

NGHIÊN CỨU SỰ HÌNH THÀNH MÀNG SINH HỌC (BIOFILM) VÀ TÍNH ĐỀ KHÁNG KHÁNG SINH CỦA TỤ CẦU KHUẨN (*Staphylococcus* spp.) SẢN SINH MÀNG SINH HỌC

Nguyễn Văn Giáp*, Cao Thị Bích Phượng

Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

*Tác giả liên hệ: nvgiap@vnua.edu.vn

Ngày nhận bài: 01.10.2018

Ngày chấp nhận đăng: 07.11.2018

TÓM TẮT

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm xác định khả năng hình thành màng sinh học (biofilm) và tính đề kháng kháng sinh của các chủng tụ cầu khuẩn (*Staphylococcus* spp.). Bằng phương pháp định lượng đã xác định được sự hình thành màng sinh học của tụ cầu khuẩn với 51,61% số chủng sản sinh màng sinh học ở mức mạnh, trung bình và yếu. Kết quả nghiên cứu biến động của màng sinh học sản sinh theo thời gian cho thấy tụ cầu khuẩn hình thành màng sinh học tăng dần trong khoảng 4 giờ đến 20 giờ, sau đó giảm trong khoảng 24-40 giờ sau nuôi cấy trên đĩa nhựa 96 giếng. Về khả năng đề kháng kháng sinh, đã xác định được tụ cầu khuẩn nằm trong màng sinh học đề kháng với nồng độ kháng sinh cao gấp 10 lần và 100 lần nồng độ kháng sinh nhỏ nhất ức chế sự phát triển vi khuẩn ở dạng tự do.

Từ khóa: Vi khuẩn, màng sinh học, đề kháng kháng sinh.

Biofilm Forming and Antibiotic Resistance of Biofilm Producing *Staphylococcus* spp.

ABSTRACT

This study was conducted to determine the biofilm formation and antibiotic resistance of the biofilm-forming *Staphylococcus* spp. By the application of microtiter plate test, a quantitative method, the biofilm formation of staphylococci was determined. It was found that 51.61% strains produced biofilms at strong, medium and weak levels. Study on the production of biofilm over time showed that the biofilm formation by staphylococci increased from 4 hours to 20 hours, and then decreased from 24 hours to 40 hours post inoculation in 96-wells plate. In terms of antibiotic resistance, the biofilm producing strains were able to survive under the concentrations of antibiotics of 10 to 100 times higher than the planktonic bacteria.

Keywords: Bacteria, biofilm, antibiotic resistance.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Màng sinh học (biofilm) là tập hợp các vi sinh vật liên kết chặt chẽ với nhau ở trên bề mặt vật chất và được bao bọc bởi chất nền ngoại bào có thành phần chính là polysaccharide (Donlan, 2002). Về thành phần vi sinh vật, màng sinh học có thể bao gồm một hoặc nhiều loài vi khuẩn khác nhau (Thornton *et al.*, 2011; Yanget *al.*, 2011). Về cấu trúc, màng sinh học hoàn chỉnh có tính phân lớp và không đồng nhất (Stewart &

Franklin, 2008), trong đó vùng lõi của màng sinh học bao gồm các tế bào vi khuẩn chuyển sang trạng thái tĩnh, không hoạt động (persister) và chiếm khoảng 1% trong tổng số vi khuẩn cấu thành lớp màng sinh học. Trong nhiều bệnh nhiễm trùng mạn tính, sự hình thành màng sinh học làm cho vi khuẩn rất khó bị tiêu diệt bởi kháng sinh, bởi lẽ khi ngừng dùng thuốc, vi khuẩn ở trạng thái không hoạt động trong màng sinh học (persister cells) sẽ hồi phục và gây nhiễm trùng trở lại. Do được lớp

polysaccharide bao bọc nên vi khuẩn có khả năng bám dính, tồn tại lâu dài trên bề mặt, đề kháng tốt với hiện tượng thực bào và sự tác động của kháng sinh (Costerton *et al.*, 1999). Dưới sự bảo vệ của lớp màng sinh học này, vi khuẩn có thể chống chịu được kháng sinh ở liều cao mà chỉ với liều kháng sinh bằng 1/1.000 liều lượng này vi khuẩn không nằm trong màng sinh học đã bị tiêu diệt (Costerton *et al.*, 1999).

Thuốc kháng sinh được dùng phổ biến để điều trị các bệnh nhiễm khuẩn. Tuy nhiên, cách sử dụng kháng sinh hiện nay được đánh giá là chưa hợp lý, phổ biến nhất là tình trạng lạm dụng kháng sinh (Lê Văn Năm và Hoàng Triều, 2016) đã làm gia tăng tình trạng kháng thuốc của vi khuẩn gây bệnh. Ở vi khuẩn, hiện tượng kháng thuốc kháng sinh do gen kháng kháng sinh quy định và gen này có thể được truyền ngang giữa các chủng vi khuẩn hoặc bởi thực khuẩn thể. Ngoài ra, một số vi khuẩn trong quá trình sinh trưởng và phát triển hình thành màng sinh học nên có khả năng đề kháng cao với kháng sinh mặc dù chúng không mang gen kháng kháng sinh. Ở Việt Nam, đã có một số nghiên cứu mức độ kháng thuốc (Nguyễn Đức Hiền, 2012) và hiện tượng kháng kháng sinh trong mối tương quan với các gen kháng thuốc (Võ Thành Thìn, 2011). Tuy vậy, nghiên cứu khả năng hình thành màng sinh học và đánh giá ảnh hưởng của màng sinh học tới sức đề kháng kháng sinh của các vi khuẩn chưa được thực hiện. Xuất phát từ những vấn đề nêu trên, nghiên cứu này đã chọn tụ cầu khuẩn làm đối tượng nghiên cứu nhằm xác định khả năng hình thành màng sinh học và tìm hiểu tính đề kháng kháng sinh của chúng nằm trong màng sinh học.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

- Chủng vi khuẩn *Staphylococcus* spp. phân lập được ở đường hô hấp của lợn/gà khỏe.

- Môi trường phân lập và nuôi cấy vi khuẩn: thạch thường (1054500500, Merck), tryptic soy broth (BA-257107, BD), yeast extract (LP0021, Oxoid).

- Giấy tẩm kháng sinh (Nam Khoa Biotek)

- Đĩa nhựa 96 giếng vô trùng (SPL Life Sciences).

- Hóa chất dùng trong định lượng màng sinh học: methanol, đệm PBS 1x, dung dịch 1% tím kết tinh (crystal violet), dung dịch cồn 80% có bổ sung 5% sodium dodecyl sulfate.

- Máy đọc ELISA (Biotek, ELx808).

2.2. Phương pháp

2.2.1. Phân lập và thuần khiết tụ cầu khuẩn

Dùng tăm bông vô trùng lấy dịch hầu họng, xoang mũi của gà/lợn khỏe mạnh. Các mẫu tăm bông được bảo quản trong nước thịt và giữ ở 4°C trong suốt quá trình vận chuyển. Các bước phân lập và thuần khiết vi khuẩn hiếu khí được thực hiện theo quy trình thường quy của Bộ môn Vi sinh vật - Truyền nhiễm, Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam.

2.2.2. Định lượng màng sinh học

Định lượng khả năng sản sinh màng sinh học được thực hiện trên đĩa 96 giếng (Stepanovic *et al.*, 2007). Các bước được tóm tắt như sau: (i) nuôi cấy vi khuẩn trong môi trường lỏng bằng đĩa nhựa vô trùng 96 giếng ở 37°C trong vòng 24 giờ; (ii) rửa trôi vi khuẩn không bám vào thành/đáy đĩa bằng PBS 1x; (iii) cố định màng sinh học bằng methanol trong vòng 20 phút ở nhiệt độ phòng; (iv) nhuộm màng sinh học bằng dung dịch tím kết tinh 1%; (v) đo mật độ quang của thuốc nhuộm tím kết tinh được giữ lại trong màng sinh học ở bước sóng 630 nm; (vi) đánh giá mức sản sinh màng sinh học theo Stepanovic *et al.* (2000): $OD_c = OD_{đc} + 3SD$, trong đó OD_c là giá trị OD ngưỡng dương tính (cut-off value), $OD_{đc}$ là giá trị OD trung bình của các mẫu đối chứng âm, SD là độ lệch chuẩn của giá trị OD của các mẫu đối chứng âm. Mẫu dương tính (sản sinh màng sinh học) là mẫu có giá trị $OD_{mẫu} > OD_c$. Mức tạo màng sinh học được đánh giá như sau: không tạo màng sinh học ($OD_{mẫu} \leq OD_c$), tạo màng sinh học yếu ($OD_c < OD_{mẫu} \leq 2OD_c$), tạo màng sinh học trung bình ($2OD_c < OD_{mẫu}$

Nghiên cứu sự hình thành màng sinh học (Biofilm) và tính đề kháng kháng sinh của tụ cầu khuẩn (*Staphylococcus* spp.) sản sinh màng sinh học

$\leq 4ODc$) và tạo màng sinh học mạnh ($4ODc < OD_{mẫu}$).

2.2.3. Nghiên cứu biến động màng sinh học theo thời gian

Để nghiên cứu biến động của sự sản sinh màng sinh học theo thời gian, vi khuẩn được nuôi ở các giếng của đĩa 96 giếng (Stepanovicet al., 2007) trong điều kiện nuôi tĩnh ở 37°C. Sau mỗi 4 giờ, loại bỏ dung dịch trong giếng, rửa để loại bỏ vi khuẩn tự do, cố định màng sinh học hình thành (nếu có) sau mỗi 4 giờ. Định lượng màng sinh học sản sinh tại mỗi thời điểm được thực hiện theo phương pháp trình bày ở mục 2.2.2.

2.2.4. Xác định khả năng đề kháng kháng sinh

Nghiên cứu khả năng đề kháng kháng sinh của vi khuẩn nằm trong màng sinh học được thực hiện theo phương pháp của Ceri et al.(1999) với một số điều chỉnh, tóm tắt như sau: (i) xác định loại kháng sinh mà vi khuẩn phân lập sẵn cảm; (ii) xác định nồng độ kháng sinh nhỏ nhất ức chế sự phát triển của vi khuẩn (MIC); (iii) nuôi cấy tĩnh vi khuẩn ở đĩa 96 giếng, trong vòng 20 giờ để hình thành biofilm; (iv) loại bỏ hoàn toàn vi khuẩn không nằm trong lớp biofilm, giữ lại biofilm; (v) thêm kháng sinh

ở nồng độ cao hơn 10 và 100 lần MIC, lưu kháng sinh trong vòng 12 giờ; (vi) loại bỏ kháng sinh, bổ sung môi trường và nuôi thêm trong vòng 24 giờ ở 37°C; (vii) thu huyền dịch vi khuẩn ở các giếng, đo giá trị OD ở bước sóng 630 nm và xác định tỷ lệ số vi khuẩn ở các nồng độ kháng sinh khác nhau so với giếng đối chứng vi khuẩn (không bổ sung kháng sinh). Các bước kể trên được tóm tắt ở hình 1.

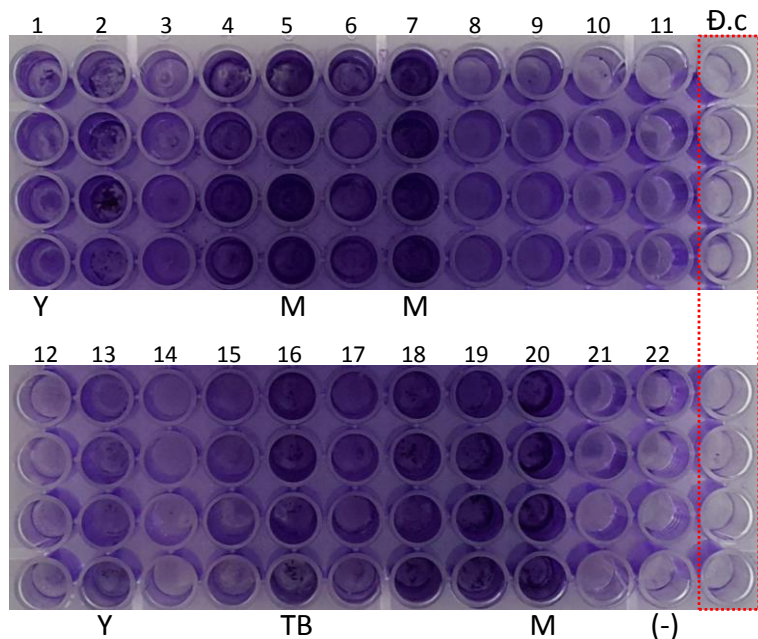
3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Định lượng khả năng sản sinh màng sinh học của tụ cầu khuẩn

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm xác định khả năng sản sinh màng sinh học của vi khuẩn và trả lời câu hỏi vi khuẩn nằm trong màng sinh học đề kháng như thế nào với loại kháng sinh mà vi khuẩn ở dạng tự do sẵn cảm. Do vậy, tụ cầu khuẩn (*Staphylococcus* spp.) đã được lựa chọn để nghiên cứu bởi đây là loại vi khuẩn thường gặp, dễ phân lập bằng môi trường nuôi cấy thông thường, có thể nhận biết thông qua màu sắc khuẩn lạc và hình thái đặc trưng dưới kính hiển vi quang học. Đã có 31 chủng tụ cầu khuẩn thuần khiết được lựa chọn để nghiên cứu khả năng sản sinh màng sinh học, với kết quả được minh họa ở hình 2.



Hình 1. Tóm tắt các bước nghiên cứu khả năng đề kháng kháng sinh



Ghi chú: Mỗi chủng tụ cầu được nuôi ở 4 giếng (theo cột). Các giếng đối chứng âm (Đ.c) được đóng khung. Mẫu hình thành màng sinh học ở mức mạnh (M), trung bình (TB), yếu (Y) và không hình thành (-).

Hình 2. Kết quả kiểm tra khả năng tạo màng sinh học của tụ cầu khuẩn

Kết quả cho thấy 8 giếng đối chứng âm (chỉ có môi trường nuôi vi khuẩn) có hiện tượng giữ màu thuốc nhuộm rất ít. Ở các giếng nuôi cấy vi khuẩn, màu thuốc nhuộm tím kết tinh được giữ lại ở các mức độ khác nhau (Hình 2). Một số mẫu có màu giống đối chứng âm và được đánh giá âm tính (không hình thành màng sinh học); một số mẫu được ký hiệu bằng chữ cái Y, TB và M là các mẫu có hiện tượng giữ màu thuốc nhuộm và được đánh giá dương tính ở các mức lần lượt là yếu, trung bình và mạnh. Hình ảnh màng sinh học sản sinh bởi tụ cầu khuẩn được minh họa ở hình 3.

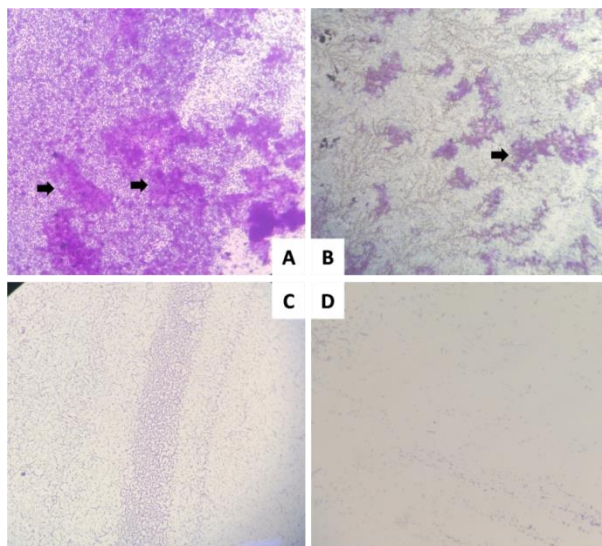
Ở giếng đối chứng âm (Hình 3D) không có sự phát triển của vi khuẩn và không có hiện tượng giữ màu thuốc nhuộm tím kết tinh. Trong khi đó, ở giếng có màng sinh học được đánh giá hình thành ở mức mạnh (Hình 3A) và trung bình (Hình 3B) có thể thấy các mảng/đám vi khuẩn (mũi tên) giữ màu thuốc nhuộm bám ở đáy giếng. Giếng ở hình 3C có sự hình thành màng sinh học ở mức yếu và không quan sát được các mảng vi khuẩn bám ở đáy giếng.

Hiện nay, nghiên cứu khả năng hình thành màng sinh học của vi khuẩn được chia thành hai nhóm chính. Nhóm định tính (phát hiện có/không sự hình thành màng sinh học) gồm: (i) phương pháp ống nghiệm (tube method) được phát triển từ năm 1982 (Christensen, 1982) và một số cải tiến sau này (Almshawit *et al.*, 2014; Paytubi *et al.*, 2014), (ii) phương pháp thử khả năng tạo chất nhày (slime) trên thạch bổ sung đỏ Congo (Freeman *et al.*, 1989; Darwish, 2013). Nhóm định lượng (xác định mức độ hình thành màng sinh học) với phương pháp đĩa nhựa (microtiter plate test) (Stepanovic *et al.*, 2000) được dùng phổ biến. Ngoài ra, đối với *Staphylococcus aureus* và các chủng tụ cầu khuẩn không gây đông vón huyết tương, nghiên cứu sự hình thành màng sinh học có thể được thực hiện gián tiếp thông qua xác định sự có mặt của các gen quyết định khả năng sản sinh màng sinh học, như gen *eno*, *icaA*, *icaD* và *bap* (Darwish, 2013). Trong nghiên cứu này, phương pháp đĩa nhựa (Stepanovic *et al.*, 2007) đã được chọn bởi có thể dùng các hóa chất thông dụng (tím kết tinh) để

Nghiên cứu sự hình thành màng sinh học (Biofilm) và tính đề kháng kháng sinh của tụ cầu khuẩn (*Staphylococcus* spp.) sản sinh màng sinh học

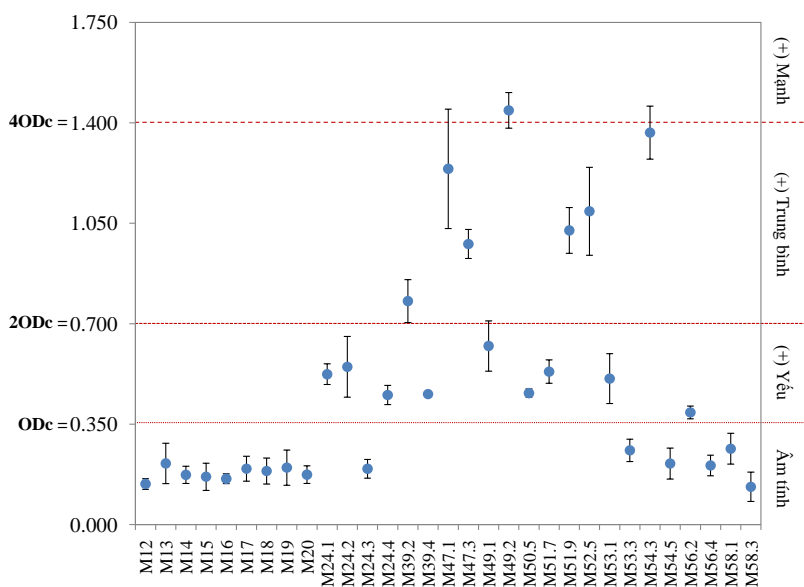
nhuộm màng sinh học và cho phép định lượng khả năng sản sinh màng sinh học ở các mức mạnh, trung bình, yếu và không hình thành. Để làm rõ mức hình thành màng sinh học (phản ánh gián tiếp qua lượng thuốc nhuộm được giữ lại),

mật độ quang của thuốc nhuộm trong mỗi giếng đã được đo và so sánh với giá trị ODc, 2ODc, 4ODc của đối chứng âm để xác định mẫu hình thành/không hình thành, cũng như mức độ sản sinh màng sinh học (Hình 4).



Ghi chú: Sự hình thành màng sinh học được đánh giá ở mức mạnh (A), trung bình (B) và yếu (C) so với đối chứng âm (D) không hình thành màng sinh học.

Hình 3. Màng sinh học nhuộm bằng tím kết tinh 1% (100X)



Ghi chú: Do mỗi chủng vi khuẩn được nuôi ở 4 giếng nên giá trị OD của màu thuốc nhuộm giữ trong màng sinh học được biểu diễn dưới dạng giá trị trung bình (chấm tròn) và khoảng biến động (thanh dọc).

Hình 4. Kết quả định lượng mức sản sinh màng sinh học của tụ cầu khuẩn

Kết quả tính giá trị ngưỡng của đối chứng âm cho giá trị ODc = 0,350. Kết quả ở hình 4 cho thấy có 16/31 mẫu (chiếm 51,61%) có khả năng hình thành màng sinh học ở 3 mức: mạnh, trung bình và yếu. Có 15/31 mẫu được đánh giá là không sản sinh màng sinh học. Tụ cầu khuẩn là loại vi khuẩn thường gặp ở ngoài môi trường, trên cơ thể động vật khỏe mạnh hoặc động vật mắc bệnh. Một số nghiên cứu trên thế giới cho thấy có khoảng 37,5-57% số chủng tụ cầu khuẩn (phân lập được từ nhiều loại mẫu khác nhau) có khả năng sản sinh biofilm (Mirani, 2013;Oliveira *et al.*, 2006). Cùng với nhiều kết quả đã được công bố (Oliveira *et al.*, 2006, Babra *et al.*, 2013), nghiên cứu này cho thấy khả năng sản sinh màng sinh học là phổ biến của tụ cầu khuẩn.

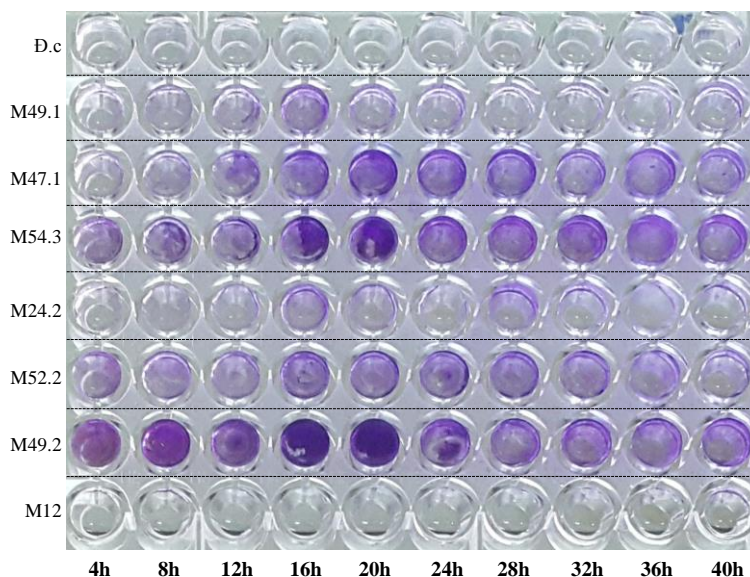
3.2. Sự hình thành màng sinh học theo thời gian của tụ cầu khuẩn

Để lựa chọn được thời điểm tụ cầu khuẩn sản sinh màng sinh học cực đại phục vụ cho nghiên cứu tính đề kháng kháng sinh, cần thiết phải làm rõ đặc điểm hình thành màng sinh học theo thời gian. Trên cơ sở kết quả nghiên cứu về khả năng hình thành màng sinh học (Hình 4), 7 chủng vi khuẩn sản sinh màng sinh học ở các

mức khác nhau được chọn để nghiên cứu. Hình 5 là ảnh chụp đĩa nhuộm màng sinh học theo thời gian (từ 4 đến 40 giờ sau nuôi vi khuẩn).

Ở giếng đối chứng (Đ.c) và mẫu M12 (đã được xác định không hình thành màng sinh học, trình bày ở hình 4), tại tất cả các thời điểm thu mẫu (từ 4 giờ đến 40 giờ) giá trị OD của thuốc nhuộm tím kết tinh giữ lại trong giếng đều thấp hơn giá trị ngưỡng ODc và không có sự biến động trong suốt thời gian theo dõi (Hình5). Nói cách khác, mẫu này không có sự hình thành màng sinh học theo thời gian. Đối với mẫu M49.1 và M24.2 (đã được xác định sản sinh màng sinh học ở mức yếu, hình 4), giá trị OD của thuốc nhuộm giữ lại trong giếng ít biến động theo thời gian (Hình5). Ngược lại, với các mẫu được xác định hình thành biofilm ở mức trung bình và mạnh (M47.1, M54.3 và M49.2), các giá trị OD có xu hướng tăng dần trong khoảng 4 giờ đến 20 giờ, sau đó giảm (từ 24 giờ đến 40 giờ).

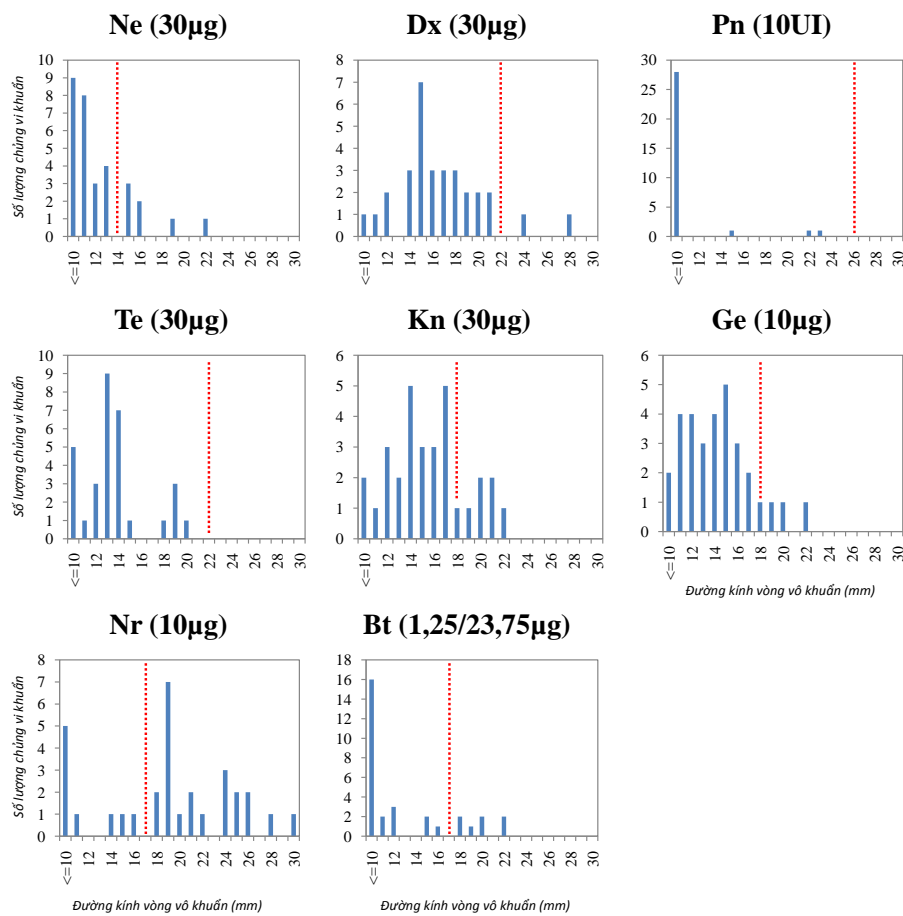
Kết quả cho thấy sự hình thành màng sinh học là một quá trình động và phụ thuộc vào thời gian. Cũng dễ nhận thấy màng sinh học sản sinh không luôn luôn tương quan tỷ lệ thuận với thời gian nuôi cấy tĩnh vi khuẩn (màng sinh học hình



Ghi chú: Màng sinh học được xác định thông qua hiện tượng giữ màu thuốc nhuộm trong giếng. Màu thuốc nhuộm càng đậm tương ứng với màng sinh học hình thành càng mạnh.

Hình 5. Sự hình thành màng sinh học theo thời gian

Nghiên cứu sự hình thành màng sinh học (Biofilm) và tính đề kháng kháng sinh của tụ cầu khuẩn (*Staphylococcus* spp.) sản sinh màng sinh học



Ghi chú: 31 chủng tụ cầu khuẩn được thử tính mẫn cảm với 8 loại kháng sinh: Neomicin (Ne), Doxycycline (Dx), Penicillin (Pn), Tetracycline (Te), Kanamycin (Kn), Gentamicin (Ge), Norfloxacin (Nr) và Trimethprime/ sulfamethoxazol (Bt). Với mỗi loại kháng sinh, đường nét đứt màu đỏ phân chia ranh giới giữa khả năng kháng (phía bên trái) và tính mẫn cảm (phía bên phải).

Hình 6. Kết quả thử tính mẫn cảm với kháng sinh của tụ cầu khuẩn

thành ở mức cực đại sau đó giảm xuống). Kết quả này là do (i) sự giảm theo thời gian các chất dinh dưỡng có trong giếng nuôi vi khuẩn và do (ii) song song với quá trình tạo màng sinh học luôn có hiện tượng phá vỡ một phần cấu trúc màng sinh học để giải phóng vi khuẩn khỏi màng.

Kết quả nghiên cứu công bố năm 2006 (Hola, 2006) về ảnh hưởng của thời gian, chất dinh dưỡng và nhiệt độ đến sự hình thành biofilm cho thấy vi khuẩn *Staphylococcus epidermidis* hình thành màng sinh học rất chậm theo thời gian ở điều kiện nuôi cấy là 25°C. Ngược lại, ở 37°C, vi khuẩn hình thành màng sinh học một cách nhanh chóng (sau nuôi

khoảng 2-4 giờ), lớp màng sinh học này hoàn chỉnh sau nuôi cấy từ 12-14 giờ, sau đó giảm dần nếu tiếp tục duy trì từ 34-42 giờ. Như vậy, kết quả trình bày ở hình 5 là tương đồng khi cũng chỉ ra sự biến động của lớp màng sinh học được hình thành theo thời gian.

3.3. Khả năng đề kháng kháng sinh của tụ cầu khuẩn sản sinh màng sinh học

Để nghiên cứu ảnh hưởng của màng sinh học tới khả năng đề kháng kháng sinh, trước hết cần phải tìm được loại kháng sinh mà vi khuẩn ở dạng tự do mẫn cảm. Tham khảo cơ sở dữ liệu của EUCAST về các loại kháng sinh mà tụ cầu

Bảng 1. Kết quả xác định khả năng đề kháng kháng sinh của tụ cầu khuẩn

Mẫu thử nghiệm	Nồng độ kháng sinh				Đối chứng
	100 MIC	10 MIC	1 MIC	0 MIC	
M24.1	0,238	0,227	0,513	1,646	0,042
M24.2	0,187	0,186	0,325	1,631	0,043
M39.2	0,312	0,259	0,608	1,631	0,044
M47.1	0,157	0,347	0,437	1,614	0,042
M49.1	0,216	0,292	0,615	1,649	0,032
M49.2	0,227	0,272	0,415	1,671	0,040
Trung bình	0,223	0,264	0,485	1,640	0,041

khuẩn mẫn cảm (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2017), tính mẫn cảm với một số loại kháng sinh đã được thử và trình bày ở hình 6.

Kết quả hình 6 cho biết các chủng tụ cầu khuẩn có tính mẫn cảm và kháng không giống nhau với mỗi loại kháng sinh. Tất cả 31/31 chủng đều kháng penicillin (đường kính vòng vô khuẩn <26 mm, theo khuyến cáo của EUCAST). Kết quả này phù hợp với đặc điểm của các chủng tụ cầu khuẩn đều sản sinh enzyme penicillinase. Ngoài ra, 31/31 chủng tụ cầu khuẩn này còn kháng tetracycline. Với norfloxacin, đa số các chủng tụ cầu khuẩn (22/31 chủng) mẫn cảm (đường kính vòng vô khuẩn >18 mm, theo khuyến cáo của EUCAST).

Trên cơ sở phân tích trên, norfloxacin đã được chọn để nghiên cứu khả năng đề kháng kháng sinh ở nồng độ cao gấp 10 lần và 100 lần nồng độ tối thiểu ức chế vi khuẩn (MIC) để tác động lên vi khuẩn nằm trong lớp màng sinh học. Sau 12 giờ duy trì kháng sinh trong giếng nuôi vi khuẩn, bổ sung môi trường không có kháng sinh và tiếp tục nuôi trong vòng 24 giờ. Kết quả xác định khả năng hồi phục của 6 chủng tụ cầu khuẩn nằm trong màng sinh học sau khi chịu tác động của kháng sinh được trình bày ở bảng 1.

Ở các mẫu đối chứng (không có vi khuẩn), môi trường nuôi không có hiện tượng vẩn đục, với giá trị OD ở bước sóng 630 nm (OD630) từ 0,032 đến 0,044 (cột 6, bảng 1). Trong khi đó, ở các mẫu nuôi vi khuẩn nằm trong lớp màng

sinh học (sau thời gian tác động của kháng sinh) có hiện tượng vẩn đục, với giá trị OD630 tăng tỷ lệ nghịch với nồng độ kháng sinh. Ở nồng độ kháng sinh 100x, 10x và 1x, đậm độ vi khuẩn giảm xấp xỉ 7,4 lần (1,640/0,223), 6,2 lần (1,640/0,264) và 3,4 lần (1,640/0,485) so với đậm độ vi khuẩn ở giếng không có kháng sinh (0x). Kết quả ở bảng 1 chứng tỏ còn vi khuẩn sống sót trong lớp màng sinh học sau thời gian tác động của kháng sinh. Nói cách khác, vi khuẩn nằm trong màng sinh học đề kháng với nồng độ kháng sinh cao gấp 10 lần và 100 lần nồng độ MIC.

Trong một công bố về khả năng đề kháng kháng sinh của *Staphylococcus aureus*, tác giả Urish đã rút ra kết luận: Sự có mặt của kháng sinh (cefazolin) ở các nồng độ cao gấp 2, 20 và 200 lần chỉ làm giảm lượng mức hình thành màng sinh học mà không thể loại bỏ được hoàn toàn màng sinh học (Urish et al., 2016). Đáng chú ý, tỷ lệ vi khuẩn nằm trong màng sinh học sống sót dao động từ 2,0% đến 57,9% sau khi chịu tác động của 3 loại kháng sinh là cefazolin, gentamicin và vancomycin ở nồng độ gấp 10 lần nồng độ tối thiểu ức chế vi khuẩn (Urish et al., 2016). So sánh với kết quả kể trên, kết quả của nghiên cứu này là phù hợp khi chứng minh được khả năng đề kháng cao với kháng sinh của vi khuẩn nằm trong lớp màng sinh học. Do đó, cần phát triển nghiên cứu theo hướng tìm kiếm hóa chất hoặc thảo dược để kết hợp với kháng sinh nhằm làm giảm sức đề kháng kháng sinh của vi khuẩn hình thành màng sinh học.

4. KẾT LUẬN

Có 51,61% số chủng tụ cầu khuẩn phân lập sản sinh màng sinh học ở các mức mạnh, trung bình và yếu. Màng sinh học được hình thành là kết quả của quá trình động. Với các chủng tụ cầu khuẩn phân lập, màng sinh học sản sinh tăng trong khoảng 4 giờ đến 20 giờ, sau đó giảm trong khoảng 24 giờ đến 40 giờ. Tụ cầu khuẩn nằm trong màng sinh học đề kháng với nồng độ kháng sinh cao gấp 10 lần và 100 lần nồng độ tối thiểu ức chế vi khuẩn ở dạng tự do.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Almshawit H., I. Macreadie, D. Grando (2014). A simple and inexpensive device for biofilm analysis. *J Microbiol Methods*, 98: 59-63.
- Babra C., J.G. Tiwari, G. Pier, T.H. Thein, R. Sunagar, S. Sundareshan, S. Isloor, N.R. Hegde, S. de Wet, M. Deighton, J. Gibson, P. Costantino, J. Wetherall, T. Mukkur (2013). The persistence of biofilm-associated antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical bovine mastitis cases in Australia. *Folia Microbiol (Praha)*, 58: 469-474.
- Ceri H., M.E. Olson, C. Stremick, R.R. Read, D. Morck, A. Buret (1999). The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *J. Clin. Microbiol*, 37: 1771-1776.
- Christensen G.D., W.A. Simpson, A.L. Bisno, E.H. Beachey (1982). Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infection and Immunity*, 37: 318-326.
- Costerton J.W., P.S. Stewart, E. P. Greenberg (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284: 1318-1322.
- Darwish S.F., H.A. Asfour (2013). Investigation of biofilm forming ability in *Staphylococci* causing bovine mastitis using phenotypic and genotypic assays. *Scientific World Journal*, 5: 378-492.
- Donlan R.M. (2002). Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8(9): 881-890.
- Freeman D.J., F.R. Falkiner, C.T. Keane (1989). New method for detecting slime production by coagulase negative *staphylococci*. *J. Clin. Pathol*, 42: 872-874.
- Hola V., F. Ruzicka, M. Votava (2006). The dynamics of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation in relation to nutrition, temperature and time. *Scripta Medica*, 79: 169-174.
- Lê Văn Năm và Hoàng Triều (2016). Thuốc thú y và một số tồn tại trong quá trình sử dụng. *Tạp chí Khoa học kỹ thuật Thú y*, 23: 85-89.
- Mirani Z.A., M. Aziz, M.N. Khan, I. Lal, N.U. Hassan, and S.I. Khan (2013). Biofilm formation and dispersal of *Staphylococcus aureus* under the influence of oxacillin. *Microb. Pathog.*, 6: 66-72.
- Nguyễn Đức Hiền (2012). Tình hình nhiễm và mức độ kháng thuốc của *Salmonella* spp. phân lập từ vịt và môi trường nuôi vịt tại thành phố Cần Thơ. *Tạp chí Khoa học*, 22: 1-7.
- Oliveira M., R. Bexiga, S.F. Nunes, C. Carneiro, L.M. Cavaco, F. Bernardo and C.L. Vilela (2006). Biofilm-forming ability profiling of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. *Vet. Microbiol*, 118: 133-140.
- Paytubi S., P. Guirado, C. Balsalobre and C. Madrid (2014). An improved and versatile methodology to quantify biofilms formed on solid surfaces and exposed to the air-liquid interphase. *J. Microbiol Methods*, 103: 77-79.
- Stepanovic S., D. Vukovic, I. Dakic, B. Savic and M. Svabic-Vlahovic (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods*, 40: 175-179.
- Stepanovic S., D. Vukovic, V. Hola, G. Di Bonaventura, S. Djukic, I. Cirkovic và F. Ruzicka (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS*, 115: 891-899.
- Stewart P.S. and M.J. Franklin (2008). Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat Rev Microbiol*, 6: 199-210.
- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (2017). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. <http://www.eucast.org>, Version 7.0.
- Thornton R.B., P.J. Rigby, S.P. Wiertsema, P. Filion, J. Langlands, H.L. Coates, S. Vijayasekaran, A.D. Keil and P.C. Richmond (2011). Multi-species bacterial biofilm and intracellular infection in otitis media. *BMC Pediatr*, 11: p. 94.
- Urish K.L., P.W. DeMuth, B.W. Kwan, D.W. Craft, D. Ma, H. Haider, R.S. Tuan, T.K. Wood and C.M. Davis (2016). Antibiotic-tolerant *Staphylococcus aureus* biofilm persists on arthroplasty materials. *Clin Orthop Relat Res.*, 474: 1649-1656.
- Võ Thành Thìn (2011). Phân tích một số gen kháng kháng sinh của vi khuẩn *E.coli* phân lập từ lợn con mắc bệnh tiêu chảy. *Tạp chí Khoa học kỹ thuật Thú y*, 18: 20-25.
- Yang L., Y. Liu, H. Wu, N. Hoiby, S. Molin and Z.-j. Song (2011). Current understanding of multi-species biofilms. *Int. J. Oral. Sci.*, 3: 74-81.