

Nghiên cứu gốc

ĐÁNH GIÁ TOÀN DIỆN ĐẶC TÍNH AN TOÀN TRONG ĐIỀU KIỆN *IN VITRO* CỦA CHỦNG *Bacillus subtilis* Eramic 25 VÀ TIỀM NĂNG ỨNG DỤNG TRONG SẢN XUẤT THỰC PHẨM BẢO VỆ SỨC KHỎE

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,✉}

¹ Công ty Cổ phần Kỹ nguyên Công nghệ Eramic, Việt Nam

² Trường Đại học Y Hà Nội, Việt Nam

³ Viện Pasteur Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

TÓM TẮT

Mục tiêu: Nghiên cứu này nhằm đánh giá toàn diện tính an toàn trong điều kiện *in vitro* của chủng *Bacillus subtilis* Eramic 25 theo hướng dẫn của GRAS, Cơ quan Quản lý Thực phẩm và Thuốc Hoa Kỳ (FDA) và Cơ quan An toàn Thực phẩm Châu Âu (EFSA), thông qua việc phân tích khả năng kháng khuẩn, độc tính tế bào, cũng như sự hiện diện của các gen kháng kháng sinh và gen độc lực liên quan đến tính an toàn của chủng.

Phương pháp: Các thử nghiệm được thực hiện bao gồm đánh giá khả năng kháng khuẩn đối với vi khuẩn gây bệnh, thử nghiệm độc tính tế bào trên hai dòng tế bào Vero và HT-29, cũng như phân tích bộ gen nhằm xác định sự hiện diện của các gen độc lực và gen kháng kháng sinh.

Kết quả: Chủng *B. subtilis* Eramic 25 không ức chế các chủng vi khuẩn gây bệnh trong thử nghiệm và không gây độc trên hai dòng tế bào Vero và HT-29. Phân tích bộ gen cũng xác nhận rằng chủng này không mang các gen mã hóa độc tố, không chứa gen gây tan máu. Các gen kháng kháng sinh không nằm trên plasmid hoặc gen nhảy, cho thấy nguy cơ lây truyền gen kháng kháng sinh là rất thấp.

Kết luận: Chủng *Bacillus subtilis* Eramic 25 đáp ứng các tiêu chí an toàn *in vitro* theo hướng dẫn của GRAS, FDA và EFSA. Kết quả này cho thấy tiềm năng ứng dụng của chủng trong sản xuất probiotic, thực phẩm chức năng và các sản phẩm thực phẩm dành cho con người, đồng thời là cơ sở để tiến hành các nghiên cứu tiếp theo trên động vật và thử nghiệm lâm sàng trên người.

Từ khóa: *Bacillus subtilis*, độc tố tế bào, gen độc tố, gen kháng kháng sinh.

COMPREHENSIVE *IN VITRO* ASSESSMENT OF THE SAFETY PROFILE OF *Bacillus subtilis* Eramic 25 AND ITS POTENTIAL FOR APPLICATION IN THE DEVELOPMENT OF FUNCTIONAL FOODS AND HEALTH SUPPLEMENTS

ABSTRACT

Aims: This study aimed to comprehensively assess the *in vitro* safety profile of *Bacillus subtilis* Eramic 25 in accordance with the guidelines of GRAS, the United States Food and Drug Administration (FDA), and the European Food Safety Authority (EFSA), through the evaluation of antimicrobial activity, cytotoxicity, and the presence of antibiotic resistance and virulence genes associated with safety.

✉ Tác giả liên hệ: Lê Thị Hội
Email: lethihoi@hmu.edu.vn
Doi: 10.56283/1859-0381/892

Nhận bài: 16/4/2025 Chính sửa: 12/5/2025
Chấp nhận đăng: 12/5/2025
Công bố online: 14/5/2025

Methods: The conducted assays included the evaluation of antibacterial activity against pathogenic bacteria, cytotoxicity testing on two cell lines, Vero and HT-29, as well as genomic analysis to identify the presence of virulence genes and antibiotic resistance genes

Results: The *B. subtilis* Eramic 25 strain does not inhibit selected common pathogens, and exhibits no cytotoxic effects on Vero and HT-29 cell lines. Furthermore, genomic analysis confirmed that this strain does not genes encoding for toxins and hemolytic genes. Antibiotic resistance genes are not located on plasmids or transposable elements, indicating a very low risk of horizontal gene transfer of antibiotic resistance.

Conclusion: *B. subtilis* Eramic 25 meets the *in vitro* safety criteria recommended by GRAS, FDA, and EFSA. These findings support the potential application of this strain in the production of probiotics, functional foods, and food products for human consumption, and provide a basis for animal studies and clinical trials on human.

Keywords: *Bacillus subtilis*, cytotoxin, toxin genes, antibiotic resistance genes.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong suốt nhiều thế kỷ, các loài vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* đã được con người sử dụng phổ biến trong quá trình lên men thực phẩm truyền thống như tương bần, natto, miso và kim chi tại nhiều quốc gia châu Á [1]. Tuy nhiên, một số chủng *Bacillus subtilis* đã được ghi nhận có khả năng sinh độc tố và gây ra các triệu chứng tương tự ngộ độc thực phẩm, đồng thời mang các gen kháng sinh có thể truyền ngang giữa các vi sinh vật [2]. Những chủng như vậy được xem là không phù hợp để sử dụng trong thực phẩm hoặc thực phẩm bảo vệ sức khỏe dùng cho con người. Vì vậy, vấn đề đánh giá tính an toàn của các chủng *Bacillus* đối với sức khỏe con người là đặc biệt quan trọng, đòi hỏi phải được đánh giá nghiêm ngặt theo khuyến cáo của GRAS, FDA và EFSA trước khi được đưa vào ứng dụng trong sản xuất.

Xuất phát từ thực tiễn đó, nghiên cứu được tiến hành nhằm đánh giá toàn diện đặc tính an toàn *in vitro* của chủng *B. subtilis* Eramic 25, tuân theo các hướng dẫn của GRAS, FDA và EFSA [3-6]. Các nội dung đánh giá bao gồm: khả năng kháng khuẩn, độc tính tế bào, và phân tích bộ gen để xác định sự hiện diện của các yếu tố liên quan đến độc lực vi khuẩn. Đặc biệt, nghiên cứu tập trung vào việc làm rõ đặc điểm mang gen kháng kháng sinh và kim loại nặng, sự hiện diện của các gen mã hóa độc tố, yếu tố độc lực hoặc các gen liên quan đến phage. Trên cơ sở đó, nghiên cứu hướng đến đánh giá tiềm năng ứng dụng của chủng *B. subtilis* Eramic 25 trong sản xuất chế phẩm probiotic an toàn cho người.

II. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu: chủng vi khuẩn *B. subtilis* Eramic 25 được phân lập từ mẫu phân của người khỏe mạnh. Chủng này đã được báo cáo là không gây tan máu (non-hemolytic), có khả năng sống sót trong điều kiện mô phỏng đường tiêu hóa như pH acid và muối mật, và nhạy cảm với các kháng sinh phổ biến được sử dụng trên người. Những đặc điểm này cho thấy chủng có tiềm năng probiotic và phù hợp để tiến hành đánh giá các đặc tính an toàn sâu hơn theo các hướng dẫn của EFSA và FDA [7].

Chủng vi khuẩn: Sử dụng 5 chủng vi khuẩn theo hướng dẫn của GRAS [8]: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Enterococcus faecium* ATCC 19434, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 và *Shigella flexneri* ATCC 12022.

Tế bào: Tế bào Vero, tế bào HT-29 do GS. J.M. Pezzuto (Trường Đại học Long Island, Hoa Kỳ) và GS. Jeanette Maier (Trường Đại học Milan, Italia) cung cấp.

Môi trường nuôi cấy: LB (Peptone 10 g/L, Yeast Extract 5 g/L và NaCl 10

g/L); BHI (Titan); Sheep Blood Agar (Oxoid); DMEM/MEME (Sigma) bổ sung L-glutamine, sodium pyruvate, NaHCO₃, penicillin/streptomycin và 10% huyết thanh bò thai (FBS), 0.05% Trypsine-EDTA.

Hoá chất: PBS (Sigma), DMSO (Sigma), Ellipticine (Sigma), In vitro toxicology assay kit (Sigma), DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen), Nextera XT DNA Library Preparation Kit (Illumina), MiSeq Reagent Kit v3 (Illumina).

Thiết bị và dụng cụ: Kính hiển vi đảo ngược Axiovert 40 CFL, buồng đếm tế bào Fisher, máy quang phổ BioTek, máy đọc đĩa ELISA Biotek Elx800, máy ly tâm Varispin 15, máy lắc ổn nhiệt Puricell Shaking 80, máy đo huỳnh quang TBS-380, hệ thống giải trình tự Illumina MiSeq, máy đo pH, cân phân tích, tủ ấm CO₂, tủ lạnh sâu -80°C, bình nitơ lỏng cùng các đĩa nuôi cấy 24 và 96 giếng (Corning). Các dụng cụ cơ bản trong phòng thí nghiệm sinh học phân tử và nuôi cấy vi sinh vật cũng được sử dụng trong suốt quá trình thực hiện nghiên cứu.

2.2. Giải trình tự và phân tích hệ gen

Chủng *B. subtilis* Eramic 25 được nuôi cấy trong môi trường LB ở 37°C trong 10 giờ, với tốc độ lắc 220 vòng/phút. Sau khi ly tâm 8.000 vòng/phút trong 15 phút, các tế bào được thu thập. DNA tổng số được tách chiết bằng bộ kit DNeasy Blood and Tissue Kits. DNA sau khi tách chiết được định lượng bằng máy đo huỳnh quang TBS-380. Thư viện DNA

được xây dựng sử dụng bộ kit Nextera XT DNA Library Preparation Kit. DNA tổng số được cắt nhỏ thành các đoạn có kích thước 400 - 500 bp, sau đó được giải trình tự toàn bộ bộ gen của vi khuẩn sử dụng bộ kit Miseq reagent kit v3 150, chạy mode Paired-end trên thiết bị Illumina Miseq Dx có read length dài 75 bp mỗi đầu.

2.3. Thử nghiệm kháng khuẩn và độc tính tế bào

Mỗi thí nghiệm được thực hiện tối thiểu 3 lần lặp lại ($n = 3$) để đảm bảo độ tin cậy.

Thử nghiệm kháng khuẩn: Khả năng kháng khuẩn của chủng *B. subtilis* Eramic 25 được đánh giá theo phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch [9]. Sau khi nuôi cấy các chủng vi khuẩn gây bệnh trên đĩa thạch máu cừu 5% ở 37°C trong 24 giờ, các khuẩn lạc được hòa vào dung dịch PBS để tạo huyền phù với mật độ khoảng 10^8 CFU/mL. Huyền phù vi khuẩn được dàn đều lên đĩa thạch BHI, sau đó đục 2 lỗ có đường kính 7 mm. Dịch nuôi cấy vi khuẩn *B. subtilis* Eramic 25 trên môi trường BHI ở 37°C trong 24 giờ được ly tâm ở 8.000 vòng/phút trong 30 phút, thu lấy dịch nổi và nhỏ 100 μ L vào lỗ trên đĩa thạch đã được chuẩn bị. Mẫu đối chứng chỉ nhỏ 100 μ L môi trường BHI vô trùng. Để yên các đĩa trong 2 giờ để dịch khuếch tán vào lớp thạch, rồi ủ ở 37°C trong 24 giờ.

Thử nghiệm độc tính tế bào: Phép thử độc tính tế bào được thực hiện trên tế bào nuôi cấy đơn lớp theo hướng dẫn của

EFSA (2014) [6]: Trypsin hóa tế bào thí nghiệm để làm rời tế bào và đếm trong buồng đếm để điều chỉnh mật độ khoảng 10^3 tế bào/mL. Tiến hành đưa 1000 μ L tế bào/giếng vào đĩa 24 giếng để tế bào bám đáy và phát triển ổn định trước 48h. Khi tiến hành thí nghiệm thì loại môi trường cũ, bổ sung 1 mL môi trường mới vào các giếng. Các mẫu thử là dạng dịch nổi sau ly tâm được đưa vào các giếng (100, 80, 60, 40 μ L/giếng) và bổ sung đủ lượng môi trường đạt 1,1 mL, mẫu đối chứng bổ sung 100 μ L Elliptine pha trong DMSO với các nồng độ 0,08, 0,4, 2, 10 μ g/L. Sau đó ủ 2h trong tủ ẩm CO₂ 5% ở 37°C. Cho MTT theo hướng dẫn của kit (ống M-5655 được pha trong 3 mL dung dịch muối đệm Balanced salt solution, sau đó lấy một lượng dung dịch đã hòa tan cho vào giếng nuôi cấy tương đương 10% trên mỗi giếng), ủ trong 2-4 tiếng. Sau khi ủ, cho vào mỗi giếng 1,1 mL MTT solubilization solution (tương đương với thể tích môi trường trong giếng). Lắc đều. Đọc kết quả OD ở bước sóng 540 nm trên máy ELISA Plate Reader.

2.4. Phân tích số liệu

Thử nghiệm độc tính tế bào: Tỷ lệ phần trăm tế bào sống sót theo công thức:

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

Trong đó: OD_{blank} là OD của giếng chỉ có môi trường nuôi cấy (không có tế bào, không có mẫu), $OD_{\text{đc}}$ là OD của giếng có chứa tế bào nhưng không có mẫu thử. Kết quả % tế bào sống là giá trị trung bình từ 3 lần thí nghiệm để đảm bảo độ chính xác.

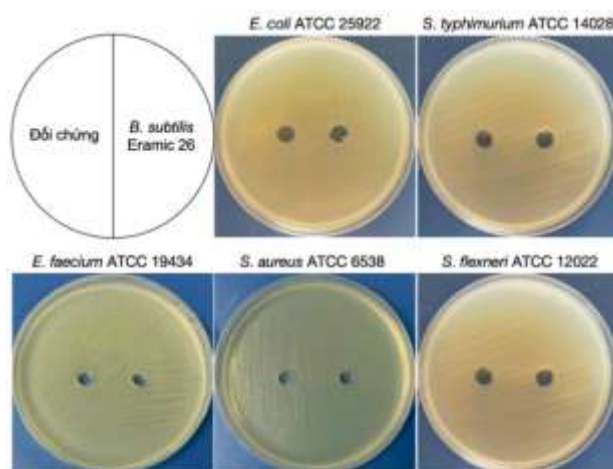
Giải trình tự và phân tích hệ gen: Các đoạn đọc sau khi thu được từ quá trình giải trình tự toàn bộ bộ gen của chủng *B. subtilis* Eramic 25 được kiểm tra chất

lượng bằng FastQC (v0.12.1) thông số mặc định. Các đoạn đọc chất lượng thấp được loại bỏ bằng fastp (v0.24.1). Sau đó, các đoạn đọc đã qua xử lý được lắp ráp *de novo* bằng SPAdes (v3.15.5), và chất lượng lắp ráp được đánh giá bằng phần mềm QUAST (v5.0.2). Hệ gen của *B. subtilis* Eramic 25 được chú giải bằng hệ thống dữ liệu RAST bản web (<https://rast.nmpdr.org/>). Các gen chức năng, bao gồm các gen liên quan đến độc tố và các yếu tố độc lực, được xác định thông qua việc so sánh với các nguồn dữ liệu đã công bố. Ngoài ra, các gen kháng

kháng sinh cũng được phát hiện và kiểm tra lại bằng công cụ ABRicate (<https://github.com/tseemann/abricate>).

III. KẾT QUẢ

3.1. Thử nghiệm khả năng kháng khuẩn



Hình 1. Kết quả thử nghiệm đặc tính kháng khuẩn của *Bacillus subtilis* Eramic 25

B. subtilis Eramic 25 không có hoạt tính kháng khuẩn đối với 5 chủng vi khuẩn được thử nghiệm, gợi ý cơ chế hoạt động gián tiếp của chủng trong việc hạn chế sự phát triển của các vi khuẩn gây bệnh.

3.2. Thử nghiệm độc tính tế bào

Bảng 1. Kết quả thử nghiệm độc tính của *Bacillus subtilis* Eramic 25 trên 2 dòng tế bào VERO và HT-29

Ellipticine		<i>B. subtilis</i> Eramic 25							
Nồng độ (µg/mL)	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	90,56	4,84	92,50	1,68
2	22,93	1,49	27,22	1,17	80	96,04	0,77	98,25	1,61
0,4	48,55	1,07	51,18	1,29	60	101,22	1,78	99,65	1,04
0,08	76,01	1,64	78,92	2,14	40	103,91	1,24	100,75	2,54

Trong nghiên cứu này, độc tính tế bào của chủng *B. subtilis* Eramic 25 được đánh giá trên hai dòng tế bào đại diện là

Vero và HT-29 thông qua phép thử MTT. Độc tính tế bào được xác định dựa trên mức độ giảm tỷ lệ sống sót của tế bào khi

tiếp xúc với dịch nổi (supernatant) thu được khi nuôi cấy *B. subtilis* Eramic 25. Ngưỡng không độc tính được áp dụng cho các mẫu có tỷ lệ tế bào sống lớn hơn 80%; ngưỡng độc tính đối với các mẫu có tỷ lệ tế bào sống nhỏ hơn 80% [6].

3.3 Phân tích hệ gen

Trình tự toàn bộ hệ gen của chủng *B. subtilis* Eramic 25 đã được giải mã và công bố trên cơ sở dữ liệu GenBank với mã số truy cập GCF_031932165.1. Phân

B. subtilis Eramic 25 không gây độc trên hai dòng tế bào Vero và HT-29. Điều này củng cố thêm bằng chứng về tính an toàn của chủng này.

tích hệ gen không phát hiện gen độc lực hoặc yếu tố di truyền di động chứa gen kháng kháng sinh, phù hợp với tiêu chí an toàn của GRAS và EFSA [3-5].

Bảng 2. Kết quả chú giải hệ gen của chủng *Bacillus subtilis* Eramic 25

Genes/ proteins	Chức năng	<i>B. subtilis</i> Eramic 25 GCF_031932165.1	<i>B. clausii</i> 088AE GCF_001558755.1	<i>B. subtilis</i> 168 GCF_000009045.1
Liên quan đến kháng kháng sinh và các hợp chất độc hại				
<i>vanW</i>	Kháng vancomycin			
<i>cat</i>	Kháng chloramphenicol			
<i>fosB</i>	Kháng fosfomycin			
<i>tet-like</i>	Kháng tetracycline			
EF-G	Kháng tetracycline			
<i>blaI</i>	Kháng beta-lactam			
PhnP	Enzym phosphodiesterase thuộc siêu họ metallo- β -lactamase			
<i>satA</i>	Kháng streptothricin			
<i>gyrA</i> (đột biến)	Kháng fluoroquinolone			
<i>gyrB</i> (đột biến)	Kháng fluoroquinolone			
<i>ydhE/norM</i>	Bơm đẩy đa kháng sinh			
<i>acrB</i>	Kháng acriflavine			
<i>chrA</i>	Kháng chromium			
<i>cadA</i>	Kháng cadmium			
<i>cadC</i>	Kháng cadmium			
Liên quan đến yếu tố độc lực				
Khả năng đáp ứng stress do bacteriocins/bacitracin				
<i>bceA</i>	Hệ thống protein gắn ATP đào thải bacitracin			
<i>bceB</i>				
<i>bceS</i>	Hệ thống nhận diện và điều hòa bảo vệ chống bacitracin			
<i>bceR</i>				
LiaI				

Genes/ proteins	Chức năng	<i>B. subtilis</i> Eramic 25 GCF_031932165.1	<i>B. clausii</i> 088AE GCF_001558755.1	<i>B. subtilis</i> 168 GCF_000009045.1
LiaH	Đáp ứng stress			
LiaG	bacteriocins/bacitracin			
Bacilysin	Bacteriocins			
Subtilisin				
Khả năng ly giải muối mật				
<i>bsh</i>	Enzym chuyển hóa và điều hòa muối mật			
Khả năng chuyển hoá chất béo				
MAGL	Monoglyceride lipase			
LPL	Lysophospholipase			
Bacteriophage				
<i>xkdG</i>	Protein thành phần giống phage PBSX			
<i>trxA</i>	Thioredoxin			
Liên quan đến khả năng sinh độc tố				
<i>bceT</i>	Độc tố ruột gây tiêu chảy			
<i>hbl</i>	Độc tố ruột gây tan máu			
<i>nhe</i>	Độc tố ruột không gây tan máu			
<i>cytK</i>	Cytotoxin K			
<i>entFM</i>	Độc tố ruột FM			
<i>cesB</i>	Độc tố gây ngộ độc thực phẩm			
Liên quan đến phân giải hồng cầu				
α -hemolysin				
β -hemolysin				
γ -hemolytic				
		Có	Không	

IV. BÀN LUẬN

4.1. Thử nghiệm khả năng kháng khuẩn

Việc không quan sát được hoạt tính kháng khuẩn trực tiếp không phủ định tiềm năng probiotic của *B. subtilis* Eramic 25. Các nghiên cứu trước đây đã chỉ ra rằng *B. subtilis* là một probiotic có giá trị, nhờ khả năng hình thành bào tử giúp chúng vượt qua các điều kiện khắc

ngiệt của đường tiêu hóa như pH thấp ở dạ dày, muối mật và enzyme tiêu hóa, từ đó đảm bảo khả năng sống sót và phát huy hiệu quả tại ruột non [10]. Mặc dù không trực tiếp tiêu diệt vi khuẩn gây bệnh qua các hợp chất kháng khuẩn, *B. subtilis* vẫn có thể ức chế sự phát triển của vi sinh vật

có hại thông qua các cơ chế gián tiếp, bao gồm cạnh tranh dinh dưỡng và vị trí bám trên bề mặt biểu mô ruột [11]. Sự hiện diện của *B. subtilis* còn được ghi nhận là có khả năng tăng cường chức năng hàng rào niêm mạc ruột nhờ kích thích sản xuất chất nhầy và củng cố tính toàn vẹn của biểu mô ruột [12]. Ngoài ra, *B. subtilis* còn có khả năng kích hoạt hệ miễn dịch tại chỗ, đặc biệt là thông qua việc tăng sản xuất kháng thể IgA và kích

hoạt các tế bào miễn dịch bẩm sinh như đại thực bào và tế bào lympho [13]. Từ đó, loài này góp phần giảm nguy cơ viêm nhiễm và cải thiện sức khỏe đường ruột tổng thể. Một lợi ích khác của *B. subtilis* là tăng cường sự phát triển của vi khuẩn có lợi khác như *Lactobacillus* và *Bifidobacterium*, từ đó giúp cân bằng hệ vi sinh vật đường ruột và làm giảm các triệu chứng rối loạn tiêu hóa như tiêu chảy, đầy hơi và táo bón.

4.2. Thử nghiệm độc tính tế bào

Bacillus subtilis là một loài vi khuẩn có tính đa hình cao, bao gồm nhiều chủng khác nhau với đặc điểm sinh học và sinh lý riêng biệt. Mặc dù được công nhận là vi khuẩn có lợi với nhiều ứng dụng trong thực phẩm, một số chủng có thể tiềm ẩn nguy cơ gây hại trong những điều kiện nhất định. Theo tiêu chuẩn an toàn của GRAS và EFSA, các chủng *Bacillus* được sử dụng trong sản phẩm probiotic dành cho người tiêu dùng cần được đánh giá độc tính toàn diện thông qua thử nghiệm độc tính tế bào.

Kết quả được trình bày trong Bảng 1 cho thấy *B. subtilis* Eramic 25 không gây ảnh hưởng tiêu cực đến khả năng sống sót

của cả hai dòng tế bào ở tất cả các nồng độ thử nghiệm. Ngược lại, ellipticine (chất đối chứng dương) thể hiện độc tính rõ rệt với tỷ lệ sống của tế bào giảm mạnh theo nồng độ, minh chứng cho độ tin cậy của mô hình thử nghiệm. Nghiên cứu của Kotowicz và cộng sự (2019), Johanna Burtscher và cộng sự (2021) cũng cho thấy các chủng *Bacillus subtilis* trong nghiên cứu của họ cũng không gây độc đối với 2 dòng tế bào trong *in vitro* [14, 15]. Đây là một trong những đặc tính an toàn quan trọng của chủng vi sinh vật được sử dụng cho con người cùng với đặc tính không gây tan máu [7] theo tiêu chuẩn của GRAS và EFSA.

4.3. Phân tích hệ gen

Kháng kháng sinh và các hợp chất độc hại

Kết quả phân tích hệ gen sử dụng hệ thống dữ liệu RAST cho thấy *B. subtilis* Eramic 25 mang nhiều gen liên quan đến khả năng kháng kháng sinh và thích nghi với điều kiện môi trường. Trong đó, có hai gen *fosB* và *satA* nằm trên nhiễm sắc thể, lần lượt liên quan đến kháng fosfomycin và streptothricin. Một số chủng *B. subtilis* cũng có chứa các gen này và được xác định là gen kháng nội tại thường gặp ở chi *Bacillus* [16]. Các gen kháng kháng sinh không liên kết hoặc

không nằm trên plasmid hoặc gen nhảy thì nguy cơ lây truyền sang các sinh vật khác có thể được coi là tối thiểu. EFSA 2012 nêu rõ: “Bất kỳ chủng vi khuẩn nào mang gen kháng kháng sinh nằm trên nhiễm sắc thể hoặc do đột biến nhiễm sắc thể gây ra đều có khả năng lây truyền ngang rất thấp và có thể được sử dụng làm thực phẩm cho con người” [5].

Bên cạnh đó, sự hiện diện của protein PhnP, là một enzyme phosphodiesterase thuộc siêu họ metallo- β -lactamase, giúp

vi khuẩn sống sót trong môi trường thiếu phospho, nhờ đó tăng khả năng thích nghi. Một số gen bơm đẩy như *ydhE*, *norM*, và *acrB* cũng được phát hiện, có vai trò trong cơ chế kháng đa thuốc thông qua việc loại bỏ kháng sinh khỏi tế bào [17]. Ngoài ra, các đột biến được ghi nhận tại vùng mã hóa gen *gyrA* và *gyrB* là các mục tiêu tác động chính của fluoroquinolone cũng góp phần vào khả năng đề kháng nhóm kháng sinh này [18]. Các gen này đều nằm trên nhiễm sắc thể, nguy cơ lây truyền ngang là thấp [5].

Đặc biệt, *B. subtilis* Eramic 25 mang các gen kháng kim loại nặng bao

Bacteriocins/Bacitracin

Phân tích hệ gen của *B. subtilis* Eramic 25 cho thấy chủng này sở hữu đầy đủ các thành phần thuộc hai hệ thống phản ứng stress màng liên quan đến kháng sinh peptide, bao gồm *BceABRS* và *LiaIHG*. Cụm gen *bceA*, *bceB*, *bceS* và *bceR* mã hóa cho các protein thuộc hệ thống vận chuyển ABC và hệ thống điều hòa hai thành phần, có vai trò trong việc phát hiện và loại bỏ bacitracin ra khỏi tế bào [20]. Bên cạnh đó, cụm gen *liaI*, *liaH* và *liaG* tham gia vào cơ chế bảo vệ màng dưới tác động của các tác nhân làm tổn thương màng như bacteriocin [21]. Tuy nhiên, hệ gen của *B. subtilis* Eramic 25 không phát hiện các gen mã hóa cho bacteriocin phổ

gồm *chrA* (kháng chromium), *cadA* và *cadC* (kháng cadmium). Những gen này thường đóng vai trò trong khả năng bảo vệ tế bào trước áp lực chọn lọc ion kim loại [19].

Quan trọng hơn, nhóm nghiên cứu không tìm thấy sự xuất hiện của các gen kháng kháng sinh nằm trên plasmid, transposon hoặc các yếu tố di truyền di động như insertion sequences (IS) trong hệ gen của *B. subtilis* Eramic 25. Một đặc tính an toàn quan trọng được xem xét bởi GRAS và EFSA.

biến như bacilysin và subtilisin, cho thấy chủng này không có khả năng tổng hợp các peptide kháng khuẩn. Điều này phù hợp với dữ liệu thực nghiệm cho thấy *B. subtilis* Eramic 25 không có hoạt tính ức chế rõ rệt đối với các vi khuẩn gây bệnh, và từ góc độ an toàn sinh học, đây là một điểm thuận lợi vì làm giảm nguy cơ gây rối loạn hệ vi sinh đường ruột khi ứng dụng probiotic. Như vậy, có sự hiện diện của các hệ thống đáp ứng stress đặc hiệu nhưng không có các yếu tố gây hại đối với vi sinh vật khác cho thấy *B. subtilis* Eramic 25 là một chủng có khả năng thích nghi cao với môi trường mà vẫn duy trì được mức độ an toàn cao trong các ứng dụng probiotic.

Kháng muối mật

Chủng *B. subtilis* Eramic 25 thể hiện khả năng kháng muối mật nhờ sự hiện diện của gen *bsh*, mã hóa enzyme bile salt hydrolase (BSH). Đây là một enzyme đặc trưng, chủ yếu được tổng hợp bởi vi khuẩn thuộc hệ vi sinh đường ruột, với

chức năng xúc tác quá trình thủy phân liên kết amide trong muối mật liên hợp, điều hòa chuyển hóa muối mật, từ đó tăng cường khả năng sống sót của vi khuẩn trong môi trường đường tiêu hóa [22].

Chuyển hoá lipid

Sự có mặt của hai protein MAGL (monoacylglycerol lipase) và LPL (lysophospholipase) trong hệ gen của *B. subtilis* Eramic 25, cho thấy chủng này có khả năng tham gia vào chuyển hóa

lipid. Điều này không chỉ giúp cung cấp năng lượng cho tế bào vi khuẩn mà còn có thể hỗ trợ tiêu hóa chất béo ở vật chủ, từ đó làm tăng tiềm năng hỗ trợ tiêu hóa khi ứng dụng probiotic [23].

Bacteriophage

Chủng *B. subtilis* Eramic 25 mang một số gen liên quan đến phage, bao gồm *xkdG*, mã hóa protein cấu trúc giống phage giúp giải phóng DNA ra môi trường bên ngoài [24], và *trxA*, mã hóa thioredoxin - một protein oxy hóa khử thường được phage sử dụng để hỗ trợ sao chép và lắp ráp [25]. Phân tích so sánh cho thấy hai chủng đối chiếu *Bacillus clausii* 088AE và chủng *Bacillus subtilis* 168 cũng mang các gen phage tương đồng với Eramic 25, cho thấy các gen này có thể là thành phần tàn tích của prophage phổ biến ở các chủng *Bacillus* [26].

Sự có mặt của một số gene liên quan đến phage có thể ảnh hưởng đến tính an

toàn của các chủng probiotic, đặc biệt tiềm ẩn nguy cơ lan truyền các gen kháng kháng sinh hoặc gen độc lực nếu chúng nằm gần các yếu tố gen di động như plasmid, transposon. Trong nghiên cứu của chúng tôi, hiện tại không phát hiện thấy các gen này nằm trên các yếu tố gen di động, như vậy có thể làm giảm nguy cơ truyền gen qua phage. Ngoài ra, các gen phage còn có thể mang lại lợi ích như tăng khả năng thích nghi với stress hoặc tăng tính cạnh tranh trong quần thể vi sinh vật [27]. Như vậy, chủng *B. subtilis* Eramic 25 vẫn đảm bảo tính an toàn theo hướng dẫn của GRAS sau khi đã đánh giá toàn diện hệ gen.

Gen độc lực

Phân tích hệ gen của *B. subtilis* Eramic 25 cho thấy chủng này hoàn toàn không mang các gen mã hóa các độc tố đường ruột hoặc yếu tố độc lực thường gặp ở *B. cereus*, như *bceT*, *hbl*, *nhe*, *cytK*, *entFM* và *cesB*. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của From và cộng sự cho thấy các chủng *Bacillus* không thuộc nhóm *B. cereus* thường không mang các gen độc tố, qua đó củng

cố tiêu chí an toàn [28]. Ngoài ra, các chủng *B. subtilis* đã được cơ quan FDA của Hoa Kỳ công nhận GRAS đều không chứa bất kỳ gen mã hóa độc tố nào, và đây cũng là một trong những yêu cầu quan trọng trong việc đánh giá tính an toàn đối với vi sinh vật được sử dụng trong thực phẩm hoặc sản phẩm hỗ trợ sức khỏe con người.

Hemolysin và khả năng tan máu

Phân tích hệ gen của *B. subtilis* Eramic 25 cho thấy không có sự hiện diện của các gen mã hóa α -hemolysin và β -hemolysin, hai loại hemolysin có khả năng gây tan hồng cầu mạnh, thường được xem là dấu hiệu sinh học liên quan đến độc lực và nguy cơ gây độc tính trên người hoặc động vật. EFSA

vẫn yêu cầu đánh giá khả năng gây tan máu ngay cả khi chủng đó được công nhận GRAS. *B. subtilis* Eramic 25 cũng đã được đánh giá khả năng gây tan máu và xác định rằng chủng này không gây tan máu [7]. Qua đó, củng cố thêm độ an toàn của *B. subtilis* Eramic 25 trong các ứng dụng probiotic.

V. KẾT LUẬN

Kết quả cho thấy *Bacillus subtilis* Eramic 25 không gây ức chế các chủng vi khuẩn gây bệnh được lựa chọn để thử nghiệm và không gây độc tính đối với hai dòng tế bào Vero và HT-29. Ngoài ra, việc phát hiện các gen như *bsh* và protein MAGL, LPL trong hệ gen mới chỉ mang tính tiềm năng, và không thể khẳng định rằng các gen hay protein này được biểu hiện hiệu quả và có hoạt tính sinh học trong điều kiện *in vivo*.

Phân tích hệ gen và các thử nghiệm *in vitro* cho thấy *B. subtilis* Eramic 25

đáp ứng các yêu cầu an toàn theo hướng dẫn của GRAS và EFSA. Đây là bước đánh giá đầu tiên và bắt buộc trong quá trình đánh giá đặc tính an toàn của một chủng vi sinh vật trước khi được đưa vào sử dụng cho con người. Giới hạn của nghiên cứu là mới chỉ đánh giá các đặc tính an toàn trong *in vitro*. Các nghiên cứu tiếp theo trên mô hình động vật và thử nghiệm lâm sàng trên người là điều kiện cần thiết để khẳng định toàn diện tính an toàn và hiệu quả thực tiễn của chủng.

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 ghi nhận và cảm ơn sự hỗ trợ quý báu từ đơn vị tài trợ.

Tài liệu tham khảo

1. Tamang JP, Watanabe K, Holzapfel WH. Diversity of microorganisms in global fermented foods and beverages. *Front Microbiol.* 2016;7:377.
2. European Food Safety Authority (EFSA); Ricci A, Allende A, Bolton D, et al. Scientific opinion on the update of the list of qualified presumption of safety (QPS) recommended microbiological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA. *EFSA Journal.* 2023;21(1):7784.
3. U.S. Food and Drug Administration. Substances generally recognized as safe. 21 CFR §170 Subpart E. Revised 2023. Accessed April 28, 2025.
4. GRAS Associates. GRAS Notice No. 1143: *Bacillus subtilis* NRRL 68053. *U.S. Food and Drug Administration.* Published 2023. Accessed April 28, 2025.
5. European Food Safety Authority (EFSA). Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. *EFSA Journal.* 2012;10(6):2740.
6. European Food Safety Authority (EFSA). Guidance on the assessment of the toxigenic potential of *Bacillus* species used in animal nutrition. *EFSA Journal.* 2014;12(5):3665.
7. Đào Gia Bách, Đoàn Thị Thuý Linh, Lưu Thị Thuý Ngân, Lê Thị Hội. Phân lập, tuyển chọn và đánh giá đặc tính các chủng *Bacillus* tiềm năng ứng dụng cho chế phẩm probiotic. *Vietnam Journal of Science and Technology, Section B.* 2024;66(5):29-33.
8. GRAS Associates. GRN No. 956 *Bacillus subtilis* ATCC SD-7280. *US Food and Drug Administration website.* Published 2021. Accessed December 23, 2024.
9. Ramachandran R, Chalasani AG, Lal R, et al. A broad-spectrum antimicrobial activity of *Bacillus subtilis* RLID 12.1. *Scientific World Journal.* 2014;2014:968487.
10. Williams N, Weir TL. Spore-based probiotic *Bacillus subtilis*: Current applications in humans and future perspectives. *Fermentation.* 2024;10(2):78.
11. Hong HA, Duc LH, Cutting SM. The use of bacterial spore formers as probiotics. *FEMS Microbiology Reviews.* 2005;29(4):813–835.
12. Urdaci MC, Bressollier P, Pinchuk I. *Bacillus clausii* probiotic strains: antimicrobial and

- immunomodulatory activities. *J Clin Gastroenterol*. 2004;38(6 Suppl):S86-S90.
13. Lee NK, Kim WS, Paik HD. *Bacillus* strains as human probiotics: characterization, safety, microbiome, and probiotic carrier. *Food Sci Biotechnol*. 2019;28(5):1297-1305.
14. Kotowicz N, Bhardwaj RK, Ferreira WT, et al. Safety and probiotic evaluation of two *Bacillus* strains producing antioxidant compounds. *Benef Microbes*. 2019;10(7):759-771.
15. Burtscher J, Etter D, Biggel M, et al. Further Insights into the Toxicity of *Bacillus cytotoxicus* Based on Toxin Gene Profiling and Vero Cell Cytotoxicity Assays. *Toxins (Basel)*. 2021;13(4):234.
16. Castañeda-García A, Blázquez J, Rodríguez-Rojas A. Molecular Mechanisms and Clinical Impact of Acquired and Intrinsic Fosfomycin Resistance. *Antibiotics (Basel)*. 2013;2(2):217-236.
17. Piddock LJ. Multidrug-resistance efflux pumps - not just for resistance. *Nat Rev Microbiol*. 2006;4(8):629-636.
18. Hooper DC, Jacoby GA. Mechanisms of drug resistance: quinolone resistance. *Ann N Y Acad Sci*. 2015;1354(1):12-31.
19. Nies DH. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev*. 2003;27(2-3):313-339.
20. Rietkötter E, Hoyer D, Mascher T. Bacitracin sensing in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*. 2008;68(3):768-785.
21. Wolf D, Kalamorz F, Wecke T, et al. In-depth profiling of the LiaR response of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*. 2010;192(18):4680-4693.
22. Kapse NG, Engineer AS, Diwan AD, et al. Genome profiling for health promoting and disease preventing traits unraveled probiotic potential of *Bacillus clausii* B106. *Microbiology and Biotechnology Letters*. 2018;46(4):334-345.
23. Granato D, Perotti F, Masserey I, et al. Cell surface-associated lipoteichoic acid acts as an adhesion factor for attachment of *Lactobacillus johnsonii* La1 to human enterocyte-like Caco-2 cells. *Appl Environ Microbiol*. 1999;65(3):1071-1077.
24. Kunst F, Ogasawara N, Moszer I, et al. The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*. 1997;390(6657):249-256.
25. Ault-Riché D, Fraley CD, Tzeng CM, Kornberg A. Novel assay reveals multiple pathways regulating stress-induced accumulations of inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 1998;180(7):1841-1847.
26. Bobay LM, Touchon M, Rocha EP. Pervasive domestication of defective prophages by bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(33):12127-12132.
27. Wang X, Kim Y, Ma Q, et al. Cryptic prophages help bacteria cope with adverse environments. *Nat Commun*. 2010;1:147.
28. From C, Pukall R, Schumann P, et al. Toxin-producing ability among *Bacillus* spp. outside the *Bacillus cereus* group. *Appl Environ Microbiol*. 2005;71(3):1178-1183.