

Aus der
Abteilung für Zahnerhaltung und Präventivzahnmedizin
des Institutes für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Einfluss von *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 auf die Kariogenität
von *Streptococcus mutans* *in vitro***

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae dentariae (Dr. med. dent.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Katharina Horb
aus Kiew

Datum der Promotion: 22.09.2017

1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis	1-2
2	Abstrakt	2
2.1	Abstrakt (Deutsch)	2
2.2	Abstract (Englisch).....	2
3	Einleitung	3
3.1	Kariesätiologie und dentaler Biofilm	3
3.2	Kariestherapie und Probiotika	4
3.3	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BB-12.....	6
3.4	Fragestellung	6
4	Material und Methoden	8
4.1	Versuchsaufbau	8
4.2	Bakterienkulturen	9
4.3	Herstellung der Probekörper	10
4.4	Aufbau der künstlichen Mundhöhle	11
4.5	Analyse des pH-Wertes, der Bakterienzahl und der Biofilmmorphologie.....	13
4.6	Transversale Mikroradiographie (TMR)	14
4.7	Statistische Auswertung	15
5	Ergebnisse	16
5.1	Auswertung der Bakterienzahl und des pH-Wertes	16
5.2	Auswertung des Mineralverlustes	17
5.3	Auswertung der Biofilmmorphologie	18
6	Diskussion	19
6.1	Diskussion von Studienergebnissen	19
6.2	Diskussion des Studiendesigns.....	22
6.3	Schlussfolgerungen	23
7	Zusammenfassung	25
8	Literaturverzeichnis	26
9	Anhang	31
9.1	Eidesstattliche Versicherung	31
9.2	Publikationsliste und Anteilserklärung an erfolgten Publikationen	32
9.3	Lebenslauf	33
9.4	Danksagung	36

2 Abstrakt

2.1 Abstrakt (Deutsch)

Probiotischen Bakterienkulturen wird eine Vielzahl von Eigenschaften zugeschrieben, u. a. einen Einfluss auf andere Bakterienarten zu haben. So könnte ein Probiotikum mit einem negativen Einfluss auf kariesassoziierte Bakterien, wie *S. mutans*, unter Umständen kariesinhibierend wirken. Diese Studie hatte u. a. das Ziel herauszufinden, inwiefern lebende und hitze-inaktivierte BB-12 den *S. mutans in vitro* beeinflussen.

Hierfür wurde eine künstliche Mundhöhle mit Schmelz- und Dentinproben aufgebaut, denen in regelmäßigen Abständen verschiedene Bakterien zugeführt wurden. Vier experimentelle Untereinheiten mit je 2 Probekörpereinheiten (jeweils mit 16 Probekörpern: 8 Schmelz, 8 Dentin) wurden 10 Tage lang Bakterienspezies, sowie Zucker und Speichel ausgesetzt. Nach Versuchsende wurden die Probekörper auf ihren pH, Bakterienzahl und Mineralverlust hin ausgewertet.

Anders als bei der Bakterienzahl und dem pH-Wert, beeinflussten die Biofilmzusammensetzung ($p = 0.01$, ANOVA) und die Art der Zahnhartsubstanz ($p < 0.001$) signifikant die Ergebnisse des Mineralverlustes. Grundsätzlich war der Mineralverlust von kavitiertem Dentin ($p < 0.05$, t-Test) höher als von approximalen Schmelzflächen ($p > 0.05$). BB-12 alleine verursachte signifikant weniger Mineralverlust als SM. Eine Zugabe von hitze-inaktivierten BB-12 führte zu einem signifikant geringeren Mineralverlust auf Dentinoberflächen als SM-Monokulturen ($p < 0.01$).

Die vorliegende Studie zeigt, dass hitze-inaktiviertes BB-12 einen hemmenden Einfluss auf die Kariogenität von SM hat und der Einsatz probiotischer Kulturen für die Kariestherapie durchaus sinnvoll sein kann.

2.2 Abstract (Englisch)

Probiotic cultures are known to have a lot of properties, e. g. to have an influence on other bacterial species. Therefore could a probiotic culture that has a negative influence on caries-associated bacteria, like *S. mutans*, impede dental caries. One of the aims of this study was to find out in what way heat-inactivated BB-12 could influence *S. mutans in vitro*.

Therefore an artificial oral cavity was established. It consisted of enamel and dentine specimens that were applied with different bacteria at regular intervals. Four experimental

subsets where each consisted of 2 specimen unities (each one with 16 specimens: 8 enamel, 8 dentine) were exposed with bacterial species, sugar and saliva for 10 days. At the end of the experiment pH, bacterial numbers and mineral loss were analyzed.

In a different way from bacterial numbers and pH, the results of the mineral loss were significantly influenced by the biofilm composition ($p = 0.01$, ANOVA) and the kind of dental hard tissue ($p < 0.001$). Generally, the mineral loss of dentine cavities ($p < 0.05$, t-Test) was higher than those of smooth enamel surfaces ($p > 0.05$). BB-12 alone caused significantly less mineral loss than SM. An addition of heat-inactivated BB-12 induced a significantly less demineralization of dentine cavities than SM-monocultures ($p < 0.01$).

The present study shows, that heat-inactivated BB-12 has an inhibitory effect on the cariogenicity of SM. Therefore an application of probiotic bacterial cultures for caries therapy could make sense.

3 Einleitung

Die in dieser Arbeit beschriebene In-vitro-Studie untersuchte den Einfluss von *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 auf die Kariogenität von *Streptococcus mutans*. Es wurde ein künstliches Mundhöhlenmodell aufgebaut, in dem sich Biofilme aus hinzugefügten Bakterienspezies auf Zahnhartsubstanzen ausgebildet haben. Die Biofilme haben im weiteren Verlauf zu Karies geführt, deren Ausmaß untersucht wurde. Die in dieser Arbeit beschriebene Studie wurde in „Archives of Oral Biology“ publiziert.[1]

3.1 Kariesätiologie und dentaler Biofilm

Ein Biofilm wird definiert als „dreidimensionale Ansammlung interagierender Mikroorganismen, die an einer Oberfläche haften und in eine Matrix extrazellulärer polymerer Substanzen eingebettet sind“.[2] In dieser Arbeit wird der Begriff „dentale Plaque“ verwendet, der im Zusammenhang mit Karies ebenso wie der „dentale Biofilm“ eine mikroskopisch sichtbare Ansammlung von Mikroorganismen, gemischt mit interzellulärer Substanz auf Zähnen bezeichnet[3]. Die Mundhöhle wird von einer Vielzahl verschiedener Mikroorganismen besiedelt. Diese haben keinen Einfluss auf die Zahnhartsubstanz, solange sie durch die funktionale Selbstreinigung von der Zahnoberfläche entfernt werden. Diese Selbstreinigung ist jedoch an Plaqueretentionsstellen eingeschränkt, wie beispielsweise an approximalen Schmelzoberflächen. Dort kann sich daher die dentale Plaque ungehindert anlagern und es kann eine Karies entstehen.[4,5]

Die menschliche Nahrung enthält verschiedene leicht fermentierbare Kohlenhydrate, die von Plaquebakterien metabolisiert werden. Als Endprodukte entstehen organische Säuren, die zu einer vorübergehenden Senkung des pH-Wertes in der Plaque führen. Das Unterschreiten eines gewissen pH-Wertes führt zu einem Herauslösen von Mineralien aus dem Zahnhartgewebe und bei wiederholten Säureangriffen zur Karies.[3] Zur Initiierung von Karies werden drei Faktoren benötigt: Bakterien, Zahn und Substrat (Zucker), die im Venn-Diagramm von Keyes dargestellt werden.[3] Die Entstehung und Progression von Karies ist ein dynamischer Prozess mit Phasen der Demineralisation durch Säuren und Remineralisation durch Mineralionen aus der Plaque.[6]

Speichel besitzt die Eigenschaft, die Auflösung der Zahnhartgewebe herabzusetzen. Er reinigt die Zahnoberflächen, remineralisiert das Zahnhartgewebe durch seine Elektrolyte und besitzt antimikrobielle Faktoren.[3] Zudem sind die Zähne vom sogenannten Pellikel überzogen.

Dieses besteht aus adsorbierten Speichelproteinen und schützt das Zahnhartgewebe vor mechanischen und chemischen Verletzungen.[7]

Karies soll im Dentin mehr als doppelt so schnell fortschreiten, als im Schmelz. Studien zufolge sind u. a. eine niedrigere Kristallinität und eine kleinere Kristallgröße des Dentins dafür ursächlich.[8] Sobald die Oberfläche des Zahnes einbricht, entsteht eine Kavität, die der Selbstreinigung nicht zugänglich ist, was wiederum zu einer vermehrten Plaqueakkumulation führt.

Es gibt mehrere Theorien bezüglich der Rolle von Plaquebakterien bei der Entstehung von Karies und parodontalen Erkrankungen. Die jüngste ist die ökologische Plaquehypothese. Diese besagt, dass diese Erkrankungen durch ein Ungleichgewicht der residenten Mikroflora mit der Folge einer Anreicherung mit „oralen pathogenen Bakterien“ verursacht werden.[9] Potentiell kariogene Bakterien sind in der dentalen Plaque natürlicherweise vorhanden. Jedoch sind diese Bakterien bei einem neutralen pH-Wert in geringer Weise konkurrenzfähig und machen nur einen kleinen Teil der gesamten Plaque aus.[9] Dies ändert sich bei Aufnahme von Kohlenhydraten, die durch Bakterien fermentiert werden und eine Ausscheidung dieser von Säuren zur Folge hat. Die Reduktion des pH hat zwei Auswirkungen: Zum einen führt ein Absinken des pH-Wertes unter einen kritischen Wert (ca. 5,5) zur Demineralisation von Zahnhartsubstanz[9] und somit zu Karies. Zum anderen führt der reduzierte pH zu einer erhöhten Proliferation kariogener Bakterien. Kariogene Bakterien wie *Streptococcus mutans* (SM) sind unter sauren Bedingungen vermehrt konkurrenzfähig und dominieren dadurch den dentalen Biofilm. *S. mutans* ist nicht nur äußerst azidogen (fähig zur schnellen Umwandlung von Zucker in Säure) und azidurisch (fähig, niederen pH-Wert-Bedingungen zu widerstehen), sondern synthetisiert außerdem ein extrazelluläres Polysaccharid, welches die Adhäsion des Bakteriums unterstützt.[3] Die Begünstigung von solchen azidogenen und azidurischen Bakterienspezies in der Mundhöhle führt wiederum vermehrt zu Karies.

Bei der Kariesentstehung und –progression spielen demzufolge mehrere Parameter eine Rolle: Die Art der Zahnhartsubstanz, die Effektivität der Selbstreinigung, die Zusammensetzung der Biofilme sowie die Aufnahme von Kohlenhydraten.

3.2 Kariestherapie und Probiotika

Eine der Ursachen von Karies ist ein Ungleichgewicht in der Ökologie der Mundhöhle. Der Prozess der Kariesentstehung und –fortschreitung könnte durch eine Veränderung dieser Ökologie sinnvoll beeinflusst werden. Dazu könnten Probiotika evtl. nützlich sein.

Dentale Karies kann auf unterschiedliche Weise therapiert werden. Heutzutage verlässt man das Konzept der Prävention durch ein invasiveres Entfernen der Zahnschicht und widmet sich vermehrt der nicht invasiven (z.B. Fluoridierung, Ernährungsberatung) und mikroinvasiven (z.B. Fissurenversiegelung, Kariesinfiltration) Kariestherapie.[10] Das Ziel ist eine möglichst zahnhartsubstanzschonende Therapie der vorhandenen Kariesläsionen in Kombination mit der Prävention. Grundsätzlich sind für die Wahl der Behandlungsmethode das Stadium und die Aktivität der Karies sowie das Kariesrisiko des Patienten relevant. Dementsprechend wird die Karies nicht nur lokal, sondern auch auf Patientenebene therapiert, sodass verschiedene Therapiemethoden miteinander kombiniert werden können.[10]

In den letzten Jahren werden Probiotika im Zusammenhang mit Prävention und Therapie der dentalen Karies vermehrt diskutiert.[11–13] Probiotika sind lebende Mikroorganismen, die einen gesundheitsfördernden Einfluss auf den Wirtsorganismus ausüben sollen.[14] Am häufigsten begegnen sie uns als Milchsäureprodukte in Form von z.B. Joghurt. Probiotika sollen u.a. die Eigenschaft besitzen, die ökologischen Bedingungen innerhalb der Lebensräume bzw. Biofilme wiederherzustellen.[15] Diese Eigenschaft der Probiotika möchte die moderne Kariesforschung für die Kariestherapie nutzen. Da sich die Bakterien innerhalb eines Biofilmes womöglich gegenseitig beeinflussen, könnte eine Zugabe von probiotischen Bakterien möglicherweise zu einer Veränderung der bakteriellen Zusammensetzung[16] und Aktivität der oralen Biofilme führen. So könnte beispielsweise ein Probiotikum mit einem negativen Einfluss auf kariesassoziierte Bakterien wie *S. mutans*, kariesinhibierend wirken.

Es wurde bereits gezeigt, dass eine regelmäßige Zufuhr lebender[17] oder toter[18] probiotischer Bakterien eine hemmende Wirkung auf *S. mutans* haben soll. Jedoch sind die meisten probiotischen Bakterien, wie z.B. Bifidobakterien, azidogen und azidurisch[19,20] und könnten selbst zu einer Neuentstehung bzw. Progression der Karies führen. Literarisch werden solche Bakterien bereits seit Längerem mit Karies in Verbindung gebracht.[19,21]

Leider konnten die meisten modernen Studien einen positiven Effekt der Probiotika auf die dentale Karies bisher nur ungenügend zeigen: Zwar konnten manche Studien eine Reduktion der Anzahl kariogener Bakterien während oder nach einer probiotischen Therapie zeigen,[22–27] andere bestätigten solch einen Einfluss jedoch nicht.[28–31] Die meisten Studien haben den Einfluss unterschiedlicher probiotischer Bakterien auf die Menge und Vorkommen von *S. mutans* untersucht, nicht aber auf direkte, kariesrelevante Parameter, wie den Mineralverlust von Zahnhartsubstanzen. Manche Studien konnten zwar ein wesentlich reduziertes

Vorkommen oder Aktivität der kariösen Läsionen in Anwesenheit von Probiotika zeigen,[26,32] andere konnten solch einen Einfluss nicht bestätigen.[33,34]

3.3 *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12

Mitglieder der Gattung *Bifidobacterium* wurden vor über einem Jahrhundert zum ersten Mal beschrieben und wurden schnell mit einem gesunden Verdauungstrakt in Verbindung gebracht.[35] *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 ist heutzutage ein kommerziell zu erwerbender Bakterienstamm, welcher in einer Vielfalt von Nahrungs- und Nahrungsergänzungsmitteln weltweit eingesetzt wird.[36] Der Nutzen von BB-12 wird in einer Vielzahl von unabhängigen klinischen Studien festgehalten.[36] Einige mögliche Mechanismen der nützlichen Wirkung von Bifidobakterien schließen den Wettkampf um Haftungsoberflächen oder Nahrung, die Änderung des pH-Wertes oder der Pufferkapazität sowie antimikrobielle und immunstimulierende Effekte ein.[15,17]

Grundsätzlich wird die Säuretoleranz von Bifidobakterien als relativ schwach beschrieben. Hiervon ausgenommen ist eine Zahl bestimmter Bakterienstämme von *B. animalis* und *B. lactis*, die in einer Umgebung mit einem pH-Wert von 3-5 überleben können.[37]

Bifidobacterium animalis subsp. *lactis* BB-12 ist ein gutes Beispiel für ein als Probiotikum weit eingesetzter Bakterienstamm, der azidogene und azidurische Eigenschaften besitzt und dessen Genom bereits vollständig entschlüsselt wurde[36].

3.4 Fragestellung

Ein möglicher Ansatz, die potenziell kariogenen Auswirkungen von BB-12 zu umgehen, wäre seine Inaktivierung durch Hitze. Lebende *Lactobacillus rhamnosus* verursachen Mineralverlust der Zahnhartsubstanzen, v. a. in Kombination mit SM.[38] Hitze-inaktivierte *Lactobacillus paracasei*[18] und *Lactobacillus rhamnosus*[18,39] besitzen jedoch die Fähigkeit, mit *S. mutans* zu aggregieren und das Vorkommen von Karies in Ratten wesentlich zu reduzieren[18].

Die vorliegende Arbeit baut auf diesen Ergebnissen auf. Das Ziel war, einen weit verbreiteten probiotischen Bakterienstamm alleine sowie in lebender oder abgetöteter Form in Kombination mit SM auf seine Kariogenität hin zu überprüfen. Im Rahmen der Vorversuche wurden u. a. optimale Bedingungen für die Anzucht der Bakterien, die den Probestoffen zugeführte Menge der Bakterien sowie eine möglichst einfache Auswertung ermittelt. Ein *in vitro* aufgebauter Versuch ermöglichte einen reibungslosen Ablauf ohne mögliche

individuelle Einflussfaktoren (z.B. Mundhygiene, Speichelqualität und –quantität) sowie eine Bestimmung des Mineralverlustes mittels TMR. Das Ziel der vorliegenden In-vitro-Untersuchung war es, den Einfluss des probiotischen Bakteriums *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (BB-12) in lebender sowie hitze-inaktivierter Form auf die Kariogenität von *S. mutans* sowie die mögliche Kariogenität des BB-12 selbst auf verschiedene Zahnhartsubstanzen hin zu überprüfen. Dabei wurden folgende Hypothesen aufgestellt:

1. BB-12 verursacht Mineralverlust der Zahnhartsubstanzen Schmelz und Dentin.
2. Eine tägliche Aufnahme von lebenden bzw. hitze-inaktivierten BB-12 reduziert die Kariogenität von SM *in vitro*.
3. Die Art der Zahnhartsubstanz hat hierbei keinen signifikanten Einfluss auf die Kariesreduktion.

4 Material und Methoden

4.1 Versuchsaufbau

In dieser Studie wurde ein nach außen abgegrenztes Mundhöhlenmilieu mit kariogenem Potenzial (37°C, 100% Feuchtigkeit, 8 × täglich Saccharosezufuhr) simuliert und die Auswirkung verschiedener Biofilmgruppen (SM, BB-12, lebendes BB-12 gemischt mit SM [BB-12_{LE} × SM], hitze-inaktiviertes BB-12 gemischt mit SM [BB-12_{HI} × SM]) auf den Mineralverlust (ΔZ) verschiedener Zahnhartsubstanzen hin untersucht. Zusätzlich wurde die Bakterienzahl und der pH-Wert der jeweiligen Biofilme ermittelt. Die Probekörper sollten glatte Approximalflächen (Schmelz) und Dentinkavitäten (Dentin) simulieren.

Der Versuch wurde biologisch dupliziert und wie folgt aufgebaut: Es wurden vier Boxen aufgestellt. Dabei wurden jeder Box unterschiedliche Bakterienkulturen hinzugefügt. Jede Box beinhaltete zwei Probeneinheiten (je eine Schmelz- und eine Dentineinheit). Eine Probeneinheit bestand je nach Art der zu untersuchenden Zahnhartsubstanz aus 16 Schmelz- oder Dentinprobekörpern. Demzufolge wurden insgesamt 256 Probekörper ($n = 32$ pro Box) für beide Versuchsdurchläufe verwendet.

Bei jedem Probekörper wurde ΔZ und bei zwölf Probekörpern pro Box (sechs aufeinanderfolgende Probekörper je Probeneinheit) die Bakterienzahl innerhalb der Biofilme ermittelt. Bei zwei Probekörpern pro Box (je eine pro Probeneinheit) wurde der pH-Wert ermittelt (Abb. 1).

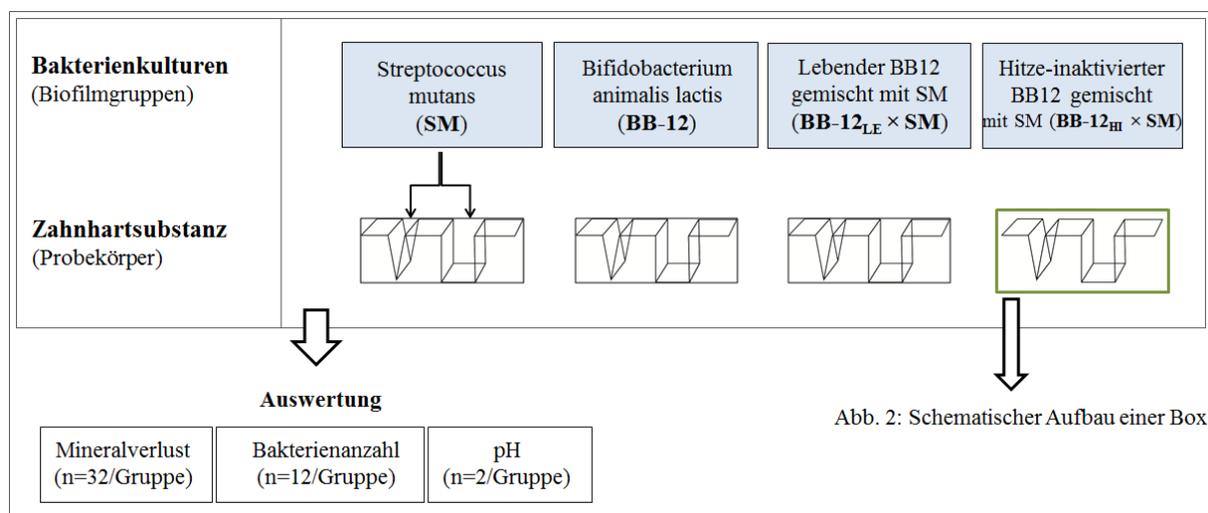


Abb. 2: Schematischer Aufbau einer Box

Abb. 1: Versuchsaufbau. Vier Versuchseinheiten, bestehend aus je zwei Probeneinheiten, wurden einer künstlichen Mundhöhle mit unterschiedlicher Bakterienflora ausgesetzt. Nach insgesamt zehn Tagen wurden der Mineralverlust (ΔZ) der jeweiligen Probekörper, der pH-Wert sowie die Bakterienzahl der verschiedenen Biofilmgruppen ausgewertet. Es wurden zwei identisch aufgebaute Versuche durchgeführt, wobei jeweils 32 Probekörper pro Gruppe und pro Versuch ausgewertet wurden. Die Gesamtanzahl der ausgewerteten Probekörper belief sich auf $n = 256$. Der pH-Wert eines jeweils zufälligen Biofilmes je Gruppe und Versuch wurde bestimmt ($n_{\text{gesamt}} = 2/\text{Gruppe}$). Anschließend wurden sechs Biofilme aus jeder Probeneinheit entnommen und auf die Bakterienzahl hin untersucht ($n = 12_{\text{gesamt}}/\text{Gruppe}$). Bei allen der 16 Probeneinheiten wurde der Mineralverlust ΔZ ($n = 32_{\text{gesamt}}/\text{Gruppe}$) bestimmt.

4.2 Bakterienkulturen

Es wurden Bakterienkulturen von SM ATCC 25175 (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) und BB-12 (SM 15954 Chr. Hansen A/S, Hoersholm, Dänemark) für 48 h (37°C , 5% CO_2) angezüchtet. SM wurde auf dem Brain Heart Infusion (BHI)- und BB-12 auf dem DeMan Rogosa Sharpe-Agar (Difco, Franklin Lakes, USA) angezogen. Bakterielle Kulturen für die tägliche Beimpfung wurden für SM in 10 ml BHI (Becton, Dickinson and Company, Sparks, USA) und für BB-12 in Thioglycolsäure (ThermoScientific, Wesel, Deutschland) für 24 h angezüchtet (ca. 3×10^7 kolonienbildende Einheiten/ml [KBE/ml]). Eine Qualitätskontrolle der täglich zugeführten Bakterien hinsichtlich ihrer mikrobiologischen Reinheit erfolgte mittels Gramfärbung.

Hitze-inaktivierte BB-12-Kulturen wurden wie folgt hergestellt: Zunächst erfolgte eine Anzucht in BHI und eine anschließende Pasteurisation für 19 h bei 80°C über Nacht. Anschließend wurde der BB-12 auf dem MRS-Agar (Carl Roth, Karlsruhe) bei 37°C und 5% CO_2 für 24 h kultiviert und auf seine mögliche Viabilität hin überprüft.

Die Entnahme der Bakterien vom Agar erfolgte mithilfe einer Sonde und die Anzucht für den täglichen Gebrauch in sterilen Reagenzgläsern. Die tägliche Beimpfung aus den Reagenzgläsern (Greiner Bio-One, Frickenhausen) erfolgte mithilfe einer sterilisierten serologischen Pipette (Sarstedt, Nürnberg).

Es wurde versucht, die Menge des jeweiligen Bakteriums während des Versuches möglichst identisch zu halten, um mögliche Auswirkungen des Bakteriums in Abhängigkeit von ihrer Konzentration zu vermeiden.

4.3 Herstellung der Probekörper

Zur Untersuchung von Bakterienbefall und einhergehender Demineralisation der Zahnhartsubstanzen wurden aus Rinderzähnen hergestellte Schmelz- und Dentinproben verwendet. Aus 60 Schneidezähnen der zweiten Dentition wurden insgesamt 256 Proben hergestellt. Schmelzproben (2 mm × 3 mm × 4 mm) und Dentinproben (2 mm × 3 mm × 2 mm) wurden zunächst auf die passende Größe zugeschnitten (Bandsäge Exakt 300 cl; Exakt Apparatebau, Norderstedt, Deutschland). Anschließend wurde die später zur Mundhöhle exponierte Oberfläche sowie der umgebende Akrylkunststoff glattgeschliffen (Schleif- und Poliermaschine Phoenix Alpha; Buehler, Düsseldorf, Deutschland) und poliert (Polierscheiben 1200, 2400, 4000 Exakt Apparatebau, Norderstedt, Deutschland).

Die Hälfte der Oberfläche jeder Probe wurde mit Nagellack (Rival de Loop, Rossmann, Burgwedel, Deutschland) überdeckt und diente als Kontrollfläche, da in diesem Bereich keine direkte Bakterienanlagerung an die Probe und keine Demineralisierung möglich war (Abb. 2).

Je nach Probeneinheit wurden jeweils 16 Schmelz- oder Dentinproben gemeinsam in Akrylkunststoff (Technovit) eingebettet. Die glattgeschliffenen Oberflächen, die aus entweder Schmelz oder Dentin bestanden, wurden der Mundhöhle exponiert. Dabei wurden die Schmelzflächen so angewinkelt, dass sie dentale Approximalflächen simulierten. Die Schmelzflächen wurden in einem Winkel von 15° zueinander aufgestellt, da Approximalkaries die Eigenschaft besitzt, unmittelbar zervikal des Kontaktpunktes zu entstehen. Diese Aufstellung sollte auch die natürliche Retention von Flüssigkeiten im Approximalraum bedingen. Dentinproben wurden mithilfe von durch Duplikation hergestellten größenidentischen Gittern aus Akrylkunststoff zu simulierten Kavitäten (2 mm × 3 mm × 3 mm) umgewandelt. Alle Flächen der Probekörper wurden mithilfe einer Wasserwaage eben gestaltet, um eine identische Retention von Flüssigkeiten auf allen Proben zu gewährleisten. Miteinander verbaut wurden die einzelnen Bestandteile der Probekörper mittels Silikon (Honigum light, DMG, Hamburg, Deutschland) (Abb.2).

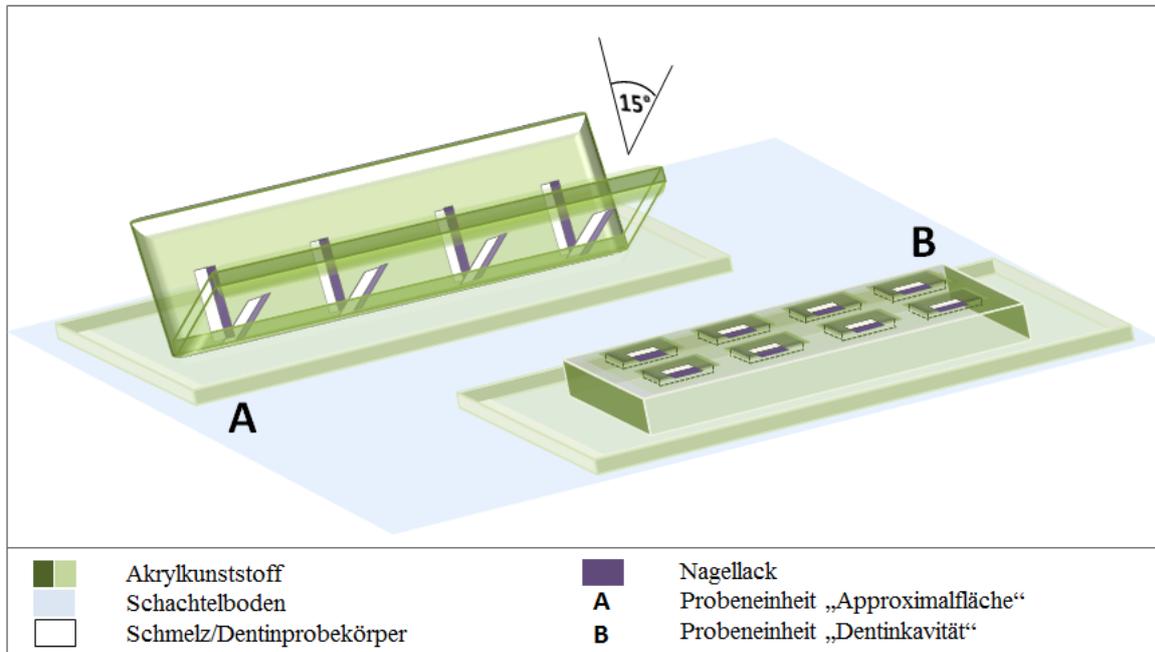


Abb. 2: Schematischer Aufbau einer Box. Pro Biofilmgruppe wurde eine Kunststoffschachtel mit zwei unterschiedlichen Probeneinheiten versehen (eine Schmelz- und eine Dentinprobeneinheit). Die Proben/Probekörper simulierten glatte approximale Schmelzflächen oder kavitierte Dentinoberflächen. Die Hälfte jeder Probe wurde mit Nagellack bedeckt und diente als Kontrollfläche. Die Schachteln mit den Probekörpern und jeweiligen Bakterienkulturen bildeten ein in sich geschlossenes System, dessen Stoffaustausch mit der Umwelt strenger Kontrolle unterlag. Zur übersichtlichen Darstellung wurde nur der Schachtelboden ohne Wände und Deckel dargestellt. Die Probeneinheiten wurden ohne Versetzung zueinander parallel aufgestellt. Auch wurden nicht, wie in der Abbildung acht, sondern 16 Proben pro Probeneinheit eingebaut. Auf die Darstellung der Klebefugen aus A-Silikon wurde ebenfalls verzichtet.

Bis zum Versuchsaufbau wurden alle Probekörper in Wasser aufbewahrt, um ein Austrocknen der Zahnhartsubstanzen zu vermeiden. Anschließend wurden die insgesamt 16 Probeneinheiten, bestehend aus je 16 Schmelz- und je 16 Dentinprobekörper, sterilisiert (121 °C, 2,1 bar, 34 min). Für jeden Versuchsdurchlauf wurden diese zu den jeweils vier Versuchsgruppen zufällig zugeordnet (Abb. 1).

4.4 Aufbau der künstlichen Mundhöhle

Das Ziel war ein möglichst genaues Mundhöhlenmilieu zu reproduzieren, um der Kariesentstehung und –progression auf natürliche Weise nahe zu kommen. Daher wurde ein computerkontrolliertes multistationäres Biofilmmodell eingesetzt, das auf vier voneinander abgegrenzte Räume (pro Raum eine Biofilmgruppe) verteilt war. Die Räume wurden von sterilen Kunststoffschachteln gebildet, die jeweils luftdichte Öffnungen für die Flüssigkeitszufuhr sowie die Abfuhr in den Boxen stehender Flüssigkeit besaßen.

Flüssigkeiten wurden den Räumen mittels programmierbaren Peristaltikpumpen (STA, Desaga-Sarstedt, Nürnberg) und sterilen Kunststoffschläuchen zu- bzw. abgeführt. Die Zufuhr resultierte in einem regelmäßigen Betropfen der Probekörper. Eine Box/Schachtel enthielt zwei Probeneinheiten: Eine mit Schmelz- und eine mit Dentinprobekörpern. Zur Simulation eines Mundhöhlenmilieus herrschten in den Räumen eine konstante Luftfeuchtigkeit von 100% und eine Temperatur von 37°C.

Vor Beginn des Versuches wurden Schachteln, Pumpen, Gefäße, Kleinmaterial für den Laborbedarf (z.B. Pipetten) und die Probekörper sowie zuführende Flüssigkeiten sterilisiert (Melag Medizintechnik, Berlin). Zur Ausbildung der Pellikel auf der Oberfläche der jeweiligen Zahnhartsubstanz wurde zu Beginn des Versuches jeder Probekörper mit 5 ml steril-filtriertem natürlichem Speichel benetzt. Dieser wurde von drei gesunden Personen (24-52 Jahre alt, zwei weiblich/eine männlich, alle mit geringem Kariesrisiko) gespendet. Das Kariesrisiko wurde hierbei anhand der Kariesrisikofaktoren wie Karieserfahrung, Fluoridaufnahme, Essgewohnheiten, Speichelfluss sowie Allgemeingesundheit bestimmt.[40] Nach 2 h wurde der Speichel entfernt und die den SM enthaltenden Probekörper mit je 5 ml der SM-Suspension beimpft. Das Beimpfen der Probekörper der Box von reinem SM erfolgte mithilfe einer serologischen Pipette (10 ml, Sarstedt). Das Vorgehen wurde nach 4, 8 und 12 h wiederholt und die SM-Biofilme bildeten sich schließlich 14 h lang aus.

Gemischte Biofilme sowie die Box des reinen BB-12 wurden daraufhin täglich mit 4,5 ml lebenden oder hitze-inaktivierten Bifidobakterien beimpft. Dieses Vorgehen sollte die tägliche Aufnahme von Probiotika simulieren. Zusätzlich wurde ab dem zweiten Versuchstag, den verschiedenen Biofilmgruppen mithilfe der Pumpen (1,25 ml/min, 15 min) ein steriles Gemisch aus MRS und 5%-iger Saccharose (Merck, Darmstadt) als Substrat zur Verfügung gestellt. Dieser Vorgang wurde täglich acht Mal wiederholt und endete abends mit einer nächtlichen Ruhepause von mind. 9 h 15 min. Dieser Vorgang sollte die tägliche Nahrungsaufnahme inklusive der Zwischenmahlzeiten simulieren. Nach der Nahrungsaufnahme folgt in einer natürlichen Mundhöhle eine Benetzung der Zähne mit Speichel. Dies wurde durch eine 20 min nach jeder Zuckerzufuhr simulierte Speichelzufuhr mit künstlich zubereitetem sterilen Speichel realisiert[41] (1,25 ml/min, 15 min). Somit hatte der Zucker bei jeder Zufuhr eine Verweildauer von insgesamt 35 min (15 min Zufuhrdauer selbst, 20 min Stehzeit). Anschließend erfolgte ein langsames Abspülen dieses durch den Speichel. (Abb. 3) Nach insgesamt zehn Tagen wurde der Versuch aufgelöst und die Probekörper wie folgt ausgewertet.

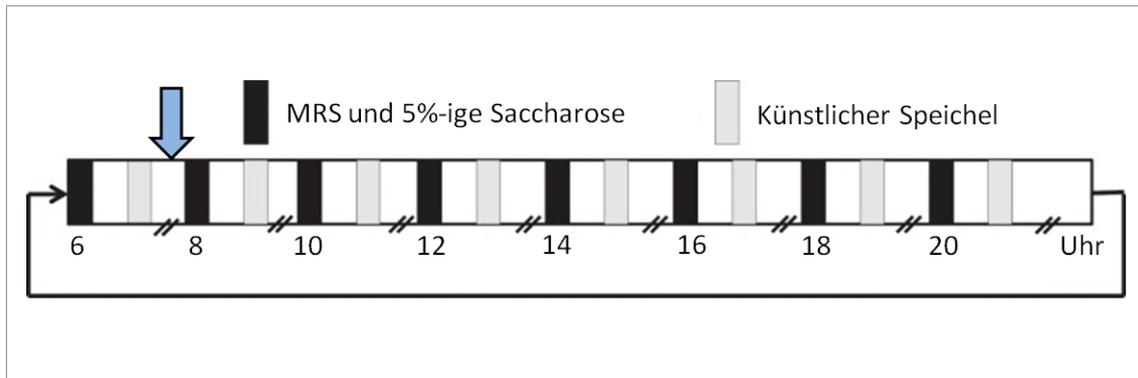


Abb. 3: Frequenz der zugeführten Medien (Tag 2-10). MRS und 5%-ige Saccharose (schwarz), sowie künstlicher Speichel (grau), wurden jeweils mit 1,25 ml/min für 15 min acht Mal täglich zugeführt. 20 min nach Beendigung der Saccharosezufuhr begann die Speichelzufuhr. Nachts erfolgte eine Ruhepause der Medienzufuhr. Es erfolgte eine tägliche Beimpfung der Probekörper mit 4,5 ml lebenden oder hitze-inaktivierten Bifidobakterien (Pfeil): tägliche Probiotikaaufnahme.

4.5 Analyse des pH-Wertes, der Bakterienzahl und der Biofilmmorphologie

Am zehnten Tag wurde der Versuch aufgelöst. Nach der Probenentnahme zur Bestimmung des pH und der Bakterienzahl wurden die Probekörper in Formalin und Glutaldehyd gemischt mit PBS über Nacht fixiert und anschließend mit Phosphatpufferter Salzlösung abgespült (5 × für mind. 30 min).

Die Proben wurden wie folgt ausgewertet: Zunächst wurde bei jedem der beiden identisch durchgeführten Versuche der pH-Wert eines beliebigen Biofilmes jedes Probekörpers mithilfe einer pH-Mikroelektrode (InLab Micro, Mettler-Toledo, Gießen, Deutschland) bestimmt. Hierzu wurde mit einer serologischen Pipette jeweils über einer Probe stehende Flüssigkeit entnommen. Nach Bestimmung des pH-Wertes wurde die Flüssigkeit dafür benutzt, um Gram-Färbungen zur ungefähren Beurteilung der Qualität und Quantität der jeweiligen Gruppen sowie eine mögliche Fremdinfektion zu beurteilen.

Als Nächstes wurde die Bakterienkonzentration auf den Probekörpern bestimmt. Diese wurde von jeweils sechs aufeinanderfolgenden Biofilmen pro Probekörper und Versuch bestimmt. Hierzu wurden die Biofilme mithilfe eines sterilen Skalpell aus definierten Arealen (2 mm x 2 mm) auf den Probekörpern entnommen. Diese wurden in jeweils 1 ml BHI-Lösung verwirbelt (Bender & Hobein, Zürich, Schweiz), in Reagenzgefäßen (SafeSeal Reagiergef. 2mm, Sarstedt) verdünnt (10^1 , 10^2 , 10^5) auf BHI-Agarplatten ausgestrichen und bei 37° anaerob herangezogen (Anaerocult, Merck; Dry Anaerobic Indicator Strips, Becton,

Dickinson and Company, Sparks, USA). Ergänzend wurden Bakterien der gemischten Biofilme (BB-12_{LE} × SM) unter aeroben Bedingungen ähnlich herangezogen. Nach 48 h wurden KBE/ml ausgezählt.

Zur morphologischen Analyse der Biofilme wurden aus jedem Probekörper vier Proben entnommen und geteilt, wobei die eine Hälfte zur Analyse mittels TMR (siehe unten) und die andere zur Rasterelektronenmikroskopie diente. Für die Auswertung im REM wurden die Proben zunächst mit 2,5%-igem Glutaraldehyd in cacodylischem Puffer fixiert, dreifach mit cacodylischem Puffer gespült und anschließend 30-60 min folgebunden in 30-100%-igem Ethanol dehydriert. Bei gewünschtem Austrocknungszustand wurden die Oberflächen der Proben mit Gold beschichtet und ausgewertet (LEO 1450VP, Zeiss, Oberkochen, Deutschland). Das Kolorieren der Abbildungen zur Darstellung der verschiedenen Bakterienarten erfolgte mithilfe von Corel Draw Photopoint X6 (Corel, Ottawa, Canada).

4.6 Transversale Mikroradiographie (TMR)

Für die Transversale Mikroradiographie mussten die Proben zunächst zugeschnitten werden. Dafür wurden die Oberflächen der Probekörper mittels Akrylkunststoff stabilisiert und die Proben mit der Bandsäge grob auseinandergeschnitten. Diese wurden anschließend mittels Sekundenkleber (Loctite, Klebstoffband, Niederwörresbach) auf Objektträger (Marienfeld, Lauda-Königshofen) geklebt und mit einer Bandsäge (s. o.) in 300 µm dünne Plättchen[38] zugeschnitten, die im Anschluss auf 100 µm geschliffen und hochglanzpoliert wurden. Die einzelnen Schnitte wurden beidseitig mittels Tesafilm (Tesa, Hamburg, Deutschland) stabilisiert und in eine Haltevorrichtung (LEGO, Grasbrunn) eingeklebt (Abb. 4). Zur Durchdringung der Proben mittels Röntgenstrahlen wurde eine nickelgefilterte Kupfer-Röntgenquelle (PW 3830, Philips, Kassel, Deutschland) verwendet. Benutzt wurde ein vertikaler Tubus (PW 2213/20, Phillips, 280 mm Strahlung-Film-Abstand). Die zugehörigen Filme (35 mm S/W-Positive, Fujifilm, Tokyo, Japan) wurden jeweils 10 s lang exponiert und unter standardisierten Bedingungen nach Herstellerangaben analog entwickelt. Die Analyse der Bilder erfolgte nach Digitalisierung mittels eines Mikroskops (Axioplan 60318, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) und einer Kamera (CFW 1312M, Scion, Frederick, USA) sowie einer Software zur Evaluation von mikroradiografischen Abbildungen (TMR for Windows 5.25; UMCG, Groningen, Niederlande). Während der Vorbereitung für die TMR frakturierten manche Probekörper und konnten nicht ausgewertet werden (ca. 16%).

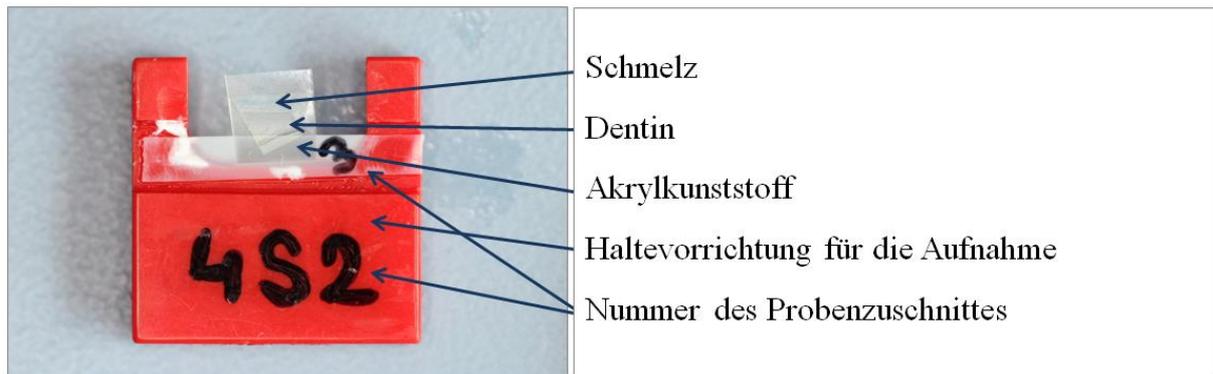


Abb. 4: Beispiel einer für die TMR vorbereiteten Probe. Es handelt sich um einen Schnitt einer Schmelzprobeneinheit. Der Schnitt wurde mit Tesafilm stabilisiert (sichtbares durchsichtiges Plättchen) und wiederum in die Haltevorrichtung eingeklebt. Oberhalb des Schmelzes befindet sich daher lediglich Akrylkunststoff zur Stabilisierung der Hartschubstanz während des Zuschneidens. Alle Schnitte wurden mit Nummern versehen, um ein Verwechseln der Proben während der Radiographie zu vermeiden.

4.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe von SPSS 20 (IBM, Armonk, USA). Es wurde eine Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt, um die Auswirkung von Einflussfaktoren auf den Mineralverlust, die Bakterienzahl und den pH darzustellen. Die Vergleiche zwischen einzelnen Gruppen wurden mittels t-Tests durchgeführt.

5 Ergebnisse

5.1 Auswertung der Bakterienzahl und des pH-Wertes

Die Ergebnisse von zwei unabhängigen Durchläufen des Experimentes variierten nicht signifikant voneinander und wurden schließlich zum Gesamtergebnis gepoolt. Erwartet wurde eine mögliche Variation der Ergebnisse abhängig von der Art der untersuchten Zahnhartsubstanz und der Biofilmzusammensetzung.

Die Art der Zahnhartsubstanz (Schmelz- oder Dentinprobekörper) beeinflusste die Anzahl der ausgezählten Bakterienkolonien signifikant ($p < 0.001$). Dies galt jedoch nicht für die Biofilmzusammensetzung einzelner Boxen (Tab. 1). Biofilme auf kavitierten Dentinoberflächen enthielten eine wesentlich höhere Bakterienzahl als Biofilme auf approximalen Schmelzoberflächen. Ausgenommen waren Biofilme von BB-12-Monokulturen. Die zur Auswertung parallel aerob und anaerob angezogenen gemischten Biofilme von SM und von lebenden BB-12 erzielten eine höhere Bakterienzahl unter aeroben als unter anaeroben Bedingungen.

Der pH-Wert befand sich in allen Boxen im mäßig sauren Bereich und wurde weder von der Art der Zahnhartsubstanz, noch der Bakterienzusammensetzung wesentlich beeinflusst ($p > 0.05$). Auch variierte er zwischen den einzelnen Versuchseinheiten nicht erheblich (Tab. 1).

Die täglich zugeführten Bakterien unterlagen strenger qualitativer und quantitativer Kontrolle. Die ungefähre Anzahl und der morphologische Zustand der zugeführten Bakterien waren zufriedenstellend. Mikroskopische Inspektion des täglichen Abwassers und des Abwassers nach Versuchsende zeigten keine Fremdinfection der Versuchseinheit an.

Biofilm- zusammensetzung ^a	Zahnhartsubstanz ^c		
	Approximaler Schmelz	Kavitiertes Dentin	Irrtums- wahrscheinlichkeit
<i>Anaerobe Kultur</i>	<i>KBE × 10⁶/ml, MW ± Standardabweichung (pH, MW ± SA)^d</i>		
SM	12 ± 14 (4.2 ± 0.4)	110 ± 132 (4.5 ± 0.3)	<i>p</i> < 0.05
BB-12	0.4 ± 0.8 (4.5 ± 0.4)	24 ± 49 (4.2 ± 0.2)	<i>p</i> > 0.05
BB-12 _{LE} × SM	5.7 ± 7.4 ^b (4.3 ± 0.2)	91 ± 121 (4.3 ± 0.4)	<i>p</i> < 0.05
BB-12 _{HI} × SM	9.7 ± 7.4 (4.5 ± 0.2)	102 ± 123 (4.3 ± 0.5 ±)	<i>p</i> < 0.05
<i>Aerobe Kultur</i>	<i>KBE × 10⁶/ml, MW ± Standardabweichung</i>		
BB-12 _{LE} × SM	24 ± 60	186 ± 262	<i>p</i> < 0.05

^a Einzelne und gemischte Biofilmkulturen wurden auf Schmelz- oder Dentinoberflächen gezüchtet. Pro Versuchsdurchlauf und Gruppe (n_{ges}/Gruppe) wurden sechs Biofilme ausgewertet. Dabei wurden kolonienbildende Einheiten (KBE) auf dem MRS-Agar unter anaeroben Bedingungen angezogen (gilt für SM und BB-12).

^b Gemischte Biofilme von SM und lebendem BB-12 wurden zusätzlich unter aeroben Bedingungen angezogen (gilt nur für SM).

^c Die Bakterienzahl variierte zwischen den Schmelz- und Dentinbiofilmen stark (*p* < 0.001, ANOVA).

^d Der pH ist der von nach Versuchsende entnommenen Proben und bezieht sich nicht auf die Anzucht der Bakterien auf dem Agar. Der pH blieb bei allen Versuchseinheiten nahezu gleich (*p* > 0.05).

Tab. 1: Bakterielle Analyse der Biofilme und pH-Wert

5.2 Auswertung des Mineralverlustes

Anders als es der Fall bei der Bakterienzahl und dem pH-Wert war, beeinflussten die Biofilmzusammensetzung (*p* = 0.01, ANOVA) und die Art der Zahnhartsubstanz (*p* < 0.001) signifikant die Ergebnisse des Mineralverlustes. Für alle Biofilmgruppen bis auf [BB-12_{LE} × SM] galt, dass der Mineralverlust von kavitiertem Dentin (*p* < 0.05, t-Test) höher war als von approximalen Schmelzflächen (*p* > 0.05).

SM als kariesassoziiertes Bakterium verursachte alleine, wie erwartet, Mineralverlust beider Zahnhartsubstanzen. BB-12 alleine verursachte ebenso Mineralverlust von Schmelz- und Dentinoberflächen, jedoch signifikant weniger als SM.

Für die gemischten Kulturen galt Folgendes: Zusammengefasst unterschieden sich gemischte Biofilme mit SM und lebendem BB-12 in ihrem Mineralverlust von denen der Monokulturen von SM nicht. Der Unterschied variierte in Anhängigkeit von der Zahnhartsubstanz (*p* >

0.05). Der von [BB-12_{LE} × SM] verursachte Mineralverlust war für approximale Schmelzoberflächen größer. Auf Dentinoberflächen dagegen war ein geringerer Mineralverlust im Vergleich zum Mineralverlust bei der reinen SM-Kultur. Demgegenüber führten gemischte Biofilme mit SM und hitze-inaktivierten BB-12 [BB-12_{HI} × SM] zu einem signifikant geringeren Mineralverlust auf Dentinoberflächen als SM-Monokulturen ($p < 0.01$). Der Mineralverlust auf beiden Zahnhartsubstanzen war bei der Kombination [BB-12_{HI} × SM] jedoch geringer als bei reinen SM-Kulturen (Tab. 1).

5.3 Auswertung der Biofilmmorphologie

Gemischte Biofilme von SM und BB-12 wurden unter dem REM bezüglich ihrer Morphologie und Aggregation beider Bakterien ausgewertet. Die Bakteriendichte auf glatten Schmelzoberflächen war geringer als auf kavitierten Dentinoberflächen und wurde von SM dominiert. In den ausgewerteten Biofilmen fanden wir keine Aggregation von SM mit lebendem oder hitze-inaktiviertem BB-12 (Abb. 5).

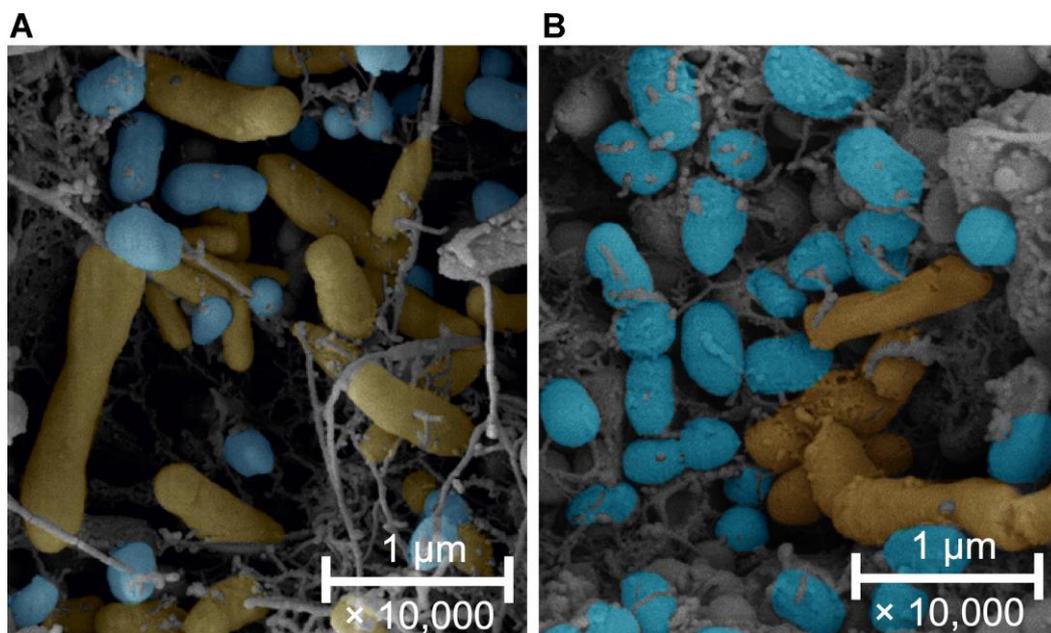


Abb. 5: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der gemischten Biofilme. (A) Gemischter Biofilm [BB-12_{LE} × SM]. (B) Gemischter Biofilm [BB-12_{HI} × SM]. Streptokokken sind in Türkis und Bifidobakterien in Ocker hervorgehoben. Bei beiden Biofilmen ist keine Aggregation der Bakterien zu erkennen. Maßstab: 1 μm (Vergrößerungsfaktor 10,000).

6 Diskussion

6.1 Diskussion von Studienergebnissen

Bifidobakterien werden aufgrund einer Vielzahl positiver Eigenschaften zur Bekämpfung zahlreicher gastrointestinaler Störungen eingesetzt.[15] Da kariespathogene Bakterien wie *S. mutans* mitunter ursächlich für die Kariesentstehung und –progression sind, könnte durch eine Inaktivierung dieser Bakterien durch Probiotika auch eine Inaktivierung der Karies erreicht werden.

Es wird regelmäßig auf einen hemmenden Einfluss probiotischer Bakterien oder ihrer Überstände auf andere Spezies verwiesen. In der vorliegenden Arbeit wird der Begriff „inaktivierte Probiotika“ verwendet. Damit wird die Unfähigkeit der Bakterien zur Vermehrung und eine abgesetzte Pathogenität verdeutlicht, jedoch nicht ein Mangel an Wirkung und Wirksamkeit im eingesetzten Gebiet. Inaktivierten Bakterienkulturen oder deren Metaboliten werden verschiedene Eigenschaften zugeschrieben, aus denen der Effekt auf den Wirt abgeleitet werden kann: Ihnen wird u. a. die Fähigkeit zugesprochen, mit anderen Spezies zu aggregieren.[18,39] Auch sollen probiotische Bakterien die Eigenschaft der Produktion von bakteriellen Verbindungen besitzen, wie extrazellulären Polysacchariden. Exopolysaccharide von Bifidobakterien sollen u. a. eine antimikrobielle Wirkung gegen mehrere pathogene Bakterien haben.[42] Es ist bekannt, dass Bifidobakterien sogenannte Bakteriozine produzieren.[43] Das sind antibakterielle Peptide, die pathogene Mikroorganismen, wie *C. perfringens* oder *E. coli* bekämpfen können.[44]

Der nützliche Einsatz probiotischer Bakterien zur Einflussnahme auf die dentale Karies wurde bisher durch Studien nicht nur ungenügend belegt, sondern ebenfalls häufig widerlegt. In den meisten In-vivo-Studien der letzten Jahre, in denen man sich mit dem Thema der Kariesprävention mittels Probiotika befasst hat, wurde die Anzahl von SM im Speichel vor und nach einer probiotischen Therapie (orale Einnahme von z.B. Joghurt) miteinander verglichen. Manche dieser Studien konnten eine statistisch relevante Reduktion der Anzahl von SM im Speichel bestätigen.[45–48] Eine Reduktion der Anzahl von SM ergibt jedoch nicht zwangsweise eine Reduktion der Karies und längst nicht alle dieser Studien konnten eine Reduktion von SM beobachten, bzw. nicht langfristig von ihr ausgehen.[49] In einer Studie beeinflusste eine monatelange Einnahme von BB-12 das Kariesvorkommen bei Kindern nicht. Diese hatte ebenso keinen Einfluss auf das orale Vorkommen und die

Ausbreitung von SM. Ebenfalls konnte keine dauerhafte Kolonisation von BB-12 in der Mundhöhle beobachtet werden.[30,31]

Die vorliegende Studie bestätigt das kariogene Potential von BB-12 *in vitro*. Die Monokultur von BB-12 verursachte Mineralverlust auf Schmelz- und Dentinoberflächen, jedoch in einem geringeren Ausmaß als die Monokultur von SM. Schlussfolgernd ließe sich vermuten, dass eine Kombination von BB-12 und SM zu einem noch größeren Anstieg des Mineralverlustes führen müsste. Das war teilweise der Fall. Gemischte Biofilme mit SM und lebendem BB-12 verursachten auf dem Schmelz mehr Mineralverlust als reine SM-Kulturen. Auf dem Dentin fand jedoch eine Reduktion des Mineralverlustes im Vergleich zu SM-Kulturen statt.

Studien belegen, dass lebende sowie abgetötete Stämme ähnliche bzw. sich ergänzende probiotische Eigenschaften aufweisen. Der Vorteil abgetöteter probiotischer Bakterien läge jedoch in der Sicherheit bei der Verwendung pathogener Bakterien und der längeren Haltbarkeitsdauer.[50] Außerdem wird eine einfachere Standardisierung der Bakterienzahl ermöglicht. Neben der vorliegenden Studie wird in einer weiteren Studie über eine mögliche Auswirkung von hitze-inaktivierten probiotischen Bakterien auf die dentale Karies berichtet. Die weitere Studie zeigte einen Rückgang des Vorkommens von SM und Karies bei Ratten nach einer Aufnahme von hitzeabgetöteten *Lactobacillus paracasei*. [18]

In der vorliegenden Studie reduzierten hitze-inaktivierte BB-12-Kulturen im Vergleich zu SM-Kulturen die Kariogenität von Biofilmen in Dentinkavitäten signifikant. Da dies jedoch nicht für die approximalen Schmelzoberflächen galt, bestätigten sich die in dieser Arbeit aufgestellten Hypothesen nur teilweise. Karies hat eine Demineralisation der Zahnhartsubstanzen zur Folge. Deshalb steht das Ausmaß des Mineralverlustes als Maß für die Kariogenität. Es konnte jedoch keine signifikante Korrelation zwischen dem Mineralverlust der Zahnhartsubstanzen, der Bakterienzahl in kariösen Biofilmen und dem pH-Wert festgestellt werden.

Eine vorangegangene Studie erzielte ähnliche Ergebnisse.[38] Diese wurde unter ähnlichen Bedingungen durchgeführt: Es wurden Schmelz- und Dentinprobekörper angefertigt und nach zehn Tagen regelmäßiger Zuckerezufuhr der Mineralverlust nach Zugabe von SM, *Lactobacillus rhamnosus* (LGG) und der Kombination beider Bakterienstämme bestimmt. In diesem Versuch wurden jedoch keine inaktivierten Bakterien verwendet. Die Ergebnisse zeigten ein erhöhtes kariogenes Potential der gemischten Biofilme und einen erhöhten Mineralverlust speziell des Dentins. Die Bakterienzahl korrelierte dabei nicht mit dem

Mineralverlust der Zahnhartsubstanzen. Die Studie belegt ebenfalls, dass der Einsatz lebender kariogener probiotischer Bakterien zur Kariesinhibition nicht sinnvoll ist. Eine weitere In-vitro-Studie untersuchte die Auswirkung von *Lactobacillus rhamnosus* LB21 auf SM auf bovinen Schmelzproben. Die Versuchsdauer war geringer (96 h), aber die Probekörper wurden mit einer unterschiedlich konzentrierten Bakterienlösung beimpft. Die Studie ergab weder einen signifikanten Unterschied im Mineralverlust, noch in der Bakterienzahl beim Beimpfen mit probiotischen Bakterien. Eine Aggregation beider Spezies konnte ebenso nicht beobachtet werden.[51]

In der vorliegenden Studie konnte keine sichtbare Aggregation zwischen SM und hitze-inaktiviertem BB-12 erkannt werden. Andere Studien belegen eine auch durch vorheriges Hitze-inaktivieren von Bakterien sichtbare Aggregation ausgewählter Stämme von Laktobazillen mit SM.[18,39] Es wurde gezeigt, dass längst nicht jedes probiotische Bakterium diese Fähigkeit besitzt.[39] Dies scheint bei BB-12 auch nicht der Fall zu sein. Leider konnte eine mögliche Aktivierung wirtseigener Immunabwehr durch BB-12 im vorliegenden In-vitro-Versuch nicht beurteilt werden. Eine Reduktion der Bakterienzahl von SM, die durch BB-12 oder seiner hitze-inaktivierten Überstände hervorgerufen sein könnte, konnte ebenfalls nicht bestätigt werden. Ein Wettbewerb beider Bakterienspezies um Nahrung kann in diesem Zusammenhang ebenso ausgeschlossen werden.

Einer der Ziele dieser Studie war belegen zu können, dass hitze-inaktiviertes BB-12 nicht nur die Kariogenität der dentalen Biofilme verändert, sondern auch die Biofilmmzusammensetzung beeinflusst. Bifilakt, das Bakterizin von BB-12, ist für seine ausgeprägten antimikrobiellen Eigenschaften bekannt. Bifilakt soll säureaktiv, allerdings nicht hitzestabil sein.[44] Das würde möglicherweise erklären, warum die Bakterienzahl von SM von hitze-inaktiviertem BB-12 nicht beeinflusst wurde. Es konnte ebenso gezeigt werden, dass die bakterienspezifische Wirkung der Bakterizine stärker, als die -unspezifische ist.[44] Demnach ist ein Mangel an Sensitivität von SM gegenüber antibakteriellen Produkten von BB-12 nicht auszuschließen. Die Reduktion der Kariogenität von SM könnte, unabhängig vom Einfluss auf dessen Adhäsion oder Wachstum, eine Reduktion seines Stoffwechsels als Ursache haben. In der Literatur wurde über Veränderungen in der Expression von Virulenzfaktoren vom enteropathogenen Bakterium *E. coli* bei Präsenz von Überständen probiotischer Enterokokken berichtet.[52] Wenn hitze-inaktiviertes BB-12 oder seine Überstände dazu führen, beispielsweise die Säurebildung von SM herabzusetzen, könnte seine Kariogenität dadurch negativ beeinflusst werden.

In der vorliegenden Studie konnte eine unerwartete Veränderung der kariogenen Aktivität in Dentinkavitäten, jedoch nicht auf glatten Schmelzoberflächen beobachtet werden. Dies könnte auf eine mögliche geminderte Kariogenität des Modells in Bezug auf für beide Bakterienspezies nicht optimale Umweltbedingungen zurückzuführen sein. Sicherlich trug der Unterschied in der Kariesprogression beider Zahnhartsubstanzen auch zu diesem Ergebnis bei. Überdies unterstützt das Ergebnis Zweifel bezüglich der Adhäsion und Retention probiotischer Bakterien auf dem Schmelz. Die Ergebnisse vorangegangener Studien zeigten die Fähigkeit von Bifidobakterien in Speichel zu überleben, jedoch eine verringerte Adhäsion auf speichelbenetztem Hydroxylapatit zu haben.[53] Es besteht die Annahme, dass die In-vivo-Adhäsion durch andere orale Bakterien begünstigt wird.[53]

6.2 Diskussion des Studiendesigns

In der In-vitro-Studie wurde eine künstliche Mundhöhle nachgebildet. Das Ziel war eine möglichst naturgetreue Kariesentstehung und –progression. Die Menge und Frequenz der zugeführten Medien und die Gestaltung der Proben wurden bewusst gewählt. Dabei war es wichtig, in ihrem chemischen Aufbau und in ihrer Exposition zur Mundhöhle verschiedene Probekörper auszutesten. Bovine Zähne hatten den Vorteil größer als menschliche Zähne zu sein, sodass die Probekörper größer und gleichmäßiger gestaltet werden konnten. Ferner ähneln diese in ihrer Zusammensetzung und ihrem Aufbau stark den menschlichen Zähnen.[54]

Das gewählte Studiendesign bringt jedoch einige Einschränkungen mit sich. Zum einen hemmte die aerobe Anzucht die Aktivität von BB-12 und es ist zu vermuten, dass gemischte Biofilme [BB-12_{LE} × SM] auch tote BB-12 enthielten. Somit ist anzunehmen, dass die Kariogenität einer reinen lebenden BB-12-Kultur höher ist als die Ergebnisse darlegen. Zum anderen ist es eine In-vitro-Studie. Obwohl versucht wurde, ein möglichst natürliches Umfeld nachzuahmen, unterbleibt z. B. eine Aussage über die Auswirkungen der Bakterien auf natürliche Pellikel. Ebenso kann die komplexe Ökologie der oralen Biofilme *in vitro* nicht komplett simuliert werden. Das Ergebnis hätte eventuell anders ausfallen können, wenn noch andere Mikroorganismen anwesend gewesen wären. Andere kariogene Mikroorganismen außer SM hätten von BB-12 beeinflusst werden können.[55] Mögliche Unterschiede in den Ergebnissen in Abhängigkeit von individuellem Kariesrisiko unterbleiben ebenso. Sicherlich hatte der geringe Mineralverlust des Schmelzes u. a. eine kurze Versuchsdauer als Ursache. Diese wurde in der Phase der Vorversuche zur Vermeidung von Kontaminationen der

Versuchseinheiten bewusst so gewählt. Eine verlängerte Versuchsdauer könnte Unterschiede in der Kariogenität der verschiedenen Biofilmkompositionen noch mehr verdeutlichen, sodass eventuell eine Herabsetzung der Kariogenität von SM durch hitze-inaktiviertes BB-12 auch auf dem Schmelz gezeigt werden könnte. Das eigentliche Ausmaß der Reduktion der Kariogenität durch hitze-inaktiviertes BB-12 bleibt weiterhin unklar und könnte anhand einer In-vivo- oder In-situ-Studie ferner beurteilt werden.

Weitere Forschungsarbeit könnte u. a. mögliche Auswirkungen anderer hitze-inaktivierter probiotischer Bakterien auf die Kariogenität dentaler Biofilme untersuchen. Beispielsweise könnte hierfür ein zur Aggregation mit SM fähiges Bakterium[39] eingesetzt werden. Auch sollte die Abhängigkeit des Ausmaßes des Mineralverlustes von der zugefügten Bakteriendosis über eine längere Zeit untersucht werden. Letztlich ist der zugrunde liegende Mechanismus der veränderten Biofilmaktivität zu erforschen. In der aktuellen Literatur wird immer mehr versucht, mögliche Mechanismen der Auswirkung von Probiotika auf SM zu erklären.[56,57] Eine Erklärung für eine mögliche Inhibition der Karies unterbleibt jedoch weiterhin und wird als ein Ergebnis einer mikrobiellen Wechselwirkung vermutet[57]. In der Kariesforschung ist die aktuelle literarische Beweislage bezüglich der Kariesinhibition durch Probiotika nur ungenügend,[16] sodass Probiotika für den Einsatz gegen die dentale Karies in weiteren Untersuchungen ferner auf ihre Sicherheit und Wirksamkeit hin überprüft werden müssen.[11]

6.3 Schlussfolgerungen

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie bestätigen die aufgestellten Hypothesen nur teilweise:

1. BB-12 verursacht Mineralverlust der Zahnhartsubstanzen Schmelz und Dentin, jedoch in einem signifikanteren Umfang als SM.
2. Eine tägliche Aufnahme von hitze-inaktiviertem BB-12 reduziert signifikant den Mineralverlust und somit die Kariogenität von SM *in vitro*. Dies gilt jedoch nicht für lebende BB-12-Kulturen.
3. Die Reduktion des Mineralverlustes durch SM in Anwesenheit von BB-12 ist bei kavitierten Dentinoberflächen signifikanter als bei approximalen Schmelzoberflächen.

Diese Studie ist zu dem Ergebnis gekommen, dass das lebende probiotische Bakterium BB-12 die Kariogenität von SM nicht wesentlich reduziert und *in vitro* nur eine geringe Retention auf Schmelzoberflächen hat. Im Gegensatz dazu reduziert hitze-inaktiviertes BB-12 die

Kariogenität von SM in Dentinkavitäten. Diese Studie bietet neue Ergebnisse in der Auswirkung von Probiotika (BB-12) auf das kariogene Bakterium SM sowie mögliche Erklärungen für seine Wirkungsweise. Es konnte bestätigt werden, dass Überreste inaktivierter probiotischer Bakterien einen hemmenden Einfluss auf dentale Karies (speziell Dentin) haben und somit zur Karieskontrolle eingesetzt werden könnten.

Der eigentliche Mechanismus bzw. eine eindeutige Erklärung für die Reduktion der Kariogenität durch hitze-inaktiviertes BB-12 unterbleibt weiterhin und sollte durch eine weitere (In-vivo oder In-situ)-Studie verifiziert und erklärt werden.

7 Zusammenfassung

Innerhalb der letzten Jahre werden probiotische Bakterien im Zusammenhang mit Prävention und Therapie von Karies vermehrt diskutiert. Da sich die Bakterien innerhalb eines Biofilms möglicherweise gegenseitig beeinflussen, könnte eine Zugabe von Probiotika zu einer Veränderung der Bakterienzusammensetzung und -aktivität führen. So könnte ein Probiotikum mit einem negativen Einfluss auf kariesassoziierte Bakterien, wie *S. mutans*, kariesinhibierend wirken. Andererseits sind die meisten probiotischen Bakterien azidogen und azidurisch und könnten selbst zur Neuentstehung bzw. Progression von Karies führen. Eine Möglichkeit, die Pathogenität der Bakterien herabzusetzen, ist ihre Inaktivierung durch Hitze.

Die meisten Studien zu oralen Probiotika haben die Effekte auf *S. mutans*, nicht aber direkt auf kariesrelevante Parameter wie den Mineralverlust von Zahnhartsubstanzen hin untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des probiotischen Bakteriums BB-12 auf die Kariogenität des *S. mutans* sowie die mögliche Kariogenität von BB-12 selbst untersucht.

Es wurde ein nach außen abgegrenztes Mundhöhlenmilieu mit kariogenem Potential simuliert. Die Probekörper aus bovinem Schmelz und Dentin wurden zersägt, poliert und anschließend in Gruppen, als Probekörpereinheiten, zur Simulation von Approximalflächen oder Dentinkavitäten in Akrylkunststoff eingebettet. Auf die Probekörper wurden Monokulturen von SM, BB-12 oder Mischkulturen aus SM und lebendem BB-12 oder SM und hitze-inaktiviertem BB-12 zur Ausbildung von Biofilmen gegeben. Nach zehn Tagen wurden die Bakterienzahl und der pH-Wert einzelner Biofilme sowie der Mineralverlust der Probekörper ermittelt.

Bei allen Biofilmen war der Mineralverlust der kavitierten Dentinoberflächen signifikanter als auf glatten Schmelzoberflächen. Monokulturen von BB-12 verursachten deutlich weniger Mineralverlust als SM auf Schmelz- und Dentinoberflächen. Lebendes BB-12 reduzierte die Kariogenität von SM nicht, während hitze-inaktiviertes BB-12 die Kariogenität von SM auf Dentinoberflächen signifikant herabsetzte. Die Bakterienzahl war auf kavitiertem Dentin höher als auf proximalem Schmelz, variierte jedoch unabhängig von den Bakterienspezies.

Hitze-inaktiviertes *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (BB-12) reduzierte die Kariogenität von *Streptococcus mutans* in Dentinkavitäten *in vitro*. Ein möglicher Ansatz für eine zukünftige Karietherapie könnte der Einsatz von inaktivierten probiotischen Bakterien nach Belegung durch weitere Studien durchaus sein.

8 Literaturverzeichnis

1. Schwendicke F, Horb K, Kneist S, Dörfer C, Paris S. Effects of heat-inactivated Bifidobacterium BB12 on cariogenicity of Streptococcus mutans in vitro. Arch Oral Biol. Dezember 2014;59(12):1384–90.
2. Marsh PD. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. Adv Dent Res. Juli 1994;8(2):263–71.
3. Meyer-Lückel H, Paris S, Ekstrand K. Karies: Wissenschaft und Klinische Praxis. Georg Thieme Verlag; 2012. 479 S.
4. Carvalho JC, Ekstrand KR, Thylstrup A. Dental plaque and caries on occlusal surfaces of first permanent molars in relation to stage of eruption. J Dent Res. Mai 1989;68(5):773–9.
5. Thylstrup A, Bruun C, Holmen L. In vivo caries models--mechanisms for caries initiation and arrestment. Adv Dent Res. Juli 1994;8(2):144–57.
6. ten Cate JM, Featherstone JD. Mechanistic aspects of the interactions between fluoride and dental enamel. Crit Rev Oral Biol Med Off Publ Am Assoc Oral Biol. 1991;2(3):283–96.
7. Lendenmann U, Grogan J, Oppenheim FG. Saliva and dental pellicle--a review. Adv Dent Res. Dezember 2000;14:22–8.
8. Ogaard B, Rølla G, Arends J. In vivo progress of enamel and root surface lesions under plaque as a function of time. Caries Res. 1988;22(5):302–5.
9. Marsh PD. Dental plaque as a biofilm and a microbial community - implications for health and disease. BMC Oral Health. 15. Juni 2006;6 Suppl 1:S14.
10. Meyer-Lueckel H, Paris S. When and How to Intervene in the Caries Process. Oper Dent. September 2016;41(S7):S35–47.
11. Gruner D, Paris S, Schwendicke F. Probiotics for managing caries and periodontitis: Systematic review and meta-analysis. J Dent. Mai 2016;48:16–25.
12. Meurman JH. Probiotics: do they have a role in oral medicine and dentistry? Eur J Oral Sci. Juni 2005;113(3):188–96.
13. Twetman S, Keller MK. Probiotics for caries prevention and control. Adv Dent Res. September 2012;24(2):98–102.
14. Gilad O, Svensson B, Viborg AH, Stuer-Lauridsen B, Jacobsen S. The extracellular proteome of Bifidobacterium animalis subsp. lactis BB-12 reveals proteins with putative roles in probiotic effects. Proteomics. Juni 2011;11(12):2503–14.
15. Russell DA, Ross RP, Fitzgerald GF, Stanton C. Metabolic activities and probiotic potential of bifidobacteria. Int J Food Microbiol. 1. September 2011;149(1):88–105.

16. Kistler JO, Pesaro M, Wade WG. Development and pyrosequencing analysis of an in-vitro oral biofilm model. *BMC Microbiol.* 10. Februar 2015;15:24.
17. Glavina D, Gorseta K, Skrinjarić I, Vranić DN, Mehulić K, Kozul K. Effect of LGG yoghurt on *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* spp. salivary counts in children. *Coll Antropol.* März 2012;36(1):129–32.
18. Tanzer JM, Thompson A, Lang C, Cooper B, Hareng L, Gamer A, Reindl A, Pompejus M. Caries inhibition by and safety of *Lactobacillus paracasei* DSMZ16671. *J Dent Res.* September 2010;89(9):921–6.
19. Beighton D, Al-Haboubi M, Mantzourani M, Gilbert SC, Clark D, Zoitopoulos L, Gallagher JE. Oral Bifidobacteria: caries-associated bacteria in older adults. *J Dent Res.* September 2010;89(9):970–4.
20. van Houte J, Lopman J, Kent R. The final pH of bacteria comprising the predominant flora on sound and carious human root and enamel surfaces. *J Dent Res.* April 1996;75(4):1008–14.
21. Tanner ACR, Sonis AL, Lif Holgerson P, Starr JR, Nunez Y, Kressirer CA, Paster BJ, Johansson I. White-spot lesions and gingivitis microbiotas in orthodontic patients. *J Dent Res.* September 2012;91(9):853–8.
22. Burton JP, Drummond BK, Chilcott CN, Tagg JR, Thomson WM, Hale JDF, Wescombe PA. Influence of the probiotic *Streptococcus salivarius* strain M18 on indices of dental health in children: a randomized double-blind, placebo-controlled trial. *J Med Microbiol.* Juni 2013;62(Pt 6):875–84.
23. Caglar E, Sandalli N, Twetman S, Kavaloglu S, Ergeneli S, Selvi S. Effect of yogurt with *Bifidobacterium* DN-173 010 on salivary mutans streptococci and lactobacilli in young adults. *Acta Odontol Scand.* November 2005;63(6):317–20.
24. Campus G, Cocco F, Carta G, Cagetti MG, Simark-Mattson C, Strohmenger L, Lingström P. Effect of a daily dose of *Lactobacillus brevis* CD2 lozenges in high caries risk schoolchildren. *Clin Oral Investig.* 2014;18(2):555–61.
25. Cildir SK, Germec D, Sandalli N, Ozdemir FI, Arun T, Twetman S, Caglar E. Reduction of salivary mutans streptococci in orthodontic patients during daily consumption of yoghurt containing probiotic bacteria. *Eur J Orthod.* August 2009;31(4):407–11.
26. Näse L, Hatakka K, Savilahti E, Saxelin M, Pönkä A, Poussa T, Korpela R, Meurman JH. Effect of long-term consumption of a probiotic bacterium, *Lactobacillus rhamnosus* GG, in milk on dental caries and caries risk in children. *Caries Res.* Dezember 2001;35(6):412–20.
27. Singh RP, Damle SG, Chawla A. Salivary mutans streptococci and lactobacilli modulations in young children on consumption of probiotic ice-cream containing *Bifidobacterium lactis* Bb12 and *Lactobacillus acidophilus* La5. *Acta Odontol Scand.* November 2011;69(6):389–94.

28. Keller MK, Hasslöf P, Dahlén G, Stecksén-Blicks C, Twetman S. Probiotic supplements (*Lactobacillus reuteri* DSM 17938 and ATCC PTA 5289) do not affect regrowth of mutans streptococci after full-mouth disinfection with chlorhexidine: a randomized controlled multicenter trial. *Caries Res.* 2012;46(2):140–6.
29. Marttinen A, Haukioja A, Karjalainen S, Nylund L, Satokari R, Öhman C, Holgerson P, Twetman S, Söderling E. Short-term consumption of probiotic lactobacilli has no effect on acid production of supragingival plaque. *Clin Oral Investig.* Juni 2012;16(3):797–803.
30. Taipale T, Pienihäkkinen K, Alanen P, Jokela J, Söderling E. Administration of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 in early childhood: a post-trial effect on caries occurrence at four years of age. *Caries Res.* 2013;47(5):364–72.
31. Taipale T, Pienihäkkinen K, Salminen S, Jokela J, Söderling E. *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 administration in early childhood: a randomized clinical trial of effects on oral colonization by mutans streptococci and the probiotic. *Caries Res.* 2012;46(1):69–77.
32. Petersson LG, Magnusson K, Hakestam U, Baigi A, Twetman S. Reversal of primary root caries lesions after daily intake of milk supplemented with fluoride and probiotic lactobacilli in older adults. *Acta Odontol Scand.* November 2011;69(6):321–7.
33. Hasslöf P, West CE, Videhult FK, Brandelius C, Stecksén-Blicks C. Early intervention with probiotic *Lactobacillus paracasei* F19 has no long-term effect on caries experience. *Caries Res.* 2013;47(6):559–65.
34. Stecksén-Blicks C, Sjöström I, Twetman S. Effect of long-term consumption of milk supplemented with probiotic lactobacilli and fluoride on dental caries and general health in preschool children: a cluster-randomized study. *Caries Res.* 2009;43(5):374–81.
35. Cronin M, Ventura M, Fitzgerald GF, van Sinderen D. Progress in genomics, metabolism and biotechnology of bifidobacteria. *Int J Food Microbiol.* 1. September 2011;149(1):4–18.
36. Garrigues C, Johansen E, Pedersen MB. Complete genome sequence of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12, a widely consumed probiotic strain. *J Bacteriol.* Mai 2010;192(9):2467–8.
37. Matsumoto M, Ohishi H, Benno Y. H⁺-ATPase activity in *Bifidobacterium* with special reference to acid tolerance. *Int J Food Microbiol.* 15. Mai 2004;93(1):109–13.
38. Schwendicke F, Dörfer C, Kneist S, Meyer-Lueckel H, Paris S. Cariogenic effects of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG in a dental biofilm model. *Caries Res.* 2014;48(3):186–92.
39. Lang C, Böttner M, Holz C, Veen M, Ryser M, Reindl A, Pompejus M, Tanzer JM. Specific *Lactobacillus*/Mutans *Streptococcus* co-aggregation. *J Dent Res.* Februar 2010;89(2):175–9.

40. Bratthall D, Hänsel Petersson G. Cariogram--a multifactorial risk assessment model for a multifactorial disease. *Community Dent Oral Epidemiol.* August 2005;33(4):256–64.
41. Wong L, Sissons C, Sissions CH. A comparison of human dental plaque microcosm biofilms grown in an undefined medium and a chemically defined artificial saliva. *Arch Oral Biol.* Juni 2001;46(6):477–86.
42. Wu M-H, Pan T-M, Wu Y-J, Chang S-J, Chang M-S, Hu C-Y. Exopolysaccharide activities from probiotic bifidobacterium: Immunomodulatory effects (on J774A.1 macrophages) and antimicrobial properties. *Int J Food Microbiol.* 15. November 2010;144(1):104–10.
43. Cheikhyoussef A, Pogori N, Chen W, Zhang H. Antimicrobial proteinaceous compounds obtained from bifidobacteria: from production to their application. *Int J Food Microbiol.* 31. Juli 2008;125(3):215–22.
44. Martinez FAC, Balciunas EM, Converti A, Cotter PD, de Souza Oliveira RP. Bacteriocin production by *Bifidobacterium* spp. A review. *Biotechnol Adv.* August 2013;31(4):482–8.
45. Bhalla M, Ingle NA, Kaur N, Yadav P. Mutans streptococci estimation in saliva before and after consumption of probiotic curd among school children. *J Int Soc Prev Community Dent.* Februar 2015;5(1):31–4.
46. Sidhu GK, Mantha S, Murthi S, Sura H, Kadaru P, Jangra JK. Evaluation of *Lactobacillus* and *Streptococcus mutans* by Addition of Probiotics in the form of Curd in the Diet. *J Int Oral Health JIOH.* Juli 2015;7(7):85–9.
47. Srivastava S, Saha S, Kumari M, Mohd S. Effect of Probiotic Curd on Salivary pH and *Streptococcus mutans*: A Double Blind Parallel Randomized Controlled Trial. *J Clin Diagn Res JCDR.* Februar 2016;10(2):ZC13-16.
48. Yousuf A, Nagaraj A, Ganta S, Sidiq M, Pareek S, Vishnani P, Acharya S, Singh K. Comparative Evaluation of Commercially Available Freeze Dried Powdered Probiotics on Mutans Streptococci Count: A Randomized, Double Blind, Clinical Study. *J Dent Tehran Iran.* Oktober 2015;12(10):729–38.
49. Ashwin D, Ke V, Taranath M, Ramagoni NK, Nara A, Sarpangala M. Effect of Probiotic Containing Ice-cream on Salivary Mutans Streptococci (SMS) Levels in Children of 6-12 Years of Age: A Randomized Controlled Double Blind Study with Six-months Follow Up. *J Clin Diagn Res JCDR.* Februar 2015;9(2):ZC06-09.
50. Adams CA. The probiotic paradox: live and dead cells are biological response modifiers. *Nutr Res Rev.* Juni 2010;23(1):37–46.
51. Fernández CE, Giacaman RA, Tenuta LM, Cury JA. Effect of the Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* LB21 on the Cariogenicity of *Streptococcus mutans* UA159 in a Dual-Species Biofilm Model. *Caries Res.* 2015;49(6):583–90.
52. Ditu L-M, Chifiriuc MC, Bezirtzoglou E, Voltsi C, Bleotu C, Pelinescu D, Mihaescu G, Lazar V. Modulation of virulence and antibiotic susceptibility of enteropathogenic

-
- Escherichia coli* strains by *Enterococcus faecium* probiotic strain culture fractions. *Anaerobe*. Dezember 2011;17(6):448–51.
53. Haukioja A, Yli-Knuuttila H, Loimaranta V, Kari K, Ouwehand AC, Meurman JH, Tenovuo J. Oral adhesion and survival of probiotic and other lactobacilli and bifidobacteria in vitro. *Oral Microbiol Immunol*. Oktober 2006;21(5):326–32.
54. Teruel J de D, Alcolea A, Hernández A, Ruiz AJO. Comparison of chemical composition of enamel and dentine in human, bovine, porcine and ovine teeth. *Arch Oral Biol*. 1. Mai 2015;60(5):768–75.
55. Takahashi N, Nyvad B. The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. *J Dent Res*. März 2011;90(3):294–303.
56. Walker GV, Heng NCK, Carne A, Tagg JR, Wescombe PA. Salivaricin E and abundant dextranase activity may contribute to the anti-cariogenic potential of the probiotic candidate *Streptococcus salivarius* JH. *Microbiol Read Engl*. März 2016;162(3):476–86.
57. Wattanarat O, Makeudom A, Sastraruji T, Piwat S, Tianviwat S, Teanpaisan R, Krisanaprakornkit S. Enhancement of salivary human neutrophil peptide 1-3 levels by probiotic supplementation. *BMC Oral Health*. 10. Februar 2015;15:19.

9 Anhang

9.1 Eidesstattliche Versicherung

Ich, Katharina Horb, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: [Einfluss von *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 auf die Kariogenität von *Streptococcus mutans in vitro*] selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.

Katharina Horb

9.2 Publikationsliste und Anteilserklärung an erfolgten Publikationen

Publikation 1: Schwendicke F, Horb K, Kneist S, Dörfer C, Paris S. Effects of heat-inactivated Bifidobacterium BB12 on cariogenicity of *Streptococcus mutans in vitro*. Arch Oral Biol. Dezember 2014;59(12):1384–90.

Beitrag im Einzelnen: Durchführung der Versuche, Lieferung und Auswertung der Ergebnisse, Mitwirkung an der Verfassung des Artikels.

PD Dr. Falk Schwendicke

Katharina Horb

9.3 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

9.4 Danksagung

Mein größter Dank gilt meinem Erstbetreuer Herrn PD Dr. Falk Schwendicke und meinem Zweitbetreuer Herrn Prof. Dr. Paris für die hervorragende Betreuung und Unterstützung meiner Dissertation.

Frau Regina Marquardt danke ich für die zuverlässige und hilfreiche Zusammenarbeit während der Durchführung der praktischen Versuche.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Kneist für die Durchführung der Rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen bedanken.

Darüber hinaus gilt meiner Familie ein ganz besonderer Dank für die Unterstützung und die Geduld, die sie in den Jahren des Studiums und der Erstellung dieser Arbeit aufgebracht hat.