

Nghiên cứu và đánh giá tính an toàn của chủng *Bacillus subtilis* Eramic 26 ứng dụng trong sản xuất probiotic

Đoàn Thị Thùy Linh¹, Đào Gia Bách², Lưu Thị Thủy Ngân¹, Ngô Bá Bình¹,
Hoàng Thị Thanh Hoa², Nguyễn Vũ Trung³, Lê Thị Hội^{2*}

¹Công ty Cổ phần Kỹ nguyên Công nghệ Eramic, phường Chương Mỹ, Hà Nội, Việt Nam

²Trường Đại học Y Hà Nội, 1 Tôn Thất Tùng, phường Kim Liên, Hà Nội, Việt Nam

³Viện Pasteur TP. Hồ Chí Minh, 167 Pasteur, phường Xuân Hòa, TP. Hồ Chí Minh, Việt Nam

Ngày nhận bài 8/4/2025; ngày chuyển phản biện 10/4/2025; ngày nhận phản biện 17/4/2025; ngày chấp nhận đăng 20/4/2025

Tóm tắt:

Nghiên cứu này đánh giá tính an toàn của chủng *Bacillus subtilis* Eramic 26 thông qua các thử nghiệm về đặc tính kháng khuẩn, khả năng gây tan máu, độc tính tế bào và phân tích gen độc lực/kháng kháng sinh, dựa theo hướng dẫn của Generally Recognised As Safe (GRAS) do Cơ quan Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ (FDA) và Cơ quan An toàn Thực phẩm châu Âu (EFSA) ban hành. Khả năng kháng khuẩn được kiểm tra với 5 chủng vi khuẩn thử nghiệm gồm *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus* và *Shigella flexneri*. Độc tính tế bào được đánh giá trên hai dòng tế bào là HT-29 và Vero. Kết quả cho thấy, *B. subtilis* Eramic 26 không ức chế các vi khuẩn thử nghiệm, cũng như không gây độc cho hai dòng tế bào HT-29 và Vero thử nghiệm. Phân tích di truyền phát hiện các gen kháng kháng sinh như *fosB*, *satA*, *ydhE/norM*, cùng các đột biến trên *gyrA* và *gyrB*, nhưng tất cả đều nằm trên nhiễm sắc thể, không liên quan đến yếu tố di động. Chủng này mang các gen mã hóa bacteriocin như bacilysin và subtilosin, giúp tăng khả năng cạnh tranh sinh học. Tổng hợp kết quả cho thấy, *B. subtilis* Eramic 26 là chủng vi khuẩn an toàn, có tiềm năng ứng dụng trong sản xuất probiotic.

Từ khóa: *Bacillus subtilis* Eramic 26, độc tính tế bào, gen độc tố, gen kháng kháng sinh, giải trình tự.

Chỉ số phân loại: 1.6, 2.8, 3.1

Research and safety evaluation of the *Bacillus subtilis* Eramic 26 strain for application in probiotic production

Thi Thuy Linh Doan¹, Gia Bach Dao², Thi Thuy Ngan Luu¹, Ba Binh Ngo¹,
Thi Thanh Hoa Hoang², Vu Trung Nguyen³, Thi Hoi Le^{2*}

¹Eramic Technology Era Joint Stock Company, Chuong My Ward, Hanoi, Vietnam

²Hanoi Medical University, 1 Ton That Tung Street, Kim Lien Ward, Hanoi, Vietnam

³Pasteur Institute in Ho Chi Minh City, 167 Pasteur Street, Xuan Hoa Ward, Ho Chi Minh City, Vietnam

Received 8 April 2025; revised 17 April 2025; accepted 20 April 2025

Abstract:

This study evaluated the safety of the *Bacillus subtilis* Eramic 26 strain through assessments of antibacterial activity, hemolytic potential, cytotoxicity, and virulence/antibiotic resistance gene analysis, following the Generally Recognised As Safe (GRAS) guidelines of the U.S. Food and Drug Administration (FDA) and the European Food Safety Authority (EFSA). Antibacterial activity was tested against five indicator bacterial strains: *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, and *Shigella flexneri*. Cytotoxicity was evaluated using two cell lines: human HT-29 and Vero. The results showed that *B. subtilis* Eramic 26 did not inhibit the tested bacterial strains and did not exhibit cytotoxic effects in either the HT-29 or Vero cell line. Genomic analysis revealed the presence of antibiotic resistance genes such as *fosB*, *satA*, and *ydhE/norM*, as well as mutations in *gyrA* and *gyrB*; however, all were located on the chromosome and not associated with mobile genetic elements. The strain harboured bacteriocin-encoding genes, including bacilysin and subtilosin, which enhance competitive fitness. Overall, the findings indicate that *B. subtilis* Eramic 26 is a safe bacterial strain with strong potential for application in probiotic production.

Keywords: antibiotic resistance genes, *Bacillus subtilis* Eramic 26, cytotoxicity, sequencing, toxin genes.

Classification numbers: 1.6, 2.8, 3.1

*Tác giả liên hệ: Email: lethihoi@hmu.edu.vn

1. Đặt vấn đề

Bacillus subtilis là vi khuẩn Gram dương có khả năng tạo thành bào tử, được sử dụng từ lâu đời trong thực phẩm lên men truyền thống như natto, doenjang, kim chi, các loại mứt và dưa muối, với vai trò cải thiện tiêu hóa và tăng cường miễn dịch nhờ vào khả năng sinh enzyme và các hợp chất kháng khuẩn tự nhiên [1]. Tuy nhiên, ngày càng có nhiều nghiên cứu cảnh báo rằng một số chủng *B. subtilis* có thể mang các gen liên quan đến độc tố, yếu tố độc lực hoặc gen kháng kháng sinh nằm trên yếu tố di động, có thể dẫn đến nguy cơ gây ngộ độc thực phẩm hoặc ảnh hưởng tiêu cực đến sức khỏe người tiêu dùng [2]. Những phát hiện này cho thấy, không phải tất cả các chủng *Bacillus* đều an toàn để sử dụng trong thực phẩm hoặc chế phẩm probiotic. Do đó, yêu cầu về việc đánh giá tính an toàn sinh học của các chủng trước khi ứng dụng thực tế là rất quan trọng. Trên thế giới, các tổ chức như FDA và EFSA đã xây dựng các khung đánh giá các đặc tính an toàn của các chủng vi sinh vật thông qua hệ thống chứng nhận GRAS (Generally Recognized As Safe) và QPS (Qualified Presumption of Safety), trong đó nhấn mạnh đến việc sàng lọc các yếu tố độc lực và kháng kháng sinh đồng thời ở cả mức độ kiểu gen và kiểu hình [3, 4]. Xuất phát từ những yêu cầu nghiêm ngặt trên, nhóm nghiên cứu thực hiện đánh giá các đặc tính an toàn của chủng *B. subtilis* Eramic 26 thông qua các thử nghiệm in vitro như đánh giá khả năng kháng khuẩn, đánh giá tính độc tế bào và phân tích các gen độc lực bao gồm gen kháng kháng sinh/kim loại nặng, gen độc tố, yếu tố độc lực, hoặc các gen liên quan đến phage theo hướng dẫn của GRAS và EFSA. Từ đó, đánh giá tiềm năng của chủng này trong sản xuất các chế phẩm probiotic.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng

Chủng *B. subtilis* Eramic 26 đã được phân lập và đăng ký trình tự bộ gen trên Ngân hàng Gen thế giới (GenBank) với mã số truy cập GCF_031932205.1. Chủng này đã được báo cáo là không phân giải hồng cầu, có khả năng duy trì sự sống trong điều kiện mô phỏng đường tiêu hóa và thể hiện tính nhạy cảm với các kháng sinh thông dụng ở người [5]. Những đặc điểm này cho thấy, *B. subtilis* Eramic 26 có triển vọng probiotic, đồng thời đáp ứng các tiêu chí sơ bộ để tiếp tục thực hiện các đánh giá về đặc tính an toàn ở mức độ sâu hơn theo hướng dẫn của GRAS và EFSA.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu đánh giá khả năng kháng khuẩn: Sử dụng năm chủng vi khuẩn theo hướng dẫn của GRAS: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium*

ATCC 14028, *Enterococcus faecium* ATCC 19434, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Shigella flexneri* ATCC 12022.

Phương pháp nghiên cứu khả năng kháng khuẩn: Nghiên cứu khả năng kháng khuẩn được thực hiện theo phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch:

Vi khuẩn thử nghiệm được nuôi cấy trên đĩa thạch máu trong 24 giờ ở 37°C. Sau đó, chọn 3-5 khuẩn lạc và hòa vào dung dịch PBS để tạo huyền phù. Mật độ vi khuẩn được điều chỉnh nằm trong khoảng 10^8 CFU/ml (độ đục 0,5 McFarland hoặc $OD_{600}=0,3-0,5$). Sử dụng tấm bông vô trùng để trải dịch huyền phù vi khuẩn lên bề mặt đĩa môi trường BHI. Đục lỗ có đường kính 7 mm trên đĩa thạch BHI đã được trải dịch vi khuẩn.

Đồng thời, *B. subtilis* Eramic 26 được nuôi cấy trong môi trường LB ở 37°C trong 24 giờ, tốc độ lắc 200 vòng/phút. Tiếp đó, dịch nuôi cấy được ly tâm 30 phút với tốc độ 8.000 vòng/phút, thu lấy dịch nổi. Tiến hành nhỏ 100 μ l vào các lỗ trên đĩa thạch đã được chuẩn bị. Tiến hành nhỏ 100 μ l môi trường nuôi cấy đối với mẫu đối chứng. Chờ dịch khuếch tán vào lớp thạch khoảng 2 giờ rồi ủ đĩa ở 37°C trong 24 giờ.

Chỉ tiêu theo dõi là quan sát khả năng tạo vòng kháng khuẩn của chủng vi khuẩn *B. subtilis* Eramic 26 sau 24 giờ. Hoạt tính kháng khuẩn được tính bằng công thức: D - d

trong đó: D là đường kính vòng kháng khuẩn (mm); d là đường kính lỗ thạch (mm).

Vật liệu nghiên cứu cho thử nghiệm đánh giá tính độc tế bào: Môi trường nuôi cấy tế bào DMEM hoặc MEM có bổ sung thêm L-glutamine, sodium pyruvate, $NaHCO_3$, penicillin/streptomycin, 10% FBS (Fetal Bovine Serum), Trypsin-EDTA (0,05%); Kit *in vitro* toxicology assay kit MTT based (Sigma), đĩa 24 giếng (Corning), đĩa 96 giếng (Corning).

Dụng cụ, thiết bị cơ bản: kính hiển vi ngược (Axiovert 40 CFL), buồng đếm tế bào (Fisher, Hoa Kỳ), máy quang phổ (BioTek), tủ ấm CO_2 , tủ lạnh sâu -80°C, bình nitơ lỏng, cân phân tích, máy đo pH và một số dụng cụ thí nghiệm khác.

Các hóa chất cơ bản khác: DMSO, PBS, ellipticine.

Các dòng tế bào HT-29 (tế bào ung thư đại tràng ở người) và Vero (tế bào thận khỉ) do GS.TS. J.M. Pezzuto - Trường Đại học Long-Island, Hoa Kỳ và GS. Jeanette Maier - Đại học Milan, Italia cung cấp.

Phương pháp đánh giá tính độc tế bào: Phương pháp xác định tính độc tế bào trên tế bào nuôi cấy đơn lớp được thực hiện theo hướng dẫn của EFSA (2014) trong đánh giá an toàn các chủng *Bacillus*. Tế bào được xử lý bằng trypsin để tách rời, sau đó được đếm bằng buồng đếm nhằm điều chỉnh mật độ phù hợp cho thí nghiệm. Chuyển 1.000 µl tế bào/giếng vào đĩa nuôi cấy 24 giếng và ủ trong 48 giờ để tế bào bám đáy và phát triển ổn định. Loại bỏ và thay thế môi trường cũ bằng 1 ml môi trường mới cho mỗi giếng trước khi tiến hành thí nghiệm. Mẫu thử được ly tâm để thu dịch nổi, sử dụng cho thí nghiệm. Dịch nổi sau ly tâm được bổ sung vào các giếng nuôi cấy với các thể tích lần lượt là 100, 80, 60 và 40 µl/giếng, sau đó bổ sung môi trường nuôi cấy để đạt tổng thể tích 1,1 ml/giếng. Tế bào được ủ với mẫu thử trong 2 giờ tại 37°C trong tủ ấm CO₂. Sau thời gian ủ, bổ sung thuốc thử 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) theo hướng dẫn của bộ kit (ống M-5655 được hòa tan trong 3 ml dung dịch Balanced Salt Solution; một lượng dung dịch MTT tương đương 10% thể tích môi trường được thêm vào mỗi giếng). Các giếng nuôi cấy tiếp tục được ủ trong 2-4 giờ. Kết thúc thời gian ủ, thêm vào mỗi giếng 1,1 ml dung dịch hòa tan MTT (MTT solubilization solution), lắc đều để hòa tan hoàn toàn tinh thể formazan. Giá trị mật độ quang học (OD) được đo tại bước sóng 540 nm bằng máy đọc ELISA Plate Reader (Biotek ELx800). Phần trăm ức chế sự phát triển của tế bào khi có mặt mẫu thử được xác định theo công thức sau:

$$\% \text{ tế bào sống} = \frac{OD_{\text{mẫu}} - OD_{\text{blank}}}{OD_{\text{đc}} - OD_{\text{blank}}} \times 100\%$$

trong đó: OD_{đc} là OD của giếng chỉ có tế bào; OD_{blank} là OD của giếng chỉ có môi trường nuôi cấy.

Thí nghiệm được lặp lại 3 lần để đảm bảo tính chính xác. Ellipticine ở các nồng độ 10, 2, 0,4, 0,08 µg/ml được sử dụng như là chất đối chứng dương.

Giải trình tự gen *B. subtilis* Eramic 26: Chủng *B. subtilis* Eramic 26 được nuôi cấy trong môi trường LB ở 37°C trong 10 giờ, với tốc độ lắc 220 vòng/phút. Ly tâm 8.000 vòng/phút trong 15 phút để thu cặn tế bào. Tách chiết DNA tổng số bằng bộ kit DNeasy Blood and Tissue Kits. Định lượng DNA tách chiết được bằng máy đo huỳnh quang TBS-380 (Turner BioSystems Inc., CA, Hoa Kỳ). Xây dựng thư viện DNA bằng bộ kit Nextera XT DNA Library Preparation Kit. Các mẫu DNA được phân mảnh thành các đoạn có kích thước 400-500 bp, sau đó được giải trình tự bằng hệ thống máy Illumina Miseq sử dụng bộ kit Miseq Reagent Kit v3. Dữ liệu thu được từ Illumina được sử dụng để phân tích tin sinh học.

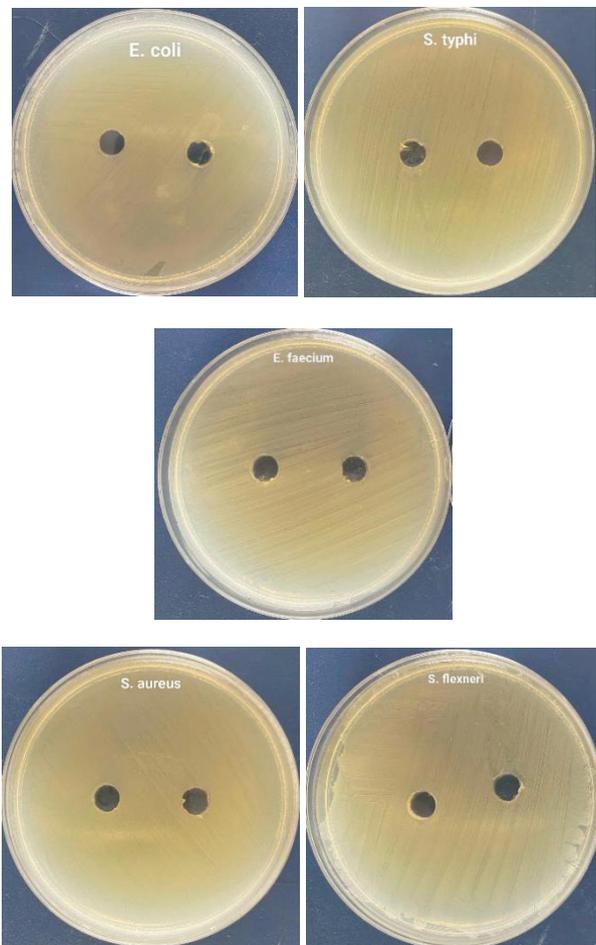
Lắp ráp, chú giải và phân tích hệ gen: Các đoạn đọc thu được từ quá trình giải trình tự toàn bộ bộ gen được kiểm tra chất lượng bằng FastQC. Loại bỏ các đoạn đọc chất lượng

thấp bằng fastp. Sau đó, các đoạn đọc đã qua xử lý được lắp ráp *de novo* bằng SPAdes và đánh giá chất lượng lắp ráp bằng phần mềm QUAST. Chú giải hệ gen bằng hệ thống dữ liệu RAST. Thông qua việc so sánh với các nguồn dữ liệu đã công bố để xác định các gen chức năng. Ngoài ra, các gen kháng kháng sinh được phát hiện và kiểm tra lại bằng công cụ ABRicate.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Thử nghiệm khả năng kháng khuẩn

Đặc tính kháng khuẩn của chủng *B. subtilis* Eramic 26 được đánh giá trên năm chủng vi khuẩn thử nghiệm, bao gồm: *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella flexneri*. Kết quả đánh giá được thể hiện trong hình 1.



Hình 1. Kết quả thử nghiệm đặc tính kháng khuẩn của *B. subtilis* Eramic 26.

Kết quả nghiên cứu cho thấy, các hợp chất kháng khuẩn trong dịch nuôi cấy của chủng *B. subtilis* Eramic 26 không ức chế các chủng vi khuẩn trong thử nghiệm.

Đặc tính không ức chế các chủng vi khuẩn thử nghiệm ở trên không ảnh hưởng đến đặc tính probiotic của *B. subtilis*. Loài này vẫn được ứng dụng rộng rãi trong các sản phẩm men vi sinh nhờ khả năng sống sót và sinh trưởng mạnh mẽ trong đường tiêu hóa. Bào tử *B. subtilis* giúp chúng chịu đựng môi trường khắc nghiệt trong đường ruột như axit dạ dày, muối mật và enzyme tiêu hóa, đảm bảo chúng đến ruột một cách an toàn và phát huy tác dụng [6]. Mặc dù không trực tiếp tiêu diệt vi khuẩn gây bệnh, *B. subtilis* vẫn có khả năng ức chế sự phát triển của các vi sinh vật gây bệnh thông qua cơ chế cạnh tranh về vị trí bám và nguồn dinh dưỡng trong đường ruột. Khả năng sinh trưởng nhanh và hiệu quả của *B. subtilis* giúp chúng chiếm ưu thế trên bề mặt niêm mạc ruột, từ đó làm giảm khả năng bám dính và phát triển của vi khuẩn gây bệnh do hạn chế không gian và chất dinh dưỡng cần thiết cho chúng [7]. Ngoài ra, *B. subtilis* kích thích sản xuất chất nhầy và củng cố hàng rào biểu mô ruột, giúp ngăn chặn vi khuẩn gây bệnh xâm nhập vào cơ thể. Chúng còn kích thích hệ miễn dịch đường ruột bằng cách tăng sản xuất kháng thể IgA và hoạt hóa các tế bào miễn dịch. Điều này giúp giảm nguy cơ viêm nhiễm và các bệnh liên quan đến đường tiêu hóa [8]. Bên cạnh đó, *B. subtilis* hỗ trợ sự phát triển của vi khuẩn có lợi như *Lactobacillus* và *Bifidobacterium*, giúp cân bằng hệ vi sinh đường ruột, giảm triệu chứng rối loạn tiêu hóa như tiêu chảy, chướng bụng, đầy hơi và táo bón [6].

3.2. Thử nghiệm đánh giá tính độc tế bào

Bacillus subtilis là loài vi khuẩn có tính đa dạng cao, bao gồm nhiều chủng khác nhau với những đặc tính riêng biệt. Tuy được coi là lợi khuẩn nhờ tác động tích cực đến sức khỏe vật chủ, nhưng trong một số điều kiện nhất định, chúng vẫn có thể tiềm ẩn nguy cơ gây hại. Hiện nay, chưa có bằng chứng khoa học đáng kể cho thấy *B. subtilis* gây độc tế bào khi sử dụng ở liều lượng và điều kiện thông thường trong các sản phẩm probiotic. Tuy nhiên, khả năng tiềm ẩn về độc tính tế bào của vi khuẩn này vẫn chưa thể hoàn toàn loại trừ. Do đó, FDA và EFSA vẫn yêu cầu các chủng vi sinh vật sử dụng cho con người vẫn cần phải đánh giá tính độc tế bào.

Đối với các loài *Bacillus*, EFSA đề xuất thử nghiệm độc tính tế bào là một chỉ số quan trọng về khả năng gây độc đối với các thành viên của chi *Bacillus* song song với các thử nghiệm tan máu. Thử nghiệm này được sử dụng để quan sát tác động của chủng đối với khả năng sống sót của tế bào HT-29 và VERO. Đây được coi là một thử nghiệm có độ nhạy cao vì chỉ có tế bào sống mới có thể tạo ra các sản phẩm formazan từ phản ứng này (bảng 1).

Bảng 1. Kết quả thử nghiệm độc tính của *B. subtilis* Eramic 26 trên 2 dòng tế bào VERO và HT-29.

Ellipticine (Đôi chứng)	<i>B. subtilis</i> Eramic 26								
	VERO		HT-29		Thế tích (μl)	VERO		HT-29	
	% tb sống	Sai số	% tb sống	Sai số		% tb sống	Sai số	% tb sống	Sai số
10	9,12	0,84	11,77	1,02	100	99,19	3,82	99,24	2,14
2	22,93	1,49	27,22	1,17	80	100,19	2,98	100,09	0,49
0,4	48,55	1,07	51,18	1,29	60	101,62	3,79	101,10	1,52
0,08	76,01	1,64	78,92	2,14	40	102,87	3,77	101,74	2,68

Theo hướng dẫn của EFSA, các mẫu có tỷ lệ tế bào sống lớn hơn 80% được xem là không gây độc tính, trong khi các mẫu có tỷ lệ tế bào sống thấp hơn 80% được xếp vào nhóm có độc tính. Kết quả thử nghiệm độc tính tế bào được trình bày trong bảng 1 cho thấy, chủng *B. subtilis* Eramic 26 không có biểu hiện gây độc đối với tế bào Vero và tế bào HT-29. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu trước đây của J. Burtscher và cs (2021) [9].

3.3. Gen kháng kháng sinh và độc lực

Toàn bộ trình tự bộ gen của *B. subtilis* Eramic 26 đã được xác định và đăng ký trên cơ sở dữ liệu GenBank với mã số truy cập GCF_031932205.1. Trình tự này đã được phân tích nhằm đánh giá và báo cáo các đặc tính an toàn theo tiêu chuẩn GRAS, FDA và EFSA.

Đặc điểm mang gen kháng kháng sinh: Theo kết quả chú giải hệ gen bằng hệ thống dữ liệu RAST (bảng 2), chủng *B. subtilis* Eramic 26 được phát hiện mang gen *fosB* và *sataA* liên quan đến khả năng kháng fosfomycin và streptothricin cùng với sự hỗ trợ của bơm đẩy, thông qua hoạt động của gen *ydhE* và *norM* [10]. Ngoài ra, chủng cũng mang đột biến điểm trên các gen *gyrA* và *gyrB*, liên quan đến khả năng kháng fluoroquinolones. Các đột biến này thường tập trung ở vùng mã hóa protein DNA gyrase, một enzyme quan trọng tham gia vào quá trình sao chép và sửa chữa DNA. Cụ thể, hai đột biến tại gen *gyrA* gồm: Ser83→Asp (S83D) và Asp87→Tyr (D87Y). Đây là hai vị trí đã được xác nhận là “hotspots” có liên quan trực tiếp đến hiện tượng kháng quinolone trong nhiều loài vi khuẩn. Đột biến Ser83→X là dạng biến đổi phổ biến nhất được ghi nhận trong các chủng *E. coli* và *Salmonella enterica* kháng ciprofloxacin, đặc biệt là các dạng S83L, S83F, S83Y [11]. Đột biến Asp87→Tyr (D87Y) cũng là một biến thể đã được ghi nhận có liên quan đến kháng thuốc. Qua phân tích, đột biến Asp426→Leu (D426L) trong gen *gyrB* cũng được ghi nhận, tương ứng với vùng kháng quinolone mở rộng. Mặc dù các đột biến trên *gyrB* không thường gặp như trên *gyrA*, nhưng khi xuất hiện đồng thời, chúng có thể làm tăng mức độ kháng đáng kể [12]. Tuy nhiên, theo khuyến cáo của EFSA, các đặc điểm

kháng phát sinh từ đột biến trên nhiễm sắc thể có khả năng truyền ngang thấp vì ít liên quan trực tiếp đến các yếu tố di động [13].

Sự hiện diện của các gen kháng kháng sinh liên kết với các yếu tố di động như plasmid, transposon hoặc trình tự chèn (IS) có thể tiềm ẩn nguy cơ truyền ngang gen kháng kháng sinh sang các loài vi khuẩn khác, đặc biệt là các vi khuẩn gây bệnh đường ruột [13]. Tuy nhiên, ở chủng *B. subtilis* Eramic 26, không phát hiện các gen kháng nằm trên các yếu tố di động này. Theo nghiên cứu của S. Seyirt và cs (2023) [14], các chủng *Bacillus* thường không chứa các gen di động có khả năng truyền gen kháng kháng sinh. Do đó, các gen kháng kháng sinh ở *Bacillus* nằm trên nhiễm sắc thể không được xem là vấn đề nghiêm trọng ảnh hưởng đến tính an toàn của các chủng probiotic. EFSA đã đưa ra các nguyên tắc sau: Khi tất cả các chủng trong một nhóm phân loại nhất định đều biểu hiện khả năng kháng lại một loại kháng sinh chung thì khả năng kháng đó có thể là đặc tính nội tại của nhóm phân loại đó (kháng tự nhiên) [13]. Đó là đặc điểm sinh học cơ bản của vi sinh vật thuộc cùng một nhóm phân loại. Các gen kháng kháng sinh không liên kết hoặc không nằm trên plasmid hoặc các yếu tố có thể di động thì nguy cơ lây truyền sang các sinh vật khác có thể được coi là tối thiểu.

Bacteriocins: Một số loài *Bacillus* như *B. licheniformis* và *B. subtilis* có khả năng tổng hợp bacitracin - một loại kháng sinh peptide vòng - giúp ức chế sự phát triển của các vi khuẩn cạnh tranh. Tuy nhiên, để tránh ảnh hưởng bất lợi từ chính kháng sinh mà chúng sản xuất, các vi khuẩn này đã phát triển các cơ chế tự bảo vệ đặc biệt [15]. Chủng *B. subtilis* Eramic 26 mang một số gen liên quan đến cơ chế đề kháng với bacitracin, bao gồm *bceA*, *bceB*, *bceS*, *bceR*.

Khả năng hình thành biofilm: Phân tích trình tự bộ gen của *B. subtilis* Eramic 26 cho thấy, sự hiện diện của gen *tasA*, mã hóa một protein cấu trúc quan trọng trong quá trình hình thành màng biofilm (bảng 2). Điều này chỉ ra rằng chủng vi khuẩn này có khả năng hình thành màng biofilm, một đặc tính quan trọng giúp vi khuẩn bám dính lên các bề mặt, phát triển bền vững trong các môi trường khác nhau và tăng cường khả năng thích nghi cũng như sống sót trong điều kiện khắc nghiệt [16].

Kháng muối mật: Chủng *B. subtilis* Eramic 26 mang gen *bsh*, mã hóa enzyme choloylglycine hydrolase (bile salt hydrolase - BSH). Đây là một enzyme đặc trưng, chủ yếu được tổng hợp bởi vi khuẩn đường ruột, với chức năng xúc tác quá trình thủy phân liên kết amide trong muối mật, từ đó điều hòa chuyển hóa muối mật và tăng cường khả năng sống sót của vi khuẩn trong đường tiêu hóa [17]. Nghiên cứu về

Bảng 2. Bảng chú giải hệ gen của chủng *Bacillus subtilis* Eramic 26.

Gen/protein	Chức năng	<i>B. subtilis</i> Eramic 26	<i>B. clausii</i> 088AE	<i>B. subtilis</i> 168
Kháng kháng sinh				
<i>vanW</i>	Kháng vancomycin	Không	Không	Không
<i>cat</i>	Kháng chloramphenicol	Không	Không	Không
<i>fosB</i>	Kháng fosfomycin	Có	Không	Có
<i>tet-like</i>	Kháng tetracycline	Không	Không	Không
<i>blaI</i>	Kháng beta-lactam	Không	Không	Không
<i>satA</i>	Kháng streptothricin	Có	Không	Có
<i>gyrA</i> (đột biến)	Kháng fluoroquinolones	Có	Có	Có
<i>gyrB</i> (đột biến)	Kháng fluoroquinolones	Có	Có	Có
<i>ydhE/norM</i>	Bơm đẩy đa kháng sinh	Có	Có	Có
Yếu tố độc lực				
Bacteriocins/đáp ứng với bacitracins				
<i>bceA</i>	Protein gắn ATP đảo thái bacitracin	Có	Có	Có
<i>bceB</i>		Có	Có	Có
<i>bceS</i>	Nhận diện và điều hòa bảo vệ chống lại bacitracin	Có	Có	Có
<i>bceR</i>		Có	Có	Có
Bacilysin	Bacteriocins	Không	Không	Không
Subtilosin				
Hình thành biofilm				
<i>tasA</i>	Cấu tạo màng biofilm	Có	Có	Có
Ly giải muối mật				
<i>bsh</i>	Enzyme chuyển hóa và điều hòa muối mật	Có	Có	Có
Độc tố				
<i>bceT</i>	Độc tố ruột gây tiêu chảy	Không	Không	Không
<i>hbl</i>	Độc tố ruột gây tan máu	Không	Không	Không
<i>nhe</i>	Độc tố ruột không gây tan máu	Không	Không	Không
<i>cytK</i>	Cytotoxin K	Không	Không	Không
<i>entFM</i>	Độc tố ruột FM	Không	Không	Không
<i>cesB</i>	Độc tố gây ngộ độc	Không	Không	Không
Hemolysin				
α -hemolysin		Không	Không	Không
β -hemolysin		Không	Không	Không
γ -hemolytic		Có	Có	Có

enzyme BSH trong các chủng probiotic mở ra nhiều triển vọng trong lĩnh vực y học và dinh dưỡng, đặc biệt trong việc hỗ trợ tiêu hóa, điều hoà chuyển hoá lipid và cải thiện sức khỏe đường ruột.

Các gen độc tố: Nghiên cứu đã tiến hành phân tích bộ gen của *B. subtilis* Eramic 26 nhằm xác định sự có mặt của các gen liên quan đến độc tố thường được ghi nhận ở vi khuẩn *Bacillus*. Các độc tố này bao gồm *bceT* (gây tiêu chảy), *hbl* (*hblA*, *hblC*, *hblD* gây tan máu), *nhe* (*nheA*, *nheB*, *nheC* không gây tan máu), *cytK* (cytotoxin K), *entFM* (độc tố ruột enterotoxin FM) và *cesB* - một độc tố do *Bacillus cereus* sản xuất, có liên quan đến ngộ độc thực phẩm với triệu chứng nôn mửa [18]. Kết quả phân tích cho thấy *B. subtilis* Eramic 26 không mang bất kỳ gen nào trong số các gen mã hóa độc tố kể trên, qua đó góp phần khẳng định tính an toàn của chủng vi khuẩn này trong các ứng dụng tiềm năng.

Kết quả phân tích genome cho thấy, *B. subtilis* Eramic 26 là một chủng an toàn, không mang bất kỳ gen độc tố nào và có tiềm năng ứng dụng trong sản xuất probiotic dành cho con người phù hợp với các tiêu chí đánh giá an toàn theo khuyến nghị của GRAS, FDA và EFSA. Dữ liệu nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với các báo cáo về những chủng đã được cấp chứng nhận GRAS, đồng thời tương đồng với nghiên cứu của C. From và cs (2005) [19] thực hiện đánh giá trên 333 chủng *Bacillus* không thuộc nhóm *B. cereus*. Chủng *B. subtilis* Eramic 26 không mang các gen độc tố đặc trưng của *B. cereus*, củng cố bằng chứng về tính an toàn của chủng vi khuẩn này trong các ứng dụng tiềm năng.

Hemolysin và khả năng ly giải hồng cầu: Một số chủng *Bacillus* có khả năng tổng hợp protein hemolysin, đóng vai trò trong quá trình ly giải hồng cầu. Chủng tham chiếu *B. subtilis* 168 được xác định mang một số gen liên quan đến khả năng phân giải hồng cầu như *yhdP*, *yhdT*, *yqxC* và *yrkA* [20]. Tuy nhiên, phân tích bộ gen của *B. subtilis* Eramic 26 bằng hệ thống dữ liệu RAST cho thấy, chủng này không mang các gen mã hóa hemolysin có liên quan đến hiện tượng ly giải hồng cầu. *B. subtilis* Eramic 26 cũng đã được đánh giá khả năng ly giải hồng cầu và xác định rằng chủng này không làm ly giải hồng cầu [5]. Qua đó, củng cố thêm tính an toàn của *B. subtilis* Eramic 26 trong các ứng dụng probiotic cho con người.

Các chủng *Bacillus* gây tan máu thường bị loại trừ khỏi các ứng dụng probiotic do tiềm ẩn nguy cơ cao đối với sức khỏe con người, đặc biệt là ở những người suy giảm miễn dịch. Do đó, EFSA đã đưa ra khuyến cáo bắt buộc về việc kiểm tra hoạt tính tan máu đối với các chủng *Bacillus*, ngay cả khi chủng vi khuẩn đó đã được công nhận theo GRAS Notice hoặc QPS. Hoạt tính tan máu được xem là một yếu

tố độc lực quan trọng và phải được đánh giá kỹ lưỡng trước khi tiến hành các nghiên cứu sâu hơn về đặc tính probiotic, nhằm đảm bảo tính an toàn và khả năng ứng dụng của chủng vi khuẩn trong thực phẩm và dược phẩm. Các chủng thể hiện hoạt tính tan máu được coi là không an toàn và không được ứng dụng trong các sản phẩm dành cho người hoặc động vật cho đến khi yếu tố này được loại bỏ, chỉnh sửa hoặc được xác nhận không gây hại cho vật chủ.

Ngoài ra, phân tích trình tự bộ gen của *B. subtilis* Eramic 26 cho thấy, sự có mặt của gen *fabG*, mã hóa enzyme 3-ketoacyl-acyl carrier protein (ACP) reductase, một thành phần thiết yếu trong quá trình sinh tổng hợp axit béo. Enzyme này xúc tác phản ứng khử phụ thuộc NADPH, chuyển đổi β -ketoacyl-ACP thành β -hydroxyacyl-ACP, đánh dấu bước khử đầu tiên trong chu trình kéo dài chuỗi axit béo. Sự hiện diện của *fabG* trong cụm gen tổng hợp axit béo của *B. subtilis* Eramic 26, cùng với các gen *fabD* (mã hóa malonyl CoA:ACP transacylase) và *acpP* mã hóa acyl carrier protein (ACP). *acpP* đóng vai trò là chất mang nhóm acyl, tham gia vào quá trình vận chuyển các đơn vị acyl giữa các enzyme trong chu trình kéo dài chuỗi axit béo, cho thấy vai trò của chủng này trong điều hòa sinh tổng hợp axit béo.

Bên cạnh cụm gen tổng hợp axit béo, bộ gen của *B. subtilis* Eramic 26 cũng chứa gen *gmuG*, mã hóa enzyme mannan endo-1,4- β -mannosidase. Enzyme này đóng vai trò quan trọng trong phân giải glucomannan thông qua thủy phân liên kết β -1,4 trong các polysaccharide như mannan, galactomannan và glucomannan. Operon *gmuBACDREFG* được kích thích phiên mã khi có mặt glucomannan, trong đó *gmuG* là một yếu tố cần thiết cho sự hoạt động của operon này. Bên cạnh đó, các sản phẩm phân giải như cellobiose và mannobiose cũng đóng vai trò là các tín hiệu kích thích mạnh mẽ quá trình phiên mã của operon này.

Ngoài vai trò trong phân giải glucomannan, *gmuG* còn được dự đoán mã hóa một protein có hoạt tính 6-phospho- β -glucosidase, một enzyme tham gia vào quá trình thủy phân β -glucoside phosphorylated thành glucose-6-phosphate, một bước quan trọng trong con đường dị hóa carbohydrate (BSubCyc). Điều này cho thấy, gen *gmuG* không chỉ góp phần vào khả năng sử dụng glucomannan mà còn giúp *B. subtilis* khai thác hiệu quả các nguồn carbon khác nhau trong môi trường, qua đó tăng cường tính thích nghi và khả năng sinh tồn của vi khuẩn trong các điều kiện khắc nghiệt.

Sự hiện diện của các gen như *fabG*, *fabD*, *acpP* và *gmuG* không chỉ phản ánh sự chuyên biệt hóa về mặt chuyển hóa của loài vi khuẩn này, mà còn cho thấy tiềm năng ứng dụng của nó trong lĩnh vực probiotic.

4. Kết luận

Kết quả nghiên cứu khảo sát đánh giá toàn diện tính an toàn theo các tiêu chuẩn quốc tế như GRAS, FDA và EFSA cho thấy, *B. subtilis* Eramic 26 là chủng có hồ sơ an toàn: không gây tan máu, không mang các gen kháng kháng sinh nằm trên yếu tố di truyền di động. Đồng thời, kết quả thử nghiệm độc tính trên hai dòng tế bào Vero và HT-29 cũng cho thấy, chủng này không gây ra ảnh hưởng bất lợi nào đến khả năng sống của tế bào. Đặc biệt, chủng *B. subtilis* Eramic 26 không chứa các gen mã hóa độc tố hoặc yếu tố độc lực. Những kết quả ban đầu này cho thấy, *B. subtilis* Eramic 26 là một ứng viên tiềm năng trong lĩnh vực sản xuất probiotic dành cho con người, đồng thời cung cấp nền tảng khoa học quan trọng cho các nghiên cứu tiếp theo trên mô hình động vật và thử nghiệm lâm sàng trên người.

LỜI CẢM ƠN

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

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] Z. Li, M. Zheng, J. Zheng, et al. (2023), “*Bacillus* species in food fermentations: An underappreciated group of organisms for safe use in food fermentations”, *Current Opinion in Food Science*, **50**, DOI: 10.1016/j.cofs.2023.101007.

[2] F. Deng, Y. Chen, T. Sun, et al. (2021), “Antimicrobial resistance, virulence characteristics and genotypes of *Bacillus* spp. from probiotic products of diverse origins”, *Food Research International*, **139**, DOI: 10.1016/j.foodres.2020.109949.

[3] U.S. Food and Drug Administration (2024), *Generally Recognized as Safe (GRAS)*, <https://www.fda.gov/food/food-ingredients-packaging/generally-recognized-safe-gras>, accessed 20 October 2024.

[4] European Food Safety Authority (2023), *Updated List of QPS-Recommended Biological Agents*, https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/qualified-presumption-safety-qps?utm_source=chatgpt.com, accessed 20 October 2024.

[5] D.G. Bach, D.T.T. Linh, L.T.T. Ngan, et al. (2024), “Isolation, selection, and evaluation of characteristics of potential *Bacillus* strains for probiotic products”, *Vietnam Journal of Science and Technology - MOST*, **66(5)**, pp.29-33, DOI: 10.31276/VJST.66(5).29-33 (in Vietnamese).

[6] N. Williams, T.L. Weir (2024), “Spore-based probiotic *Bacillus subtilis*: Current applications in humans and future perspectives”, *Fermentation*, **10(78)**, DOI: 10.3390/fermentation10020078.

[7] H.A. Hong, L.H. Duc, S.M. Cutting (2005), “The use of bacterial spore formers as probiotics”, *FEMS Microbiology Reviews*, **29(4)**, pp.813-835, DOI: 10.1016/j.femsre.2004.12.001.

[8] N.K. Lee, W.S. Kim, H.D. Paik (2019), “*Bacillus* strains as human probiotics: Characterization, safety, microbiome, and probiotic carrier”, *Food Science and Biotechnology*, **28(5)**, pp.1297-1305, DOI: 10.1007/s10068-019-00691-9.

[9] J. Burtscher, D. Etter, M. Biggel, et al. (2021), “Further insights into the toxicity of *Bacillus cytotoxicus* based on toxin gene profiling and Vero cell cytotoxicity assays”, *Toxins (Basel)*, **13(4)**, DOI: 10.3390/toxins13040234.

[10] A.C. García, J. Blázquez, A.R. Rojas (2013), “Molecular mechanisms and clinical impact of acquired and intrinsic fosfomycin resistance”, *Antibiotics (Basel)*, **2(2)**, pp.217-236, DOI: 10.3390/antibiotics2020217.

[11] J. Ruiz (2003), “Mechanisms of resistance to quinolones: Target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection”, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **51(5)**, pp.1109-1117, DOI: 10.1093/jac/dkg222.

[12] J. Strahilevitz, G.A. Jacoby, D.C. Hooper, et al. (2009), “Plasmid-mediated quinolone resistance: A multifaceted threat”, *Clin. Microbiol. Rev.*, **22(4)**, pp.664-689, DOI: 10.1128/CMR.00016-09.

[13] 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.

[14] S. Seyirt, P. Şanlıbaba, B.U. Tezel (2023), “Antibiotic resistance in probiotic microorganisms”, *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, **11(4)**, pp.746-757, DOI: 10.24925/turjaf.v11i4.746-757.5833.

[15] E. Rietkotter, D. Hoyer, T. Mascher (2008), “Bacitracin sensing in *Bacillus subtilis*”, *Molecular Microbiology*, **68(3)**, pp.768-785, DOI: 10.1111/j.1365-2958.2008.06194.x.

[16] S. Arnaouteli, N.C. Bamford (2021), “*Bacillus subtilis* biofilm formation and social interactions”, *Nature Reviews Microbiology*, **19(9)**, pp.600-614, DOI: 10.1038/s41579-021-00540-9.

[17] N.G. Kapse, A.S. Engineer, V. Gowdaman, et al. (2018), “Genome profiling for health promoting and disease preventing traits unraveled probiotic potential of *Bacillus clausii* B106”, *Microbiology and Biotechnology Letters*, **46(4)**, pp.334-345, DOI: 10.4014/mbl.1804.04001.

[18] S. Ceuppens, A. Rajkovic, M. Heyndrickx, et al. (2011), “Regulation of toxin production by *Bacillus cereus* and its food safety implications”, *Critical Reviews in Microbiology*, **37(3)**, pp.188-213, DOI: 10.3109/1040841X.2011.558832.

[19] C. From, R. Pukall, P. Schumann, et al. (2005), “Toxin-producing ability among *Bacillus* spp. outside the *Bacillus cereus* group”, *Applied and Environmental Microbiology*, **71(3)**, pp.1178-1183, DOI: 10.1128/AEM.71.3.1178-1183.2005.

[20] X. Pan, X. Chen, X. Su, et al. (2014), “Involvement of SpoVG in hemolysis caused by *Bacillus subtilis*”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **443(3)**, pp.899-904, DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.12.069.