

KHẢO SÁT THÀNH PHẦN VI SINH VÀ CÁC ĐẶC TÍNH PROBIOTIC CỦA CÁC SẢN PHẨM MEN TIÊU HÓA TRÊN THỊ TRƯỜNG

Nguyễn Thị Huyền, Nguyễn Thị Thu Hương, Trịnh Thị Thùy Linh,
Nhữ Thị Hà, Trịnh Thị Hảo, Nguyễn Thành Linh, Đặng Xuân Nghiêm*

Khoa Công nghệ Sinh học, Đại học Nông nghiệp Hà Nội

Email: dxngkiem@hua.edu.vn*

Ngày gửi bài: 13.12.2013

Ngày chấp nhận: 19.02.2014

TÓM TẮT

Nghiên cứu này đã khảo sát thành phần vi sinh vật sống và các đánh giá các đặc tính probiotic của 24 sản phẩm men tiêu hóa cho người có trên thị trường Hà Nội vào năm 2012. Theo thông tin trên nhãn, vi khuẩn trong các sản phẩm men tiêu hóa thuộc 4 chi là *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* và *Bifidobacterium*, trong đó loài *L. acidophilus* là vi khuẩn thường dùng nhất, với tần suất có mặt trong các sản phẩm là gần 80%. Kết quả phân lập trên đĩa thạch cho thấy 13 trong số 24 sản phẩm này có số lượng vi khuẩn sống thấp hơn so với thông tin trên nhãn và so với số lượng tiêu chuẩn. Thậm chí, không có chủng *Bifidobacterium* nào được phân lập từ các sản phẩm có công bố thành phần là vi sinh vật này. Tất cả 54 chủng vi khuẩn được phân lập đều thể hiện khả năng bám dính, chịu acid dạ dày và muối mật tốt. Khả năng kháng 6 loại kháng sinh thông thường và sinh các chất ức chế 3 loài vi khuẩn gây bệnh của các chủng rất đa dạng với 59,3% số chủng kháng ít nhất một kháng sinh; 53 chủng ức chế tối thiểu một vi khuẩn gây bệnh và trong đó có 9 chủng ức chế cả 3 loại.

Từ khóa: *Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, probiotics, *Streptococcus*.

Investigation of Microbial Composition and Probiotic Properties of Commercial Probiotic Products

ABSTRACT

In this study, microbial compositions and probiotic properties of 24 commercial probiotic products for human available in 2012 in Hanoi were evaluated. According to the labeled information, all probiotic bacteria in those products belonged to *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* and *Bifidobacterium* genera, whereby *L. acidophilus* was most frequently found with an approximate value of 80%. Plate counting method revealed that 13 out of 24 investigated products had lower live cell numbers than those claimed on the labels or in the statutory regulations. In addition, no *Bifidobacterium* strains could be isolated from any products labeled with their names. All 54 isolated strains showed good adherence to chicken mucus, strong gastric acidic fluid tolerance and high resistance to bile salts. Their antibiotic resistance towards six antibiotics and their antagonistic effect against three common pathogenic bacterial species differed largely with 59.3% of the strains resistant to at least one antibiotic; 5 strains could inhibited at least one pathogenic bacterial species and 9 strains can inhibited all three pathogens.

Keywords: *Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, probiotics, *Streptococcus*.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong bộ quy tắc đánh giá probiotics trong thực phẩm được xây dựng bởi tổ chức Nông Lương Liên hợp quốc (FAO) và tổ chức Y tế Thế giới (WHO) năm 2002, probiotics được định nghĩa

là “các sinh vật sống mà khi được đưa vào cơ thể với lượng đủ sẽ tạo ra lợi ích về sức khỏe cho vật chủ” (Araya et al., 2002). Các vi khuẩn probiotic đã được chứng minh có thể tạo ra nhiều lợi ích cho con người và vật nuôi như tăng cường khả năng đề kháng với bệnh nhiễm trùng (Perdigon

et al., 1995; Arunachalam and Chandra, 2000), ngăn ngừa các bệnh đường ruột, chống nhiễm trùng đường tiết niệu và sinh dục (Hilton et al., 1992; Vanderhoof et al., 1999; Allen et al., 2010), giảm nhiễm trùng đường hô hấp và dị ứng (Bengmark, 2000; Hatakka et al., 2001), tạo ra sự dung nạp lactose thụ động (McDonough et al., 1987), giảm cholesterol máu (Fuller, 1997), giảm nguy cơ ung thư ruột kết và tăng khả năng đề kháng với các hóa liệu pháp chống ung thư (Von Buelzingsloewen et al., 2003), và ngăn chặn việc sinh trưởng của hệ vi sinh vật có hại hay điều chỉnh trạng thái miễn dịch ở mô niêm mạc khoang miệng (Meurman, 2005). Chiếm thành phần đông đảo nhất trong số các probiotics là các vi khuẩn thuộc chi *Bifidobacterium* và *Lactobacillus*. Ngoài ra, các đại diện của chi *Bacillus* hay các chủng *Escherichia coli* cũng được sử dụng làm probiotics (Gueimonde et al., 2013). Các loài *Bacillus* đã được sử dụng như probiotics cách đây ít nhất 55 năm vì chế phẩm Enterogermina đã được đăng ký từ năm 1958 ở Italia. Trong số vi khuẩn chi *Bacillus* từng được sử dụng làm probiotics, các loài đã được nghiên cứu sâu rộng nhất là *Bacillus subtilis*, *Bacillus clausii*, *Bacillus cereus*, *Bacillus coagulans* và *Bacillus licheniformis* (Hong et al., 2005).

Hiện tại, việc sử dụng các sản phẩm probiotic đang rất phổ biến tại Việt Nam. Nhiều nhà sản xuất đang chạy đua sản xuất ra các sản phẩm probiotic dưới các dạng khác nhau, gồm dạng viên, dạng lỏng hay dạng bột bởi các probiotics dễ sản xuất và không phải tuân theo các quy chuẩn chất lượng nghiêm ngặt. Các sản phẩm này được cấp phép bởi Bộ Y tế như các sản phẩm hỗ trợ điều trị với công dụng công bố từ việc ngăn ngừa tiêu chảy, ngộ độc thực phẩm cho tới kích thích hệ miễn dịch. Một số thông tin về sản phẩm probiotic bắt buộc phải công bố trên nhãn chỉ bao gồm tên loài của chủng probiotics và số lượng tế bào sống (cfu) trong một gram chế phẩm mà không hề cần tên chủng chính xác cũng như các đặc tính probiotic. Trong thực tế, có bằng chứng khoa học cho thấy rằng các thuộc tính probiotic là đặc hữu của mỗi chủng chứ không là đặc điểm chung của một loài vi sinh vật (Araya et al., 2002). Hơn nữa, trong năm 2011, trên các

phương tiện thông tin đại chúng đã thông báo khoảng 50% sản phẩm probiotic trên thị trường Việt Nam không đủ về số lượng vi sinh vật còn sống, thậm chí không có vi sinh vật sống. Trước những thực tế kể trên, nghiên cứu này được tiến hành nhằm kiểm tra nhanh một cách có hệ thống thành phần vi sinh vật và một số thuộc tính probiotic của các sản phẩm probiotic có mặt trên thị trường Hà Nội năm 2012.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Vật liệu cho nghiên cứu này là 24 sản phẩm men hỗ trợ tiêu hóa khác nhau được mua tại các hiệu thuốc tân dược trên địa bàn Hà Nội từ tháng 5 đến tháng 9 năm 2012. Vì đây là nghiên cứu có hệ thống trên toàn bộ các sản phẩm cùng loại trên thị trường để có thông tin chung về thực trạng của loại sản phẩm probiotic nên tên thương mại của chúng sẽ không được công bố.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Phân lập vi khuẩn probiotic

Các sản phẩm probiotic thương mại được cân và pha loãng bằng nước cất vô trùng tới các nồng độ để có khoảng từ 40 đến 200 khuẩn lạc trên mỗi đĩa thạch (đường kính 9cm) chứa môi trường khác nhau khi cấy trải 100 μ l dịch tế bào. Môi trường chọn lọc BSM bổ sung 0,05% (w/v) L-cysteine hydrochloride để phân lập *Bifidobacterium*, môi trường MRS bổ sung và 50 g/l mupirocin (Delchimica, Italy) để phân lập loại vi khuẩn khác (Simson et al., 2004). Sau khi xác định được nồng độ pha loãng thích hợp, mỗi mẫu được cấy trên 3 đĩa thạch. Các mẫu được định hướng phân lập Bifidobacteria được nuôi kỵ khí, trong khi các mẫu khác được nuôi hiếu khí ở 37°C. Các khuẩn lạc đơn của mỗi chủng vi khuẩn được giữ trong đĩa giống (master plate) và ở tủ lạnh sâu -70°C trong môi trường có 25% (v/v) glycerol cho các nghiên cứu tiếp sau. Việc xác nhận các chủng vi khuẩn đã được phân lập dựa trên thông tin trên nhãn sản phẩm gốc và việc quan sát hình thái tế bào, hình thái khuẩn lạc, kiểu bắt màu thuốc nhuộm Gram.

2.2.2. Đánh giá đặc tính đối kháng với vi khuẩn gây bệnh

Phương pháp đối kháng trực tiếp đơn giản nhất, “spot-on-lawn”, đã được sử dụng để khảo sát đặc tính đối kháng với vi khuẩn *E. coli* (ATCC 25922), *Salmonella typhimurium* (ATCC 13311) và *Streptococcus aureus* (ATCC 25913) của các vi khuẩn probiotic phân lập được. Trong phương pháp này các chủng vi khuẩn thuộc loài gây bệnh nhưng không có yếu tố gây bệnh (virulent factors) được cấy trải trên mặt môi trường thạch dinh dưỡng (100 µl dịch vi khuẩn ở nồng độ 10^6 cfu/ml) trước khi các đĩa giấy thấm Whatman có đường kính 5mm đã nhúng vào dịch vi khuẩn probiotic ở nồng độ tương đương được đặt lên đĩa thạch. Sau khi ủ 48 giờ ở 37 °C, bán kính các vòng ức chế hay đối kháng sẽ được đo.

2.2.3. Kiểm tra khả năng chịu muối mật và dịch axit dạ dày

Theo phương pháp truyền thống, 1 ml dịch nuôi cấy vi khuẩn ở cuối pha sinh trưởng được ly tâm với tốc độ 5000 vòng/phút trong 5 phút để thu tế bào. Tế bào đã loại bỏ môi trường nuôi cấy sau đó được trộn với dịch dạ dày mô phỏng gồm glucose (3,5 g/lít), NaCl (2,05 g/lít), KH_2PO_4 (0,60 g/lít), CaCl_2 (0,11 g/lít), và KCl (0,37 g/lít) được chuẩn độ về các pH 2,0 bằng dung dịch HCl 1M và lọc bằng màng lọc 0,2 µm. Sau đó lysozyme (0,1 g/lít) và pepsin (13,3 mg/lít) được cho vào dịch gốc trước khi tiến hành thí nghiệm (Corcoran et al., 2005). Dịch mật lợn và dịch mật gà tươi đã được lọc vô khuẩn cũng được sử dụng làm thí nghiệm tương tự vì đã có nghiên cứu cho thấy việc thay thế này có thể phản ánh khả năng chịu muối mật của người (Dunne et al., 2001). Sau khi ủ vi khuẩn cần kiểm định với 1ml các dịch kể trên trong 2 giờ, dịch vi khuẩn đã xử lý được cấy vạch bằng tăm gỗ tiệt trùng lên trên đĩa thạch chứa môi trường dinh dưỡng thích hợp để so sánh tốc độ sinh trưởng so với các mẫu đối chứng trong nước và được cất giữ ở 4°C. Tỷ lệ sống sót của một số chủng vi khuẩn cũng đã được xác định bằng phương pháp cấy trải trên đĩa thạch và đếm khuẩn lạc.

2.2.4. Khả năng kháng các loại kháng sinh

Khả năng kháng với 6 loại kháng sinh thông thường nhất của các chủng vi khuẩn

probiotic đã được đánh giá bằng phương pháp cấy quét dịch vi khuẩn ở nồng độ khoảng 10^6 cfu/ml trên đĩa thạch có chứa kháng sinh bằng tăm vô trùng. Các kháng sinh được dùng thuộc hai nhóm: (i) nhóm ức chế quá trình tổng hợp thành tế bào vi khuẩn gồm ampicillin (50 µg/ml), penicillin và (ii) nhóm ức chế quá trình dịch mã gồm chloramphenicol (35 µg/ml), kanamycin (50 µg/ml), gentamycin (10 µg/ml), và tetracycline (50 µg/ml). Các đĩa thạch sau đó được ủ 48 giờ ở 37°C.

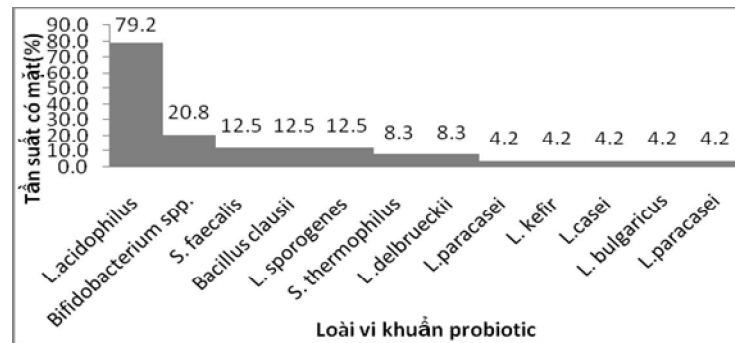
2.2.5. Khả năng bám dính vào tế bào màng nhày niêm mạc ruột

Khả năng bám dính của vi khuẩn cần kiểm định vào các tế bào biểu mô niêm mạc ruột hồi (ileum) được tách từ ruột non còn tươi của gà đã được nghiên cứu theo phương pháp của Jensen (Jensen et al., 2012) có cải tiến. Trước khi thí nghiệm, lớp tế bào biểu mô ngày của ruột hồi gà đã được tách ra và rửa bằng đệm PBS (pH 7,2). Dịch vi khuẩn ở nồng độ khoảng 10^6 cfu/ml được thêm vào các giếng trên đĩa có chứa tế bào biểu mô. Sau khi ủ 1 giờ, các tế bào biểu mô được rửa 3 lần bằng đệm PBS để loại ra các tế bào không bám dính. Khả năng bám dính của mỗi chủng vi sinh vật được đánh giá thông qua quan sát dưới kính hiển vi và cấy trải trên đĩa thạch dịch rửa lại bằng đệm có bổ sung 0,1% chất hoạt động bề mặt là Tween 80.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Số lượng và thành các vi sinh vật trong các sản phẩm probiotic

Nghiên cứu này đã được bắt đầu bằng việc thu mua mẫu đại diện của toàn bộ các sản phẩm probiotic có bán tại các hiệu thuốc tân được tại nhiều địa bàn khác nhau. Tổng số đã có 24 sản phẩm men tiêu hóa được thu thập phục vụ cho nghiên cứu. Trái với thực tế, việc số loại các chủng vi khuẩn có thể dùng làm chế phẩm probiotic là rất lớn, chỉ có 12 loài vi khuẩn được công bố có mặt ít nhất trong một trong số 24 sản phẩm probiotic (Hình 1). Trong số này, 8 chủng thuộc chi *Lactobacillus*, hai chủng thuộc chi *Streptococcus*, một chủng thuộc chi *Bacillus* là *Bacillus clausii*, còn lại là các chủng *Bifidobacterium* spp.



Hình 1. Tần suất có mặt của các chủng vi khuẩn trong 24 chế phẩm probiotic trên thị trường Việt Nam năm 2012 theo thông tin ghi trên nhãn các sản phẩm

Lactobacillus acidophilus hiện diện trong 79,2% số sản phẩm probiotic thu mua được. Nguyên nhân có thể là do loài vi khuẩn này có tính chống chịu cao và có thể bảo quản được lâu ở điều kiện nhiệt độ môi trường. Nhóm *Bifidobacterium* được công bố có mặt trong các sản phẩm với tần suất là 20,8%, và chúng gồm *Bif. longum*, *Bif. lactis* cũng có thể là do gần đây có nhiều thông tin về tác dụng đặc biệt của nhóm vi khuẩn này (Fukuda et al., 2011). Tuy vậy, không chủng *Bifidobacterium* được phân lập bằng cả phương pháp hiếu khí và kỵ khí, mặc dù khi soi một số sản phẩm dưới kính hiển vi, các tế bào có hình dạng đặc trưng của nhóm

này đã được quan sát thấy. Nhóm *Streptococcus* chỉ có một đại diện là *Streptococcus thermophilus* có mặt với tần suất 8,3%.

Mặc dù kết quả bảng 1 cho thấy có vi khuẩn sống trong tất cả các chế phẩm, có 5 sản phẩm chứa ít loại chủng vi khuẩn sống hơn so với công bố trên nhãn sản phẩm, và như đã nhắc ở trên đa số chúng được công bố có chứa thành phần là *Bifidobacterium*. Ngược lại, có 4 sản phẩm chứa nhiều loại chủng vi sinh vật hơn so với số chủng ghi trên nhãn. Đặc biệt, căn cứ vào việc so sánh hình thái và các kiểm định hóa sinh, 13 trong số 24 sản phẩm có số lượng chủng vi khuẩn

Bảng 1. Số lượng và thành phần các chủng vi khuẩn probiotic phân lập được so với thông tin trên nhãn sản phẩm

Tên sản phẩm (SP)	Số lượng trên nhãn/ thực tế (cfu/g)	Số chủng trên nhãn/ thực tế	Các chủng thực tế so với trên nhãn	Tên sản phẩm (SP)	Số lượng trên nhãn/ thực tế (cfu/g)	Số chủng trên nhãn/ thực tế	Các chủng thực tế so với trên nhãn
SP1	3x10 ⁸ /1,43x10 ⁷	3/6	3 giống, 3 khác	SP13	*_/1,43x10 ⁶	1/1	1 giống
SP2	1x10 ⁸ /3,94x10 ⁶	5/4	4 giống	SP14	1x10 ⁸ /2.3x10 ⁵	1/1	1 giống
SP3	*_/8x10 ⁵	1/1	1 giống	SP15	2x10 ⁸ /8x10 ⁵	2/4	2 giống, 2 khác
SP4	1x10 ⁸ /3,25x10 ⁶	2/4	2 giống, 2 khác	SP16	1x10 ⁸ /1,95x10 ⁵	1/1	1 giống
SP5	1x10 ⁸ /1,2x10 ⁶	3/1	1 giống	SP17	*_/9,8x10 ⁶	2/2	2 giống
SP6	*_/9,3x10 ⁵	1/1	1 giống	SP18	1x10 ⁸ /4,1x10 ⁶	1/2	1 giống, 1 khác
SP7	2x10 ⁸ /1,08x10 ⁵	1/1	1 giống	SP19	*_/3,16x10 ⁶	3/1	1 giống
SP8	*_/1,95x10 ⁵	3/1	1 giống	SP20	1x10 ⁶ /3x10 ⁶	3/5	3 giống, 2 khác
SP9	1x10 ⁸ /4,26x10 ⁶	1/1	1 giống	SP21	*_/2,6x10 ⁸	3/3	3 giống
SP10	*_/1,56x10 ⁶	3/3	3 giống	SP22	*_/5,15x10 ⁷	1/4	1 giống, 3 khác
SP11	*_/3,1x10 ⁶	3/1	1 giống	SP23	*_/7,82x10 ⁶	4/3	3 giống
SP12	1x10 ⁷ /6,25x10 ⁶	1/1	1 giống	SP24	*_/9,5x10 ⁵	3/2	2 giống

Ghi chú: *Các sản phẩm không ghi số lượng tế bào vi khuẩn trên nhãn.

lớn hơn so với số ghi trên nhãn, ví dụ như sản phẩm 1 (SP1) có chứa 6 loại vi khuẩn khác nhau nhưng trên nhãn ghi thành phần chỉ gồm 3 chủng. Như vậy, 54 chủng vi khuẩn khác nhau đã được phân lập từ 24 sản phẩm men tiêu hóa khác nhau. Tổng số tế bào vi khuẩn còn sống (cfu) trên một gram sản phẩm probiotic thường được quy định là lớn hơn 10^6 , nhưng 7 trong số các sản phẩm được kiểm tra có số lượng vi khuẩn còn sống nhỏ hơn con số đó, cộng với 6 sản phẩm khác có số lượng vi khuẩn còn sống thấp hơn đáng kể so với số lượng được công bố trên nhãn các sản phẩm (bảng 1). Kết quả này tương tự với công bố của Nimrat và Vuthiphandchai (2011) về kết quả kiểm định các sản phẩm probiotic cho thủy sản tại Thái Lan và đã được lý giải là do các vi khuẩn chết dần đi trong quá trình lưu trữ và bảo quản.

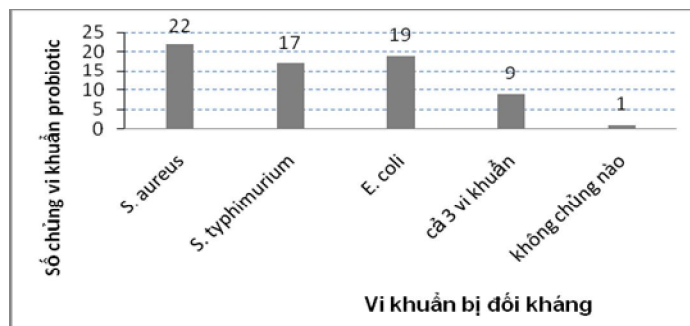
3.2. Khả năng đối kháng với loài vi khuẩn gây bệnh

Khả năng đối kháng với vi khuẩn *E. coli* (ATCC 25922), *Salmonella typhimurium* (ATCC 13311) và *Streptococcus aureus* (ATCC 25913) của 54 chủng vi khuẩn probiotic phân lập được từ các sản phẩm thương mại đã được khảo sát bằng phương pháp cấy chấm điểm trên các đĩa giấy thấm đặt lên đĩa thạch đã cấy trải từng loại vi khuẩn gây bệnh. Quan sát sơ bộ cho thấy có 9 chủng đối kháng với cả 3 vi khuẩn kiểm định và một chủng không đối kháng với vi khuẩn gây bệnh nào, trong khi số chủng đối kháng với từng vi khuẩn kiểm định tương ứng là 19; 17 và 22. Tuy nhiên đa số các chủng vi

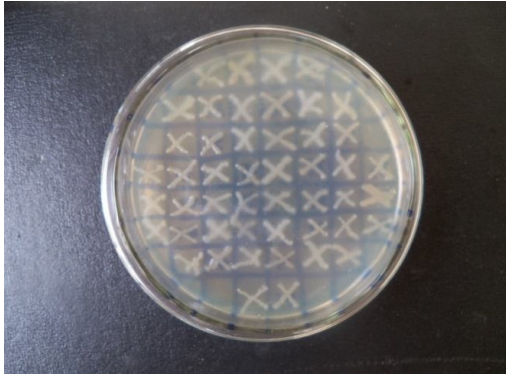
khuẩn probiotic có hoạt tính đối kháng tương đối yếu (Hình 2). Như vậy, dường như tính đối kháng với các vi sinh vật gây bệnh không phải là tiêu chí quan trọng trong việc lựa chọn chủng probiotic thương mại. Cũng trong một nghiên cứu tương tự trên các chủng probiotic dùng cho nuôi thủy sản, không chủng vi khuẩn nào từ các sản phẩm thương mại có hoạt tính đối kháng với *V. harveyi*, một vi khuẩn gây bệnh cơ hội thông thường cho thủy sản (Nimrat and Vuthiphandchai, 2011), hay chỉ một số chủng *Lactobacillus* trong số các chủng được khảo sát có hoạt tính đối kháng với các vi khuẩn gây bệnh qua các mô niêm mạc (Chateu et al., 1993; Jacobsen et al., 1999).

3.3. Khả năng kháng muối mật và acid dạ dày

Khả năng chịu muối mật và acid dịch dạ dày là những đặc tính phải có của một chủng vi khuẩn probiotic (Havenarr, 1992). Tất cả 54 chủng vi khuẩn probiotic trong nghiên cứu này đều thể hiện sự chống chịu cao khi được ngâm trong dịch mật bão hòa hay trong dịch mô phỏng acid dạ dày. Sau khi xử lý và cấy quét, tất cả các chủng có tốc độ mọc tương đối bằng với mẫu đối chứng không xử lý (hình 3). Với các mẫu có cấy trải để đếm khuẩn lạc, sự sai khác về tỷ lệ sống sót so với mẫu đối chứng không có ý nghĩa thống kê. Kết quả này cũng phù hợp với kết quả của một số nghiên cứu khác khi phản ánh rằng các chủng vi khuẩn probiotic gần như không bị ảnh hưởng bởi muối mật và pH thấp của dịch dạ dày (Jensen et al., 2012; Boonkumklao et al., 2006).



Hình 2. Số lượng các chủng vi khuẩn probiotic đối kháng với 3 vi khuẩn thuộc loài có khả năng gây bệnh



Hình 3. Sự sinh trưởng của các chủng vi khuẩn sau xử lý muối mật và dịch dạ dày sau 24 giờ

Ghi chú: Các chủng vi khuẩn probiotic bị xử lý (quệt từ phải qua trái - từ trên xuống tại mỗi ô) và mẫu đối chứng (quệt từ trái qua phải- từ trên xuống dưới trong cùng một ô) để trong nước ở 4°C trong cùng 2h.

3.4. Khả năng kháng kháng sinh

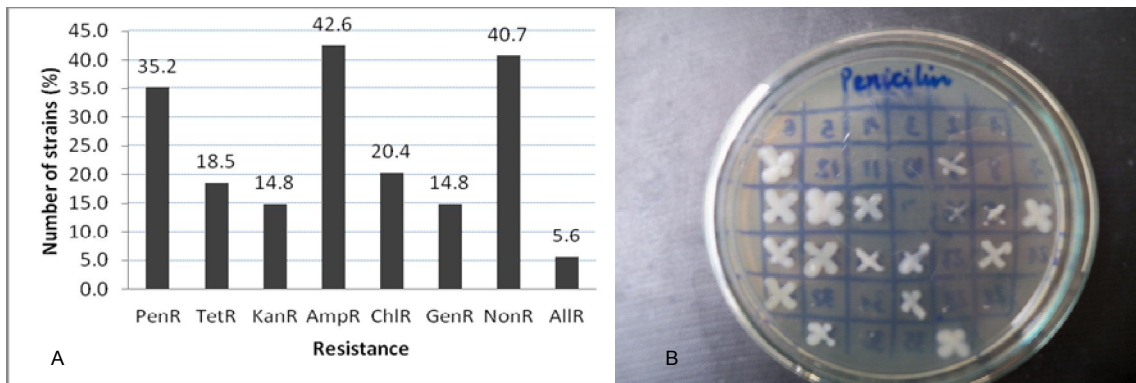
Khả năng kháng kháng sinh của vi khuẩn probiotic thường được quan tâm bởi vì (i) nếu đặc tính kháng kháng sinh do gene nằm trên các yếu tố di truyền di động như plasmid thì đặc tính này là có hại do nó có thể được truyền cho các chủng vi khuẩn gây bệnh; (ii) nếu đặc tính này là tự nhiên do gene nằm trên nhiễm sắc thể quy định thì lại là một đặc điểm tốt vì các chủng kháng kháng sinh có thể được sử dụng để duy

trì sự có mặt của vi khuẩn trong hệ tiêu hóa của những người đang phải điều trị kháng sinh (Gueimonde et al., 2013).

Kết quả nghiên cứu sau 3 lần lặp lại bằng phương pháp cấy quệt cho thấy có 5,6% số chủng kháng tất cả 6 loại kháng sinh và 49,3% không kháng bất kỳ loại kháng sinh. Số chủng vi khuẩn kháng mỗi kháng sinh ức chế quá trình sinh tổng hợp thành tế bào cao hơn khoảng gấp hai lần so với số chủng kháng mỗi kháng sinh ức chế quá trình sinh tổng hợp protein (Hình 4). Giống như các kết quả trong nghiên cứu tổng quan của Gueimonde (Gueimonde et al., 2013), khả năng và bản chất kháng kháng sinh của các chủng vi khuẩn probiotic là rất khác nhau, ngay cả trong cùng một loài và cần có thêm các nghiên cứu để đảm bảo các chủng kháng kháng sinh là an toàn khi sử dụng.

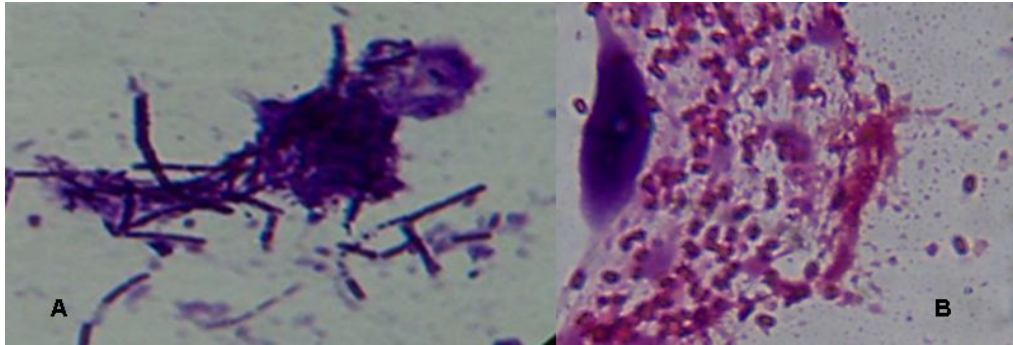
3.5. Khả năng bám dính

Sau khi ủ với lớp màng biểu mô nhày của ruột non gà rồi rửa 3 lần, tất cả các chủng đều vẫn còn bám khá nhiều trên các đám nhầy có bản chất là glycoprotein, trong khi còn rất ít tế bào vi khuẩn không bám vào mô nhầy. Kết quả này phù hợp với kết quả cấy trải và đếm khuẩn lạc từ dịch rửa có bổ sung chất tẩy rửa. Khả năng bám dính biểu mô và dịch nhày ruột non nơi có tốc độ dòng lưu chuyển hỗn dịch thức ăn



Hình 4. Khả năng kháng 6 loại kháng sinh của 54 chủng probiotic

Chú thích: (A) các đặc tính kháng penicillin (PenR), tetracycline (TetR), kanamycin (KanR), ampicillin (AmpR), chloramphenicol (ChlR), gentamycin (GenR), không kháng kháng sinh nào (NonR), kháng tất cả 6 kháng sinh (AllR); (B) hình ảnh thể hiện khả năng kháng penicillin của một số chủng vi khuẩn phân lập được.



Hình 5. Hình ảnh thể hiện khả năng bám dính vào màng nhầy ruột non gà của 2 vi khuẩn probiotic khác nhau (A, B)

cao là một tiêu chí quan trọng tuyển chọn các chủng vi khuẩn probiotic. Sự bám dính của hệ vi sinh vật có lợi giúp cạnh tranh sự bám dính của các tác nhân gây bệnh, giúp vi khuẩn probiotics có thể sinh sống một thời gian nhất định, cạnh tranh dinh dưỡng và tiết ra một số chất ức chế chúng (Arthur et al., 2003). Trong các thí nghiệm sơ bộ, khi không có điều kiện tiến hành trên biểu mô nhầy ruột non của người, thí nghiệm trên gà là một giải pháp thay thế rất kinh tế và đáng tin cậy vì đã có các nghiên cứu chứng minh là các chủng vi khuẩn có khả năng bám dính tốt vào màng nhầy của ruột gà cũng có khả năng bám dính tốt vào ruột người và ngược lại (Ganan et al., 2012). Thí nghiệm này còn gợi mở ra khả năng ứng dụng các chủng vi khuẩn probiotic của người cho chăn nuôi gia cầm.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đánh giá thành phần vi sinh vật và các đặc tính probiotic của 24 sản phẩm probiotic cho người trên thị trường cho thấy tất cả các chủng vi khuẩn phân lập được đều có các đặc tính probiotic tốt, nhưng có 13 sản phẩm có số lượng vi khuẩn không đủ. Ngoài ra, nhiều chủng vi khuẩn trong các chế phẩm probiotic có thể kháng ít nhất một kháng sinh và bản chất của đặc tính này cần được nghiên cứu và công bố công khai cho người sử dụng và các nhà quản lý.

LỜI CẢM ƠN

Đề tài sinh viên nghiên cứu khoa học này được tài trợ bởi Chương trình Hợp tác Việt -Bỉ (CUI-Project). Nhóm nghiên cứu xin chân thành cảm ơn!

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Allen, S.J., Martinez, E. G., Gregorio, G.V., Dans, L.F. (2010). Probiotics for treating acute infectious diarrhoea. Cochrane Database Syst Rev. 11: CD003048
- Araya, M., Morelli, L., Reid, G., Sanders, M.E., and Stanton, C. (2002). Joint FAO/WHO Working Group Report on Guidelines for the evaluation of probiotics in food, London, Ontario.
- Arthur, C., Ouwehand and Salminen, S. (2003). In vitro Adhesion Assays for Probiotics and their in vivo Relevance: A Review. Microbial Ecology in Health and Disease 2003; 15: 175-184
- Arunachalam, K., Gill, H. S., Chandra, R. K. (2000). Enhancement of natural immune function by dietary consumption of *Bifidobacterium lactis* (HN019). Eur J Clin. 54: 263-267.
- Balayan, M.A., Susanna, S., Mirzabekyan, Isajanyan, M., Pepoyan, Z. S., Trchounian, A. H., Pepoyan, A. Z. and Bujdakova, H. (2010). Some Peculiarities of Growth and Functional Activity of *Escherichia coli* Strain from Probiotic Formula "ASAP". World Academy of Science, Engineering and Technology. 44.
- Bengmark, S. (2000). Colonic food: pre- and probiotics. Am J Gastroenterol. 95: 5-7.

- Boonkumkiao, P., Kongthong, P., & Assavanig, A. (2006). Acid and bile tolerance of *Lactobacillus thermotolerans*, a novel species isolated from chicken feces. *Kasetsart J Nat Sci.* 40: 13-17.
- Chateau, N., Castellanos, I. and Deschamps, A. M. (1993). Distribution of pathogen inhibition in the *Lactobacillus* isolates of a commercial probiotic consortium. *J. Appl. Bacteriol.* 74: 36-40.
- Corcoran, B. M., Stanton, C., Fitzgerald, G. F., and Ross, R. P. (2005). Survival of Probiotic *Lactobacillus* in Acidic Environments Is Enhanced in the Presence of Metabolizable Sugars. *Appl Environ Microbiol.* 71(6): 3060-3067.
- Dunne, C., O'Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O'Halloran, S., Feeney, M., Flynn, S., Fitzgerald, D., Daly, C., Kiely, B., O'Sullivan, G.C., Shanahan, F., Collins, J.K. (2001). In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *Am. J. Clin. Nutr.* 73 (2): 386-392.
- Fuller, R. (1997). *Probiotics 2: applications and practical aspects.* London: Chapman & Hall.
- Fukuda S, Toh H, Hase K, Oshima K, Nakanishi Y, et al. (2011) Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature.* 469: 543-547
- Ganan, M., Martínez-Rodríguez, A.J., Carrascosa, A.V., Vesterlund, S., Salminen, S. and Satokari, R. (2012). Interaction of *Campylobacter* spp. and human probiotics in chicken intestinal mucus. *Zoonoses and Public Health.* 60 (2): 141-148.
- Gueimonde, M., Sánchez, B., Clara, G., de los Reyes-Gavilán and Abelardo Margolles (2013). Antibiotic resistance in probiotic bacteria. *Frontiers in Microbiology* (4) 202. doi: 10.3389/fmicb.2013.00202.
- Gueimonde, M., Sánchez, B., G de Los Reyes-Gavilán, C., Margolles, A. (2013). Antibiotic resistance in probiotic bacteria. *Front Microbiol.* 18(4): 202. doi: 10.3389/fmicb.2013.00202. eCollection 2013.
- Hatakka, K., Savilahti, E., Ponka, A., Meurman, J. H., Poussa, T., Naese, L. et al. (2001). Effect of long term consumption of probiotic milk on infections in children attending day care centres: double blind, randomised trial. *BMJ.* 2: 1318-1319.
- Havenarr, R., (1992). Selection of strains for probiotic use. In: R. Fuller (Eds.). *Probiotics: The Scientific Basis.* London, Chapman and Hall: 209-224.
- Hong, H.A., Duc le, H., and Cutting, S.M. (2005). The use of bacterial spore formers as probiotics. *FEMS Microbiol Rev.* 29: 813-835.
- Hilton, E., Isenberg, H. D., Alperstein, P., France, K., Borenstein, M.T. (1992). Ingestion of yogurt containing *Lactobacillus acidophilus* as prophylaxis for candidal vaginitis. *Ann Intern Med.* 116: 353-357.
- Jacobsen, C. N., Rosenfeldt Nielsen, V., Hayford, A. E., Møller, P. L., Michaelsen, K. F., Paerregaard, A., Sandstrom, B., Tvede, M., Jakobsen, M. (1999). Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 4949-4956.
- Jensen, H., Grimmer, S., Naterstad, K., Axelsson, L. (2012). In vitro testing of commercial and potential probiotic lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol.* 153: 216-222.
- Kolader, M. E., Vinh, H., Ngoc Tuyet, P. T., Thompson, C., Wolbers, M., Merson, L., Campbell, J.I, Ngoc Dung T.T., Manh Tuan, H., Vinh Chau, N.V., Farrar, J., van Doorn, H. R., Baker, S. (2013). An oral preparation of *Lactobacillus acidophilus* for the treatment of uncomplicated acute watery diarrhoea in Vietnamese children: study protocol for a multicentre, randomised, placebo-controlled trial. *Trials.* 28 (14): 27. doi: 10.1186/1745-6215-14-27.
- McDonough, F. E., Hitchins, A. D., Wong, N. P., Wells, P., Bodwell, C. E. (1987). Modification of sweet acidophilus milk to improve utilization by lactose-intolerant persons. *Am J Clin Nutr.* 45: 570-574.
- Meurman, JH. (2005). Probiotics: do they have a role in oral medicine and dentistry? *Eur J Oral Sci.* 113: 188-196.
- Nimrat, S. and Vuthiphandchai, V. (2011). In vitro evaluation of commercial probiotic products used for marine shrimp cultivation in Thailand. *African Journal of Biotechnology.* 10(22): 4643-4650.
- Perdigon, G., Alvarez, S., Rachid, M., Aguero, G., Gobbato, N (1995). Immune system stimulation by probiotics. *J Dairy Sci.* 35: 412-420.
- Simpson, P. J., Fitzgerald, G. F., Stanton, C. and Ross, R. P. (2004). The evaluation of a mupirocin-based selective medium for the enumeration of bifidobacteria from probiotic animal feed. *J. Microbiol. Methods.* 57: 9-16.
- Tagg, J. R., Dajani, A. S., Wannamaker, L. W. (1976). Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Bacteriol. Rev.* 40: 722-756.
- Vanderhoof, J. A., Whitney, D. B., Antonson, D. L., Hanner, T. L., Lupo, J. V., Young, R. J. (1999). *Lactobacillus* GG in the prevention of antibiotic-associated diarrhea in children. *J Pediatr.* 135: 564-568.
- Von Buelzingsloewen, I., Adlerberth, I., Wold, A. E., Dahlén, G., Jontell, M. (2003). Oral and intestinal microflora in 5-fluorouracil treated rats, translocation to cervical and mesenteric lymph nodes and effects of probiotic bacteria. *Oral Microbiol Immunol.* 18: 278-284.