

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT

=====***=====

PHẠM NHƯ TRỌNG

**PHÂN LẬP NẤM *ASPERGILLUS FLAVUS* VÀ *ASPERGILLUS
PARACITICUS* SINH ĐỘC TỔ TỪ HẠT LẠC**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Hà Nội - 2015

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 NẤM *ASPERGILLUS FLAVUS* VÀ *ASPERGILLUS
PARACITICUS* SINH ĐỘC TỔ TỪ HẠT LẠC**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Chuyên ngành: Vi sinh vật

Mã số: 62 42 40

Người hướng dẫn khoa học: PGS.TS. Phạm Xuân Đà

Học viên:

Phạm Như Trọng

Hà Nội - 2015

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan rằng, số liệu và kết quả nghiên cứu trong khóa luận này là trung thực.

Tôi xin cam đoan rằng, mọi sự giúp đỡ cho việc thực hiện khóa luận này đã được cảm ơn và các thông tin được trích dẫn trong khóa luận này đã được ghi rõ nguồn gốc.

Hà Nội, ngày 20 tháng 12 năm 2015

Người viết báo cáo

Phạm Như Trọng

LỜI CẢM ƠN

Khóa luận tốt nghiệp này được thực hiện tại Khoa Vi sinh - Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm Quốc gia dưới sự hướng dẫn của PGS.TS Phạm Xuân Đà Viện trưởng Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm Quốc gia.

Để hoàn thành đề tài tốt nghiệp này, ngoài sự cố gắng, nỗ lực của bản thân, tôi đã nhận được rất nhiều sự giúp đỡ, quan tâm từ thầy cô, đồng nghiệp, gia đình, bạn bè.

Tôi Xin gửi lời cảm ơn sâu sắc tới PGS.TS Phạm Xuân Đà đã hướng dẫn và tạo điều kiện cho tôi hoàn thành khóa luận này.

Tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành tới các cán bộ Khoa Vi sinh, Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm Quốc gia đã tận tình giúp đỡ và tạo điều kiện thuận lợi cho tôi thực hiện đề tài này.

Và cuối cùng, tôi xin cảm ơn gia đình và bạn bè đã luôn sát cánh bên tôi, chia sẻ, tạo động lực cho tôi trong suốt quá trình học tập, nghiên cứu.

Hà Nội, ngày 20 tháng 12 năm 2015

Người viết báo cáo

Phạm Như Trọng

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN.....	i
MỤC LỤC.....	v
DANH MỤC BẢNG.....	viii
DANH MỤC HÌNH.....	ix
DANH MỤC VIẾT TẮT.....	x
PHẦN THỨ NHẤT - MỞ ĐẦU.....	1
1.1. Đặt vấn đề.....	1
1.2. Mục đích - Yêu cầu.....	2
1.2.1. Mục đích.....	2
1.2.2. Yêu cầu.....	2
PHẦN THỨ HAI - TỔNG QUAN TÀI LIỆU.....	3
2.1. Giới thiệu chung về lạc.....	3
2.1.1. Cấu tạo của lạc.....	3
2.1.2. Giá trị và công dụng của lạc đối với đời sống của con người.....	3
2.2. Nấm mốc sinh độc tố aflatoxin trên lạc.....	4
2.2.1. Các loại nấm sinh aflatoxin trên lạc.....	4
2.2.2. Đặc điểm hình thái.....	4
2.2.3. Các yếu tố ảnh hưởng tới sự sinh trưởng <i>A. flavus</i> và <i>A. parasiticus</i>	6
2.2.4. Điều kiện sinh độc tố.....	7
2.3. Độc tố aflatoxin.....	7
2.2.1. Lịch sử phát hiện aflatoxin.....	7
2.2.2. Định nghĩa.....	8
2.2.3. Cấu tạo và tính chất hóa lý của aflatoxin.....	8
2.2.4. Độc tính của aflatoxin.....	10
2.2.5. Cơ chế tác động của aflatoxin trong cơ thể.....	11
2.2.6. Cơ chế sinh tổng hợp aflatoxin.....	11

2.3. Các phương pháp xác định sự có mặt của độc tố aflatoxin	11
2.3.1. Phương pháp hóa sinh	11
2.3.2. Phương pháp vi sinh.....	11
2.3.3. Phương pháp sử dụng kỹ thuật PCR	12
2.4. Tình hình nghiên cứu về độc tố aflatoxin trên lạc	14
2.4.1. Ngoài nước	14
2.4.2. Trong nước	14
PHẦN THỨ BA - ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU ...	16
3.1. Đối tượng.....	16
3.1.1. Chủng chuẩn nấm <i>Aspergillus</i> và mẫu lạc	16
3.1.2. Dụng cụ và thiết bị	16
3.1.3. Các môi trường chính sử dụng trong quá trình nghiên cứu	16
3.1.4. Hóa chất.....	16
3.2. Phương pháp nghiên cứu.....	17
3.2.1. Phương pháp phân lập nấm mốc <i>A. flavus</i> và <i>A. parasiticus</i>	17
3.2.2. Phương pháp định danh nấm mốc dựa vào hình thái và cấu tạo vi thể ...	19
3.2.3. Phương pháp định danh nấm mốc dựa vào trình tự gen <i>ITS</i>	19
3.2.4. Xác định khả năng sinh độc tố dựa vào phương pháp sắc ký khối phổ... 23	
PHẦN THỨ TƯ - KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	26
4.1. Kết quả phân lập nấm mốc <i>A. flavus</i> và <i>A. parasiticus</i>	26
4.2. Kết quả định danh nấm mốc dựa vào hình thái và cấu tạo vi thể	26
4.4. Kết quả giải trình tự gen <i>ITS</i> định danh nấm <i>A. flavus</i> , <i>A. parasiticus</i>	31
4.4.1. Kết quả tách chiết ADN	31
4.4.2. Kết quả khuếch đại bằng phản ứng PCR đặc hiệu.....	32
4.4.3. Kết quả giải trình tự	33
4.4.4. Kết quả chụp ảnh hiển vi điện tử quét.....	36
4.5. Kết quả phân tích khả năng sinh độc tố aflatoxin bằng sắc ký khối phổ	39

PHẦN NĂM - KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	40
5.1. Kết luận	40
5.2. Kiến nghị.....	40
TÀI LIỆU THAM KHẢO	41
PHỤ LỤC	43

DANH MỤC BẢNG

Bảng 2.1. Đặc điểm hình thái nấm <i>A. flavus</i> và <i>A. parasiticus</i>	5
Bảng 2.2. Công thức phân tử của các aflatoxin và tính chất.....	9
Bảng 3.1. Chương trình gradient của pha động	24
Bảng 3.2. Điều kiện chạy khối phổ	24
Bảng 4.1. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc và cấu tạo vi thể	27
Bảng 4.2. Kết quả định danh nấm <i>A. flavus</i> và <i>A. parasiticus</i>	31
Bảng 4.3. Kết quả đo nồng độ ADN sau khi tách chiết	32
Bảng 4.4. Kết quả tìm kiếm trên ngân hàng gen quốc tế.....	36

DANH MỤC HÌNH

Hình 2.1. Công thức cấu tạo chung của aflatoxin.....	8
Hình 2.2. Trình tự đoạn <i>ITS</i> định danh nấm.....	12
Hình 4.1. Hình thái khuẩn lạc sau 5 ngày nuôi cấy trên môi trường MEA	29
Hình 4.2. Hình thái khuẩn lạc sau 7 ngày nuôi cấy trên môi trường MEA	30
Hình 4.3. Kết quả điện di sản phẩm PCR đoạn <i>ITS</i>	33
Hình 4.4. Trình tự từ nu từ 330 đến nu 590	35
Hình 4.5. Trình tự ADN của nấm M45	35
Hình 4.6. Ảnh hiển vi điện tử quét nấm M50	37
Hình 4.7. Sắc đồ chạy sắc ký khối phổ nấm M45.....	39

DANH MỤC VIẾT TẮT

ADN	: Axid Deoxyribo Nucleic
ARN	: Acid ribonucleic
ELISA	: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EDTA	: Ethylendiamin Tetraacetic Acid
ITS	: Internal Transcribed Spacer
HPLC	: High-performance Liquid Chromatography
MEA	: Malt Extract Agar
PCR	: Polymerase Chain Reaction
TAE	: Tris-acetate-EDTA
TLC	: Thin Layer Chromatography
YEP	: Yeast Extract Peptone