

KHẢO SÁT KHẢ NĂNG PHỐI HỢP *PROBIOTIC* VI KHUẨN *BACILLUS SUBTILIS* VỚI *LYSOZYME* LÀM CHẾ PHẨM ĐIỀU TRỊ NHIỄM KHUẨN MŨI – HỌNG

NGUYỄN THANH TỐ NHI*, TRẦN THU HOA**

ĐẶT VẤN ĐỀ

Bacillus subtilis được dùng khá phổ biến từ lâu làm chế phẩm probiotic chữa rối loạn tiêu hóa và gần đây được nghiên cứu về khả năng kháng nhiễm khuẩn mũi - họng [3]. Lysozyme có tác dụng diệt vi khuẩn gram dương và tiêu hủy mucoprotein, kháng virus, ... được dùng riêng rẽ hoặc phối hợp với kháng sinh để điều trị các bệnh nhiễm trùng như viêm họng, viêm xoang, viêm nha chu,...[8]. Nhằm góp phần làm tăng hiệu quả điều trị nhiễm khuẩn đường mũi - họng và giảm áp lực sử dụng kháng sinh, đề tài khảo sát khả năng phối hợp vi khuẩn *B. subtilis* với lysozyme làm chế phẩm điều trị nhiễm khuẩn mũi - họng được tiến hành. Lysozyme trong phối hợp sẽ diệt bớt vi khuẩn gây bệnh, tạo điều kiện cho bào tử *B. subtilis* để kháng lysozyme có thể tăng trưởng và cạnh tranh hữu hiệu với các vi khuẩn, ngược lại *B. subtilis* giúp khắc phục tác dụng phụ gây rối loạn tiêu hóa của lysozyme. Hai vấn đề gồm (i) khả năng đề kháng của bào tử *B. subtilis* trong lysozyme và (ii) khả năng kháng khuẩn của từng thành phần riêng rẽ và của phối hợp được đưa ra tìm giải đáp trong phạm vi đề tài này.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vi khuẩn: Các chủng vi khuẩn sử dụng trong nghiên cứu này được liệt kê trong Bảng 1.

Bảng 1. Các chủng vi sinh vật sử dụng.

TT	Tên chủng*	Đặc điểm	Môi trường thích hợp
1	<i>Bacillus subtilis</i> PY79 ^a	Hoang dại, nguyên dưỡng	LB, DSM
2	<i>Staphylococcus aureus</i> ^b	Đề kháng Ery	MHA, TSB
3	<i>S. aureus</i> ATCC 43300	Đề kháng Me, Ery, Cm	MHA, TSB
4	<i>Streptococcus pyogenes</i> ^c	Đề kháng cL	BA
5	<i>Haemophilus influenzae</i> ^b	Đề kháng Cl, Am, Ox, cL	BA, CA
6	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231		MHA, Sabouraud

Am = Ampicillin, Cl = Chloramphenicol, Ery = Erythromycin, Me = Methicillin,

Ox = Oxacillin, cL = clindamycin, St = Streptomycin

* Nguồn gốc của chủng: ^aYoungman và cs 1984, ^bBệnh viện Phạm Ngọc Thạch,

^cBộ môn Vi sinh-Ký sinh – Khoa Dược, ĐHYD TP. HCM

(*) Sinh viên khóa 2004- 2008, Khoa CNSH, Trường Đại học Mở TP. Hồ Chí Minh

(**) PGS. TS Trường ĐH Khoa học tự nhiên TP. Hồ Chí Minh

Môi trường: Luria Bertani (LB), Difco sporulation medium (DSM), Trypticase soy broth (TSB), Sabouraud, Nutrient broth (NB), Nutrient agar (NA), Mueller-Hinton-Agar (MHA), Thạch máu (BA), Thạch sô-cô-la (CA).

- **Thử nghiệm khả năng chịu đựng lysozyme của *B. subtilis*:** bào tử *B. subtilis* được chuẩn bị theo quy trình của Nicholson và Setlow [5] và đã mô tả tóm tắt trong công bố trước đây [2]. Huyền dịch bào tử *B. subtilis* được trộn với 5 ml dịch hòa tan 1 viên ngậm lysopaine (Boehringer ingelheim international GmbH) trong NaCl 0,9% hoặc trong dung dịch lysozyme 100 mg/ml, hoặc trong dung dịch NaCl 0,9%, sao cho mật độ *B. subtilis* đạt khoảng 10^8 CFU/ml. Các hỗn hợp này được ủ ở 37°C, có lắc hoặc không lắc. Tại các thời điểm 0 giờ, 24 giờ, 1 tuần, 1 tháng và 3 tháng lấy mẫu pha loãng trải đếm theo phương pháp đếm khuẩn lạc [7].

- **Thử nghiệm khả năng đối kháng vi sinh vật của *B. subtilis*.** Áp dụng phương pháp cấy vạch *B. subtilis* trên bản thạch như đã mô tả trước đây [1, 3].

- **Thử nghiệm khả năng kháng khuẩn của lysozyme.** Xác định MIC của lysozyme bằng phương pháp pha loãng trên bản thạch [4]. Lysozyme được pha loãng trong NaCl 0,9% và lọc vô khuẩn (miliopore 0,22 μ m), tiếp theo cho vào môi trường thích hợp cho *B. subtilis* và vi sinh vật cần khảo sát, sao cho nồng độ lysozyme trong hộp số 1 đến hộp số 10 lần lượt là 100 mg/ml, 50 mg/ml, 25 mg/ml, 12,5 mg/ml, 6,25 mg/ml, 3,125 mg/ml, 1,563 mg/ml, 0,781 mg/ml, 0,391 mg/ml và 0 mg/ml. Để thạch đông khoảng 10 phút, chấm dịch vi khuẩn pha trong NaCl 0,9% có mật độ $1-3 \cdot 10^8$ CFU/ml lên đĩa. Ủ ở 37°C trong 24 – 48 giờ, quan sát và xác định đĩa có nồng độ lysozyme mà không có vi khuẩn mọc.

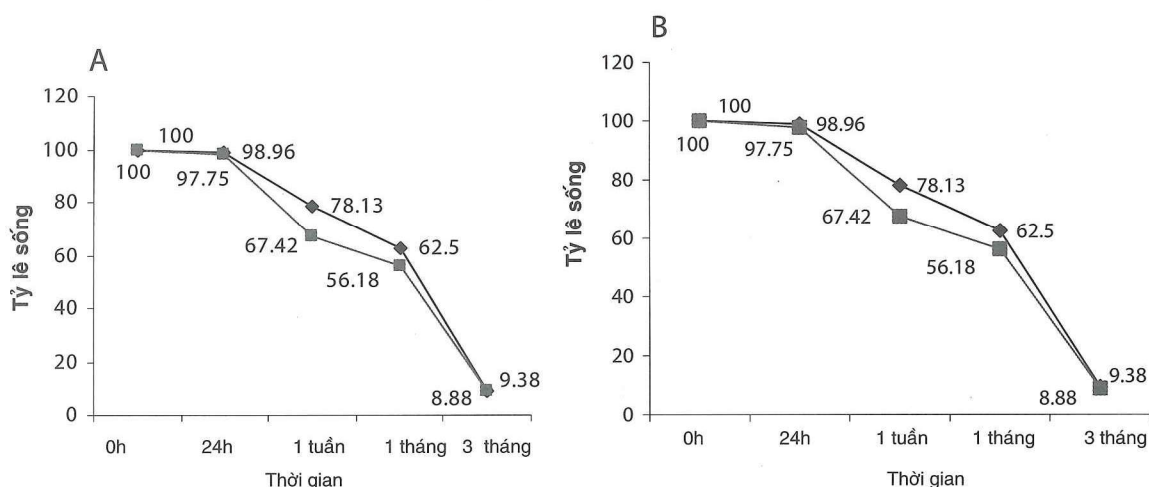
- **Thử nghiệm khả năng kháng khuẩn của phối hợp.** Tương tự thử nghiệm xác định MIC của lysozyme, chỉ khác là bổ sung thêm dịch lọc vô trùng của canh cấy 24 giờ của *B. subtilis* vào môi trường với lượng 0,33 ml/ml. Cách chuẩn bị dịch lọc vô trùng của canh cấy 24 giờ *B. subtilis* đã được mô tả trước đây [3].

KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

Khả năng chịu đựng lysozyme của bào tử *B. subtilis*.

Trong hỗn hợp với lysopaine hoặc lysozyme 100 mg/ml, bào tử *B. subtilis* chỉ ổn định trong khoảng 1 tuần (Hình 1A) đến 1 tháng (Hình 1B) với tỉ lệ sống khoảng 60%. Trong thử nghiệm khả năng đề kháng của bào tử *B. subtilis* trong lysozyme này, điều kiện nhiệt độ 37°C là thích hợp nhất cho hoạt động của lysozyme và lắc liên tục để tăng sự tiếp xúc đã được chọn lựa. Ngoài ra, điều kiện nhiệt độ này và lắc tạo thông khí cũng là đề kháng thích hợp cho sự nảy mầm của bào tử *B. subtilis* thành dạng sinh dưỡng, không có khả năng đề kháng với tác động thủy giải của enzyme trên liên kết glucosid của vách tế bào. Như vậy, những điều kiện đã chọn lựa về nhiệt độ, lắc liên tục và đặc biệt là nồng độ rất cao của lysozyme (100 mg/ml) là những điều kiện khắc khe nhất có thể có khi bảo quản phối hợp *B. subtilis* và lysozyme. Kết quả về tỉ lệ sống sót của *B.*

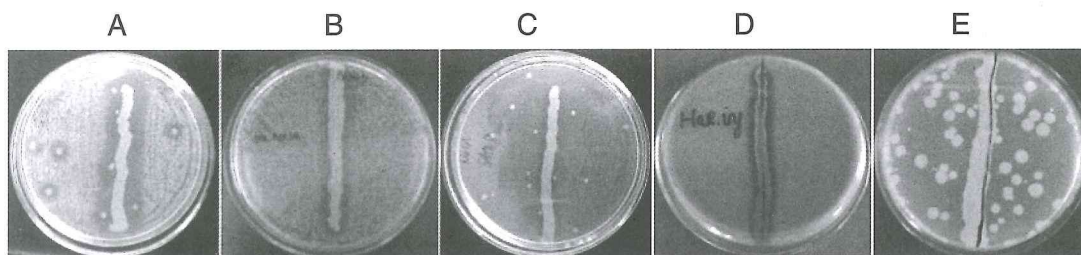
subtilis ở điều kiện này là 73% sau 1 tuần và 60% sau 1 tháng theo chúng tôi là khá khả quan.



Hình 1. Tỷ lệ sống của *B. subtilis* trong hỗn hợp với lysopaine (A) và trong dung dịch lysozyme 100 mg/ml (B). *B. subtilis* nguyên liệu dạng huyền dịch ủ 37°C (—◆—), lắc ở 37°C (—■—).

Khả năng kháng khuẩn của *B. subtilis*

Dịch tiết của *B. subtilis* ức chế sự phát triển của *Staphylococcus aureus*, *S. aureus* đề kháng methicillin (MRSA), *Streptococcus pyogenes* và *C. albicans*, nhưng hầu như không tác động trên *Haemophilus influenzae* (Hình 2). Trường hợp *H. influenzae* có thể giải thích là do trong chất tiết của *B. subtilis* có một số kháng sinh bị phân hủy bởi máu [6], mà thí nghiệm lại được tiến hành trên thạch nâu - môi trường tốt nhất cho sự phát triển của *H. influenzae*.

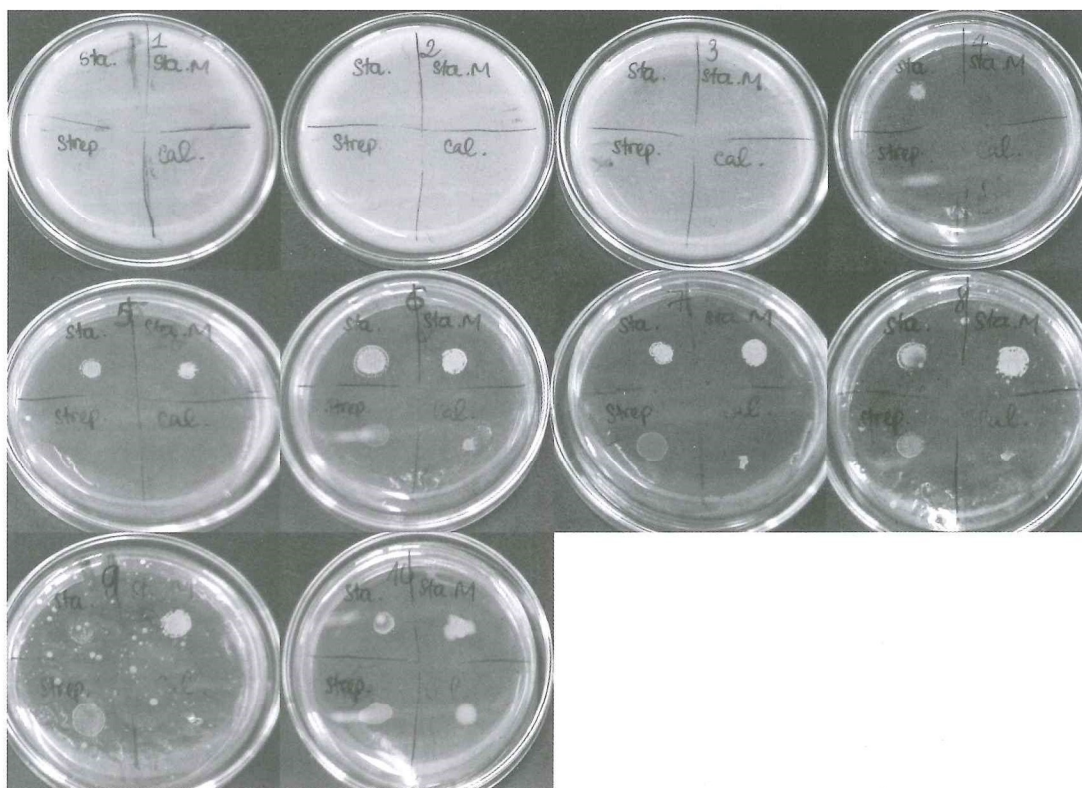


Hình 2. Tính kháng khuẩn bởi chất tiết của *B. subtilis*. (A) *Staphylococcus aureus*, (B) MRSA, (C) *S. pyogenes*, (D) *H. influenzae* và (E) *C. albicans*

Khả năng kháng khuẩn của lysozyme

Lysozyme có tính chất kháng khuẩn, đặc biệt trên vi khuẩn gram dương. Trong nghiên cứu này, tính chất đối kháng của lysozyme với vi sinh vật gây bệnh mũi – họng được kiểm chứng qua thử nghiệm xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của lysozyme trên *S. aureus*, *S. aureus* đề kháng methicillin (MRSA), *H. influenzae* và *C. albicans*. Kết quả thử nghiệm xác định MIC cho thấy điểm gãy MIC của lysozyme trên *S. aureus* được đọc ở đĩa số 3 tương ứng với nồng độ lysozyme là 25 mg/ml, trên *S. aureus* đề kháng methicillin (MRSA) và *S. pyogenes* được đọc ở đĩa số 4 tương ứng với nồng độ lysozyme là 12,5 mg/ml, và trên *C. albicans* là đĩa số 5 tương ứng với nồng độ lysozyme là 6,25 mg/ml (Hình 3). Thử nghiệm xác định MIC của lysozyme trên *H. influenzae* cho thấy ở đĩa số 1 tương ứng với nồng độ lysozyme là 100 mg/ml vẫn có *H. influenzae* mọc. Kết quả xác định MIC được trình bày trong Bảng 2.

Hình 3. MIC của lysozyme trên vi sinh vật khảo sát.

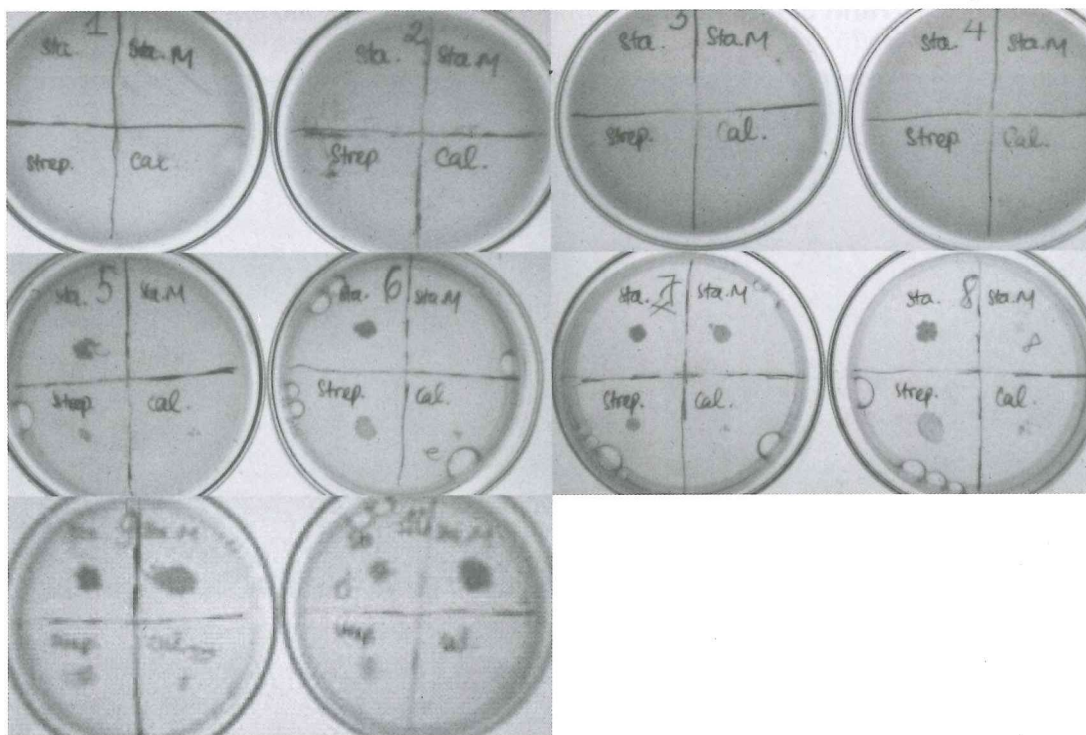


Nồng độ lysozyme được pha loãng dần trong hộp số 1 đến hộp số 10 lần lượt là 100 mg/ml, 50 mg/ml, 25 mg/ml, 12,5 mg/ml, 6,25 mg/ml, 3,125 mg/ml, 1,563 mg/ml, 0,781 mg/ml, 0,391 mg/ml, 0 mg/ml. Kí hiệu trên đĩa: Sta. M là *S. Aureus*, Sta.M là *S. Aureus* đề kháng methicillin, Strep. Là *S. Pyogenes*, Cal. Là *C. albicans*.

Khả năng kháng khuẩn của phối hợp *B. subtilis* với lysozyme

Thử nghiệm xác định MIC của lysozyme trong phối hợp với *B. subtilis* được dùng để đánh giá khả năng kháng khuẩn của phối hợp. Kết quả cho thấy điểm gây MIC của phối hợp *B. subtilis* và lysozyme trên *S. aureus*, *S. pyogenes* và *C. albicans* được đọc ở đĩa số 4 tương ứng với nồng độ lysozyme là 12,5 mg/ml; trên *S. aureus* đề kháng methicillin được đọc ở đĩa số 7 tương ứng với nồng độ lysozyme là 1,563 mg/ml (Hình 4). Như vậy có thể nói phối hợp làm tăng tác dụng trên *S. aureus*, *S. aureus* đề kháng methicillin, tuy nhiên lại bị giảm khả năng ức chế trên *C. albicans*. Ngoài ra, trên *H. influenzae* điểm gây MIC được đọc ở đĩa số 2, tương ứng với nồng độ lysozyme là 50 mg/ml, như vậy phối hợp làm tăng tác dụng trên vi khuẩn này (Bảng 2).

Hình 4. MIC của phối hợp *B. subtilis* và lysozyme trên vi sinh vật khảo sát



Nồng độ lysozyme được pha loãng dần trong hộp số 1 đến hộp số 10 lần lượt là 100 mg/ml 50 mg/ml, 25 mg/ml 12,5 mg/ml 6,25 mg/ml 3,125 mg/ml 1,563 mg/ml 0,781 mg/ml 0,391 mg/ml và 0 mg/ml. Dịch nuôi cấy *B. subtilis* 0,33 ml/ml môi trường ở tất cả các nồng độ lysozyme. Kí hiệu trên đĩa: Sta. là *S. aureus*, Sta.M là *S. aureus* đề kháng methicillin, Strep. là *S. pyogenes*, Cal. là *C. albicans*.

Bảng 2. Kết quả MIC của lysozyme trên vi sinh vật khảo sát

STT	Vi sinh vật	MIC (mg/ml)	
		Riêng rẽ	Phối hợp
1	<i>S. aureus</i>	25	12,5
2	MRSA	12,5	1,563
3	<i>S. pyogenes</i>	12,5	12,5
4	<i>C. albicans</i>	6,25	12,5
5	<i>H. influenzae</i>	>100	50

Từ kết quả thử nghiệm MIC của lysozyme trong phối hợp trong đề tài này, kết hợp với khảo sát của các tác giả trước đây về tác dụng của *B. subtilis* [3], chúng tôi chọn hàm lượng của lysozyme trong phối hợp là 25 mg/ml và hàm lượng của bào tử *B. subtilis* là 10^{10} CFU/ml.

KẾT LUẬN

1) Trong hỗn hợp với lysopaine hoặc lysozyme 100 mg/ml, *B. subtilis* chỉ ổn định được khoảng 1 tuần đến 1 tháng trong khi bào tử *B. subtilis* riêng lẻ vẫn có tỉ lệ sống cao sau thời gian 3 tháng thử nghiệm.

2) Khả năng kháng khuẩn của phối hợp *B. subtilis* với lysozyme tăng lên so với từng thành phần riêng rẽ kể cả trên *H. influenzae* ngoại trừ tác dụng trên *C. albicans*.

3) Lượng lysozyme cần cho vào để phối trộn với *B. subtilis* làm thuốc điều trị bệnh nhiễm mũi - họng là 25 mg/ml và bào tử *B. subtilis* phải có số đơn vị sống tối thiểu là 10^{10} CFU/ml.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Forestier et al., Probiotic activities of *Lactobacillus casei ramosus* invitro adherence to intestinal cell and antimicrobial properties. Res. Microbial 152, 167-173 (2001).
2. Trần Thu Hoa, Lê Thị Bình, Phạm Hùng Vân, Nguyễn Văn Thanh. Điều chế và theo dõi độ ổn định huyền dịch bào tử *Bacillus subtilis* tái tổ hợp. Tạp chí Y học Thành phố, 4, 438-442 (2002).
3. Trần Thu Hoa, Đỗ Thị Hồng Tươi, Nguyễn Thị Ngọc Tuyết và Nguyễn Văn Thanh, Khả năng ức chế vi khuẩn gây bệnh đường hô hấp trên của *Bacillus subtilis*. Tạp chí Dược học, 364, 4, 21-25 (2006).
4. NCCLS, Method of dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, Vol20. No.2, M7 – A5 (2000).

5. Nicholson W. L., Setlow P. Sporulation, germination and outgrowth. In: *Molecular biological methods for Bacillus* (Harwood C. R., Cutting S.), John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, United Kingdom, 27 – 74 (1990).
6. Phạm Ngọc Thạch, 1963, Trùng trùng xupilit trong điều trị. Tạp chí Y học thực hành số 6. Trong tập hợp các công trình nghiên cứu về lao và bệnh phổi của Bác Sĩ Phạm Ngọc Thạch. Viện lao và bệnh phổi. Nhà xuất bản Y học. Hà Nội (1999).
7. Trần Linh Thuộc. Phương pháp phân tích vi sinh vật trong nước, thực phẩm và mỹ phẩm. Nhà xuất bản Giáo Dục (2002).
8. Vidal. NXB OVP Editions du Vidal, 396 (2000).

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, phối hợp probiotic *Bacillus subtilis* có đặc tính chống lại một số vi sinh vật gây bệnh mũi họng đã được chứng minh trước đây với *lysozyme* là một thành phần của hệ miễn dịch bẩm sinh, dùng làm chế phẩm điều trị bệnh nhiễm khuẩn mũi – họng đã được tạo ra. Trước hết, kết quả khảo sát về tỉ lệ sống sót của *B. subtilis* trong *lysozyme* ở 37°C cho thấy tỉ lệ này là 73% sau 1 tuần và 60% sau 1 tháng, nhưng chỉ còn khoảng 9% sau 3 tháng. Bằng thử nghiệm xác định MIC trên môi trường rắn, khả năng kháng khuẩn của phối hợp *B. subtilis* với *lysozyme* được chứng minh là tăng lên so với từng thành phần riêng rẽ, ngoại trừ tác dụng trên *Candida albicans*. Trong phối hợp, thành phần hoạt tính bào tử *B. subtilis* phải có số đơn vị sống tối thiểu là 10^{10} CFU/ml và *lysozyme* là 25 mg/ml.

SUMMARY

In the present study, a combination of probiotic *Bacillus subtilis*, who have antagonistic properties against numbers common nasopharyngeal microbes previously been demonstrated and *lysozyme*, who is a part of the innate immune system for treatment of nasopharyngeal infections was established. First, survival proportion of *B. subtilis* spores in *lysozyme* at 37°C for a week and a month were showed (73% and 60%, respectively). Unfortunately, this proportion was decrease dramatically after three months (around 9%). Our results from the estimation of MICs determined in solid medium showed that *in vitro* antimicrobial effects by the combination were enhanced compare with individual components, except action on *Candida albicans*. We suggest the combination with active ingredient *B. subtilis* spores (at least 10^{10} CFU/ml) and *lysozyme* (25 mg/ml).