

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC

LÝ THỊ BÍCH HẠNH

***TINH SẠCH CÁC HỢP CHẤT THỨ CẤP
CÓ HOẠT TÍNH KHÁNG NẤM TỬ CHỨNG BACILLUS
PHÂN LẬP Ở VIỆT NAM***

Chuyên ngành: Công nghệ sinh học

Mã số: 60 42 02 01

LUẬN VĂN THẠC SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Người hướng dẫn khoa học: TS. Đỗ Thị Tuyền

THÁI NGUYỄN - 2015

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan các kết quả nghiên cứu dưới đây là do tôi và nhóm cộng sự nghiên cứu tại phòng Công nghệ sinh học enzyme – Viện Công nghệ sinh học – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam thực hiện từ tháng 5 năm 2014 đến tháng 5 năm 2015.

Thái Nguyên, ngày 06 tháng 11 năm 2015

Học viên

Lý Thị Bích Hạnh

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 Hàn lâm Khoa học và Công Nghệ Việt Nam đã định hướng nghiên cứu, sửa luận văn và tạo mọi điều kiện về hóa chất, thiết bị, thời gian cho tôi trong quá trình thực hiện đề tài này.

Tôi xin cảm ơn các anh chị cán bộ Phòng Công nghệ sinh học enzyme, Viện Công nghệ sinh học đã chỉ bảo, giúp đỡ tận tình cho tôi trong quá trình nghiên cứu cũng như chia sẻ những kinh nghiệm chuyên môn.

Tôi xin cảm ơn **PGS.TS. Nguyễn Vũ Thanh Thanh** các thầy cô giáo tại trường Đại Học Khoa học, Đại học Thái Nguyên, các thầy cô trong Viện Công nghệ sinh học – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong suốt quá trình học tập.

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

Hà Nội, Tháng 5 năm 2015

Học viên

Lý Thị Bích Hạnh

BẢNG CHỮ VIẾT TẮT

APS	Ammonium presulphate
AFC	Antifungal compound
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
BCF	Biological Control Fungi
CFU	Connoly-Forming unit
DEAE-cellulose	Dimethylaminoethyl-cellulose
ĐC	Đôi chứng
<i>F. oxysporum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>
kDa	Kilo Dalton
LB	Luria – Bertani
PDA	Potato Dextrose agar
M	Marker
MIC	Minimal Inhibitory Concentration
FTIR	Fourier transform infrared spectroscopy
TLC	Thin Layer Chromatography
Pr	Protein
<i>R. solani</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>
SDS	Sodium doecyl sulfate
TB	Trung bình
TEMED	N, N, N', N', - Tetramethyl ethylene diamine
TN	Thí nghiệm
v/v	Volume/volume (thể tích/ thể tích)
w/v	Weight/volume (khối lượng/thể tích)

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN	iii
BẢNG CHỮ VIẾT TẮT	iv
MỤC LỤC	v
DANH MỤC HÌNH	vii
DANH MỤC BẢNG	vii
MỞ ĐẦU	1
1. Lí do chọn đề tài.....	1
2. Mục tiêu của đề tài	2
3. Nội dung nghiên cứu	2
CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU	3
1.1. Khái quát về chất đối kháng sinh trưởng nấm	3
1.2. Vai trò của vi khuẩn <i>B. subtilis</i> trong kiểm soát sinh học	5
1.2.1. Đại cương về vi khuẩn <i>B. subtilis</i>	5
1.2.2. Nghiên cứu các hợp chất có hoạt tính kháng nấm	6
1.3. Tình hình nghiên cứu các chế phẩm sinh học phòng trừ nấm trên thế giới... 8	
1.4. Tình hình nghiên cứu các chế phẩm sinh học phòng trừ nấm tại Việt Nam	13
CHƯƠNG 2: VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP	16
2.1. Vật liệu và hóa chất.....	16
2.1.1. Chủng giống.....	16
2.1.2. Hóa chất.....	16
2.1.3. Các loại đệm và dung dịch.....	16
2.1.4. Môi trường	17
2.1.5. Thiết bị thí nghiệm	18
2.2. Phương pháp nghiên cứu.....	18
2.2.1. Phương pháp nuôi cấy vi sinh và thu nhận dịch ngoại bào	18
2.2.2. Phương pháp đánh giá hoạt tính ức chế sinh trưởng nấm.....	19

2.2.3. Thử hoạt tính kháng nấm bằng khoanh giấy lọc.....	20
2.2.4. Phương pháp tủa muối amonium sulfate	20
2.2.5. Phương pháp sắc ký trao đổi ion DEAE-cellulose	20
2.2.6. Phương pháp sắc ký lọc gel Biogel P100.....	21
2.2.7. Xác định hàm lượng protein tổng số.....	23
2.2.8. Điện di SDS - PAGE.....	23
2.2.9. Đánh giá tính chất lý hóa của protein tinh sạch	25
CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	27
3.1. Hoạt tính ức chế nấm của dịch lọc ngoại bào chủng <i>B. subtilis</i> AS	27
3.1.1. Hoạt tính ức chế của dịch lọc ngoại bào đối với nấm <i>F. oxysporum</i>	27
3.1.2. Hoạt tính ức chế của dịch lọc ngoại bào đối với nấm <i>R. solani</i>	29
3.2. Tinh sạch protein có hoạt tính kháng nấm.....	31
3.2.1. Tủa protein bằng muối amonium sulfate	31
3.2.1. Tinh sạch qua cột sắc ký trao đổi ion DEAE – cellulose.....	31
3.2.2. Tinh sạch protein có hoạt tính kháng nấm qua sắc ký lọc gel Biogel P100 ..	35
3.3. Đánh giá tính chất của protein tinh sạch.....	39
3.3.1. Ảnh hưởng của nhiệt độ	40
3.3.2. Ảnh hưởng của proteinase K.....	41
3.3.3. Khả năng ức chế sợi bào tử nấm.....	43
3.3.4. Hoạt tính nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của protein với nấm <i>R.solani</i> và <i>F. oxysporum</i>	45
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	48
1. Kết luận	48
2. Đề nghị	48
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	49
PHỤ LỤC	

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Hình thái khuẩn lạc chủng <i>B.subtilis</i> AS trên môi trường PDA.....	5
Hình 2.1. Quy trình tinh sạch protein kháng nấm từ chủng <i>B. subtilis</i> AS	22
Hình 2.2. Đường chuẩn Bradford	23
Hình 3.1. Hoạt tính ức chế của dịch lọc ngoại bào chủng <i>B. subtilis</i> AS đối với nấm <i>F. oxysporum</i> sau 5 ngày.	28
Hình 3.2. Hoạt tính ức chế nấm của dịch lọc ngoại bào chủng <i>B. subtilis</i> AS đối với nấm <i>R. solani</i> sau 3 ngày.	30
Hình 3.3. Sắc ký đồ các phân đoạn qua cột sắc ký trao đổi ion DEAE-cellulose.....	32
Hình 3.4. Điện di đồ các phân đoạn protein tinh sạch qua cột DEAE – cellulose	33
Hình 3.5. Hoạt tính kháng nấm <i>F. oxysporum</i> (A, D) và <i>R. solani</i> (B, C)	34_Toc434515732
Hình 3.6. Sắc ký đồ các phân đoạn proteintinh sạch có hoạt tính kháng nấm sau khi qua cột Biogel P100.....	36
Hình 3.7. Điện di đồ các phân đoạn protein có hoạt tính kháng nấm qua cột Biogel P100.....	36
Hình 3.8. Các phân đoạn protein tinh sạch có hoạt tính kháng nấm qua cột Biogel P100,..	38
Hình 3.9. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên hoạt tính kháng nấm <i>F. oxysporum</i> (A).....	40
Hình 3.10. Ảnh hưởng của proteinase K đến hoạt tính kháng nấm <i>F. oxysporum</i> (A) và nấm <i>R. solani</i> (B)	42
Hình 3.11. Khả năng ức chế sự nảy mầm bào tử <i>F. oxysporum</i> của protein tinh sạch từ chủng <i>B. subtilis</i> AS.	44
Hình 3.12. Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của protein tinh sạch từ chủng <i>B. subtilis</i> AS lên hoạt tính kháng nấm <i>F. oxysporum</i>	45
Hình 3.13. Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của protein tinh sạch từ chủng <i>B. subtilis</i> AS lên hoạt tính kháng nấm nấm <i>R. solani</i>	46

DANH MỤC BẢNG

Bảng 2.1. Thành phần các loại đệm và dung dịch	17
Bảng 2.2. Thành phần môi trường nuôi cấy vi sinh vật.....	17
Bảng 2.3. Danh sách các thiết bị thí nghiệm được sử dụng.....	18
Bảng 2.4. Thành phần gel cô và gel tách	24
Bảng 3.1. Ảnh hưởng của nồng độ dịch lọc tế bào <i>B. subtilis</i> AS lên sinh trưởng của <i>F. oxysporum</i>	28
Bảng 3.2. Ảnh hưởng của nồng độ dịch lọc tế bào <i>B. subtilis</i> AS lên sinh trưởng của nấm <i>R. solani</i>	29
Bảng 3.3. Tóm tắt quá trình tinh sạch protein kháng nấm từ chủng <i>B. subtilis</i> AS qua các bước tinh sạch	39

MỞ ĐẦU

1. Lí do chọn đề tài

Hàng năm, các bệnh cây trồng đã gây ra những tổn thất to lớn cho sản xuất nông nghiệp. Theo tổ chức nông lương liên hợp quốc (FAO, 2004), thiệt hại trong nông nghiệp do các bệnh vi nấm gây ra đến 537,3 triệu tấn các loại nông sản chủ yếu, chiếm khoảng 11,6% tổng sản lượng nông nghiệp trên thế giới. Trong đó chiếm 83% là bệnh do vi nấm gây ra, chủ yếu là các bệnh như: đạo ôn, khô vằn, thối cổ rễ, mốc sương... đặc biệt bệnh do nấm *Fusarium* và *Rhizoctonia* gây ra chiếm tỉ lệ tương đối lớn.

Hiện nay, các biện pháp hóa học vẫn được sử dụng rất phổ biến và rộng rãi với một lượng rất lớn vì nó mang lại hiệu quả phòng trừ cao, rẻ tiền. Tuy nhiên bên cạnh đó, nó cũng gây ra những tác hại rất to lớn đến môi trường và sức khỏe con người, tạo ra sự kháng thuốc với nhiều loại bệnh hại. Vì vậy gây nên nhiều khó khăn trong công tác phòng trừ bệnh.

Để khắc phục những nhược điểm do biện pháp hóa học gây ra như trên, 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 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.

Vi khuẩn *Bacillus* theo nhiều tài liệu đã công bố 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 *Bacillus subtilis* đã được ứng dụng để kiểm soát bệnh cây trồng do nấm gây ra.

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, để phát triển sản phẩm sinh học 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* AS 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, chúng tôi đã thực hiện đề tài luận văn: "**Tinh sạch các hợp chất thứ cấp có hoạt tính kháng nấm từ chủng *Bacillus* phân lập ở Việt Nam**".

2. Mục tiêu của đề tài

- Tinh sạch hợp chất thứ cấp có hoạt tính kháng nấm *F. oxysporum* và *R. solani* từ chủng *B. subtilis* AS.
- Đánh giá tính chất lý hóa của hợp chất được tinh sạch.

3. Nội dung nghiên cứu

- Đánh giá khả năng ức chế sinh trưởng và phát triển của dịch lọc ngoại bào vi khuẩn *B. subtilis* AS đối với hai chủng nấm *F. oxysporum* và *R. solani*.
- Tách chiết và tinh sạch protein có hoạt tính kháng nấm từ dịch lọc ngoại bào vi khuẩn *B. subtilis* AS.
- Đánh giá sự ảnh hưởng của nhiệt độ, proteinase K, ức chế sợi tử bào nấm và nồng độ ức chế tối thiểu lên hoạt tính kháng nấm của protein tinh sạch được.