

Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ ban đầu của các thành phần môi trường tinh bột – casein lên sự tạo kháng sinh kháng methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* bởi *Streptomyces flaveus*

Phan Thị Huyền*, Phạm Hữu Lộc

Tóm tắt—*Staphylococcus aureus* là tụ cầu khuẩn có khả năng gây ra nhiều bệnh nguy hiểm đe dọa tính mạng con người. Hiện nay, sự kháng đa thuốc của *S. aureus* đang là một vấn đề nan giải đối với ngành y tế Việt Nam và một số nước khác trên thế giới. Xạ khuẩn *Streptomyces flaveus* phân lập được trước đây từ đất vùng ven thành phố Hồ Chí Minh có khả năng tạo kháng sinh kháng lại methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA). Trong bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả khảo sát ảnh hưởng của nồng độ ban đầu của các thành phần môi trường tinh bột – casein lên sự tạo kháng sinh kháng MRSA của xạ khuẩn. Khi tăng nồng độ tinh bột, lượng kháng sinh tạo thành cũng tăng theo. Trong khi đó, nồng độ casein cao ức chế sự tạo thành kháng sinh của xạ khuẩn. Đối với KNO₃ và NaCl, cả hai đều cần thiết cho sự tạo thành kháng sinh. Mặc dù tăng cao nồng độ KNO₃ không làm thay đổi lượng kháng sinh kháng MRSA, tăng cao nồng độ NaCl lại làm giảm đi lượng kháng sinh này.

Index Terms—Xạ khuẩn, kháng sinh, *Staphylococcus aureus*, MRSA, *Streptomyces flaveus*, tinh bột – casein.

1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Staphylococcus aureus là vi khuẩn Gram dương, tế bào có hình cầu, thường kết hợp lại với nhau

Ngày nhận bản thảo: 12-5-2017, ngày chấp nhận đăng: 05-11-2017

Nghiên cứu này được tài trợ bởi trường Trường Đại học Bách khoa, ĐHQG-HCM trong khuôn khổ đề tài mã số T-KTHH-2016-41.

Phan Thị Huyền, Phạm Hữu Lộc – Trường Đại học Bách Khoa – ĐHQG-HCM. Email: huyencnshbk@hcmut.edu.vn

thành tụ cầu. Trên bề mặt môi trường thạch, khuẩn lạc *S. aureus* có màu vàng nên được gọi là tụ cầu vàng. Tụ cầu vàng có khả năng gây ra rất nhiều bệnh nguy hiểm khác nhau đe dọa nghiêm trọng tính mạng của con người [1, 2]. Sự xuất hiện của các biến thể kháng thuốc của *S. aureus* hiện nay đang là một vấn đề được báo động đối với ngành y tế Việt Nam cũng như một số nước khác trên thế giới, như methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) – *S. aureus* kháng methicillin và vancomycin-resistant *S. aureus* (VRSA) – *S. aureus* kháng vancomycin [3-5]. 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, ... [6]. Linezolid – một kháng sinh tổng hợp – từng được sử dụng thay thế nhưng lại gây suy tủy [7]. Tương tự, daptomycin – kháng sinh tạo bởi *Streptomyces roseosporus* – cũng gây tác dụng phụ đối với cơ xương [8]. Do đó, 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 đối với sức khỏe con người là thực sự cần thiết.

Trước đây, chúng tôi đã phân lập được xạ khuẩn có khả năng tạo kháng sinh kháng MRSA từ đất vùng ven thành phố Hồ Chí Minh. Xạ khuẩn này được định danh là *Streptomyces flaveus* trong một nghiên cứu trước đây của chúng tôi [9]. 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 [10]. Hợp chất có khả năng kháng các mốc này thuộc loại manumycin – một kháng sinh có hoạt tính chống ung thư [11],

nhưng manumycin này lại không có khả năng kháng nấm men và vi khuẩn [12]. Khả năng kháng vi khuẩn của *S. flaveus* cho đến nay vẫn chưa được nghiên cứu và báo cáo, và do đó việc xác định các kháng sinh tạo ra bởi xạ khuẩn này cho mục đích điều trị các bệnh do vi khuẩn MRSA gây ra sẽ thực sự có ý nghĩa. Nhằm mục đích này, chúng tôi đã tiến hành lên men xạ khuẩn để tiến tới thu nhận và xác định cấu trúc phân tử của các kháng sinh này.

Trong bài báo này, chúng tôi trình bày ảnh hưởng của các nồng độ ban đầu của các thành phần môi trường tinh bột – casein lên lượng kháng sinh kháng MRSA tạo ra bởi *S. flaveus* phân lập được.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Vật liệu

2.1.1 Nguồn xạ khuẩn

Xạ khuẩn *S. flaveus* phân lập được trước đây từ đất vùng ven thành phố Hồ Chí Minh [9].

2.1.2 Vi sinh vật kiểm định

Vi khuẩn kiểm định là vi khuẩn MRSA của phòng thí nghiệm Công nghệ sinh học, Trường Đại học Bách khoa, ĐHQG-HCM.

2.1.3 Môi trường nuôi cấy

Môi trường sử dụng để bảo quản và lên men xạ khuẩn là môi trường tinh bột – casein, có thành phần như sau: tinh bột hòa tan (10 g/l), casein (0,3 g/l), KNO_3 (2,0 g/l), NaCl (2,0 g/l), K_2HPO_4 (2,0 g/l), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,05 g/l), CaCO_3 (0,02 g/l), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,01g/l), pH 6,8±0,2.

Môi trường sử dụng để bảo quản, nuôi cấy và xác định khả năng kháng vi khuẩn MRSA là môi trường 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.

Các môi trường được hấp tiệt trùng ở 121°C trong thời gian 15 phút. Đối với các môi trường thạch được sử dụng cho việc bảo quản giống vi sinh vật và việc xác định khả năng kháng vi khuẩn MRSA của dịch lên men xạ khuẩn, 20 g/l thạch được thêm vào môi trường trước khi hấp tiệt trùng.

2.2 Phương pháp

2.2.1 Lên men xạ khuẩn

Bào tử xạ khuẩn trên môi trường thạch tinh bột –

casein được cấy vào bình tam giác 250ml chứa 30 ml môi trường lỏng tinh bột – casein, lên men lắc tròn 180 rpm ở nhiệt độ 30°C trong 24 h. 5 ml giống xạ khuẩn này được cấy sang các bình tam giác 250 ml chứa 100 ml môi trường lỏng tinh bột – casein với các nồng độ tinh bột ban đầu khác nhau là 5, 10, 15, 20 và 25 g/l, lắc tròn 180 rpm ở nhiệt độ 30°C. Cứ sau mỗi 24 h, 2 ml dịch lên men được lấy ra từ mỗi bình, đem ly tâm ở 12000 rpm, thu lấy phần dịch để định lượng kháng sinh trên môi trường thạch đĩa.

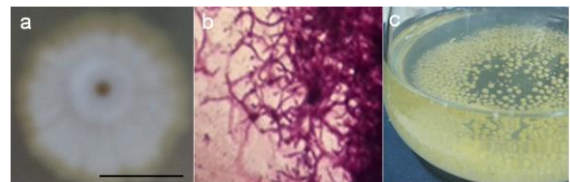
2.2.2 Định lượng kháng sinh

Phương pháp khuếch tán kháng sinh trên môi trường thạch đĩa được áp dụng để xác định lượng kháng sinh có trong dịch lên men sau ly tâm. Đĩa Petri có đường kính 9 cm chứa 20 ml thạch LB đã tiệt trùng được cấy trải với MRSA đã nuôi trong môi trường lỏng LB ở 37°C trong 24 h, sau đó các lỗ có đường kính 6 mm được đục xuyên bề mặt thạch, cho vào lỗ từng 50µl dịch lên men đã ly tâm, đợi dịch thấm hết vào thạch rồi thêm tiếp cho đến khi cho hết 300 µl. Mỗi mẫu dịch được lặp 3 lần. Để dịch thấm hết vào thạch, các đĩa được ủ ở 37°C trong 24-48 h. Vòng kháng khuẩn được đo bằng thước chia vạch đến milimet.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.

3.1 Hình thái xạ khuẩn *S. flaveus*

S. flaveus có khả năng xuất hiện thành khuẩn lạc trên môi trường thạch tinh bột – casein chỉ sau ba ngày nuôi ở 30°C. Bào tử màu trắng sẽ xuất hiện trên khuẩn lạc một vài ngày sau đó tùy theo mật độ khuẩn lạc được cấy trên mặt thạch. Dưới kính hiển vi quang học, khuẩn ty của xạ khuẩn nhuộm màu tím của tím tinh thể. Trong môi trường nuôi cấy lỏng, sinh khối xạ khuẩn có hình khối tròn, màu trắng ngà, lớn dần theo thời gian (Hình 1), rồi sau đó phân rã.



Hình 1. Hình thái xạ khuẩn *S. flaveus*. (a) Khuẩn lạc trên môi trường thạch tinh bột – casein, thanh bar 0,5 cm; (b) Khuẩn ty nhuộm Gram dưới kính hiển vi quang học, (c) Sinh khối trong môi trường lỏng tinh bột – casein, dung tích bình 250 ml.

3.2 Ảnh hưởng của nồng độ tinh bột ban đầu lên khả năng tạo kháng sinh kháng MRSA

Các bình tam giác 250 ml chứa 100 ml môi trường lỏng tinh bột – casein với các nồng độ tinh bột ban đầu khác nhau được lên men như mô tả ở Mục 2.2.1. Khả năng kháng MRSA của dịch ly tâm sau lên men được xác định như mô tả ở Mục 2.2.2. Hình 2 cho thấy khi tăng nồng độ tinh bột ban đầu, lượng kháng sinh tạo ra cũng tăng theo, thấy rõ nhất vào ngày thứ ba của quá trình lên men. Vào ngày thứ ba của quá trình lên men, đường kính vòng kháng khuẩn thu được với nồng độ tinh bột ban đầu 25 g/l là $22 \pm 1,3$ mm.

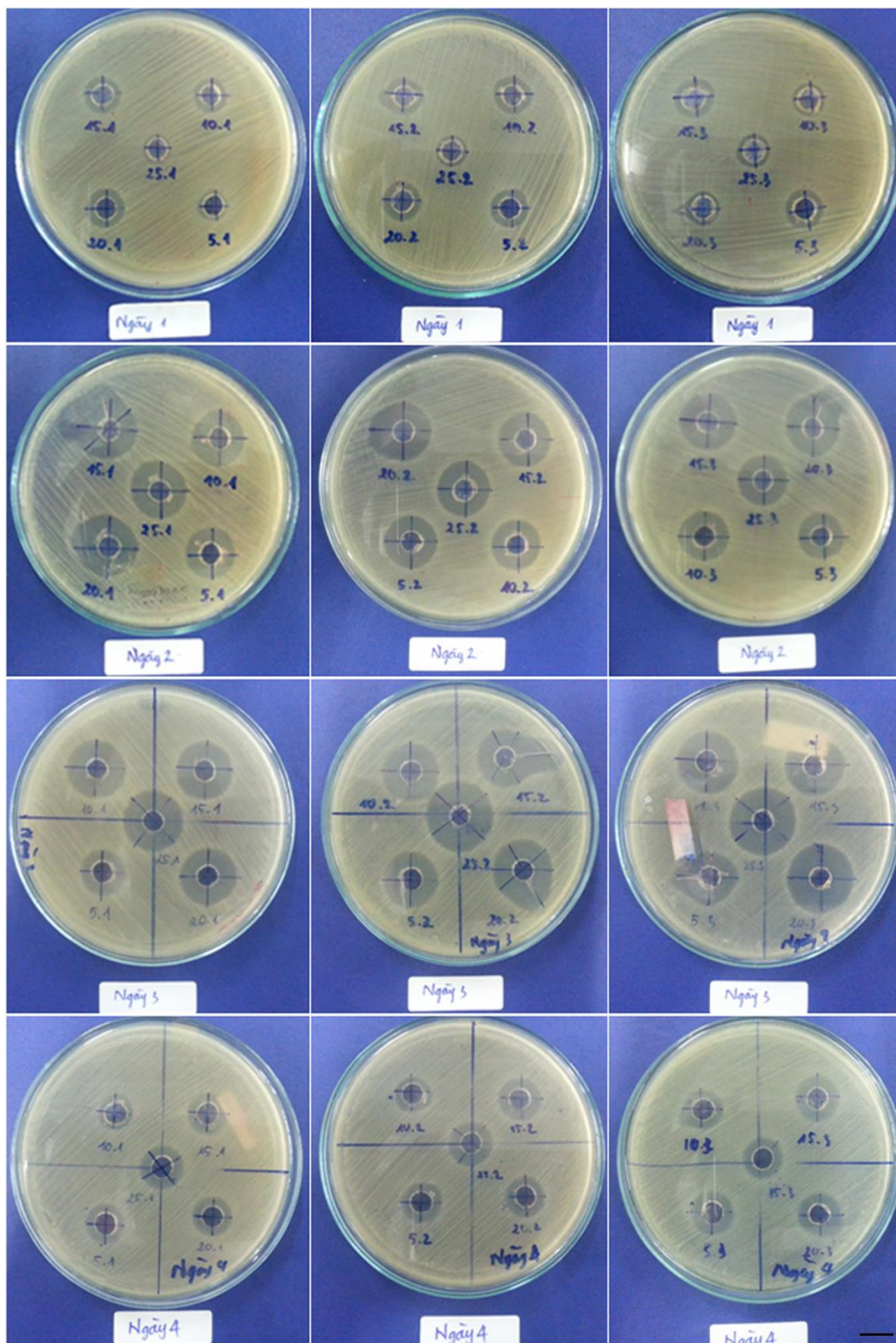
Nồng độ của nguồn carbon có ảnh hưởng đến sự tạo thành kháng sinh ở các *Streptomyces*. Glucose tăng cường sự sinh tổng hợp kháng sinh ở một số loài trong khi nó cũng có thể ức chế sự sinh tổng hợp kháng sinh ở một số loài khác [13]. Với *S. flaveus*, sự tăng lượng kháng sinh tạo ra khi tăng nồng độ tinh bột ban đầu là một điểm lợi, vì tinh bột là loại nguyên liệu dễ kiếm và có giá rẻ nên được sử dụng cho việc sản xuất kháng sinh từ xạ khuẩn này. Tuy vậy, chúng tôi cần nghiên cứu thêm để xác định ngưỡng nồng độ tinh bột ban đầu tại đó lượng kháng

sinh tạo thành đạt tối đa. Mặt khác, việc sử dụng các nguồn carbon khác nhau trong các môi trường khác nhau trong lên men tạo kháng sinh của xạ khuẩn này cũng cần được nghiên cứu thêm.

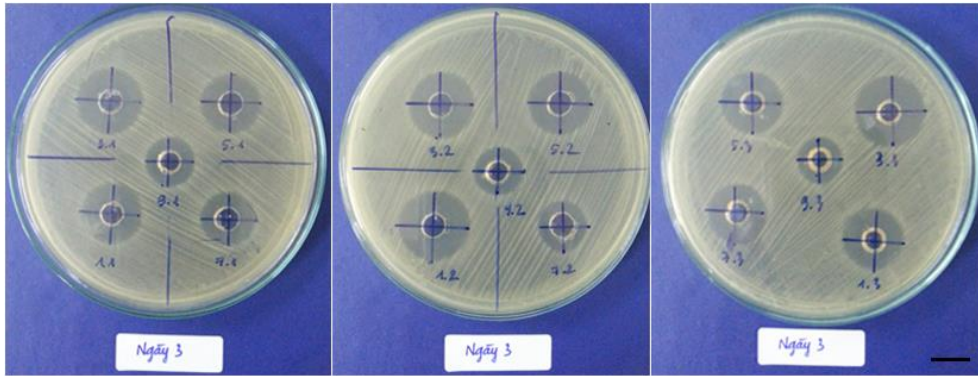
Theo thời gian lên men, lượng kháng sinh tăng rồi sau đó giảm đi ở tất cả các nồng độ tinh bột ban đầu. Vào ngày thứ tư của quá trình lên men, lượng kháng sinh giảm đi thấy rõ. Hiện tượng lượng kháng sinh giảm đi sau quá trình tăng cũng được quan sát thấy ở quá trình lên men tạo kháng sinh bởi *Streptomyces hygroscopicus* [14]. Hiện tượng này có thể là do xạ khuẩn sử dụng kháng sinh để cung cấp năng lượng cho tế bào khi nguồn dinh dưỡng bên trong môi trường lên men đã trở nên cạn kiệt.

3.3 Ảnh hưởng của nồng độ ban đầu của nitơ hữu cơ và vô cơ lên khả năng tạo kháng sinh kháng MRSA

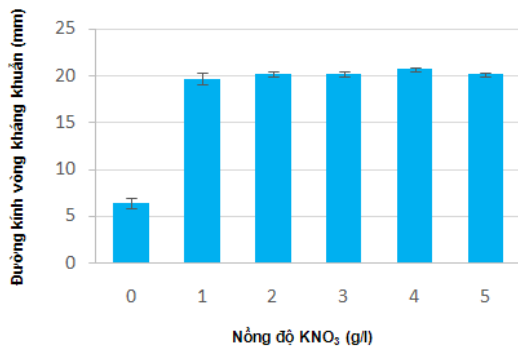
Đối với nitơ hữu cơ casein, các bình tam giác 250ml mỗi bình chứa 100 ml môi trường lỏng tinh bột – casein có nồng độ tinh bột ban đầu là 25 g/l và các nồng độ casein ban đầu là 0,1, 0,3, 0,5, 0,7 và 0,9 g/l được lên men như trong Mục 3.2. Dịch lên men được thu nhận vào ngày thứ ba của quá trình lên men.



Hình 2. Ảnh hưởng của nồng độ tinh bột ban đầu lên lượng kháng sinh kháng MRSA tạo thành theo thời gian lên men. Dịch lên men sau mỗi 24 h được thử kháng lặp 3 với MRSA. Các con số 5, 10, 15, 20 và 25 chỉ các nồng độ ban đầu (g/l) của tinh bột. Các con số 1, 2 và 3 sau các dấu chấm chỉ 3 mẫu lặp kháng MRSA cho mỗi mẫu dịch lên men. Đường kính vòng kháng khuẩn đo được bao gồm cả đường kính lỗ thạch. Thanh bar 1 cm.



Hình 3. Ảnh hưởng của nồng độ casein ban đầu lên lượng kháng sinh tạo thành. Các con số 1, 3, 5, 7 và 9 chỉ nồng độ ban đầu của casein tương ứng là 0,1, 0,3, 0,5, 0,7 và 0,9 g/l. Các con số 1, 2 và 3 sau các dấu chấm chỉ 3 mẫu lặp lại cho mỗi mẫu dịch lên men. Đường kính vòng kháng khuẩn bao gồm cả đường kính lỗ thạch. Thanh bar 1 cm.



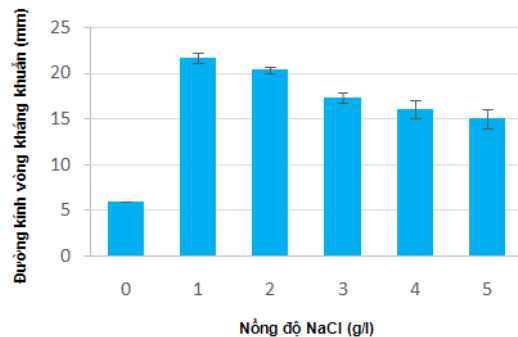
Hình 4. Ảnh hưởng của nồng độ KNO₃ ban đầu lên lượng kháng sinh tạo thành vào ngày thứ ba của quá trình lên men. Đường kính vòng kháng khuẩn bao gồm cả đường kính lỗ thạch. Thanh sai số được xác định từ các số đo lặp 3 lần (xem Mục 2.2.2).

Kết quả khảo sát cho thấy khả năng kháng MRSA của dịch lên men cao nhất ở nồng độ casein ban đầu là 0,3 g/l. Dịch lên men có nồng độ casein ban đầu là 0,7 và 0,9 g/l cho khả năng kháng MRSA giảm đi thấy rõ so với các dịch có nồng độ casein ban đầu thấp hơn (Hình 3).

Đối với nitơ vô cơ KNO₃, các thí nghiệm được khảo sát giống như đối với casein, với các nồng độ KNO₃ ban đầu là 1, 2, 3, 4 và 5 g/l. Kết quả khảo sát cho thấy KNO₃ với các nồng độ ban đầu khác nhau không ảnh hưởng đến lượng kháng sinh kháng MRSA tạo thành. Tuy nhiên, kháng sinh kháng MRSA không xuất hiện rõ ràng khi vắng mặt KNO₃ ban đầu trong môi trường lên men (Hình 4). Điều này chứng tỏ rằng KNO₃ cần thiết cho sự tạo thành kháng sinh kháng MRSA. Tuy vậy, các nồng độ

KNO₃ lớn hơn 1 g/l không làm thay đổi nhiều đến khả năng tạo kháng sinh này của xạ khuẩn.

3.4 Ảnh hưởng của nồng độ NaCl ban đầu lên khả năng tạo kháng sinh kháng MRSA



Hình 5. Ảnh hưởng của nồng độ NaCl ban đầu lên lượng kháng sinh tạo thành vào ngày thứ ba của quá trình lên men. Đường kính vòng kháng khuẩn bao gồm cả đường kính lỗ thạch. Thanh sai số được xác định từ các số đo lặp 3 lần (xem Mục 2.2.2).

Thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của các nồng độ NaCl ban đầu (1, 2, 3, 4, và 5 g/l) lên khả năng tạo kháng sinh kháng MRSA của xạ khuẩn được tiến hành giống như với các nồng độ KNO₃ ban đầu (Mục 3.3). Kết quả khảo sát cho thấy nồng độ NaCl ban đầu 1 g/l cho nhiều kháng sinh nhất. Các nồng độ NaCl ban đầu cao hơn làm giảm lượng kháng sinh tạo thành. Cũng giống như KNO₃, khi NaCl vắng mặt trong môi trường lên men, kháng sinh kháng MRSA hầu như không được tạo thành (Hình 5).

4 KẾT LUẬN.

Kết quả của nghiên cứu này cho thấy các thành phần tinh bột, casein, KNO_3 và NaCl của môi trường tinh bột – casein đều có ảnh hưởng lên khả năng tạo kháng sinh kháng MRSA của xạ khuẩn *S. flaveus*. Tinh bột ảnh hưởng tích cực đến lượng kháng sinh tạo thành. Tuy nhiên, cần nghiên cứu thêm để xác định ngưỡng nồng độ ban đầu của tinh bột ức chế khả năng tạo kháng sinh của xạ khuẩn. Các nồng độ casein cao hơn 0,3 g/l ức chế sự tạo thành kháng sinh kháng MRSA. NaCl , cũng như KNO_3 , cần thiết cho sự tạo kháng sinh của xạ khuẩn. Nồng độ NaCl ban đầu càng cao hơn 1 g/l, lượng kháng sinh kháng MRSA tạo ra càng ít đi, trong khi sự khác nhau về nồng độ KNO_3 ban đầu từ 1 đến 5 g/l hầu như không tạo ra sự khác nhau về lượng kháng sinh tạo thành.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] 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).
- [2] Al-Ahmadi RS *et al.* Invasiveness and risk factors for community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)". *EC Bacteriol Virol Res*, 2(5): 199-208 (2017).
- [3] 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).
- [4] 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).
- [5] Drees M1, Boucher H. New agents for *Staphylococcus aureus* endocarditis. *Curr Opin Infect Dis*, 19:544-550 (2006).
- [6] Weigel LM, 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).
- [7] Gorchynski J, Rose JK. Complications of MRSA treatment: Linezolid-induced myelosuppression presenting with pancytopenia. *West J Emerg Med*, 9: 177-178 (2008).
- [8] 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).
- [9] Phan Thị Huyền, Huỳnh Thu, Phan Ngọc Uyên Phương, Võ Thị Ly Tao. Xạ khuẩn phân lập từ đất vùng ven thành phố Hồ Chí Minh: nguồn kháng sinh tiềm năng. *Tạp chí Phát triển Khoa học & Công nghệ*, 18 (K3-2015): 78-84 (2015).
- [10] 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).
- [11] 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).
- [12] 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).
- [13] Sánchez SS, Chávez A, Forero A, García-Huante Y, Romero A, Mauricio Sánchez M, Rocha D, Sánchez B, Ávalos M, Guzmán-Trampe S, Rodríguez-Sanoja R, Langley E, Ruiz B. Carbon source regulation of antibiotic production. *J Antibiot*, 63: 442-459 (2010).
- [14] Ilić S, Konstantinović S, Veljković VB, Savić DB, Gojđić-Cvijović GD. The impact of different carbon and nitrogen sources on antibiotic production by *Streptomyces hygroscopicus* CH-7. *Current research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, 1337-1342. A. Méndez-Vilas (Ed.), Formatex Research Center, Spain (2010).

Phan Thị Huyền - Hiện là giảng viên Bộ môn Công nghệ Sinh học, Khoa Kỹ thuật Hóa học, Trường Đại học Bách Khoa – ĐHQG-HCM. Email: huyencnshbk@hcmut.edu.vn.

Phạm Hữu Lộc – Trường Đại học Bách Khoa – ĐHQG-HCM.

Study on effects of the initial concentrations of ingredients in the starch – casein medium on production of antibiotics against the methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by *Streptomyces flaveus*

Phan Thi Huyen*, Pham Huu Loc
Ho Chi Minh city University of Technology, VNU-HCM
Corresponding author: huyencnshbk@hcmut.edu.vn

Received: 12-5-2017; Accepted: 05-11-2017

Abstract—The bacterium *Staphylococcus aureus* is able to cause many diseases that are risky to human life. At present, the resistance of *S. aureus* to multiple antibiotics is a very difficult problem for healthcare industry in Vietnam and some other countries in the world. *Streptomyces flaveus*, an actinomycete isolated previously from the adjacent area of Ho Chi Minh City, is able to produce antibiotics against the methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA). In this paper, we present the results of the investigation on effects of the initial concentrations of different ingredients in the starch – casein medium on fermentation by *S. flaveus* for production of antibiotics against the MRSA. While increasing the starch concentration, antibiotics produced were increased. Meanwhile, high concentrations of casein inhibited the actinomycete to produce antibiotics. For KNO₃ and NaCl, both were necessary for the antibiotic production. Though the increase in KNO₃ concentration did not change the production of antibiotics against MRSA, the increase in NaCl concentration reduced the antibiotic production.

Index Terms—Actinomycetes, antibiotics, *Staphylococcus aureus*, MRSA, *Streptomyces flaveus*, starch – casein.