

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN  
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM



**BÙI THỊ HÀ**

**NGHIÊN CỨU XẠ KHUẨN THUỘC CHI *STREPTOMYCES*  
SINH CHẤT KHÁNG SINH CHỐNG NẤM GÂY BỆNH  
TRÊN CÂY CHÈ Ở THÁI NGUYÊN**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC**

THÁI NGUYÊN - 2008

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN  
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM



**BÙI THỊ HÀ**

**NGHIÊN CỨU XẠ KHUẨN THUỘC CHI *STREPTOMYCES*  
SINH CHẤT KHÁNG SINH CHỐNG NẤM GÂY BỆNH  
TRÊN CÂY CHÈ Ở THÁI NGUYÊN**

Chuyên ngành: **Sinh học thực nghiệm**

Mã số: **60.42.30**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC**

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC

**TS. VI THỊ ĐOAN CHÍNH**

THÁI NGUYÊN - 2008

## LỜI CẢM ƠN

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới cô giáo TS. Vi Thị Doan Chính đã tận tình giúp đỡ tôi trong quá trình thực hiện và hoàn thành luận văn này.

Xin chân thành cảm ơn ThS. Nguyễn Phú Hùng và các cán bộ của bộ môn Sinh học thuộc Khoa KHTN & XH - ĐHTN đã nhiệt tình giúp đỡ tôi.

Xin chân thành cảm ơn PGS. TS. Ngô Đình Quang Bính và các cán bộ phòng Di truyền vi sinh học - Viện Công nghệ sinh học thuộc Viện khoa học và công nghệ Việt Nam.

Xin cảm ơn Ban lãnh đạo Trường Đại học Y - Dược Thái Nguyên, Khoa Sinh - KTNN, Khoa Sau Đại học - Trường Đại học Sư phạm - ĐHTN đã tạo nhiều điều kiện để tôi hoàn thành luận văn này.

Xin cảm ơn Ban chủ nhiệm khoa KHCB, Bộ môn Hóa - sinh đã tạo mọi điều kiện cho tôi được học tập và hoàn thành luận văn này.

Tôi xin cảm ơn các thầy cô, bạn bè đồng nghiệp đã động viên, tạo mọi điều kiện giúp đỡ tôi trong suốt quá trình làm luận văn.

Lời cảm ơn sâu sắc nhất tôi xin dành cho gia đình và những người thân yêu của tôi.

## LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của riêng tôi. Các số liệu, kết quả nghiên cứu trong luận văn là trung thực và chưa từng được công bố trong bất kỳ công trình nào khác.

*Thái nguyên, ngày 15 tháng 9 năm 2008*

**Tác giả**

**Bùi Thị Hà**

# MỤC LỤC

Trang

Trang phụ bìa

Lời cảm ơn

Lời cam đoan

Mục lục

Những chữ viết tắt

Danh mục các bảng

Danh mục các hình vẽ, đồ thị

**MỞ ĐẦU**..... 1

## **Chương 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU**

1.1. GIỚI THIỆU VỀ XẠ KHUẨN.....3

1.1.1. Phân bố của xạ khuẩn trong tự nhiên.....3

1.1.2. Đặc điểm hình thái của xạ khuẩn.....4

1.1.3. Sự hình thành bào tử của xạ khuẩn.....5

1.1.4. Cấu tạo của xạ khuẩn.....6

1.2. CÁC PHƯƠNG PHÁP PHÂN LOẠI XẠ KHUẨN HIỆN ĐẠI... ..8

1.2.1. Đặc điểm hình thái và tính chất nuôi cấy.....8

1.2.2. Đặc điểm hóa phân loại (Chemotaxonomy).....9

1.2.3. Đặc điểm sinh lý - sinh hóa.....10

1.2.4. Phân loại số (Numerical taxonomy).....10

1.2.5. Phân loại xạ khuẩn chi *Streptomyces*.....11

1.3. CHẤT KHÁNG SINH TỪ XẠ KHUẨN.....12

1.3.1. Lược sử nghiên cứu chất kháng sinh.....12

1.3.2. Sự hình thành chất kháng sinh ở xạ khuẩn.....15

1.3.3. Các yếu tố ảnh hưởng đến sinh tổng hợp chất kháng sinh.....16

1.4. MỘT SỐ BỆNH HẠI CHÈ DO NẤM GÂY RA VÀ ỨNG DỤNG CỦA

CKS TRONG BẢO VỆ THỰC VẬT.....18

1.4.1. Một số bệnh hại chè do nấm.....	18
1.4.2. Các chất kháng sinh trong bảo vệ thực vật.....	21
<b>Chương 2 - NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU</b>	
2.1. Nguyên liệu và hóa chất.....	24
2.1.1. Nguyên liệu.....	24
2.1.2. Hóa chất, dụng cụ và thiết bị.....	24
2.2. Phương pháp nghiên cứu.....	27
2.2.1. Phương pháp phân lập nấm gây bệnh từ các mẫu chè.....	27
2.2.2. Phân lập và tuyển chọn xạ khuẩn.....	28
2.2.2.1. Phân lập xạ khuẩn theo Vinogradski.....	28
2.2.2.2. Xác định hoạt tính kháng sinh .....	28
2.2.2.3. Tuyển chọn các chủng xạ khuẩn sinh chất kháng sinh.....	29
2.2.3. Bảo quản giống.....	29
2.2.4. Nghiên cứu các đặc điểm sinh học và phân loại xạ khuẩn.....	30
2.2.4.1. Đặc điểm hình thái.....	30
2.2.4.2. Đặc điểm nuôi cấy.....	31
2.2.4.3. Đặc điểm sinh lý - sinh hóa.....	31
2.2.5. Lên men tạo kháng sinh.....	32
2.2.5.1. Lựa chọn môi trường lên men thích hợp .....	32
2.2.5.2. Ảnh hưởng của nguồn cacbon.....	33
2.2.5.3. Ảnh hưởng của nguồn Nitơ.....	33
2.2.6. Các phương pháp sinh học phân tử trong phân lập gen 16S - rRNA...33	
2.2.6.1. Tách chiết DNA của xạ khuẩn bằng đệm CTAB.....	33
2.2.6.2. Khuếch đại gen 16S - rRNA bằng phản ứng PCR.....	34
2.2.6.3. Phương pháp điện di trên gel agarose.....	35
2.2.7. Phương pháp xử lý số liệu.....	36
<b>Chương 3 - KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN</b>	
3.1. Phân lập và thuần khiết các chủng nấm gây bệnh trên chè.....	37

3.2. Phân lập và tuyển chọn xạ khuẩn.....	38
3.2.1. Hoạt tính kháng nấm của các chủng xạ khuẩn.....	38
3.2.2. Tuyển chọn các chủng xạ khuẩn có HTKN cao.....	41
3.3. Đặc điểm sinh học và đặc điểm phân loại của 2 chủng XK Đ1 và R2....	42
3.3.1. Đặc điểm hình thái.....	42
3.3.2. Đặc điểm nuôi cấy.....	43
3.3.3. Đặc điểm sinh lý - sinh hóa.....	45
* Khả năng đồng hóa các nguồn cacbon.....	45
* Nhiệt độ sinh trưởng thích hợp .....	46
* Khả năng chịu muối.....	46
* Khả năng sinh enzym ngoại bào.....	47
3.3.4. Hoạt tính kháng sinh của 2 chủng R2 và Đ1.....	48
3.3.5. Vị trí phân loại của hai chủng xạ khuẩn R2 và Đ1.....	50
3.4. Khả năng sinh tổng hợp CKS của 2 chủng xạ khuẩn đã lựa chọn.....	52
3.4.1. Lựa chọn môi trường lên men thích hợp.....	52
3.4.2. Ảnh hưởng của nguồn cacbon.....	54
3.4.3. Ảnh hưởng của nguồn nitơ.....	56
3.5. Phân loại các chủng xạ khuẩn theo phương pháp sinh học phân tử.....	57
3.5.1. Kết quả tách chiết DNA tổng số của các chủng xạ khuẩn.....	57
3.5.2. Kết quả nhân gen 16S - rRNA bằng phản ứng PCR.....	58
<b>Chương 4 - KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ</b>	
4.1. Kết luận.....	60
4. 2. Kiến nghị về những nghiên cứu tiếp theo.....	61
<b>CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN VĂN.....</b>	<b>62</b>
<b>TÀI LIỆU THAM KHẢO.....</b>	<b>63</b>

## NHỮNG CHỮ VIẾT TẮT TRONG LUẬN VĂN

XK	: Xạ khuẩn
VSV	: Vi sinh vật
CKS	: Chất kháng sinh
HSCC	: Hệ sợi cơ chất
HSKS	: Hệ sợi khí sinh
KTKS	: Khuẩn ty khí sinh
HTKS	: Hoạt tính kháng sinh
HTKN	: Hoạt tính kháng nấm
MT	: Môi trường
KHVQH	: Kính hiển vi quang học
KHVĐT	: Kính hiển vi điện tử
DNA	: Deoxyribonucleic Acid
RNA	: Ribonucleic Acid
ISP	: International Streptomyces Project
TE	: Tris - Ethylendiamin tetracetic acid
SDS	: Sodiumdodecyl sulfat
TAE	: Tris - Acetate - Ethylendiamin tetracetic acid
PCR	: Polymerase chain reaction (phản ứng chuỗi polymerase)



## DANH MỤC CÁC BẢNG

Trang

Bảng 3.1. Đặc điểm một số mẫu chè làm nguồn phân lập các chủng nấm.....	37
Bảng 3.2. Xạ khuẩn có hoạt tính kháng nấm theo nhóm màu.....	39
Bảng 3.3. Tính đối kháng của xạ khuẩn với 3 chủng nấm gây bệnh trên chè.....	40
Bảng 3.4. Hoạt tính kháng nấm của 2 chủng xạ khuẩn.....	41
Bảng 3.5. Đặc điểm nuôi cấy của chủng R2 và Đ1.....	44
Bảng 3.6. Khả năng đồng hóa nguồn cacbon của 2 chủng xạ khuẩn Đ1 và R2....	45
Bảng 3.7. Nhiệt độ sinh trưởng thích hợp của 2 chủng R2 và Đ1.....	46
Bảng 3.8. Khả năng chịu muối của 2 chủng R2 và Đ1.....	47
Bảng 3.9. Hoạt tính kháng sinh của 2 chủng R2 và Đ1 với 3 chủng nấm kiểm định.....	48
Bảng 3.10. So sánh đặc điểm phân loại của chủng R2 với <i>S. misawaensis</i> ....	50
Bảng 3.11. So sánh đặc điểm phân loại của chủng Đ1 với <i>A. brunneofungu</i> .52	
Bảng 3.12: Hoạt tính kháng sinh của 2 chủng xạ khuẩn trên các môi trường lên men khác nhau.....	53
Bảng 3.13. Ảnh hưởng của nguồn cacbon lên khả năng sinh tổng hợp CKS của 2 chủng R2 và Đ1.....	55
Bảng 3.14. Ảnh hưởng của nguồn nitơ lên khả năng sinh tổng hợp CKS của 2 chủng R2 và Đ1.....	56

## DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ

### Trang

Hình 3.1. Ba chủng nấm phân lập từ các mẫu chè bị bệnh.....	38
Hình 3.2. Tỷ lệ các chủng xạ khuẩn có hoạt tính kháng nấm theo nhóm màu.....	39
Hình 3.3. Tỷ lệ các chủng xạ khuẩn có hoạt tính kháng nấm.....	40
Hình 3.4. Hoạt tính kháng nấm của 2 chủng xạ khuẩn lựa chọn.....	42
Hình 3.5. Cường sinh bào tử và bề mặt bào tử chủng R2.....	42
Hình 3.6. Cường sinh bào tử và bề mặt bào tử chủng Đ1.....	43
Hình 3.7. Khả năng hình thành sắc tố melanin của 2 chủng.....	44
Hình 3.8. Hoạt tính enzym của các chủng xạ khuẩn.....	47
Hình 3.9. Hoạt tính kháng 3 chủng nấm kiểm định của 2 chủng Đ1 và R2....	49
Hình 3.10: Ảnh hưởng của môi trường đến khả năng tổng hợp CKS .....	54
Hình 3.11: Ảnh hưởng của nguồn cacbon đến khả năng tổng hợp CKS.....	55
Hình 3.12 : Ảnh hưởng của nguồn nitơ đến khả năng tổng hợp CKS.....	57
Hình 3.13. Ảnh điện di DNA tổng số của 2 chủng xạ khuẩn.....	58
Hình 3.14. Ảnh điện di sản phẩm PCR của 2 chủng xạ khuẩn nghiên cứu.....	59