

NGHIÊN CỨU ĐẶC TÍNH PROBIOTIC CỦA BACILLUS SUBTILIS BS02

VŨ THANH THẢO, NGUYỄN MINH THÁI,
NGUYỄN THỊ LINH GIANG, TRẦN HỮU TÂM, TRẦN CÁT ĐÔNG
Phòng TN Vi Sinh Công Nghệ Dược, Khoa Dược, ĐHY Dược TP.HCM

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, mục tiêu của chúng tôi là khảo sát các đặc tính probiotic của chủng *Bacillus subtilis* BS02 phân lập từ phân người. Các đặc tính probiotic được khảo sát theo hướng dẫn của WHO/FAO bao gồm: khả năng sinh enzym ngoại bào, khả năng đối kháng với các vi khuẩn gây bệnh ở đường ruột, khả năng chịu acid, muối mật, và các yếu tố an toàn. Sau đó, khả năng để điều trị tiêu chảy trong một mô hình chuột BS02 bào tử đã được nghiên cứu. Kết quả cho thấy BS02 có thể sinh các enzym ngoại bào, tồn tại trong điều kiện khắc nghiệt của đường tiêu hóa. Các thử nghiệm kháng kháng sinh cho thấy BS02 nhạy cảm với 13 kháng sinh được thử nghiệm, ngoại trừ ceftazidime. Cuối cùng, kết quả thử nghiệm cho thấy bào tử BS02 có khả năng điều trị bệnh tiêu chảy trên mô hình chuột khi so sánh với nhóm đối chứng không sử dụng probiotic.

Từ khóa: *Bacillus subtilis* BS02, đặc tính probiotic.

SUMMARY

Our objective is studied the probiotic characteristics of *Bacillus subtilis* BS02 isolated from human faeces. Probiotic characteristics were tested according to the guidelines of WHO/FAO, which include: producing extracellular enzymes, competitive ability against pathogenic bacteria in gastrointestinal tract, tolerance with acidity in the stomach and bile salt, and safety aspects. After that, the ability to treat diarrhea in a mouse model of BS02 spores was investigated. The results showed that BS02 can produce extracellular enzymes, survive in the strict conditions of gastrointestinal tract. The antibiotic resistance test results showed that BS02 sensitive to 13 tested antibiotics, except ceftazidime. Ultimately, BS02 spores had capable of treating diarrhea in mouse model when compared with control group not used probiotic.

Keywords: *Bacillus*, probiotic.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Probiotic là các chế phẩm bổ sung có chứa vi sinh vật sống nhằm tăng cường sức khỏe cho người sử dụng bằng cách duy trì sự cân bằng và cải thiện hệ vi khuẩn đường ruột [11]. Các vi khuẩn thường được sử dụng làm probiotic là các vi khuẩn lactic như *Lactobacillus* spp. và *Bifidobacterium* spp. Các vi khuẩn này đã được chứng minh tính an toàn qua quá trình sử dụng lâu dài [6, 10]. Tuy nhiên, do đây là chủng vi khuẩn yếm khí và đòi hỏi điều kiện dinh dưỡng đặc biệt nên việc nuôi cấy gặp nhiều khó khăn và giá thành cao. Bên cạnh đó các vi khuẩn này không chịu được các điều kiện khắc nghiệt của quá trình sản xuất như đông khô, sấy, tạo hạt,... và có

tuổi thọ khi bảo quản ngắn. Trước đây *Bacillus* được xem là vi khuẩn sống trong đất do đó chúng ít được xem xét như là probiotic theo nghĩa phải thuộc nhóm vi khuẩn đường ruột, tuy nhiên, gần đây Tâm và cộng sự [14] đã chứng minh *Bacillus* có thể được xem là một thành phần của hệ vi sinh vật đường ruột. Trong nghiên cứu trước đây, chúng tôi đã tiến hành phân lập các chủng *Bacillus* từ phân người khỏe mạnh, trong đó chủng *Bacillus subtilis* BS02 được đánh giá là chủng có khả năng tạo bào tử cao và sinh trưởng tốt. Để có thể ứng dụng chủng vi khuẩn này như nguồn cung cấp probiotic, chúng tôi tiếp tục nghiên cứu các đặc tính probiotic của chủng BS02.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng

Vi khuẩn thử nghiệm: Chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* BS02 được phân lập từ phân người tình nguyện khỏe mạnh tại TP. Hồ Chí Minh do Phòng Thí nghiệm Vi sinh Công nghệ Dược cung cấp.

Động vật thử nghiệm: Chuột nhắt trắng giống *Swiss albino*, giới tính đực, thể trọng chuột từ 18-25 gam được Viện Pasteur Nha Trang cung cấp. Chuột được nuôi ổn định trong vòng 1 tuần trước khi tiến hành thử nghiệm.

Các chủng vi khuẩn gây bệnh: Gồm các chủng chuẩn của ATCC và các chủng được phân lập và giữ tại Bộ môn Vi sinh - Ký sinh: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Proteus vulgaris* ATCC 49132, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Streptococcus faecalis* ATCC 29213, *Sarcina marcescens* ATCC 14756, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhi*.

Các thuốc thử Lugol, TCA mua của Merck.

2. Phương pháp

Phương pháp thử khả năng sinh enzym ngoại bào

Thử nghiệm khả năng sinh một số loại enzym như: protease, amylase, lipase. Hoạt hóa *Bacillus subtilis* BS02 trên môi trường TSB (Tryptic Soy Broth) trong 2-6 giờ. Chuẩn bị huyền phù vi khuẩn ở mật độ 10^8 CFU/ml, cấy theo vạch thẳng lên các môi trường TSA (Tryptic Soy Agar) có chất cảm ứng thích hợp. Ủ 37°C trong 24 giờ. Đọc kết quả bằng các thuốc thử Lugol (amylase) [14], thuốc thử trichloacetic acid (protease), quan sát các vòng đục xung quanh khóm (lipase). Sau khi định tính khả năng sinh enzym chúng tôi tiến hành định lượng hoạt tính enzym ngoại bào của BS02 trong môi trường bổ sung cơ chất cảm ứng tương ứng với hoạt tính của enzym amylase xác định theo phương pháp Heinkel, protease xác định theo phương pháp Anson, lipase xác định theo phương pháp esterase.

Phương pháp thử nghiệm khả năng kháng khuẩn

Phương pháp vạch thẳng vuông góc: cấy BS02 dọc theo một đường ngang trên đĩa thạch TSA. Sau 24 giờ, tiến hành cấy vi khuẩn gây bệnh theo các vạch thẳng góc với vạch vi khuẩn đã mọc. Ủ 37°C, 24 giờ. Đo khoảng cách giữa mép của vạch vi khuẩn với chỗ vi sinh vật gây bệnh bắt đầu sinh trưởng.

Phương pháp khuếch tán: Dùng que bông vô trùng trải huyền trực vi khuẩn gây bệnh đã chuẩn bị mật độ 10^8 CFU/ml. Đục lỗ đường kính 6 mm trong bản thạch. Chuẩn bị dịch nuôi cấy BS02 bằng cách lấy 3 – 5 khuẩn lạc riêng rẽ cấy vào môi trường TSB, ủ 37°C trong 24h, ly tâm 10.000 vòng/30 phút, thu dịch nổi và lọc qua lọc 0,45µm, thu dịch nuôi cấy. Cho 30 µl dịch nuôi cấy BS02 vào lỗ. Tiến hành song song với một lỗ chứng chứa môi trường nuôi cấy. Để yên khoảng 15 phút cho các chất thử nghiệm khuếch tán vào lớp thạch. Ủ 37°C, 24 h. Đo đường kính vòng vô khuẩn [4].

Phương pháp xác định khả năng chịu pH acid dạ dày và muối mật

Khả năng chịu acid dạ dày và muối mật của bào tử BS02 tiến hành theo phương pháp của Duc Le và cộng sự [5]. Bào tử BS02 có mật độ 10^8 bào tử/ml cho vào TSB pha trong đệm đẳng trương (muối Bott và Wilson gồm K_2HPO_4 1,24%, H_2PO_4 0,76%, natri citrat 0,1%, $[NH_4]_2SO_4$ 0,6%, pH 6,7) có muối mật 0,3% và 0,5 % hoặc trong TSB pH 2 và pH3 và ủ ở 37°C, lắc 200 rpm. Sau 1 giờ và 3 giờ tiến hành pha loãng mẫu ở nồng độ thích hợp với muối Bott và Wilson, và trải lên môi trường TSA, ủ ở 37°C trong 24 giờ để xác định số lượng tế bào. Khả năng chịu muối mật và acid của bào tử được tính dựa vào số tế bào còn lại sau thời gian thử nghiệm [1].

Phương pháp thử nghiệm tính nhạy cảm kháng sinh

Thử nghiệm tính nhạy cảm kháng sinh của *Bacillus subtilis* BS02 được tiến hành bằng phương pháp pha loãng kháng sinh trong thạch, theo hướng dẫn của CLSI (tài liệu M7-A9 và M45-A) với 14 loại kháng sinh thử nghiệm là: Ampicillin, Penicillin, Vancomycin, Gentamicin, Erythromycin, Tetracycline, Chloramphenicol, Rifampin, Cefotaxime, Amikacin, Ciprofloxacin, Levofloxacin, Cefotaxime, Ceftriaxone [3, 4].

Khảo sát độc tính cấp

Tiến hành khảo sát đặc tính của chủng vi khuẩn ở liều cao và tăng dần để xác định liều LD_{50} là liều gây chết một nửa thú vật.

Chuột được chia ngẫu nhiên thành 4 lô, mỗi lô 10 con. Lô chứng cho uống nước muối sinh lý 0,85%, lô thử nghiệm BS02 cho uống dung dịch có chứa bào tử vi khuẩn với liều tăng dần 10^7 , 10^8 , 10^9 , 5×10^{10} CFU/10 g chuột [13].

Theo dõi chuột sau khi cho uống 72h về hoạt động, hành vi bất thường, số lượng chuột chết, cân nặng và tiếp tục theo dõi trong 14 ngày. Chuột ngay sau khi chết hoặc sau 14 ngày thử nghiệm được hy

sinh, mổ để quan sát đại thể xem sự bất thường có thể xảy ra ở gan, thận, tim, lá lách và ruột non [2, 7].

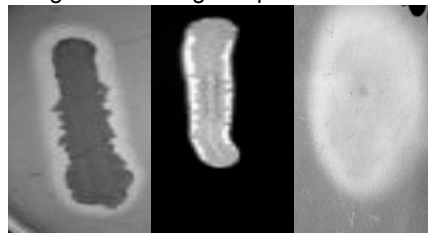
Thử nghiệm khả năng trị tiêu chảy trên mô hình chuột

Gây tiêu chảy ở chuột nhất trắng bằng kháng sinh. Sau đó cho chuột đã bị tiêu chảy uống bào tử vi khuẩn. Quan sát phân chuột hằng ngày cho đến khi hết tiêu chảy. Chia chuột làm 3 lô, mỗi lô 6 con. Lô thí nghiệm BS02; lô chứng (+): Cho chuột uống hỗn hợp hai kháng sinh với liều như sau: 20 mg streptomycin và 30 mg lincomycin/ 10 g chuột x 2 lần x 4 ngày, lô chứng (-): chỉ uống nước muối 0,85%. Sau khi toàn bộ chuột ở các lô thí nghiệm và lô chứng (+) đã bị tiêu chảy chuyển qua uống kháng sinh liều duy trì bằng 1/4 liều kháng sinh trên để hạn chế khả năng tự phục hồi. Đồng thời cho chuột uống vi khuẩn và nước muối với liều như sau: lô thí nghiệm BS02: bào tử vi khuẩn BS02 liều 10^6 CFU/10 g chuột x 2 lần/ngày, lô chứng (+) và lô chứng (-) nước muối sinh lý 0,85%.

KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

Khả năng sinh enzym ngoại bào

Kết quả thử nghiệm cho thấy chủng BS02 có khả năng sinh các enzym amylase, protease và lipase (Hình 1) với hoạt tính của enzym/ml môi trường nuôi cấy được trình bày trong Bảng 1. Khả năng sinh enzym ngoại bào là một tiêu chí chọn lọc quan trọng giúp hỗ trợ tiêu hóa cho vật chủ, do đó chủng BS02 là chủng có tiềm năng làm probiotic.



Hình 1. Khả năng sinh enzym ngoại bào của BS02

Bảng 1. Hoạt tính enzym ngoại bào của BS02 (mật độ tế bào 10^8 CFU/ml)

Chủng vi khuẩn	Hoạt tính (U/ml)		
	Amylase	Protease	Lipase
BS02	1,74	2,97	1,01

Khả năng đối kháng với các chủng gây bệnh kháng khuẩn

Chủng BS02 có khả năng đối kháng với cả vi khuẩn Gram âm như *E. coli*, *Shigella* và vi khuẩn Gram dương *S. aureus*, *Sarcina* với khoảng cách ức chế và đường kính vòng vô khuẩn lớn hơn 10 cm. Tuy nhiên BS02 không có khả năng đối kháng với các chủng: *S. faecalis*, *P. aeruginosa*, *Salmonella*, *Proteus*. Kết quả nghiên cứu tương tự nghiên cứu của Marahiel và cộng sự (1993) chứng minh các chủng *B. subtilis* có thể sinh ra các chất kháng khuẩn và kháng nấm phổ rộng như subtilin, bacilysin, chlorotetain, mycobacillin [9]. Trong một nghiên cứu khác của Pushkarev và cộng sự (2007) chứng minh

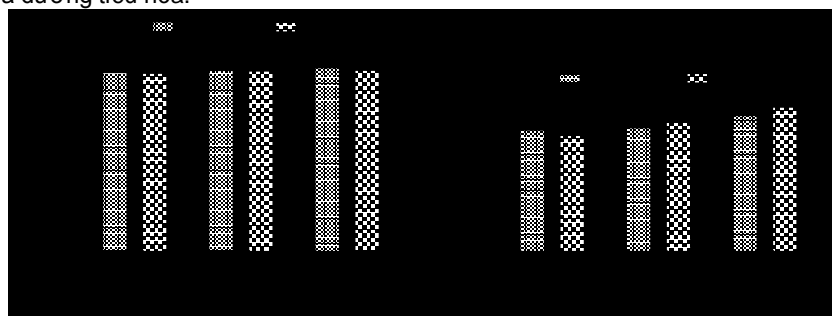
bactisporin - một chế phẩm probiotic chứa bào tử của *B. subtilis* 3H có khả năng đối kháng với các vi khuẩn gây bệnh, đặc biệt là các vi khuẩn đường tiết niệu [12].

Bảng 2. Khả năng đối kháng theo phương pháp vạch thẳng vuông góc và khuếch tán

Vi khuẩn gây bệnh	Phương pháp vạch thẳng vuông góc Khoảng cách (mm)	Phương pháp khuếch tán Đường kính vòng vô khuẩn (mm)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	17	15
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0	0
<i>S. faecalis</i> ATCC 29212	0	0
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	14	18
<i>S.aureus</i> (MRSA) ATCC 43300	13,8	19
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC49132	0	0
<i>Sarcina marcescens</i> ATCC 14756	16	18
<i>Salmonella typhi</i>	0	0
<i>Shigella dysenteria</i>	10	15

Khả năng chịu pH acid dạ dày và muối mật

Đối với acid dạ dày, ở thời điểm 90 phút, tỉ lệ sống của chủng khoảng 95% khi khảo sát ở pH 2. Trong khi đó đối với thử nghiệm khả năng chịu muối mật, tỉ lệ sống của chủng sau 3 phút là khoảng 75% ở cả nồng độ muối mật 0,3% và 0,5%. Kết quả thử nghiệm cho thấy bào tử của BS02 có khả năng chịu được các điều kiện khắc nghiệt của đường tiêu hóa.



Hình 2. Khả năng chịu acid và muối mật của BS02

A. Khả năng chịu acid, B. Khả năng chịu muối mật

Kết quả thử nghiệm tính nhạy cảm kháng sinh

Kết quả thử nghiệm khả năng đề kháng kháng sinh của BS02 cho thấy chủng nhạy cảm với 13 kháng sinh thử nghiệm, nhưng đề kháng với ceftazidime được biện giải bằng giá trị MIC áp dụng cho *Bacillus sp.* theo hướng dẫn của M45-A của CLSI [3].

Bảng 3. Kết quả nhạy cảm với các loại kháng sinh của BS02

Kháng sinh	MIC (µg/ml)	Biện giải	Kháng sinh	MIC (µg/ml)	Biện giải
Penicillin	<0,0625	S	Gentamicin	1	S
Ampicillin	<0,125	S	Erythromycin	0,25	S
Cefotaxime	4	S	Tetracycline	4	S
Ceftazidime	32	R	Ciprofloxacin	0,25	S
Ceftriaxone	8	S	Levofloxacin	0,5	S
Vancomycin	1	S	Chloramphenicol	4	S
Amikacin	<8	S	Rifampin	0,25	S

Ghi chú: S: nhạy cảm, I: trung gian, R: kháng

Dựa vào các kết quả thử nghiệm đặc tính probiotic *in vitro* như khả năng sinh enzyme ngoại bào, đối kháng với các chủng vi khuẩn gây bệnh, khả năng chịu acid và muối mật, cũng như các thử nghiệm nhạy cảm kháng sinh cho thấy chủng BS02 tiềm năng cho việc ứng dụng làm probiotic.

Độc tính cấp

Liều tối đa cho chuột uống của cả 3 chủng vi khuẩn thử nghiệm là 5.10^{10} CFU/ 10 g chuột. Ở liều khảo sát cao nhất này, chuột vẫn khỏe mạnh, hoạt

động bình thường, không có dấu hiệu bất thường xảy ra, không có chuột chết trong vòng 72 giờ. Thử nghiệm chuột trong 14 ngày sau khi cho uống vi khuẩn không khác nhau giữa lô chứng và lô thử.

Giải phẫu đại thể tất cả các chuột của các lô thử nghiệm sau 14 ngày không phát hiện các bất thường trên gan, thận, tim, phổi và ruột non. Như vậy, ở liều cao nhất có thể hòa thành huyền dịch để cho chuột uống (5.10^{10} CFU/ 10 g chuột) vẫn không có chuột chết. Vì vậy, chúng tôi không thể xác định chính xác liều LD₅₀ mà chỉ có thể kết luận liều LD₅₀ cao hơn

5.10¹⁰ CFU/ 10 g chuột (tức 5 x 10¹² CFU/kg thể trọng/ngày).

Khả năng điều trị tiêu chảy

Kết quả gây tiêu chảy cho chuột với kháng sinh

Sau 4 ngày gây tiêu chảy bằng kháng sinh, ở lô thử nghiệm và lô chứng dương, trọng lượng chuột giảm, trong khi lô chứng (-) chỉ uống nước muối sinh lý trọng lượng chuột tăng.

Bảng 4. Độ tăng cân của các lô thử nghiệm so với lô chứng (-)

STT chuột	Lô chứng (-)	Lô chứng (+)	BS02
1	3.75	-3.65	-3.50
2	5.56	-4.24	-3.68
3	4.41	-4.16	-3.93
4	4.23	-3.52	-3.84
5	4.92	-3.49	-4.10
6	3.45	-4.89	-3.96
Trung bình	4.39	-3.99*	-3.84*

* Khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa lô chứng (+) và lô thử nghiệm so với lô chứng (-).

Tác dụng trị tiêu chảy của bào tử vi khuẩn *in vivo*

Sau khi gây tiêu chảy, tiến hành điều trị với bào tử của BS02. Kết quả điều trị tiêu chảy được đánh giá dựa vào 3 yếu tố: tỉ lệ chuột chết, tỉ lệ chuột khỏi tiêu chảy, và mức độ tăng cân của chuột. Đối với tỉ lệ chuột chết ở lô chứng (+), gây tiêu chảy nhưng không điều trị với probiotic tỉ lệ chuột chết sau khi gây tiêu chảy sau 7 ngày là 50%, trong khi ở lô thử nghiệm BS02 không có chuột chết. Đối với tỉ lệ chuột khỏi tiêu chảy, kết quả trình bày trong Bảng 5.

Bảng 5. Tỉ lệ chuột khỏi tiêu chảy sau 3 ngày điều trị

Lô chuột	Tỉ lệ chuột hết tiêu chảy (%)		
	Sau 1 ngày	Sau 2 ngày	Sau 3 ngày
BS02	50%	75%	100%
Chứng (+)	0%	0%	33%

Chuột được điều trị bằng bào tử BS02 phục hồi sau 3 ngày sử dụng probiotic với liều 10⁶ bào tử/10g thể trọng chuột x2 lần/ ngày, trong khi ở lô chứng dương tỉ lệ chuột hết tiêu chảy là 33%.

Đối với mức độ tăng cân của chuột ở các lô thử nghiệm sau 3 ngày điều trị được trình bày trong Bảng sau.

Bảng 6. Mức độ tăng cân của chuột lô chứng (+)

STT chuột	Mức độ tăng cân ở lô chứng (+) (g/chuột)				Mức độ tăng cân ở lô BS02 (g/chuột)			
	Sau khi tiêu chảy	Ngày 1	Ngày 2	Ngày 3	Sau khi tiêu chảy	Ngày 1	Ngày 2	Ngày 3
1	-3,65	-1,89	-1,26	-1,26	-3,50	0,65	1,03	0,82
2	-4,24	-0,68	-0,03	-0,10	-3,68	-1,40	0,33	1,77
3	-4,16	-1,37	-0,29	Chết	-3,93	-1,61	0,08	0,83
4	-3,52	-2,54	-0,96	-1,33	-3,84	0,45	0,31	1,11
5	-3,49	-0,89	Chết	Chết	-4,10	-1,53	1,02	0,85
6	-4,89	-0,30	Chết	Chết	-3,96	0,69	1,35	1,60
Trung bình	-3,99	-1,28	-0,64	-0,90	-3,84	-0,64	0,76	1,17

* Khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô chứng dương

Chuột được điều trị bằng BS02 trọng lượng tăng theo thời gian điều trị. Chuột ở lô chứng (+) vẫn tiếp tục giảm cân qua các ngày uống kháng sinh liều duy trì. Như vậy, dựa vào cả 3 chỉ tiêu theo dõi, có thể kết luận bào tử BS02 có khả năng điều trị tiêu chảy do sử dụng kháng sinh phổ rộng. Đối với liều của BS02 trong điều trị tiêu chảy là 10⁶ bào tử/10g thể trọng chuột, 2 lần/ngày, liều này tương đương với liều 10⁸ bào tử/1 kg thể trọng, tương ứng với liều của các sản phẩm probiotic được khuyến cáo bởi WHO.

Trong nghiên cứu này chúng tôi đã khảo sát một số đặc tính probiotic chủng *Bacillus subtilis* BS02 cũng như khả năng điều trị tiêu chảy trên mô hình chuột, kết quả cho thấy BS02 có tiềm năng ứng dụng làm probiotic.

KẾT LUẬN

Sau khi tiến hành các thử nghiệm về đặc tính của chủng làm probiotic như khả năng kháng khuẩn, chịu đựng acid dạ dày, muối mật, và thử nghiệm khả năng nhạy kháng kháng sinh, độc tính cấp và khả năng điều trị tiêu chảy, chúng tôi nhận thấy chủng BS02 có tiềm năng ứng dụng làm probiotic.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Barbosa T. M., Serra C. R., et al. (2005). *Screening for Bacillus isolates in the broiler gastrointestinal tract*. Appl Environ Microbiol, 71(2): 968-978.
- Burger C., Fischer D. R., et al. (2005). *Acute and subacute toxicity of the hydroalcoholic extract from Wedelia paludosa (Acmela brasiliensis) (Asteraceae) in mice*. J Pharm Pharm Sci, 8(2): 370-3.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2008). *Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria; approved guideline*. (eds), Vol. 26. pp 14-15.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2012). *Method for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard*. (eds). pp.
- Duc Le H., Hong H. A., et al. (2004). *Characterization of Bacillus probiotics available for human use*. Appl Environ Microbiol, 70(4): 2161-71.
- Heczko P. B., Strus M., et al. (2006). *Critical evaluation of probiotic activity of lactic acid bacteria and their effects*. J Physiol Pharmacol, 57 Suppl 9: 5-12.

7. Hong H. A., Huang J. M., et al. (2008). *The safety of Bacillus subtilis and Bacillus indicus as food probiotics*. J Appl Microbiol, 105(2): 510-20.
8. Hong H. A., Khaneja R., et al. (2009). *Bacillus subtilis isolated from the human gastrointestinal tract*. Res Microbiol, 160(2): 134-43.
9. Marahiel M. A., Nakano M. M., et al. (1993). *Regulation of peptide antibiotic production in Bacillus*. Mol Microbiol, 7(5): 631-6.
10. Naidu A. S., Bidlack W. R., et al. (1999). *Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB)*. Crit Rev Food Sci Nutr, 39(1): 13-126.
11. Nguyễn Văn Thanh, Đông T. C., et al. (2009). Công nghệ sinh học Dược. (eds). pp 315. NXB Giáo Dục Việt Nam.
12. Pushkarev A. M., Tuigunova V. G., et al. (2007). *Use of antagonistic Bacillus subtilis bacteria for treatment of nosocomial urinary tract infections*. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol, (2): 90-3.
13. Sorokulova I. B., Pinchuk I. V., et al. (2008). *The safety of two Bacillus probiotic strains for human use*. Dig Dis Sci, 53(4): 954-63.
14. Tam N. K., Uyen N. Q., et al. (2006). *The intestinal life cycle of Bacillus subtilis and close relatives*. J Bacteriol, 188(7): 2692-700.