

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM
VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT

NGUYỄN HUYỀN TRANG

PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN CHỦNG
***PSEUDOMONAS SP.* SINH HOẠT CHẤT KHÁNG**
***VIBRIO SP.* GÂY BỆNH Ở TÔM NUÔI**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Hà Nội – 2014

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM
VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT

PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN CHỦNG
***PSEUDOMONAS SP.* SINH HOẠT CHẤT KHÁNG**
***VIBRIO SP.* GÂY BỆNH Ở TÔM NUÔI**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 60420114

Người hướng dẫn khoa học: TS. NGUYỄN CHÍ THUẬN

Học viên: NGUYỄN HUYỀN TRANG

Hà Nội – 2014

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin tỏ lòng biết ơn chân thành và sâu sắc tới TS. Nguyễn Chí Thuận - Trưởng phòng Công nghệ Phôi - Viện Công nghệ Sinh học đã tận tình hướng dẫn và dìu dắt tôi trong quá trình nghiên cứu và hoàn thành luận án.

Tôi xin chân thành cảm ơn TS. Nguyễn Hoàng Uyên, người đã giúp đỡ và tận tình chỉ bảo tôi trong quá trình thực hiện luận án của mình.

Tôi cũng xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới phòng Đào tạo - Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật, trường Đại học Thái Nguyên và lãnh đạo Viện Công nghệ Sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tạo mọi điều kiện cho tôi hoàn thành luận văn này.

Bên cạnh đó, tôi xin cảm ơn những người thân trong gia đình và bạn bè đã tạo điều kiện, động viên, giúp đỡ tôi cả về vật chất và tinh thần để tôi có thể hoàn thành bản luận văn này.

Một lần nữa tôi xin chân thành cảm ơn!

Hà Nội, ngày 15 tháng 12 năm 2014

Học viên

Nguyễn Huyền Trang

Bảng chữ viết tắt

APW	Alkaline Pepton Water
bp	Base pair
CFU	Colony-Forming Unit
DNA	Deoxyribonucleic acid
IPTG	isopropyl- β -D-thiogalactoside
kb	Kilobase pair
LB	Luria - Bertani
NB	Nutrient broth
PCA	phenazine - 1 carboxylic
PCN	Pyocyanin
PCR	Polymerase Chain Reaction
RNA	Ribonucleic acid
rRNA	Ribosomal ribonucleic acid
SAM	S-adenosylmethionine
TCA	Trichloroacetic acid
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indonyl- β galactosidase

MỤC LỤC

MỞ ĐẦU	4
Chương 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU	6
1.1. Tổng quan về vi khuẩn <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6
1.1.1. Phân loại.....	6
1.1.2 Đặc điểm	7
1.1.3. Cấu trúc gen.....	9
1.1.4. Phương pháp xác định vi khuẩn <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10
1.1.4.1. Phương pháp phân lập vi sinh truyền thống.....	10
1.1.4.2. Phương pháp sinh học phân tử phân loại vi khuẩn	10
1.1.5. Ứng dụng của vi khuẩn <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11
1.2. Hoạt chất pyocyanin	12
1.2.1. Cấu trúc pyocyanin và sự tham gia của các gen.....	12
1.2.2. Hoạt tính kháng khuẩn của pyocyanin	13
1.2.3. Ứng dụng của hoạt chất pyocyanin	14
1.3. Tổng quan về <i>Vibrio sp.</i> gây bệnh ở tôm nuôi	15
1.3.1. Đặc điểm phân loại chủng <i>Vibrio sp</i> gây bệnh trên tôm nuôi	15
1.3.2 Bệnh do vi khuẩn <i>Vibrio sp</i> gây ra trên tôm.....	15
1.3.2.1. Lịch sử phát triển bệnh:.....	15
1.1.2.2 Đặc điểm dịch tễ.....	17
1.3.3. Các phương pháp phòng ngừa và điều trị.....	18
1.3.2.1. Biện pháp phòng bệnh tổng hợp	18
1.3.2.2. Điều trị.....	19
Chương 2: VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP	21
2.1 Vật liệu nghiên cứu	21

2.1.1 Đối tượng nghiên cứu	21
2.1.2 Thiết bị	21
2.1.3 Hóa chất	22
2.1.3.1 Hóa chất sử dụng cho vi sinh:	22
2.1.3.2. Hóa chất sử dụng trong sinh học phân tử:.....	24
2.2 Phương pháp nghiên cứu.....	25
2.2.1. Phương pháp vi sinh	25
2.2.1.1. Phương pháp phân lập vi khuẩn trên môi trường King A.....	25
2.2.1.2 Phương pháp nhuộm tế bào quan sát hình thái của vi khuẩn.....	26
2.2.1.3 Phương pháp xác định hoạt tính enzyme của vi khuẩn.....	26
2.2.1.4. Phương pháp lập kháng sinh đồ	27
2.2.1.5. Phương pháp xác định mật độ vi khuẩn:.....	27
2.2.1.6. Phương pháp tách chiết và xác định sắc tố pyocyanin - PCN [32].....	28
2.2.1.7. Phương pháp xác định ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến sinh khối và nồng độ hoạt chất của vi khuẩn	28
2.2.1.8. Phương pháp xác định khả năng kháng <i>Vibrio sp</i> :	28
2.2.2 Phương pháp sinh học phân tử.....	29
2.2.2.1. Phương pháp tách chiết DNA tổng số.....	29
2.2.2.2. Phương pháp PRC khuếch đại gen.....	30
2.2.2.3. Phương pháp điện di.....	32
2.2.2.4. Phương pháp làm sạch sản phẩm PCR	33
2.2.2.5. Phương pháp tách dòng gen tái tổ hợp (Cloning)	34
2.2.2.6. Phương pháp giải trình tự gen.....	36
Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	38
3.1 Kết quả phân lập và xác định <i>P. aeruginosa</i> bằng phương pháp vi sinh vật	38
3.1.1 Kết quả phân lập vi khuẩn <i>P. aeruginosa</i> trên môi trường King A	38

3.1.2	Kết quả nhuộm Gram.....	39
3.1.3.	Kết quả nghiên cứu hoạt tính enzyme	40
3.1.4.	Kết quả thử hoạt tính kháng kháng sinh	41
3.2.	Kết quả xác định <i>P. aeruginosa</i> bằng phương pháp sinh học phân tử	42
3.2.1.	Kết quả tách chiết DNA tổng số.....	42
3.2.2.	Kết quả PCR gen đặc hiệu <i>P. aeruginosa</i> (PA):	43
3.2.3.	Kết quả PCR gen 16s rRNA	44
3.2.4.	Kết quả tách dòng tái tổ hợp mang đoạn gen 16s rRNA.....	45
3.2.5.	Kết quả giải trình tự gen 16s rRNA và định tên vi khuẩn.....	47
3.3.	Kết quả nghiên cứu khả năng sinh hoạt chất kháng <i>Vibrio sp</i> của <i>P.aeruginosa</i> PS39	51
3.3.1.	Kết quả xác định ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến sinh khối vi khuẩn và nồng độ hoạt chất.	51
3.3.2.	Kết quả xác định khả năng kháng <i>Vibrio</i> của dịch nuôi vi khuẩn và hoạt chất PCN	54
3.3.3.	Xác định nồng độ hoạt chất PCN ức chế <i>Vibrio sp</i>	56
3.3.4.	Kết quả xác định ảnh hưởng nồng độ hoạt chất PCN ức chế <i>Vibrio</i> in vitro	58
	KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	61
	TÀI LIỆU THAM KHẢO	62
	Phụ lục 1	74
	Phụ lục 2	75

MỞ ĐẦU

Trong những năm gần đây, việc sử dụng kháng sinh trong nuôi trồng thủy sản nhằm phòng và hạn chế các bệnh do nhiễm khuẩn ngày càng trở nên phổ biến. Vì vậy, đề kháng kháng sinh do vi sinh vật đã tăng lên rất nhiều, nhưng số kháng sinh mới được đưa vào sử dụng để khắc phục vấn đề lại rất giới hạn. Hiện tượng đa kháng thuốc kháng sinh đang là mối lo không chỉ của người nuôi mà còn của cả các nhà quản lý sức khỏe cộng đồng bởi nó không chỉ làm giảm hiệu quả điều trị mà còn tiềm ẩn nhiều nguy cơ đối với sức khỏe con người. Mặt khác, vì các quan ngại và hạn chế của việc sử dụng kháng sinh trong nuôi trồng thủy sản nên các nghiên cứu đang hướng sự quan tâm đến các chất thay thế có nguồn gốc thiên nhiên, do các chất này không gây đề kháng khuẩn và tồn dư trong vật nuôi cũng như ảnh hưởng tới môi trường.

Pseudomonas sp là vi khuẩn phổ biến được tìm thấy trong đất, nước, hệ vi sinh vật trên da và các môi trường nhân tạo trên khắp thế giới. Chúng là một trong những vi sinh vật có giá trị thương mại và công nghệ sinh học. Trong các chế phẩm sinh học, *Pseudomonas* được sử dụng như probiotic kiểm soát sinh học đối với nấm gây bệnh và vi khuẩn trong nông nghiệp, phẩy khuẩn trong nuôi trồng thủy sản. Các vi khuẩn *Pseudomonas sp* có khả năng tiết nhiều loại sắc tố là các hợp chất có tính kháng khuẩn. Trong đó, các hợp chất phenazine do *Pseudomonas sp* tiết ra môi trường là những hợp chất có phổ kháng khuẩn rộng.

Phenazine là nhóm sắc tố do *Pseudomonas sp* tiết ra bao gồm: pyocyanin PCN (5-N-methyl-1-hydroxyphenazine), phenazine-1-carboxylic (PCA) và phenazine-1-carboxamide. Sắc tố pyocyanin từ *Pseudomonas aeruginosa*, được chiết bằng chloroform, là phenazine có sắc tố màu xanh. Nghiên cứu tách chiết, tính chất và ứng dụng của pyocyanin đã được tiến hành ở nhiều phòng thí nghiệm trên thế giới:

Mĩ (Scott Angell-2006); Đức (Kasozi-2012); Iran (Jamileh Nowroozi-2012); Ấn Độ (Preetha -2010); Thái Lan (Pattamarat Rattanachuy-2010). Sắc tố đã được xác định là có phổ kháng khuẩn rộng [75], chống nấm [55], các *Vibrio sp* gây bệnh trong nuôi trồng thủy sản [66]. Phân lập và điều tra cho thấy pyocyanin có tính kháng mạnh với vi khuẩn *Vibrio sp* như *V. parahaemolyticus* , *V. vulnificus* , *V. alginolyticus* , *V. fluvialis* , *V. Proteolyticus*, *V. harveyi* và do đó nó có thể được ứng dụng cho các chế phẩm sinh học trong nuôi trồng thủy sản.

Đề tài nghiên cứu: “**Phân lập và tuyển chọn chủng *Pseudomonas sp* sinh hoạt chất kháng *Vibrio sp* gây bệnh ở tôm nuôi**” được thực hiện nhằm mục đích phân lập được chủng *Pseudomonas sp* có khả năng sinh hoạt chất kháng *Vibrio* gây bệnh trên tôm nuôi, góp phần điều trị bệnh và giúp tăng năng suất tôm nuôi ở Việt Nam.

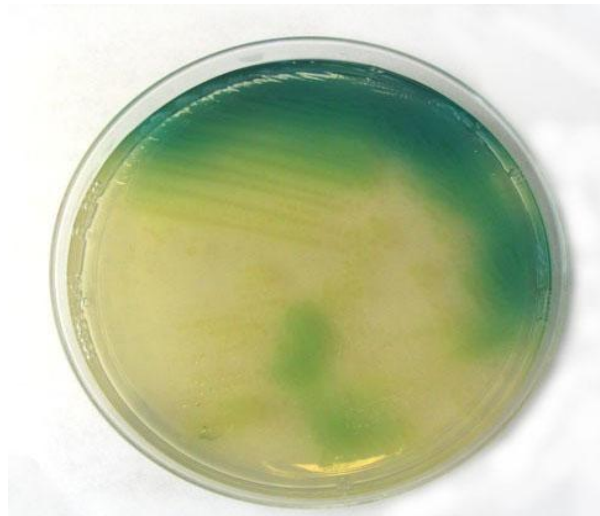
Nhiệm vụ đặt ra cho đề tài là:

1. Phân lập và tuyển chọn chủng *Pseudomonas sp* có khả năng kháng lại vi khuẩn gây bệnh trên tôm nuôi.
2. Sàng lọc chủng *Pseudomonas sp* sinh hoạt chất kháng khuẩn.
3. Giải trình tự gen 16s rRNA, định danh vi khuẩn.

Chương 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Tổng quan về vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas là một chi vi khuẩn xuất hiện ở mọi nơi trong môi trường. Sự biến dưỡng dễ thay đổi và linh động của chúng làm cho chúng có thể sống ở nhiều môi trường khác nhau như nước, đất, trên cây và trong các động vật. Vi khuẩn không chỉ phát triển trong môi trường không khí bình thường, mà còn có thể sống trong môi trường có ít khí oxy, 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. Trong số những loài *Pseudomonas* này, có những loài tiêu biểu có thể được sử dụng trong công nghệ sinh học. Một trong số đó là loài *Pseudomonas aeruginosa*.



Hình 1.1: Khuẩn lạc *P. aeruginosa* trên môi trường King A.

1.1.1. Phân loại

Giới (regnum)	<i>Bacteria</i>
Ngành (phylum)	<i>Proteobacteria</i>
