

## ĐÁNH GIÁ SỰ SINH TRƯỞNG Ở NHIỆT ĐỘ THẤP CỦA *SERRATIA PLYMUTHICA* RVH1 VÀ ĐỒNG ĐỘT BIẾN

Nguyễn Thị Như Hạ<sup>1</sup>, Chris Michiels<sup>2</sup> và Nurlinawati<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

<sup>2</sup> Khoa Kỹ thuật Khoa học sinh học, Trường KU Leuven

### ABSTRACT

*A study on growth assessment of Serratia plymuthica RVH1 (causing chilled food spoilage) and the mutant TMI-S18 (a cold-defective mutant of S. plymuthica RVH1) at low temperatures was carried out. Growth parameter estimates of the wild type and mutant strain were determined by program Microfit 1.0. The results showed that in comparison to Tryptic Soy Broth (TSB), Luria Bertani (LB) performed better in supporting growth of the strain, Serratia plymuthica RVH1 budAB<sup>-</sup> at low temperatures. Besides, the both cell number and OD measurements can be used interchangeably for growth assessment of Serratia plymuthica RVH1 budAB<sup>-</sup>. The linear relationship between log(OD) and log(cfu/ml) of Serratia plymuthica RVH1 budAB<sup>-</sup> in either LB or TSB at three different temperatures was also obtained. Although the growth at 30°C ( $\mu_{max}=0,15h^{-1}$ ) was seen, the mutant TMI\_S18 showed distinct growth from its wild type at low temperatures which was the defective growth at low temperature (4°C) ( $\mu_{max}$ , can't be determined). Therefore, in this experiment, the gene plsC knocked out in mutant TMI\_S18 is the one gene essential for cold adaptation of Serratia plymuthica. However, mutant and complement strains, the linear relationship between log(OD) and log(cfu/ml) of the mutant was unable to be constructed.*

### Thông tin chung:

Ngày nhận: 10/6/2014

Ngày chấp nhận: 04/8/2014

### Title:

Low temperature growth assessment of *Serratia plymuthica* RVH1 and mutant strain TMI-S18

### Từ khóa:

*Serratia plymuthica* RVH1, đánh giá sự tăng trưởng, quan hệ tuyến tính, đồng đột biến TMI-S18

### Keywords:

*Serratia plymuthica* RVH1, growth assessment, linear regression, the mutant TMI-S18

### TÓM TẮT

Nghiên cứu đánh giá về sự tăng trưởng của *Serratia plymuthica* RVH1 (đồng vi khuẩn góp phần gây hư hỏng thực phẩm tươi sống) và đồng đột biến (không có khả năng thích nghi trong môi trường lạnh) ở nhiệt độ thấp được thực hiện. Các thông số tăng trưởng được xác định cho đồng hoang dại và đồng đột biến bằng chương trình MicroFit phiên bản 1.0. Kết quả thu nhận cho thấy, Luria Bertani (LB) là môi trường nuôi cấy thích hợp nhất cho sự tăng trưởng của *Serratia plymuthica* RVH1 budAB<sup>-</sup> ở nhiệt độ thấp so với TSB. Phương pháp đo đĩa và đo mật độ quang (OD) đều có thể được áp dụng cho quá trình thu thập số liệu đánh giá sự tăng trưởng của *Serratia plymuthica* RVH1 budAB<sup>-</sup>. Kết quả cũng cho thấy có quan hệ tuyến tính giữa log(OD) và log(cfu/ml) cho sự tăng trưởng của *Serratia plymuthica* RVH1 budAB<sup>-</sup> trong cả môi trường nuôi cấy LB và TSB ở nhiệt độ khác nhau. Mặc dù, có sự tăng trưởng ở 30°C ( $\mu_{max}=0,15$  giờ<sup>-1</sup>), đồng đột biến TMI-S18 thể hiện không có khả năng sinh trưởng, thích nghi ở điều kiện lạnh (không xác định được  $\mu_{max}$ ). Vì vậy, theo nghiên cứu trên, gen plsC bị bất hoạt trong đồng đột biến là một trong những gen cần thiết cho sự thích nghi điều kiện lạnh của *Serratia plymuthica*. Tuy nhiên, không thể thiết lập mô hình tuyến tính giữa log(OD) và log(cfu/ml) cho đồng đột biến này.

## 1 GIỚI THIỆU

Nhiệt độ có vai trò quan trọng trong quá trình sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn. Những loài vi khuẩn khác nhau có khoảng nhiệt độ tăng trưởng không giống nhau. Tầm quan trọng của nhiệt độ được thể hiện cụ thể qua sự ảnh hưởng đến sự chuyên hóa ở mức độ tế bào (hoạt động của enzyme, quá trình phiên mã, giải mã, hay tính lưu động của màng tế bào). Bên cạnh đó, có nhiều nghiên cứu chứng minh tác hại nghiêm trọng của vi khuẩn gây bệnh ưa lạnh (như *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Clostridium botulinum* và *Bacillus cereus*) trong chuỗi thực phẩm (Laksanalamai et al., 2011; Lindstrom et al., 2006).

Một điểm chú ý khác là mật độ khuẩn lạc hiện diện ảnh hưởng đến sự an toàn và khả năng bảo quản thực phẩm. Do đó, việc xác định số lượng tế bào là điều cần thiết. Động học của tăng trưởng, tồn tại và chết của vi sinh vật trong thực phẩm cần được xem xét một cách rõ ràng bằng việc đánh giá mỗi nguy vi sinh (Codex, 1999). Khái niệm về dự báo vi sinh vật - một mô hình sinh thái học về vi sinh trong thực phẩm được đề xuất bởi Roberts và Jarvis (1983). Vì vậy, những mô hình toán học được sử dụng để có thể tiên đoán thời hạn sử dụng của sản phẩm thực phẩm. Những mô hình này mô tả đặc điểm tác động lẫn nhau của các thông số về môi trường sinh trưởng. Sự sinh trưởng của vi khuẩn trong pha lũy thừa là quá trình được xúc tác, quá trình này được biểu diễn bởi phương trình động học bậc một (Poschet et al., 2005; Swinnen et al., 2004). Mô hình sinh trưởng bậc một là một mô hình trong đó dữ liệu thiết lập được dùng để mô tả sự phát triển lũy thừa của quần thể vi khuẩn theo thời gian. Chính vì thế, đường cong sinh trưởng của vi khuẩn thường được xây dựng như là hàm

logarit của số lượng tế bào theo thời gian. Đặc biệt, mô hình lũy thừa, mô hình logistic hay mô hình của Baranyi và Roberts là những mô hình bậc một thông dụng nhất (Fakruddin et al., 2011).

Hiện nay, vi khuẩn ưa ấm là nguồn gây nên bệnh thực phẩm do sự phát triển nhanh chóng ở nhiệt độ cơ thể người và đã có nhiều nghiên cứu nhằm nắm bắt được sinh thái và sinh lý của vi khuẩn trên. Ví dụ như nhiệt độ tăng trưởng của *Salmonella* và *E.coli* thuộc nhóm ưa ấm từ 3,5 đến 37°C (Matches và Liston, 1968) và 4°C-50°C (Adam và Moss, 2008) đã được nghiên cứu rất chi tiết. Trong khi đó, rất ít thông tin về vi khuẩn ưa lạnh (tồn tại và phát triển ở 4°C hoặc thấp hơn), mặc dù chúng là nguyên nhân cho sự hư hỏng thực phẩm ở cả nhiệt độ thường và nhiệt độ lạnh. Câu hỏi được đặt ra cho mối liên hệ giữa vi khuẩn ưa ấm (*Samonella* và *E.coli*) và những dòng *Enterobacteriaceae* ưa lạnh đã khởi nguồn nghiên cứu về việc có khả năng vi khuẩn ưa ấm thích nghi được lạnh hay không.

*Serratia plymuthica* RVH1 được phân lập từ môi trường chế biến thực phẩm. Dòng khuẩn lạc này có liên hệ với thực phẩm tươi sống và góp phần gây hư hỏng. Chúng có khả năng tồn tại và sinh sản ở nhiệt độ thấp. Ngoài ra, *S.plymuthica* RVH1 cũng sở hữu mối nguy lớn với sự an toàn và ổn định của thực phẩm bảo quản lạnh. Việc hiểu rõ hơn cơ chế thích nghi với nhiệt độ lạnh ở dòng khuẩn trên là điều cần thiết nhằm khắc phục và cải thiện mối nguy này.

## 2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1 Vật liệu nghiên cứu

#### 2.1.1 Dòng vi khuẩn

Dòng vi khuẩn sử dụng trong nghiên cứu được liệt kê ở Bảng 1.

**Bảng 1: Dòng vi khuẩn tương ứng với nhiệt độ tối ưu và môi trường tăng trưởng**

Dòng	Kiểu gen	Môi trường nuôi cấy	Nhiệt độ tối ưu	Tham khảo
<i>Serratia plymuthica</i> RVH1 <i>budAB</i>	<i>budAB</i> <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup>	LB*, TSB**	30°C	Vivijs (2009) (số liệu chưa công bố)
<i>Serratia plymuthica</i> TM1 S18	<i>plsC</i> (bất hoạt)	LB	30°C	Nurlinawati (2010) (số liệu chưa công bố)

\*LB - Luria Bertani; \*\*TSB - Tryptone soya broth

#### 2.1.2 Môi trường

Môi trường nuôi cấy Luria Bertani (LB) và Tryptone soya broth (TSB) được tiệt trùng trong 20

phút ở 121°C trước khi sử dụng.

Dung dịch đệm phosphate (pH = 7,0) được tiệt trùng trong 20 phút ở 121°C trước khi sử dụng

2.1.3 Thiết bị

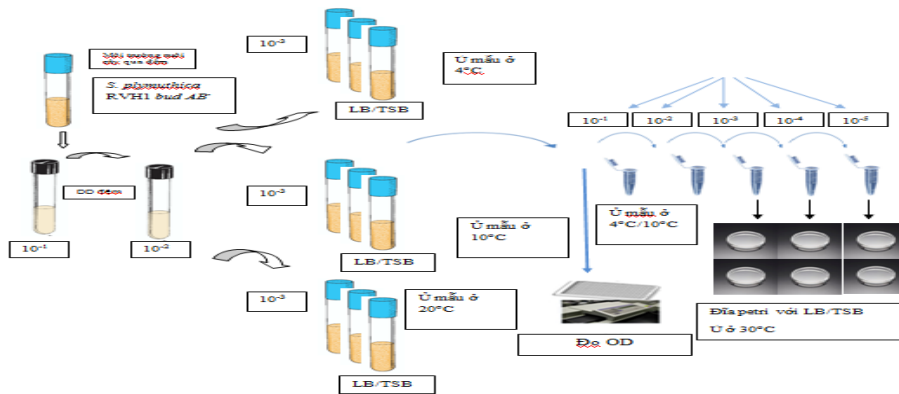
Độ đục của huyền phù vi khuẩn (mật độ quang) được đo bằng máy Multiskan RC với bước sóng là 600 nm và thể tích mỗi giếng đo là 300 ml.

Số lượng khuẩn lạc sau nuôi cấy trên đĩa petri được xác định bằng dụng cụ đếm.

2.2 Phương pháp bố trí thí nghiệm

2.2.1 Thí nghiệm 1: Sự sinh trưởng và phát triển của *Serratia plymuthica* RVH1 ở nhiệt độ thấp

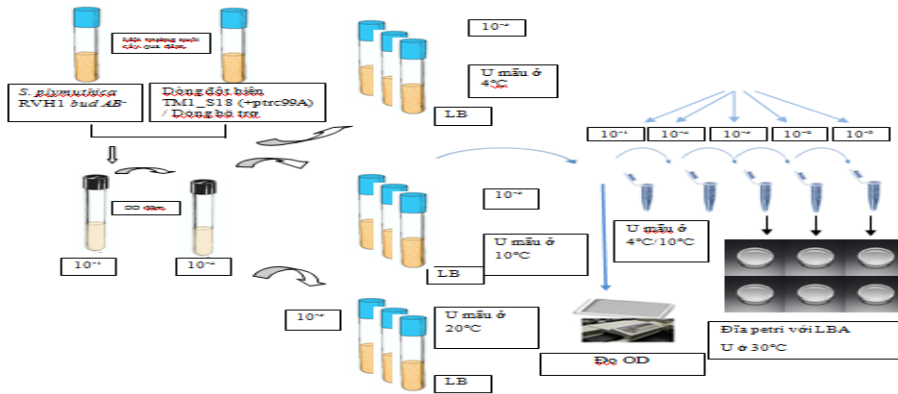
Mục đích: Xác định thông số và đường cong sinh trưởng của dòng *Serratia plymuthica* RVH1



Hình 1: Sơ đồ bố trí thí nghiệm

2.2.2 Thí nghiệm 2: Đánh giá sự sinh trưởng và phát triển của *Serratia plymuthica* TM1-S18 và dòng bổ trợ (complemented strain)

Mục đích: Xác định thông số và đường cong



Hình 2: Sơ đồ bố trí thí nghiệm

Tiến hành thí nghiệm: Thí nghiệm được bố trí theo sơ đồ (Hình 2). Quá trình nuôi cấy dòng *Serratia plymuthica* bố mẹ, dòng đột biến (TM1-S18) và dòng bổ trợ được thực hiện trong ống nghiệm (có lắc) ở 4°C, 10°C, 30°C. Tiến trình pha

trong môi trường LB và TSB ở nhiệt độ thấp. Xây dựng mô hình hồi quy giữa log(OD) và log (cfu/ml) bằng vẽ đồ thị.

Tiến hành thí nghiệm: Thí nghiệm được bố trí theo sơ đồ (Hình 1). 1ml môi trường nuôi cấy qua đêm đã pha loãng được cấy truyền vào 9 ml canh trường LB và TSB. Sau đó, canh trường được đem ủ ở ba nhiệt độ khác nhau (4°C, 10°C, 20°C) trong ống nghiệm với tốc độ lắc là 200 vòng/phút. Thực hiện lấy mẫu mỗi ngày để xác định giá trị mật độ quang (OD) và mật độ khuẩn lạc. Sự phát triển được thực hiện đến khi đạt được pha cân bằng. Thí nghiệm được lặp lại ba lần.

sinh trưởng của dòng *Serratia plymuthica* bố mẹ, dòng đột biến (TM1-S18) và dòng bổ trợ. Xây dựng mô hình hồi quy giữa log(OD) và log (cfu/ml) bằng vẽ đồ thị.

loãng, ủ ấm, đo đặc thông số phát triển được hiện tương tự thí nghiệm 1 (ở trên). Sau đó, đánh giá sự phát triển bằng đo OD và đồ đĩa. Thí nghiệm được lặp lại ba lần.

### 2.3 Phương pháp thu thập, tính toán và xử lý số liệu

Số liệu được phân tích hồi quy tương quan bằng chương trình Minitab (16.0).

## 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1 Thí nghiệm 1: Sự sinh trưởng và phát triển của *Serratia plymuthica* RVH1 ở nhiệt độ thấp

Mục đích của thí nghiệm là xác định được loại môi trường thích hợp cho sự sinh trưởng của dòng vi khuẩn khảo sát từ hai loại môi trường nuôi cấy thông dụng (LB và TSB). Do đó, tiến hành đánh giá sự phát triển của *Serratia plymuthica* RVH1 *budAB*<sup>-</sup> (là dòng bố mẹ của những dòng đột biến được chọn lọc) ở nhiệt độ thấp trong môi trường LB và TSB. Môi trường nuôi cấy giúp cho sự sinh trưởng tốt ở nhiệt độ thấp sẽ được lựa chọn cho thí nghiệm về sau.

Theo Hình 3 và Hình 4, trong môi trường nuôi cấy LB và TSB, đường sinh trưởng của *Serratia plymuthica* RVH1 *budAB*<sup>-</sup> được thiết lập dựa trên hàm logarithm của số lượng tế bào ( $\log(\text{cfu/ml})$ ) và mật độ quang (OD) ở 4°C, 10°C và 20°C.

Các thông số sinh trưởng được ước tính dựa vào chương trình Microfit 1.0, một mô hình cấp một dựa trên công thức của Baranyi (*Baranyi và Roberts, 1994*). Mô hình này trình diễn ba pha (pha lag, pha lũy thừa, pha cân bằng) phân biệt của sự sinh trưởng. Vì vậy, bên cạnh xây dựng đường sinh trưởng, các thông số tăng trưởng (tốc độ sinh trưởng cực đại-  $\mu_{\max}$ , thời gian tiềm phát- pha lag-  $t_{\text{lag}}$ , thời gian thế hệ-  $t_d$ , số lượng cực đại tế bào khuẩn lạc-  $N_{\max}$ ) của *S.plymuthica* RVH1 *budAB*<sup>-</sup> trong hai môi trường nuôi cấy tại nhiệt độ khác nhau được phân tích (Bảng 2).

Về tổng quan, độ tin cậy của số liệu được kiểm định dựa trên đường sinh trưởng và độ lệch chuẩn được thiết lập bằng  $\log(\text{cfu/ml})$  và giá trị OD (Hình 3 và 4). Trong môi trường LB và TSB cùng với sự phát triển ở 4°C, nhiều điểm dữ liệu được thu thập trong pha tiềm phát và pha cân bằng góp phần ước lượng chính xác tốc độ sinh trưởng cực đại cũng như thời gian pha lag cho *Serratia plymuthica* RVH1 *budAB*<sup>-</sup>. Tuy nhiên, tại 10°C và 20°C, khó xác định chính xác thời gian pha lag và tốc độ sinh trưởng lớn nhất bởi vì ít điểm dữ liệu được thu nhận ở pha tiềm phát và pha cân bằng. Sự thiếu hụt điểm dữ liệu ở pha tiềm phát và pha lag hạn chế sự tương thích số liệu vào mô hình Microfit. Điều này lý giải thời gian của pha tiềm phát có giá trị âm ở 10°C trong môi trường nuôi

cấy TSB và giá trị tốc độ sinh trưởng cực đại ( $\mu_{\max}$ ) trong môi trường LB ở 10°C cao hơn so với 20°C (Bảng 2). Vì vậy, các thông số trên có thể được bỏ qua do không phù hợp với thực tế sinh học. Từ đường cong sinh trưởng của *Serratia plymuthica* RVH1 *budAB*<sup>-</sup> xây dựng bởi log (cfu/ml) (Hình 3, 4) cho thấy sự sinh trưởng của *Serratia plymuthica* RVH1 *budAB*<sup>-</sup> trong LB và TSB là khác nhau ở ba nhiệt độ. Pha tiềm phát được thể hiện rõ ràng ở nhiệt độ sinh trưởng 4°C, ngắn hơn ở 10°C và hầu như không có ở 20°C (Hình 3, 4). Bên cạnh đó, thời gian pha lag được ước tính từ đường cong sinh trưởng thiết lập bởi Microfit 1.0. Điều này lý giải sự thích nghi điều kiện lạnh của vi khuẩn ở nhiệt độ thấp. Nói theo cách khác, pha lag hiện diện khi có sự thay đổi về điều kiện nhiệt độ sinh trưởng từ cao xuống thấp, tương ứng với môi trường nuôi cấy ban đầu và môi trường nuôi cấy khuẩn lạc sau đó. Thực vậy, môi trường nuôi cấy đầu tiên là canh LB ở 30°C (có lác) đến khi đạt pha cân bằng.

Trong môi trường LB thời gian pha tiềm phát là dài nhất ở 4°C (36,6h), tiếp theo là ở 10°C (20,3h) trong khi thời gian ngắn nhất là ở 20°C (1,3h). Thời gian pha lag ở 20°C được ước lượng quá nhỏ do đó khó quan sát được trên cả 2 đồ thị được xây dựng bởi log (cfu/ml) hoặc giá trị OD.

Trong môi trường TSB thời gian pha tiềm phát ở 4°C, 10°C và 20°C là 21,6h -1,6h và 0,7h theo thứ tự. Điều này có nghĩa là ở 20°C và 10°C hầu như không có pha tiềm phát nhưng pha lag được hiện diện ở nhiệt độ nuôi cấy là 4°C. Điều quan trọng là bên cạnh điều kiện nhiệt độ, pha tiềm phát bị ảnh hưởng bởi điều kiện lịch sử sinh lý của tế bào. Pha tiềm phát sẽ kéo dài hơn trong môi trường nuôi cấy thứ hai khi mà tế bào được lấy từ môi trường nuôi cấy trước có hoạt động chuyển hóa thấp do ở gần trạng thái của pha cân bằng khi so sánh với tế bào được lấy từ pha lũy thừa (*Baranyi and Roberts, 1994*). Vì vậy, để khảo sát được pha lag ở các nhiệt độ khác nhau trong thí nghiệm này, trước khi cấy vào thí nghiệm thực sự, tế bào vi khuẩn đã đạt được pha cân bằng ở 30°C.

Khi so sánh pha lag của đường cong sinh trưởng thiết lập bởi log (cfu/ml) và OD, ta thấy đồ thị OD mô tả pha tiềm phát rõ ràng hơn đồ thị log (cfu/ml). Điều này được lý giải là do việc đo đạc OD huyền phù có độ đục thấp sẽ dễ dẫn đến kết quả không chính xác cũng như không phân biệt được sự khác biệt giữa hai lần khảo sát. Ngoài ra, tỷ lệ khoảng cách giữa điểm cao nhất và điểm thấp nhất trên đồ thị log (OD) là nhỏ hơn so với đồ thị log (cfu/ml). Do đó, rất khó để quan sát được sự



khác biệt không đáng kể giữa hai mẫu. Đặc biệt điều này rất dễ xảy ra ở pha lag.

Dựa vào Bảng 2, trong môi trường nuôi cấy LB, cấp độ sinh trưởng cực đại ( $\mu_{max}$ ) ở 10°C của *Serratia plymuthica* RVH1 *budAB*<sup>-</sup> là 0,8 (giờ<sup>-1</sup>) cao hơn so với 20°C (0,7 giờ<sup>-1</sup>). Điều này hầu như là không đúng trong thực tế sinh học, vì vậy thông số này được bỏ qua do bởi không đủ dữ liệu thu thập. Có sự khác biệt đáng kể về  $\mu_{max}$  trong môi trường LB giữa nhiệt độ nuôi cấy 4°C (0,06 giờ<sup>-1</sup>) và 20°C (0,7 giờ<sup>-1</sup>).

Tốc độ sinh trưởng cực đại ở 20°C (0,38 giờ<sup>-1</sup>) trong môi trường nuôi cấy TSB có sự khác biệt lớn với  $\mu_{max}$  ở 4°C (0,07 giờ<sup>-1</sup>) và 10°C (0,11 giờ<sup>-1</sup>). Tuy nhiên, sự khác biệt này không đáng kể khi so sánh giữa 4°C và 10°C về  $\mu_{max}$ .

Về tổng quan có thể kết luận rằng sự tăng trưởng của *Serratia plymuthica* RVH1 *budAB*<sup>-</sup> trong cả môi trường LB và TSB có pha lag kéo dài ở 4°C nhưng ngắn hơn ở 10°C và 20°C. Đồng thời tốc độ sinh trưởng cực đại bị hạn chế ở 4°C và 10°C so với 20°C mặc dù dòng vi khuẩn vẫn phát triển được ở 4°C trong môi trường nuôi cấy.

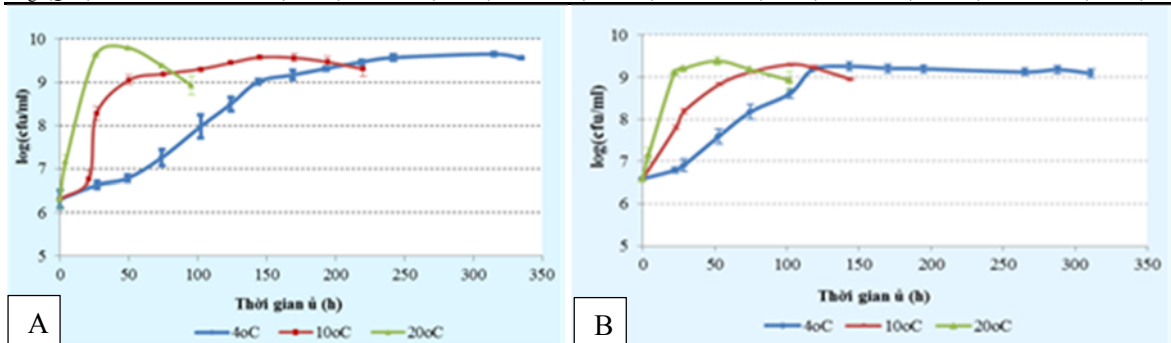
So sánh sự tăng trưởng của *Serratia plymuthica* RVH1 *budAB*<sup>-</sup> trong môi trường nuôi cấy LB và TSB cũng được chú ý. Ngoại trừ thông số  $\mu_{max}$  có độ tin cậy thấp ở 10°C trong LB, nhìn chung sự

sinh trưởng trong LB trình diễn giá trị cao hơn về  $\mu_{max}$  và tổng số tế bào ở cả 10°C và 20°C khi so sánh với sự tăng trưởng trong TSB. Một điểm nổi bật khác là thời gian pha lag ở cả ba nhiệt độ nuôi cấy trong môi trường LB thì dài hơn TSB mặc dù vi khuẩn được tiên nuôi cấy trong canh LB (Bảng 2). Điều quan tâm ở đây là dù được tiên nuôi cấy trong LB sau đó được chuyển sang nuôi cấy trong canh LB mới khác nhưng vẫn có sự thay đổi về điều kiện nuôi cấy vì sự tăng trưởng đạt đến pha cân bằng ở trong môi trường nuôi cấy thứ nhất góp phần dẫn đến sự thay đổi về pH, hàm lượng chất dinh dưỡng, cũng như sự trao đổi hợp chất. Do đó, ngay cả khi cùng sử dụng môi trường LB cho cả hai lần tiên và sau nuôi cấy cũng không có nghĩa là có chính xác cùng điều kiện sinh trưởng. Điều này được minh chứng thông qua pha tiềm phát kéo dài hơn trong môi trường LB so với TSB.

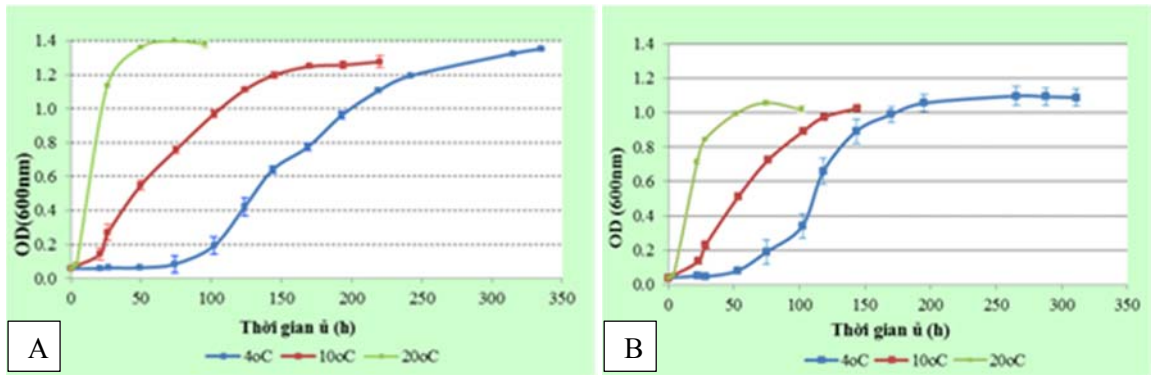
Một điểm khác đáng lưu ý là sự sinh trưởng ở 4°C trong LB có giá trị  $\mu_{max}$  thấp hơn (không đáng kể) và thời gian dài hơn để đạt mật độ khuẩn lạc cao nhất sau đó nuôi cấy trong môi trường TSB, tuy nhiên số lượng khuẩn lạc cực đại trong LB đạt giá trị cao hơn trong TSB. Giải thích cho điều này là do sự sinh trưởng tế bào trong LB khởi đầu với số lượng tế bào thấp hơn nhưng đạt được giá trị tổng số tế bào cao hơn khi so sánh với nuôi cấy trong TSB.

**Bảng 2:** Thông số tăng trưởng của *Serratia plymuthica* RVH1 *budAB*<sup>-</sup> trong LB và trong TSB ở 4°C, 10°C và 20°C được thiết lập bởi Microfit 1.0

Thông số tăng trưởng	LB			TSB		
	4°C	10°C	20°C	4°C	10°C	20°C
$N_{max}$ (cfu/ml)	9,5± 0,05	9,4 ± 0,07	9,4 ± 0,23	9,2 ± 0,04	9,2 ± 0,09	9,2 ± 0,1
$\mu_{max}$ (giờ <sup>-1</sup> )	0,06 ± 0,00	0,8 ± 0,17	0,7 ± 5,05	0,07 ± 0,01	0,11 ± 0,04	0,38 ± 0,26
$t_d$ (giờ)	12,3± 0,04	0,9 ± 0,15	1 ± 5,03	9,9 ± 0,07	6,0 ± 0,22	1,8 ± 0,48
$t_{lag}$ (giờ)	36,6 ± 7,1	20,3 ± 1,29	1,34 ± 2,12	21,6 ± 6,89	-1,7 ± 10,86	0,7 ± 4,02



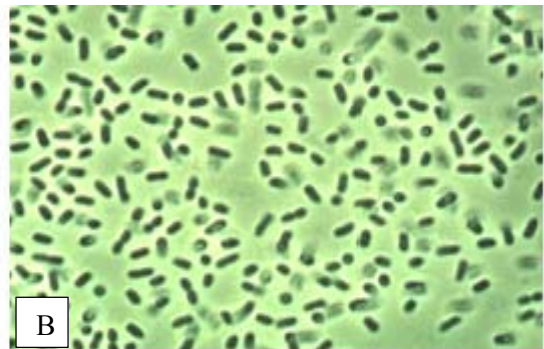
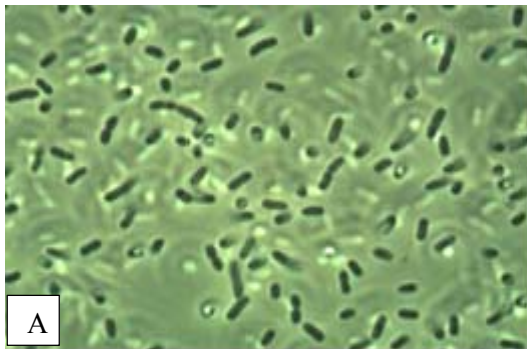
**Hình 3:** Đường cong sinh trưởng của *Serratia plymuthica* RVH1 *budAB*<sup>-</sup> được thiết lập bởi log (mật độ vi khuẩn) trong LB (A) và TSB (B) ở nhiệt độ 4°C (◆), 10°C (■) và 20°C (▲). Điểm dữ liệu là các giá trị trung bình ±SD của ba lần thí nghiệm độc lập



**Hình 4: Đường cong sinh trưởng của *Serratia plymuthica* RVH1 *budAB* được thiết lập bởi mật độ quang (OD) trong LB (A) và TSB (B) ở nhiệt độ 4°C (—●—), 10°C (—■—) và 20°C (—▲—). Điểm dữ liệu là các giá trị trung bình ±SD của ba lần thí nghiệm độc lập**

Mục đích tiếp theo của nghiên cứu là thiết lập mối quan hệ giữa mật độ quang và số lượng tế bào nhằm đánh giá khả năng xây dựng mô hình hồi quy giữa OD và log (cfu/ml) bằng vẽ đồ thị. Trước tiên thực hiện kiểm tra thống kê về hệ số tương quan (R) giữa log (OD) và log (cfu/ml). Điều quan trọng là những hệ số tương quan trong thí nghiệm này có giá trị cao chứng tỏ có mối tương quan tốt giữa log (OD) và log (cfu/ml). Sau đó đồ thị hồi quy cùng với các phương trình hồi quy trong môi trường

nuôi cấy LB và TSB ở từng nhiệt độ khác nhau và cả ba nhiệt độ được biểu diễn. Các phương trình hồi quy này được thể hiện ở Bảng 3. Giá trị trung bình của các biến phụ thuộc (giá trị log(cfu/ml)) được xác định bởi hàm bậc nhất của biến độc lập (giá trị log(OD)). Dựa vào phương trình hồi quy khi giá trị log(OD) tăng thì giá trị log(cfu/ml) tăng tuyến tính. Cùng với hệ số xác định ( $R^2$ ) lớn hơn 85% và sai số chuẩn (S) thấp cho thấy phương trình hồi quy được thiết lập có độ tin cậy cao.



**Hình 5: Ảnh tế bào của *Serratia plymuthica* RVH1 *budAB* trong LB (A) và TSB (B) được chụp bằng kính hiển vi Leica DMLB (Đức)**

Quan sát phương trình hồi quy và hệ số góc, ta thấy giữa log(OD) và log(cfu/ml) có mối tương quan không đổi ở từng nhiệt độ (4°C, 10°C và 20°C) cho sự phát triển của *Serratia plymuthica* RVH1 *budAB* trong LB và TSB. Khi xét về các phương trình hồi quy và hệ số góc ở các nhiệt độ và môi trường thì có sự khác biệt không đáng kể (Bảng 3). Vì vậy, phương trình hồi quy tổng hợp thiết lập cho cả ba nhiệt độ được thực hiện với hệ số góc là 2,24 trong môi trường nuôi cấy LB và 1,78 trong môi trường TSB.

Điều chú ý ở đây là có sự khác biệt về phương trình hồi quy giữa nuôi cấy trong LB và TSB mặc dù sự khác biệt không đáng kể. Giá trị OD không những liên quan đến số lượng tế bào mà còn liên quan đến hình dạng và kích thước. Ngoài ra, tế bào có kích thước dày và dài hơn có khả năng làm thay đổi độ hấp thụ của ánh sáng. Do có sự khác biệt về hệ số góc giữa hai công thức, một giả thiết được đưa ra là hệ số góc khác nhau có thể sẽ là yếu tố chỉ thị cho sự khác về kích thước của vi khuẩn trong LB hoặc TSB. Với hệ số góc lớn hơn khi nuôi cấy trong LB so với TSB, hình dạng tế bào vì

khử được nuôi cấy trong LB nhỏ hơn TSB được giả định. Vì vậy, tiến hành kiểm tra hình thái học vi khuẩn bằng kính hiển vi để khẳng định giả thuyết trên. Ảnh tế bào của *Serratia plymuthica* RVH1 *budAB*<sup>-</sup> trong LB và TSB được thể hiện trong Hình 5. Tuy nhiên, hình dạng tế bào của *Serratia*

*plymuthica* RVH1 *budAB*<sup>-</sup> trong môi trường nuôi cấy LB dường như dày và dài hơn so với TSB. Do đó, giả thuyết là không xảy ra cũng như sự khác nhau của hệ số góc là không đáng kể và được giải thích bởi sai số trong thí nghiệm.

**Bảng 3: Phương trình hồi quy của *Serratia plymuthica* RVH1 *budAB*<sup>-</sup> trong LB và TSB ở 4°C, 10°C, 20°C và tổng hợp cả 3 nhiệt độ (lấy từ đồ thị hồi quy – Minitab 16.0)**

Môi trường và nhiệt độ nuôi cấy	Phương trình hồi quy	R <sup>2</sup> (%)	S
LB – 4°C	Log (cfu/ml)- 4°C = 9,380+2,213logOD-4°C	98,7	0,15
LB – 10°C	Log (cfu/ml)-10°C = 9,342+2,493logOD-10°C	95,4	0,26
LB – 20°C	Log (cfu/ml)- 20°C = 9,182+2,113logOD-20°C	93,6	0,41
LB – 4-10-20°C	Log(cfu/ml)-4-10-20°C = 9,317+2,237logOD-4-10-20°C	95,8	0,26
TSB – 4°C	Log (cfu/ml)- 4°C = 9,232+1,735logOD-4°C	96,9	0,19
TSB – 10°C	Log (cfu/ml)-10°C = 9,272+1,815logOD-10°C	97,0	0,17
TSB – 20°C	Log (cfu/ml)- 20°C = 9,230+1,846logOD-20°C	97,9	0,19
TSB- 4-10-20°C	Log (cfu/ml)- 4-10-20°C = 9,243+1,782logOD-4-10-20°C	97,1	0,17

**3.2 Thí nghiệm 2: Đánh giá sự sinh trưởng và phát triển của *Serratia plymuthica* TM1-S18 và dòng bổ trợ (complemented strain)**

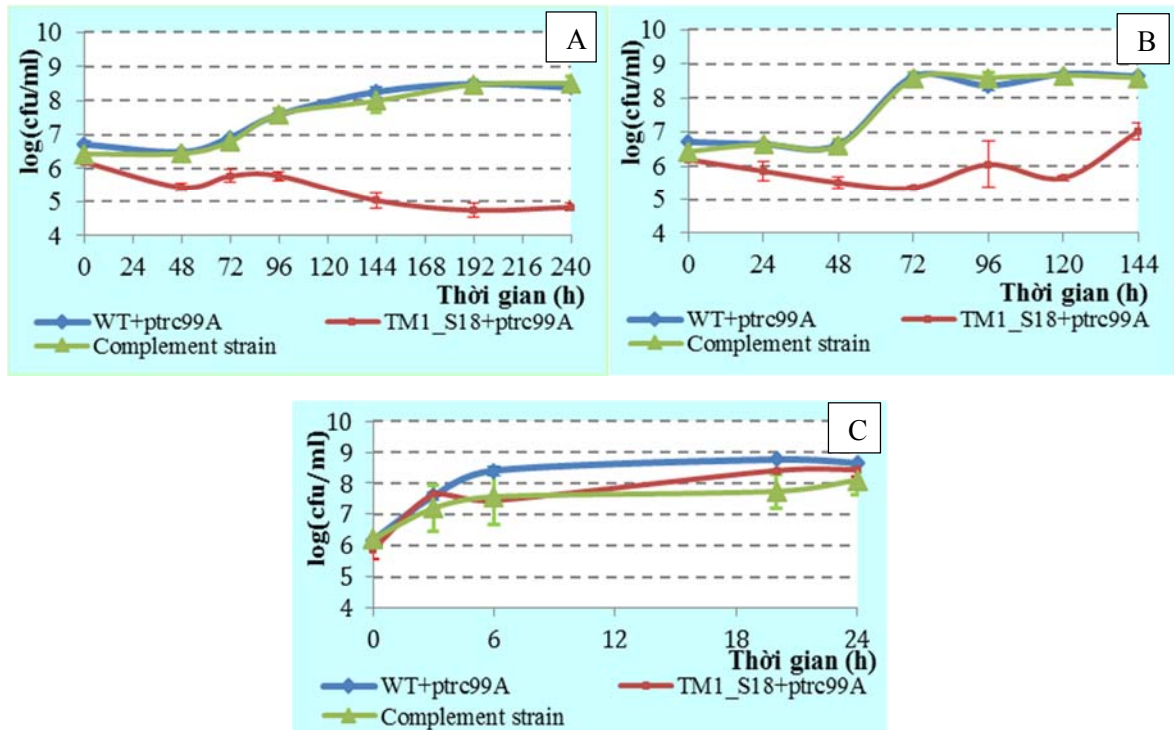
*Serratia plymuthica* TM1-S18 (có gắn ptrc99A) được giả định là dòng đột biến không có khả năng phát triển ở nhiệt độ thấp. Đánh giá sự tăng trưởng của dòng đột biến này, dòng bổ trợ và bố mẹ được thực hiện trong ống nghiệm (có lắc rung) ở ba nhiệt độ 30°C, 10°C và 4°C. Đường cong sinh trưởng của những loài trên ở nhiệt độ khác nhau được vẽ bởi log (số lượng tế bào) và OD (Hình 6, 7). Các thông số tăng trưởng ước lượng tại nhiệt độ 30°C (tính toán bằng chương trình Microfit 1.0) được trình bày ở Bảng 4. Ở 4°C thông số tăng trưởng của dòng đối chứng (bố mẹ) và dòng bổ trợ được ước tính nhưng dòng đột biến TM1-S18 thì không. Tuy nhiên, ở 10°C thông số tăng trưởng của cả ba dòng không thể tìm thấy. Dữ liệu cho thấy dòng đột biến TM1-S18+ptrc99A không phát triển ở 4°C và 10°C và dường như có khuynh hướng chết dần. Đối với dòng đối chứng và dòng bổ trợ ở 10°C lượng điểm dữ liệu thu thập quá ít ở giai đoạn pha lag và pha lũy thừa dẫn đến không thể xác định chính xác thông số tăng trưởng. Đường cong sinh trưởng của ba dòng ở 30°C là khá tương đồng. Từ Bảng 4 tốc độ sinh trưởng cực đại của dòng bổ trợ (0,68 giờ<sup>-1</sup>) là cao nhất tiếp theo là dòng đối chứng (0,21 giờ<sup>-1</sup>) và sau cùng là dòng đột biến (0,15 giờ<sup>-1</sup>). Tuy nhiên, những giá trị này có độ tin cậy không cao do sự thiếu hụt về điểm dữ liệu thu thập trong pha lũy thừa dẫn đến sai số trong ước lượng  $\mu_{max}$  số lượng tế bào cao nhất có giá trị đạt được gần như nhau (9,7 log(cfu/ml)) trong khi thời gian tiềm phát của

dòng đối chứng (5,4 giờ) là dài nhất theo sau bởi dòng đột biến (3,2 giờ) và dòng bổ trợ (2,9 giờ).

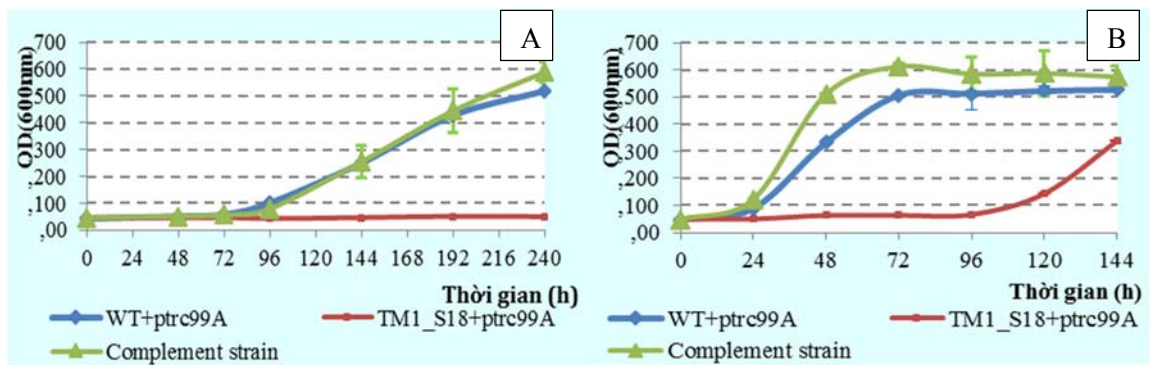
Sự sinh trưởng ở 4°C dòng đối chứng và dòng bổ trợ có cùng số lượng tế bào cực đại khoảng 8,4 log(cfu/ml) thấp hơn ở 30°C trái ngược với dòng đối chứng và dòng bổ trợ ở 4°C không có sự tăng trưởng của dòng đột biến. Mặc dù, tốc độ sinh trưởng của dòng đối chứng (0,1 giờ<sup>-1</sup>) cao hơn dòng bổ trợ (0,05 giờ<sup>-1</sup>), dòng bổ trợ dẫn thể hiện khả năng phát triển ở nhiệt độ thấp nhờ vào kết quả của việc thực hiện bổ thể.

Điều quan trọng là sự phát hiện rằng dòng đột biến có số lượng tế bào giảm đáng kể và tăng nhẹ ở 4°C và 10°C (theo thứ tự) trong quá trình nuôi cấy. Hiểu theo cách khác cụ thể hơn là dòng đột biến hầu như không thể tăng trưởng hay khiếm khuyết sự phát triển ở nhiệt độ thấp (4°C). Vì vậy, gen *plsC* bị bất hoạt ở dòng đột biến TM1-S18 là một gen giữ vai trò quan trọng trong sự thích nghi điều kiện lạnh của *Serratia plymuthica*.

Trong thí nghiệm này, mục đích xây dựng mối quan hệ giữa log(OD) và log(cfu/ml) của dòng bố mẹ, đột biến và bổ trợ là không thành công. Phương trình hồi quy của những dòng này ở 4°C và 10°C biểu diễn hệ số xác định (R<sup>2</sup>) rất thấp (<65%) và giá trị sai số chuẩn (S) cao ngoại trừ phương trình hồi quy của dòng đột biến ở 10°C (Bảng 5). Nguyên nhân có thể do những điểm dữ liệu không nằm trong khoảng đo đặc OD (như <6,5 log(cfu/ml)) mà còn do sự dao động của số liệu ngay cả khi nằm trong khoảng cho phép.



Hình 6: Đường cong sinh trưởng của dòng đối chứng (—◆—), TM1-S18 (với ptrc99A) (—■—), dòng bổ trợ (—▲—) ở 4°C (A), 10°C (B) và 30°C (C) được xây dựng bởi log(cfu/ml). Điểm dữ liệu là những giá trị trung bình ±SD của ba lần thí nghiệm độc lập. ‘WT+ ptrc99A: dòng đối chứng’, ‘Complement strain: dòng bổ trợ’



Hình 7: Đường cong sinh trưởng của dòng đối chứng (—◆—), TM1-S18 (với ptrc99A) (—■—), dòng bổ trợ (—▲—) ở 4°C (A), 10°C (B) được xây dựng bởi OD. Điểm dữ liệu là những giá trị trung bình ±SD của ba lần thí nghiệm độc lập. ‘WT+ ptrc99A: dòng đối chứng’, ‘Complement strain: dòng bổ trợ’



**Bảng 4: Thông số tăng trưởng của dòng bố mẹ (với ptrc99A) ở 4°C, dòng bố trợ ở 4°C, dòng bố mẹ (với ptrc99A) ở 30°C, TM1-S18 (với ptrc99A) ở 30°C, dòng bố trợ ở 30°C được thiết lập bởi Microfit 1.0**

Thông số tăng trưởng	30°C			4°C	
	Dòng bố mẹ + ptrc99A	S18 + ptrc99A	Dòng bố trợ	Dòng bố mẹ + ptrc99A	Dòng bố trợ
N <sub>max</sub> (cfu/ml)	9,7	9,7	9,6	8,4	8,5
μ <sub>max</sub> (h <sup>-1</sup> )	0,21	0,15	0,68	0,1	0,05
t <sub>d</sub> (h)	3,4	4,5	1,03	7,1	12,9
t <sub>lag</sub> (h)	5,4	3,2	2,94	71,9	53,7

**Bảng 5: Phương trình hồi quy của dòng bố mẹ, TM1-S18, dòng bố trợ ở 4°C, 10°C (lấy từ đồ thị hồi quy – Minitab 16.0)**

Dòng – nhiệt độ	Phương trình hồi quy	R <sup>2</sup> (%)	S
Bố mẹ + ptrc99A_4°C	Log (Bố mẹ + ptrc99A_4°C) = 9,131+1,807log(OD - Bố mẹ + ptrc99A_4°C)	93,8	0,23
S18 + ptrc99A_4°C	Log (S18 + ptrc99A_4°C) = 3,993 -1,312log(OD - S18 + ptrc99A_4°C)	54,1	0,41
Dòng bố trợ_4°C	Log (Dòng bố trợ_4°C) = 8,234+1,572log(OD - Dòng bố trợ_4°C)	58,5	0,64
Bố mẹ + ptrc99A_10°C	Log (Bố mẹ + ptrc99A_10°C) = 8,848+1,911log(OD - Bố mẹ + ptrc99A_10°C)	64,6	0,67
S18 + ptrc99A_10°C	Log (S18 + ptrc99A_10°C) = 7,213+1,179log(OD - S18 + ptrc99A_10°C)	41,9	0,47
Dòng bố trợ_10°C	Log (Dòng bố trợ_10°C) = 8,651+1,887log(OD - Dòng bố trợ_10°C)	58,3	0,77

**4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT**

**4.1 Sự tăng trưởng của *Serratia plymuthica* RVH1 budAB<sup>-</sup> ở nhiệt độ thấp**

So với TSB, LB là môi trường nuôi cấy thích hợp nhất cho sự tăng trưởng của *Serratia plymuthica* RVH1 budAB<sup>-</sup> ở 10°C và 20°C mặc dù tốc độ tăng trưởng cực đại thấp hơn ở 4°C. Pha tiềm phát dài nhất ở 4°C tiếp theo là 10°C và 20°C.

Tốc độ sinh trưởng bị hạn chế ở 10°C và 4°C so với 20°C. Dòng vi khuẩn vẫn có thể tăng trưởng ở 4°C cho cả môi trường LB và TSB. Pha lag (ở các nhiệt độ khác nhau) trong môi trường LB thì kéo dài hơn trong TSB.

Kết quả cho thấy có quan hệ tuyến tính giữa log(OD) và log(cfu/ml) cho sự tăng trưởng của *Serratia plymuthica* RVH1 budAB<sup>-</sup> trong cả môi trường nuôi cấy LB và TSB ở nhiệt độ khác nhau.

**4.2 Đánh giá sự tăng trưởng *Serratia plymuthica* TM1-S18 và dòng bố trợ**

Sự tăng trưởng của dòng bố mẹ, đột biến TM1-S18 và dòng bố trợ đều được thể hiện ở 30°C. Tuy nhiên, ở 4°C và 10°C dòng đột biến có sự giảm mạnh và tăng nhẹ về số lượng tế bào (theo thứ tự) trong khi dòng bố mẹ và bố trợ tăng trưởng tốt ở

nhiệt độ này. Điều này có nghĩa là dòng đột biến biểu diễn sự khiếm khuyết trong tăng trưởng ở nhiệt độ thấp (4°C). Vì vậy, gen *plsC* bị bất hoạt trong dòng đột biến là một trong những gen cần thiết cho sự thích nghi điều kiện lạnh của *Serratia plymuthica*. Dù vậy, không thể thiết lập mô hình tuyến tính cho dòng đột biến này.

Kết quả đạt được của nghiên cứu giữ vai trò quan trọng trong việc hiểu rõ cơ chế thích nghi điều kiện lạnh của *Serratia plymuthica* nói riêng và họ *Enterobacteriaceae* ưa lạnh nói chung. Đặc biệt, nghiên cứu góp phần cải thiện, giải quyết những vấn đề trong an toàn đồng thời ổn định thực phẩm liên quan đến vi khuẩn gây hư hỏng và gây bệnh ở nhiệt độ thấp.

**TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Baranyi, J. and Roberts, T.A, 1994. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. International Journal of Food Microbiology. 23: 277-294.
2. Codex Alimentarius Commission (CAC), 1999. Draft principles and guidelines for the conduct of microbiological risk assessment (at step 8 of the procedure). Alinorm, 99/13,

- Appendix2. Available at <http://www.fao.org/docrep/meeting/005/X0798e.X0798e01.htm#bm21.2>.
3. Roberts, T. A., and Jarvis, B, 1983. Predictive modeling of food safety with particular reference to *Clostridium botulinum* in model cured meat systems In T.A. Roberts & F.A. Skinner (Eds). *Food microbiology: Advances and prospects*. New York: Academic Press: 85-95.
  4. Laksanalasmal, P., Burall, L. and Datta, A. R., 2011. Adaptation Mechanisms of Psychrotolerant bacterial pathogens. *Extremophiles Handbook* DOI 10.1007/978-4-431-53898-1\_6.4.
  5. Lindstrom, M., Kiviniemi, K. and Korkeala H., 2006. Hazard and control of group II (non-proteolytic) *Clostridium botulinum*. *International Journal of Food Microbiology* 108: 92 – 104.
  6. Matches, J.R. and Liston, J., 1968. Low temperature growth of *Salmonella*. *Journal of Food Science*. 33:641-645.
  7. M.R. Adams and M.O. Moss, 2008. *Food Microbiology*. The Royal Society of Chemistry. Third Edition. 46-48pp.
  8. Md. Fakruddin, Reaz M.M. and Khanjada S.B.M, 2011. Predictive microbiology: Modeling microbial responses in food. *Ceylon Journal of Science (Bio. Sci.)*. 40 (2): 121-131.
  9. Poschet, F., Vereecken, K.M., Geeraerd, A.H., Nicolaï, B.M. and Van Impe, J.F., 2005. Analysis of a novel class of predictive microbial growth models and application to coculture growth. *International Journal of Food Microbiology*. 100: 107–124.
  10. Swinnen, I.A.M., Bernaerts, K., Dens, E.J.J., Geeraerd, A.H. and Van Impe, J.F., 2004. Predictive modeling of the microbial lag phase: a review. *International Journal of Food Microbiology*. 94:137–159.