

ĐÁNH GIÁ TỶ LỆ VI KHUẨN SỐNG, VI KHUẨN CHẾT TRONG MỘT SỐ NỀN SỮA CHUA BẰNG KỸ THUẬT PHÂN TÍCH DÒNG CHẢY TẾ BÀO

Đến tòa soạn 20-02-2021

Đặng Thị Hương, Lê Thành Long, Trần Hùng, Phạm Văn Quân, Phạm Như Trọng
Viện kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm quốc gia

SUMMARY

EVALUATE THE LIVING AND DEATH RATES OF PROBIOTIC IN YOGURT PRODUCTS BY UTILIZING FLOW CYTOMETRY TECHNIQUE

The goal of this paper was developing a new method to determine the amount of beneficial probiotic microorganisms living in products instead of the traditional plate counting method. This method was applied to assess live/dead baclight bacterial viability and counting kit, in combination with flow cytometry method (FCM) for zoning, distinguish living probiotics bacteria, dead bacteria and determining total number of bacteria in yogurt products in a short time. The results of the study showed that the rate of living bacteria was from 98.2% to 99.9% when staining with SYTO9 and the rate of dead bacteria was from 85.7% to 99.6% when staining with PI in some samples.

Keywords: flow cytometry, probiotic bacteria.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong vài thập kỷ qua, các sản phẩm có chứa probiotics đã được phát triển và ưa chuộng ở các nước châu Âu. Probiotics được định nghĩa là “vi sinh vật sống, khi được sử dụng với lượng thích hợp sẽ mang lại lợi ích sức khỏe cho người sử dụng” được chấp nhận bởi tổ chức Lương thực và Nông nghiệp của tổ chức Liên hợp quốc/Tổ chức Y tế thế giới và Hiệp hội Khoa học Quốc tế về probiotics và prebiotics [2,5]. Cả hai loài *Lactobacillus bulgaricus* và *Streptococcus thermophilus* (LAB) đều lên men yếm khí axit lactic trong sữa để tạo thành sữa chua. Nhiều nghiên cứu cho thấy tác dụng điều trị có lợi của vi khuẩn (LAB) trong sữa chua đối với sức khỏe đường ruột [6]. LAB có thể bảo vệ chống lại nhiễm trùng đường ruột và ức chế các chất gây ung thư về mặt hóa học, gây ra khối u trong đường

tiêu hóa. Lợi ích của việc sử dụng sữa chua đối với chức năng tiêu hóa thông qua hệ vi khuẩn đường ruột, quá trình vận chuyển đường ruột và tăng cường phản ứng miễn dịch đường tiêu hóa. Một số bệnh về đường tiêu hóa như không dung nạp lactose, tiêu chảy, ung thư ruột, bệnh viêm ruột và nhiễm vi khuẩn khác đã được ức chế thông qua việc tiêu thụ nhiều sữa chua như một sản phẩm thực phẩm [6]. Số lượng và khả năng còn sống của probiotics được coi là một khía cạnh quan trọng đối với chức năng của chế phẩm sinh học [4], do đó các nhà sản xuất probiotics cần các công cụ phân tích chính xác để xác định số lượng vi sinh vật probiotics còn tồn tại trong thời gian tối thiểu [1]. Theo truyền thống, đếm đĩa là phương pháp để xác định được khả năng sống nhưng có nhược điểm thời gian nuôi cấy tương đối dài [7]. Phương pháp đếm đĩa bị hạn chế là không định lượng chính

xác được các vi khuẩn khi chúng bị kết tụ, ức chế bởi các tế bào lân cận và thành phần của môi trường tăng trưởng được sử dụng. Do đó, ngày càng có nhiều quan tâm đến việc phát triển các phương pháp nhanh chóng để xác định khả năng sống của tế bào. Các phương pháp phân tử để xác định và định lượng vi khuẩn probiotic đã được phát triển rộng rãi trong những năm gần đây. Trong đó, phản ứng chuỗi polymerase thời gian thực định lượng (real-time PCR) cũng như kỹ thuật huỳnh quang có tiềm năng thay thế phương pháp định lượng thông thường đối với vi khuẩn probiotic [3]. Tuy nhiên, hiện tại vẫn còn một số hạn chế. PCR thời gian thực không cho phép phân biệt giữa DNA phát sinh từ tế bào chết hay tế bào sống; do đó, DNA từ các tế bào chết sẽ đóng góp vào kết quả. Ngược lại, các kỹ thuật huỳnh quang như kết hợp huỳnh quang tại chỗ, kết hợp với phương pháp đo tế bào dòng chảy (FCM) bằng cách sử dụng bộ dụng cụ khả năng sống của vi khuẩn thương mại, cho phép đếm riêng biệt tế bào sống và chết, nhưng không cho phép định lượng loài hoặc chủng cụ thể trong các chế phẩm hỗn hợp.

Tiêu chí quan trọng nhất để phân biệt giữa các tế bào bị hư hỏng có thể sống được và không thể phục hồi là tính toàn vẹn của màng. Tế bào sống có màng nguyên vẹn có thể loại trừ thuốc nhuộm liên kết DNA dễ dàng xâm nhập vào tế bào chết hoặc tế bào bị tổn thương màng. Nguyên tắc này ngày càng được áp dụng nhiều hơn trong FCM. Với các vết nhuộm huỳnh quang, phương pháp tiếp cận kép bao gồm nhuộm các tế bào nguyên vẹn với một vết, sau đó nhuộm lại các tế bào bị tổn thương màng hoặc tất cả các tế bào có vết khác thường được sử dụng [3]. Trong nghiên cứu này sử dụng bộ kit “Live/dead baclight bacterial viability and counting kit” có chứa SYTO9 và propidium iodide (PI) kết hợp với FCM để phân biệt được tế bào sống và chết. SYTO9 nhuộm màu xanh lục phát huỳnh quang tất cả các tế bào, trong

khi PI chỉ xâm nhập vào các tế bào có màng tế bào bị tổn thương, nhuộm chúng thành màu đỏ.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Các sản phẩm sữa chua dạng lỏng (sữa chua uống men sống Probi (Vinamilk), sữa uống lên men Yakult (Nhật Bản), sữa chua uống men sống Nuti (NutiFood)...), dạng đặc (sữa chua ăn probi có đường (Vinamilk), có bổ sung vi khuẩn.

2.2. Hóa chất, thiết bị

Hóa chất chính bao gồm: Attune focusing fluid (Thermo), Attune wash solution (Thermo), Attune debubble solution (Thermo), Attune shutdown solution (Thermo), Attune Performance Tracking Beads (Thermo), Live/dead baclight bacterial viability and counting kit (Thermo), Proteinase K (Thermo).

Chủng chuẩn: *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, *Lactobacillus casei* 393, *Bifidobacterium bifidum* ATCC 15700, *L. thermophilus* ATCC 8317, *L. rhamnosus* ATCC 7469

Thiết bị bao gồm: Thiết bị Attune NxT Acoustic Focusing Cytometer (Thermo), máy vortex IKA (Đức), máy li tâm lạnh Mikro 200 (Hettich), block nhiệt (Labnet), Tủ ATSH safe FAST Elite 215D (Italy) và các phụ trợ khác.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Chuẩn bị mẫu cho phân tích dòng chảy tế bào:

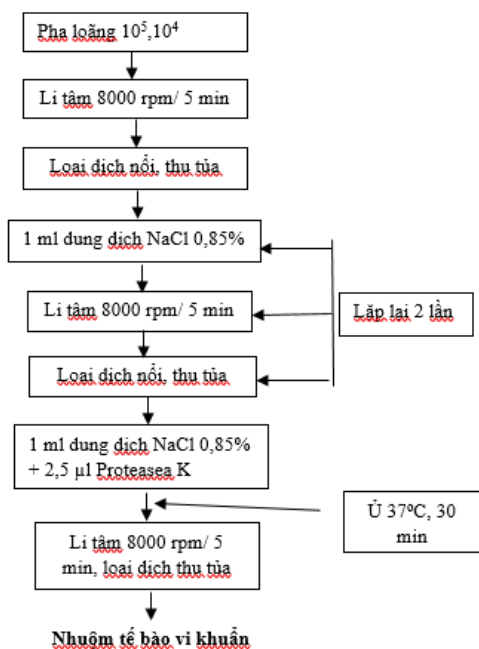
Chuẩn bị mẫu bao gồm các ống như sau: mẫu không nhuộm SYTO9 và PI (propidium iodide) được sử dụng như một kiểm soát nền [7], mẫu nhuộm SYTO9 và PI, mẫu nhuộm SYTO9 hoặc nhuộm PI.

- Đối với nền mẫu là sữa chua dạng lỏng: mẫu được đồng nhất, hút 1 mL mẫu và 9 mL nước muối 0,85%, sau đó pha loãng mẫu trong nước muối 0,85% khoảng nồng độ vi khuẩn 10^5 , 10^4 .

- Đối với nền mẫu là sữa chua dạng đặc: mẫu được đồng nhất, cân 10 g mẫu và bổ sung 90 g

nước pepton, sau đó tiếp tục pha loãng mẫu trong nước muối 0,85% khoảng nồng độ vi khuẩn 10^5 , 10^4 .

Các bước xử lý mẫu tiếp theo hình 1 như sau:



Hình 1. Sơ đồ quy trình xử lý mẫu

2.3.2. Nhuộm tế bào vi khuẩn – phương pháp nhuộm huỳnh quang:

Thuốc nhuộm huỳnh quang SYTO9 và propidium iodide (PI) của Live/dead bacLight bacterial viability and counting kit (Thermo) được chuẩn bị theo mô tả của nhà sản xuất [7]. Bộ sản phẩm này sử dụng hỗn hợp của hai axit nucleic làm chỉ thị - SYTO9 (thuốc nhuộm huỳnh quang xanh) và propidium iodide (huỳnh quang đỏ). Sự kết hợp của thuốc nhuộm huỳnh quang SYTO9 và PI có thể xác định khả năng sống của vi khuẩn dựa trên tính toàn vẹn của màng. SYTO9 là chất nhuộm màu axit nucleic huỳnh quang màu xanh thẩm qua tế bào. PI là chất xen kẽ DNA huỳnh quang màu đỏ không thẩm thấu tế bào, thường được sử dụng để nhuộm các vi khuẩn không thể sống được vì PI chỉ xâm nhập vào vi khuẩn nếu màng chúng bị tổn thương. Do đó, vi khuẩn có màng tế bào nguyên vẹn phát huỳnh quang màu xanh lá cây, trong khi vi khuẩn với màng tế bào bị tổn thương thường phát huỳnh quang màu đỏ. Loại tế bào phát huỳnh quang đỏ - màu đặc trưng bởi vi khuẩn chết. Cả SYTO 9 và propidium

iodide đều được kích thích hiệu quả bởi quang phổ 488 nm.

Mẫu được chuẩn bị theo mục 2.3.1 và thực hiện nhuộm tế bào theo quy trình sau:

Quy trình nhuộm:

- Bổ sung 1 mL dung dịch NaCl 0,85% vào các ống mẫu.

- Trộn đều các ống mẫu bằng cách vortex nhẹ nhàng. Hút 0,5 mL mỗi ống chia thành 2 ống riêng biệt.

- Bổ sung 1,5 µL SYTO9 và 1,5 µL PI, vortex nhẹ nhàng, đem ủ tối 37°C, 15 phút.

2.3.3. Phương pháp đo tế bào dòng chảy (flow cytometry method - FCM)

Các thử nghiệm được chạy trên thiết bị đo tế bào dòng chảy Attune NxT Acoustic Focusing Cytometer (thermo fisher). Attune NxT có thể được cấu hình với tối đa 4 tia laser phân tách theo không gian (405, 488, 561 và 637 nm) và sáu thông số bao gồm FSC, SSC và bốn kênh huỳnh quang (FL1-FL4). Thiết bị Invitrogen Attune NxT Acoustic Cytometer đo dòng chảy tế bào sử dụng kết hợp công nghệ sóng âm thanh và thủy động lực học nhằm đưa các tế bào/đối tượng nghiên cứu tới vị trí trung tâm của dòng chất lỏng và hệ thống quang học để phân tích các đặc tính của chúng. Nồng độ vi khuẩn tối ưu để định lượng từ 10^4 đến 10^5 trên mỗi mL, tốc độ điều chỉnh là 12,5 µL/giây, thể tích 40-100 µL.

Các bước thực hiện:

Bước 1: Thiết lập các thông số của thiết bị, kiểm tra hiệu suất, thiết lập đường chuẩn

Bước 2: Thử nghiệm mẫu vi khuẩn sống

Bước 3: Thử nghiệm mẫu vi khuẩn chết (đối chứng)

Bước 4: Biểu thị kết quả:

- Dựa vào kích thước của tế bào vi khuẩn và độ phức tạp kết hợp với khả năng phát huỳnh quang của tế bào sống và tế bào chết.

- Tế bào có màng tế bào nguyên vẹn sẽ cho huỳnh quang xanh lá cây (SYTO9), trong khi đó các tế bào mà màng đã bị phá hủy thường sẽ biểu hiện rất ít với SYTO9 và phát huỳnh quang màu đỏ (PI).

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

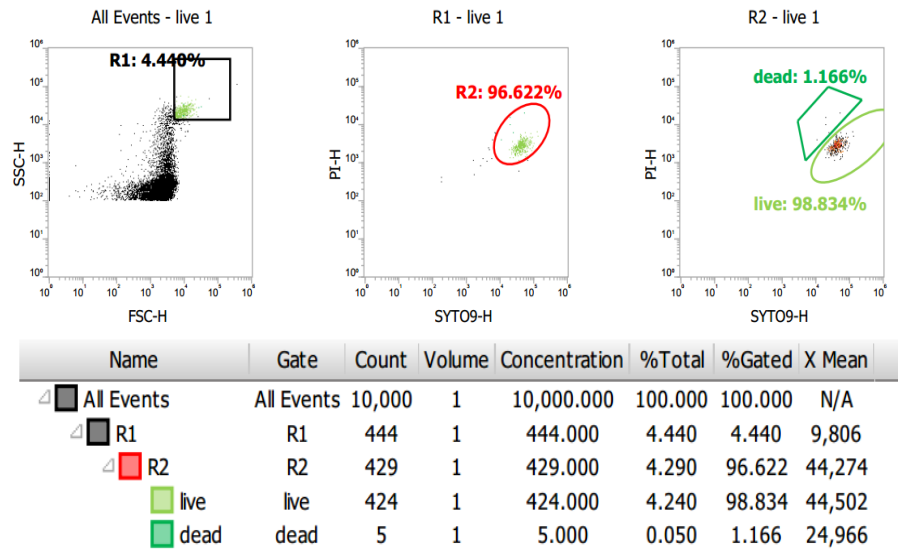
Tiến hành thử nghiệm khả năng sống chết của vi khuẩn trên các nền sữa chua khác nhau như được mô tả ở mục 2.1.

3.1. Nền sữa chua uống men sống Probi

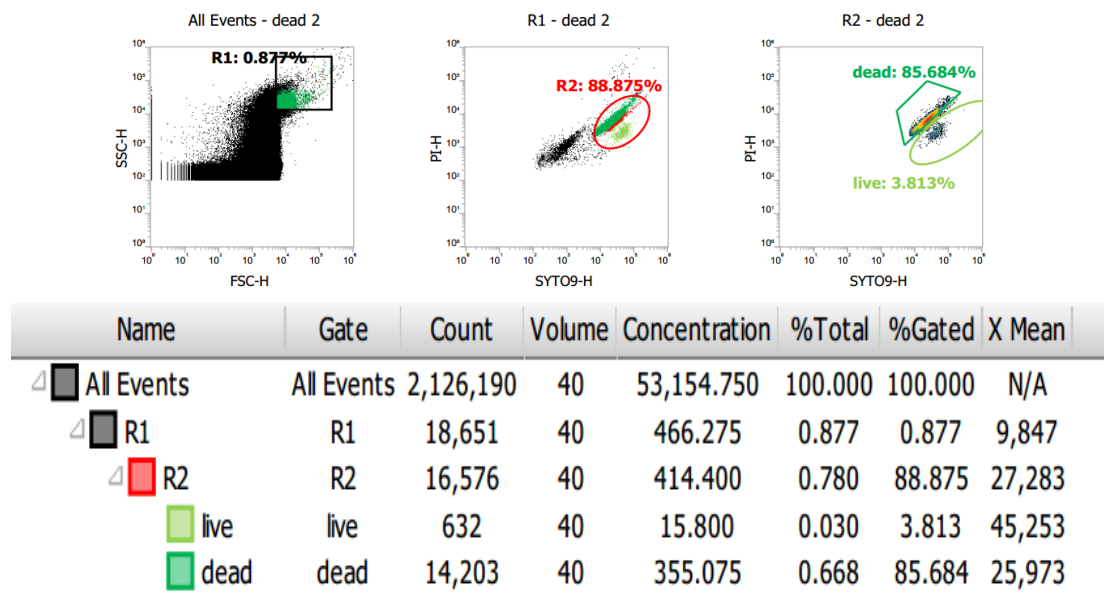
Sữa chua uống men sống Probi (Vinamilk) với dung tích 65 mL. Bổ sung vi khuẩn *L.paracasei*, *L.casei* 431, theo công bố trên nhãn: sản phẩm chứa khoảng 20 tỷ lợi khuẩn /100 mL tức là khoảng 2.108 CFU/mL. Tiến hành pha loãng nồng độ vi khuẩn đến 10^5 . Sau đó tiến hành xử lý nền bằng enzym, nhuộm theo mục 2.3.2 và 2.3.2, kết quả thu được trong hình 2 và 3.

Từ kết quả ở hình 2 và 3 cho thấy, ở nền mẫu này đã xác định khoanh vùng chính xác vi

khuẩn. Khi tiến hành thử nghiệm với thuốc nhuộm có chứa SYTO9, nhận thấy sự phân tách vùng sống, vùng chết và tỉ lệ vi khuẩn sống đạt 98,8% và định lượng được số lượng vi khuẩn sống $4,2 \times 10^5$ CFU trong 1 mL. Tiến hành thử nghiệm song song, mẫu được nhuộm với thuốc nhuộm có chứa PI tỷ lệ chết đạt 85,7% và định lượng số lượng vi khuẩn chết $3,6 \times 10^5$ CFU trong 1 mL (Hình 3). Kết quả của hai thử nghiệm hoàn toàn phù hợp với nhau.



Hình 2. Kết quả thử nghiệm mẫu khi nhuộm với SYTO9

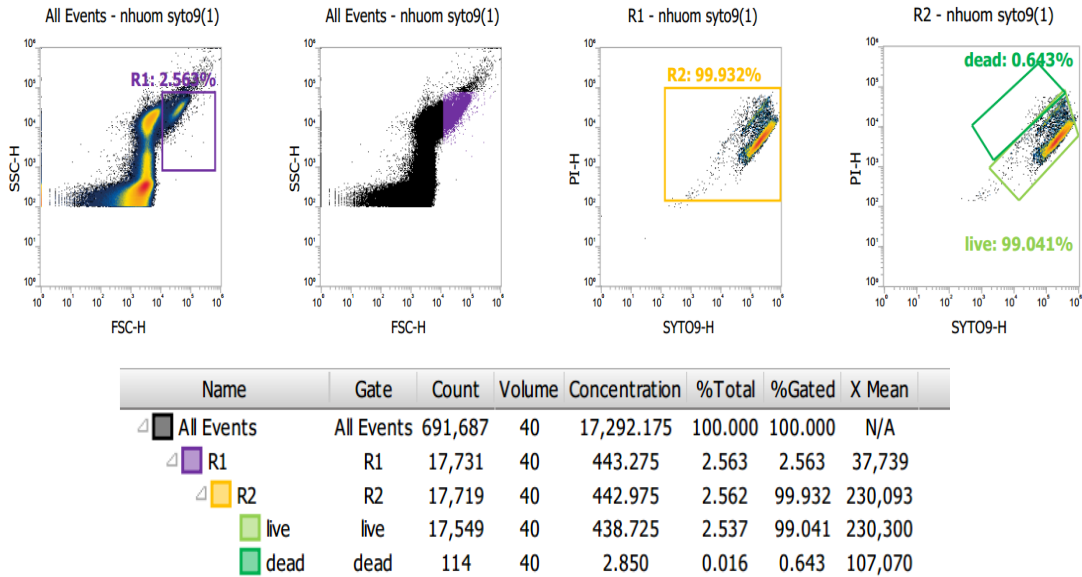


Hình 3. Kết quả thử nghiệm mẫu khi nhuộm với PI

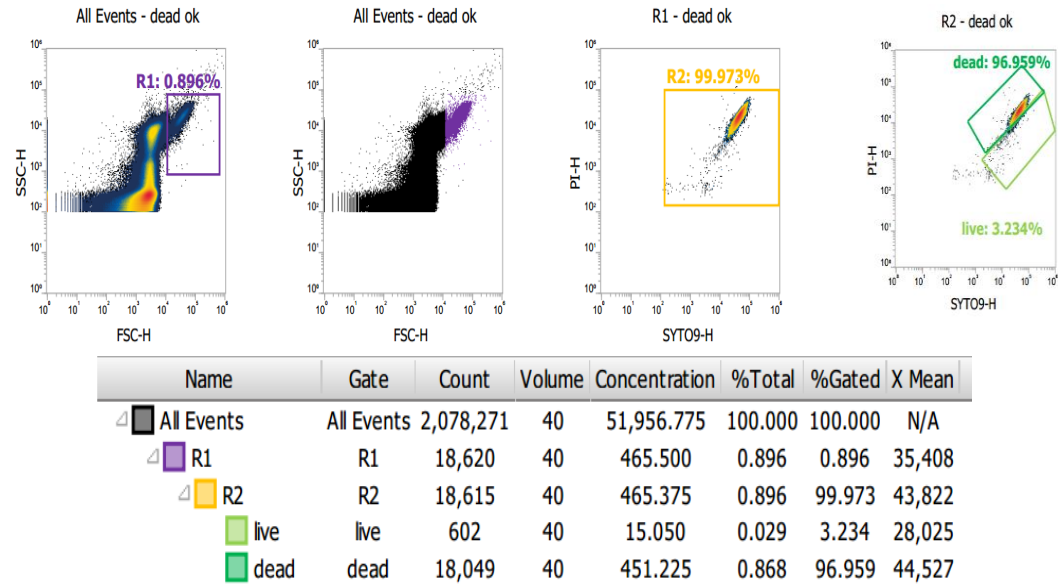
3.2. Nền sữa chua uống men sống Nuti

Sữa chua uống men sống Nuti (NutiFood, Việt Nam) có dung tích 65 mL. Bổ sung vi khuẩn *L.paracasei*, theo công bố trên nhãn: sản phẩm chứa khoảng 13 tỷ lợi khuẩn/ chai 65 mL tức là khoảng 2.10^8 CFU/mL. Tiến hành pha loãng nồng độ vi khuẩn đến 105. Sau đó tiến hành xử lý nền bằng enzym, nhuộm theo mục 2.3.2 và 2.3.2, kết quả thu được trong hình 4, hình 5. Mẫu thử được thử nghiệm đồng thời với thuốc nhuộm có chứa SYTO9 và thuốc nhuộm PI để

xác định khoanh vùng chính xác vùng tế bào vi khuẩn. Từ kết quả hình 4 và 5 cho thấy, mẫu nhuộm với SYTO9 tỷ lệ sống của vi khuẩn đạt 99,0% và định lượng được số lượng vi khuẩn sống $4,4 \times 10^5$ CFU trong 1 mL (Hình 4). Mẫu nhuộm với thuốc nhuộm có chứa PI tỷ lệ chết của vi khuẩn đạt 96,9% và định lượng được số lượng vi khuẩn chết $4,5 \times 10^5$ CFU trong 1 mL (Hình 5).



Hình 4. Kết quả thử nghiệm mẫu khi nhuộm với SYTO9

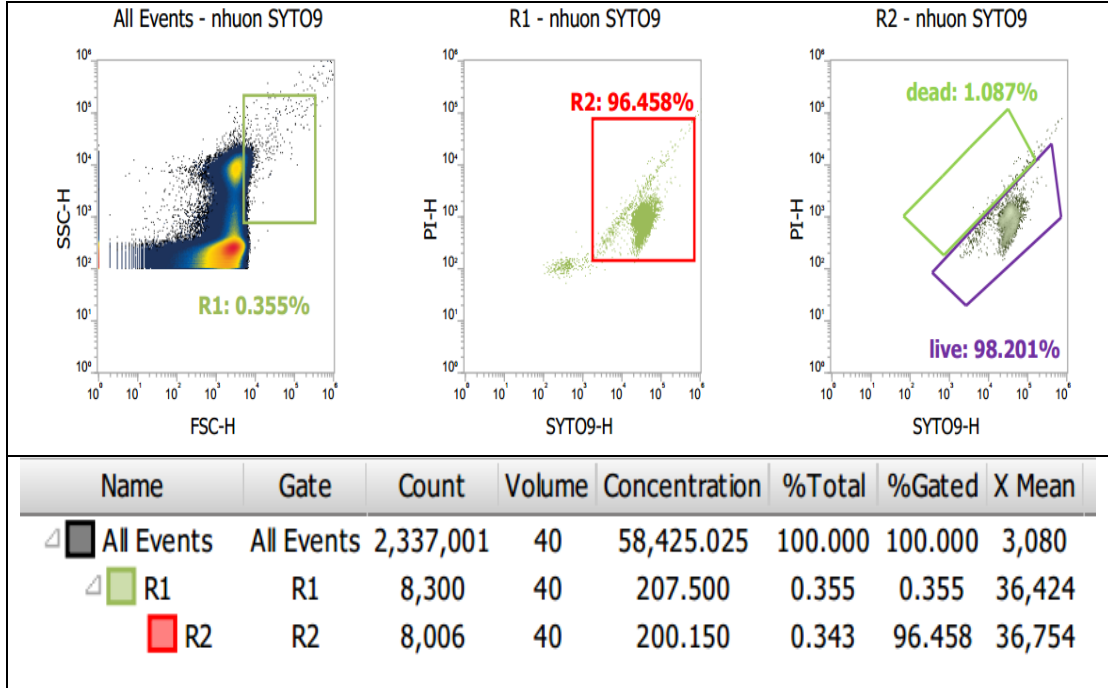


Hình 5. Kết quả thử nghiệm mẫu khi nhuộm với PI

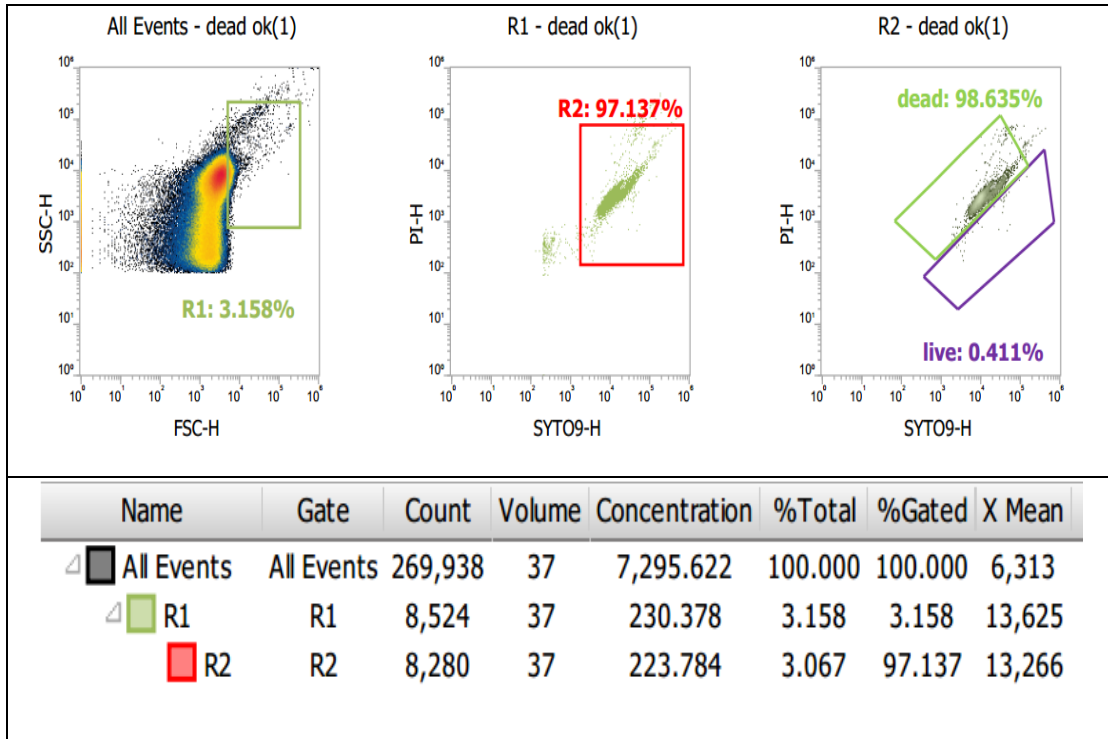
3.3. Nền sữa chua uống lên men Yakult

Sữa chua uống lên men Yakult (Nhật Bản) có dung tích 65 mL. Bổ sung vi khuẩn *L.casei*, theo công bố trên nhãn: sản phẩm chứa khoảng hơn 6,5 tỷ lợi khuẩn/chai loại 65 mL tức là khoảng 1.10^8 CFU/mL.

Tiến hành pha loãng nồng độ vi khuẩn đến 10^5 . Sau đó tiến hành xử lý nền bằng enzym, nhuộm theo mục 2.3.2 và 2.3.2, kết quả thu được trong hình 6 và 7.



Hình 6. Kết quả thử nghiệm mẫu khi nhuộm với SYTO9



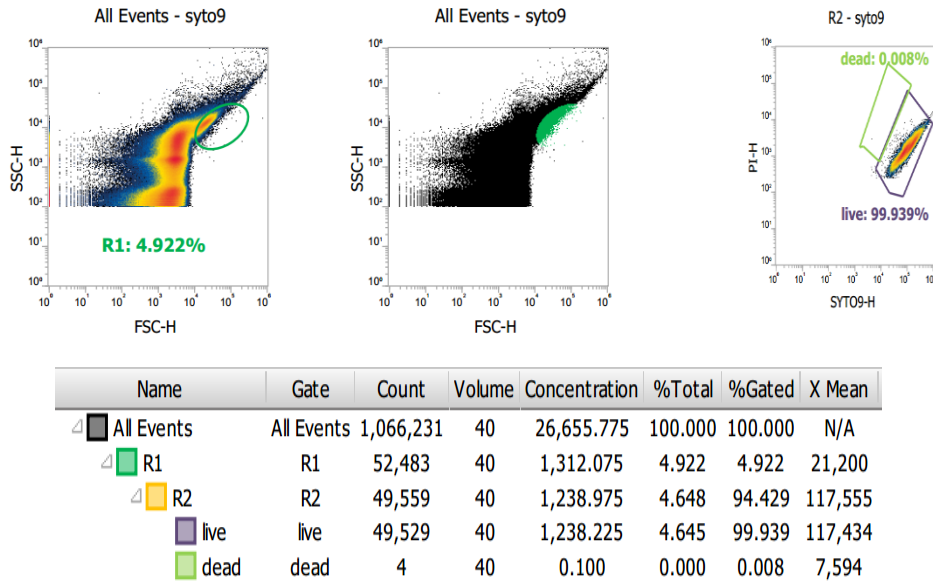
Hình 7. Kết quả thử nghiệm mẫu khi nhuộm với PI

Từ kết quả hình 6 và 7 cho thấy, mẫu được nhuộm với thuốc nhuộm có chứa SYTO9 tỉ lệ vi khuẩn sống đạt 98,2% và xác định được số lượng vi khuẩn sống $2,0 \times 10^5$ CFU trong 1 mL (Hình 6). Tiến hành thử nghiệm song song, mẫu được nhuộm với thuốc nhuộm có chứa PI tỉ lệ chết đạt 98,6% và định lượng số lượng vi khuẩn chết $2,2 \times 10^5$ CFU trong 1 mL (Hình 7). Kết quả của hai thử nghiệm hoàn toàn phù hợp, xác định khoảng vùng giữa vùng vi khuẩn sống và vùng vi khuẩn chết một cách chính xác.

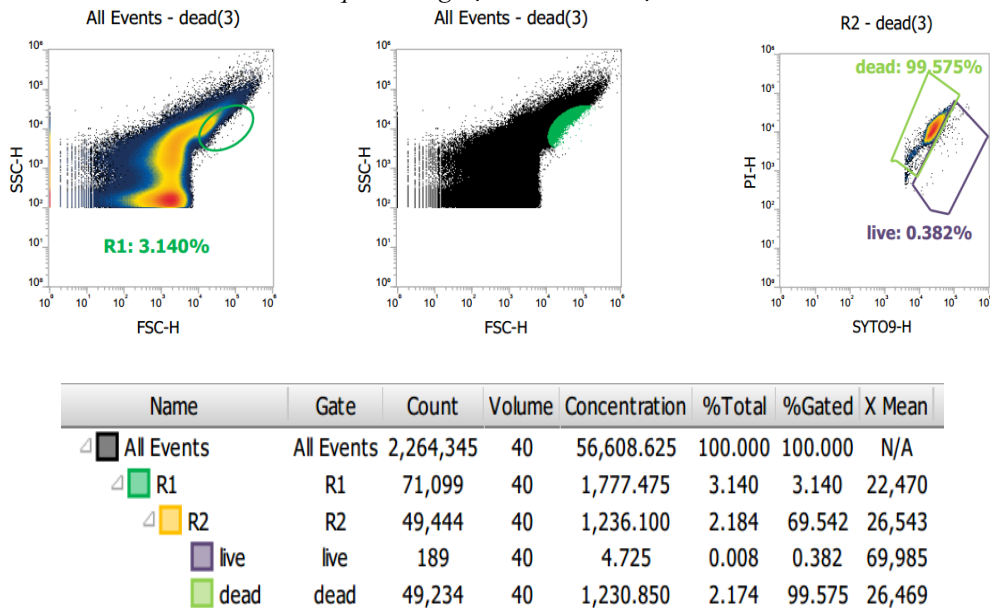
3.4. Nền sữa chua ăn Probi

Sữa chua ăn Probi (Vinamilk, Việt nam) loại 100 g/hộp. Bổ sung vi khuẩn *L.casei* 431, theo công bố trên nhãn: sản phẩm chứa khoảng hơn 1 tỷ lợi khuẩn/hộp tức là khoảng 1.10^8 CFU/mL.

Tiến hành pha loãng nồng độ vi khuẩn đến 10^6 . Sau đó tiến hành xử lý nền bằng enzym, nhuộm theo mục 2.3.2 và 2.3.2, kết quả thu được trong hình 8 và 9.



Hình 8. Kết quả thử nghiệm mẫu khi nhuộm với SYTO9



Hình 9. Kết quả thử nghiệm mẫu khi nhuộm với PI

Tương tự như trên, mẫu thử được thử nghiệm đồng thời với thuốc nhuộm SYTO9 và thuốc nhuộm PI để xác định chính xác vùng vi khuẩn sống và vùng vi khuẩn chết. Từ kết quả hình 8 và 9 cho thấy, mẫu nhuộm với SYTO9 tỷ lệ sống của vi khuẩn đạt 99,9 % và định lượng được số lượng vi khuẩn sống $1,2 \times 10^6$ CFU trong 1 mL) (Hình 8). Mẫu nhuộm với thuốc nhuộm có chứa PI tỷ lệ chết của vi khuẩn đạt 99,6% và định lượng được số lượng vi khuẩn chết $1,2 \times 10^6$ CFU trong 1 mL (Hình 9).

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xây dựng thành công phương pháp sử dụng kỹ thuật đo dòng chảy tế bào vào phân biệt vi khuẩn sống, vi khuẩn chết trong một số nền sữa chua ở Việt Nam. Khoanh vùng vi khuẩn sống đạt tỷ lệ từ 98,2 % đến 99,9 % khi nhuộm với SYTO9 và khoanh vùng vi khuẩn chết đạt tỷ lệ từ 85,7 % đến 99,6 % khi nhuộm với PI và xác định được số lượng vi khuẩn có trong mẫu.

Thời gian thực hiện theo phương pháp đo tế bào dòng chảy rất ngắn (dưới 2 giờ) so với kỹ thuật thông thường (hơn 48 giờ), có thể áp dụng hiệu quả trong nghiên cứu - phát triển và kiểm soát chất lượng sản phẩm sữa.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chiron, C., Tompkins, T. and Burguière, P., 2018. Flow cytometry: a versatile technology for specific quantification and viability assessment of micro-organisms in multistrain probiotic products. *Journal of Applied Microbiology*, 124(2), pp.572-584.

2. FAO/WHO, 2002, Guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario, Canada.

3. Kramer, M., Obermajer, N., Bogovič Matijašić, B., Rogelj, I. and Kmetec, V., 2009. Quantification of live and dead probiotic bacteria in lyophilised product by real-time PCR and by flow cytometry. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84(6), pp.1137-1147.

4. Majeed, M., Majeed, S., Nagabhushanam, K., Punnapuzha, A., Philip, S. and Mundkur, L., 2018. Rapid assessment of viable but non-culturable *Bacillus coagulans* MTCC 5856 in commercial formulations using Flow cytometry. *PLOS ONE*, 13(2), p.e0192836.

5. Reid, G., Jass, J., Sebulsky, M. and McCormick, J., 2003. Potential Uses of Probiotics in Clinical Practice. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(4), pp.658-672.

6. Suliman Ma, A. and Mamdoh Ers, O., 2009. The Benefits of Lactic Acid Bacteria in Yogurt on the Gastrointestinal Function and Health. *Pakistan Journal of Nutrition*, 8(9), pp.1404-1410.

7. Vasavada, P. and White, C., 1993. Developing Methodology for Microbiological Evaluation of Milk and Dairy Products - An Introduction. *Journal of Dairy Science*, 76(10), pp.3099-3100.