

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN KHOA HỌC CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT

-----o0o-----

LÊ THANH HOÀNG

**TINH SẠCH PROTEIN CÓ HOẠT TÍNH KHÁNG NẤM TỬ CHỨNG  
*Bacillus subtilis* XL62, ỨNG DỤNG THỬ NGHIỆM CHẾ PHẨM BCF  
TRÊN MÔ HÌNH *IN VITRO***

**LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC**

**Hà Nội - 2012**

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN KHOA HỌC CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT

-----o0o-----

**LÊ THANH HOÀNG**

**TINH SẠCH PROTEIN CÓ HOẠT TÍNH KHÁNG NẤM TỬ CHỨNG  
*Bacillus subtilis* XL62, ỨNG DỤNG THỬ NGHIỆM CHẾ PHẨM BCF  
TRÊN MÔ HÌNH *IN VITRO***

**Chuyên ngành:**

**Sinh học thực nghiệm**

**Mã số:**

**60 42 30**

Học viên : Lê Thanh Hoàng

Hướng dẫn khoa học: TS Đỗ Thị Tuyên

*Luận văn được thực hiện tại Phòng CNSH Enzyme, Viện CNSH*

**Hà Nội - 2012**

## LỜI CẢM ƠN

Để hoàn thành luận văn này, tôi xin bày tỏ lòng cảm ơn sâu sắc tới TS Đỗ Thị Tuyên, Phó trưởng phòng Công nghệ sinh học Enzyme, Viện Công nghệ sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã định hướng nghiên cứu, hướng dẫn, sửa luận văn và giúp đỡ tôi trong quá trình học tập và làm việc.

Tôi cũng xin chân thành cảm ơn PGS TS Quyên Đình Thi, Trưởng phòng Công nghệ sinh học Enzyme, Phó Viện trưởng Viện Công nghệ sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam, đã tạo mọi điều kiện về hóa chất, thiết bị, thời gian cho tôi thực hiện đề tài.

Tôi xin cảm ơn tập thể Phòng Công nghệ sinh học Enzyme, Viện Công nghệ sinh học đã chỉ bảo, giúp đỡ tận tình cho tôi trong quá trình thực nghiệm cũng như chia sẻ những kinh nghiệm chuyên môn.

Tôi xin cảm ơn Phòng đào tạo và các thầy cô giáo tại Cơ sở đào tạo sau đại học Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã luôn quan tâm, tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong quá trình học tập.

Cuối cùng, tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành đến gia đình, bạn bè và đồng nghiệp đã luôn giúp đỡ, tạo điều kiện, động viên tôi trong suốt thời gian học tập.

*Hà Nội, tháng 11 năm 2012*  
Học viên

Lê Thanh Hoàng

## CÁC TỪ VIẾT TẮT

AFC	Antifungal compound
APS	Ammonium persulphate
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
BCF	Biological Control Fungi
CFU	Conoly-Forming Unit
DEAE-cellulose	Dimethylaminoethyl-cellulose
ĐC	Đối chứng
<i>F. oxysporum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>
kDa	Kilo Dalton
M	Marker
MIC	Minimum inhibitory concentration
OD	Optical density
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
Pr	Protein
<i>R. solani</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>
SDS	Sodium dodecyl sulfate
TB	Trung bình
TEMED	N,N,N',N' - Tetramethyl ethylene diamine
TN	Thí nghiệm
v/v	Volume/volume
w/v	Weight/volume

## MỤC LỤC

LỜI CẢM ƠN.....	i
CÁC TỪ VIẾT TẮT .....	ii
MỤC LỤC.....	iii
DANH MỤC HÌNH.....	v
DANH MỤC BẢNG.....	vi
MỞ ĐẦU .....	1
<b>1 CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU .....</b>	<b>3</b>
1.1 Khái quát về chất đối kháng sinh trường nấm.....	3
1.2 Vai trò của vi khuẩn <i>Bacillus</i> trong kiểm soát sinh học .....	4
1.2.1 Đại cương về vi khuẩn <i>B. subtilis</i> .....	4
1.2.2 Ứng dụng của các chủng <i>Bacillus</i> trong kiểm soát sinh học.....	5
1.3 Nghiên cứu chế phẩm sinh học phòng trừ nấm bệnh trên thế giới.....	7
1.3.1 Nghiên cứu các hợp chất có hoạt tính kháng nấm .....	8
1.3.2 Sản xuất chế phẩm sinh học phòng trừ nấm.....	9
1.4 Nghiên cứu chế phẩm sinh học phòng trừ nấm bệnh ở Việt Nam .....	10
1.4.1 Nghiên cứu các biện pháp sinh học phòng trừ nấm bệnh .....	10
1.4.2 Nghiên cứu sản xuất và thương mại các chế phẩm phòng trừ nấm .....	12
<b>2 CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP.....</b>	<b>17</b>
2.1 Vật liệu và hóa chất .....	17
2.1.1 Chủng giống.....	17
2.1.2 Hóa chất.....	17
2.1.3 Các loại đệm và dung dịch .....	17
2.1.4 Môi trường .....	18
2.1.5 Thiết bị thí nghiệm.....	18
2.2 Phương pháp nghiên cứu .....	19
2.2.1 Lên men chìm nuôi cấy vi sinh vật.....	19
2.2.2 Xác định hoạt tính kháng nấm .....	19

2.2.3	<i>Xác định ảnh hưởng của dinh dưỡng và các yếu tố hóa lý</i> .....	20
2.2.4	<i>Tách chiết và tinh sạch protein có hoạt tính kháng nấm</i> .....	21
2.2.5	<i>Điện di SDS-PAGE</i> .....	22
2.2.6	<i>Xác định hàm lượng protein tổng số</i> .....	23
2.2.7	<i>Xác định tính chất protein tinh sạch</i> .....	23
<b>3</b>	<b>CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN</b> .....	<b>25</b>
3.1	Tính kháng nấm của hoạt chất ngoại bào từ <i>B. subtilis</i> XL62 .....	25
3.1.1	<i>Hoạt tính kháng nấm của dịch lọc tế bào từ B. subtilis XL62</i> .....	25
3.1.2	<i>Ảnh hưởng của thành phần môi trường nuôi cấy</i> .....	27
3.1.3	<i>Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy</i> .....	30
3.1.4	<i>Ảnh hưởng của pH nuôi cấy ban đầu</i> .....	31
3.1.5	<i>Ảnh hưởng của tốc độ lắc</i> .....	34
3.2	Tinh sạch protein có hoạt tính kháng nấm.....	35
3.2.1	<i>Tinh sạch qua sắc ký trao đổi ion DEAE-cellulose</i> .....	35
3.2.2	<i>Tinh sạch qua sắc ký lọc gel Biogel P100</i> .....	36
3.3	Đánh giá tính chất của protein tinh sạch .....	41
3.3.1	<i>Ảnh hưởng của nhiệt độ</i> .....	41
3.3.2	<i>Ảnh hưởng của proteinase K</i> .....	42
3.3.3	<i>Khả năng ức chế sợi bào tử nấm</i> .....	42
3.4	Sản xuất và thử nghiệm chế phẩm BCF .....	43
3.4.1	<i>Sản xuất chế phẩm BCF quy mô phòng thí nghiệm</i> .....	43
3.4.2	<i>Thử nghiệm chế phẩm BCF trên mô hình in vitro</i> .....	45
<b>4</b>	<b>KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ</b> .....	<b>48</b>
4.1	Kết luận.....	48
4.2	Kiến nghị .....	49
	<b>TÀI LIỆU THAM KHẢO</b> .....	<b>50</b>
	<b>PHỤ LỤC</b> .....	<b>54</b>

## DANH MỤC HÌNH

<b>Hình 1.1.</b> Hình thái khuẩn lạc chủng <i>B. subtilis</i> XL62 trên môi trường PDA.....	4
<b>Hình 2.1.</b> Quy trình tinh sạch protein kháng nấm từ chủng <i>B. subtilis</i> XL62 .....	22
<b>Hình 3.1.</b> Động thái sinh trưởng của <i>B. subtilis</i> XL62 trong các môi trường dinh dưỡng khác nhau .....	28
<b>Hình 3.2.</b> Hoạt tính ức chế sinh trưởng <i>F. oxysporum</i> của <i>B. subtilis</i> XL62 trong các môi trường khác nhau .....	29
<b>Hình 3.3.</b> Hoạt tính ức chế sinh trưởng <i>R. solani</i> của <i>B. subtilis</i> XL62 trong các môi trường khác nhau.....	29
<b>Hình 3.4.</b> Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy lên sinh trưởng của <i>B. subtilis</i> XL62.....	30
<b>Hình 3.5.</b> Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy lên hoạt tính ức chế sinh trưởng <i>F. oxysporum</i> và <i>R. solani</i> .....	31
<b>Hình 3.6.</b> Mật độ tế bào <i>B. subtilis</i> XL62 trong môi trường MT4 và MT2 với các giá trị pH ban đầu khác nhau.....	32
<b>Hình 3.7.</b> Ảnh hưởng pH môi trường ban đầu lên hoạt tính ức chế <i>F. oxysporum</i> .....	33
<b>Hình 3.8.</b> Ảnh hưởng pH môi trường ban đầu lên hoạt tính ức chế <i>R. solani</i> .....	33
<b>Hình 3.9.</b> Ảnh hưởng của tốc độ lắc lên sinh trưởng của chủng XL62.....	34
<b>Hình 3.10.</b> Ảnh hưởng của tốc độ lắc lên hoạt tính ức chế sinh trưởng nấm <i>F. oxysporum</i> và <i>R. solani</i> .....	35
<b>Hình 3.11.</b> Sắc ký đồ c ác phân đoạn qua cột sắc ký trao đổi ion DEAE -cellulose (A); Hoạt tính kháng <i>F. oxysporum</i> của các đỉnh protein sau khi qua cột DEAE-52 cellulose (B) .....	36
<b>Hình 3.12.</b> Sắc ký đồ (A) và điện di đồ (B) các phân đoạn tinh sạch qua cột Biogel ở peak 1.....	37
<b>Hình 3.13.</b> Hoạt tính kháng nấm các phân đoạn tinh sạch ở peak 1 sau khi qua cột Biogel. ....	37
<b>Hình 3.14.</b> (A) Sắc ký đồ qua cột Biogel P 100; (B) điện di đồ các phân đoạn tinh sạch qua cột Biogel ở peak 2. ....	38
<b>Hình 3.15.</b> Hoạt tính kháng nấm <i>F. oxysporum</i> các phân đoạn tinh sạch peak 2.....	38
<b>Hình 3.16.</b> Sắc ký đồ các phân đoạn qua cột Biogel P100 (A); Điện di đồ các phân đoạn tinh sạch trước và sau khi qua cột Biogel ở peak 3 (B).....	39
<b>Hình 3.17.</b> Hoạt tính kháng nấm <i>F. oxysporum</i> của các phân đoạn tinh sạch ở peak3. ....	39
<b>Hình 3.18.</b> Hoạt tính kháng <i>F. oxysporum</i> và <i>R. solani</i> của protein tinh sạch ở peak 3.....	40
<b>Hình 3.19.</b> Hoạt tính kháng <i>R. solani</i> của protein tinh sạch từ <i>B. subtilis</i> XL62 ở peak 3.....	40
<b>Hình 3.20.</b> Ảnh hưởng của nhiệt độ lên hoạt tính kháng nấm <i>F. oxysporum</i> (A) và <i>R. solani</i> (B). 42	
<b>Hình 3.21.</b> Ảnh hưởng của proteinase K đến hoạt tính kháng nấm <i>F. oxysporum</i> (A) và <i>R. solani</i> (B). ....	42
<b>Hình 3.22.</b> Khả năng ức chế sự nảy mầm bào tử <i>F. oxysporum</i> của protein tinh sạch từ <i>B. subtilis</i> XL62 quan sát trên kính hiển vi quang học. ....	42
<b>Hình 3.23.</b> Lên men sản xuất chế phẩm BCF trên quy mô 20 lít/mẻ .....	44
<b>Hình 3.24.</b> Hoạt tính ức chế <i>F. oxysporum</i> (A,C) và <i>R. solani</i> (B,D) của chế phẩm BCF dạng đơn (A,B) và dạng đa (C,D) sau 5 ngày thí nghiệm.....	46
<b>Hình 3.25.</b> Hoạt tính ức chế <i>F. oxysporum</i> (A) và <i>R. solani</i> (B) của chế phẩm BCF dạng lỏng cô đặc 10 lần sau 5 ngày thí nghiệm. ....	46

## DANH MỤC BẢNG

<b>Bảng 2.1.</b> Thành phần các loại đệm và dung dịch.....	17
<b>Bảng 2.2.</b> Thành phần môi trường nuôi cấy vi sinh vật.....	18
<b>Bảng 2.3.</b> Danh sách các thiết bị thí nghiệm được sử dụng.....	18
<b>Bảng 3.1.</b> Ảnh hưởng của nồng độ dịch lọc tế bào <i>B. subtilis</i> XL62 lên sinh trưởng của <i>F. oxysporum</i> .....	26
<b>Bảng 3.2.</b> Ảnh hưởng của nồng độ dịch lọc tế bào <i>B. subtilis</i> XL62 lên sinh trưởng của sợi <i>R. solani</i> .....	26
<b>Bảng 3.3.</b> Ảnh hưởng của nồng độ dịch lọc tế bào <i>B. subtilis</i> XL62 lên sinh trưởng của hạch <i>R. solani</i> .....	26
<b>Bảng 3.4.</b> Sự biến động giá trị pH môi trường dinh dưỡng trong quá trình nuôi cấy.....	31
<b>Bảng 3.5.</b> Tóm tắt quá trình tinh sạch protein kháng nấm từ <i>B. subtilis</i> XL62 ở peak 3 khi qua các bước tinh sạch .....	39
<b>Bảng 3.6.</b> Khả năng ức chế <i>F. oxysporum</i> và <i>R. solani</i> của dịch nuôi cấy chủng <i>B. subtilis</i> XL62, sau các ngày lên men khác nhau. ....	44
<b>Bảng 3.7.</b> Hoạt tính ức chế <i>R. solani</i> và <i>F. oxysporum</i> của chế phẩm BCF sau 5 ngày thử nghiệm.....	46
<b>Bảng 3.8.</b> Hoạt tính ức chế <i>R. solani</i> và <i>F. oxysporum</i> của chế phẩm BCF cô đặc 10 lần sau 5 ngày thử nghiệm .....	46

## MỞ ĐẦU

Chất đối kháng sinh trường nấm (antifungal compounds, AFC) là những chất có khả năng ức chế sự sinh trưởng và phát triển của nấm đặc biệt là nấm gây bệnh ở cây trồng như lạc, cà chua, đậu tương, cây cà phê. Các protein và peptide có hoạt tính kháng nấm đều được tách chiết phần lớn từ động vật, thực vật, vi khuẩn và nấm.

Dựa trên cấu trúc hoặc chức năng, các protein và peptide có khả năng kháng nấm được phân loại thành nhiều lớp khác nhau, chẳng hạn như chitinase và chitinase-like protein, ribonuclease, chất ức chế protease. Peptide kháng nấm đầu tiên được tách chiết từ *B. subtilis* là iturin và bacillomycin. Chúng có cấu trúc peptidolipid mạch vòng và có khả năng kháng nấm và tan huyết.

Các chủng *Bacillus* đã được biết đến với vai trò quan trọng trong việc kiểm soát bệnh cây trồng. Chúng có khả năng sinh tổng hợp nhiều hợp chất kháng nấm khác nhau như các chất kháng sinh, lipopeptide, bacillomycin, iturin, mycosubtilin và fengycin. Một số chủng *B. subtilis* đã được ứng dụng để kiểm soát bệnh cây trồng do nấm gây ra, chúng có phổ biến trong đất, chịu được nhiệt độ cao, sinh trưởng nhanh trong môi trường lỏng và có nhiều bào tử.

Hiện nay trên thế giới cũng như ở Việt Nam, việc sử dụng các chế phẩm sinh học thay thế một phần thuốc hóa học để phòng trừ một số bệnh cây trồng do vi sinh vật gây ra đang là xu hướng chủ yếu. Chế phẩm sinh học diệt nấm có nguồn gốc từ vi khuẩn đối kháng có tác dụng tích cực đối với nông nghiệp, ưu việt hơn so với việc dùng thuốc hóa học. Sử dụng chế phẩm có nguồn gốc từ vi khuẩn đối kháng để diệt nấm gây hại trên cây trồng sẽ mang lại những lợi ích lâu dài cho người sản xuất như: làm tăng năng suất của cây trồng, giảm chi phí đầu tư, làm đất không bị bạc màu, thân thiện với môi trường sinh thái, không ảnh hưởng đến sức khỏe của con người và vật nuôi, góp phần quan trọng trong việc phát triển nền nông nghiệp hữu cơ bền vững và hiệu quả.

Việc nghiên cứu phòng trừ nấm bệnh cây trồng bằng các chế phẩm sinh học đã được hình thành và phát triển ở Việt Nam nhưng vẫn còn nhiều hạn chế. Các chế phẩm dưới dạng tinh sạch tách chiết từ vi sinh vật mới nghiên cứu chủ yếu ở trong phòng thí nghiệm và quy mô sản xuất thử nên giá thành còn cao. Các sản phẩm trên thị trường

chủ yếu là các sản phẩm có chứa tế bào vi sinh vật đối kháng nên thời gian hữu hiệu ngắn, hiệu quả không cao. Mặt khác, các sản phẩm sử dụng tế bào mang nguy cơ gây bệnh rất lớn cho con người. Vì vậy, phát triển sản phẩm sinh hóa đạt độ tinh sạch cao để phòng chống nấm bệnh cây trồng là một vấn đề rất cấp thiết. Trong quá trình nghiên cứu, chúng tôi đã phân lập và tuyển chọn được chủng *B. subtilis* XL62 có khả năng ức chế mạnh các nấm gây bệnh cây trồng như *F. oxysporum* và *R. solani*. Xuất phát từ những lý do trên và tình hình nghiên cứu ở Việt Nam, tôi đã thực hiện đề tài luận văn: "**Tinh sạch protein có hoạt tính kháng nấm từ chủng *Bacillus subtilis* XL62, ứng dụng thử nghiệm chế phẩm BCF trên mô hình *in vitro***" trong khuôn khổ đề tài "Nghiên cứu công nghệ sản xuất chế phẩm BCF phòng chống bệnh cây trồng do nấm *Fusarium* sp. và *Rhizoctonia solani*" do TS. Nguyễn Ngọc Dũng làm chủ nhiệm với các mục tiêu: (1) Tinh sạch được protein từ *B. subtilis* XL62 có hoạt tính kháng nấm, (2) Thử nghiệm khả năng ức chế *F. oxysporum* và *R. solani* của chế phẩm BCF trên mô hình *in vitro*.