

臭氧水对口臭相关细菌的体外抑制效果研究

江静 黎春晖 聂敏海

【摘要】 目的:探讨臭氧水对口臭相关细菌的体外抑制效果。方法:通过革兰氏染色和 PCR 条带对口臭相关细菌牙龈卟啉单胞菌、具核梭杆菌和中间普氏菌 3 种细菌临床株进行鉴定。利用臭氧发生器制备臭氧水并以碘量法测定水中的臭氧浓度及该设备可获得的最大臭氧水浓度。最后,利用臭氧水的杀菌作用和人工唾液模拟口腔环境,获得体外抑菌效果。结果:3 株菌的革兰氏染色结果均与理论相符。实验所用的臭氧发生器制备的臭氧水最大浓度约为 0.2 mg/L。臭氧浓度在 0.05、0.1、0.2 mg/L 时,对 3 株菌均具有较好的抑制作用,但随着臭氧浓度降低,抑制效果减弱。同时,人工唾液干扰后,臭氧水抑菌作用降低。结论:臭氧水可以抑制口臭相关细菌牙龈卟啉单胞菌、中间普氏菌和具核梭杆菌的增殖,人工唾液可减弱其抑菌能力。

【关键词】 口臭; 牙龈卟啉单胞菌; 中间普氏菌; 具核梭杆菌; 臭氧水

The inhibitory effect of ozone water on bad breath pathogens *in vitro*

JIANG Jing, LI Chunhui, NIE Minhai. 646000 Luzhou, Southwest Medical University, School of Stomatology, Sichuan Province, China

【Abstract】 Objective: To study the inhibitory effect of ozone water on bad breath pathogens *in vitro*. **Methods:** *In vitro* cultured bad breath pathogens *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*), *Prevotella intermedia* (*Pi*) and *Fusobacterium nucleatum* (*Fn*) were identified by Gram stain and a PCR test. Ozonated water was prepared by ozone generator and the concentration of ozone in water was measured using iodine titration. Artificial saliva was used to observe its interference on ozone function. **Results:** Gram stain and PCR results were consistent with strain characteristics. The ozone concentration of ozonated water reached to the maximum of 0.2 mg/L. Ozone water with the concentration was 0.05, 0.1 and 0.2 mg/L inhibited the proliferation of *Pg*, *Pi* and *Fn*. But the inhibitory effect was weakened when the concentration decreased. The artificial saliva reduced the effect of ozone water. **Conclusion:** The *Pg*, *Pi* and *Fn* can be inhibited by ozone water. Artificial saliva may reduce the effects of ozone water on the bacteria.

【Key words】 Bad breath; *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*); *Prevotella intermedia* (*Pi*); *Fusobacterium nucleatum* (*Fn*); Ozone water

中图分类号:R781.9 文献标志码:A doi:10.3969/j.issn.1001-3733.2019.01.004

口臭主要由口腔微生物(革兰氏阴性厌氧菌占多数)对口腔中滞留物质腐败分解引起^[1]。同时,口臭给就诊患者带来严重的心理负担和社交障碍。研究表明,口臭主要是由牙周致病菌内含硫氨基酸的代谢产物增加所致,如硫化氢(H₂S)、二甲硫醇[(CH₃)₂S]、甲硫醇(CH₃SH)等^[2]。口臭致病菌主要是厌氧菌,如牙龈卟啉菌(*porphyromonas gingivalis*, *Pg*)、中间普氏菌(*prevotella intermedia*, *Pi*)、具核梭杆菌(*Fusobacterium nucleatum*, *Fn*)等^[3]。资料显示,超过 80% 的口臭患者通常是由多种菌株混合感染所致,且这类菌

株在理化特性上极为相似^[4]。因此,在研究患者口腔中口臭致病菌时,应先了解感染菌群,有利于后期用药。

口臭就诊患者没有年龄和性别的区分,病例的分布范围也较广。因此,临床用药也较为广泛,最终细菌对某些临床药物产生耐药性。臭氧水具有广谱杀菌作用,可能具有清除口臭的作用。同时,臭氧水杀菌基本无毒副作用,为临床上替代抗生素提供新思路。为此,本课题组从西南医科大学附属口腔医院(2017 年)收集到 3 株临床分离株,探讨臭氧水的杀菌作用,以期达到除口臭的作用。

作者单位:646000 泸州,西南医科大学口腔医学院

通讯作者:黎春晖 E-mail:6012647@qq.com

1 材料与方法

1.1 主要试验材料与仪器

1.1.1 试验菌株 牙龈卟啉单胞菌(*Pg*)、具核梭杆菌(*Fn*)及中间普氏菌(*Pi*)来自2017年西南医科大学附属口腔医院病人口腔中的分离株。

1.1.2 主要仪器 臭氧发生器(GX-188型,成都肯格王三氧电器设备有限公司);洁净工作台(SW-CJ-2F,苏净集团苏州安泰空气技术有限公司);厌氧培养箱(YQX-II,上海精其仪器有限公司);倒置生物显微镜(AE31,麦克奥迪实业集团有限公司);酶标仪(Multiskan,赛默飞世尔仪器有限公司,美国)。

1.1.3 试剂 臭氧测定试剂盒(Lot:8304172,广东环凯微生物科技有限公司);革兰氏染液(规格10 ml×4);人工唾液(XH-002,东莞市誉扬检测仪器有限公司);细菌基因组DNA提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司];BHI血琼脂平板(广东环凯微生物科技有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 细菌复苏及传代 将冻存管(菌株)表面用75%乙醇擦拭后移入洁净工作台,分别复苏后各取

100 μl到血平板上涂布培养。置入厌氧培养箱中,设置温度为37℃(10% CO₂, 80% N₂, 10% H₂)。培养3 d后,分别挑取具*Fn*、*Pg*、*Pi*单菌落进行扩增,收集菌体进行试验。

1.2.2 革兰氏染色鉴定 用吸水纸将载玻片擦干,在玻片上滴10 μl生理盐水,接种环灼烧,待其冷却后,挑取单个菌落均匀涂于玻片的生理盐水上,待其自然干燥。再通过固定、95%乙醇染色、脱色、复染等,油镜头下观察菌体形态。

1.2.3 PCR鉴定 DNA提取:按试剂盒说明书操作。PCR扩增:引物序列见表1。

1.2.4 臭氧水的制备及测定方法 在环境温度为25℃的条件下,将臭氧发生器产生的臭氧气体以多孔砂棒通入盛有250 ml灭菌蒸馏水的具塞三角瓶中,并分别于臭氧水产生的每隔2 min即2、4、6 min……关闭发生器,再用碘量法分别测定各个时间点所对应的臭氧水中臭氧浓度,并测得该臭氧发生器开机所能获得的最大臭氧水浓度以及获得最大臭氧水浓度所需的时间。为减小实验误差,此实验中所涉及的测量步骤均需重复3次,实验结果取3次的平均值。

表1 3株菌的扩增引物序列

Tab 1 The amplification primer sequences of 3 strains of bacteria

菌株	引物序列		扩增目的片段 16SRNA
	Forward	Reverse	
中间普氏菌	5'-AGACGGCCTAATACCCGATGTTG-3'	5'-TTACCCGCACCAACAAGCTAATCAG-3'	GI: AY689226.1
牙龈卟啉菌	5'-TGGGACTTGCTGCTCTTGCTATG-3'	5'-GATGGCTTCCTGCTGTTCTCCA-3'	GI: AB261608.1
具核梭杆菌	5'-GCCGA ACTACAAGTGTAGAGGTG-3'	5'-GTTCGACCCCAACACCTAGTA-3'	GI: EF089177.1

1.2.5 臭氧水抑菌试验 取离心管并按如下方法加入试剂:实验组离心管中分别加入浓度为0.2、0.1、0.05 mg/L的臭氧水4.5 ml,阴性对照组离心管中加入蒸馏水4.5 ml,再分别各组的离心管中加入对应细菌编号的0.5 ml菌悬液,分别作用30 s和60 s,适当稀释后取10 μl接种于实验用BHI血琼脂培养基。在厌氧环境中(80% N₂, 10% H₂, 10% CO₂)培养48 h后进行菌落数CFU计数,计算出抑菌率,观察在30 s和60 s作用时间下3种不同浓度臭氧水的体外抑菌效果。重复实验3次,实验结果取3次的均值。采用人工唾液模拟正常口腔环境,同样条件下,观察臭氧水的抑菌情况。本实验结果重复3次,取平均值。

2 结果

2.1 革兰染色结果

3株菌经革兰染色后,油镜下观察可见中间普氏菌(图1A)为革兰阴性球杆菌,牙龈卟啉单胞菌(图1B)为革兰阴性短杆菌,具核梭杆菌(图1C)为革兰阴性梭状杆菌,形态特点与3株菌的理论形态相符。

2.2 PCR鉴定结果

3株菌经PCR鉴定,结果显示中间普氏菌,牙龈卟啉菌,具核梭杆菌分别在105、194、175 bp左右有一条清晰的条带(图2),与理论相符。

2.3 臭氧水浓度测定结果

在实验室当时室温下,采用目前的臭氧水制备条件下制备所得的臭氧水的最大浓度为0.2 mg/L,对其进行对倍稀释,获得3个浓度分别为0.2、0.1、0.05 mg/L的臭氧水备用。

2.4 臭氧水抑菌试验结果

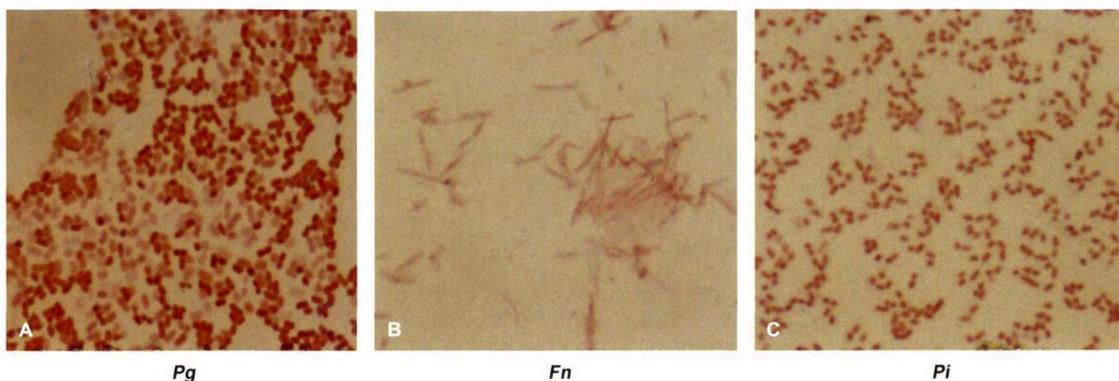
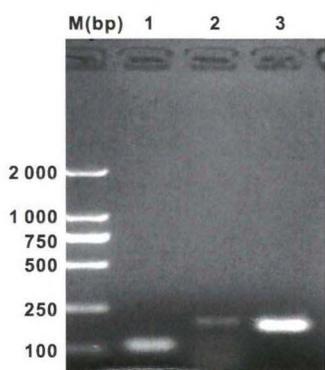


图 1 3 种细菌的形态

(×1 000)

Fig 1 The morphology of the 3 bacteria stains

(×1 000)



1: 中间普氏菌; 2: 牙龈卟啉单胞菌; 3: 具核梭杆菌

图 2 *Pi*、*Pg*、*Fn* 的 16S rDNA PCR 条带谱图结果

Lane 1: *Pi*; Lane 2: *Pg*; Lane 3: *Fn*

Fig 2 The 16SrDNA PCR bands of the 3 bacteria strains

臭氧水抑菌结果显示,臭氧水在臭氧浓度在0.05、0.1、0.2 mg/L 3 个浓度时对中间普氏菌,牙龈卟啉菌及具核梭杆菌均具有较好的抑制作用,随着臭氧浓度的降低,臭氧水对 3 株菌的抑制效果也减弱,具有浓度依赖关系(表 2)。

2.5 人工唾液干扰臭氧水抑菌试验结果

由表 3 可知,在唾液的存在情况下,臭氧水在臭氧浓度为 0.2、0.1、0.05 mg/L 的臭氧水时对中间普氏菌,牙龈卟啉菌及具核梭杆菌均具有一定的抑制作用,同时随着臭氧浓度的降低,臭氧水对 3 株菌的抑制效果也减弱,具有浓度依赖关系。但抑菌作用较单纯臭氧水相比显著降低。

表 2 3 株菌的臭氧水抑菌试验结果

Tab 2 The results of ozone water suppression test of 3 bacteria strains

臭氧水浓度	臭氧水溶液作用 30 s 培养后抑菌率(%)			臭氧水溶液作用 60 s 培养后抑菌率(%)		
	<i>Pg</i>	<i>Fn</i>	<i>Pi</i>	<i>Pg</i>	<i>Fn</i>	<i>Pi</i>
0.2 mg/L	96.33 ± 3.18	95.54 ± 3.89	73.72 ± 13.33	99.74 ± 0.44	99.78 ± 0.32	85.73 ± 7.27
0.1 mg/L	91.81 ± 3.73	91.33 ± 2.12	66.71 ± 8.26	99.72 ± 0.43	99.68 ± 0.30	80.40 ± 3.07
0.05 mg/L	42.67 ± 33.54	42.43 ± 18.93	62.89 ± 5.36	99.72 ± 0.43	65.20 ± 7.11	66.61 ± 2.03

表 3 人工唾液干扰臭氧水抑菌试验结果

Tab 3 The results of inhibition test of ozone water interfered by artificial saliva

臭氧水浓度	臭氧水溶液作用 30 s 培养后抑菌率(%)			臭氧水溶液作用 60 s 培养后抑菌率(%)		
	<i>Pg</i>	<i>Fn</i>	<i>Pi</i>	<i>Pg</i>	<i>Fn</i>	<i>Pi</i>
0.2 mg/L	53.92 ± 6.69	53.69 ± 9.26	38.81 ± 7.71	81.24 ± 22.67	99.81 ± 0.32	48.75 ± 5.73
0.1 mg/L	36.37 ± 10.10	20.99 ± 12.25	27.07 ± 11.78	37.69 ± 12.30	99.55 ± 0.39	30.36 ± 6.44
0.05 mg/L	13.34 ± 7.11	12.79 ± 8.14	16.19 ± 3.56	28.86 ± 6.23	25.54 ± 2.71	20.77 ± 7.01

3 讨论

研究发现,牙龈卟啉单胞菌、具核梭杆菌及中间普

氏菌等与口臭密切相关,郭兴怀等^[5]抽取 43 例口臭患者细菌样本,检测发现主要是牙龈卟啉单胞菌、中间普氏菌等构成,且主要牙周致病菌与口臭程度存在着

高度相关性。肖晗等^[6]发现,具核梭杆菌通过刺激 IL-6 的产生促进食管癌细胞的增殖。具核梭杆菌感染可导致肠胃炎,主要是该菌株诱导肠上皮细胞 Caco-2 凋亡,其具体机制可能与 GADD34 及 GADD153 基因表达转录水平上调和 AKT 磷酸化下调密切相关^[7]。中间普氏菌是产黑色素类革兰氏阴性厌氧杆菌,没有芽孢,是口臭患者十分常见的病原微生物^[8]。潘亚萍等^[9]通过细菌混合培养发现,口臭患者口腔里的中间普氏菌变形链球菌与、血链球菌呈拮抗关系,与伴放线放线杆菌和具核梭杆菌呈共生关系。本课题基于 3 株菌的严重危害性和普遍性,以其为研究对象,进行深入探讨。

抗生素可以有效杀死口臭致病菌,达到清除口臭的目的。但近年来,凸显的耐药性问题让不少医务人员束手无策。因此,抗生素替代产品的挖掘任重道远。研究表明^[10],臭氧可以杀灭口腔患者中的部分病原微生物,且当臭氧水浓度达到 1.3 mg/L 时,作用 120 s 后,对中间普雷沃菌杀菌率可达到 100%。臭氧主要是依靠其强氧化性破坏细菌细胞内核酸,如嘌呤和嘧啶,破坏 DNA 复制,不会产生耐药性。本研究结果发现,臭氧水具有降低口臭的作用。当臭氧水浓度在 0.05、0.1、0.2 mg/L 时对 3 种菌均具有较好的抑制作用,且随着臭氧浓度的升高,抑制作用加强,60 s 作用效果比 30 s 强。臭氧水对口臭厌氧菌的作用时间是否与抑制率成线性关系,还需进一步研究证实。

本研究发现,当用人工唾液来模拟口腔环境时,臭氧水抑菌作用降低。证明临床应用上,臭氧水还需要进一步改进。抑菌作用下降可能与人工唾液中的还原性金属离子、缓冲液存在等有关,也可能与人工唾液的 pH 值、唾液流率及微观成分的变化有关。本课题组将进一步通过临床试验来加以探索和研究。

4 结 论

臭氧水能够对口臭相关细菌产生抑制作用,降低口臭。0.2 mg/L 和 0.1 mg/L 的臭氧水溶液对 3 种菌的抑制效果均明显高于 0.05 mg/L 的臭氧水溶液对 3

株菌的抑制效果,临床上为达到良好的治疗效果,应使用浓度 ≥ 0.1 mg/L 的臭氧水溶液,且作用时间以达到 60 s 为宜。但实际应用中,还可能存在不少缺陷。因此,需要进一步深入研究。

参 考 文 献

- [1] 朱卫东,沙月琴. 牙周治疗改善口臭的作用[J]. 实用口腔医学杂志, 2003, 19(2): 116-118.
- [2] 周宜坤,张杰,何泽,等. 西帕依固龈液治疗口臭随机对照试验的 Meta 分析[J]. 实用口腔医学杂志, 2017, 33(1): 109-113.
- [3] 刘瑜,李树锦,张森林,等. 牙龈卟啉单胞菌脂多糖促进牙龈成纤维细胞的自噬[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2017, 33(3): 315-319.
- [4] 杨禾,孟姝,赵蕾,等. 应用实时荧光定量 PCR 定量检测慢性牙周炎患者龈下菌斑中牙龈卟啉单胞菌[J]. 现代口腔医学杂志, 2008, 22(2): 143-146.
- [5] 郭兴怀,张晓萍. 慢性牙周炎主要牙周致病菌和口臭的相关性分析[J]. 临床口腔医学杂志, 2016, 32(5): 262-264.
- [6] 肖晗,葛李晨,王海芳,等. 具核梭杆菌促进食管癌细胞增殖的研究[J]. 解剖学研究, 2014, 36(2): 132-135, 141.
- [7] 王昆. 具核梭杆菌诱导的肠上皮细胞炎症反应的初步研究[D]. 重庆:第三军医大学, 2015.
- [8] 邹岩,漆正楠,尹君,等. 慢性根尖周炎感染根管中中间普氏菌基因多态性研究[J]. 实用口腔医学杂志, 2012, 28(3): 369-372.
- [9] 潘亚萍,章锦才,张蕴惠. 中间普氏菌与其它几种口腔细菌相互作用的动态观察[J]. 中国医科大学学报, 1996, 25(3): 264-266.
- [10] 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[J]. 临床口腔医学杂志, 2006, 22(7): 420-421.

(收稿:2018-09-07 修回:2018-11-27)