

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC

ĐỖ BÍCH DUỆ

**NGHIÊN CỨU MỘT SỐ ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC CỦA
VI KHUẨN *ESCHERICHIA COLI* TRÊN THỊT LỢN
BÁN TẠI THÀNH PHỐ THÁI NGUYÊN**

LUẬN VĂN THẠC SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Thái Nguyên - 2012

MỞ ĐẦU

1. Đặt vấn đề

Ngày nay, khi đời sống xã hội ngày càng nâng cao, chất lượng cuộc sống ngày càng cải thiện, vấn đề vệ sinh an toàn thực phẩm trở thành vấn đề được quan tâm của các ngành, các cấp và của toàn thể người tiêu dùng. Thực phẩm phải đảm bảo tiêu chuẩn: tươi, sạch, giàu dinh dưỡng và an toàn cho người sử dụng. Trong đó, thịt tươi là một loại thực phẩm thông dụng trong thực đơn hàng ngày của mỗi gia đình. Tuy nhiên, trong quá trình vận chuyển, tiêu thụ con người thường chỉ quan tâm tới lợi nhuận trước mắt mà sẵn sàng bỏ qua các quy chuẩn về vệ sinh an toàn thực phẩm (VSATTP), do vậy nguồn thực phẩm tươi sống nói chung, nguồn thịt nói riêng bị ô nhiễm ngày càng lớn đe dọa sức khỏe của con người. Thực phẩm ô nhiễm do nhiều nguyên nhân, trong đó chủ yếu là các vi khuẩn gây bệnh, đặc biệt ô nhiễm vi khuẩn *Escherichia coli* trong thực phẩm đã trở thành đề tài nghiên cứu của nhiều tác giả trong những năm gần đây. *E. coli* gây bệnh bằng nhiều yếu tố khác nhau như nhiễm trùng huyết, sinh tổng hợp độc tố gây ngộ độc thực phẩm (NĐTP), rối loạn tiêu hóa hấp thu. Nếu bệnh xảy ra không được điều trị kịp thời có thể dẫn đến tử vong. Điều đáng ngại hơn, người ta lo ngại về nguy cơ biến chủng của loài vi khuẩn này. Nếu không được kiểm soát và xử lý kịp thời, có thể gây ngộ độc hàng loạt như ở Đức và một số nước Châu Âu trong thời gian vừa qua.

Với vị trí địa lý là trung tâm vùng của khu vực trung du miền núi phía bắc, thành phố Thái Nguyên có nhiều cơ quan, xí nghiệp, nhà máy, công ty... đặc biệt có nhiều trường Đại học, Cao đẳng.. nằm trên địa bàn nên nhu cầu tiêu thụ thực phẩm thịt lợn là rất lớn. Mặt khác, việc giết mổ lợn và bán thịt chủ yếu do tư nhân thực hiện, phương tiện vận chuyển, dụng cụ bán thịt chưa đạt tiêu chuẩn vệ sinh thú y. Việc kiểm tra vệ sinh thú y của cán bộ kiểm dịch còn gặp nhiều khó khăn, hiện chỉ dừng lại ở mức độ kiểm tra cảm quan thịt được bày bán tại các chợ.

Xuất phát từ những lý do trên, chúng tôi tiến hành đề tài: ***“Nghiên cứu một số đặc điểm sinh học của vi khuẩn *Escherichia coli* trên thịt lợn bán tại thành phố Thái Nguyên”***.

2. Mục tiêu nghiên cứu

- Đánh giá tình trạng nhiễm *E. coli* trên thịt lợn tươi.
- Tìm hiểu một số đặc điểm sinh học, hóa học.... đặc điểm di truyền phân tử của một số chủng *E. coli* phân lập được, xác định gen gây ngộ độc thực phẩm, từ đó có biện pháp hạn chế, giảm thiểu thiệt hại cho người dân.

3. Nội dung nghiên cứu

- Lấy mẫu phân lập vi khuẩn *E. coli* trong 1 gram thịt lợn tươi.
- Tìm hiểu đặc điểm sinh hóa, khả năng miễn cảm kháng sinh, type huyết thanh của các chủng vi khuẩn *E. coli* phân lập được. Tìm gen gây ngộ độc thực phẩm (VT1; VT2...) bằng kỹ thuật phản ứng chuỗi trùng hợp (PCR, polymerase chain reaction).
- Nghiên cứu đặc điểm di truyền bằng việc đọc trình tự gen mã hóa riboxom 16S
 - + Nuôi cấy các chủng vi khuẩn phân lập
 - + Tách chiết DNA tổng số, nhân đoạn gen mã hóa riboxom 16S bằng kỹ thuật PCR, thiết kế plasmid tái tổ hợp, tạo tế bào *E. coli* DH 5 α khả biến, biến nạp plasmid vào *E. coli* DH 5 α , tách và tinh sạch plasmid.
 - + Đọc trình tự đoạn gen mã hóa riboxom 16S

CHƯƠNG 1

TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. MỘT SỐ NGHIÊN CỨU VỀ THỊT

1.1.1. Đặc tính chung của thịt

Thịt là loại thực phẩm giàu dinh dưỡng và dễ tiêu hóa, cung cấp nhiều loại axit amin không thay thế, cần thiết cho hoạt động sống của cơ thể, giúp con người phát triển tốt về thể lực. Thịt cũng là loại thực phẩm giàu khoáng chất, đặc biệt là các khoáng chất dễ hấp thu [23]. Thịt tươi là thịt chưa bị biến chất bởi quá trình tự phân hủy, chưa có sự thay đổi về cảm quan và độc chất có hại.

1.1.2. Thành phần hóa học của thịt

Thành phần hóa học của thịt rất khác nhau, phụ thuộc vào các yếu tố giống, loài, lứa tuổi, độ béo gầy và điều kiện chăm sóc, nuôi dưỡng. Nhưng nhìn chung thành phần hóa học của thịt bao gồm:

- + Nước : 50 - 75%
- + Protein : 14 - 21%
- + Lipit : 3,5 - 21,5 %
- + pH của thịt tươi thông thường ở mức 6 - 6,5%

Ngoài các thành phần chính ở trên thớ thịt còn có các khoáng chất, các loại vitamin, các loại men và các chất dinh dưỡng khác cần thiết cho con người.

Đánh giá cảm quan đối với thịt tươi theo phương pháp của Nguyễn Vĩnh Phước [13] và trung tâm kiểm tra vệ sinh thú y Trung ương I - Cục thú y [19] đã đưa ra một số đánh giá cảm quan thông qua bảng 1.1.

Bảng 1.1. Đánh giá cảm quan thịt

Chỉ tiêu	Thịt tươi	Thịt kém tươi, thịt ôi
Trạng thái bên ngoài	Hơi khô, màu hơi nhạt	Khô, có khi ướt nhớt, màu sẫm
Vết cắt	Hơi ướt, màu hồng	Uớt nhớt, màu thẫm
Độ đàn hồi	Rắn chắc, đàn hồi cao, ấn ngón tay vào thịt tạo vết lõm, nhấc tay ra không để lại vết.	Hơi nhão, nhão, ấn ngón tay vào để lại vết nhẹ (thịt kém tươi), vết hằn sâu, không mất (thịt ôi)
Mỡ	Màu sáng, độ rắn và mùi vị tự nhiên của thịt tươi, không có mùi lạ	Màu tối, độ rắn giảm, có vị ôi
Gân	Gân trong, bám chặt vào thành ống xương	Kém trong, độ đàn hồi kém
Tủy	Tủy trong, bám chặt vào thành ống xương	Đục, co lại, không đầy ống xương
Nước lợc	Trong, mùi vị thơm ngon, trên mặt có những giọt mỡ to	Đục, mùi vị ôi, trên bề mặt có giọt mỡ nhỏ

Theo phương pháp sinh hóa học, thịt tươi được đánh giá bằng các phản ứng sinh hóa học dựa theo các tiêu chuẩn như bảng 1.2.

Bảng 1.2. Tiêu chuẩn đánh giá thịt tươi bằng các phản ứng sinh hóa học

Tiêu chuẩn	Thịt tươi	Thịt kém tươi	Thịt ôi
pH của nước thịt ngâm	5,4 - 6,4	6,5 - 6,7	> 6,7
Hàm lượng NH ₃ (mg)	< 1,26	1,27 - 1,68	> 1,68
Phản ứng CuSO ₄ làm sa lắng protein	Nước thịt trong hoặc hơi đục	Nước thịt vẫn đục hoặc có hạt	Nước thịt đục có cặn sánh như keo
Phản ứng tìm peroxydaza (thử benzidin)	Nước thịt ngâm, lọc có màu xanh lá mạ, sau mấy phút chuyển màu nâu	Nước thịt ngâm, lọc không có hoặc lâu mới có màu xanh lá mạ	Nước thịt ngâm, lọc không biến đổi màu sắc
Phản ứng Nestler tìm NH ₃	Nước thịt ngâm, lọc không màu	Nước thịt ngâm, lọc có màu vàng nhạt	Nước thịt ngâm, lọc có màu vàng vỏ chanh
Phản ứng tìm H ₂ S (dùng axetat chì)	Giấy lọc giữ nguyên màu	Giấy lọc có màu nâu nhạt	Giấy lọc có màu nâu sẫm hoặc đen

1.1.3. Các nguyên nhân gây hư hỏng thịt

* Quá trình tự phân giải của thịt

Trong các mô bào của cơ đều có chứa các loại enzym, chúng là sản phẩm của quá trình sống, giúp cho phản ứng hóa học tại các mô bào diễn ra nhanh hay chậm [31].

Thịt trong quá trình bảo quản có thể bị biến chất và hư hỏng. Sau khi giết mổ, thịt chưa bị biến chất. Nhưng nếu, thịt để lâu chưa kịp tiêu thụ hoặc cất giữ dùng dần ở những điều kiện không thích hợp sẽ bị biến chất bởi các enzyme có sẵn

trong thịt và vi sinh vật tạp nhiễm dẫn đến ôi, thiu, hỏng về trạng thái cảm quan, hình thành những độc chất có hại.

Những hiện tượng hư hỏng của thịt thường gặp là: Thịt nhớt, thối rữa, lên men chua, có các chấm màu trên bề mặt thịt, thịt mốc [10].

* Vi khuẩn gây hư hỏng thịt

Mặc dù rất nhiều biện pháp vệ sinh và các kỹ thuật chống nhiễm khuẩn được áp dụng đối với con vật trước khi giết mổ và trong quá trình giết mổ, nhưng hiện tượng nhiễm khuẩn vào thân thịt vẫn xảy ra [26]. Vi khuẩn nhiễm vào thịt gồm có một số loài vi khuẩn gây hư hỏng thịt và nhiều loài vi khuẩn gây bệnh cho người [46].

- Một số vi khuẩn gây hư hỏng thịt tươi

Dựa vào khả năng phân hủy thịt của vi khuẩn người ta có thể chia chúng theo 3 nhóm [35].

+ Nhóm Proteolytic có các men phân giải protein thành các cơ chất đơn giản cần thiết cho hoạt động sống của chúng, đại diện là vi khuẩn *Pseudomonas*.

+ Nhóm vi khuẩn có khả năng lên men đường sẽ phân hủy glucogen còn dự trữ trong cơ thành rượu, axit và hơi.

+ Nhóm vi khuẩn có enzym phân giải lipit sẽ phân hủy mỡ thành axit béo và glycerol.

Dựa vào khả năng làm thay đổi đặc tính sinh học của thịt người ta chia các loại vi khuẩn gây hư hỏng theo các nhóm sau [27]:

+ Nhóm vi khuẩn làm mất độ tươi của thịt: gồm có các vi khuẩn thuộc họ *Alcaligenes*, *Chromobacteriaceae* các loài vi khuẩn *Proteus vulgaris* và *Pseudomonas fluorescens*.

+ Nhóm làm chua thịt: gồm có các vi khuẩn thuộc họ *Chromobacteriaceae*, và vi khuẩn *Pseudomonadaceae*.

+ Nhóm làm nhớt mặt thịt: vi khuẩn *Alcaligenes*, *Xanthomonas*.

+ Nhóm gây mùi khó ngửi ở thịt với điển hình là *Pseudomonas*.

- Một số vi khuẩn gây hư hỏng thịt bảo quản lạnh.

Nhiều loài vi khuẩn không phát triển ở nhiệt độ thấp, nhưng vẫn có thể sống sót trong quá trình bảo quản lạnh. Theo Bell và Gill (1986) [28] đã tìm thấy một số loài của các giống *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Lactobacillus*, *Brochothrix*, *Alteromonas* và thành viên của họ Enterobacteriaceae trong thịt bảo quản lạnh. Nói chung, các vi khuẩn ở dạng sinh dưỡng tăng lên trong suốt thời gian bảo quản lạnh [47].

Một số vi khuẩn gây bệnh cho người có thể phát triển trong thịt bảo quản lạnh với tốc độ chậm. Số lượng ban đầu, chủng loại vi khuẩn gây hư hại thịt và tốc độ sinh trưởng của chúng sẽ quyết định thời gian bảo quản thịt [40]. Tuy nhiên trong thịt bảo quản lạnh vẫn có các vi sinh vật ưa lạnh như: Nhóm *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Aerobacterium* và một số loại cầu khuẩn thuộc nhóm *Pseudomonas* như *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas fluoresceus*, *Pseudomonas geniculata*, ngoài ra còn có nấm men, nấm mốc vẫn phát triển. Thịt có mùi đất là do xạ khuẩn mọc. Thịt muối vẫn tồn tại vi sinh vật ưa mặn và làm hỏng thịt [10].

1.2. VI KHUẨN GÂY NGỘ ĐỘC THỰC PHẨM

1.2.1. Ngộ độc thực phẩm

Ngộ độc thực phẩm (NĐTP) hay là trúng độc thức ăn xảy ra do ăn phải thức ăn chứa chất độc. Bệnh thường xảy ra một cách đột ngột, hàng loạt (nhưng không phải là dịch), có những triệu chứng của một bệnh cấp tính. Biểu hiện bệnh thường là nôn mửa, tiêu chảy (riêng trường hợp nhiễm độc tố của vi khuẩn độc thịt thì bị táo bón) và các triệu chứng khác đặc hiệu cho loại ngộ độc [1].

1.2.2. Nguyên nhân gây ngộ độc thực phẩm

Thực phẩm có nguồn gốc động vật và thực vật là nguồn thực phẩm thiết yếu của con người. Việc lựa chọn thực phẩm và cách chế biến thực phẩm phù hợp khoa học đem lại cho con người nguồn dinh dưỡng quan trọng đảm bảo sức khỏe và chất

lượng dân số. Tuy nhiên, ngoài việc đáp ứng nhu cầu dinh dưỡng cho con người thì các nguồn thực phẩm kém chất lượng có thể gây nguy hại đến sức khỏe con người.

Ngộ độc thực phẩm xảy ra khi chúng ta dùng phải thức ăn, thức uống nhiễm bẩn, bảo quản không đúng cách hoặc bị nhiễm trùng, virus, ký sinh trùng, nấm mốc hay hóa chất độc hại... Ở nước ta những năm gần đây các ca NĐTP có chiều hướng gia tăng mà nguyên nhân chính là do các nguồn thực phẩm hay nước uống bị ô nhiễm. Các thực phẩm có nguồn gốc động vật có xu hướng dễ bị nhiễm khuẩn hơn. Nhiễm độc thực phẩm có thể chia làm hai loại: Loại 1, nhiễm độc do hóa chất; loại 2, nhiễm độc do vi sinh vật gây bệnh.

Hóa chất độc bao gồm các hóa chất sử dụng trong công nghiệp và nông nghiệp. Trong sản xuất nông nghiệp nhiều loại hóa chất bảo vệ thực vật độc hại được sử dụng, đặc biệt là nhóm clo hữu cơ như diclo-diphenyl-tricloetan (DDT), dipteren, lindane, padane... Các hóa chất này một phần ngấm xuống mạch nước ngầm, phân tán vào môi trường không khí, tồn dư trên các sản phẩm nông sản, động vật ăn phải các sản phẩm này, tiếp đến con người sử dụng thực phẩm động vật nhiễm hóa chất, rau quả nhiễm hóa chất, làm gia tăng các bệnh rối loạn chuyển hóa, bệnh hiểm nghèo.

Ngộ độc thực phẩm có thể gây ra do thực phẩm bị ô nhiễm vi sinh vật và độc tố do vi sinh vật tạo ra. Vấn đề NĐTP đang là mối lo ngại và được quan tâm xử lý ở hầu hết các quốc gia trên thế giới, thậm chí cả các quốc gia phát triển như Mỹ (Hoa Kỳ), Anh, Nhật Bản, Trung Quốc... cũng không phải là ngoại lệ [1].

1.2.3. Một số vi khuẩn phân lập được từ thịt gây ngộ độc thực phẩm

Vi sinh vật nhiễm vào thực phẩm không gây bệnh cho người sử dụng nhưng trong quá trình trao đổi chất cũng sản sinh ra yếu tố gây hại [14], [45]. Một số vi sinh vật nhiễm trong thực phẩm gây ngộ độc, có thể chia làm 2 dạng:

i) Ngộ độc thực phẩm xảy ra ngay lập tức trong các trường hợp thức ăn nhiễm các vi khuẩn tổng hợp ngoại độc tố như *S. aureus*, *C. botulinum*, *B. cereus*... Các vi khuẩn này sinh trưởng và phát triển trong thức ăn và giải phóng ra một lượng độc tố gây ngộ độc cấp tính cho người khi ăn thực phẩm bị nhiễm loại vi khuẩn này.

ii) Ngộ độc thực phẩm gây ra bởi một số vi khuẩn như: *Listeria*, *Salmonella*, *E. coli*, *Shigella*, *Campylobacter* nhiễm trong thực phẩm, khi xâm nhập vào cơ thể chúng không những gây nên các triệu chứng ngộ độc mà còn làm tổn thương nghiêm trọng các cơ quan nội tạng.

*** Tổng số vi khuẩn hiếu khí và yếm khí tùy tiện**

Sự phát hiện ra số lượng lớn vi khuẩn trên thịt, điều này chứng tỏ rằng việc giết mổ gia súc và gia cầm tại các cơ sở với điều kiện vệ sinh là rất kém. Việc xác định tổng số vi khuẩn hiếu khí trong thực phẩm được sử dụng như một yếu tố đánh dấu (marker) về điều kiện vệ sinh, nhiệt độ bảo quản trong quá trình sản xuất, vận chuyển thực phẩm. Đây là phương pháp tốt nhất để đánh giá sơ bộ tình trạng vệ sinh của thực phẩm [29]. Số lượng vi khuẩn hiếu khí và yếm khí tùy tiện ở thịt thay đổi theo thời gian và điều kiện bảo quản. Hệ vi khuẩn hiếu khí trên thịt được chia làm 3 nhóm, dựa vào nhiệt độ thích hợp để chúng có thể phát triển được.

Nhìn chung vi khuẩn gây hư hỏng thực phẩm có thể phát triển được từ 12°C đến 42°C. Tuy nhiên, một số chủng đột biến có thể phát triển ngoài khoảng nhiệt độ này. Trong bảo quản thực phẩm khoảng nhiệt độ vi khuẩn có thể phát triển được gọi là vùng nhiệt độ nguy hiểm.

*** Coliforms**

Coliforms là những vi khuẩn hiếu khí và kỵ khí không bắt buộc, lên men đường lactose trong môi trường canh thang lactose (màu mật bò xanh dương) trong vòng 48 giờ ở 35°C. Các *Coliforms* có nguồn gốc từ rác thải hữu cơ của thực vật và động vật [36].

Sự có mặt của các thành viên thuộc nhóm *Coliforms* trong thực phẩm phản ánh tình trạng vệ sinh của thực phẩm, chúng chỉ ra khả năng có mặt của các yếu tố gây bệnh khác ẩn trong thực phẩm. Một số nhà nghiên cứu cho rằng các mẫu thực phẩm nhiễm *Coliforms* với số lượng lớn thì khả năng có mặt của các vi khuẩn gây bệnh lớn. Yếu tố chỉ điểm này có liên quan tới tác nhân gây bệnh hay không đang