

Aus der Abteilung für Zahnerhaltungskunde und
Präventivzahnmedizin
der medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Wirkung oraler Probiotika auf *Streptococcus mutans*
hinsichtlich einer Inhibition, Adhäsionskompetition und
der Kariogenität in vitro

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Franziska Maria Alt

aus Eutin

Datum der Promotion: 18.09.2020

Vorwort

Im Rahmen dieser Dissertation gab es eine Vorabpublikation:

Schwendicke F, Korte F, Dörfer CE, Kneist, Fawzy El-Sayed K, Paris S: Inhibition of *Streptococcus mutans* Growth and Biofilm Formation by Probiotics in vitro, *Caries Res.* 2017;51(2):87-95

Inhaltsverzeichnis

1	Abstract	7
2	Einleitung	9
3	Material und Methoden	16
3.1	Überblick	16
3.2	Bakterienstämme	17
3.2.1	Probiotika	17
3.2.2	Streptokokken	19
3.3	Vorversuche	20
3.4	Hauptversuche	22
3.4.1	Kompetitionsassay	22
3.4.2	Adhäsionsassay	23
3.4.3	Kariogenitätsbeeinflussung	25
3.5	Versuchspräparationen Durchflussskammermodell	25
3.5.1	Probekörper	25
3.5.2	Medien	26
3.5.3	Pumpen-Schlauch-System	27
3.6	Transversale Mikroradiographie	28
3.7	Statistische Analyse	29
4	Ergebnisse	30
4.1	Kompetitionsassay	30
4.2	Adhäsionsassay	33
5	Diskussion	37
6	Anhang	41
6.1	Zeitplan Adhäsionsassay	42
6.2	Inhaltsstoffe „Modified defined Mucine Medium“ (DMM)	44
6.3	Herstellung-Brain-Heart-Infusion-Bouillon mit Saccharose	45
6.4	Brain-Heart-Infusion-Bromkresol	46
6.4.1	Vorbereitung des Versuches	46
6.4.2	Versuch und Ergebnis	46
7	Literaturverzeichnis	48
8	Eidesstattliche Versicherung	57
9	Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen	58

10 Lebenslauf	60
11 Publikationsliste.....	61
12 Danksagung	62

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Probiotische Stämme	18
Quelle: Schwendicke F, Korte F, Dörfer CE, Kneist, Fawzy El-Sayed K, Paris S: Inhibition of Streptococcus mutans Growth and Biofilm Formation by Probiotics in vitro, Caries Res. 2017;51(2):87-95	
Tabelle 2: CFU der probiotischen Stämme	21
Quelle: Eigene Daten	
Tabelle 3: CFU der experimentellen <i>Streptococcus mutans</i> -Stämme	21
Quelle: Eigene Daten	
Tabelle 4: Kompetitionsassay: Inhibition von <i>S. mutans</i> durch unterschiedliche probiotische Stämme im Rahmen einer Verdrängung (1. <i>S. mutans</i> , 2. Probiotikum) und einer Exklusion (1. Probiotikum, 2. <i>S.</i> <i>mutans</i>) auf Voll- und Halb-BHI-Agar	31
Quelle: Schwendicke F, Korte F, Dörfer CE, Kneist, Fawzy El-Sayed K, Paris S: Inhibition of Streptococcus mutans Growth and Biofilm Formation by Probiotics in vitro, Caries Res. 2017;51(2):87-95	
Tabelle 5: Kompetitionsassay: Inhibition von <i>S. mutans</i> durch probiotische Stämme im Rahmen einer "Koexpansion" auf Voll-BHI-Agar	32
Quelle: Eigene Daten	
Tabelle 6: Koloniebildende Einheiten in den Biofilmen	36
Quelle: Schwendicke F, Korte F, Dörfer CE, Kneist, Fawzy El-Sayed K, Paris S: Inhibition of Streptococcus mutans Growth and Biofilm Formation by Probiotics in vitro, Caries Res. 2017;51(2):87-95	

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Kariesätiologie nach Keyes im Zusammenspiel der drei Faktoren "Bakterien", "Zahn" und "Substrat", von König ergänzt um den Faktor "Zeit"	9
Quelle: Eigene Daten	

Abbildung 2: Stephan-Kurve. Nach einem Säureangriff fällt der pH-Wert innerhalb von 10 Minuten rapide ab und erholt sich in den folgenden 50 Minuten	10
Quelle: kopiert aus ukgm.de, online: UKGM Gießen, Ursachen für Karies	
Abbildung 3: Schema zur Ätiopathogenese der Karies. Dem pathologischen Faktor "Fermentierbare Kohlenhydrate" (rot) stehen verschiedene protektive Faktoren (grün) gegenüber. Das Zusammenspiel der verschiedenen Faktoren entscheidet letztlich darüber, ob Karies voranschreitet und die klinischen Symptome auftreten oder der Prozess arretiert wird.	12
Quelle: modifiziert nach Meyer-Lückel et al., 2012	
Abbildung 4: Studiendesign.....	16
Quelle: Eigene Dateien	
Abbildung 5: <i>Streptococcus mutans</i> ist ein Beispiel für kokkoide Bakterienanordnung	19
Quelle: kopiert aus Encyclopaedia britannica, online britannica.com, Streptococcus mutans, bacterium	
Abbildung 6: Anzahl der CFU der probiotischen Stämme und von <i>S. mutans</i> ATCC 25175 im a) Exklusionsassay und b) Verdrängungsassay.....	33
Quelle: Schwendicke F, Korte F, Dörfer CE, Kneist, Fawzy El Sayed K, Paris S: Inhibition of Streptococcus mutans Growth and Biofilm Formation by Probiotics in vitro, Caries Res. 2017;51(2):87-95	
Abbildung 7: Auswertung des Mineralverlustes der Gruppen SM, FDL, LC-11, SM x FDL, SM x LC-11	35
Quelle: Schwendicke F, Korte F, Dörfer CE, Kneist, Fawzy El Sayed K, Paris S: Inhibition of Streptococcus mutans Growth and Biofilm Formation by Probiotics in vitro, Caries Res. 2017;51(2):87-95	

1 Abstract

Probiotika sind besonders in den letzten Jahren in einigen Studien hinsichtlich ihrer antikariogenen Eigenschaften geprüft worden. Grundlage war dabei die Annahme, dass orale Probiotika zu einer Adhäsion an dentalen Oberflächen und zu einer Inhibition kariogener Keime, allen voran *Streptococcus mutans* (SM), fähig sind. Vermutet wird, dass sie auf diese Weise einen reduktiven Effekt auf die Demineralisierung von Schmelzoberflächen erzielen können. Wir nahmen ein In-vitro-Screening von 8 probiotischen Stämmen vor. Deren inhibitorische Fähigkeiten wurden auf zwei experimentelle *Streptococcus mutans*-Stämme (ATCC 20523/25175) auf Brain-Heart-Infusion-Agar hinsichtlich einer Exklusion (Kultivierung von SM, danach Kultivierung des Probiotikums) und einer Verdrängung (Kultivierung des Probiotikums, danach Kultivierung von SM) untersucht. Die Versuche waren als Bi- und Monospeziesmodelle aufgebaut. Eine anschließende Auswertung wurde visuell vorgenommen. Wir nahmen weitere Untersuchungen vor, in denen die Exklusions- oder Verdrängungskapazitäten der Probiotika gegenüber den experimentellen *Streptococcus mutans*-Stämmen auf bovinem Zahnschmelz getestet wurden. Der Test erfolgte in einem eigens für die Versuche erstellten Kontinuitätsflussbiofilmmodell. Zwei Stämme stellten sich als wirksamste Probiotika heraus, FDL (*Lactobacillus acidophilus*), mit einer hohen inhibitorischen Fähigkeit und LC-11 (*Lactobacillus casei*) mit hoher Adhäsionskapazität. Beide Stämme wurden jeweils mit *S. mutans* ATCC 25175 in einem artifiziellen Mundmodell kokultiviert. Der Mineralverlust (ΔZ) an bovinem Zahnschmelz wurde mittels Transversaler Mikroradiografie ermittelt. Da sich nur unwesentliche Unterschiede in der Ergebnisdarstellung der Exklusions- und Verdrängungsversuche sowie der Inhibition von ATCC 20523 oder 25175 ergaben, fassten wir diese zusammen. FDL war der einzige probiotische Stamm, der beide experimentelle *Streptococcus mutans*-Stämme im Rahmen eines Exklusionsassays nachhaltig inhibieren konnte. Allerdings konnte ihm keine starke Inhibitionskapazität im Rahmen des Verdrängungsassays nachgewiesen werden. Beide Biofilmmodelle, in denen LC-11 eingesetzt wurde, zeigten eine hohe probiotische Last, während sich dessen Inhibitionskapazität nicht maßgeblich von der anderer Probiotika unterschied. Der durch experimentelle *Streptococcus mutans*-Stämme verursachte Mineralverlust an bovinem Zahnschmelz betrug $\Delta Z(\text{Median; Q25./Q75.})=9772; 6277/13558 \text{ Vol\%} \times \mu\text{m}$ und stieg in Kokultivierung mit FDL $\Delta Z=24578; 19081/28768 \text{ Vol\%} \times \mu\text{m}$ sogar

an, während er in Kombination mit LC-11 signifikant sank $\Delta Z=4835$; 263/7865 Vol% $\times \mu\text{m}$. Die Anzahl der Bakterien war in dem *Streptococcus mutans*-Monospeziesbiofilm am geringsten und in den bikultivierten Biofilmen am höchsten. Eine Inhibition kariogener Bakterien durch Probiotika führt nicht zwangsweise zu einer Reduktion der Kariogenität in den resultierenden Bispeziesbiofilmen. Im Gegensatz dazu scheinen die Exklusions- und Verdrängungskapazitäten relevant zu sein.

To exert anticaries effects, probiotics are described to inhibit growth and biofilm formation of cariogenic bacteria such as *Streptococcus mutans* (SM). We screened 8 probiotics and assessed how SM growth or biofilm formation inhibition affects cariogenicity of probiotic-SM mixed-species biofilms in vitro. Growth inhibition was assessed by cocultivating probiotics and 2 SM strains (ATCC 20523/25175) on agar. Probiotics were either precultured before SM cultivation (exclusion), or SM precultured prior to probiotic cultivation (displacement). Inhibition of SM culture growth was assessed visually. Inhibition of SM biofilm formation on bovine enamel was assessed using a continuous-flow short-term biofilm model, again in exclusion or displacement mode. The cariogenicity of mixed-species biofilms of SM with the most promising growth and biofilm formation inhibiting probiotic strains was assessed using an artificial mouth model, and enamel mineral loss (ΔZ) was measured microradiographically. We found limited differences in SM growth inhibition in exclusion versus displacement mode, and in inhibition of SM 20532 versus 25175. Results were therefore pooled. *Lactobacillus acidophilus* FDL inhibited significantly more SM culture growth than most other probiotics. *L. casei* LC-11 inhibited SM biofilm formation similarly to other alternatives but showed the highest retention of probiotics in the biofilms ($p < 0.05$). Mineral loss from SM monospecies biofilms ($\Delta Z = 9,772$, 25th/75th percentiles: 6,277/13,558 vol% $\times \mu\text{m}$) was significantly lower than from mixed-species SM \times FDL biofilms ($\Delta Z = 24,578$, 25th/75th percentiles: 19,081/28,768 vol% $\times \mu\text{m}$; $p < 0.01$) but significantly higher than from SM \times LC-11 biofilms ($\Delta Z = 4,835$, 25th/75th percentiles: 263/7,865 vol% $\times \mu\text{m}$; $p < 0.05$). Probiotics inhibiting SM culture growth do not necessarily reduce the cariogenicity of SM-probiotic biofilms. Nevertheless, SM biofilm formation inhibition may be relevant in the reduction of cariogenicity [Schwendicke et al., 2017].

2 Einleitung

Seit Menschengedenken existieren Zahnschmerzen und können nicht nur eine Qual darstellen, sondern führen im schlimmsten Fall auch zu Dysfunktionen im stomatognathen System. Eine der Hauptursachen findet sich in der Krankheit „Karies“. Bereits 3000 v.Chr. beschäftigte man sich mit dem Thema und glaubte, ein Wurm wüte in Zähnen, wovon Keilschrifttexte babylonischer Tontäfelchen heute noch zeugen. Im Laufe der Jahrhunderte formten sich immer neuere Theorien und entsprechende Behandlungsansätze. Trotz moderner Medizin und erforschter Ätiologie zählt Karies noch immer zu einer der am weitesten verbreiteten chronischen Erkrankungen des Menschen. Die Grundvoraussetzung für Initiation von Karies ist das Vorhandensein dentaler Plaque, einem mikrobiellen Biofilm auf der Zahnoberfläche, dessen metabolische Aktivität zur Bildung von Säuren führt, welche die Zahnhartsubstanzen demineralisieren. Bakterien machen etwa 75% des Volumens oraler Biofilme aus und man hat über 1000 verschiedene Bakterienspezies in menschlichen Biofilmen nachweisen können [Shellis, 2012].

Eine der einfachsten Veranschaulichungen beschreibt die Ätiologie der Karies durch das Zusammentreffen der drei Faktoren „Zahn“, „Bakterien“ und „Substrat“, wobei mit letzterem leicht fermentierbare Kohlenhydrate, kurz gefasst Zucker, gemeint sind [Keyes, 1962]. Abbildung 1 zeigt dazu das bekannte Venn-Diagramm von Keyes, das dieser bereits Anfang der 60er Jahre entwickelte, 10 Jahre später von König um den Faktor „Zeit“ ergänzt. Bis heute hat es mit der Ergänzung dieses Faktors, mit dem die Dauer der Plaqueretention und die Häufigkeit der Substratzufuhr gemeint sind, seine Gültigkeit [König, 1971].

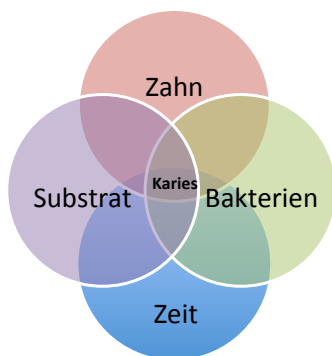


Abbildung 1: Kariesätiologie nach Keyes im Zusammenspiel der drei Faktoren "Bakterien", "Zahn" und "Substrat", von König ergänzt um den Faktor "Zeit"

Einer der für die Kariesentstehung besonders relevanten Mikroorganismen ist *Streptococcus mutans* (hier auch *S. mutans*, SM) [Tanzer et al., 2001]. In fortgeschrittenen Läsionsstadien, besonders kavitierten, findet man zunehmend auch Laktobazillen und Bifidobakterien bei etwas geringerem *Streptococcus mutans*-Vorkommen [Becker et al., 2002]. *S. mutans* gehört zur Ordnung der Lactobacillales, da Milchsäure sein primäres Stoffwechselendprodukt ist. Bei der Art handelt es sich um grampositive Bakterien. Sie stellt sich, wie schon der Name verrät, mikroskopisch kettenförmig angeordnet dar und existiert vornehmlich fakultativ anaerob. *S. mutans* ist in der Lage, ein unlösliches, klebriges, extrazelluläres Polysaccharid zu synthetisieren, das seine Adhäsion maßgeblich fördert [Shellis, 2012]. Er ist sowohl azidogen und damit in der Lage, Zucker schnell in Säure umzuwandeln, als auch azidurisch, also säuretolerant. *S. mutans* metabolisiert demnach leicht fermentierbare Kohlenhydrate unter Abgabe von organischen Säuren, vornehmlich Milchsäure. Auf diese Weise senkt Zuckerzufuhr den im „Ruhezustand“ nahezu neutralen pH-Wert eines *S. mutans*-reichen Biofilms und überführt ihn in ein saures Milieu. Innerhalb der ersten zehn Minuten nach Zuckerkonsum kommt es zu einem raschen Abfall des pH-Wertes auf bis zu 4,0. Einige Minuten nach dem Zuckerimpuls baut sich der Wert durch die Puffer- und Spülfunktion des Speichels langsam wieder auf und stabilisiert sich auf 6,5 - 7,0. Dieses Änderungsmuster wird als Stephan-Kurve bezeichnet (Abb.2) [Marsh und Martin, 1992].

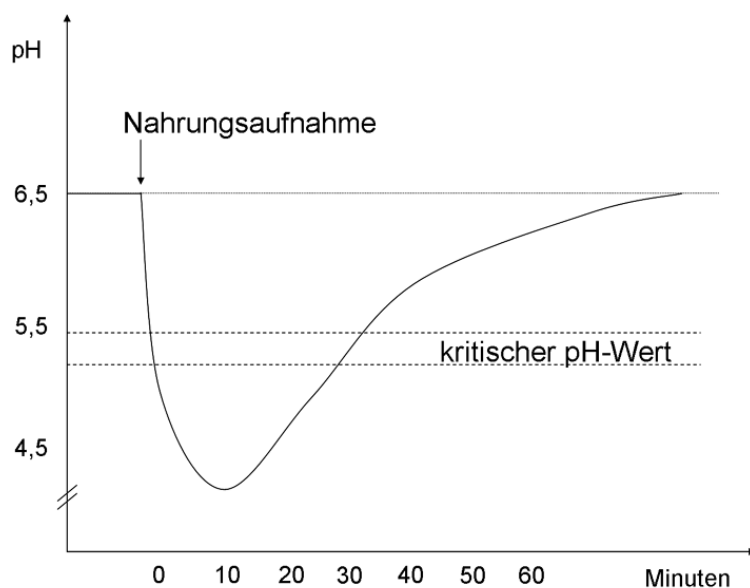


Abbildung 2: Stephan-Kurve. Nach einem Säureangriff fällt der pH-Wert innerhalb von 10 Minuten rapide ab und erholt sich in den folgenden 50 Minuten

Dieser Vorgang wiederholt sich, je nach Häufigkeit der Zuckerzufuhr am Tag mehrfach. Bei einem vermehrten Zucker- und Kohlenhydratkonsum sinkt der pH-Wert häufig in einen Bereich unterhalb von 5, wodurch weniger säuretolerante Bakterienspezies ökologisch benachteiligt gegenüber azidurischen Spezies, wie *S. mutans* und Laktobazillen, sind. Die Folge ist eine Verschiebung innerhalb der Ökologie des betroffenen Biofilms, die mit einer Bevorzugung azidogener und azidurischer Spezies einhergeht.

Sinkt der pH-Wert im Biofilm, tritt das Phänomen Demineralisation, also das Lösen von Hydroxylapatitkristallen $[Ca_5(PO_4)_3(OH)]$ aus der Zahnhartsubstanz auf. Hierbei werden Ionen aus dem Kristallgitter des Apatits gelöst, wodurch die Zahnhartsubstanzen porös werden. Während unter physiologischen Bedingungen so entstandene Defekte in Perioden neutralen pH-Werts remineralisieren können, also die Zahnhartsubstanzen wieder Mineral aufnehmen, führt ein zu häufiger Abfall des pH-Wertes zu einem immer fortschreitenden Mineralverlust.

Zahnschmelz und Dentin besitzen beide einen sogenannten kritischen pH-Wert, unterhalb dessen eine Demineralisation der jeweiligen Zahnhartsubstanz im Speichel stattfindet (Abb. 2). Der Wert für Schmelz liegt bei etwa 5,2 – 5,5 pH [ten Cate et al., 2003]. Der von Dentin liegt deutlich höher, auch wenn ein exakter Wert bisher nicht ermittelt wurde. Initialkaries entsteht demzufolge, wenn der kritische pH-Wert in der dentalen Plaque rezidivierend unterschritten wird und der Mineralverlust, der während der Demineralisationsphasen entstanden ist, während der Phasen der Remineralisation nicht mehr kompensiert werden kann.

Initiale Karies zeichnet sich durch eine Porosität der Zahnhartsubstanzen unter der Oberfläche aus, die zumeist von einer etwas stärker mineralisierten Oberflächenschicht bedeckt ist. Im Schmelz imponiert klinisch eine sogenannte „white spot lesion“, eine weißlich opake, leicht aufgeraute Veränderung des Schmelzes [Shellis, 2012]. Durch immer weiteren Mineralverlust werden die Zahnhartsubstanzen beim Fortschreiten der Erkrankung zunehmend instabil und kollabieren schließlich. Die hieraus resultierende Kavitation - ein Kariesloch - bietet für den oralen Biofilm einen geschützten Bereich, in dem er vor den Selbstreinigungskräften der Mundhöhle sowie Mundhygienemaßnahmen des Patienten geschützt ist.

Bis heute existieren einige Theorien zur Ätiopathogenese der Karies. Bereits 1890 postulierte der in Berlin tätige amerikanische Zahnarzt W.D. Miller seine sogenannte chemoparasitäre Theorie, nach der Karies durch von Bakterien produzierte Säure entsteht [Dieck und Miller, 1908]. Diese grundlegende Theorie wurde durch verschiedene darauf aufbauende „Plaques-hypothesen“ konkretisiert. Neben der

Zahnhartsubstanzen sind im Gegensatz zu vielen anderen Körpergeweben nicht in der Lage, durch zelluläre Prozesse zu regenerieren. Daher ist die Therapie der Karies traditionell durch eine Entfernung der demineralisierten und infizierten Zahnhartsubstanzen sowie eine Restauration des Kariesdefektes durch alloplastische Materialien geprägt.

Das bessere Verständnis von der Erkrankung hat in den vergangenen Jahren dazu geführt, dass vermehrt auch Therapieformen in den Fokus rücken, welche auf eine kausale Beeinflussung des oben beschriebenen Kariesprozesses abzielen. Zu diesen non-invasiven Behandlungsmethoden zählen Maßnahmen zur Beeinflussung der Ernährung, der Mineralisationsvorgänge sowie Maßnahmen, die auf die Beeinflussung des Biofilms abzielen [Paris et al., 2012].

So sehen Maßnahmen, die auf Ernährung abzielen, beispielsweise eine Beratung mit dem Ziel einer Ernährungsumstellung vor. Das ist besonders für Patienten mit erhöhtem Kariesrisiko von Bedeutung [Zero, 2004]. Andere Maßnahmen zielen auf eine vermehrte Zuckersubstitution durch synthetische oder natürliche Zuckerersatz- oder -austauschstoffe ab [Makinen, 2011].

Ein weiterer Ansatzpunkt liegt in der Beeinflussung der Mineralisation der Zahnhartsubstanzen. So wird beispielsweise durch Fluoride die Remineralisation von Schmelz und Dentin gefördert und eine erneute Demineralisation gehemmt [Ten Cate, van Loveren, 1999].

Von entscheidender Bedeutung in der aktuellen Arbeit ist das Biofilmmangement als kariespräventive und -therapeutische Maßnahme. Der orale Biofilm kann hierbei sowohl mechanisch durch Mundhygienemaßnahmen als auch chemisch durch antimikrobielle Substanzen entfernt, bzw. ein erneutes Wachstum inhibiert werden. Basierend auf der ökologischen Plaquehypothese kommen zudem seit jüngerer Zeit auch biologische Maßnahmen in Betracht. Sie zielen darauf ab, durch Unterdrückung pathogener und Förderung kommensaler Spezies, eine gesunde Homöostase im Biofilm zu erhalten und die metabolische Aktivität in einem nicht-kariogenen Bereich zu halten [Paris et al., 2012]. Aktuelle Forschungen beschäftigen sich auf dem Gebiet besonders mit dem Einsatz oraler Probiotika.

Laut Definition der World Health Organization handelt sich bei Probiotika um lebende Organismen, die dem Wirt gesundheitlichen Nutzen bringen, wenn sie in ausreichender Menge verabreicht werden [WHO, 2001]. Das Wort Probiotikum hat seinen Ursprung in der griechischen Sprache und bedeutet so viel wie „für das Leben“. Probiotika unterteilen sich in folgende Gattungen: Laktobazillen, Bifidobakterien, Lakto- und Enterokokken, Streptokokken und Hefepilze [Klein et al., 1998]. Sie finden sich zumeist als Zusatz oder als natürlicher Bestandteil von

Milchprodukten. Eine Auflistung ihrer wichtigsten Eigenschaften nahm G. Reuter, einer der Pioniere der Probiotikaforschung, im Rahmen des Kolloquiums eines einschlägigen Probiotikaherstellers vor. Die Auflistung beinhaltete die Fähigkeit von Probiotika zur Vermehrung am Bestimmungsort, deren physiologische und toxikologische Unbedenklichkeit und deren Verdrängung unerwünschter Mikroorganismen [Immel-Sehr, 2007]. Ihrer vermuteten eigenen Kariogenität geschuldet, wurden Probiotika lange Zeit nicht in der Kariesprävention eingesetzt. Die meisten Probiotika sind selbst azidurisch und azidogen. U.a. aber seit G. Reuters Deklaration ihrer Nutzbarkeit als Teil der Ernährung, sind sie Fragment eines Paradigmenwechsels geworden. Während Probiotika erfolgreich bei der Behandlung von gastrointestinalen Erkrankungen eingesetzt wurden, gibt es erst jüngst konkrete Forschungsansätze für den oralen Bereich. Ein Ansatz sieht vor, probiotische Mikroorganismen einzusetzen, die eine ähnliche ökologische Nische besetzen wie *Streptococcus mutans*, somit in Konkurrenz mit dem Keim treten und im Idealfall eine Reduktion pathogener Keime zu erzielen [Meurmann, 2005; Russell et al, 2011; Twetman und Keller, 2012]. Bisher gibt es einige Studien zu diesem Ansatz, die jedoch, unabhängig von In-vitro- oder klinischem Format, ambivalente Ergebnisse präsentieren. Während die eine Seite postuliert, dass Probiotika vermutlich keine kariesprotektive Wirkung erzielen, demonstriert auf der anderen Seite eine Vielzahl an Studien eine Reduktion der Zahl kariogener Keime in der Mundhöhle im Zuge einer Probiotikatherapie [Laleman et al., 2014]. Wenige Studien konnten sogar eine reduzierte Inzidenz und Aktivität kariöser Läsionen nach Probiotikatherapie nachweisen [Näse et al., 2001; Petersson et al., 2011].

Auch Studien zu Risiken einer geregelten Probiotikagabe wurden v.a. in den letzten Jahren durchgeführt, hatten aber hauptsächlich präklinischen Charakter [Schwendicke et al., 2014a]. Auch wenn Probiotika eigentlich *per definitionem* als gesundheitlich unbedenklich gelten, konnten einzelnen Bakterienstämmen bereits in der Vergangenheit kariogene Eigenschaften nachgewiesen werden [Hedberg et al., 2008; Kneist et al., 2010; Meurman et al., 1995].

Bei Betrachtung der genauen Wirkung von Probiotika, stößt die Wissenschaft bis heute an ihre Grenzen. Bekannt ist, dass der Wirkmechanismus eines Probiotikums von dessen Virulenzfaktoren bestimmt wird. *Per definitionem* machen diese Eigenschaften, als die man Virulenzfaktoren vereinfacht beschreiben könnte, eigentlich die pathogene Wirkung des Keims aus. Im Zusammenhang eines Kariesmanagements sollen sie aber nutzbar gemacht und gegen pathogene Keime, wie *S. mutans*, eingesetzt werden, um so zu einer Reduktion der Kariogenität zu führen. Einzelne Theorien zu genaueren Wirkmechanismen existieren. Einige

Studien konnten beispielsweise zeigen, dass Probiotika proteinöse Toxine, wie z.B. Bacteriocin, als inhibitorische Komponente pathogener Bakterien absondern [Cheikhoussef et al., 2008; Martinez et al., 2013]. In einer anderen Studie wurde der Wettbewerb zwischen Probiotika und pathogenen Keimen um Zahnoberflächen, aber auch um Kohlenhydrate diskutiert [Terai et al., 2015]. Weitere Theorien befassen sich beispielsweise mit einer Immunstimulation von Wirtszellen oder der Aktivierung präbiotischer, also in ihrer Ursprungsform nicht biologisch wirksamer, nach Metabolisierung aber gesundheitsfördernd wirkender Stoffe [Rasmussen und Hamaker, 2017]. In dem Bereich wurde bisher allerdings hauptsächlich im Rahmen gastrointestinaler Erkrankungen geforscht.

Verschiedene Virulenzfaktoren scheinen Probiotika zu befähigen, eine Art Exklusion von *S. mutans* herbeiführen zu können. So scheint der Keim in Anwesenheit bestimmter probiotischer Stämme in seinen Adhäsionseigenschaften an dentalen Oberflächen eingeschränkt zu sein.

Das Ziel der vorliegenden Studie war, zunächst ein Screening der Inhibitions-, Exklusions- und Verdrängungseigenschaften einzelner probiotischer Stämme gegenüber experimenteller *Streptococcus mutans*-Stämme durchzuführen. In einem zweiten Schritt wurde untersucht, ob probiotische Stämme, die nachweislich Inhibitions-, Exklusions- oder Verdrängungseigenschaften gegenüber *S. mutans* aufwiesen, auch eine Reduktion der Kariogenität von Pathogen-Probiotika-Bispeziesmodellen (SM x Probiotikum) herbeiführen können. Wir stellten daher die Hypothese auf, dass Stämme, die inhibitorisch, exkludierend oder verdrängend auf experimentelle *Streptococcus mutans*-Stämme wirken, eine signifikante Reduktion der Kariogenität von SM-Biofilmen bewirken.

3 Material und Methoden

3.1 Überblick

In der vorliegenden Studie wurden probiotische Stämme ausgewählt, denen bereits in vorhergehenden Studien gesundheitsfördernde Wirkungen nachgewiesen werden konnten. Der Stamm LC-11 wurde trotz fehlender wissenschaftlicher Bewertungen zu Gesundheitsmodulationen aufgenommen, da vermutet wird, dass er eine hohe Säuretoleranz aufweist [Danisco, Technical Memorandum]. Gegenstand der Studie war, die Wirkung der ausgewählten Probiotika auf experimentelle *Streptococcus mutans*-Stämme zu untersuchen. Das Studiendesign bestand aus einem schrittweisen Screening zu jedem probiotischen Stamm durch ein Wettbewerbsassay, dann ein Adhäsionsassay und einem anschließenden Versuch zur Validierung einer eventuellen Kariogenitätsbeeinflussung (Abb. 4). Die Wettbewerbsassays dienen der Untersuchung einer Interferenz zwischen Probiotikum mit *S. mutans* in bestimmten Kulturabfolgen. Im Rahmen der Adhäsionsassays wurde in einem achtundvierzigstündigen, kontinuierlichen Durchflusskammermodell die Exklusions- und Verdrängungswirkung von Probiotika auf *S. mutans* ATCC 25175 untersucht. Zwei probiotische Stämme, die in den beschriebenen Versuchen in ihrer Wirksamkeit am stärksten auffielen, wurden weiteren Untersuchungen unterzogen. In einem zehntägigen, kontinuierlichen Durchflusskammermodell wurde ihre Kariogenitätsbeeinflussung auf dentalen Schmelzoberflächen geprüft.



Abbildung 4: Studiendesign

3.2 Bakterienstämme

3.2.1 Probiotika

Der Begriff Probiotika entstammt dem Griechischen und bedeutet so viel wie „für das Leben“. Er umfasst die Gattungen der Laktobazillen, Bifidobakterien, Lakto- und Enterokokken, Streptokokken und Hefepilze [Klein et al., 1998]. Probiotische Eigenschaften sind stammspezifisch [BgVV, 1999]. Die World Health Organization definiert Probiotika als lebende Organismen, die dem Wirt gesundheitlichen Nutzen bringen, wenn sie in ausreichender Menge verabreicht werden [WHO, 2001]. Zeitgeistig betrachtet, werden sie zum sogenannten „Functional Food“ gezählt, einem Begriff, der zuerst in Japan geprägt wurde. Inzwischen haben „Funktionelle Lebensmittel“ auch im europäischen Raum an Bedeutung gewonnen. Die Verbraucherzentrale beschreibt sie als normale Lebensmittel (Brot, Joghurt, Milch usw.), die zudem mit einer funktionellen Zutat angereichert werden. Diese soll sich durch eine gesundheitsfördernde Wirkung auszeichnen [Verbraucherzentrale, 2016]. Insbesondere in Deutschland sind mit jenen gesundheitsfördernden Lebensmitteln meist probiotisch angereicherte Produkte gemeint. Der Begriff entbehrt jedoch nach wie vor einer rechtlichen Definition.

Die in der vorliegenden Studie verwendeten Probiotika sind kommerziell erhältlich (Tabelle 1). Bis auf einen Stamm wurden ihnen in vorhergehenden Studien gesundheitsfördernde Wirkungen unterschiedlicher Art zugeschrieben, weshalb sie für diese Studie ausgewählt wurden.

Tabelle 1: Probiotische Stämme

Abkürzung	Stamm	Hersteller	Beispielprodukt	Wissenschaftlicher Anspruch
FDL	<i>Lactobacillus acidophilus</i> DSM 13241	1	Müller Vitality, Müller Dairy, Shropshire, Vereinigtes Königreich	Reduktion der Anzahl kariogener Bakterien [Tahmourespour und Kermanshahi, 2011]
LC-11	<i>Lactobacillus casei</i> ATCC SD5213	2	Flora FIT, Danisco, Kopenhagen, Dänemark	Wissenschaftlich noch nicht bewertet
F-19	<i>Lactobacillus paracasei</i> LMG-P-17806	1	Arla Cultura, Arla, Viby, Dänemark	Koaggregation mit <i>Streptococcus mutans</i> , keine Reduktion der Kariesinzidenz [Michalek et al., 1981]
LGG	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG ATCC 53103	1	Culturelle, Valio Dairy, Helsinki, Finnland	Reduktion der Anzahl kariogener Bakterien sowie möglicherweise Minderung der Kariesinzidenz [Jindal et al., 2012]
LR-32	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LR-32 ATCC SD5217	2	FloraFIT, Danisco, Copenhagen, Dänemark	Beeinflussung der immunologischen Wirtsantwort [Aguirre und Collins, 1993]
BB-12	<i>Bifidobacterium animalis subsp. Lactis</i> DSM 15954	1	Muller Vitality, Muller Dairy, Shropshire, Vereinigtes Königreich	Reduktion der Anzahl kariogener Bakterien [Toiviainen et al., 2015]
TH-4	<i>Streptococcus thermophilus</i> DSM 15957	2	FloraTrex, Global Healing Center, Houston, USA	Reduktion der Reizbarkeit [Saavreda et al., 2004]
BC-30	<i>Bacillus coagulans</i> GBI-30 6086	3	Ganeden BC30, Ganeden; Mayfield Heights; Sustenex Schiff, Cleveland, USA	Reduktion funktioneller gastrointestinaler Beschwerden [Abhari et al., 2015], Reduktion rheumatoider Arthritis

1: Chr. Hansen, Hoersholm, Dänemark; <http://www.chr-hansen.com>; 2: Danisco Du Pont, Kopenhagen, Dänemark; <http://www.dansico.com>; 3: Ganeden, Mayfield Heights, Ohio; <http://www.ganedenbc30.com>

FDL: *Lactobacillus acidophilus*; LC-11: *Lactobacillus casei*; F-19: *Lactobacillus paracasei*; LGG: *Lactobacillus rhamnosus* GG; LR-32: *Lactobacillus rhamnosus* LR-

32; BB-12: *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis*; TH-4: *Streptococcus thermophilus*; BC-30: *Bacillus coagulans* GBI-30

3.2.2 Streptokokken

Streptococcus mutans ist der am häufigsten mit der Entstehung einer Karies assoziierte Keim. Hierbei handelt es sich um eine grampositive, fakultativ anaerobe und kokkoid angeordnete Bakterienart mit hochkariogenen und widerstandsfähigen Eigenschaften (Abbildung 4). So ist der Keim bspw. in der Lage, aus Saccharose Glukanpolymere zu synthetisieren, die ihm eine besonders gute Adhäsion im Biofilm ermöglichen. Der Elternstamm ist im Gegensatz zu späteren Mutanten in Tiermodellen in der Lage, sogenannte IPS (intrazelluläre Polysaccharide) für Perioden einer Nahrungsknappeit zu speichern [Marsh und Martin, 1999]. *S. mutans* ist azidogen und azidurisch, produziert demnach also nicht nur Säure als Stoffwechselendprodukt, sondern ist auch überaus säuretolerant.

Bei den im Versuch verwendeten experimentellen *Streptococcus mutans*-Stämmen handelt es sich zum einen um *Streptococcus mutans* ATCC 20523, zum anderen um *Streptococcus mutans* ATCC 25175, da beide Stämme in ähnlichen Studiendesigns ein gutes Wachstum aufwiesen und gängige Spezies sind [Salli et al., 2017; Rebert F, 2014]. Bezogen wurden beide Spezies von dem Leibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig. Im Hauptversuch wurde nur *Streptococcus mutans* ATCC 25175 verwendet.

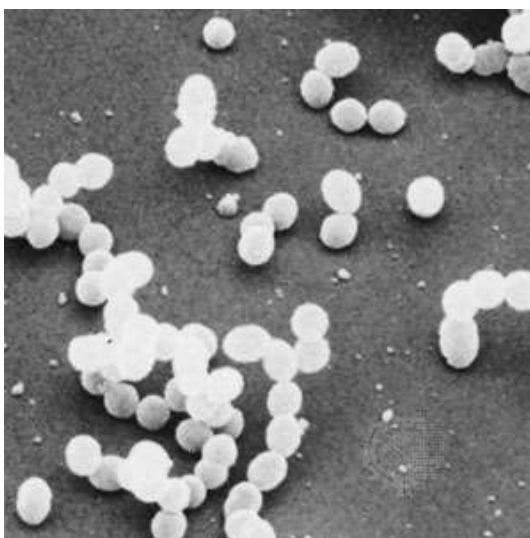


Abbildung 5: *Streptococcus mutans* ist ein Beispiel für kokkoide Bakterienanordnung

3.3 Vorversuche

Mittels einer Reihe von Vorversuchen, wurden für die folgenden Hauptversuche geeignete Methoden festgelegt. Zunächst wurde ein Agar als Nährboden für die bakteriellen Stämme ausgewählt. Brain-Heart-Infusion-Agar (BHI, Franklin Lakes, USA) bietet eine gute Wachstumsgrundlage für sowohl Probiotika als auch experimentelle *Streptococcus mutans*-Stämme. Zur Kultivierung der probiotischen Kulturen wurden diese zunächst auf BHI-Agar angezüchtet. Bei den Kulturen handelte es sich um probiotisch wirksame Stämme diverser bakterieller Arten aus den Gattungen *Lactobacillus* (LC-11, FDL, F-19, LGG, LR-32), *Bifidobacterium* (BB-12), *Streptococcus* (TH-4) und *Bacillus* (BC-30) (nähere Informationen sind Tabelle 1 zu entnehmen).

Verdünnungsreihen mit Brain-Heart-Infusion-Bouillon (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) als Medium wurden vorgenommen. Dabei wurde parallel die jeweilige Extinktion mittels Photometer (Pharmacia Biotech Novaspec II, Visible Spectrophotometer, Uppsala, Schweden) gemessen. Die Verdünnungen wurden in 100 µl Schritte gestaffelt und bis zu einem Extinktionswert von etwa OD = 1 (Optische Dichte) durchgeführt. Um eine spätere Auszählung der CFU (colony forming units, Kolonie bildende Einheiten) zu vereinfachen, wurde die Verdünnungsstufe, bei der eine OD = 1 auftrat, festgehalten. Zudem wurden die jeweiligen Verdünnungsreihen auf BHI-Agar ausgestrichen und für 72 Stunden bei 37° C. kultiviert (Thermo SCIENTIFIC, Typ B6420, Waltham, Massachusetts, USA). Daraus ergaben sich für die auf BHI-Agar gezüchteten Kulturen die auszählungsgünstigsten Verdünnungsstufen für jeweilige Bakterienstämme (siehe Tabelle 2).

Ähnlich verfahren wurde mit beiden *Streptococcus mutans*-Stämmen (*S. mutans* ATCC 20523, *S. mutans* ATCC 25175). Sie wurden auf BHI-Agar für 72 Stunden bei 37° C. kultiviert. Im Anschluss wurden Verdünnungsreihen in 100 µl Schritten, gefolgt von Extinktionsmessungen, vorgenommen. Abschließend wurden die Stämme kultiviert und die CFU ausgezählt (Ergebnisse siehe Tabelle 3).

Um zu untersuchen, ob eine Unterscheidung von dem jeweiligen Probiotikum und *S. mutans* auf einem Kulturmedium möglich ist, wurden insgesamt 14 Kulturproben entnommen und histologisch nach Gramfärbung evaluiert. Die Sensitivität, also das Erkennen von experimentellen *Streptococcus mutans*-Stämmen, nicht aber von Probiotika, lag bei 0,86. Die Spezifität, also die Identifizierbarkeit von Probiotika, nicht aber von experimentellen *Streptococcus mutans*-Stämmen, lag ebenfalls bei 0,86 (siehe Anhang 6.4).

Tabelle 2: CFU der probiotischen Stämme auf BHI-Agar

Bakterienstamm	Verdünnungsstufe	CFU (koloniebildende Einheiten) pro 2 ml
FDL	10 ⁶	16
LC-11	10 ⁶	48
F-19	10 ⁷	1
LGG	10 ⁶	35
LR-32	10 ⁶	25
BB-12	10 ⁶	7
TH-4	10 ⁵	10
BC-30	10 ⁷	31

FDL: *Lactobacillus acidophilus*; LC-11: *Lactobacillus casei*; F-19: *Lactobacillus paracasei*; LGG: *Lactobacillus rhamnosus* GG; LR-32: *Lactobacillus rhamnosus* LR-32; BB-12: *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis*; TH-4: *Streptococcus thermophilus*; BC-30: *Bacillus coagulans* GBI-30

Tabelle 3: CFU der experimentellen *Streptococcus mutans*-Stämme

Bakterienstamm auf BHI	Verdünnungsstufe	CFU (koloniebildende Einheiten) pro 2 ml
<i>S. mutans</i> 20523	10 ⁵	45
<i>S. mutans</i> 25175	10 ⁵	39

3.4 Hauptversuche

Die Hauptversuche bestanden aus einem zweistufigen Screening, in dem alle acht probiotischen Kulturen auf ihre Wirkung auf *S. mutans* hin untersucht wurden. Die erste Stufe sah vor, im Rahmen eines Inhibitionsassays die hemmenden Fähigkeiten auf das Wachstum von *S. mutans* nachzuweisen. Folgend sollte die Wettbewerbsfähigkeit von Probiotika mit *S. mutans* ATCC 25175 um die Adhäsion an dentalen Oberflächen am Zahnschmelz von bovinen Zahnprobekörpern belegt werden. Dieser Versuch baute auf einem Bispeziesmodell auf, das mit einem kontinuierlichen Fluss an Medien bedient wurde. Bei den Medien handelte es sich um Speichel-, Nahrungs- und Bakterienlösungen (nähere Informationen unter 3.4.2 Adhäsionsassay). Zur Verwendung kamen nur experimentelle *Streptococcus mutans*-Stämme und ein jeweiliges Probiotikum, die durchgehend in einem festgelegten Zeitplan auf die dentalen Schmelzflächen gespült wurden. Auf diesem Screening basierte die Auswahl von zwei probiotischen Stämmen, einer mit der besten inhibitorischen Eigenschaft und ein weiterer mit der besten Adhäsionseigenschaft. Beide Stämme wurden innerhalb eines zehntägigen kontinuierlichen Biofilmmodells auf ihren Einfluss auf *S. mutans* ATCC 25175 sowie die assoziierte Kariogenität getestet.

3.4.1 Kompetitionsassay

Die Kompetitionsassays wurden in zwei Gruppen aufgeteilt, damit Versuche auf Voll- und auf Halb-BHI-Agarplatten vorgenommen werden konnten. In dem Versuch wurden beide experimentelle *Streptococcus mutans*-Stämme (ATCC 25175 und ATCC 20523) sowie alle erwähnten probiotischen Stämme verwendet. Drei Inhibitionsmodelle wurden analysiert:

1. „Verdrängung“: *S. mutans* wurde für 12 Stunden kultiviert, es folgte die Zugabe von einem probiotischen Keim und eine weitere Kokultivierung für 24 Stunden.
2. „Exklusion“: Probiotischer Keim wurde für 12 Stunden kultiviert, es folgte die Zugabe von *S. mutans* und eine Kokultivierung für 24 Stunden.
3. „Koexpansion“: *S. mutans* und ein jeweiliger probiotischer Keim wurden zeitgleich appliziert und für 36 Stunden kokultiviert.

Die Kulturen wurden dabei in einem definierten Bereich der Agarplatte inokuliert. Dieser Bereich wurde durch ein Drittel der gesamten Breite mittig dargestellt. Zur Verwendung kam ein sterilisierter, spitzförmiger Applikator. Nach 36 Stunden der Kultivierung konnten die jeweiligen Inhibitionsgrade gemessen und im Rahmen einer dafür erstellten fünfgradigen Ordinalskala bewertet werden. Dabei steht Grad 0 für das Ausbleiben einer Inhibition, Grad 1 für eine Hemmung im ersten Viertel, Grad 2 für eine Hemmung bis einschließlich ins zweite Viertel, Grad 3 für eine Hemmung bis einschließlich ins dritte Viertel und Grad 4 für eine Hemmung bis einschließlich ins letzte Viertel.

Die Bewertung erfolgte durch zwei unabhängige Prüfer. Die Übereinstimmung der Ergebnisse der jeweiligen Prüfer lag bei $\kappa = 0.88$. Die Inhibition wurde an biologischen Duplikaten analysiert.

3.4.2 Adhäsionsassay

Der Wettbewerb der probiotischen Stämme und *S. mutans* um eine Oberflächenadhäsion wurde an Zahnschmelz von Rinderzahnprobekörpern untersucht. Wie erwähnt wurde hier nur Gebrauch von *Streptococcus mutans* ATCC 25175 gemacht. Alle acht Probiotika kamen zum Einsatz. Zur Durchführung kam der Versuch in einem Bispeziesmodell, also einem Versuchsaufbau, bei dem ein probiotischer Stamm mit einem experimentellen *Streptococcus mutans*-Stamm kombiniert eingesetzt wurde. Für jeden probiotischen Stamm wurde ein eigenes Adhäsionsassay erstellt, sowie für jedes Assay eine eigene abgeschlossene Durchflussskammer verwendet, die über ein komplexes Pumpensystem mit den vorgesehenen Medien versorgt wurde. Bei den Medien handelte es sich um (1) „Modified defined Mucine Medium“ (DMM) als artifizieller Speichel, (2) BHI-Bouillon versetzt mit dem jeweiligen Probiotikum und (3) BHI-Bouillon versetzt mit *S. mutans* ATCC 25175 sowie (4) saccharosehaltige BHI-Bouillon als Nahrungsmittel für die Stämme. Dabei wurde 48 Stunden lang auf einen kontinuierlichen Fluss in einem strikt eingehaltenen Zeitplan geachtet (siehe Anhang 1-3). Dazu konnten 50 Incisivi von Rinderzähnen der zweiten Dentition so präpariert werden, dass insgesamt 216 Schmelzprobekörper der Größe $2 \times 2 \times 4$ mm entstanden (Band Saw Exakt 300cl, Exakt Apparatebau, Norderstedt, Deutschland). Die Oberflächen der Proben wurden planiert (Phoenix Alpha, Buehler, Düsseldorf, Deutschland) und einer stufenweisen Politur unterzogen (Schleifpapier 1200, 2400, 4000, Exakt Advanced Technologies, Norderstedt, Deutschland). Im Anschluss erfolgte die Einbettung von jeweils 20 Probekörpern in Akrylharzträger (Technovit 4071, Heraeus Kulzer, Hanau,

Deutschland), die sterilisiert wurden (121° C., 2,1 Bar, 34 Min). Für jedes Assay und damit jede Durchflussskammer kam ein Technovitträger zum Einsatz.

Zunächst wurde an Tag 1 durch Applikation von 1 ml steril filtriertem Speichel auf jeder Probe eine Pellikel generiert. Die Kultivierungsbedingungen wurden über den gesamten Versuch bei 37°C und 100% Feuchtigkeit konstant gehalten. Die folgenden 48 Stunden bestanden aus Fluss- und Ruhephasen (siehe Anhang 1). Um das Modell so naturgetreu wie möglich zu gestalten, erfolgten entsprechende Nachruhen und tägliche Nahrungszufuhren zu festgelegten Zeiten. Ermöglicht wurde der Fluss durch den Einsatz von Pumpen, die nach dem entwickelten Zeitplan programmiert worden waren und im Wechsel die Lösungen in die Kammern und über die Schmelzproben spülten. Weitere Pumpen sorgten für den geregelten Abfluss aus den Kammern.

Dazu wurden die Kammern dreimal täglich mit der Saccharose enthaltenden BHI-Bouillon, sechsmal täglich mit dem künstlichen Speichel, dreimal täglich mit der *S. mutans* ATCC 25175 versetzten BHI-Bouillon und einmal morgendlich mit der Probiotikum enthaltenden BHI-Bouillon gespült. Die Flussrate lag bei 1,25 ml/Min für jeweils 15 Min. mit einer anschließenden dreizehnminütigen Einwirkzeit und einer zweiminütigen Abpumpphase. Die BHI-Saccharose-Bouillon wurde hauptsächlich als Nährmittel für den verwendeten experimentellen *Streptococcus mutans*-Stamm eingesetzt. Der artifizielle Speichel fand seine Verwendung hauptsächlich als spülendes Medium, aber auch als Puffer und Enzymträger, um das orale Surrogat so naturgetreu wie möglich nachzuempfinden. Unterteilt wurde die tägliche Bepflüfung in drei Zyklen (siehe Anhang 1). Jeweils einmal täglich um 10:50 Uhr erfolgte ein Wechsel der gesamten Mediumflaschen sowie der Abflussflasche. Bereits durchgeflossene Medien wurden in einem abgedichteten Behältnis (Abflussflasche) aufgefangen, welches jeden Tag ausgetauscht wurde. Zudem wurden im Laufe der Versuchstage dreimal Proben entnommen, auf BHI Agar ausgestrichen und kultiviert, um eine Fremdbesiedelung mit nicht vorgesehenen Keimen auszuschließen. Die Auswertung erfolgte visuell und wies keine untypischen Keimbesiedelungen oder Wachstumsmuster auf.

An Tag 3 wurden die angezüchteten Biofilme der Probekörper von einem definierten Bereich (2 × 2 mm) jeweils mit einem sterilen Skalpell entnommen und in 1 ml BHI-Bouillon inokuliert und mit einem Vortexgerät (Heidolph REAX2000, Schwabach, Deutschland) gemischt. Sie wurden Verdünnungsreihen (10 – 10³) unterzogen, um eine Auszählung der kultivierten *S. mutans* ATCC 25175- und Probiotikastämme vornehmen zu können. Zusätzlich wurden Bromkresolgrün enthaltende BHI-Agar-Platten (BHI-Agar versetzt mit 0,1 g Bromkresolgrün pro 100 g Agar) (siehe Anhang

6.4) durch Ausstreichen mit den Biofilmen beimpft. Danach wurde 48 Stunden lang bei 37° C kultiviert. Die Auszählung der CFU erfolgte im Anschluss. Für den Versuch wurde als Referenz auch eine Kammer ausschließlich mit *S. mutans* ATCC 25175 gespült.

3.4.3 Kariogenitätsbeeinflussung

Die beiden probiotischen Stämme, die sich in den untersuchten Eigenschaften als vielversprechend erwiesen hatten, wurden weiterhin auf ihre Antikariogenität getestet. Der entsprechende Versuch lehnte sich methodisch an das Adhäsionsassay an. Im Flussmodell wurden kontinuierlich für 10 Tage Schmelzprobekörper gespült. Dazu wurden die Kammern dreimal täglich mit der Saccharose enthaltenden BHI-Bouillon, sechsmal täglich mit dem künstlichen Speichel, dreimal täglich mit der *S. mutans* ATCC 25175 versetzten BHI-Bouillon und einmal täglich mit der Probiotikum enthaltenden BHI-Bouillon gespült. Die Flussrate lag bei 1,25 ml/Min für jeweils 15 Min. mit einer anschließenden dreizehnminütigen Einwirkzeit und einer zweiminütigen Abpumpphase. Der tägliche Aufbau der Spülungen vollzog sich in drei Zyklen und im Rahmen von Aktiv- und Ruhephasen (siehe Anhang 1).

Tag 1 sah das Anzüchten einer Pellicel durch Applikation von 1 ml steril filtriertem Speichel auf jede Probe mit anschließender vierundzwanzigstündiger Kultivierung bei 100 % Feuchtigkeit und 37° C. vor. An Tag 12 des Versuchs wurden die Probekörper entnommen und auf eine Demineralisierung im Sinne einer kariösen Läsion hin untersucht. Dazu wurden sie in 100 µm dicke Scheiben geschnitten und ein möglicher Schmelzverlust mittels Transversaler Mikroradiografie (TMR) und eines Digitalbild-Analyse-Systems festgestellt (siehe 3.6 Transversale Mikroradiografie).

3.5 Versuchspräparationen Durchflusskammermodell

3.5.1 Probekörper

Die für den Versuch verwendeten Rinderzahnincisivi wurden in einer Lösung aus 0,8 % Thymolwasser (Thymol; Roth 3209, Karlsruhe, Deutschland) gelagert. Zur Vorbereitung wurden aus den Incisivi 216 2 × 2 × 4 mm große Probekörper

hergestellt (Band Saw Exakt 300 cl, Norderstedt, Deutschland). In den Zwischenzeiten, in denen keine direkte Weiterverarbeitung möglich war, wurden die Probekörper ebenfalls in oben erwähnter Thymol-Lösung gelagert. Ein Wechsel der Lösung erfolgte im Wochentakt. Eine Planierung der Oberflächen der Probekörper wurde schonend vorgenommen (Phoenix Alpha, Buehler, Düsseldorf, Deutschland), sodass der Schmelz oberflächendeckend erhalten blieb. Im Anschluss wurden die Oberflächen einer ebenfalls schonenden, gleichmäßigen, stufenweisen Politur unter der Anwendung von Schleifpapier der in vorgenommener Reihenfolge genannten Stärken 1200, 2400 und 4000 unterzogen (Exakt, Norderstedt, Deutschland). Die präparierten Probekörper wurden in Akrylharzträger (Technovit 4071, Heraeus Kulzer, Hanau, Deutschland) unter striktem Erhalt einer freien Oberfläche eingebettet. Dazu wurde im Voraus ein Negativ des herzustellenden Riegels aus Silikon angefertigt, in das jeweils 20 Probekörper, zwei parallele Reihen à 10 Körper, eingefügt und mit dem autopolymerisierenden, aus Flüssigkeit und Pulver anmischbaren Akrylharz aufgefüllt wurden. In dem Verfahren wurden 10 Riegel hergestellt, die im Anschluss sterilisiert wurden (121° C., 2,1 Bar, 34 Min.).

3.5.2 Medien

3.5.2.1 Speichel

Der steril-infiltrierte Speichel, der zur Züchtung einer Pellikel vorgesehen war, wurde aus Eigenspeichel eines Probanden gewonnen. Dieser gab unter vorherigem Einsatz von speichelstimulierenden Paraffinkaugummis innerhalb von mehreren Tagen im Gesamten 220 ml Eigenspeichel ab. Mittels eines Filtrationsaufsatzes auf einer Kanüle wurde der Naturspeichel gefiltert.

3.5.2.2 Brain-Heart-Infusion-Bouillon

Unter ständigem Rühren und Erhitzen auf 80° C wurde für 1 L Bouillon 1 L Aqua dest. nach und nach mit 18,5 g pulverisiertem BHI-Agar versetzt. Nach etwa 30 Min. erfolgte die Umfüllung in Flaschen der geforderten Größe und die Sterilisation im Autoklaven (FA Tuttnauer 3870 ELV Breda, Niederlande). Zur Beimpfung wurden Bakterien mittels einer sterilen Pipettenspitze in die Flasche eingebracht und für 48 Stunden bei 37° C. in einem CO₂-Brutschrank (Thermo SCIENTIFIC, Typ B6420 Waltham, Massachusetts, USA) kultiviert.

3.5.3 Pumpen-Schlauch-System

Insgesamt wurden 10 Kammern dem Versuch entsprechend entworfen, wobei eine dem Ersatz diente, eine der isolierten Bespülung mit *S. mutans* ATCC 25175 als Referenz und die anderen 8 für die jeweiligen probiotischen Stämme vorgesehen waren. Die Kammern bestanden aus präparierten Pipettenaufsatzbehältnissen (Quality Pipette Tips 100 p. Sarstedt AG und Co., Nümbrecht, Deutschland), deren Inhalt entnommen worden war. Die Deckel wiesen jeweils 4 Perforationen für die Zulaufe (DMM, *S. mutans* ATCC 25175, Probiotikum und BHI-Bouillon) und der Boden eine für den Ablauf auf. Ebenso wurden die Deckel der Flaschen für die im Versuch eingesetzten Medien (Thermo Scientific, 0,5 L oder 2,0 L, Darmstadt, Deutschland) mit jeweils einer Perforation versehen. Im laufenden Versuch erfolgte ein Wechsel der Deckel. Über Pipettenaufsätze wurde eine Verbindung zwischen den Kammern und den Schläuchen hergestellt. Das vollständige Kammer-Schlauch-Konstrukt wurde in der Sterilisation der Charité – Universitätsmedizin Berlin aufbereitet und anschließend unter sterilen Bedingungen mittels Parafilm M (Brand, Wertheim, Deutschland) abgedichtet und an Pumpen angeschlossen.

Zur Verwendung kamen 4 große programmierbare Pumpen, um für den Zulauf der Medien zu sorgen, und 9 kleine, ausschließlich in der Pumpgeschwindigkeit beeinflussbare Pumpen (Seko, Type: PR1, Seko Deutschland GmbH, Mainz-Kastel, Deutschland), die den Ablauf sichern sollten. Bei den großen MCP-Pumpen (MCP Standard ISM 404, Ismatech, Wertheim, Deutschland) wurde auf multifunktionelle, multipel programmierbare Modelle zurückgegriffen. Programmierbar waren die Pumpen nach Geschwindigkeit (1 – 240 rpm), Drehzahl (rpm, resolution 0,1 rpm) und Fließrate ($\mu\text{l}/\text{min}$, mL/min , L/min) sowie die Intervaldosen nach Zeit und Volumen und die Anzahl der Dosierzyklen. Sie wurden durch einen DC-Motor betrieben. Adaptiert wurde ein Pumpenkopf, der zeitgleich 8 Schläuche bedienen kann. Zur Einstellung der exakten Programmierungen wurden Vorversuche unternommen, bei denen ein Natriumchloridmedium 0,9 % das Referenzmedium bildete. Für die Nachtruhe wurde ein großes Intervallfenster eingerichtet.

Da die kleinen Pumpen nur in der Fließgeschwindigkeit programmierbar waren, wurden sie an Steckerleisten angeschlossen, die mittels eines computergestützten Systems programmiert wurden. Die Einrichtung wurde so vorgenommen, dass die Pumpen in den Zwischenintervallen in einen Standbymodus übergangen. Eine Kontrolle des Gesamtsystems erfolgte mehrmals täglich.

Für den letzten Versuch, bei dem nur die zwei effektivsten Probiotikastämme in Bi- und Monospeziesmodellen eingesetzt wurden, waren sechs Kammern vorgesehen, eine ohne jegliche Keime, drei Monospezieskammern (zwei Probiotika und einmal *S. mutans* ATCC 25175) und zwei Bispezieskammern (SM × Probiotikum).

3.5.3.1 Schläuche

Für die Ablaufpumpen (Seko, Type: PR1) wurden die dafür gebräuchlichen Einsatzschläuche (Santoprene Standard, ExxonMobil Chemical Europe, Machelen, Belgien) aus thermoplastischem Elastomer in der Größe 6,25 × 10,55 RUN verwendet. Die Verbindung erfolgte über ein Adaptersystem (Rotilabo-Reduktionsstücke, Carl Roth; Karlsruhe, Deutschland) mit jeweils zwei weiteren Silikon-Pumpen-Schläuchen (Carl Roth) der Stärke 1,6 mm. Vor Beginn des Hauptversuches wurden alle Pumpen für jeweils 60 Min. mit eingesetzten Schläuchen einmal ohne und einmal mit Referenzmedium (Natriumchlorid 0,9 %) in Betrieb genommen, anschließend mit Aqua dest. gereinigt und dann sterilisiert. Die großen Zulaufpumpen (MCP Standard ISM 404) wurden mit den dem System und den dem multiplen Pumpenkopf zugehörigen Schläuchen (070498-08i/ SC0602, Silicone, ID: 0,76 mm, Wall: 0,80 mm, Black/Black, QTY: 6p, IDEX, Wertheim, Deutschland) versehen. Diese wurden ebenfalls jeweils eine Stunde ohne und eine mit dem Referenzmedium (Natriumchlorid 0,9 %) in Betrieb genommen, im Anschluss mit Aqua dest. gereinigt und vor der endgültigen Inbetriebnahme sterilisiert.

3.6 Transversale Mikroradiographie

Die Transversale Mikroradiografie (TMR) gilt als Goldstandard zur Bestimmung von Mineralverlusten. Ebenso ermöglicht sie die Beurteilung von remineralisierten Bereichen in der Zahnhartsubstanz. Als Vorbereitung wurden die Probekörper in 100 µm dicke Scheiben geschnitten (Band Saw 300 cl, Mikroschleifsystem 400 CS, Schleifpapier 1200, 2400, 4000) und diese anschließend planparallel präpariert. Eine nickelgefilterte Kupferstrahlenquelle (CuKalpha, PW 1730/10, Philips, Eindhoven, Niederlande), die mit 20 kV und 10 mA arbeitet und sich eines vertikalen Strahlenrohrs (PW 2213/20, Panalytical, Kassel, Deutschland) bedient, kam zum Einsatz. Es wurde ein Film-Objekt-Abstand von 280 mm eingestellt. Die

verwendeten Filme (Fuji fine 71337, Fujifilm; Tokio, Japan) wurden jeweils mit 5 Sek. belichtet und nach Herstellerangaben entwickelt. Im Anschluss wurden die mikroradiographischen Bilder mittels eines Digitalbildanalysesystems (XC 77 CE, Sony; Tokio, Japan) unter einem Universalmikroskop (Axioskop2 60318, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) digitalisiert und der Mineralverlust bestimmt (TMR für Windows 2.0.27.2, Inspector Research, Amsterdam, Niederlande).

3.7 Statistische Analyse

Die statistische Analyse wurde mit SPSS20 (IBM, Armonk, New York, USA) vorgenommen. Die Untersuchung der Normalverteilung der Daten erfolgte mittels Shapiro-Wilk-Test. Für das Adhäsionsassay und die Bewertung der Kariogenität der einzelnen Stämme wurde eine Varianzanalyse ANOVA (von engl. Analysis of variance) sowie Post-hoc-Tukey Signifikanztests (HSD) durchgeführt. Das Signifikanzlevel wurde auf $p < 0,05$ festgesetzt.

4 Ergebnisse

4.1 Kompetitionsassay

Die Ergebnisse der Kompetitionsassays zeigten, dass besonders drei probiotische Stämme in ihren kompetitiven Eigenschaften gegenüber *S. mutans* ATCC 20523 als auch *S. mutans* ATCC 25175 auffällig sind. In den Exklusionsverfahren, also dem Versuchsdesign, in dem erst eine Kultivierung von Probiotikum, dann von experimentellen *Streptococcus mutans*-Stämmen vorgesehen war, handelte es sich dabei um BC-30 (*Bacillus coagulans* GBI-306086), FDL (*Lactobacillus acidophilus* DSM 13241) und um LR-32 (*Lactobacillus rhamnosus* LR-32 ATCC SD5217) (Tabelle 4). In dem Verdrängungsverfahren, also dem Versuchsdesign, bei dem zuerst experimentelle *Streptococcus mutans*-Stämme und dann Probiotikum inokuliert wurden, war es hingegen ein Keim, der auffiel. FDL wies die stärkste kompetitive Eigenschaft gegenüber beiden experimentellen *Streptococcus mutans*-Stämmen auf (Tabelle 4). Ein Resümee beider Verfahren ergab, dass die Spezies BC-30 und LR-32 am stärksten kompetitiv auf Halb-BHI-Agar wirken, während das für die Spezies FDL auf Voll-BHI-Agar gilt.

Tabelle 4: Wettbewerbsassay: Inhibition von *S. mutans* durch unterschiedliche probiotische Stämme im Rahmen einer Verdrängung (1. *S. mutans*, 2. Probiotikum) und einer Exklusion (1. Probiotikum, 2. *S. mutans*) auf Voll- und Halb-BHI-Agar

Probiotikum	BHI	Exklusion von		Verdrängung von	
		SM ATCC 20523	SM ATCC 25175	SM ATCC 20523	SM ATCC 25175
FDL	Voll	3 – 4	3	3	3
	Halb	3	3	2 – 3	0 - 2
LC-11	Voll	2 – 3	0 – 2	2 – 3	3
	Halb	1 – 2	3	2 – 3	0 - 3
F-19	Voll	1	0	0 – 1	1
	Halb	0 – 1	0	0 – 2	0 - 2
LGG	Voll	2 – 3	0 – 3	0 – 3	1 – 2
	Halb	2	3	3	3
LR-32	Voll	3	0 – 4	0 – 4	3
	Halb	3 – 4	4	2 – 4	2 – 3
BB-12	Voll	2	0 – 2	2	0 – 3
	Halb	2 – 3	3	3	0 - 3
FDTH-4	Voll	2	2 – 4	1 – 4	0 – 1
	Halb	2	2	2	3
BC-30	Voll	2	4	1 – 4	2
	Halb	2 – 3	3	2 – 3	2 - 3

1: keine Hemmung; 2: Hemmung im ersten Viertel; 3: Hemmung bis einschließlich ins zweite Viertel; 4: Hemmung bis einschließlich ins dritte Viertel

FDL: *Lactobacillus acidophilus*; LC-11: *Lactobacillus casei*; F-19: *Lactobacillus paracasei*; LGG: *Lactobacillus rhamnosus* GG; LR-32: *Lactobacillus rhamnosus* LR-32; BB-12: *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis*; TH-4: *Streptococcus thermophilus*; BC-30: *Bacillus coagulans* GBI-30

Die Ergebnisse der Versuchsreihe zur Koexpansion, also einer zeitgleichen Kultivierung von jeweiligem Probiotikum und experimentellem *Streptococcus mutans*-Stamm zeigten, dass drei probiotische Stämme besonders wirksam sind: FDL, LC-11 und LR-32 (Tabelle 5).

Tabelle 5: Wettbewerbsassay: Inhibition von *S. mutans* durch probiotische Stämme im Rahmen einer "Koexpansion" auf Voll-BHI-Agar

Koexpansion		
Probiotikum	SM ATCC 20523	SM ATCC 25175
FDL	3	2
LC-11	1 - 3	2
F-19	1	1
LGG	1 - 2	2
LR-32	2 - 3	1
BB-12	2	1
TH-4	2	1
BC-30	1 - 2	2

0: keine Wirksamkeit; 1 – 2: schwache Wirksamkeit; 3 – 4: starke Wirksamkeit

FDL: *Lactobacillus acidophilus*; LC-11: *Lactobacillus casei*; F-19: *Lactobacillus paracasei*; LGG: *Lactobacillus rhamnosus* GG; LR-32: *Lactobacillus rhamnosus* LR-32; BB-12: *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis*; TH-4: *Streptococcus thermophilus*; BC-30: *Bacillus coagulans* GBI-30

4.2 Adhäsionsassay

Die probiotischen Stämme und der experimentelle *Streptococcus mutans*-Stamm ATCC 25175 wurden im (a) Exklusiv- und (b) Verdrängungsmodus kokultiviert. Im Exklusivassay wurde *S. mutans* ATCC 25175 durch alle Probiotika gleichermaßen an einer Adhäsion gehindert, es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen hinsichtlich der *Streptococcus mutans*-Adhäsion (Abb. 6a). Im Verdrängungsassay zeigte sich ein ähnliches Bild, wobei hier bestimmte Probiotika besser in der Lage waren *S. mutans* ATCC 25175 zu verdrängen als andere (Abb. 6b).

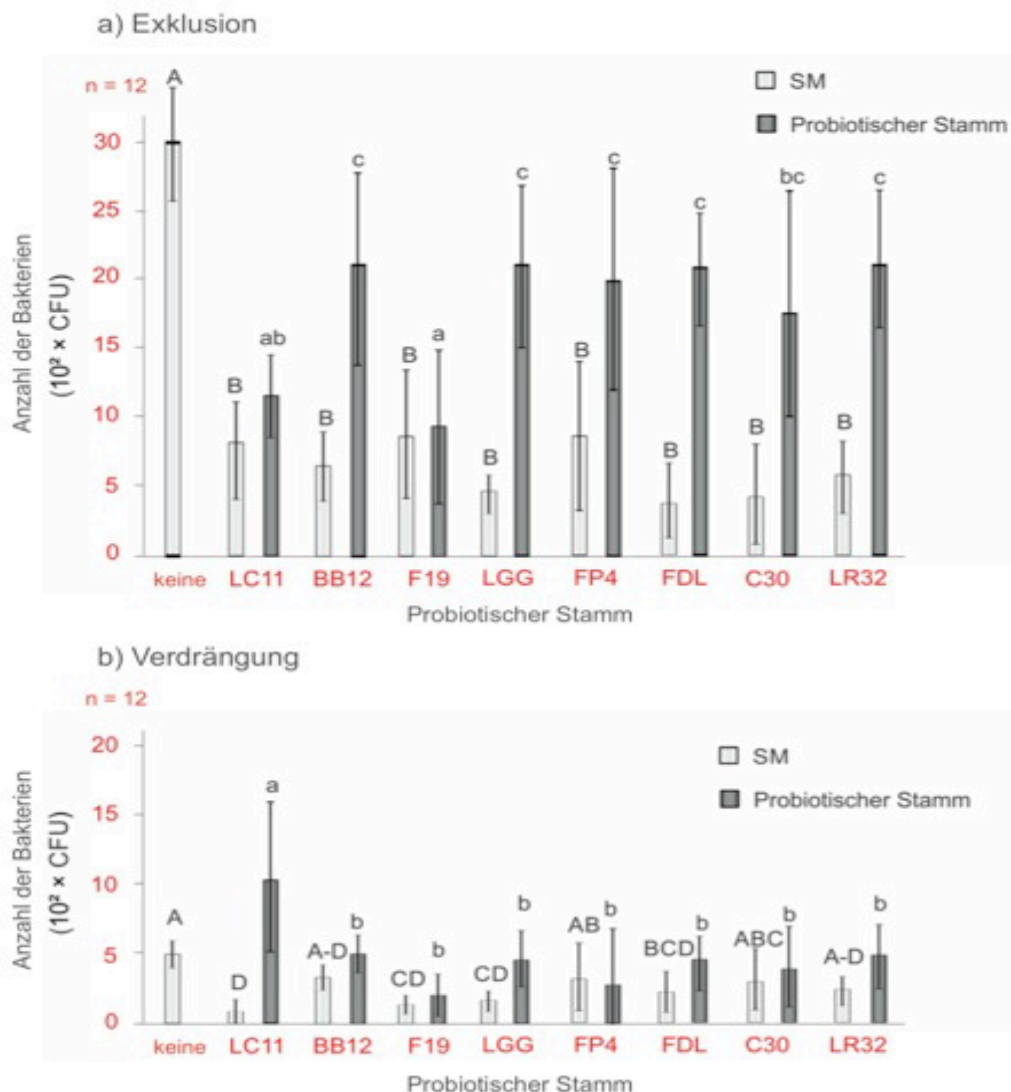


Abbildung 6: Anzahl der CFU der probiotischen Stämme und von *S. mutans* ATCC 25175 im a) Exklusivassay und b) Verdrängungsassay

FDL: *Lactobacillus acidophilus*; LC-11: *Lactobacillus casei*; F-19: *Lactobacillus paracasei*; LGG: *Lactobacillus rhamnosus* GG; LR-32: *Lactobacillus rhamnosus* LR-

32; BB-12: *Bifidobacterium animalis subsp. Lactis*; TH-4: *Streptococcus thermophilus*; BC-30: *Bacillus coagulans* GBI-30, SM: *Streptococcus mutans*

Der Mittelwert (Balken) und die Standardabweichungen (Antennen) der koloniebildenden Einheiten (CFU) von SM (hellgrau) und den probiotischen Stämmen (dunkelgrau) wurden bestimmt. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind durch unterschiedliche Buchstaben (Großbuchstaben: SM, Kleinbuchstaben: Probiotika) gekennzeichnet ($p < 0,05$, Tukey's HSD). Die Anzahl der analysierten Proben ist mit n angegeben [Schwendicke et al, 2017].

4.3 Kariogenitätsbeeinflussung

In der Analyse zur Beeinflussung der Kariogenität wurden demnach FDL und LC-11 eingesetzt. Die Stämme wurden in Versuchsgruppen eingeteilt. Sie bestanden jeweils aus isoliertem *S. mutans* ATCC 25175, FDL, LC-11 und aus den Kokultivierungen SM × FDL und SM × LC-11.

Hierbei verursachten *Streptococcus mutans*-Monokulturen signifikant höhere Mineralverluste als Probiotikamonokulturen. Bei Kokultivierung von SM × FDL war der Mineralverlust hingegen signifikant höher ($p < 0,01$), bei Kokultivierung von SM × LC-11 signifikant niedriger ($p < 0,05$) (Abb. 7).

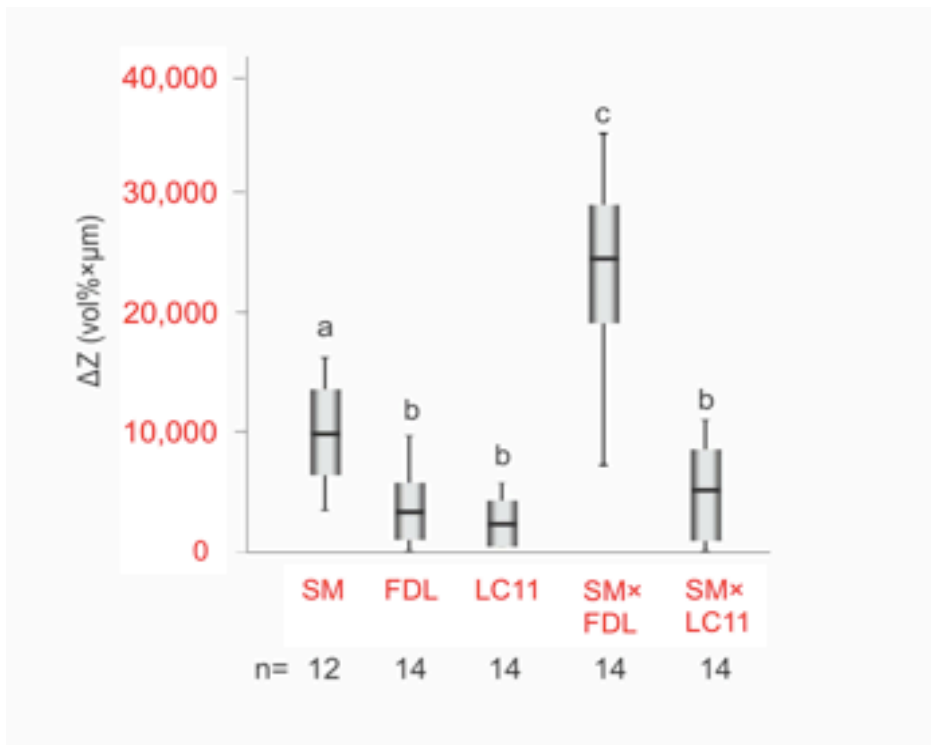


Abbildung 7: Auswertung des Mineralverlustes der Gruppen SM, FDL, LC-11, SM x FDL, SM x LC-11

FDL: *Lactobacillus acidophilus*; LC-11: *Lactobacillus casei*; SM: *Streptococcus mutans*

Kasten: 25./75. Perzentile, Linien: Mediane, Fehlerbalken: Minima und Maxima, Kreise: Ausreißer, n: Anzahl analysierter Probekörper. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind durch unterschiedliche Buchstaben angezeigt ($p < 0,05$, Mann-Whitney/Bonferroni) [Schwendicke et al, 2017].

Im Anschluss wurden die CFU der Stämme der jeweils auf den Probekörpern angezüchteten Biofilme ausgezählt (Tabelle 6). Ausgewertet wurden die Gruppen SM, FDL, LC-11 und die Kokulturen SM x FDL und SM x LC-11 bei einer Verdünnung von 10^3 .

Die Anzahl der Bakterien im Biofilm war in der Gruppe von monospezifisch kultiviertem *S. mutans* ATCC 25175 am geringsten und am höchsten in denen der Kokultivierung. Die meisten koloniebildenden Einheiten konnten in der Kombination SM x FDL ausgezählt werden.

Tabelle 6: Koloniebildende Einheiten in den Biofilmen

Spezies	10³ × CFU
SM	89 (16/120) ^a
FDL	2900 (400/520) ^b
LC-11	340 (140/340) ^b
SM×FDL	26000 (9200/80000) ^c
SM×LC-11	16000 (6200/80000) ^c

FDL: *Lactobacillus acidophilus*; LC-11: *Lactobacillus casei*; SM: *Streptococcus mutans*

Angegeben sind Mediane und 25./75. Perzentile. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen an ($p < 0,05$; Mann-Whitney/Bonferroni). Die Anzahl der analysierten Proben n beträgt 7 [Schwendicke et al., 2017].

5 Diskussion

Kariöse Läsionen entstehen durch Demineralisierung von Zahnhartsubstanz. Eine Reihe von kariogen wirksamen Stämmen bakterieller Arten ist dafür verantwortlich. Die Bakterien etablieren sich in einem sogenannten Biofilm an der Oberfläche der Zahnhartsubstanz. Bei der Metabolisierung von Kohlenhydraten überführen sie das orale Milieu, insbesondere das des Biofilms, in einen sauren pH-Bereich, wodurch die Demineralisierung, bei der Mineralien aus der Zahnhartsubstanz herausgelöst werden, vonstatten gehen kann [Shellis, 2012]. Ausschlaggebend ist dabei die bakterielle Zusammensetzung des Biofilms. Einer der Protagonisten in dem Prozess um die Entstehung von Karies ist die Bakterienart *Streptococcus mutans* [Kovacs et al., 2019; Sadasiva et al., 2019]. Die aktuelle Studienlage lässt Vermutungen zu, dass der Keim durch den Einsatz von Probiotika mindestens in seiner Quantität, möglicherweise aber auch in seiner Aktivität beeinflussbar ist [Wu et al., 2019; Paris et al., 2012; Pahumunto et al., 2019]. Demnach wären Probiotika als Therapeutikum von Karies denkbar. Dass eine solche Kariesprävention- oder -behandlung wirksam ist, konnte allerdings noch nicht vollständig bewiesen werden. Die systematische Beurteilung der Relevanz verschiedener Virulenzfaktoren probiotischer Bakterien könnte ein Forschungsansatz sein, wurde bisher aber nicht vorgenommen.

Das Design der vorliegenden Studie wurde in vier Versuchsschritte unterteilt. Zunächst wurde eine Auswahl an probiotischen Stämmen nach ihren Eigenschaften getroffen (Tabelle 1). Die ausgewählten Probiotika wurden einem zweistufigen Screening unterzogen. Der erste Teil bestand aus der Untersuchung einer möglichen Inhibition von experimentellen *Streptococcus mutans*-Stämmen durch Probiotika. Der zweite Teil baute auf der Untersuchung des Wettbewerbs von Probiotika und *S. mutans* ATCC 25175 um eine Adhäsion an Zahnschmelz auf. In dem letzten Versuchsteil der Studie wurden die beiden probiotischen Stämme, die aus dem Screening als effektivste hervorgegangen waren, in ihrer Kariogenitätsbeeinflussung untersucht. Folglich wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine Korrelation zwischen den Inhibitions- bzw. Adhäsionseigenschaften von Probiotika und der simulierten Kariesprävention durch die Probiotikatherapie besteht. Die Hypothese konnte teilweise bestätigt werden. Weiterhin wurde die Hypothese aufgestellt, dass die beiden effektivsten probiotischen Stämme des Screenings die Kariogenität in einem Biofilm reduzieren können. Diese Hypothese konnte nicht vollständig bestätigt werden.

Auf unseren Ergebnissen basierend könnten Probiotika, die in der Lage sind, *S. mutans* von Zahnoberflächen zu verdrängen, eine kariespräventive Wirkung haben. Probiotika scheinen demnach mit kariogenen Keimen in einen Wettbewerb sowohl um Nahrung als auch um Oberfläche, mithin um einen signifikanten Teil ihres Lebensraums, einzutreten. Alle untersuchten Stämme der Probiotika waren in der Lage, eine Besiedlung von Flächen mit *S. mutans* teilweise zu verhindern; sie bewirkten also den Ausschluss der initialen Besiedlung durch experimentelle *Streptococcus mutans*-Stämme an bakterienfreien Zahnoberflächen. Solche Bedingungen sind klinisch allerdings nur selten vorzufinden, vor allem nicht in geschützten Nischen, also genau den Risikoflächen für Karies.

Auf der Basis des durchgeführten Screenings wurden die in den Adhäsions- und Inhibitionsscreenings vielversprechendsten Probiotika ausgewählt. Zwei Stämme fielen besonders auf, FDL und LC-11. In den vorliegenden Versuchsreihen zeigte LC-11 die höchste verdrängende Wirkung. Zudem konnte der Keim die Kariogenität von *S. mutans* ATCC 25175 maßgeblich reduzieren. Dabei sank jedoch die Gesamtzahl der Bakterien in den untersuchten Biofilmen unter dem Einfluss von LC-11 nicht ab, sondern stieg unter der Zugabe sogar an. Demnach kann davon ausgegangen werden, dass durch die Änderung der Zusammensetzung des Biofilms ebenfalls eine Verschiebung der Aktivität innerhalb des Biofilms stattgefunden hat. Die Biofilmanalysen der Studie waren nicht darauf ausgelegt, die Änderung der Zusammensetzung zu untersuchen. Weitergehende Analysen dieser Verschiebungen sollten in zukünftige Studien einbezogen werden, um die beobachteten Effekte besser erklären zu können.

Der inhibitorische Stamm FDL verursachte hingegen sogar eine Steigerung der Kariogenität der Biofilme. Solche kariesfördernden Effekte von Probiotika sind bereits in vergangenen Studien demonstriert worden [Schwendicke et al., 2014a]. Probiotische Keime sind oft selbst azidogen und mithin auch kariogen [Haukioja et al., 2008; Keller und Twetman, 2012]. Eine Vermutung liegt darin, dass Probiotika einen Biofilm unter der Voraussetzung eines niedrigen pH-Wertes und der Zugabe von Saccharose besonders stark transformieren können. Der Nutzen eines Vorabscreenings zur Beurteilung der Veränderung einer Biofilmmzusammensetzung unter dem Einsatz von unterschiedlichen pH-Werten, Saccharose und dem jeweiligen probiotischen Stamm, wird in einer Studie diskutiert [Pham et al., 2009]. Zudem wird der Einsatz hitzebehandelter Bakterien, um kariespräventive Effekte der Probiotika mit erhöhter Sicherheit zu vereinbaren, in Erwägung gezogen [Tanzer et al., 2010].

Folglich kann einigen probiotischen Stämmen selbst durch ihre azidogenen Eigenschaften eine Kariogenität zugeschrieben werden. In Abhängigkeit von dem Stamm ist diese mitunter als hoch einzustufen. Hier stellt sich die Frage nach der klinischen Relevanz dieser Kariogenität und nach dem Nutzen einer probiotischen Therapie. Ein therapeutischer Nutzen könnte in der Zukunft bspw. in der Präventivzahnmedizin liegen. Probiotika würden also gezielt bereits gegen die Entstehung von Karies eingesetzt werden.

Die Studie hat eine Reihe von Schwächen. Es wurde ein vereinfachtes Biofilmmodell eingesetzt; der angezüchtete Biofilm in Mono- und Bikulturen ist eine Vereinfachung. Wie sich also weitere Bakterienstämme, die normalerweise im oralen Milieu zu finden sind, in der Gegenwart der hier verwendeten kariogenen und probiotischen Stämme verhielten, kann nicht beurteilt werden. Orale Biofilme sind hochkomplex; es kommt zu Kreuzvernetzungen und sog. Cross-Feeding, also verketteter Katabolismen. Die Präsenz kreuzvernetzender Bakterienstämme kann z.B. zu einer erheblichen Steigerung der Adhäsion von probiotischen Spezies führen [Haukioja et al., 2006].

Die Versuche wurden aufgrund des Umfangs ausschließlich an Zahnschmelz durchgeführt. Es wurde keine Bewertung der Adhäsion von Probiotikastämmen und *S. mutans* ATCC 25175 an Dentin vorgenommen. Zudem wurde die Adhäsion an Schmelzproben von Rinderinzisiven bewertet. Allerdings ist bovine Zahnhartsubstanz in ihrer Anatomie und Mikrostruktur, also u.a. der Dichte, Härte und der chemischen Zusammensetzung, der menschlichen Zahnhartsubstanz sehr ähnlich [Esser et al., 1998; Oesterle et al., 1998]. Demnach kann davon ausgegangen werden, dass ein Unterschied zwischen Zahnhartsubstanz bovinen oder menschlichen Schmelzes für eine Studie dieser Art nur bedingt relevant ist.

In der vorliegenden Studie erlauben die eingesetzten Analysemethoden eine eingeschränkte Evaluation der biologischen Mechanismen, die von einem Probiotikaeinsatz ausgehen. Veränderungen im Biofilm bleiben unklar, Adaptionen des bakteriellen Metabolismus wurden nicht und die Verschiebungen der Biofilmmzusammensetzung wie diskutiert nicht detailliert dargestellt.

Insgesamt werden weitere Studien benötigt. In künftigen Forschungsprojekten könnten ergänzende Methoden und Abläufe etabliert werden. Um bei quantitativen Auswertungen eine höhere Genauigkeit zu erzielen, könnte über alternative Verfahren nachgedacht werden, so z.B. über den Einsatz einer kompetitiven RT-PCR, einer Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion. Dabei wird dem Prozess eine bekannte Konzentration eines Referenz-DNA-Moleküls beigefügt, das sich jedoch in seiner Länge von dem zu bestimmenden Molekül unterscheidet. Die

Moleküle konkurrieren um eine Primerbindung und die entstehende Produktmenge der Referenz im Vergleich zu der auszuzählenden Probe gilt als Maß für die Menge analysierter RNA.

Denkbar wäre auch, die beobachteten Effekte *in situ* zu validieren. Probanden würden Schmelzprobekörper oral eingegliedert und zu einer geregelten Probiotikazufuhr angehalten werden. Auf diese Weise könnten klinische Effekte nachgestellt und trotzdem kontrollierte experimentelle und analytische Bedingungen kombiniert werden. Da sowohl *In-vitro*- als auch *In-vivo*-Studien aufgrund der Vielfalt vorkommender Bakterienspezies eine Herausforderung darstellen, sollte man *In-Silico*-Analysen in Betracht ziehen. Sie bieten gerade für solch umfangreiche Studien die Möglichkeit, ein computergesteuertes und organbezogenes Programm zu entwickeln und Ergebnisse nach einer Computersimulation algorithmisch zu erzielen. In der Vergangenheit wurde diese Methode vor allem für darmbezogene Studien verwendet, bspw. um die Dynamik des Mikrobioms im Ileum zu erforschen [Lin et al., 2018]. Zukünftige Studien könnten neben der Erforschung der hier im Vordergrund stehenden Effekte auf Schmelz diese auch auf Dentin vornehmen. Bereits zuvor wurden große Unterschiede in der Adhäsion an Dentin oder Zahnschmelz aufgezeigt [Anderson et al., 1998; Schwendicke et al., 2014a].

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass Probiotika, die kariogene Bakterien inhibieren, keine nennenswerte Reduktion der Kariogenität innerhalb bikultivierter Biofilme herbeiführen müssen. Im Kontrast dazu sind jedoch die Verdrängungskapazitäten relevant. Laboratorische Evaluationsmethoden sollten vor einem weiteren Screening von Probiotika im Rahmen des Kariesmanagements nach den klinischen Ergebnissen angepasst, etabliert und validiert werden.

6 Anhang

6.1 Zeitplan Adhäsionsassay

Tag 1: Pellikelbildung

Folgende 10 Tage: 11:00 – 11:30

Tageszeit	Medium/Keim	Zyklus	Bemerkung
Tag 1 (im Ganzen)	Steril-filtrierter Speichel*		Pellikelbildung
Folgende 10 Tage:			
07:15 – 7:45	Probiotika**	Ab Tag 2	15 Min aktive Bespülung, 02 Min. abpumpen, 13 Min Ruhe
07:45 – 08:00	DMM		15 Min aktive Bespülung, dann abpumpen
Ruhephase			
11:00 – 11:30	<i>S. mutans</i> ***	1	15 Min. aktive Bespülung, 02 Min. abpumpen 13 Min. Ruhe
11:30 – 11:45	DMM****		15 Min. aktive Bespülung, dann abpumpen
Ruhephase			
14:00 – 14:30	BHI-S*****		15 Min. aktive Bespülung, 02 Min abpumpen 13 Min. Ruhe
14:30 – 14:45	DMM		15 Min. aktive Bespülung, dann abpumpen
14:45 – 15:15	<i>S. mutans</i>	2	

15:15 – 15:30	DMM	
Ruhephase		
17:45 – 18:15	BHI-S	
18:15 – 18:30	DMM	
18:30 – 19:00	<i>S. mutans</i>	3
19:00 – 19:15	DMM	
Ruhephase		
21:30 – 22:00	BHI-S	
22:00 – 22:15	DMM	
Nachtruhe		

- * Eigenspeichel, steril filtriert
- ** Lactobacillus entsprechend des Assays (LC-11, LA5, F-19, LGG, LR-32, BB 12, TH-4, BC-30)
- *** *Streptococcus mutans* ATCC 25175
- **** „Modified defined Mucine Medium“, entspricht künstlichem Speichel
- ***** Brain Heart Infusion Bouillon mit 2% Saccharose

6.2 Inhaltsstoffe „Modified defined Mucine Medium“ (DMM)

Stoff	Bestellnr.	Molare Masse in g/Mol	Konzentration in mmol/l	Ansatz	Menge in g
Kaliumchlorid CaCl₂ · 3 H₂O	Roth 5239.2	147,02	1,0	2 l	0,294
Magnesiumchlorid-Hexahydrat MgCl₂ · 6 H₂O	Merck 1.05833.0250	203,30	0,2	2 l	0,081
Kaliumdihydrogenphosphat KH₂PO₄	Merck 104873 oder Roth 3904.2	136,08	0,5	2 l	0,136
di-Kaliumhydrogenphosphat-Trihydrat K₂HPO₄ · 3 H₂O	Merck 1,05099.0250	228,23	0,5	2 l	0,228
Natriumchlorid (Kochsalz) NaCl	Roth HN00.1 oder Merck 1.06404.0500	58,44	1,0	2 l	0,117
Kaliumchlorid KCl	Merck 1.04936.0250	74,55	3,0	2 l	0,447
Ammoniumchlorid NH₄Cl	Merck 1.01145.0500	53,49	0,2	2 l	0,021
Harnstoff (Urea) CH₄N₂O	Merck 1.08488.0250	60,06	0,5	2 l	0,060
Mucin* fr. porcine stomach, Type III	Sigma M1778		2,5 g/l	2 l	5,0

* Das Mucin wird mindestens einen Tag vorher in 200 ml Aqua dest. gelöst und für eine Stunde unter Rühren auf 80° C erhitzt.

6.3 Herstellung-Brain-Heart-Infusion-Bouillon mit Saccharose

Brain Heart Infusion Agar ½ Menge

Stoff	Hersteller	Ansatz	Menge
Brain Infusion Agar (BHI)	Heart Becton Dickinson GmbH; Heidelberg, Deutschland)	1 l	18,5 g
Aqua dest.	Aufbereitung in der Poliklinik für Mund-Kiefer- und Zahnheilkunde Charité Berlin	1 l	1 l
Saccharose		1 l	2%

6.4 Brain-Heart-Infusion-Bromkresol

Im Rahmen der Versuche wurde eine Methode zur Unterscheidung der probiotischen Stämme von *S. mutans* entwickelt.

Dazu wurde Bromkresolgrün (Bromkresolgrün ACS T115 Roth, Karlsruhe, Deutschland) (auch Bromkresolblau) in einer Versuchsreihe mit Verdünnungen bei der Herstellung von BHI-Agar beigefügt. Eine anschließende Beimpfung mit den im Versuch verwendeten Stämmen erfolgte, um visuell eine bestmögliche Auswertung zu erzielen.

Eine geeignete Dosis wurde bei einer Zugabe von 0,1 g Bromkresolgrün auf 100 ml BHI-Agar und einer anschließenden Verdünnung auf 10^1 erzielt.

6.4.1 Vorbereitung des Versuches

Zunächst wurde jeweils auf eine Voll- und eine Halb-BHI-Agarplatte in einem Viertel der Platte der jeweilige probiotische Stamm ausgestrichen. In ein Eppendorfgefäß wurde eine kleine Spatelspitze des Bromkresolblaupulvers gegeben. Mit einer mechanischen Pipette wurde 1 ml der BHI-Bouillon zugegeben und beide Stoffe mit Hilfe des mechanischen Rüttlers in ein optisch homogenes Medium überführt. Mittels einer Einmal-Pipette wurde in jedes Viertel auf den jeweiligen Kulturausstrich ein Tropfen des Mediums gegeben. Die Verteilung erfolgte mit einem Glasspatel. Anschließend wurde der Tropfen unter anaeroben Bedingungen für 48 Stunden kultiviert.

6.4.2 Versuch und Ergebnis

Zahlreiche Versuchsreihen dienten zur Bestimmung einer geeigneten Anfangsdosis für das Bromkresolgrün. Dazu wurden in 100 ml BHI-Agar im flüssigen Zustand bei der Herstellung jeweils Bromkresolmengen von 0,1 g, 0,2 g, 0,3 g, 0,4 g und 0,5 g beigefügt und beim Gießen der Platten bereits Einschätzungen über den Färbungsgrad des Gemisches vorgenommen. Nach Beimpfung mit den probiotischen Stämmen (LC-11, FDL, F-19, LGG, LR-32, BB-12, TH-4, BC-30) und *Streptococcus mutans* ATCC 25175 und der anschließenden Kultivierung über 48 Stunden bei 37° C. in einem CO₂-Brutschrank (Thermo SCIENTIFIC, Typ B6420 Waltham, Massachusetts, USA) wurde eine erste visuelle Beurteilung über die Bewertungsmöglichkeiten vorgenommen. Diese führte zu dem Ausschluss der

Dosierungen 0,2 g, 0,3 g, 0,4 g und 0,5 g. Mit einer Dosierung von 0,1 g pro 100 ml wurden die Verdünnungsreihen bis 10^{10} vorgenommen, diese dann ausplattiert und inokuliert, kultiviert und visuell bewertet. Die Verdünnung 10^1 wurde als geeignet beurteilt. Zur Verifizierung der Nützlichkeit des Bromkresolgrüns für die Differenzierung von *S. mutans* von den probiotischen Kulturen wurden weitere Versuche durchgeführt. Die Kompetitionsassays wurden in den jeweiligen Gruppen auf dem BHI-Bromkresol-Agar wiederholt. Bei der Inokulation wurden jeweils 0,5 ml des Mediums injiziert. Alle Competitionstests wurden dupliziert. Zur Validierung der Behauptung, den jeweiligen probiotischen Stamm von *S. mutans* unterscheiden zu können, wurden von allen Kulturen jeweils 8 CFU entnommen und einer Gramfärbung unterzogen. Die fixierten Kulturen wurden im Anschluss mikroskopiert und verifiziert. In der Versuchsreihe war nach weiterer achtundvierzigstündiger Kultivierung ein Farbumschlag zu erkennen. Während sich probiotische Stämme eher königsblau präsentierten, waren die experimentellen *Streptococcus mutans*-Stämme von einem Jade-Tannengrün. Die Auswertung nach der Gramfärbung ergab eine Sensitivität und eine Spezifität von 0,86, sie reichten von 0,71 bis 1,00.

7 Literaturverzeichnis

- Aguirre M, Collins MD: Lactic acid bacteria and human clinical infections. *J. Appl. Bact.* 1993; 75:95-107.
- Abhari KH, Shekarforoush SS, Sajedianfard J, Hosseinzadeh S, Nazifi S: The effect of probiotic, prebiotic and synbiotic diets containing *Bacillus coagulans* and inulin on rat intestinal microbiota. *Iran J Vet Res* 2015;16(3):267-273.
- Ahola AJ, Yli-Knuuttila H, Suomalainen T, Poussa T, Ahlstrom A, Meurman JH, Korpela R: Short-term consumption of probiotic-containing cheese and its effect on dental caries risk factors. *Archives of oral biology* 2002; 47:799-804.
- Anderson P, Levinkind M, Elliot JC: Scanning microradiographic studies of rates of in vitro demineralization in human and bovine dental enamel. *Archives of oral biology* 1998;43:649-656.
- Becker MR, Paster BJ, Leys EJ et al. Molecular analysis of bacterial species associated with childhood caries. *J Clin Microbiol* 2002; 40:1001–1009
- BgVV: Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, Abschlussbericht der Arbeitsgruppe "Probiotische Mikroorganismenkulturen in Lebensmitteln" am BgVV im Oktober 1999; S. 4; Absatz 3.4.
- Caglar E, Kuscu OO, Selvi Kuvvetli S, Kavaloglu Cildir S, Sandalli N, Twetman S: Short-term effect of ice-cream containing *bifidobacterium lactis* bb-12 on the number of salivary mutans streptococci and lactobacilli. *Acta odontologica Scandinavica* 2008; 66:154-158.
- 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 odontologica Scandinavica* 2005;63:317-320.

- Cheikhoussef A, Pogori N, Chen W, Zhang H: Antimicrobial proteinaceous compounds obtained from bifidobacteria: From production to their application. *International journal of food microbiology* 2008;125:215-222.
- Danisco A/S: *Lactobacillus casei*-11, Technical Memorandum TM49-le, S. 1.
- Dibdin GH, Shellis RP, Wilson CM: An apparatus for the continuous culture of micro-organisms on solid surfaces with special reference to dental plaque. *J Applied Bacteriology* 1976;40:261-268.
- Dieck W, Miller WD: Ein Lebensbild. Gedächtnisrede, gehalten am 24. November 1907, *Korrespondenz-Blatt für Zahnärzte* 37/1 (1908), S. 1-23.
- Esser M, Tinschert J., Marx R: Materialkennwerte der Zahnhartsubstanz des Rindes im Vergleich zur humanen Zahnhartsubstanz, 1998. *Dtsch Zahnärztl Z*53, 5.
- Foligne B, Zoumpopoulou G, Dewulf J, Ben Younes A, Chareyre F, Sirard JC, Pot B, Grangette C: A key role of dendritic cells in probiotic functionality. *PloS one* 2007;2:e313.
- Gabrielson MO, Hsiung GD: Sensitivity of agar overlay method for the recognition of enteroviruses. *Applied microbiology* 1965;13:967-972.
- Glavina D, Gorseta K, Skrinjaric I, Vranic DN, Mehulic K, Kozul K: Effect of Igg yoghurt on streptococcus mutans and lactobacillus spp. Salivary counts in children. *Collegium antropologicum* 2012;36:129-132.
- Hasslöf P, West CE, Karlsson Videhult F, Brandelius C, Stecksén-Blicks C: Early intervention with probiotic *Lactobacillus paracasei* f19 has no long-term effect on caries experience. *Caries Research* 2013;47:559-565.
- Haukioja A, Soderling E, Tenovuo J: Acid production from sugars and sugar alcohols by probiotic lactobacilli and bifidobacteria in vitro. *Caries Res* 2008;42:449-453.
- 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 microbiology and immunology* 2006;21:326-332.

- Hedberg M, Hasslöf P, Sjöström I, Twetman S, Stecksén-Blicks C: Sugar fermentation in probiotic bacteria – an in vitro study. *Oral microbiology and immunology* 2008;23:482-485.
- Jindal G, Pandey RK, Singh RK, Pandey N: Can early exposure to probiotics in children prevent dental caries? A current perspective. *J Oral Biol Craniofac Res.* 2012;2(2):110-115.
- Kalman DS, Schwartz HI, Alvarez P, Feldman S, Pezzullo JC, Krieger DR: A prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled parallel-group dual site trial to evaluate the effects of a bacillus coagulans-based product on functional intestinal gas symptoms. *BMC gastroenterology* 2009;9:85.
- 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 Research* 2012;46:140-146.
- Keller MK, Twetman S: Acid production in dental plaque after exposure to probiotic bacteria. *BMC oral health* 2012;12:44.
- Klein,G, Pack A, Bonaparte C, Reuter G: Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Int.J.Food Microbiol.* 1998;41:103-125.
- Kneist S, Schmidt F, Callaway A, Willershausen B, Rupf S, Wicht M, Thiede B: Diversity of *Lactobacillus* species in deep carious lesions of primary molars. *European archives of paediatric dentistry : official journal of the European Academy of Paediatric Dentistry* 2010;11:181-186.
- Kovacs CJ, Faustoferri RC, Bischer AP, Quivey RG Jr.: *Streptococcus mutans* requires mature rhamnose-glucose polysaccharides for proper pathophysiology, morphogenesis and cellular division. *Mol Microbiol.* 2019; doi:10.1111/mmi.14330.
- Laleman I, Detaillieur V, Slot DE, Slomka V, Quirynen M, Teughels W: Probiotics reduce mutans streptococci counts in humans: A systematic review and meta-analysis. *Clinical oral investigations* 2014;18:1539-1552.

- Lin C, Culver J, Weston B, Underhill E, Gorky J, Dhuriati P: GutLogo: Agent-based modeling framework to investigate spatial and temporal dynamics in the gut microbiome. *PLoS One* 2018 Nov 9;13(11):e0207072
- Loesche WJ: Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev* 1986;50:353-380.
- Makinen KK: Sugar alcohol sweeteners as alternatives to sugar with special consideration of xylitol. *Med Princ Pract* 2011;20:303-320.
- Mandel DR, Eichas K, Holmes J: *Bacillus coagulans*: A viable adjunct therapy for relieving symptoms of rheumatoid arthritis according to a randomized, controlled trial. *BMC complementary and alternative medicine* 2010;10:1.
- Marsh PD: Dental plaque as a biofilm and a microbial community - implications for health and disease. *BMC oral health* 2006;6:S14.
- Marsh PD: Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology* 2003;149:279-294.
- Marsh PD, Martin MV: *Oral Microbiology*. 3rd ed. London: Chapman Hall; 1992
- Marsh PD und Martin MV: *Orale Mikrobiologie* 1999, Kapitel 4, S. 58.
- Martinez FAC, Balciunas EM, Converti A, Cotter PD, de Souza Oliveira RP: Bacteriocin production by bifidobacterium spp. A review. *Biotechnology Advances* 2013;31:482-488.
- 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. *Clinical oral investigations* 2012;16:797-803.
- Meurman JH: Probiotics: Do they have a role in oral medicine and dentistry? *European journal of oral sciences* 2005;113:188-196.

- Meurman JH, Antila H, Korhonen AS, S.: Effect of lactobacillus rhamnosus strain gg (atcc 53103) on the growth of streptococcus sobrinus in vitro. European journal of oral sciences 1995;103:253-258.
- Michalek SM, Hirasawa M, Kiyono H, Ochiai K, McGhee JR: Oral ecology and virulence of Lactobacillus casei and Streptococcus mutans in gnotobiotic rats. Infect Immun. 1981;33: 690-6.
- 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 Research 2001;35:412-420.
- Nyvad B, Takahashi N: Caries ecology revisited: Microbial dynamics and the caries process. Caries Res 2008;42: 409-418.
- Oesterle LJ, Shellhart WC, Belanger GK: The use of bovine enamel in bonding studies. A J Orthod Entofacial Orthop 114:514-519.
- Paris S, Ekstrand KR, Meyer-Lückel H. Von der Diagnostik zur Therapie. Karies. Hrsg.: Meyer-Lückel H, Paris S, Ekstrand KR. Stuttgart: Thieme, 2012, S. 153f. Print.
- Paris S, Ekstrand KR, Meyer-Lückel H. Von der Diagnostik zur Therapie. Karies. Hrsg.: Meyer-Lückel H, Paris S, Ekstrand KR. Stuttgart: Thieme, 2012, S. 154ff. Print.
- Paris S, Dörfer C, Meyer-Lückel H: Karieskontrolle durch Beeinflussung des Biofilms. Karies. Hrsg.: Meyer-Lückel H, Paris S, Ekstrand KR. Stuttgart: Thieme, 2012, S. 171f. Print.
- Paris S, Dörfer C, Meyer-Lückel H: Karieskontrolle durch Beeinflussung des Biofilms. Karies. Hrsg.: Meyer-Lückel H, Paris S, Ekstrand KR. Stuttgart: Thieme, 2012, S. 172f. Print.
- 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 odontologica Scandinavica 2011;69:321-327.

- Pahumunto N, Sopphatha B, Piwat S, Teanpaisan R: Increasing IgA and reducing *Streptococcus mutans* by probiotic *Lactobacillus paracasei* SD1: A double-blind, randomized, controlled study. J Dent Sci. 2019, 14(2):178-184.
- Pham LC, van Spanning RJ, Röling WF, Prospero AC, Terefezork Z, Ten Cate JM, Crielaard W, Zaura E: Effects of probiotic *Lactobacillus salivarius* W24 on the compositional stability of oral microbial communities. Arch Oral Biol. 2009 Feb;54(2):132-7.
- Rasmussen HE, Hamaker BR: Prebiotics and Inflammatory Bowel Disease. Gastroenterol Clin North Am. 2017 Dec;46(4):783-795.
- Rebert F: Influence on the reproduction of selected pathogens by antiseptics and Tissue Tolerable Plasma (TTP) 2014, Dissertation, S.68.
- Russell DA, Ross RP, Fitzgerald GF, Stanton C: Metabolic activities and probiotic potential of bifidobacteria. International journal of food microbiology 2011;149:88-105.
- Saavedra JM, Abi-Hanna A, Moore N, Yolken RH: Long-term consumption of infant formulas containing live probiotic bacteria: Tolerance and safety. The American journal of clinical nutrition 2004;79:261-267.
- Sadasiva K, Kumar KS, Rayar S, Shamini S, Unnikrishnan M, Kandaswamy D: Evaluation of the Efficacy of Visual, Tactile Method, Caries Detector Dye, and Laser Fluorescence in Removal of Dental Caries and Confirmation by Culture and Polymerase Chain Reaction: An *In Vivo* Study. J Pharm Bioallied Sci. 2019; (Suppl 2):S146-S150. Doi:10.4103/JPBS.JPBS_279_18.
- Salli KM, Gürsoy UK, Söderling EM, Ouwehand AC: Effects of Xylitol and Sucrose Mint Products on *Streptococcus mutans* Colonization in a Dental Simulator Model, Curr Microbiol. 2017; 74(10):1153-1159.
- Schwendicke F, Dorfer C, Kneist S, Meyer-Lueckel H, Paris S: Cariogenic effects of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* gg in a dental biofilm model. Caries Res 2014a;48:186-192.

- Schwendicke F, Horb K, Kneist S, Dörfer C, Paris S: Effects of heat-inactivated bifidobacterium bb12 on cariogenicity of streptococcus mutans in vitro. Archives of Oral Biology 2014b;59:1384-1390.
- Schwendicke F, Korte F, Dörfer CE, Kneist, Fawzy El-Sayed K, Paris S: Inhibition of Streptococcus mutans Growth and Biofilm Formation by Probiotics in vitro, Caries Res. 2017;51(2):87-95.
- Singh R, 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 odontologica Scandinavica 2011;69:389-394.
- Shellis P: Ätiologie und Pathogenese der Karies. Karies. Hrsg.: Meyer-Lückel H, Paris S, Ekstrand KR. Stuttgart: Thieme, 2012, S. 30. Print.
- Shellis P: Ätiologie und Pathogenese der Karies. Karies. Hrsg.: Meyer-Lückel H, Paris S, Ekstrand KR. Stuttgart: Thieme, 2012, S. 32. Print.
- Shellis P: Ätiologie und Pathogenese der Karies. Karies. Hrsg.: Meyer-Lückel H, Paris S, Ekstrand KR. Stuttgart: Thieme, 2012, S. 34. Print.
- Sissons CH, Cutress TW, Hoffman MP, Wakefield JSJ: A multi-station dental plaque microcosm (artificial mouth) for the study of plaque growth, metabolism, ph, and mineralization. Journal of Dental Research 1991;70:1409-1416.
- 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 Research 2009;43:374-381.
- 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 Research 2013;47:364-372.

- 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 Research* 2012;46:69-77.
- Tahmourespour A, Kermanshahi RK: The effect of probiotic strain (*Lactobacillus acidophilus*) on the plaque formation of oral Streptococci. *Bosn J Basic Med Sci* 2011;11(1):37-40.
- 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. *Journal of Dental Research* 2010;89:921-926.
- Tanzer JM, Livingston J, Thompson AM: The microbiology of primary dental caries in humans. *J Dent Edu* 2001;65:1028-1037.
- ten Cate JM, Larsen MJ, Pearce EIF et al.: Chemical Interactions between the Tooth and Oral Fluids. In: Fejerskov O, Kidd EAM, eds *Dental Caries. The Disease and its Clinical Management*. Oxford: Blackwell Munksgaard; 2003:49-70
- ten Cate JM, van Loveren C: Fluoride mechanisms. *Dent Clin North Am* 1999; 43:713-742, vii.
- Terai T, Okumura T, Imai S, Nakao M, Yamaji K, Ito M, Nagata T, Kaneko K, Miyazaki K, Okada A, Nomura Y, Hanada N: Screening of probiotic candidates in human oral bacteria for the prevention of dental disease. *PloS one* 2015;10:e0128657.
- Toiviainen A, Jalasvuori H, Lahti E, Gursoy U, Salminen S, Fontana M, Flannagan S., Eckert G, Kokaras A, Paster B, Söderling E: Impact of orally administered lozenges with *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Bifidobacterium animalis* subsp. Lactis BB-12 on the number of salivary mutans streptococci, amount of plaque, gingival inflammation and the oral microbiome in healthy adults. *Clin Oral Investig.* 2015;19:77-83.
- Twetman L, Larsen U, Fiehn N-E, Stecksén-Blicks C, Twetman S: Coaggregation between probiotic bacteria and caries-associated strains: An in vitro study. *Acta odontologica Scandinavica* 2009;67:284-288.

Twetman S, Keller MK: Probiotics for caries prevention and control. *Advances in Dental Research* 2012;24:98-102.

Verbraucherzentrale, „Functional Food“: Angebliche Gesundheitsmacher aus dem Kaufregal, 2016, Website: Verbraucherzentrale.de 13.01.2016;1-12.

World Health Organization (WHO), Health and nutritional properties of probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Report of a joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Cordoba: Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization; 2001.

Wong L, Sissons CH: A comparison of human dental plaque microcosm biofilms grown in an undefined medium and a chemically defined artificial saliva. *Archives of Oral Biology* 2001;46:477-486.

Wu CY, He SJ, Mar K, Stephen Hsu CY, Hung SL: Inhibition of *Streptococcus mutans* by a commercial yoghurt drink. *J Dent Sci.* 2019;14(2):198-205.

Zero DT: Sugars – the arch criminal? *Caries Res* 2004;38:277-285.

8 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Franziska Alt (geb. Korte), versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Wirkung oraler Probiotika auf *Streptococcus mutans* hinsichtlich einer Inhibition, Adhäsionskompetition und der Kariogenität 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/der Betreuer/in, 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.“

Datum

Unterschrift

9 Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Franziska Alt, geb. Korte, hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Publikation: Schwendicke F, Korte F, Dörfer CE, Kneist, Fawzy El-Sayed K, Paris S:
Inhibition of *Streptococcus mutans* Growth and Biofilm Formation by
Probiotics in vitro, *Caries Res.* 2017;51(2):87-95

Beitrag im Einzelnen:

- Entwicklung des Studiendesigns im Sinne eines Zwei-Schritt-Screenings, in dem erst inhibitorische Effekte ausgewählter Probiotika auf ausgewählte experimentelle *Streptococcus mutans*-Stämme getestet wurden und im Anschluss die adhäsiven Effekte, die sie auf bovinem Zahnschmelz haben.
- Entwurf und Durchführung des Versuches für das bakterielle Inhibitionsassay (Material and Methods, Study design) im Rahmen der Exklusion und der Verdrängung sowie die Datenerhebung
- Datenerhebung für die Inhibition von *Streptococcus mutans* durch Probiotika auf bovinem Zahnschmelz im Rahmen eines Biofilmmodells (Material and Methods, Study design)
- Kultivierung, Herstellung von Verdünnungsreihen und Festlegung bestmöglicher Auszählungsstufen sämtlicher Kulturen (Material and Methods, Bacterial Strains and Culture Conditions)
- Entwurf und Durchführung des Versuchsdesigns für die „Biofilm Formation Inhibition“ mit Präparation sämtlicher Proben, Herstellung der Versuchsriegel, der Medien, inklusive Saliva und des Durchflussskammer-Pumpen-Konstruktes, Aufstellung des Zeitplanes und Erhebung sämtlicher Daten für Exklusion und Verdrängung (Material and Methods, Biofilm Formation Inhibition)
- Entwurf des Versuches „Cariogenicity of Mixed SM-Probiotic Biofilms“ (Material and Methods)

- Entwicklung des Modells zu Figur 1: „Growth inhibition assessment“
- Entwicklung des Modells zu Tabelle 2: „Growth inhibition assay“ und Tabelle 3: „Bacterial numbers in 10-day biofilms“ sowie Figur 2: „SM biofilmformation inhibition“ und Erhebung sämtlicher Daten
- Insgesamte Analyse und Interpretation sämtlicher Daten

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der
betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

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

11 Publikationsliste

Veröffentlichung im Peer-Review-Verfahren:

Schwendicke F, **Korte F**, Dörfer CE, Kneist, Fawzy El-Sayed K, Paris S: Inhibition of Streptococcus mutans Growth and Biofilm Formation by Probiotics in vitro, Caries Res. 2017;51(2):87-95

12 Danksagung

Ich widme diese Dissertation meinen Eltern, die immer alles möglich gemacht haben und mir stets zur Seite stehen.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. S. Paris für die Überlassung des Themas und die ausgezeichnete Betreuung.

Besonders danke ich Herrn Dr. F. Schwendicke für die Hilfe und die steten Ratschläge sowie die Betreuung. Er hatte immer ein offenes Ohr für meine Anliegen.

Mein Dank geht auch an Frau C. Schweynoch und Herrn R. Toll, die mir im Labor unterstützend zur Seite standen sowie Frau R. Marquardt für die praktische Unterstützung bei dem Biofilmmodell.

Meinem Mann, Moritz Alt, und meiner Familie danke ich ganz besonders für jegliche Unterstützung und Geduld während der gesamten Zeit.

Danke an Herrn Prof. Dr. P.-A. Alt für Inspirationen und Anregungen.

Zuletzt gebührt mein Dank all denen, die direkt und indirekt an der Entstehung und dem Gelingen dieser Arbeit beteiligt sind.

„Kurz ist das Leben, lange die Kunst, die Gelegenheit plötzlich, die Erfahrung trüglich, die Beurteilung schwer.“ Hippokrates