

VIỆN HÀN LÂM KH&CN VIỆT NAM
VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT

-----***-----

LUẬN VĂN CAO HỌC
Mã số chuyên ngành: 60420103

Đề tài:

Nghiên cứu xạ khuẩn sinh kháng sinh kháng tụ cầu vàng *Staphylococcus aureus* phân lập từ đất rừng ngập mặn Thái Bình và Nam Định

Học viên: Lê Xuân Dân

Lớp: CHST _ K15

Hướng dẫn: PGS.TS Ngô Đình Bình

Hà Nội, 2013

Mục lục

Mục lục.....	i
Danh mục các từ viết tắt.....	vi
Danh mục bảng.....	vii
Danh mục hình	ix
Mở đầu	1
Phần 1. Tổng quan tài liệu.....	3
1.1. Xạ khuẩn.	3
1.1.1. Xạ khuẩn và sự phân bố trong tự nhiên.	3
1.1.2. Cấu tạo của xạ khuẩn.	3
1.1.3. Đặc điểm hình thái, quá trình sinh trưởng và phát triển của xạ khuẩn. ..	5
1.1.4. Đặc điểm sinh lý, sinh hóa.	6
1.1.5. Sự hình thành bào tử.	6
1.2. Phân loại xạ khuẩn.	8
1.2.1. Lịch sử phân loại xạ khuẩn.	8
1.2.2. Theo đặc điểm hình thái và tính chất nuôi cấy.	10
1.2.3. Theo đặc điểm hóa học.	11
1.2.4. Theo đặc điểm sinh lý, sinh hóa.	12
1.2.5. Theo phân loại số.	12
1.2.6. Theo sự phát sinh chủng loại.	13
1.2.7. Phân loại theo Chương trình xạ khuẩn quốc tế (ISP)	14
1.3. Một số sản phẩm trao đổi chất quan trọng của xạ khuẩn.	14
1.3.1. Kháng sinh và cơ chế hình thành chất kháng sinh của vi sinh vật	14
1.3.2. Phân lập xạ khuẩn sinh chất kháng sinh từ tự nhiên.	15
1.3.3. Các nhóm chất kháng sinh chính có nguồn gốc từ xạ khuẩn.	16
1.3.4. Các yếu tố ảnh hưởng đến sinh tổng hợp kháng sinh của xạ khuẩn.	18
1.4. Tổng quan về vi khuẩn <i>Staphylococcus aureus</i>	19
1.4.1. Đặc điểm phân loại.....	19
1.4.2. Đặc điểm sinh vật học	20
1.4.2.1. Hình thái và tính chất nuôi cấy	20
1.4.2.2. Đặc tính và yếu tố độc lực.....	21
1.4.2.3. Khả năng đề kháng.....	23
1.4.2.4. Sự kháng kháng sinh	23
1.4.2.5. Khả năng gây bệnh.....	23
Phần 2 : Vật liệu và phương pháp	24
2.1. Vật liệu	24
2.1.1. Nguyên liệu	24
2.1.2. Môi trường .(g/l)	24

2.2. Phương pháp nghiên cứu.....	27
2.2.1. Phân lập và tuyển chọn xạ khuẩn.....	27
2.2.1.1. Phân lập xạ khuẩn.	27
2.2.1.2. Phân lập vi khuẩn <i>Staphylococcus aureus</i> :	27
2.2.1.2. Các phương pháp xác định hoạt tính kháng sinh	28
2.2.1.3. Tuyển chọn xạ khuẩn	28
2.2.1.4. Bảo quản chủng giống.....	29
2.2.2. Phân loại xạ khuẩn.	29
2.2.2.1. Đặc điểm hình thái	29
2.2.2.2. Đặc điểm nuôi cấy.....	29
2.2.2.3. Phương pháp xác định trình tự đoạn gene 16S rRNA	31
2.2.3. Nghiên cứu động thái của quá trình lên men	33
2.2.4. Tách chiết chất kháng sinh.....	33
2.2.4.1. Tách chiết chất kháng sinh từ sinh khối.....	33
2.2.4.2. Tách chiết chất kháng sinh từ dịch lọc.....	33
2.2.5. Xác định một số tính chất hoá lý và phân loại kháng sinh	33
2.2.5.1. Xác định độ bền nhiệt của dịch kháng sinh thô	33
2.2.5.2. Xác định pH khuếch tán của kháng sinh thô.....	33
2.2.5.3. Phương pháp xác định giá trị Rf	34
Phần 3. Kết quả và thảo luận.....	36
3.1. Phân lập và tuyển chọn	36
3.1.1. Phân lập xạ khuẩn từ đất rừng ngập mặn.....	36
3.1.2. Phân lập vi khuẩn <i>Staphylococcus aureus</i>	37
3.1.2. Sàng lọc hoạt tính kháng sinh của các chủng xạ khuẩn phân lập.	40
3.2. Phân loại xạ khuẩn bằng phương pháp truyền thống.....	45
3.2.1. Đặc điểm hình thái chủng xạ khuẩn TB10.2.....	45
3.2.2. Đặc điểm sinh lý sinh hoá	46
3.2.2.1. Khả năng chịu muối.	46
3.2.2.2. Khả năng đồng hóa nguồn đường	46
3.2.3. Mô tả đặc điểm phân loại	47
3.3. Phân loại bằng phương pháp sinh học phân tử	49
3.4. Nghiên cứu động thái lên men của chủng TB10.2.....	52
3.5. Nghiên cứu một số tính chất của dịch kháng sinh thô	54
3.5.1. Tách chiết chất kháng sinh.....	54
3.5.2. Độ bền nhiệt của dịch kháng sinh thô	54
3.5.3. Ảnh hưởng của pH đến độ khuếch tán của dịch kháng sinh thô.....	55
3.5.4. Đặc điểm sắc kí của dịch kháng sinh thô của chủng xạ khuẩn chủng <i>S. padanus</i> TB10.2 trong một số hệ dung môi.....	56
Kết luận	58
Tài liệu tham khảo.....	59

Lời cảm ơn

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới PGS.TS Ngô Đình Bính là người thầy đã hướng cho tôi những ý tưởng khoa học, tận tình hướng dẫn, truyền đạt kiến thức, giúp đỡ và tạo mọi điều kiện thuận lợi cho tôi hoàn thành bản luận án này.

Tôi xin trân trọng cảm ơn phòng tập thể phòng Di truyền Vi sinh vật, Viện Công nghệ sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tạo điều kiện cho tôi hoàn thành khóa học và bản luận án này.

Tôi xin cảm ơn tất cả các thầy cô giáo Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật, Viện Hàn lâm khoa học và công nghệ Việt Nam đã chia sẻ, động viên, giúp tôi vượt qua mọi khó khăn để hoàn thành tốt công việc nghiên cứu của mình.

Cuối cùng, tôi xin tỏ lòng biết ơn đến gia đình và bè bạn, những người luôn bên tôi, động viên, góp ý và tạo điều kiện tốt nhất cho tôi trong suốt thời gian học tập và nghiên cứu.

Tác giả

Lời cam đoan

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của tôi và một số kết quả cùng cộng tác với các đồng sự khác. Các số liệu và kết quả trình bày trong luận văn là trung thực.

Hà Nội, ngày tháng năm 2013

Tác giả

Danh mục các từ viết tắt

KTKS	Khuẩn ty khí sinh
KTCC	Khuẩn ty cơ chất
RF (Rectus-Flexibilis)	Cuồng bào tử thẳng hay lượn sóng
RA (Retinaculum apertum)	Cuồng bào tử xoắn đơn hình móc câu
DNA	Deoxyribonucleic acide
RNA	Ribonucleic acide
CSBT	Cuồng sinh bào tử
BMBT	Bề mặt bào tử
PCR	Polymerase chain reaction

Danh mục bảng

Bảng 3.1. Phân loại xạ khuẩn TB theo màu sắc KTKS	36
Bảng 3.2. Phân loại xạ khuẩn ND theo màu sắc KTKS	36
Bảng 3.3. Kết quả phân lập vi khuẩn <i>S. aureus</i> tại các phòng mổ và phòng thủ thuật.....	37
Bảng 3.4. Phân loại xạ khuẩn phân lập ở Thái Bình theo nhóm màu và hoạt tính kháng sinh.....	40
Bảng 3.5. Hoạt tính kháng sinh của các chủng xạ khuẩn phân lập tại Tỉnh Thái Bình kháng vi khuẩn <i>Staphylococcus aureus</i>	41
Bảng 3.6. Hoạt tính kháng sinh của các chủng xạ khuẩn phân lập tại Thái Bình trong môi trường dịch thể kháng vi khuẩn <i>Staphylococcus aureus</i>	41
Bảng 3.7. Phân loại xạ khuẩn phân lập tại rừng ngập mặn Tỉnh Nam Định theo nhóm màu và hoạt tính kháng sinh.....	42
Bảng 3.8. Hoạt tính kháng sinh của các chủng xạ khuẩn tuyển chọn kháng vi khuẩn <i>Staphylococcus aureus</i>	43
Bảng 3.9. Hoạt tính kháng sinh của các chủng xạ khuẩn tuyển chọn trong môi trường dịch thể kháng vi khuẩn <i>Staphylococcus aureus</i>	44
Bảng 3.10. Đặc điểm hình thái của chủng TB10.2	45
Bảng 3.11. một số đặc điểm hình thái của chủng xạ khuẩn TB110.2.....	45
Bảng 3.12. Khả năng đồng hóa các nguồn đường	46
Bảng 3.13. So sánh đặc điểm hình thái của chủng TB10.2 với chủng <i>S. padanus</i>	48
Bảng 3.14. so sánh trình tự 16S rRNA của chủng TB10.2 trên ngân hàng gen quốc tế	51
Bảng 3.15. Hoạt tính kháng sinh của chủng xạ khuẩn <i>S. padanus</i> TB10.2 trên các môi trường nghiên cứu.....	53
Bảng 3.16. Sự biến đổi pH, hoạt tính kháng sinh, sinh khối của chủng <i>S. padanus</i> TB10.2 trên môi trường Gauze-1	53

Bảng 3.17. Hoạt tính của dịch kháng sinh thô của chủng *S. Padanus* TB10.2 sau khi xử lý nhiệt với vi sinh vật kiểm định *S. aureus* (mm)..... 55

Bảng 3.18. Ảnh hưởng của pH tới sự khuếch tán của chất kháng sinh .**Error! Bookmark not defined.**

Bảng 3.19. Giá trị Rf của dịch kháng sinh thô trên một số hệ dung môi..... 57

Danh mục hình

Hình 1.1 Hình thể <i>Staphylococcus aureus</i>	20
Hình 1.2 Các yếu tố độc lực của <i>Staphylococcus aureus</i>	22
Hình 2.1. Đĩa thạch Gradient pH	34
Hình 2.2. Băng sắc kí trên giấy	35
Hình 3.1. phân lập vi khuẩn <i>S.aureus</i> tại bệnh viện ĐK tỉnh Bắc Ninh	37
Hình 3.2a. kháng sinh đồ chủng vi khuẩn <i>S.aureus</i> của bệnh viện đa khoa tỉnh Bắc Ninh.....	38
Hình 3.2b. Kháng sinh đồ chủng vi khuẩn <i>S.aureus</i> do phòng Di truyền Vi sinh vật – Viện Công nghệ Sinh học cung cấp	39
Hình 3.3. hoạt tính kháng sinh của các chủng xạ khuẩn phân lập tại Tỉnh Thái Bình diệt vi khuẩn <i>S. aureus</i>	41
Hình 3.4. Hoạt tính kháng sinh của các chủng xạ khuẩn tuyển chọn đất ngập mặn tỉnh Thái Bình.....	42
Hình 3.5. hoạt tính kháng sinh của các chủng xạ khuẩn phân lập tại Nam Định diệt vi khuẩn <i>S. aureus</i>	43
Hình 3.6. Hoạt tính kháng sinh của dịch nuôi cấy các chủng xạ khuẩn tuyển chọn tại đất rừng ngập mặn tỉnh Nam Định.....	44
Hình 3.7. Hình dạng và bề mặt bào tử chủng TB10.2	45
Hình 3.8. Khả năng đồng hoá các nguồn đường của chủng TB10.2.	47
Hình 3.9. Màu của KTKS (A) và màu của KTCC (B) của chủng TB10.2 trên môi trường Gause 1 sau 7 ngày nuôi.	48
Hình 3.10. Điện di DNA của chủng TB10.2 sau khi tách từ kit QIAamp DNA Mini Kit.....	50
Hình 3.11. Điện di sản phẩm PCR gen 16S rRNA của chủng TB10.2.....	50
Hình 3.12. Cây phát sinh chủng loại của chủng TB10.2	52
Hình 3.13. Động thái của quá trình lên men sinh tổng hợp chất kháng sinh của chủng xạ khuẩn <i>Streptomyces padanus</i> TB10.2 trên môi trường Gauze-1. ...	54

Mở đầu

Tụ cầu vàng là vi khuẩn thường xuất hiện ở các bệnh viện, chúng gây ra các mối đe dọa lớn cho bệnh nhân cũng như bệnh viện nếu không có công tác kiểm soát nhiễm khuẩn thực sự tốt. Chúng gây nhiễm trùng vết mổ làm ảnh hưởng đến tính mạng bệnh nhân. Bên cạnh đó, khả năng kháng kháng sinh của tụ cầu vàng rất lớn vì vậy cần nghiên cứu các sinh học diệt khuẩn có nguồn gốc từ các vi sinh vật đối kháng đã và đang được các nhà khoa học hướng đến và xạ khuẩn sinh kháng sinh là trung tâm trong vấn đề nghiên cứu này.

Xạ khuẩn thuộc nhóm sinh vật nhân sơ (prokaryote) với số lượng loài lớn và phân bố ở nhiều vùng sinh thái khác nhau. Chúng ngày càng được biết đến rộng rãi với nhiều ứng dụng thực tế thông qua việc tạo ra các sản phẩm thứ cấp có giá trị cao như chất kháng sinh, chất chống ung thư, các chất kích thích sinh trưởng và nhiều hợp chất y dược khác. Ngoài ra, xạ khuẩn còn có khả năng sinh ra các enzyme ngoại bào nên được sử dụng rộng rãi làm các chế phẩm sinh học trong nông nghiệp và công nghệ xử lý rác thải.

Thái Bình và Nam Định là hai tỉnh có diện tích đất rừng ngập mặn lớn của Bắc bộ. Việc nghiên cứu đa dạng sinh học vi sinh vật của đất rừng ngập mặn chưa được công bố nhiều, đặc biệt là các sản phẩm trao đổi chất của chúng. Vì vậy, để góp phần tìm hiểu về đa dạng sinh học xạ khuẩn ở đất rừng ngập mặn và hoạt tính chất kháng sinh của chúng đối với vi khuẩn tụ cầu vàng, chúng tôi thực hiện đề tài: **“Nghiên cứu xạ khuẩn sinh kháng sinh kháng tụ cầu vàng *Staphylococcus aureus* phân lập từ đất rừng ngập mặn Thái Bình và Nam Định”**.

***/ Mục tiêu của đề tài:**

- Khảo sát sự phân bố, đặc điểm hình thái của xạ khuẩn trong các mẫu đất thu thập tại một số khu vực đất rừng ngập mặn thuộc 2 tỉnh Thái Bình và Nam Định.