NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG BÁM DÍNH CỦA MỘT SỐ CHỦNG VI KHUẨN PROBIOTIC TRÊN MÀNG NHẦY RUỘT in vitro

Nguyễn La Anh*, Quách Thị Việt, Đặng Thu Hương, Trần Thị Ngoan
Viện Công nghiệp thực phẩm

TÓM TẮT

Khả năng bám dính lên màng nhầy ruột là một trong những tiêu chí chính để đánh giá đặc tính probiotic của chủng vi sinh vật. Trong nghiên cứu này, phương pháp đơn giản để đánh giá khả năng bám dính của các chủng vi khuẩn probiotic trên màng nhầy ruột in vitro đã được xây dựng và miêu tả. Các đĩa vi chuẩn 24 giếng được phủ một lượng dịch màng nhầy ruột, sau đó bổ sung dịch sinh khối vi sinh vật và ủ 1 giờ tại 37oC. Sau khi rửa trôi những tế bào không bám dính ra ngoài, xác định mật độ tế bào bám dính bằng phương pháp trang cấy. Đồng thời sử dụng kỹ thuật kính hiển vi điện tử quét để chụp hình ảnh của các tế bào vi khuẩn bám dính trên màng nhầy ruột in vitro. Các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng bám dính là nồng độ, thể tích dịch màng nhầy bổ sung vào mỗi giếng trên đĩa vi chuẩn và mật độ tế bào vi sinh vật sống ban đầu. Kết quả đã được so sánh khi bổ sung 0,6 ml dung dịch màng nhầy nồng độ 1,5 mg/ml vào 1 giếng trên đĩa vi chuẩn 24 giếng, ủ ở 4oC qua đêm, sau đó sinh khối vi sinh vật trong dung dịch HEPES 10mM pH 7,4 với mật độ tế bào 109-1010 CFU/ml được đưa vào các giếng. Khả năng bám dính của chúng giống được đánh giá bằng mật độ tế bào bám dính trên 1 đơn vị diện tích màng nhầy và tỷ lệ phần trăm giữa tế bào bám dính so với tổng lượng tế bào bổ sung ban đầu. Trong 27 chủng vi khuẩn lactic và Bifidobacterium có khả năng sống sót cao trong đường dạ dày - ruột được khảo sát khả năng bám dính trên màng nhầy ruột in vitro. Trong số các chủng nghiên cứu, 9 chủng thuộc các loài Lactobacillus casei, L. fermentum, L. plantarum, L. reuteri, L. brevis và L. salivarius có khả năng bám dính cao trên màng nhầy ruột với mật độ tế bào khoảng 107- 108 CFU/cm2. Kết quả được đối chiếu với hình ảnh chụp trên kính hiển vi điện tử quét SEM.

Từ khóa: bám dính, đĩa vi chuẩn, màng nhầy ruột, probiotic, SEM

MỞ ĐẦU

Probiotic là vi sinh vật có lợi cho đường dạ dày- ruột (gastrointestine- GI), chịu được dịch vị dạ dày và dịch vị mật để tiến đến ruột non, tồn tại và phát triển được trong đường ruột, hỗ trợ thực hiện các chức năng về tiêu hóa và miễn dịch. Hai nhóm vi sinh vật probiotic có mặt tự nhiên trong đường dạ dày- ruột của người khoẻ mạnh là vi khuẩn Lactobacillus (vi hiếu khí – microaerophilic) có mặt chủ yếu ở ruột non, vi khuẩn Bifidobacterium (yếm khí nghiêm ngặt) có mặt chủ yếu ở ruột già (Fuller, 1991; Kirjavainen, Gibson, 1999). Chúng chiếm đến 90% tổng số vi sinh vật đường ruột; phần vi sinh vật còn lại đa dạng hơn và bao gồm cả những vi sinh vật có khả năng gây hại (Toumut, 1993). Vi khuẩn probiotic có khả năng bám dính vào màng nhầy phủ lên lớp tế bào biểu mô ở ruột. Màng nhầy ruột được tiết ra từ lớp tế bào; đồng thời màng nhầy này ngăn cách không cho một số loại vi sinh vật không có lợi thâm nhập. Probiotic bảo vệ chất nhầy đường ruột nhờ sự tổng hợp và tiết ra các peptit có tính kháng khuẩn, mucins, do đó ngăn chặn sự bám dính của vi sinh vật gây bệnh với biểu bì ruột. Probiotic có vai trò này giảm nhiễm trùng và giảm dị ứng với kháng nguyên trong thực phẩm (De Simone et al., 1993). Probiotics có khả năng tăng khả cường hệ miễn dịch màng nhầy và mô bạch huyết liên quan đến màng nhầy (Brandtzaeg, 1998; Isolauri et al., 2001).

Để đánh giá khả năng vi khuẩn có bám năng lâm probiotic, cần đánh giá khả năng bám dính của chúng lên màng nhầy ruột như phương pháp kiểm tra sự bám dính của vi sinh vật lên trên mô tế bào đường ruột đơn lớp bằng cách dùng các dòng tế bào Caco2, HT-29 (Lehto, S. Salminen, 1997; Duary et al, 2011) Phương pháp này không đánh giá được sự bám dính của tế bào vi sinh vật lên trên lớp màng nhầy ở trên lớp tế bào biểu mô đường ruột.

Ngoài ra còn có phương pháp khác là kiểm tra sự bám dính của tế bào vi sinh vật lên màng nhầy được phủ lên lớp nhựa polystyrene của đĩa vi chuẩn. Chất nhầy thường được tách từ phân hoặc ruột. Tế bào vi sinh vật được xử lý với hoá chất phóng xạ, xác định được tỷ lệ vi sinh vật bám dính bằng cách đo cường độ phóng xạ từ tế bào phát ra (Ouwehand et al., 1999). Phương pháp này đòi hỏi phải sử dụng hoá chất phóng xạ và không dễ tiếp cận ở các phòng thí nghiệm không được trang bị cơ sở vật chất.

Do đó, trong nghiên cứu này chúng tôi đã xây dựng phương pháp đơn giản nhằm xác định sự bám dính của tế bào vi sinh vật trên chất nhầy được tách từ ruột lợn, không sử dụng chất phóng xạ. Song song tiến hành chụp ảnh bằng kính hiển vi điện tử quét SEM (Scanning Electron Microscope) với độ phóng đại lớn để khẳng định kết quả. Một số chủng vi khuẩn lactic và Bifidobacterium được lưu giữ tại Bộ sưu tập giống vi sinh vật của Viện Công nghiệp thực phẩm đã được khảo sát về khả năng sống sót trong dịch dạ dày và dịch mật nhân tạo cho kết quả khả quan với được tiếp tục khảo sát đánh giá khả năng bám dính trên màng nhầy ruột lợn invitro.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Chủng giống và phương pháp bảo quản

Trong nghiên cứu đánh giá khả năng bám dính trên màng nhầy niêm mạc ruột in vitro đã sử dụng 27 chủng vi khuẩn lactic và Bifidobacterium có khả năng sống sót tốt trong dịch dạ dày và dịch mật nhân tạo. Các chủng vi khuẩn này được lưu giữ tại bộ sưu tập giống vi sinh vật của Viện Công nghiệp thực phẩm. Kết quả cụ thể về khả năng bám dính của chủng Bifidobacterium longum AHOP2 và 9 chủng Lactobacillus sp gồm có: L. casei PK2, AHOP1; L. fermentum SBV2;

L. plantarum LV1; 0-17, NCDC3; L. reuteri GNTP 6573; L. brevis NCTH24; L. salivarius CNTP 6598 được miêu tả trong bài báo này.

Môi trường và điều kiện nuôi cấy

Môi trường lên men cho các chủng vi khuẩn lactic là môi trường MRS: Peptone 10g; cao nấm men 15g; glucose 20 g; Tween 80 1 g; $K_2HPO_4.3H_2O$ 2,62 g; CH_3COONa 5 g; $(NH_4)_3$citrat 2,15 g; $MgSO_4.7H_2O$ 5% 4 ml; $MnSO_4.H_2O$ 1% 5 ml; thể tích môi trường 1 lít; pH 6,5 - 6,8. Chế độ thanh trùng 121o C trong 15 phút. Vi khuẩn lactic được hoạt hóa từ ống thạch đứng hoặc hoạt hóa từ ống bảo quản lạnh sâu sang môi trường MRS broth (7 ml/ống nghiệm), thời gian 24h tại 30o C.Các chủng vi khuẩn lactic được bảo quản trong thạch đứng MRS (có bổ sung $CaCO_3$ 3 g/l; agar 20 g/l), thời gian bảo quản 1 tháng/lần ở 4o C.

Môi trường lên men cho các chủng Bifidobaterium là môi trường MRS có bổ sung thêm 0,5 g L-cystein trong 1000 ml môi trường. Vi khuẩn Bifidobacterium được hoạt hóa từ ống lạnh sâu sang môi trường MRS lỏng (7 ml/ống nghiệm), có bổ sung L-cystein, thời gian 24 h tại 37o C và nuôi trong bình hút chân không. Các chủng Bifidobaterium được nghiêm ngặt nên bảo quản trong môi trường lạnh sâu: sữa gầy 10%; L-cystein 0,2%, tại -80o C.

Quy trình thí nghiệm đánh giá giá khả năng bám dính tế bào vi khuẩn trên màng nhầy ruột invitro

Các bước tiến hành thí nghiệm đánh giá khả năng bám dính tế bào vi khuẩn trên màng nhầy ruột được tiến hành theo quy trình cải tiến từ báo cáo Ouwehand và cộng sự, 1999. Các bước tiến hành bao gồm: (1)- thu nhận và đông khô chất nhầy từ ruột lợn; (2)- pha dịch màng nhầy; (3)- cố định màng nhầy trên đáy đĩa vi chuẩn 24 giếng; (4)- chuẩn bị dịch sinh khối vi sinh vật; (5)- phủ dịch sinh khối vi sinh vật trên màng nhầy đã được cố định trên đĩa vi chuẩn và ủ; (6)- loại bỏ phần dịch sinh khối thừa và rửa màng nhầy; (7)- tách màng nhầy khỏi giếng và xác định số lượng tế bào vi sinh vật đã bám dính vào màng.

Phủ màng nhầy ruột lên đĩa vi chuẩn polystyrene 24 giếng

Bộ ruột lợn được nhập từ lò giết mổ tập trung, bảo quản ở 4oC trong thời gian vận chuyển và sau đó được xử lý ngay bằng hóa chất để thu nhận chất nhầy ruột lợn, tiếp đến là đông khô, bảo quản tại -20o C, tương tự cách xử lý của Ouwehand và cộng sự, 1999. Chuẩn bị dung dịch chất nhầy nồng độ từ 0,3 đến 2,0 mg/ml trong dung dịch đệm HEPES Hank's buffer (HH, HEPES 10 mM, pH 7,4). Ly tâm ở chế độ 4000g/5 phút/4oC. Sau đó lọc vô khuẩn bởi màng lọc 0,2 µm, bổ sung từ 0,1 đến 0,8 ml/giếng vào các giếng trên đĩa vi chuẩn polystyrene 24 giếng. Cất đĩa vào tủ lạnh 4o C qua đêm.

Chuẩn bị dịch sinh khối vi sinh vật

Lấy mẫu dịch lên men để pha loãng và trang cấy kiểm tra mật độ tế bào. Pha loãng trong dung dịch NaCl 0,85% pH 4,5. Lấy 25 ml dịch lên men (chủng lactic) và 30 ml dịch lên men (chủng Bifidobacterium) vào ống 50ml-falcon vô trùng. Ly tâm 8000 rpm/10 phút tại 4o C. Loại bỏ dịch lên men, bổ sung dung dịch đệm HH làm tan sinh khối trong ống rồi ly tâm. Lặp lại bước rửa thêm 1 lần rồi hòa lại sinh khối trong dung dịch đệm HH. Mật độ của dịch sinh khối vi khuẩn để phủ giếng vi chuẩn được chuẩn bị trong khoảng 107 đến 1011 CFU/ml.

Đánh giá khả năng bám dính của tế bào vi khuẩn trên màng nhầy

Sau khi đĩa chứa màng nhầy ruột được ủ qua đêm, rửa hai lần bằng dung dịch đệm HH. Tiếp đó, bổ sung 0,4ml dịch sinh khối vi sinh vật đã được chuẩn bị ở bước trên vào các giếng. Mẫu đối chứng là giếng có phủ màng nhầy ruột nhưng không bổ sung vi sinh vật. Ủ đĩa vi chuẩn tại 37o C trong 1 h. Với đĩa có chứa chủng Bifidobacterium, đặt đĩa vi chuẩn trong hộp kín có gói kị khí. Kết thúc 1 h, dùng dung dịch đệm HH rửa 2 lần với 0,4 ml/lần nhằm loại bỏ các tế bào không bám dính ra ngoài. Bổ sung 0,4 ml dung dịch đệm HH có bổ sung 0,1% Triton X vào các giếng, cẩn thận dùng đầu típ cọ vào đáy giếng để tách các tế bào bám dính ra khỏi màng nhầy. Dùng dung dịch đệm HH chứa 0,1% Triton X vào giếng để thu được nốt các tế bào bám dính trong giếng ra ngoài. Dùng dung dịch NaCl 0,85% pH 6,5 + 0,1% TritonX để pha loãng mẫu. Với chủng lactic, trang cấy trên MRS agar, nuôi ở 30o C trong 48 h. Với các chủng Bifidobacterium, trang cấy trên MRS agar có 0,05% L-cystein, nuôi trong hộp kị khí có gói, 37o C trong 48 h để kiểm tra mật độ tế bào bám dính trên đĩa. Kết quả mật độ tế bào bám dính (CFU/ml) được xác định là số lượng tế bào có khả năng bám dính trong 1 ml dịch sinh khối vi sinh vật ban đầu. Tỷ lệ tế bào bám dính là phần trăm số tế bào có khả năng bám dính so với tổng số tế bào trong dịch sinh khối. Mật độ tế bào bám dính (CFU/cm2) là số tế bào bám dính trên 1 cm2 diện tích màng nhầy phủ trên đáy giếng polystyrene.

Chụp ảnh SEM mẫu tiêu bản bám dính của vi khuẩn trên màng nhầy ruột invitro

Chuẩn bị các phiến bản polystyrene vô trùng để làm tiêu bản. Đặt các phiến bản polystyrene vô trùng vào đĩa vi chuẩn, sau đó phủ 0,6 ml dung dịch màng nhầy ruột nồng độ 1,5mg/ml trong dung dịch đệm HH. Ủ tại 4o C qua đêm. Bổ sung dịch sinh khối vi sinh vật vào giếng vi chuẩn như đã nêu trên. Sau khi ủ 1 h tại 37o C, dùng dung dịch đệm HH để rửa, lặp lại quá trình rửa 2 lần. Lấy phiến bản ra khỏi giếng và thực hiện xử lý hóa chất để làm tiêu bản cho việc chụp bằng kính hiển vi điện tử quét SEM (Scanning Electron Microscope Hitachi S4800) theo quy trình của phòng "Kính hiển vi điện tử" tại Viện Pasteur, bao gồm các bước: cố định, rửa, nhuộm, làm khô tiêu bản, phủ màng carbon và chụp ảnh.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phương pháp đánh giá khả năng bám dính tế bào vi khuẩn trên màng nhầy ruột

Các yếu tố ảnh hưởng đến kết quả đánh giá khả năng bám dính của tế bào lên màng nhầy ruột là nồng độ, thể tích dịch màng nhầy bổ sung vào mỗi giếng trên đĩa vi chuẩn và mật độ tế bào vi sinh vật sống ban đầu. Đã tiến hành thử nghiệm với dịch màng nhầy có nồng độ từ 0,3 ÷ 2 mg/ml, thể tích dịch màng nhầy phủ giếng từ 0,1 ÷ 0,8 ml/giếng; dịch sinh khối tế bào có nồng độ từ 107 ÷ 1011 CFU/ml (kết quả không thể hiện). Kết quả đánh giá khả năng bám dính tế bào của các chủng vi sinh vật có tính lặp lại và so sánh được với nhau khi tiến hành quy trình với điều kiện: bổ sung 0,6 ml dung dịch màng nhầy nồng độ 1,5 mg/ml vào 1 giếng trên đĩa vi chuẩn 24 giếng. Ủ ở 4o C qua đêm, sau đó sinh khối vi sinh vật trong dung dịch HEPES 10 mM pH 7,4 với mật độ tế bào 109-1010 CFU/ml được đưa vào các giếng.

Khả năng bám dính của một số chủng vi khuẩn lactic và Bifidobacterium trên màng nhầy ruột

Trong 27 chủng vi khuẩn lactic và Bifidobacterium có khả năng sống sót cao trong dường dạ dày - ruột được khảo sát khả năng bám dính trên màng nhầy ruột in vitro. Kết quả bám dính của 9 chủng có khả năng bám dính cao và 1 chủng có khả năng bám dính thấp được thể hiện ở trên Bảng 1 để so sánh. Mật độ bám dính của tế bào vi sinh vật trên màng nhầy ruột với mật độ tế bào khoảng 107- 108 CFU/cm2 được coi là khá cao.

Bảng 1. Kết quả bám dính của các chủng vi khuẩn probiotic trên đĩa vi chuẩn 24 giếng

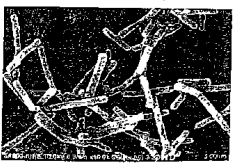
STT	Tên chủng vi sinh vật	Mật độ tế bào của dịch sinh khối phủ giếng (CFU/ml)	Mật độ tế bào bám dính (CFU/ml)	Tỷ lệ tế bào bám dính (%)-	Mật độ tế bào bám dính (CFU/cm2)
1	B. longum AHOP2	2,67×107	1,26×106	4,61	2,91×105
2	L. casei PK2	3,70×109	5,25×107	1,42	1,19×107
3	L. fermentum SBV2	1,40×109	7,58×107	5,42	1,72×107
4	L. brevis NCTH24	6,07×109	1,18×108	1,94	2,66×107
5	L. plantarum NCDC3	9,33×109	1,73×108	1,85	3,91×107
6	L. reuteri CNTP 6573	2,57×109	2,98×108	11,62	6,76×107
7	L. casei AHOP1	1,63×1011	4,90×108	0,30	1,11×108
8	L. salivarus CNTP 6596	1,81×1011	5,20×108	0,29	1,18×108
9	L. plantarum LV1	1,00×1010	6,53×108	6,53	1,48×108
10	L. plantarum 0-17	5,53×109	8,27×108	14,94	1,87×108

Trong các công bố về nghiên cứu khả năng bám dính tế bào vi sinh vật, thông thường tỷ lệ (%) tế bào bám dính so với tổng số tế bào cho giếng ban đầu thường được sử dụng để đánh giá. Tuy nhiên kết quả ở trên Bảng 1 cho thấy tỷ lệ này chưa hẳn đã khẳng định đúng được khả năng bám dính của tế bào vi sinh vật. Ví dụ chủng B. longum AHOP2 có tỷ lệ phần trăm tế bào bám dính cao (4,81%) nhưng mật độ tế bào trên cm2 màng nhầy lại thấp. Lý do là sinh khối lên men của chủng này không cao, dẫn đến lượng tế bào ban đầu cho vào giếng ít, do đó tế bào có nhiều cơ hội cạnh tranh vị trí bám dính, dẫn đến tỷ bám dính tương đối cao so với các chủng khác trong nghiên cứu này. Trong lúc đó, mật độ tế bào bám dính của AHOP2 trên đơn vị diện tích màng nhầy khá thấp. Chỉ số này phản ánh đúng thực trạng về khả năng bám dính của chủng này (2,91x105 CFU/cm2). Ngược lại với chủng AHOP2, chủng L. casei AHOP1 có mật độ tế bào bám dính trên cm2 khá cao (1,11×108 CFU/cm2) nhưng tỷ lệ tế bào bám dính so với số tế bào cho vào giếng ban đầu thấp (0,3%). Nguyên nhân dẫn đến tình trạng này là do mật độ tế bào lên men cao nên tổng lượng tế bào bổ sung vào giếng lớn, tế bào có cơ hội cạnh tranh vị trí bám dính ít hơn, dẫn đến mật độ tế bào bám dính trên cm2 lớn nhưng khi so với lượng tế bào vi sinh vật ban đầu thì tỷ lệ lại ít. Do đó thông số mật độ tế bào bám dính (CFU/cm2) phải đi kèm với thông số về tỷ lệ bám dính để đánh giá khách quan hơn về khả năng bám dính của tế bào. Trong số các chủng nghiên cứu khả năng bám dính của chung L. plantarum 0-17 là cao nhất đạt 1,87x108 CFU/cm2 và tỷ lệ bám dính là 14,94%.

Đánh giá định tính khả năng bám dính của vi khuẩn trên màng nhầy ruột invitro bằng kỹ thuật SEM

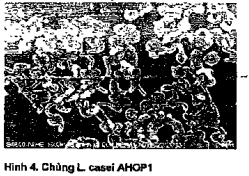
Hình ảnh SEM một số chủng vi khuẩn bám dính trên lam phiến polystyrene đã được phủ màng nhầy ruột, thể hiện trên các Hình 1-6. Hình ảnh có tính minh hoạ định tính khả năng bám dính của các chủng vi sinh vật.

Hình 1. Chủng B. longum AHOP2



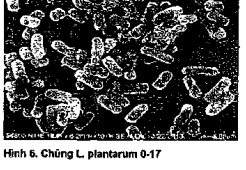
Hình 2. Chủng L. casei PK2

Hình 3. Chủng L. reuteri CNTP 6573



Hình 4. Chủng L. casei AHOP1

Hình 5. Chủng L. salivarius CNTP 6598



Hình 6. Chủng L. plantarum 0-17

Chủng B. longum AHOP2 có mật độ bám dính thấp với 2,91×105 CFU/cm2, có hình ảnh SEM rất thưa thớt (Hình 1). Chủng L. casei AHOP1 có mật độ bám dính cao hơn 1,11×108 CFU/cm2 thì có hình ảnh trên SEM khá dày đặc (Hình 4) Trong số 27 chủng được tiếp tục khảo sát về khả năng bám dính (kết quả không thể hiện) thì có 9 chủng có năng lực bám dính cao, trong đó 4 chủng có khả năng bám dính ở mức 108 CFU/cm2 là L. salivarius CNTP 6598, L. casei AHOP1, L. plantarum LV1, L. plantarum 0-17; có 5 chủng có khả năng bám dính ở mức 107 CFU/cm2 như L. reuteri CNTP 6573 , L. casei PK2, L. fermentum SBV2, L. plantarum NCDC3, L. brevis NCTH24. Trong các nghiên cứu khác, một số chủng vi khuẩn L. rhamnosus, L. plantarum, L. casei đã được xác định là có khả năng bám dính trên màng nhầy ruột cao với tỷ lệ phần trăm tế bào bám dính (so với tổng số tế bào cho giếng ban đầu) nằm trong khoảng từ 3-5% cho đến 40% (Ouwehand và cs., 1999). Trong nghiên cứu này, ngoài các chủng L. plantarum, L. casei, kết quả còn cho thấy các chủng L. reuteri CNTP 6573 và L. fermentum SBV2 vừa có tỷ lệ bám dính cao vừa có mật độ bám dính cao; các chủng L. salivarius CNTP 6598 và L. brevis NCTH24 tuy có tỷ lệ bám dính thấp nhưng mật độ bám dính khá cao. Cho đến nay bản chất của các thụ cảm đối với chất nhầy màng ruột của các chủngđược nhắc tới ở đây chưa được xác định.

KẾT LUẬN

Phương pháp được miêu tả trong nghiên cứu này được xây dựng nhằm xác định khả năng bám dính của tế bào vi sinh vật lên màng nhầy ruột có kết hợp với chụp hình ảnh tiêu bản bằng kỹ thuật SEM. Phương pháp có ưu điểm là khá đơn giản và khá thi trong việc thực hiện, không sử dụng hoá chất phóng xạ, không tốn thời gian như phương pháp đòng tế bào ruột vì cần thời gian để nuôi dòng tế bào phủ kín giếng polystyren. Chín chủng vi khuẩn lactic thuộc các loài Lactobacillus casei, L. fermentum, L. plantarum, L. reuteri, L. brevis và L. salivarius được đánh giá có khả năng bám dính trên màng nhầy ruột khá cao đạt mật độ 107- 108 CFU/cm2 trong điều kiện in vitro. Các chủng vi khuẩn thuộc cùng một loài có khả năng bám dính trên màng nhầy ruột có thể khác nhau, do đó đây là tính đặc trưng cho từng chủng.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu là một phần của đề tài Hợp tác Nghị định thư với Thái Lan mã số 05/2011/HĐ- NĐT. Chúng tôi xin cảm ơn Bộ Khoa học và Công nghệ đã giao cho nhiệm vụ này

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Brandtzaeg P. (1998) Development and Basic Mechanisms of Human Gut Immunity. Nutrition Reviews, Volume 56 (1), S-18

De Simone C. , Vesely R., Bianchi Salvadori B. and Jirillo E. (1993) The role of probiotics in modulation of the immune system in man and in animals. Int J Immunotherapy 9: 23-28

Duary R. K., Rajput Y. S., Virender Kumar Batish, and Sunita Grover (2011) Assessing the adhesion of putative indigenous probiotic lactobacilli to human colonic epithelial cells. Indian J Med Res 134 (5): 664–671

Fuller R. (1991) Probiotics in medicine. Gut 32: 439-442

Isolauri E., Sütas Y., Kankaanpää P., Arvilommi H., Salminen S. (2001) Probiotics: effects on immunity Am J Clin Nutr 73: 444-450

Kirjavainen P.V., Gibson G.R. (1999) Healthy gut microflora and allergy: factors influencing development of the microbiota. The Finnish Medical Society Duodecim, Ann Med 31: 288-292

Lehto E.M. and Salminen S. (1997) Adhesion of two Lactobacillus plantarum strains, one Lactococcus and one Propionibacterium strains to cultured human intestinal CaCo – 2 cell line. Biosci Microflora 16: 15-17

Ouwehand A.C., Kirjavainen P. V., Gruenlund M.M., Isolauri E., Salminen S.J. (1999) Adhesion of probiotic micro-organisms to intestinal mucus. International Dairy Journal, 9: 623-630

Tournut J. (1993) The digestive flora of the pig and its variations. Rec. Med. Vet. 169: 645–652

ADHESION ABILITY OF SOME PROBIOTIC BACTERIAL STRAINS ON INTESTINAL MUCUS IN VITRO

Nguyen La Anh*, Quach Thi Viet, Dang Thu Huong, Tran Thi Ngoan

Food Industries Research Institute

SUMMARY

Intestinal adhesion ability is one of the criteria for evaluation probiotic properties of microorganisms. In this study, a simple method for evaluation of adherence ability of probiotic bacteria on intestinal mucus in vitro was developed and described. The 24-well microtitre plates were coated with pig intestinal mucus, followed by being flooded with microbial suspensions and incubated for 1 hour at 37oC. Afterwards the excessive suspensions were removed and the adhered bacterial cells were estimate by plate counting method. Parallely, the mucus- coated polystyrene slides with adhered bacterial cells was processed for scanning electron microscopy (SEM) to capture the image of adhered cell on mucus in vitro. The factors affecting the evaluation of adherence ability were concentration, volume of added mucus solution onto a well of microtitre plate and cell density of microbial suspension flooding the wells. The results were comparable when 0.6ml of mucus solution of 1.5mg/ml was added a well of 24-well microplate, incubated at 4oC overnight and then microbial suspensions in HEPES 10mM pH 7.4 of density 109-1010 CFU/ml were used for flooding the wells. The adherence ability of bacteria strains was evaluated based on the parameters of percentage of adhered cells and population of adhered cells on 1cm2 mucus-coated polystyrene slides. Among 27 strains of lactic acid bacteria and Bifidobacterium of high survival ability through artificial gastrointestinal fluids were studied for adherence ability on intestinal mucus in vitro, only 9 strains belonging to species Lactobacillus casei, L. fermentum, L. plantarum, L. reuteri, L. brevis và L. salivarius showed their relatively high adherence ability on intestinal mucus with population 107- 108 CFU/cm2 mucus- coated polystyrene surface with SEM image for visual confirmation.

Keywords: adhesion, intestinal mucus, microtitre plate, probiotic, SEM

Author for correspondance: Tel: +844-38583450, Fax: + 844-38584554, email: anhnl@firi.vn