Tạp chí Khoa học ĐHQGHN, Khoa học Tự nhiên và Công nghệ 23 (2007) 181-187

Một số đặc trưng sinh lý và hoá sinh của chủng vi khuẩn *Streptococcus Sobrinus* ATCC 6715

Nguyễn Thị Mai Phương[1,*], Phan Tuấn Nghĩa[2], Marquis E. Robert[3]

[1] *Viện Công nghệ Sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 18 Hoàng Quốc Việt, Hà Nội, Việt Nam*

[2] *Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, 334 Nguyễn Trãi, Hà Nội, Việt Nam*

[3] *Trường Đại học Tổng hợp Rochester, 601 Elmwood Avenue, Rochester 14642, New York, Hoa Kỳ*

Nhận ngày 9 tháng 12 năm 2005

Tóm tắt. *Streptococus sobrinus* là một trong những chủng vi khuẩn gây sâu răng chủ yếu. Các số liệu thu được cho thấy chủng vi khuẩn này có khả năng hô hấp, sản xuất và chống chịu với H_2O_2 cao hơn so với những chủng vi khuẩn ít có khả năng chịu axit khác như *S. sanguis* NCTC10904 và *S. gordonii* ATCC10588. Chủng vi khuẩn này cũng có hoạt tính các enzyme NADH oxidase và superoxide dismutase cao, gợi ý rằng chính các enzyme này đã tham gia vào quá trình bảo vệ tế bào vi khuẩn khỏi tổn thương do axit và H_2O_2.

1. Mở đầu

Trong số các loài vi khuẩn có mặt ở mảng bám răng *Streptococcus sobrinus* được xem là một trong những đối tượng chính gây sâu răng do có khả năng sản xuất axit mạnh đồng thời có thể chịu axit cao. Sự tạo thành axit thông qua qúa trình đường phân làm giảm pH ở mảng bám răng xuống thậm chí dưới pH 4,0 dẫn đến việc làm mòn men răng và gây ra sâu răng [1]. Bên cạnh những thay đổi về pH, các vi sinh vật trong mảng bám răng sống trong môi trường với stress oxi hoá, một phần do chính các vi sinh vật trong vi khu hệ đường miệng tạo ra, mặt khác là do việc sử dụng các chất oxi hoá trong các sản phẩm bảo vệ răng, miệng. Cũng đã có những công trình khác nhau nghiên cứu về những cơ chế bảo vệ stress axit và oxi hoá khác nhau của các vi khuẩn đường miệng [2-8], tuy vậy còn rất nhiều vấn đề cần được làm sáng tỏ về cơ chế của những hiện tượng này. Công trình nghiên cứu của chúng tôi tập trung vào một số đặc trưng sinh lý và hoá sinh của chủng *S. sobrinus* ATCC 6715 nhằm góp phần làm sáng tỏ cơ chế chống chịu axit cũng như chống chịu oxi hoá của chúng.

2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Chủng vi sinh vật

S. sobrinus ATCC 6715, *S. mutans* GS-5, *S. mutans* UA159, *S. sanguis* NCTC 10904 và chủng *S. gordonii* ATCC 10558 được lấy từ bộ sưu tập giống của phòng thí nghiệm GS. Robert E. Marquis, Đại học Tổng hợp Rochester, New

* Tác giả liên hệ. ĐT: 84-4-8360853.
E-mail: phuong_nguyen_99@yahoo.com

York, Hoa Kỳ. Các chủng vi sinh vật dùng cho nghiên cứu được giữ và cấy chuyển hàng tuần trên môi trường thạch (tryptic soy agar -TSA) của hãng Difco. Tế bào được nuôi cấy tĩnh hoặc cấy lắc ở 37°C trong môi trường chứa 3% tryptone, 0,5% dịch chiết nấm men và 1% glucose.

2.2. Hoá chất

H_2O_2 ở dạng dung dịch ổn định 30% (9,78M), cytochrom C, xanthine, xanthine oxidase mua từ hãng Sigma (Mỹ). Các hoá chất còn lại đều đạt mức độ tinh sạch phân tích.

2.3. Hô hấp của tế bào

Tế bào được thu từ pha ổn định của quá trình sinh trưởng. Sau khi li tâm và rửa hai lần với dung dịch muối KCl 50 mM có chứa $MgCl_2$ 1 mM, tế bào được hoà vào dung dịch đệm photphat 20 mM có các pH khác nhau chứa 0,5% glucose. Mật độ tế bào đạt khoảng 1,5 mg trọng lượng khô/ 1ml. Dung dịch tế bào được lắc kỹ để đạt độ bão hoà không khí và được dùng ngay để đo lượng O_2 tiêu thụ ở nhiệt độ phòng sử dụng máy đo O_2,VWR Model 4000 theo phương pháp được mô tả bởi Cadwell và cộng sự [9].

2.4. Khả năng sản xuất H_2O_2

Dịch tế bào được chuẩn bị như cho thí nghiệm đo hô hấp. Ở những thời gian nhất định (20-30 phút), 1 ml mẫu được lấy ra, li tâm ở tốc độ 14.000 vòng/ phút, trong 3 phút để loại bỏ tế bào. Dịch trên tủa được sử dụng để phân tích hàm lượng H_2O_2 do vi khuẩn sinh ra bằng phản ứng với thuốc thử tím tinh thể leuco với sự có mặt của peroxidse theo phương pháp của Motolla và cộng sự [10].

2.5. Tác dụng gây chết của H_2O_2

Dung dịch tế bào được chuẩn bị trong pepton 1%, pH 7 với mật độ khoảng 10^9 tế bào/ml. H_2O_2 được thêm vào mẫu nghiên cứu để có nồng độ cuối cùng đạt 0,1%; 0,3% và 0,5%. Ở những thời điểm khác nhau, 100µl dịch tế bào được lấy ra, pha loãng trong dung dich pepton 1% ở các mật độ nhỏ dần 10 lần và được cấy trải trên đĩa thạch. Các đĩa này được đặt vào tủ ấm 37°C cho đến khi các khuẩn lạc hình thành rõ rệt và có thể đếm bằng mắt thường. Tác dụng gây chết của H_2O_2 được biểu thị qua giá trị D là thời gian mà tại đó 90% quần thể tế bào vi khuẩn bị chết dưới tác dụng của một tác nhân nào đó (ví dụ như H_2O_2 0,3% trong nghiên cứu này). Ngoài ra còn được biểu thị bằng giá trị LogN/No, trong đó N là số tế bào sống sót tại thời điểm thu mẫu và No là số tế bào ban đầu. Theo cách biểu thì D chính là thời điểm có LogN/No = -1.

2.6. Chuẩn bị tế bào thấm

Tế bào sau khi được rửa hai lần với dung dịch muối KCl 50 mM có chứa $MgCl_2$ 1mM được hoà vào trong đệm Tris-HCl 75mM (pH 7,0) có chứa $MgSO_4$ 10 mM. Sau khi thêm toluen (ti lệ 1:10), dịch tế bào được trộn đều và ủ ở 37°C trong 5 phút. Tế bào được nhanh chóng làm đông lạnh và ngay sau đó được làm tan ở 37°C. Chu kỳ này được lặp lại hai lần. Toluen được loại bỏ bằng cách ly tâm, tế bào được hoà trở lại trong đệm Tris-HCl và được cất giữ ở -70°C đến khi dùng hoặc có thể được dùng trực tiếp cho các phân tích.

2.7. Hoạt độ enzyme

Chuẩn bị dịch chiết tế bào: Tế bào sau khi rửa với dung dịch muối được hoà trong đệm Tris-HCl 20 mM, pH 7,0 có chứa KCl 50mM

và $MgCl_2$ 1mM. Một thể tích dịch tế bào được trộn với một thể tích cát thủy tinh (tỷ lệ 1:1) và được nghiền phá bằng máy làm vỡ tế bào. Sự phá vỡ hoàn toàn của các tế bào được kiểm tra bằng kính hiển vi. Dịch phá tế bào được ly tâm ở 15. 000 vòng trong 10 phút ở 4°C để thu dịch chiết trong dùng cho xác định hoạt độ enzyme.

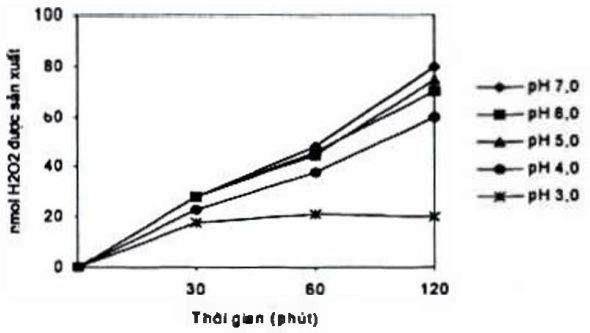
Hoạt độ của NADH oxidase được xác định ở 25°C theo phương pháp của Poole và Claiborne [11] sử dụng cả tế bào thấm và dịch chiết tế bào. Một đơn vị hoạt độ NADH oxidase là lượng enzyme xúc tác để oxi hoá 1mmol NADH trong thời gian 1 phút ở điều kiện phản ứng.

Hoạt độ superoxide dismutase (SOD) được xác định theo phương pháp của McCord và Fredovich [12] thông qua sự ức chế quá trình khử cytochrom C bởi xanthine khi có mặt xanthine oxidase. Một đơn vị hoạt độ SOD là lượng SOD có khả năng làm giảm 50% tốc độ khử cytochrom C trong các điều kiện phân tích.

3. Kết quả nghiên cứu

3.1. Khả năng sản xuất H_2O_2

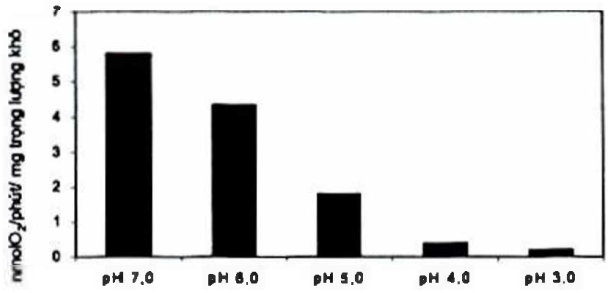
Mức độ sản xuất H_2O_2 của *S. sobrinus* 6715 ở các điều kiện pH khác nhau được trình bày ở đồ thị 1. Kết quả cho thấy sự sản xuất H_2O_2 của của *S. sobrinus* ATCC 6715 không khác nhau đáng kể ở pH từ 5,0 đến 7,0 đạt khoảng 80 nmol H_2O_2/mg khối lượng khô của tế bào và giảm mạnh ở pH 4,0. Tuy vậy, ở pH 4,0 tế bào vẫn còn khả năng sản xuất H_2O_2 tương đối mạnh (đạt tới gần 40 nmol H_2O_2/mg khối lượng khô của tế bào) và thậm chí ở pH 3,0, trong 30 phút ban đầu chủng này vẫn có khả năng sinh H_2O_2 mặc dù mức độ sản xuất lúc này chỉ còn đạt khoảng 20 nmol H_2O_2/mg trọng lượng khô của tế bào và sau đó bị ngừng lại. Nguyên nhân ngừng lại có thể do các tế bào đã bị chết ở pH thấp.



Hình 1. Khả năng sản xuất H_2O_2 của chủng *S. sobrinus* ATCC 6715 ở các pH khác nhau.

3.2. Khả năng tiêu thụ oxy

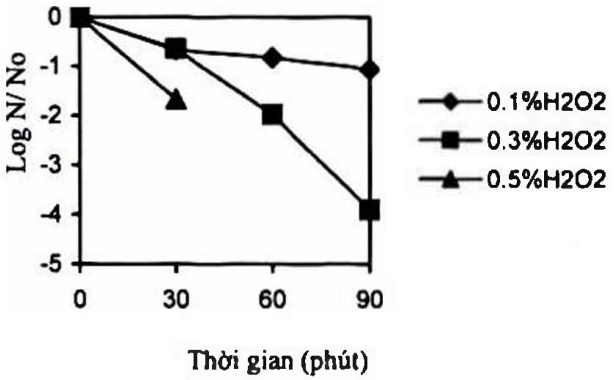
Kết quả nghiên cứu (hình 2) cho thấy sự hô hấp của chủng *S. sobrinus* tại pH 7,0 đạt giá trị cao nhất (60 nmol O_2/phút/mg trọng lượng khô tế bào) và giảm dần ở các pH thấp hơn. Tuy nhiên, tế bào vẫn thể hiện hô hấp ở pH 4,0 và thậm chí pH 3,0 mặc dù hoạt động này là thấp hơn đáng kể so với ở pH 6,0 và pH 7,0 (chỉ đạt 0,2 và 0,4 nmol O_2/phút/mg khối lượng khô).



Hình 2. Khả năng hô hấp của *S. sobrinus* 6715 tại các pH khác nhau.

3.3. Tác dụng gây chết của H_2O

Để tìm hiểu khả năng chống chịu với tổn thương oxi hoá ở chủng *S. sobrinus* chúng tôi đã nghiên cứu ảnh hưởng của H_2O_2 đến khả năng sống sót của vi khuẩn này và so sánh với một số chủng khác. Kết quả trình bày ở bảng 1 và hình 3 cho thấy các tế bào *S. sobrinus* tỏ ra chống chịu cao với H_2O_2.



Hình 3. Tác dụng gây chết của H_2O_2 đối với *S. sobrinus* 6715.

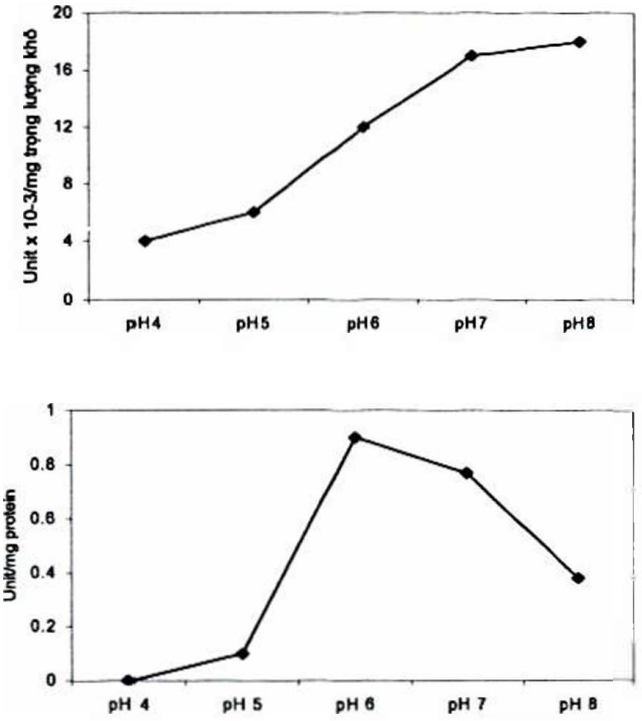
Bảng 1. Tác dụng gây chết của H_2O_2 0,3% đối với vi khuẩn một số chủng Streptococcus

Chủng	Giá trị D (phút)
S. sobrinus ATCC 6715	46,5
S. mutans GS-5	15,0
S. mutans UA159	41,0
S. sanguis NCTC 10904	15,0
S. gordonii ATCC 10558	16,0

Ở nồng độ H_2O_2 0,3%, sau 30 phút vẫn còn tới 30% tế bào sống sót và giá trị D đạt tới 46,5 phút, cao hơn hẳn những loài được xem là chịu axít như *S. mutans* GS-5 hay UA159 và cao hơn rất nhiều so với những loài kém chịu axít như *S. sanguis* hay *S. gordonii.*

3.4. Hoạt độ NADH oxidase và SOD

Kết quả nghiên cứu (hình 4) đã cho thấy sự phụ thuộc giữa hoạt độ vào pH môi trường của NADH oxidase đối với cả tế bào thấm và dịch chiết tế bào *S. sobrinus* là tương tự đã phát hiện thấy ở các loài Streptococcus khác [13]. Tuy vậy, so với dịch chiết tế bào, hoạt độ NADH oxidase của tế bào thấm giảm chậm hơn khi pH giảm xuống dưới 5,0. Điều này có thể liên quan đến khả năng bảo vệ của một số hợp phần khác trong tế bào đối với NADH oxidase. Đặc biệt, hoạt độ này của dịch chiết tế bào, ngay cả ở pH 5,0 vẫn còn 0,128 đơn vị/ mg protein, cao hơn nhiều so với hoạt độ tại pH 7,0 của hai chủng *S. sanguis* và *S. gordonii* kém chịu axít hơn (bảng 2). Ngoài ra, các số liệu trong bảng 2 cũng cho thấy hoạt độ NADH oxidase và SOD ở dịch chiết của loài *S. sobrinus* và *S. mutans* GS-5 là cao hơn hẳn so với các loài còn lại (từ 10-30 lần đối với NADH oxidase và 3-10 lần đối với SOD).



Hình 4. Hoạt độ NADH oxidase của tế bào thấm (A) và của dịch chiết (B) tế bào *S. sobrinus.*

Bảng 2. Hoạt độ NADH oxidse và SOD trong dịch chiết của tế bào vi khuẩn gây sâu răng Streptococci

Chủng	Hoạt độ enzyme (đơn vị/mg protein)	
	NADH oxidase	Superoxide dismutase
S. sobrinus ATCC 6715	1,280±0,090	279,070±4,700
S. mutans GS-5	1,130±0,060	152,050±3,500
S.mutans UA159	0,185±0,041	71,980± 2,370
S.sanguis NCTC 10904	0,007±0,001	20,830± 6,710
S.gordonii ATCC 10558	0,015±0,002	76,730±10,520

4. Thảo luận

Các vi khuẩn thuộc giống Streptococcus không có khả năng tổng hợp nhân hem nên không có hệ thống oxy hoá phosphoryl hoá nhưng vẫn có khả năng hô hấp cao [14]. Ở những chủng gây bệnh đường miệng như là *S. mutans* GS-5 hay *S. sobrinus* sự tiêu thụ oxi liên quan chủ yếu đến hai hệ thống NADH oxidase [15] thông qua các phản ứng sau:

$$NADH + O_2 + H^+ \xrightarrow{\text{NADH oxidase sinh } H_2O_2} NAD^+ + H_2O_2 \quad (a)$$

$$2NADH + O_2 + 2H^+ \xrightarrow{\text{NADH oxidase sinh } H_2O} 2NAD^+ + 2H_2O_2 \quad (b)$$

Trong hai NADH oxidase nêu trên, enzyme xúc tác cho phản ứng (a) còn gọi là Nox-1, xúc tác cho phản ứng chuyển 2 điện tử từ NADH sang một phân tử oxi và giải phóng ra peroxit hydro với sự góp mặt của 2 proton. Enzyme này là một hợp phần của phức hệ alkylperoxidase với hai thành phần là AhpF (Nox-1) và AhpC có hoạt tính peroxidase (phân giải H_2O_2 khi có chất khử). Còn enzyme của phản ứng (b) là một NADH oxidase (còn gọi là Nox-2) xúc tác cho sự chuyển 4 điện tử từ hai phân tử NADH sang một phân tử oxi để tạo ra hai phân tử nước với sự góp mặt của 4 proton. Nox-1 được phát hiện là có hoạt tính cao ở các chủng vi khuẩn sản xuất H_2O_2 chủ yếu của trong mảng bám răng như *S. sobrinus*, *S. sanguis*, *S. gordonii*, *S. oralis* còn Nox-2 lại trội hơn Nox-1 ở *S. mutans*.

NADH oxidase trong dịch chiết của các cơ thể Streptococcus tỏ ra rất nhạy với axit và gần như mất hoàn toàn không thể hiện hoạt tính ở pH 5,0 [13]. Mặc dầu vậy, sự tiêu thụ oxi của các cơ thể nguyên vẹn tỏ ra ít nhạy với axít hơn vì tế bào có cơ chế duy trì ΔpH giữa bên trong và bên ngoài màng tế bào: khi môi trường bi axit hoá, pH bên trong tế bào vẫn được duy trì cao hơn pH ở bên ngoài môi trường [16], do tế bào có khả năng bơm proton ra bên ngoài thông qua hoạt động của hệ thống F-ATPase định vị trên màng. Điều này lý giải vì sao các tế bào của *S. mutans* GS-5, *S. sanguis* NCTC [13,17] cũng như *S. sobrinus* ATCC 6715 có thể duy trì sự hô hấp ở pH 4,0. Ngoài ra, tính kém nhạy của NADH oxidase của tế bào thấm có thể do sự bảo vệ của các hợp phần tế bào cũng là cơ sở cho phép tế bào duy trì hô hấp khi môi trường bị axit hoá.

Bên cạnh *S. sobrinus*, *S. sanguis*, *S. gordonii*, *S. oralis* được xem là những chủng sản xuất H_2O_2 chủ yếu của trong mảng bám răng [18,19], nghiên cứu của chúng tôi khẳng định khả năng sản xuất H_2O_2 cao của *S. sobrinus* (hình 1). Thông thường, các chủng sản xuất H_2O_2 cao thì có khả năng kháng với H_2O_2 hơn các chủng sản xuất H_2O_2 yếu và điều này cũng được khẳng định thêm trong nghiên cứu của chúng tôi (bảng1). Hoạt độ NADH oxidase cao của chủng *S. sobrinus* ATCC 6715 là cơ sở giúp cho khả năng sản xuất H_2O_2 cao của chủng này.

Trong nghiên cứu của chúng tôi, sự tiêu thụ NADH được đánh giá như hoạt độ của NADH oxidase và điều này cũng có thể hiểu như là hoạt độ của alkyperoxidase. Mức độ tiêu thụ NADH cao hơn *của S. sobrinus* so với các chủng khác lý giải vì sao chủng này lại chịu H_2O_2 tốt hơn (bảng 2). Điều này cũng phù hợp với quan sát cho thấy *S. mutans* GS-5 với Nox-2 sinh H_2O chiếm phần chính của hoạt tính NADH oxidase [13] tỏ ra nhạy hơn nhiều với tác dụng của H_2O_2.

Cả *S. mutans* và *S. sobrinus* đều là những vi khuẩn mảng bám răng rất chịu axit. Hoạt độ SOD cao của hai chủng này so với một số chủng chịu axit kém hơn như *S. gordonii* hoặc *S. sanguis* gợi ý về khả năng xuất hiện gia tăng các gốc superoxide khi tế bào bị stress axit và SOD với vai trò triệt tiêu các gốc superoxide đã hỗ trợ cho tế bào sống tốt hơn trong môi trường có stress này.

Tài liệu tham khảo

[1] R.E. Marquis, Oxygen metabolism, oxidative stress and acid-base physiology of dental plaque biofilms, *J. Indust. Microbiol.* 15 (1995) 198.

[2] W.A. Belli, R.E. Marquis, Adaptation of *Streptococci mutans* and *Enterococcus hirae* to acid stress in continuous culture, *Appl. Environ. Microbiol.* 57 (1991) 1134.

[3] R.M. Duckworth, S.N. Morgan, A.M. Murray, Fluoride in saliva and plaque following use of fluoride-containing mouthwashes, *J. Dent. Res.* 59 (1987) 1187.

[4] I.R. Hamilton, N.D. Buckley, Adaptation of *Streptococcus mutans* to acid tolerance, *Oral Microbiol. Immunol.* 6 (1991) 65.

[5] G.C. Jayaraman, J.E. Pender, R.A. Burne, Transcriptional analysis of the *Streptococcus mutans hrcA, grpE and dnaK* genes and regulation of expression in response to heat shock and environmental acidification, *Mol. Microbiol.* 25 (1997) 329.

[6] T.N. Phan, K.M. Kirsch, R.E. Marquis, Selective sensitization of bacteria to peroxide damage associated with fluoride inhibition of catalase and pseudocatalase, *Oral Microbiol. Immunol.* 16 (2001) 28.

[7] T.N. Phan, J.S. Reidmiller, R.E. Marquis, Sensitization of *Actinomyces naeslundii* and *Streptococcus sanguis* in biofilms and suspensions to acid damage by fluoride and other weak acids, *Arch. Microbiol.* 174 (2000) 248.

[8] L.B. Pool, M. Highuchi, M. Shimada, M. L. Calzi, Y. Kamio, *Streptococcus mutans* H_2O_2-forming NADH oxidase isozyme an alkyl hydroperoxide reductase protein, *Free Radical Biol. Med.* 28 (2000) 108.

[9] C.E. Cadwell, R.E. Marquis, Oxygen metabolism by *Treponema denticola. Oral. Microbiol. Immunol.* 14 (1999) 66.

[10] H.A. Motolla, B.E. Simpson, G. Gorin, Absoptiometric determination of hydrogen peroxide in submicrogram amounts with leuco crystal violet and peroxidase as catalyst, *Anal. Chem.* 42 (1970) 410.

[11] L.B. Pool, A.Claiborne, Interactions of pyridine nucleotide with redox forms of the flavin-containing NADH peroxidase form from *Streptococcus faecali, J. Biol.Chem.* 261(1986) 14525.

[12] J.M. McCord, I. Fredovich, Superoxide dismutase, An enzyme function of erythrocuprein (hemocuprein), *J. Biol. Chem.* 244 (1969) 6049.

[13] T.N. Phan, P.T.M. Nguyen, J. Abranches, R.E. Marquis, Inhibition by fluoride and organic weak acids of respiration and hydrogen peroxide production of oral streptococci in acidified environments, *Oral Microbiol. Immunol.* 17 (2002) 119.

[14] M. Highuchi, Y. Yamamoto, L.B. Poole, M. Shimada, Y. Sato, N. Takahashi, Y. Kamio, Functions of two types of NADH oxidases in energy metabolism and oxidative stress of *Streptococcus mutans, J. Bacteriol.* 18 (1999) 5940.

[15] C.M. Gibson, T.C. Mallett, A.Claiborne, M.G. Caparon, Contribution of NADH oxidase to aerobic metabolism of *Streptococcus pyogenes, J. Bacteriol.* 182 (2000) 448.

[16] W.A. Belli, D.H. Buckley, R.E. Marquis, Weak acid effects and fluoride inhibition of glycolysis by *Streptococcus mutans* GS-5, *Can. J. Microbiol.* 41 (1995) 785.

[17] P.T.M. Nguyen, J. Abranches, T.N. Phan, R.E. Marquis, Repressed respiration of oral streptococci grown in biofilms, *Curr. Microbiol.* 44 (2002) 262.

[18] C.S. Ryan, I. Kleinberg, Bacteria in human mouths involved in the production and utilization of hydrogen peroxide, *Arch. Oral Biol,* 40 (1995) 753.

[19] E. L. Thomas, K.A. Pera, Oxygen metabolism of *Streptococcus mutans*: Uptake of oxygen and release of superoxide and hydrogen peroxide, *J. Bacteriol.* 154 (1983) 1236.

Some physiological and biochemical characteristics of *Streptococcus Sobrinus* ATCC 6715

Nguyen Thi Mai Phuong[1], Phan Tuan Nghia[2], Robert E. Marquis[3]

[1]*Institute of Biotechnology, Vietnamese Academy of Science and Technology, 18 Hoang Quoc Viet, Hanoi, Vietnam*

[2]*College of Science, VNU, 334 Nguyen Trai, Hanoi, Vietnam*

[3]*University of Rochester, 601 Elmwood Road, Rochester 14642, N.Y., USA*

Streptococus sobrinus is one of the major pathogens in dental carries. The obtained data show that the organism has a higher level of H_2O_2 production and oxygen uptake and hydrogen peroxide resistance compared to some other less acid tolerant oral strains including *S. sanguis* NCTC10904 and *S. gordonii* ATCC10588. The organism also exhibits a higher level of NADH oxidase and superoxide dismutase activities, suggesting the involvement of enzymes in protection of the organism from acid and H_2O_2 damage.