

TĂNG CƯỜNG TÁC DỤNG DIỆT VI KHUẨN *STREPTOCOCCUS MUTANS* UA159 Ở DẠNG HUYỀN DỊCH VÀ BIOFILM CỦA 8-HYDROXYQUINOLIN KẾT HỢP VỚI CÁC ION KIM LOẠI CÓ KHẢ NĂNG CHUYỂN ĐỔI

NGUYỄN THỊ MAI PHƯƠNG, NGUYỄN THỊ NGỌC DAO

Viện Công nghệ sinh học

ĐỖ NGỌC LIÊN

Trường đại học Khoa học tự nhiên, ĐHQGHN

ROBERT E. MARQUIS

Đại học Tổng hợp Rochester, Niu Yoóc, Mỹ

Các vi khuẩn *Streptococci* đường miệng trong mảng bám răng thường xuyên trải qua các stress oxy hóa do sự hình thành những gốc oxy hoạt động, bao gồm cả peroxit hydro (H_2O_2) sinh ra trong quá trình trao đổi chất hay có trong các sản phẩm bảo vệ răng [4, 11]. Chúng tôi nhận thấy độ nhạy với tổn thương, gồm cả những tổn thương diệt vi khuẩn sâu răng do H_2O_2 , có thể tăng lên đáng kể khi kết hợp với các ion kim loại chuyển đổi hay các chất tạo phức càng cua (chelator) như 1,10-O-phenanthrolin [1, 5]. Các hợp chất quinolin đã được sử dụng rất có hiệu quả để khử trùng, đặc biệt là để chống nấm cũng như các vi khuẩn khác [12, 13, 14]. Trong số các dẫn xuất của quinolin, 8-Hydroxyquinolin (8HQ) là một chất tạo phức càng cua và có tác dụng ngăn ngừa hiệu quả rất nhiều bệnh khác nhau [3]. Chính vì vậy, chúng tôi đã nghiên cứu tác dụng diệt khuẩn của 8HQ lên chủng vi khuẩn *Streptococcus mutans* UA159, tác nhân chính gây sâu răng [2], ở cả dạng huyền dịch và biofilm nhằm tìm hiểu khả năng và cơ chế diệt vi khuẩn của hợp chất này. Các nghiên cứu trước đây cho thấy tác dụng của 8HQ lên vi khuẩn là do khả năng tạo phức với các ion kim loại, đặc biệt là Fe^{2+} [12]. Bài báo này trình bày các kết quả nghiên cứu về tác dụng diệt mạnh cũng như gợi ý về cơ chế làm gia tăng tổn thương oxy hóa của 8HQ đối với chủng vi khuẩn *S. mutans* UA159. Mục đích cuối cùng của nghiên cứu là tìm ra những hợp chất kháng khuẩn mới, có hiệu

quả kháng khuẩn cao để cải thiện chất lượng của các sản phẩm bảo vệ răng.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Nguyên liệu

Chủng vi khuẩn *S. mutans* UA159 được lấy từ bộ sưu tập giống của phòng thí nghiệm của giáo sư Robert E. Marquis, trường đại học Tổng hợp Rochester, Niu Yoóc, Mỹ.

H_2O_2 ở dạng dung dịch ổn định 30% (9,78M). Các hóa chất còn lại đều đạt mức độ tinh sạch phân tích.

2. Phương pháp

a) Giữ và nuôi cấy các chủng vi khuẩn

Các chủng vi khuẩn dùng cho nghiên cứu được giữ và cấy chuyển hàng tuần lên 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% trypton, 0,5% dịch chiết nấm men và 1% glucoza.

b) Tác dụng diệt vi khuẩn của 8HQ

Dung dịch tế bào được chuẩn bị trong pepton 1%, pH = 7,0 với mật độ khoảng 10^9 tế bào/ml [9]. 8HQ được thêm vào mẫu nghiên cứu để có nồng độ cuối cùng đạt 35 μ M và 69 μ M. Các ion kim loại cần nghiên cứu hay H_2O_2 cũng được thêm vào cùng với 8HQ. Đối với thí nghiệm biofilm, cách làm cũng tương tự nhưng nồng độ các chất nghiên cứu cao hơn khoảng 10

lần và thời gian lấy mẫu cũng dài hơn. Ở những thời điểm khác nhau, 100 µl dịch tế bào được lấy ra, pha loãng liên tiếp 10 lần trong dung dịch pepton 1% 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 diệt vi khuẩn của 8HQ 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. 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 diễn thì D chính là thời điểm có LogN/No = -1. Các thí nghiệm đều được lặp lại nhiều lần và các số liệu trình bày ở đây là đại diện cho những lần thí nghiệm khác nhau.

c) Tạo biofilm

Biofilm được hình thành trên các giá thể thủy tinh như đã mô tả trước đây [10]. Màng biofilm lúc đầu được hình thành trong môi trường tripton-dịch chiết nấm men-sucroza (TYS). Một ngày trước khi làm thí nghiệm, các biofilm được chuyển sang môi trường tripton-dịch chiết nấm men-glucoza (TYG). Mỗi biofilm có mật độ đạt khoảng 3×10^8 tế bào/mm² trên diện tích 18,75 cm², có trọng lượng trung bình khoảng 120 mg. Độ pH cuối cùng của môi trường nuôi cấy huyền dịch đạt khoảng 3,8 và trong môi trường biofilm đạt khoảng 4,5. Khi sấy khô, hàm lượng protein đạt khoảng 40%

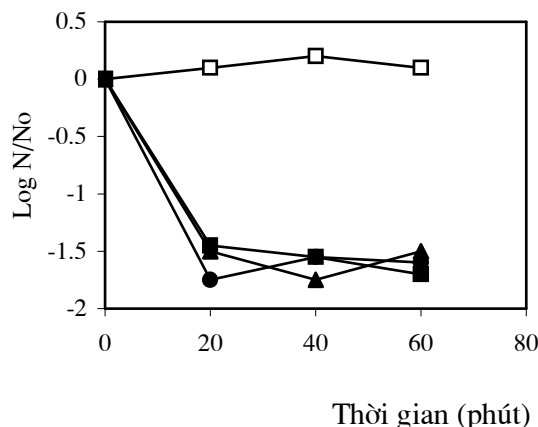
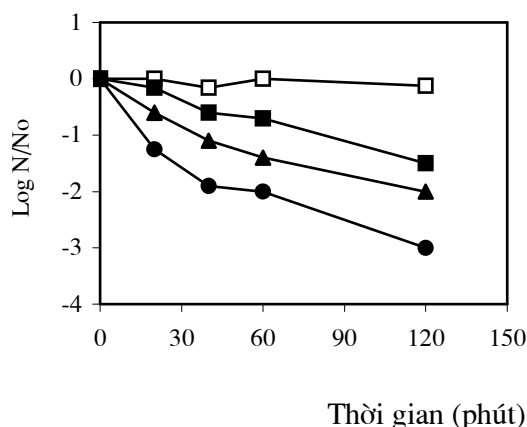
trọng lượng khô vì phần lớn trong số đó là polysaccharit được hình thành trong quá trình tạo biofilm. Vì hàm lượng đường luôn dư thừa trong môi trường nên các tế bào trên biofilm đều trải qua quá trình thích nghi axit trước khi tiến hành thí nghiệm.

Để tách rời các tế bào khỏi màng biofilm, các màng này trước tiên được tách khỏi giá thể thủy tinh vào trong dung dịch pepton 1%. Sau đó, các màng biofilm này sẽ được làm đồng nhất bằng máy nghiền đồng thể và máy siêu âm trong 15 giây. Việc xử lý này đảm bảo tạo được huyền dịch tế bào đồng nhất với các tế bào được tách rời nhau khi quan sát dưới kính hiển vi phân cực.

II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Tác dụng diệt chủng vi khuẩn *S. mutans* UA159 ở dạng huyền dịch và biofilm của 8HQ

Các số liệu trình bày trong hình 1A cho thấy 8HQ có tác dụng diệt vi khuẩn *S. mutans* trong huyền dịch ở nồng độ rất thấp (khoảng 0,00015-0,00062%). Thời gian diệt 90% ở nồng độ 8HQ 0,00062% là 15 phút. Trong khi đó, đối với các tế bào biofilm, phải sử dụng 8HQ ở nồng độ cao hơn khoảng 100 lần để có giá trị D tương tự. Đối với các tế bào biofilm khi nồng độ 8HQ tăng trên 0,1% thì tác dụng diệt khuẩn của 8HQ không tăng đáng kể (hình 1B).



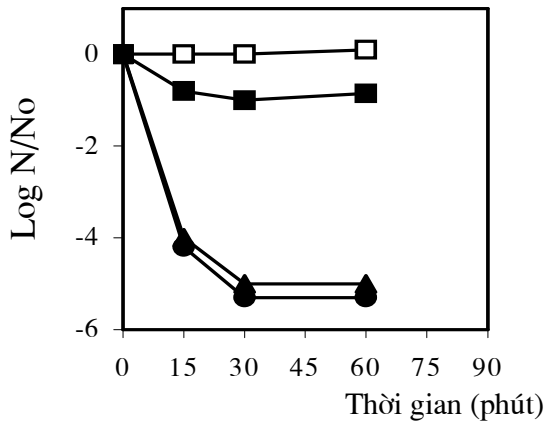
Hình 1. Tác dụng diệt vi khuẩn *S. mutans* UA159 ở dạng huyền dịch (A) và biofilm (B) của 8HQ.

A: (□): đối chứng; (■): 0,00015% 8HQ; (▲) 0,0003% 8HQ; (●): 0,0006% 8HQ.
 B: (□): đối chứng; (■): 0,1% 8HQ; (▲) 0,2% 8HQ; (●): 0,5% 8HQ.

2. Tác dụng diệt chủng vi khuẩn *S. mutans* UA159 ở dạng huyền dịch của 8HQ kết hợp với các ion kim loại và H₂O₂

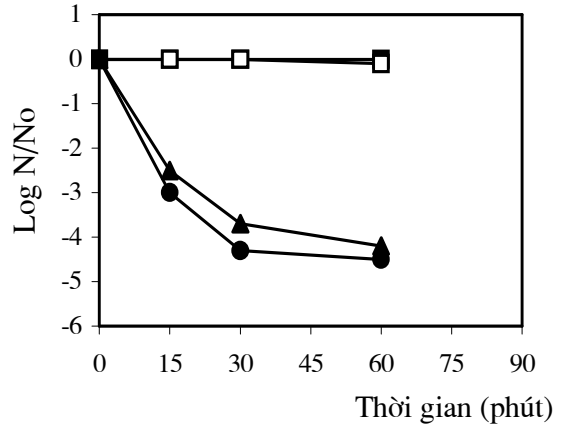
Tác dụng diệt khuẩn của 8HQ tăng lên đáng kể khi nó kết hợp với các ion kim loại có khả năng chuyển đổi như Cu²⁺ và Fe²⁺. Khi thêm Fe²⁺ ở nồng độ rất thấp (khoảng 0,0002%), giá trị D ban đầu giảm xuống chỉ còn 5 phút. Tương tự như vậy, khi thêm H₂O₂ 0,01% thì giá trị D

cũng giảm đi rõ rệt so với ban đầu. Kiểu tăng cường tác dụng diệt khuẩn này đã được phát hiện từ nhiều nghiên cứu trước đây. Nguyên nhân của nó là do các ion kim loại khử đã đóng vai trò xúc tác cho sự hình thành các gốc OH[•] từ H₂O₂ thông qua phản ứng Fenton [7]. Tác dụng gia tăng diệt khuẩn của Cu²⁺ và Fe²⁺ là tương tự nhau và mạnh hơn so với các ion kim loại khác như Co²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺ thông qua so sánh các giá trị D của chúng (hình 2, 3, 4, 5, 6).



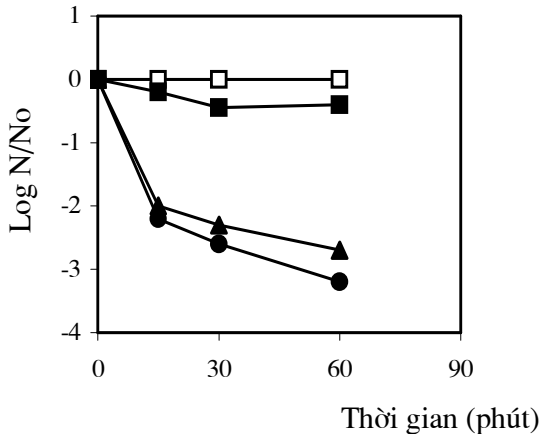
Hình 2. Tác dụng diệt vi khuẩn *S. mutans* UA159 ở dạng huyền dịch của 8HQ kết hợp với Fe²⁺ và H₂O₂

(□): đối chứng; (■): 0,0002% Fe²⁺ + 0,0001% H₂O₂; (▲): 0,0002% Fe²⁺ + 0,0002% 8HQ; (●): 0,0002% Fe²⁺ + 0,0001% H₂O₂ + 0,0002% 8HQ



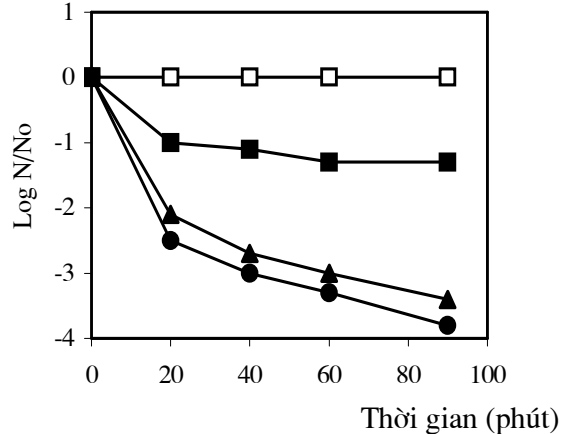
Hình 3. Tác dụng diệt vi khuẩn *S. mutans* UA159 ở dạng huyền dịch của 8HQ kết hợp với Zn²⁺ và H₂O₂

(□): đối chứng; (■): 0,0002% Zn²⁺ + 0,0001% H₂O₂; (▲): 0,0002% Zn²⁺ + 0,0002% 8HQ; (●): 0,0002% Zn²⁺ + 0,0001% H₂O₂ + 0,0002% 8HQ



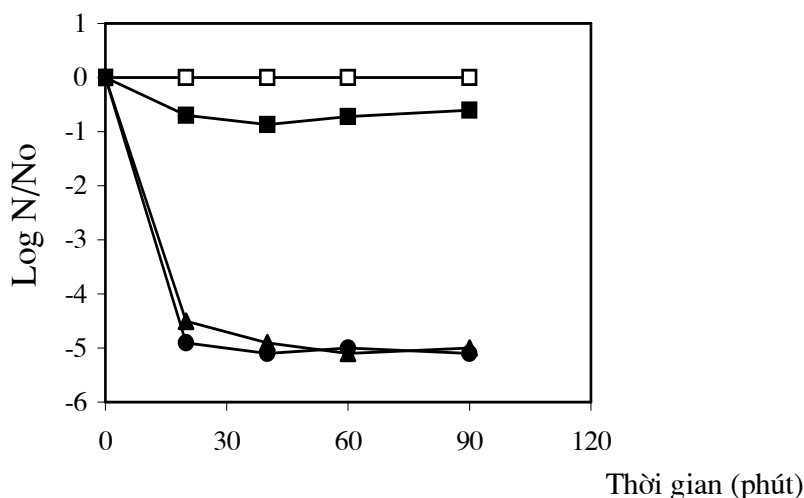
Hình 4. Tác dụng diệt vi khuẩn *S. mutans* UA159 ở dạng huyền dịch của 8HQ kết hợp với Cu²⁺ và H₂O₂

(□): đối chứng; (■): 0,0002% Cu²⁺ + 0,0001% H₂O₂; (▲): 0,0002% Cu²⁺ + 0,0002% 8HQ; (●): 0,0002% Cu²⁺ + 0,0001% H₂O₂ + 0,0002% 8HQ



Hình 5. Tác dụng diệt vi khuẩn *S. mutans* UA159 ở dạng huyền dịch của 8HQ kết hợp với Co²⁺ và H₂O₂

(□): đối chứng; (■): 0,0002% Co²⁺ + 0,0001% H₂O₂; (▲): 0,0002% Co²⁺ + 0,0002% 8HQ; (●): 0,0002% Co²⁺ + 0,0001% H₂O₂ + 0,0002% 8HQ

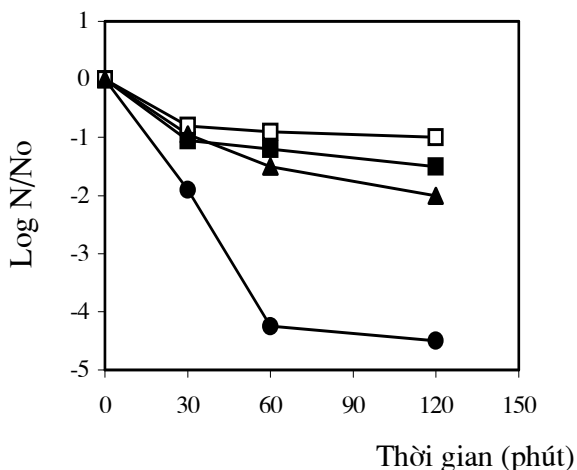


Hình 6. Tác dụng diệt vi khuẩn *S. mutans* UA159 ở dạng huyền dịch của 8HQ kết hợp với Ni²⁺ và H₂O₂

(□): đối chứng; (■): 0,0002% Ni²⁺ + 0,0001% H₂O₂; (▲): 0,0002% Ni²⁺ + 0,0002% 8HQ; (●): 0,0002% Ni²⁺ + 0,0001% H₂O₂ + 0,0002% 8HQ

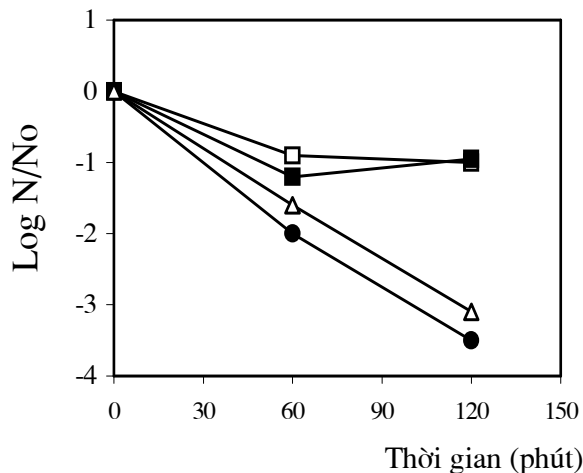
3. Tác dụng diệt chủng vi khuẩn *S. mutans* UA159 ở dạng biofilm của 8HQ kết hợp với các ion kim loại và H₂O₂

Khi tăng nồng độ các chất tác dụng lên khoảng 10 lần so với các thí nghiệm thực hiện với các tế bào huyền dịch, chúng tôi thu được tác dụng diệt khuẩn tương tự đối với các tế bào biofilm. Với công thức 8HQ (0,001%), H₂O₂ (0,01%), Fe²⁺ (1 mM) hay 8HQ (0,001%), Fe (1 mM) và tương tự với Cu²⁺, có thể diệt hoàn toàn các vi khuẩn *S. mutans* trên biofilm (hình 7, 8, 9, 10, 11).



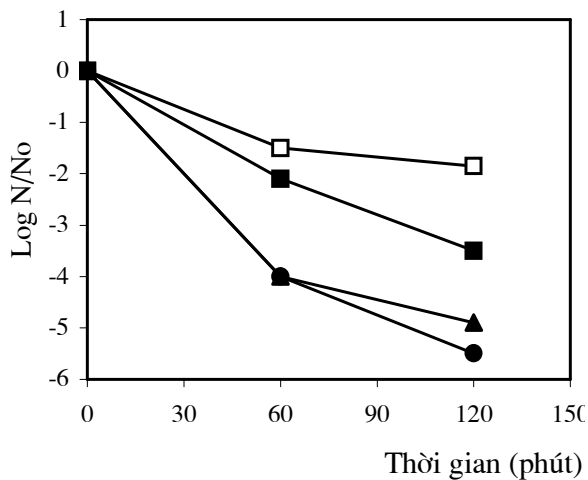
Hình 7. Tác dụng diệt vi khuẩn *S. mutans* UA159 ở dạng biofilm của 8HQ kết hợp với Fe²⁺ và H₂O₂

(□): 1 mM Fe²⁺; (■): 1 mM Fe²⁺ + 0,01% H₂O₂;
(▲): 1 mM Fe²⁺ + 0,01% H₂O₂ + 0,001% 8HQ;
(●): 1 mM Fe²⁺ + 0,001% 8HQ



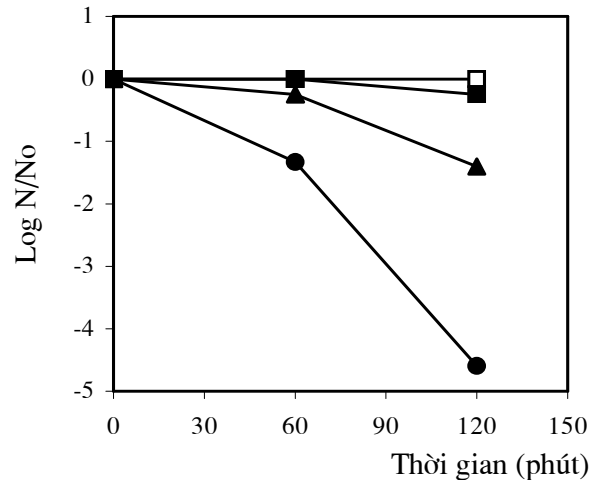
Hình 8. Tác dụng diệt vi khuẩn *S. mutans* UA159 ở dạng biofilm của 8HQ kết hợp với Zn²⁺ và H₂O₂

(□): 1 mM Zn²⁺; (■): 1 mM Zn²⁺ + 0,01% H₂O₂;
(▲): 1 mM Zn²⁺ + 0,01% H₂O₂ + 0,001% 8HQ;
(●): 1 mM Zn²⁺ + 0,001% 8HQ



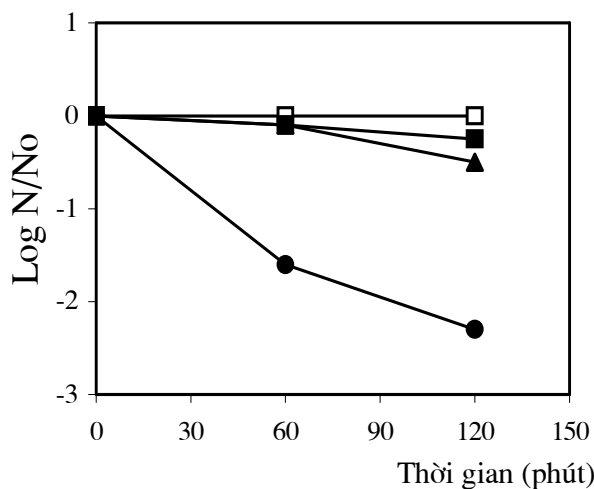
Hình 9. Tác dụng diệt vi khuẩn *S. mutans* UA159 ở dạng biofilm của 8HQ kết hợp với Cu²⁺ và H₂O₂

(□): 1mM Cu²⁺, (■): 1mM Cu + 0,01% H₂O₂,
 (▲): 1mM Cu²⁺ + 0,01% H₂O₂ + 0,001% 8HQ,
 (●): 1mM Cu²⁺ + 0,001% 8HQ



Hình 10. Tác dụng diệt vi khuẩn *S. mutans* UA159 ở dạng biofilm của 8HQ kết hợp với Co²⁺ và H₂O₂

(□): 1mM Co²⁺, (■): 1mM Co²⁺ + 0,01% H₂O₂,
 (▲): 1mM Co²⁺ + 0,01% H₂O₂ + 0,001% 8HQ,
 (●): 1mM Co²⁺ + 0,001% 8HQ



Hình 11. Tác dụng diệt vi khuẩn *S. mutans* UA159 ở dạng biofilm của 8HQ kết hợp với Ni²⁺ và H₂O₂

(□): 1mM Ni, (■): 1mM Ni²⁺ + 0,01% H₂O₂, (▲), 1mM Ni²⁺ + 0,01% H₂O₂ + 0,001% 8HQ,
 (●): 1mM Ni²⁺ + 0,001% 8HQ

III. THẢO LUẬN

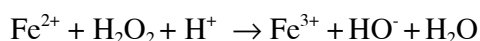
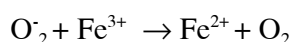
Ở đây, chúng tôi trình bày các kết quả nghiên cứu về tác dụng diệt khuẩn của 8HQ, 8HQ kết hợp với các ion kim loại và H₂O₂. Các kết quả cho thấy các tế bào trên biofilm chống chịu 8HQ tốt hơn các tế bào ở dạng huyền dịch.

Điều này cũng trùng hợp với những phát hiện của Phan và cs. [9] về tính chống chịu axit của các tế bào trên biofilm so với các tế bào trong huyền dịch. Sự khác nhau có lẽ là do trạng thái sinh lý của các tế bào trên biofilm và do khả năng khuếch tán hạn chế các proton vào màng biofilm [7]. Chính sự hạn chế này sẽ giúp làm

giảm tính nhạy cảm của vi khuẩn trên biofilm với 8HQ.

Bản thân H₂O₂ không phải là rất độc nhưng khi có mặt các ion kim loại chúng sẽ tham gia vào phản ứng Fenton (xem sơ đồ phản ứng), dẫn đến sự hình thành các gốc oxy tự do, trong đó có HO[•] rất độc, làm tăng cường tổn thương ADN, diệt vi khuẩn [6, 7].

Các bước chính trong phản ứng Fenton:



Các nghiên cứu của Shen và cs. [12] cho thấy 8HQ là chất ức chế sinh tổng hợp ARN trong nấm men thông qua việc tạo phức với các ion kim loại trong trung tâm hoạt động của ARN polymeraza, ADN polymeraza, ribonucleotit reductaza. 8HQ cũng có thể làm gãy các sợi ADN, gây peroxit hóa trong màng tế bào. Belli và cs. cho rằng các chất tạo phức càng của khi kết hợp với Fe²⁺ có thể chuyển kim loại qua màng của các tế bào biểu bì, vì vậy làm tăng tính nhạy cảm của tế bào với các chất oxy hóa. Các kết quả nghiên cứu của chúng tôi về khả năng giải kim hãm sự phát triển của tế bào của chủng *S. mutans* UA159 bị ức chế bởi 8HQ bằng MgCl₂ [8] đã cho thấy tính độc của 8HQ không phải do cơ chế tạo phức càng của với các ion kim loại của hợp chất này. Trong thí nghiệm, trên việc kết hợp của 8HQ với Fe²⁺ làm gia tăng tổn thương gây chết nhiều hơn sự kết hợp của H₂O₂ với Fe²⁺ đã chứng tỏ cơ chế tác dụng của 8HQ rất phức tạp, không phải chỉ do kim loại và H₂O₂ đã tham gia vào phản ứng Fenton. Vậy tại sao 8HQ độc với tế bào của *S. mutans*? Điều này chỉ có thể giải thích bằng cơ chế làm gia tăng tổn thương oxy hóa với khả năng 8HQ kích thích sự hình thành gốc tự do như O[•]. Để khẳng định giả thiết này cần phải tiến hành nhiều thí nghiệm về tác dụng của 8HQ lên các enzym quan trọng tham gia vào hệ thống tự bảo vệ cơ thể vi khuẩn trong điều kiện có các stress oxy hóa như NADH oxyđaza và superoxit dismutaza (SOD).

IV. KẾT LUẬN

8HQ có tác dụng diệt rất mạnh chủng vi khuẩn gây sâu răng *S. mutans* UA159. Tác dụng

của chúng có thể cho phép tạo được công thức diệt toàn bộ tế bào của *S. mutans* trên biofilm.

Cơ chế tác động của hợp chất này là rất phức tạp. Có lẽ nó đã làm gia tăng tổn thương oxy hóa đối với chủng vi khuẩn *S. mutans* UA159, đặc biệt khi có mặt của các ion kim loại.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Abranches J., Nguyen P. T. M., Marquis R. E.**, 2001: Augmentation of peroxide damage to biofilms of *Streptococcus mutans* by transition-metal cations and chelator. 101st ASM conference, Orlando., 2: 583.
2. **Belli W. A., Marquis R. E.**, 1991: Appl. Environ. Microbiol., 57: 1134-1138.
3. **Depalma P. D. et al.**, 1973: *J. Dent. Res.*, 55(2): 292-298.
4. **Duckworth R. M., Morgan S. N., Murray A. M.**, 1987: *J. Dent. Res.*, 59: 1187-1191.
5. **Dunning C. J., Ma Y., Marquis R. E.**, 1998: *Appl. Env. Microbiol.*, 64(1): 27-33.
6. **Gibson C. M. et al.**, 2000: *J. Bacteriol.*, 182: 448-455.
7. **Marquis R. E.**, 1995: *J. Indust. Microbiol.*, 15: 198-207.
8. **Nguyen P. T. M. et al.**, 2002: *Curr. Microbiol.*, 44: 262-266.
9. **Phan T. N., Reidmiller J. S., Marquis R. E.**, 2000: *Arch. Microbiol.*, 174: 248-255.
10. **Nguyễn Thị Mai Phương, Phan Tuấn Nghĩa, Robert E. Marquis**, 2003: *Tạp chí Dược học*, 10: 11-15.
11. **Ryan C. S., Kleinberg I.**, 1995: *Arch. Oral. Biol.*, 40: 753-763.
12. **Shen A. Y., Chen C. P., Roffler S.**, 1999: *Life Science*, 64(9): 813-825.
13. **Soballe B., Poole R. K.**, 1999: *Microbiol.*, 145: 1817-1830.
14. **Soballe B., Poole R. K.**, 2000: *Microbiol.*, 146: 887-896.

KILLING AUGMENTATION OF *STREPTOCOCCUS MUTANS* IN BIOFILMS AND SUSPENSIONS BY 8-HYDROXYQUINOLINE COMBINED WITH TRANSITION-METAL CATIONS

NGUYEN THI MAI PHUONG, NGUYEN THI NGOC DAO,
DO NGOC LIEN, ROBERT E. MARQUIS

SUMMARY

8-hydroxyquinoline (8HQ) has been used extensively as a chelator of mineral cations and has been found to have a variety of inhibitory effects on the biochemical systems, mainly related to the sequestration of the metal cofactors for enzymes. The bacteria biofilms are notes for resistant to antimicrobial agents reflected by slower rates of killing and higher numbers surviving challenge compared with the suspension populations. The *Streptococcus mutans* strain UA159 mono-organism biofilms on glass slides grown in fed-batch culture were more resistant to 8HQ than those in suspensions. The additions of H₂O₂ and transition-metal cations greatly increased the sensitivity of 8HQ. Nearly the total killing of cells in biofilm could be achieved in a two-hours expose with as little as 0.001% 8HQ combined with 1 mM iron or copper cations or with 0.01% (2.9 mM) H₂O₂. The result suggest that 8HQ can be highly toxic for oral streptococci by enhancing the oxidative damage caused by H₂O₂ and transition-metal cations.

Ngày nhận bài: 5-11-2002