

Bước đầu nghiên cứu khảo sát một số đặc tính của chủng *Bacillus subtilis* bản địa, phân lập từ người Việt Nam khỏe mạnh ứng dụng trong sản xuất chế phẩm probiotic

Đào Gia Bách^{1*}, Đoàn Thị Thùy Linh², Lưu Thị Thủy Ngân², Dương Hưng Thịnh², Nguyễn Vũ Trung³, Lê Thị Hội^{1*}

¹Trường Đại học Y Hà Nội, 1 Tôn Thất Tùng, phường Trung Tự, quận Đống Đa, Hà Nội, Việt Nam

²Công ty Cổ phần Kỹ nguyên Công nghệ Eramic, xã Ngọc Hòa, huyện Chương Mỹ, Hà Nội, Việt Nam

³Viện Pasteur TP Hồ Chí Minh, 167 Pasteur, phường Võ Thị Sáu, quận 3, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

Ngày nhận bài 28/11/2024; ngày chuyển phân biện 2/12/2024; ngày nhận phân biện 30/12/2024; ngày chấp nhận đăng 6/1/2025

Tóm tắt:

Khái niệm về probiotic hiện nay ngày càng phổ biến nhờ vào các nghiên cứu ứng dụng và sự đa dạng của các chế phẩm probiotic. Trong nghiên cứu này, nhóm nghiên cứu tiến hành nuôi cấy phân lập và định danh các chủng *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) từ mẫu phân người khỏe mạnh và đánh giá một số đặc tính probiotic của chủng thu được. Các thử nghiệm đánh giá được thực hiện dựa trên hướng dẫn GRAS (Generally Recognised as Safe) của Cục Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ (FDA). Đây là tiêu chuẩn quan trọng được các công ty thực phẩm và dược phẩm sử dụng để đánh giá đặc tính probiotic cũng như tính an toàn của vi khuẩn, bao gồm khả năng gây tan máu, độ nhạy cảm với kháng sinh, khả năng chịu axit dạ dày và muối mật. Kết quả nghiên cứu đã tuyển chọn được một chủng *B. subtilis* không gây tan máu, được đặt tên là *B. subtilis* Eramic26 (Eramic26). Chủng này có hình thái khuẩn lạc hoàn toàn khác biệt so với các chủng *B. subtilis* gây tan máu. Ngoài ra, chúng tôi cũng đánh giá tính nhạy cảm của chủng với các loại kháng sinh thường sử dụng ở người, khả năng sống sót và tồn tại trong môi trường hệ tiêu hóa. Kết quả cho thấy, chủng Eramic26 có khả năng thích nghi tốt với hệ tiêu hóa con người, không kháng lại các kháng sinh quan trọng và đạt tiêu chuẩn an toàn theo hướng dẫn GRAS.

Từ khóa: *B. subtilis*, Eramic26, hệ tiêu hóa, kháng sinh, men vi sinh.

Chỉ số phân loại: 1.6, 2.8, 3.5

Preliminary investigation on some characteristics of indigenous *B. subtilis* strains isolated from healthy Vietnamese for application in probiotic production

Gia Bach Dao^{1*}, Thi Thuy Linh Doan², Thi Thuy Ngan Luu², Hung Thinh Duong², Vu Trung Nguyen³, Thi Hoi Le^{1*}

¹Hanoi Medical University, 1 Ton That Tung Street, Trung Tu Ward, Dong Da District, Hanoi, Vietnam

²Eramic Technology JSC, Ngọc Hoa Commune, Chuong My District, Hanoi, Vietnam

³Pasteur Institute Ho Chi Minh City, 167 Pasteur Street, Vo Thi Sau Ward, District 3, Ho Chi Minh City, Vietnam

Received 28 November 2024; revised 30 December 2024; accepted 6 January 2025

Abstract:

The concept of probiotics is becoming increasingly widespread today due to applied research and the diversity of probiotic products. In this study, we cultured, isolated, and identified *B. subtilis* strains from stool samples of healthy individuals and evaluated the probiotic properties of the obtained strains. The evaluation experiments were conducted based on the Generally Recognised As Safe (GRAS) guidelines of the U.S. Food and Drug Administration (FDA). This is an important standard used by food and pharmaceutical companies to assess the probiotic characteristics and safety of bacterial strains, including hemolytic activity, antibiotic susceptibility, tolerance to gastric acid, and bile salts. Study results selected a non-hemolytic *B. subtilis* strain, designated as *B. subtilis* Eramic26 (Eramic26). This strain exhibited completely distinct colony morphology compared to hemolytic *B. subtilis* strains. Additionally, we assessed its susceptibility to commonly used antibiotics in humans, its survival and persistence in the human gastrointestinal tract: The results showed that Eramic26 adapts well to the human digestive system, does not exhibit resistance to critical antibiotics, and meets the safety standards according to the GRAS guidelines.

Keywords: antibiotic, *B. subtilis*, digestive system, Eramic26, probiotic.

Classification numbers: 1.6, 2.8, 3.5

*Tác giả liên hệ: Email: daogiabachlabmb@gmail.com; lethihoi@hmu.edu.vn

1. Đặt vấn đề

Theo Tổ chức Y tế Thế giới (WHO) và Tổ chức Nông Lương của Liên hợp quốc (FAO), probiotic được định nghĩa là những vi sinh vật sống, có các đặc tính an toàn khi đưa vào cơ thể với liều lượng thích hợp, sẽ mang lại những hiệu quả tích cực đối với sức khỏe của vật chủ [1, 2]. Trong khoảng hai thập kỷ gần đây, mối quan tâm và nhu cầu sử dụng probiotic của người tiêu dùng ngày càng cao, từ đó góp phần thúc đẩy mạnh mẽ các hoạt động nghiên cứu liên quan đến lĩnh vực này [3]. Đối với người, những vi khuẩn này thường được bổ sung nhằm cân bằng hệ vi sinh vật bên trong đường ruột, cải thiện sức khỏe và tăng cường miễn dịch. *B. subtilis* là những tế bào hình que, thường có chiều dài khoảng 2-4 micromet và chiều rộng khoảng 0,25-1 micromet, tồn tại đơn lẻ hoặc xếp thành chuỗi, có khả năng di động và sinh bào tử hình elip ở trong trạng thái “ngủ đông” giúp cho chúng sống sót trong các điều kiện môi trường khắc nghiệt. GRAS (Generally Recognised as Safe) là một chứng nhận tiêu chuẩn của Cục Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ (FDA) áp dụng cho các chất phụ gia thực phẩm và vi sinh vật được công nhận là an toàn cho con người trước khi được đưa vào sản phẩm, thực phẩm sử dụng cho người [4, 5]. Các sản phẩm probiotic đạt chất lượng cần tuân thủ các yêu cầu khắt khe về lựa chọn chủng giống vi sinh vật, môi trường nuôi cấy, quy trình lên men... Hiện nay, tại Việt Nam, hầu hết các chủng vi sinh vật được nghiên cứu ứng dụng trong thực phẩm, sản xuất probiotic đều chưa được đánh giá một cách đầy đủ các đặc tính theo các tiêu chuẩn của GRAS. Trong nghiên cứu này, nhóm nghiên cứu bước đầu khảo sát và đánh giá một số đặc tính probiotic của chủng Eramic26 bản địa, phân lập từ người Việt Nam khỏe mạnh theo các tiêu chuẩn và hướng dẫn của GRAS.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng

Mẫu phân của người trưởng thành khỏe mạnh, không sử dụng kháng sinh và các chế phẩm probiotic tối thiểu trong vòng 1 tháng.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Tiêu chuẩn lựa chọn mẫu: Người cho mẫu là người trưởng thành khỏe mạnh, không mắc các bệnh lý về đường tiêu hóa, không sử dụng kháng sinh hay các chế phẩm probiotic tối thiểu trong vòng 1 tháng. Mẫu phân sau khi lấy

được chuyển về phòng thí nghiệm trong vòng 2 giờ ở điều kiện nhiệt độ thường hoặc phải được bảo quản ở nhiệt độ 4-8°C không quá 12 giờ.

Nuôi cấy và phân lập vi khuẩn: Lấy 1 g phân cho vào ống falcon có chứa 9 ml đệm PBS 1x vô trùng, lắc đều, xử lý nhiệt ở 80°C trong 30 phút. Mẫu được pha loãng đến nồng độ 10^{-3} và được trải trên đĩa môi trường nuôi cấy giàu dinh dưỡng (LB) pH 7. Các khuẩn lạc nghi ngờ có đặc điểm như: màu trắng đục, dạng hình tròn, rìa răng cưa, không đều được cấy chuyển sang các đĩa LB pH 7 khác cho đến khi chỉ xuất hiện một loại khuẩn lạc thuần nhất nhằm mục đích định danh sau đó.

Chủng vi khuẩn sau khi phân lập được lưu giữ trong ống Eppendorf có chứa 1 ml glycerol 20%, bảo quản trong tủ -80°C.

Định danh vi khuẩn: Các chủng vi khuẩn sau khi phân lập được tiến hành định danh trên hệ thống định danh vi sinh MALDI-TOF. Các chủng vi khuẩn cho kết quả định danh là *B. subtilis* sẽ được giữ trong ống eppendorf chứa glycerol 20% ở -80°C sẵn sàng cho các thử nghiệm tiếp theo.

Đánh giá khả năng gây tan máu: Khả năng tan máu của vi khuẩn được tiến hành bằng cách sử dụng môi trường thạch Columbia chứa 5-7% máu cừu. Sau 24 giờ ủ ở 37°C, hoạt tính tan máu của chủng được đánh giá và phân loại dựa trên sự ly giải hồng cầu trong môi trường xung quanh khuẩn lạc. Tan máu alpha (α), beta (β), gamma (γ) xuất hiện dưới dạng màu xanh lục, trong và không có vùng rõ ràng xung quanh các khuẩn lạc tương ứng. Chủng *Staphylococcus aureus* ATCC 25922 được sử dụng để làm đối chứng dương [6]. Các chủng tan máu gamma (γ) được coi là an toàn.

Thử nghiệm mức độ nhạy cảm với kháng sinh: Mức độ nhạy cảm của chủng vi khuẩn được đánh giá bằng phương pháp khuếch tán đĩa Kirby Bauer theo hướng dẫn GRAS [7] đối chiếu dựa trên tiêu chuẩn của Viện Chuẩn hóa các phòng thí nghiệm vi sinh lâm sàng (CLSI) 2021 [8]. 9 loại kháng sinh được thử nghiệm là các khoanh giấy chứa gentamycin 10 μ g, clindamycin 2 μ g, chloramphenicol 30 μ g, erythromycin 15 μ g, rifampicin 5 μ g, vancomycin 30 μ g, tetracycline 30 μ g, linezolid 30 μ g, ciprofloxacin 5 μ g. Kết quả được phiên giải theo tiêu chuẩn CLSI M100, 2021 đối với *Staphylococcus* spp. và GRAS Notice No 1131 đối với *B. subtilis* BS50 [7-9].

Thử nghiệm khả năng chịu muối mật và axit dạ dày: Quy trình đánh giá khả năng chịu muối mật và axit dạ dày được tiến hành theo hướng dẫn GRAS [7]. Vi khuẩn được

cây trên đĩa môi trường DSM, ủ ở 37°C trong 24 giờ. Lấy 1 khuẩn lạc hoà vào 2 ml môi trường LB lỏng, ủ ở 37°C trong 6 giờ. Sau đó, chuyển 200 µl dịch đó vào ống nghiệm mới có chứa 2 ml môi trường sinh bào từ DSM, ủ qua đêm ở 37°C trong máy lắc. Sau 24 giờ, tiến nhuộm, soi mẫu dưới kính hiển vi để kiểm tra sự có mặt của bào tử. Sau đó, dịch nuôi cấy được xử lý nhiệt ở 65°C trong 45 phút để diệt các tế bào sinh dưỡng còn lại trong dịch nuôi nhằm thu được dịch bào tử. Sau đó, chuyển 100 µl dung dịch bào tử này vào ống nghiệm có chứa 10 ml một trong các loại dung dịch thử sau, ủ ở 37°C trong vòng 3 giờ.

- Nước muối 0,2% (2 mg NaCl/1 ml H₂O).
- Muối mật 0,2% (1 mg sodium cholate + 1 mg sodium deoxycholate/1 ml nước muối 0,2%).
- Dịch ruột mô phỏng (SIF) (1 mg pancreatin/1 ml nước muối 0,2%).
- Dịch dạ dày mô phỏng (SGF) (3,5 mg pepsin/1 ml nước muối 0,2%), pH được điều chỉnh về các mức 2, 3, 4 bằng axit HCl.

Các mẫu thử được tiến hành lấy mẫu tại các thời điểm 0, 1 và 3 giờ để đánh giá khả năng sống sót của bào tử (tiến hành pha loãng và cấy đếm trên đĩa thạch DSM, mỗi nồng độ pha loãng được cấy trải trên 2 đĩa môi trường DSM).

Chỉ số theo dõi là tỷ lệ sống tương đối được tính toán theo tỷ lệ phần trăm của số lượng bào tử sau khi phát triển so với số lượng bào tử ban đầu theo công thức:

$$\text{Tỷ lệ sống (\%)} = \frac{\text{số lượng bào tử sau khi phát triển}}{\text{số lượng bào tử ban đầu}} \times 100\%$$

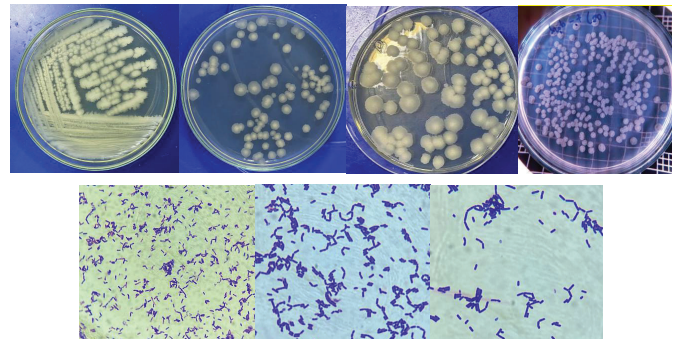
3. Kết quả và bàn luận

3.1. Nuôi cấy, phân lập và định danh chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis*

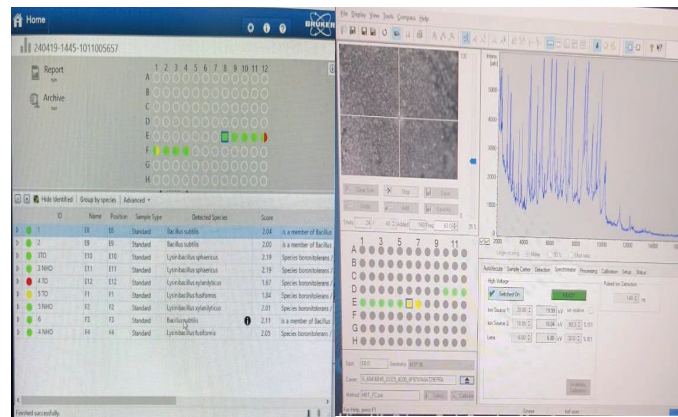
B. subtilis có thể phân lập được từ mẫu phân của người, nhưng khả năng phân lập không cao như ở các nguồn khác như đất hoặc phân động vật vì chúng thường là vi khuẩn có trong môi trường tự nhiên và không phải là một phần ưu thế trong hệ vi sinh vật đường ruột của người. Tuy nhiên, nếu điều kiện nuôi cấy phù hợp, khả năng phân lập được vi khuẩn này từ mẫu phân người sẽ cao hơn. Việc phân lập thành công vi khuẩn thường phụ thuộc vào phương pháp nuôi cấy và môi trường sử dụng.

Tổng số 30 mẫu phân thu thập được từ người khỏe mạnh, đáp ứng tiêu chuẩn lựa chọn, nhóm nghiên cứu tiến hành nuôi cấy, phân lập và chọn ra các chủng vi khuẩn có

đặc điểm hình thái khuẩn lạc nghi ngờ *B. subtilis* như có màu trắng đục, dạng hình tròn, rìa không đều dạng răng cưa (hình 1). Các chủng này được làm sạch và định danh trên hệ thống định danh vi sinh MALDI-TOF (hình 2).



Hình 1. Khuẩn lạc vi khuẩn *Bacillus subtilis*.



Hình 2. Hình ảnh kết quả định danh trên hệ thống vi sinh MALDI-TOF.

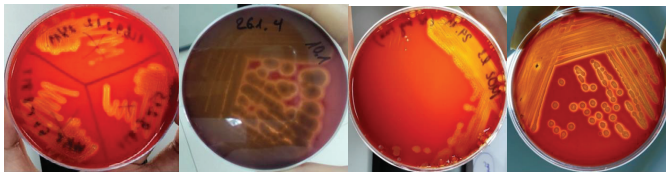
Từ 30 mẫu phân, nhóm nghiên cứu phân lập được 102 chủng *Bacillus*, trong đó có *B. amyloliquefaciens*, *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. flexus*, *B. pumilus*, *B. sralis*, *B. licheniformis* và *B. subtilis*. Trong 102 chủng *Bacillus* này, chúng tôi định danh được 8 chủng *B. subtilis*. Các chủng *B. subtilis* phân lập được lưu giữ ở -80°C sẵn sàng cho các thí nghiệm tiếp theo.

3.2. Đánh giá khả năng tan máu

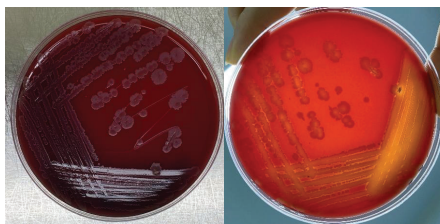
Cơ quan An toàn Thực phẩm châu Âu (EFSA) đưa ra khuyến cáo bắt buộc phải thử nghiệm hoạt tính tan máu để đảm bảo rằng, chủng vi khuẩn không có khả năng gây tan máu ngay cả khi chủng vi khuẩn ấy đã được công nhận GRAS Notices hay QPS (Qualified Presumption of Safety) [9, 10]. Biểu hiện của hoạt động tan máu là một yếu tố độc lực cơ bản phải được khảo sát để đảm bảo tính an toàn của chủng trước khi thực hiện các thử nghiệm đặc tính probiotic khác. Các chủng thể hiện hoạt động tan máu được coi là

không an toàn và không được ứng dụng vào sản phẩm dành cho con người cũng như động vật cho tới khi yếu tố này được loại bỏ, chỉnh sửa hoặc được xác nhận không gây hại cho vật chủ. Trong thử nghiệm này, chúng tôi sử dụng chủng *Staphylococcus aureus* ATCC 25922 để làm chứng dương.

Nghiên cứu tiến hành đánh giá khả năng gây tan máu của 8 chủng *B. subtilis* đã được định danh bằng hệ thống định danh vi sinh MALDI-TOF. Kết quả có 7 chủng *B. subtilis* phân lập được gây tan máu, tất cả các chủng *B. subtilis* này đều có hình thái khuẩn lạc đặc trưng của *B. subtilis*, khuẩn lạc đặc trưng hình vành khăn (hình 3) và chỉ có duy nhất một chủng *B. subtilis* không gây tan máu, hình thái khuẩn lạc của chủng này khác biệt hoàn toàn so với chủng gây tan máu (hình 4, 5). Chủng này được nhóm nghiên cứu đặt tên là Eramic26. Hình thái của chủng này cũng tương tự như hình thái của chủng *B. subtilis* SG188 được báo cáo trong hướng dẫn GRAS [7].



Hình 3. Hình ảnh tan máu của một số chủng *Bacillus subtilis* phân lập được.



Hình 4. Hình ảnh không gây tan máu của chủng *Bacillus subtilis* Eramic26.



Hình 5. Hình thái khuẩn lạc của chủng *Bacillus subtilis* Eramic26.

Khả năng gây tan máu của *B. subtilis* có thể được giải thích qua hai yếu tố chính. Thứ nhất, một số chủng tiết ra enzyme hemolysin, một loại protein có khả năng ly giải màng tế bào hồng cầu. Hemolysin có thể gây hại cho mô người khi vi khuẩn xâm nhập vào cơ thể, đặc biệt là trong

trường hợp nhiễm khuẩn. Thứ hai, *B. subtilis* có khả năng sản xuất nhiều loại enzyme ngoại bào khác nhau, giúp chúng cạnh tranh trong môi trường sống. Một số enzyme này có khả năng làm hư hại màng tế bào khác, dẫn đến hiện tượng tan máu khi vi khuẩn sinh trưởng trong môi trường giàu chất dinh dưỡng như môi trường máu.

Trong nghiên cứu đặc tính các chủng probiotic, tiêu chí an toàn là yếu tố quan trọng hàng đầu. Vì vậy, với các chủng *B. subtilis* được lựa chọn cho mục đích sử dụng trong thực phẩm, việc kiểm tra khả năng gây tan máu là một bước bắt buộc. Chủng gây tan máu thường bị loại trừ vì có nguy cơ cao đối với người dùng, nhất là ở những người có hệ miễn dịch suy yếu. Bên cạnh đó, các tiêu chuẩn an toàn như GRAS của FDA cũng yêu cầu phải kiểm tra khả năng này để đảm bảo không có tác động tiêu cực khi sử dụng chế phẩm probiotic chứa *B. subtilis*.

Kết quả này cho thấy, việc phân lập được một chủng *B. subtilis* có đặc tính không gây tan máu là vô cùng khó khăn. Những chủng gây tan máu là những chủng tiềm ẩn nguy cơ đối với sức khỏe con người, đặc biệt khi được ứng dụng trong thực phẩm hay dược phẩm.

3.3. Đánh giá mức độ nhạy cảm với kháng sinh

Thử nghiệm mức độ nhạy cảm với kháng sinh phải được thực hiện tiếp theo vì mục đích an toàn của chủng. Thử nghiệm này được thực hiện theo GRAS Notices [7] sử dụng phương pháp khuếch tán đĩa Kirby Bauer dựa trên tiêu chuẩn CLSI 2021 [8] với 9 loại kháng sinh. Kết quả được thể hiện trong bảng 1.

Bảng 1. Kết quả đánh giá độ nhạy cảm với kháng sinh.

Tên kháng sinh	Đường kính vùng ức chế (mm)				
	S	I	R	Eramic26	
Gentamycin 10 µg	≥15	13-14	≤12	26	S
Clindamycin 2 µg	≥21	15-20	≤14	6	R
Chloramphenicol 30 µg	≥18	13-17	≤12	26	S
Erythromycin 15 µg	≥23	14-22	≤13	26	S
Rifampicin 5 µg	≥20	17-19	≤16	19	I
Vancomycin 30 µg	≥17	15-16	≤14	22	S
Tetracycline 30 µg	≥19	15-18	≤14	26	S
Linezolid 30 µg	≥21	--	≤20	30	S
Ciprofloxacin 5 µg	≥21	16-20	≤15	32	S

S: nhạy cảm, I: trung gian, R: kháng.

Kết quả bảng 1 chỉ ra rằng, chủng Eramic26 được thử nghiệm nhạy cảm với hầu hết các loại kháng sinh. Chủng này không tìm thấy khoảng tham chiếu đối với kháng sinh ampicilin sulbactam, trung gian với rifampicin và kháng clindamycin. Tuy nhiên, khả năng đề kháng với một loại kháng sinh nhất định có thể là vốn có của một loài hoặc một chi vi khuẩn. Điều này cũng được quy định chặt chẽ bởi EFSA và GRAS [9, 10]. Hơn nữa, tình trạng kháng kháng sinh ở mức vừa phải có thể được coi là một đặc điểm tích cực, như những trường hợp điều trị sử dụng kết hợp probiotic và kháng sinh. Hơn nữa, nếu chế phẩm sinh học được đánh giá nhạy cảm với tất cả các loại kháng sinh, khả năng sống sót và tồn tại của chúng có thể sẽ bị tác động, can thiệp và mất hiệu lực [11].

3.4. Đánh giá khả năng chịu muối mật và axit dạ dày

Theo X.X. Zhou và cs (2007) [12], vi sinh vật probiotic chỉ phát huy được tác dụng có lợi lên vật chủ khi chúng định cư và tồn tại được trong hệ tiêu hóa, đây là môi trường chứa thành phần muối mật và axit, những yếu tố chính ức chế sự sinh trưởng và phát triển của vi sinh vật. Nghiên cứu của H. Kumura và cs (2004) [13] đã chỉ ra rằng, đặc tính probiotic của vi sinh vật được thể hiện sau khi chúng có thể tồn tại và thích nghi khoảng 3 giờ trong hệ tiêu hóa. Đây chính là thời gian thức ăn lưu hành trong ruột non. Bên cạnh đó, chủng có tiềm năng probiotic phải có khả năng chịu pH thấp mới có thể giúp chúng vượt qua hàng rào pH bên trong dạ dày. Dải pH khảo sát được thực hiện theo hướng dẫn GRAS [7] với 3 mức độ lần lượt là pH 2, 3, 4 và thời gian 3 giờ cũng là giới hạn quyết định sàng lọc của chúng. Kết quả thử nghiệm khả năng chịu muối mật và axit dạ dày được trình bày tại bảng 2.

Bảng 2. Thử nghiệm khả năng chịu muối mật và axit dạ dày.

Dịch mô phỏng	Chủng Eramic26 (Đơn vị CFU)			Tỷ lệ sống sót sau 1 giờ (%)	Tỷ lệ sống sót sau 3 giờ (%)
	0 giờ	1 giờ	3 giờ		
Nước muối 0,2%	3,45x10 ⁷	3,34x10 ⁷	3,75x10 ⁷	97	109
Muối mật 0,2%	3,45x10 ⁷	3,56x10 ⁷	3,68x10 ⁷	103	107
Mô phỏng dịch ruột	3,45x10 ⁷	3,23x10 ⁷	3,01x10 ⁷	94	87
Mô phỏng dịch dạ dày pH 2	3,45x10 ⁷	2,17x10 ⁷	3,05x10 ⁷	63	9
Mô phỏng dịch dạ dày pH 3	3,45x10 ⁷	2,42x10 ⁷	4,00x10 ⁷	70	12
Mô phỏng dịch dạ dày pH 4	3,45x10 ⁷	3,46x10 ⁷	3,70x10 ⁷	100	107

Kết quả bảng 2 cho thấy, chủng Eramic26 trong môi trường nước muối 0,2% và muối mật 0,2% đều có tỷ lệ sống sót rất cao. Kết quả thể hiện rằng, chủng này hoàn toàn có thể tồn tại và phát triển tốt trong hệ tiêu hóa. Trên thực tế, trong quá trình làm thí nghiệm, nhóm nghiên cứu quan sát kết quả ở 2 mốc thời gian là sau 1 và 3 giờ. Ở lần quan sát đầu tiên sau 1 giờ, mật độ vi sinh vật tăng lên rất chậm, gần như không đáng kể trong môi trường muối mật, lần lượt là 97% ở môi trường nước muối 0,2% và 103% trong môi trường muối mật 0,2%. Sau 3 giờ, mật độ vi sinh vật tăng lên một cách nhanh chóng, lần lượt là 109 và 107% ở môi trường nước muối và muối mật. Kết quả tương tự được giải thích bởi Q.D. Tinh và cs (2013) [14] khi nghiên cứu về vi khuẩn probiotic. Theo đó, thời gian đầu mật độ vi sinh vật tăng lên rất chậm, đây là giai đoạn mà vi khuẩn thích nghi với môi trường có muối mật. Muối mật tác động đến tế bào vi sinh vật làm hạn chế sự phát triển của chúng. Tuy nhiên, sau đó tốc độ phát triển của vi sinh vật tăng lên rất nhanh do một số protein và enzyme trên màng tế bào vi khuẩn có khả năng trung hòa tác động của muối mật bằng cách cắt đứt liên kết N-actyl giữa gốc steroid và chuỗi amino axit bên của axit mật. Ngoài ra, chủng Eramic26 có khả năng thích nghi và sống sót trong môi trường mô phỏng dịch ruột với tỷ lệ là 87%. Đối với thử nghiệm mô phỏng dịch dạ dày ở pH thấp, tại mức pH 2 và 3, chủng vẫn có thể tồn tại, song tỷ lệ sống sót ở điều kiện này là rất thấp chỉ khoảng 9-12%. Trong khi đó, kết quả ở mức pH 4 lại cho thấy khả năng thích nghi và phát triển rất mạnh mẽ của chủng khi qua 1 giờ tỷ lệ sống sót của chủng gần như tuyệt đối và sau 3 giờ chúng có thể thích nghi và phát triển với tỷ lệ 107%. Tuy nhiên, khi dạ dày đang trong trạng thái nghỉ ngơi, mức pH ổn định thường được duy trì ở mức pH 4 và pH dạ dày hầu như chỉ giảm xuống mức pH 2 hoặc 3 khi đang trong quá trình tiêu hóa thức ăn. Qua thử nghiệm này, nhóm nghiên cứu đánh giá chủng Eramic26 có khả năng thích nghi, phát triển tốt và hoàn toàn tồn tại được bên trong môi trường khắc nghiệt của hệ tiêu hóa.

4. Kết luận

Sau khi tiến hành nuôi cấy, phân lập trên 30 mẫu phân của người khỏe mạnh và tiến hành định danh các chủng vi khuẩn nghi ngờ trên hệ thống định danh vi sinh MALDI-TOF, nhóm nghiên cứu thu được 8 chủng *B. subtilis* trong 102 chủng *Bacillus* spp. Qua thử nghiệm đặc tính gây tan

máu ban đầu, chúng tôi chọn ra được một chủng *B. subtilis* không gây tan máu và đặt tên cho chủng là *B. subtilis* Eramic26 để tiếp tục tiến hành thử nghiệm các đặc tính probiotic như mức độ nhạy cảm với kháng sinh hay khả năng chịu axit dạ dày và muối mật. Kết quả cho thấy, chủng Eramic26 không gây tan máu, có khả năng thích nghi và tồn tại tốt trong hệ tiêu hóa con người, đáp ứng tiêu chuẩn an toàn GRAS. Chủng này đủ điều kiện tiếp tục cho các thử nghiệm đặc tính probiotic khác trước khi được đưa vào ứng dụng và phát triển các chế phẩm probiotic sử dụng cho người.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Công ty Cổ phần Kỹ nguyên Công nghệ Eramic. Nhóm tác giả xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] Food and Agriculture Organization of the United Nations/ World Health Organization (2001), *Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria*, <https://openknowledge.fao.org/server/api/core/bitstreams/8b1233c6-f928-4ff0-85e1-78b2e27c6e4e/content>, accessed 8 October 2024.

[2] C. Hill, F. Guarner, G. Reid, et al. (2014), “Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic”, *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, **11(8)**, pp.506-514, DOI: 10.1038/nrgastro.2014.66.

[3] I. Jankovic, W. Sybesma, P. Phothisirath, et al. (2010), “Application of probiotics in food products-challenges and new approaches”, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **21(2)**, pp.175-181, DOI: 10.1016/j.copbio.2010.03.009.

[4] G.A. Burdock, I.G. Carabin (2004), “Generally recognized as safe (GRAS): History and description”, *Toxicology Letters*, **150(1)**, pp.3-18, DOI: 10.1016/j.toxlet.2003.07.004.

[5] J.L. Frestedt (2018), *Foods, Food Additives, and Generally Regarded as Safe (GRAS) Food Assessments*, Food Control and Biosecurity, pp.543-565, DOI: 10.1016/b978-0-12-811445-2.00016-7.

[6] N.P. Mangia, L. Saliba, P. Deiana (2019), “Functional and safety characterisation of autochthonous *Lactobacillus paracasei* FS103 isolated from sheep cheese and its survival in sheep and cow fermented milks during cold storage”, *Annals of Microbiology*, **69**, pp.161-170, DOI: 10.1007/s13213-018-1416-1.

[7] Generally Recognised As Safe (2023), *GRAS Notices No 1131*, <https://www.hfpappexternal.fda.gov/scripts/fdcc/index.cfm?id=1131&set=GRASNotices>, accessed 20 October 2023.

[8] Clinical and Laboratory Standards Institute (2021), *M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*, pp.36-46.

[9] European Food Safety Authority (2012), “Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance”, *EFSA Journal*, **10(6)**, DOI: 10.2903/j.efsa.2012.2740.

[10] European Food Safety Authority (2014), “Guidance on the assessment of the toxigenic potential of *Bacillus* species used in animal nutrition”, *EFSA Journal*, **12(5)**, DOI: 10.2903/j.efsa.2014.3665.

[11] G.H. Choi, J.I.I. Fugaban, C.M. Dioso, et al. (2021), “Selection of bacteriocinogenic *Bacillus* spp. from traditional fermented Korean food products with additional beneficial properties”, *Fermentation*, **7(4)**, DOI: 10.3390/fermentation7040271.

[12] X.X. Zhou, Y.J. Pan, Y.B. Wang, et al. (2007), “*In vitro* assessment of gastrointestinal viability of two photosynthetic bacteria, *Rhodospseudomonas palustris* and *Rhodobacter sphaeroides*”, *Journal of Zhejiang University Science B*, **8(9)**, pp.686-692, DOI: 10.1631/jzus.2007.B0686.

[13] H. Kumura, Y. Tanoue, M. Tsukahara, et al. (2004), “Screening of dairy yeast strains for probiotic applications”, *Journal of Dairy Science*, **87(12)**, pp.4050-4056, DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(04)73546-8.

[14] Q.D. Tinh, T.T. Trung, N.N. Duy, et al. (2013), “Survey of some probiotic activity of traditional passionfruit-kefir and *Lactobacillus casei* VTCC 186-supplemented passionfruit-kefir”, *Science and Technology Development*, **16(3)**, pp.40-47 (in Vietnamese).