

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:

Tuyển chọn, cải biến và nghiên cứu đặc điểm sinh học của chủng xạ khuẩn có khả năng kháng vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* phân lập ở Việt Nam

Học viên: Nguyễn Huy Hùng

Lớp: CHST _ K16

Hướng dẫn: TS. Nguyễn Xuân Cảnh

Hà Nội, 2014

Lời cảm ơn

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới TS Nguyễn Xuân Cảnh Khoa Công nghệ sinh học - Học viện Nông nghiệp Hà Nội, 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 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 2014

Tác giả

MỤC LỤC

MỤC LỤC.....	i
Danh mục hình	iv
Danh mục bảng	v
TỔNG QUAN TÀI LIỆU	3
1.1. GIỚI THIỆU VỀ XẠ KHUẨN.....	3
1.1.1. Sự phân bố và ý nghĩa của xạ khuẩn trong tự nhiên.....	3
1.1.2. Vị trí của xạ khuẩn trong sinh giới	4
1.1.3. Cấu tạo của xạ khuẩn	5
1.1.4. Đặc điểm hình thái của xạ khuẩn.....	8
1.1.5. Sự hình thành bào tử xạ khuẩn	9
1.1.6. Sinh tổng hợp chất kháng sinh.....	11
1.2. PHÂN LẬP CÁC CHỦNG XẠ KHUẨN SINH TỔNG HỢP CHẤT KHÁNG SINH	13
1.2.1. Phân lập các chủng xạ khuẩn sinh chất kháng sinh	13
1.2.2. Phân loại và định tên xạ khuẩn	14
2.1. VẬT LIỆU	33
2.1.1. Chủng giống vi sinh vật	33
2.1.2. Hóa chất	33
2.1.3. Thiết bị	33
2.1.4. Môi trường	33
2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	34
2.2.1. Bảo quản giống [3].....	34
2.2.2. Xác định đặc điểm sinh học	35
2.2.3. Xác định sinh khối	36
2.2.4. Xác định hoạt tính kháng sinh [6,19].....	36

2.2.5. Nghiên cứu điều kiện lên men [3, 6].....	37
2.2.6. Chạy sắc ký giấy chất kháng sinh.....	38
PHẦN 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	39
3.1. Phân lập vi khuẩn <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	39
3.2. Xây dựng kháng sinh đồ đối với các chủng <i>P. aeruginosa</i> phân lập	41
3.3. Phân lập và tuyển chọn các chủng xạ khuẩn có khả năng kháng vi khuẩn <i>P. aeruginosa</i>	42
3.3.1. Phân lập xạ khuẩn	42
3.3.2. Sàng lọc và tuyển chọn các chủng xạ khuẩn kháng vi khuẩn <i>P. aeruginosa</i>	43
3.4. Nghiên cứu các đặc điểm phân loại và đặc điểm sinh học của chủng xạ khuẩn 8.9.....	45
3.4.1. Đặc điểm nuôi cấy và đặc điểm hình thái.....	45
3.4.1. Đặc điểm hình thái	46
3.4.2. Một số đặc điểm sinh hóa của chủng 8.9.....	46
3.4.3. Mô tả đặc điểm phân loại.....	48
3.4.4. Phân loại bằng phương pháp sinh học phân tử.....	50
3.5. Nghiên cứu động thái lên men của chủng xạ khuẩn 8.9.....	52
3.6. Nghiên cứu một số tính chất của dịch kháng sinh thô.....	54
3.6.1. Tách chiết chất kháng sinh.....	54
3.6.2. Độ bền nhiệt của dịch kháng sinh.....	54
3.6.3. Ảnh hưởng của pH đến độ khuếch tán của dịch kháng sinh thô	55
3.6.4. Đặc điểm sắc ký của dịch kháng sinh thô của chủng xạ khuẩn 8.9 trong một số hệ dung môi.....	55
3.7. Nghiên cứu cải biến chủng xạ khuẩn 8.9.....	56
PHẦN 4. KẾT LUẬN.....	59
TÀI LIỆU THAM KHẢO	60

Tài liệu tiếng Việt	60
Tài liệu tiếng anh.....	60

CÁC CHỮ VIẾT TẮT TRONG KHÓA LUẬN

HSCC	Hệ sợi cơ chất
HSKS	Hệ sợi khí sinh
RNA	Ribonucleic acide
DNA	Deoxyribonucleic acide
RA	Cuồng bào tử xoắn đơn hình móc câu
RF	Cuồng bào tử thẳng hay lượn song
CSBT	Cuồng sinh bào tử
BMBT	Bề mặt bào tử
CKS	Chất kháng sinh
TKMX	Trực khuẩn mũ xanh
PCR	Polymerase chain reaction

Danh mục hình

Hình 1.1. Khuẩn lạc xạ khuẩn

Hình 1.2. Bào tử xạ khuẩn

Hình 1.3. Trục khuẩn mũ xanh *Pseudomonas aeruginosa*

Hình 3.1. Hình thái khuẩn lạc (A) và tế bào ở độ phóng đại 11000 lần trên kính hiển vi điện tử quét của chủng vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* phân lập tại bệnh viện huyết học truyền máu TW sau 02 ngày nuôi cấy ở 37⁰C.

Hình 3.2. Thử hoạt tính kháng sinh chủng vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* của các chủng xạ khuẩn bằng phương pháp khối thạch

Hình 3.3. Kết quả thử hoạt tính các chủng xạ khuẩn phân lập bằng phương pháp giếng thạch với vi sinh vật kiểm định là vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa*

Hình 3.4. Khả năng sinh trưởng và màu sắc khuẩn lạc chủng 8.9 khi nuôi cấy trên môi trường ISP-1 (A) và ISP-2 (B)

Hình 3.5. Hình thái cuống sinh bào tử và bề mặt bào tử của chủng xạ khuẩn NĐ 8.9 khi quan sát trên kính hiển vi quang học ở độ phóng đại 1000 lần (A) và kính hiển vi điện tử quét ở độ phóng đại 7500 lần

Hình 3.6. Sự sinh trưởng của chủng xạ khuẩn 8.9 trên môi trường có các nguồn cacbon khác nhau

Hình 3.7. Sinh trưởng và phát triển của chủng 8.9 trên môi trường ISP-6

Hình 3.8. Điện di sản phẩm PCR gene 16S rRNA của chủng 8.9

Hình 3.9. Cây phát sinh chủng loại của chủng 8.9

Hình 3.10. Động thái của quá trình lên men sinh tổng hợp chất kháng sinh của chủng xạ khuẩn 8.9 trên môi trường Gauze-1

Hình 3.11. Biểu đồ giá trị Rf của chất kháng sinh thô 8.9

Danh mục bảng

Bảng 3.1. Kết quả phân lập vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* tại Viện huyết học truyền máu TW.

Bảng 3.2. Kết quả định kháng sinh đồ trên máy VITEK2 compact tại bệnh viện Huyết học truyền máu TW

Bảng 3.3. Phân loại xạ khuẩn theo nhóm màu

Bảng 3.4. Hoạt tính kháng sinh của các chủng xạ khuẩn tuyển chọn đối với vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa*

Bảng 3.5. Đặc điểm hình thái nuôi cấy chủng 8.9

Bảng 3.6. Khả năng sử dụng nguồn cacbon của chủng xạ khuẩn 8.9

Bảng 3.7. So sánh đặc điểm hình thái của chủng 8.9 với chủng *S. parvulus*

Bảng 3.8. Khả năng sử dụng nguồn cacbon của 2 chủng 8.9 và *S. parvulus*

Bảng 3.9. So sánh trình tự gen 16S RNA trên ngân hàng gen quốc tế

Bảng 3.10. Hoạt tính kháng sinh của chủng xạ khuẩn 8.9 trên các môi trường nghiên cứu

Bảng 3.11. Sự biến đổi pH, hoạt tính kháng sinh, sinh khối chủng 8.9

Bảng 3.12. Hoạt tính của dịch kháng sinh thô của chủng xạ khuẩn 8.9 đối với vi sinh vật kiểm định *Pseudomonas aeruginosa* ở các nhiệt độ khác nhau

Bảng 3.13. Ảnh hưởng của pH tới sự khuếch tán của chất kháng sinh

Bảng 3.14. Giá trị Rf của dịch kháng sinh thô trên một số hệ dung môi

Bảng 3.15. Hoạt tính kháng sinh của các chủng xạ khuẩn được lựa chọn sau khi gây đột biến đối với vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa*

MỞ ĐẦU

Pseudomonas aeruginosa (hay còn gọi là Trục khuẩn mũ xanh) là một vi khuẩn phổ biến gây bệnh ở động vật và con người. Nó được tìm thấy trong đất, nước, hệ vi sinh vật trên da và các môi trường nhân tạo trên khắp thế giới. Vi khuẩn không chỉ phát triển trong môi trường không khí bình thường, mà còn có thể sống trong môi trường có ít khí ôxy, và do đó có thể cư trú trong nhiều môi trường tự nhiên và nhân tạo. Vi khuẩn này dinh dưỡng bằng rất nhiều các hợp chất hữu cơ; ở động vật, nhờ khả năng thích ứng vi khuẩn cho phép nó lây nhiễm và phá hủy các mô của người bị suy giảm hệ miễn dịch. Triệu chứng chung của việc lây nhiễm thông thường là gây ra viêm nhiễm và nhiễm trùng huyết. Nếu vi khuẩn xâm nhập vào các cơ quan thiết yếu của cơ thể như phổi, đường tiết niệu, và thận, sẽ gây ra những hậu quả chết người; vì vi khuẩn này phát triển tốt trên các bề mặt bên trong cơ thể. Vi khuẩn cũng được phát hiện trên các dụng cụ y khoa bao gồm catheter, gây ra nhiễm khuẩn bệnh viện và phòng mạch. Đây cũng là nguyên nhân gây ra viêm chân lông.

Nước ta là một nước nhiệt đới nóng ẩm thuận lợi cho vi sinh vật nói chung và xạ khuẩn nói riêng phát triển. Do đó, có thể tìm thấy nhiều chủng xạ khuẩn có khả năng sinh kháng sinh quý, trong đó có kháng sinh kháng lại vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* gây ra các bệnh về nhiễm trùng.

Để giải quyết những vấn đề này, chúng tôi thực hiện đề tài: **“Tuyển chọn, cải biến và nghiên cứu đặc điểm sinh học của chủng xạ khuẩn có khả năng kháng vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* phân lập ở Việt Nam”**.

***/ Mục tiêu của đề tài:**

- Phân lập được vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* từ các mẫu thu thập tại một số bệnh viện.
- Sàng lọc và tuyển chọn được chủng xạ khuẩn có khả năng kháng vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* từ bộ sưu tập các chủng xạ khuẩn phân lập ở Việt Nam

- Phân loại và nghiên cứu một số đặc điểm sinh học của chủng xạ khuẩn đã tuyển chọn.
- Cải biến được chủng xạ khuẩn đã tuyển chọn để nâng cao hoạt tính kháng khuẩn
- Bước đầu xác định được nhóm hoạt chất chính từ chủng xạ khuẩn đã tuyển chọn tác động lên vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa*.

***/ Nội dung**

- Phân lập vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* từ các mẫu bệnh phẩm, nước thải, đất thu thập tại một số bệnh viện.
- Kiểm tra tính miễn cảm của các chủng *Pseudomonas aeruginosa* phân lập được với một số loại chất kháng sinh
- Kiểm tra hoạt tính kháng sinh của các chủng xạ khuẩn đã phân lập được với vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* để tuyển chọn ra các chủng có hoạt tính cao.
- Phân loại và nghiên cứu các đặc điểm hình thái, nuôi cấy, sinh lý – sinh hóa của các chủng xạ khuẩn tuyển chọn.