

## Działanie Dentoseptu na bakterie beztlenowe wyizolowane z kieszonek dziąsłowych

### The effect of Dentosept on anaerobic bacteria isolated from gingival pockets

Anna Kędzia

#### Streszczenie

Zbadano 186 szczepów bakterii beztlenowych wyizolowanych z materiałów pochodzących z kieszonek dziąsłowych od 24 pacjentów z chorobami przyzębia. Badanie wrażliwości drobnoustrojów beztlenowych na Dentosept przeprowadzono metodą seryjnych rozcieńczeń w agarze *Brucella* z dodatkiem 5% odwłóknionej krwi baraniej. Inokulum zawierało  $10^5$  CFU/ml. Inkubację prowadzono przez 48 godzin w  $37^\circ\text{C}$  ( $310^\circ\text{K}$ ) w anaerostatach zawierających 10%  $\text{CO}_2$ , 10%  $\text{H}_2$  i 80%  $\text{N}_2$ , w obecności katalizatora palladowego i wskaźnika warunków beztlenowych. Za MIC uznano takie stężenie Dentoseptu, które hamowało wzrost bakterii beztlenowych.

Wyniki wskazują, że szczepy z rodzaju *Bacteroides* (50%), *Porphyromonas* (43%), *Peptostreptococcus* (33%) i *Propionibacterium* (31%) były najbardziej wrażliwe na preparat (MIC  $\leq 0,6$  mg/ml). Szczepy z rodzaju *Prevotella* (21%) i *Fusobacterium* (20%) wykazały mniejszą wrażliwość. Najmniej wrażliwe okazały się szczepy z rodzaju *Peptococcus* i *Clostridium*. Stężenia MIC Dentoseptu dla tych szczepów były w zakresie od 5 mg do  $\geq 20$  mg/ml.

#### Summary

A total of 186 strains of anaerobic bacteria isolated from the samples obtained from gingival pockets from 24 patients with periodontitis were tested. The susceptibility of anaerobes to Dentosept was determined by means of plate dilution technique in *Brucella* agar with 5% defibrinated sheep blood. The inoculum contain  $10^5$  CFU/ml. Incubation was performed for 48 h at  $37^\circ\text{C}$  ( $310^\circ\text{K}$ ) in anaerobic jars containing 10%  $\text{CO}_2$ , 10%  $\text{H}_2$  and 80%  $\text{N}_2$ , in presence of palladium catalyst and indicator of anaerobiosis. The MIC was interpreted as the lowest concentration Dentosept inhibiting the growth of anaerobic bacteria.

The results of investigations indicated, strains belonging to genera *Bacteroides* (50%), *Porphyromonas* (43%), *Peptostreptococcus* (33%) and *Propionibacterium* (31%) were most sensitive to Dentosept (MIC  $\leq 0,6$  mg/ml). The strains of *Prevotella* spp. (21%) and *Fusobacterium* spp. (20%) were less sensitive to this drug. The strains belonging to genera *Peptococcus* and *Clostridium* were much less susceptible. The MIC of Dentosept for these strains were in ranges from 5 mg to  $\geq 20$  mg/ml.

---

#### HASŁA INDEKSOWE:

bakterie beztlenowe, wrażliwość beztlenowców na Dentosept, lek ziołowy

---

---

#### KEY WORDS:

anaerobic bacteria, susceptibility of anaerobes to Dentosept, herbal drug

---

Z Zakładu Mikrobiologii i Jamy Ustnej AM w Gdańsku  
Kierownik: dr hab. n. med. A. Kędzia

Adres autorki: 80-214 Gdańsk, ul. Smoluchowskiego 14.

Wiele dzieł medycznych okresu starożytności zawiera opisy roślin i możliwości przygotowywania z nich leków. Takie informacje zawierały tabliczki przechowywane w najstarszej bibliote-

ce świata starożytnego, należącej do asyryjskiego króla *Assurbanipala* (668-635 p. n. e.). Wiele przepisów dotyczących przygotowywania leków z roślin, wywarów z żywic i olejków, podaje egipski papirus z około 1550 r. p. n. e. (odszyfrowany przez niemieckiego egiptologa *Georga Ebersa* w XIX w). *Hipokrates* (460-377 p. n. e.) opisał 236 roślin i leków sporządzonych z ziół, które były stosowane w starożytnej Grecji.

Obecnie coraz częściej w profilaktyce i terapii różnych chorób stosuje się preparaty zawierające wyciągi lub olejki roślinne. Przykładem takiego leku jest *Dentosept* (*Phytopharm*). W skład *Dentoseptu* wchodzi: płynne wyciągi z kory dębu, koszyczków rumianku, liści szatwi, ziela tymianku, kwiatów arniki, ziela mięty i kłączy tataraku, standaryzowane na zawartość olejków eterycznych i garbników. Preparat między innymi zawiera: garbniki, cineol, pinen, triterpeny, kwasy fenolowe, alkohole seskwiterpenowe i flawonoidy. Składniki olejków eterycznych pochodzących z liści szatwi, ziela tymianku, liści mięty, kwiatów arniki, kwiatostanu rumianku i kłączy tataraku działają przeciwbakteryjnie i przeciwzapalnie (1, 3, 4, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 15). *Dentosept* oraz *Dentosept A* (zawiera: *Dentosept*, boraks, anestetynę, metylcelulozę i glicerol) są zalecane do płukania jamy ustnej w przypadku ropnych zapaleń dziąseł, owrzodzeń błony śluzowej, chorób przyzębia, zapaleń języka, stomatopatii protetycznych i kandydozy jamy ustnej.

Celem badań była ocena wrażliwości na *Dentosept* (*Phytopharm*) bakterii beztlenowych występujących w chorobach przyzębia.

## Materiał i metody

Materiały do badań bakteriologicznych pobrano od 24 pacjentów, u których stwierdzono: zapalenie przyzębia dorosłych (AP) 8 osób szybko postępujące zapalenie przyzębia (RPP) – 12 osób i młodzieńcze zapalenie przyzębia (JP) – 4 osoby. Materiały pobierano i niezwłocznie przesyłano (w pojemniku z płynem transportowym) z zachowaniem warunków beztlenowych do laboratorium. Próbkę pobrane z kieszonek dziąsłowych (płyn kieszonkowy lub bakteryjna

błonka nazębna poddziąsłowa) posiewano na powierzchni jednego podłoża wzbogaconego i sześciu podłoży selektywnych (8). Inkubację posiewów prowadzono przez 10 dni w temperaturze 37°C (310°K) w anaerostatach, w mieszaninie gazów: 10% CO<sub>2</sub>, 10% H<sub>2</sub> i 80% N<sub>2</sub>, w obecności katalizatora palladowego i wskaźnika warunków beztlenowych (8).

Wyhodowane drobnoustroje beztlenowe klasyfikowano wg schematów *Virginia Anaerobe Laboratory Manual* (5), *Bergey's Manual* (6), uwzględniając najnowsze zmiany taksonomiczne. Bakterie identyfikowano na podstawie cech morfologicznych, fizjologicznych i biochemicznych (testy API 20A i inne, wytwarzanie z glukozy kwasów tłuszczowych nasyconych od C<sub>1</sub> do C<sub>6</sub>, i nienasyconych: kwas bursztynowy i mlekowy) (2, 14).

Badaniom wrażliwości na *Dentosept* (*Phytopharm*) poddano 186 szczepów bakterii beztlenowych należących do rodzajów: *Prevotella* (28 szczepów), *Porphyromonas* (14 szczepów), *Bacteroides* (10 szczepów), *Fusobacterium* (30 szczepów), *Veillonella* (26 szczepów), *Peptostreptococcus* (36 szczepów), *Peptococcus* (5 szczepów), *Propionibacterium* (16 szczepów), *Actinomyces* (16 szczepów), *Clostridium* (5 szczepów) oraz 7 szczepów wzorcowych. Badania przeprowadzono metodą seryjnych rozcieńczeń preparatu w agarze. *Dentosept* był bezpośrednio przed doświadczeniem rozcieńczany w jałowej wodzie destylowanej. Następnie odpowiednie rozcieńczenia preparatu dodawano do agaru *Brucella* zawierającego 5% odwłóknionej krwi baraniej (2, 14).

Jako inokulum użyto 48-godzinnych hodowli szczepów beztlenowców we wzbogaconym bulionie tioglikolanowym zawierającym 10<sup>5</sup> CFU w 1 ml. Inkubację podłoży z posiewami i kontrolnych (bez preparatu) prowadzono w 37°C (310°K) w anaerostatach zawierających 10% CO<sub>2</sub>, 10% H<sub>2</sub> i 80% N<sub>2</sub>, katalizator palladowy i wskaźnik Eh. Wyniki badań odczytywano po 48 godzinach hodowli. Za MIC uznano takie najmniejsze rozcieńczenie *Dentoseptu*, przy którym nie było na podłożu widocznego makroskopowo wzrostu bakterii.

## Wyniki i omówienie

W tabeli I zamieszczono wyniki badań wrażliwości na Dentosept 186 bakterii beztlenowych. Spośród 82 szczepów Gram-ujemnych pałeczek beztlenowych największą wrażliwość na badany preparat wykazały bakteroidy. Wzrost połowy szczepów tego rodzaju był hamowany przez niskie stężenia wynoszące  $\leq 0,6$  mg/ml. Bardziej wrażliwe na Dentosept były szczepy z gatunku *Bacteroides forsythus* (57%) w porównaniu z *Bacteroides pneumosintes* (33%). Dużą wrażliwością charakteryzowały się szczepy z rodzaju *Porphyromonas*, z których 43% było hamowanych w stężeniach  $\leq 0,6$  mg/ml. Dla pozostałych badanych szczepów wymienionego rodzaju stężenia Dentoseptu hamujące wzrost mieściły się w zakresie od 5 mg do  $\geq 20$  mg/ml. Mniejszą wrażliwość na badany preparat wykazały szczepy z rodzaju *Prevotella* i *Fusobacterium*. Najniższe badane stężenie  $\leq 0,6$  mg/ml hamowało wzrost od 21% do 20% szczepów odpowiednio. Prawie 80% tych szczepów wymagało do zahamowania wzrostu stężeń w zakresie od 5 mg do  $\geq 20$  mg/ml.

Spośród wszystkich badanych Gram-ujemnych bakterii najniższą wrażliwość na Dentosept wykazały szczepy z rodzaju *Veillonella*. Zaledwie 8% tych ziarniaków było wrażliwych na stężenia  $\leq 0,6$  mg/ml. Wzrost 4 (15%) szczepów był hamowany przez 5 mg/ml, a pozostałych 20 (77%) w zakresie stężeń od 10 mg do  $\geq 20$  mg/ml. Spośród 41 szczepów Gram-dodatnich ziarniaków dużą wrażliwość wykazały szczepy z rodzaju *Peptostreptococcus*. Dla 1/3 badanych szczepów stężenie hamujące wzrost wynosiło  $\leq 0,6$  mg/ml, a dla kolejnych 3 (9%) szczepów było w zakresie od 1,2 mg do 2,5 mg/ml. Pozostałe 21 szczepów (58%) było wrażliwych w zakresie stężeń 5 mg –  $\geq 20$  mg/ml. Mniej wrażliwe na Dentosept były szczepy ziarniaków z gatunku *Peptococcus niger*, dla których stężenia hamujące wzrost mieściły się w zakresie 5 mg –  $\geq 20$  mg/ml.

Gram-dodatnie pałeczki charakteryzowały się dużą wrażliwością na badany preparat. W zakresie stężeń od  $\leq 0,6$  do 2,5 mg/ml było hamowanych 7 (44%) szczepów z rodzaju *Actinomyces*,

a w zakresie  $\leq 0,6$  mg – 1,2 mg/ml 6 (37%) szczepów z rodzaju *Propionibacterium*. Pozostałe szczepy tych pałeczek wymagały do zahamowania wzrostu stężeń od 5 mg do  $\leq 20$  mg/ml. Znacznie niższą wrażliwość wykazały laseczki Gram-dodatnie z rodzaju *Clostridium*, które były wrażliwe na stężenia Dentoseptu w zakresie od 5 mg do  $\geq 20$  mg/ml.

Badane szczepy wzorcowe wykazały niską wrażliwość na Dentosept (Phytopharm). Wzrost szczepów: *Bacteroides fragilis* ATCC 25285, *Bacteroides vulgatus* ATCC 8482, *Bacteroides ovatus* ATCC 8483, *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25585 i *Propionibacterium acnes* ATCC 11827 nie był hamowany przez stężenie 20 mg/ml. Natomiast szczep *Peptostreptococcus anaerobius* ATCC 27337 był wrażliwy na 10 mg/ml, a *Clostridium perfringens* ATCC 13124 na 20 mg preparatu w 1 ml.

Z doświadczeń innych autorów wynika, że niektóre olejki roślinne wykazują dużą aktywność wobec badanych przez nich bakterii beztlenowych. Olejek goździkowy, tymiankowy, oreganowy i cynamonowy w stężeniu 100 ppm hamowały wzrost szczepu *Clostridium botulinum* (7). Szczep Gram-dodatniej pałeczki z gatunku *Propionibacterium acnes* był wrażliwy na stężenia 0,5% olejku z drzewa herbacianego i 100 mg/ml olejku kardamonowego (7). Natomiast wobec szczepów *Clostridium* i *Bifodobacterium* najaktywniejsze były olejki: cynamonowy (200-800 ppm), goździkowy (200-1400 ppm), geraniowy, oreganowy, tymiankowy i miętowy (zakres MIC 400-2000 ppm) (7). Z przeprowadzonych badań wynika, że Dentosept w porównywalnych stężeniach (0,6 – 2,5 mg/ml) hamował wzrost 28% szczepów bakterii beztlenowych.

Ponieważ Dentosept (Phytopharm) zawiera według producenta 60-70% alkoholu należy wyjaśnić jakie stężenia hamują wzrost bakterii beztlenowych. Z badań 10 szczepów wzorcowych oraz 120 szczepów bakterii beztlenowych wyodrębnionych z różnych zakażeń w obrębie jamy ustnej wynika, że wszystkie szczepy były niewrażliwe na  $\leq 10\%$  stężenie alkoholu etylowego (tab. II). Stężenie alkoholu w badanych próbkach Dentoseptu wynosiło  $\leq 1,2\%$ .

Podsumowując wyniki badań należy zazna-

Tabela I. Wrażliwość na Dentosept 186 szczepów bakterii beztlenowych wyizolowanych z kieszonek dziąsłowych

Drobnoustroje	Liczba szczepów	Najmniejsze stężenie hamujące MIC mg/ml						
		≤0,6	1,2	2,5	5,0	10,0	15,0	≥20,0
<i>Prevotella intermedia</i>	11	2			1	5		3
<i>Prevotella melaninogenica</i>	12	4			2	2	1	3
<i>Prevotella oralis</i>	5				1	1		3
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	7	3			1	2		1
<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>	7	3			2	1		1
<i>Bacteroides forsythus</i>	7	4			3			
<i>Bacteroides pneumosintes</i>	3	1				1		1
<i>Fusobacterium furcosus</i>	3	1			1			1
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	15	4				3		8
<i>Fusobacterium mortiferum</i>	2						1	1
<i>Fusobacterium russii</i>	8	1				3	1	3
<i>Fusobacterium periodonticum</i>	2					2		
<i>Veillonella parvula</i>	14	1			2	2	2	7
<i>Veillonella atypica</i>	12	1			2	1		8
<i>Peptostreptococcus micros</i>	10	2	1			1		6
<i>Peptostreptococcus magnus</i>	8	4	1		2	1		
<i>Peptostreptococcus productus</i>	4	1		1		1		1
<i>Peptostreptococcus asaccharolyticus</i>	10	3			1	1		5
<i>Peptostreptococcus prevotii</i>	4	2			1			1
<i>Peptococcus niger</i>	5				2	1		2
<i>Propionibacterium acnes</i>	6	1	1			2	1	1
<i>Propionibacterium lymphophilum</i>	5	3						2
<i>Propionibacterium propionicus</i>	5	1			1	1		2
<i>Actinomyces israelii</i>	4	1	1	1	1			
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	8		2		1	1	1	3
<i>Actinomyces viscosus</i>	4	1	1		1	1		
<i>Clostridium spp.</i>	5					1	2	2
Ogółem	186	44	7	2	25	34	9	65

Tabela II. Szczepy bakterii beztlenowych odporne na  $\leq 10\%$  stężenie alkoholu etylowego

Gatunki bakterii beztlenowych	Liczba szczepów
1. Szczepy wzorcowe	
<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285	1
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> ATCC 29741	1
<i>Bacteroides vulgatus</i> ATCC 8482	1
<i>Bacteroides ovatus</i> ATCC 8483	1
<i>Fusobacterium nucleatum</i> ATCC 25585	1
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i> ATCC 27337	1
<i>Propionibacterium acnes</i> ATCC 13127	1
<i>Propionibacterium granulosum</i> ATCC 25564	1
<i>Clostridium perfringens</i> ATCC 13124	1
<i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 3584	1
2. Szczepy wyodrębnione z zakażeń w obrębie jamy ustnej	
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	10
<i>Prevotella intermedia</i>	12
<i>Prevotella bivia</i>	6
<i>Prevotella denticola</i>	8
<i>Prevotella oralis</i>	7
<i>Prevotella oris</i>	2
<i>Prevotella prevotti</i>	3
<i>Bacteroides forsythus</i>	10
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	10
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	6
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	3
<i>Peptostreptococcus micros</i>	7
<i>Propionibacterium acnes</i>	5
<i>Eubacterium alactolyticum</i>	3
<i>Eubacterium lentum</i>	3
<i>Actinomyces israelii</i>	6
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	8
<i>Actinomyces viscosus</i>	4
<i>Clostridium perfringens</i>	7
Ogółem	130

czyć, że na najniższe badane stężenie Dentoseptu ( $\leq 0,6$  mg/ml) odsetki wrażliwych szczepów Gram-ujemnych i Gram-dodatnich bakterii były zbliżone i wynosiły 28% oraz odpowiednio 22%. Podobne były też odsetki szczepów wymienionych drobnoustrojów, które do zahamowania wzrostu wymagały najwyższych stężeń wynoszących  $\leq 20$  mg/ml (31% i 25% odpowiednio). Należy zaznaczyć, że badane stężenia Dentoseptu, które hamowały wzrost bakterii beztlenowych, były znacznie niższe od stosowanych w praktyce (od 3 do 100-krotnie niższe).

Powyższe wyniki wskazują, że Dentosept może być stosowany pomocniczo w profilaktyce i leczeniu zakażeń w obrębie jamy ustnej, w których uczestniczą bakterie beztlenowe.

## Wnioski

1. Najwyższą wrażliwość na Dentosept wykazały szczepy z rodzaju *Bacteroides* i *Porphyromonas*.

2. Szczepy z rodzaju *Peptococcus*, *Clostridium* i *Veillonella* charakteryzowały się najmniejszą wrażliwością na badany preparat.

3. Dentosept wykazał dużą aktywność wobec wszystkich badanych drobnoustrojów beztlenowych.

4. Stężenia preparatu użyte w badaniach były znacznie niższe od tych, które są stosowane w praktyce.

5. Dentosept może być stosowany pomocniczo w profilaktyce i leczeniu zakażeń w obrębie jamy ustnej, w których uczestniczą bakterie beztlenowe.

## Piśmiennictwo

1. Aggag M. E., Yousef R. T.: Study of antimicrobial activity of chamomile oil. *Planta Med.*, 1972, 22, 140-144.
2. Baron E. J., Finegold S. M.: *Bailey and Scotts Diagnostic Microbiology*. C. M. Mosby Co., 8<sup>th</sup> ed. St. Louis 1990.
3. Carle R., Isaac O.: Die Kamille-Wirkung und Wirksamkeit. *Zschr. Phytother.*, 1987, 8, 67-77.
4. Cianco M., Banfi E., Tubaro A., Dellaggia R.: A microbiological survey on the activity of a hydroalcoholic extract of Chamomile. *Int. J. Crude Drug Res.*, 1983, 21, 4, 145-151.

5. *Holdeman L. V., Cato E. P., Moore W. E. C.*: Anaerobe Laboratory Manual. V. P. I. Blacksburg 4<sup>th</sup> ed., Baltimore M. D., Virginia 1977. – 6. *Holt J. G.*: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Williams and Wilkins 9th ed., Baltimore M. D., 1993. – 7. *Kalemba D.*: Przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze właściwości olejków eterycznych. Post. Mikrobiol., 1998, 38, 2, 185-203. – 8. *Kałowski M., Kędzia A.*: Nieprzetrwalnikujące drobnoustroje bez-tlenowe: Diagnostyka mikrobiologiczna w medycynie. PZWL, Warszawa 1990, 207-230. – 9. *Kędzia B., Seigiet-Kujawa B., Hołderna E., Krzyżaniak M.*: Skład chemiczny oraz działanie przeciwdrobnoustrojowe olejku szalwiowego (Ol. *Salviae*). Herba Pol., 1990, 36, 4, 155-164. – 10. *Kędzia B.*: Przeciwdrobnoustrojowe działanie Ol. *Chamomille* i jego składników. Herba Pol., 1991, 37, 1, 29-38.
- Leki roślinne – informator Herbapolu, Warszawa 1978. – 12. *Szalontay M., Verzar-Petri G., Florian E., Gimpel F.*: Weitere Angaben zur bakteriziden und fungiziden Wirkung biologisch aktiver Stoffe von *Matricaria chamomilla*. L. Pharm. Ztg., 1975, 120, 982. – 13. *Szalontay M., Verzar-Petri G., Florian E., Gimpel F.*: Weitere Angaben zur bakteriziden und fungiziden Wirkung biologisch aktiver Stoffe von *Matricaria chamomilla*. L. Dtsch. Apoth. Ztg., 1975, 115, 912. – 14. *Wexler H. M., Finegold S. M.*: Antibacterial susceptibility tests: anaerobic bacteria: Manual of Clinical Microbiology., Balows ed., Am. Soc. Microbiol., 5 th ed., Washington 1991, 1133-1137. – 15. *Yousef R. T., Taiwil G.*: Antimicrobial Activity of Volatile Oils. Pharmazie, 1980, 11, 698-701.

11. *Ożarowski A., Łańcucki J., Gęsiorowska K.*:

Otrzymano: dnia 28.XII.1999 r.