

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM



ĐỖ THỊ HIỀN

**TUYỂN CHỌN MỘT SỐ CHỦNG XẠ KHUẨN
SINH KHÁNG SINH ỨC CHẾ VI KHUẨN
GRAM DƯƠNG Ở CÁC VÙNG NÚI ĐÁ VÔI
VÀ KHAI THÁC KHOÁNG SẢN
TẠI THÁI NGUYÊN**

LUẬN VĂN THẠC SĨ NGÀNH CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Thái nguyên 2019

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM



ĐỖ THỊ HIỀN

**TUYỂN CHỌN MỘT SỐ CHỦNG XẠ KHUẨN
SINH KHÁNG SINH ỨC CHẾ VI KHUẨN
GRAM DƯƠNG Ở CÁC VÙNG NÚI ĐÁ VÔI
VÀ KHAI THÁC KHOÁNG SẢN
TẠI THÁI NGUYÊN**

Chuyên ngành: Công nghệ sinh học
Mã số ngành: 8420201

LUẬN VĂN THẠC SĨ NGÀNH CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Người hướng dẫn khoa học: 1.TS. Nguyễn Xuân Vũ
2.TS. Nguyễn Mạnh Tuấn

Thái Nguyên 2019

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của riêng tôi. Các số liệu có nguồn gốc rõ ràng và tuân thủ đúng quy tắc. Kết quả trình bày trong luận văn được thu thập trong quá trình nghiên cứu là trung thực, chưa từng được ai công bố trước đây.

Thái Nguyên, tháng 3 năm 2019

Tác giả

Đỗ Thị Hiền

LỜI CẢM ƠN

Luận văn này được thực hiện tại bộ môn Công nghệ Vi sinh, Viện khoa học Sự sống, Trường Đại học Nông lâm- Đại học Thái Nguyên. Để hoàn thành được luận văn này em đã nhận được sự động viên, giúp đỡ tận tình của rất nhiều cá nhân và tập thể.

Lời đầu tiên, em xin gửi lời cảm ơn chân thành tới TS. Nguyễn Xuân Vũ và TS. Nguyễn Mạnh Tuấn, người thầy đã trực tiếp hướng dẫn em rất tận tình trong quá trình thực hiện đề tài, giúp em vượt qua khó khăn và hoàn thành tốt luận văn này.

Em xin gửi lời cảm ơn đến chị Đỗ Bích Duệ cán bộ tại bộ môn Công nghệ Vi sinh, Viện Khoa học Sự sống, Trường Đại học Nông Lâm Thái Nguyên đã nhiệt tình giúp đỡ em trong quá trình thực hiện đề tài.

Em xin gửi lời cảm ơn đến thầy Trần Văn Phùng - Viện trưởng Viện Khoa học Sự sống cùng các cán bộ nghiên cứu của viện đã tạo điều kiện cho em được thực tập và hoàn thành đề tài này.

Em xin cảm ơn các thầy cô giáo Khoa Công nghệ sinh học- Công nghệ thực phẩm, các cán bộ trong Trường ĐH Nông Lâm- ĐH Thái Nguyên đã giúp đỡ, trang bị kiến thức và tạo điều kiện cho em trong quá trình học tập.

Cuối cùng em xin cảm ơn đến gia đình, bạn bè và những người thân đã giúp đỡ động viên và tạo điều kiện cho em trong suốt quá trình học tập và thực hiện đề tài này.

Xin chân thành cảm ơn!

NHỮNG CHỮ VIẾT TẮT TRONG LUẬN VĂN

VSV	: Vi sinh vật
CKS	: Chất kháng sinh
KTCC	: Khuẩn ti cơ chất
KTKS	: Khuẩn ty khí sinh
MT	: Môi trường
DNA	: Deoxyribonucleic Acid
RNA	: Ribonucleic Acid
ISP	: International Streptomyces Project
TE	: Tris - Ethylendiamin tetracetic acid
SDS	: Sodiumdodecyl sulfat
TAE	: Tris - Acetate - Ethylendiamin tetracetic acid
PCR	: Polymerase chain reaction (phản ứng chuỗi polymerase)
MRSA	: <i>Staphylococcus aureus</i> kháng methicillin

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 3.1. Hoạt tính đối kháng vi sinh vật kiểm định của các chủng xạ khuẩn.....	25
Bảng 3.2. Đặc điểm nuôi cấy của chủng P5-1 trên các loại môi trường nuôi cấy ở 28°C sau 21 ngày	29
Bảng 3.3. Khả năng sử dụng các nguồn cacbon của chủng xạ khuẩn	31
Bảng 3.4. Khả năng sinh trưởng của xạ khuẩn ở nồng độ muối khác nhau	33
Bảng 3.5. Khả năng sinh trưởng của chủng xạ khuẩn P5-1 ở các điều kiện nhiệt độ khác nhau	33
Bảng 3.6. Khả năng sinh trưởng của xạ khuẩn ở các điều kiện pH khác nhau.....	34
Bảng 3.7. Hoạt tính kháng khuẩn của chủng P5-1 trên các môi trường lên men khác nhau.....	35
Bảng 3.8. Hoạt tính kháng khuẩn chủng P5-1 theo thời gian lên men	37
Bảng 3.9. Kết quả kiểm tra giá trị MIC	38
Bảng 3.10. Kết quả Search Blast các trình tự tương đồng gen 16S- rRNA của chủng P5-1 trên GenBank.	41

DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ

Hình 1.1. Các dạng khuẩn lạc xạ khuẩn	5
Hình 3.1. Số lượng các chủng xạ khuẩn phân lập ức chế sinh trưởng các chủng vi khuẩn kiểm định	27
Hình 3.2. Hoạt tính kháng khuẩn chủng xạ khuẩn phân lập sử dụng phương pháp cấy chấm điểm.	28
Hình 3.3. Hình thái khuẩn lạc của chủng P5-1 trên các môi trường.....	30
Hình 3.4 Xạ khuẩn sinh trưởng trên môi trường bổ sung các nguồn cacbon.	32
Hình 3.5. Khả năng sinh trưởng của chủng xạ khuẩn P5-1 ở các điều kiện nhiệt độ khác nhau	34
Hình 3.6. Hoạt tính kháng khuẩn của chủng P5-1 trên các môi trường lên men khác nhau.....	36
Hình 3.7. Hoạt tính kháng khuẩn chủng P5-1 trong môi trường Gause I theo thời gian lên men.....	37
Hình 3.8. Kháng sinh thô thu được từ dịch lên men chủng P5-1.....	38
Hình 3.9. Kết quả MIC chủng P5-1 với các chủng vi khuẩn kiểm định.....	39
Hình 3.10. Kết quả điện di DNA tổng số của chủng xạ khuẩn P5-1 trên gel agarose 1%	40
Hình 3.11. Kết quả điện di sản phẩm PCR khuếch đại gen mã hóa 16S- rRNA chủng P5-1 trên gel agarose 1%	40
Hình 3.12. Cây phân loại của chủng P5-1 và một số chủng xạ khuẩn.....	42

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN	ii
NHỮNG CHỮ VIẾT TẮT TRONG LUẬN VĂN	iii
DANH MỤC CÁC BẢNG.....	iv
DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ.....	v
MỤC LỤC.....	vi
MỞ ĐẦU	1
1. Đặt vấn đề	1
2. Mục tiêu nghiên cứu.....	2
3. Đối tượng nghiên cứu.....	3
4. Ý nghĩa khoa học và ý nghĩa thực tiễn.....	3
Chương 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU	4
1.1 Tổng quan về xạ khuẩn	4
1.1.1 Giới thiệu về xạ khuẩn	4
1.1.2. Đặc điểm sinh học của xạ khuẩn	5
1.2. Phân loại xạ khuẩn	7
1.2.1. Phân loại theo đặc điểm hình thái và tính chất nuôi cấy.....	7
1.2.2. Phân loại theo đặc điểm sinh lý, sinh hóa.....	8
1.2.3. Phân loại xạ khuẩn bằng phương pháp phân tích tự gene 16S-rRNA	8
1.3. Khả năng sinh chất kháng sinh của xạ khuẩn	9
1.3.1. Khái niệm về chất kháng sinh	9
1.3.2. Sự tạo thành chất kháng sinh từ xạ khuẩn.....	10
1.4. Tình hình nghiên cứu xạ khuẩn sinh kháng sinh.	13
1.4.1. Tình hình nghiên cứu xạ khuẩn sinh kháng sinh trên thế giới.....	13
1.4.2. Tình hình nghiên cứu xạ khuẩn sinh kháng sinh trong nước.....	14
Chương 2: NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	16
2.1. Đối tượng và phạm vi nghiên cứu.....	16
2.2. Nội dung nghiên cứu	16

2.3. Vật liệu	16
2.3.1. Nguồn xạ khuẩn	16
2.3.2. Vi sinh vật kiểm định	16
2.3.3. Môi trường phân lập và nuôi cấy	17
2.3.4. Hóa chất và thiết bị	18
2.4. Phương pháp nghiên cứu.....	18
2.4.1. Phân lập và nuôi cấy xạ khuẩn	18
2.4.2. Tuyển chọn chủng xạ khuẩn sinh kháng sinh	19
2.4.3. Nghiên cứu các đặc điểm sinh học để phân loại xạ khuẩn	19
2.4.4. Lựa chọn môi trường lên men tối ưu cho sinh tổng hợp kháng sinh cho chủng xạ khuẩn nghiên cứu.	20
2.4.5. Phương pháp lên men, tách kháng sinh thô cho chủng xạ khuẩn nghiên cứu.....	21
2.4.6. Phương pháp xác định nồng độ kháng sinh tối thiểu ức chế sinh trưởng vi khuẩn kiểm định (MIC ₉₀)	21
2.4.7. Phương pháp định danh và phân loại chủng loại	22
Chương 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	25
3.1. Kết quả phân lập và tuyển chọn các chủng xạ khuẩn sinh kháng sinh từ mẫu đất....	25
3.2. Kết quả nghiên cứu đặc điểm sinh học của chủng xạ khuẩn P5-1.....	28
3.2.1. Kết quả nghiên cứu đặc điểm hình thái của chủng xạ khuẩn P5-1.....	28
3.2.2. Kết quả nghiên cứu đặc điểm sinh lí - sinh hóa.....	31
3.3. Kết quả nghiên cứu lựa chọn môi trường lên men thích hợp cho sinh tổng hợp kháng sinh cho chủng P5-1	35
3.3.1. Kết quả lựa chọn môi trường lên men thích hợp.	35
3.3.2. Kết quả xác định thời gian lên men tối ưu.	36
3.4. Kết quả đánh giá nồng độ kháng sinh tối thiểu ức chế 90% vi khuẩn kiểm định (MIC ₉₀).....	38
3.5 Kết quả phân loại chủng xạ khuẩn P5-1 bằng phương pháp sinh học phân tử.....	39
3.5.1. Kết quả tách DNA tổng số	39
3.5.2. Kết quả nhân gene mã hóa 16S-rRNA bằng phản ứng PCR	40

3.5.3. Kết quả giải trình tự gene mã hóa 16S-rRNA.....	41
KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ.....	43
1. KẾT LUẬN.....	43
2. ĐỀ NGHỊ.....	43
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	44
PHỤ LỤC	