

**AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR ZAHNÄRZTLICHE PROTHETIK
PROF. DR. G. HANDEL
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG**

**UNTERSUCHUNGEN ZUR ADHÄSION VON ORALEN STREPTOKOKKEN AN
ZAHNÄRZTLICHE WERKSTOFFE IN ABHÄNGIGKEIT VON DER
AUSWERTMETHODIK IN VITRO**

**Inaugural-Dissertation
Zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin**

**der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg**

**vorgelegt von
*Mira Louise Ehrenfeld***

2013

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. T.E. Reichert

1. Berichterstatter: Priv.-Doz Dr. med. dent. Sebastian Hahnel

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Peter Proff

Tag der mündlichen Prüfung: 23.07.2013

Inhaltsverzeichnis:

I. Einleitung	1
II. Literaturübersicht	3
1. Physiologische Grundlagen	3
1.1 Natürlicher Speichel	3
1.1.2 Speichelbildung	3
1.1.2 Zusammensetzung und Funktion	4
1.2 Künstlicher Speichel	7
1.3 Erworbenes Pellicel	9
1.3.1 Bildung des Pellicels	9
1.3.2 Biochemische Zusammensetzung	13
1.3.3 Funktion des Pellicels	17
1.3.4 Mikrobielle Adhäsion an das Pellicels	18
1.4 Quantifizierung von Mikroorganismen in Versuchsaufbauten zur Biofilmbildung	23
1.5 <i>Streptococcus mutans</i>	29
2. Werkstoffkundliche Grundlagen	31
2.1 Kunststoffe	31
2.1.1 Komposite	31
2.1.2 Prothesenkunststoffe	31
2.1.3 Kunststoff für Tiefziehschienen	32
2.2 Zahnschmelz	32
III. Material und Methoden	34
1. Aufgabenstellung	34
2. Materialauswahl	34
2.1 Herstellung der Prüfkörper	35
2.1.1 Polyethylen	35
2.1.2 <i>Palapress vario</i>	35
2.1.3 Glas	35
2.1.4 <i>Sinfony</i>	36
2.1.5 Zahnschmelz	36
2.2 Nachbearbeitung	36
2.3 Kontrolle der Oberflächenrauigkeit	36
2.4 Lagerung der Prüfkörper	37
3. Mikroorganismen	37

4. Speichel und Speichelersatzlösung	38
5. Versuchsaufbau	38
5.1 Vorversuche	38
5.2 Hauptversuche	43
5.2.1 Fließkammer mit der Resazurin-Reduktionsmethode	45
5.2.2 Fließkammer mit <i>Cytox Violet®</i>	47
6. Rasterelektronenmikroskopie	49
7. Datenverarbeitung und statistische Auswertung	49
7.1 Fehlerbalken	49
7.2 Statistische Auswertung	50
IV. Ergebnisse	51
1. Vorversuche zur Festlegung der Farbstoffkonzentration	51
1.1 Analyse der relativen Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der Farbstoffkonzentrationen	51
1.1.1 Methode A	51
1.1.1.1 Polyethylen	51
1.1.1.2 <i>Palapress vario</i>	51
1.1.1.3 Glas	51
1.1.2 Methode B	53
1.1.2.1 Polyethylen	53
1.1.2.2 <i>Palapress vario</i>	53
1.1.2.3 Glas	54
1.1.3 Methode C	55
1.1.3.1 Polyethylen	55
1.1.3.2 <i>Palapress vario</i>	55
1.1.3.3 Glas	56
1.2 Analyse der Standardabweichungen	57
1.3 Analyse der Oberflächenrauigkeit	59
2. Vorversuche	62
2.1 Analyse der relativen Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Pellikelbildung und dem Material	62
2.1.1 Methode A	62
2.1.1.1 Ohne Speichelpellikel	62
2.1.1.2 Mit Speichelpellikel	63

2.1.2	Methode B	64
2.1.2.1	Ohne Speichelpellikel	64
2.1.2.2	Mit Speichelpellikel	65
2.1.3	Methode C	65
2.1.3.1	Ohne Speichelpellikel	65
2.1.3.2	Mit Speichelpellikel	66
2.2	Analyse der Standardabweichungen	66
2.3	Analyse der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen	68
2.4	Analyse der Oberflächenrauigkeit	70
3.	Hauptversuche	72
3.1	Analyse der relativen Fluoreszenzintensität in den Versuchen unter dynamischen Bedingungen	72
3.1.1	Fließkammer mit Speichelpellikel und mit dem Farbstoff Resazurin	72
3.1.2	Fließkammer ohne Speichelpellikel und mit dem Farbstoff Resazurin	73
3.1.3	Fließkammer mit Speichelpellikel und mit dem Farbstoff <i>Cytox Violet</i> ®	74
3.1.4	Fließkammer ohne Speichelpellikel und mit dem Farbstoff <i>Cytox Violet</i> ®	76
3.2	Analyse der Standardabweichungen	77
3.3	Analyse der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen	78
3.4	Analyse der Oberflächenrauigkeit	79
V.	Diskussion	81
1.	Diskussion der Methoden	81
1.1	Experimentelle Pellikelbildung	81
1.2	Auswahl des <i>Streptococcus mutans</i>	84
1.3	Experimentelle Bakterienadhäsion	84
1.4	Versuchsaufbau	86
1.5	Quantifizierungsmethoden von Mikroorganismen in Versuchsaufbauten zur Biofilmbildung	88
2.	Diskussion der Ergebnisse	93
2.1	Wahl der Fluoreszenzfarbstoffkonzentration	93
2.2	Adhäsion von <i>S. mutans</i> mit und ohne Speichel in den semistatischen Versuchen im Vergleich	98
2.3	Adhäsion von <i>S. mutans</i> mit und ohne Speichel in den Versuchen unter dynamischen Bedingungen im Vergleich	102
2.4	Ergebnisse der Untersuchungen mittels Rasterelektronenmikroskop	104

2.5 Einfluss der Quantifizierungsmethode von Mikroorganismen in Versuchsaufbauten zur Biofilmbildung	107
VI. Zusammenfassung	110
VII. Schlussfolgerung	112
VIII. Literaturverzeichnis	114
IX. Danksagung	135

Abkürzungsverzeichnis:

Abb.	Abbildung
ATM	Atomkraftmikroskopie
Aqua dest.	Aqua destillata
Bis-GMA	Bisphenol-A-Glycidyl Methacrylate
bzw.	beziehungsweise
DAPI	4',6 diamidino-2-phenilyndole
DMMB	1,9-dimethyl-methylen Blau
EDGMA	Ethyleneglycol-dimethacrylate
et al.	et alii
FDA	Fluorescein Diacetat
FISH	fluorescence <i>in situ</i> hybridization
g	Gramm
h	Stunde
KCl	Kaliumchlorid
l	Liter
m	Meter
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
NADH/H ⁺	Nicotinsäureamidadenindinucleotid
nm	Nanometer
PE	Polyethylen
pH	Pondus Hydrogenii
PK	Probekörper
PRP	prolinreiche Proteine
REM	Rasterelektronenmikroskop
TEGDMA	Triethylenglycoldimethacrylat
TEN	Transmissionselektronenmikroskop
UDMA	Urethandimethacrylat
vgl.	vergleiche
Vol%	Volumenprozent
XXT	2,3-bis(2methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-((phenylamino)carbonyl)-2H-tetrazolium Hydroxid
z.B.	zum Beispiel
%	Prozent
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter

I. Einleitung

Karies zählt neben der Parodontitis zu den häufigsten Krankheitsbildern der Zähne. Dabei gilt das Bakterium *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) neben *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus mitis* und weiteren Bakterienspezies als einer der Leitkeime in der Pathogenese der Karies. Die Adhäsion der Mikroorganismen an die Zahnhartsubstanz bzw. an Füllungs- und Restaurationsmaterialien spielt dabei eine große Rolle. *In vivo* lagern sich die Mikroorganismen nicht direkt an das Material oder den Zahn an, sondern über das durch den Speichelfluss gebildete Pellicel. Durch Kolonisations- und Wachstumsvorgänge kommt es dann zur Entstehung der dentalen Plaque, einem Biofilm, der nicht mehr durch die Selbstreinigung der Mundhöhle entfernt ist.¹

Die dentale Plaque besteht aus Bakterien (ca. 70 %) und einer Plaquematrix (ca. 30 %), die zum einen aus Speichelglykoproteinen und zum anderen aus extrazellulär produzierten Polysacchariden der Bakterien besteht.² Die Bakterien sind in der Plaquematrix eingebettet und leben dort in Symbiose oder Asymbiose.³ Einige der Bakterien können Toxine und Säuren produzieren, die z.B. Karies auslösen können oder mitverantwortlich für parodontale Erkrankungen sind.⁴ Daher stellt die Hemmung bzw. Verminderung der Adhäsion der Mikroorganismen an Restaurationsmaterialien einen Forschungsansatz in der Zahnmedizin dar.

Ein potentieller Ansatzpunkt zur Verminderung der Plaquebildung ist, die Werkstoffe auf die bakterielle Adhäsion zu überprüfen und zu verbessern. Da die Möglichkeit besteht, die Adhäsion der Bakterien durch Verbesserung der Eigenschaften eines Materials wie der Oberflächenrauigkeit oder -energie oder durch die Materialwahl (z.B. Keramik) zu beeinflussen⁵, wurden Studien durchgeführt, die unterschiedliche Adhäsionsverhalten an verschiedenen Materialien feststellen konnten.⁶

Außerdem ist es von großer Bedeutung, die komplexen Vorgänge der Pellicelbildung und Bakterienadhäsion vollständig aufzuklären, um an diesem Punkt in die Kariogenese eingreifen zu können.

Für die Erforschung der Bakterienadhäsion und Plaquebildung sowie für die Entwicklung spezieller zahnärztlicher Werkstoffe sind umfangreiche Untersuchungen unabdingbar. Diese

¹ Hellwig et al., 2009.

² Gängler et al., 2005.

³ Gängler et al., 2005.

⁴ Gängler et al., 2005.

⁵ Nikama et al., 1998; Zalkind et al., 1998; Marsh, 1993.

⁶ Kawai et al., 2001; Steinberg et al., 2002; Tanner et al., 2005.

können sowohl *in vivo* als auch *in vitro* stattfinden. Da die Versuche *in vitro* im Gegensatz zu den Untersuchungen *in vivo* keinen individuellen Schwankungen unterworfen sind und somit zumindest bis zu einem gewissen Grad eine Reproduzierbarkeit gewährleisten, werden diese für die Grundlagenerforschung häufig bevorzugt.

Die Quantifizierung der Bakterien kann durch verschiedene Methoden erfolgen, wobei Verfahren mit Fluoreszenzstoffen, die ursprünglich für die Verwendung von Zytotoxizitätsuntersuchungen entwickelt wurden, verbreitet sind.

Aufgabenstellung dieser Dissertation war es, die Eignung des Fluoreszenzfarbstoff *Cytox Violet®* zur Quantifizierung von in Biofilmen organisierten Mikroorganismen zu untersuchen und mit den üblicherweise im biologischen Labor der Poliklinik für zahnärztliche Prothetik der Universität Regensburg verwendeten Methoden zu vergleichen.

II. Literaturübersicht

1. Physiologische Grundlagen

1.1 Natürlicher Speichel

1.1.1 Speichelbildung

Speichel wird von den drei paarigen großen Speicheldrüsen (Glandula parotidea, Glandula sublingualis, Glandula submandibularis) sowie kleinen submukösen Speicheldrüsen, die sich in der Rachen- und Mundschleimhaut befinden, sezerniert.⁷ Die Gesamtheit des Speichels, der von den verschiedenen Speicheldrüsen produziert wird, wird als Mischspeichel bezeichnet. Die Azini der Speicheldrüsen sind für die Chlorid-, Natrium- und Wassersekretion verantwortlich. Der in der jeweiligen Speicheldrüse gebildete Speichel wird auch als Primärspeichel bezeichnet. Dieser ist zunächst isoton, wird aber durch Rückresorption von Ionen durch die Schalt- und Streifenstücke letztendlich durch die Ausführungsgänge als hypotoner Sekundärspeichel in die Mundhöhle sezerniert.⁸ Dabei ist der Speichel beim Austritt aus den Ausführungsgängen zunächst steril, wird aber sofort mit Mikroorganismen kontaminiert.⁹ Durch das Sulkusfluid, das polymorphnukleäre Leukozyten, exfoliierte Epithelzellen und tote oder lebende Bakterien und deren Metaboliten enthält, wird der Mischspeichel komplettiert.¹⁰

Die Speicheldrüsen unterscheiden sich hinsichtlich der Zusammensetzung des von ihnen sezernierten Speichels. Die Glandula parotidea ist eine rein seröse Drüse, die Glandula submandibularis ist eine gemischt seromuköse Drüse und die Glandula sublingualis ist eine überwiegend muköse Drüse.¹¹ Die serösen Zellen der Glandula parotidea produzieren z.B. α -Amylase, Lysozym, Laktoferrin, Peroxidase, die Wachstumsfaktoren NGF und EGF und bei Säuglingen auch Lipase, während die mukösen Zellen der Glandula submandibularis im Wesentlichen Schleime (Muzine) produzieren.¹²

Der Speichelfluss wird durch das autonome Nervensystem kontrolliert und unterliegt einem zirkadianen Rhythmus, welcher für Ruhe- und Stimulationsspeichel unterschiedlich ist.¹³ Die Glandula submandibularis sezerniert den Hauptanteil des Speichels in körperlicher Ruhe bei

⁷ Edgar, 1992; Hellwig et al., 2009.

⁸ Welsch, 2006; Lüllmann-Rauch, 2006.

⁹ Hellwig et al., 2009.

¹⁰ Gängler et al., 2005; Lüllmann-Rauch, 2006.

¹¹ Lüllmann-Rauch, 2006.

¹² Welsch, 2006.

¹³ Gängler et al., 2005; Llena-Puy, 2006.

Parasympathikusaktivität (Ruhespeichel),¹⁴ bei Stimulation des Sympathikus sezerniert hingegen die Glandula parotidea den größten Teil des Reizspeichels.¹⁵

Die durchschnittliche Fließrate beträgt ca. 1 l pro Tag.¹⁶ Jedoch schwanken die individuellen Werte des Ruhespeichels wie auch die stimulierte Fließrate erheblich.¹⁷

1.1.2 Zusammensetzung und Funktion

Speichel erfüllt mehrere Aufgaben:

- er besitzt eine Pufferkapazität, indem z.B. nach Anstieg des Säuregehalts vermehrt Hydrogencarbonat sezerniert wird¹⁸
- er ist durch das Speichelenzym α -Amylase an der Verdauung beteiligt, da dieses Kohlenhydrate im Mund spaltet¹⁹
- er spielt durch die im Speichel enthaltenen Ionen (v.a Calcium- und Phosphationen) eine wichtige Rolle bei der Remineralisierung des Zahnschmelzes²⁰ und bei der Mineralisation des Zahnsteins²¹
- er fördert die Bolusbildung²²
- er schützt die Mundschleimhaut durch Muzine und weitere Glykoproteine²³
- er trägt durch Lösung von Geschmacksstoffen zur Geschmacksbildung bei²⁴
- er hält den Wasserhaushalt des Körpers durch reflektorische Auslösung des Durstgefühls in Balance.²⁵

Der Speichel besitzt einen neutralen pH-Wert von 7 und besteht zu 99 % aus Wasser; der restliche Anteil von einem Prozent differenziert sich in anorganische und organische Bestandteile.²⁶

Die wichtigsten anorganischen Bestandteile sind Calcium, Phosphat, Magnesium, Chlorid, Natrium, Hydrogencarbonat, Thiocyanat und Kalium.²⁷ Carbonat dient als wichtigster Puffer,

¹⁴Münzel, 1981.

¹⁵Lüllmann-Rauch, 2006.

¹⁶Vaupel, 2000.

¹⁷Dawes, 1972; Gängler et al., 2005; Llena-Puy, 2006.

¹⁸Sanderink et al., 2004; Gängler et al., 2005; Hellwig et al., 2009.

¹⁹Gängler et al., 2005; Hellwig et al., 2009.

²⁰Sanderink et al., 2004; Gängler et al., 2005; Hellwig et al., 2009.

²¹Gängler et al., 2005.

²²Gängler et al., 2005.

²³Gängler et al., 2005; Hellwig et al., 2009.

²⁴Gängler et al., 2005.

²⁵Gängler et al., 2005.

²⁶Gängler et al., 2005; Hellwig et al., 2009.

²⁷Klimek et al., 1999; Hellwig et al., 2009.

um bakterielle pH-Veränderungen durch Säureproduktion von Bakterien auszugleichen.²⁸ Auch Calciumphosphat wirkt bei einem pH-Wert unter 5,5 als Puffer bei der Zahnschmelzauflösung durch Säuren.²⁹

Die organischen Bestandteile können in niedermolekulare und hochmolekulare Bestandteile eingeteilt werden³⁰, wobei die hochmolekularen organischen Bestandteile (ca. 2 g/l³¹) den größten Teil ausmachen. Tabelle 1 gibt eine Übersicht über diese Bestandteile und ihre Funktion.

²⁸Gängler et al., 2005; Hellwig et al., 2009.

²⁹Schwab et al., 2006.

³⁰Jungermann et al., 1980.

³¹Edgar, 1992.

Tabelle 1 : Übersicht über die wichtigsten organischen Bestandteile im Speichel:

Speichelbestandteile	Funktion
α -Amylase	Ist das wichtigste Verdauungsenzym des Speichels und kann in bis zu sechs verschiedenen Isoformen vorkommen. ³² Es initiiert den Abbau von Stärke bereits in der Mundhöhle und vermag zudem die Adhäsion verschiedener oraler Streptokokken an die Zahnoberfläche zu beeinflussen. ³³
Mukoglykoprotein 1 und 2	Gewährleisten die Gleitfähigkeit des Speisebreis; außerdem können sie Wasser binden und bilden so ein hydrophiles, viskoelastisches Gel. Dieses überzieht die Mundschleimhaut und die Zahnoberflächen und bietet somit der Mundschleimhaut Schutz vor dem Eindringen toxischer und karzinogener Substanzen. Zudem tragen die Mukoglykoproteine an den Zähnen zur Adhäsion von Bakterien bei. ³⁴ Z.B. bindet <i>Streptococcus mutans</i> über das Enzym Enolase an Mukoglykoprotein 2. ³⁵
Lysozym	Besitzt eine antimikrobielle Wirkung, die auf der Fähigkeit beruht, Polysaccharide der Bakterienzellwand zu hydrolysieren und somit Bakterien zu zerstören. ³⁶
Immunglobuline	Dienen als Wirkstoffe der spezifischen Immunität. Das sekretorische Immunglobulin A überwiegt quantitativ mit einer Konzentration von 200 mg/l dem Immunglobulin G und dem Immunglobulin M. ³⁷ IgG kommt jedoch eine wichtige Aufgabe in der Mundhöhle zu, da es eine immunglobulingesteuerte Aggregation der Bakterien vermittelt. Durch diese Aggregation wird die Adhäsion der Mikroorganismen an die Oberflächen der Mundhöhle reduziert, da die Mikroorganismen im Speichel verbleiben und geschluckt werden. ³⁸
Chitinasen	Sind in der Lage Chitin, das Bestandteil von Hefezellwänden ist, zu hydrolysieren und damit die Besiedlung der Mundhöhle durch Hefen zu verhindern. ³⁹
Lactoferrin	Kann Eisen binden und übt somit einen hemmenden Effekt auf das Bakterienwachstum aus. ⁴⁰
Laktoperoxidase	Wirkt bakteriostatisch, ⁴¹ indem sie den Stoffwechsel der Bakterien hemmt. ⁴²
Wachstumsfaktoren	Tragen dazu bei, dass Wunden in der Mundhöhle schnell ausheilen, wie z.B. EGF. ⁴³

Zu den niedermolekularen organischen Bestandteilen des Speichels zählen Harnstoff, Harnsäure, Citrat, Lactat, Glukose, Lipide und einige reduzierende Substanzen.⁴⁴

³²Buddecke, 1981; Edgar, 1992.

³³Ramasubbu et al., 1996.

³⁴Loomis et al., 1987; Tabak et al., 1990; Sanderink et al., 2004.

³⁵Ge et al., 2004.

³⁶Sanderink et al., 2004; Schwab et al., 2006.

³⁷Edgar, 1992; Marsh, 2003.

³⁸Sanderink et al., 2004; Schwab et al., 2006.

³⁹Sanderink et al., 2004.

⁴⁰Sanderink et al., 2004.

⁴¹Lawrence, 2002; Schwab et al., 2006.

⁴²Lawrence, 2002.

⁴³Gängler et al., 2005; Lüllmann-Rauch, 2006.

⁴⁴Buddecke, 1981; Edgar, 1992.

1.2 Künstlicher Speichel

Künstliche Speichelersatzlösungen finden in der Zahnmedizin und Medizin in verschiedenen Bereichen Anwendung, so z. B. für experimentelle Untersuchungen im Labor⁴⁵ oder bei Patienten mit ausgeprägter Mundtrockenheit.⁴⁶ Dabei wird das Produkt jeweils auf den Anwendungsbereich abgestimmt und angepasst.

Zu den Anwendungsgebieten für Untersuchungen im Labor zählen beispielsweise die Erforschung von Biofilmen und dentaler Plaque. Weitere Anwendungsgebiete ergeben sich in der Untersuchung dentaler Materialien hinsichtlich ihres Verschleiß- und Korrosionsverhaltens und der Anlagerung von Bakterien.⁴⁷

Für die Untersuchung der Adhäsion von oralen Mikroorganismen an Grenzflächen ist die Anwendung von Versuchsbedingungen, die idealerweise den natürlichen Gegebenheiten der Mundhöhle entsprechen sollten, wichtig.⁴⁸ Durch Verwendung eines künstlichen Speichelersatzes können standardisierte und reproduzierbare Versuchsbedingungen geschaffen werden; die Verwendung von natürlichem Speichel ist in derartigen Systemen hingegen problematisch, da sowohl die Produktion als auch die Zusammensetzung von natürlichem Speichel erheblichen intra- und interindividuellen Schwankungen unterworfen sind.⁴⁹ Aufgrund dieser intra- und interindividuellen Schwankungen ist es schwierig, ein naturgetreues Pendant zu schaffen.⁵⁰ Da verschiedene Fragestellungen die Herstellung eines individuell geeigneten künstlichen Speichels erfordern, wurden in den letzten Jahren Speichelersatzlösungen für verschiedene Verwendungszwecke entwickelt, u.a. auch für Versuche mit Bakterien *in vitro*.⁵¹ Das ist jedoch nicht für alle Mikroorganismen einheitlich zu verwirklichen, da sich Mikroorganismen ganz unterschiedlicher Adhäsionsmechanismen bedienen und in ihrem Adhäsionsverhalten gegenseitig beeinflussen.⁵² So entwickelte Hahnel z.B. eine Speichelersatzlösung speziell für die Adhäsion des Bakterienstamms *Streptococcus mutans* (*S. mutans*).⁵³

Bis dato sind verschiedene künstliche Speichel und ihre Anwendung in Laboratorien in der Literatur beschrieben. Bekannte Speichelersatzlösungen wurden von Fusayama et al.,⁵⁴

⁴⁵Hahnel et al., 2008.

⁴⁶Guggenheim et al., 2003; Hahnel et al., 2008.

⁴⁷Hahnel, 2007.

⁴⁸Shellis, 1978; Mühlriedel, 2009.

⁴⁹Shellis, 1978.

⁵⁰Hahnel, 2007.

⁵¹Kirstein, 1986; Lüllmann-Rauch, 2006; Hahnel, 2007.

⁵²Hahnel, 2007.

⁵³Hahnel, 2007

⁵⁴Fusayama et al., 1963.

Muhler et al.⁵⁵ oder Shellis⁵⁶ entwickelt; diese wurden in unterschiedlichen Studien in beschriebener oder modifizierter Form verwendet.

Bis zum heutigen Tag beschäftigten sich nur sehr wenige Studien mit künstlichen Speichellösungen zur Untersuchung der bakteriellen Adhäsion. Shellis beschäftigte sich mit einem exakt definierten künstlichen Speichel für die Untersuchung des Wachstums von dentaler Plaque. Ein definiertes Medium enthält eine genau bestimmte Menge und Anzahl an definierten und chemisch reinen Inhaltsstoffen⁵⁷ und dient häufig zur Selektion des Wachstums bestimmter Mikroorganismen. Die Hauptbestandteile der von ihm vorgestellten Lösung waren neben verschiedenen Salzen, Vitamin- und Aminosäuremixturen, Muzin, Albumin und Amylase aus der Glandula submandibularis und der Glandula sublingualis von Rindern.⁵⁸ Kritisch ist dabei zu bewerten, dass im Anschluss keine Untersuchungen hinsichtlich der durch den Speichel mit beeinflussten Adhäsion bzw. des Wachstums verschiedener oraler Mikroorganismen durchgeführt wurden und die von Shellis entwickelte Lösung trotz exakt beschriebener Zusammensetzung damit ein undefiniertes Medium bleibt. Wijeyeweera hingegen stellte eine Speichelersatzlösung her, die auf der Zusammensetzung des natürlichen Speichels beruht und untersuchte deren Einfluss auf das Wachstum oraler Mikroorganismen.⁵⁹ Auch Wong et al. stellten eine Speichelersatzlösung (definierten modifizierten *DMM*) her, die sich teilweise auf Angaben von Shellis und Wyss stützt und untersuchten deren Einfluss auf den Reifungsvorgang dentaler Plaque.⁶⁰ Hahnel stellte verschiedene Speichelersatzlösungen her, die er hinsichtlich des Adhäsionsverhaltens von *S. mutans* untersuchte. Die Speichelersatzlösungen bestanden aus verschiedenen Proteinkonzentrationen. Dabei wurden verschiedene Albumin-, Immunglobulin A-, Lysozym, Mucin- und α- Amylase-Konzentrationen verwendet. Diese Speichelersatzlösung wurde mit dem von Wong et al. definierten *DMM*, das Hahnel zuvor modifizierte, verglichen. Hahnel stellte fest, dass die Adhäsion von *S. mutans* bei allen von ihm entwickelten Speichellösungen höher war als bei dem definierten modifizierten *DMM*, und dass mit einem höheren Muzingehalt der Speichelersatzlösung v.a. auf Prüfkörpern aus Glas die Adhäsion von *S. mutans* anstieg.⁶¹ Da Hahnel den gleichen *S. mutans*-Stamm untersuchte, der auch in dieser

⁵⁵Muhler et al., 1947.

⁵⁶Shellis, 1978.

⁵⁷Wong et al., 2001

⁵⁸Shellis, 1978.

⁵⁹Wijeyeweera, 1987.

⁶⁰Wong et al., 2001.

⁶¹Hahnel, 2007.

Arbeit verwendet wurde, wurde eine Speichelersatzlösung gewählt, die der von Hahnel beschriebenen Speichelersatzlösung ähnlich ist.

1.3 Erworbenes Pellikel

Dawes et al. haben 1963 für die azelluläre bakterienfreie Membran, die alle oralen Oberflächen mit einer bis zu einem Mikrometer dicken Biopolymerschicht bedeckt,⁶² den Begriff „erworbenes Pellikel“ eingeführt.⁶³ Das Pellikel setzt sich im Wesentlichen aus Proteinen zusammen; weitere Bestandteile sind neben den Proteinen Kohlenhydrate und Lipide.⁶⁴

1.3.1 Bildung des Pellikels

Bei der Bildung des Pellikels spielt die selektive Bindung von Speichelbestandteilen an den Zahnschmelz eine wichtige Rolle.⁶⁵ Man geht davon aus, dass der gesamte Adsorptionsprozess das Ergebnis eines thermodynamischen Gewinns an Entropie ist, der entsteht, wenn ein Wassermolekül an der Zahnschmelzoberfläche durch ein Protein ersetzt wird.⁶⁶ Dabei spielen die verschiedenen Wechselwirkungen zwischen Speichel, den gelösten Proteinen und dem Zahnschmelz bzw. Zahnersatzmaterial eine Rolle; hier ist v.a. die Polarität der einzelnen Komponenten von Interesse.⁶⁷ Die für die Proteinadsorption relevanten Kräfte können in langstreckenwirksame Kräfte (van der Waals- und Coulomb-Kräfte), mittelstreckenwirksame Kräfte (hydrophobe Wechselwirkungen) und kurzstreckenwirksame Kräfte (elektrostatische, ionische- und Säure-Base-Interaktionen) eingeteilt werden.⁶⁸

Die Proteinadsorption geht in zwei Phasen von statt.⁶⁹ Der initiale Vorgang (erste Phase) dauert einige Minuten und beginnt schon wenige Sekunden, nachdem die Oberfläche dem Speichel ausgesetzt wurde.⁷⁰ Dieser Vorgang wird durch die Wechselwirkung zwischen gegensätzlich geladenen Speichelproteinen einerseits und elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den Phosphat- und Calciumionen andererseits, die für die Adsorption der Speichelproteine verantwortlich sind, begründet.⁷¹

⁶²Gibbons et al., 1985; Marsh et al., 2003.

⁶³Dawes et al., 1963.

⁶⁴Carlen et al., 1998; Yao et al., 2001.

⁶⁵Al-Hashimi et al., 1989; Li et al., 2003b; Yao, 2003.

⁶⁶Moreno et al., 1982; Vassilakos, 1992; Vassilakos, 1993.

⁶⁷Hannig et al., 2009.

⁶⁸Hannig et al., 2009.

⁶⁹Hannig et al., 2009.

⁷⁰Walmann et al., 1992; Hannig, 1999; Hannig, 2004.

⁷¹Bennick, 1979; Moreno, 1982.

Dies kann dadurch erklärt werden, dass ein Teil der im Speichel enthaltenen Proteine aufgrund ihrer entgegen gerichteten Ladung eine hohe Affinität zu den an der Zahnschmelzoberfläche lokalisierten Calcium- und Phosphatgruppen aufweist, was zur Ausbildung elektrostatischer Wechselwirkungen zwischen den Makromolekülen im Speichel und der Zahnhartsubstanz führt.⁷² Zu diesen Proteinen, die auch als „*pellicle precursor proteins*“ bezeichnet werden,⁷³ zählen neben den prolinreichen Proteinen auch Histatine, Statherin, Cystatine, α -Amylase und prolinreiche Glykoproteine.⁷⁴ Außerdem spielen van-der-Waals-Kräfte, ionische Kräfte und hydrophobe Kräfte in der initialen Phase eine Rolle.⁷⁵

Das weitere Pellikelwachstum (zweite Phase) beginnt nach ca. 30 Minuten. Bis zu diesem Zeitpunkt ist das Pellikel zunächst nach dem Initialstadium konstant geblieben.⁷⁶ In diesem Stadium der Pellikelbildung kommt es zur Adsorption von mizellenähnlichen Aggregaten und heterotypische Komplexen aus dem Mischspeichel und von Biopolymeren. Durch diese kommt es zur starken Zunahme der Dicke des Pelliels innerhalb der nächsten 30-90 Minuten.⁷⁷ Das zwei Stunden alte Pellikel hat eine ähnliche Zusammensetzung wie die im Mischspeichel vorhandenen Proteinkomplexe,⁷⁸ die als kugelförmige Aggregate mit einem Durchmesser von 150 nm sezerniert werden.⁷⁹

Die Dicke des Pelliels ist jedoch stark von der Lokalisation in der Mundhöhle abhängig. So ist das Pellikel in Bereichen, in denen eine Selbstreinigung durch die Zunge etc. stattfindet (z.B. lingual) in der Regel dünner als in Bereichen, die schwer zu reinigen sind (z.B. bukkal).⁸⁰

Die Zusammensetzung des Pelliels kann schwanken, da die Pellikelbildung ein dynamischer Prozess ist und Komplexbildungen,⁸¹ Proteolysen und enzymatischen Vernetzungen unterworfen ist,⁸² die eine ständige Adsorption, Resorption und Modifikation der adsorbierten Bestandteile und intramolekulare Komplexbildungen zur Folge haben.⁸³

Im Speichel sind jedoch nicht einzelne chemische Substanzen, sondern kolloidale Partikel und Proteinagglomerate zu finden. Deren elektrostatische Eigenschaften werden durch das

⁷²Hellwig et al., 2009.

⁷³Lamkin et al., 1996.

⁷⁴Lendenmann et al., 2000.

⁷⁵Hannig et al., 2006.

⁷⁶Kuboki, 1987; Amaechi, 1999.

⁷⁷Kuboki, 1987; Amaechi, 1999.

⁷⁸Young, 1999.

⁷⁹Vitkov et al., 2004.

⁸⁰Hannig, 1999.

⁸¹Iontcheva, 1997; Iontcheva et al., 2000.

⁸²Yao, 1999; Yao, 2000.

⁸³Iontcheva, 1997; Yao, 1999; Yao, 2000.

Zetapotential beschrieben. Das Zetapotential beschreibt das elektrostatische Potential, das durch die Akkumulation von Ionen an den kolloidalen Partikeln hervorgerufen wird.⁸⁴ Die Proteinadsorption wird von der strukturellen Neuanordnung und -orientierung nach der initialen Adhäsion charakterisiert, die in Konformationsänderungen resultiert.⁸⁵ Die geladenen Gruppen werden je nach Polarität der Oberfläche umverteilt; Änderungen in der Hydratation des Sorbents und der Proteinoberflächen sind das Ergebnis. Eine geringere strukturelle Stabilität der Proteinagglomerate ermöglicht dabei die Adsorption von Proteinen aufgrund der leichteren Neustrukturierung. Diese Neustrukturierung kann über einen längeren Zeitraum erfolgen.⁸⁶

Die Bildung einer Pellikelschicht findet allerdings nicht nur auf den Zahnhartsubstanzen statt, sondern auch auf Weichgeweben⁸⁷ oder iatrogen in die Mundhöhle eingebrachten Materialien wie zahnärztlichen Werkstoffen und Restaurationen.⁸⁸

Die Protein Zusammensetzung eines auf zahnärztlichen Werkstoffen gebildeten Pellikels kann aufgrund der Oberflächeneigenschaften der zahnärztlichen Materialien stark variieren.⁸⁹ Dies kommt durch die unterschiedlichen physiko-chemischen Eigenschaften sowie der Oberflächenenergie und der Rauigkeit der Materialien zustande.⁹⁰

Proteine weisen unterschiedliche Affinitäten zu verschiedenen dentalen Materialien auf. So werden z.B. mehr Proteine auf rauen Oberflächen adsorbiert.⁹¹ Dabei korreliert die Menge der adsorbierten Proteine mit der Oberflächenenergie.⁹²

Außerdem scheint die Hydrophilie bzw. Hydrophobie eines Materials von Bedeutung zu sein.⁹³ *In vitro* adsorbieren mehr Proteine auf hydrophilen Oberflächen als auf hydrophoben.⁹⁴ Während hydrophile Oberflächen v.a. mit den polaren Gruppen der Proteine interagieren, wird die Adsorption zu hydrophoben Oberflächen wahrscheinlich von den Hydrocarbon-Ketten von organischen Molekülen moduliert.⁹⁵ Vassiliakos et al. fanden, dass größere Mengen an hydrophoben Speichelbestandteilen an hydrophobe Oberflächen adsorbieren als

⁸⁴Norde, 1986; Norde, 1995.

⁸⁵Gray, 2004.

⁸⁶Norde, 1995.

⁸⁷Bradway et al., 1989.

⁸⁸Edgerton et al., 1992; Yoo et al., 2003.

⁸⁹Sönju et al., 1975; Bradway et al., 1989; Edgerton et al., 1992; Edgerton et al., 1996; Yoo et al., 2003.

⁹⁰Edgerton et al., 1996.

⁹¹Carlen et al., 2001.

⁹²Arvidsson et al., 2004.

⁹³Vassiliakos et al., 1993; Lindh et al., 2002.

⁹⁴Steinberg et al., 2002.

⁹⁵Vassiliakos et al., 1993; Lindh et al., 2002.

an hydrophile und umgekehrt.⁹⁶ Des Weiteren spielt auch die Vorbehandlung der Materialien eine Rolle bei der Proteinadsorption, wie z.B. die Korrosion des Materials oder die Vorbehandlung mit Calcium.⁹⁷

Pellikel, die auf verschiedenen Substraten gebildet wurden, weisen laut Hannig untereinander die gleichen Enzymaktivitäten und eine ultrastrukturell homogene Oberfläche auf, aber Unterschiede in ihrer Zähigkeit.⁹⁸ Diese Zähigkeit ist das Ergebnis der oben genannten Oberflächeneigenschaften eines Materials.⁹⁹ Sie führen dazu, dass das Pellikel sich unterschiedlich adhären zu dem jeweiligen Substrat verhält. Eine niedrige Oberflächenenergie des Substrats führt z.B. dazu, dass das Pellikel nur locker am Substrat haftet, während umgekehrt eine hohe Oberflächenenergie zu einer starken Haftung am Substrat führt.¹⁰⁰ Somit spielt sowohl das Pellikel¹⁰¹ als auch die Eigenschaften des Materials, die über kurz- oder langstreckenwirksamen Kräfte das Pellikel durchdringen können,¹⁰² eine Rolle bei der Adhäsion von Mikroorganismen. Einen Überblick über die Komplexität der Pellikelbildung mit anschließender bakterieller Adhäsion gibt Abb. 1.

⁹⁶Vassilakos et al., 1992.

⁹⁷Milleding et al., 2001; Steinberg et al., 1995.

⁹⁸Schwender et al., 2005.

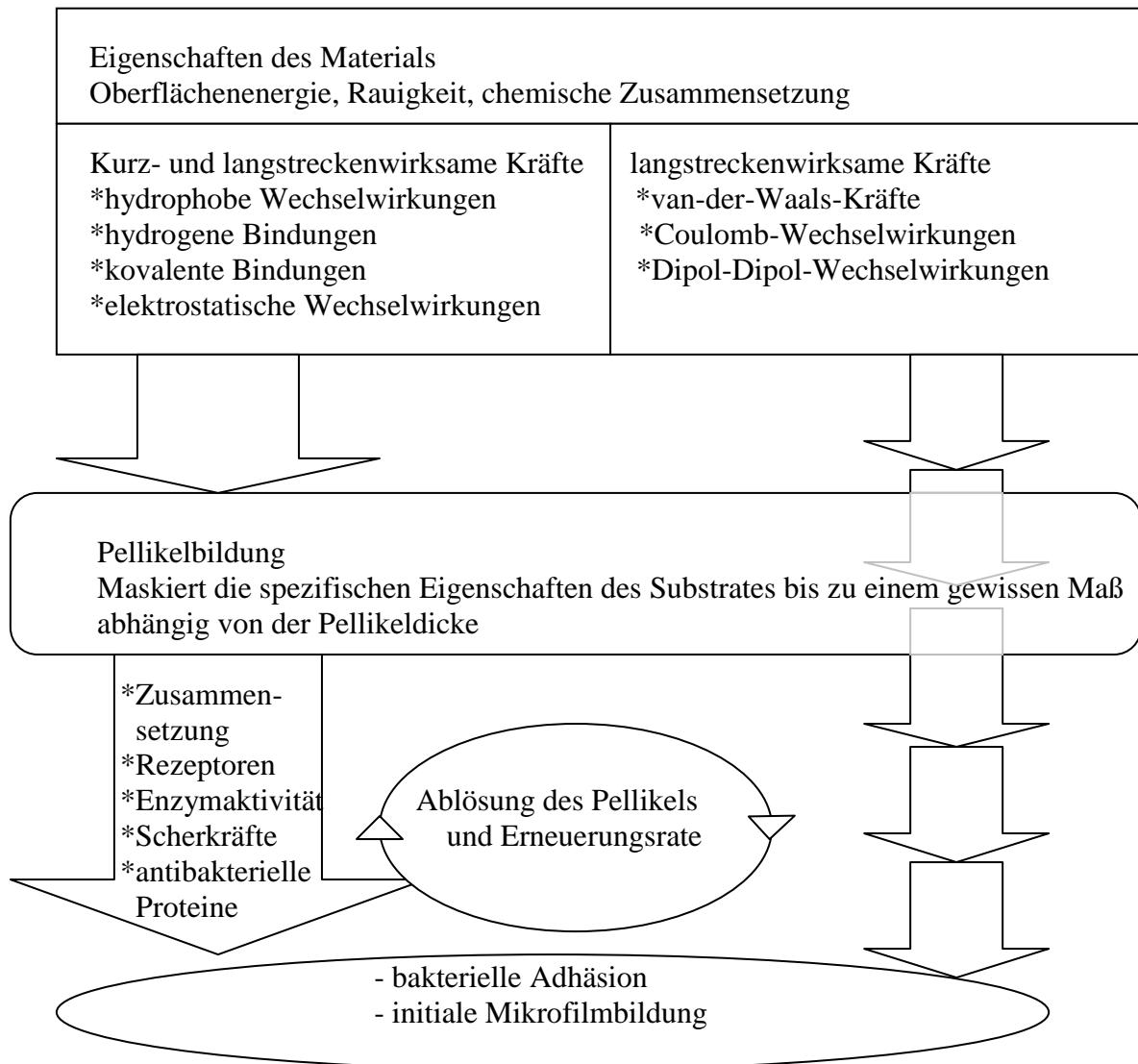
⁹⁹Norde et al., 1995.

¹⁰⁰Vassilakos et al., 1993.

¹⁰¹Lamkin et al., 1993.

¹⁰²Norde et al., 1995; Goobes et al., 2008.

Abb. 1: Wechselwirkungen zwischen Proteinen, dem Speichel und Bakterien in der Mundhöhle: die substratspezifischen Oberflächeneigenschaften werden durch das Pellicel bis zu einem gewissen Maß maskiert, dennoch wird die Biofilmbildung durch langstreckenwirksame Kräfte, die durch das Pellicel dringen, beeinflusst.¹⁰³



1.3.2 Biochemische Zusammensetzung

Die biochemische Zusammensetzung des Pellicels unterscheidet sich je nach Lokalisation in der Mundhöhle, der Bildungsdauer und der jeweiligen für die Analyse angewandten Untersuchungsmethode stark. In der Literatur sind verschiedene Studien beschrieben, die zeigen, dass das Pellicel je nachdem, wo es im Mund lokalisiert ist¹⁰⁴ und je nach

¹⁰³Hannig et al., 2009.

¹⁰⁴Carlen, 1998.

untersuchter Zahnfläche in seiner Dicke und Zusammensetzung Schwankungen aufweist.¹⁰⁵ Zudem gibt es Unterschiede zwischen einem neu gebildeten Pellikel, das in den ersten beiden Stunden nach der Reinigung der entsprechenden Oberflächen entsteht und einem „alten“ Pellikel, das auf Zähnen entsteht, die länger keiner professionellen Zahncleingung unterzogen wurden.¹⁰⁶

Außerdem unterscheiden sich auch *in vivo* gebildete Pellikel bezüglich ihrer Zusammensetzung stark von *in vitro* gebildeten Pellikeln.¹⁰⁷

Tabelle 2 gibt einen Überblick über die Pellikelproteinbestandteile, die auf unterschiedlichen Substanzen in Abhängigkeit verschiedener Versuchsbedingungen nachgewiesen werden konnten.

¹⁰⁵Sönju et al., 1973.

¹⁰⁶Sönju et al., 1973; Lendemann et al., 2000.

¹⁰⁷Al-Hashimi et al. 1989; Carlen et al., 1998; Yao et al., 2001.

Tabelle 2: Pellikelproteinbestandteile auf verschiedenen Substanzen, die unter verschiedenen Versuchsbedingungen gebildet wurden:

Proteine	Nachweis im Pellikel			Kunststoff in vivo	Prothese in situ	Titan	Hydroxylapatit	Zirkonoxid
						in vitro	in vitro	in vitro
	Carlen et al., 1998 in vitro	Carlen et al., 1998 in vitro	Li et al., 2004a in vivo	Yoo et al. 2003	Edgerton et al., 1992	Lima et al., 2008	Lima et al., 2008	Lima et al., 2008
Agglutinin	X	X						
Albumin	X	X	X		X			
Amylase	X	X	X	X	X	X	X	X
Carboanhydrase II			X					
Cystatin SA-1				X				
Cystatin SN				X				
Histatin 1			X					
Immunglobulin A	X	X	X		X	X	X	X
Immunglobulin G			X			X	X	X
Immunglobulin M			X					
Laktoferrin			X					
Lysozym			X		X			
Muzinglykoprotein 1 (=MG 1)			X	X	X			
Muzinglykoprotein 2 (=MG 2)	X	X		X				
Peroxidase								
PRP	X	X	X					
G-PRP	X	X						
S-PRP	X	X		X				
Statherine			X					
Fibronectin						X	X	X
Fibrinogen						X	X	X

Das Pellikel setzt sich im Wesentlichen aus Proteinen, Kohlenhydraten und Lipiden zusammen. Tabelle 3 zeigt verschiedene im Pellikel enthaltene Proteintypen und deren Funktion.

Tabelle 3: Proteintyp und Funktion:

Proteintyp	Funktion
MUC-5B (=Muzinglykoprotein 1)	Bindet Wasser und verleiht somit dem Speichel seine Viskosität und Gleitfunktion. Es schützt gegen Austrocknung und verleiht dem Pellikel seine Undurchlässigkeit, die es gegen Proteolyse schützt. Der Schutz kommt v.a. durch heterotypische Komplexe zustande, die das Muzin mit prolinreichen Proteinen (PRP), Amylase, Statherinen und Histatinen bildet. ¹⁰⁸
MUC-7 (=Muzinglykoprotein 2)	Ist v.a. aus kardiologischer Sicht von Bedeutung: eine verminderte MUC-7 Konzentration korreliert mit einer höheren intraoralen Keimzahl von <i>S. mutans</i> . ¹⁰⁹
Saure prolinreiche Proteine	Binden zusammen mit Statherinen sehr stark an Hydroxylapatit, wodurch Kryptotope zutage treten und damit die Bindung von Erstbesiedlern sowie von Nachfolgekeimen ermöglichen. ¹¹⁰
Statherine	Haben die gleiche Funktion wie saure prolinreiche Proteine. ¹¹¹
α -Amylase	Kommt im Pellikel in zwei Isoformen vor. Die glykosylierte Isoform kommt im Pellikel öfter vor als die nicht-glykosylierte Isoform. ^[1] α -Amylase spaltet Stärke in Glucose (20%) und Maltose (80%). ^[2] Sie wird sowohl von der Glandula parotidea als auch der Glandula submandibularis sezerniert. ^[3]
Agglutinine	Fördern die Aggregation von <i>S. mutans</i> <i>in vitro</i> und bilden heterotypische Komplexe mit Immunglobulin A (IgA), die sie vermutlich gegen Proteasen schützen. ¹¹² Die wichtigste Eigenschaft von IgA ist, dass es an mikrobielle Antigene bindet und die Mikroorganismen agglutiniert, damit diese leichter eliminiert werden können. ¹¹³
Cystatine	Weisen eine mikrobielle Aktivität gegen den Keim <i>Porphyromonas gingivalis</i> , der als Mitverursacher der Parodontitis zählt, auf. ¹¹⁴
β 2-Mikroglobulin	Agglutiniert <i>S. mutans</i> . ¹¹⁵
Albumin	Ist ein Carrier Protein und reguliert den kolloid-osmotischen Druck. ¹¹⁶
Carboanhydrase II	Ist an der pH-Homöostase beteiligt. ¹¹⁷
Histatine	Wirken toxisch auf Bakterien und Pilze. ¹¹⁸
IgA, IgM, IgG	Dienen der Erkennung von mikrobiellen Antigenen, wodurch die Keime deaktiviert werden und deren Wachstum und Kolonisierung auf Zahnoberflächen und Schleimhäuten eingeschränkt wird. ¹¹⁹
Laktoferrin	Wirkt bakteriostatisch. ¹²⁰
Lysozym	Aggregiert mit Mikroorganismen und hemmt auch deren Säureproduktion innerhalb von Biofilmen. Es wirkt bakterizid und bakteriostatisch. ¹²¹
Peroxidase	Wirkt insbesondere bei gleichzeitiger Anwesenheit von Fluoridionen u.a. auf kariogene (säureproduzierende) Keime bakteriostatisch. ¹²²
Fibronectin	Dient als Rezeptorprotein für <i>S. mutans</i> . ¹²³
Fibrinogen	Ist der Gerinnungsfaktor I und ein akute-Phase-Protein, dass auf erhöhte Entzündungswerte hinweist. ¹²⁴

Neben Proteinen wurden im Pellikel Kohlenhydrate gefunden. Zu diesen Zuckern gehören Glucose und Galactose, Mannose, Fructose, Glucosamine und Galactosamine.¹²⁵ Die Glucose

¹⁰⁸Sanderink et al., 2004.

¹⁰⁹Sanderink et al., 2004.

¹¹⁰Sanderink et al., 2004.

¹¹¹Vgl.: Tabelle 3 S. 16: saure prolinreiche Proteine.

¹¹²Sanderink et al., 2004; Loimaranta et al., 2005.

¹¹³Sanderink et al., 2004.

¹¹⁴Sanderink et al., 2004.

¹¹⁵Sanderink et al., 2004.

¹¹⁶Hannig et al., 2007d.

¹¹⁷Hannig et al., 2007d.

¹¹⁸Sanderink et al., 2004.

¹¹⁹Sanderink et al., 2004.

¹²⁰Sanderink et al., 2004.

¹²¹Sanderink et al., 2004.

¹²²Sanderink et al., 2004.

¹²³Sanderink et al., 2004; Hannig et al., 2007d.

¹²⁴Hannig et al., 2007d; Hellwig et al., 2009.

¹²⁵Sönju et al., 1975; Mayhall, 1976.

macht über die Hälfte des Kohlenhydratanteils im Pellikel aus.¹²⁶ Die Herkunft der Glucose ist bis dato noch nicht vollständig geklärt. Es wird davon ausgegangen, dass bakterielle Glucane, die sich in das Pellikel einlagern, sowie auch eingelagerte Glykosyltransferasen, die Glucose synthetisieren, zu dem Zuckergehalt im Pellikel beitragen. Aber auch Glykolipide, deren Kohlenhydratanteil ausschließlich aus Glucose besteht, könnten eine mögliche Ursache für den Glucosegehalt im Pellikel sein.¹²⁷

Weiterhin kommen auch Lipide im Pellikel vor, jedoch gibt es über ihre Funktion im Pellikel bis dato kaum Veröffentlichungen. Der Lipid-Anteil macht ca. 22-23 % des Trockengewichts des Pelliels aus.¹²⁸ Die Zusammensetzung kann aber individuell stark schwanken und scheint sich auf die Kariesanfälligkeit des Zahnschmelzes auszuwirken, da die Lipide als Barriere dienen und die Diffusion von Säuren in das Pellikel einschränken.¹²⁹ Diese Eigenschaft kann eventuell aber auch der Zunahme der Zähigkeit des Pelliels durch Interaktionen mit Muzinen zugeschrieben werden.¹³⁰

1.3.3 Funktion des Pelliels

Die primäre Funktion des Pelliels ist der Schutz des Zahnschmelzes. Man geht davon aus, dass das Pellikel die Friktion zwischen den Zähnen und der Mucosa und somit auch die Abrasion des Zahnschmelzes durch Mastikation und parafunktionellen Tätigkeiten wie z.B. das Knirschen mit den Zähnen reduziert.¹³¹

Das Pellikel dient zudem als Diffusionsbarriere und vermindert die Löslichkeit des Zahnschmelzes durch Säuren.¹³² Dies wird durch die adsorbierten Proteine vermittelt, die den Einfluss von Calcium, Phosphat und Fluoriden während der Remineralisierungsphase zulassen¹³³ und gleichzeitig den Verlust von Mineralstoffen aus der Zahnhartsubstanz unterdrücken,¹³⁴ aber auch die ungehemmte Kristallisation des Zahnschmelzes verhindern.¹³⁵

Zusätzlich beeinflusst das Pellikel die Adhärenz von Mikroorganismen an die Zahnoberfläche, da einige Proteine als Liganden für die Mikroorganismen fungieren.¹³⁶ In

¹²⁶Sönju et al., 1975.

¹²⁷Slomiany, 1986.

¹²⁸Slomiany et al., 1990.

¹²⁹Slomiany et al., 1986; Hannig et al., 2007a.

¹³⁰Slomiany et al., 1986; Slomiany et al., 1990.

¹³¹Lendemann et al., 2000; Sanderink et al., 2004.

¹³²Zahradník et al., 1977.

¹³³Zahradník et al., 1977.

¹³⁴Sanderink et al., 2004.

¹³⁵Hay, 1973; Moreno et al., 1979; Sanderink et al., 2004.

¹³⁶Gibbons et al., 1976, Sanderink et al., 2004.

Tabelle 4 sind typische mikrobielle Liganden bzw. Pellikelrezeptoren, die eine Bedeutung für die Adhäsion bestimmter Mikroorganismen besitzen, dargestellt.

Tabelle 4: Typische mikrobielle Liganden bzw. Pellikelrezeptoren.¹³⁷

Protein	gebundene Bakterien
α -Amylase	<i>S. gordonii</i> , <i>S. mitis</i> , <i>S. salivarius</i> , <i>S. anginosus</i> , <i>S. parasanguinis</i>
Fibronektin	<i>T. denticola</i> , <i>S. mutans</i> , <i>S. gordonii</i>
MUC-7	viele Bakterien darunter <i>S. salivarius</i> , <i>S. parasanguinis</i>
	<i>A. naeslundii</i> Genospezies-2, <i>S. mutans</i> , <i>S. gordonii</i>
sIgA	<i>S. sanguinis</i> , <i>S. parasanguinis</i>
Statherin	<i>A. naeslundii</i> Genospezies-2, <i>F. nucleatum</i> , <i>P. gingivalis</i>
Speichelagglutinine	<i>S. mutans</i> , <i>S. sobrinus</i> , <i>S. gordonii</i> , <i>S. oralis</i> ; <i>S. intermedius</i>
PRP, PRG	<i>S. mutans</i> , <i>S. gordonii</i> , <i>S. oralis</i> ; <i>S. intermedius</i>
	<i>A. naeslundii</i> Genospezies-2, <i>P. gingivalis</i> , <i>P. loescheii</i>
Dextran, Glucan	<i>S. mutans</i> , <i>S. sobrinus</i> , <i>Veillonella</i>
Diverse Glykoproteine 1	<i>S. sanguinis</i> , <i>S. parasanguinis</i> , <i>S. oralis</i> , <i>S. mitis</i>
1=unter Inbegriff ihrer endständigen Sialinsäuren (N-Acetylneuraminsäure) und Blutgruppenantigene; PRP=Prolinreiche (Glyko-) Proteine; sIgA=sekretorisches IgA; MUC=Muzin	

1.3.4 Mikrobielle Adhäsion an das Pellikel

Die orale Biofilmbildung wird durch die Adhäsion von Bakterien an das Zahnschmelzoberhäutchen bestimmt. Die Adhäsion kommt durch das Gleichgewicht zwischen einer adäquaten Wirtsabwehr und einem komplexen physico-chemischen Mechanismus zustande.¹³⁸ Die Oberflächenenergie der Zahnoberfläche,¹³⁹ die Oberflächenrauigkeit,¹⁴⁰ die elektrostatischen und elektrodynamischen Kräfte und vor allem die Glykoproteinbestandteile des Pellikels beeinflussen die Kolonisierung der Mikroflora.¹⁴¹

Der Adhäsionsprozess der Mikroorganismen vollzieht sich in mehreren Phasen.

Dabei kann eine reversible Adhäsion der Pionierkeime (erste Phase) von einer irreversiblen Adhäsion (zweite Phase) unterschieden werden.¹⁴²

In der ersten Phase besiedeln überwiegend Gram-positive Bakterien das Pellikel. Insbesondere *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sanguinis* und

¹³⁷Sanderink et al., 2004.

¹³⁸Gängler et al., 2005.

¹³⁹Sönju et al., 1975.

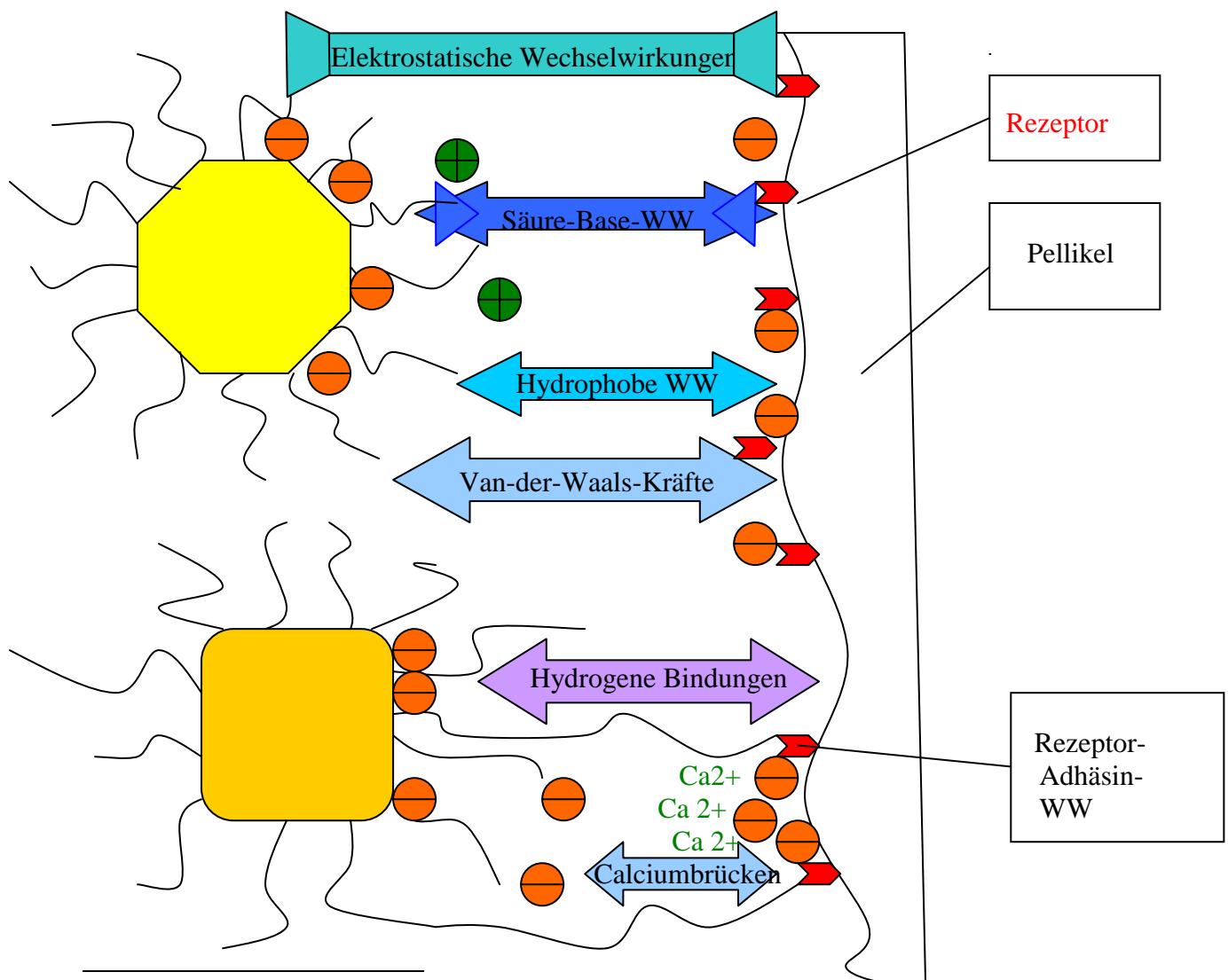
¹⁴⁰Carlen et al., 2001.

¹⁴¹Gängler et al., 2005; Müller et al., 2004.

¹⁴²Marsh et al., 2003.

*Actinomyces naeslundii*¹⁴³ und auch Arten von *Eikenella* und *Hämophili* lassen sich unter den Pionieren finden.¹⁴⁴ Diese so genannten Pionierkeime haften innerhalb weniger Stunden selektiv dem Pellicel an und schaffen durch ihre metabolische Aktivität adäquate Lebensbedingungen für die nachfolgenden Mikroorganismen.¹⁴⁵ In Abb. 2 ist die initiale Bakterienadhäsion schematisch dargestellt.

Abb. 2: Die initiale Bakterienadhäsion wird durch die Fimbrien sowie lang-, mittel- und kurzstreckenwirksame Kräfte beeinflusst und führt zu einer spezifischen Rezeptor-Adhäsion-Wechselwirkung. Dabei können die wirksamen Kräfte anziehend (hydrophobe Wechselwirkungen (WW), van-der-Waals-Kräfte, hydrogene Bindungen, Kalziumbrücken), abstoßend (elektrostatische WW) oder beides sein (Säure-Base-WW).¹⁴⁶



¹⁴³Li et al., 2004b.

¹⁴⁴Ten Cate et al., 2006.

¹⁴⁵Sanderink et al., 2004.

¹⁴⁶Hannig et al., 2009.

In der zweiten Phase vermehren sich die Erstbesiedler und bilden Mikrokolonien aus, die von einer extrazellulären polymeren Matrix bakteriellen Ursprungs und von adsorbierten Glykoproteinen und Proteinen, die aus dem Speichel stammen, umgeben sind.¹⁴⁷ Es kommt zur Adhäsion weiterer Bakterien, der so genannten Koadhäsion und Koaggregation. Unter Koaggregation versteht man die Adhäsion genetisch unterschiedlicher Bakterienarten aneinander, während man bei Koadhäsion von der Adhäsion genetisch identischer Bakterienarten spricht.¹⁴⁸ Streptokokken benutzen für die Koadhäsion spezifische Oberflächenproteine.¹⁴⁹ Zur Entstehung und Aufrechterhaltung der Kolonien sind sowohl die Kommunikationsmechanismen unter den Bakterien durch Signalmoleküle und Gentransfer als auch jene zwischen Bakterien- und Körperzellen wie dem Epithel, Phagozytosezellen und allen immunkomplementen Zellen von Bedeutung.¹⁵⁰

Während der zweiten Phase der bakteriellen Adhäsion werden Mikroorganismen irreversibel an die Plaque gebunden. Dies geschieht mit Hilfe der Pili und Fimbrien der Bakterien oder aber Oberflächenproteinen der bakteriellen Glykokalyx, die Adhäsine genannt werden.¹⁵¹ Die Adhäsine enthalten Lektine, eine Kohlenhydratummantelung, Lipoteichonsäure oder kohlenhydratbindende Proteine. Diese können Wechselwirkungen mit einer Vielzahl von Rezeptoren eingehen, die in der Plaqueoberfläche sitzen und tragen somit letztendlich zur irreversiblen Bakterienadhäsion bei.¹⁵²

Fusobacterium nucleatum fungiert als Brücke zwischen den nicht oder nur schwach aggregierenden aeroben und den obligat anaeroben Besiedlern,¹⁵³ indem es zunächst an die aeroben und fakultativ aeroben Erstbesiedler bindet¹⁵⁴ und damit die Bindung von anaeroben Besiedlern wie *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* und *Eubacterium spp.*¹⁵⁵ ermöglicht.¹⁵⁶ In Abb. 3 ist die Plaque nach Kolenbrander schematisch dargestellt.

¹⁴⁷Marsh et al., 2003.

¹⁴⁸Kolenbrander, 1993; Busscher et al., 1997.

¹⁴⁹Sanderink et al., 2004.

¹⁵⁰Gängler et al., 2005.

¹⁵¹Marsh, 1999.

¹⁵²Liljemark et al, 1996; Jenkinson et al., 1997; Hannig, 2003.

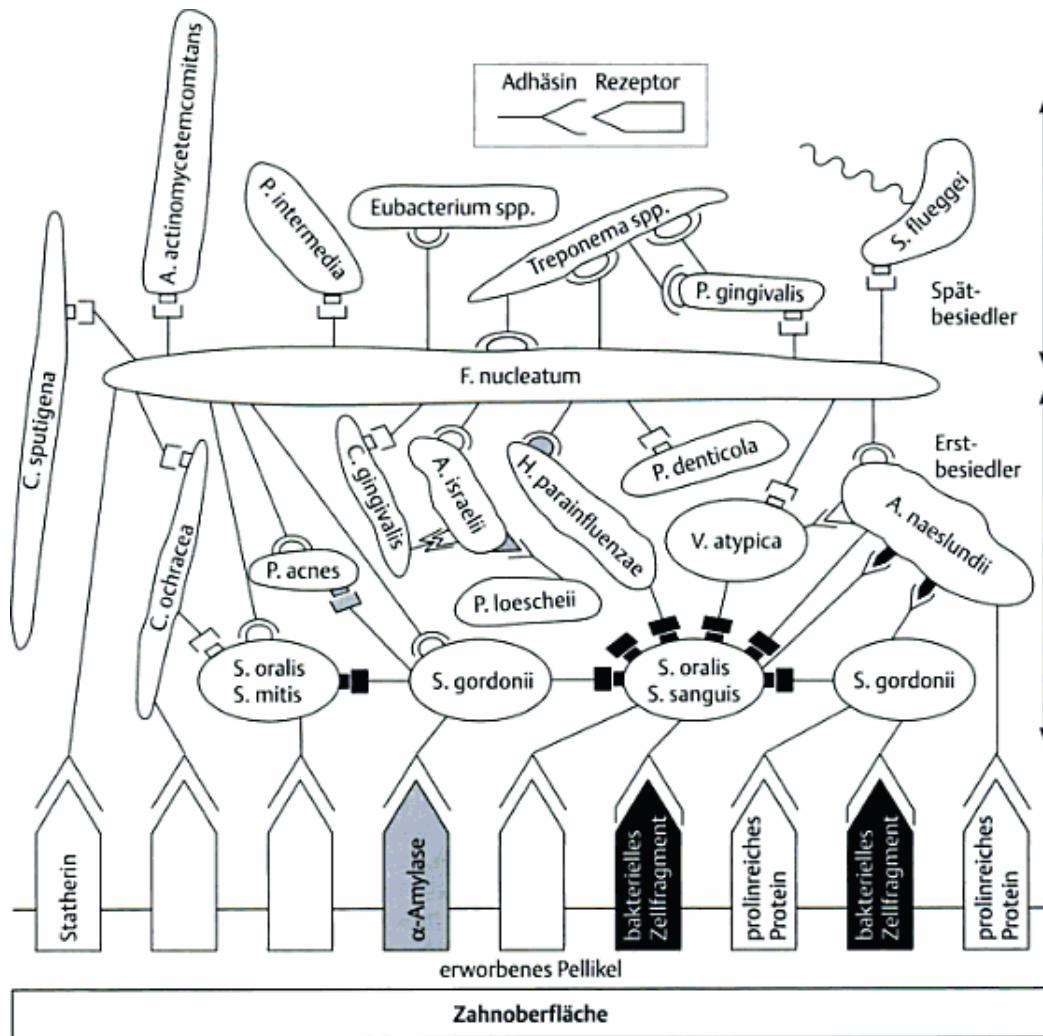
¹⁵³Bradshaw et al., 1998.

¹⁵⁴Kolenbrander et al., 1993; Bradshaw et al., 1998.

¹⁵⁵Kolenbrander et al., 2002.

¹⁵⁶Kolenbrander et al., 1993; Bradshaw et al., 1998.

Abbildung 3: Schematische Darstellung der dentalen Plaque nach Kolenbrander.¹⁵⁷



Mit zunehmender Dicke des Pellicels und somit zunehmender Reifung werden die primär Gram-positiven Kokken zunehmend durch filamentöse Bakterien ersetzt, die mit der Zeit die ökologischen Bedingungen (v.a. durch Verminderung des Sauerstoffangebots) für die Gram-negative, anaerobe Mikroflora schaffen.¹⁵⁸

Nach einem Tag befindet sich auf der Zahnoberfläche ein komplexer Bakterienrasen;¹⁵⁹ nach ca. einer Woche besteht die ausgereifte Plaque zu 60-70 Vol. % aus dichtgepackten Bakterien, die in eine amorphe Plaquematrix eingebettet sind.¹⁶⁰ Die Pionierkeime finden sich darin nicht mehr.¹⁶¹ Generell kann die mikrobielle Zusammensetzung der Plaque mit der

¹⁵⁷Kolenbrander et al., 2000.

¹⁵⁸Listgaten et al., 1999.

¹⁵⁹Klimek et al., 1999.

¹⁶⁰Lehmann et al., 1998.

¹⁶¹Klimek et al., 1999; Marsh et al., 2003.

Lokalisation in der Mundhöhle deutlich variieren.¹⁶² Dies wird in den folgenden Tabellen 5, 6 und 7 verdeutlicht.

Tabelle 5: mikrobielle Zusammensetzung bzw. mengenmäßige Anteile der wichtigsten Bakterienarten in der approximalen Plaque. M=prozentuale Anteile (Median) der Gesamtflora; N=Anzahl der besiedelten Plaqueproben (%).¹⁶³

Bakterienspezies	M(%)	N (%)
<i>Streptokokkus</i>	23	100
<i>Mutans-Gruppe</i>	2	66
<i>Sanguis-Gruppe</i>	6	86
Gram-positive Stäbchen, v.a. <i>Actinomyces</i>	42	100
<i>A. israelii</i>	17	72
<i>A. naeslundii</i>	19	79
Gram-negative Stäbchen (v.a. <i>Prevotella</i>)	8	93
<i>Neisseria</i>	2	76
<i>Veillonella</i>	1	93
<i>Fusobacterium</i>	<1	55
<i>Lactobacillus</i>	<1	24

Tabelle 6: mikrobielle Zusammensetzung bzw. mengenmäßige Anteile der wichtigsten Bakterienarten der Fissuren-Plaque bei Erwachsenen. M=prozentuale Anteile (Median) der Gesamtflora; N=Anzahl der besiedelten Plaqueproben (%).¹⁶⁴

Bakterienspezies	M(%)	N (%)
<i>Streptokokkus</i>	45	100
<i>Mutans-Gruppe</i>	25	70
<i>Sanguis-Gruppe</i>	1	50
<i>Actinomyces</i>	18	80
<i>A. naeslundii</i>	3	70
<i>Veillonella</i>	3	60
<i>Lactobacillus</i>	<1	20
<i>L. casei</i>	<1	10

¹⁶²Marsh et al., 2003.

¹⁶³Sanderink, 2004.

¹⁶⁴Sanderink, 2004.

Tabelle 7: mikrobielle Zusammensetzung bzw. mengenmäßige Anteile der wichtigsten Mikroorganismen von auf Zahnprothesen befindlichen Plaque–Biofilmen. M=prozentuale Anteile (Median) der Gesamtflora; N=Anzahl der besiedelten Plaqueproben (%).¹⁶⁵

Bakterienspezies	M(%)	N (%)
<i>Streptokokus</i>	41	88
<i>Mutans-Gruppe</i>	<1	50
<i>Sanguis-Gruppe</i>	1	63
<i>Staphylokokkus</i>	8	100
<i>S. aureus</i>	6	88
Gram-negative Stäbchen gesamt	33	100
<i>Actinomyces</i>	21	88
<i>Veillonella</i>	8	100
Pilze	<<<1	63

1.4 Quantifizierung von Mikroorganismen in Versuchsaufbauten zur Biofilmbildung

Es gibt verschiedene Methoden für die Quantifizierung von Bakterien auf zahnärztlichen Werkstoffen. Diese können stark in ihrer Präzision und dem Arbeitszeitaufwand differieren.

Eine traditionelle Methode der Bakterienquantifizierung ist deren Kultivierung auf Agar-Platten. Die Bakterien werden mit Hilfe von Ultraschall von ihrem Substrat abgelöst, auf Agar-Platten aufgebracht und inkubiert. Erst nach weiterer Inkubation kann eine Quantifizierung der Bakterien vorgenommen werden.¹⁶⁶ Diese Methode bietet den Vorteil, dass nur Bakterien erfasst werden, die einen aktiven Stoffwechsel besitzen; jedoch ist sie sehr zeit- und arbeitsintensiv. Außerdem lassen sich desorbierte Biofilme mit ihr schwer quantifizieren und auch das Ablösen des Pellikels vom Substrat ist schwierig, wodurch auch die Präzision dieser Methode mangelhaft ist.¹⁶⁷

Es gibt verschiedene Mikroskopietechniken. Dazu zählen etwa die klassische Fluoreszenzmikroskopie, die Rasterelektronenmikroskopie, die Transmissionselektronenmikroskopie oder die Atomkraftmikroskopie, mit deren Hilfe die Ultrastruktur und die Matrix des Biofilms genau untersucht werden können.

Die klassische Fluoreszenzmikroskopie wird häufig zusammen mit Lebend/Totfärbungen angewandt. Hierfür werden z.B. mit dem LIVE/DEAD® BacLight™ Bactiarial Viability Kit die lebenden Bakterien grün und die toten Bakterien rot markiert. Durch unterschiedliche Filter werden die lebenden und toten Bakterien mit Hilfe einer Bildverarbeitungssoftware und einer digitalen Kamera zu einem digitalen Bild verarbeitet. Die Bakterien können

¹⁶⁵Sanderink, 2004.

¹⁶⁶Olsson et al., 1992; Tanner et al., 2005.

¹⁶⁷Hannig et al., 2007b; Hannig et al., 2010.

anschließend computergestützt ausgezählt werden.¹⁶⁸ Der Nachteil dieser Methode ist, dass nur kleine Bildausschnitte analysiert werden können.

Die Rasterelektronenmikroskopie (REM) kann dreidimensionale Oberflächenstrukturen in verschiedenen Auflösungen visualisieren.¹⁶⁹ Da für diese Untersuchung ein Vakuum benötigt wird und die Proben nur wenige leitende Eigenschaften besitzen, sind für diese Methode in vielen Fällen die Fixierung, Dehydrierung und das Beschichten mit einem leitenden Material nötig.¹⁷⁰ Es werden dabei Methoden benötigt, die nicht die Struktur der Proben zerstören und keine Artefakte produzieren.¹⁷¹ Die REM kann auch mit Gold-Immunodarstellung angewendet werden, um Proteine im Pellikel zu visualisieren und zu quantifizieren.¹⁷² Problematisch an der konventionellen Rasterelektronenmikroskopuntersuchung ist es, eine Trocknung der Proben vorzunehmen ohne Artefakte zu produzieren. Mit der REM ist die Differenzierung verschiedener Bakterienspezies wie Kokken-, Filamenten- und Stäbchenstämmen nicht möglich.¹⁷³

Eine weitere Methode zur Quantifizierung von Mikroorganismen stellt die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) dar, die es erlaubt, sehr dünne Schichten von bis zu 0,1 nm zu untersuchen.¹⁷⁴ Einer der Vorteile dieser Methode ist die hohe Auflösung, die bis zu 0,1 nm reicht.¹⁷⁵ Die Fixierung findet typischerweise mit Glutaraldehyd, Osmiumtetroxid oder per Gefriertrocknung statt.¹⁷⁶ Außerdem müssen die Proben mit Aceton oder Ethanol dehydriert und anschließend in Kunststoff eingebettet werden, um ultradünnen Schichten zu erhalten. Zusätzlich werden häufig schwere Elemente wie z.B. Uranylacetat verwendet, um den Kontrast zu maximieren.¹⁷⁷ TEM ist eine exzellente Methode für die Untersuchungen an Bakterien und ihrer Matrix oder für Untersuchungen am Pellikel. Jedoch ist diese Methode äußerst komplex und zeitbeanspruchend;¹⁷⁸ zudem können die TEM-Bilder nur einen sehr kleinen Ausschnitt des untersuchten Materials anzeigen.¹⁷⁹

¹⁶⁸Bürgers et al., 2012.

¹⁶⁹Hannig et al., 2010.

¹⁷⁰Hannig et al., 2010.

¹⁷¹Bergmans et al., 2005.

¹⁷²Hannig et al., 2007b; Hannig, 2008.

¹⁷³Gusberti et al., 1985; Hannig, 2010.

¹⁷⁴Hannig et al., 2010.

¹⁷⁵Bergmans et al., 2005.

¹⁷⁶Hannig et al., 2010.

¹⁷⁷Hannig et al., 2010.

¹⁷⁸Hannig & Balz, 1999; Hannig et al., 2008.

¹⁷⁹Gröger et al., 2006.

Die Atomkraftmikroskopie (AMF) hat den großen Vorteil, dass für die Untersuchung der Proben kein Vakuum benötigt wird.¹⁸⁰ Auflösungen bis zu kleiner 1 nm sind bei dieser Methode möglich. Membrankomponenten und lebende Zellen können direkt im Puffer oder auf einer Probe untersucht werden.¹⁸¹ Außerdem können strukturelle Veränderungen etwa durch die Zugabe von antimikrobiellen Agentien wie auch Zell-Zell-Interaktionen in Echtzeit beobachtet werden.¹⁸² Die Arbeitsgruppe um Mei untersuchte etwa die Kraft, mit der Bakterien an unterschiedlich rauen Oberflächen haften.¹⁸³

Mit der Epifluoreszenzmikroskopie werden Bakterien mittels eines Fluoreszenzfarbstoffs angefärbt auf den die Emission und Anregung des Lichts abgestimmt wird. Mit dieser Methode können die Absorptions- und Desorptionsvorgänge sowie das Wachstum der Mikroorganismen in Echtzeit beurteilt werden. Außerdem kann die Anzahl der Bakterien, das Biovolumen der Plaque und die bedeckte Oberfläche der Prüfkörper beurteilt werden.¹⁸⁴ Jedoch können nur glatte und opaque Prüfkörper wie etwa Keramiken, Metalle und einige Kunststoffe im Epifluoreszenzmikroskop ausgewertet werden und das Fluoreszenzsignal erlischt bereits nach 10 Sekunden, womit eine computergestützte Analyse nötig ist.¹⁸⁵

Der Nachteil aller Elektronenmikroskopmethoden ist, dass die Quantifizierung der Bakterien mitunter schwierig ist und häufig aufwändige Fixierungsmethoden nötig sind, um die Bakterien auf den Trägern mikroskopieren zu können.¹⁸⁶ Die mikroskopierten Bakterien können entweder manuell oder computergestützt ausgezählt werden.

Eine weitere Möglichkeit, Bakterien zu quantifizieren, stellt die Szintillationsmethode dar. Diese beruht darauf, die Mikroorganismen mittels einer Tritium bzw. ^{35}S -Methionin enthaltenden Nährlösung radioaktiv zu markieren. Anschließend können die Mikroorganismen mittels eines Szintillationsgeräts quantitativ erfasst werden.¹⁸⁷ Nach der Inkubation mit den radioaktiv-markierten Bakterien werden die adhärenten Bakterien per Szintillationszähler in radioaktiven Teilen pro Minute gemessen.¹⁸⁸ Die Methode ist zeit- und arbeitsintensiv, jedoch ist vor allem das Anfallen radioaktiven Abfalls als nachteilig zu bewerten.

¹⁸⁰Dufrene, 2008.

¹⁸¹Dufrene, 2008.

¹⁸²Dufrene, 2008.

¹⁸³Mei et al., 2011.

¹⁸⁴An et al., 1997.

¹⁸⁵An et al., 1995.

¹⁸⁶Hannig et al., 2010.

¹⁸⁷Clark, 1978; Carlen et al., 2001; Ahn et al., 2002; Ahn et al., 2005.

¹⁸⁸Steinberg et al., 2002.

Eine Methode, die vor allem bei der Erforschung dentaler Plaque zur Anwendung kommt, ist die Bakteriengewichtsbestimmung. Prinzipiell kann sowohl das Nassgewicht als auch das Trockengewicht der Plaque bestimmt werden, jedoch ist die Korrelation zwischen Proteingehalt der Plaque und dem Nassgewicht genauer.¹⁸⁹ Die Arbeitsgruppe um Sissons löste für die Nassgewichtbestimmung die Plaque von den Proben ab, füllte diese in Polypropylencaps und bestimmte innerhalb der folgenden fünf Minuten das Gewicht der gebildeten Plaque bis auf 0,1 mg genau.¹⁹⁰ Der Nachteil dieser Methode ist, dass die initiale Adhäsion von Mikroorganismen nicht nachvollzogen werden kann, da Mindestmengen von 1 mg erforderlich sind.¹⁹¹

Das Anfärben von Mikroorganismen stellt eine weitere weitverbreitete Quantifizierungsmethode dar. Das direkte Anfärben von Bakterien ist z.B. mit 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) möglich, das an Adenin-Thymin-reiche Regionen der Doppelstrang-DNA vitaler und toter Zellen bindet.¹⁹² Der Nachteil dieser Methode ist, dass keine Unterscheidung verschiedener Bakterienarten möglich ist. Mittels einer anderen Methode, der FISH (fluorescence *in situ* hybridization), können verschiedene Bakterienarten unterschieden werden.¹⁹³ Diese Technik basiert auf Oligonukleotidsonden, die mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert sind und an die bakterielle rRNA spezifisch binden. Voraussetzung bei dieser Methode ist eine große Anzahl an intakten Ribosomen, da diese mit der Anzahl der lebenden Zellen korrelieren; diese Methode erfasst somit nur lebende Zellen.¹⁹⁴ FISH hat vor allem in Verbindung mit der konfokalen Laserrastermikroskopie, einer besonderen Form der Epifluoreszenzmikroskopie, seine Verwendung in der Visualisierung von initialen und gereiften Biofilmen *in situ* gefunden. Sowohl die konfokale Laserrastermikroskopie als auch die TEM ermöglichen es, sehr dünne Schichten des Biofilms zu betrachten und computergestützt zu einem dreidimensionalen Bild zusammenzufügen. Somit ist die Analyse der räumlichen Struktur von Biofilmen möglich. Während es bei der konfokalen Laserrastermikroskopie keiner Fixierung oder Einbettung der Proben bedarf ist dies für die TEM nötig.¹⁹⁵ Hierzu werden die Proben nach der Inkubation mit Glutaraldehyd und Osmiumtetroxid fixiert und in ca. 50 nm dicke Schichten geschnitten.¹⁹⁶ Nachteilig an der

¹⁸⁹Sissons et al., 1995.

¹⁹⁰Sissons et al., 1995.

¹⁹¹Sissons et al., 1995.

¹⁹²Schwartz et al., 2003.

¹⁹³Paster et al., 1998; Amann et al., 1990.

¹⁹⁴Amann et al., 1990; Amann et al., 1995; Hannig et al., 2007b.

¹⁹⁵Christensen et al., 2000; Marsh et al., 2003.

¹⁹⁶Al-Ahmad et al., 2009a und b.

FISH-Methode ist, dass sie mit einem hohen Zeitaufwand verbunden ist und kein „high through output screening“ möglich ist.

In den letzten Jahren wurden verschiedene Methoden zur Quantifizierung von Mikroorganismen in Mikrotiterplatten beschrieben. Diese können grob in Biofilm-Biomassen-Untersuchungen, bei der die Matrix und tote und lebendige Zellen quantifiziert werden (z.B. *Crystal Violet* und *Syto9*), Viabilitätsuntersuchungen, bei denen lebendige Zellen quantifiziert werden (z.B. 2,3-bis(2methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-((phenylamino)carbonyl)-2H-tetrazolium Hydroxid (XTT), Resazurin und Fluorescein Diacetat (FDA)) und Matrix-Quantifizierungs-Untersuchungen, bei denen die verschiedenen Matrixkomponenten untersucht werden (z.B., 1,9-dimethyl-methylen Blau (DMMB)), unterteilt werden.¹⁹⁷ DMMB bildet ein unlösliches, komplexes Produkt mit den sulphatierten Polysacchariden in der Biofilmmatrix. Anschließend wird eine Lösung zugegeben, die den Komplex wieder auflöst; dabei wird Farbstoff freigesetzt, der wiederum spektrophotometrisch gemessen wird und proportional zu der Menge an sulphatierten Polysacchariden in der Matrix ist.¹⁹⁸

Die Arbeitsgruppe um Peeters untersuchte die Eignung verschiedener fluoreszierender Farbstoffe für die Quantifizierung von Bakterien.¹⁹⁹ Für die Biomassenbestimmung wählten sie *Crystal Violet* und *Syto 9*. *Crystal Violet* ist ein basischer Farbstoff, der an negativ geladene Oberflächenmoleküle und Polysaccharide in der extrazellulären Matrix bindet.²⁰⁰ Bei dieser Methode werden sowohl lebende als auch tote Zellen und die Matrix erfasst. *Syto 9* ist ein Färbemittel, das die Nukleinsäuren anfärbt.²⁰¹ Es diffundiert passiv durch die Membran und bindet an die DNA lebender und toter Zellen.²⁰² Da DNA auch in der Matrix vorkommt, wird mit dieser Methode die gesamte Biofilmmasse untersucht.²⁰³ Andere Fluoreszenzfarbstoffe erfassen nur die Viabilität der Zellen und nicht die gesamte Biomasse eines Biofilms. Problematisch an diesen Viabilitätsuntersuchungen ist generell, dass in der Literatur verschiedene Stadien der Viabilität beschrieben werden und die Differenzierung dieser Stadien eine der größten Herausforderungen in der modernen Mikrobiologie darstellt.²⁰⁴ Anhand der Tatsache, dass ca. 50 % der oralen Bakterien lebendig sind, sich aber nicht kultivieren lassen, wird die Notwendigkeit verlässlicher Viabilitätsuntersuchungen

¹⁹⁷Peeters et al., 2008.

¹⁹⁸Barbosa et al., 2003.

¹⁹⁹Stephanovic et al., 2000.

²⁰⁰Li et al., 2003a.

²⁰¹Boulos et al., 1999.

²⁰²Boulos et al., 1999.

²⁰³Whitechurch et al., 2002.

²⁰⁴Decker, 2001.

deutlich.²⁰⁵ Die verschiedenen fluoreszierenden Farbstoffe bedienen sich unterschiedlicher Mechanismen um die Bakterien anzufärben.²⁰⁶ Viele basieren auf die Aufnahme des Farbstoffes in die Membran der entsprechenden Bakterien, andere basieren auf der Umwandlung des Fluoresceins durch intrazelluläre Esterasen. Die Voraussetzung dieser Fluoreszenzfarbstoffe ist, dass das Fluorescein sich frei in den Zellen ausbreitet und auch nach der Teilung in ihnen verbleibt.²⁰⁷

Die Arbeitsgruppe um Peeters untersuchte auch drei repräsentative Farbstoffe (XTT, FDA und die Resazurin-Reduktionsmethode) für die Lebend/Totuntersuchung eines Biofilms. XTT beruht auf der Reduktion des Farbstoffes zu einem wasserlöslichen Formazan, das proportional zur Anzahl der metabolisch aktiven Zellen ist.²⁰⁸ Diese Methode ist teuer und zeitaufwändig und zeigte keine wesentlichen Vorteile gegenüber FDA und Resazurin.²⁰⁹ Ein, dem XTT ähnlicher Fluoreszenzfarbstoff, ist das MTT. Die MTT-Reaktionslösung setzt sich aus einer Lösung von 1 ml MTT, das aus 5 mg Thiazolyl Blau Tetrazolium Bromid pro ml PBS besteht, PMS, das aus 0,3 mg Phenazinmethosulfat pro ml PBS besteht und 8 ml PBS zusammen. In einer Studie von Hahnel et al. wurde die MTT-Reaktionslösung mit der konventionellen Resazurin-Reduktionsmethode verglichen. Anstatt mit 15 µl/ml PBS Resazurin wurde die Bakterienlösung mit 200 µl/ml PBS MTT-Reaktionslösung inkubiert und nach vier und vierundzwanzig Stunden Inkubationszeit wurden die relativen Fluoreszenzintensitäten gemessen. Diese Versuche wurden mit *S. sobrinus* und *S. mutans* durchgeführt. Während die konventionelle Resazurin-Reduktionsmethode keine Unterschiede in der Höhe der relativen Fluoreszenzintensitäten zwischen der Inkubationszeit von vier und vierundzwanzig Stunden festgestellt werden konnten, wurden bei der MTT-Reaktionslösung höhere relative Fluoreszenzintensitäten nach vierundzwanzig Stunden erzielt.²¹⁰

FDA ist ein weiterer fluoreszenter Farbstoff, der genaue und reproduzierbare Ergebnisse liefert. Dabei wird das farblose FDA von nichtspezifischen intra- und extrazellulären Esterasen in ein fluoreszierendes, gelbes Produkt umgewandelt.²¹¹ Die Resazurin-Reduktionsmethode ist eine einfache und dennoch genaue Methode zur Quantifizierung von Bakterien. Das nicht fluoreszierende, blaue Resazurin (7-Hydroxy-3H-phenoxazin-3-on-10-oxid) wird von bakteriellen Enzymen zu dem fluoreszierenden, pinkfarbenen Resorufin

²⁰⁵Aas et al., 2005.

²⁰⁶Hannig et al., 2010.

²⁰⁷Hannig et al., 2010.

²⁰⁸Roehm et al., 1991.

²⁰⁹Peeters et al., 2008.

²¹⁰Brambilla et al., 2009; Hahnel et al., 2011.

²¹¹Adam et al., 2001; Taylor et al., 2001.

oxidiert.²¹² Der Farbstoff kann vielfältig angewendet werden, z.B. zum Nachweis von *Staphylokokkus aureus*,²¹³ Vancomycin-resistenten *Enterokokken*²¹⁴ und Gram-negativen Bakterien.²¹⁵

Die Auswertung der Methoden A und B erfolgt, indem 10 Prozent des kommerziell erhältlichen Farbstoffes mit 90 % destilliertem Wasser vermischt wird und zum Zellmedium dazugegeben wird. Anschließend werden die Bakterien entweder mit dem Fluorometer oder der Überstand der Bakterienlösung mit einem Photometer quantifiziert. Jedoch liefert die Auswertung mit dem Fluorometer genauere Werte.²¹⁶ Dabei genügen schon 80 Zellen, um ein ausreichend starkes fluoreszierendes Signal zu erhalten.²¹⁷ Im Vergleich zu anderen Färbemethoden wie etwa bei radioaktiver Nachweismethoden fällt kein Abfall an und die Zellen können für weitere Untersuchungen verwendet werden.²¹⁸

1.5 *Streptococcus mutans*

Streptococcus mutans (*S. mutans*) ist ein Gram-positives, fakultativ anaerobes Bakterium aus der Gruppe der Streptokokken.²¹⁹ In der Regel tritt es paarweise oder in kurzen Ketten auf.²²⁰ Der Keim gehört nicht zur normalen Bakterienflora der Mundhöhle, sondern wird wie andere pathogene Keime durch Speichel von Mensch zu Mensch (insbesondere von der Mutter zum Kind) übertragen.²²¹

Die Mutansgruppe, zu der *Streptococcus mutans*, *Streptococcus cricetus* und *Streptococcus sobrinus* zählen,²²² gilt neben *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus mitis* und einigen Actinomycesspezien²²³ und *Lactobacillen*²²⁴ als wichtigster Verursacher der Karies.²²⁵

²¹²Zalata et al., 1998.

²¹³Novak et al., 1993.

²¹⁴Tenover et al., 1995.

²¹⁵Collins et al., 1997.

²¹⁶O'Brien et al., 2000.

²¹⁷O'Brien et al., 2000.

²¹⁸O'Brien et al., 2000.

²¹⁹Hof et al., 2009.

²²⁰Vgl. Abb. 4 S.30; Sanderink et al., 2004.

²²¹Klimek, 1999; Sanderink et al., 2004.

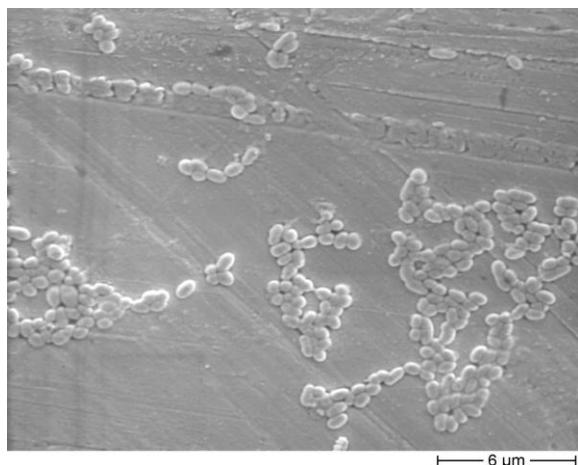
²²²Marsh et al., 2003.

²²³Bowden, 1990; Hof et al., 2009.

²²⁴Ellen 1985; Van Houte, 1994.

²²⁵Marsh et al., 2003.

Abbildung 4: *Streptococcus mutans* auf einem Prüfkörper aus PMMA im Rasterelektronenmikroskop bei 3800-facher Vergrößerung.



Die hohe Kariogenität des *S. mutans* wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst. Dazu zählen:

1. Die Fähigkeit, aus niedermolekularen Zuckern mit Hilfe von Glycosyltransferasen langkettige Polysaccharide aufzubauen (Mutane und Glucane), die es *S. mutans* ermöglichen, fester an das Zahnoberhäutchen zu binden als andere konkurrierende Mundhöhlenkeime.²²⁶ Mutane stellen innerhalb der Plaque den Hauptbestandteil der volumen- und strukturbildenden Matrix dar und können durch Dextrinasen, andere Bakterien oder Enzyme der Mundflüssigkeit nicht abgebaut werden;²²⁷ die Aktivität der Glycosyltransferasen kann daher als Messlatte für die Virulenz des Erregers herangezogen werden.²²⁸
2. *S. mutans* fermentiert Kohlenhydrate schneller als andere Keime zu Milchsäure (Laktat). Die Milchsäuren führen zum Abfall des pH-Werts in der Plaque; ein niedriger pH-Wert trägt wiederum zur Demineralisation der Zahnhartsubstanz bei.²²⁹
3. *S. mutans* toleriert Säuremengen, die zum Wachstumsstillstand anderer Bakterien führen würden. Es verfügt über hocheffiziente Membrantransportsysteme, die ihm die Zellteilung auch noch bei pH-Werten unter vier ermöglichen.²³⁰
4. Die Fähigkeit, ein großes Spektrum an Zuckern sowie geringfügig auch Mannitol und Sorbitol fermentieren zu können, verschafft ihm einen Vorteil gegenüber anderen Keimen.²³¹
5. Die Eigenschaft, dass einige Stämme der *S. mutans*-Gruppe in der Lage sind, Proteasen zu bilden, die im Speichel enthaltene IgA-Antikörper deaktivieren und damit die

²²⁶Minahi 1977; Hamada 1984; Hof et al., 2009.

²²⁷Sanderink et al., 2004.

²²⁸Schilling et al., 1992.

²²⁹Stephan, 1947; Hamada, 1984; Sanderink et al., 2004; Schwab et al., 2006.

²³⁰Harper et al., 1983.

²³¹Sanderink et al., 2004.

Immunabwehr des Wirts abschwächen können.²³²

6. Einige Serotypen sind zudem in der Lage, intrazelluläre Polysaccharide als Reserve-Kohlenhydrate zu bilden, mit deren Hilfe sie auch in Zeiten geringer Substratzufuhr ihre Azidogenität beibehalten können.²³³

2. Werkstoffkundliche Grundlagen

2.1 Kunststoffe

2.1.1 Komposite

Komposite werden nach C.P. Ernst nach drei Kriterien eingeteilt: der Konsistenz, den enthaltenen Füllern und der Matrixkomponente. Bei der Konsistenz werden geschmeidige, stopfbare und hochfeste Komposite sowie sogenannte „Flowables“ unterschieden. Die Füller werden in Mikro-, Nano-, Hybrid- und nanooptimierte Hybridfüller eingeteilt. Nach der Matrixkomponente unterscheidet man zudem Bis-GMA-basierte Komposite, Omocere, Kompomere, Komposite mit speziell langketigen Monomeren, Komposite mit verzögerter Schrumpfkraft, Komposite mit schrumpfkraft-reduzierenden Monomeren und Komposite mit reduziertem E-Modul trotz hohem Füllergehalt.²³⁴

In den 1940er Jahren wurde eine besondere Form von Kompositen vorgestellt,²³⁵ die zahnfarbene Verblendung von Brücken- und Kronenkonstruktionen sowie herausnehmbare Versorgung wie Teleskoparbeiten etc. ermöglicht. Moderne Verblendkunststoffe sind lichthärtende Materialien. Sie enthalten Dimethacrylat-Monomere, verschiedene anorganische und organische Füllstoffe, Pigmente und den Photoinitiator Campherchinon. Die Aushärtung erfolgt bei einer Wellenlänge zwischen 350 nm und 500 nm für ca. 5-25 Minuten in speziellen Polymerisationsgeräten entweder unter Atmosphärendruck oder Vakuum. Das Aushärten unter Vakuum hat den Vorteil, dass der inhibierende Einfluss des Luftsauerstoffes umgangen wird.²³⁶

2.1.2 Prothesenkunststoffe

Im Jahr 1936 wurde Polymethylmethacrylat (PMMA) mit dem sog. *Paladon-Verfahren* als Prothesenkunststoff in die Zahnheilkunde eingeführt und ist bis heute der am häufigsten

²³²Sanderink et al., 2004.

²³³Minahi et al., 1977.

²³⁴Ernst, 2010.

²³⁵Janda, 1996.

²³⁶Janda, 2000; Eichner et al., 2005.

verwendete Prothesenkunststoff. Bei den in der Zahnheilkunde eingesetzten Polymethylmethacrylaten handelt es sich immer um ein Zweikomponentenmaterial, das aus einem Pulver und einem Monomer besteht.²³⁷

Das Monomer besteht aus ca. 90 % Methacrylat, 8 % Vernetzern und 2 % Additiven. Das Pulver enthält ca. 99 % Polymethylmethacrylat-Perlpolymer, deren mittlere Perlgröße ungefähr 30 µm beträgt. Das PMMA ist meistens mit Komonomeren kopolymerisiert, außerdem enthält das Pulver Pigmente zur Einfärbung.²³⁸

Bei kalthärtenden Materialien enthält sowohl das Pulver als auch die Flüssigkeit einen Initiatorbestandteil. Moderne kalthärtende Materialien enthalten in der Flüssigkeit Spuren von Kupferionen und im Pulver Barbitursäure-Verbindungen als Initiatorbestandteil.²³⁹

2.1.3 Kunststoff für Tiefziehschienen

Seit 1956 gibt es in der Zahnmedizin die Möglichkeit, Kunststoffe tiefzuziehen.²⁴⁰ Zu diesen thermoplastischen Tiefziehfolienkunststoffen gehören Polystyrol, Polycarbonat, PMMA und weiche Kunststoffe wie Poly(vinylacetat)-Polyethylen.²⁴¹ Sie sind in Platten- oder Folienform erhältlich.

Die Platten oder Folien werden in Tiefziehgeräten mit geeigneten Wärmequellen (z.B. Infrarot-Strahlern) erwärmt und an einer formgebenden Unterlage in etwa gleichbleibender Schicht adaptiert.²⁴² In der Zahnmedizin finden derartige Kunststoffe insbesondere zur Herstellung von Schienen, Implantatbohrsablonen und als Verbandplatten Anwendung.

2.2 Zahnschmelz

Zahnschmelz besteht zu 95 Gewichtsprozent (Gew%) aus einem Gefüge von Apatitkristallen, die weiteren 5 Gew% stellen Wasser und organische Matrix dar.²⁴³ Die kleinen Mengen an organischen Bestandteilen liegen zum größten Teil im inneren Drittel des Zahnschmelzmantels in Form von Zahnschmelzbüscheln und bestehen aus Proteinen, Lipiden und Spuren von Kohlenhydraten, Citrat und Lactat.²⁴⁴ Wasser kommt im Zahnschmelz entweder an die organischen Anteile gebunden oder kristallin als Hydratationsschale vor. Die Apatitkristalle sind in ihrem Querschnitt annähernd hexagonal. Etwa 100 der

²³⁷Eichner et al., 2005; Craig et al., 2006; McCabe et al., 2008.

²³⁸Eichner et al., 2005.

²³⁹Eichner et al., 2005.

²⁴⁰Eichner et al., 2005.

²⁴¹Eichner et al., 2005; Craig et al., 2006.

²⁴²Eichner et al., 2005; Craig et al., 2006.

²⁴³Lüllmann-Rauch, 2006.

²⁴⁴Hellwig et al., 2009.

Zahnschmelzkristalle liegen im Querschnitt zusammengefügt und bilden Zahnschmelzprismen. Diese verlaufen in horizontaler und vertikaler Richtung wellenförmig von der Zahnschmelz-Dentin-Grenze fast bis zur Zahnschmelzoberfläche.²⁴⁵ Im Zahnschmelzlängsschnitt lassen sich weiterhin Vertiefungen erkennen, die Perikymatien. Sie sind bei jugendlichen Zähnen ausgeprägter als bei älteren Individuen und können Schlupfwinkel für Mikroorganismen darstellen.²⁴⁶

²⁴⁵Hellwig et al., 2009.

²⁴⁶Hellwig et al., 2009.

III. Material und Methoden

1. Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit ist es, die Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffes *Cytox Violet®* zur Quantifizierung der Adhäsion von Gram-negativen Streptokokken auf zahnärztlichen Werkstoffen zu untersuchen. Die Arbeit gliedert sich in drei Teile. Im ersten Teil sollen verschiedene Konzentrationen der Fluoreszenzfarbstoffe Resazurin und *Cytox Violet®* in einem semistatischen System auf ausreichend starke relative Fluoreszenzintensitäten untersucht werden, damit die Bakterienquantifizierung reproduzierbar dargestellt werden kann. Es sollten die Farbstoffkonzentrationen ermittelt werden, bei denen die letzte Steigerung des Fluoreszenzsignals auftrat. Im zweiten Teil sollte die im ersten Teil bestimmte Konzentration des jeweiligen Farbstoffes hinsichtlich ihrer Eignung zur Bestimmung der Adhäsion von *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) an den Prüfkörpern analysiert werden. Dabei wurde wiederum in einem semistatischen System die Adhäsion von *S. mutans* an die bloßen Materialien sowie an die mit einem Pellikel bedeckten Materialien untersucht. Im dritten Teil der Untersuchungen sollten die Farbstoffe Resazurin und *Cytox Violet®* hinsichtlich ihrer Eignung zur Quantifizierung von *S. mutans* an verschiedenen zahnärztlichen Werkstoffen in einem dynamischen Fließkammersystem untersucht werden.

2. Materialauswahl

Bei der Auswahl der Materialien wurde Wert darauf gelegt, dass die Materialien Unterschiede in der Adhäsion von Mikroorganismen erwarten ließen.

Tabelle 8 gibt einen Überblick über die verschiedenen in den Vor- und Hauptversuchen verwendeten Materialien.

Tabelle 8: Angaben zu den Materialien

	Handelsname	Materialklasse/ Beschreibung	Hersteller	Cargennummer(n)	Farbe
1	<i>Palapress vario</i>	Gießbarer, kaltpolymerisierender Prothesenkunststoff	<i>Heraeus Kulzer</i> , Hanau, D	Pulver: LOT 011014 Monomer: LOT 010426	rosa
2	Polyethylen	Vorpolymerisierte Polyethylenfolien zur Herstellung von Tiefziehschienen	<i>Erkodent</i> , Pfalzgrafenweiler, D	X	farblos
3	<i>Sinfony</i>	Lichthärtendes Komposite zur Herstellung von Kronen, Brücken Inlays und Onlays	<i>3 M Espe</i> , Seefeld, D	LOT 324565	D A1
4	Glas	Deckgläser	<i>Marienfeld</i> , D	X	X
5	X	Rinderzahnschmelz	X	X	X

2.1 Herstellung der Prüfkörper

2.1.1 Polyethylen

Die Polyethylen-Prüfkörper wurden aus vorgefertigten Polyethylenplatten (*Erkodent*, Erich Kopp GmbH, Pfalzgrafenweiler, D) mit Hilfe eines runden Stanzers mit einem Durchmesser von 10 mm gewonnen. Die Prüfkörper wurden nicht nachbearbeitet, da ein Beschleifen der Prüfkörper aufgrund des weichen Materials nicht möglich war.

2.1.2 *Palapress vario*

Die Prüfkörper wurden aus einer konfektionierten Metallform mit 10 mm Durchmesser gewonnen. Die Metallform wurde auf eine Acetatfolie gelegt, die wiederum um die Ebenmäßigkeit der Oberfläche der Prüfkörper zu garantieren auf eine Glasplatte gelegt wurde. Zur Herstellung der Prüfkörper wurden 5 g des Pulvers (LOT 011014) und 3 ml Flüssigkeit (LOT 010426) gemischt. Der angeteigte Kunststoff wurde anschließend bis auf das Niveau des oberen Randes der Metallvorlagen eingebracht, um eine möglichst einheitliche Dicke der Prüfkörper zu gewährleisten. Im Anschluss wurden die Prüfkörper für 15 Minuten bei 50°C im Drucktopf (Futuramat, Schütz Dental Group, Rosabach, D) polymerisiert.

2.1.3 Glas

Vorgefertigte Deckgläser (Deckgläser *Marienfeld*, Lauda-Königshofen, D) mit einem Durchmesser von 10 mm wurden als Referenzprüfkörper verwendet.

2.1.4 *Sinfony*

Die Prüfkörper wurden mit Hilfe von Metallvorlagen, die auf eine mit Acetatfolie bedeckte Glasplatte gelegt wurden, hergestellt. Das Material wurde wiederum bis auf das Niveau des oberen Randes der Metallvorlage eingebracht und im UV-Lichtpolymerisationsgerät (Unilux AC, Kulzer, Hanau, D) zweimal für je 30 sec polymerisiert. Im Anschluss wurden die Prüfkörper aus der Form gelöst und für 15 Minuten im UV-Lichtpolymerisationsgerät mit Vakuum (ESPE Visio Beta, 3M ESPE, Seefeld, D) endpolymerisiert.

2.1.5 Zahnschmelz

Die Prüfkörper aus Zahnschmelz wurden aus den vestibulären Flächen von extrahierten Rinderzähnen angefertigt. Die Zähne wurden mit einer Trennscheibe in ca. 2 mm dicke Scheiben geschnitten und mit einer Fräse rund geschliffen, bis sie einen Durchmesser von ca. 10 mm aufwiesen. Die Zähne wurden bis zur Verwendung in Chlor-Amin gelagert, damit sie nicht spröde wurden.

2.2 Nachbearbeitung

Die Prüfkörper aus *Palapress vario*, *Sinfony* und Zahnschmelz wurden durch Entgratung der Ränder mit konventionellen zahntechnischen Fräsen nachbearbeitet und anschließend mit Schleifpapier (Siliziumkarbid) der Körnung 4000 (Buehler GmbH, Düsseldorf, D) mittels eines Schleifgeräts (Buehler Metaserv, Coventry, GB) unter Wasserkühlung poliert. Die Politur, wie sie auch *in situ* durch den Zahnarzt erfolgt, ist insbesondere bei Kunststoffen von Bedeutung, da durch eine Politur der Oberfläche die Füllkörper stärker freigelegt werden als bei der Polymerisation gegen eine Kunststofffolie.

2.3 Kontrolle der Oberflächenrauigkeit

Insgesamt wurden 696 Prüfkörper hergestellt. Bei den Prüfkörpern aus *Palapress vario*, *Sinfony* und Polyethylen wurden 30 % der Prüfkörper zufällig ausgewählt und ihre Oberflächenrauigkeit (R_a) stichprobenartig überprüft. Dieses Vorgehen diente dazu, eine optimale Politur der Prüfkörper zu gewährleisten und potentiellen Verfälschungen der Versuchsergebnisse aufgrund von schlechter Politur vorzubeugen. Bei den Prüfkörpern wurde an drei Stellen (zwei marginal, eine zentral) die Oberflächenrauigkeit R_a mit einem profilometrischen Rauigkeitsmessgerät (Tastschlittenprinzip; Perthometer S6P, Feinprüf-Perthen, Göttingen, D) gemessen. Rauigkeiten bis 0,2 μm scheinen keinen Einfluss auf die

Bakterienadhäsion zu besitzen.²⁴⁷ Um sicher unter diesem Grenzwert zu bleiben, wurde eine Rauigkeit bis 0,08 µm als tolerabel erachtet.²⁴⁸ Prüfkörper, die höhere Werte für die Oberflächenrauigkeit aufwiesen, wurden entweder nachbearbeitet oder verworfen. Die Prüfkörper aus Glas und Zahnschmelz wurden aufgrund der Tatsache, dass sie nicht polierbar sind nicht auf ihre Oberflächenrauigkeit untersucht.

2.4 Lagerung der Prüfkörper

Alle Prüfkörper mit Ausnahme der Prüfkörper aus Zahnschmelz wurden bis zur Verwendung dunkel und trocken gelagert. Die Prüfkörper aus Zahnschmelz wurden bis zu ihrer Verwendung in Chlor-Amin gelagert. Sieben Tage vor Versuchsbeginn wurden alle Prüfkörper bis auf die Prüfkörper aus Glas in Alkohol desinfiziert und in destilliertem Wasser (Aqua dest.) im Kühlschrank bei 6°C dunkel gelagert. Die Prüfkörper aus Glas wurden hingegen erst kurz vor dem Versuchsbeginn desinfiziert.

3. Mikroorganismen

Für alle Versuche wurde der Bakterienstamm *Streptococcus mutans* (NCTC 10449; DSMZ 20523) verwendet, der von der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland) bezogen wurde. 25 µl Bakterienkultur wurden in 25 ml DSMZ Medium 92, bestehend aus 30 g tryptischer Soja-Nährboullion (Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, USA) und 3 g Hefeextrakt (Sigma, St. Louis, USA), die in 1000 ml Aqua dest. mit einem pH von 7,0-7,2 gelöst wurden, für 20 h bei 37°C angezüchtet. Diese Kultur wurde wöchentlich wiederum in 25 ml Medium pro 25 µl Bakterienkultur überimpft und im Anschluss für 20 h bei 37°C inkubiert. An den Tagen vor den Versuchen wurden die Bakterien entsprechend obiger Beschreibung gezüchtet. Für die Versuche wurde die Vorkultur verwendet und das Zellpellet nach einer Inkubationszeit von 20 h bei 18°C für 5 Minuten bei 2300 U/min abzentrifugiert. Die Bakterien wurden zweimal mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) gewaschen und schließlich in PBS resuspendiert. Zur Normierung der Bakteriendichte der Versuchskultur wurde mittels Photometer zunächst der Nullwert mit blankem PBS bestimmt und anschließend die optische Dichte der Versuchskultur auf einen Wert von 0,3 eingestellt. Der PBS-Puffer wurde aus 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,425 g Na₂HPO₄ und 0,2 g KH₂PO₄, die in einem Liter Aqua dest. gelöst wurden, hergestellt; die Pufferlösung wurde vor der Verwendung autoklaviert.

²⁴⁷Bollen et al., 1997.

²⁴⁸Hahnel et al., 2008.

4. Speichel und Speichelersatzlösung

Für die Vorversuche wurde zur Simulation der Bildung des Speichelzellkerns natürlicher Speichel verwendet. Dieser wurde von einer gesunden weiblichen Person (22 Jahre alt) durch Expektoration jeweils um die gleiche Tageszeit gesammelt; der Speichelfluss wurde dabei lediglich durch Muskelbewegungen angeregt. Der gesammelte Speichel wurde mit Hilfe von Einmalfiltrationsgeräten sterilfiltriert (Vacuflo PV 050/3; Porengröße 0,45 µm; Schleicher & Schüller GmbH, Dassel, D) und bis zur Verwendung in Tubes tiefgefroren (-20°C) gelagert. Für die Hauptversuche wurde aufgrund des größeren Bedarfs an Speichel eine Speichelersatzlösung verwendet. Nähere Angaben zur Zusammensetzung der Speichelersatzlösung finden sich in Tabelle 9.

Tabelle 9: Zusammensetzung der Speichelersatzlösung

verwendete Proteine	Konzentration	Hersteller
Albumin	40 µg/ ml PBS	Albumin aus Rinderserum, Sigma-Aldrich, Steinheim am Albuch, D
α-Amylase	1 mg/ml PBS	α-Amylase aus Schweinepankreas, Fluka Biochemika, Buchs, CH
Lysozym	10 µg/ml PBS	Lysozym von Hühnereiweiß, Fluka Biochemika, Buchs, CH
Muzin	850 mg/l PBS	Muzin aus Schweinemagen Type III, Sigma-Aldrich, Steinheim am Albuch, D

Die Auswahl der Zusammensetzung der Speichelersatzlösung orientierte sich an der von Hahnel entwickelten und getesteten Speichelersatzlösung.²⁴⁹

Auch die Speichelersatzlösung wurde analog zum natürlichen Speichel mittels Einmalfiltrationsgeräten filtriert und tiefgefroren gelagert (-20°C).

5. Versuchsaufbau

5.1 Vorversuche

Zur Quantifizierung der adhärenten Mikroorganismen wurden in den Vorversuchen drei verschiedene Methoden angewandt. Methode A war die konventionelle etablierte Resazurin-Reduktionsmethode;²⁵⁰ bei Methode B wurde eine abgewandelte Resazurin-Reduktionsmethode verwendet, bei der der Farbstoff erst nachträglich zugegeben wurde. Methode C basierte auf der Verwendung eines anderen Farbstoffes (*Cytox Violet®*).

²⁴⁹Hahnel, 2007.

²⁵⁰Hahnel et al., 2008; Bürgers et al., 2009.

Unabhängig von der Methode wurden die vorbereiteten Prüfkörper aus Polyethylen und *Palapress vario* sieben Tage vor dem Versuch mit 70%igem Ethanol desinfiziert und anschließend mit demineralisiertem Wasser (V.E.-Wasser) gewaschen. Im Anschluss wurden die Prüfkörper in 24er Wellplatten (Sarstedt, Inc.; Newton, NC 28658; USA) gelegt, und in jedes Well 1 ml Aqua dest. pipettiert. Die Prüfkörper wurden nun für eine Woche im Kühlschrank bei 6°C gelagert; dies diente zur Standardisierung der Versuchsbedingungen und Auswaschung von Restmonomeren.

Am Versuchstag wurden die Prüfkörper aus Polyethylen und *Palapress vario* aus der Wasserlagerung entnommen und in konfektionierte 48er Well-Platten (48 Well Cell Culture Cluster, Corning Inc., Corning, NY 14831, USA) mit dem Dubliersilikon Deguform (DeguDent GmbH, Hanau, D) eingeklebt. Die Prüfkörper aus Glas wurden am Tag vor dem Versuch ebenfalls mit 70%igem Ethanol gereinigt und mit V.E.-Wasser abgewaschen. Im Gegensatz zu den anderen Prüfkörpern wurden diese aber nicht eingeklebt, sondern in die 48er Well-Platte gelegt.²⁵¹

In dem Versuch nach Methode A gab es je verwendeter Konzentration 9 Meßproben, deren relative Fluoreszenzsignale später in die Versuchsauswertung einflossen und fünf Kontrollen.²⁵² Die Kontrollen setzten sich aus drei Farbstoffkontrollen und einer Bakterienkontrolle, um sowohl die Einflüsse des Farbstoffs Resazurin als auch der Bakterienlösung auf die relativen Fluoreszenzintensitäten auszuschalten, zusammen. Für eine zusätzliche Überprüfung der Ergebnisse wurde zudem ein Leerwert eingeführt. In diesem Well wurde der Prüfkörper lediglich mit PBS-Pufferlösung über die gesamte Versuchzeit bei 37°C inkubiert.

Bei der Auswertung wurde das arithmetische Mittel dieser relativen Fluoreszenzintensitäten von den Werten der Messproben abgezogen.

Die Meßproben und die drei Farbkontrollen wurden mit Resazurin in den Konzentrationen 7,5 µl, 15 µl und 30 µl zusammen mit der Bakterienlösung in Well-Platte im Thermoschüttelgerät (OrbitalShaker, Thermo Forma) für zweieinhalb Stunden bei 37°C inkubiert. Für die Resazurinfarbstofflösung wurde 0,007536 g Resazurin (Resazurin, Sodium Salt, Fa. Sigma, Steinheim am Albuch, D) in 10 ml Aqua dest. gelöst und bis zur Verwendung dunkel im Kühlschrank gelagert. Tabelle 10 liefert eine Übersicht über das Pipettierschema.

²⁵¹Vgl.: Abb. 5 S. 42.

²⁵²Vgl.: Tabelle 10 S. 40.

Tabelle 10: Pipettierschema der Methode A:

	Bakterienlösung	Farbstoff	PBS
Messprobe (n=9)	1 ml	7,5 µl, 15 µl, 30 µl	X
Farbstoffkontrolle (n=3)	X	7,5 µl, 15 µl, 30 µl	1 ml
Bakterienkontrolle (n=1)	1 ml	X	X
Leerwert (n=1)	X	X	1 ml

Die Resazurin-Reduktionsmethode dient in dieser Arbeit zur Quantifizierung der Bakterien, die sich an die Prüfkörper angelagert haben.

Nach der Inkubationszeit wurde die Bakterienlösung bzw. der PBS-Puffer abgesaugt und die Wells zweimal mit 1 ml PBS-Puffer gewaschen. Nach der Zugabe von je 1 ml PBS pro Well wurde die Fluoreszenz mit dem Plattenlesegerät FLUOStar Optima (BMG Labtech) bei einer Wellenlänge von 560 nm²⁵³ gemessen.

Abbildung 6: Plattenlesegerät FLUOStar Optima



Bei dem Versuch nach Methode B wurde die Bakterienlösung ohne den Farbstoff Resazurin für zweieinhalb Stunden bei 37°C mit den Prüfkörper inkubiert. Im Anschluss wurde die Bakteriensuspension bzw. die Pufferlösung abgesaugt und die Prüfkörper wiederum zweimal mit PBS gewaschen. Erst jetzt wurde im Unterschied zur Methode A der Farbstoff Resazurin

²⁵³Siehe Abb. 6 S. 40.

in den Konzentrationen 7,5 µl, 15 µl und 30 µl und jeweils 1 ml PBS hinzugefügt und die Well-Platte nochmals für zweieinhalb Stunden bei 37°C inkubiert. 180 µl des Überstandes wurden nach Ablauf der Inkubationszeit in eine 96er Well-Platte (96 Well Cell Culture Cluster, Corning Inc., Corning, NY 14831, USA) umpipettiert und die relative Fluoreszenzintensität im Fluorometer bei einer Wellenlänge von 560 nm bestimmt. Mit dieser Methode wurde die Messung der Eigenfluoreszenz der Prüfkörper umgangen.

Der Versuch nach Methode C erfolgte in der gleichen Weise wie der Versuch nach Methode B, jedoch wurde mit *Cytox Violet®* ein anderer Fluoreszenzfarbstoff als Resazurin verwendet. Für diesen Farbstoff wurden Konzentrationen von 10 µl, 20 µl und 40 µl, die jeweils mit 200 µl PBS-Puffer für zweieinhalb Stunden bei 37°C mit den Prüfkörpern inkubiert wurden, untersucht. Der Überstand wurde mittels dem Fluorometer bei einer Wellenlänge von 590 nm quantifiziert. Tabelle 11 zeigt das Pipettierschema für die Methoden B und C, während Tabelle 5 einen Überblick über die Unterschiede im Versuchsaufbau je nach Methodik liefert.

Abbildung 5: Übersicht über die verschiedenen Methoden (Unterschiede: Methode A (grün), Methode B und C (rot); Gemeinsamkeiten (gelb)).

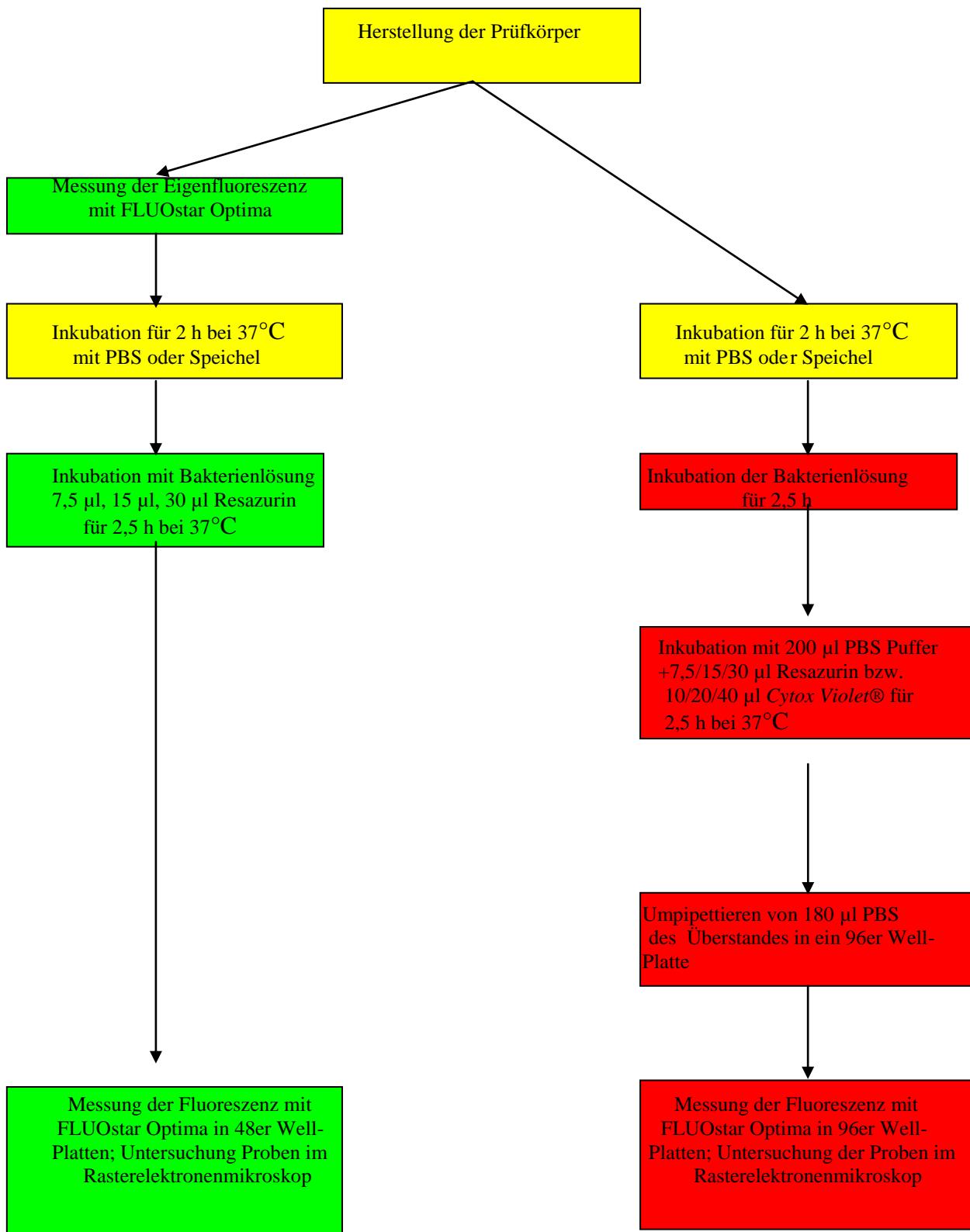


Tabelle 11: Pipettierschema für die Methode B und C:

	Bakterienlösung	Farbstoff	PBS
Messprobe (n=9)	1 ml	10 µl, 20 µl und 40 µl <i>Cytox Violet®</i> 7,5 µl, 15 µl, 30 µl Resazurin	X
Nullkontrolle (n=3)	X	X	1 ml

Durch den Farbstoff *Cytox Violet®* wird die Aktivität der zellulären Dehydrogenase gemessen. Dabei ist die Umwandlung in das fluoreszierende Produkt direkt proportional zu der Anzahl der vitalen adhärenten Zellen und deren Proliferation. Das Absorptionsspektrum liegt dabei bei 590 nm.²⁵⁴

Es erfolgten drei weitere Vorversuche nach Methode A, B und C jeweils mit und ohne Speichel, wobei die Farbstoffe in den Konzentrationen 15 µl Resazurin pro ml PBS bzw. Bakterienlösung und 20 µl *Cytox Violet®* pro 200 µl PBS verwendet wurden. Bei den Versuchen wurde analog zu den Vorversuchen zur Ermittlung der Farbstoffkonzentration vorgegangen; der Unterschied bestand lediglich darin, dass vor der Bakterieninkubation die Prüfkörper zunächst entweder mit Speichel oder PBS-Puffer für zwei Stunden bei 37°C inkubiert wurden. Anschließend wurde jedes Well zweimal mit PBS-Puffer gewaschen, um die nicht adhärenten Speichelbestandteile zu eliminieren. Während der zweistündigen Inkubationszeit wurde die Versuchskultur hergestellt.²⁵⁵

Es wurde je nach Methode mit den festgelegten Farbstoffkonzentrationen, wie oben beschrieben, weiterverfahren.

5.2 Hauptversuche

Die Hauptversuche wurden mittels eines Fließkammerverfahrens (dynamischer Versuchsaufbau) durchgeführt.²⁵⁶ Die Versuche wurden sowohl mit der konventionellen Resazurin-Reduktionsmethode (Methode A)²⁵⁷ als auch mit dem Farbstoff *Cytox Violet®* (Methode C) durchgeführt. Als Prüfkörper dienten die in der Zahnmedizin gängigen Materialien *Palapress Vario*, *Sinfony* sowie Zahnschmelz²⁵⁸.

Der Aufbau des Versuches unter dynamischen Bedingungen besteht aus einem Speichel- und Bakterienreservoir, einer Pumpe (IPC- 8 V1.32, Ismatec, Glatbrugg-Zürich, CH) und zwölf

²⁵⁴Epigentek, 2009.

²⁵⁵s.o.

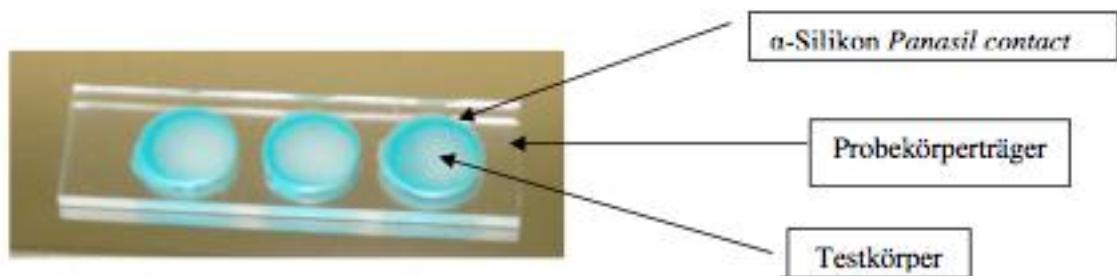
²⁵⁶Rosentritt et al., 2008; Mühlfriedel, 2009.

²⁵⁷Rosentritt et al., 2008.

²⁵⁸s.o.

parallel betriebenen Fließkammern, in die jeweils drei Prüfkörper platziert werden können. Die Fließkammern setzen sich aus einer handelsüblichen Spritze (20ml), einem Gehäuse, den Prüfkörperträgern²⁵⁹ und einem Gummipropf zusammen, der die Spritze verschließt.²⁶⁰

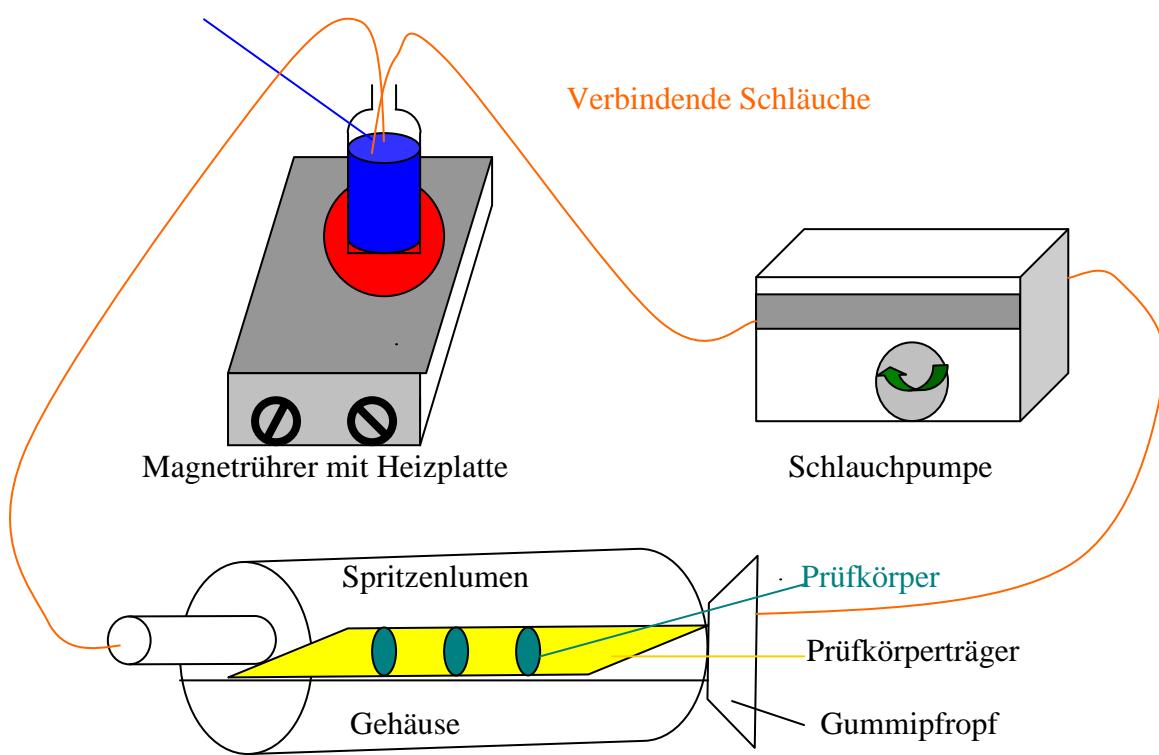
Abbildung 7: Prüfkörperträger mit Testkörper²⁶¹:



Die einzelnen Bestandteile des Versuchsaufbaus sind über Schläuche miteinander verbunden. Abbildung 8 gibt einen Überblick über den Versuchsaufbau mit dem Fließkammerverfahren.

Abbildung 8: Aufbau der Fließkammer:

Suspension mit *S. mutans*
bzw. Speichel oder
PBS bei 37°C



²⁵⁹Vgl.: Abb. 7 S. 44.

²⁶⁰Mühlfriedel, 2009.

²⁶¹Mühlfriedel, 2009.

5.2.1 Fließkammer mit der Resazurin-Reduktionsmethode

In jedem Versuch unter dynamischen Bedingungen konnten insgesamt 30 Prüfkörper untersucht werden. Pro Material wurden in je drei Fließkammerträger insgesamt 9 Prüfkörper mit einem dünnfließenden Silikon (*Panasil contact plus*, Kettenbach Dental, Eschenburg, D) eingeklebt.

Analog wurde in zwei weitere Träger je ein Prüfkörper aus Zahnschmelz, *Palapress Vario* und *Sinfony* eingeklebt. Diese dienten als Null- und Bakterienkontrolle. In drei weitere Träger wurden jeweils drei Prüfkörper aus Zahnschmelz, *Palapress Vario* und *Sinfony* eingeklebt, die als Farbkontrollen dienten.²⁶²

Abbildung 9: Schema der Fließkammern pro Versuchsdurchlauf bei der Resazurin-Reduktionsmethode:²⁶³

Zur Anzeige wird der QuickTime™
Dekompressor „
benötigt.

Um die Eigenfluoreszenz der Prüfkörper zu bestimmen, wurden die Träger auf speziell angefertigten Messplatten fixiert; in die Messplatten wurden 48 ml PBS pipettiert. Die Bestimmung der Eigenfluoreszenz erfolgte analog zu der semistatischen Resazurin-Reduktionsmethode mit dem Plattenlesegerät FLUOStar Optima.

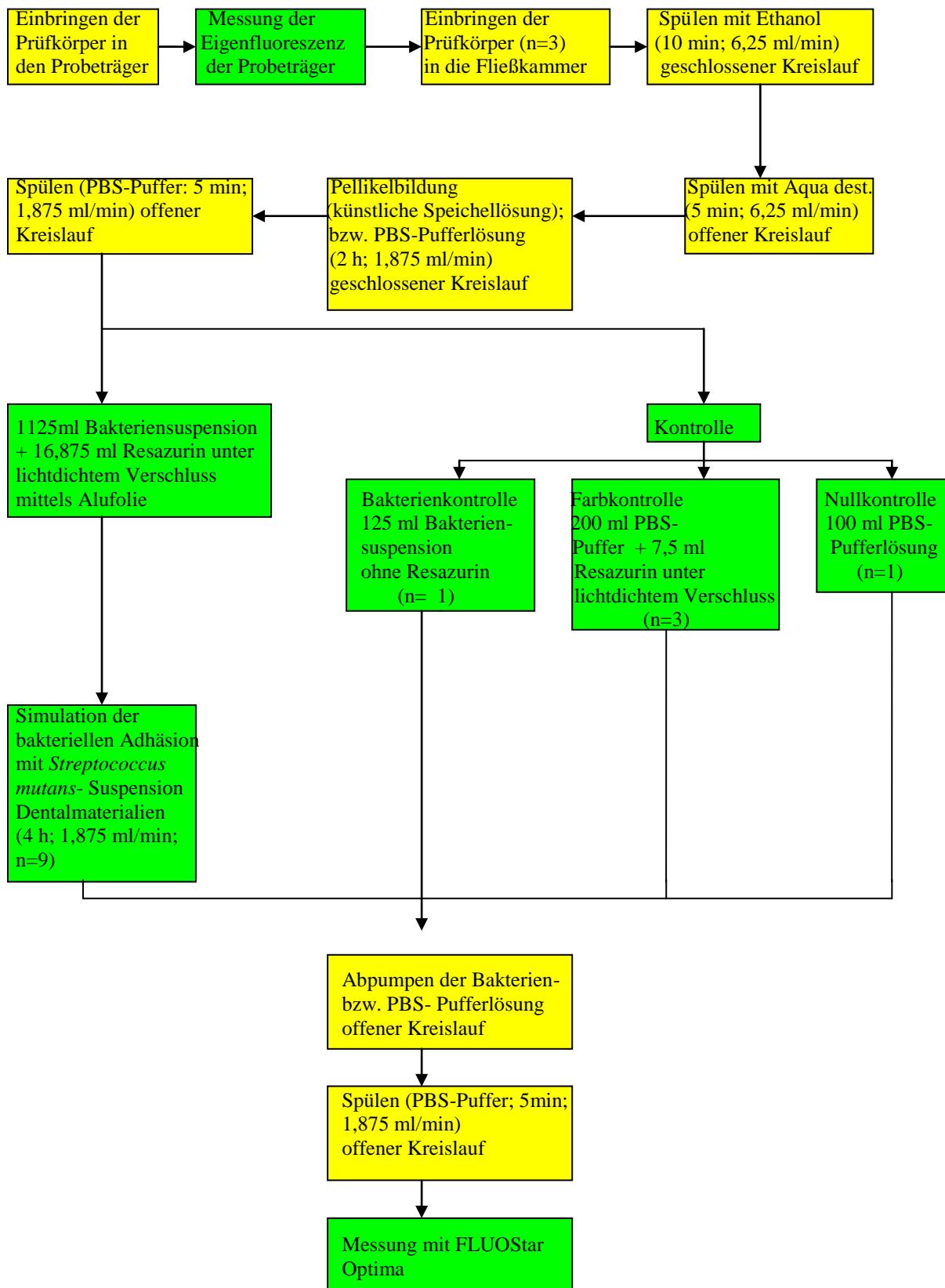
Die Träger wurden im Anschluß in die Fließkammern eingebracht und die Schläuche mit der Pumpe und den Kammern verbunden.

Die Herstellung der Versuchskultur erfolgte analog zu den Vorversuchen, allerdings wurde ein größeres Volumen von 1,25 l Bakteriensuspension hergestellt. 125 ml der Versuchskultur wurden als Bakterienkontrolle in eine kleine Duraflasche abgefüllt. Die übrigen 1,125 l der Versuchskultur wurden mit 16,875 ml Resazurin versetzt; für die Farbkontrollen wurden 375 ml PBS mit 5,625 ml Resazurin versetzt. In Abbildung 10 sind die Versuche unter dynamischen Bedingungen mit der Resazurin-Reduktionsmethode schematisch dargestellt.

²⁶²Vgl. Abb. 9 S. 45.

²⁶³Mühlfriedel et al., 2009.

Abbildung 10: Versuche unter dynamischen Bedingungen mit der konventionellen Resazurin-Reduktionsmethode (Unterschiede zu Methode C (grün); Gemeinsamkeiten mit Methode C (gelb)):



5.2.2 Fließkammer mit *Cytox Violet*®

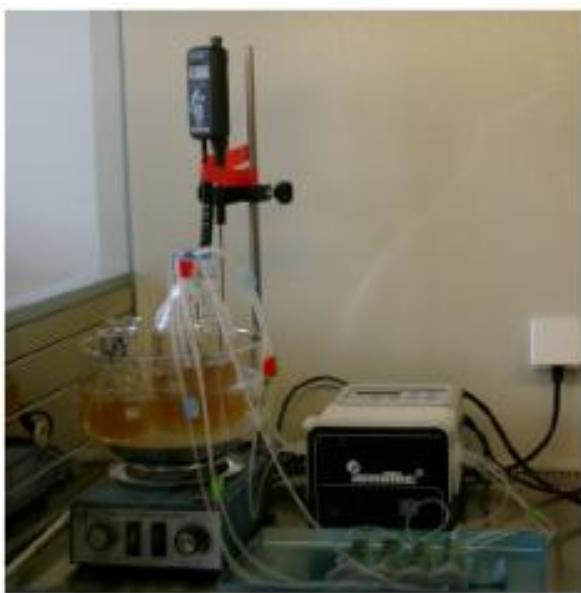
Bei den Versuchen mit *Cytox Violet*® wurden analog zu dem Fließkammerverfahren nach der Resazurin-Reduktionsmethode neun Prüfkörper pro Material, jedoch keine Farb- und Bakterienkontrollen verwendet. Drei Nullkontrollen dienten zur Überprüfung der Ergebnisse. Die Prüfkörper der Nullkontrollen wurden nur mit PBS und ohne Farbstoff inkubiert.

Der Versuchsablauf erfolgte analog zu dem Versuch unter dynamischen Bedingungen nach der Resazurin-Reduktionsmethode; auch die Versuchskultur wurde wie oben beschrieben hergestellt.

Jedoch war die Messung der Eigenfluoreszenz vor dem Versuchsbeginn nicht nötig, da die relative Fluoreszenzintensität des Überstandes ermittelt wurde und die Simulation der Bakterienadhäsion fand nach Angaben des Herstellers ohne vorherige Zugabe des Farbstoffes statt.

Abbildung 11 stellt den Versuchsaufbau während der bakteriellen Adhäsion dar.

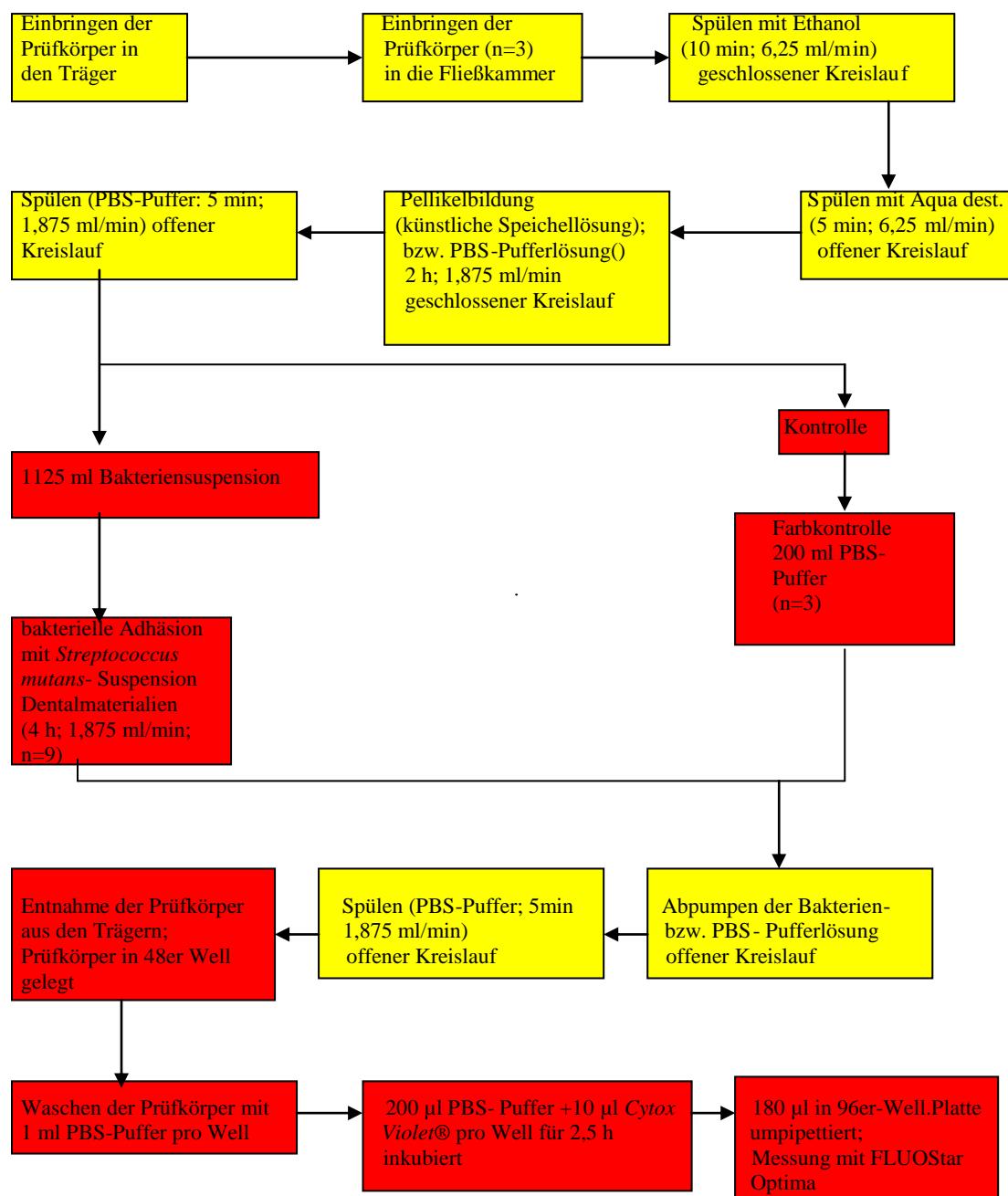
Abbildung 11: Versuchsaufbau (Bakterienadhäsion)



Die Träger wurden anschließend aus den Spritzen entnommen, und die Prüfkörper vorsichtig aus den Trägern gelöst und in eine 48er-Well-Platte gelegt. Jedes Well wurde einmal mit 1 ml PBS gewaschen, mit 200 µl PBS und 20 µl *Cytox Violet*® (nicht bei den 3 Nullkontrollen) versehen, und für zweieinhalb Stunden bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden 180 µl des Überstandes aus jedem Well in eine 96er Wellplatte (96 Well Cell Culture Cluster, Corning Inc., Corning, NY 14831, USA) umpipettiert und die relative Fluoreszenzintensität mit dem Plattenlesegerät FLUOStar Optima bei einer Wellenlänge von 590 nm gemessen. In

Abbildung 12 sind die Gemeinsamkeiten und Unterschiede mit der konventionellen Resazurin-Reduktionsmethode dargestellt.

Abbildung 12: Versuche unter dynamischen Bedingungen mit *Cytox Violet®* (Unterschiede zu Methode A (rot); Gemeinsamkeiten mit Methode A (gelb)):



6. Rasterelektronenmikroskopie

Für jeden Versuch wurden jeweils die Prüfkörper, die die höchste und niedrigste Fluoreszenzintensität aufwiesen, für 30 Minuten auf Papierhandtüchern getrocknet und dann mit einem Kohlenstoffkleber (*Leit-C nach Göcke*, Provac GmbH, Oestrich-Winkel, D) auf die Träger (*Alu-Stubs*, Provac GmbH, Oestrich-Winkel, D) für das Rasterelektronenmikroskop aufgeklebt.

Die aufgeklebten Proben wurden für einen Zeitraum von sieben Tagen unter staubfreien Bedingungen unter einem Abzug gelagert, bevor sie mit einem Sputtergerät (SCD 005 Sputter Coater, Fa. BALTEC, Walluff, D) für 360 sec bei einer Spannung von 30 mV mit einer Goldschicht versehen wurden, um sie leitfähig zu machen.

Im Rasterelektronenmikroskop (Cambridge S240, Cambridge Instruments, Nussloch, D) wurde jeder aufgeklebte Prüfkörper bei 1700-facher und 3800-facher Vergrößerung quantitativ und qualitativ hinsichtlich der Zahl der adhärenten Streptokokken untersucht.

Die in den Vorversuchen verwendeten Prüfkörper aus Polyethylen konnten nicht wie die anderen Prüfkörper nachbearbeitet werden,²⁶⁴ da das Material zu weich war. Bei diesen Polyethylenprüfkörpern war es aufgrund der rauen Oberfläche und des Elektronenstrahls zum Teil nicht möglich, ein ausreichend scharfes Bild zu erzeugen. In diesen Fällen wurde stattdessen der Prüfkörper mit der zweithöchsten Bakterienanlagerung verwendet. Die Prüfkörper aus Glas wurden aufgrund ihrer geringen Schichtstärke nicht untersucht.

Mittels der erhaltenen REM-Bilder wurde mit dem Programm *Optimas* (OptimaSoftware, Albershausen, D) die mit *Streptococcus mutans* bedeckte Oberfläche der Prüfkörper prozentual zur Gesamtoberfläche des Prüfkörpers bestimmt. Aufgrund der hohen Untersuchungszeit wurde die Kontrolle der Bakterienadhäsion auf zwei Bilder beschränkt. Dabei wurden jeweils ein Bild pro Prüfkörper mit 1700-facher und eins mit 3800-facher Vergrößerung analysiert. Der aufgenommene Bildausschnitt wurde zufällig ausgesucht.

7. Datenverarbeitung und statistische Auswertung

7.1 Fehlerbalken

Mittels gruppierter Fehlerbalken wurden die aus den Versuchen gewonnenen Daten graphisch dargestellt. Fehlerbalkendiagramme kennzeichnen die Lage des Mittelwerts einer Stichprobe und enthalten zudem Angaben über die wahrscheinliche Lage des Mittelwerts in der

²⁶⁴Vgl.: S 36

Grundgesamtheit. Hierzu kann die Standardabweichung in der Grafik dargestellt werden. Die Standardabweichung kann für die Darstellung in der Grafik mit einem beliebigen Faktor multipliziert werden; im vorliegenden Fall war der Faktor eins.

7.2 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der in den Versuchen gewonnenen Daten erfolgte mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA). Die Homogenität der Varianzen wurde mit dem Test nach Levene überprüft. Bestanden signifikante Unterschiede, so wurden die paarweisen Vergleiche mit dem Games-Howell-Test durchgeführt; bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Varianzen wurden die paarweisen Vergleiche mit dem Tukey-HSD-Test untersucht. Das Signifikanzniveau α wurde auf 0,05 festgelegt.

IV. Ergebnisse

1. Vorversuche zur Festlegung der Farbstoffkonzentration

1.1 Analyse der relativen Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der Farbstoffkonzentrationen

1.1.1 Methode A

In dem Vorversuch nach Methode A wurde der Einfluss der verschiedenen Resazurinkonzentrationen auf die relative Fluoreszenzintensität bei den Materialien *Palapress vario*, Polyethylen und Glas untersucht. Hierzu wurden die verschiedenen Materialien zunächst für zweieinhalb Stunde mit *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) und Resazurin in den Konzentrationen 7,5 µl/ml PBS, 15 µl/ml PBS und 30 µl/ml PBS inkubiert und die relative Fluoreszenzintensität bestimmt. Die so erhaltenen Werte wurden relativ zur verwendeten Resazurinkonzentration ermittelt.²⁶⁵

1.1.1.1 Polyethylen

Die einfaktorielle ANOVA zwischen den Gruppen wies keine signifikanten Unterschiede in der relativen Fluoreszenzintensität auf ($p=0,067$)²⁶⁶, was darauf hindeutet, dass die drei verschiedenen Farbstoffkonzentrationen keinen erheblichen Einfluss auf die Fluoreszenzintensität haben.²⁶⁷

1.1.1.2 *Palapress vario*

Die einfaktorielle ANOVA zwischen den Gruppen zeigte signifikante Unterschiede in der relativen Fluoreszenzintensität ($p=0,035$). Der Levene-Test deutete auf eine nicht homogene Verteilung der Gruppenvarianzen hin ($p=0,003$); aus diesem Grund wurden die anschließenden paarweisen Vergleiche mit dem Games-Howell-Test durchgeführt. Dieser zeigte keine signifikanten Unterschiede in der relativen Fluoreszenzintensität zwischen den Gruppen, was darauf hindeutet, dass die drei verschiedenen Farbstoffkonzentrationen keinen erheblichen Einfluss auf die relative Fluoreszenzintensität haben.²⁶⁸

1.1.1.3 Glas

Die einfaktorielle ANOVA zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen hinsichtlich der relativen Fluoreszenzintensität ($p=0,753$), was darauf hindeutet, dass die

²⁶⁵Vgl.: Material und Methode S. 38ff.

²⁶⁶Vgl.: Tabelle 12 S. 52 und Abb. 13 S. 52.

²⁶⁷Vgl.: Tabelle 12 S. 52 und Abb. 13 S. 52.

²⁶⁸Vgl.: Tabelle 12 S. 52 und Abb. 13 S. 52.

relative Fluoreszenzintensität nicht von den verschiedenen Farbstoffkonzentrationen beeinflusst wird.²⁶⁹

Für die weiteren Versuche wurde aufgrund der Tatsache, dass die Farbstoffkonzentrationen von 7,5 µl, 15 µl und 30 µl pro ml Bakterienlösung bei allen drei Materialien keinen signifikanten Einfluss auf die relative Fluoreszenzintensität hatten, eine mittlere Resazurinkonzentration von 15 µl pro ml Bakterienlösung ausgewählt.

Abbildung 13: relative Fluoreszenzintensität bei Methode A in Abhängigkeit von den Resazurinkonzentrationen und den verwendeten Materialien

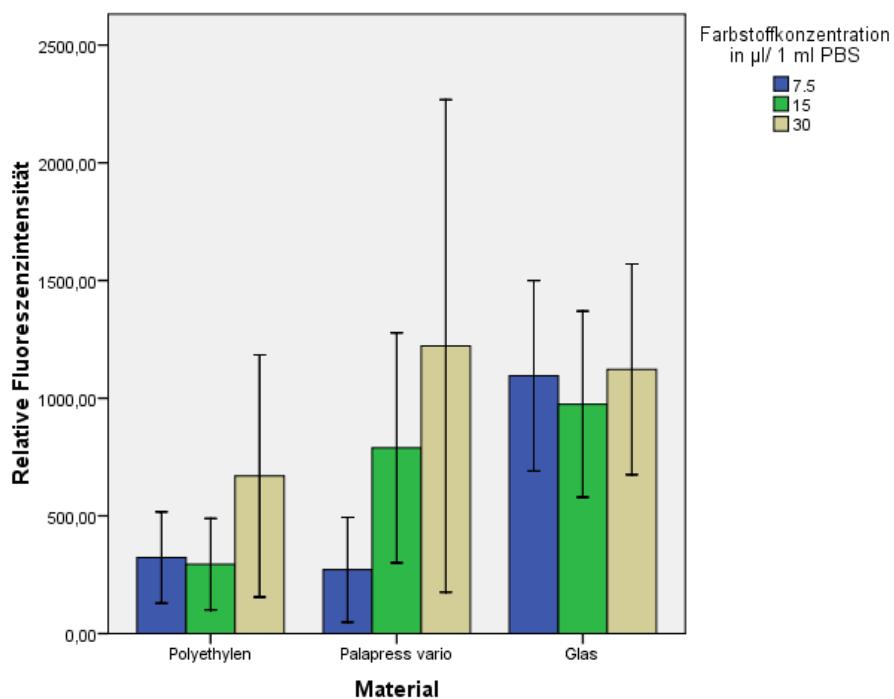


Tabelle 12: statistische Auswertung der Methode A (rot=signifikante Unterschiede, schwarz=nicht signifikante Unterschiede):

Resazurinkonzentration pro ml Bakterienlösung im Vergleich	Polyethylen	Palapress vario	Glas
7,5 µl: 15 µl	0,985	0,052	0,832
7,5 µl: 30 µl	0,123	0,085	0,991
15 µl: 30 µl	0,9	0,558	0,759

²⁶⁹Vgl.: Tabelle 12 S. 52 und Abb. 13 S. 52.

1.1.2 Methode B

In diesem Versuch nach Methode B wurde der Einfluss der verschiedenen Resazurinkonzentrationen auf die relative Fluoreszenzintensität untersucht. Auch bei diesem Versuch wurden die Materialien Polyethylen, Glas und *Palapress vario* verwendet. Der Ablauf entsprach dem der Methode A, jedoch wurde der Farbstoff erst nach erfolgter Bakterienadhäsion zugegeben. Für die Messung der relativen Fluoreszenzintensität wurde der Überstand nach einer Inkubationszeit von zweieinhalb Stunden in ein 96er Well umpipettiert und ohne Prüfkörper gemessen.²⁷⁰

1.1.2.1 Polyethylen

Die einfaktorielle ANOVA zeigte signifikante Unterschiede in der relativen Fluoreszenzintensität zwischen den Gruppen ($p=0,004$). Der Levene-Test deutete auf eine homogene Verteilung der Gruppenvarianzen hin ($p=0,357$); aus diesem Grund wurden die anschließenden paarweisen Vergleiche mit dem Tukey-HSD-Test durchgeführt. Dieser zeigte signifikante Unterschiede sowohl zwischen den Resazurinkonzentrationen 7,5 µl/ml PBS und 15 µl/ml PBS, als auch zwischen 7,5 µl/ml PBS und 30 µl/ml PBS. Die Unterschiede zwischen 15 µl/ml PBS und 30 µl/ml PBS waren nicht signifikant,²⁷¹ was darauf hindeutet, dass mit einer Resazurinkonzentration von 30 µl/ml PBS keine höhere relative Fluoreszenzintensität mehr erzielt werden kann.

1.1.2.2 *Palapress vario*

Die einfaktorielle ANOVA zeigte signifikante Unterschiede in der relativen Fluoreszenzintensität zwischen den Gruppen ($p=0,001$). Der Levene-Test deutete auf eine homogene Verteilung der Gruppenvarianzen hin ($p=0,203$); aus diesem Grund wurden die anschließenden paarweisen Vergleiche mit dem Tukey-HSD-Test durchgeführt. Diese zeigten signifikant höhere relative Fluoreszenzintensitäten bei den Resazurinkonzentrationen 15 µl/ml PBS als bei 7,5 µl/ml PBS und 30 µl/ml PBS.²⁷² Dies deutet darauf hin, dass mit der höheren Farbstoffkonzentration von 30 µl/ml PBS keine höhere relative Fluoreszenzintensität mehr zu erzielen ist.

²⁷⁰Vgl.: Material und Methoden S. 38ff.

²⁷¹Vgl.: Tabelle 13 S. 55 und Abb. 14 S. 54.

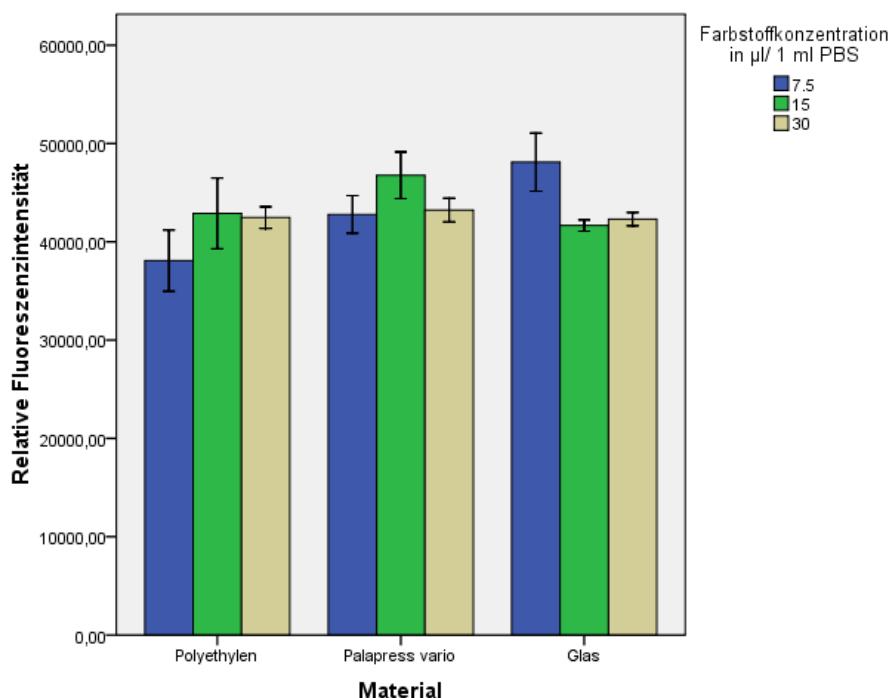
²⁷²Vgl.: Tabelle 13 S. 55 und Abb. 14 S. 54.

1.1.2.3 Glas

Die einfaktorielle ANOVA zeigte signifikante Unterschiede in der relativen Fluoreszenzintensität zwischen den Gruppen ($p<0,001$); der Levene-Test war signifikant ($p=0,002$). Daher wurden die paarweisen Vergleiche mit dem Games-Howell-Test durchgeführt. Dieser wies signifikante Unterschiede zwischen den Resazurinkonzentrationen 7,5 $\mu\text{l}/\text{ml}$ PBS und 15 $\mu\text{l}/\text{ml}$ PBS sowie zwischen 7,5 $\mu\text{l}/\text{ml}$ PBS und 30 $\mu\text{l}/\text{ml}$ PBS auf, was darauf hindeutet, dass bei einer Farbstoffkonzentration von 7,5 $\mu\text{l}/\text{ml}$ PBS eine deutlich höhere relative Fluoreszenzintensität erzielt wurde als bei den höheren Farbstoffkonzentrationen.²⁷³

Für die weiteren Versuche wurde eine Resazurinkonzentration von 15 $\mu\text{l}/\text{ml}$ PBS verwendet, da zumindest bei den Prüfkörpern aus *Palapress vario* und Polyethylen eine höhere Farbstoffkonzentration keinen signifikanten Einfluss auf die relative Fluoreszenzintensität hatte.

Abbildung 14: relative Fluoreszenzintensität bei Methode B in Abhängigkeit von den Resazurinkonzentrationen und den verwendeten Materialien



²⁷³Vgl.: Tabelle 13 S. 55 und Abb. 14 S. 54.

Tabelle 13: statistische Auswertung der Methode B (rot=signifikante Unterschiede, schwarz=nicht signifikante Unterschiede):

Resazurinkonzentration pro ml PBS im Vergleich	Polyethylen	<i>Palapress vario</i>	Glas
7,5 µl: 15 µl	0,007	0,001	0,001
7,5 µl: 30 µl	0,014	0,887	0,002
15 µl: 30 µl	0,953	0,003	0,135

1.1.3 Methode C

In diesem Vorversuch wurde der Einfluss der verschiedenen *Cytox Violet®*-Konzentrationen auf die relative Fluoreszenzintensität untersucht. Der Versuchsablauf entsprach dem bei Methode B, jedoch wurden statt Resazurin *Cytox Violet®* in den Konzentrationen 10 µl/200 µl PBS, 20 µl/200 µl PBS und 40 µl/200 µl PBS verwendet.²⁷⁴

1.1.3.1 Polyethylen

Die einfaktorielle ANOVA wies signifikante Unterschiede in der relativen Fluoreszenzintensität zwischen den Gruppen auf ($p<0,001$). Der Levene-Test deutete auf eine inhomogene Verteilung der Gruppenvarianzen hin ($p=0,048$); aus diesem Grund wurden die anschließenden paarweisen Vergleiche mit dem Games-Howell-Test durchgeführt. Dieser zeigte signifikante Unterschiede zwischen den Konzentrationen 10 µl/200 µl PBS und 20 µl/200 µl PBS, sowie zwischen 20 µl/200 µl PBS und 40 µl/200 µl PBS, als auch zwischen 10 µl/200 µl PBS und 40 µl/200 µl PBS. Das bedeutet, dass mit der *Cytox Violet®* Konzentration von 20 µl/200 µl PBS die signifikant höchste relative Fluoreszenzintensität erzielt wurde, während diese bei höheren Konzentrationen wieder sank²⁷⁵.

Die Standardabweichung der relativen Fluoreszenzintensität für den Messwert 20 µl war aufgrund dessen, dass die Messgrenze des Geräts erreicht wurde, gleich null.

1.1.3.2 *Palapress vario*

Die einfaktorielle ANOVA zeigte hinsichtlich der relativen Fluoreszenzintensität signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen ($p<0,001$). Der Levene-Test deutete auf eine inhomogene Verteilung der Gruppenvarianzen hin ($p<0,001$); aus diesem Grund wurden die anschließenden paarweisen Vergleiche mit dem Games-Howell-Test durchgeführt. Dieser zeigte signifikante Unterschiede in der relativen Fluoreszenzintensität zwischen den

²⁷⁴Vgl.: Material und Methoden S. 38 ff.

²⁷⁵Vgl.: Tabelle 14 S. 57 und Abb. 15 S. 57.

Konzentrationen 10 µl/200 µl PBS und 40 µl/200 µl PBS sowie 20 µl/200 µl PBS und 40 µl/200 µl PBS, während der Unterschied zwischen 10 µl/200 µl PBS und 20 µl/200 µl PBS nicht signifikant war.²⁷⁶ Daraus kann man entnehmen, dass bei höheren *Cytox Violet®* Konzentrationen eine signifikant höhere relative Fluoreszenzintensität gemessen wird.

Die Standardabweichung der relativen Fluoreszenzintensität für den Messwert 40 µl war aufgrund dessen, dass die Messgrenze des Geräts erreicht wurde, gleich null.

1.1.3.3 Glas

Die einfaktorielle ANOVA zeigte signifikante Unterschiede in der relativen Fluoreszenzintensität zwischen den Gruppen ($p<0,001$). Der Levene-Test deutete auf eine homogene Verteilung der Gruppenvarianzen hin ($p=0,443$); aus diesem Grund wurden die anschließenden paarweisen Vergleiche mit dem Tukey-HSD-Test durchgeführt. Dieser zeigte signifikante Unterschiede zwischen den Konzentrationen 10 µl/200 µl PBS und 20 µl/200 µl PBS sowie zwischen 20 µl/200 µl PBS und 40 µl/200 µl PBS als auch zwischen 10 µl/200 µl PBS und 40 µl/200 µl PBS²⁷⁷. Hier wurde mit steigender Farbstoffkonzentration eine signifikant höhere relative Fluoreszenzintensität gemessen.

Für die weiteren Versuche wurde die *Cytox Violet®*-Konzentration 20 µl/200 µl PBS ausgewählt, da eine höhere Konzentration zumindest bei dem Material Polyethylen wieder zu einer Abnahme der relativen Fluoreszenzintensität führte.

²⁷⁶Vgl.: Tabelle 14 S. 57 und Abb. 15 S. 57.

²⁷⁷Vgl.: Tabelle 14 S. 57 und Abb. 15 S. 57.

Abbildung 15: relative Fluoreszenzintensität bei Methode C in Abhängigkeit von den *Cytox Violet®*-Konzentrationen und den verwendeten Materialien

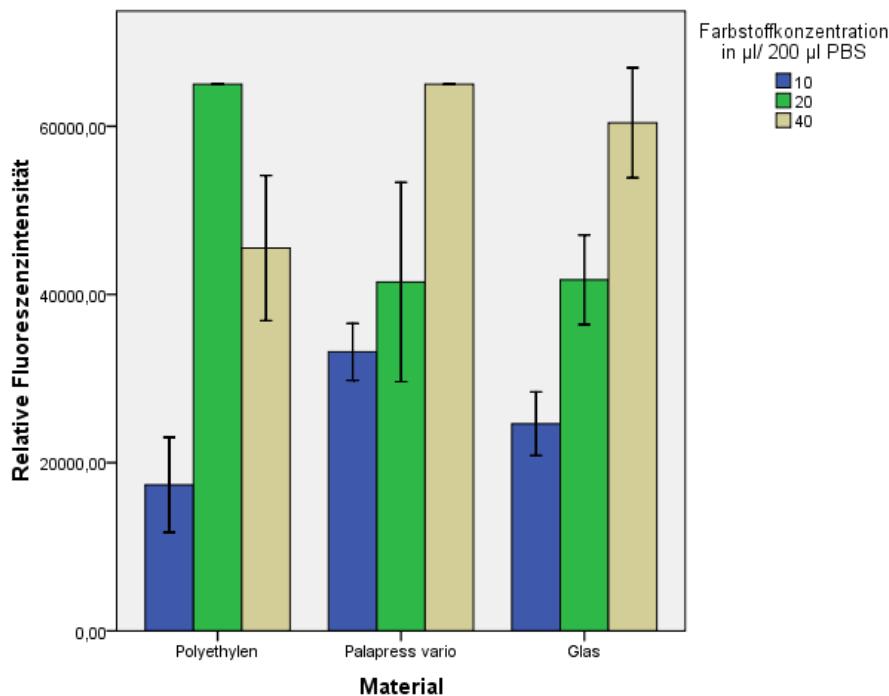


Tabelle 14: statistische Auswertung der Methode C (rot=signifikante Unterschiede, schwarz=nicht signifikante Unterschiede):

<i>Cytox Violet®</i> Konzentration pro 200 µl PBS im Vergleich	Polyethylen	<i>Palapress vario</i>	Glas
10 µl: 20µl	< 0,001	0,198	< 0,001
10 µl: 40 µl	< 0,001	< 0,001	< 0,001
20 µl: 40 µl	0,001	0,002	< 0,001

1.2 Analyse der Standardabweichungen

Es wurden zum einen die relative Höhe der Standardabweichungen und zum anderen die Standardabweichung prozentual zur erhaltenen Fluoreszenzintensität beurteilt.

Unter Anwendung der Methode A wurden von den drei Methoden die niedrigsten relativen Standardabweichungen festgestellt. Mit Erhöhung der Fluoreszenzfarbstoffkonzentration nahmen hier jedoch die Abweichungen zu.²⁷⁸ Unter Anwendung der Methode B traten höhere relative Standardabweichungen als unter Anwendung der Methode A auf, bei Anwendung der Methode C waren die relativen Standardabweichungen am höchsten.²⁷⁹

²⁷⁸Vgl.: Tabelle 15 S. 58.

²⁷⁹Vgl.: Tabelle 16 und Tabelle 17 S. 59.

Wenn man allerdings die Standardabweichungen prozentual zur erzielten relativen Fluoreszenzintensität beurteilt, so ist Methode A den Methoden B und C unterlegen. Bei Anwendung der Methode A wurden Standardabweichungen erzielt, die größer als hundert Prozent der erzielten relativen Fluoreszenzintensität waren. Bei Anwendung der Methode C waren die Abweichungen größer als bei Anwendung der Methode B.²⁸⁰

Jedoch ist die Aussagekraft der relativen und prozentualen Standardabweichung für die Prüfkörpern aus Polyethylen und der Farbstoffkonzentration 20 µl/200 µl PBS und den Prüfkörper aus *Palapress* vario und der Farbstoffkonzentration 40 µl/200 µl PBS eingeschränkt, da die Standardabweichungen aufgrund der Meßgrenze des Plattenlesegerätes gleich null waren.²⁸¹

Tabelle 15: Standardabweichungen der Methode A: relative und prozentuale Standardabweichung im Vergleich

Methode A	relative Standardabweichung	Standardabweichung in %
Polyethylen: Konzentration 7,5 µl	400,0	123,1
Polyethylen: Konzentration 15 µl	400,0	133,4
Polyethylen: Konzentration 30 µl	1050,0	155,6
<i>Palapress</i> : Konzentration 7,5 µl	450,0	163,6
<i>Palapress</i> : Konzentration 15 µl	1000,0	181,8
<i>Palapress</i> : Konzentration 30 µl	2135,0	170,8
Glas: Konzentration 7,5 µl	825,0	750,0
Glas: Konzentration 15 µl	820,0	82,0
Glas: Konzentration 30 µl	925,0	80,4

²⁸⁰Vgl.: Tabelle 15 S. 58 und Tabelle 16 und 17 S. 59.

²⁸¹Vgl.: Tabelle 17 S. 59.

Tabelle 16: Standardabweichungen der Methode B: relative und prozentuale Standardabweichung im Vergleich

Methode B	relative Standardabweichung	Standardabweichung in %
Polyethylen: Konzentration 7,5 µl	5882,5	15,4
Polyethylen: Konzentration 15 µl	7059,0	16,4
Polyethylen: Konzentration 30 µl	2941,3	6,9
Palapress: Konzentration 7,5 µl	4117,8	9,7
Palapress: Konzentration 15 µl	4706,0	10,0
Palapress: Konzentration 30 µl	2353,0	5,4
Glas: Konzentration 7,5 µl	5882,5	12,2
Glas: Konzentration 15 µl	1176,5	2,8
Glas: Konzentration 30 µl	1176,5	2,8

Tabelle 17: Standardabweichungen der Methode C: relative und prozentuale Standardabweichung im Vergleich

Methode C	relative Standardabweichung	Standardabweichung in %
Polyethylen: Konzentration 10 µl	11857,4	66,8
Polyethylen: Konzentration 20 µl	0	0
Polyethylen: Konzentration 40 µl	25000,5	51,7
Palapress: Konzentration 10 µl	6857,3	20
Palapress: Konzentration 20 µl	25000,5	58,3
Palapress: Konzentration 40 µl	0	0
Glas: Konzentration 10 µl	7857,3	30,5
Glas: Konzentration 20 µl	11000,2	25,2
Glas: Konzentration 40 µl	14286,0	22,7

1.3. Analyse der Oberflächenrauhigkeit

Um den Einfluss der Oberflächenrauhigkeit auf die Pellikelbildung auszuschließen, wurden 30 % der Prüfkörper aus *Palapress vario* und Polyethylen mit einem profilometrischen Rauigkeitsmeßgerät jeweils an zwei marginalen und einer zentralen Stelle untersucht. Die Prüfkörper aus Glas wurden aufgrund ihrer geringen Schichtstärke nicht untersucht. Die gemessenen Rauigkeitswerte lagen bei maximal 0,08 µm und damit unterhalb der in der Literatur gefundenen Werte von 0,2 µm, bei denen kein Einfluss auf die Adhäsion von Bakterien und Speichelbestandteilen an den Prüfkörper besteht.²⁸²

²⁸²Vgl.: Tabelle 18 S. 60/61.

Tabelle 18: Ergebnisse der Meßwerte der Oberflächenrauigkeit:

Material	Meßstelle 1 in µm	Meßstelle 2 in µm	Meßstelle 3 in µm
Palapress vario 1	0,08	0,08	0,08
Palapress vario 2	0,04	0,04	0,04
Palapress vario 3	0,08	0,08	0,08
Palapress vario 4	0,08	0,08	0,04
Palapress vario 5	0,04	0,04	0,04
Palapress vario 6	0,08	0,08	0,04
Palapress vario 7	0,08	0,04	0,08
Palapress vario 8	0,08	0,08	0,08
Palapress vario 9	0,04	0,04	0,08
Palapress vario 10	0,08	0,04	0,04
Palapress vario 11	0,08	0,04	0,08
Palapress vario 12	0,04	0,04	0,04
Palapress vario 13	0,04	0,04	0,04
Palapress vario 14	0,08	0,08	0,08
Palapress vario 15	0,08	0,08	0,04
Palapress vario 16	0,08	0,08	0,04
Palapress vario 17	0,08	0,08	0,08
Palapress vario 18	0,08	0,08	0,08
Palapress vario 19	0,04	0,04	0,08
Palapress vario 20	0,08	0,08	0,04
Palapress vario 21	0,08	0,04	0,04
Palapress vario 22	0,04	0,08	0,04
Palapress vario 23	0,08	0,08	0,04
Palapress vario 24	0,08	0,08	0,08
Palapress vario 25	0,04	0,04	0,04
Palapress vario 26	0,08	0,04	0,08
Palapress vario 27	0,08	0,08	0,08
Palapress vario 28	0,04	0,04	0,04
Palapress vario 29	0,04	0,04	0,04
Palapress vario 30	0,04	0,08	0,04
Palapress vario 31	0,08	0,04	0,08
Palapress vario 32	0,04	0,04	0,08
Palapress vario 33	0,08	0,08	0,08
Palapress vario 34	0,08	0,08	0,04
Palapress vario 35	0,08	0,04	0,08
Palapress vario 36	0,08	0,08	0,08
Palapress vario 37	0,04	0,08	0,04
Palapress vario 38	0,08	0,08	0,04
Palapress vario 39	0,04	0,08	0,04
Palapress vario 40	0,04	0,08	0,04
Polyethylen1	0,04	0,08	0,04
Polyethylen 2	0,04	0,08	0,04
Polyethylen 3	0,08	0,08	0,04
Polyethylen 4	0,04	0,08	0,04
Polyethylen 5	0,08	0,08	0,08
Polyethylen 6	0,08	0,04	0,08
Polyethylen 7	0,04	0,04	0,08
Polyethylen 8	0,04	0,08	0,04

Polyethylen 9	0,04	0,08	0,08
Polyethylen 10	0,08	0,04	0,08
Polyethylen 11	0,04	0,04	0,08
Polyethylen 12	0,08	0,08	0,08
Polyethylen 13	0,08	0,04	0,04
Polyethylen 14	0,08	0,08	0,04
Polyethylen 15	0,08	0,08	0,04
Polyethylen 16	0,04	0,04	0,08
Polyethylen 17	0,04	0,08	0,08
Polyethylen 18	0,04	0,08	0,04
Polyethylen 19	0,08	0,08	0,04
Polyethylen 20	0,08	0,04	0,08
Polyethylen 21	0,04	0,04	0,08
Polyethylen 22	0,04	0,08	0,04
Polyethylen 23	0,04	0,08	0,08
Polyethylen 24	0,08	0,04	0,08
Polyethylen 25	0,08	0,08	0,04
Polyethylen 26	0,08	0,04	0,04
Polyethylen 27	0,08	0,04	0,04
Polyethylen 28	0,04	0,04	0,08
Polyethylen 29	0,04	0,08	0,04
Polyethylen 30	0,04	0,08	0,04
Polyethylen 31	0,08	0,04	0,08
Polyethylen 32	0,08	0,08	0,04
Polyethylen 33	0,08	0,04	0,04
Polyethylen 34	0,08	0,04	0,08
Polyethylen 35	0,08	0,08	0,08
Polyethylen 36	0,04	0,08	0,04
Polyethylen 37	0,08	0,08	0,04
Polyethylen 38	0,04	0,04	0,08
Polyethylen 39	0,04	0,04	0,08
Polyethylen 40	0,04	0,08	0,04

2. Vorversuche mit und ohne Speichelpellikel mit den ausgewählten Farbstoffkonzentrationen

2.1 Analyse der relativen Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Pellikelbildung und dem Material

2.1.1 Methode A

2.1.1.1 Ohne Speichelpellikel

Der Versuchsablauf erfolgte wie bei der in Material und Methoden unter 5.1 beschriebenen Methode A mit einer Resazurinkonzentration von 15 µl/ml PBS. Es wurden wiederum die Materialien Polyethylen, *Palapress vario* und Glas verwendet²⁸³.

Die einfaktorielle ANOVA zeigte signifikante Unterschiede in der relativen Fluoreszenzintensität zwischen den Gruppen ($p=0,035$). Der Levene-Test war auch signifikant ($p=0,046$) und lässt somit auf eine heterogene Verteilung der Gruppenvarianzen schließen. Daher wurden die anschließenden paarweisen Vergleiche mit dem Games-Howell-Test durchgeführt. Dieser deutete auf eine ähnliche relative Fluoreszenzintensität bei den verschiedenen Materialien hin²⁸⁴.

²⁸³Vgl.: Material und Methoden S. 38 ff.

²⁸⁴Vgl.: Abb. 16 S. 63 und Tabelle 19 S. 63.

Abbildung 16: Methode A, B und C ohne vorherige Speichelpellikelbildung: relative Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der verschiedenen Farbstoffe und den verwendeten Materialien

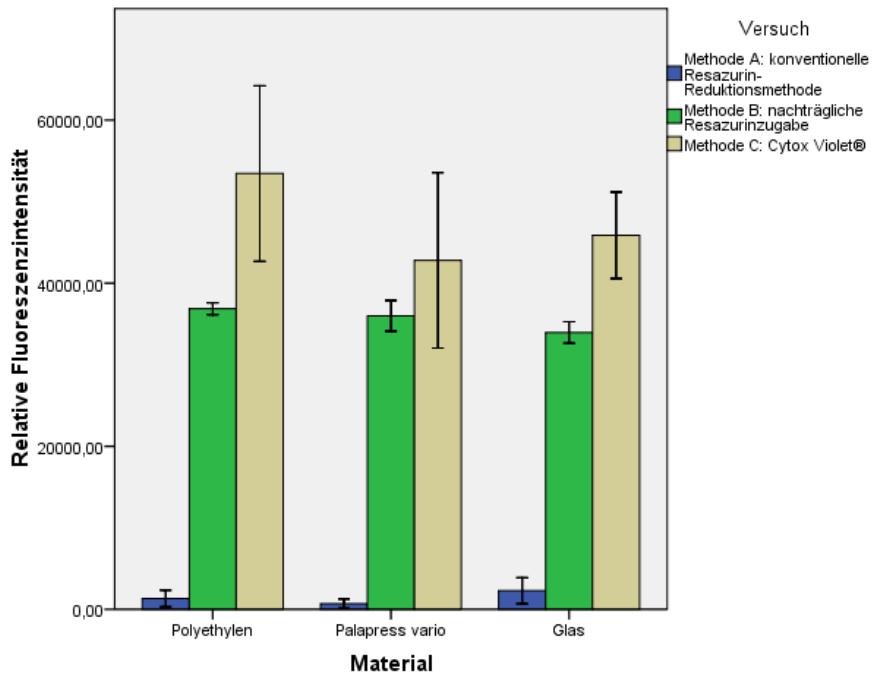


Tabelle 19: statistische Auswertung der Methode A (rot=signifikanter Unterschied, schwarz=kein signifikanter Unterschied):

Verglichene Materialien	Mit Pellikelbildung	Ohne Pellikelbildung
<i>Palapress vario:</i>		
Polyethylen	0,404	0,317
<i>Palapress vario: Glas</i>	0,997	0,35
Polyethylen: Glas	0,363	0,063

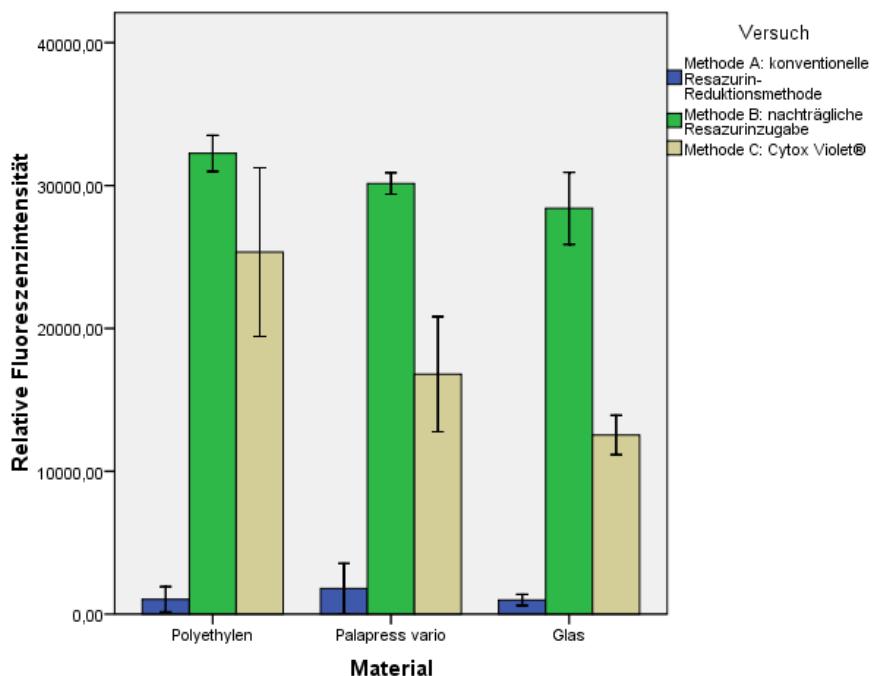
2.1.1.2 Mit Speichelpellikel

Bei diesem Versuch wurden die Prüfkörper zunächst für zwei Stunden mit steril filtriertem natürlichem Speichel und erst anschließend mit *Streptococcus mutans* und 15 µl Resazurin inkubiert; nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die relative Fluoreszenzintensität gemessen²⁸⁵.

²⁸⁵Vgl.: Material und Methoden S. 38 ff.

Die einfaktorielle ANOVA zeigte keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der relativen Fluoreszenzintensität zwischen den Gruppen ($p=0,314$), was darauf hindeutet, dass die relative Fluoreszenzintensität bei den verschiedenen Materialien ähnlich ist²⁸⁶.

Abbildung 17: Methode A, B und C mit vorheriger Speichelpellikelbildung: relative Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der verschiedenen Farbstoffmethoden und den verwendeten Materialien



2.1.2. Methode B

2.1.2.1 Ohne Speichelpellikel

Der Versuchsablauf entsprach dem in Material und Methoden unter 5.1 beschriebenen mit den Materialien Polyethylen, *Palapress vario* und Glas, jedoch mit einer Resazurinkonzentration von 15 µl/ml PBS²⁸⁷.

Die einfaktorielle ANOVA zeigte signifikante Unterschiede in der relativen Fluoreszenzintensität zwischen den Gruppen ($p=0,01$); der Levene-Test wies auf keine signifikanten Unterschiede hin ($p=0,249$). Die anschließenden Vergleiche mit dem Tukey-HSD-Test zeigten eine signifikant höhere relative Fluoreszenzintensität bei Polyethylen und

²⁸⁶Vgl.: Abb. 17 S. 64 und Tabelle 19, S. 63.

²⁸⁷Vgl.: Material und Methoden S. 38ff.

Palapress vario als bei Glas. Die Unterschiede zwischen Polyethylen und *Palapress vario* waren nicht signifikant²⁸⁸.

Tabelle 20: statistische Auswertung der Methode B (rot=signifikanter Unterschied, schwarz=kein signifikanter Unterschied):

Verglichene Materialien	Mit Pellikelbildung	Ohne Pellikelbildung
<i>Palapress vario</i> :		
Polyethylen	0,52	0,434
<i>Palapress vario</i> : Glas	0,122	0,001
Polyethylen: Glas	<0,001	0,021

2.1.2.2 Mit Speichelpellikel

Die Prüfkörper wurden für zwei Stunden mit steril filtriertem, humanem Speichel und anschließend für zweieinhalb Stunden mit *Streptococcus mutans* inkubiert; im Anschluss erfolgte die Inkubation mit Resazurin in einer Konzentration von 15 µl/ml PBS für weitere zwei Stunden. 180 µl des Überstandes wurden in 96er Wells umgefüllt und die Fluoreszenzintensität gemessen²⁸⁹.

Die einfaktorielle ANOVA zeigte signifikante Unterschiede in der relativen Fluoreszenzintensität zwischen den Gruppen ($p=0,01$). Da der Levene-Test eine homogene Verteilung der Varianzen zeigte ($p=0,345$), wurden die sich anschließenden Vergleiche mit dem Tukey-HSD-Test durchgeführt. Dieser zeigte eine signifikant höhere relative Fluoreszenzintensität bei Polyethylen als bei Glas. Die Unterschiede zwischen Polyethylen und *Palapress vario* und Glas und *Palapress vario* waren nicht signifikant²⁹⁰.

2.1.3. Methode C

2.1.3.1 Ohne Speichelpellikel

Der Versuchsaufbau entsprach dem in Material und Methoden unter Punkt 5.1 beschriebenen. Es wurden die Materialien Polyethylen, *Palapress vario* und Glas untersucht²⁹¹.

²⁸⁸Vgl.: Abb. 16 S. 63 und Tabelle 20 S. 65.

²⁸⁹Vgl.: Material und Methoden S. 38ff.

²⁹⁰Vgl.: Abb. 17 S. 64 und Tabelle 21 S. 66.

²⁹¹Vgl.: Material und Methoden S. 38ff.

Die einfaktorielle ANOVA zeigte keine signifikanten Unterschiede in der relativen Fluoreszenzintensität zwischen den Gruppen ($p=0,85$), was darauf schließen lässt, dass die relative Fluoreszenzintensität bei den verwendeten Materialien ähnlich ist²⁹².

Tabelle 21: statistische Auswertung der Methode C (rot=signifikanter Unterschied, schwarz=kein signifikanter Unterschied):

Verglichene Materialien	Mit Pellikelbildung	Ohne Pellikelbildung
<i>Palapress vario:</i>		
Polyethylen	0,002	0,079
<i>Palapress vario: Glas</i>	0,171	0,255
Polyethylen: Glas	<0,001	0,788

2.1.3.2 Mit Speichelpellikel

Zunächst wurden die Prüfkörper Polyethylen, *Palapress vario* und Glas für zwei Stunden mit sterilfiltriertem, humanem Speichel und anschließend für weitere zweieinhalf Stunden mit *Streptococcus mutans* inkubiert. Erst im Anschluss wurden 20 µl *Cytox Violet®* hinzugefügt und mit 200 µl PBS für weitere 2h inkubiert. Von dem so erhaltenen Überstand wurden 180 µl in 96er Wells transferiert und die relative Fluoreszenzintensität gemessen²⁹³.

Die einfaktorielle ANOVA wies signifikante Unterschiede in der relativen Fluoreszenzintensität zwischen den Gruppen ($p<0,001$) auf. Der Levene-Test zeigte keine signifikanten Unterschiede ($p=0,11$), deshalb wurde eine homogene Verteilung der Varianzen angenommen. Die sich anschließenden paarweisen Vergleiche mit dem Tukey-HSD-Test wiesen signifikante Unterschiede zwischen den Materialien Polyethylen und *Palapress vario* sowie Polyethylen und Glas auf. Lediglich die Unterschiede zwischen *Palapress vario* und Glas waren nicht signifikant. Dabei zeigte Polyethylen eine signifikant höhere relative Fluoreszenzintensität als Glas und *Palapress vario*.²⁹⁴

2.2 Analyse der Standardabweichungen

Beurteilt wurden sowohl die Höhe der relativen Standardabweichung als auch die Standardabweichung prozentual zur erhaltenen relativen Fluoreszenzintensität.

²⁹²Vgl.: Abb.16 S. 63 und Tabelle 21 S. 66.

²⁹³Vgl.: Material und Methoden S. 38ff.

²⁹⁴Vgl.: Abb. 17 S. 64 und Tabelle 21 S. 66.

Die relativen Standardabweichungen ohne vorherige Speichelinkubation waren unter Anwendung der Methode A und B ähnlich, während bei Anwendung der Methode C wesentlich höhere relative Standardabweichungen auftraten.

Bei Anwendung der Methode A ohne vorherige Pellikelbildung wurden für die Prüfkörper aus *Palapress vario* die niedrigsten relativen Standardabweichungen gemessen. Unter Anwendung der Methode B wurden hingegen die niedrigsten Standardabweichungen für die Prüfkörper aus Polyethylen und Glas beobachtet. Bei Anwendung der Methode C wurden wesentlich höhere relative Standardabweichungen als bei Anwendung der Methode A und B festgestellt.²⁹⁵

Werden die Standardabweichungen in Prozent ausgehend von den gemessenen relativen Fluoreszenzintensitäten beurteilt, so wurden bei Anwendung der Methode A ohne vorherige Pellikelbildung die höchsten prozentualen Standardabweichungen von größer als hundert Prozent beobachtet.²⁹⁶ Bei Anwendung der Methode B ohne vorherige Pellikelbildung wurden die niedrigsten prozentualen Abweichungen für die Materialien Glas und *Palapress vario* beobachtet und unter Anwendung der Methode C bei den Prüfkörpern aus Polyethylen.²⁹⁷

Einen Überblick über das Verhalten der Standardabweichungen gibt Tabelle 22.

Tabelle 22: Standardabweichungen der Methoden A, B und C ohne vorherige Pellikelbildung: prozentual und relativ im Vergleich (rot=hoch, orange=mittel, grün=niedrig):

ohne Pellikelbildung	Methode A		Methode B		Methode C	
	relativ	prozentual	relativ	prozentual	relativ	prozentual
Polyethylen	2285,7	160,0	1428,6	47,6	14571,2	26,8
<i>Palapress vario</i>	1428,6	200,0	4286,2	11,8	14286,0	32,8
Glas	3714,3	173,3	2857,2	<1	10714,5	23,1

Bei den Versuchen mit vorheriger Pellikelbildung traten unter Anwendung der Methode A für alle Prüfkörper die niedrigsten relativen Standardabweichungen auf. Bei Anwendung der Methode C waren für die Prüfkörper aus Polyethylen die relativen Standardabweichungen am höchsten, bei Anwendung der Methode B hingegen für die Prüfkörper aus *Palapress vario* und Glas.²⁹⁸

²⁹⁵Vgl.: Tabelle 22 S. 67.

²⁹⁶Vgl.: Tabelle 22 S. 67.

²⁹⁷Vgl.: Tabelle 22 S. 67.

²⁹⁸Vgl.: Tabelle 23 S. 68.

Für die Versuche mit vorheriger Pellikelbildung wurden die niedrigsten prozentualen Standardabweichungen bei Anwendung der Methode B gemessen. Die Werte unter Anwendung der Methode C lagen bei den Prüfkörpern aus Polyethylen und *Palapress vario* zwischen denen bei Anwendung der Methoden A und B, bei den Prüfkörpern aus Glas waren sie bei Anwendung der Methode C am höchsten.²⁹⁹

Methode B ist auch bei den Vorversuchen mit vorheriger Pellikelbildung am genauesten. Methode C ist trotz der höheren relativen Standardabweichungen präziser als Methode A.

Tabelle 23: Standardabweichungen der Methoden A, B und C mit vorheriger Pellikelbildung: prozentual und relativ im Vergleich(rot=hoch, orange=mittel, grün=niedrig):

mit Pellikelbildung	Methode A		Methode B		Methode C	
	relativ	prozentual	relativ	prozentual	relativ	prozentual
Polyethylen	2000,0	166,7	2400,0	9,5	12000,0	47,6
<i>Palapress vario</i>	3600,0	225,0	9600,0	37,3	8000,0	47,6
Glas	800,0	83,3	3200,0	11,42	2400,0	85,7

2.3 Analyse der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen

Im Rasterelektronenmikroskop wurde jeweils der Prüfkörper mit der niedrigsten und höchsten Fluoreszenzintensität untersucht. Dies geschah für Methode A, B und C mit und ohne Pellikelbildung. Die Auszählung der Bakterien erfolgte dabei mit einem Computerprogramm, das die prozentuale mit Bakterien bedeckte Oberfläche angibt. Dabei korrelierten für die Vergrößerung 1700 bei Methode B und C die Werte der prozentualen Bakterienbesiedlung mit der Höhe der relativen Fluoreszenzintensität (eingeteilt in hoch, mittel und niedrig).³⁰⁰ Bei Methode A stimmte zwar das Verhältnis zu den relativen Fluoreszenzintensitäten von Glas, jedoch nicht von Polyethylen und *Palapress vario*.³⁰¹ Bei einer Vergrößerung von 3800 konnten im Gegensatz zu den Bildern bei einer Vergrößerung von 1700 keine relevanten Beobachtungen gemacht werden.

²⁹⁹Vgl.: Tabelle 23 S. 68.

³⁰⁰Vgl.: Tabelle 24, 25 und 26 S. 69.

³⁰¹Vgl.: Tabelle 22 S. 67 und Tabelle 19 S. 63.

Tabelle 24: Methode A: Werte der prozentual von Bakterien bedeckten Oberfläche (%) im Vergleich zur Fluoreszenzintensität für die höchste Bakterienakkumulation bei einer Vergrößerung von 1700:

Methode A mit Speichelinkubation	%	Fluoreszenzintensität
<i>Palapress vario</i>	30,0	hoch
Polyethylen	36,5	mittel
Glas	10,6	niedrig
Methode A ohne Speichelinkubation	%	Fluoreszenzintensität
<i>Palapress vario</i>	24,8	niedrig
Polyethylen	20,3	mittel
Glas	27,8	hoch

Tabelle 25: Methode B: Werte der prozentual bedeckten Oberfläche (%) im Vergleich zur Fluoreszenzintensität für die höchste Bakterienakkumulation bei einer Vergrößerung von 1700:

Methode B mit Speichelinkubation	%	Fluoreszenzintensität
<i>Palapress vario</i>	13,6	mittel
Polyethylen	36,5	hoch
Glas	10,3	niedrig
Methode B ohne Speichelinkubation	%	Fluoreszenzintensität
<i>Palapress vario</i>	25,8	niedrig
Polyethylen	53,1	hoch
Glas	26,6	mittel

Tabelle 26: Methode C: Werte der prozentual bedeckten Oberfläche (%) im Vergleich zur Fluoreszenzintensität für die höchste Bakterienakkumulation bei einer Vergrößerung von 1700:

Methode C mit Speichelinkubation	%	Fluoreszenzintensität
<i>Palapress vario</i>	25,1	mittel
Polyethylen	33,1	hoch
Glas	24,7	niedrig
Methode C ohne Speichelinkubation	%	Fluoreszenzintensität
<i>Palapress vario</i>	27,7	niedrig
Polyethylen	31,8	hoch
Glas	25,8	mittel

2.4 Analyse der Oberflächenrauhigkeit

Es wurden wiederum 30 % der Prüfkörper aus *Palapress vario* und Polyethylen zufällig ausgewählt und mit einem profilometrischen Rauigkeitsmeßgerät jeweils an zwei marginalen und einer zentralen Stelle untersucht, um den Einfluss der Oberflächenrauhigkeit auszuschließen. Die Prüfkörper aus Glas wurden aufgrund ihrer geringen Schichtstärke nicht untersucht. Alle Ergebnisse lagen unter der geforderten Rauigkeit von 0,08 µm, bei der kein Einfluss auf die Adhäsion von Bakterien und Speichelbestandteilen an den Prüfkörper besteht.³⁰²

³⁰²Vgl.: Tabelle 27 S. 71

Tabelle 27: Ergebnisse der Meßwerte der Oberflächenrauigkeit:

Material	Meßstelle 1 in µm	Meßstelle 2 in µm	Meßstelle 3 in µm
Palapress vario 1	0,04	0,04	0,04
Palapress vario 2	0,04	0,04	0,04
Palapress vario 3	0,08	0,08	0,08
Palapress vario 4	0,08	0,08	0,04
Palapress vario 5	0,04	0,04	0,04
Palapress vario 6	0,04	0,04	0,04
Palapress vario 7	0,04	0,08	0,04
Palapress vario 8	0,04	0,04	0,08
Palapress vario 9	0,04	0,08	0,04
Palapress vario 10	0,04	0,08	0,04
Palapress vario 11	0,04	0,08	0,04
Palapress vario 12	0,08	0,08	0,04
Palapress vario 13	0,08	0,04	0,08
Palapress vario 14	0,04	0,04	0,04
Palapress vario 15	0,08	0,08	0,04
Palapress vario 16	0,04	0,08	0,04
Palapress vario 16	0,04	0,08	0,04
Palapress vario 17	0,08	0,08	0,04
Palapress vario 18	0,04	0,08	0,04
Palapress vario 19	0,08	0,08	0,08
Palapress vario 20	0,08	0,04	0,08
Palapress vario 21	0,04	0,04	0,08
Palapress vario 22	0,04	0,08	0,04
Palapress vario 23	0,04	0,08	0,08
Palapress vario 24	0,08	0,04	0,08
Palapress vario 25	0,04	0,04	0,08
Polyethylen 1	0,08	0,08	0,04
Polyethylen 2	0,08	0,04	0,04
Polyethylen 3	0,08	0,08	0,04
Polyethylen 4	0,08	0,08	0,04
Polyethylen 5	0,04	0,04	0,08
Polyethylen 6	0,04	0,04	0,08
Polyethylen 7	0,04	0,04	0,08
Polyethylen 8	0,08	0,04	0,04
Polyethylen 9	0,04	0,08	0,08
Polyethylen 10	0,08	0,08	0,08
Polyethylen 11	0,08	0,04	0,08
Polyethylen 12	0,08	0,08	0,08
Polyethylen 13	0,08	0,08	0,04
Polyethylen 14	0,04	0,08	0,04
Polyethylen 15	0,08	0,04	0,04
Polyethylen 16	0,04	0,08	0,08
Polyethylen 17	0,08	0,08	0,04
Polyethylen 19	0,08	0,04	0,04
Polyethylen 20	0,08	0,08	0,08
Polyethylen 21	0,08	0,04	0,08
Polyethylen 22	0,04	0,08	0,08
Polyethylen 23	0,04	0,08	0,08
Polyethylen 24	0,04	0,08	0,04
Polyethylen 25	0,08	0,04	0,04

3 Hauptversuche

3.1 Analyse der relativen Fluoreszenzintensitäten in den Versuchen unter dynamischen Bedingungen

3.1.1 Fließkammer mit Speichelpellikel und mit dem Farbstoff Resazurin

Der Versuchsaufbau entsprach dem in Material und Methoden unter 5.2 beschriebenen unter Verwendung der Materialien *Sinfony*, *Palapress vario* und Zahnschmelz.³⁰³

Die einfaktorielle ANOVA zeigte signifikante Unterschiede in der relativen Fluoreszenzintensität zwischen den Gruppen ($p<0,001$). Der Levene-Test deutete auf eine homogene Verteilung der Gruppenvarianzen hin ($p=0,097$); aus diesem Grund wurden die anschließenden paarweisen Vergleiche mit dem Tukey-HSD-Test durchgeführt. Dieser zeigte eine signifikant höhere relative Fluoreszenzintensität für Zahnschmelz als für *Palapress vario* und *Sinfony*. Zwischen *Sinfony* und *Palapress vario* waren die Unterschiede nicht signifikant, was auf eine ähnlich hohe relative Fluoreszenzintensität bei den Materialien *Sinfony* und *Palapress vario* hindeutet, während Zahnschmelz eine wesentlich höhere relative Fluoreszenzintensität aufwies³⁰⁴.

³⁰³Vgl.: Material und Methoden S. 43ff.

³⁰⁴Vgl.: Abb. 18 S. 73 und Tabelle 28 S. 73.

Abbildung 18: Versuche unter dynamischen Bedingungen mit dem Farbstoff Resazurin mit vorheriger Pellikelbildung, relative Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von dem Material

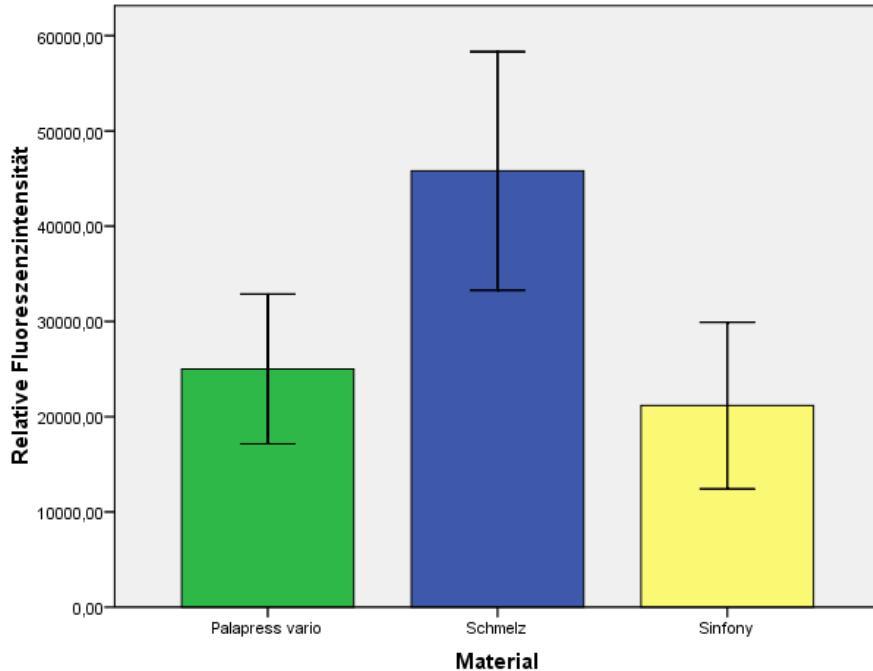


Tabelle 28: statistische Auswertung mit dem Tukey-HSD-Test (rot=signifikanter Unterschied, schwarz=kein signifikanter Unterschied):

Verglichene Materialien	Fließkammer mit Resazurin und Speichel
Palapress vario- Zahnschmelz	<0,001
Palapress vario- Sinfony	0,639
Zahnschmelz- Sinfony	<0,001

3.1.2 Fließkammer ohne Speichelpellikel und mit dem Farbstoff Resazurin

Der Versuchsaufbau entsprach dem in Material und Methoden unter 5.2 beschriebenen unter Verwendung der Materialien *Sinfony*, *Palapress vario* und *Zahnschmelz*.³⁰⁵

Die einfaktorielle ANOVA zeigte signifikante Unterschiede in der relativen Fluoreszenzintensität zwischen den Gruppen ($p<0,001$). Da der Levene-Test auf eine heterogene Verteilung der Varianzen hinwies ($p=0,005$), wurden die paarweisen Vergleiche mit dem Games-Howell-Test durchgeführt. Dabei war die relative Fluoreszenzintensität bei

³⁰⁵Vgl.: Material und Methoden S. 43ff.

Zahnschmelz signifikant höher als bei *Sinfony* und *Palapress vario*. Zwischen den Materialien *Sinfony* und *Palapress vario* waren keine signifikanten Unterschiede zu verzeichnen³⁰⁶.

Abbildung 19: Versuch unter dynamischen Bedingungen mit dem Farbstoff Resazurin ohne vorherige Pellikelbildung, relative Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von dem Material

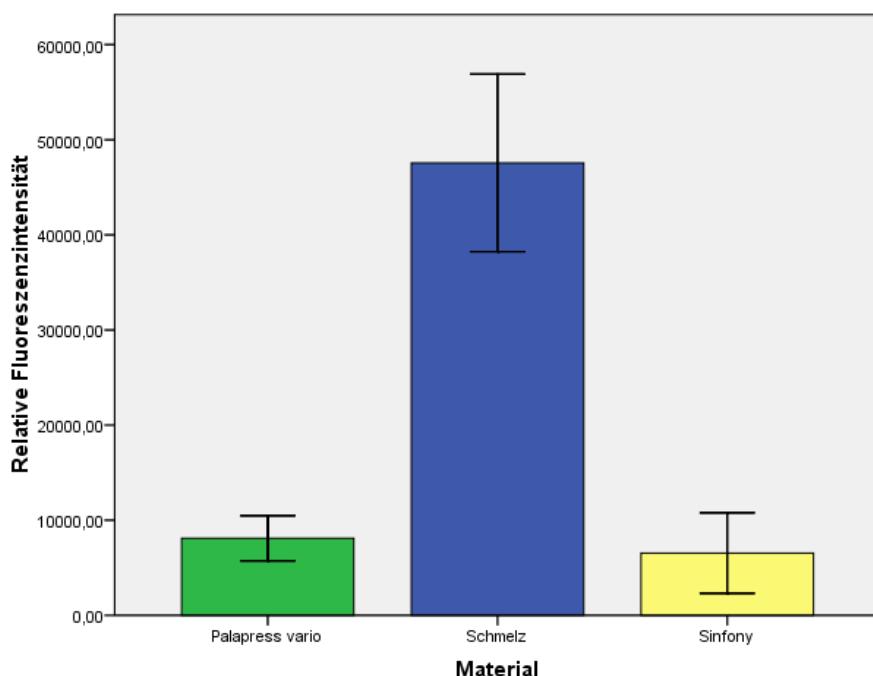


Tabelle 29: statistische Auswertung mit dem Games-Howell-Test (rot=signifikanter Unterschied, schwarz=kein signifikanter Unterschied)

Verglichene Materialien	Fließkammer ohne Speichel und mit Resazurin
<i>Palapress vario</i> - Zahnschmelz	< 0,001
<i>Palapress vario</i> - <i>Sinfony</i>	0,613
Zahnschmelz- <i>Sinfony</i>	< 0,001

3.1.3 Fließkammer mit Speichelpellikel und mit dem Farbstoff *Cytox Violet®*

Der Versuchsaufbau entsprach dem unter 5.2 beschriebenen unter Verwendung der Materialien *Sinfony*, *Palapress vario* und Zahnschmelz.³⁰⁷

Die einfaktorielle ANOVA wies signifikante Unterschiede in der relativen Fluoreszenzintensität zwischen den Gruppen auf ($p<0,001$). Da der Levene-Test auf eine homogene Verteilung der Varianzen hinwies ($p=0,900$), wurden die paarweisen Vergleiche

³⁰⁶Vgl.: Abb. 19 S. 74 und Tabelle 29 S. 74.

³⁰⁷Vgl.: Material und Methoden S. 47ff.

mit dem Tukey-HSD-Test durchgeführt. Dieser zeigte eine signifikant höhere relative Fluoreszenzintensität bei dem Material *Palapress vario* als bei *Sinfony* und eine signifikant höhere relative Fluoreszenzintensität bei Zahnschmelz als bei *Sinfony*. Die Unterschiede zwischen Zahnschmelz und *Palapress vario* waren nicht signifikant, was darauf hindeutet, dass die relative Fluoreszenzintensität bei Zahnschmelz und *Palapress vario* wesentlich höher ist als bei *Sinfony*³⁰⁸.

Abbildung 20: Versuch unter dynamischen Bedingungen mit dem Farbstoff *Cytox Violet®* mit vorheriger Pellikelbildung, relative Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von dem Material

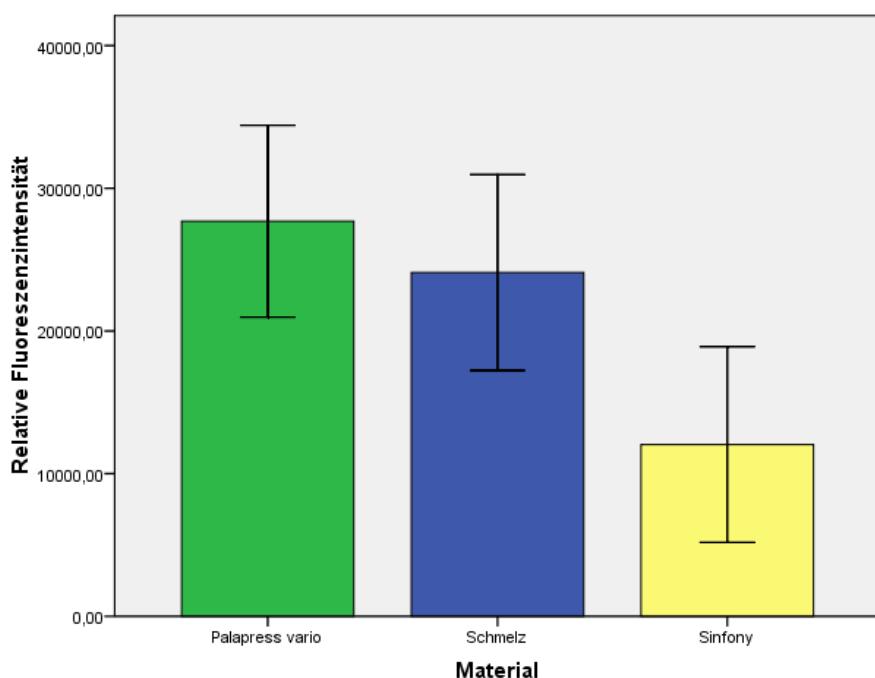


Tabelle 30: statistische Auswertung mit dem Tukey-HSD-Test (rot=signifikanter Unterschied, schwarz=kein signifikanter Unterschied)

Verglichene Materialien	Fließkammer mit Speichel und <i>Cytox Violet®</i>
<i>Palapress vario</i> - Zahnschmelz	0,514
<i>Palapress vario</i> - <i>Sinfony</i>	<0,001
Zahnschmelz- <i>Sinfony</i>	0,003

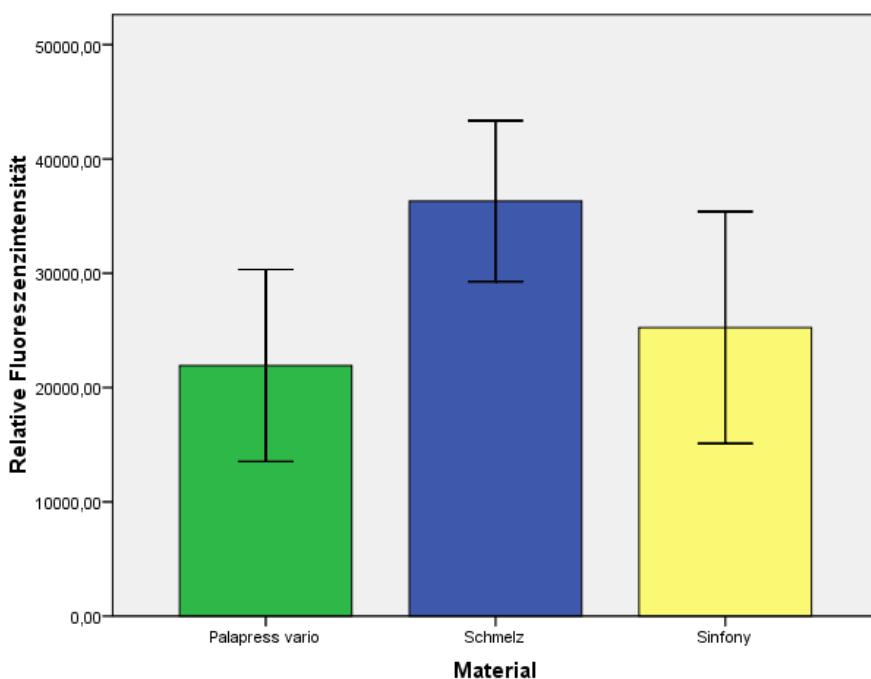
³⁰⁸Vgl.: Abb. 20 S. 75 und Tabelle 30 S. 75.

3.1.4 Fließkammer ohne Speichelpellikel und mit dem Farbstoff *Cytox Violet®*

Der Versuchsaufbau entsprach dem in Material und Methoden unter 5.2 beschriebenen unter Verwendung der Materialien *Sinfony*, *Palapress vario* und Zahnschmelz.³⁰⁹

Die einfaktorielle ANOVA wies signifikante Unterschiede in der relativen Fluoreszenzintensität zwischen den Gruppen ($p=0,04$) auf. Der Levene-Test deutete auf eine homogene Verteilung der Gruppenvarianzen hin ($p=0,584$); aus diesem Grund wurden die anschließenden paarweisen Vergleiche mit dem Tukey-HSD-Test durchgeführt. Dabei zeigte Zahnschmelz eine signifikant höhere relative Fluoreszenzintensität als *Palapress vario*. Zwischen den Materialien Zahnschmelz und *Sinfony* sowie zwischen *Palapress vario* und *Sinfony* gab es keine signifikanten Unterschiede. Dies weist darauf hin, dass die relative Fluoreszenzintensität bei dem Material Zahnschmelz signifikant höher ist als bei *Palapress vario*³¹⁰.

Abbildung 21: Versuch unter dynamischen Bedingungen mit dem Farbstoff *Cytox Violet®* ohne vorherige Pellikelbildung, relative Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von dem Material



³⁰⁹Vgl.: Material und Methoden S. 47ff.

³¹⁰Vgl.: Abb. 21 S. 76 und Tabelle 31 S. 77.

Tabelle 31: statistische Auswertung mit dem Tukey-HSD-Test (rot=signifikanter Unterschied, schwarz=kein signifikanter Unterschied)

Verglichene Materialien	Fließkammer ohne Speichel und mit <i>Cytox Violet®</i>
<i>Palapress vario</i> - Zahnschmelz	0,05
<i>Palapress vario</i> - <i>Sinfony</i>	0,679
Zahnschmelz- <i>Sinfony</i>	0,31

3.2 Analyse der Standardabweichungen

Auch bei den Hauptversuchen wurde zum einen die relative Höhe der Standardabweichungen und zum anderen die Abweichung prozentual zu den gemessenen relativen Fluoreszenzintensitäten eruiert. Die relativen Standardabweichungen waren bei den Versuchen unter dynamischen Bedingungen (Hauptversuche) bei Anwendung der Methoden A und C mit und ohne vorherige Pellikelbildung ähnlicher als bei den semistatischen Versuchen (Vorversuche). Sowohl bei den Versuchen mit als auch ohne vorherige Pellikelbildung wurden für die Prüfkörper aus Zahnschmelz und *Sinfony* bei Anwendung der Methode A niedrigere relative Standardabweichungen gemessen als bei Anwendung der Methode C, während die relative Standardabweichung für die Prüfkörper aus *Palapress vario* bei Anwendung der Methode A etwas höher war als bei Anwendung der Methode C.³¹¹

Betrachtet man die Abweichungen prozentual zu den gemessenen relativen Fluoreszenzintensitäten, so wurden in den Versuchen ohne vorherige Pellikelbildung bei Anwendung der Methode C für die Prüfkörper aus *Sinfony* und *Palapress vario* niedrigere prozentuale Werte gemessen, während für den Prüfkörper aus Zahnschmelz bei Anwendung der Methode A die prozentualen Werte niedriger waren als bei Anwendung der Methode C.³¹² Bei den Versuchen mit vorheriger Pellikelbildung traten unter Anwendung der Methode C für die Materialien Zahnschmelz und *Palapress vario* die niedrigsten prozentualen Abweichungen von der relativen Fluoreszenzintensität auf, während bei Anwendung der Methode A die niedrigste prozentuale Standardabweichung für die Prüfkörper aus *Sinfony* gemessen wurden.³¹³

³¹¹Vgl. Tabelle 32 und 33 S. 78.

³¹²Vgl.: Tabelle 32 S.78.

³¹³Vgl.: Tabelle 33 S.78.

Tabelle 32: Standardabweichungen der Methoden A und C ohne vorherige Pellikelbildung: relativ und prozentual im Vergleich

ohne Pellikelbildung	Methode A		Methode C	
	relativ	prozentual	relativ	prozentual
Zahnschmelz	800,0	91,4	3700,0	172,0
Palapress vario	1937,5	162,8	1900,0	52,8
Sinfony	875,0	140,0	1580,0	63,2

Tabelle 33: Standardabweichungen der Methoden A und C mit vorheriger Pellikelbildung: relativ und prozentual im Vergleich

mit Pellikelbildung	Methode A		Methode C	
	relativ	prozentual	relativ	prozentual
Zahnschmelz	1625,00	63,4	1720,0	63,2
Palapress vario	2562,5	53,9	1360,0	47,2
Sinfony	1187,5	76,0	1360,0	113,3

3.3. Analyse der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen

Analog zu den Vorversuchen wurde auch hier jeweils der Prüfkörper mit der höchsten und niedrigsten relativen Fluoreszenzintensität im Rasterelektronenmikroskop bei 1700-facher und 3800-facher Vergrößerung untersucht.

Da nicht alle Prüfkörper im Rasterelektronenmikroskop untersucht wurden, sondern jeweils nur der mit der höchsten und niedrigsten relativen Fluoreszenzintensität, ist ein Vergleich dieser beiden Quantifizierungsmethoden schwierig. Die relativen Fluoreszenzintensitäten wurden deshalb vereinfacht in hoch, mittel und niedrig eingeteilt. Dabei korrelieren bei allen vier Fließkammern mit den Werten der prozentual bedeckten Oberfläche bei 1700-facher Vergrößerung für die Prüfkörper mit den erzielten Fluoreszenzintensitäten.³¹⁴ Bei einer Vergrößerung von 3800 konnten im Gegensatz zu den Bildern bei einer Vergrößerung von 1700 keine relevanten Beobachtungen gemacht werden.

³¹⁴Vgl.: Tabelle 34 und 35 S. 79.

Tabelle 34: Fließkammern mit Resazurin mit und ohne Pellikel: Werte der prozentual mit Bakterien bedeckten Oberfläche (%) im Vergleich zur Höhe der Fluoreszenzintensität bei einer Vergrößerung von 1700

Fließkammer mit Speichelinkubation	%	Fluoreszenzintensität
<i>Palapress vario</i>	38,4	mittel
Zahnschmelz	77,3	hoch
<i>Sinfony</i>	29,3	niedrig
Fließkammer ohne Speichelinkubation	%	Fluoreszenzintensität
<i>Palapress vario</i>	35,5	mittel
Zahnschmelz	56,2	hoch
<i>Sinfony</i>	19,6	niedrig

Tabelle 35: Fließkammer mit *Cytox Violet®* mit und ohne Pellikel: Werte der prozentual mit Bakterien bedeckten Oberfläche (%) im Vergleich zur Höhe der Fluoreszenzintensität bei einer Vergrößerung von 1700

Fließkammer mit Speichelinkubation	%	Fluoreszenzintensität
<i>Palapress vario</i>	58,1	hoch
Zahnschmelz	49	mittel
<i>Sinfony</i>	33,2	niedrig
Fließkammer ohne Speichelinkubation	%	Fluoreszenzintensität
<i>Palapress vario</i>	29,7	niedrig
Zahnschmelz	55,7	hoch
<i>Sinfony</i>	45,2	mittel

3,4. Analyse der Oberflächenrauigkeit

Auch in den Hauptversuchen wurden, um den Einfluss der Oberflächenrauigkeit auf die Pellikel- und Bakterienadhäsion auszuschließen, 30 % der Prüfkörper aus *Palapress vario* und *Sinfony* wurden zufällig ausgewählt und mit einem profilometrischen Rauigkeitsmeßgerät jeweils an zwei marginalen und einer zentralen Stelle untersucht. Die Prüfkörper aus Rinderzahnschmelz wurden aufgrund dessen, dass Zahnschmelz nicht polierbar ist, nicht untersucht. Alle Ergebnisse lagen unter der geforderten Rauigkeit von 0,08 µm, bei der kein Einfluss auf die Adhäsion von Bakterien und Speichelbestandteilen an den Prüfkörper besteht.³¹⁵

³¹⁵Vgl.: Tabelle 36 S. 80.

Tabelle 36: Ergebnisse der Meßwerte der Oberflächenrauigkeit:

Material	Meßstelle 1 in µm	Meßstelle 2 in µm	Meßstelle 3 in µm
<i>Palapress vario 1</i>	0,04	0,04	0,04
<i>Palapress vario 2</i>	0,04	0,04	0,04
<i>Palapress vario 3</i>	0,04	0,04	0,04
<i>Palapress vario 4</i>	0,04	0,04	0,04
<i>Palapress vario 5</i>	0,04	0,04	0,04
<i>Palapress vario 6</i>	0,04	0,04	0,04
<i>Palapress vario 7</i>	0,04	0,04	0,04
<i>Palapress vario 8</i>	0,04	0,04	0,04
<i>Palapress vario 9</i>	0,04	0,04	0,04
<i>Palapress vario 10</i>	0,04	0,04	0,04
<i>Palapress vario 11</i>	0,04	0,04	0,02
<i>Palapress vario 12</i>	0,04	0,04	0,04
<i>Sinfony 1</i>	0,04	0,04	0,04
<i>Sinfony 2</i>	0,04	0,04	0,04
<i>Sinfony 3</i>	0,04	0,04	0,04
<i>Sinfony 4</i>	0,04	0,04	0,04
<i>Sinfony 5</i>	0,04	0,04	0,04
<i>Sinfony 6</i>	0,04	0,04	0,04
<i>Sinfony 7</i>	0,04	0,04	0,02
<i>Sinfony 8</i>	0,04	0,04	0,04
<i>Sinfony 9</i>	0,04	0,04	0,04
<i>Sinfony 10</i>	0,04	0,04	0,04
<i>Sinfony 11</i>	0,04	0,04	0,04
<i>Sinfony 12</i>	0,04	0,04	0,04

V. Diskussion

1. Diskussion der Methoden

1.1 Experimentelle Pellikelbildung

Die experimentelle Pellikelbildung beginnt schon wenige Sekunden, nachdem eine Oberfläche dem Speichel ausgesetzt wird.³¹⁶ Sie kann prinzipiell *in vitro* und *in vivo* stattfinden. Für die Pellikelbildung *in vivo* werden die zu untersuchenden Proben entweder mit Zement oder adhäsiv an den Zähnen befestigt³¹⁷ oder an einer Miniplastschiene, die über die Zähne gezogen wird.³¹⁸ Jedoch werden die Proben bei diesen Verfahren bereits vor der eigentlichen *in vivo* Pellikelbildung mit Mikroorganismen kontaminiert³¹⁹ und dadurch die späteren Ergebnisse bereits bei der Pellikelbildung verfälscht. Die Arbeitsgruppe um Lie konnte nach zweistündiger Pellikelbildung *in situ* Mikroorganismen im Pellikel nachweisen.³²⁰ Außerdem kann je nach Lokalisation im stomatognathen System die Pellikelzusammensetzung und -dicke stark schwanken.³²¹ So stellten Amaechi et al. fest, dass das Pellikel an der lingualen Seite der unteren Frontzähne am dicksten (1,06 µm) ist, während es an den palatalen Flächen der oberen Frontzähne am dünnsten ist (0,3 µm).³²² Von weiterem Interesse sind bei der Pellikelbildung *in situ* auch die Scherkräfte und Selbstreinigungs Kräfte (z.B. durch Zungen- und Wangenbewegungen) und die Wirkung von antibakteriellen Substanzen und Mechanismen wie etwa die Anwesenheit von agglutinierenden Substanzen, die letztendlich auch zu einer unterschiedlichen Dicke des Pelliels führen.³²³ Außerdem ist die residuale Mundflora bei Versuchsbedingungen *in situ* je nach Versuchsaufbau antimikrobiellen Wirkstoffen und Agentien, wie sie etwa in Zahnpasten und Mundspülösungen zur Plaquekontrolle enthalten sind, ausgesetzt. Durch die Agentien zur Plaquekontrolle werden bereits adhäsente Bakterien wieder entfernt und die erneute Adhäsion vermindert, während durch antimikrobielle Substanzen die Bakterien abgetötet werden und ihr Wachstum gehemmt wird.³²⁴

³¹⁶Walmann et al., 1992; Hannig, 1999.

³¹⁷Lie, 1975; Amaechi et al., 1999.

³¹⁸Hannig, 1999.

³¹⁹Li et al., 2004b.

³²⁰Li et al., 2004b.

³²¹Carlen, 1998.

³²²Amaechi et al., 1999.

³²³Amaechi et al., 1999; Hannig et al., 1999, Marsh et al., 2003.

³²⁴Marsh et al., 2003.

In den vorliegenden Untersuchungen wurde aus den oben genannten Gründen und der damit verbundenen mangelnden Standardisierbarkeit und Reproduzierbarkeit die Pellikelbildung *in vitro* bevorzugt.

In der Literatur gibt es verschiedene Angaben über die Zeitspanne, die benötigt wird, bis sich ein Pellikel *in vitro* mit ausgeglichenen Adsorptions- und Desorptionsvorgängen ausgebildet hat. Die Angaben reichen von 20 Minuten³²⁵ bis zu eineinhalb Stunden.³²⁶ Die Arbeitsgruppe um Pratt-Tepstra fand Unterschiede in der Anzahl der Bakterien auf einem in fünf Minuten gebildeten und einem in zwei Stunden gebildeten Pellikel *in vitro*.³²⁷ Diese Unterschiede begründen sie damit, dass *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) überwiegend an hochmolekulare Speichelbestandteile bindet,³²⁸ die sich erst in der späten Phase des Pellikelwachstums ausbilden.³²⁹ Auch Oberleitner kam in einer Studie, in der er die absorbierten Proteine zwischen dem Zeitpunkt 0 und 24 Stunden untersuchte, zu dem Ergebnis, dass eine Inkubationszeit von zwei Stunden für ein ausgewogenes Pellikel *in vitro* ausreichend ist und das Pellikel ab diesem Zeitpunkt in seiner Dicke konstant bleibt.³³⁰ Deshalb wurde in dieser Arbeit eine Pellikelbildungszeit von zwei Stunden gewählt. Diese garantiert zum einen die Bildung eines ausgewogenen Pellikels und zum anderen optimale Adhäsionsbedingungen für *S. mutans*. Jedoch gewährleistet eine Pellikelbildung *in vitro* nicht, dass die tatsächlichen Umstände einer Pellikelbildung *in vivo* komplett nachgeahmt werden können.³³¹ Daher bevorzugt Hannig für die genaue Erforschung der Prozesse, die bei der Pellikelbildung vonstatten gehen, die Pellikelbildung *in vivo*.³³²

Liegt der Schwerpunkt der Untersuchungen darin, dass die Versuchsbedingungen möglichst der Bakterienadhäsion *in vivo* entsprechen, ist eine Pellikelbildung vor der Bakterieninkubation sinnvoll. Werden potentiell toxische und hemmende Einflüsse des Probematerials untersucht, kann die Bakterienadhäsion ohne vorherige Pellikelbildung untersucht werden.³³³ In der vorliegenden Arbeit wurden beide Verfahren angewandt, um letztgenannten Aspekt zu berücksichtigen und um die Ergebnisse des Farbstoffes *Cytox Violet®* unter einer größtmöglichen Vielfalt an Versuchsbedingungen zu untersuchen. Die

³²⁵Vacca Smith et al., 2000.

³²⁶Sönju et al., 1973; Kuboki et al., 1987.

³²⁷Pratt-Terpstra et al., 1990.

³²⁸Gibbons et al., 1986.

³²⁹Kuboki et al., 1987; Amaechi et al., 1999.

³³⁰Oberleitner, 2008.

³³¹Hanning et al., 2009.

³³²Yao et al., 2001; Hannig et al., 2009.

³³³Hahnel, 2007.

Proben wurden in den Versuchsreihen ohne Pellicelbildung anstatt mit Speichel oder der Speichelersatzlösung nur mit PBS inkubiert.

Für die Pellicelbildung wurde sowohl eine von Hahnel entwickelte Speichelersatzlösung als auch humaner Speichel verwendet, wobei letzterer von einem Spender mit kariesfreiem und parodontal gesundem Gebiss stammt, um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse weitgehend zu gewährleisten. Der Speichel wurde, um eine Kontamination der Versuchsaufbauten mit weiteren, sich in der Mundhöhle befindlichen Bakterien zu vermeiden, filtriert. Die Filtration stellt dabei nur eine von vielen Möglichkeiten dar, den Speichel von Mikroorganismen zu befreien. Weitere in der Literatur beschriebene Methoden sind der Einsatz von sterilen Detergenzien wie Wasserstoffperoxid oder Chlorhexidin, die Zentrifugation und physikalische Methoden wie die Gamma- und UV-Bestrahlung. Die Zentrifugation und die Behandlung des Speichels mit Wasserstoffperoxid führen zwar zu einer Reduktion der Mikroorganismen, aber nicht zu einer ausreichenden Keimabreicherung, womit das Vorhandensein weiterer Bakterien nicht auszuschließen ist.³³⁴ Eine Zugabe von Chlorhexidin eignete sich für die vorliegende Untersuchung nicht, da es eine Oberflächenaktivität besitzt, die die Adhäsion von Mikroorganismen inhibiert.³³⁵ Der Nachteil der Filtration gegenüber der Gamma-Bestrahlung ist, dass der Proteingehalt des Speichels aufgrund der Undurchlässigkeit der Filter bis zu 50 Prozent reduziert wird.³³⁶ Jedoch ist die Gamma-Bestrahlung sehr zeitintensiv.³³⁷

Die Speichelersatzlösung setzte sich aus Albumin, Muzin, Lysozym und α -Amylase zusammen. Sie wurde in Anlehnung an die von Hahnel entwickelte Speichelersatzlösung verwendet, welche auf den auch in diesen Untersuchungen verwendeten *Streptococcus mutans*-Stamm abgestimmt worden ist.³³⁸ Dies ist sinnvoll, da Muzin MG 2, Lysozym und α -Amylase als Rezeptoren für die Bindung von Mikroorganismen fungieren³³⁹ und somit eine ausreichende Adhäsion des *S. mutans*, der *in vivo* keine zentrale Rolle bei der initialen Besiedlung der Plaque spielt,³⁴⁰ ermöglichen. Um die realen Verhältnisse zu simulieren, wurden sowohl menschlicher Speichel als auch Speichelersatzlösung während des Versuchsablaufs auf einer Temperatur von 37°C, die der Körpertemperatur entspricht, gehalten. Dies erfolgte in Anlehnung an weitere Studien, bei denen die Pellicelbildung bei

³³⁴Williams et al., 1963; Sreenbny et al., 1995.

³³⁵Goldberg et al., 1990.

³³⁶Ruhl et al., 2011.

³³⁷Williams et al., 1963; Sreenbny et al., 1995.

³³⁸Hahnel, 2007.

³³⁹Douglas, 1994; Hannig, 2006; Hannig, 2007b.

³⁴⁰Orstavik et al., 1974.

37°C stattfand.³⁴¹ Jedoch existieren auch Studien, bei denen das Pellikel bei Raumtemperatur³⁴² oder bei 4°C gebildet wurde.³⁴³ Um sicherzustellen, dass es während längerer Inkubationszeiten nicht zur Sedimentation einzelner Bestandteile der Speichel- oder Speichelersatzlösung kommt, wurden diese während der Inkubation ständig mit einem Rührfisch gerührt bzw. mittels Thermoschüttelgerät gerüttelt.

1.2 Auswahl des *Streptococcus mutans*

In den vorliegenden Untersuchungen wurde *S. mutans* als repräsentatives Bakterium für die Versuche ausgewählt, da *S. mutans* nahezu in der gesamten bezahlten Bevölkerung vorkommt.³⁴⁴ *S. mutans* spielt nachgewiesenermaßen zusammen mit *Streptococcus sobrinus* eine wichtige Rolle bei der Pathogenese von Karies³⁴⁵ und zählt mit einer Konzentration von 10⁵ Zellen pro ml Speichel zu den häufigsten Keimen des orofazialen Systems.³⁴⁶

S. mutans besitzt die Fähigkeit, an Speichelbestandteile zu binden³⁴⁷ und benötigt für seine Wachstumsprozesse *in vitro* keine weiteren Mikroorganismen als Kofaktoren, da es die Speichelbestandteile selbst fermentieren kann.³⁴⁸ Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass *S. mutans* *in vivo* gar nicht an das Pellikel, sondern an andere bereits adhärente Mikroorganismen bindet,³⁴⁹ da sich erst durch die Säureproduktion bereits adhärenter Bakterien eine optimale Nische für das Wachstum von *S. mutans* im stomatognathen System bildet.³⁵⁰

1.3 Experimentelle Bakterienadhäsion

Die Adhäsion von Mikroorganismen *in vivo* vollzieht sich in zwei Phasen: der initialen und der späteren, sekundären Bakterienadhäsion. Je nachdem, welche Phase und welcher Bakterienstamm untersucht werden soll, werden daher unterschiedlich lange Inkubationszeiten benötigt. Während für die initiale Bakterienadhäsion ein Zeitraum von wenigen Stunden ausreichend ist, muss für die Untersuchung der Plaquebildung und Reifung des Biofilms mit einem Zeitraum von mehreren Tagen bis Wochen gerechnet werden. Da für die Untersuchung der zweiten, späteren Phase ein deutlicher Mehraufwand an Zeit und

³⁴¹Orstavik et al., 1974; Satou et al., 1991.

³⁴²Carlen et al., 1998.

³⁴³Stinson et al., 1981.

³⁴⁴Sanderink et al., 2004.

³⁴⁵Loesche et al., 1975, Sanderink et al., 2004.

³⁴⁶Kawaschima et al., 2003.

³⁴⁷Peros et al., 1986; Koga et al., 1990, Koop et al., 1990.

³⁴⁸De Jong et al., 1987.

³⁴⁹Douglas et al., 1984.

³⁵⁰Klimek et al., 1999.

apparativen Bedingungen benötigt wird, wurde in der vorliegenden Untersuchung die initiale Phase als Untersuchungsgegenstand gewählt.

In vivo dauert es zwei bis vier Stunden, bis sich ein Pellikel mit adhärenten Mikroorganismen ausgebildet hat.³⁵¹ Daher muss man auch bei Versuchen *in vitro* von ähnlichen Zeiträumen ausgehen. In früheren Studien lassen sich dazu verschiedene Daten finden, die diese Annahme bestätigen. Es werden hier Inkubationsdauern von einer Stunde,³⁵² zwei Stunden,³⁵³ vier Stunden oder drei bis sechs Stunden genannt.³⁵⁴ Unter Berücksichtigung dessen, dass für die Pellikelbildung zwei Stunden ausreichend sind, wurde für die Adhäsion der Mikroorganismen ein Zeitraum von zweieinhalb Stunden gewählt, womit den ca. vier Stunden, die benötigt werden, bis sich *in vivo* ein Pellikel mit adhärenten Mikroorganismen gebildet hat,³⁵⁵ weitgehend Rechnung getragen wird.

Eine längere Inkubationszeit wäre möglich, wenn man der *S. mutans*-Suspension während der Inkubationszeit eine Nährlösung zuführen würde. Dies begründet sich darin, dass im Laufe der Zeit die Nährsubstrate verbraucht werden und mehr Stoffwechselprodukte anfallen, was letztendlich zu einem Wachstumsstopp der Kolonie in der stationären Phase bis hin zum Absterben der Kolonie in der Absterbephase, in der mehr Bakterien sterben als neu entstehen, führt.³⁵⁶ In manchen Studien wird *S. mutans* vom Beginn der Inkubationszeit eine Saccharosehaltige Nährlösung zugesetzt,³⁵⁷ da *S. mutans* extrazelluläre Polysaccharide bilden kann, die wiederum eine wichtige Rolle bei den Adhäsions- und Aggregationsprozessen von *S. mutans* spielen.³⁵⁸

Eine weitere Möglichkeit ist die Zugabe einer zuckerhaltigen Lösung zusammen mit dem Enzym Glykosyltransferase, da dies auch in freier, ungebundener Form im Pellikel gefunden wurde.³⁵⁹ Die Arbeitsgruppe um Shahal hat das Enzym aus Streptokokken gewonnen. Anschließend wurde das Enzym gereinigt, und die Proben wurden nach bereits erfolgter Pellikelbildung mit dem Enzym eine Stunde lang inkubiert, womit die Bildung von extrazellulären Polysacchariden induziert wurde.³⁶⁰

³⁵¹Montanaro et al., 2004.

³⁵²Orstavik et al., 1974.

³⁵³Montanaro et al., 2004; Rosentritt et al., 2008.

³⁵⁴Lee et al., 2009.

³⁵⁵Lie, 1975; Marsh et al., 2003.

³⁵⁶Sanderink et al., 2004.

³⁵⁷Kopec et al., 1995; Shahal et al., 1998; Kawai et al., 2000.

³⁵⁸Rosan et al., 2000.

³⁵⁹Schilling et al., 1988; Vacca Smith et al., 1996.

³⁶⁰Shahal et al., 1998.

Da die Glykosyltransferase B durch Lysozym und Albumin womöglich in ihrem Effekt verstärkt wird³⁶¹ und dieser Effekt nicht kalkulierbar ist, wurde in dieser Arbeit auf eine Zugabe des Enzyms verzichtet. Aus dem gleichen Grund wurde in der vorliegenden Studie auch keine saccharosehaltige Nährlösung zugegeben. Zudem sind Glucane zwar wichtig für die Adhäsion von *S. mutans*, jedoch sind diese Vorgänge eher in der zweiten Phase der bakteriellen Adhäsion von Bedeutung und nicht in der in dieser Studie untersuchten initialen Bakterienadhäsion.³⁶²

Da es auch bei der Bakterieninkubation zur Sedimentation der Bakterien kommt, wurde die Bakterienlösung während der Inkubationszeit auf 37°C gehalten und ständig gerührt oder gerüttelt. Außerdem wurde die Bakteriensuspension vor der Inkubation auf ihre optische Dichte untersucht, welche bei einer Wellenlänge von 500 nm 0,3 betragen sollte, um sicher zu gehen, dass in jedem Versuch eine ungefähr analoge Bakterienzahl verwendet wurde und die Ergebnisse somit reproduzierbar sind. Eine optische Dichte von 0,3 entspricht einer Anzahl von *S. mutans* von $3,65 \times 10^8$ Zellen/ml³⁶³ und liegt somit im Bereich der im stomatognathen System vorkommenden Bakterienzahl von 10^8 - 10^9 pro ml Speichel.³⁶⁴

1.4. Versuchsaufbau

Prinzipiell können Versuche *in vitro* unter statischen, semistatischen oder hydrodynamischen Bedingungen durchgeführt werden. Bereits hinsichtlich der Definition der Begriffe semistatisch und statisch gibt es Differenzen in der Literatur. Jedoch bezeichnen die meisten Autoren ein System als semistatisch, das ununterbrochen durch Rütteln oder Rotieren in Bewegung ist, während ein statisches System sich überhaupt nicht in Bewegung befindet.³⁶⁵ In der Literatur beschriebene Versuche fanden meist unter statischen oder semistatischen Bedingungen statt,³⁶⁶ jedoch können diese Methoden nicht die in der Mundhöhle auftretenden hydrodynamischen Verhältnisse, unter denen die Pellicelbildung *in vivo* stattfindet, sowie die Zungen- und Lippenbewegungen und Scherkräfte nachahmen.³⁶⁷ Die statischen und semistatischen Methoden bieten jedoch den Vorteil, dass sie wesentlich weniger zeitintensiv sind und wurden daher in dieser Arbeit neben und vergleichend zur hydrodynamischen Methode eingesetzt. In der vorliegenden Arbeit wurde die semistatische Methode gewählt,

³⁶¹Kho et al., 2005.

³⁶²Rosan et al., 2000.

³⁶³Satou et al., 1988.

³⁶⁴Marsh et al., 2003.

³⁶⁵Orstavik et al., 1974; Sardin et al., 2004.

³⁶⁶Satou et al. 1991; Montanaro et al., 2004; Imazato et al., 2006.

³⁶⁷Amaechi et al., 1999; Sharma et al., 2005.

weil mit ihr im Gegensatz zur statischen Methode zumindest in gewissem Maß die Simulation von Scherkräften möglich ist, wenn auch der dynamische Speichelfluss nicht studiert werden kann. Hierfür wurden die Proben in Wellplatten eingebracht und in einer Feuchtigkeitskammer eingeschlossen (um das Verdunsten der verwendeten Suspensionen zu vermeiden) und entsprechend der Inkubationszeit des Speichels und der Bakterienlösung in einem Schüttelgerät mit 53 Schüttelbewegungen pro Minute geschüttelt.

Fließkammersysteme haben sich mittlerweile als gängiges Versuchssystem etabliert, das die dynamischen Bedingungen, die in der Mundhöhle vorherrschen, simulieren kann.³⁶⁸ Zwischen den einzelnen in der Literatur beschriebenen Systemen variiert jedoch der Versuchsaufbau erheblich. Jedes dieser Systeme kann den konstanten Speichelfluss und die auftretenden Scherkräfte simulieren. Sowohl der konstante Speichelfluss als auch die auftretenden Scherkräfte wirken sich proportional auf die Adhäsion von Bakterien aus.³⁶⁹ In der vorliegenden Studie wurde die von Mühlfriedel entwickelte Fließkammer eingesetzt. Beim Aufbau einer Fließkammer ist es wichtig, dass analog zu den Verhältnissen in der Mundhöhle eine laminare und keine turbulente Strömung erzeugt wird.³⁷⁰ Des Weiteren ist die Kontrolle der Abscherkräfte³⁷¹ und der Reynoldzahl³⁷² im Gegensatz zu semistatischen Versuchsaufbauten möglich. Nur so sind reproduzierbare Versuchsbedingungen möglich, die sich den Bedingungen *in vivo* annähern. Daher entwickelte Mühlfriedel eine Fließkammer mit laminarem Strömungsprofil bei einer Speichelströmgeschwindigkeit von 1,875 ml/min. Die genaue Einhaltung dieser Strömungsgeschwindigkeit ist für eine gleichmäßige Bakterienadhäsion auf den Proben unabdingbar, was Mühlfriedel anhand der Untersuchung der Proben im REM feststellen konnte.³⁷³ Aus diesen Gründen wurde auch in der vorliegenden Arbeit eine Strömungsgeschwindigkeit von 1,875 ml pro Minute beibehalten. Mikroorganismen haften nur solange an einer Oberfläche, bis die Abscherkräfte die Adhäsionskräfte übersteigen. Die Arbeitsgruppe um Christersson stellte dabei fest, dass eine Steigerung der Fließrate um das 30-fache eine Reduktion der anhaftenden Bakterienzahl von 70-80% mit sich bringt.³⁷⁴ Einzelne Bakterien, die sich in Unebenheiten der Prüfkörper anhaften, sind zudem geringeren Scherkräften als Bakterienaggregate ausgesetzt.³⁷⁵

³⁶⁸Pratt-Terpstra et al., 1989; Busscher et al., 1992; Eick et al., 2004; Rosentritt et al., 2008.

³⁶⁹Christersson et al., 1989; Mohamed et al. 2000.

³⁷⁰Busscher et al., 1992.

³⁷¹Christersson et al., 1987.

³⁷²Bos et al., 1999.

³⁷³Mühlfriedel, 2009.

³⁷⁴Christersson et al., 1988.

³⁷⁵Hannig et al., 1998.

Unterstützend hierzu wurde beobachtet, dass die Abscherkräfte bei Partikeln, die einen Durchmesser von größer einem Mikrometer aufweisen, überproportional ansteigen.³⁷⁶

Die Verwendung einer Fließkammer bietet insbesondere dann einen Vorteil gegenüber semistatischen Versuchsaufbauten, wenn Versuchsabläufe länger als 24 Stunden dauern. Die Arbeitsgruppe um Eick hat festgestellt, dass nach 8 Stunden die Mikroorganismen nicht mehr genügend Nährstoffe haben und die toxischen Stoffwechselprodukte sie schädigen, womit die Anzahl der lebenden Bakterien abnimmt.³⁷⁷ Daher entwickelte sie, um einen Abtransport der Noxen zu gewährleisten, in einem zweiten Versuchsaufbau ein Fließkammersystem, bei dem sie nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden einen hohen Prozentsatz an lebenden Mikroorganismen gefunden hat.³⁷⁸

Fließkammern sind sehr sensible Systeme, die sehr störanfällig sind. Unter anderem verursacht zum Beispiel die Luft, die durch das Abpumpen der Lösung zwischen einem Medienwechsel entsteht, das Ablösen von bereits auf den Proben adhärenten Bakterien.³⁷⁹ Diese Tatsache wurde von der Arbeitsgruppe um Busscher genauer untersucht. In ihrem Versuchsaufbau wurde zunächst eine Pellicelbildung auf den Proben initiiert, dann die Bakterienlösung inkubiert und danach die adhärenten Mikroorganismen quantifiziert. Im Anschluss wurden die Proben mit PBS gespült, das abgesaugt wurde und die adhärenten Mikroorganismen ein zweites Mal quantifiziert. Sie fanden nach der zweiten Quantifizierung 50 % weniger Bakterien als bei der ersten³⁸⁰. Demzufolge kann der Lufteinstrom während des Medienwechsels zur Verfälschung der Ergebnisse führen, da sich die Bakterienanzahl dadurch vermindert. Trotzdem ist ein Medienwechsel ohne das komplette Abpumpen des Mediums nicht möglich, wenn die Medien nicht vermischt werden sollen; daher war der potentiell verfälschende Lufteinstrom in dieser Arbeit unumgänglich. Obwohl dies ein grundlegendes Problem der Fließkammersysteme darstellt, spielt es für einen vergleichenden Ansatz, wie er in der vorliegenden Arbeit angestrebt wird, keine entscheidende Rolle.

1.5 Quantifizierungsmethoden von Mikroorganismen in Versuchsaufbauten zur Biofilmbildung

Zur Quantifizierung von Mikroorganismen auf verschiedenen Probematerialien stehen vielfältige Methoden zur Verfügung. Diese sollten Kriterien wie eine einfache Handhabung,

³⁷⁶Liu, 2011.

³⁷⁷Eick et al., 1996.

³⁷⁸Eick et al., 2004.

³⁷⁹Busscher et al., 1992.

³⁸⁰Busscher et al., 1992.

geringen finanziellen Aufwand und eine ausreichende Genauigkeit erfüllen. Das Ziel der vorliegenden Arbeit lag darin, den Fluoreszenzfarbstoff Resazurin mit dem neueren Fluoreszenzfarbstoff *Cytox Violet®* zu vergleichen.

Prinzipiell stehen zur Quantifizierung von Mikroorganismen indirekte und direkte Methoden zur Verfügung,³⁸¹ Letztere erlauben eine visuelle Kontrolle der Bakterien.³⁸² Zu den indirekten Verfahren zählen beispielsweise die Bakterienkultivierung auf Agar-Platten, die Szintillationsmethode und diverse Fluoreszenzmarker.³⁸³ Zu den direkten Methoden gehören die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM), die Rasterelektronenmikroskopie (REM), die Atomkraftmikroskopie (AMF) und die Epifluoreszenzmikroskopie.

Der Vorteil der traditionellen Bakterienkultivierung auf Agar-Platten besteht darin, dass nur lebende Bakterien erfasst werden. Dies soll zwar auch mit den Fluoreszenzfarbstoffen erreicht werden, da diese ursprünglich für Viabilitätsuntersuchungen eingesetzt wurden, allerdings können bei der Resazurin-Reduktionsmethode auch schon bereits abgestorbene Bakterien aufgrund der langen Halbwertszeit des Resazurin noch ein Fluoreszenzsignal abgeben.³⁸⁴ Ein wesentliches Problem der Bakterienkultivierung ist außerdem, dass nicht alle Bakterien kultivierbar sind, dies ist bei *S. mutans* jedoch nicht der Fall.³⁸⁵ Die Bakterien werden dabei zumeist durch Ultraschall abgelöst, auf Agar-Platten aufgebracht und inkubiert. Nach einer weiteren Proliferationsperiode können sie dann anhand der Zahl der koloniebildenden Einheiten quantifiziert werden.³⁸⁶ Eine weitere Möglichkeit besteht darin, die mittels Ultraschall abgelösten Bakterien in Lösung zu bringen und diese dann kolorimetrisch zu quantifizieren. Der Grad des kolorimetrischen Signals korreliert dabei mit den in der Lösung enthaltenen Mikroorganismen.³⁸⁷ Medlhammer attestiert dieser Methode aber eine zu geringe Sensibilität.³⁸⁸ Zudem ist sie im Vergleich zu Fluoreszenzfarbstoffen sehr zeit- und arbeitsintensiv. Des Weiteren lassen sich desorbierte Biofilme mit dieser Methode nur schwer quantifizieren und auch das Ablösen des Pellikels ist schwierig, da dies zumeist nicht gesamtheitlich zu bewerkstelligen ist und somit nicht alle Bakterien erfasst werden.³⁸⁹ Aus den genannten Gründen kam die Bakterienkultivierung als Quantifizierungsmethode nicht in Frage.

³⁸¹An et al., 1997.

³⁸²An et al., 1997, Müller et al., 2007.

³⁸³An et al., 1997, Müller et al., 2007.

³⁸⁴O'Brien et al., 2000.

³⁸⁵Hannig et al., 2010.

³⁸⁶Olsson et al., 1992; Tanner et al., 2005.

³⁸⁷Medlhammer, 2003.

³⁸⁸Medlhammer, 2003.

³⁸⁹Hannig et al., 2007b; Hannig et al., 2010.

Die Szintillationsmethode wird in der Literatur relativ häufig beschrieben. Dabei werden die Mikroorganismen zunächst radioaktiv markiert und anschließend im Szintillationsgerät quantifiziert.³⁹⁰ Diese Methode ist zwar ein sehr sensitives „high-through output“-Verfahren, jedoch birgt sie auch Nachteile wie das Anfallen von radioaktiven Materialien und deren Abfallprodukten. Die Methode setzt daher den Einsatz eines speziellen Instrumentariums voraus und ist aufgrund der radioaktiven Substanzen mit einem hohen technischen und finanziellen Aufwand verbunden und damit speziellen Laboratorien vorbehalten.³⁹¹

Eine weitere, für die Untersuchung von Biofilmen geeignete Methode, ist die Bakteriengewichtsbestimmung mittels Analyse des Nassgewichts der Plaque.³⁹² Ein Nachteil dieser Methode ist, dass Mindestmengen erforderlich sind und somit die Adhäsion der Mikroorganismen in der initialen Phase kaum nachvollzogen werden kann.³⁹³ Diese Problematik lässt sich auch bei der Szintillationsmethode und der Kultivierung von Mikroorganismen auf Agar-Platten feststellen.³⁹⁴

Diverse Mikroskopiertechniken wie die Rasterelektronenmikroskopie (REM), die Atomkraftmikroskopie (AMF), die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) und andere stellen eine weitere Gruppe von möglichen Methoden dar. Der gemeinsame Vorteil dieser direkten Methoden ist, dass die Adhäsion der Mikroorganismen visuell kontrolliert wird.

Der Nachteil der Rasterelektronenmikroskopie ist die aufwändige Fixierungstechnik; zudem können bei dieser Technik lebende nicht von toten Bakterien unterschieden werden, da alle Bakterien durch den Fixierungsvorgang absterben. Um die Ergebnisse optisch zu kontrollieren, wurden in der vorliegenden Arbeit jeweils die Prüfkörper mit der höchsten und niedrigsten relativen Fluoreszenzintensität einer Versuchsreihe im REM analysiert. Die Transmissionselektronenmikroskopie ist eine Methode, die es erlaubt, sehr dünne Schichten des Biofilms zu untersuchen.³⁹⁵ Die TEM eignet sich vor allem für detaillierte Untersuchungen (Schichtstärken unter 0,1 nm³⁹⁶) von Bakterien und ihrer umgebenden Matrix oder für Untersuchungen am Pellikel. Nachteilig an der TEM ist, dass die TEM-Bilder nur einen kleinen Ausschnitt des untersuchten Materials anzeigen.³⁹⁷ Außerdem sind geeignete Schnitte von Kompositen mit einem Füllergehalt von bis zu 80% aufgrund des

³⁹⁰Shahal et al., 1998; Carlen et al., 2001; Ahn et al., 2002; Ahn et al., 2005.

³⁹¹An et al., 1997.

³⁹²Sissons et al., 1995.

³⁹³Sissons et al., 1995.

³⁹⁴Ahn et al., 1995 und 1997; Müller et al., 2007.

³⁹⁵Hannig et al., 2010.

³⁹⁶An et al., 1997.

³⁹⁷Gröger et al., 2006.

weichen Materials nur sehr schwierig zu erhalten.³⁹⁸ Überdies ist die Methode äußerst komplex und zeitintensiv.³⁹⁹ Sowohl die REM als auch die TEM sind aufgrund dessen, dass jeweils nur kleine Ausschnitte der Prüfkörper analysiert werden können, nicht ideal für die Quantifizierung von Mikroorganismen geeignet.

Mit der Atomkraftmikroskopie können Membrankomponenten und lebende Zellen direkt im Puffer oder auf einer Probe untersucht werden.⁴⁰⁰ Diese Methode hat den großen Vorteil, dass für die Untersuchung der Proben kein Vakuum benötigt wird.⁴⁰¹ Durch Zugabe von antimikrobiellen Agentien können außerdem strukturelle Veränderungen und darüber hinaus auch Zell-Zell-Interaktionen in Echtzeit beobachtet werden.⁴⁰² Der enorme Arbeits- und Zeitaufwand dieser Methode wurde jedoch für die Untersuchungen in dieser Arbeit als nicht praktikabel erachtet.

Letztendlich liegen die Hauptvorteile der Quantifizierung von Mikroorganismen mittels Fluoreszenzfarbstoffen in der einfachen und zeitsparenden Handhabung und der ausreichenden Präzision.⁴⁰³ Prinzipiell ist es möglich, mittels Fluoreszenzfarbstoffen Matrix-, Biofilm-Biomassen- und Vitalitätsuntersuchungen durchzuführen. In der vorliegenden Arbeit wurden die beiden Vitalitätsassays mit Resazurin und *Cytox Violet®* vergleichend eingesetzt. Resazurin wurde zudem auf seine Anwendungsart untersucht, in dem es einmal zusammen mit den Mikroorganismen und einmal erst nach stattgefunder Bakterieninkubation zugegeben wurde. Bei der Resazurin-Reduktionsmethode wird der blaue, nicht fluoreszierende Farbstoff Resazurin von lebenden Zellen zu dem fluoreszierenden Produkt Resorufin reduziert.⁴⁰⁴ Dabei besteht eine enge Korrelation zwischen der Zellzahl und der relativen Fluoreszenzintensität.⁴⁰⁵ Prinzipiell kann Resorufin kolorimetrisch und fluorometrisch gemessen werden. In dieser Arbeit wurde die laut O'Brien et al. sensitivere fluorometrische Methode angewandt.⁴⁰⁶ Jedoch kann insbesondere nach langen Inkubationszeiten durch die metabolische Aktivität der Mikroorganismen Resorufin weiter zu dem nicht fluoreszierenden Hydroresorufin reduziert werden; dies bedeutet, dass diese Zellen nicht mehr als metabolisch aktive Zellen erfasst werden. Außerdem können auch bereits abgestorbene Zellen, die zuvor Resazurin zu Resorufin reduziert haben, immer noch

³⁹⁸Goldbergs et al., 1990.

³⁹⁹Hannig & Balz, 1999; Hannig et al., 2008.

⁴⁰⁰Dufrene, 2008.

⁴⁰¹Dufrene, 2008.

⁴⁰²Dufrene, 2008.

⁴⁰³Peeters et al., 2008.

⁴⁰⁴Riss et al., 2003.

⁴⁰⁵O'Brien et al., 2000; Riss et al., 2003.

⁴⁰⁶O'Brien et al., 2000.

fluoreszieren.⁴⁰⁷ Diese beiden Fakten können daher vor allem nach längeren Inkubationszeiten die Präzision der konventionellen Resazurin-Reduktionsmethode, wie sie derzeit im biologischen Labor der Poliklinik für zahnärztliche Prothetik der Universität Regensburg angewendet wird, herabsetzen. Ein weiteres Problem ist, dass die Prüfkörper nach der Farbstoffinkubation mit PBS gespült werden, um zu vermeiden, dass bei der späteren Quantifizierung auch lose Bakterien mitgezählt werden. Jedoch kann eben dieser Waschvorgang auch zum Ablösen von lockeren adhärenen Bakterien führen und somit die Ergebnisse verfälschen. Allerdings tritt dieses Problem auch bei nahezu allen genannten Färbemethoden auf. Um diese nicht erwünschte Bakterienablösung zu reduzieren, wurde eine speziell für den Waschvorgang konzipierte Vorrichtung verwendet, die gewährleistet, dass die Spülflüssigkeit stets in einem Winkel von 45 Grad im Randbereich des Prüfkörpers auftrifft und somit geringe Abscherkräfte entstehen.

Ein neuerer fluoreszierender Farbstoff, der ähnlich wie die Resazurin-Reduktionsmethode im biologischen Labor der Poliklinik für zahnärztliche Prothetik der Universität Regensburg angewendet wird, ist *Cytox Violet®*. Die Farbstoffkombination misst gemäß Herstellerangabe die Aktivität der zellulären Dehydrogenase und erfasst sowohl adharente als auch die sich in Lösung befindenden Zellen. Dabei ist die Änderung in der Fluoreszenzintensität durch die Aktivität der zellulären Dehydrogenase direkt proportional zur Zellviabilität. Der Farbstoff wurde im Gegensatz zur konventionellen Resazurin-Reduktionsmethode jedoch nicht der Bakteriensuspension zugegeben, sondern erst, nachdem die bakterielle Adhäsion bereits erfolgt ist, für einen Zeitraum von zweieinhalb Stunden mit den am Prüfkörper adharenten Bakterien inkubiert. Der Überstand wird nach dieser Zeit abpipettiert und nur die relative Fluoreszenzintensität des Überstandes gemessen. Bei der konventionellen Resazurin-Reduktionsmethode muss hingegen vor dem eigentlichen Versuchsbeginn die Eigenfluoreszenz der Prüfkörper gemessen werden und diese in der späteren Auswertung aufwändig wieder von den zweiten Messwerten abgezogen werden. Allerdings wurde in den semistatischen Versuchen das Resazurin, zusätzlich zur konventionellen Resazurin-Reduktionsmethode, analog dem Fluoreszenzfarbstoff *Cytox Violet®* angewendet. Beide Methoden, bei denen der Überstand quantifiziert wurde, versprechen somit die in der Eigenfluoreszenz der Prüfkörper begründete Fehlerquelle auszuschalten.

⁴⁰⁷O'Brien et al., 2000.

2. Diskussion der Ergebnisse

2.1 Wahl der Fluoreszenzfarbstoffkonzentration

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurden für die drei verschiedenen Quantifizierungsmethoden (Methode A, B und C) in semistatischen Versuchsaufbauten die Fluoreszenzfarbstoffkonzentrationen festgelegt. Bei der konventionellen Resazurin-Reduktionsmethode (Methode A) wurden die Konzentrationen 7,5 µl, 15 µl und 30 µl pro ml Bakterienlösung zweieinhalb Stunden mit „*S. mutans*“ inkubiert, um den Einfluss der Fluoreszenzfarbstoffkonzentrationen auf die relative Fluoreszenzintensität zu untersuchen. Es wurden für alle drei Methoden die Probematerialien Glas, *Palapress vario* und Polyethylen verwendet.⁴⁰⁸ Während bei den Prüfkörpern aus Polyethylen und Glas die niedrigsten relativen Fluoreszenzintensitäten für die Konzentration 15 µl pro ml Bakterienlösung gemessen wurden, wurde für den Prüfkörper aus *Palapress vario* bei der Konzentration 15 µl pro ml Bakterienlösung eine mittlere relative Fluoreszenzintensität gemessen.⁴⁰⁹ Nach der statistischen Auswertung ließen die Ergebnisse auf keinen signifikanten Einfluss der drei Farbstoffkonzentrationen auf die relative Fluoreszenzintensität schließen. Daher wurde für die weiteren Versuche die mittlere Konzentration von 15 µl pro ml Bakterienlösung gewählt.⁴¹⁰ Im zweiten Versuch (Methode B) wurde auch Resazurin als Fluoreszenzfarbstoff verwendet, jedoch wurde zunächst die *S. mutans*-Lösung für zwei Stunden inkubiert und erst nach erfolgter Bakterienadhäsion Resazurin für zweieinhalb Stunden mit 1 ml PBS inkubiert.⁴¹¹ Für die weiteren Versuche wurde die Konzentration 15 µl pro ml PBS ausgewählt, da die höhere Konzentration von 30 µl pro ml PBS bei den Prüfkörpern aus *Palapress vario* und Polyethylen keine signifikante Steigerung der relativen Fluoreszenzintensität mehr bewirkte.⁴¹² Der Versuchsaufbau erfolgte in Anlehnung an die Forderung von O'Brien et al., dass Resazurin erst nach der kompletten Inkubationszeit der Bakterienlösung inkubiert werden soll. Dem liegt zu Grunde, dass zu hohe Fluoreszenzintensitäten durch die lange Halbwertszeit von Resazurin entstehen, indem Bakterien noch fluoreszieren, die bereits abgestorben sind⁴¹³ und dadurch die Ergebnisse verfälschen können. Außerdem kann durch diesen Versuchsaufbau die Umwandlung von Resazurin in das nicht fluoreszierende Produkt

⁴⁰⁸Vgl. Material und Methoden S. 38ff.

⁴⁰⁹Vgl.: Tabelle 37 und 38 S.95 und Tabelle 39 S. 96.

⁴¹⁰Vgl.. Ergebnisse S. 51ff.

⁴¹¹Vgl. Material und Methoden S. 38ff.

⁴¹²Vgl. Ergebnisse S. 53ff.

⁴¹³O'Brien et al., 2000.

Hydroresorufin vermieden werden.⁴¹⁴ Die von O'Brien vermuteten zu hohen relativen Fluoreszenzwerte durch Methode A können nicht bestätigt werden, da bei Methode B die relativen Fluoreszenzintensitäten generell stärker waren als bei Methode A.⁴¹⁵ Nicht vollständig ausgeschlossen werden kann hingegen, dass die Umwandlung von Resazurin in Hydroresorufin bereits nach einer Inkubationszeit von einer Stunde stattfindet,⁴¹⁶ da bei Methode A generell wesentlich niedrigere Fluoreszenzintensitäten als bei Methode B gemessen wurden. Bei Methode B konnte jedoch im Gegensatz zu Methode A ein signifikanter Einfluss der Konzentrationen, je nach verwendetem Material, auf die relativen Fluoreszenzintensitäten festgestellt werden. So war für den Prüfkörper aus Polyethylen die relative Fluoreszenzintensität für die Konzentration 7,5 µl pro ml PBS signifikant niedriger, für den Prüfkörper aus *Palapress vario* war die relative Fluoreszenzintensität bei der Konzentration 15 µl pro ml PBS signifikant höher und für den Prüfkörper aus Glas war die Konzentration von 7,5 µl pro ml PBS signifikant höher.⁴¹⁷ Auch ist es unwahrscheinlich, dass das Resazurin unterschiedlich metabolisiert wird, da derselbe Bakterienstamm verwendet wurde. Nicht auszuschließen ist allerdings, dass sich die Bakterien bei Methode B während der Inkubationszeit des Fluoreszenzfarbstoffes von zweieinhalb Stunden weiter vermehren und somit stärkere relative Fluoreszenzintensitäten erzeugt werden.

Bei dem Versuch nach Methode C wurde analog zu Methode B verfahren. Jedoch wurde der Fluoreszenzfarbstoff *Cytox Violet®* in den Konzentrationen 10 µl, 20 µl und 40 µl pro 200 µl PBS hinzugegeben und die relative Fluoreszenzintensität gemessen. Für die weiteren Versuche wurde die Konzentration von 20 µl pro 200 µl PBS ausgesucht, da es bei der Konzentration von 40 µl pro 200 µl PBS bei den Polyethylenproben wieder zur Abnahme der relativen Fluoreszenzintensität kam.⁴¹⁸ Die gemessenen relativen Fluoreszenzintensitäten waren bei Methode C im Vergleich zu Methode B und A am höchsten. Auch bei Methode C wurde wie bei Methode B ein signifikanter Einfluss der Konzentrationen je nach verwendetem Material festgestellt. Bei dem Prüfkörper aus *Palapress vario* war die relative Fluoreszenzintensität für die Konzentration 40 µl pro 200 µl PBS am höchsten. Für die Prüfkörper aus Glas und Polyethylen waren bei allen Konzentrationen die Unterschiede signifikant. Dabei war die relative Fluoreszenzintensität bei dem Material Glas für die Konzentration 40 µl pro 200 µl PBS am höchsten, während bei dem Material Polyethylen die

⁴¹⁴O'Brien et al., 2000.

⁴¹⁵Vgl.: Ergebnisse S. 51ff.

⁴¹⁶O'Brien et al., 2000.

⁴¹⁷Vgl.: Tabelle 37 und 38 S. 95 und Tabelle 39 S. 96.

⁴¹⁸Vgl. Ergebnisse S. 55f.

relative Fluoreszenzintensität für die Konzentration 20 µl pro 200 µl PBS am höchsten war.⁴¹⁹ Es ist durchaus möglich, dass der Fluoreszenzfarbstoff *Cytox Violet®* durch *S. mutans* anders metabolisiert wird als Resazurin, da zumindest bei Methode B die Inkubationszeiten für die Bakterienlösung und den Fluoreszenzfarbstoff gleich lang waren. Allerdings kann bei *Cytox Violet®* auch eine Interaktion des Fluoreszenzfarbstoffes mit dem Substrat in Frage kommen, da in diese Versuchsreihe keine Farbstoffkontrollen eingeführt wurden. Die relativen Fluoreszenzintensitäten bei Anwendung der Methoden A und C zeigten je nach verwendeter Farbstoffkonzentration bei den Prüfkörpern aus Glas und *Palapress vario* die gleichen Tendenzen, während sich bei den Prüfkörpern aus Polyethylen die Trends unter Anwendung der Methode B und C entsprachen.⁴²⁰ Jedoch zeigen diese Trends eine unterschiedliche Signifikanz, womit die drei Methoden unterschiedlich präzise sind.

Tabelle 37: Höhe der relativen Fluoreszenzintensitäten bei den Prüfkörpern aus *Palapress vario* in Abhängigkeit der verwendeten Methoden A, B und C und den verwendeten Fluoreszenzfarbstoffkonzentrationen (S=signifikanter Unterschied):

<i>Palapress vario</i>	Hohe Fluoreszenzintensität	mittlere Fluoreszenzintensität	niedrige Fluoreszenzintensität
Methode A	30 µl pro ml Bakterienlösung	15 µl pro ml Bakterienlösung	7,5 µl pro ml Bakterienlösung
Methode B	15 µl pro ml PBS (S)	30 µl pro ml PBS	7,5 µl pro ml PBS
Methode C	40 µl pro 200 µl PBS (S)	20 µl pro 200 µl PBS	10 µl pro 200 µl PBS

Tabelle 38: Höhe der relativen Fluoreszenzintensitäten bei den Prüfkörpern aus Polyethylen in Abhängigkeit der verwendeten Methoden A, B und C und den verwendeten Fluoreszenzfarbstoffkonzentrationen (S=signifikanter Unterschied):

Polyethylen	hohe Fluoreszenzintensität	mittlere Fluoreszenzintensität	niedrige Fluoreszenzintensität
Methode A	30 µl pro ml Bakterienlösung	7,5 µl pro ml Bakterienlösung	15 µl pro ml Bakterienlösung
Methode B	15 µl pro ml PBS (S)	30 µl pro ml PBS	7,5 µl pro ml PBS (S)
Methode C	20 µl pro 200 µl PBS (S)	40 µl pro 200 µl PBS (S)	10 µl pro 200 µl PBS (S)

⁴¹⁹Vgl.: Tabelle 37 und 38 S. 95 und Tabelle 39 S. 96.

⁴²⁰Vgl.: Tabelle 40 S. 96 und Tabelle 41 und 42 S. 97.

Tabelle 39: Höhe der relativen Fluoreszenzintensitäten bei den Prüfkörpern aus Glas in Abhängigkeit der verwendeten Methoden A, B und C und den verwendeten Fluoreszenzfarbstoffkonzentrationen (S=signifikanter Unterschied):

Glas	hohe Fluoreszenzintensität	mittlere Fluoreszenzintensität	niedrige Fluoreszenzintensität
Methode A	30 µl pro ml Bakterienlösung	7,5 µl pro ml Bakterienlösung	15 µl pro ml Bakterienlösung
Methode B	7,5 µl pro ml PBS (S)	30 µl pro ml PBS	7,5 µl pro ml PBS
Methode C	40 µl pro 200 µl PBS (S)	20 µl pro 200 µl PBS (S)	10 µl pro 200 µl PBS (S)

Die Unterschiede der drei Versuchsreihen liegen in der jeweiligen Präzision der Methode. Einen Hinweis auf diese liefern die Standardabweichungen. Diese sollten möglichst gering sein, da für alle zehn Prüfkörper einer Methode die gleichen Bedingungen herrschten. Hohe Standardabweichungen deuten daher auf eine mangelnde Präzision und Reproduzierbarkeit der Methode hin. Es wurden einerseits die relativen Standardabweichungen und andererseits die prozentuale Standardabweichung von der gemessenen relativen Fluoreszenzintensität ermittelt. Bei Anwendung der Methode A waren die relativen Standardabweichungen am niedrigsten. Die relativen Standardabweichungen bei Anwendung der Methode B waren wiederum wesentlich niedriger als die bei Anwendung der Methode C. Nicht berücksichtigt wurden die Standardabweichungen bei Anwendung der Methode C für den Prüfkörpern aus Polyethylen und der Fluoreszenzfarbstoffkonzentration 20 µl pro 200 µl PBS und die für den Prüfkörper aus *Palapress vario* und der Fluoreszenzfarbstoffkonzentration 40 µl pro 200 µl PBS, da diese aufgrund des Erreichens der Meßgrenze des Plattenlesegeräts gleich null waren.⁴²¹

Tabelle 40: Standardabweichungen der Methode A: relative und prozentuale Standardabweichung im Vergleich:

Methode A	relative Standardabweichung	Standardabweichung in %
Polyethylen: Konzentration 7,5 µl	400,0	123,1
Polyethylen: Konzentration 15 µl	400,0	133,4
Polyethylen: Konzentration 30 µl	1050,0	155,6
<i>Palapress:</i> Konzentration 7,5 µl	450,0	163,6
<i>Palapress:</i> Konzentration 15 µl	1000,0	181,8
<i>Palapress:</i> Konzentration 30 µl	2135,0	170,8
Glas: Konzentration 7,5 µl	825,0	750,0
Glas: Konzentration 15 µl	820,0	82,0
Glas: Konzentration 30 µl	925,0	80,4

⁴²¹Vgl.: Tabelle 40 S. 96 und Tabelle 41 und 42 S. 97.

Tabelle 41: Standardabweichungen der Methode B: relative und prozentuale Standardabweichung im Vergleich:

Methode B	relative Standardabweichung	Standardabweichung in %
Polyethylen: Konzentration 7,5 µl	5882,5	15,4
Polyethylen: Konzentration 15 µl	7059,0	16,4
Polyethylen: Konzentration 30 µl	2941,3	6,9
Palapress: Konzentration 7,5 µl	4117,8	9,7
Palapress: Konzentration 15 µl	4706,0	10,0
Palapress: Konzentration 30 µl	2353,0	5,4
Glas: Konzentration 7,5 µl	5882,5	12,2
Glas: Konzentration 15 µl	1176,5	2,8
Glas: Konzentration 30 µl	1176,5	2,8

Tabelle 42: Standardabweichungen der Methode C: relative und prozentuale Standardabweichung im Vergleich:

Methode C	relative Standardabweichung	Standardabweichung in %
Polyethylen: Konzentration 10 µl	11857,4	66,8
Polyethylen: Konzentration 20 µl	0	0
Polyethylen: Konzentration 40 µl	25000,5	51,7
Palapress: Konzentration 10 µl	6857,3	20
Palapress: Konzentration 20 µl	25000,5	58,3
Palapress: Konzentration 40 µl	0	0
Glas: Konzentration 10 µl	7857,3	30,5
Glas: Konzentration 20 µl	11000,2	25,2
Glas: Konzentration 40 µl	14286,0	22,7

Betrachtet man hingegen die prozentuale Standardabweichung so wurden bei Verwendung der Methode B die niedrigsten Standardabweichungen festgestellt, gefolgt von denen bei Anwendung der Methode C. Unter Anwendung der Methode A waren die prozentual ermittelten Standardabweichungen zum Teil größer als hundert Prozent der gemessenen relativen Fluoreszenzintensität und damit wesentlich höher als die bei der Anwendung der Methoden B und C.⁴²²

Aufgrund der prozentualen Standardabweichungen wurden unter Anwendung der Methode B die genauesten Ergebnisse erzielt. Methode C war bei dieser Versuchsreihe genauer als Methode A.

⁴²²Vgl.: Tabelle 40 S. 96 und Tabelle 41 und 42 S. 97.

2.2 Adhäsion von *S. mutans* mit und ohne Speichel in den semistatischen Versuchen im Vergleich

Weiterhin wurden die Methoden A, B und C mit und ohne Pellikelbildung mit den festgelegten Fluoreszenzfarbstoffkonzentrationen untersucht. Das Ziel bestand darin, den Einfluss der Pellikelbildung auf die relative Fluoreszenzintensität zu untersuchen und die Ergebnisse der verschiedenen Farbstoffe und Methoden zu vergleichen.

In den semistatischen Versuchen wurden hierzu die Methoden A, B und C mit den Materialien Polyethylen, *Palapress vario* und Glas untersucht.

In dieser Versuchsreihe konnten bei Methode A keine signifikanten Unterschiede in den relativen Fluoreszenzintensitäten festgestellt werden, sowohl mit als auch ohne vorherige Speichelinkubation.⁴²³ Das heißt, dass bei Methode A weder die Materialien noch die Pellikelbildung einen erheblichen Einfluss auf die relative Fluoreszenzintensität hatten. Jedoch nahmen die relativen Fluoreszenzintensitäten nach Pellikelbildung für die Prüfkörper aus *Palapress vario* zu und für die Prüfkörper aus Glas ab.⁴²⁴

Bei Methode B traten sowohl mit als auch ohne vorherige Pellikelbildung signifikante Unterschiede zwischen den Materialien auf. Während ohne Pellikelbildung die relative Fluoreszenzintensität bei den Polyethylen- und *Palapress vario*-Prüfkörpern signifikant höher war als bei den Prüfkörpern aus Glas, war dieses mit vorheriger Pellikelbildung nur bei den Polyethylenprüfkörpern signifikant höher. Tendenziell waren die relativen Fluoreszenzintensitäten der verschiedenen Materialien mit und ohne vorherige Pellikelbildung jedoch ähnlich; die relativen Fluoreszenzintensitäten waren bei den Prüfkörpern aus Polyethylen am höchsten, gefolgt von denen aus *Palapress vario* und den Prüfkörpern aus Glas.⁴²⁵ Es konnte bei Methode B somit ein signifikanter Einfluss des Materials und des Pelliels auf die relative Fluoreszenzintensität beobachtet werden. Da bei Methode A und B der gleiche Fluoreszenzfarbstoff (Resazurin) und dieselben Materialien verwendet wurden, sind die Unterschiede zwischen Methode A und B wahrscheinlich in der Präzision der jeweiligen Methode begründet.

Auch im zweiten Teil dieser Arbeit konnten die von O'Brien vermuteten Veränderungen in den relativen Fluoreszenzintensitäten durch den Zeitpunkt der Zugabe des Farbstoffes zur Bakterienlösung nicht beobachtet werden.⁴²⁶ Die relativen Fluoreszenzintensitäten waren bei Zugabe des Fluoreszenzfarbstoffes nach Bakterieninkubation generell höher als bei Zugabe

⁴²³Vgl.: Ergebnisse S. 62f. und Tabelle 43 und Tabelle 44 S. 99.

⁴²⁴Vgl.: Tabelle 43 und Tabelle 44 S. 99.

⁴²⁵Vgl.: Ergebnisse S. 64f. und Tabelle 43 und Tabelle 44 S. 99.

⁴²⁶O'Brien et al., 2000.

des Farbstoffes zur Bakterienlösung.⁴²⁷ Jedoch könnte der Grund hierfür wiederum in der Reduktion von Resazurin zu Hydroresorufin liegen oder in den kürzeren Inkubationszeiten bei Methode A, da nicht ausgeschlossen werden kann, dass sich nach der bloßen Bakterieninkubation die Bakterien während der Farbstoffinkubation weiter vermehren. Die Methode B wurde in den späteren Versuchen unter dynamischen Bedingungen nicht weiter verfolgt.

Methode C wies wie Methode A auf keine signifikanten Unterschiede zwischen den Materialien ohne Speichelinkubation hin, jedoch waren die Werte der relativen Fluoreszenzintensität für die Polyethylenproben mit vorheriger Speichelinkubation signifikant höher.⁴²⁸ Hier wurden wie bei Methode B für die Polyethylenproben wesentlich höhere relative Fluoreszenzintensitäten erzielt als für die Prüfkörper aus *Palapress vario* und Glas.⁴²⁹ Bei Methode C scheint die Pellikelbildung somit die relativen Fluoreszenzintensitäten zu beeinflussen.

Tabelle 43: Höhe der relativen Fluoreszenzintensitäten ohne vorherige Pellikelbildung in Abhängigkeit der Methode und des Materials (S=signifikanter Unterschied):

ohne Pellikelbildung	hohe Fluoreszenzintensität	mittlere Fluoreszenzintensität	niedrige Fluoreszenzintensität
Methode A	Glas	Polyethylen	<i>Palapress vario</i>
Methode B	Polyethylen (S)	<i>Palapress vario</i> (S)	Glas
Methode C	Polyethylen	Glas	<i>Palapress vario</i>

Tabelle 44: Höhe der relativen Fluoreszenzintensitäten mit vorheriger Pellikelbildung in Abhängigkeit der Methode und des Materials (S=signifikanter Unterschied):

mit Pellikelbildung	hohe Fluoreszenzintensität	mittlere Fluoreszenzintensität	niedrige Fluoreszenzintensität
Methode A	<i>Palapress vario</i>	Polyethylen	Glas
Methode B	Polyethylen (S)	<i>Palapress vario</i>	Glas
Methode C	Polyethylen (S)	Glas	<i>Palapress vario</i>

Die Anwendung der Methode A stellte zum Zeitpunkt der Untersuchungen den Standard des biologischen Labors der Poliklinik für zahnärztliche Prothetik der Universität Regensburg dar. Da bei allen drei Methoden dieselben Materialien verwendet wurden, sind die Abweichungen, die die verschiedenen Methoden zeigten, der Präzision der Quantifizierungsmethode geschuldet. Je niedriger die Standardabweichung ist, desto präziser

⁴²⁷Vgl. Ergebnisse S. 62ff.

⁴²⁸Vgl. Ergebnisse S. 65f. und Tabelle 43 und 44 S. 99.

⁴²⁹Vgl.: Tabelle 43 und Tabelle 44 S. 99.

und reproduzierbarer sind die Ergebnisse. Bei diesen Versuchen wurden die relativen und die prozentualen Standardabweichungen ermittelt. Bei den Versuchen ohne vorherige Pellikelbildung traten bei Anwendung der Methode B für die Prüfkörper aus Polyethylen und Glas die niedrigsten relativen Standardabweichungen auf, bei Anwendung der Methode A hingegen für die Prüfkörper aus *Palapress vario*. Unter Anwendung der Methode C wurden die höchsten relativen Standardabweichungen für alle Prüfkörper gemessen. Betrachtet man allerdings die prozentuale Standardabweichung so war diese für den Prüfkörper aus Polyethylen bei Anwendung der Methode C am niedrigsten. Unter Anwendung der Methode B wurde die niedrigste prozentuale Standardabweichung bei den Prüfkörpern aus Glas und *Palapress vario* beobachtet. Bei Anwendung der Methode A traten prozentuale Standardabweichungen auf, die mehr als hundert Prozent von der gemessenen relativen Fluoreszenzintensität betragen.⁴³⁰ Bei den Versuchen ohne vorherige Pellikelbildung ist Methoden B am präzisesten. Methode C liefert trotz der hohen relativen Standardabweichungen genauere Ergebnisse als Methode A, da bei dieser teilweise prozentuale Standardabweichungen von größer als hundert Prozent gemessen wurden.

Tabelle 45: Standardabweichungen der Methoden A, B und C ohne vorherige Pellikelbildung: prozentual und relativ im Vergleich:

ohne Pellikelbildung	Methode A		Methode B		Methode C	
	relativ	prozentual	relativ	prozentual	relativ	prozentual
Polyethylen	2285,7	160,0	1428,6	47,6	14571,2	26,8
<i>Palapress vario</i>	1428,6	200,0	4286,2	11,8	14286,0	32,8
Glas	3714,3	173,3	2857,2	<1	10714,5	23,1

Tabelle 46: Standardabweichungen der Methoden A, B und C mit vorheriger Pellikelbildung: prozentual und relativ im Vergleich:

mit Pellikelbildung	Methode A		Methode B		Methode C	
	relativ	prozentual	relativ	prozentual	relativ	prozentual
Polyethylen	2000,0	166,7	2400,0	9,5	12000,0	47,6
<i>Palapress vario</i>	3600,0	225,0	9600,0	37,3	8000,0	47,6
Glas	800,0	83,3	3200,0	11,42	2400,0	85,7

⁴³⁰Vgl.: Tabelle 45 S.100.

Methode B ist auch bei der Vorversuchsreihe mit vorheriger Pellikelbildung am genauesten.⁴³¹ Methode C ist trotz der höheren relativen Standardabweichungen präziser als Methode A, da bei dieser prozentualen Standardabweichungen von mehr als hundert Prozent auftraten. Aufgrund dessen, dass Methode B und C genauere Ergebnisse liefern als Methode A, ist ein statistisch signifikanter Einfluss des Materials oder des Pellikels wahrscheinlich. Die Ergebnisse können sowohl in der Zusammensetzung des verwendeten Speichels,⁴³² als auch im Material begründet sein, da auf verschiedenen Materialien unterschiedliche Pellikel gebildet werden können.⁴³³ Der Einfluss der Pellikelbildung auf die spätere Adhäsion von Bakterien ist bis dato noch nicht erschöpfend untersucht. Da jedoch auch nach Pellikelbildung einige Materialien stärker besiedelt werden als andere, muss davon ausgegangen werden, dass einige Oberflächeneigenschaften der Proben auch durch das Pellikel hindurch reichen und die Aggregation von Mikroorganismen beeinflussen.⁴³⁴

Ein möglicher Grund, dass die relativen Fluoreszenzintensitäten und damit die Anzahl der adhärenten Mikroorganismen bei Methode B und C nach Pellikelbildung ansteigen bzw. abnehmen, liegt in den veränderten Oberflächeneigenschaften nach der Speichelinkubation, die in der Literatur vielfältig beschrieben wurden. Die Arbeitsgruppe um Sardin beobachtete eine Korrelation zwischen den unpolaren Energiekomponenten der mit natürlichem Speichel unter semistatischen Bedingungen inkubierten Materialien und der Anzahl der adhärenten Bakterien.⁴³⁵ Jedoch wurden von dieser Arbeitsgruppe andere Materialien und Mikroorganismen als in dieser Studie untersucht. Des Weiteren wurde eine detaillierte Analyse der Oberflächeneigenschaften in der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt.

Eine weitere mögliche Begründung für die veränderten Adhäsionswerte nach Pellikelbildung sind Unterschiede in der Zähigkeit des Pellikels.⁴³⁶ Pellikel mit unterschiedlichen Zähigkeiten haften unterschiedlich fest an einer Oberfläche oder haben eine unterschiedlich schnelle Erneuerungsrate.⁴³⁷ Speichelfilme werden daher auf Flächen mit niedriger Oberflächenenergie nur lose angeheftet und können daher leichter desorbiert werden,⁴³⁸ womit der Verschleierungseffekt des Pellikels aufgehoben ist. Es ist also möglich, dass die auf den *Palapress vario*-Proben gebildeten Pellikel, stärker an dem Material haften als ein Pellikel auf Glas und somit die relative Fluoreszenzintensität nach Pellikelbildung bei Methode C

⁴³¹Vgl.: Tabelle 46 S.100.

⁴³²Hahnel 2008b.

⁴³³Norde, 1995; Schwender et al., 2005.

⁴³⁴Casimero et al., 2008.

⁴³⁵Sardin et al., 2004.

⁴³⁶Schwender et al., 2005.

⁴³⁷Baier et al., 1978.

⁴³⁸Baier et al., 1978.

signifikant verändert ist.

2.3 Adhäsion von *S. mutans* mit und ohne Pellikelbildung in den Versuchen unter dynamischen Bedingungen im Vergleich

Die Versuche unter dynamischen Bedingungen wurden mit den Fluoreszenzfarbstoffen Resazurin und *Cytox Violet®* jeweils mit und ohne vorherige Pellikelbildung durchgeführt.⁴³⁹

Bei der Verwendung von Resazurin und *Cytox Violet®* wurde ohne vorherige Pellikelbildung eine signifikant höhere relative Fluoreszenzintensität bei Zahnschmelz gemessen.⁴⁴⁰ Hier hat bei beiden Quantifizierungsmethoden die Beschaffenheit des Zahnschmelzes einen Einfluss auf die relativen Fluoreszenzintensitäten und damit auf die Anzahl der adhärenten Mikroorganismen. Die Ergebnisse für die Prüfkörper aus *Sinfony* und *Palapress vario* waren bei beiden Methoden nicht signifikant unterschiedlich. Somit wurden mit beiden Methoden ähnliche Ergebnisse erzielt.

Tabelle 47: Höhe der relativen Fluoreszenzintensitäten ohne vorherige Pellikelbildung in Abhängigkeit des Fluoreszenzfarbstoffes und der Materialien (S=signifikanter Unterschied):

ohne Pellikelbildung	hohe Fluoreszenzintensität	mittlere Fluoreszenzintensität	niedrige Fluoreszenzintensität
Resazurin	<i>Zahnschmelz</i> (S)	<i>Palapress vario</i>	<i>Sinfony</i>
<i>Cytox Violet®</i>	<i>Zahnschmelz</i> (S)	<i>Sinfony</i>	<i>Palapress vario</i>

Eine Aussage über die Präzision der jeweiligen Methode lässt sich durch die Betrachtung der Standardabweichungen treffen. Dabei sprechen niedrige Standardabweichungen für die Genauigkeit der Methode.

Die Standardabweichungen wurden sowohl relativ als auch prozentual ermittelt. Eruiert man die relative Standardabweichung der Versuche unter dynamischen Bedingungen ohne vorherige Pellikelbildung, so waren diese bei Anwendung der Methode A für die Prüfkörper aus Zahnschmelz und *Sinfony* niedriger als die bei Anwendung der Methode C. Unter Anwendung der Methode C traten hingegen die niedrigsten relativen Standardabweichungen bei den Prüfkörpern aus *Palapress vario* auf. Die prozentual zur relativen Fluoreszenzintensität ermittelten Standardabweichungen waren bei Anwendung der Methode C für die Prüfkörper aus *Palapress vario* und *Sinfony* niedriger als bei Anwendung der

⁴³⁹Vgl. Material und Methoden S. 45ff.

⁴⁴⁰Vgl. Ergebnisse S. 72ff. und Tabelle 47 S. 102.

Methode A.⁴⁴¹ Obwohl die Standardabweichungen in den Hauptversuchen ohne vorherige Pellikelbildung sich weniger stark in Abhängigkeit der angewandten Methode unterscheiden, war dennoch Methode C etwas genauer als Methode A.

Tabelle 48: Standardabweichungen der Methoden A und C ohne vorherige Pellikelbildung: relativ und prozentual im Vergleich:

ohne Pellikelbildung	Methode A		Methode C	
	relativ	prozentual	relativ	prozentual
Zahnschmelz	800,0	91,4	3700,0	172,0
Palapress vario	1937,5	162,8	1900,0	52,8
Sinfony	875,0	140,0	1580,0	63,2

In dem Versuchsaufbau mit Resazurin und vorheriger Pellikelbildung konnten keine wesentlichen Unterschiede zu dem Versuchsaufbau ohne vorherige Pellikelbildung festgestellt werden. Auch hier wurden die höchsten relativen Fluoreszenzintensitäten für Zahnschmelz, gefolgt von *Palapress vario* und *Sinfony* erzielt. Während jedoch die relativen Fluoreszenzintensitäten bei den Materialien *Sinfony* und *Palapress vario* mit vorheriger Pellikelbildung deutlich höher waren als ohne, blieb die relative Fluoreszenzintensität für Zahnschmelz ungefähr gleich.⁴⁴² Diese Unterschiede waren zwar nicht signifikant,⁴⁴³ sind allerdings eine mögliche Folge des Pellikeleinflusses.

Bei dem Versuch unter dynamischen Bedingungen mit vorheriger Speichelinkubation und dem Farbstoff *Cytox Violet®* wurden hingegen signifikant höhere relative Fluoreszenzintensitäten bei Zahnschmelz und *Palapress vario* gefunden als bei *Sinfony*. Dabei wurden die höchsten relativen Fluoreszenzintensitäten für das Material *Palapress vario*, mittlere für Zahnschmelz und die niedrigsten für *Sinfony* erzielt. Hier stiegen die Werte bei *Palapress vario* mit Speichelinkubation an, während sie bei Zahnschmelz und *Sinfony* nach der Speichelinkubation abnahmen.⁴⁴⁴ Methode C gibt somit einen deutlichen Einfluss des Pellikels auf die relative Fluoreszenzintensität zu erkennen, während die Ergebnisse mit und ohne vorherige Pellikelbildung bei Methode A ähnlich sind und somit kein Einfluss der Pellikelbildung zu erkennen ist.⁴⁴⁵

⁴⁴¹Vgl.: Tabelle 48 S. 103.

⁴⁴²Vgl.: Ergebnisse S. 72ff. und Tabelle 49 S. 104.

⁴⁴³Vgl.: Ergebnisse S. 73f.

⁴⁴⁴Vgl.: Ergebnisse S. 76ff. und Tabelle 49 S. 104.

⁴⁴⁵Vgl.: Tabelle 49 S. 104.

Tabelle 49: Höhe der relativen Fluoreszenzintensitäten mit vorheriger Pellikelbildung in Abhängigkeit des Fluoreszenzfarbstoffes und der Materialien (S=signifikanter Unterschied):

mit Pellikelbildung	hohe Fluoreszenzintensität	mittlere Fluoreszenzintensität	niedrige Fluoreszenzintensität
Resazurin	Zahnschmelz (S)	Palapress vario	Sinfony
Cytox Violet®	Palapress vario (S)	Zahnschmelz (S)	Sinfony

Betrachtet man die relativen Standardabweichungen in den Versuchen unter dynamischen Bedingungen mit Pellikelbildung, so entsprachen diese den Versuchen ohne vorherige Pellikelbildung.⁴⁴⁶ Auch hier waren diese bei Anwendung der Methode A für die Prüfkörper aus Zahnschmelz und *Sinfony* niedriger als die bei Anwendung der Methode C. Unter Anwendung der Methode C trat hingegen die niedrigste relative Standardabweichung bei den Prüfkörpern aus *Palapress vario* auf. Bei Betrachtung der prozentualen Standardabweichungen in den Versuchen mit vorheriger Pellikelbildung verhielten sich diese ähnlich.⁴⁴⁷ Jedoch war bei Verwendung des Farbstoffes *Cytox Violet®* für die Prüfkörper aus *Sinfony* die prozentuale Standardabweichung von der relativen Fluoreszenzintensität größer als 100 Prozent. In den Hauptversuchen mit vorheriger Pellikelbildung ist somit Methode A etwas präziser als Methode C.

Tabelle 50: Standardabweichungen der Methoden A und C mit vorheriger Pellikelbildung: relativ und prozentual im Vergleich:

mit Pellikelbildung	Methode A		Methode C	
	relativ	prozentual	relativ	prozentual
Zahnschmelz	1625,00	63,4	1720,0	63,2
Palapress vario	2562,5	53,9	1360,0	47,2
Sinfony	1187,5	76,0	1360,0	113,3

2.4 Ergebnisse der Untersuchung mittels Rasterelektronenmikroskop

Die Werte für die relativen Fluoreszenzintensitäten wurden mit der Auszählung der Bakterienbesiedlung der Prüfkörper im Rasterelektronenmikroskop verglichen. Die in der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahme von Bakterien bedeckten Flächen wurden in Relation zur Gesamtfläche des Prüfkörpers angegeben. Die Fluoreszenzintensitäten wurden hierfür grob in hoch, mittel und niedrig unterteilt. Da kein statistisch sinnvoller Vergleich der prozentual bedeckten Oberfläche mit der Stärke der relativen Fluoreszenzintensitäten möglich war, bieten die Daten nur einen ungefähren Anhaltspunkt. Allerdings muss generell bedacht

⁴⁴⁶Vgl.: Diskussion S.102f.

⁴⁴⁷Vgl.: Tabelle 50 S. 104.

werden, dass immer nur ein kleiner Ausschnitt des Prüfkörpers in der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahme dargestellt wird. Es ist daher möglich, dass ein Ausschnitt eines Prüfkörpers ausgewertet wurde, der mit prozentual mehr oder weniger Bakterien besiedelt war als die anderen Bereiche des Prüfkörpers. Außerdem wurden nicht alle Prüfkörper einer Versuchsreihe untersucht, sondern immer nur der Prüfkörper mit der jeweils höchsten und niedrigsten relativen Fluoreszenzintensität pro Material und Versuchsaufbau. Auch dies minimiert die Aussagekraft der Rasterelektronenmikroskopuntersuchungen, da möglicherweise starke Schwankungen in der bedeckten Oberfläche bzw. in der relativen Fluoreszenzintensität innerhalb der jeweils 10 untersuchten Prüfkörpern pro Material auftreten. Somit dienten die Untersuchungen der Prüfkörper im Rasterelektronenmikroskop vor allem der qualitativen Kontrolle.

Für die Vorversuche bei Methode B und C korrelierten die beiden verglichenen Werte für den Prüfkörper mit der höchsten Bakterienanlagerung bei einer Vergrößerung von 1700. Bei Methode A war dies nicht der Fall.⁴⁴⁸ Die Bilder bei einer Vergrößerung von 3800 konnten im Gegensatz zu den Bildern bei einer Vergrößerung von 1700 keine relevanten Beobachtungen gemacht werden.

Tabelle 51: Methode A: Werte der prozentual bedeckten Oberfläche(%) im Vergleich zur Fluoreszenzintensität für die höchste Bakterienakkumulation bei einer Vergrößerung von 1700:

Methode A mit Speichelinkubation	%	Fluoreszenzintensität
<i>Palapress vario</i>	30	hoch
Polyethylen	36,5	mittel
Glas	10,6	niedrig
Methode A ohne Speichelinkubation	%	Fluoreszenzintensität
<i>Palapress vario</i>	24,8	niedrig
Polyethylen	20,3	mittel
Glas	27,8	hoch

⁴⁴⁸Vgl.: Tabelle 51 S. 105 und Tabelle 52 und 53 S. 106.

Tabelle 52: Methode B: Werte der prozentual bedeckten Oberfläche (%) im Vergleich zur Fluoreszenzintensität für die höchste Bakterienakkumulation bei einer Vergrößerung von 1700:

Methode B mit Speichelinkubation	%	Fluoreszenzintensität
<i>Palapress vario</i>	13,6	mittel
Polyethylen	36,5	hoch
Glas	10,3	niedrig
Methode B ohne Speichelinkubation	%	Fluoreszenzintensität
<i>Palapress vario</i>	25,8	niedrig
Polyethylen	53,1	hoch
Glas	26,6	mittel

Tabelle 53: Methode C: Werte der prozentualbedeckten Oberfläche (%) im Vergleich zur Fluoreszenzintensität für die höchste Bakterienakkumulation bei einer Vergrößerung von 1700:

Methode C mit Speichelinkubation	%	Fluoreszenzintensität
<i>Palapress vario</i>	25,1	mittel
Polyethylen	33,1	hoch
Glas	24,7	niedrig
Methode C ohne Speichelinkubation	%	Fluoreszenzintensität
<i>Palapress vario</i>	27,7	niedrig
Polyethylen	31,8	hoch
Glas	25,8	mittel

Bei den Versuchen unter dynamischen Bedingungen wurden dieselben Vergleiche angestellt. Hierbei korrelierten, unabhängig von der Methodik, die Werte für die relative Fluoreszenzintensität und für die prozentual bedeckte Oberfläche für alle Fließkammern.⁴⁴⁹ Die Bilder bei einer Vergrößerung von 3800 konnten im Gegensatz zu den Bildern bei einer Vergrößerung von 1700 keine relevanten Beobachtungen gemacht werden.

⁴⁴⁹Vgl.: Tabelle 54 und 55 S. 107.

Tabelle 54: Versuche unter dynamischen Bedingungen mit Resazurin mit und ohne Pellikel: Werte der prozentual bedeckten Oberfläche (%) im Vergleich zur Fluoreszenzintensität für die höchste Bakterienakkumulation bei einer Vergrößerung von 1700:

Fließkammer mit Speichelinkubation	%	Fluoreszenz-intensität
<i>Palapress vario</i>	38,4	mittel
Zahnschmelz	77,3	hoch
<i>Sinfony</i>	29,3	niedrig
Fließkammer ohne Speichelinkubation	%	Fluoreszenz-intensität
<i>Palapress vario</i>	35,5	mittel
Zahnschmelz	56,2	hoch
<i>Sinfony</i>	19,6	niedrig

Tabelle 55: Versuche unter dynamischen Bedingungen mit *Cytox Violet®* mit und ohne Pellikel: Werte der prozentual bedeckten Oberfläche (%) im Vergleich zur Fluoreszenzintensität für die höchste Bakterienakkumulation bei einer Vergrößerung von 1700:

Fließkammer mit Speichelinkubation	%	Fluoreszenzintensität
<i>Palapress vario</i>	58,1	hoch
Zahnschmelz	49	mittel
<i>Sinfony</i>	33,2	niedrig
Fließkammer ohne Speichelinkubation	%	Fluoreszenzintensität
<i>Palapress vario</i>	29,7	niedrig
Zahnschmelz	55,7	hoch
<i>Sinfony</i>	45,2	mittel

2.5 Einfluss der Quantifizierungsmethode von Mikroorganismen in Versuchsaufbauten zur Biofilmbildung

Die vorliegende Arbeit liefert in Abhängigkeit von der Quantifizierungsmethode sehr unterschiedliche Ergebnisse. Diese sind einerseits auf die Anwendungsart eines Fluoreszenzfarbstoffes (Resazurin) zurückzuführen, andererseits variierten die Ergebnisse aufgrund der Anwendung unterschiedlicher Fluoreszenzfarbstoffe (Resazurin und *Cytox Violet®*). Bei den semistatischen Versuchen wurde Resazurin in einer Versuchsreihe zusammen mit der Bakterienlösung inkubiert (Methode A) und in einer zweiten Versuchsreihe (Methode B) erst nach stattgefunder Bakterienadhäsion der Fluoreszenzfarbstoff Resazurin inkubiert. In der dritten Versuchsreihe wurde analog zur Versuchsreihe nach Methode B verfahren, allerdings wurde der Fluoreszenzfarbstoff *Cytox Violet®* verwendet. Unter Anwendung der Methode A wurde kein Einfluss des Pellikels und des Materials auf die Adhäsion von Mikroorganismen festgestellt, während dies bei Methode B der Fall war. Unter Anwendung der Methode C hatte das Pellikel einen Einfluss auf die

Ergebnisse, aber nicht auf das Material. Betrachtet man die Standardabweichungen der Methoden in den Vorversuchen, so sind diese für Methode B am niedrigsten und somit die Versuchsergebnisse am besten reproduzierbar. Methode C schnitt besser ab als Methode A. Im biologischen Labor der Poliklinik für zahnärztliche Prothetik der Universität Regensburg wurde bislang vor allem die konventionelle Resazurin-Reduktionsmethode (Methode A) zur Quantifizierung von Mikroorganismen angewandt. Da bei dieser Methode das Resazurin zusammen mit der Bakterienlösung inkubiert wird, weist die Methode zwei Nachteile auf. Zum einen fließt die Eigenfluoreszenz der Prüfkörper mit in das erhaltene relative Fluoreszenzsignal ein, zum anderen besitzt Resazurin eine lange Halbwertszeit, die dazu führen kann, dass die Ergebnisse verfälscht werden. Um die Eigenfluoreszenz der Prüfkörper zu umgehen wird diese vor dem Versuchsbeginn mit einem Plattenlesegerät bestimmt und nach Versuchsablauf wiederum von den erhaltenen relativen Fluoreszenzintensitäten abgezogen. Somit kann die Eigenfluoreszenz zwar umgangen werden, dennoch bleibt sie eine potentielle Fehlerquelle. Dieses Problem wird mit dem Fluoreszenzfarbstoff *Cytox Violet®* (Methode C) und der Zugabe des Resazurins nach bereits erfolgter Bakterienadhäsion (Methode B) umgangen, da der Überstand nach Inkubation umpipettiert wird. Die Arbeitsgruppe um O'Brien beschrieb erstmalig die Problematik der langen Halbwertszeit des Resazurin bei Zugabe zur Bakterienlösung. Zum einen ist es bei Zugabe des Resazurins zur Bakterienlösung möglich, dass auch noch bereits abgestorbene Bakterien zur Höhe des gemessenen Fluoreszenzsignals beitragen und somit fälschlicherweise zu hohe Werte gemessen werden; zum anderen wird bei zu langen Inkubationszeiten das fluoreszierende Resazurin zu Hydroresorufin reduziert, das nicht fluoresziert und somit die Werte für die relative Fluoreszenzintensität zu niedrig ausfallen.⁴⁵⁰ Da in dieser Arbeit die relativen Fluoreszenzintensitäten bei Methode A generell viel niedriger waren als bei Methode B, ist es eher wahrscheinlich, dass Resazurin entweder zu dem nicht fluoreszenten Produkt weiter reduziert wurde oder, dass sich bei Methode B die Bakterien während der Inkubation des Farbstoffes weiter teilten und somit eine höhere relative Fluoreszenzintensität hervorgerufen wurde. Sollte tatsächlich bereits nach einer Stunde die Umsetzung zu dem nicht fluoreszierenden Produkt Hydroresorufin stattfinden, bedeutete dies, dass Resazurin nur über eine Inkubationsdauer von weniger als einer Stunde präzise Ergebnisse liefert. Eine Studie von Hahnel verstärkt diese Vermutung. Er konnte unter Verwendung von Resazurin keine Unterschiede in den relativen Fluoreszenzintensitäten nach der Inkubation von *S. mutans* und

⁴⁵⁰O'Brien et al., 2000.

S. sobrinus nach vierundzwanzig Stunden gegenüber zwei Stunden feststellen.⁴⁵¹ Da es unwahrscheinlich ist, dass das Wachstum der Bakterienstämme bereits nach zwei Stunden stagniert, liegt der Grund für die von Hahnel gefundenen Ergebnissen in der ungenügenden Präzision der konventionellen Resazurin-Reduktionsmethode. Daher sollte künftig eine andere Quantifizierungsmethode als die konventionelle Resazurin-Reduktionsmethode eingesetzt werden.

Bei den Versuchen unter dynamischen Bedingungen (Hauptversuche) wurde Methode B nicht weiterverfolgt. Die Methoden A und C lieferten ähnliche Ergebnisse. Bei diesen Versuchen unter dynamischen Bedingungen wiesen die Methoden A und C ohne vorherige Pellikelbildung keine signifikanten Unterschiede in den relativen Fluoreszenzintensitäten auf. Bei beiden konnte ein Einfluss des Materials auf die Ergebnisse festgestellt werden. Aufgrund der prozentualen Standardabweichungen, die bei Methode A mehr als hundert Prozent betrugen, liefert Methode C in den Vorversuchsreihen ohne vorherige Pellikelbildung die präziseren Ergebnisse. Dies war bei den Versuchen mit vorheriger Pellikelbildung nicht der Fall. Bei den Versuchen mit vorheriger Pellikelbildung ist *Cytox Violet®* im Bezug auf die Reproduzierbarkeit der Methode A aufgrund der höheren Standardabweichungen unterlegen. Hier konnte bei Methode C eine Abhängigkeit der Ergebnisse von der Pellikelbildung festgestellt werden, während dies bei Methode A nicht der Fall war. Um den Fluoreszenzfarbstoff *Cytox Violet®* zu etablieren, müsste daher mehr über dessen Metabolisierung durch Mikroorganismen erforscht werden und eine Interaktion mit den Materialien der Prüfkörper und dem Speichelpellikel ausgeschlossen werden. Über den Einfluss des Bakterienstammes auf die Metabolisierung des Fluoreszenzfarbstoffes liefert diese Arbeit keinen Aufschluss, da ausschließlich ein *S. mutans*-Stamm untersucht wurde. Daher wären auch Studien mit anderen Mikroorganismen für die endgültige Etablierung des Fluoreszenzfarbstoffes *Cytox Violet®* unbedingt durchzuführen. Von weiterem Interesse wäre es, die Präzision des Fluoreszenzfarbstoffes *Cytox Violet®* über längeren Inkubationszeiten zu untersuchen.

⁴⁵¹Hahnel et al., 2012.

VI. Zusammenfassung

Ein wichtiges Forschungsthema in der Zahnmedizin befasst sich mit der Adhäsion von Mikroorganismen an Zahnersatzmaterialien. Dabei sind v.a. kariesverursachende Leitkeime (wie *Streptococcus mutans*) von Interesse. Einen wichtigen Ansatz stellt dabei die Entwicklung von Restaurationsmaterialien, die eine geringe Adhäsion von Bakterien gewährleisten, dar. Diese wird zumeist in Versuchen *in vitro* bestimmt.

Für derartige Versuche *in vitro* sind effiziente und präzise Quantifizierungsmethoden von Bedeutung. Hierbei wird v.a. auf eine einfache und zeitsparende Anwendung sowie möglichst wenige anfallende Abfallprodukte geachtet. Eine sehr anerkannte Methode für Versuche *in vitro* stellen Fluoreszenzfarbstoffe dar, die ursprünglich für Viabilitätsuntersuchungen, wie z.B. von Bakterien in Kuhmilch,⁴⁵² gedacht waren, sich aber auch als Methode zur Quantifizierung der in Biofilm organisierten Mikroorganismen in Mikrotiterplatten durchgesetzt haben. Von besonderer Bedeutung für die Quantifizierung von Bakterien sind Fluoreszenzfarbstoffe, die nur die lebenden Bakterien erfassen. Ein solcher, neuerer Farbstoff ist *Cytox Violet®*, dessen Eigenschaften im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden sollten. *Cytox Violet®* wurde in verschiedenen Versuchsaufbauten mit der im biologischen Labor der Poliklinik für zahnärztliche Prothetik der Universität Regensburg bereits etablierten konventionellen Resazurin-Reduktionsmethode verglichen. Als Bakterienstamm wurde *Streptococcus mutans* ausgewählt, da dieser nachgewiesenermaßen eine wesentliche Rolle bei der Entstehung von Karies spielt.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden hierfür zunächst die Farbstoffkonzentrationen für drei unterschiedliche Quantifizierungsmethoden ausgewählt. Die erste Quantifizierungsmethode stellt dabei die konventionelle Resazurin-Reduktionsmethode (Methode A) dar. Bei dieser Methode wird das Resazurin während der Simulation der Biofilmbildung inkubiert. Bei der zweiten Quantifizierungsmethode wurde Resazurin erst nach bereits stattgefundener Adhäsion des *S. mutans* inkubiert (Methode B). Für die dritte Quantifizierungsmethode wurde der Farbstoff *Cytox Violet®* verwendet (Methode C), der auch erst nach der Bakterienadhäsion zugegeben wurde. Die Versuche wurden mit verschiedenen Farbstoffkonzentrationen mit den Probematerialien Glas, Polyethylen und *Palapress vario* durchgeführt. Es wurde eine Farbstoffkonzentration von 15 µl Resazurin pro ml PBS bzw. Bakterienlösung und 20 µl *Cytox Violet®* pro 200 µl PBS ausgewählt.

⁴⁵²O'Brien et al., 2000.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden die drei Quantifizierungsmethoden mit der festgelegten Farbstoffkonzentration jeweils mit und ohne vorherige Pellikelbildung in einem semistatischen Versuchsaufbau untersucht. Die Probematerialien entsprachen denen des ersten Versuchsaufbaus. Bei diesem Versuchsaufbau wurde von den Prüfkörpern, bei denen jeweils die höchste und die niedrigste Fluoreszenzintensität gemessen wurde, eine rasterelektronenmikroskopische Aufnahme mit 1700-facher und 3800-facher Vergrößerung erstellt. Dies geschah, um eine optische Kontrolle der Bakterienanlagerung zu gewährleisten. Mit einem Computerprogramm wurde anhand dieser Bilder die mit Bakterien bedeckte Oberfläche in Prozent ermittelt. Die Ergebnisse der drei Quantifizierungsmethoden fielen im zweiten Teil sehr unterschiedlich aus. Während bei Methode A weder ein Einfluss des Materials, noch des Pellikels auf die relativen Fluoreszenzintensitäten festgestellt werden konnte, traf bei Methode B beides zu. Bei Methode C hatte das Material keinen Einfluss, dafür aber die Pellikelbildung. In den Vorversuchsreihen war Methode B am präzisesten und Methode C besaß eine bessere Reproduzierbarkeit als Methode A. Zudem konnte in den Vorversuchen eine Abhängigkeit der Ergebnisse von der Verwendungsart des Fluoreszenzfarbstoffes festgestellt werden.

Im dritten Teil dieser Arbeit wurde die konventionelle Resazurin-Reduktionsmethode (Methode A) mit der Quantifizierungsmethode mittels *Cytox Violet®* (Methode C) in einer hydrodynamischen Fließkammer verglichen. Dies geschah jeweils mit und ohne Pellikelbildung aus einer Speichelersatzlösung. Für die Versuche unter dynamischen Bedingungen wurden die Probematerialien Zahnschmelz, *Sinfony* und *Palapress vario* ausgewählt. Auch hier wurde aus oben genanntem Grund von jedem Versuch unter dynamischen Bedingungen eine rasterelektronenmikroskopische Aufnahme des Prüfkörpers, mit dem das höchste und niedrigste relative Fluoreszenzsignal erzeugt wurde, mit 1700-facher und 3800-facher Vergrößerung erstellt. Sowohl bei Methode A als auch Methode C konnte ein Einfluss der Materialien auf die relativen Fluoreszenzintensitäten nachgewiesen werden. Bei Methode C war außerdem ein Einfluss der Pellikelbildung auf die relativen Fluoreszenzintensitäten feststellbar. Sowohl bei den Versuchen unter dynamischen Bedingungen als auch bei den semistatischen Versuchsaufbauten wurden sehr unterschiedliche Ergebnisse erzielt. Bei den Hauptversuchen war Methode C ohne vorherige Pellikelbildung genauer als Methode A, bei den Versuchen mit vorheriger Pellikelbildung war es umgekehrt.

VII. Schlussfolgerung

Versuche *in vitro* spielen eine wichtige Rolle bei Untersuchungen der Adhäsion von Mikroorganismen an dentalen Materialien. Hierfür sind präzise, einfache und wenig zeitintensive Quantifizierungsmethoden hilfreich.

Ziel dieser Arbeit war es, den Farbstoff *Cytox Violet®* als Quantifizierungsmethode für Versuche, die die Bakterienanlagerung an dentalen Materialien untersuchen, zu etablieren. Die dafür ausgewählten Versuchsaufbauten waren sowohl semistatisch als auch hydrodynamische Fließkammern. Als Referenz diente hierfür die bereits seit Jahren etablierte konventionelle Resazurin-Reduktionsmethode.

Resazurin gilt spätestens seit der Veröffentlichung von O'Brien et al. als sehr präzisier Fluoreszenzfarbstoff, jedoch besitzt er eine lange Halbwertszeit. Zudem wird bei langen Inkubationszeiträumen das Resazurin in den Bakterienzellen gespeichert und gibt auch bei bereits abgestorbenen Bakterien noch ein Fluoreszenzsignal ab. Dies kann fälschlicherweise zu zu hohen relativen Fluoreszenzintensitäten führen, die die Präzision der konventionellen Resazurin-Reduktionsmethode limitieren. In diesem Punkt unterscheidet sich der Farbstoff *Cytox Violet®*, da die Bakterien das fluoreszierende Produkt laut Hersteller wieder an die Lösung abgeben.

Interessanterweise wurden in den vorliegenden Untersuchungen bei den verschiedenen Quantifizierungsmethoden sehr unterschiedliche relative Fluoreszenzintensitäten in Abhängigkeit von der verwendeten Quantifizierungsmethode erzielt. Das bedeutet, dass durch die Verwendung verschiedener Fluoreszenzmarker die Ergebnisse variieren können. Zudem wurde festgestellt, dass es wesentliche Unterschiede in der Präzision der verschiedenen Quantifizierungsmethoden gibt. Bei der Resazurin-Reduktionsmethode und *Cytox Violet®* kann die Interaktion der Fluoreszenzfarbstoffe mit dem Pellikel in dieser Arbeit nicht ausgeschlossen werden. Die konventionelle Resazurin-Reduktionsmethode (Methode A) ist zwar eine etablierte Quantifizierungsmethode im biologischen Labor der Poliklinik für zahnärztliche Prothetik der Universität Regensburg, dennoch scheint sie bei Zugabe nach bereits erfolgter Bakterienadhäsion, wie bei den Versuchen nach Methode B, genauere Ergebnisse zu liefern. Die konventionelle Resazurin-Reduktionsmethode (Methode A), bei der der Fluoreszenzfarbstoff gleichzeitig mit der Bakterienlösung inkubiert wird, ist in den Vorversuchsreihen dieser Arbeit ungenauer als der Fluoreszenzfarbstoff *Cytox Violet®* (Methode C). Bei den Versuchen unter dynamischen Bedingungen (Hauptversuche) ist ohne vorherige Pellikelbildung auch *Cytox Violet®* präziser als die konventionelle Resazurin-

Reduktionsmethode. Bei den Versuchen mit vorheriger Pellicelbildung lieferte Methode A hingegen die genaueren Ergebnisse.

Der Fluoreszenzfarbstoff *Cytox Violet®* ist somit in dem Großteil der Versuchsreihen präziser als die konventionelle Resazurin-Reduktionsmethode, allerdings wäre es sinnvoll, in weiteren Forschungsanstrengungen mehr über die Metabolisierung von *Cytox Violet®* herauszufinden und den Farbstoff über längere Inkubationszeiträume sowie mit anderen Bakterienstämmen zu untersuchen.

VIII. Literaturverzeichnis

- 1) AAS JA, PASTER BJ, STOKES LN, OLSEN I, DEWHIRST FE (2005): Defining the Normal Bacterial Flora of the Oral Cavity; *Journal of Clinical Microbiology* 43, 5721–5732.
- 2) ADAM G, DUNCAN H (2001): Development of a Sensitive and Rapid Method for the Measurement of Total Microbial Activity Using Fluorescein Diacetate (FDA) in a Range of Soils; *Soil Biology & Biochemistry* 33, 943–951.
- 3) AHN SJ, KHO HS, LEE SW, NAHM DS (2002): Roles of Salivary Proteins in the Adherence of Oral Streptococci to Various Orthodontic Brackets; *Journal of Dental Research* 81, 411-415.
- 4) AHN SJ, LIM BS, YANG HC, CHANG YI (2005): Quantitative Analysis of the Adhesion of Cariogenic Streptococci to Orthodontic Metal Brackets; *The Angle Orthodontist* 75, 666-667.
- 5) AL-AHMAD A, FOLLO M, SELZER AC, HELLWIG E, HANNIG M, HANNIG C (2009a): Bacterial Colonization of Enamel *in situ* Investigated Using Fluorescence *in situ* Hybridization; *Journal of Medical Microbiology* 58, 1359–1366.
- 6) AL-AHMAD A, ROTH D, WOLKEWITZ M, WIEDEMANN-AL-AHMAD M, FOLLO M, RATKA-KRÜGER P, DEIMLING D, HELLWIG E, HANNIG C (2009b): Change in Diet and Oral Hygiene over an Eight Week Period: Effects on Oral Health and Oral Biofilm; *Clinical Oral Investigations* 14, 391-396.
- 7) AL-HASHIMI I, LEVINE MJ (1989): Characterization of *in vivo* Salivary Derived Enamel Pellicle; *Archives of Oral Biology* 34, 289-295.
- 8) AMAECHI BT, HIGHAM SM, EDGAR WM, MILOSEVIC A (1999): Thickness of Acquired Salivary Pellicle as a Determinant of the Sites of Dental Erosion; *Journal of Dental Research* 78, 1821-1828.
- 9) AMANN RI, BINDER BJ, OLSON R J, CHISHOLM SW, DEVEREUX R, STAHL DA (1990): Combination of 16S rRNA-targeted Oligonucleotide Probes with Flow Cytometry for Analyzing Mixed Microbial Populations; *Applied and Environmental Microbiology* 56, 1919–1925.
- 10) AMANN RI, LUDWIG W, SCHLEIFER KH (1995): Phylogenetic Identification and *in situ* Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation; *Microbiology Reviews* 59, 143–169.

- 11) AN YH, FRIEDMAN RJ, DRAUGHN RA, SMITH EA, NICHOLSON JH, JOHN JF (1995): Rapid Quantification of Staphylococci Adhered to Titanium Surfaces Using Image Analyzed Epifluorescence Microscopy; *Journal of Microbiological Methods* 24, 29-40.
- 12) AN YH, FREIDMAN RJ (1997): Laboratory Methods for Studies of Bacterial Adhesion. *Journal of Microbiological Methods* 30, 141-152.
- 13) ARVIDSSON A, LOFGREN CD, CHRISTERSSON CE, GLANTZ PO, WENNERBERG A (2004): Characterization of Structures in Salivary Secretion Film Formation. An Experimental Study with Atomic Force Microscopy; *Biofouling* 20, 181-188.
- 14) BAIER RE, GLANTZ PO (1978): Characterization of Oral *in vivo* Films Formed on Different Types of Solid Surfaces; *Acta Odontologica Scandinavica* 36, 289-301.
- 15) BARBOSA I, GARCIA S, BARBIER-CHASSEFIERE V, CARUELLE J-P, MARTELLY I, PAPY-GARCIA D (2003): Improved and Simple Micro Assay For Sulphated Glucosaminoglycans Quantification in Biological Extracts and its Use in Skin and Muscle Tissue Studies; *Glycobiology* 13, 647-653.
- 16) BENNICK A, CANNON M, MADAPALLIMATTAM G (1979): The Nature of the Hydroxyapatite-binding Site in Salivary Acidic Proline-rich Proteins; *Biochemical Journal* 183, 115-126.
- 17) BERGMANS L, MOISIADIS P, Van MEERBECK B, QUIRYNE M, LAMBRECHT P (2005): Microscopic Observation of Bacteria: Review Highlighting the Use of Environmental SEM; *International Endodontic Journal* 38, 775-788.
- 18) BOLLEN CML, LAMBRECHTS P, QUIRYNEN M (1997): Comparison of Surface Roughness of Oral Hard Materials to the Threshold Surface Roughness for Bacterial Plaque Retention: A Review of the Literature; *Dental Materials* 13, 258-269.
- 19) BOULOS L, PREVOST M, BARBEAU B, COALLIER J, DESJARDINS R (1999): LIVE/ DEAD® Baclight™: Application of a New Rapid Staining Method for Direct Enumeration of Viable and Total Bacteria in Drinking Water; *Journal of Microbiological Methods* 37, 77-86.

- 20) BOS R VAN DER MEI HC, BUSSCHER HJ (1999): Physico-chemistry of Initial Microbial Adhesive Interactions- Its Mechanisms and Methods for Study; FEMS Microbiological Review 23, 179-230.
- 21) BOWDEN GHW (1990): Microbiology of Root Surface Caries in Humans; Journal of Dental Research 69, 1205-1210.
- 22) BRAMBILLA E, GAGLIANI M, IONESCU A, FADINI L, GARCIA-GODOY F (2009): The Influence of Light-curing Time on the Bacterial Colonization of Resin Composite Surfaces; Dental Materials 25, 1067-1072.
- 23) BRADSHAW DJ, MARSH PD, WATSON K, ALLISON C (1998): Role of *Fusobacterium nucleatum* and Coaggregation in Anaerobe survival in Planktonic and Biofilm Oral Microbial Communities during Aeration; Infection and Immunity 66, 4729-4732.
- 24) BRADWAY SD, BERGEY EJ, JONES PC, LEVINE MJ: (1989): Oral Mucosal Pellicle Adsorption and Transpeptidation of Salivary Components to Buccal Epithelial Cells; Biochemical Journal 261, 887-896.
- 25) BUDDECKE E (1981): Biochemische Grundlagen der Zahnmedizin; De Gruyter, Berlin/New York, 86-104.
- 26) BÜRGERS R, EIDT A, FRANKENBERGER C, ROSENTRITT M, SCHWEIKL H, HANDEL G, HAHNEL S (2009): The Anti-adherence Activity and Bactericidal Effect of Microparticulate Silver Additives in Composite Resin Materials; Archives of Oral Biology 54, 595-601.
- 27) BÜRGERS R, WITECY C, HAHNEL S, GOSAU M (2012): The effect of various topical peri-implantitis antiseptics on *Staphylococcus epidermidis*, *Candida albicans*, and *Streptococcus sanguinis*; Archives of Oral Microbiology 57, 940-947.
- 28) BUSSCHER HJ, WEERKAMP AH, van der MEI HC, van PELT AWJ, de JONG HP, ARENDSD J (1984): Measurement of the Surface Free Energy of Bacterial Cell Surfaces and Its Relevance for Adhesion; Applied and Environmental Microbiology 48, 980-983.
- 29) BUSSCHER HJ, DOORNBUSCH GI, van der MEI HC (1992): Adhesion of Mutans Streptococci to Glass With and Without a Salivary Coating as Studied in a Parallelplate Flow Chamber; Journal of Dental Research 71, 491-500.
- 30) CARLÉN A, BÖRJESSON AJ, NIKDEL K, OLSSON J (1998): Composition of Pellicles Formed in Vivo on Tooth Surfaces in Different Parts of the Dentition,

- and in Vitro on Hydroxyapatite; *Caries Research* 32, 447-455.
- 31) CARLÉN A, NIKDEL K, WENNERBERG A, HOLMBERG K, OLSSON J (2001): Surface Characteristics and in Vitro Biofilm Formation on Glass Ionomer and Composite Resin; *Biomaterials* 22, 481-487.
- 32) CASIMERO LA, MARTINS CH, de CARVALHO TC, PANZERI H, LAVRADOR MA, PIRES-DE-SOUZA FDE C (2008): Effectiveness of a New Toothbrush Design Versus a Conventional Tongue Scraper in Improving Breath Odor and Reducing Tongue Microbiota. *Journal of Applied Oral Science* 16, 271-274.
- 33) CHRISTENSEN GD, SIMPSON GA, ANGLEN JO, GAINOR BJ (2000): Methods for Evaluating Attached Bacteria and Biofilms. IN: AN YH, FRIEDMAN RJ: *Handbook of Bacterial Adhesion: Principles, Methods and Applications*; Humana Press, 213-233
- 34) CHRISTERSSON CE, FORNALIK MS, BAIER RE, GLANTZ PO (1987): In Vitro Attachment of Oral Microorganisms to Solid Surfaces: Evaluation of a Controlled Flow Method; *Scandinavian Journal of Dental Research* 95, 151-158.
- 35) CHRISTERSSON CE, DUNFORD RG, GLANTZ PO, BAIER RE (1989): Effect of Critical Surface Tension on Retention of Oral Microorganisms; *Scandinavian Journal of Dental Research* 97, 247-256.
- 36) CHRISTERSSON CE, LINDH L, ARNEBRANT T (2000): Film-forming Properties and Viscosities of Saliva Substitutes and Human Whole Saliva; *European Journal of Oral Science* 108, 418-425.
- 37) CLARK WB, BAMMANN LL, GIBBONS RJ (1978): Comparative Estimates of Bacterial Affinity and Adsorption Sites on Hydroxyapatite Surfaces; *Infection and Immunity* 19, 846-853.
- 38) COLLINS LA, FRANZBLAU SG (1997): Microplate Alamar Blue Assay versus BACTEC 460 System for High-Throughput Screening of Compounds against *Mycobacterium Tuberculosis* and *Mycobacterium Avium*; *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41, 1004-1009.
- 39) CRAIG D, POWERS J, WATAHA J (2006): *Zahnärztliche Werkstoffe*; Urban und Fischer München, 1. Auflage.
- 40) DAWES C, JENKINS GN, TONGE CH (1963): The Nomenclature of the Integuments of the Enamel Surface of Teeth; *British Dental Journal* 16, 65-68.
- 41) DAWES C, CHEBIB FS (1972): The Influence of previous Stimulation and the

- Day of the Week on the Concentration of Protein and the main Electrolytes in human parotid saliva; Archives of Oral Biology 17, 1289-1301.
- 42) DECKER EM (2001): The Ability of Direct Fluorescence-based, Two- colour Assays to Detect Different Physiological States of Oral Streptococci; Letters in Applied Microbiology 33, 188–192.
- 43) DE FRIES R, MITSUHASHI M (1995): Quantification of Mitogen Induced Human Lymphocyte Proliferation: Comparison of Alamar Blue Assay to 3H-thymidine Incorporation Assay (Abstract); Journal of Clinical Laboratory Analysis 9, 89-95.
- 44) DE JONG MH, VAN DER HOEVEN JS (1987): The Growth of Oral Bacteria on Saliva; Journal of Dental Research 66, 498-505.
- 45) DOUGLAS CWI, RUSSELL RRB (1984): The Adsorption Of Human Salivary Components To Strains Of The Bacterium Streptococcus Mutans; Archives of Oral Biology 29, 751-757.
- 46) DOUGLAS CWI (1994): Bacterial-Protein Interactions In The Oral Cavity; Advances in Dental Research 8, 254-262.
- 47) DUFRENE YF (2008): Towards Nanomicrobiology Using Atomic Force Microscopy; Nature Reviews Microbiology 6, 674–680.
- 48) EDGAR M (1992): Saliva: Its Secretion, Composition and Functions; British Dental Journal 172, 305-312.
- 49) EDGERTON M, LEVINE MJ (1992): Characterization of Acquired Denture Pellicle from Healthy and Stomatitis Patients; The Journal of Prosthetic Dentistry 68, 683-691.
- 50) EDGERTON M, LO SE, SCANNAPIECO FA (1996): Experimental Salivary Pellicles Formed on Titanium Surfaces Mediate Adhesion of Streptococci; The International Journal of Oral and Maxillofacial Implants 11, 443-449.
- 51) EICHNER K, KAPPERT HF (2005): Zahnärztliche Werkstoffe und ihre Verarbeitung Band 1 Grundlagen und Verarbeitung; Thieme Verlag, Stuttgart, 8. Auflage.
- 52) EICK S, WELKER D, BÖHLAND A, PRÖSSEL A, PFISTER W, STRAUBE E (1996): Effekt von Glasionomerwerkstoff-Eluaten auf ausgewählte Spezien der Mundflora; Swiss Dental 17, 19.
- 53) EICK S, GLOCKMANN E, BRANDL B, PFISTER W (2004): Adherence of Streptococcus Mutans to Various Restorative Materials in a Continuous Flow

- System; Journal of Oral Rehabilitation 31, 278-285.
- 54) ELLEN RP, BANTING DW, FILLERY ED (1985): Streptococcus Mutans and Lactobacillus Detection in the Assessment of Dental Root Surface Caries Risk; Journal of Dental Research 64, 1245-1249.
- 55) EPIGENTEK, 2009.
- 56) ERB RE, EHLERS MH (1950): Resazurin Reducing Time as an Indicator of Bovine Semen Capacity. Journal of Dairy Science 33, 853-64.
- 57) ERNST CP (2010): Update Komposite - Teil 1 - Eine Einteilung der Kompositmaterialien; ZMK 26, 198-207.
- 58) FUSAYAMA T, KATAYORI T, NOMOTO S (1963): Corrosion of Gold and Amalgam Placed in Contact with Each Other; Journal of Dental Research 42, 1183- 1197.
- 59) GÄNGLER P & ARNOLD WH in GÄNGLER P, HOFFMANN T, WILLERSHAUSEN B, SCHWENZER N (2005): Konservierende Zahnheilkunde und Parodontologie; Thieme Verlag, Stuttgart, 2. Auflage.
- 60) GE J, CATT MD, GREGORY RL (2004): Streptococcus Mutans Surface α -Enolase Binds Salivary Mucin MG2 and Human Plasminogen; Infection and Immunity 72, 6748-6752.
- 61) GEURTSEN W (1999): Kunststofffüllung; in: HEIDEMANN D (Hrsg.), Kariologie und Füllungstherapie (Praxis der Zahnheilkunde 2); Urban & Schwarzenberg München Wien Baltimore, 4. Auflage 1999, 177-217.
- 62) GIBBONS RJ, MORENO EC, SPINAL DM (1976): Model Delineating the Effects of a Salivary Pellicle on the Adsorption of Streptococcus Miteor onto Hydroxyapatite; Infection and Immunity 14, 1109-1112.
- 63) GIBBONS RJ, ETHERDEN I (1985): Albumin as a Blocking Agent in Studies of Streptococcal Adsorption to Experimental Salivary Pellicles; Infection and Immunity 50, 592-594.
- 64) GIBBONS RJ, COHEN L, HAY DI (1986): Strains of Streptococcus Sobrinus Attach to Different Pellicle Receptors; Infection and Immunity 52, 555-561.
- 65) GOLDBERGS S, KONIS Y, ROSENBERG M (1990): Effect of Cetylpyridinium Chloride on Microbial Adhesion to Hexadecane and Polystyrene. Applied and Environmental Microbiology 56, 1678-1682.
- 66) GOOBES G, GOOBES R, SHAW WJ, GIBSON JM, LONG JR, RAGHUNATHAN V, SCHUELER-FURMAN O, POPHAM JM, BAKER D,

- CAMPBELL CT, SATYTON PS, DROBNY GP (2008): The Structure, Dynamics, and Energetics of Protein Adsorption-lessons Learned from Adsorption of Statherin to Hydroxyapatite; Magnetic Resonance in Chemistry 45, 32-47.
- 67) GRAY JJ (2004): The Interaction of Proteins with Solid Surfaces; Current Opinion in Structural Biology 14, 110–115.
- 68) GRÖGER G, ROSENTRITT M, BEHR M, SCHRÖDER J, HANDEL G. (2006): Dental Resin Materials in vivo-TEM Results after One Year; a Pilot Study; Journal of Material Science: Materials in Medicine 17; 825-828.
- 69) GUGGENHEIMER J, MOORE PA (2003): Xerostomia: Etiology, Recognition and Treatment; The Journal of American Dental Association 134, 61-69.
- 70) GUSBERTI FA, FINGER M, LANG NP (1985): Scanning Electron Microscope Study of 48-hour Plaque on Different Bridge Pontics Designs; Schweizer Monatszeitschrift für Zahnmedizin 95, 539–549.
- 71) HAHNEL S (2007): Die Eignung von Proteinmischungen als Speichelersatz für die bakterielle in vitro Adhäsion, Dissertation, Universität Regensburg.
- 72) HAHNEL S, ROSENTRITT M, BÜRGERS R, HANDEL GJ (2008a): Surface Properties and in Vitro *Streptococcus Mutans* Adhesion to Dental Resin Polymers; Journal of Materials Science: Materials in Medicine 19, 2619–2627.
- 73) HAHNEL S, ROSENTRITT M, HANDEL GJ, BÜRGERS R (2008b): Influence of Saliva Substitute Films on Initial *Streptococcus mutans* Adhesion to Enamel and Dental Substrata; Journal of Dentistry 36, 977-983
- 74) HAHNEL S, MÜLBAUER G, HOFFMANN J, IONESCU A, BÜRGERS R ROSENTRITT M, GERHARD H, HÄBERLEIN I (2011): *Streptococcus mutans* and *Streptococcus Sobrinus* Biofilm Formation and Metabolic Activity on Dental Materials; Acta Odontologica Scandinavica Early Online 1-8.
- 75) HAMADA S, KOGA T, OOSHIMA T (1984): Virulence Factors of *Streptococcus Mutans* and Dental Caries Prevention; Journal of Dental Research 63, 407-411.
- 76) HANNIG M(1998): Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Initialen Bioadhäsionsprozesse an Festkörperoberflächen in der Mundhöhle; Quintessenz Verlag GmbH
- 77) HANNIG M (1999): Ultrastructural Investigation of Pellicle Morphogenesis at Two Different Intraoral Sites During a 24-h period; Clinical Oral Investigations 3,

88-95.

- 78) HANNIG M & BALZ M (1999): Influence of in Vivo Formed Salivary Pellicle on Enamel Erosion; *Caries Research* 33, 372–379.
- 79) HANNIG M, HESS NJ, HOTH-HANNIG W, DE VRESE M (2003): Influence of Salivary Pellicle Formation Time on Enamel Demineralization--an in Situ Pilot Study; *Clinical Oral Investigation* 7, 158-161.
- 80) HANNIG M, FIEBRIGER M, GÜNTZER M, DÖBERT A, NEKRASHEVYCH Y (2004): Protective Effect of the in Situ Formed Short-term Salivary Pellicle; *Archive of Oral Biology* 49, 903–910.
- 81) HANNIG M, JOINER A (2006): The Structure, Function and Properties of the Acquired Pellicle; *Monographs in Oral Science* 19, 29-64.
- 82) HANNIG M, HANNIG C (2007c) Does a Biofilm Free of Bacteria, Exist in Situ?; *Journal de Parodontologie et d'Implantologie Orale* 26, 187–200.
- 83) HANNIG M, HANNIG C (2007d): Der Initiale Orale Biofilm- Pathogen oder Protektiv?; *Oralprophylaxe & Kinderzahnheilkunde* 27, 73-82.
- 84) HANNIG C, HANNIG M, ATTINT (2005): Enzyms in the Acquired Enamel Pellicel; *European Journal of Oral Science* 113, 2-13.
- 85) HANNIG C, BECKER K, HÄUSLER N, HOTH-HANNIG W, ATTIN T, HANNIG M (2007a): Protective Effect of the in Situ Pellicle on Dentin Erosion-an ex Vivo Pilot Study; *Archives of Oral Biology* 52, 444-449.
- 86) HANNIG C, HANNIG M, REHMER O, BRAUN G, HELLWIG E, AL-AHMAD A (2007b): Fluorescence Microscopic Visualization and Quantification of Initial Bacterial Colonization on Enamel in Situ; *Archive of Oral Biology* 52, 1048–1056.
- 87) HANNIG C, RUGEERI A, AL-KHAYER B, SCHMITZ P, SPITZMÜLLER B, DEIMLING D, HUBER K, HOTH-HANNIG W, BOWDEN WH, HANNIG M (2008): Electron Microscopic Detection and Activity of Glucosyltransferase B, C, and D in the in Situ Formed Pellicle; *Archive of Oral Biology* 53, 1003–1010.
- 88) HANNIG C, HANNIG M (2009): The Oral Cavity-a Key System to Understand Substratum-dependent Bioadhesion on Solid Surfaces in Man; *Clinical Oral Investigations* 13; 123-129.
- 89) HANNIG C, FOLLO M, HELLWIG E, AL-AHMAD A (2010): Visualization of Adherent Microorganisms Using Different Techniques; *Journal of Medical Microbiology* 59, 1-7.

- 90) HARPER DS, LÖSCHE WJ (1983): Effect of pH upon Sucrose and Glucose Catabolism by the Various Genogroups of Streptococcus Mutans; *Journal of Dental Research* 62, 555-561.
- 91) HAY DI (1973): The Interaction of Human Parotid Salivary Proteins with Hydroxyapatite; *Archives of Oral Biology* 18, 1517-1529.
- 92) HELLWIG E, KLIMEK J, ATTIN T (2009): *Einführung in die Zahnerhaltung*; Deutscher Zahnärzte Verlag, Köln, 5. Auflage.
- 93) HOF H, DÖRRIES R (2009): *Medizinische Mikrobiologie*; Thieme Verlag, Stuttgart, 4. Auflage.
- 94) IMAZATO S, KURAMOTO A, TAKAHASHI Y, EBISU S, PETERS MC (2006): In Vitro Antibacterial Effects of the Dentin Primer of Clearfil Protect Bond; *Dental Materials* 22, 527-532.
- 95) IONTCHEVA I, OPPENHEIM FG, TROXLER RF (1997): Human Salivary Mucin MG1 Selectively Forms Heterotypic Complexes with Amylase, Proline-rich Proteins, Statherin, and Histatins; *Journal of Dental Research* 76, 734-743.
- 96) IONTCHEVA I, OPPENHEIM FG, OFFNER GD, TROXLER RF (2000): Molecular Mapping of Statherin- and Histatin-binding Domains in Human Salivary Mucin MG1 (MUC 5B) by the Yeast Two-Hybrid System; *Journal of Dental Research* 79, 732-739.
- 97) JANDA R (1996): Verblendkunststoffe – Materialien und Leistungsfähigkeit; *Die Quintessenz der Zahntechnik* 22, 1003-1015.
- 98) JANDA R (2000): Chemie und Physik zahnärztlicher Kunststoffe; in: EICHNER K, KAPPERT HF (Hrsg.), *Zahnärztliche Werkstoffe und ihre Verarbeitung*; Thieme- Verlag Stuttgart New York, 7. Auflage.
- 99) JENKINSON HK, LAMONT RJ (1997): Streptococcal Adhesion and Colonization; *Critical Review of Oral Biology & Medicine* 8, 175–200.
- 100) JUNGERMANN K, MÖHLER H (1980): Biochemie; Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- 101) KAPPERT HF, EICHNER K (2008): *Zahnärztliche Werkstoffe und ihre Verarbeitung Band 2 Werkstoffe unter klinischen Aspekten*; Thieme Verlag, Stuttgart, 5. Auflage.
- 102) KAWAI K, URANO M, EBISU S (2000): Effect of Surface Roughness of Porcelain on Adhesion of Bacteria and their Synthesizing Glucans; *The Journals of Prosthetic Dentistry* 83, 664-667.

- 103) KAWAI K, URANO M. (2001): Adherence of Plaque Components to Different Restorative Materials; *Operative Dentistry* 26, 396-400.
- 104) KAWASHIMA M, HANADA N, HAMADA T, TAGAMI J, SENPUKU H (2003): Real-time Interaction of Oral Streptococci with Human Salivary Components; *Oral Microbiology and Immunology* 18, 220-225.
- 105) KHO HS, VACCA SMITH AM, KOO H, SCOTT-ANNE K, BOWEN WH (2005): Interactions of *Streptococcus mutans* Glucosyltransferase B with Lysozyme in Solution and on the Surface of Hydroxyapatite; *Caries Research* 39, 411-416.
- 106) KIRSTEIN M (1986): Zusammensetzung Künstlicher Speichel Und Ihre Anwendung In Der Zahnheilkunde; Eberhard-Karls-Universität Thüringen, Dissertation.
- 107) KLIMEK J, HELLWIG E (1999): Kariesätiologie und -diagnose; in: HEIDEMANN D (Hrsg.), *Kariologie und Füllungstherapie (Praxis der Zahnheilkunde 2)*; Urban und Schwarzenberg München Wien Baltimore.
- 108) KOGA T, OKAHASHI N, TAKAHASHI I, KANAMOTO T, ASAKAWA H, IWAKI M (1990): Surface Hydrophobicity, Adherence, and Aggregation of Cell Surface Protein Antigen Mutants of *Streptococcus Mutans* Serotype c; *Infection and Immunity* 58, 289-296.
- 109) KOLENBRANDER PE (1993): Coaggregation of Human Oral Bacteria: Potential Role in the Accretion of Dental Plaque; *Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement* 74, 79-86.
- 110) KOLENBRANDER PE (2000): Oral Microbial Communities: Biofilms, Interactions, and Genetic Systems; *Annual Review of Microbiology* 54, 413–437.
- 111) KOLENBRANDER PE, ANDERSEN RN, BLEHERT DS, EGLAND PG, FOSTER JS, PALMER RJ (2002): Communication among Oral Bacteria; *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66, 486-505.
- 112) KOOP HM, VALENTIJN-BENZ M, van NIEUW AMERONGEN A, ROUKEMA PA, De GRAAFF J (1990): Aggregation of Oral Bacteria by Human Salivary Mucins in Comparison to Salivary and Gastric Mucins of Animal Origin; *Antonie van Leeuwenhoek* 58, 255-263.
- 113) KOPEC LK, BOWEN WH (1995): Adherence of Microorganisms to Rat Salivary Pellicles; *Caries Research* 29, 507-512.
- 114) KUBOKI Y, TERAOKA K, OKADA S (1987): X-ray Photoelectron

- Spectroscopic Studies of the Adsorption of Salivary Constituents on Enamel; Journal of Dental Research 66, 1016-1019.
- 115) LAMKIN MS, OPPENHEIM FG (1993): Structural Features of Salivary Function; Critical Review of Oral Biology & Medicine 4, 251-2519.
- 116) LAMKIN MS; ARANCILLO AA, OPPENHEIM FG (1996): Temporal and Compositional Characteristics of Salivary Protein Adsorption to Hydroxyapatite; Journal of Dental Research 75, 803-808.
- 117) LAWRENCE HP (2002): Salivary Markers of Systemic Disease: Noninvasive Diagnosis of Disease and Monitoring of General Health; Journal of Canadian Dental Association 68, 170-174.
- 118) LEE SP, LEE SJ, LIM BS, AHN SJ (2009): Surface Characteristics of Orthodontic Materials and Their Effects on Adhesion of Mutans Streptococci; Angle Orthodontist 79, 353-360.
- 119) LEHMANN KM, HELLWIG E (1998): Einführung in die Zahnheilkunde; Urban und Schwarzenberg, 8. Auflage.
- 120) LENDEMANN U, GROGAN J, OPPENHEIM FG (2000): Saliva and Dental Pellicle – a Review; Advances in Dental Research 14, 22-28.
- 121) LI X, YAN Z, XU J (2003a): Quantitative Variation of Biofilms among Strains in Natural Populations of *Candida albicans*; Microbiology 149, 353–362.
- 122) LI J, HELMERHORST EJ, CORLEY RB, LUUS LE, TROXLER RF, OPPENHEIM FG (2003b): Characterization of the Immunologic Responses to Human in Vivo Acquired Pellicle as a Novel Means to Investigate Its Composition; Oral Microbiology and Immunology 18, 183-191.
- 123) LI J, HELMERHORST EJ, TROXLER RF, OPPENHEIM FG (2004a): Identification of in Vivo Pellicle Constituents by Analysis of Serum Immune Responses; Journal of Dental Research 83, 60-64.
- 124) LI J, HELMERHORST EJ, LEONE CW, TROXLER RF, YASKELL T, HAFFA-JEE AD, SOCRANSKY SS, OPPENHEIM FG (2004b): Identification of Early Microbial Colonizers in Human Dental Biofilm; Journal of Applied Microbiology 97, 1311–1318.
- 125) LIE T (1975): Pellicle Formation on Hydroxyapatite Splints Attached to the Human Dentition: Morphologic Confirmation of the Concept of Adsorption; Archives of Oral Biology 20, 739-742.
- 126) LILJEMARK WF, BLOOMQUIST C (1996): Human Oral Microbial Ecology

- and Dental caries and Periodontal Diseases; Critical Review of Oral Biology & Medicine 7, 180–198.
- 127) LIMA EM, KOO H, VACCASMITH AM, ROSALEN PL, DEL BEL CURRY AA (2008): Adsorption of Salivary and Serum Proteins, and Bacterial Adherence on Titanium and Zirconia Ceramic Surfaces; Clinical Oral Implants Research 19, 780-785.
- 128) LINDH L (2002): On the Adsorption Behaviour of Saliva and Purified Salivary Proteins at Solid/Liquid Interfaces (Abstract); Swedish Dental Journal. Supplement 152, 1-57.
- 129) LISTGATEN MA (1999): Formation of Dental Plaque and Other Oral Biofilms, in Newman HN, Wilson M (eds): Dental Plaque Revisited – Oral Biofilms in Health and Disease. Cardiff; Bioline, 187–210.
- 130) LIU D (2011): Molecular detection of Human Bacterial Pathogens. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- 131) LLENA-PUY C (2006): The Role of Saliva in Maintaining Oral Health and as an Aid to Diagnosis; Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal 11, 449-455.
- 132) LOESCHE WJ, ROWAN J, STRAFFON LH, LOOS PJ (1975): Association of Streptococcus Mutans with Human Dental Decay; Infection and Immunity 11, 1252- 1260.
- 133) LOIMARANTA V, JAKUBOVICS NS, HYTÖNEN J, FINNE J, JENKINSON HF, STRÖMBERG N (2005): Fluid- or Surface-phase Human Salivary Scavenger Protein gp-340 Exposes Different Bacterial Recognition Properties; Infection and Immunity 73; 2245-2252.
- 134) LOOMIS RE, PRAKOBPHOL A, LEVINE MJ, REDDY MS, JONES PC (1987): Biochemical and Biophysical Comparison of Two Mucins from Human Submandibular-Sublingual Saliva; Archives of Biochemistry and Biophysics 258, 452-464.
- 135) LÜLLMANN-RAUCH R (2006): Taschenbuch Histologie; Thieme Verlag, Stuttgart, 2. Auflage.
- 136) LUTZ F, PHILLIPS RW, ROULET JF, IMFELD TH (1983): Komposite – Klassifikation und Wertung; Schweizer Monatsschrift für Zahnmedizin 93, 914-929.
- 137) MARSH PD (1993): Antimicrobial Strategies in the Prevention of Dental Caries, Caries Research 27, 72–76.

- 138) MARSH P, MARTIN MV(1999): Oral Microbiology, 4th ed., Oxford, Wright
- 139) MARSH P, MARTIN M (2003): Orale Mikrobiologie; Thieme-Verlag, Stuttgart.
- 140) MASON CA, HAMER G, BRYERS JD (1986): The Death and Lysis of Microorganisms in Environmental Processes. FEMS Microbiology Letters 39, 373–401.
- 141) MAYHALL CW, BUTLER WT (1976): The Carbohydrate Composition of Experimental Salivary Pellicles; Journal of Oral Pathology 5, 358-370.
- 142) MEDLHAMMER M (2003): Adhäsion von Streptococcus Mutans an Zahnärztlichen Materialien in Vitro; Universität Regensburg, Dissertation.
- 143) MC CABE JF, WALLS AWG (2008): Applied Dental Materials; Blackwell Munksgaard, Oxford, 9. Auflage.
- 144) MEI L, BUSSCHER HJ, VAN DER MEI HC, REN Y (2011): Influence of Surface Roughness on Streptococcal Adhesion Forces to Composite Resins; Dental Materials 27, 770-778.
- 145) MILLEDING P, CARLEN A, WENNERBERG A, KARLSSON S (2001): Protein Characterization of Salivary and Plasma Biofilms Formed in Vitro on Non-corroded and Corroded Dental Ceramic Materials; Biomaterials 18, 2545-2555.
- 146) MINAHI GE, LOESCHE WJ (1977): Sucrose Metabolism by Prominent Members of the Flora Isolated from Cariogenic and Non-Cariogenic Dental Plaques; Infection and Immunity 17, 55-61.
- 147) MOHAMED N, RAINIER TR, ROSS JM (2000): Novel Experimental Study of Receptor-Mediated Bacterial Adhesion Under the Influence of Fluid Shear; Biotechnology and Bioengineering 68, 628-636.
- 148) MONTANARO L, CAMPOCIAA D, RIZZIA S, DONATIA ME, BRESCHIC L, PRATIC C, ARCIOLAA CR (2004): Evaluation of Bacterial Adhesion of Streptococcus Mutans on Dental Restorative Materials; Biomaterials 25, 4457–4463.
- 149) MORENO EC, ZAHRADNIK RT (1979): Demineralization and Remineralization of Dental Enamel; Journal of Dental Research 58, 896-890.
- 150) MORENO EC, KRESKA M, HAY DI (1982): Adsorption Thermodynamics of Acidic Proline-rich Human Salivary Proteins onto Calcium Apatites; Journal of Biological Chemistry 257, 2981–2989.
- 151) MUHLER JC, SWENSON HM (1947): Preparation Of Synthetic Saliva From

- Direct Analysis Of Human Saliva; Journal of Dental Research 26, 474.
- 152) MÜHLFRIEDEL B (2009): Etablierung eines Fließkammersystems zur Bakteriellen Adhäsion in Vitro; Dissertation, Universität Regensburg.
- 153) MÜLLER R, THALMAIER U, SCHMALZ G (2004): Bacterial Adhesion to Surfaces of Defined Polarity in Relation to Previous Protein Adsorption; European Cells and Materials 7, 69.
- 154) MÜLLER R, GRÖGER G, HILLER KA, SCHMALZ G, RUHL S (2007): Fluorescence Based Bacterial Overlay Methode for Simultaneous In Situ Quantification of Surface Attached Bacteria; Applied and Environmental Microbiology 73, 2653-2660.
- 155) MÜLLER R, THALMEIER U SCHMALZ G, RUHL S (2007): Fluorescence-Based Bacterial Overlay method for Simultaneous *In Situ* Quantification of Surface-Attached Bacteria. 73, 2653-2660.
- 156) MÜNZEL M (1981): Die Biochemie der Menschlichen Speicheldrüsensekrete; Archives of Oral Biology 21, 233-237.
- 157) NAKAYAMA GR, CATON MC, NOVA MP, PARANDOOSH Z (1997): Assessment of the Alamar Blue Assay for Cellular Growth and Viability in Vitro; Journal of Immunological Methods 204, 205-208.
- 158) NIKAWA H, HAMADA T, YAMAMOTO T (1998): Denture Plaque—Past and Recent Concerns; Journal of Dentistry 26, 299-304.
- 159) NORDE W (1986): Adsorption of Proteins from Solution at the Solid-Liquid Interface; Advances in Colloid and Interface Science 25, 267-340.
- 160) NORDE W (1995): Adsorption of Proteins at Solid–Liquid Interfaces; European Cells and Materials Journal 5, 97–112.
- 161) NOVAK SM, HINDLER J, BRUCKNER DA (1993): Reliability of Two Novel Methods, Alamar and E Test, for Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*; Journal of Clinical Microbiology 31, 3056-3057.
- 162) OBERLEITNER M (2008): Analysis of the Adsorption and Desorption of Salivary Protein Pellicles by Fluorescence Staining and Imaging; Diplomarbeit, Universität Regensburg.
- 163) O`BRIEN J, WILSON I, ORTON T, POGNAN F (2000): Investigation of the Alamar-Blue Fluorescent Dye for the Assessment of Mammalian Cell Cytotoxicity; European Journal of Biochemistry 267, 5421-5426.
- 164) OLSSON J, VAN DER HEIJDE Y, HOLMBERG K (1992): Plaque Formation in

- vivo and Bacterial Attachment in Vitro on Permanently Hydrophobic and Hydrophilic Surfaces; *Caries Research* 26, 428-433.
- 165) ORSTAVIK D, KRAUS FW, HENSHAW LC (1974): In Vitro Attachment of Streptococci to the Tooth Surface; *Infection and Immunity* 9, 794-800.
- 166) PASTER J, BARTOSZYK I, DEWHIRS FE (1998): Identification of Oral Streptococci Using PCR-based, Reverse-capture, Checkerboard Hybridization; *Methods in Cell Science* 20, 223–231.
- 167) PEETERS E, NELIS HJ, COENYE T (2008): Comparison of Multiple Methods for Quantification of Microbial Biofilms Grown in Microtiter Plates; *Journal of Microbiological Methods* 72, 157–165.
- 168) PEROS WJ, GIBBONS RJ (1986): Evidence Suggesting Multiple Binding Sites in Experimental Pellicles for *Streptococcus Mutans* JBP; *Journal of Dental Research* 65, 1332-1334.
- 169) PRATT-TERPSTRA I, WEERKAMP AH, BUSSCHER HJ (1989): The Effects of Pellicle Formation on Streptococcal Adhesion to Human Enamel and Artificial Substrata with Various Surface Free-energies; *Journal of Dental Research* 68, 463- 467.
- 170) PRATT-TERPSTRA I (1990): Salivary Protein Adsorption and Oral Streptococcal Adhesion; Dissertation, Rijksuniversiteit Groningen.
- 171) RAMASUBBU N, PALOTH V, LUO Y, BRAYER GD, LEVINE MJ (1996): Structure of Human Salivary α -Amylase at 1.6 \AA Resolution: Implications for Its Role in the Oral Cavity; *Acta Crystallographica Section D*, 52, 435-446.
- 172) RISS T, MORAVEC R (2003): Simplifying Cytotoxicity Screening; *Promega Notes* 83, 10-13.
- 173) ROEHM NW, RODGERS GH, HATFIELD SM, GLASEBROOK AL (1991): An Improved Colorimetric Assay for Cell Proliferation and Viability Utilizing the Tetrazolium Salt XTT; *Journal of Immunological Methods* 142, 257–265.
- 174) ROSAN B, LAMONT RJ (2000): Dental Plaque Formation; *Microbes and Infection* 2, 1599-1607.
- 175) ROSENTRITT M, HAHNEL S, GRÖGER G, MÜHLFRIEDEL B, BÜRGERS R, HANDEL G (2008): Adhesion of *Streptococcus Mutans* to Various Dental Materials in a Laminar Flow Chamber System; *Journal of Biomedical Materials Research* 86, 36-44.
- 176) RUHL S, SANDBERG AL, CISAR JO (2004): Salivary Receptors for the

- Proline-rich Protein-binding and Lectin-like Adhesins of Oral Actinomyces and Streptococci; *Journal of Dental Research* 83, 505-510.
- 177) RYKKE M, SONJU T, ROLLA G (1990): Interindividual and Longitudinal Studies of Amino Acid Composition of Pellicle Collected in Vivo; *Scandinavian Journal of Dental Research* 98, 129-134
- 178) SANDERINK RB, BERNHARDT H, KNOKE M, MEYER J, WEBER C, WEIGER R (2004): Curriculum Orale Mikrobiologie und Immunologie; Quintessenz Verlags-GmbH, Berlin 1. Auflage.
- 179) SARDIN S, MORRIER JJ, BENAY G, BARSOTTI O (2004): In Vitro Streptococcal Adherence on Prosthetic and Implant Materials. Interactions with Physicochemical Surface Properties; *Journal of Oral Rehabilitation* 31, 140-148
- 180) SAS R, DAWES C (1997): The Intra-oral Distribution of Unstimulated and Chewing-gum-Stimulated Parotid Saliva, *Archives of Oral Biology* 42, 469-474.
- 181) SATOU J, FUKUNAGA A, SATOU N, SHINTANI H, OKUDA K (1988): Streptococcal Adherence on Various Restorative Materials; *Journal of Dental Research* 67, 588-591.
- 182) SATOU J, FUKUNAGA A, MORIKAWA A, MATSUMAE I, SATOU N, SHINTANI H (1991): Streptococcal Adherence to Uncoated and Saliva-coated Restoratives; *Journal of Oral Rehabilitation* 18, 421-429.
- 183) SCHILLING KM, BOWEN WH (1988): The Activity of Glucosyltransferase Adsorbed Onto Saliva-coated Hydroxyapatite; *Journal of Dental Research* 67, 2-8.
- 184) SCHILLING KM, BOWEN WH (1992): Glucans Synthesized in Situ in Experimental Salivary Pellicle Function as Specific Binding Sites for Streptococcus Mutans; *Infection and Immunity* 60, 284-295.
- 185) SCHMALZ G, ARENHOLT-BINDSLEV D (2005): Biokompatibilität zahnärztlicher Werkstoffe; Urban & Fischer, München 1. Auflage.
- 186) SCHWAB W & FUNK RHW in REITEMEIER B, SCHWENZER N, EHRENFELD M (2006): Einführung in die Zahnmedizin; Thieme Verlag, Stuttgart 1. Auflage.
- 187) SCHWARTZ T, HOFFMANN S, OBST U (2003): Formation of Natural Biofilms During Chlorine Dioxide and u.v. Disinfection in a Public Drinking Water Distribution System; *Journal of Applied Microbiology* 95, 591-601.
- 188) SCHWENDER N, HUBER K, AL MARRAWI F, HANNIG M (2005): Initial Bioadhesion on Surfaces in the Oral Cavity Investigated by Scanning Force

- Microscopy; Applied Surface Science 252, 117–122.
- 189) SHAHAL Y, STEINBERG D, HIRSCHFELD Z, BRONSSTEYN M, KOPOLOVIC K (1998): In Vitro Bacterial Adherence onto Pellicle-coated Aesthetic Restorative Materials; Journal of Oral Rehabilitation 25, 52–58.
- 190) SHARMA PK, GIBCUS MJ, VAN DER MEI HC, BUSSCHER HJ (2005): Influence of Fluid Shear and Microbubbles on Bacterial Detachment from a Surface; Applied and Environmental Microbiology 71, 3668–3673.
- 191) SHELLIS RP (1978): A Synthetic Saliva For Cultural Studies Of Dental Plaque; Archives of Oral Biology 23, 485-489.
- 192) SIEGRIST BE, BRECX MC, GUSBERTI FA, JOSS A, LANG NP (1991): In Vivo Early Human Dental Plaque Formation on Different Supporting Substances; Clinical Oral Implants Research 2, 38-46.
- 193) SISSONS CH, WONG L, CUTRESS TW (1995): Pattern and Rates of Growth of Microcosm Dental Plaque Biofilms; Oral Microbiology and Immunology 10, 160-167.
- 194) SLOMIANY BL, MURTY VLN, ZDESKA E, SLOMIANY A, GWOZDZINSKI K, MANDEL ID (1986): Tooth Surface-pellicle Lipids and Their Role in the Protection of Dental Enamel Against Lactic-acid Diffusion In Man; Archives of Oral Biology 31, 187-191.
- 195) SLOMIANY BL, MURTY VL, MANDEL ID, SENGUPTA S, SLOMIANY (1990): Effect of Lipids on the Lactic Acid Retardation Capacity of Tooth Enamel and Cementum Pellicles Formed in Vitro from Saliva of Caries-resistant and Caries-susceptible Human Adults, Archive of oral Biology 35,175-180.
- 196) SÖNJU T, RÖLLA G (1973): Chemical Analysis of the Acquired Pellicle Formed in Two Hours on Cleaned Human Teeth in Vivo; Caries Research 7, 30-38.
- 197) SÖNJU T, GLANTZ PO (1975): Chemical Composition of Salivary Integuments Formed In Vivo on Solids With Some Established Surface Characteristics; Archives of Oral Biology 20, 687-691.
- 198) SREEBNY LM (1982): Sugar and Human Dental Caries; World Review of Nutrition and Dietetics 40, 19–65.
- 199) SREEBNY LM, ZHU WX, SCHWARTZ SS, MEEK AG (1995): The Preparation of Analouogous Saliva for Use with Patients undergoing Therapeutic Radiation for Head and Neck Cancer; Journal of Oral an Maxillofacial Surgery 53, 131-139.
- 200) STEINBERG D, KLINGER A, KOHAVI D, SELA MN (1995): Adsorption of

- Human Salivary Proteins to Titanium Powder. I. Adsorption of Human Salivary Albumin; *Biomaterials* 16, 1339–1343.
- 201) STEINBERG D, EYAL S. (2002): Early Formation of *Streptococcus sobrinus* Biofilm on Various Dental Restorative Materials; *Journal of Dentistry* 30, 47-51.
 - 202) STEPHAN RM (1947): PH and Dental Caries; *Journal of Dental Research* 26, 340.
 - 203) STEPANOVIC S, VUKOVIC D, DAKIE I, SAVIC B, SYABIC- VLAHOVIC M (2000): A Modified Microtiter-plate Test for Quantification of Staphylococcal Biofilm Formation; *Journal of Microbiological Methods* 40, 175–179.
 - 204) STINSON MW, JINKS DC, MERRICK JM (1981): Adherence of *Streptococcus Mutans* and *Streptococcus Sanguis* to Salivary Components Bound to Glass; *Infection and Immunity* 32, 583-591.
 - 205) TABAK LA (1990): Structure and Function of Human Salivary Mucins; *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* 1, 229-234.
 - 206) TANNER J, VALLITTU PK, SÖDERLING E (2000): Adherence of *Streptococcus Mutans* to an E-glass Fiber-reinforced Composite and Conventional Restorative Materials Used in Prosthetic Dentistry; *Journal of Biomedical Materials Research* 49, 250-256.
 - 207) TANNER J, ROBINSON C, SÖDERLING E, VALLITTU P (2005): Early Plaque Formation on Fibre-reinforced Composites in Vivo; *Clinical Oral Investigations* 9, 154-160.
 - 208) TAYLOR JP, WILSON B, MILLS MS, BURNS RG (2001): Comparison of Microbial Numbers and Enzymatic Activities in Surface Soils and Subsoil Using Various Techniques; *Soil Biology & Biochemistry* 34, 387–401.
 - 209) TEN CATE JM (2006): Biofilms, a New Approach to the Microbiology of Dental Plaque; *Odontology* 94, 1–9.
 - 210) TENOVER FC, SWENSON JM, O'HARA CM, STOCKER SA. (1995): Ability of Commercial and Reference Antimicrobial Susceptibility Testing Methods to Detect Vancomycin Resistance in Enterococci; *Journal of Clinical Microbiology* 33, 1524-1527.
 - 211) VACCA-SMITH A, VENKITARAMAN A, QUIVEY R, BOWEN W (1996): Interactions of Streptococcal Glycosyltransferases with Alpha-amylase and Starch on the Surface of Saliva-coated Hydroxyapatite; *Archives of Oral Biology* 41, 291-298.

- 212) VACCA SMITH AM, BOWEN WH (2000): In Situ Studies of Pellicle Formation on Hydroxyapatite Discs; *Archives of Oral Biology* 45, 277-291.
- 213) VAN HOUTE J (1994): Role of Microorganisms in Caries Etiology; *Journal of Dental Research* 73, 672-681.
- 214) VASSILAKOS N, ARNEBRANDT T, GLANTZ PO (1992): Adsorption of Whole Saliva onto Hydrophilic and Hydrophobic Solid Surfaces: Influence of Concentration, Ionic Strength and PH; *Scandinavian Journal of Dental Research* 100, 346-353.
- 215) VASSILAKOS N, ARNEBRANDT T, GLANTZ PO (1993): An in Vitro Study of Salivary Film formation at Solid/Liquid Interfaces; *Scandinavian Journal of Dental Research* 101, 133–137.
- 216) VAUPEL P (2000): Funktionen des Magen-Darm-Trakts; in: SCHMIDT RF, THEWS G, LANG F (Hrsg.), *Physiologie des Menschen*, Springer Verlag Berlin Heidelberg New York, 28. Auflage 2000, 806-848.
- 217) VEERMAN EC, VAN DEN KEYBUS PA, VISSINK A, NIEUW AMERONGEN AV (1996): Human Glandular Salivas: Their Separate Collection and Analysis; *European Journal of Oral Science* 104, 346-352.
- 218) VITKOV L, HANNIG M, NEKRASHEVYEH Y, KRAUTGARTNER WD (2004): Supramolecular Pellicle Precursors; *European Journal of Oral Science* 112, 320–325.
- 219) VOYTIK-HARBIN SL, BRIGHTMAN AO, WAISNER B, LAMAR CH, BADYLAK SF (1998): Application and Evaluation of the Alamar Blue Assay for Cell Growth and Survival of Fibroblasts; *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal* 34, 239-246.
- 220) WALLMAN C, KRASSE B (1992): Mutans Streptococci in Margins of Fillings and Crowns, *Journal of Dentistry* 20, 163-166.
- 221) WELSCH, (2006): *Lehrbuch Histologie*; Elsevier Urban & Fischer, München, 2. Auflage.
- 222) WHITE MJ, DICAPRIO ML, GREENBERG DA (1996): Assessment of Neuronal Viability with Alamar Blue in Cortical and Granule Cell Cultures; *Journal of Neuroscience Methods* 70, 195-200.
- 223) WHITECHURCH CB, TOLKER-NIELSEN T, RAGAS PC, MATTICK JS, (2002): Extracellular DNA Required for Bacterial Biofilm Formation; *Science* 295, 1487.

- 224) WILLIAMS NB, POWLEN DO (1959): Human Parotid Saliva as a Whole Source of Nutrient for Microorganisms; *Achieves of Oral Biology* 1, 48-61.
- 225) WIJEYEWEERA RL (1987): Studies on the Prominent and Base Forming Bacteria in Supragingival Plaque and Their Relation to the Production of Cariogenic and Non-Cariogenic Stephan PH Curves in Vitro; State University of New York at Stony Brook, Dissertation.
- 226) WONG L, SISSONS CH (2001): A Comparison of Human Dental Plaque Microcosm Biofilms Grown in an Undefined Medium and a Chemically Defined Artificial Saliva; *Archives of Oral Biology* 46, 477-486.
- 227) YAO Y, LAMKIN MS, OPPENHEIM FG (1999): Pellicle Precursor Proteins: Acidic Proline-rich Proteins, Statherin and Histatins, and Their Crosslinking Reaction by Oral Transglutaminase; *Journal of Dental Research* 78, 1696–1703.
- 228) YAO Y, LAMKIN MS, OPPENHEIM FG (2000): Pellicle Precursor Protein Crosslinking: Characterization of an Adduct between Acidic Proline-rich Protein (PRP-1) and Statherin Generated by Transglutaminase; *Journal of Dental Research* 79, 930–938.
- 229) YAO Y, GROGAN J, ZEHNDER M, LENDENMANN U, NAM B, WU Z, COSTELLO CE, OPPENHEIM FG (2001): Compositional Analysis of Human Acquired Enamel Pellicle by Mass Spectrometry; *Archives of Oral Biology* 46, 293-303.
- 230) YAO Y, BERG EA, COSTELLO CE, TROXLER RE, OPPENHEIM FG (2003): Identification of Protein Components in Human Acquired Enamel Pellicle and Whole Saliva Using Novel Proteomics Approaches; *The Journal of Biological Chemistry* 278, 5300-5308
- 231) YOO JH, KHO HS, KIM YK, LEE SW, CHUNG SC (2003): Experimental Salivary Pellicles Formed on the Surface of Self-curing Resin; *Journal of Oral Rehabilitation* 30, 251-259.
- 232) YOUNG A, RYKKE M, RÖLLA G (1999): Quantitative and Qualitative Analyses of Human Salivary Micelle-like Globules; *Acta Odontol Scand* 57, 105–110.
- 233) ZAHRADNIK RT (1977): Modification by Salivary Pellicles of in Vitro Enamel Remineralization; *Journal of Dental Research* 58, 2066-2073.
- 234) ZALATA AA, LAMMETIJN N, CHRISTOPHE A, COMHAIRE FH (1998): The Correlates and Alleged Biochemical Background of the Resazurin Reduction Test

in Semen; International Journal of Andrology 21, 289-294.

- 235) ZALKIND MM, KEISAR O, EVER-HADANI P, GRINBERG R, SELA MN
(1998): Accumulation of Streptococcus Mutans on Light-cured Composites and
Amalgam: an in Vitro Study; Journal of Esthetic Dentistry 10, 187-190.

IX. Danksagung

Für die freundliche Überlassung des Themas und die großzügige Bereitstellung von Arbeitsmitteln danke ich Herrn Professor Dr. Gerhard Handel sehr herzlich.

Herrn Priv. Doz. Dr. Sebastian Hahnel gebührt mein besonderer Dank für die freundschaftliche und kollegiale Zusammenarbeit und Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit.

Frau Dipl.-Ing. Sibylle Schneider-Feyrer danke ich für die freundliche und umfassende Einweisung in die Bedienung des Rasterelektronenmikroskops.

Besonders danken möchte ich auch Frau MTA Gerlinde Held für die stets freundliche Zusammenarbeit und die vielen hilfreichen und wertvollen Ratschläge bei der Durchführung der praktischen Versuche.

Herzlich Dank geht auch an David Franz, der mir bei der Erstellung der Arbeit geduldig zur Seite stand.

Meinen Eltern danke ich dafür, dass ich in jeder Hinsicht immer auf sie zählen kann.