

## SÀNG LỌC VÀ TUYỂN CHỌN XẠ KHUẨN SINH TỔNG HỢP CHITINASE ĐƯỢC PHÂN LẬP TỪ ĐẤT Ở VƯỜN QUỐC GIA YOK ĐÔN

Đỗ Thị Tú Oanh<sup>1</sup>, Huỳnh Nguyễn Tô Uyên<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Huyền<sup>1</sup>, Trần Minh Định<sup>1</sup>

Ngày nhận bài: 22/11/2022; Ngày phản biện thông qua: 13/12/2022; Ngày duyệt đăng: 31/03/2023

### TÓM TẮT

Để phát triển tác nhân sinh học mới cho canh tác nông nghiệp, chúng tôi tập trung vào xạ khuẩn có nguồn gốc ở các vườn quốc gia, khu bảo tồn thiên nhiên có khả năng tổng hợp chitinase. Trong nghiên cứu này, từ 20 mẫu đất thu nhận ở vườn quốc gia Yok Đôn, 13 chủng xạ khuẩn có hoạt độ chitinase cao nhất đã được tuyển chọn từ 48 chủng sinh chitinase đã được phân lập với hoạt độ chitinase 0,781-3,836 (U/mg protein). Protein thô chứa chitinase thu nhận được từ quá trình nuôi cấy của 13 chủng trên đều có khả năng ức chế nảy mầm của bào tử nấm *Phytophthora* sp. và *Fusarium* sp. trong điều kiện *in vitro*. Trong số 13 chủng xạ khuẩn tiềm năng, hai xạ khuẩn đã được định danh là *Streptomyces cellostaticus* AYS-17 và *Streptomyces triostinicus* AYS-22. Nghiên cứu này cho thấy tiềm năng ứng dụng xạ khuẩn sinh chitinase trong đối kháng nấm gây bệnh cây trồng và an toàn với sức khỏe con người.

**Từ khóa:** Chitinase, hoạt tính kháng nấm, *Streptomyces*.

### 1. MỞ ĐẦU

Chitinase (EC 3.2.1.14) là một nhóm các enzyme phân hủy chitin thành các N-acetylglucosamine, chitobiose hay chitotriose bằng cách thủy phân liên kết  $\beta$ -1,4-glycosidic (Bhattacharya et al., 2007). Rất nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng các chitinase ở vi sinh vật đóng vai trò quan trọng trong việc ức chế sinh trưởng của rất nhiều loài nấm hại cây trồng thông qua cơ chế phân hủy chitin ở thành tế bào nấm (Chernin et al., 1997). Chitinase A và chitinase B của *S. albocinaceus* S-22 có khả năng phân hủy thành tế bào nấm (Bhattacharya et al., 2007), enzyme chitinase A tái tổ hợp tinh sạch có khả năng ức chế sự nảy mầm của bào tử nấm *Fusarium falciforme* (Tran et al., 2022b). Theo nghiên cứu của Yuan và cộng sự (1995), *Streptomyces lydicus* WYEC108 có khả năng phá hủy các bào tử nấm của *Pythium* và phá hủy thành tế bào của sợi nấm (Yuan et al., 1995).

Cho đến nay Việt Nam vẫn là quốc gia sản xuất và xuất khẩu hồ tiêu số một thế giới. Năm 2022, Việt Nam xuất khẩu ước đạt 220.000 tấn, chiếm 55% tổng sản lượng hồ tiêu trên toàn thế giới (Vietnamplus, 2022). Tuy nhiên, người trồng tiêu đang phải đối mặt với dịch bệnh do nấm *Phytophthora* sp. và *Fusarium* sp., là nguyên nhân ảnh hưởng đến năng suất và chất lượng hồ tiêu xuất khẩu, dẫn đến những thiệt hại kinh tế nghiêm trọng. Để kiểm soát các bệnh này, việc dùng các loại thuốc có nguồn gốc hóa học thường xuyên và lâu dài vừa giảm hiệu quả, ảnh hưởng xấu đến chất lượng tiêu xuất khẩu và đặc biệt là gây ô nhiễm môi trường. Gần đây nghiên cứu sử dụng vi sinh vật để tạo ra chế phẩm sinh học đã góp phần quan

trọng trong việc điều trị nấm bệnh đồng thời không gây tác hại tới môi trường (Lê Minh Tường và Ngô Thị Kim Ngân, 2014). Trong đó, một số xạ khuẩn có khả năng sinh tổng hợp các hợp chất kháng nấm, như chitinase (Phạm Hồng Hiền và cs, 2019). Do vậy, xạ khuẩn sở hữu chitinase có tiềm năng ứng dụng thay thế thuốc hóa học trong việc bảo vệ cây trồng.

Vườn quốc gia (VQG) Yok Đôn, tỉnh Đắk Lắk là khu vực duy nhất ở Việt Nam có hệ sinh thái rừng khộp, với hệ động vật và thực vật phong phú, có đa dạng sinh học cao. Khi phân tích dữ liệu về hệ vi sinh vật trong đất tại VQG Yok Đôn bằng phương pháp giải trình tự 16S rRNA metagenomics, kết quả cho thấy, xạ khuẩn Actinobacteriota rất phong phú và đa dạng chiếm 20,28% tổng số vi sinh vật đất (Tran et al., 2022a). Trong nước cũng như thế giới đã có nhiều công trình nghiên cứu về chitinase. Tuy nhiên, chưa có nghiên cứu về phân lập và sàng lọc các chủng xạ khuẩn để thu nhận chitinase ở khu vực VQG Yok Đôn. Để góp phần tham gia vào việc nghiên cứu chitinase từ xạ khuẩn, chúng tôi thực hiện nghiên cứu này nhằm sàng lọc và định danh được một số xạ khuẩn sinh chitinase cao ứng dụng cho canh tác nông nghiệp ở Tây Nguyên.

### 2. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 2.1. Nội dung nghiên cứu

- Thu thập mẫu đất, phân lập và sàng lọc xạ khuẩn có khả năng tổng hợp chitinase.
- Xác định hoạt độ chitinase của xạ khuẩn.
- Ảnh hưởng của protein thô chứa chitinase từ xạ khuẩn đến sự phát triển của bào tử nấm.

<sup>1</sup>Viện Công nghệ Sinh học và Môi trường, Trường Đại học Tây Nguyên;

Tác giả liên hệ: Đỗ Thị Tú Oanh; ĐT: 0962566389; Email: dttoanh@ttn.edu.vn.

- Định danh và phân tích phát sinh loài của các chủng xạ khuẩn tiềm năng.

## 2.2. Phương pháp

### 2.2.1. Thu mẫu và phân lập xạ khuẩn có khả năng tổng hợp chitinase dựa vào phương pháp đĩa thạch

Mẫu đất được thu thập tại các vị trí khác nhau ở vườn quốc gia Yok Đôn, dưới tán rừng, đất ẩm, độ sâu 0 - 20 cm, theo nguyên tắc 5 điểm và khối lượng của mỗi mẫu là 300 - 400 g. Mẫu đất sau đó được pha loãng trong nước muối sinh lý và trải trên môi trường thạch Gause cải tiến (nguồn carbon là huyền phù chitin 0,2%) trong 5 - 10 ngày (Nguyễn Thị Diệu Hạnh và cs, 2021). Các chủng có khuẩn lạc phát triển nhanh và tạo vòng phân giải huyền phù chitin lớn được lựa chọn để đánh giá hoạt độ chitinase trong môi trường lỏng. Xạ khuẩn được quan sát, nhận diện và làm thuần trên môi trường Gause I (nguồn carbon là tinh bột).

### 2.2.2. Xác định hoạt độ chitinase của xạ khuẩn

Xạ khuẩn được nuôi trong ống nghiệm chứa 5 mL môi trường tổng hợp lỏng (5 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,85 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,15 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,3 g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,1 g NaCl; 0,1 g CaCl<sub>2</sub>; nước cất đủ 1000 ml; pH 6,1 có bổ sung 0,2% huyền phù chitin) trong 5 ngày (30°C, 150 vòng/phút). Sau đó, dịch nuôi cấy được ly tâm (13.000 vòng/phút, trong 5 phút, ở 4°C) loại bỏ sinh khối vi khuẩn, phần dịch nổi phía trên sẽ được thu nhận và thẩm tách qua đêm trong đệm phosphate 20mM (pH 6.0) ở 4°C.

Hoạt tính chitinase theo phương pháp Shales cải tiến được mô tả theo nghiên cứu của Trần Minh Định và cs.. Nguyên tắc: Hoạt độ chitinase được xác định dựa vào lượng đường khử N-acetyl-β-D-Glucosamine sinh ra trong phản ứng thủy phân. Khi cho chitinase tác dụng với cơ chất là huyền phù chitin, N-acetyl-β-D-Glucosamine sinh ra được định lượng qua phản ứng với thuốc thử Schale. Hoạt tính chitinase được thực hiện trong 600 μL hỗn hợp phản ứng có chứa 0,1% huyền phù chitin, enzyme thô, 20 mM đệm phosphate (pH6). Hỗn hợp phản ứng được ủ trong 15 phút ở 37°C. Hàm lượng đường khử sinh ra được xác định bằng phương pháp Schales cải tiến với N-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) được dùng để dựng đường chuẩn (Tran et al., 2018). Một đơn vị hoạt tính chitinase được xác định là lượng enzyme cần thiết để giải phóng 1 μmol N-acetyl D-glucosamine trong thời gian 1 phút ở 37°C, pH 6. Nồng độ protein được xác định theo phương pháp Bradford (Tran et al., 2018).

Chủng xạ khuẩn có hoạt độ chitinase cao được lựa chọn cho các thí nghiệm tiếp theo.

### 2.2.3. Ảnh hưởng của protein thô chứa chitinase đến sự phát triển của bào tử nấm

Các chủng nấm sử dụng trong thí nghiệm gồm *Fusarium* sp. và *Phytophthora* sp. được phân lập từ đất, rễ cây hồ tiêu và lưu giữ tại Viện Công nghệ Sinh học và Môi trường, Trường Đại học Tây Nguyên.

**Thu nhận protein thô chứa chitinase:** Xạ khuẩn được nuôi trong môi trường tổng hợp lỏng (5 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,85 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,15 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,3 g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,1 g NaCl; 0,1 g CaCl<sub>2</sub>; có bổ sung 0,2% huyền phù chitin; nước cất đủ 1000 ml; pH 6,1) trong 5 ngày (30°C, 150 vòng/phút). Sau đó, dịch nuôi cấy được ly tâm để phân tách tế bào, loại bỏ sinh khối thu dịch nổi. Protein thô được thu nhận bằng phương pháp tủa với muối (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> độ bão hòa 80%. Sau đó dung dịch tủa được ly tâm (10.000 vòng/phút, 10 phút, 4°C), loại bỏ dịch nổi và thu tủa. Hòa tan cặn tủa với dung dịch đệm phosphate (pH 6.0), thẩm tách qua đêm trong đệm phosphate 20 mM (pH 6.0) nhằm loại bỏ các ion kim loại và thành phần môi trường nuôi cấy (Tran et al., 2018).

Để kiểm tra khả năng ức chế của protein thô thu nhận từ xạ khuẩn với bào tử nấm *Fusarium* sp. và *Phytophthora* sp., thí nghiệm được thực hiện bằng cách ủ dịch protein thô với bào tử nấm. Một trăm microlit hỗn hợp gồm 50 μL protein thô chứa chitinase (nồng độ 50 μg protein) và 50 μL chứa khoảng 4000 bào tử nấm được ủ ở 33°C, 15 giờ. Đối chứng thay protein thô bằng 50 μL đệm phosphate 20 mM (pH 6.0). Sự nảy mầm của bào tử nấm được quan sát dưới kính hiển vi ở độ phóng đại 4000 lần. Đồng thời, sau 15 giờ, 100 μL dung dịch ủ được cấy vào giếng trên môi trường PDA đã được đục lỗ (9mm) (Tran et al., 2022b). Sau 4 ngày nuôi cấy, hoạt tính kháng nấm được tính theo công thức:

$$\text{Hiệu lực ức chế (\%)} = \frac{C - T}{C} \times 100$$

C: đường kính của tán nấm trên môi trường trong đĩa đối chứng (mm)

T: đường kính của tán nấm trong đĩa có bào tử nấm được ủ với enzyme (mm)

### 2.2.4. Định danh chủng xạ khuẩn tiềm năng

Trình tự nucleotide của gene 16S rRNA được khuếch đại bằng PCR với cặp mồi 27f-YM 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' và 1492r 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3' và *Taq* DNA polymerase. Sản phẩm PCR được phân tách bằng điện di trong gel Agarose 1% và Band mục tiêu được cắt ra và tinh sạch bằng Wizard SV Gel and Clean-Up (Promega Co., USA). Các trình tự nucleotide sau đó được so sánh với các trình tự nucleotide của gen 16S rRNA của các xạ khuẩn đã biết trên các ngân hàng gene DDBJ/Genbank/

EMBL thông qua chương trình BLAST. Cây phân loại (phylogenetic tree) dựa vào trình tự 16S rDNA được phân tích và xây dựng qua phần mềm MEGA 7.0 theo phương pháp neighbor-joining, Kimura two-parameter với chỉ số bootstrap là 1000 lần (Tran et al., 2018).

2.2.5. Phương pháp xử lý số liệu

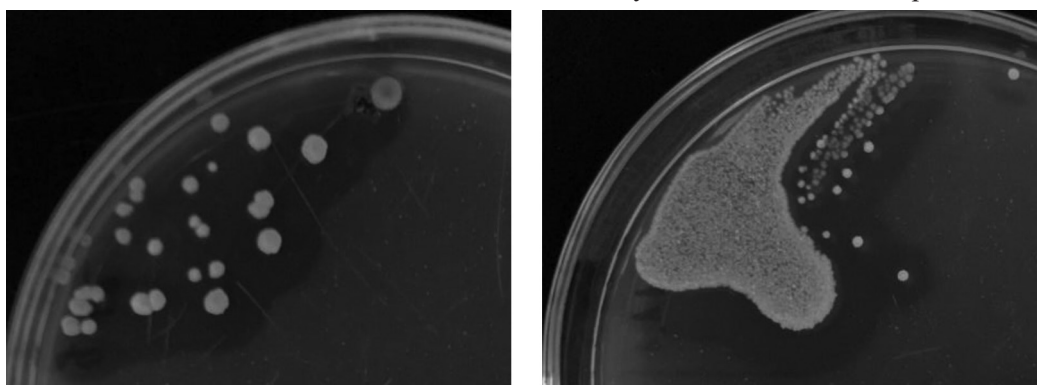
Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần, số liệu được phân tích ANOVA (Duncan’ test  $p < 0,05$ ) bằng phần mềm xử lý thống kê SPSS phiên bản 22.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập và sàng lọc xạ khuẩn có khả năng tổng hợp chitinase

Phân lập các chủng vi khuẩn có khả năng tổng hợp chitinase

Từ các mẫu đất thu thập tại vườn quốc gia Yok Đôn, tiến hành phân lập trên môi trường Gause-chitin sau 5 - 10 ngày nuôi cấy. Các chủng xạ khuẩn phân lập hình thành vòng phân giải huyền phù chitin trên các đĩa thạch được quan sát cẩn thận (Hình 1). Trong quá trình phân lập, dựa vào hình thái, kích thước vòng phân giải, kết quả thu nhận được 48 chủng khác nhau có vòng phân giải chitin và được đặt tên theo thứ tự AYS-1 đến AYS-48 (AYS là ký hiệu viết tắt của Actinomycetes, Yok Đôn, Soil). Xạ khuẩn được lựa chọn được tiến hành cấy ria làm thuần và bảo quản.



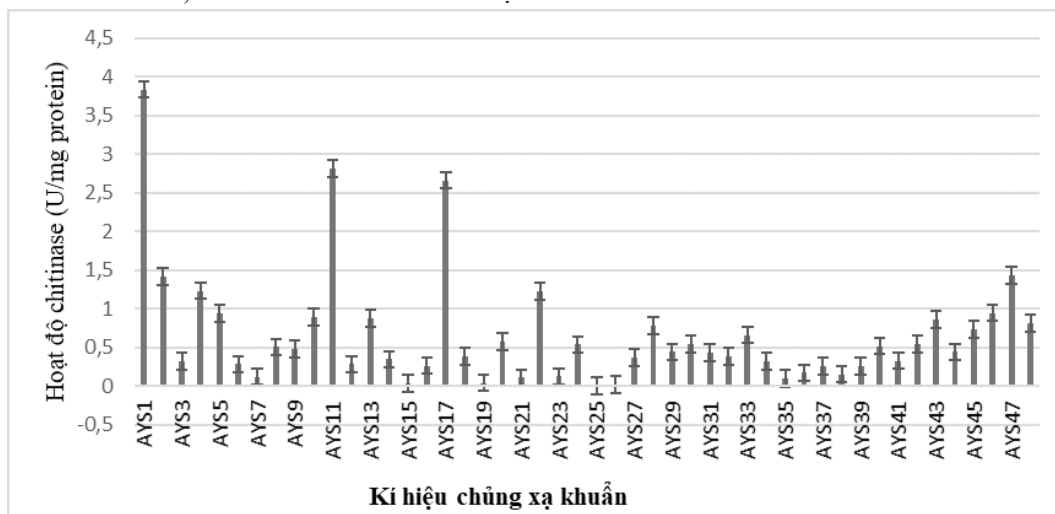
Hình 3.1. Xạ khuẩn sinh chitinase hình thành vòng phân giải trên môi trường Gause – chitin

Hoạt độ chitinase của các chủng xạ khuẩn phân lập

Bốn mươi tám chủng xạ khuẩn được nuôi cấy trên môi trường tổng hợp lỏng bổ sung 0,2% huyền phù chitin. Tiến hành loại bỏ sinh khối, thu nhận dịch nuôi cấy và thẩm tách. Dung dịch sau thẩm tách được sử dụng để xác định chitinase và nồng độ protein. Kết quả hoạt độ chitinase được thể hiện qua biểu đồ 3.1.

Ba chủng xạ khuẩn sinh tổng hợp chitinase có hoạt tính tốt nhất là AYS-1, AYS-11 và AYS-17 với hoạt

độ chitinase lần lượt đạt 3,836524 (U/mg protein); 2,816201 (U/mg protein) và 2,661916 (U/mg protein). Tiếp theo là chủng AYS-47, AYS-4, AYS-22 với hoạt độ chitinase lần lượt là 1,428 (U/mg protein) và 1,417 (U/mg protein) và 1,226 (U/mg protein). Các chủng xạ khuẩn AYS-46, AYS-5, AYS-10, AYS-13, AYS-43, AYS-48, AYS-28 có hoạt tính không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (ANOVA,  $n=3$ , độ tin cậy 95%).



Biểu đồ 3.1. Hoạt độ chitinase của các chủng xạ khuẩn phân lập tại VQG Yok Đôn

Ghi chú: 1 đơn vị hoạt tính enzyme là khả năng phân giải tạo ra 1 μmol – GlcNAc trong khoảng thời gian 1 phút.

Chủng AYS-2, AYS-45, AYS-47 có hoạt độ chitinase cao nhưng kích thước khuẩn lạc nhỏ và tốc độ phát triển của khuẩn lạc chậm nên không được lựa chọn cho các thí nghiệm tiếp theo. Từ kết quả đánh giá hoạt độ chitinase, với hoạt độ chitinase 0,781-3,836 (U/mg protein) mười ba chủng vi khuẩn tiềm năng đã được lựa chọn cho các thí nghiệm kế tiếp, gồm các chủng AYS-1, AYS-4, AYS-5, AYS-10, AYS-11, AYS-13, AYS-17, AYS-22, AYS-28, AYS-33, AYS-43, AYS-46, AYS-48.

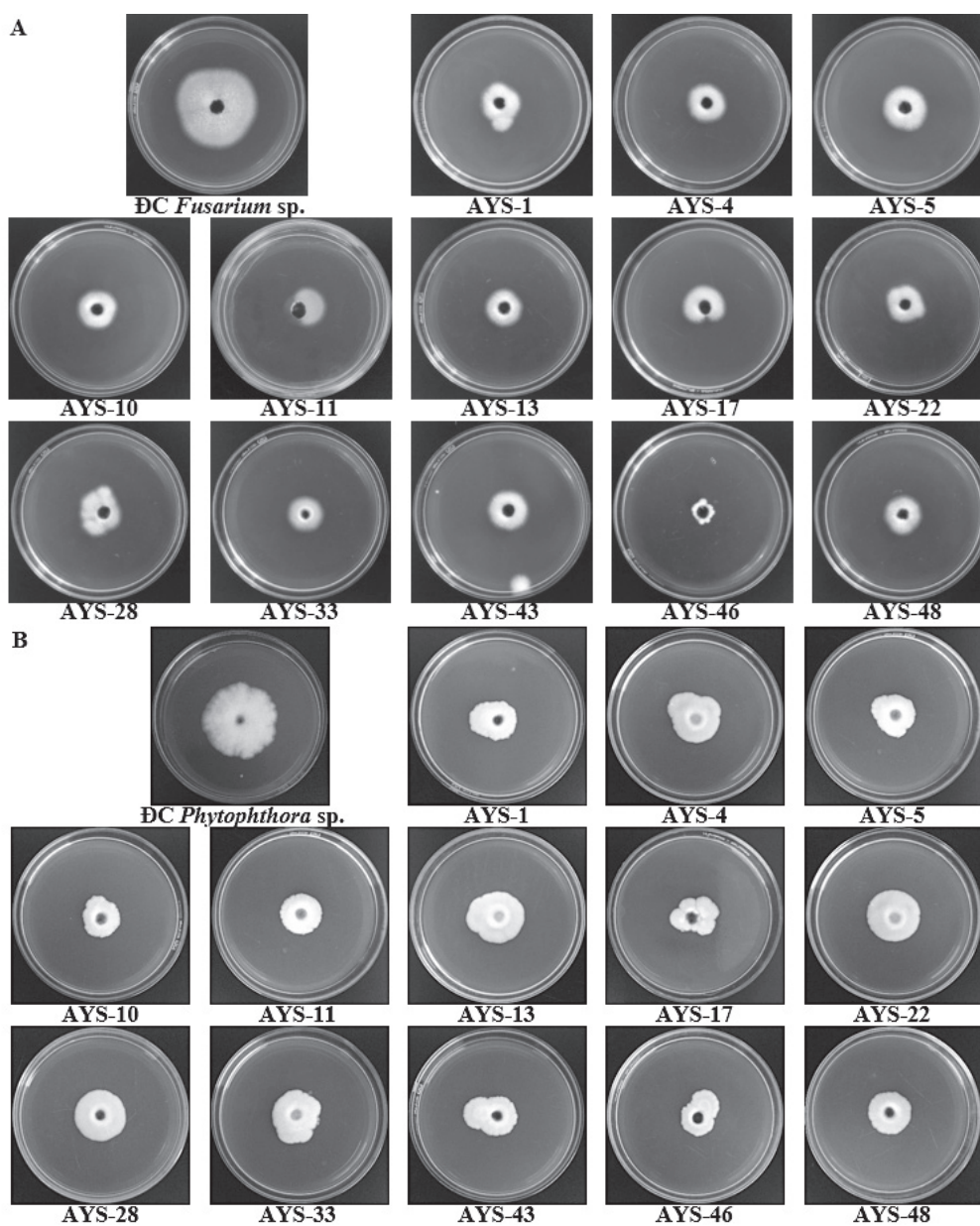
**3.2. Ảnh hưởng của protein thô chứa chitinase đến phát triển của bào tử nấm**

Để kiểm tra ảnh hưởng của protein thô chứa chitinase từ xạ khuẩn đến sự phát triển của bào tử nấm, thí nghiệm được thực hiện bằng cách ủ protein thô protein thô cùng với bào tử nấm, 2 chủng nấm

được lựa chọn là *Fusarium sp.* và *Phytophthora sp.*

Đối với nấm *Fusarium sp.* với đường kính tán nấm đối chứng là 48 mm, đường kính tán nấm công thức (ủ bào tử nấm với enzyme) là 14 - 26,3 mm hiệu lực ức chế đạt 45 - 70% (hình 3.2A). Trong đó, chitinase từ chủng 2 chủng AYS-46 và AYS-43 có hiệu lực ức chế mạnh nhất, lần lượt là 70% và 66%, chitinase thu nhận từ các chủng còn lại đều có hiệu lực ức chế nấm nhưng không có sự khác biệt đáng kể.

Đường kính nấm *Phytophthora sp.* ở đĩa đối chứng đạt 44 mm, đường kính nấm công thức là 21,3 - 30,3 mm, hiệu lực ức chế nấm đạt 31 - 51,5% (hình 3.2B). Trong đó, 3 chủng AYS-46, AYS-10 và AYS-1 có hiệu lực ức chế cao nhất, lần lượt là 51,5%; 49,2% và 48,4%.



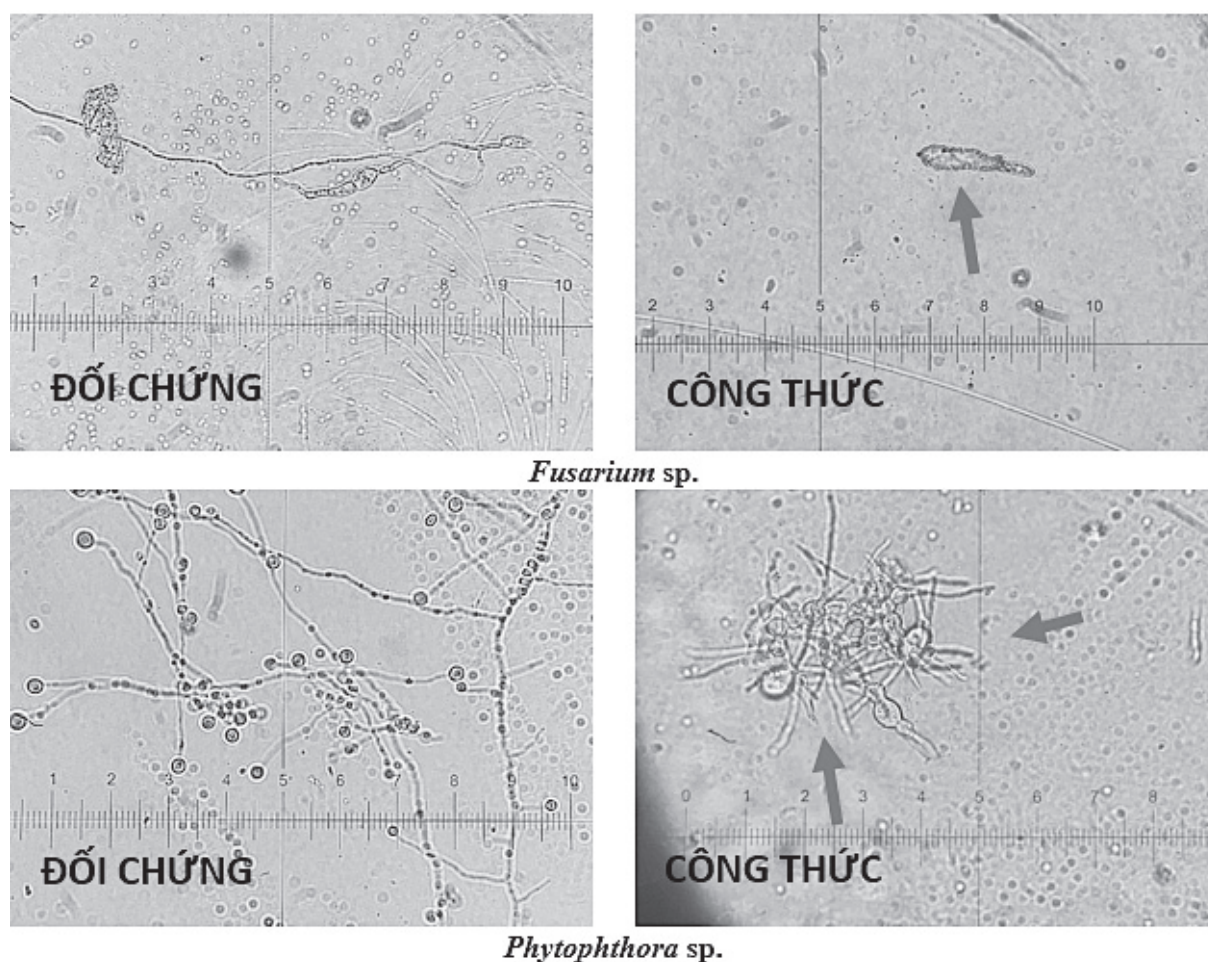
**Hình 3.2. Khả năng ức chế sự phát triển của bào tử của nấm bằng protein thô (A) *Fusarium sp.* (B) *Phytophthora sp.***

Đồng thời, quan sát bào tử nấm dưới kính hiển vi sau 15 giờ ủ với protein đều cho thấy sự khác biệt giữa công thức và đối chứng (Hình 3.2). Bào tử *Fusarium sp.* và *Phytophthora sp.* ở đối chứng có hiện tượng nảy mầm, hình thành hệ sợi, phát triển nhanh, dễ dàng quan sát sợi nấm và bào tử dưới kính hiển vi. Trong khi đó ở tất cả các công thức bào tử nấm ủ với protein thô thu nhận từ xạ khuẩn, quan sát bào tử cho thấy bào tử vỡ tan, đầu sợi nấm bị chai không phát triển, vách tế bào bị vỡ, sợi nấm có hiện tượng bị nát do tác động phân hủy của enzyme chitinase.

Kết quả khả năng đối kháng trên các loại nấm cho thấy, protein thô chứa chitinase của 13 chủng xạ khuẩn đều có khả năng ức chế nảy mầm bào tử

nấm *Fusarium sp.* và *Phytophthora sp.*

Như vậy, kết quả trên chứng minh protein thô chứa chitinase của 13 chủng xạ khuẩn có khả năng phân hủy vách bào tử nấm làm mất khả năng nảy mầm của bào tử trên cả hai loại nấm được thử nghiệm, phá hủy cấu trúc hệ sợi của nấm. Do đó, protein thô chứa chitinase có tiềm năng trở thành chất kháng nấm gây bệnh ở cây trồng một cách hiệu quả. Cơ chế ức chế sự phát triển của nấm là do sự thủy phân các chuỗi chitin bởi chitinase, làm thành tế bào mỏng hơn và vỡ nguyên sinh chất. Đồng thời, chitin mới được tổng hợp cũng có thể bị phân hủy bởi chitinase, dẫn đến ức chế sự kéo dài và phát triển của sợi nấm (Lu et al., 2018).



Ghi chú: Các mũi tên chỉ ra sự phân hủy của sợi nấm dưới tác dụng của protein.

Hình 3.3. Bào tử nấm *Fusarium sp.* và *Phytophthora sp.* được quan sát dưới kính hiển vi.

Ngoài ra, các nghiên cứu trước đây chỉ ra rằng, chitinase thô được sản xuất từ xạ khuẩn *Streptomyces sporovirgulis* có khả năng ức chế kháng lại sự phát triển của nấm *Alternaria alternata* (phân lập từ su hào), *Fusarium oxysporum* (phân lập từ khoai tây), *Fusarium solani* (phân lập từ mùi tây) và *Botrytis cinerea* (phân lập từ cà chua) (Swiontek Brzezinska et al., 2013). rBvChiA và

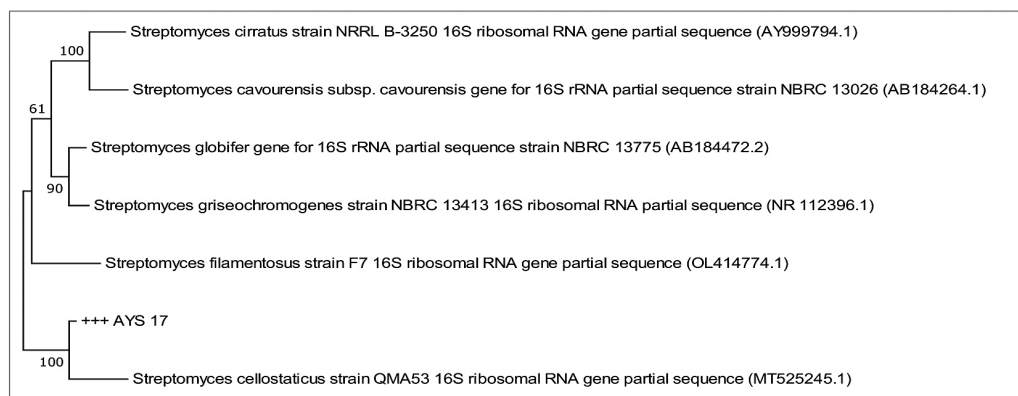
rBvChiB ức chế có khả năng ức chế sự nảy mầm của bào tử *Fusarium falciforme*, đồng rBvChiA ức chế 37,8% sinh trưởng của nấm *Fusarium* trên môi trường PDA (Tran et al., 2022b). *Streptomyces* đã được nghiên cứu về khả năng ứng dụng kiểm soát bệnh khô vằn do *Rhizoctonia solani* trên cây lúa và được sử dụng làm tác nhân kiểm soát sinh học hoặc phân bón sinh học (Yang et al., 2021).

### 3.3. Định danh xạ khuẩn tiềm năng

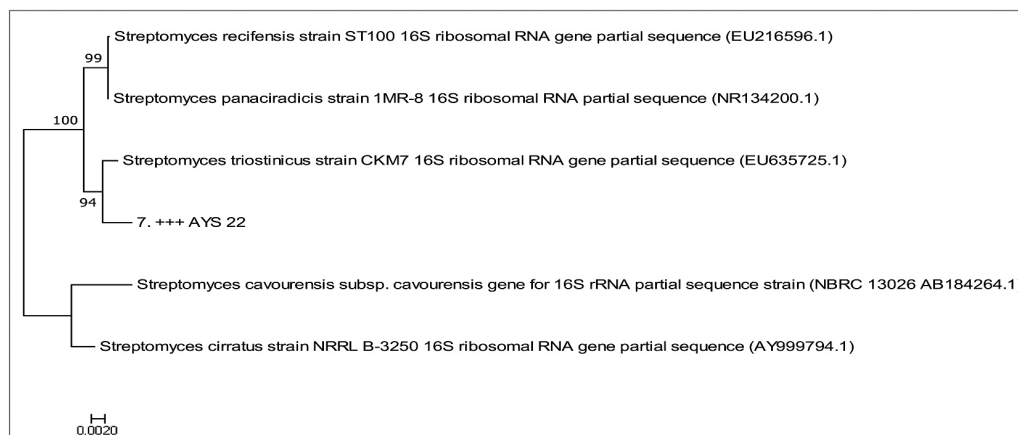
Trình tự nucleotide của gen 16S rRNA của xạ khuẩn AYS-17 (1397 bp) và AYS-22 (1398 bp) được kiểm tra và so sánh với ngân hàng dữ liệu trên cơ sở dữ liệu NCBI/DDBJ/EMBL. Kết quả cho thấy, trình tự gen 16S rRNA của chủng AYS-17 tương đồng 100% với trình tự gen 16S

rRNA của *Streptomyces cellostaticus* và trình tự gen 16S rRNA của chủng AYS-22 tương đồng 99% với trình tự gen 16S rRNA của *Streptomyces triostinicus* CKM7. Phân tích cây phát sinh loài (Hình 3.3) cũng cho thấy, chủng AYS-17 được định danh là *S. cellostaticus* và AYS-22 được định danh là *S. triostinicus*.

A



B



Ghi chú: +++ là xạ khuẩn được giải trình tự.

**Hình 3.4.** Cây phát sinh loài của chủng AYS-17 (A) và AYS-22 (B) với các loài xạ khuẩn đã công bố dựa vào trình tự gen 16S rRNA

### 4. KẾT LUẬN

Đã tuyển chọn được 13 chủng xạ khuẩn sinh tổng hợp chitinase có hoạt tính cao trong 48 chủng phân lập. Protein thô chứa chitinase thu nhận được từ quá trình nuôi cấy 13 chủng trên đều có khả năng ức chế sự nảy mầm của bào tử nấm *Phytophthora*

sp. và *Fusarium* sp. trong điều kiện *in vitro*. Đã định danh được 2 chủng là *Streptomyces cellostaticus* AYS-17 và *Streptomyces triostinicus* AYS-22 có khả năng sinh tổng hợp chitinase có hoạt tính kháng nấm cao để tiếp tục nghiên cứu ứng dụng.

## SCREENING AND SELECTION OF CHITINASE-PRODUCING ACTINOMYCETES ISOLATED FROM SOIL IN YOK DON NATIONAL PARK

Do Thi Tu Oanh<sup>2</sup>, Huynh Nguyen To Uyen<sup>2</sup>, Nguyen Thi Huyen<sup>2</sup>, Tran Minh Dinh<sup>2</sup>

Received Date: 22/11/2022; Revised Date: 13/12/2022; Accepted for Publication: 31/03/2023

### SUMMARY

To develop the different types of biocontrol agents for crop cultivation, we focused on actinomycetes possessing chitinase from National Parks. In this study, 13 Streptomyces strains with the highest chitinase activity was were selected from 48 chitinolytic actinomycetes isolated from the soil samples at Yok Don National ParkYok Don National Park soil samples. The crude protein containing chitinases produced by these strains inhibited the germination of spores of Phytophthora and Fusarium. Among the 13 selected strains, AYS-17 and AYS-22 were identified to belong to the genus Streptomyces cellostaticus AYS-17 and Streptomyces triostinicus AYS-22Among the 13 selected strains, AYS-17 and AYS-22 were identified to belong to the genus Streptomyces cellostaticus AYS-17 and Streptomyces triostinicus AYS-22. The crude protein-containing chitinases produced by these strains inhibited the germination of spores of Phytophthora and Fusarium. This study showed the potential of the application of applying actinomycete-produced compounds as a biocontrol agent and bio-fertilizer in the developmement of sustainable agriculture.

**Keywords:** Chitinase activity, antifungal activity, Streptomyces.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

#### Tài liệu tiếng Việt

Nguyễn Thị Diệu Hạnh, Hứa Trường Chinh , Đặng Bích Ngân, Nguyễn Thị Thanh Thúy, Nguyễn Ngọc Ân, Phạm Tấn Việt (2021). Phân lập và tuyển chọn xạ khuẩn có khả năng sinh các hợp chất có hoạt tính cao. *Journal of Science and Technology-IUH*, 53(05).

Phạm Hồng Hiền, Đào Ngô Tú Quỳnh, Nguyễn Thị Diệu Hương, Nguyễn Thị Chúc Quỳnh, Phùng Quang Tùng, Bạch Thị Điệp, Nguyễn Xuân Cảnh (2019). Tuyển chọn và nghiên cứu đặc điểm của chủng xạ khuẩn có khả năng đối kháng với nấm *Phytophthora* gây bệnh trên một số loại cây ăn quả. *Tạp chí Khoa học Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, 12, 109.

Lê Minh Tường, Ngô Thị Kim Ngân (2014). Phân lập và xác định khả năng đối kháng của các chủng xạ khuẩn đối với nấm *Rhizoctonia solani* Kuhn gây bệnh đốm vằn trên lúa. *Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Cần Thơ*, 4, 113-119.

Vietnamplus (2022). Việt Nam hiện vẫn là quốc gia sản xuất và xuất khẩu hồ tiêu lớn nhất. Trích dẫn từ: <https://www.vietnamplus.vn/viet-nam-hien-van-la-quoc-gia-san-xuat-va-xuat-khau-ho-tieu-lon-nhat/828427.vnp>. [2022/11/2022]

#### Tài liệu tiếng nước ngoài

Chernin, L. S., De La Fuente, L., Sobolev, V., Haran, S., Vorgias, C. E., Oppenheim, A. B., & Chet, I. (1997). Molecular cloning, structural analysis, and expression in *Escherichia coli* of a chitinase gene from *Enterobacter agglomerans*. *Applied and environmental microbiology*, 63(3), 834-839.

Bhattacharya, D., Nagpure, A., & Gupta, R. K. (2007). Bacterial chitinases: properties and potential. *Critical reviews in biotechnology*, 27(1), 21-28.

Lu, Y., Wang, N., He, J., Li, Y., Gao, X., Huang, L., & Yan, X. (2018). Expression and characterization of a novel chitinase with antifungal activity from a rare actinomycete, *Saccharothrix yanglingensis* Hhs. 015. *Protein Expression and Purification*, 143, 45-51.

Swiontek Brzezinska, M., Jankiewicz, U., & Lisiecki, K. (2013). Optimization of cultural conditions for the production of antifungal chitinase by *Streptomyces sporovirgulis*. *Applied biochemistry and microbiology*, 49(2), 154-159.

<sup>2</sup>Institute of Biotechnology and Environment, Tay Nguyen University;  
Corresponding author: Do Thi Tu Oanh; Tel: 0962566389; Email: dttoanh@ttn.edu.vn.

- Tran, D. M., Sugimoto, H., Nguyen, D. A., Watanabe, T., & Suzuki, K. (2018). Identification and characterization of chitinolytic bacteria isolated from a freshwater lake. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 82(2), 343-355.
- Tran, D. M., Huynh, T. U., Nguyen, T. H., Do, T. O., Tran, T. P. H., Nguyen, Q. V., & Nguyen, A. D. (2022a). Soil microbiome dataset from Yok Don national park in the Central Highlands region of Vietnam. *Data in Brief*, 40, 107798.
- Tran, D. M., Huynh, T. U., Nguyen, T. H., Do, T. O., Pentekhina, I., Nguyen, Q. V., & Nguyen, A. D. (2022b). Expression, purification, and basic properties of a novel domain structure possessing chitinase from *Escherichia coli* carrying the family 18 chitinase gene of *Bacillus velezensis* strain RB. IBE29. *Molecular Biology Reports*, 1-8.
- Yang, C. J., Huang, T. P., & Huang, J. W. (2021). Field Sanitation and Foliar Application of *Streptomyces padanus* PMS-702 for the Control of Rice Sheath Blight. *The Plant Pathology Journal*, 37(1), 57.
- Yuan, W. M., & Crawford, D. L. (1995). Characterization of *Streptomyces lydicus* WYEC108 as a potential biocontrol agent against fungal root and seed rots. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(8), 3119-3128.