

# Wybrane metody pomiaru pH biofilmu bakteryjnego

\*Marcin Aleksiański, Izabela Strużycka

Zakład Stomatologii Zachowawczej Instytutu Stomatologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego  
Kierownik Zakładu: prof. dr hab. n. med. Elżbieta Jodkowska

## SELECTED METHODS OF BACTERIAL BIOFILM PH MEASUREMENT

### Summary

Dental plaque consists of many different microorganisms which are depended of one another and it has been recognized as a microbial biofilm. Scientific studies have been carried out for many years in order to explain how metabolism of bacterias in dental plaque changes when it is exposed to different chemical complexes and groceries. Changes of pH reflect the intensity of metabolic action in dental plaque.

The aim of this study was to describe selected methods which are used to examine changes of dental plaque. Three basic methods were presented: Sampling, Microtouch, Telemetric as well as recently introduced for such study like: *Ion-Sensitive Field Effect Transistor*, microsensors, pH-stat system. It was also described a strip method which is the cheapest and the simplest way to measure changes of plaque pH. It is nowadays compared to other methods which need specialistic equipment.

The studies in which the methods mentioned above are used enable to reliable assess the influence of different chemical complexes on changes of pH of dental plaque. The outcomes make possible to assess, amongst others, cariogenicity of different food supplies or anticaries action of different products used in prophylaxis (chewing gums, rinses, chlorhexidin, essential oil, triclosan etc.).

The results of influence of different food supplies and pharmacological products on pH changes in bacterial biofilm also give important information on caries etiopathogenesis. It improves our knowledge not only in the field of caries prevention, but also non caries tooth lesions.

**Key words:** dental plaque, biofilm, pH measurement

Płytkę nazębną ma strukturę biofilmu. Składa się z bakterii, które zmieniają się w zależności od stopnia dojrzałości płytki i pozostają ze sobą w skomplikowanych zależnościach. Badania wykazują, że w skład płytki nazębnej wchodzi ponad 146 rodzajów drobnoustrojów (1). Adhezja do powierzchni twardych tkanek zęba, sąsiedztwo różnych gatunków bakterii, obecność substancji pozakomórkowej w układzie wielokomórkowym oraz heterogenna struktura i działanie pozwalają na homeostazę biofilmu nawet w trudnych warunkach środowiskowych, takich jak brak lub nadmiar substratu czy obecność preparatów bakteriobójczych (2). Drobnoustroje metabolizują węglowodany, w wyniku czego powstają kwasy karboksylowe, takie jak mlekowy, octowy czy propionowy. Kwasy te mają zdolność demineralizacji twardych tkanek zęba, powodując w konsekwencji próchnicę zębów. Metabolizm płytki nazębnej zależy od rodzaju, składu, konsystencji spożywanego pokarmu i częstości spożywania posiłków oraz osobniczego potencjału kwasotwórczego płytki (3).

W przeszłości skuteczność preparatów zapobiegających próchnicy, modyfikujących metabolizm drobnoustrojów biofilmu, badano na modelach bez udziału

bakterii (4) lub z drobnoustrojami w stadium planktonowym (5). Postęp metod i technik badawczych, który nastąpił w ostatnim czasie, umożliwia ocenę wpływu różnych środków i produktów na procesy metaboliczne zachodzące w biofilmie. Aby określić wpływ danego preparatu na płytkę nazębną, wykonuje się między innymi pomiary pH. Pierwsze badania tego typu były prowadzone przez Stephana (1944 rok), który stworzył krzywą zmian pH płytki nazębnej po obciążeniu sacharozą oraz ustalił pH krytyczne płytki nazębnej, czyli wartość pH, poniżej której szkliwo zaczyna się rozpuszczać. Obecnie istnieje szereg metod badania pH płytki nazębnej. Najchętniej stosowane bywają trzy podstawowe metody badania pH biofilmu bakteryjnego: Sampling, Microtouch, Telemetric (6).

W metodzie Sampling (pobieranie próbek) płytka jest zeskrobywana z powierzchni zębów przy pomocy plastikowego paska lub ekskawatora. Następnie, po odpowiednim opracowaniu, badana przy pomocy mikroelektrody (ang. *plaque sampling and ex vivo measurement*) (7). Stężenia poszczególnych kwasów (mlekowy, octowy, propionowy) mierzone są metodą elektroforezy po odpowiednim rozcieńczeniu. Warun-

kiem zastosowania tej metody jest dobór pacjentów, którzy są w stanie wytworzyć co najmniej 3 mg płytki nazębnej w okresie jej akumulacji. Zaleca się, aby czas akumulacji trwał około 48 godzin (8). Przez ten czas pacjent powstrzymuje się od zabiegów higienicznych w zakresie higieny jamy ustnej. Wahania pH, jakie powoduje dany produkt żywnościowy, mogą być również analizowane poprzez pomiar zmian w stymulowanej ślinie. Po zebraniu śliny jest ona dzielona na kilka porcji, w zależności od ilości badanych produktów, następnie produkty dodawane są do poszczególnych porcji śliny, po czym badane jest pH przy pomocy specjalnej sondy, w określonych odstępach czasu (9). Przy użyciu tej metody badano wiele produktów spożywczych, jak również wpływ gumy do żucia zawierającej różne składniki na metabolizm płytki nazębnej (10). Wadą tej metody jest brak możliwości uzyskania warunków panujących w jamie ustnej. Zaletą jest skrócenie do minimum uczestnictwa pacjenta w procesie pomiarów, ponieważ proces pobierania materiału trwa krótko i jest stosunkowo prosty.

Obserwacje zmian pH płytki mogą być także prowadzone dynamicznie wewnątrz jamy ustnej przy pomocy drugiej z wymienionych metod (ang. *Microtouch electrode*). Na wstępie ustala się moment wyjściowy pomiaru pH płytki, w dalszej kolejności pacjent płucze jamę ustną sacharozą, po czym mierzone jest pH płytki nazębnej znajdującej się bezpośrednio na powierzchniach zębów. Pomiaru zwykle dokonuje się po 2, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 i 60 minutach (9, 11, 12). Pomiar wykonywany jest przy pomocy mikroelektrody połączonej z elektrodą referencyjną znajdującą się w naczyniu z roztworem 3M KCl wraz z palcem pacjenta. Jest to tzw. mostek solny. Istotną jest kalibracja układu pomiarowego, co wykonywane jest zwykle przed każdym odczytem przy pomocy roztworów standardowych o pH 7,00 oraz 4,01. Kalibracja jest operacją czasochłonną, ponieważ mikroelektroda jest bardzo czuła. Moment rozpoczęcia pomiaru, czyli ustalenia wartości wyjściowej pH, może nastąpić w różnym czasie od zastosowania preparatu mającego wpłynąć na metabolizm płytki nazębnej. W wypadku badania różnego typu płukanek wartość wyjściową określano na 90 minut po zastosowaniu poszczególnych badanych roztworów (11). Pomiar ten można wykonywać, sprawdzając działanie danego roztworu bezpośrednio po obciążeniu glukozą. W ten sposób badano skuteczność roztworu zawierającego mocznik (3). Sześć minut po płukaniu jamy ustnej sacharozą lub sorbitolem pacjent płukał ją ponownie roztworem mocznika. Pomiar wykonywany był od 3. do 27. minuty po płukaniu, co 4 minuty.

Wadą zastosowania mikroelektrod, w tym przypadku Beetrode, jest brak możliwości sterylizacji w autoklawie. Zgodnie z zaleceniami producenta urządzenie to właściwie nie powinno być stosowane w badaniach *in vivo* u ludzi. W cytowanych powyżej badaniach (3) elektroda dezynfekowana była 50% roztworem etanolu i przyporządkowana do danego pacjenta, co generuje dodatkowo wysokie koszty badań.

Trzecią metodą pomiaru płytki nazębnej jest metoda telemetryczna. System telemetryczny składa się zwykle ze szklanej elektrody o średnicy 2 mm, która na stałe umocowana jest na powierzchni stycznej zębą. Zwykle mocuje się ją do ruchomej protezy częściowej. Elektroda referencyjna przymocowana jest na stałe do ramienia osoby badanej. W przypadku tej metody elektrody pokryte płytką nazębną mierzą zmiany pH w przestrzeniach międzyzębowych. Chociaż stosując metodę telemetryczną, uzyskiwane są informacje dotyczące tylko jednej powierzchni zęba (stycznej), jest to miejsce, w którym często występuje próchnica. Podczas stosowania tej metody wykrywane są bardziej zaznaczone i dłużej trwające zmiany pH. Jest to związane prawdopodobnie z tym, że przestrzenie międzyzębowe są trudniej dostępne dla śliny, która ma właściwości buforujące. Według badań przeprowadzonych przez Ligstroma i wsp. (6) wyniki pomiarów pH płytki nazębnej wykonywane trzema metodami, po spożyciu różnych produktów, znacznie się różniły. Najniższe wskazania odczytano po zastosowaniu metody telemetrycznej, następnie *Microtouch* i *Sampling*. Jednak po zastosowaniu każdej z metod oceniane produkty zostały ustawione w tej samej kolejności pod względem wpływu na obniżenie pH po ich spożyciu.

Ciekawym rozwiązaniem wprowadzonym w ostatnich latach umożliwiającym badanie pH bezpośrednio w jamie ustnej, jest wykorzystanie jako elektrody jonoczułego tranzystora polowego (ang. *Ion-Sensitive Field Effect Transistor*). Elektroda ta zostaje na stałe umieszczona w ustach pacjenta na 3 dni, w czasie których następuje akumulacja płytki nazębnej. Następnie podczas badania dołącza się do niej elektrodę referencyjną i po przepłukaniu jamy ustnej określonym preparatem mierzy pH. Kalibrację układu wykonuje się przy pomocy standardowych roztworów referencyjnych (13).

Modyfikacją zastosowania mikroelektrod jest technika mikrosensorowa (2). Akumulacja płytki nazębnej zachodzi w tym wypadku w jamie ustnej pacjenta, ale powstały biofilm badany jest *in vitro*. Elektroda, którą wykonywany jest pomiar, sterowana jest w strukturze biofilmu przy pomocy specjalnego joysticka pod kontrolą stereomikroskopu. Czujnik elektrody przemieszczany jest w biofilmie od dna, czyli od miejsca adhezji z powierzchnią zęba na zewnątrz i wówczas dokonywane są pomiary. W ten sposób możliwe jest uzyskanie profilu płytki nazębnej. Metoda ta umożliwia porównanie kwasogenności biofilmu w zależności od środowiska, w którym powstał i potencjału próchnicotwórczego płytki, w określonym jej miejscu, w obecności określonego substratu. Ma to ścisły związek z miejscami, w których następuje demineralizacja twardych tkanek zęba, w naturalnych zagłębieniach, w których akumuluje się płytka nazębna.

Badania wpływu różnych produktów spożywczych czy preparatów farmakologicznych na zmiany pH biofilmu bakteryjnego dostarczają istotnych informacji dotyczących etiopatogenezy próchnicy. Wyniki badań pozwalają na poszerzenie naszej wiedzy nie tylko na temat

metod zapobiegania tej chorobie, ale także uszkodzeniom twardych tkanek zębów niepróchnicowego pochodzenia.

Badanie metabolizmu płytki nazębnej jako całości pozwala spojrzeć na problem fermentacji cukrów, które nie są metabolizowane przez *Streptococcus mutans* i przez to uznawane za niepróchnicogenne. Po wyizolowaniu poszczególnych rodzajów bakterii z płytki nazębnej zbadano ich zdolności do fermentacji izomerów sacharozy, które są powszechnie używane jako substytuty cukru (1). Okazało się, że bakterie z rodzaju *Actinomyces*, które dominują w płytce nazębnej, są w stanie metabolizować izomery sacharozy, co może wskazywać na potencjalną próchnicogenność tych produktów. W innych badaniach stwierdzono jednak, że drobnoustrojom z rodzaju *Actinomyces* przeszkadza w funkcjonowaniu kwaśne środowisko powstające w konsekwencji wytwarzania kwasów, nie wyizolowano ich bowiem w obecności pH poniżej 5,5 (14). Substancją stosowaną jako substytut cukru była także *lactosylfructoside* (laktofruktoza) ([O-beta-D-Gal-(1-4)-O-alpha-D-Glc-(1-2)-beta-D-Fru]). Badania wykazały, że jest to związek chemiczny niemetalizowany przez bakterie próchnicogenne, np. *Streptococcus mutans* i *Streptococcus sobrinus*, stąd może być bezpiecznie stosowany w profilaktyce próchnicy. Jednak obecnie udowodniono, mierząc pH płytki nazębnej bezpośrednio w jamie ustnej, że inne bakterie wchodzące w skład płytki nazębnej, takie jak *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mitis* i *Streptococcus oralis* mogą powodować fermentację tego związku chemicznego, obniżając pH poniżej 5,0 (13). Inną jeszcze metodą stosowaną do określania zdolności bakterii do wytwarzania kwasów jest zastosowanie pH-stat system (Radiometer, Copenhagen, Denmark). Metoda ta pozwala na pomiar ilości wytworzonych kwasów przy określonych wartościach pH środowiska (15). Określona wartość pH środowiska utrzymywana jest poprzez buforowanie wytwarzanych jonów  $H^+$  określoną ilością NaOH. W przypadku badań na *Streptococcus mitis* były to wartości pH 6,0; 5,5 oraz 5,0. Zdolność do wytwarzania kwasów przez drobnoustroje, przy danej wartości pH środowiska, mierzono przez pomiar szybkości wytworzonych jonów  $H^+$ .

W dobie powszechnego zastosowania preparatów zawierających fluor badanie metabolizmu płytki nazębnej może umożliwić odnalezienie miejsc, do których penetracja fluoru jest najmniejsza, i które przez to są najbardziej narażone na próchnicę. Wykorzystując technikę mikrosensorową, udało się opisać mechanizm demineralizacji bruzdy w poszczególnych jej częściach (16). Okazało się, że w powierzchniowych warstwach bruzdy, gdzie stężenie fluoru jest największe, demineralizacja następowała wolniej, przybierając na intensywności w głębszych warstwach, gdzie stężenie fluoru zmniejszało się. Tłumaczy to zjawisko tzw. próchnicy ukrytej.

Wadą wszystkich opisanych wyżej metod jest konieczność zastosowania specjalistycznego sprzętu.

Zmniejsza to powszechność badania metabolizmu płytki nazębnej ze względu na koszt. Ostatnio opisaną metodą, która eliminuje to ograniczenie, jest zastosowanie specjalnych pasków „Strip metod”. Paski wskazują pH w różnych zakresach – od 2,0 do 9,0. Wprowadza się je do powierzchni stycznych na 10 s, a następnie odczytuje wynik. W zależności od pH pasek zabarwia się na określony kolor. Na paskach można odczytać pomiary różniące się od 0,2 do 0,5 jednostki pH. W przeprowadzonych badaniach porównujących metodę Microtouch z metodą Strip stwierdzono, że krzywe pH płytki nazębnej po obciążeniu sacharozą są niemal identyczne (17). Jest to jednak metoda stosunkowo nowa i wymaga dalszych badań w celu potwierdzenia jej skuteczności.

W ostatnich latach przedmiotem zainteresowania wielu naukowców zajmujących się tą dziedziną stomatologii stały się między innymi badania oceniające wpływ niektórych produktów żywnościowych na metabolizm i spadek pH płytki nazębnej. Poszukuje się skutecznego preparatu, który zwalniałby szybkość, z jaką opada pH płytki oraz minimalizowałby czas, w którym wartość pH płytki jest niższa od pH krytycznego szkliwa, czyli poniżej 5,5. Opracowywane są również związki chemiczne, które będą w stanie utrzymać równowagę pomiędzy procesami de- i remineralizacji zachodzącymi w jamie ustnej.

Szczególną wartość w ocenie metabolizmu płytki nazębnej mogą mieć badania nad określaniem kariogenności produktów zawierających skrobię. Nie ma jednoznacznej opinii co do wpływu skrobi na występowanie próchnicy, duże znaczenie jednak ma sposób przetwarzania jej w procesie technologicznym (18). Dlatego konieczne jest badanie konkretnych produktów żywnościowych szczególnie, jeżeli stanowią one główne źródło węglowodanów w danej populacji (9).

Związkami chemicznymi mającymi wpływ na płytkę nazębną są niewątpliwie związki fluoru, ale i inne środki, takie jak chlorheksydyna, płukanki oparte na olejkach eterycznych, triclosan, SLS. Prowadzone są badania przez wiele ośrodków naukowych sprawdzające, czy łączenie wyżej wymienionych związków w roztworach do płukania, np. chlorheksydyny z fluorem (8) czy fluoru z triclosanem i cynkiem (11) może dodatkowo wpływać na metabolizm płytki nazębnej. Bada się również wpływ bezcukrowej gumy do żucia zawierającej mocznik na kwasotwórczość i zasadowotwórczość płytki nazębnej (3). Niezwykle istotna jest konieczność zbadania skuteczności danego związku chemicznego w warunkach jamy ustnej. Często zdarza się bowiem, że wyniki badań skuteczności różnych substancji są pozytywne w warunkach *in vitro* podczas hodowli bakterii w laboratorium, ale nie pokrywają się z wynikami badań przeprowadzonych w warunkach *in vivo* (11). Pojawiające się nowe metody i techniki badawcze w coraz większym stopniu pozwalają zbliżyć warunki badania do naturalnych, występujących w jamie ustnej na powierzchni zęba, co pozwala na uzyskiwanie coraz bardziej wiarygodnych wyników badań. □

## Piśmiennictwo

1. Matsuyama J, Sato T, Hoshino E et al.: Fermentation of Five Sucrose Isomers by Human Dental Plaque Bacteria. *Caries Res* 2003; 37: 410-415.
2. Zaura E, Ten Cate JM: Dental Plaque as a Biofilm: A Pilot Study of the Effects of Nutrients on Plaque pH and Dentin Demineralization. *Caries Res* 2004; 38 (suppl. 1): 9-15.
3. Smith CA, Higham SM, Smith PW, Verran J: The Effect of Chewing Urea-Containing Gum on Plaque Acidogenic and Alkaligenic and Alkaligenic Parameters. *Caries Res* 2004; 38: 124-129.
4. Exterkate RAM, Damen JJM, Ten Cate JM: A Single-section Model for Enamel De- and Remineralization Studies. 1. The Effects of Different Ca/P Ratios in Remineralization Solutions. *J Dent Res* 1993; 72: 1599-1603.
5. Jarvinen H, Tenovu J, Huovinen P: *In Vitro* Susceptibility of *Streptococcus mutans* to Chlorhexidine and Six Other Antimicrobial Agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1993; 37: 1158-1159.
6. Lingström P, Imfeld T, Birkhed D: Comparison of Three Different Methods for Measurement of Plaque-pH in Humans after Consumption of Soft Bread and Potato Chips. *J Dent Res* 1993; 72: 865-870.
7. Vogel GL, Zhang Z, Chow LC, Schumacher GE: Changes in lactate and other ions in plaque and saliva after a fluoride rinse and Subsequent Sucrose Administration. *Caries Res* 2002; 36: 44-52.
8. Zhang JZ, Harper DS, Vogel GL, Schumacher G: Effect of an Essential Oil Mouthrinse, with and without Fluoride, on Plaque Metabolic Acid Production and pH after a Sucrose Challenge. *Caries Res* 2004; 38: 537-541.
9. Rebelo Vieira JM, Rebelo MAB, Cury JA: Evaluation of the cariogenic potential of cassava flours from the Amazonian Region. *Caries Res* 2002; 36: 417-422.
10. Dawes C, Dibdin GH: Salivary concentrations of urea released from a chewing gum containing urea and how these affect the urea content of gel-stabilized plaques and their pH after exposure to sucrose. *Caries Res* 2001; 35: 344-353.
11. Giertsen E: Effects of Mouthrinses with Triclosan, Zinc Ions, Copolymer, and Sodium Lauryl Sulphate Combined with Fluoride on Acid Formation by Dental Plaque *in vivo*. *Caries Res* 2004; 38: 430-435.
12. Aranibar Quiroz EM, Lingstrom P, Birkhed D: Influence of short-term sucrose exposure on plaque acidogenicity and cariogenic microflora in individuals with different levels of *Mutans Streptococci*. *Caries Res* 2003; 37: 51-57.
13. Hata S, Mayanagi H: Cariogenic potential of lactosylfructoside as determined by acidogenicity of oral *Streptococci in vitro* and human dental plaque *in situ*. *Caries Res* 2001; 35: 338-343.
14. Svensater G, Borgstrom M, Bowden GHW, Edwardsson S: The Acid-Tolerant Microbiota Associated with Plaque from Initial Caries and Healthy Tooth Surfaces. *Caries Res* 2003; 37: 395-403.
15. de Soet JJ, Nyvad B, Kilian M: Strain-related acid production by oral *streptococci*. *Caries Res* 2000; 34: 486-490.
16. Zaura E, Buijs MJ, Ten Cate JM: The effects of the solubility of artificial fissures on plaque pH. *J Dent Res* 2002; 81: 567-571.
17. Carlén A, Hassan H, Lingström P: The 'Strip Method': A Simple Method for Plaque pH Assessment. *Caries Res* 2010; 44: 341-344.
18. Lingstrom P, van Houte J, Kashket S: Food Starches and Dental Caries. *CROBM* 2000; 11: 366-380.

nadesłano: 10.10.2011

zaakceptowano do druku: 07.11.2011

Adres do korespondencji:

\*Marcin Aleksiański

Zakład Stomatologii Zachowawczej IS WUM

ul. Miodowa 18, 00-246 Warszawa

tel.: (22) 502 20 32

e-mail: marcin\_aleksinski@wp.pl