

Antimikrobni učinak kalcijeva hidroksida na streptococcus mutans, streptococcus faecalis i candida albicans, *in vitro*, u tekućem hranilištu

Božidar Pavelić
Ivica Anić
Silvana Jukić
Božidar Stilinović*
Dora Najžar Flegler

Zavod za bolesti zubi,
Stomatološki fakultet
Sveučilišta u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički
fakultet*

Antimicrobial Effect of Calcium Hydroxide on
S. Mutans, S. Faecalis and C. Albicans *in vitro*,
in Liquid Media

Sažetak

U radu je ispitana osjetljivost mikroorganizama *Streptococcus mutans*, *Streptococcus faecalis* i *Candida albicans*, na različite koncentracije vodenih pripravaka kalcijeva hidroksida. Od praha kalcijeva hidroksida i sterilne destilirane vode (SDV) spravljeno je 12 vodenih pripravaka određenih koncentracija. Ispitivani mikroorganizmi zasebno su stavljeni u tekuće hranilište (Todd Hewit Broth), na temperaturi od 37 °C u aerobnim uvjetima tijekom 24 sata. Nakon inkubacije pripremljeni je sadržaj imao oko 107/ml mikroorganizama. U 12 kušalica s po 6 ml tekućeg hranilišta i 2 ml suspenzije mikroorganizama stavljeno je po 2 ml vodene otopine kalcijeva hidroksida. Tako pripremljena hranilišta ostavljena su u aerobnim uvjetima na 37 °C tijekom 48 sati.

Ispitivani pripravci kalcijeva hidroksida pokazali su najveći antimikrobni učinak nakon 24 sata. Rezultat je ostao isti i nakon 48 sati.

Inhibicija rasta *Streptococcus mutans* nastupila je pri koncentraciji suspenzije $\text{Ca}(\text{OH})_2$ od $136,97 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$ i pH 12,73, a za *Streptococcus faecalis* i *Candida albicans* pri koncentraciji od $271,18 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$ i pH 12,76.

Ključne riječi: Kalijev hidroksid, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus faecalis*, *Candida albicans*, Todd Hewit Broth tekuće hranilište

Acta Stomatol. Croat.
1995; 29: 219—224

IZVORNI ZNANSTVENI
RAD

Primljeno: 1. ožujka 1996.
Received: March 1. 1996.

Uvod

Na tržištu stomatološkog materijala danas je velik izbor preparata kalcijeva hidroksida (1,2). Svi preparati osim kalcijeva hidroksida, sadrže i dodatne sastojke koji utječu na fizikalno-kemijska svojstva i terapijski učinak proizvoda (3,4,5). Najjednostavniji pripravak kalcijeva hidroksida jest vodena suspenzija koja se na tržištu prodaje uglavnom u obliku paste (6). Ti pripravci se na stvrdnjavaju nego talože soli na doirnoj površini npr. u dodiru s dentinom ili zubnom pulpom (7).

Osim vodene suspenzije, preparati kalcijeva hidroksida mogu biti u obliku cementa, kita, laka ili kao vrsta punila (kod umjetnih masa). Podjelom pripravaka u kemijski definirane podskupine lakše se razumijeva njihov terapijski učinak.

Prema istraživanju Staehle i Pioch (7), vodena suspenzija pokazala je najjači antimikrobni učinak, cement malo slabiji, a u ostalih preparata (lak, kit, umjetan materijal) tog učinka nije bilo. Treba naglasiti da i unutar kemijski definiranih podskupina ima različitih učinaka s obzirom na dodane komponente. Primjerice "MPC" cement (Kerr, Romulus, USA) koji se danas više ne rabi, unatoč istoj kliničkoj primjeni i pripadnosti istoj skupini cemenata kao i "Dycal" (De Trey Dentsply, Konstanz, Njemačka) uopće nije oslobađao hidroksidne ione. Smatra se da je uzrok tome hidrofobno parafinsko ulje, sastavnica "MPC" cementa. Sličan je primjer i kod lakova. Preparat "Cavity Liner Woelm" (Rorer, Bielefeld, Njemačka) jače oslobađa hidroksidne ione s antimikrobnim učinkom od preparata "Hydroxyline" (Merz, Frankfurt, Njemačka) što ne oslobađa hidroksidne ione i ne utječe na rast mikroorganizama (7). Nove preparate kalcijeva hidroksida s umjetnim masama također nazivamo cementima, iako oni ne pokazuju svojstva kalcijeva hidroksida (otpuštanje hidroksidnih iona), niti dostižu tvrdoću i čvrstoću klasičnog cementa (1).

Svrha rada

Svrha rada bila je odrediti pH vrijednost najniže koncentracije vodene suspenzije kalcijeva hidroksida što pokazuje antimikrobni učinak na *Streptococcus mutans*, *Streptococcus faecalis* i *Candida albicans*, in vitro, u tekućim hranilištima.

Materijal i postupci

U radu se je rabio prah kalcijeva hidroksida br.11052 ("Kemika" Zagreb, Hrvatska) otopljen u sterilnoj destiliranoj vodi (SDV). Serijska razrjeđenja prikazana su u tablici 1. Vrijednosti pH suspenzije mjerene su, neposredno prije injiciranja u kulturu mikroorganizma. MA-5730 pH-metrom s NEC 0101 kombiniranom elektrodom točnosti ± 0.02 pH.

Tablica 1. Serijska razrjeđenja vodenih suspenzija kalcijeva hidroksida.

Table 1. Serial dilution of water suspension of calcium hydroxide.

$\text{Ca}(\text{OH})_2$ g/100 ml SDV	pH	$\text{Ca}(\text{OH})_2$ g/100 ml SDV	pH
0,032	10,93	2,048	12,76
0,064	11,90	4,096	12,80
0,128*	12,50*	8,192	12,82
0,256	12,69	16,284	12,83
0,512	12,72	32,768	12,83
1,024	12,73	65,536	12,83

Serijska razrjeđenja rađena su tako da se je masa kalcijeva hidroksida podvostručavala za svaki sljedeći pripravak (počevši od 0,001 g), a količina je SDV ostala ista (100 ml). Pripravci od 0,001-0,128 g/100ml SDV nezasićene su otopine kalcijeva hidroksida. Sva ostala razrjeđenja čine vodene suspenzije (stvaraju talog). Količina kalcijeva hidroksida od 0.128 g/100 ml SDV maksimalna je količina praha koja se može otopiti a da se na stvara talog.

U ispitivanju su upotrijebljene bakterije *Streptococcus mutans* soj D-283, *Streptococcus faecalis*, izoliran pod brojem 6716-R/89 na Zavodu za mikrobiologiju Medicinskog fakulteta u Zagrebu i kvasnica *Candida albicans* biotip 357, izolirana na Zavodu za bolesti usta Stomatološkog fakulteta u Zagrebu. Ispitivani mikroorganizmi inkubirani su 24 sata na 37 °C u aerobnim uvjetima. Nakon inkubacije broj mikroorganizama iznosio je $10^7/\text{ml}$ sadržaja.

Sva tri ispitivana mikroorganizma zasebno su nasadena u Todd Hewitt Broth hranilište. Za svaki od tih mikroorganizama pripravljeno je 13 kušalica sa 6 ml Todd Hewitt Broth hranilišta i 2 ml inkubiranog sadržaja. Nakon miješanja, u kušalice je injicirano još po 2 ml suspenzije serijskih razrjeđenja kalcijeva hidroksida. U kontrolno hranilište injicirano je 2 ml sterilne destilirane vode. Tekuća hranilišta stavljena su u inkubator na aerobne uvjete i temperaturu 37 °C. Pokusi su ponavljani pet puta za svaki ispitivani mikroorganizam. Antimikrobni učinak očitavao se nakon 24 i 48 sati na temelju zamućenosti bujona i nasada testiranog sadržaja iz pojedine kušalice na kruto hranilište (*S. mutans* nasaden je na MS agar, *S. faecalis* na krvni agar, a *C. albicans* na Saboraud agar).

Rezultati

Skupni rezultati ispitivanja prikazani su u tablicama 2 i 3. Razlika zamućenosti bujona kod bakterija *Streptococcus mutans* i *Streptococcus faecalis* bila je jasno izražena na prijelazu iz koncentracije bez inhibitornog učinka u koncentraciju s inhibitornim učinkom. Kod kvasnice *Candida albicans* taj prijelaz nije bio jasan. Tablica 3 pokazuje kontrolne rezultate nakon što su naknadno nasadene na kruta hranilišta.

Rast bakterija *Streptococcus mutans* inhibiran je suspenzijom od 1.024 g $\text{Ca}(\text{OH})_2/100$ ml SDV i pH 12.73, a kod *Streptococcus faecalis* inhibicija je nastupila kod suspenzije 2.048 g $\text{Ca}(\text{OH})_2/100$ ml SDV i pH 12,76 (slike 1 i 2).

Tablica 2. Antimikrobni učinak vodenih suspenzija kalcijeva hidroksida

Table 2. Antimicrobial effect of water suspensions of $\text{Ca}(\text{OH})_2$

$\text{Ca}(\text{OH})_2$ g/100 ml SDV	pH	Zamućenost bujona nakon 24 i 48 sati		
		<i>S. mutans</i>	<i>S. faecalis</i>	<i>C. albicans</i>
kontrola	6,84	M	M	SM
0,032	10,93	M	M	SM
0,064	11,90	M	M	M
0,128	12,50	M	M	M
0,256	12,69	M	M	M
0,512	12,72	M	M	M
1,024	12,73	B	M	M
2,048	12,76	B	B	DB
4,096	12,80	B	B	DB
8,192	12,82	B	B	DB
16,384	12,83	B	B	DB
32,768	12,83	B	B	DB/B
65.536	12,83	B	B	DB/B

M - mutno

SM - slabo mutno

DB - djelomice bistro

B - bistro

Tablica 3. Kontrola uzoraka ispitanih na tekućim hranilištima

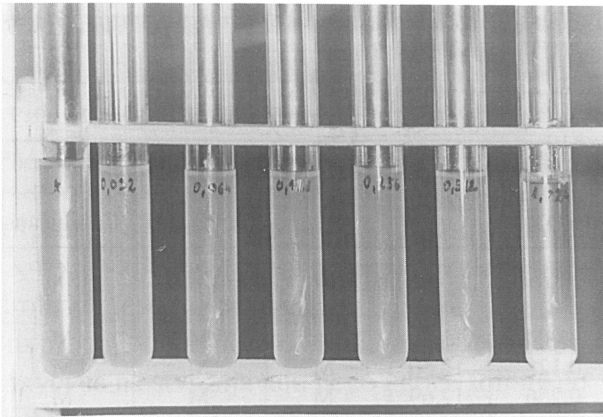
Table 3. Control samples tested on the liquid infusion

$\text{Ca}(\text{OH})_2$ g/100 ml SDV	<i>S. mutans</i>	<i>S. faecalis</i>	<i>C. albicans</i>
kontrola	+	+	+
0,032	+	+	+
0,064	+	+	+
0,128	+	+	+
0,256	+	+	+
0,512	+	+	+
1,024	-	+	+
2,048	-	-	-
4,096	-	-	-
8,192	-	-	-
16,384	-	-	-
32,768	-	-	-
65.536	-	-	-

+ rast kolonija (test pozitivan)

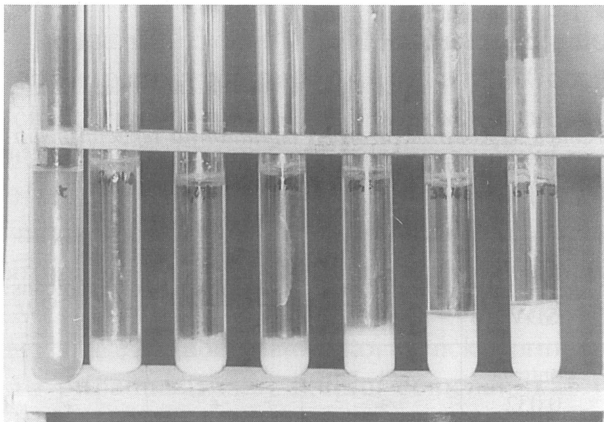
- nema rasta kolonija (test negativan)

Kod kvasnice *Candida albicans* inhibitorni učinak opažen je kod suspenzije 2.048 g $\text{Ca}(\text{OH})_2/100$ ml SDV i pH 12.76.



Slika 1. Rast bakterija *S. faecalis* u tekućem hranilištu (zamućuje) do koncentracije vodene suspenzije $\text{Ca}(\text{OH})_2$ od 1,024 i pH 12,73. K - kontrola.

Figure 1. Growth of bacteria *S. faecalis* in the liquid infusion up to the concentration of $\text{Ca}(\text{OH})_2$ water suspension of 1.024 and pH of 12,73. K - control.



Slika 2. Inhibicija rasta *S. faecalis* u tekućem hranilištu kod početne koncentracije $\text{Ca}(\text{OH})_2$ od 2,048 i pH 12,76. K - kontrola.

Figure 2. Inhibition of the *S. faecalis* growth in the liquid infusion induced by water suspension of $\text{Ca}(\text{OH})_2$. The starting concentration is 2.048 and pH is 12.73. K - control.

Rasprava

Vodena suspenzija najjednostavniji je pripravak kalcijeva hidroksida, a u usporedbi s ostalim (cement, smola, lak) otpušta najviše hidroksidnih iona što stvaraju lužnati medij. Smatra se da baš taj lužnati učinak kalcijevu hidroksidu

daje izrazito antibakterijsko svojstvo, iako sve bakterije nisu podjednako na njega osjetljive. Antimikrobni učinak kalcijeva hidroksida razvija se na neposredan i posredan način. Neposredan način očituje se djelovanjem hidroksidnih iona što svojim jetkim učinkom uništavaju mikroorganizme (8), a posrednim djelovanjem kalcijev hidroksid razlaže medij u kojem rastu mikroorganizmi uništavajući tako supstrat potreban za njihov rast (9). Za razliku od ispitivanja na krutim hranilištima, gdje je teško na jednostavan način odrediti dubinu difuzije ispitivanog sredstva u agar i promjene izazvane u samoj hranjivoj podlozi, pri radu s tekućim hranilištima te su promjene jasno vidljive (promjena zamućenosti bujona, taloženje proteinske osnove bujona).

U ovom radu promjena zamućenosti bujona podudarila se s antimikrobnim učinkom (tablica 2) kod bakterija *S. mutans* i *S. faecalis*, a kod kvasnice taj prijelaz nije bio jasno izražen. Najniža inhibitorna koncentracija suspenzije kalcijeva hidroksida za *S. mutans* bila je $136,97 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$ pri pH 12,73, a za *S. faecalis* i *C. albicans* $271,18 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$ pri pH 12,76. Prva niža koncentracija bez antimikrobnog učinka (tablica 2) imala je pH vrijednost za *S. mutans* 12,72, a za *S. faecalis* i *C. albicans* 12,73. Smatra se da osim pH vrijednosti jednako važnu ulogu u antimikrobnom djelovanju ima i ukupno otpuštena količina OH iona u jedinici vremena (10).

Prema Knappwostu (11), pH vrijednost vodene suspenzije kalcijeva hidroksida ovisi i o veličini čestica praha, pa se u "visoko dispergiranoj suspenziji" može postići lužnatost od pH 13, a time i veći antimikrobni učinak.

Streptococcus faecalis, koji se često javlja u inficiranim korijenskim kanalima preživljava pri pH 11,5, ali ugiba pri pH 12,5 (12). Prema ispitivanju Liolios-a i sur. (13), svi preparati što se koriste za punjenje korijenskih kanala, a sadrže kalcijev hidroksid, pokazali su inhibitorni učinak na rast bakterije *S. faecalis*. Knappwost (11) tvrdi da kalcijev hidroksid potpuno smanjuje

broj mikroorganizama *S. faecalis* unutar 40 minuta. Bystrom i sur. (14) dobili su u tekućem hranilištu inhibitorni učinak rasta bakterije *S. faecalis* pri pH 12,5.

U usporedbi s ostalim preparatima kalcijeva hidroksida, *S. mutans* pokazao je najveću osjetljivost na vodene suspenzije (7). Prema ispitivanju Barbosa i sur. (15), čista vodena suspenzija pokazala je veći antimikrobni učinak na *S. mutans* u odnosu prema kombinaciji s detergentom. U istom je ispitivanju *C. albicans* pokazala jednaku osjetljivost na čisti kalcijev hidroksid i na pomiješan s detergentom. Vodena suspenzija kalcijeva hidroksida "Calxyl" pokazala je inhibitorni učinak na rast kvasnice *C. albicans*, za razliku od preparata što se stvrdnjavaju (16).

U usporedbi s radom (17) u kojem su se ispitivali isti mikroorganizmi i ista serijska razrješenja na krutim hranilištima, u ovom se je radu u tekućim hranilištima dobio antimikrobni uč-

inak pri nižim pH vrijednostima. U literaturi nismo pronašli podatke o ispitivanju mikroorganizama *S. mutans* i *C. albicans* na tekućim hranilištima. No pH vrijednosti kod kojih su dobiveni inhibitorni učinci na rast mikroorganizama na krutim se hranilištima podudaraju s vrijednostima dobivenim u ovome radu.

Zaključak

Vodena suspenzija kalcijeva hidroksida, u usporedbi s ostalim preparatima, pokazala je najbolji antibakterijski učinak u uvjetima *in vitro*. Najniža inhibitorna koncentracija suspenzije kalcijeva hidroksida za *S. mutans* bila je $136,97 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$ pri pH 12,73, a za *S. faecalis* i *C. albicans* $271,18 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$ pri pH 12,76.

Na temelju dobivenih rezultata, vodena suspenzija kalcijeva hidroksida najprimjereniji je pripravak za uporabu u kliničkom radu.

ANTIMICROBIAL EFFECT OF CALCIUM HYDROXIDE ON *S. MUTANS*, *S. FAECALIS* AND *C. ALBICANS* IN VITRO, IN LIQUID MEDIA

Summary

In this study, the sensitivity of Streptococcus mutans, Streptococcus faecalis and Candida albicans to different concentrations of calcium hydroxide water solutions was examined. The microorganisms were dispersed in Todd Hevitt Broth infusion at temperature of 37 °C in aerobic condition for 24 h. After incubation, the content was diluted up to 10⁷/ml of micro-organisms per tube. In 12 test tubes, 6 ml of bouillon and 2 ml of micro-organism suspension were mixed with 2 ml of Ca(OH)₂ water solution. The tubes were incubated aerobically at 37 °C for 48 h and the results were evaluated after 24 and 48 h.

Adresa za dopisivanje:
Address for correspondence:

The examined solution of calcium hydroxide revealed the highest antimicrobial effect after 24 h, however, the results remained unchanged even after 48 h. The growth inhibition of *S. mutans* in infusion was recorded at a concentration of $136.97 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$ and pH 12.73. The growth of *S. faecalis* and *C. albicans* was inhibited at a concentration of $271.18 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$ and pH 12.76.

Key words:

Dr. Božidar Pavelić
Zavod za bolesti zubi
Stomatološki fakultet
Sveučilišta u Zagrebu
Gundulićeva 5
10000 Zagreb

Literatura

1. STAEHLE H J, HOPPE W, PIOCH T H. Experimentelle Studien über die Löslichkeit, die OH Ionen Abgabe die mechanische Belastbarkeit von Unterfüllungsmaterialien auf der Basis von Kunstharzen und Kalziumhydroxid. Dtsch zahnärztl Z 1987; 42:572-6.
2. STAEHLE H J. Experimentelle Studien zur Diffusion von Wasserstoff, Hydroxyl und Kalziumionen durch das Dentin menschlicher Zähne. Dtsch zahnärztl Z 1988; 43:155-9.
3. FISHER F J, McCABE F J. Calcium hydroxide base materials. An investigation into the relationship between chemical structure and antibacterial properties. Brit Dent J 1978; 144:341-4.
4. BÜSSMANN K, HOPPE W, STAEHLE H J. Experimentelle Untersuchungen über die antimikrobielle Wirksamkeit verschiedener Unterfüllungsmaterialien. Dtsch zahnärztl Z 1984; 39:725-31.
5. STAEHLE H J, ZIEGLER A, HOPPE W. Experimentelle Untersuchungen über die OH Ionen Abgabe kalziumhydroxidhaltiger Präparate. Dtsch zahnärztl Z 1984; 39:128-31.
6. STAEHLE H J, HOPPE W. Calciumhydroxidpräparate Klassifikation und Andwung. Zahnärztl Mitt 1988; 78:1178-9.
7. STAEHLE H J, PIOCH T. Die Alkalisierende Wirkung Kalziumhydroxidhaltiger Handelspräparate. Schhweiz Monatsschr Zahnmed 1988; 98:1072-7.
8. FOREMAN P C, BARNES I E. A review of calcium hydroxide. Int Endod J 1990; 23:283-97.
9. METZLER R S, MONTGOMERY S. The effectiveness of ultrasonic and calcium hydroxide for the debridement of human mandibular molars. J Endodon 1989; 15:373-8.
10. ARNOLD M, GERHARDT G, RICHTER G. Dissoziationsverhalten Kalziumhydroxid-haltiger Präparate. Zahnärztliche Praxis 1994; 11:390-5.
11. KNAPPWOST A. Kupfer-Calciumhydroxid statt Calciumhydroxid in der Endodontie. Zahnärztliche praxis 1993; 4:136-9.
12. COHEN F, LASFARGUES J J. Quantitative chemical study of root canal preparations with calcium hydroxide. Endodon Dent Traumatol 1988; 4:108-13.
13. LIOLIOS E, ECONOMIDIS N, PARISIS-MESIMERIS S, AVRAMIODOU E, TSIKIRI E. Vergleichende experimentelle Untersuchung der antimikrobiellen Wirksamkeit von Ca(OH)₂-enthaltenden Wurzelkanalzementen. ZWR 1993; 102:851-5.
14. BYSTRÖM A, CLAESSESON R, SUNDQUIST G. The antimicrobial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. Endod Dent Traumatol 1985; 1:170-5.
15. BARBOSA S V, SPANGBERG S W, ALMEDIA D. Low surface tension calcium hydroxide solution is an effective antiseptic. Int Endod J 1994; 27:6-10.
16. KLAIBER B, GRÜNER W, BREDT W. Antimikrobielle Wirksamkeit von Wurzelfüllmaterialien, provisorischen Befestigungszementen und Unterfüllungs- bzw. Überkappungsmitteln. Dtsch zahnärztl Z 1982; 37:448-51.
17. PAVELIĆ B, ANIĆ I, NAJŽAR-FLEGER D, STILINOVIĆ B, TEMMER K. Antimikrobni učinak vodenih pripravaka kalcijevod hidroksida na *Streptococcus mutans*, *Streptococcus faecalis* i *Candida albicans* in vitro. Acta Stomatol Croat 1991; 25:207-12.