

## Ocena działania na bakterie beztlenowe płynów używanych w e-papierosach

<sup>1</sup>Zakład Mikrobiologii Jamy Ustnej, Katedra Mikrobiologii, Gdański Uniwersytet Medyczny  
Kierownik Zakładu i Katedry: prof. dr hab. Anna Kędzia

<sup>2</sup>Katedra i Zakład Periodontologii i Chorób Błony Śluzowej Jamy Ustnej,  
Gdański Uniwersytet Medyczny

Kierownik Katedry i Zakładu: dr hab. Aida Kusiak, prof. nadzw.

<sup>3</sup>Zakład Ortodontji, Gdański Uniwersytet Medyczny  
Kierownik Zakładu: dr hab. Anna Wojtaszek-Słomińska

<sup>4</sup>Katedra i Zakład Chemii Medycznej, Gdański Uniwersytet Medyczny  
Kierownik Katedry i Zakładu: prof. dr hab. Michał Woźniak

---

### EVALUATION OF ACTIVITY OF LIQUIDS USE TO E-CIGARETTES ON ANAEROBIC BACTERIA

#### SUMMARY

*The activity to 10 liquids used to e-cigarettes (Liqueen) contain nicotine – 11 mg/ml and aromatic substances against 6 strains of anaerobes isolated from patients with infections of oral cavity and 2 reference strains were tested. The bactericidal activity (MBC) was determined by the broth-dilution method in thioglycolate broth with inoculums 10<sup>6</sup> CFU per ml. Incubation was performed at 37°C for 48 hours. The MBC was defined of the concentration of the liquid, need to kill the tested strains of anaerobic bacteria. The results indicated that all tested liquids were without of the microorganisms. From among 10 tested liquids, 6 demonstrated bactericidal activity against all tested anaerobic bacteria. The 3 tested liquids were bactericidal against 5 or 4 strains of anaerobes. After 10 or 15 min bactericidal activity on the strains belonging to the genus of *Fusobacterium nucleatum* demonstrated 5 liquids, and to the strains from the genus of *Prevotella intermedia* 4 liquids.*

---

**KEY WORDS:** ANAEROBIC BACTERIA – E-CIGARETTES  
LIQUID –BACTERICIDAL ACTIVITY

---

Pierwszy papieros elektroniczny, nazwany e-papierosem, został skonstruowany i opatentowany przez amerykańskiego inżyniera Herberta A. Gilberta w 1963 r. (1). Jednak obecny kształt papierosy te zawdzięczają Chińczykom, którzy wprowadzili je na swój rynek w 2004 r., traktując je jako substytut papierosów tytoniowych (1). Firma Ruyan w 2007 r. uzyskała międzynarodowy patent na e-papierosy i dzięki temu zostały one wprowadzone na rynek amerykański, a potem w innych krajach (1, 2). Od tego czasu ich sprzedaż stale wzrasta. Z danych wynika, że korzysta z nich ponad 10 mln osób w Europie oraz w Stanach Zjednoczonych (1).

E-papieros jest urządzeniem, które zwykle ma kształt i wymiar zbliżony do zwykłego papierosa. Składa się z 2 lub 3 części. Każdy papieros zawiera tzw. kartridż, czyli pojemnik na płyn (liquid), atomizer, w którym użyty płyn jest podgrzewany w celu wytworzenia pary oraz źródło zasilania (akumulator). Papierosy te mogą też być wyposażone w diodę, która imituje żarzenie się e-papierosa.

Podczas palenia zwykłego papierosa, w procesie spalania tytoniu powstaje dym zawierający około 4000 związków chemicznych, z których ponad 40 ma działanie rakotwórcze i toksyczne dla organizmu człowieka (w tym m.in. metale ciężkie) (2). Wkłady wykorzystywane w e-papierosach zawierają roztwór nikotyny, glikol propylenowy i glicerynę w różnych proporcjach oraz tzw. aromaty, którymi są związki syntetyczne lub substancje roślinne. Czasem są też dodawane barwniki lub kwasy organiczne, tj. kwas jabłkowy czy mlekowy (1). Najważniejszym składnikiem papierosów elektronicznych jest nikotyna uzyskiwana z tytoniu. Jej działanie jest uzależnione od dawki. W doświadczeniach wykazano, że małe dawki nikotyny podnoszą poziom adrenaliny, a większe oddziałują na układ nerwowy i powodują zaburzenia metabolizmu komórek nerwowych (3). Nikotyna jest alkaloidem, który podnosi ciśnienie krwi, podwyższa tętno, przyczynia się do zwężenia tętnic i tworzenia skrzepów krwi, co może być przyczyną udaru mózgu lub zawału serca (2). Ponadto wykazano, że wysokie dawki nikotyny działają toksycznie zarówno po zażyciu doustnym, jak i po kontakcie ze skórą (2, 3). Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że dawka toksyczna nikotyny dla osoby dorosłej wynosi 2-5 mg/kg masy ciała, a dla dziecka 1,4-1,9 mg/kg m.c. (5, 6).

Płyny stosowane w e-papierosach zawierają różne substancje zapachowe, zwane aromatami, które przedostają się do dróg oddechowych. W piśmiennictwie nie ma informacji na temat ich działania na układ oddechowy. Są one wdychane po ogrzaniu (wewnątrz papierosów elektronicznych), co może oddziaływać niekorzystnie, ponieważ może prowadzić do powstania substancji toksycznych. W badaniach wykazano, że nikotyna może ulegać utlenianiu wskutek oddziaływania np. aromatu miętowego, owocowego czy waniliowego (2). Wykazano też, że mentol przyczynia się do zwiększenia stężenia nikotyny we krwi (7). Ponadto wyniki badań 35 płynów, pięciu różnych producentów, używanych w e-papierosach wykazały, że oddziałują one na komórki embrionalne (2). Można wnioskować, że toksyczność płynów stosowanych w papierosach elektronicznych jest skorelowana z zawartością aromatów, a nie nikotyny (2). Przeprowadzone doświadczenia wskazują też na wysoką cytotoksyczność aromatu cynamonowego, powodowanie podwyższenia ciśnienia krwi przez aromaty zawierające lukrecję oraz niekorzystny wpływ na dolne drogi oddechowe aromatów, w składzie których występował diacetyl (2). W szeregu publikacjach opisano też niekorzystne oddziaływanie glikolu propylenowego zarówno na ludzi, jak i na zwierzęta (8-17).

Stale wzrasta liczba osób, które tradycyjne papierosy zastępują papierosami elektronicznymi, uznając je za bezpieczne. Jednak w piśmiennictwie brakuje badań klinicznych i danych wskazujących na ich korzystne, czy niekorzystne oddziaływanie na organizm człowieka. Wyniki dotychczasowych, jedynie sporadycznych badań nie dają odpowiedzi czy można je uznać za bezpieczne. Brakuje też informacji na temat, czy e-papierosy są szkodliwe dla środowiska. Nie ma również danych na temat stosowanych w e-papierosach płynów, np. czy zawierają one drobnoustroje (jako zanieczyszczenie), oraz jakie jest ich oddziaływanie na drobnoustroje, np. występujące w jamie ustnej czy górnych drogach oddechowych.

Celem badań była ocena działania bakteriobójczego (MBC) płynów używanych w papierosach elektronicznych wobec bakterii beztlenowych.

### Materiały i metody

W badaniach wykorzystano 6 szczepów bakterii beztlenowych. Zostały one wyizolowane z materiałów pobranych od pacjentów z różnymi zakażeniami w obrębie jamy ustnej. Wyizolowane drobnoustroje należały do następujących gatunków: *Finogoldia magna*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella loescheii*, *Porphyromonas asaccharolytica*, *Fusobacterium nucleatum*

i *Parabacteroides distasonis* (po 1 szczepie). Badaniami objęto także 2 szczepy wzorcowe z gatunków: *Finogoldia magna* ATCC 29328 i *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586.

Pobrane materiały posiewano na odpowiednie podłoża przeznaczone do hodowli beztlenowców, w tym wzbogacone i wybiórcze (18). Hodowlę posiewów prowadzono w temp. 37°C przez 10 dni w anaerostatach zawierających mieszaninę gazów o składzie: 10% CO<sub>2</sub>, 10% H<sub>2</sub> i 80% N<sub>2</sub>, katalizator palladowy i wskaźnik beztlenowości. Wyhodowane na odpowiednim podłożu bakterie beztlenowe były identyfikowane na podstawie cech morfologicznych, fizjologicznych i biochemicznych, z wykorzystaniem testów API 20A (bio Merieux), zdolności do wytwarzania z glukozy kwasów tłuszczowych od C<sub>1</sub> do C<sub>6</sub> oraz kwasu mlekowego, bursztynowego i fumarowego (metodą chromatografii gazowej), a także oceny zdolności kolonii do naturalnej fluorescencji w świetle UV. Wyizolowane szczepy beztlenowców identyfikowano do gatunku zgodnie z obowiązującymi zasadami (19).

Do doświadczeń wybrano 10 płynów najczęściej używanych w e-papierosach przez palaczy w Polsce, firmy Liqueen, o zawartości 11 mg/ml nikotyny (light). Każdy płyn zawierał też inną substancję zapachową (aromat).

Do doświadczeń wykorzystano następujące płyny:

1. United States of Tobacco
2. Fresh Ice Mint
3. Natural Tobacco
4. English Black Tea
5. Black Currant
6. Juicy Cherry
7. Energy Drink
8. Very Strawberry
9. Caffe Latte
10. Strong Mint

W celu stwierdzenia, czy w testowane płyny aromatyzujące nie zawierają bakterii beztlenowych pobierano po 0,1 ml płynu i posiewano na podłożo Brucella z dodatkiem 5% odwłóknionej krwi baraniej, menadionu i heminy. Inkubację posiewów prowadzono w temp. 37°C przez 48 godz. w aerostatach, w warunkach beztlenowych. Brak wzrostu bakterii beztlenowych na podłożo świadczył, że oceniany płyn nie zawiera żadnych drobnoustrojów rosnących beztlenowo.

Natomiast w celu oznaczenia działania bakteriobójczego (MBC) 10 testowanych płynów na 6 szczepów bakterii beztlenowych i 2 szczepy wzorcowe, do 1 ml płynu dodawano zawiesinę bakterii beztlenowych, zawierającą 10<sup>6</sup> CFU/ml. Następnie po 5, 10 i 15 min

pobierano próbkę o objętości 0,1 ml, którą posiewano do 2 ml bulionu tioglikolanowego. Kontrolę wzrostu szczepów stanowił bulion tioglikolanowy, który został zaszczipiony 0,1 ml hodowli każdego badanego szczepu bakterii beztlenowych, które zawierały  $10^6$  CFU/ml. Inkubację prowadzono w temp.  $37^{\circ}\text{C}$  przez 48 godz. Brak wzrostu bakterii beztlenowych w podłożu świadczył o działaniu bakteriobójczym (MBC) ocenianego płynu.

### Wyniki badań

Uzyskane wyniki badań wskazują, że wszystkie testowane płyny nie zawierały bakterii beztlenowych. W tabelach 1 i 2 zostały przedstawione wyniki bakteriobójczego (MBC) działania 10 płynów stosowanych w e-papierosach na 6 wybranych szczepach bakterii beztlenowych wyizolowanych z materiałów pobranych od pacjentów oraz 2 szczepy wzorcowe.

Spośród 10 testowanych płynów działanie bakteriobójcze wobec wszystkich badanych szczepów bakterii beztlenowych wykazały 3 płyny, w tym Fresh Mint, Juicy Cherry i Strong Mint. Aktywność bakteriobójczą wobec 5 testowanych szczepów beztlenowców wykazały 3 płyny, w tym English Black Tea, Energy Drink i Caffè Latte. Natomiast 3 kolejne płyny: Natural Tobacco, Black Currant oraz Very Strawberry, działały bakteriobójczo wobec 4 szczepów bakterii beztlenowych. Najniższą aktywnością charakteryzował

się płyn o nazwie United States of Tobacco, który po 10 min działał bakteriobójczo wobec 5 spośród 6 ocenianych szczepów i po 15 minutach na 1 szczep. Wszystkie testowane płyny wykazały aktywność bakteriobójczą wobec szczepu z gatunku *Porphyromonas asaccharolytica*. Natomiast 5 płynów działało bakteriobójczo na pałeczki z gatunku *Fusobacterium nucleatum*, 6 płynów na pałeczki z gatunku *Prevotella intermedia*, 7 płynów na szczep *Parabacteroides distasonis* i 9 płynów na Gram-ujemne pałeczki z gatunku *Prevotella loescheii* i Gram-dodatnie ziarniaki z gatunku *Finegoldia magna*.

### Wnioski

Spośród ocenianych płynów używanych w e-papierosach 3 działały bakteriobójczo wobec wszystkich badanych bakterii beztlenowych.

Sześć testowanych płynów charakteryzowało się aktywnością biobójczą wobec 4 lub 5 badanych szczepów beztlenowców.

Najniższą aktywność wykazał płyn o nazwie United States of Tobacco, który działał bakteriobójczo po 10 lub 15 minutach na 5 szczepów bakterii beztlenowych

Po 10 lub 15 minutach działanie bakteriobójcze wobec szczepów z gatunku *Fusobacterium nucleatum* wykazało 5 płynów, a wobec pałeczek z gatunku *Prevotella intermedia* 4 testowane płyny.

**Tabela 1.** Bakteriobójcze działanie (MBC) płynów używanych w e-papierosach na bakterie beztlenowe.

Bakterie beztlenowe	Nazwa płynu														
	United States of Tobacco			Fresh Mint			Natural Tobacco			English Black Tea			Black Currant		
	Najmniejsze stężenie bakteriobójcze (MBC)														
	Czas w min														
	5	10	15	5	10	15	5	10	15	5	10	15	5	10	15
<i>Finegoldia magna</i>	+	+	-**	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Prevotella intermedia</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	
<i>Prevotella loescheii</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-
<i>Parabacteroides distasonis</i>	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Szczepy wzorcowe															
<i>Finegoldia magna</i> ATCC 29328	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Fusobacterium nucleatum</i> ATCC 25586	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-

**Tabela 2.** Bakteriobójcze działanie (MBC) płynów używanych w e-papierosach na bakterie beztlenowe.

Bakterie beztlenowe	Nazwa płynu														
	Juicy Cherry			Energy Drink			Very Strawberry			Caffe Late			Strong Mint		
	Najmniejsze stężenie bakteriobójcze (MBC)														
	Czas w min														
	5	10	15	5	10	15	5	10	15	5	10	15	5	10	15
<i>Finegoldia magna</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Prevotella intermedia</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Prevotella loescheii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Parabacteroides distasonis</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Szczepy wzorcowe															
<i>Finegoldia magna</i> ATCC 29328	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Fusobacterium nucleatum</i> ATCC 25586	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-
+ wzrost bakterii beztlenowych - brak wzrostu bakterii beztlenowych															

## Piśmiennictwo

1. Stelmach W. Jeszcze raz o palącym problemie – czyli o e-papierosach. Cz. 1. Elektroniczny papieros. Post Fitoter 2010; 3:177-9. 2. Etter JF. Cała prawda o e-papierosach. Wed Filia, Poznań 2014. 3. Stelmach W. Jeszcze raz o palącym problemie – czyli o e-papierosach; dokończenie. Post Fitoter 2010; 4:239-40. 4. Stelmach W. Palący problem – czyli prawie wszystko o tytoniu i skutkach jego używania. Cz. III i IV. Post Fitoter 2009; 3:204-10. 5. Smolinske SC, Spoerke DG, Spiller SK i wsp. Cigarette and nicotine chewing-gum toxicity in children. Hum Exper Toxicol 1988. 6. Gosselin RE, Smith RP, Hodge HC i wsp. Clinical toxicology of commercial products. 6<sup>th</sup> ed. Williams and Wilkins 1988. 7. Frieberg M. Options for state of local governments to regulate non-cigarette tobacco products. Annal Health Law 2012. 8. Saini M, Amma MK, Dash S i wsp. Hematological alternations in propylene glycol-dosed female rats are minimal. Vet Hum Toxicol. 1996; 38(2):81-5. 9. Zar T, Graeber C, Perazella MA. Recognition, treatment, and prevention of propylene glycol toxicity. Semin Dial 2007; 20(3):217-9. 10. Yaucher NE, Fish TT, Smith HW i wsp. Propylene glycol associated renal toxicity for lorazepam infusion. Pharmacother 2003; 23(9):1094-99.

11. Chicella M, Jansen P, Parthiban A i wsp. Propylene glycol accumulation associated with continuous infusion of lorazepam in pediatric intensive care patients. Crit Care Med 2002; 30:2752-5. 12. Yorgin PD, Theodorn AA, Al-Uzri A i wsp. Propylene glycol-induced proximal renal tubular cell injury. Am J Kidney Dis 1997; 30:134-9. 13. Olson KR. Poisoning and drug overdose. 3<sup>rd</sup> ed. Stanford CT. Appleton and Lange 1999. 14. Robertson OH, Loosli CG, Puck TT i wsp. Tests for the chronic toxicity of propylene glycol and triethylene glycol on monkeys and rats by vapour inhalation and oral administration. J Pharmacol Exp Ther 1947; 91(1):52-76. 15. Suber RL, Deskin R, Nikiforov I i wsp. Subchronic nose-only inhalation study of propylene glycol in Sprague-Dawley rats. Food Chem Toxicol 1989; 27(9):573-83. 16. Bauer MC, Weiss DJ, Perman V. Hematological alternations in kittens induced by 6 and 12% dietary propylene glycol. Vet Hum Toxicol 1992; 34(2):127-31. 17. Fransalinos KE, Polosa R. Safety evaluation and risk assessment of electronic cigarettes as tobacco cigarette substitutes: a systemic review. Ther Adv Drug Safety 2014; 5:267-86. 18. Holdeman LV, Cato EP, Moore WEC. Anaerobe laboratory manual VPI, Blacksburg. 4<sup>th</sup> ed. Baltimore 1977. 19. Forbes BA, Sahn DF, Weissfeld AS. Bailey and Scott's diagnostic microbiology. 12<sup>th</sup> ed. Mosby Elsevier, St. Louis 2007.

otrzymano/received: 01.09.2014  
zaakceptowano/accepted: 15.10.2014

Adres/address:  
\*prof. dr hab. Anna Kędzia  
Zakład Mikrobiologii Jamy Ustnej Katedra Mikrobiologii  
Gdański Uniwersytet Medyczny  
ul. Do Studzienki 38, 80-227 Gdańsk  
tel. +48 (58) 349-21-85  
e-mail: anak@gumed.edu.pl