

XÁC ĐỊNH VI KHUẨN SINH SẮC TỔ ĐỎ *SERRATIA MARCESCENS* TRONG THỰC PHẨM

Đến tòa soạn 12 - 7 – 2017

**Nguyễn Thành Trung, Phạm Như Trọng, Tạ Thị Yên,
Đặng Thị Oanh, Lê Thị Hồng Hảo**
Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm Quốc gia

SUMMARY

METHOD FOR IDENTIFICATION OF PRODIGIOSIN-PRODUCING *SERRATIA MARCESCENS* IN FOOD

Some undercooked foods including pork, egg, and steamed rice turned red by the prodigiosin pigments which were found in Ha Tinh, Nghe An, Quang Ngai province and Hanoi. This might be the result of contamination and growth of some bacteria strains such as Serratia marcescens, Vibrio psychroerythrus or Hahella chejuensis. This study based on conventional method to isolate prodigiosin-producing bacteria, then isolated colonies were named by using 16S ribosomal gene sequencing technique. The results revealed that prodigiosin-producing isolates are Serratia marcescens. Furthermore, isolated colonies were spiked on meat, eggs, and steamed rice in vitro showed that formation and spread of red pigment on meat at room temperature and decomposition of meat in 72 hours as well.

1. MỞ ĐẦU

Bảo quản thực phẩm đúng quy cách là rất cần thiết đặc biệt với thực phẩm đã qua chế biến. Nguy cơ ô nhiễm các vi sinh vật rất dễ xảy ra với thực phẩm chín. Các vi sinh có mặt ở khắp mọi nơi, từ vi sinh vật chỉ điểm vệ sinh trong môi trường không khí, vi sinh vật ô nhiễm từ dụng cụ bao gói, chế biến cũng như tay người. Thực phẩm bị nhiễm vi sinh vật ảnh hưởng rất

nhiều đến sức khỏe và có nguy cơ truyền các mầm bệnh cho người sử dụng. Các vi sinh vật dễ nhiễm vào thực phẩm thường gặp như *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Staphylococci*, nấm men, nấm mốc.

Serratia marcescens là một loài trực khuẩn hình que Gram âm, kỵ khí tùy nghi, thuộc họ *Enterobacteriaceae*. Loài vi khuẩn này thường được tìm thấy trong đất, nước, thực vật và động

vật. Phương thức lây truyền của vi khuẩn này lên người bằng cách trực tiếp hoặc gián tiếp qua các dụng cụ. *Serratia marcescens* có thể gây nên bệnh viêm phổi, nhiễm trùng huyết, viêm màng não và áp xe não, nhiễm trùng đường tiết niệu, nhiễm trùng mắt. Chúng xâm nhập vào thức ăn từ môi trường không khí và nước. *S. marcescens* sinh sắc tố đỏ là prodigiosin. Quá trình sinh sắc tố có liên quan mật thiết đến nhiệt độ và quá trình này bị ức chế tại nhiệt độ lớn hơn 37°C [2].

Thực phẩm biến thành màu đỏ tạo một tâm lý không tốt trong xã hội và gây khó khăn trong công tác quản lý an toàn thực phẩm. Do đó, phân lập và xác định nhóm vi sinh hình thành sắc tố đỏ rất cần thiết và quan trọng.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Thịt, trứng và cơm bị biến màu đỏ tại tỉnh Hà Tĩnh, Nghệ An, Quảng Ngãi và thủ đô Hà Nội từ năm 2014 đến 2016.

Thịt, trứng và gạo không có màu đỏ mua tại siêu thị.

2.2. Vật liệu, hóa chất

Các hóa chất và vật liệu sử dụng trong nghiên cứu gồm: Tryptone Soy Agar (TSA), Nutrient Agar (NA), Thuốc nhuộm gram, API 20E, Master mix PCR, RED GEL, AGAROSE.

2.3. Chuẩn chủng và chất chuẩn

Các chủng chuẩn được sử dụng gồm *Serratia marcescens* ATCC 13880; *Escherichia coli* ATCC 25922 và thang chuẩn ADN 100bp.

2.4. Phương pháp nghiên cứu

2.4.1. Phân lập vi khuẩn sinh sắc tố đỏ

Vi khuẩn sinh sắc tố đỏ có trong thực phẩm (thịt, trứng và cơm) được phân lập qua nhiều bước trên thạch chọn lọc và thạch dinh dưỡng để thu được các khuẩn lạc sinh sắc tố đỏ riêng rẽ [1][3].

Tiến hành nuôi cấy tại nhiệt độ 25°C/24-48h.

2.4.2. Xác định sự hình thành sắc tố đỏ của vi khuẩn trên mẫu thực phẩm và môi trường nuôi cấy

Khuẩn lạc sau khi phân thử nghiệm khả năng hình thành màu đỏ trên thạch TSA: 4°C, 22°C, 25°C, 37°C khoảng 24 đến 48h.

Khuẩn lạc sau khi phân lập được nhiễm vào các mẫu thịt, trứng và cơm đã nấu chín, sau đó ủ trong các điều kiện nhiệt độ khác nhau: 4°C, 22°C, 25°C, 37°C

2.4.3. Xác định vi khuẩn bằng nhuộm gram và thử sinh hóa

Các khuẩn lạc có màu đỏ trên môi trường thạch TSA được tiến hành nhuộm gram, sau khi xác định về mặt cấu trúc qua kính hiển vi, các khuẩn lạc này được tiếp tục tiến hành thử một số tính chất sinh hóa (Kit API 20E).

2.4.4. Khuếch đại đoạn gen 16s, giải trình tự

- Chủng được phân lập nuôi trên môi trường TSA qua đêm thu sinh khối và tiến hành chạy phản ứng PCR với trình tự mồi 16S rRNA.

Tên	Primer
16S rRNA Rev	5'- ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT - 3'
16S rRNA for	5' - AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG - 3'

- Chu trình chạy PCR:

Các bước	Nhiệt độ/thời gian	Chu kỳ
Biến tính ban đầu	96°C/6 phút	35 chu kỳ
Biến tính	94°C/40 giây	
Gắn mồi	56°C/ 1 phút	
Kéo dài	72°C/1 phút 30 giây	
Kết thúc	72°C/10 phút	

- Sản phẩm PCR được điện di kiểm tra và tinh sạch.

- Sản phẩm tinh sạch PCR được giải trình tự theo phương pháp Sanger và so sánh với ngân hàng gen bởi công cụ BLAST

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Phân lập vi khuẩn sinh sắc tố đỏ từ thịt và trứng

Các mẫu thịt, trứng và cơm màu đỏ được thu thập từ các chi cục An toàn thực phẩm các tỉnh Nghệ An, Hà Tĩnh, Quảng Ngãi và Hà Nội. Các chấm đỏ trên thịt, trứng và cơm lan dần theo thời gian (Hình 1).

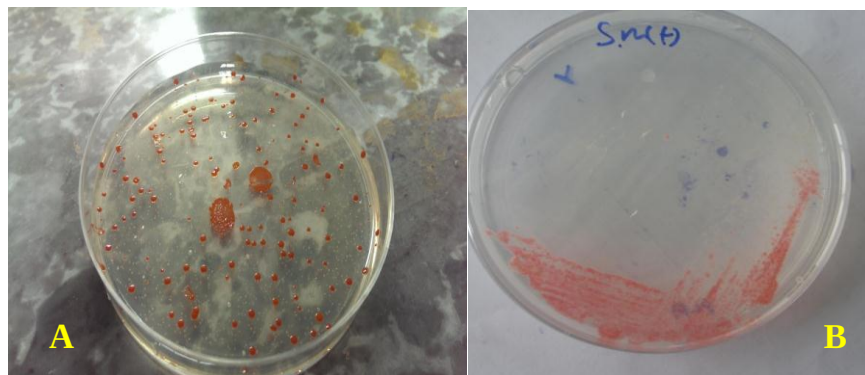
Vi khuẩn sinh màu đỏ trong thịt và trứng được phân lập dần qua từng bước thu được khuẩn lạc riêng rẽ và có đặc điểm hình thái khuẩn lạc điển hình (nhảy, lồi, sinh sắc tố đỏ) giống với chủng chuẩn (Hình 2).

3.2. Kết quả thử khả năng sinh màu của vi khuẩn đã phân lập tại các nhiệt độ khác nhau

Vi khuẩn phân lập hình thành sắc tố đỏ tốt nhất ở 25°C/18h. Vi khuẩn không sinh sắc tố ở 37°C/72h, tuy nhiên vi khuẩn tăng sinh khối rất mạnh tại nhiệt độ này. Vi khuẩn không sinh trưởng ở 4°C/72h.



Hình 1. Mẫu thịt đỏ, trứng đỏ, cơm đỏ lấy tại Hà Tĩnh, Nghệ An, Quảng Ngãi



Hình 2. Khuẩn lạc đỏ phân lập từ Thịt (A) và Chủng chuẩn *S. marcescens* (B)

3.3. Kết quả thử sinh hóa

Kết quả nhuộm gram trên các khuẩn lạc nghi ngờ đều tương đồng nhau: gram âm (-), hình que, di động.

Kết quả chạy phản ứng sinh hóa trên API cho thấy có một số sự khác biệt giữa chủng chuẩn và khuẩn lạc phân lập.

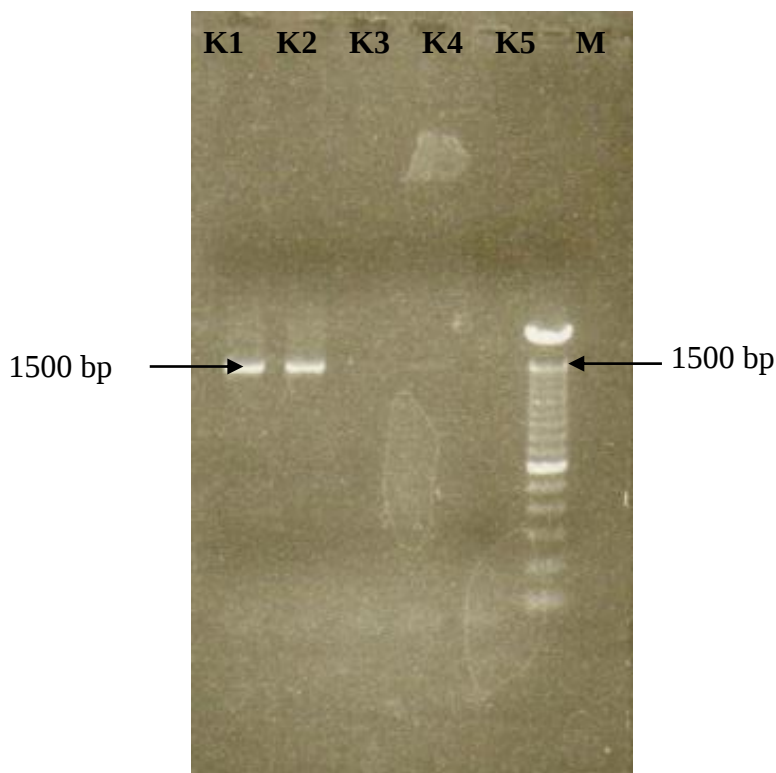
Từ các kết quả về hình thái và thử sinh hóa cho thấy các khuẩn lạc nghi ngờ thuộc chi *Serratia*, tuy nhiên để khẳng định loài vi khuẩn sinh sắc tố đỏ thì cần có các bước tiến hành tiếp theo về kiểu gen.

3.4. Kết quả chạy PCR – khuếch đại đoạn gen 16S

Các khuẩn lạc được tiến hành chạy PCR với cặp mồi 16S rRNA Rev và 16S rRNA for, với chiều dài đoạn khuếch đại là 1500bp (Hình 3).

3.5. Kết quả giải trình tự

Đoạn gen khuếch đại được tiến hành giải trình tự và cho kết quả chủng vi khuẩn sinh sắc tố đỏ trong thịt là chủng *Serratia marcescens*, có độ tương đồng 99% (Hình 4).



Hình 3: Kết quả khuếch đại đoạn gen 16S: M: Thang chuẩn 100bp, K1-K5: Khuẩn lạc đỏ từ thịt và trứng

Serratia marcescens subsp. marcescens Db11, complete genome
Sequence ID: [reflNZ_HG326223.1](#) Length: 5113802 Number of Matches: 7

Range 1: 4260312 to 4260736 GenBank Graphics					▼ Next Match ▲ Previous Match
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
749 bits(405)	0.0	419/425(99%)	3/425(0%)	Plus/Minus	
Features: rRNA-16S ribosomal RNA					
Query 1	GCGGTAG--C-AGGGAGCTTGCCTCCCGGGTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTCT				57
Sbjct 4260736	GCGGTAGCACAAAGGAGCTTGCCTCCCTGGGTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTCT				4260677
Query 58	GGGAAGCTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGT				117
Sbjct 4260676	GGGAAGCTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGT				4260617
Query 118	CGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCCTCTTGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATT				177
Sbjct 4260616	CGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCCTCTTGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATT				4260557
Query 178	AGCTAGTAGGTGGGGTAATGGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATG				237
Sbjct 4260556	AGCTAGTAGGTGGGGTAATGGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATG				4260497
Query 238	ACCAGCCCACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAT				297
Sbjct 4260496	ACCAGCCCACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAT				4260437
Query 298	ATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGG				357
Sbjct 4260436	ATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGG				4260377
Query 358	TGTAAAGCACTTTCAGCGAGGAGGAAGGTGGTGAGCTTAATACGCTCATCAATTGACGT				417
Sbjct 4260376	TGTAAAGCACTTTCAGCGAGGAGGAAGGTGGTGAGCTTAATACGCTCATCAATTGACGT				4260317
Query 418	TACTC 422				
Sbjct 4260316	TACTC 4260312				

Hình 4. Kết quả giải trình tự đoạn gen 16S khuẩn lạc đồ phân lập từ thịt

4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

4.1. Kết luận

- Phân lập và xác định được các chủng *S. marcescens* trong mẫu thịt, trứng và cơm
- Đánh giá được khả năng sinh sắc tố đỏ và điều kiện tối ưu hình thành sắc tố đỏ của chủng phân lập.

4.2. Kiến nghị

Phòng thí nghiệm đã phân lập được các chủng *Serratia marcescens* trong thực phẩm và đã đánh giá được khả năng sinh sắc tố đỏ trong thực phẩm và trên thạch nuôi cấy. Tuy nhiên, phòng thí nghiệm chưa có điều kiện tiếp tục nghiên cứu về dịch tễ học của *Serratia marcescens* tại Việt Nam và khả năng kháng kháng sinh của các chủng nhằm kiểm soát, ngăn ngừa các bệnh do *S. marcescens* gây nên.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Giles M., H-M. Harwood^b, D.A. Gosling^c, D. Hennessy^c, C.T. Pearce^c, A.J. Daley. (2006) "What is

the best screening method to detect *Serratia*

marcescens colonization during an outbreak in a neonatal intensive care nursery?". *Journal of Hospital Infection*, 62, 349-352.

2. Wu Yen-Mu, Po-Chang Hsu, Chien-Chang Yang, Hong-Jyun Chang, Jung-Jr Ye, Ching-Tai Huang, Ming-Hsun Lee. (2013)

Serratia marcescens meningitis: Epidemiology, prognostic factors and treatment outcomes. *Journal of Micro., Immuno. and infect.* 46, 259-265.

3. Zang Chi-Zong, Chiung-Wen Yeh, Wei-Feng Chang, Chia-Chi Lin, Shu-Chen Kan, Chwen-Jen Shieh, Yung-Chuan Liu. (2014)

Identification and enhanced production of prodigiosin isoform pigment from *Serratia marcescens* N10612. *Journal of Chem. Egi.* 45:1133-1139.