

臭氧水对根管感染细菌的体外抑制研究

陈玫 时清 杨圣辉 李金陆

【摘要】 目的 比较臭氧水与2%氯亚明、3%双氧水对感染根管细菌的杀菌效果。方法 采用定量悬液法,分别将臭氧水、2%氯亚明、3%双氧水3种冲洗剂作用于牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*, *P. g*)、具核梭杆菌(*Fusobacterium nucleatum*, *F. n*)、牙髓卟啉单胞菌(*Porphyromonas endodontalis*, *P. e*)、粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*, *E. f*),作用时间分为15s、30s和60s 3组,分别计算杀菌率,采用SPSS17.0统计软件分析,比较3种冲洗剂在不同作用时间下对4种感染根管细菌杀菌率的差异。结果 3.69 mol/L臭氧水对*P. g*、*F. n*、*P. e*、*E. f*作用15s时,杀菌率为99.89%、99.94%、99.67%、99.91%;作用30s时,杀菌率为99.96%、99.94%、100%、99.93%;作用60s时,杀菌率分别为99.91%、99.95%、99.99%、99.93%;杀菌率无显著差异($P>0.05$),且与2%CR、3% H_2O_2 比较,杀菌率无统计学差异($P>0.05$)。结论 3.69mol/L臭氧水与常用根管消毒剂2%氯亚明和3%双氧水均具有显著的杀菌效果,用于根管消毒有一定的临床应用价值和可行性。

【关键词】 臭氧水;根管感染细菌;牙髓卟啉单胞菌;粪肠球菌;根管消毒剂

【中图分类号】 R780.2 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1006-673X(2016)05-0265-03

Effectiveness of ozonated water against bacteria in infected root canal in vitro CHEN Mei, SHI Qing, YANG Sheng-hui, LI Jin-lu. Department of Pediatric Dentistry, Capital Medical University School of Stomatology, Beijing 100050, China

【Abstract】 Objective To investigate the antimicrobial effect of ozonated water and common root canal detergents 2% CR, 3% H_2O_2 against *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas endodontalis* and *Enterococcus faecalis* in vitro. **Methods** *P. g*, *F. n*, *P. e* and *E. f* were treated respectively with ozonated water, 2% CR and 3% H_2O_2 . The antibacterial effect of these disinfectant was evaluated and compared. **Results** Ozonated water showed obvious antibacterial effect against *P. g*, *F. n*, *P. e* and *E. f* after 15s treatment, the sterilizing rate was 99.89%, 99.94%, 99.67%, 99.91% respectively after 30s treatment, 99.96%, 99.94%, 100%, 99.93% respectively after 60s treatment, and 99.91%, 99.95%, 99.99%, 99.93% respectively. There was no significant difference in sterilizing rate among different treatment time and between ozonated water and 2% CR and 3% H_2O_2 . **Conclusion** The sterilizing rate of the three detergents showed no significant difference under three different treatment time. Ozonated water may be feasible as a new root canal detergent.

【Key words】 Ozonated water; Infected root canal; *Porphyromonas gingivalis*; *Enterococcus faecalis*; Root canal detergents

根管治疗过程中,根管消毒是重要步骤之一。理想的根管消毒剂应具有高效杀菌、能溶解坏死牙髓组织、生物相容性好等性质。目前临床常用的根管冲洗剂主要有酸类、螯合剂类、蛋白酶类、碱性盐溶液、氧化剂、生理盐水等^[1]。不同类型冲洗剂各有其优缺点;尚无一种冲洗剂能达到理想要求^[2-4]。随着研究的深入,几种新型根管消毒剂被发现,如MTAD、Tetraclean、电化学活化溶液、中草药制剂、臭氧水等^[1,5]。臭氧(O_3)是氧气的同素异形体,气态呈蓝色,并有特殊气味,具有强氧化性。臭氧溶于水中,分子可直接与微生物反应,也可分解出单原子氧及羟基,与微生物发生反应;杀菌机理主要为分解产

生的氧原子与细胞壁的不饱和键发生反应,并作用于脂蛋白和脂多糖,使细胞膜通透性发生改变,导致细胞溶解死亡。对病毒的作用机理则是破坏病毒衣壳蛋白的多肽链,并使病毒RNA受损,阻止病毒的转录和复制^[6]。由于其广谱、高效的杀菌作用,臭氧已被广泛用于消毒、食品、药品的加工等多领域。在医疗上,臭氧主要应用于医疗环境的消毒、医护人员的手部消毒及器械消毒。在口腔医学领域,臭氧也以臭氧气体^[7,8]、臭氧水、臭氧化植物油等形式用于窝洞消毒^[9,10]、牙周袋冲洗、义齿清洁等方面。本研究探讨臭氧水对根管感染常见细菌的杀菌作用,为臭氧水应用于根管消毒提供实验依据。

材料和方法

1. 主要仪器及试剂

M-7200 电解式臭氧水机、OM-1000 电子臭氧水

作者单位:100050 北京 首都医科大学口腔医学院儿童口腔科[陈玫(现在厦门市口腔医院)、时清],口腔医学研究所(杨圣辉,李金陆)
通讯作者:时清,E-mail:dentshi@163.com,电话:010-57099200

浓度测试仪[百特环保科技(烟台)有限公司上海分公司]。CDC 固体培养基和液体培养基^[11]。

2. 标准菌株

牙龈卟啉单胞菌 (*Porphyromonas gingivalis*, *P. g*) ATCC 33277、47-A1; 具核梭杆菌 (*Fusobacterium nucleatum*, *F. n*) ATCC 10953; 牙髓卟啉单胞菌 (*Porphyromonas endodontalis*, *P. e*) ATCC 35406; 粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*, *E. f*) ATCC 29212(首都医科大学口腔医学研究所微生物室提供)。

3. 实验方法

抑菌剂制备:臭氧水 水温 17℃、pH6.5 用电解式臭氧水机制备 3.69mol/L 臭氧水,电子臭氧水浓度测试仪检测浓度。2% 氯亚明 (chloramine, CR)、3% 双氧水 (hydrogen peroxide, H₂O₂), 临床应用制剂。

采用定量悬液法,将各-20℃冻干国际标准菌株分别接种于 CDC 固体培养基 37℃厌氧复苏、纯化、增菌,比浊仪比浊至菌液浓度为 10⁶CFU/ml;将 0.5ml 菌液至 15ml 无菌离心管,加 5ml 中性磷酸缓冲盐溶液,3000r/min 离心清洗 3 次,弃上清液,加入 1ml PBS 缓冲液,振荡混匀;再分别加入 9ml 3.69mol/L 臭氧水、2% CR、3% H₂O₂,作用时间分别为 15、30、60s;加入 5mlPBS 缓冲液离心清洗 3 次,取各离心管内菌液 0.1ml,滴种 CDC 平皿中涂匀;37℃厌氧培养 24~72h;*E. f* 微需氧培养^[12]。空白对照组仅将等量无菌生理盐水滴种于 CDC 培养皿中培养^[13,14]。菌落计数,计算杀菌率。杀菌率 (%) = (对照组菌落数-实验组菌落数)/对照组菌落数 * 100%^[15]。实验重复 3 次,取平均值。

4. 统计学处理

采用 SPSS17.0 统计软件进行分析,各组杀菌率进行秩和检验。

结 果

空白对照组无菌落生长。3 种冲洗剂不同作用时间对 4 种细菌的杀菌率见表 1-4。不同作用时间臭氧水、2% CR、3% H₂O₂ 对 *P. g*、*F. n*、*P. e*、*E. f* 的杀菌率差异无统计学意义。

讨 论

研究证实,臭氧水对专性厌氧菌及兼性厌氧菌均有显著杀菌效果,且对专性厌氧菌的效果优于兼

表 1 3 种冲洗剂不同时间对 *P. g* 的杀菌率 (%)

冲洗剂	15s	30s	60s	<i>P_t</i>
臭氧水	99.89	99.96	99.91	0.922
2% CR	100	99.99	100	0.368
3% H ₂ O ₂	100	99.99	100	0.368
<i>P</i>	0.105	0.050	0.105	

注:*P*:3 种冲洗剂杀菌率检验;*P_t*:同一冲洗剂 3 个时间段检验

表 2 3 种冲洗剂不同时间对 *F. n* 的杀菌率 (%)

冲洗剂	15s	30s	60s	<i>P_t</i>
臭氧水	99.94	99.94	99.95	0.886
2% CR	99.95	99.98	99.91	0.808
3% H ₂ O ₂	99.96	99.97	99.97	0.754
<i>P</i>	0.871	0.939	0.939	

注:*P*:3 种冲洗剂杀菌率检验;*P_t*:同一冲洗剂 3 个时间段检验

表 3 3 种冲洗剂不同时间对 *P. e* 的杀菌率 (%)

冲洗剂	15s	30s	60s	<i>P_t</i>
臭氧水	99.67	100	99.99	0.350
2% CR	100	100	100	1.0
3% H ₂ O ₂	100	100	100	1.0
<i>P</i>	0.368	1.0	0.105	

注:*P*:3 种冲洗剂杀菌率检验;*P_t*:同一冲洗剂 3 个时间段检验

表 4 3 种冲洗剂不同时间对 *E. f* 的杀菌率 (%)

冲洗剂	15s	30s	60s	<i>P_t</i>
臭氧水	99.91	99.83	99.93	0.710
2% CR	100	100	100	1.0
3% H ₂ O ₂	100	100	100	0.953
<i>P</i>	0.236	0.236	0.558	

注:*P*:3 种冲洗剂杀菌率检验;*P_t*:同一冲洗剂 3 个时间段检验

性厌氧菌^[14-16]。本实验选取感染根管常见的 3 种专性厌氧菌 *P. g*、*F. n*、*P. e*, 及 1 种兼性厌氧菌 *E. f*。产黑色素杆菌如 *P. g*、*P. e* 等,是感染根管中的优势厌氧菌,与急性根尖周炎症状有密切的关系;*F. n* 是感染根管检出率最高的菌种之一,也是乳牙急性根尖脓肿检出率较高的菌种之一^[17]; *E. f* 感染则是根管治疗失败常见的原因之一^[18]。

臭氧水的杀菌效果与其浓度及作用时间成正比。刘宝娟等^[15]的研究证实,较低浓度 (1.339 mol/L) 的臭氧水对具核梭杆菌及牙龈卟啉单胞菌作用 2min,或对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌及变形链球菌作用 5min,其杀菌率与 3% 双氧水、0.25% 次氯酸钠液的杀菌效果一致。体外研究也证实,4

mol/L 臭氧水作用 10min, 对牙本质小管内的粪肠球菌及变形链球菌有显著杀菌效果^[16], 配合超声仪器使用则效果更显著^[19]。本实验显示臭氧水分别作用不同时间后, 对 *P. g.*、*F. n.*、*P. e.* 专性厌氧菌的杀菌率均达 99% 以上, 对兼性厌氧菌 *E. f.* 杀菌率也达到 99% 以上, 与 Nagayoshi 等^[16] 的研究结果相似, 且在不同作用时间下, 3 种冲洗剂的杀菌率无显著差异。

臭氧水对微生物的杀灭作用还与水温、pH 值、有机杂质含量等因素相关。张桂祥等^[14] 的研究表明, 臭氧水的半衰期与温度有关, 温度越高, 半衰期越短, 我们采用电极法, 在水温 17℃, pH 6.5 条件下, 其半衰期约为 80min。因此, 在臭氧水的储存过程中应该考虑温度的影响^[13]。Huth 等^[20] 研究证实臭氧水不仅对体外感染根管模型内浮游状态的细菌有杀灭作用, 对菌斑生物膜中的微生物也可起到有效的杀灭作用, 其作用受臭氧浓度、作用时间等影响^[17]。董波等^[21] 通过电镜观察发现, 臭氧水对去除根管预备过程产生的玷污层也有一定作用。此外, 体外微硬度检测也证实, 1% 次氯酸钠、3% 过氧化氢、15% EDTA 对根管分别作用 5min 及 15min, 均会降低牙本质微硬度, 而 2.15mol/L 臭氧水溶液对牙本质微硬度则无明显影响^[22]。

目前临床常用的根管冲洗剂, 均不能完全满足理想冲洗剂的要求, 特别是对于乳牙及年轻恒牙, 根尖孔较大, 且儿童在治疗过程中配合程度有限, 进行根管冲洗时容易发生各种并发症。臭氧水具有显著的杀菌效果及较好的生物安全性, 较传统根管冲洗剂小^[2], 且臭氧水在作用过程中不产生气泡, 运用于根管冲洗时不易发生皮下气肿等并发症, 运用于乳牙及年轻恒牙根管冲洗安全性较高, 有一定可行性。

本研究表明, 臭氧对 4 种根管内检出菌的有较强杀菌作用, 与 2% 氯亚明和 3% 双氧水的杀菌作用无显著差异, 可在一定程度上反应臭氧水对感染根管的作用。但在临床中, 根管内多为混合菌感染, 且多以菌斑生物膜的形式存在, 因此本实验仍不能完全模拟临床实际感染根管内的情况。因此, 臭氧水作为根管冲洗剂应用于临床有待进一步研究。

参 考 文 献

1 El Karim I, Kennedy J, Hussey D. The antimicrobial effects of root

- canal irrigation and medication. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2007, 103(4):560-569.
- Huth KC, Jakob FM, Saugel B, et al. Effect of ozone on oral cells compared with established antimicrobials. *Eur J Oral Sci*, 2006, 114(5): 435-440.
- 张泳, 方厂云. 根管冲洗剂的研究进展. *广东牙病防治*, 2008, 16(3):142-144.
- Hülsmann M, Hahn W. Complications during root canal irrigation - literature review and case reports. *Int Endod J*, 2000, 33(3): 186-193.
- Jaju S, Jaju PP. Newer Root Canal Irrigants in Horizon: A Review. *CInt J Dent*, 2011, 2011:851359
- 郑露, 陈昭斌, 许欣. 臭氧水的制备及其杀灭微生物效果与机制研究现状. *现代预防医学*, 2010, 37(15):2918-2919.
- Skomro P, Opalko K, Gadomska-Krasny J, et al. Ozone therapy with the OzonyTron apparatus. *Ann Acad Med Stetin*, 2005, 51(2): 39-42.
- Millar BJ, Hodson N. Assessment of the safety of two ozone delivery devices. *J Dent*, 2007, 35(3): 195-200.
- Montevocchi M, Dorigo A, Cricca M, Checchi L. Comparison of the antibacterial activity of an ozonated oil with chlorhexidine digluconate and povidone-iodine. A disk diffusion test. *New Microbiol*, 2013, 36(3):289-302.
- Sechi LA, Lezczano I, Nunez N, et al. Antibacterial activity of ozonized sunflower oil (Oleozone). *J Appl Microbiol*, 2001, 90(2): 279-284.
- 熊德鑫. 临床厌氧菌检验手册. 北京: 中国科学技术出版社, 1994. 165-166.
- 冯骏驰, 杨圣辉. 臭氧化水对口腔变形链球菌的体外作用研究. *现代口腔医学杂志*, 2008, 22(2):150-152.
- 中华人民共和国国家技术监督局. GB15981-1995. 消毒与灭菌效果的评价方法与标准. 北京: 中国标准出版社, 1995-12-15.
- 张桂祥, 林修光. 臭氧水稳定性与杀菌性的试验观察. *现代预防医学*, 2007, 34(9):1772-1773.
- 刘宝娟, 倪龙兴, 杨巨才, 等. 常用根管冲洗液与臭氧液杀菌效果的实验研究. *临床口腔医学杂志*, 2006, 22(7):420-421.
- Nagayoshi M, Kitamura C, Fukuzumi T, et al. Antimicrobial Effect of Ozonated Water on Bacteria Invading Dentinal Tubules. *J Endod*, 2004, 30(11): 778-781.
- Bialoszewski D, Pietruczuk-Padzik A, Kalicinska A, et al. Activity of ozonated water and ozone against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Med Sci Monit*, 2011, 17(11): 339-344.
- Sun J, Song X, Kristiansen BE, et al. Occurrence, population structure, and antimicrobial resistance of enterococci in marginal and apical periodontitis. *J Clin Microbiol*, 2009, 47(7): 2218-2225.
- Hubbezoglu I, Zan R, Tunc T, et al. Antibacterial Efficacy of Aqueous Ozone in Root Canals Infected by *Enterococcus faecalis*. *Jundishapur J Microbiol*, 2014, 7(7):1-5.
- Huth KC, Quirling M, Maier S, et al. Effectiveness of ozone against endodontopathogenic microorganisms in a root canal biofilm model. *Int Endod J*, 2009, 42(1): 3-13.
- 董波, 朱地, 王建平. 臭氧水溶液去除根管内玷污层的扫描电镜观察. *J Oral Sci*, 2009, 25(6):736-738.
- 朱地, 于海利, 刘丽梅. 臭氧水溶液对牙本质微硬度影响的实验研究. *口腔医学研究*, 2015, (5):520-521

(2015年11月17日收稿)