

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM
VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT**



Nguyễn Phú Tâm

**PHÂN LẬP, ĐÁNH GIÁ ĐA DẠNG VÀ KHẢ NĂNG SINH
KHÁNG SINH CỦA XẠ KHUẨN NỘI SINH TRÊN CÂY MÀNG
TANG TẠI TỈNH PHÚ THỌ**

Chuyên ngành vi sinh vật học

Mã số: 60420103

**LUẬN VĂN THẠC SỸ SINH HỌC
NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC**

TS. Ph íQuyết Tiến

HÀ NỘI - 2016

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan các số liệu và kết quả được công bố trong luận văn là hoàn toàn trung thực, chính xác và chưa được công bố ở bất kỳ công trình nào khác.

Hà Nội, ngày 9 tháng 12 năm 2016

Học viên

Nguyễn Phú Tâm

LỜI CẢM ƠN

Lời đầu tiên, tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành tới TS. Phí Quyết Tiến chủ nhiệm đề tài VAST04.07/16-17 đã hết lòng giúp đỡ, động viên và tạo mọi điều kiện thuận lợi cho tôi trong suốt quá trình học tập, nghiên cứu để hoàn thành luận văn tốt nghiệp.

Tiếp theo, tôi cũng xin được gửi lời cảm ơn tới các thầy, cô của trường Đại học Thái Nguyên, Viện Sinh thái và Tài Nguyên sinh vật và các thầy, cô của Viện Công nghệ sinh học đã nhiệt tình giảng dạy cho tôi trong suốt thời gian tham gia khóa học.

Tôi cũng xin chân thành cảm ơn NCS. Vũ Thị Hạnh Nguyên, NCS. Quách Ngọc Tình và các cán bộ phòng Công nghệ lên men – Viện Công nghệ sinh học đã chỉ bảo nhiệt tình, giúp đỡ và tạo mọi điều kiện để tôi thực hiện luận văn tốt nghiệp.

Cuối cùng, tôi cũng xin chân thành cảm ơn bạn bè, gia đình, những người đã giúp đỡ, động viên và tạo điều kiện cho tôi trong suốt quá trình học tập.

Hà Nội, ngày 9 tháng 12 năm 2016

Học viên

Nguyễn Phú Tâm

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN	ii
DANH MỤC HÌNH	vi
DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU VÀ CHỮ VIẾT TẮT	viii
MỞ ĐẦU	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	3
1.1. Xạ khuẩn nội sinh trên thực vật và cây dược liệu.....	3
1.1.1. Khái niệm xạ khuẩn nội sinh	3
1.1.2. Các phương pháp phân lập xạ khuẩn nội sinh	4
1.1.3. Ứng dụng của xạ khuẩn nội sinh trên thực vật	5
1.1.3.1. Kháng ung thư, kháng viêm.....	5
1.1.3.2. Kiểm soát sinh học.....	7
1.1.3.3. Một số dược chất kháng từ xạ khuẩn nội sinh	7
1.1.4. Tình hình nghiên cứu xạ khuẩn nội sinh.....	9
1.1.4.1. Tình hình nghiên cứu trên thế giới	9
1.1.4.2. Tình hình nghiên cứu ở Việt Nam	10
1.2. Đánh giá đa dạng xạ khuẩn nội sinh trên thực vật.....	12
1.3. Khả năng sinh chất kháng sinh của xạ khuẩn nội sinh trên cây dược liệu.....	15
1.3.1. Chất kháng sinh từ xạ khuẩn nội sinh.....	15
1.3.2. Các gen tham gia vào quá trình tổng hợp kháng sinh và các hợp chất trao đổi thứ cấp.....	17
1.3.2.1. Gen chức năng <i>pks-I</i> , <i>pks-II</i> tham gia tạo polyketide đa vòng thơm	17
1.3.2.2. Gen chức năng <i>nrps</i>	18
1.3.2.3. Đánh giá đa dạng gen mã hóa PKS-I, PKS-II, NRPS	18
1.3.3. Chất kháng sinh và kháng sinh điều trị ung thư nhóm anthracycline	20

1.4. Cây Màng tang và tiềm năng khai thác xạ khuẩn nội sinh trên cây Màng tang	22
2.1. Vật liệu nghiên cứu	24
2.1.1. Mẫu cây Màng tang, chủng giống vi sinh vật.....	24
2.1.2. Hóa chất, enzyme, thiết bị nghiên cứu.....	24
2.1.3. Môi trường nuôi cấy.....	24
2.2. Phương pháp nghiên cứu.....	25
2.2.1. Lấy mẫu cây Màng tang.....	25
2.2.2. Phương pháp xử lý bề mặt mẫu	25
2.2.4. Khuếch đại gen mã hóa PKS-I, PKS-II, NRPS của xạ khuẩn	26
2.2.5. Nghiên cứu đặc điểm sinh học của chủng xạ khuẩn MPT28	26
2.2.5.1. Quan sát đặc điểm hình thái khuẩn lạc, khả năng sinh melanin.....	26
2.2.5.2. Quan sát đặc điểm cuống sinh bào tử và bề mặt bào tử	27
2.2.5.3. Đặc điểm sinh lý, sinh hóa.....	27
2.2.6. Phân loại chủng xạ khuẩn MPT28 dựa trên phân tích trình tự gen 16S rDNA.....	28
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	30
3.1. Phân lập xạ khuẩn nội sinh trên cây Màng tang tại tỉnh Phú Thọ	30
3.2. Sự đa dạng xạ khuẩn nội sinh trên cây Màng tang	32
3.2.1. Đa dạng xạ khuẩn nội sinh theo bộ phận của cây Màng tang.....	32
3.2.2. Đa dạng xạ khuẩn trên cây Màng tang theo môi trường phân lập	33
3.2.3. Đa dạng xạ khuẩn nội sinh đánh giá theo nhóm màu khuẩn ty	34
3.3. Khả năng sinh kháng sinh của các chủng xạ khuẩn nội sinh.....	35
3.3.1. Khả năng kháng vi sinh vật kiểm định của xạ khuẩn	35
3.3.2. Xác định gen mã hóa polyketide synthases (PKS-I, PKS-II) và nonribosomal peptide synthetase (NRPS) tham gia sinh tổng hợp kháng sinh	39

3.3.3. Khả năng sinh tổng hợp chất thuộc nhóm anthracycline.....	41
3.4. Đặc điểm sinh học và phân loại của chủng xạ khuẩn MPT28.....	42
3.4.1. Đặc điểm sinh học chủng xạ khuẩn MPT28.....	43
3.4.1.1. Đặc điểm hình thái và bề mặt chuỗi bào tử.....	43
3.4.1.2. Đặc điểm sinh hóa.....	44
3.4.1.3. Ảnh hưởng của nồng độ muối, pH, nhiệt độ tới khả năng sinh trưởng của xạ khuẩn.....	45
3.4.2. Phân loại dựa trên xác định trình tự gen mã hóa 16S rDNA của chủng xạ khuẩn MPT28.....	46
3.4.2.1. Khuếch đại gen 16S rDNA.....	46
3.4.2.2. Giải trình tự đoạn gen 16S rDNA.....	46
CHƯƠNG 4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	48
4.1. Kết luận.....	48
4.2. Kiến nghị.....	48
PHỤ LỤC.....	57

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Cấu trúc của một số kháng sinh điển hình thuộc nhóm anthracycline: DOX, DNR, EPI và IDA	21
Hình 3.1. Hình ảnh khuẩn lạc các chủng xạ khuẩn nội sinh phân lập trên một số môi trường đặc hiệu sau 6 tuần nuôi cấy.....	30
Hình 3.2. Tỷ lệ xạ khuẩn nội sinh phân bố trên các bộ phận của cây Màng tang	32
Hình 3.3. Tỷ lệ xạ khuẩn nội sinh trên cây Màng tang được phân lập trên các loại môi trường khác nhau	33
Hình 3.4. Tỷ lệ các chủng xạ khuẩn nội sinh được phân theo nhóm màu	35
Hình 3.5. Hoạt tính kháng <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228 (A) <i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778 (B) của các chủng xạ khuẩn nội sinh.....	37
Hình 3. 6. Sản phẩm PCR khuếch đại gen <i>pks-I</i> , <i>pks-II</i> của một số chủng xạ khuẩn nội sinh đại diện	39
Hình 3. 7. Sản phẩm PCR khuếch đại gen <i>nrps</i> của một số chủng xạ khuẩn nội sinh đại diện	40
Hình 3. 8. Hình thái khuẩn lạc (A) trên môi trường ISP1 và bề mặt chuỗi bào tử (B) dưới kính hiển vi quang học có độ phóng đại 7.500 lần của chủng MPT28.....	44
Hình 3.9. Điện di đồ sản phẩm PCR khuếch đại gen 16S rDNA trên gel agarose 1,0%	46

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1. Tổng hợp một số nghiên cứu trên thế giới về các loài xạ khuẩn nội sinh trên thực vật.....	9
Bảng 1.2. Xạ khuẩn mới được phân lập từ các cây dược liệu	14
Bảng 1.3. Các kháng sinh mới từ xạ khuẩn nội sinh	16
Bảng 1.4. Tần xuất xuất hiện gen <i>pks-I</i> , <i>nrps</i> trong các phân nhóm xạ khuẩn khác nhau.....	19
Bảng 2.1. Trình tự cặp mồi được sử dụng trong phản ứng PCR khuếch đại gen 16S rDNA.....	28
Bảng 3.1. Đặc điểm hình thái của các chủng xạ khuẩn nội sinh điển hình phân lập từ mẫu cây Màng tang.....	31
Bảng 3.2. Số liệu thống kê khả năng kháng vi sinh vật kiểm định của 25 chủng xạ khuẩn nội sinh phân lập từ cây Màng tang.....	36
Bảng 3.3. Khả năng kháng vi sinh vật kiểm định của các chủng xạ khuẩn....	37
Bảng 3.4. Khuếch đại gen mã hóa PKS-I, PKS-II, NRPS và khả năng sinh anthracycline của 14 chủng xạ khuẩn nội sinh	41
Bảng 3.5. Khả năng kháng vi sinh vật kiểm định của chủng MPT28	42
Bảng 3.6. Màu sắc khuẩn lạc của chủng MPT28 khi nuôi cấy trên các môi trường khác nhau.....	43
Bảng 3.7. Khả năng đồng hóa nguồn carbon, nitơ của chủng xạ khuẩn MPT28 sau 7-14 ngày nuôi cấy ở 30 °C	44
Bảng 3.8. Ảnh hưởng của nồng độ NaCl, nhiệt độ, pH đến sinh trưởng của chủng MPT28.....	45
Bảng 3.9. Trình tự gen mã hóa 16S rDNA của chủng MPT28.....	47

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU VÀ CHỮ VIẾT TẮT

STT	Từ viết tắt	Tên đầy đủ
1	ACCd	Aminocyclopropane-1-carboxylicacid deaminase
2	ACP	Acyl carrier protein
3	AT	Acyl transferase
4	CA	Citrate acid-agar
5	DAB	Deacetyl baceatin
6	DNA	Deoxyribonucleotide acid
7	DNR	Daunorubicin
8	DOX1	Doxorubicin
9	EPI	Epirubicin
10	HGT	Horizontal gene transfer
11	HV	Humic acid-agar
12	IAA	Indol-3-acetic acid
13	IDA	Idarumycin
14	KS	Ketosynthase
15	MRSA	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
16	NaOCl	Sodium hypochlorite
17	NRPS	Nonribosomal peptide synthetase
18	PKS	Ppolyketide synthase
19	PKS-I	Polyketide synthase I
20	PKS-II	Polyketide synthase II
21	RNA	Ribonucleic acid
22	RA	Raffinose-histidine agar
23	SPA	Sodium propionate-asparagine-salt agar
24	VSV	Vi sinh vật

MỞ ĐẦU

Vi khuẩn gây bệnh có khả năng kháng thuốc kháng sinh là vấn đề nghiêm trọng và thu hút mối quan tâm rất lớn của cộng đồng. Vì vậy, việc nghiên cứu, lựa chọn các tác nhân kháng khuẩn mới từ tự nhiên là ưu tiên hàng đầu của các nhà khoa học và các công ty dược phẩm trên thế giới. Cho đến nay, các nhà khoa học vẫn không ngừng tìm kiếm các nguồn hợp chất tự nhiên khác nhau để phát triển các loại thuốc kháng sinh cũng như các loại thuốc khác nhằm chăm sóc sức khỏe cộng đồng, giảm thiểu những tác dụng phụ tới sức khỏe của người bệnh do một số thuốc tổng hợp hóa học gây ra.

Nhiều nghiên cứu chứng minh thực vật là một nguồn tự nhiên quan trọng trong điều trị các bệnh gây ra bởi vi sinh vật và hỗ trợ điều trị chống ung thư. Chẳng hạn, cây Màng tang (*Litsea cubeba* (Lour.) Pers.) là cây bụi thuộc họ *Lauraceae*, trong quả Màng tang rất giàu tinh dầu, lượng tinh dầu tối đa trong quả là khoảng 5% trọng lượng tươi. Thành phần chính của tinh dầu là citral có hoạt tính sinh học như chống vi khuẩn, chống oxy hóa, diệt côn trùng, kháng khuẩn, chống ung thư. Cây quế (*Cinamomum loureiri*) chứa dược chất trong tinh dầu của lá vỏ cây và quả với 90% là cinnamaldehyde có hoạt tính kháng khuẩn cao đối với cả vi khuẩn Gram (+) và vi khuẩn Gram (-). Ngoài giá trị khoa học, thành phần của cây mang lại, cây dược liệu còn là môi trường cho các xạ khuẩn nội sinh (sống trong các loại mô thực vật) có khả năng sinh tổng hợp chất kháng sinh. Theo các nghiên cứu, ước tính khoảng 70% các kháng sinh có nguồn gốc tự nhiên được sử dụng trong y học lâm sàng hiện nay được sinh tổng hợp bởi xạ khuẩn. Gần đây, một số công bố cho thấy các hợp chất chuyển hóa thứ cấp do xạ khuẩn nội sinh tạo ra trên cây dược liệu không chỉ có số lượng phong phú mà còn có sự đa dạng về chức năng như tính kháng vi sinh vật, chống ôxi hóa, chống sốt rét và kiểm soát sinh học. Tuy nhiên, số lượng các nghiên cứu về xạ khuẩn nội sinh trên cây Màng tang nói riêng và cây dược liệu nói chung tại Việt Nam vẫn còn rất hạn chế. Xuất phát từ những định hướng trên, chúng tôi thực hiện nghiên cứu đề