

NGHIÊN CỨU SỬ DỤNG PHƯƠNG PHÁP VI SINH VẬT ĐỂ XÁC ĐỊNH KHÁNG SINH TỒN DƯ TRONG THỰC PHẨM

A STUDY ON USING MICROBIAL SCREENING METHOD FOR DETECTION OF ANTIBIOTIC
RESIDUES IN FOOD

Đoàn Thị Vân, Nguyễn Thị Lan Phương

Trường Đại học Sư phạm – Đại học Đà Nẵng

Email: doanvandhsp2014@gmail.com,

nguyenthilanhphuongsp@gmail.com

Nguyễn Đức Trường

Trường Đại học công nghiệp thực phẩm TP. Hồ Chí Minh

Email: truongnd@cntp.edu.vn

TÓM TẮT

Việc lạm dụng thuốc kháng sinh trong chăn nuôi, bảo quản thực phẩm dẫn đến sự tồn dư kháng sinh trong nhiều sản phẩm trứng, sữa, thịt, cá và các cơ quan nội tạng, điều này không chỉ ảnh hưởng đến chất lượng thực phẩm mà còn là mối nguy hại đối với sức khỏe con người. Trong nghiên cứu này, chúng tôi nuôi cấy 4 chủng vi sinh vật: *Micrococcus lutea* ATCC 9341, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Bacillus subtilis* L2 và *Bacillus stearothermophilus* trên 9 loại môi trường khác nhau nhằm đánh giá ảnh hưởng của các loại thuốc kháng sinh thường lạm dụng trong thực phẩm (tetracycline, benzylpenicillin, streptomycin, grisin, bacitracin) đến khả năng sinh trưởng của những vi khuẩn này. Kết quả cho thấy, cả 4 chủng vi sinh vật đều bị ức chế sinh trưởng hoặc bị tiêu diệt trong môi trường có chứa kháng sinh, trong đó 2 chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* L2 trên môi trường với pH 8,0 và *Bacillus stearothermophilus* trên môi trường Kundrat được xem là mẫn cảm nhất đối với sự có mặt của các thuốc kháng sinh nghiên cứu.

Từ khóa: tồn dư; kháng sinh; vi sinh vật; *Bacillus subtilis* L2; *Bacillus stearothermophilus*.

ABSTRACT

The abuse of antibiotics in breeding and in food preservation can lead to the existence of residual antibiotics in many products such as egg, milk, meat, fish and in the viscera that not only affects negatively the quality of the product but also threatens human health. In this research, four microorganism strains: *Micrococcus Luteus* ATCC 9341, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Bacillus subtilis* L2 and *Bacillus stearothermophilus* were inoculated on 9 different culture media in order to assess the effect of common-abused antibiotics for food (tetracycline, benzylpenicillin, streptomycin, grisin, bacitracin) on the growth ability of such bacteria. The result showed that all objective bacteria were inhibited or killed in the antibiotic-containing media. Among them, *Bacillus subtilis* L2 cultured in the media with pH 8,0 and *Bacillus stearothermophilus* cultured in the media Kundrat were the two strains which are the most sensitive to the studied antibiotics.

Keywords: residue; antibiotics; microorganisms; *Bacillus subtilis* L2; *Bacillus stearothermophilus*.

1. Đặt vấn đề

Ngày nay, chất kháng sinh được sử dụng rộng rãi trong thực tiễn như: để chữa bệnh cho gia súc, gia cầm; bảo quản thức ăn; kích thích sự phát triển hoặc là dung dịch phòng chống dịch bệnh theo mùa. Cùng với thời gian, chúng sẽ bài tiết ra khỏi cơ thể, nhưng đôi khi một số kháng sinh còn tồn đọng trong các tế bào và cơ quan của động vật. Các sản phẩm thường sử dụng có thể có mặt của kháng sinh như: các sản phẩm thịt, cá, sữa, trứng, nội tạng động vật... Ngoài ra, kháng

sinh còn có thể cho thẳng vào thực phẩm với mục đích ức chế, tiêu diệt vi sinh vật, để bảo quản thực phẩm [1]. Sử dụng các loại thực phẩm có chứa tồn dư chất kháng sinh trong thời gian dài có thể ảnh hưởng không tốt đến sức khỏe con người như: phá vỡ cân bằng tự nhiên của hệ vi sinh vật đường ruột, gây rối loạn quá trình tiêu hoá thức ăn của vi sinh; làm giảm hiệu quả điều trị của kháng sinh do tạo ra dòng vi khuẩn kháng lại kháng sinh; xuất hiện các phản ứng dị ứng; làm tăng nguy cơ lây lan bùng nổ dịch bệnh bởi những vi khuẩn gây bệnh kháng thuốc [2].



Hình 1. Dị ứng với Penicillin (nguồn: PGS.TS Dương Thanh Liêm [2])

Để xác định tồn dư chất kháng sinh trong thực phẩm, các nhà khoa học đã nghiên cứu ra một số phương pháp như: hoá học, hoá - lý (như phương pháp sắc ký HPLC, GC hay phương pháp quang phổ và quang phổ khối), phân tích miễn dịch (như ELISA, EIA) và sử dụng vi sinh vật [3, 4]. Trong đó, phương pháp sử dụng vi sinh vật ngày càng được nghiên cứu sâu, áp dụng rộng rãi vì tính đơn giản, dễ thực hiện và rẻ tiền [5, 6]. Xuất phát từ những nhận định trên, chúng tôi tiến hành đề tài “Nghiên cứu sử dụng phương pháp vi sinh vật để xác định chất kháng sinh tồn dư trong thực phẩm” với mong muốn góp phần nâng cao an toàn vệ sinh thực phẩm - bảo vệ sức khoẻ con người.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng nghiên cứu

- Kháng sinh: tetracycline, benzylpenicillin, streptomycin, grisin và bacitracin;

- Vi sinh vật: *Sarcina lutea* ATCC 9341 (*Micrococcus lutea* ATCC 9341); vi khuẩn có bào tử: *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Bacillus subtilis* L2 và *Bacillus stearothermophilus*;

- Các loại thực phẩm cần xác định tồn dư kháng sinh: thịt, cá, trứng, sữa...

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Phương pháp chuẩn bị các loại môi trường với pH 6,0; pH 7,2; pH 8,0; các môi trường số 2; 3; 5; 6; 7 và môi trường Kundrat [7];

- Phương pháp nuôi cấy các chủng vi sinh vật và pha loãng chúng tới nồng độ cần thiết để nghiên cứu (107 CFU/ lít) (riêng các mẫu *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Bacillus subtilis* L2 và *Bacillus stearothermophilus* cần tách bào tử, sau đó tiến hành pha loãng) [7];

- Phương pháp chuẩn bị các hệ thống thử nghiệm: số 1 (môi trường với pH 6,0 và mẫu vi

sinh *Bacillus subtilis* L2); số 2 (môi trường với pH 7,2 và mẫu vi sinh *Bacillus subtilis* L2); số 3 (môi trường với pH 8,0 và mẫu vi sinh *Bacillus subtilis* L2); số 4 (môi trường số 5 và mẫu vi sinh *Bacillus subtilis* L2); số 5 (môi trường số 6 và mẫu vi sinh *Bacillus subtilis* L2); số 6 (môi trường số 2 và mẫu vi sinh *Bacillus cereus* ATCC 11778); số 7 (môi trường số 3 và mẫu vi sinh *Bacillus cereus* ATCC 11778); số 8 (môi trường số 7 và mẫu vi sinh *Micrococcus lutea* ATCC 9341); số 9 (môi trường với pH 8,0 và mẫu vi sinh *Micrococcus lutea* ATCC 9341); số 10 (môi trường Kundrat và mẫu vi sinh *Bacillus stearothermophilus*);

- Phương pháp chuẩn bị các dung dịch đệm (bao gồm: dung dịch đệm số 1 (nước cất) dung dịch đệm số 2 (citrate-hydrochloric với pH $5,0 \pm 0,1$); dung dịch đệm số 4 (phosphate với pH 6,0); dung dịch số 6 (phosphate với pH $7,9 \pm 0,1$). Hấp khử trùng dung các dịch đệm ở nhiệt độ $121 \pm 10^\circ\text{C}$, trong vòng 20 ± 3 phút [6];

- Phương pháp pha loãng chất kháng sinh ở những nồng độ thích hợp để nghiên cứu [6];

+ Đối với tetracycline: cân lấy $10 \pm 0,0001$ mg tetracycline cho vào lọ thủy tinh vô trùng có chứa 10 ml 0,1% HCL, chúng ta thu được dung dịch cơ bản (trong 1ml dung dịch cơ bản có chứa 960 đơn vị hoạt tính). Dung dịch cơ bản có thể bảo quản trong tủ lạnh ở nhiệt độ từ 0°C đến $+40^\circ\text{C}$, trong vòng 7 ngày. Sử dụng dung dịch đệm số 2 để pha loãng dung dịch cơ bản ra các nồng độ khác nhau (100; 10; 1; 0,01; 0,005 Đv/ml).

+ Đối với benzylpenicillin: cân 1g benzylpenicillin pha với 10 ml dung dịch đệm số 4, chúng ta thu được dung dịch cơ bản (trong 1ml dung dịch cơ bản có chứa 1000000 đơn vị hoạt tính). Sử dụng dung dịch đệm số 4 để pha loãng dung dịch cơ bản ra các nồng độ khác nhau

(10000; 100; 1; 0,01; 0,005 Đv/ml).

+ Đối với streptomycin: cân 1g kháng sinh ở dạng bột pha với 10 ml dung dịch đệm số 4, chúng ta thu được dung dịch cơ bản (trong 1ml dung dịch cơ bản có chứa 1000000 đơn vị hoạt tính). Sử dụng dung dịch đệm số 6 để pha loãng dung dịch cơ bản ra các nồng độ khác nhau (10000; 100; 10; 2; 0,5; 0,01 Đv/ml).

+ Đối với grisin: để thu được dung dịch cơ bản (trong 1ml dung dịch cơ bản có chứa 1000 đơn vị hoạt tính) chúng ta cân 10 mg grisin cho vào lọ thủy tinh vô trùng có chứa 10 ml dung dịch 0,01% HCL. Dung dịch đệm bảo quản trong ngăn lạnh, trong vòng 30 ngày. Sử dụng dung dịch đệm số 1 để pha loãng dung dịch cơ bản được ra các nồng độ khác nhau (10; 2; 0,5; 0,01 Đv/ml).

+ Đối với bacitracin: cân 10 mg kháng sinh ở dạng bột pha với 10 ml dung dịch đệm số 4, chúng ta thu được dung dịch cơ bản (trong 1ml dung dịch cơ bản có chứa 1000 đơn vị hoạt tính). Sử dụng dung dịch đệm số 1 để pha loãng dung dịch cơ bản ra các nồng độ khác nhau (10; 2; 0,5; 0,01 Đv/ml).

- Phương pháp tách kháng sinh từ các loại thực phẩm khác nhau [6]:

+ Đối với sữa và các sản phẩm từ sữa: lấy 10ml mẫu cho vào bình tam giác 50ml và thêm vào 10ml dung dịch đệm tương ứng với từng loại kháng sinh muốn xác định. Đem ly tâm 3000 vòng/phút. Sau 10 phút, thu được dung dịch lỏng.

+ Đối với trứng: cho đun trứng trong nước ở nhiệt độ $65\pm 5^{\circ}\text{C}$ trong khoảng 10 phút. Bóc vỏ, lấy 10gam trứng vào bình tam giác, thêm vào 10ml dung dịch đệm tương ứng với từng loại kháng sinh muốn xác định. Đem ly tâm 3000 vòng/phút. Sau

10 phút, thu được dung dịch lỏng.

+ Đối với thịt và các nội tạng của động vật (như thận, gan, phổi...): lấy 10gam cho vào bình tam giác, thêm vào 20ml dung dịch đệm tương ứng với từng loại kháng sinh muốn xác định và đem nghiền nhỏ (trong vòng 3 phút). Để mẫu trong tủ lạnh với nhiệt độ từ 0°C đến $+4^{\circ}\text{C}$ trong vòng 90 phút để tách kháng sinh. Sau đó cho mẫu vào nước nóng $65\pm 5^{\circ}\text{C}$ trong 30 phút. Đem ly tâm 3000 vòng/phút. Sau 10 phút, thu được dung dịch lỏng;

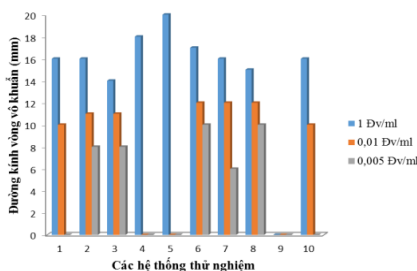
- Phương pháp đục lỗ thạch để nghiên cứu hoạt tính của kháng sinh tới các loại vi khuẩn, từ đó xác định lượng kháng sinh tồn đọng trong thực phẩm [5].

Cách tiến hành thí nghiệm chung: chuẩn bị riêng rẽ 10 mẫu hệ thống thử nghiệm, mỗi mẫu lấy 10 ml cho vào từng đĩa Petri, sau khi đĩa thạch đông lại, dùng khoan nút chai tạo lỗ thạch đường kính (5mm) cách nhau 2 - 3 cm. Dung dịch kháng sinh thử nghiệm được pha loãng ở các nồng độ khác nhau, rồi cho vào từng lỗ thạch. Đặt đĩa thạch trong tủ cấy từ 2 - 3 tiếng để kháng sinh khuếch tán vào thạch, sau đó đặt vào tủ ẩm với nhiệt độ thích hợp cho vi sinh vật kiểm định phát triển, sau 48 tiếng lấy đĩa ra quan sát và đo đường kính vòng vô khuẩn. Hoạt tính kháng sinh là độ lớn của đường sinh vòng vô khuẩn.

3. Kết quả nghiên cứu và thảo luận

3.1. Nghiên cứu sự mẫn cảm của các mẫu vi sinh vật đến tetracycline

Nhờ dung dịch đệm, tetracycline được pha loãng ở các nồng độ 1Đv/ml; 0,01Đv/ml; 0,005Đv/ml, rồi cho vào các lỗ thạch để nghiên cứu. Kết quả thu được biểu diễn ở Hình 2 và minh họa ở Hình 3 như sau:



Hình 2. Biểu đồ sự phụ thuộc đường kính với các nồng



Hình 3. *Bacillus cereus* ATCC 11778 vòng vô khuẩn

độ tetracycline

Từ biểu đồ cho thấy, hầu hết các vi sinh vật nghiên cứu đều mẫn cảm với tetracycline, đặc biệt *Bacillus subtilis* L2 mẫn cảm nhất. Hệ thống thử nghiệm số 9 không mẫn cảm với tetracycline. Vi sinh vật bị ức chế phát triển ngay cả khi tetracycline ở nồng độ rất thấp (0,005Đv/ml) (ở các hệ thống thử nghiệm số 2, 3, 6, 7, 8).

3.2. Nghiên cứu sự mẫn cảm của các mẫu vi sinh vật đến benzylpenicillin

Benzylpenicillin được pha loãng ở các nồng độ 1Đv/ml; 0,01Đv/ml; 0,005 Đv/ml, rồi cho vào các lỗ thạch để nghiên cứu. Kết quả thu được biểu diễn ở Hình 4 và minh hoạ ở Hình 5.

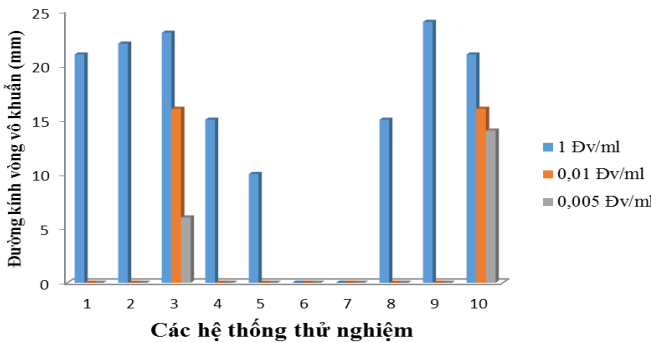
Từ kết quả trên Hình 4, 5 có thể đưa ra kết luận như sau: *Bacillus stearothermophilus* trên môi trường Kundrat mẫn cảm với

với môi trường số 2

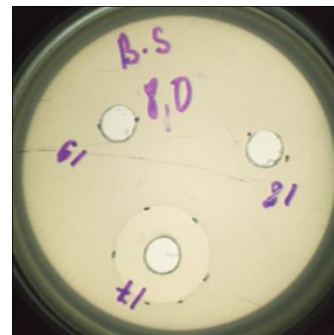
benzylpenicillin ngay cả ở nồng độ rất thấp (0,005Đv/ml). *Bacillus cereus* ATCC 11778 hoàn toàn không bị ức chế sự phát triển dưới tác động của benzylpenicillin. Các mẫu hệ thống thử nghiệm số 1, 2, 4, 5, 8, 9 xuất hiện đường kính vòng vô khuẩn lớn, nhưng chỉ khi benzylpenicillin ở nồng độ cao (1 Đv/ml). Như vậy, để xác định benzylpenicillin ở nồng độ 0,005 Đv/ml, có thể sử dụng các mẫu hệ thống số 3 và số 10.

3.3. Nghiên cứu sự mẫn cảm của các mẫu vi sinh vật đến streptomycin

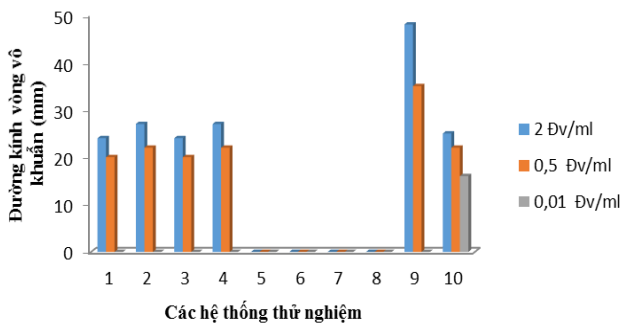
Streptomycin được pha loãng ở các nồng độ 2Đv/ml; 0,5Đv/ml; 0,01 Đv/ml, rồi cho vào các lỗ thạch để nghiên cứu. Kết quả thu được thể hiện trên Hình 6, 7.



Hình 4. Biểu đồ về sự phụ thuộc đường kính vòng vô khuẩn với các nồng độ benzylpenicillin



Hình 5. *Bacillus subtilis* L2 với môi trường pH8,0



Hình 6. Biểu đồ về sự phụ thuộc đường kính vòng vô khuẩn với các nồng độ Streptomycin

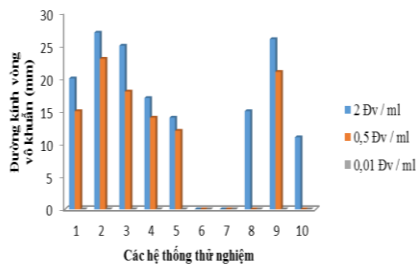


Hình 7. *Bacillus subtilis* L2 với môi trường pH 8,0

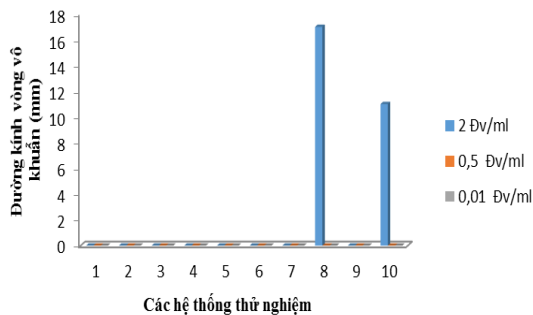
Từ biểu đồ (Hình 6) có thể thấy rằng, vi sinh vật từ các mẫu hệ thống thử nghiệm số 1, 2, 3, 4, 9, 10 đều bị ức chế phát triển bởi streptomycin. Trong đó, chỉ có *Bacillus stearothermophilus* trên môi trường Kundrat miễn cảm với streptomycin ở nồng độ 0,01 Đv/ml. Sự phát triển của các vi sinh vật tại các mẫu số 5, 6, 7, 8 đều không bị ảnh hưởng bởi tác động của streptomycin.

3.4. Nghiên cứu sự miễn cảm của các mẫu vi sinh vật đến grisin

Grisin được pha loãng ở các nồng độ 2Đv/ml; 0,5Đv/ml; 0,01 Đv/ml, rồi cho vào các lỗ thạch để nghiên cứu. Kết quả thu được trình bày ở Hình 8 và 9.



Hình 8. Biểu đồ về sự phụ thuộc đường kính vòng vô khuẩn với các nồng độ grisin



Hình 10. Biểu đồ về sự phụ thuộc đường kính vòng vô khuẩn với các nồng độ bacitracin

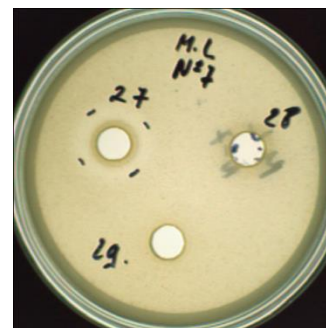
Ở nồng độ 0,01 Đv/ml, sinh trưởng của tất cả các vi sinh vật nghiên cứu đều không bị ảnh hưởng dưới tác động của grisin. Tại các mẫu hệ thống số 1, 2, 3, 4, 5, 8, 9, 10 đều xuất hiện vòng vô khuẩn khi grisin ở nồng độ từ 0,5 Đv/ml trở lên. Sinh trưởng và phát triển của *Bacillus cereus* ATCC 11778 không bị ảnh hưởng dưới tác động của grisin.

3.5. Nghiên cứu sự miễn cảm của các mẫu vi sinh vật đến bacitracin

Bacitracin được pha loãng ở các nồng độ 2Đv/ml; 0,5Đv/ml; 0,01 Đv/ml, rồi cho vào các lỗ thạch để nghiên cứu. Kết quả thu được biểu diễn ở Hình 10 và minh họa ở Hình 11.



Hình 9. *Micrococcus lutea* ATCC 9341 với môi trường pH 8,0



Hình 11. *Micrococcus lutea* ATCC 9341 với môi trường số 7



Hình 12. *Micrococcus lutea* ATCC 9341 với dung dịch đệm pH 6,0; 7,2; 8,0



Hình 13. *Bacillus subtilis* L2 với dung dịch đệm 1, 2, 4, 6

Kết quả nghiên cứu cho thấy, chỉ có *Micrococcus lutea* ATCC 9341 với môi trường số 7 và *Bacillus stearothermophilus* trên môi trường Kundrat miễn cảm đối với bacitracin ở nồng độ 2 Đv/ml.

3.6. Kiểm tra tính kháng khuẩn của các dung dịch đệm

Thử nghiệm các mẫu vi sinh vật nghiên cứu với các dung dịch đệm đều nhận thấy rằng không xuất hiện vòng vô khuẩn (Hình 12, 13). Vì vậy, các dung dịch đệm dùng để pha loãng kháng sinh đều không ảnh hưởng tới sự sinh trưởng và phát triển của vi sinh vật kiểm định.

3.7. Xác định kháng sinh tồn dư trong các loại thực phẩm

Sau khi nghiên cứu, đã tổng kết rằng, bằng phương pháp vi sinh vật có thể xác định kháng sinh tồn dư trong thực phẩm. Trong đó, hai mẫu vi sinh vật là *Bacillus subtilis* L2 và *Bacillus stearothermophilus* đều bị tiêu diệt (hoặc kìm hãm sự phát triển) dưới tác động của nhiều loại kháng sinh, ngay khi ở nồng độ rất thấp (0,005Đv/ml), vì thế có thể được sử dụng một trong hai mẫu vi sinh vật trên để phát hiện ra tồn dư kháng sinh.

Kháng sinh tồn dư trong thực phẩm (thịt, cá, trứng, sữa...) được tách ra nhờ các dung dịch đệm (gọi là dung dịch tách), bảo quản trong tủ lạnh ở nhiệt độ 0-4°C, trong vòng 24 tiếng. Chuẩn bị: hệ thống thứ nhất (gồm môi trường pH 8,0 cùng với *Bacillus subtilis* L2) hoặc hệ thống thứ hai (gồm

môi trường Kundrat với *Bacillus stearothermophilus*), sau đó cho 10ml từ từng hệ thống vào đĩa Petri. Sau khi đĩa Petri thạch đông lại sẽ tiến hành đục lỗ thạch. Dung dịch tách được cho vào các lỗ thạch. Đặt đĩa thạch trong tủ cấy từ 2 - 3 tiếng để kháng sinh khuếch tán vào thạch, sau đó đặt vào tủ ấm với nhiệt độ thích hợp cho vi sinh vật kiểm định phát triển, sau 48 tiếng lấy đĩa ra quan sát. Nếu xuất hiện vòng kháng khuẩn chứng tỏ mẫu thực phẩm có chứa kháng sinh tồn dư.

4. Kết luận

Qua các kết quả nghiên cứu cho thấy, tất cả các mẫu vi sinh vật nghiên cứu đều có miễn cảm khác nhau với các loại kháng sinh, vì vậy có thể sử dụng chúng để xác định kháng sinh tồn dư trong các loại thực phẩm.

Bacillus subtilis L2 miễn cảm với các loại kháng sinh ngay cả ở nồng độ thấp, vì thế để xác định kháng sinh tồn dư trong thực phẩm có thể sử dụng *Bacillus subtilis* L2 trên môi trường với pH 8,0.

Mẫu vi khuẩn *Bacillus cereus* ATCC 11778 chỉ tạo vòng vô khuẩn với tetracycline, nên có thể dùng chúng để xác định tetracycline tồn dư trong thực phẩm.

Trên môi trường Kundrat, *Bacillus stearothermophilus* bị tiêu diệt và ức chế sinh trưởng dưới tác động của hầu hết các loại kháng sinh, vì vậy, có thể sử dụng mẫu vi khuẩn này để xác định kháng sinh tồn dư trong thực phẩm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Пищевые довавки. А.п. Кочеткова; а.н. Зайцев., *Пищевые довавки*, М.: Колос, 2001. - 256 с.
- [2] PGS.TS. Dương Thanh Liêm (2014), *Kháng sinh sử dụng trong thức ăn chăn nuôi, sự tồn dư và tính*

kháng thuốc của vi khuẩn gây bệnh, ĐH Nông Lâm Tp. HCM.

- [3] TS. Vũ Ngọc hoà, *Các phương pháp xác định lượng dư thuốc kháng sinh trong thực phẩm*, ĐH Bách khoa Tp. HCM.
- [4] Phạm Kim Đăng và các tác giả (2008), “Ứng dụng phương pháp ELISA để phân tích tồn dư kháng sinh nhóm quinolone trong tôm tại một số tỉnh ven biển khu vực phía Bắc”, *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, tập VI, Số 3, 261 -267. Đại học Nông nghiệp Hà Nội.
- [5] Кальницкая .О.И. *Современные методы определения антибиотиков*, Ветеринария, 2006г.-54-56с.
- [6] Кальницкая .О.И., *Методы лабораторного контроля животноводческой продукции, содержащей антибиотики*, МГУПБ. Москва 2006-98с.
- [7] Минздравом СССР, *Методические указания по определению остаточных количеств антибиотиков в продуктах животноводства*, Минздравом СССР. 1984- 27с.