng:** thành phần tương tự môi trường T3 đặc nhưng không có agar.

* **Môi trường H de Barjac:** KH₂PO₄ 6,8g/l, NaOH 2,4g/l, peptone 7,5g/l, glucose 10g/l, dung dịch A 10ml/l, dung dịch B 10ml/l, dung dịch C 10ml/l, nước cất 1lít. [5], [4]

- Dung dịch A:

Thành phần	Trọng lượng
MgSO ₄ .7H ₂ O	12,3 g/l
MnSO ₄ .4H ₂ O	0,223 g/l
ZnSO ₄ .7H ₂ O	1,4 g/l
Nước cất	1 lít

- Dung dịch B:

Thành phần	Trọng lượng
FeSO ₄ .7H ₂ O	2g/l
H ₂ SO ₄ đậm đặc	3ml/l
Nước cất	1 lít

Hòa 2g FeSO₄.7H₂O vào 100ml nước cất, sau đó cho 3ml dung dịch H₂SO₄ đậm đặc vào. Sau khi tan hết bổ sung nước cất cho đủ 1 lít.

- Dung dịch C: Hòa 20g CaCl₂ vào 1 lít nước.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Các chủng VK *Bacillus* được phân lập từ đất RNM Cần Giò theo phương pháp của Traves (1987) [7]. Sau đó, tiến hành tuyển chọn bằng cách nghiên cứu đặc điểm hình thái tế bào, bào tử, tinh thể dưới kính hiển vi điện tử (Fadel et al, 1988). [6]

Các chủng VK có chứa bào tử, tinh thể độc sẽ được tiến hành thử hoạt tính diệt sâu phương pháp của Thiery và Frachon [1], [2]. Chủng VK có hoạt lực diệt sâu mạnh được định danh đến loài bằng cách giải trình tự 16s rRNA và so sánh với ngân hàng gen NCBI.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Phân lập và tuyển chọn chủng VK *Bacillus* từ đất RNM Cần Giò

Từ 5 mẫu đất được lấy ở những khu vực khác nhau trong RNM Cần Giò, 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 80⁰C trong 30 phút (diệt các tế bào sinh dưỡng và các tế bào không sinh bào tử). Kết quả thu được 28 dạng khuẩn lạc (KL) khác nhau, tạm gọi là 28 chủng và được kí hiệu là P1, P2,..., P28.

Sau đó, tiến hành nuôi cấy các chủng trên môi trường T₃ ở 30⁰C. Sau 48h 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 được trình bày ở Bảng 1.

Bảng 3.1. Đặc điểm hình thái KL và một số đặc điểm sinh học của các chủng VK phân lập được

Kí hiệu chủng	Hình thái khuẩn lạc (KL)	Hình thái tế bào (TB)	Bào tử	Tinh thể
P1	KL nhỏ, màu trắng trong, bề mặt nhẵn, viền mờ, đường kính khoảng 2mm	Hình que, bào tử hình ovan, hơi lệch tâm	+	-
P2	KL có màu vàng nhạt, có nhầy nhớt, đường kính khoảng 3mm	Hình sợi dài, xếp chồng lên nhau	-	-
P3	KL có màu trắng kem, viền nhẵn, có núp nhỏ ở tâm, nhìn nghiêng bề mặt hơi sần sùi, đường kính khoảng 5mm	Hình que, hai đầu hơi tù, xếp riêng rẽ, bào tử hình trứng, chính tâm	+	+
P4	KL to, có màu trắng kem, hình tán xạ như bông hoa, có khả năng di động, đường kính khoảng 6mm	Hình que, xếp riêng rẽ hoặc thành chuỗi, bào tử lệch tâm	+	-
P5	KL nhỏ, có màu đỏ hồng, khả năng di động nhanh, đường kính khoảng 2mm	Hình cầu, có kích thước lớn	-	-
P6	KL to, màu trắng sữa, mọc tỏa ra như lông chim, viền hơi mờ, đường kính khoảng 6mm	Hình que, xếp riêng rẽ, bào tử hình trứng	+	-
P7	KL có màu kem, bề mặt sần sùi, bám chặt vào mặt thạch, có hình thành vòng mờ xung quanh KL, đường kính khoảng 4mm	Hình que, xếp đơn hay xếp chuỗi, bào tử lệch tâm	+	-
P8	KL màu vàng nhạt, phẳng, trơn, có nhầy nhớt, đường kính khoảng 3mm	Hình bầu dục, không hình thành bào tử	-	-
P9	KL có hình trứng, trắng sữa, có nhiều vòng tròn đồng tâm, đường kính khoảng 3mm	Hình que, xếp thành chuỗi, bào tử lệch tâm	+	-
P10	KL tròn, trắng sữa, viền có gờ nổi lên, ở giữa KL lõm xuống, đường kính 3-4mm	Hình que, ngắn, nhỏ, bào tử chính tâm	+	-
P11	KL có hình dạng bất định, không đều màu, xung quanh KL có vòng mờ, đường kính khoảng 2mm	Hình thoi, đứng riêng rẽ	-	-
P12	KL màu trắng trong, dạng sợi li ti, có nhiều thùy nhỏ, bám chặt vào bề mặt thạch, đường kính 4mm	Hình que, xếp thành chuỗi, bào tử lệch tâm	+	-
P13	KL tròn, viền nhẵn, màu trắng sữa, có tâm, bề mặt gồ ghề, đường kính 8 - 10 mm	Hình que, xếp riêng rẽ, bào tử lệch tâm	+	-
P14	Tương tự KL chủng P3 nhưng viền lan ra xung quanh, đường kính 5-6mm	Hình que, đầu hơi tù, bào tử chính tâm	+	+
P15	Tương tự KL chủng P13 nhưng viền tròn, bề	Hình que, xếp riêng	+	-

	mặt nhẵn, có khả năng di động, đường kính khoảng 5mm	rẽ, bào tử lệch tâm		
P16	KL có màu trắng kem, viền nhẵn, bề mặt nhẵn, đường kính khoảng 4mm	Hình que, bào tử chính tâm	+	
P17	KL có hình sao, trắng trong, bề mặt gồ ghề, đường kính 4–6mm	Hình que, bào tử hình trứng, lệch tâm	+	-
P18	KL có màu xám trắng, bề mặt hơi nhầy nhớt, ở giữa có nóm nhỏ, đường kính khoảng 5mm	Hình bầu dục, xếp thành chuỗi	-	-
P19	Tương tự KL chủng P3 nhưng viền ngoài mờ, lan tỏa nhiều, đường kính 5–6mm	Hình que, đầu hơi tù, xếp riêng rẽ, bào tử chính tâm	+	+
P20	Hình tròn, ướt, vàng nhạt, mép nhẵn, có nhầy nhớt, bám chặt vào bề mặt thạch, đường kính 5 mm	Hình cầu, bắt màu đậm, xếp riêng rẽ	-	-
P21	Tương tự KL chủng P8 nhưng không có vòng đồng tâm, đường kính 5–6mm	Hình bầu dục, không hình thành bào tử	-	-
P22	Tương tự KL chủng P13 nhưng bề mặt nhẵn, đường kính 7 – 8 mm	Hình que, xếp riêng rẽ, bào tử lệch tâm	+	-
P23	KL khô, gồ ghề, vàng cam, mép răng cưa, không đều, có nhiều vòng tròn đồng tâm, đường kính 3 – 4mm	Hình cầu, xếp riêng rẽ, không hình thành bào tử	-	-
P24	KL ở giữa trắng kem, xung quanh trắng trong, mép gợn sóng, bám chặt vào bề mặt thạch, đường kính 3–4mm	Hình que, xếp thành chuỗi, bào tử hình trứng, ngay tâm	+	-
P25	KL màu trắng kem, hình trứng, mịn, mép răng cưa, bề mặt nhẵn, có vòng mờ xung quanh KL, đường kính 5 – 6mm	Hình que, xếp riêng rẽ hay thành chuỗi	+	-
P26	Tương tự KL chủng P16 nhưng viền tròn, bề mặt nhẵn, đường kính 8 – 10mm	Hình que, bào tử chính tâm	+	-
P27	KL có hình giống chiếc tất, bề mặt ướt, màu trắng kem, viền hơi mờ, bám vào mặt thạch, đường kính khoảng 10mm	Hình que, xếp riêng rẽ, bào tử lệch tâm	+	-
P28	Tương tự KL chủng P3 nhưng viền tròn hơn, màu trắng sữa, đường kính 5 – 6mm	Hình que, hai đầu hơi tù, bào tử hình bầu dục, chính tâm	+	+

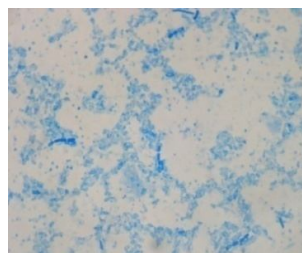
Ghi chú: + (kết quả dương tính); - (kết quả âm tính).

Kết quả cho thấy trong số 28 chủng VK phân lập có:

- 20/28 chủng thuộc chi *Bacillus* (TB có dạng que, hình thành bào tử).
- 4/20 chủng quan sát thấy có sự hiện diện của tinh thể độc. (P3, P14, P19, P28)



(a)

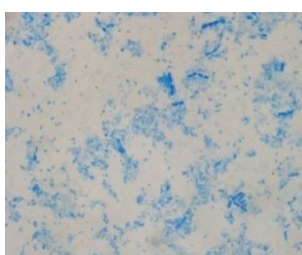


(b)

Hình 1. Hình thái KL (a) và hình thái TB (b) của chủng P3 (x100)



(a)

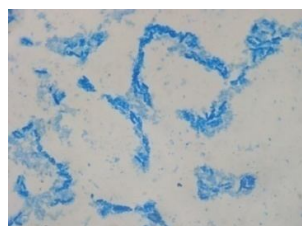


(b)

Hình 2. Hình thái KL (a) và hình thái TB (b) của chủng P14 (x100)



(a)

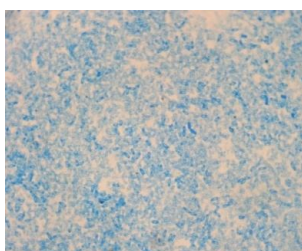


(b)

Hình 3. Hình thái KL (a) và hình thái TB (b) của chủng P19 (x100)



(a)



(b)

Hình 4. Hình thái KL (a) và hình thái TB (b) của chủng P28 (x100)

3.2. Thử nghiệm hoạt tính diệt sâu của các chủng VK có tinh thể độc

Để thử hoạt tính diệt sâu của các chủng VK phân lập được, chúng tôi tiến hành nuôi cấy 4 chủng VK (P3, P14, P19, P28) trên môi trường H de Barjac ở 30°C, lắc 220 vòng/phút trong 40h. Sau đó, tiến hành xác định số lượng bào tử, tinh thể và thử hoạt tính trên sâu tơ (*Plutella xylostella*).

3.2.1. Kết quả xác định số lượng bào tử

Để xác định số lượng bào tử chúng tôi tiến hành xử lí 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 ấm ở 28°C trong 24h rồi đếm số lượng khuẩn lạc mọc trên mỗi đĩa. Kết quả được thể hiện ở Bảng 3.2.

Bảng 3.2. Số lượng bào tử /ml dịch lên men

Kí hiệu chủng	Số lượng bào tử ($\times 10^9$) /ml dịch lên men
P3	1,98 ^a ± 0,07
P14	2,21^b ± 0,06
P19	1,52 ^c ± 0,10
P28	1,70 ^d ± 0,14

(a,b,c,d: chỉ sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê)

Kết quả cho thấy, trong 4 chủng VK nghiên cứu, chủng P14 có tốc độ sinh trưởng nhanh nên cho số lượng bào tử và tinh thể cao nhất so với các chủng còn lại. Do mỗi tế bào của các chủng VK khi bị phá vỡ giải phóng ra một bào tử và một tinh thể độc. 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 VK đang sử dụng.

3.2.2. Kết quả hoạt lực diệt sâu

Để tiến hành thử nghiệm hoạt lực diệt sâu, chúng tôi tiến hành pha loãng dịch lên men của 4 chủng (P3, P14, P19, P28) đạt đến nồng độ 10^9 bào tử/ml. Thí nghiệm thử hoạt lực diệt sâu được bố trí trong các đĩa Petri, mỗi đĩa 10 con sâu (trung đối đồng đều về kích thước, tuổi). Kết quả xác định hoạt lực diệt sâu ở các thời điểm sau 24h, 48h và 72h (tính theo công thức Abbott) được trình bày ở Bảng 3.3.

Bảng 3.3. Hoạt lực diệt sâu của các chủng VK nghiên cứu

Kí hiệu chủng	Tỉ lệ sâu chết (%)		
	24h	48h	72h
P3	36,67	74,81	95,23
P14	53,33	78,88	100
P19	3,33	13,33	38,69
P28	26,67	57,03	77,38

Kết quả cho thấy, cả 4 chủng VK nghiên cứu đều có hoạt lực diệt sâu. Trong đó:

- Chủng P19 có hoạt lực diệt sâu yếu hơn ba chủng còn lại: ở 24h (3,33%); 48h (13,33%); 72h (38,69%).
- Chủng P3 và P28 có hoạt lực diệt sâu cao hơn P19 nhưng yếu hơn so với chủng P14:
 - + P3: 24h (36,67%), 48h (74,81%), 72h (95,23%).
 - + P28: 24h (26,67%), 48h (57,03%), 72h (77,38%).
- Chủng P14 có hoạt lực diệt sâu mạnh nhất trong 4 chủng: 24h (53,33%), 48h (78,88%), 72h (100%).
- Sự khác biệt giữa các chủng có ý nghĩa về mặt thống kê. Vì vậy, chúng tôi quyết định chọn chủng P14 để tiến hành định danh đến loài bằng sinh học phân tử.



Hình 5. Hoạt lực diệt sâu của chủng P14 sau 24h



Hình 6. Hoạt lực diệt sâu của chủng P14 sau 48h



Hình 7. Hoạt lực diệt sâu của chủng P14 sau 72h

3.3. Định danh bằng sinh học phân tử chủng P14

Để định danh, chúng tôi gửi chủng P14 đến Công ti Xét nghiệm Nam khoa giải trình tự gen 16S rRNA, kết quả như sau:

```
TCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTC
GAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAG
TAACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGG
CTAATACCGGATGCTTGTGTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCT
TCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGT
AATGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGC
CACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGG
GAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGA
TGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGT
TCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACT
ACGTGCCAGCA
```

So sánh với ngân hàng gen NCBI, trình tự gen 16S rRNA của chủng P14 có độ tương đồng 99% với loài *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. Kết luận chủng P14 thuộc loài *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*.

4. Kết luận

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

- Đã phân lập được 20 chủng VK Bacillus từ đất RNM Cần Giờ, trong đó tuyển chọn được 4 chủng có sự hiện diện của tinh thể độc.
- Đã chọn được chủng P14 dựa trên khả năng hình thành bào tử, tinh thể độc và hoạt tính diệt sâu cao nhất.
- Kết quả định danh chủng VK P14 bằng việc giải trình tự gen 16S rRNA cho thấy chủng này thuộc loài *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*.

5. Kiến nghị

Tiếp tục khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và sinh độc tố của chủng *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*, tiến tới tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy, nhằm tăng hoạt lực diệt sâu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Thị Thanh Hạnh, Lê Thị Minh Thành, Ngô Đình Bính, Dương Văn Hợp (2008), “Nghiên cứu sự phân bố và một số đặc điểm sinh học của chủng *B. thuringiensis* phân lập tại Vườn Quốc gia Cát Bà”, *Tạp chí Sinh học*, 30(2), tr.129 - 135.
2. Bùi Thị Hương, Đỗ Thị Ngọc Huyền, Nguyễn Tuấn, Nguyễn Thùy Châu, Đinh Duy Kháng (2005), *Phân lập các chủng B. thuringiensis var kurstaki ở Việt Nam*, Hà Nội.
3. Võ Minh Phát (2010), *Sản xuất thuốc trừ sâu B. thuringiensis bằng bùn thải*, Luận văn Thạc sĩ Công nghệ Sinh học, Đại học Bách Khoa TPHCM.
4. Phạm Văn Ty, Vũ Nguyên Thành (2007), *Giáo trình Công nghệ sinh học*, (5), Nxb Giáo dục.
5. Bajac D. & E. Frachon (1990), “Classification of *Bacillus thuringiensis* strains” *Entomophaga*, Vol. 35(2), pp.233-240.
6. Maher Obeidat, Dhia Hassawi, Ihab Ghabeish (2004), “Characterization of *Bacillus thuringiensis* strains from Jordan and their toxicity to the Lepidoptera, *Ephesia kuehniella* Zeller”, *African Journal of Biotechnology*, Vol. 3(11), pp.622-226.
7. 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*, Vol. 4 (12), pp.1224 - 1229.
8. Shahram Aramideh, Mohammad Hassan Saferalizadeh, Ali Asghar Pourmirza, Mahmud Rezazadeh Bari, Mansureh Keshavarzi and Mahdi Mohseniazar (2010), “Isolation and identification native *Bacillus thuringiensis* in different habitat from west azerbaijan and evaluate effects on indian moth plodia interpunctella (hubner) (lepidoptera: pyralidae)”, *Mun. Ent. Zool*, Vol. 5, pp.1034-1037.

(Ngày Tòa soạn nhận được bài: 26-8-2013; ngày phản biện đánh giá: 23-9-2013;

ngày chấp nhận đăng: 16-10-2013)