Xạ khuẩn phân lập từ đất vùng ven Thành phố Hồ Chí Minh: nguồn kháng sinh tiềm năng

- **Phan Thị Huyền**
- **Huỳnh Thư**
- **Phan Ngọc Uyên Phương**
- **Võ Thị Ly Tao**

Trường Đại học Bách Khoa, ĐHQG-HCM

(Bản nhận ngày 28 tháng 2 năm 2015, hoàn chỉnh sửa chữa ngày 15 tháng 8 năm 2015)

TÓM TẮT

Xạ khuẩn là vi khuẩn Gram dương có hình thái giống nấm sợi. Phần lớn các kháng sinh tự nhiên hữu dụng ngày nay có nguồn gốc từ xạ khuẩn. Nghiên cứu này phân lập các xạ khuẩn có trong đất lấy từ các vùng ven thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam. Một trong số các xạ khuẩn phân lập được này được xác định là Streptomyces flaveus bằng phương pháp giải trình tự 16S rDNA. S. flaveus có khả năng kháng được cả vi khuẩn Gram dương và Gram âm, đặc biệt là vi khuẩn Gram dương Staphylococcus aureus và biến thể kháng đa thuốc của nó – methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA). MRSA hiện đang là mối đe dọa nghiêm trọng sức khỏe con người không chỉ ở Việt Nam mà còn ở rất nhiều nước khác trên thế giới. Tuy nhiên, các kháng sinh được chỉ định để điều trị các bệnh do MRSA gây ra hiện nay không mấy hiệu quả. Vì thế, S. flaveus phân lập được từ nghiên cứu này sẽ là nguồn kháng sinh tiềm năng chống lại các bệnh gây ra bởi vi khuẩn MRSA.

Keywords: *Xạ khuẩn, kháng sinh, Staphylococcus aureus, MRSA, Streptomyces flaveus.*

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Xạ khuẩn (actinomycetes) là vi khuẩn Gram dương thuộc giống Actinomyces, họ Actinomyceteae. Ở nhiều nước phát triển trên thế giới, xạ khuẩn đã và đang được sử dụng để sản xuất nhiều kháng sinh có giá trị ở qui mô công nghiệp [1, 2]. Việt Nam là một đất nước tiêu thụ rất nhiều các loại kháng sinh khác nhau cho mục đích chữa bệnh, nhưng ngành công nghiệp này chưa được quan tâm phát triển dù đã có rất nhiều công ty dược phẩm được thành lập và đi vào sản xuất ở Việt nam [3]. Tuy nhiên, các công ty này chủ yếu nhập thiết bị và qui trình sản xuất, đồng thời nhập các nguyên liệu kháng sinh để đóng chai hoặc tạo ra viên nén, đóng gói rồi xuất ra thị trường, mặc dù cũng đã có những tìm

hiểu, nghiên cứu về quá trình lên men tạo một số loại kháng sinh trong rất ít các viện nghiên cứu, các trường đại học trên cả nước [4]. Việc nghiên cứu sản xuất kháng sinh từ vi sinh vật ở Việt Nam vì thế còn rất sơ sài và và do đó chưa đủ khả năng tạo tiềm lực để phát triển ngành công nghiệp sản xuất kháng sinh trong nước. Nghiên cứu này phân lập xạ khuẩn có khả năng sản xuất kháng sinh từ đất ở các vùng ven thành phố Hồ Chí Minh làm nguồn giống phục vụ cho nghiên cứu sản xuất kháng sinh ở Việt Nam. Tìm kiếm các kháng sinh mới có khả năng chống lại vi khuẩn gây bệnh kháng đa thuốc là một công việc có ý nghĩa cấp thiết hiện nay. Vi khuẩn *Staphylococcus aureus* là một ví dụ. Vi khuẩn này có khả năng gây ra rất nhiều bệnh khác nhau cho con người từ nhiễm trùng da nhẹ như mụn nhọt, viêm nang lông, viêm xoang, … cho đến viêm giác mạc, viêm vú, viêm phổi, viêm màng não, viêm tủy xương, viêm khớp, nhiễm khuẩn huyết, ... do đó đe dọa nghiêm trọng tính mạng con người [5]. Một biến thể kháng đa thuốc của *S. aureus* là methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA). Vancomycin – kháng sinh tạo bởi xạ khuẩn *Amycolatopsis orientalis* – từng được chỉ định để điều trị các bệnh gây ra bởi MRSA, nhưng kết quả điều trị bằng cách sử dụng kháng sinh này lại không cao và các chủng kháng lại vancomycin VRSA (vancomycin-resistant *S. aureus*) đã xuất hiện [6-8]. Các chủng VRSA không những kháng lại methicillin, vancomycin mà còn có khả năng kháng lại nhiều kháng sinh khác thuộc các họ aminoglycoside, macrolide, fluoroquinolone, ... [9]. Linezolid – một kháng sinh tổng hợp – từng được sử dụng thay thế nhưng lại gây suy tủy [10]. Tương tự, daptomycin – kháng sinh tạo bởi *Streptomyces roseosporus* – cũng gây tác dụng phụ đối với cơ xương [11]. Việc tìm ra được kháng sinh thay thế trong điều trị hiệu quả các bệnh gây ra bởi MRSA mà không gây tác hại nặng nề vì thế thực sự cần thiết trong vấn đề chăm sóc sức khỏe con người.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

2.1.1. Nguồn xạ khuẩn

Nguồn để phân lập xạ khuẩn là các mẫu đất được lấy từ các vùng ven thành phố Hồ Chí Minh (Hóc Môn, Củ Chi, …), Việt Nam.

2.1.2. Vi sinh vật kiểm định

Các vi sinh vật được sử dụng cho việc chọn các chủng xạ khuẩn có khả năng tạo kháng sinh là các vi khuẩn Gram dương *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, biến thể kháng nhiều kháng sinh của *S. aureus* là methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA), và vi khuẩn Gram âm *Escherichia coli*.

2.1.3. Môi trường phân lập và nuôi cấy

Môi trường nuôi cấy vi khuẩn kiểm định là môi trường lỏng Luria-Bertani (LB), có thành phần như sau:

Tryptone	10 g/l
Cao nấm men	5 g/l
NaCl	10 g/l
pH	7.0±0.2

Môi trường sử dụng cho việc xác định khả năng kháng các vi khuẩn kiểm định là môi trường Meuller-Hinton (Himedia, Ấn độ).

Môi trường sử dụng cho phân lập và nuôi cấy xạ khuẩn là môi trường tinh bột – casein [12], có thành phần như sau:

Tinh bột hòa tan	10.0 g/l
Casein	0.3 g/l
KNO_3	2.0 g/l
NaCl	2.0 g/l
K_2HPO_4	2.0g/l
$MgSO_4.7H_2O$	vết
$CaCO_3$	vết
$FeSO_4.7H_2O$	vết
pH	6.8±0.2

Các môi trường được hấp tiệt trùng ở 121°C trong thời gian 15 phút. 1.5 g/l thạch được thêm vào môi trường trước khi hấp tiệt trùng khi môi trường được sử dụng cho quá trình phân lập, làm thuần và bảo quản giống.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Thu nhận và bảo quản mẫu

Các mẫu đất được thu nhận từ lớp đất cách bề mặt khoảng 5-10 cm với các dụng cụ đã tiệt trùng. Mẫu được đựng riêng lẻ trong các túi nilon sạch và được hong khô trong không khí 3-5 ngày, sau đó được cất giữ trong ngăn mát tủ lạnh cho đến khi được sử dụng cho quá trình phân lập xạ khuẩn.

2.2.2. Phân lập và nuôi cấy xạ khuẩn

Ngay trước quá trình phân lập, các mẫu đất được loại bỏ rác hữu cơ và các loại đá có kích thước lớn, sau đó được nghiền và rây. Mẫu sau khi rây được cho vào nước cất, lắc, pha loãng theo hệ số thập phân và từng 0,1 ml mẫu pha loãng được cấy trãi lên môi trường phân lập chứa trong các đĩa Petri có đường kính 10 cm.

Xạ khuẩn trên các môi trường phân lập được ủ trong điều kiện nhiệt độ 30°C trong thời gian 3-15 ngày.

Xạ khuẩn được nhận biết trên cơ sở hình thái khuẩn lạc và hình thái tế bào. Xạ khuẩn tạo kháng sinh được chọn trên cơ sở khả năng kháng các vi sinh vật có mặt trong mẫu đất phát triển được trên môi trường thạch tinh bột – casein và khả năng kháng các vi khuẩn kiểm định trên môi trường thạch Meuller-Hinton. Hình thái tế bào được quan sát dưới kính hiển vi quang học nền sáng sau khi nhuộm đơn bằng crytal violet hoặc fuschin.

Các chủng xạ khuẩn có khả năng tạo kháng sinh được thuần khiết bằng phương pháp cấy ria nhiều lần trên môi trường thạch cho đến khi thuần. Giống xạ khuẩn thuần khiết trên môi trường thạch được bảo quản ở điều kiện nhiệt độ 4°C.

2.2.3. So sánh sắp hàng các trình tự 16S rDNA

So sánh sắp hàng các trình tự 16S rDNA được thực hiện bằng cách sử dụng phần mềm MultAlin [13].

2.2.4. Xác định khả năng kháng các vi khuẩn kiểm định

Vi khuẩn kiểm định được nuôi qua đêm trong môi trường lỏng LB ở nhiệt độ 37°C.

Khả năng kháng các vi khuẩn kiểm định được thực hiện bằng cách sử dụng đĩa giấy có đường kính 6 mm (cung cấp bởi Sigma Aldrich Ltd., Nhật bản) có tẩm dịch nuôi cấy xạ khuẩn. Giống xạ khuẩn thuần khiết trên môi trường thạch được cấy vào bình tam giác chứa môi trường lỏng tinh bột – casein đã tiệt trùng. Bình tam giác được lắc ở 160 vòng/phút trong điều kiện nhiệt độ 30°C. Sau 5 ngày, dịch nuôi cấy trong bình được thu nhận bằng cách ly tâm ở

4000 vòng/phút. 300µl dịch ly tâm được tẩm vào đĩa giấy bằng cách lần lượt tẩm từng 50µl vào đĩa, đợi ở nhiệt độ phòng cho đến khi đĩa khô và tẩm tiếp.

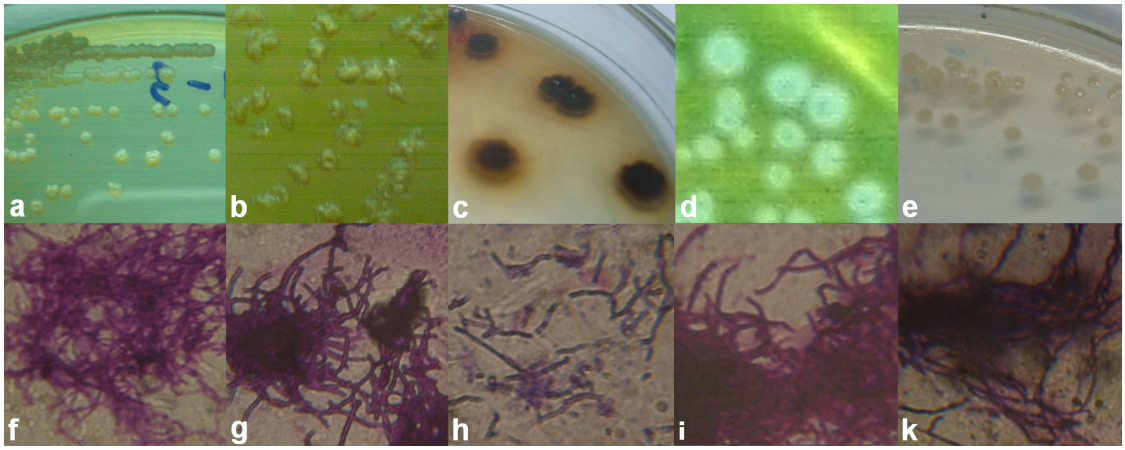
Đĩa giấy sau khi được tẩm dung dịch nuôi cấy xạ khuẩn được đặt lên trên bề mặt môi trường thạch Meuller-Hinton [14] trong các đĩa Petri đã cấy trãi với các vi khuẩn kiểm định bằng tăm bông tiệt trùng. Các đĩa Petri này được ủ trong thời gian 24-48 giờ ở nhiệt độ 37°C.

Các đĩa giấy đối chứng chứa các kháng sinh amoxicillin+clavunic acid và vancomycin có đường kính 6 mm được cung cấp bởi Nam Khoa Ltd., Việt Nam.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập xạ khuẩn từ đất

Các chủng có khuẩn lạc nghi ngờ là xạ khuẩn sau khi nhuộm với crystal violet hoặc fuschin sẽ được xác minh nếu có tế bào hình sợi, bắt màu tím của crystal violet hoặc màu hồng của fuschin khi quan sát dưới kính hiển vi quang học nền sáng (Hình 1). Các chủng xạ khuẩn được làm thuần bằng cách cấy ria nhiều lần trên môi trường thạch tinh bột – casein.

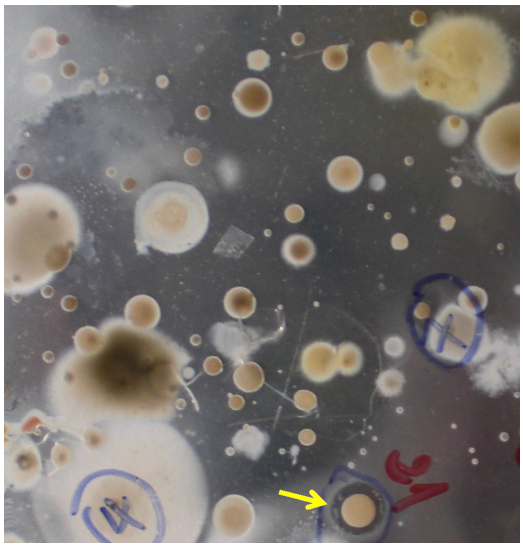


Hình 1. Khuẩn lạc thuần của các xạ khuẩn phân lập được từ đất và khuẩn ty của chúng. (a-e): Hình ảnh khuẩn lạc của các chủng xạ khuẩn thuần trên môi trường thạch. (f-g): Khuẩn ty của các chủng tương ứng từ a đến e.

Hình 1 cho thấy các xạ khuẩn phân lập được có hình thái khuẩn lạc rất đa dạng. Trên môi trường thạch, một số chủng xạ khuẩn có khả năng chiết xuất vào môi trường các chất màu do đó làm cho màu của môi trường bị thay đổi. Ngoài ra, một số chủng xạ khuẩn có khả năng tạo bào tử, còn một số khác thì không.

Có 35 chủng xạ khuẩn có khả năng kháng vi sinh vật được chọn như trình bày trong phần Vật liệu và phương pháp. Vòng trong suốt xuất hiện là vì vi sinh vật xung quanh khuẩn lạc xạ khuẩn không phát triển được do các chất sinh ra từ khuẩn lạc xạ khuẩn khuếch tán vào môi trường. Các vi sinh vật không phát triển được

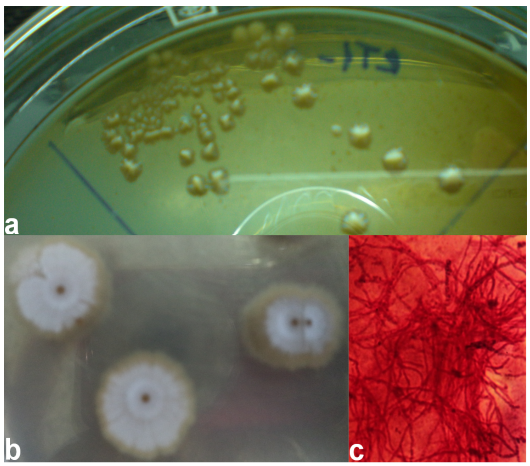
này là các vi sinh vật có trong mẫu đất sinh trưởng được trên môi trường phân lập (Hình 2).



Hình 2. Các chủng có khuẩn lạc với vòng trong suốt xung quanh (mũi tên màu vàng).

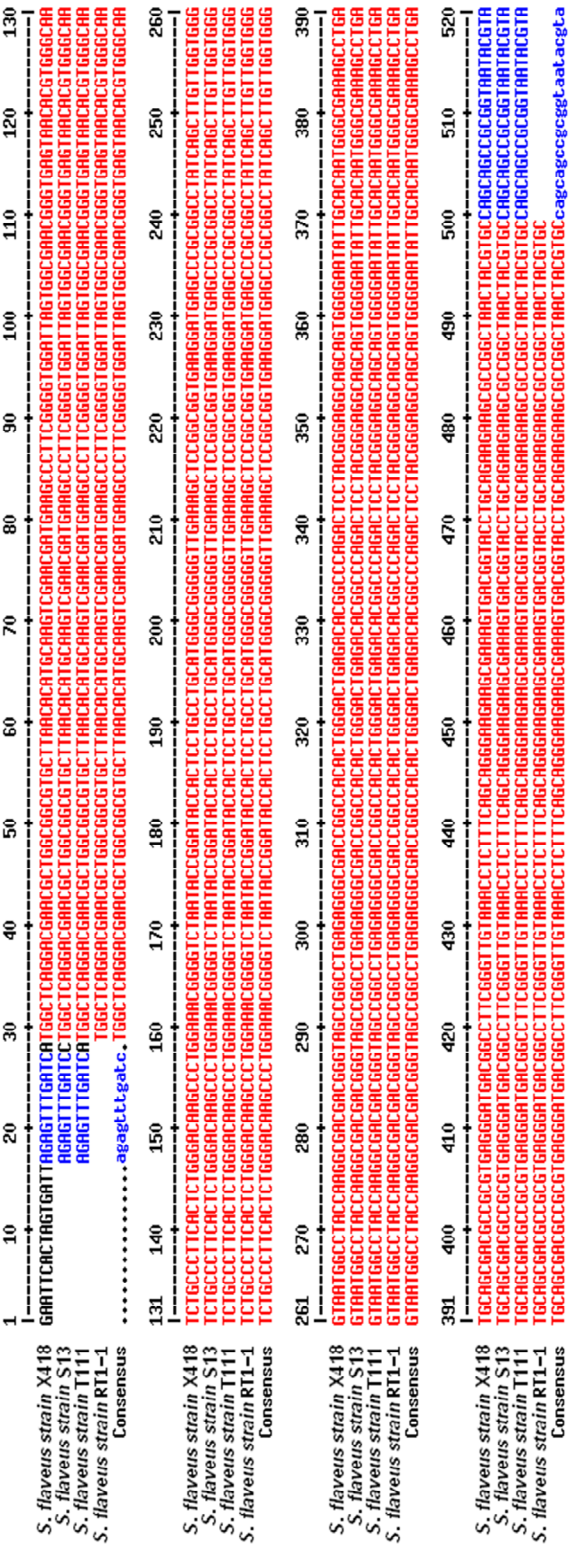
3.2. Chủng xạ khuẩn RT1-1 và tiềm năng kháng vi khuẩn MRSA

Xạ khuẩn RT1-1 có khuẩn lạc xuất hiện trên môi trường thạch tinh bột – casein sau 3 ngày nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C. Khuẩn lạc RT1-1 hơi gồ ghề, không bóng và có màu trắng ngà. Chủng RT1-1 có khả năng tạo bào tử màu trắng kể từ ngày thứ tư trên môi trường thạch. Khuẩn ty có thể được quan sát bằng kính hiển vi quang học nền sáng khi sinh khối đem nhuộm được lấy từ khuẩn lạc trên môi trường thạch trước khi bào tử hình thành hoặc sinh khối được tách từ dịch nuôi cấy sau vài ngày trong môi trường lỏng (Hình 3).



Hình 3. Khuẩn lạc và khuẩn ty của chủng xạ khuẩn RT1-1. (a) Khuẩn lạc trên môi trường thạch sau 3 ngày nuôi cấy. (b) Khuẩn lạc trên môi trường thạch sau 10 ngày nuôi cấy. (c) Khuẩn ty nhuộm fuschin sau 5 ngày nuôi cấy trong môi trường lỏng.

Chủng xạ khuẩn RT1-1 được xác định là *Streptomyces flaveus* bởi Nam Khoa Ltd., bằng phương pháp giải trình tự 16S rDNA. Hình 4 trình bày sự tương đồng rất cao của đoạn trình tự 16S rDNA cung cấp bởi Nam Khoa Ltd. với các trình tự 16S rDNA của các *S. flaveus* đã biết khác lưu trên ngân hàng NCBI [15].



Hình 4. So sánh sắp hàng đoạn trình tự 16S Rdna của *S. flaveus* RT1-1 với các trình tự 16S Rdna của các *S. flaveus* khác

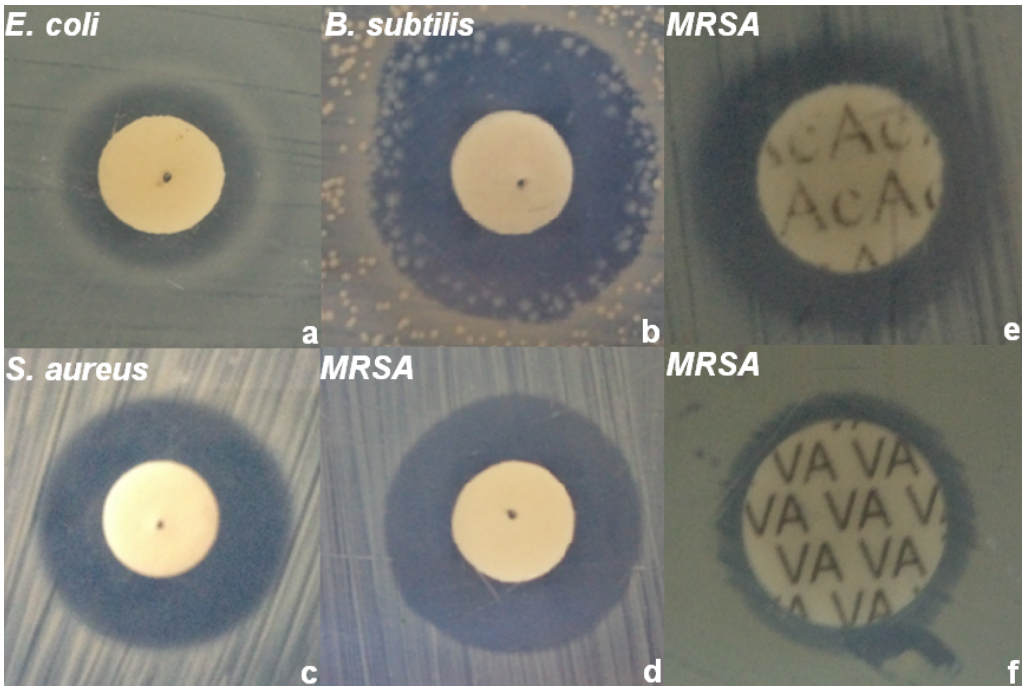


Figure 5 Khả năng kháng các vi khuẩn kiểm định của *S. flaveus* RT1-1 trên môi trường thạch Meuller-Hinton. (a-d) Đĩa giấy tẩm dịch nuôi *S. flaveus* RT1-1 sau 5 ngày nuôi cấy. Đĩa đối chứng chứa (e) 20µg amoxicillin + 10µg clavunic acid và (f) 30µg vancomycin. Đường kính của tất cả các đĩa giấy đều là 6 mm.

Chủng xạ khuẩn *S. flaveus* RT1-1 có khả năng tạo ra các chất kháng lại sự sinh trưởng của các vi khuẩn Gram dương và Gram âm, đặc biệt là vi khuẩn Gram dương *S. aureus* và MRSA (Hình 5).

Một nghiên cứu vào năm 2011 cho thấy MRSA tồn tại rất phổ biến trong các bệnh viện thuộc các nước châu Á [16]. So với các nước châu Á khác, ở Việt Nam, tỉ lệ MRSA trong số *S. aureus* lây nhiễm do chăm sóc y tế tương đối cao (109 trên 147 trường hợp khảo sát, chiếm 74,1%), đồng thời tỉ lệ MRSA trong số *S. aureus* lây nhiễm trong cộng đồng cũng không nhỏ (197 trên 654 trường hợp khảo sát, chiếm 30,1%). Bệnh nhân nhiễm MRSA hay *S. aureus* nói chung thường được chỉ định điều trị bằng vancomycin [17]. Tuy nhiên, kết quả điều trị bằng cách sử dụng vancomycin không cao [6-8], vì các vi khuẩn Gram dương này có thành tế bào dày do đó làm chậm sự khuếch tán của vancomycin, vì thế vancomycin không can thiệp được quá trình tổng hợp thành tế bào của tế bào vi khuẩn mới [18, 19].

Ngoài vancomycin, linezolid và daptomycin [10, 11], kháng sinh có tên thương mại là augmentin – sự kết hợp giữa amoxicillin (thuộc họ penicillin, sinh ra bởi nấm mốc *Penicillium chrysogenum*) và clavunic acid (kháng sinh tạo bởi xạ khuẩn *Streptomyces clavuligerus*) cũng kháng *S. aureus* tốt hơn so với penicillin hoặc với chỉ amoxicillin [20]. Tuy nhiên, việc sử dụng kết hợp giữa amoxicillin và clavunic acid lại tạo ra các chủng *S. aureus* kháng amoxicillin ở mức cao hơn [21].

S. flaveus RT1-1 phân lập được trong nghiên cứu này có khả năng kháng *S. aureus* và cả MRSA rất cao (Hình 5). Sau 5 ngày nuôi cấy trong môi trường lỏng tinh bột – casein, 300 µl dịch nuôi cấy xạ khuẩn này cho đường kính vòng trong suốt khoảng 15 mm đối với cả *S. aureus* và MRSA trên môi trường thạch Meuller-Hinton. Một nghiên cứu báo cáo vào năm 1995 cho thấy loài *S. flaveus* còn có khả năng kháng được nhiều nấm mốc và mốc nước gây bệnh ở thực vật [22]. Hợp chất có khả năng kháng các nấm này thuộc loại manumycin – một kháng sinh có hoạt tính chống ung thư [23], nhưng manumycin không có khả năng kháng nấm men và vi khuẩn [24]. Khả năng kháng vi khuẩn của các hợp chất khác sinh ra bởi *S. flaveus* cho đến nay vẫn chưa được nghiên cứu và báo cáo, và do đó việc xác định các hợp chất tạo ra bởi xạ khuẩn này cho mục đích điều trị các bệnh do vi khuẩn *S. aureus* và MRSA gây ra sẽ thực sự rất cần thiết.

4. KẾT LUẬN

Đất vùng ven thành phố Hồ Chí Minh là nguồn tốt để phân lập xạ khuẩn có khả năng tạo kháng sinh. *S. flaveus* phân lập được bởi nghiên cứu này là xạ khuẩn có tiềm năng được sử dụng để sản xuất kháng sinh chống lại các bệnh hiểm nghèo gây ra bởi vi khuẩn kháng đa thuốc MRSA ở người.

Lời cảm ơn: *Nghiên cứu này được tài trợ bởi trường Đại học Bách khoa Tp. HCM trong khuôn khổ đề tài mã số* ***T-KTHH-2014-52****.*

Actinomycetes isolated from soils collected in adjacent areas of Hochiminh city: sources of potential antibiotics

- **Phan Thi Huyen**
- **Huynh Thu**
- **Phan Ngoc Uyen Phuong**
- **Vo Thi Ly Tao**

Ho Chi Minh city University of Technology, VNU-HCM.

ABSTRACT

Actinomycetes are Gram-positive bacteria resembling filamentous fungi in shape. The majority of natural antibiotics useful today are obtained from actinomycetes. This study isolated actinomycetes from soil samples collected in adjacent areas of HoChiMinh City, Việt Nam. One of the isolates was Streptomyces flaveus determined using 16S rDNA sequencing method. S. flaveus was capable

of inhibiting the growth of both Gram-positive and Gram-negative bacteria, especially the Staphylococcus aureus and its multi-antibiotic resistant form – the methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA). MRSA is at present a serious threat to human health not only in Vietnam but also in many other countries around the world. However, antibiotics indicated for the treatment of diseases caused by the MRSA are currently not much effective. Thus, S. flaveus in this study will be a source of potential antibiotics against diseases caused by the MRSA.

Keywords: *Actinomycetes, antibiotics, Staphylococcus aureus, MRSA, Streptomyces flaveus.*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1]. Ceylan O, Okmen G, Ugur A. Isolation of soil *Streptomyces* as source antibiotics active against antibiotic-resistant bacteria. *EurAsia J BioSci*, 2: 73-82 (2008).

[2]. Procópio REL, Silva IR, Martins MK, Azevedo JL, Araújo JM. Antibiotics produced by *Streptomyces. Braz J Infect Dis*, 16: 466-471 (2012).

[3]. http://danhba.bacsi.com/category/cong-ty-duoc/location/tp-hcm/

[4]. Nguyễn Phương Nhuệ, Nguyễn Văn Hiếu, Lê Gia Hy. Nghiên cứu tối ưu môi trường lên men chủng *Streptomyces orientalis* 4912 sinh vancomycin. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, 47: 25-34 (2012).

[5]. Balaban N, Collins LV, Cullor JS, Hume EB, Medina-Acosta E, Motta OV, O'Callaghan R, Rossitto PV, Shirtliff ME, Silveira LS, Tarkowski A, Torres JV. Prevention of diseases caused by *Staphylococcus aureus* using the peptide RIP. *Peptides*, 21: 1301-1311 (2000).

[6]. Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, Yabuta K, Oguri T, Tenover FC. Methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J Antimicrob Chemother*, 40: 135-136 (1997).

[7]. Bozdogan B, Esel D, Whitener C. Antibacterial susceptibility of a vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strain isolated at the Hershey Medical Center. *J Antimicrob Chemother*, 52: 864-868 (2003).

[8]. Drees M1, Boucher H. New agents for *Staphylococcus aureus* endocarditis. *Curr Opin Infect Dis*, 19: 544-550 (2006).

[9]. Weigel LM1, Donlan RM, Shin DH, Jensen B, Clark NC, McDougal LK, Zhu W, Musser KA, Thompson J, Kohlerschmidt D, Dumas N, Limberger RJ, Patel JB. High-level vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with a polymicrobial biofilm. *Antimicrob Agents Chemother*, 51: 231-238 (2007).

[10]. Gorchynski J, Rose JK. Complications of MRSA treatment: Linezolid-induced myelosuppression presenting with pancytopenia. *West J Emerg Med*, 9: 177-178 (2008).

[11]. Steenbergen JN, Alder J, Thorne GM, Tally FP. Daptomycin: a lipopeptide antibiotic for the treatment of serious Gram-positive

infections. *J Antimicrob Chemother*, 55: 283-288 (2005).

[12]. Kumari M, Myagmarjav BE, Prasad B, Choudhary M. Identification and characterization of antibiotic-producing actinomycetes isolates. *Am J Microbiol*, 4: 24-31 (2013).

[13]. Corpet F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucl Acids Res*, 16: 10881-10890 (1988).

[14]. Atlas RM. *Handbook of Microbiological Media*. London: CRC Press. Trang 1226. ISBN 0-8493-1818-1 (2004).

[15]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/?term=Streptomyces+flaveus+16S+rRNA#

[16]. Song JH, Hsueh PR, Chung DR, Ko KS, Kang CI, Peck KR, Yeom JS, Kim SW, Chang HH, Kim YS, Jung SI, Son JS, So TM, Lalitha MK, Yang Y, Huang SG, Wang H, Lu Q, Carlos CC, Perera JA, Chiu CH, Liu JW, Chongthaleong A, Thamlikitkul V, Van PH, ANSORP Study Group. Spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* between the community and the hospitals in Asian countries: an ANSORP study. *J Antimicrob Chemother*, 66: 1061-1069 (2011).

[17]. Rayner C, Munckhof WJ. Antibiotics currently used in the treatment of infections caused by *Staphylococcus aureus. Intern Med J*, 36: 142-143 (2006).

[18]. Howden BP, Davies JK, Johnson PD, Stinear TP, Grayson ML. Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications. *Clin Microbiol Rev*, 23: 99-139 (2010).

[19]. Gould IM. VRSA-doomsday superbug or damp squib. *Lancet Infect Dis*, 10: 816-818 (2010).

[20]. Groppo FC, Castro FM, Pacheco AB, Motta RH, Filho TR, Ramacciato JC, Florio FM, Meechan JG. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* and oral streptococci strains from high-risk endocarditis patients. *Gen Dent*, 53: 410-413 (2005).

[21]. Guillemot D, Bonacorsi S, Blanchard JS, Weber P, Simon S, Guesnon B, Bingen E, Carbon C. Amoxicillin-clavulanate therapy increases childhood nasal colonization by methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains producing high levels of penicillinase. *Antimicrob Agents Chemother*, 48: 4618-4623 (2004).

[22]. Yeop LJ, Kim BS, Hwang BK. Numerical identification of *Streptomyces flaveus* producing antibiotic substances inhibitory to plant pathogenic fungi. *J Microbiol Biotech*, 6: 324-334 (1995).

[23]. Zhou JM, Zhu XF, Pan QC, Liao DF, Li ZM, Liu ZC. Manumycin inhibits cell proliferation and the Ras signal transduction pathway in human hepatocellular carcinoma cells. *Int J Mol Med*, 11: 767-771 (2003).

[24]. Hwang BK, Lee JY, Kim BS, Moon SS. Isolation, structure elucidation, and antifungal activity of a manumycin-type antibiotic from *Streptomyces flaveus*. *J Agric Food Chem*, 44: 3653-3657 (1996).