

ỨNG DỤNG KỸ THUẬT PCR PHỤC VỤ KIỂM ĐỊNH *SALMONELLA* TRONG NƯỚC MẶT Ô NHIỄM

Lê Đức Mạnh, Nguyễn Thị Hương Giang

Viện Công nghiệp Thực phẩm, 301-Nguyễn Trãi, Thanh Xuân, Hà Nội

1. Tóm tắt

Vấn đề ô nhiễm nước mặt, đặc biệt là ô nhiễm bởi nước thải của các nhà máy và nước thải sinh hoạt đang là vấn đề bức xúc tại Việt Nam. Khu hệ vi sinh vật nước ô nhiễm rất đa dạng về chủng loại và gây nhiều khó khăn cho việc đánh giá các chỉ tiêu vi sinh vật. Với *Salmonella*, các kỹ thuật vi sinh thường quy cho tỷ lệ dương tính giả cao do nhiều vi sinh vật có thể cùng thể hiện những tính như *Salmonella* khi đánh giá. Bài báo đề cập và so sánh kết quả kiểm định chỉ tiêu *Salmonella* theo kỹ thuật thường quy và PCR. Kết quả cho thấy kỹ thuật PCR có thể được ứng dụng hữu hiệu và cho độ đặc hiệu cao hơn khi kiểm định chỉ tiêu *Salmonella* trong khu hệ phức tạp. Tuy nhiên, sự can trọng là cần thiết khi đánh giá kết quả thu nhận được do khả năng dương tính giả vẫn hiện hữu và sự có mặt của khu hệ vi sinh vật đa dạng có thể làm giảm độ nhạy của phương pháp. Trong trường hợp nghi vấn, PCR có thể được sử dụng như test khẳng định *Salmonella*.

Từ khóa: *Nước mặt, ô nhiễm, vi sinh vật, Salmonella, PCR*

2. Mở đầu

Hiện nay vấn đề ô nhiễm sông ngòi, ao hồ, đặc biệt là ô nhiễm bởi nước thải của các nhà máy và nước thải sinh hoạt đang là vấn đề bức xúc tại Việt Nam. Ô nhiễm từ nước thải không chỉ ảnh hưởng tới sức khỏe cộng đồng mà còn ảnh hưởng trực tiếp đến sản xuất, đặc biệt tại các nhà máy sản xuất và chế biến thực phẩm. Để đảm bảo môi trường sản xuất sạch các thông số vệ sinh cần được quan tâm, trong đó có các thông số về chất lượng nước trước và sau xử lý. Một nhóm vi sinh vật được quan tâm nhiều là *Salmonella* do khả năng gây bệnh cho người và vật nuôi. *Salmonella* là trực khuẩn Gram âm, kích thước trung bình $3,0 \times 0,5 \mu\text{m}$, có nhiều tiêm mao xung quanh thân (trừ *S. gallinarum* và *S. pullorum* gây bệnh ở gà vịt). Giống như các vi khuẩn đường ruột khác, *Salmonella* thuộc nhóm hiếu kỵ khí tùy tiện. Về tính chất sinh lý, *Salmonella* không lên men đường lactoza nhưng lên men đường glucoza và sinh hơi, sử dụng được citrat ở môi trường Simmons, catalaza (+), oxidaza (+), lysin decacboxylaza (+), ONPG (+), ureaza (-), RM (+), VP(-), H_2S (+) [2]. Dựa trên cấu trúc kháng nguyên, *Salmonella*

được chia thành các nhóm và các typ huyết thanh khác nhau. Người ta đã tìm được gần 70 yếu tố kháng nguyên O ở *Salmonella*. Kết hợp với kháng nguyên H có mặt ở hầu hết *Salmonella*, có thể thu được trên 1500 typ huyết thanh. Kháng nguyên K chỉ có ở *S. typhi* và *S. paratyphi* [2]. *Salmonella typhi* và *S. paratyphi* là tác nhân gây bệnh thương hàn [1].

Khu hệ vi sinh vật nước mặt ô nhiễm rất đa dạng về chủng loại và gây khó khăn cho việc đánh giá các chỉ tiêu vi sinh vật. Với *Salmonella*, các kỹ thuật vi sinh thường quy cho tỷ lệ dương tính giả cao do nhiều vi sinh vật có thể cùng thể hiện những tính như *Salmonella* khi đánh giá. Bài báo này đề cập tới việc ứng dụng kỹ thuật sinh học phân tử nhằm nâng cao độ chính xác của các xét nghiệm vệ sinh môi trường và chất lượng nước.

3. Nguyên vật liệu và phương pháp

3.1. Mẫu phân tích

Mẫu nước mặt được lấy ở hồ, ao thuộc nhiều địa điểm khác nhau của thành phố Hà Nội (Bảng 1). Các mẫu được lưu trữ đầy kín trong ống 50 ml và bảo quản trong điều kiện lạnh (trong đá) cho tới khi phân tích vi sinh (sau 3h).

Bảng 1. Danh sách mẫu nước mặt ô nhiễm trên địa bàn Hà Nội sử dụng trong nghiên cứu

Mẫu	Địa điểm lấy mẫu
1	Hồ Làng Phùng Khoan, (hồ 1)
2	Hồ Làng Phùng Khoan, (hồ 3)
3	Hồ ở gần nhà máy bóng đèn phích nước Rạng Đông
4	Sông Kim Giang
5	Hồ Linh Đàm (hồ 1)
6	Hồ Linh Đàm (hồ 2)
7	Hồ Linh Đàm (hồ 3)
8	Sông Tô Lịch (đoạn Đại Kim)
9	Nước Cống Định Công
10	Hồ Định Công (hồ 2)
11	Hồ Định Công (hồ 3)
12	Sông Tô Lịch (đoạn Cầu Mới)

3.2. Xác định *Salmonella* trong nước mặt ô nhiễm bằng phương pháp thường quy

Phương pháp xác định *Salmonella* thường quy bao gồm các bước tăng sinh, tăng sinh chọn lọc, phân lập và nhận diện. ở bước tăng sinh, 25 ml mẫu được chuyển vào túi PE vô trùng sau đó bổ sung 225 ml dung dịch BPW, đồng nhất mẫu và ủ ở 37°C. Bước tăng sinh chọn lọc được thực hiện sau 18 - 24 giờ bằng cách chuyển 0,1ml dịch tăng sinh đã trộn đều sang 10 ml môi trường tăng sinh Rappaport-Vassliadis (RV). Sau đó, chúng được ủ ở 42 ± 0,2°C trong 12 -24 giờ. Tiếp theo, các khuẩn lạc đơn được phân lập bằng que cấy từ môi trường tăng sinh chọn lọc lên đĩa môi trường chọn lọc phân biệt đặc trưng cho *Salmonella* (MLCB [3]). Tất cả các đĩa môi trường sau khi cấy được ủ ở 37°C trong 22 - 24 giờ. Trên môi trường MLCB khuẩn lạc *Salmonella* có màu đen. Các khuẩn lạc có đặc điểm như trên được khẳng định bằng các thử nghiệm sinh hoá trên môi trường TSI và LIM. Môi trường TSI có thể xác định được khả năng lên men của các loại đường glucoza, lactoza, sucroza và khả năng sinh khí H₂S. Môi trường LIM xác định khả năng phản ứng lysin, Indol, khả năng dịch chuyển. Ngoài ra, để so sánh phương pháp, trong nghiên cứu này, các khuẩn lạc cũng được kiểm tra bằng kỹ thuật PCR.

3.3. Xác định *Salmonella* trong nước mặt ô nhiễm bằng kỹ thuật PCR

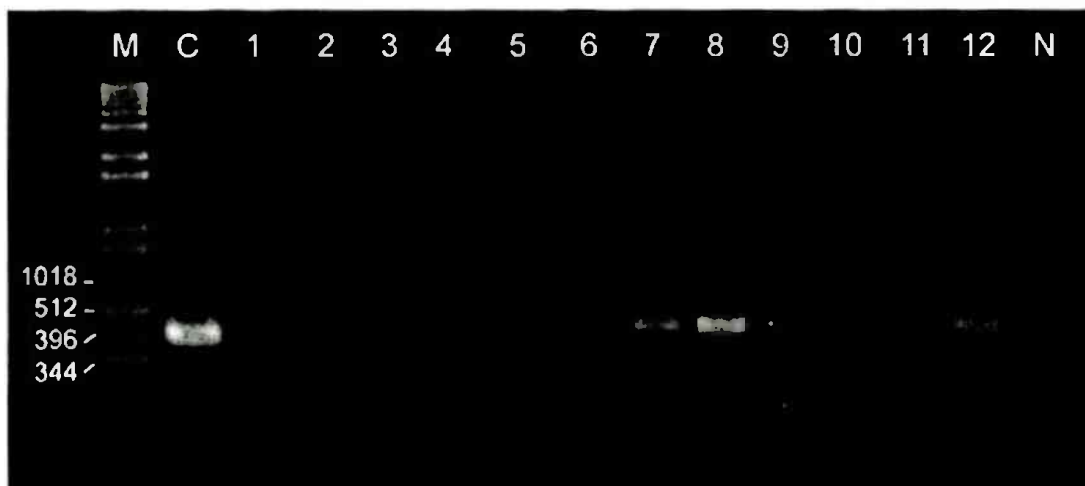
Trong phương pháp này, mẫu phẩm được làm giàu không chọn lọc, sau đó sinh khối vi sinh vật được sử dụng làm khuôn cho PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu cho *Salmonella*. Tương tự như trên, hệ vi sinh vật được làm giàu bằng cách chuyển 25ml mẫu sang túi PE vô trùng, bổ sung 225 ml dung dịch BPW, đồng nhất mẫu và ủ ở 37°C trong 18 - 24 giờ. Vì *Salmonella* là vi khuẩn Gram âm, có thành tế bào tương đối mỏng do vậy có thể dễ dàng bị phá hủy khi đun sôi ở 100°C trong 15 phút. Canh trường đun sôi được dùng trực tiếp làm khuôn cho phản ứng PCR. Trường hợp không tiến hành phản ứng ngay, ADN khuôn được bảo quản trong tủ -20°C. Các mồi Salm3 (5'-GCTGCGCGCAACGGCG AAG-3') và Salm4 (5'-TCCCGGCAGAGTTCCATT-3') được sử dụng. Hai mồi này sẽ nhân một đoạn 389 cặp bazơ của phần bảo thủ trong gen *invA*, một gen quan trọng của *Salmonella* spp. cho quá trình xâm nhiễm tế bào (*inv*=invasive) [5]. Cặp mồi này đã được các nhà khoa học Italia sử dụng trước đó để phát hiện *Salmonella* spp.[5]. Chu trình nhiệt của phản ứng PCR bao gồm bước biến tính ở 95°C trong 2 phút kế tiếp là 35 chu kỳ nhiệt (94°C - 40 giây, 62°C- 40 giây, 72°C- 40 giây) và bước hoàn thiện ở 72°C trong 7 phút. Sản phẩm PCR được phân tách trên gel agarose 1,5% với dung dịch đệm là 1×TAE ở hiệu điện thế 100V và cường độ dòng điện 80mA. Gel sau đó được nhuộm bằng dung dịch ethidium bromide 0,5 mg/l và quan sát dưới ánh sáng cực tím.

4. Kết quả và bàn luận

4.1. So sánh kết quả kiểm định *Salmonella* thường quy và bằng PCR đối với mẫu phẩm

Các mẫu nước mặt bị ô nhiễm (Bảng 1) được phân tích đồng thời bằng kỹ thuật kiểm định *Salmonella* thường quy và bằng phương pháp PCR như đã trình bày ở trên. Kết quả được trình bày trong Bảng 2. Tất cả 12 mẫu phân tích đều cho kết quả dương tính khi làm giàu bằng RV, tuy nhiên chỉ có 4 mẫu cho kết quả dương tính trên MLCB. Điều này phần nào cho thấy sự phức tạp của hệ vi sinh vật nước mặt bị ô nhiễm. Thông thường, trong kiểm định thực phẩm, tần suất dương tính với RV tương đối thấp và những mẫu dương tính với RV đã thể hiện nguy cơ cao. Chỉ những khuẩn lạc cho kết quả dương tính trên MLCB mới được phân tích tiếp bằng TSI và LIM như kỹ thuật phân tích *Salmonella* thường quy yêu cầu. Kết quả kiểm tra bằng TSI và LIM trùng khớp với kết quả mà môi trường MLCB đem lại. Như vậy, theo phân tích thường quy có thể kết luận có 4 mẫu dương tính với *Salmonella*, đó là các mẫu 3, 7, 8 và 12.

Ngoài kỹ thuật thường quy, các mẫu nước cũng được phân tích đồng thời bằng kỹ thuật PCR. Kết quả kiểm định bằng PCR cho thấy có 3 mẫu nước dương tính với *Salmonella* và trùng với kết quả theo đánh giá thường quy (Hình 1, Bảng 2). Khác biệt duy nhất là mẫu số 3 cho kết quả âm tính khi xác định bằng PCR nhưng dương tính với đánh giá thường quy. Điều này cho thấy độ tương đồng cao giữa hai phương pháp. Thông thường phương pháp PCR được đánh giá là có độ tin cậy cao hơn [4, 5] và như vậy phân tích bằng PCR sẽ giảm thiểu được số lượng dương tính giả. Những mẫu nhiễm *Salmonella* là những mẫu nước từ Hồ Linh Đàm, Sông Tô Lịch (đoạn Đại Kim), sông Tô Lịch (đoạn Cầu Mới).



Hình 1. Sản phẩm PCR sử dụng mồi Salm3 và Salm4 đối với các mẫu nước mặt bị ô nhiễm sau khi làm giàu không chọn lọc. M- thang ADN chuẩn (1Kb, Invitrogen); C - Chủng *Salmonella* chuẩn; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 - các mẫu nước ở các vùng khác nhau; N - sản phẩm PCR không có ADN khuôn

Bảng 2. Kết quả phân tích *Salmonella* của các mẫu nước mặt ô nhiễm ở nhiều vùng khác nhau thuộc địa bàn Hà Nội

Mẫu	Phương pháp vi sinh									Kết luận theo kỹ thuật vi sinh	Kết luận theo PCR
	RV	MLCB	TSI				LIM				
			Glucosa	Lactosa	Sucrosa	H ₂ S	Lysine	Indol	Chuyển động		
1	+	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
2	+	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
3	+	+	+	-	-	+	+	-	+	<i>Salmonella</i>	-
4	+	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
5	+	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
6	+	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
7	+	+	+	-	-	+	+	-	+	<i>Salmonella</i>	<i>Salmonella</i>
8	+	+	+	-	-	+	+	-	+	<i>Salmonella</i>	<i>Salmonella</i>
9	+	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
10	+	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
11	+	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
12	+	+	+	-	-	+	+	-	+	<i>Salmonella</i>	<i>Salmonella</i>

Chú thích: "nd" - không tiến hành kiểm tra; "-" - âm tính; "+" - Dương tính

4.2. Khả năng sử dụng phương pháp PCR trong test khẳng định *Salmonella*

Ứng dụng PCR trong phân tích nước mặt ô nhiễm cũng không phải hoàn toàn không có sai số. Một số mẫu phẩm đem lại những băng không đặc hiệu và có thể ảnh hưởng tới kết quả đánh giá (Hình 1, bảng 2, 3, 11). Sự có mặt của những băng này về lý thuyết có thể làm giảm độ nhạy của phương pháp (cạnh tranh khuôn trong PCR) và thậm chí là dương tính giả (nếu sản phẩm không đặc hiệu có cùng kích thước với sản phẩm đích). Trong trường hợp nghi vấn có thể tiến hành làm giàu chọn lọc và áp dụng kỹ thuật PCR để khẳng định những khuẩn lạc nghi ngờ. Nhằm kiểm tra khả năng khẳng định của phương pháp PCR chúng tôi tiến hành thử nghiệm một loạt những khuẩn lạc dương tính trên môi trường MLCB và sau đó kiểm tra đồng thời bằng TSI, LIM và bằng kỹ thuật PCR. Để thực hiện điều này, 9 khuẩn lạc mẫu đen có hình thái tương đối khác nhau trên môi trường MLCB của mẫu số 8 được kiểm tra. Kết quả kiểm tra sinh hóa của 9 khuẩn lạc đều đưa đến kết quả tương đồng với chủng chuẩn và có

thể kết luận là *Salmonella* (Bảng 3). Tuy nhiên chỉ có 5 khuẩn lạc được khẳng định là *Salmonella* bằng PCR. Kết quả thử nghiệm với khuẩn lạc tỏ ra đặc hiệu hơn nhiều so với khi đánh giá cả khu hệ (Hình 2, Hình 1). Như vậy, trong trường hợp nghi vấn, kỹ thuật PCR tỏ ra rất hữu hiệu trong test khẳng định *Salmonella*.

Bảng 3. Kết quả test sinh hóa của các khuẩn lạc nghi ngờ và khẳng định bằng PCR

Khuẩn lạc số	Test sinh hóa							Kết luận theo test sinh hóa	Kết luận theo PCR
	TSI				LIM				
	Glucoza	Lactoza	Sucrosa	H ₂ S	Lysine	Indol	Chuyển động		
1	+	-	-	+	+	-	+	<i>Salmonella</i>	<i>Salmonella</i>
2	+	-	-	+	+	-	+	<i>Salmonella</i>	-
3	+	-	-	+	+	-	+	<i>Salmonella</i>	-
4	+	-	-	+	+	-	+	<i>Salmonella</i>	<i>Salmonella</i>
5	+	-	-	+	+	-	+	<i>Salmonella</i>	-
6	+	-	-	+	+	-	+	<i>Salmonella</i>	<i>Salmonella</i>
7	+	-	-	+	+	-	+	<i>Salmonella</i>	<i>Salmonella</i>
8	+	-	-	+	+	-	+	<i>Salmonella</i>	-
9	+	-	-	+	+	-	+	<i>Salmonella</i>	<i>Salmonella</i>



Hình 2. Sản phẩm PCR sử dụng cặp mồi Salm3 và Salm4 từ 9 khuẩn lạc nghi ngờ *Salmonella* dương tính (tạo sắc tố đen trên MLCB). M - thang ADN chuẩn (1Kb, Invitrogen); C - Chủng *Salmonella* chuẩn; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 - các khuẩn lạc nghi ngờ

5. Kết luận

Kỹ thuật PCR có thể được ứng dụng hữu hiệu và cho độ đặc hiệu cao hơn so với kỹ thuật vi sinh thường quy trong kiểm định chỉ tiêu *Salmonella* của khu hệ phức tạp như nước mặt ô nhiễm. Tuy nhiên, sự cẩn trọng là cần thiết khi đánh giá kết quả thu nhận được do khả năng dương tính giả vẫn hiện hữu và sự có mặt của khu hệ vi sinh vật đa dạng có thể làm giảm độ nhạy của phương pháp. Trong trường hợp nghi vấn, PCR có thể được sử dụng như test khẳng định *Salmonella*.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này nhận được sự hỗ trợ của chương trình KHCN trọng điểm cấp nhà nước trong khuôn khổ đề tài KC.04.21. Tác giả xin cảm ơn TS. Vũ Nguyên Thành (Viện Công nghiệp Thực phẩm) vì những góp ý trong quá trình thực hiện.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Kiều Hữu Ảnh, Ngô Tự Thành, *Vi sinh vật học của các nguồn nước*, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, 1985, tr.250-259.
2. Nguyễn Huy Chính (chủ biên), *Vi sinh vật y học*, NXB Y học, Hà Nội, 2001, tr.172- 193.
3. TCVN 6847:2001 VSV- hướng dẫn chung phương pháp phát hiện *Salmonella*.
4. Katsuyuki H., Mikio S., Hisao H., Kasthuri V., Comparison of commercially available kits with standard methods for detection of *Salmonella* strain in food. *Appl. Env. Microbiol.* 1997, Vol. 63, p.775-778.
5. Perretti R., Mannazzu I., Cocolin L., Comi G., Clementi F, Twelve-hour PCR based method for detection of *Salmonella* spp. in food. *Appl. Microbiol*, 2001, Vol. 67, p.977-978.

VNU. JOURNAL OF SCIENCE, Nat., Sci., & Tech., T.XXIII, N_o1, 2007

APPLICATION OF PCR TECHNIQUE FOR DETECTION OF *SALMONELLA* IN POLLUTED SURFACE WATER

Le Duc Manh, Nguyen Thi Huong Giang

Food Industries Research Institute, 301-Nguyen Trai, Thanh Xuan, Hanoi

Pollution of surface water by municipal wastewater and liquid waste from manufacturing plants is of great concern in Vietnam. Complex microbial ecosystem in polluted surface water makes it difficult to assess microbiological parameters. *Salmonella* testing using standard microbiological procedure often results in false positive. In this study, *Salmonella* testing using PCR technique was compared with traditional method. It was demonstrated that PCR offers some advantages over the traditional technique, namely higher selectivity and faster performance. It was noted however, the interpretation of data should be accompanied with caution since false positive and template competition could not be eliminated. PCR was found very useful as a confirmatory tool during analysis of ambiguous samples.