Aus dem
Institut für Parodontologie und Synoptische Zahnmedizin
der Medizinischen Fakultät der Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Charakterisierung der Wirkung antimikrobieller Substanzen auf Multispeziesbiofilme mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité -
Universitätsmedizin Berlin

von
Zahnärztin Kristin Steiner
geb. Heinrich
aus Halle / Saale

Gutachter: 1. Prof. Dr. Dr. J.-P. Bernimoulin

2. Prof. Dr. med. dent. T. Kocher

3. Prof. Dr. med. dent. J. Deschner

Datum der Disputation: 07. 03. 2012

Datum der Promotion: 03. 06. 2012

Für meine Mutter

und meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis IV
Abkürzungsverzeichnis VII
Abbildungsverzeichnis VIII
Tabellenverzeichnis IX
1 Einleitung 1
2 Wissenschaftlicher Hintergrund 3
2.1 Ätiologie und Pathogenese der Parodontalerkrankungen 3
2.1.1 Gingivitis 3
2.1.2 Parodontitis 4
2.1.3 Mikrobiologie der Parodontitis 5
2.2 Dentale Plaque als Biofilm 8
2.2.1 Definition des Biofilms 8
2.2.2 Morphologie des Biofilms 9
2.2.3 Extrazelluläre polymere Substanzen 10
2.2.4 Charakteristika der dentalen Plaque 11
2.3 Entstehung und Entwicklung des dentalen Biofilms 12
2.4 Eigenschaften von Mikroorganismen in Biofilmen 15
2.4.1 Erhöhte Resistenz gegenüber antimikrobiellen Substanzen 16
2.5 Therapie der Parodontalerkrankungen 17
2.5.1 Wirkungsweise oraler Antiseptika 17
2.6 Antibakterielle Mundspüllösungen 18
2.6.1 Bisbiguanide Antiseptika 19
2.6.2 Phenolderivate 21
2.6.3 Metallsalze 23
2.6.4 Fluoride 23
2.6.5 Quarternäre-Ammonium-Verbindungen 26
3 Ziele der Untersuchung 28
4 Material und Methode 29
4.1 Gewinnung komplexer Multispeziesbiofilme 29
4.1.1 Bakterienstämme 29
4.1.2 Herstellung der Monospezieskulturen 30
4.1.3 Nährmedien 30
4.1.4 Biofilmträger 31
4.2 Kultivierung von In-Vitro-Multispeziesbiofilmen 31
4.3 Entnahme und Weiterkultivierung von In-vivo-Multispeziesbiofilmen 32
4.4 Wirkung einer Mundspüllösung auf In-vivo-Multispeziesbiofilme 33

4.5 Vergleich der Wirkung verschiedener Mundspüllösungen auf In-vivo-Multispeziesbiofilme 34
4.6 Darstellung von Biofilmen mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie 34
4.6.1 Standardisiertes Protokoll für die Bilddokumentation im REM 36
4.6.2 Standardisierte Auswertung der REM-Bilder 37
4.7 Prüfsubstanzen 38
4.7.1 Chlorhexamed Forte® 0,2 % 39
4.7.2 Listerine® 39
4.7.3 Hexoral® 40
4.7.4 Meridol® 40

5 Ergebnisse 41

5.1 Kultivierung von In-vitro-Multispeziesbiofilmen 41
5.1.1 Testkultivierung 41
5.1.2 Nährmedien 41
5.1.3 Biofilmzusammensetzung 41
5.2 Kultivierung von In-vivo-Multispeziesbiofilmen 42
5.3 Wirkung einer Mundspüllösung (Listerine®) auf In-vivo-Multispeziesbiofilme 43
5.4 Vergleichende Wirkung verschiedener Mundspüllösungen auf In-vivo-Multispeziesbiofilme 44
5.5 Darstellung von Biofilmwachstum mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie 44
5.5.1 In-vivo-Multispeziesbiofilm, behandelt mit Kontrolllösung (PBS) 46
5.5.2 In-vivo-Multispeziesbiofilm, behandelt mit Chlorhexamed Forte® 0,2 % 47
5.5.3 In-vivo-Multispeziesbiofilm, behandelt mit Listerine® 48
5.5.4 In-vivo-Multispeziesbiofilm, behandelt mit Meridol® 49
5.5.5 In-vivo-Multispeziesbiofilm, behandelt mit Hexoral® 50
5.6 Bakterielle Morphotypen 51
5.7 Deformierte Bakterien 56
5.8 Absolute Bakterienmenge und Änderung der bakteriellen Zusammensetzung der In-vivo-Multispeziesbiofilme mit und ohne Behandlung mit Mundspüllösungen 57

6 Diskussion 71

6.1 Studiendesign 71
6.1.1 Biofilmmodelle 71
6.1.2 Biofilmgewinnung 75
6.1.3 Anzahl der Probanden 77
6.1.4 Nährmedium 78
6.1.5 Trägermaterial und Wachstumsbedingungen 79
6.2 Zusammensetzung der In-Vitro-Multispeziesbiofilme 80
6.3 Zusammensetzung der In-vivo-Multispeziesbiofilme 82

6.4 REM-Untersuchung von Biofilmen 83
6.5 Wirkungsweise der antimikrobiellen Substanzen 84
6.5.1 Einwirkzeit 84
6.5.2 Anwendungsform 85
6.5.3 Wirkung 85
6.5.4 Klinische Anwendung antimikrobieller Susbstanzen 87
7 Zusammenfassung 89
8 Summary 92
Literaturverzeichnis 94
Danksagung 110
Lebenslauf 111
Erklärung 111

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
Abb.	Abbildung
A. bidest.	Aqua bidestillata
AmF/SnF_2	Amin-/Zinnfluorid
ATCC	American Type Culture Collection
℃	Grad Celcius
CHX	Chlorhexidin
CLSM	Confokales Laser Scanning Mikroskop
CPC	Cetylpyridinium-Chlorid
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EPS	Extrazelluläre Polymere Substanzen
g	Gramm
HEX	Hexoral®
l	Liter
LIS	Listerine®
m	milli, 10^{-3}
n	nano, 10^{-9}
µ	mikro, 10^{-6}
mg	Milligramm
MER	Meridol®
MO	Mikroorganismen
PBS	Phosphat Buffered Saline = phosphatgepufferte Kochsalzlösung, pH 7,2
ppm	parts per million
PYG-Medium	Peptone Yeast Extract Glucose Medium
REM	Rasterelektronenmikroskop
S.	*Streptococcus*
spp.	Pluralform, lat. für *species pluralis*
SH	Schwefelwasserstoff

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung parodontaler Strukturen, intaktes (links) und erkranktes Parodont (rechts) in der Übersicht. (Nach P. Murawel [Murawel, 2005]) 3
Abb. 2: Gingiva in der Übersicht 4
Abb. 3: Subgingivale mikrobielle Komplexe 8
Abb. 4: Biofilm (nach Rickard et al. 2003 [Rickard et al., 2003]) 12
Abb. 5: Schema des Versuchsablaufs 34
Abb. 6: Vier Standardfelder auf einem Deckgläschen 36
Abb. 7: In-vitro-Multispeziesbiofilm 42
Abb. 8: Biofilm vor und nach der Wirkung der Mundspüllösung Listerine® 43
Abb. 9: Biofilm, behandelt mit Kontrolllösung (PBS) 46
Abb. 10: Biofilm, behandelt mit Chlorhexamed Forte® 0,2 % (CHX) 47
Abb. 11: Biofilm, behandelt mit Listerine® 48
Abb. 12: Biofilm, behandelt mit Meridol® 49
Abb. 13: Biofilm, behandelt mit Hexoral® 50
Abb. 14: Morphotypen 1 - 4 52
Abb. 15: Morphotypen 5 - 8 53
Abb. 16: Morphotypen 9 - 12 54
Abb. 17: Morphotypen 13 – 15 55
Abb. 18: Deformierte Kokken 56
Abb. 19: Deformierte Kurzstäbchen 56
Abb. 20: Deformierte Langstäbchen 57
Abb. 21: Relative Reduktion in % im direkten Probandenvergleich 59
Abb. 22: Gesamtbakterienmenge Plaquebiofilm Proband 1 61
Abb. 23: Gesamtbakterienmenge Plaquebiofilm Proband 2 62
Abb. 24: Gesamtbakterienmenge Plaquebiofilm Proband 3 63
Abb. 25: Gesamtbakterienmenge Plaquebiofilm Proband 4 64
Abb. 26: Gesamtbakterienmenge Plaquebiofilm Proband 5 65
Abb. 27: Gesamtbakterienmenge Plaquebiofilm Proband 6 66
Abb. 28: Gesamtbakterienmenge Plaquebiofilm Proband 7 68
Abb. 29: Kontrolle des dentalen Biofilms durch antimikrobielle Substanzen 77

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Zusammensetzung der verwendeten Medien 31
Tab. 2: Zusammensetzung von Chlorhexamed Forte® 0,2 % 39
Tab. 3: Zusammensetzung von Listerine® 39
Tab. 4: Zusammensetzung von Hexoral® 40
Tab. 5: Zusammensetzung von Meridol® 40
Tab. 6: Morphotypen und ihre Symbole 51

1 Einleitung

Die durch mikrobielle Besiedlung von Zahnoberflächen entstehende dentale Plaque stellt einen medizinisch wichtigen Biofilm dar. Sie gilt als ätiologischer Faktor für Karies, Gingivitis und Parodontitis, die häufigsten Infektionskrankheiten des Menschen in der westlichen Welt [Ramfjord et al., 1968].

Die Parodontitis ist eine entzündliche Erkrankung des Zahnhalteapparats, die in allen Altersstufen und in verschiedenen Formen auftreten kann, zu irreversiblem Verankerungsverlust (Knochenabbau) führt und ohne therapeutische Maßnahmen Zahnverlust zur Folge haben kann. Es besteht daher ein großer Bedarf, Informationen über das Wachstum des natürlichen Biofilms und seine Struktur zu erhalten, um das Entstehen und Fortschreiten von Parodontopathien zu verhindern.

Biofilme sind komplexe dreidimensionale Strukturen, in denen Mikroorganismen wie z. B. Bakterien in eine schleimartige extrazelluläre Matrix eingebettet sind. Sie entstehen jedoch nicht nur in der Mundhöhle, sondern sind ubiquitär. Biofilme spielen in der Medizin, in natürlichen Wassersystemen und in der Industrie eine bedeutende Rolle, da sie sämtliche Oberflächen bewachsen, wodurch vielfältige Schäden entstehen können [Costerton et al., 1999; Peyton & Characklis, 1995; Sissons, 1997]. Ihre Bedeutung bei der Entstehung humaner Erkrankungen wie Parodontitis, Otitis media, Endocarditis, Prostatitis, Harnleiterinfektionen, Gallenwegsinfektionen und vielen anderen Infektionen sowie ihr Vorkommen an medizinischen Geräten oder Apparaten (z. B. orthopädischen Klappen, Kathetern) ist mittlerweile wissentschaftlich anerkannt [Costerton et al., 1999; Romero et al., 2008; Schaudinn et al., 2009].

Die Wissenschaft ist deshalb schon seit Jahrzehnten mit der Forschung nach effizienten Mitteln zur Entfernung und Prävention von Biofilmen beschäftigt. Es besteht ein gesteigertes Interesse daran, die mechanische Reinigung durch Kombination mit chemischen Wirkstoffen zu verbessern [Fine, 1995; Pratten et al., 1998b; Thrower et al., 1997; Wilson, 1996; Wilson et al., 1996; Wilson et al., 1998].

Ein Schwerpunkt der dentalen Forschung sind antimikrobielle Substanzen [Herles et al., 1994]. Diese können in Zahnpasten inkorporiert oder in Form von Mundspüllösungen zugeführt werden, wobei letztere als besonders geeignete Transportmittel angesehen

werden [Marsh, 1992]. Antiseptische Mundspüllösungen werden in vielen klinischen Situationen sowohl zur Prävention als auch zur Behandlung plaqueassoziierter oraler Erkrankungen eingesetzt [Patters et al., 1983; Patters et al., 1986; Pitten & Kramer, 1999; Riep et al., 1999; Schierholz et al., 1999]. Dabei ist es in Hinsicht auf die mikrobielle Vielfalt der Gingivitis und Parodontitis wünschenswert, dass möglichst viele verschiedene Spezies der parodontalpathogenen Flora erreicht und reduziert werden.

Als problematisch erweist sich dabei, dass Bakterien, die in einer Biofilmformation wachsen, eine merklich höhere Wirkstoffresistenz aufweisen als planktonische Zellen [Romero et al., 2008; Stewart, 2002; Stewart & Costerton, 2001]. Auch die Dicke des Biofilms und die Verteilung von lebenden und toten Bakterien (Vitalität) in den verschiedenen Biofilmschichten haben einen entscheidenden Einfluss auf die Wirksamkeit der angewandten Antiseptika [Brecx et al., 1990; Netuschil et al., 1989; Netuschil et al., 1995].

Für In-vitro-Untersuchungen mussten daher Modelle entwickelt werden, mit denen Biofilme angezüchtet und antimikrobielle Substanzen getestet werden können. In der Literatur werden unterschiedliche Modelle beschrieben [Kinniment et al., 1996b; Pitten et al., 2003; Shapiro et al., 2002; Wecke et al., 2000; Wimpenny, 1997]. Oft sind diese jedoch kompliziert und lassen reproduzierbare Ergebnisse vermissen [Keevil et al., 1987]. Die fehlende Reproduzierbarkeit und die Vielzahl der unterschiedlichen Kultursysteme machen Vergleiche zwischen Studien schwierig [McLean et al., 1999; Shapiro et al., 2002]. Außerdem wurden auch Mikroorganismen untersucht, die in der Zahnmedizin nicht relevant sind. Das Verständnis von Biofilmen ist erst im Laufe der letzten Jahrzehnte durch die Weiterentwicklung und Anwendung verbesserter mikroskopischer Techniken gewachsen [Gorur et al., 2009; Marsh, 2005]. So wird zum Beispiel die Darstellung der Organisation von Biofilmen durch die hochauflösende Rasterelektronenmikroskopie (REM) oder die confokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) ermöglicht [Gorur et al., 2009; Schaudinn et al., 2009; Wecke et al., 2000]. Dabei standen dentale Biofilme (Plaque) immer im Fokus der Aufmerksamkeit [Keevil et al., 1987; Wecke et al., 2000; Wood et al., 2000].

In der vorliegenden Studie wurden Biofilme aus tiefen parodontalen Taschen (mindestens 6 mm Sondierungstiefe) *in vitro* kultiviert und anschließend mit verschiedenen Mundspüllösungen behandelt. Das Ergebnis wurde mittels hochauflösender Rasterelektronenmikroskopie visualisiert.

2 Wissenschaftlicher Hintergrund

2.1 Ätiologie und Pathogenese der Parodontalerkrankungen

Die häufigsten Erkrankungen des Zahnhalteapparates sind plaquebedingte entzündliche Veränderungen am Weich- und Hartgewebe des Parodonts. Das Parodont umfasst die Gewebegruppen Gingiva, Alveolarknochen, Desmodont und Wurzelzement (siehe Abb. 1), wobei die drei Letztgenannten funktionell eine Einheit bilden.

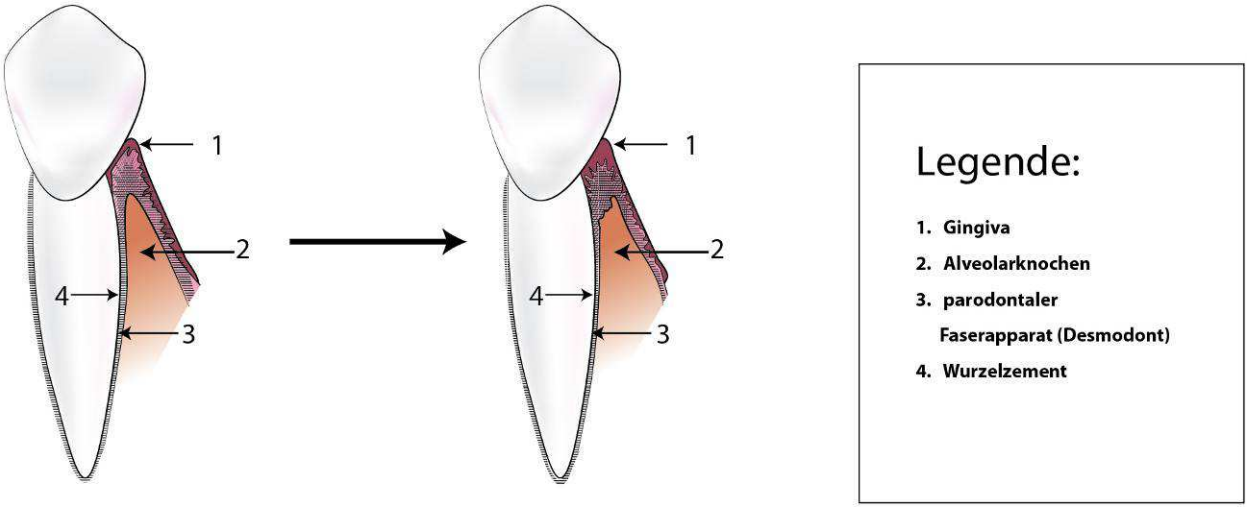


Abb. 1: Schematische Darstellung parodontaler Strukturen, intaktes (links) und erkranktes Parodont (rechts) in der Übersicht. (Nach P. Murawel [Murawel, 2005])

Gingivitis und Parodontitis entwickeln sich aus einem Wechselspiel zwischen bakteriellem Zahnbelag (Plaque) und den Abwehrreaktionen des Wirts. Die Häufigkeit und die Dauer des bakteriellen Angriffs sowie lokale Fehlbelastungen des Zahnhalteapparates spielen als ätiologische Faktoren jedoch ebenso eine Rolle.

2.1.1 Gingivitis

Die Gingiva ist Teil der Mundschleimhaut und bildet den marginalen Teil des Parodonts. Sie umschließt die Zähne am Zahnhals und sichert so die Kontinuität der Oberflächenauskleidung der Mundhöhle.

Eine akute oder chronische Entzündung im Bereich der freien marginalen und interdentalen, selten auch der befestigten Gingiva (siehe Abb. 2) wird als Gingivitis bezeichnet.

Die häufigste Form ist die unspezifische plaquebedingte Gingivitis, verursacht durch Stoffwechselprodukte der sich entwickelnden und langfristig bestehenden supra- und später subgingivalen bakteriellen Plaque. Löe et al. konnten 1965 experimentell das Enstehen einer Gingivitis durch Plaquebakterien zeigen [Löe et al., 1965]. Bei Zahnmedizinstudenten mit optimaler Mundhygiene und gesunden Gingivaverhältnissen wurde durch dreiwöchige Abstinenz jeglicher Mundhygiene eine Plaqueakkumulation am Gingivarand ermöglicht. Innerhalb von 2 - 3 Wochen konnte so bei allen Versuchspersonen eine Gingivitis ausgelöst werden, die nach einigen Tagen optimaler Zahnpflege wieder vollständig verschwand. Diese Erkenntnisse führten zur unspezifischen Plaquehypothese, welche besagt, dass die Vermehrung der Plaquebakterien in ihrer Gesamtheit die Erkrankung verursacht. Klinisch wird die Gingivitis anhand sichtbarer Symptome der Entzündung wie Rötung und Schwellung und messbarer Symptome wie Exsudation und Blutung diagnostiziert. Die Blutungsneigung ist ein guter Indikator für die Schwere der Entzündung. Histologisch findet sich im Umkreis des Sulkusbodens (Taschenboden) ein Infiltrat aus Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten. Die gingivale Entzündung kann über Jahre hinweg bestehen, ohne sich zu einer Parodontitis zu entwickeln. In der Regel geht die Gingivitis aber einer späteren Parodontitis voraus [Listgarten et al., 1985; Page, 1986; Sheiham, 1997].

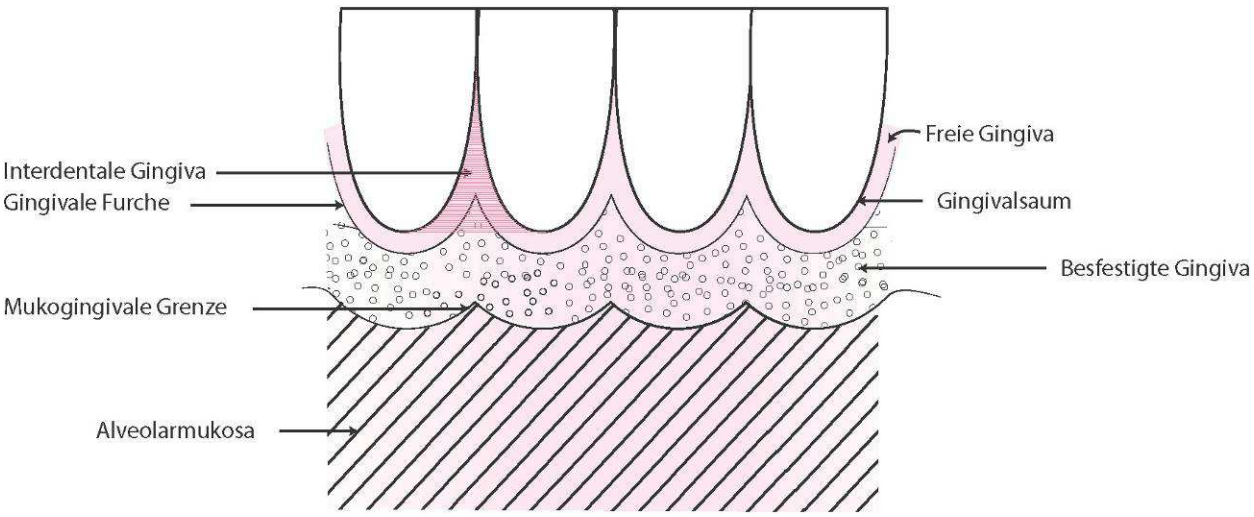


Abb. 2: Gingiva in der Übersicht
(eigene Darstellung)

2.1.2 Parodontitis

Parodontitis ist ein klassisches Beispiel für biofilmvermittelte Erkrankungen [Schaudinn et al., 2009]. Der Begriff Parodontitis steht für die Ausdehnung des marginalen Entzün-

dungsprozesses auf die zahntragenden Strukturen. Dies führt zur Destruktion der parodontalen Hart- und Weichgewebe (siehe Abb. 1) und kann unbehandelt den Zahnverlust zur Folge haben [Haffajee & Socransky, 1994]. Während die Gingivitis als ein körpereigener Schutzmechanismus gegen die aus der Plaque in das Gewebe diffundierenden Bakterienprodukte anzusehen ist [Van Palenstein Helderman, 1981], wird jede Form der Parodontitis als Folge eines lokalen Infektes durch spezielle parodontalpathogene Keime betrachtet [Rateitschak, 1994]. Fakultativ pathogene Keime aus der normalen Mundflora, vor allem obligate und fakultative Anaerobier, vermehren sich und verdrängen weniger pathogene Keime. Dabei spielt ein für sie günstiges Milieu wie die anaeroben Bedingungen im Bereich des Sulkusbodens ebenso eine Rolle wie Änderungen der Abwehrlage des Wirts. Für die gram-negativen Arten *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (früher *Actinobacillus actinomycetemcomitans*), *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis* und *Tannerella forsythia* (früher *Bacteroides forsythius*) konnte gezeigt werden, dass sie maßgeblich an der Initiation und Fortleitung parodontaler Entzündungsprozesse beteiligt sind. Diese Bakterienarten sind mit Pathogenitätsfaktoren wie Phagozytoseresistenz, immunglobulin- und komplementabbauenden Proteasen oder Toxinen ausgestattet [Baehni, 1995; Genco, 1996; Greenstein & Lamster, 1997; Mombelli, 1994]. Im Verlauf komplexer Wechselwirkungen zwischen Bakterien, zellulärer und humoraler Immunabwehr und anderen körpereigenen Zellen kommt es zum fortschreitenden Verlust des kollagenen Faserapparates. Osteoklasten werden stimuliert, Knochengewebe abzubauen. Der Sulkusboden wird immer weiter apikal verschoben und die Verankerungsfunktion des Parodonts geht mehr und mehr verloren [Machtei et al., 1997; Page & Beck, 1997; Seymour et al., 1993].

Die genannte Entzündungsreaktion variiert in ihrer Ausprägung inter- und intraindividuell [Lindhe et al., 1973; Löe et al., 1965; Page & Baab, 1985]. Neben der bakteriellen Ursache ist auch eine genetische Disposition möglich, die die Entwicklung einer Parodontitis begünstigt [Kinane & Hart, 2003; Kornman et al., 1997].

2.1.3 Mikrobiologie der Parodontitis

Bakterien werden allgemein nach ihrer Morphologie eingeteilt. Dabei werden kugelige Bakterien als Kokken, längliche, zylindrische Bakterien als Stäbchen und spiral- oder schraubenförmige Bakterien als Spirillen oder Spirochäten bezeichnet. Diese Grund-

formen können einzeln auftreten oder sich zu typischen Formen zusammenfinden (paarige Kokken = Diplokokken, Kokken in Trauben = Staphylokokken, Kokken in Ketten = Streptokokken). Stäbchenbakterien und Spirillen können eine oder mehrere Geißeln (sogenannte Flagellen) ausbilden, mit deren Hilfe sie sich fortbewegen können. Die Anzahl und Anordnung der Geißeln sind Unterscheidungsmerkmale. Einige Bakterien bilden Schleimhüllen bzw. Kapseln aus, andere Sporen.

Wichtig für die Klassifikation der Bakterien ist außerdem die Lebensweise. Besondere Bedeutung hat dabei die Art der Atmung (aerob oder anaerob) sowie die Möglichkeit, die Bakterien auf bestimmte Weise zu färben. Die Gramfärbung ist eine Methode zur differenzierenden Färbung von Bakterien, die Rückschlüsse auf die Zusammensetzung und Struktur der Zellwand ermöglicht, so dass eine taxonomische Einteilung in gram-positive und gram-negative Bakterien möglich wird. Die Zusammensetzung der parodontalen Mikroflora variiert sowohl im gesunden als auch im erkrankten Parodont [Paster et al., 2001]. Die Flora des gesunden Parodonts zeigt mehrheitlich gram-positive, fakultativ anaerobe Kokken und unbewegliche Stäbchen. Bei der Gingivitis und vor allem der Parodontitis verschiebt sich das Spektrum zu gram-negativen, obligat anaeroben, beweglichen Stäbchen und Spirochäten.

Obwohl die kultivierbare subgingivale Flora bei Patienten mit entzündungsbedingten fortgeschrittenen Parodontalerkrankungen eine große Heterogenität der beteiligten Mikroorganismen aufweist, sind nur vier bis fünf parodontalpathogene Keime in den erkrankten Läsionen regelmäßig kulturell nachweisbar [Haffajee & Socransky, 1994].

Basierend auf der traditionellen Identifizierung von Bakterien, die mit Hilfe von Nährmedien kultiviert wurden, und der Anwendung neuerer molekularbiologischer Methoden konnten mehr als 700 Bakterienarten in der menschlichen Mundhöhle identifiziert werden [Paster et al., 2006; Socransky & Haffajee, 2005]. Von den etwa 400 im gingivalen Sulkus bzw. im parodontalen Defekt isolierten Spezies und Subspezies werden zirka 10 − 12 mit aktivem Stützgewebeabbau in Zusammenhang gebracht [Slots, 1986]. Weitere 300 Arten stammen von anderen Stellen der Mundhöhle wie Zunge, Mundschleimhäuten, kariösen Läsionen und endodontischen Infektionen. Man geht davon aus, das bei jedem Individuum etwa 100 − 200 dieser 700 Bakterienspezies existieren, wodurch wesentliche Unterschiede zwischen verschiedenen Individuen entstehen [Paster et al., 2006]. Einige Spezies, wie bestimmte *Streptococcus spp.* und *Veillonella spp.* sind oft und an vielen Stellen der Mundhöhle vorhanden, die Mehrzahl der Bakterienarten sind

jedoch für einen speziellen Lebensraum wie den parodontalen Defekt, den Zungenrücken oder den harten Gaumen selektiv [Paster et al., 2006].

Anfangs konzentrierten sich die Untersuchungen auf die mit oralen Erkrankungen wie Gingivitis, aggressiver und chronischer Parodontitis assoziierten Mikroorganismen. Dabei konnten sogenannte Schlüsselpathogene wie z. B. *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* und *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* identifiziert werden. Das parodontalpathogene Potential dieser Schlüsselkeime ist in zahlreichen In-vitro- und In-vivo-Studien belegt [Beikler et al., 2006; Haffajee et al., 1998; Moore & Moore, 1994; Slots, 1986; Slots & Ting, 1999; Takeuchi et al., 2001; Van Winkelhoff et al., 2002].

Socransky et al. postulierten 1998, dass Mundkrankheiten besser verstanden werden können, wenn man sich nicht auf die einzelnen Pathogene, sondern auf Zusammenschlüsse von Organismen konzentrierte [Socransky et al., 1998]. Die Forschergruppe identifizierte und definierte fünf Komplexe von Bakterien, die bei parodontalen Infektionen wiederholt zusammen gefunden wurden (siehe Abb. 3). Die am stärksten pathogenen Spezies *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* und *Treponema denticola* wurden dabei dem roten Komplex zugeordnet, der vom sogenannten orangenen Komplex abhängig ist. Dieser wiederum umfasst die etwas weniger pathogenen, die parodontale Läsion früh kolonisierenden Organismen [Socransky et al., 1998]. Andere Komplexe (grün, gelb, lila) sind mit parodontaler Gesundheit, Gingivitis oder Inaktivität bei bestehender Parodontitis verbunden.

Die unterschiedlichen Serotypen des gram-negativen, fakultativen Anaerobiers *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* können aufgrund ihrer unterschiedlichen Virulenz keinem Cluster zugeteilt werden. Während der Serotyp a mehrheitlich aus Stellen mit Gingivitis isoliert wird [Darveau et al., 1997], sind andere Serotypen mit unterschiedlichen Parodontitisformen assoziiert, wobei leukotoxische Serotypen Leitkeime der lokalisierten aggressiven Parodontitis zu sein scheinen [Haraszthy et al., 2000].

Die weiteren Bakterien außerhalb der Komplexe (siehe Abb. 3 blaues Feld) wie *Actinomyces naeslundii genospezies II* (entspricht *Actinomyces viscosus)*, *Selenomonas noxia* und *A. actinomycetemcomitans serotyp b* haben respektive zu den Komplexen keine nähere Beziehung untereinander [Socransky et al., 1998].

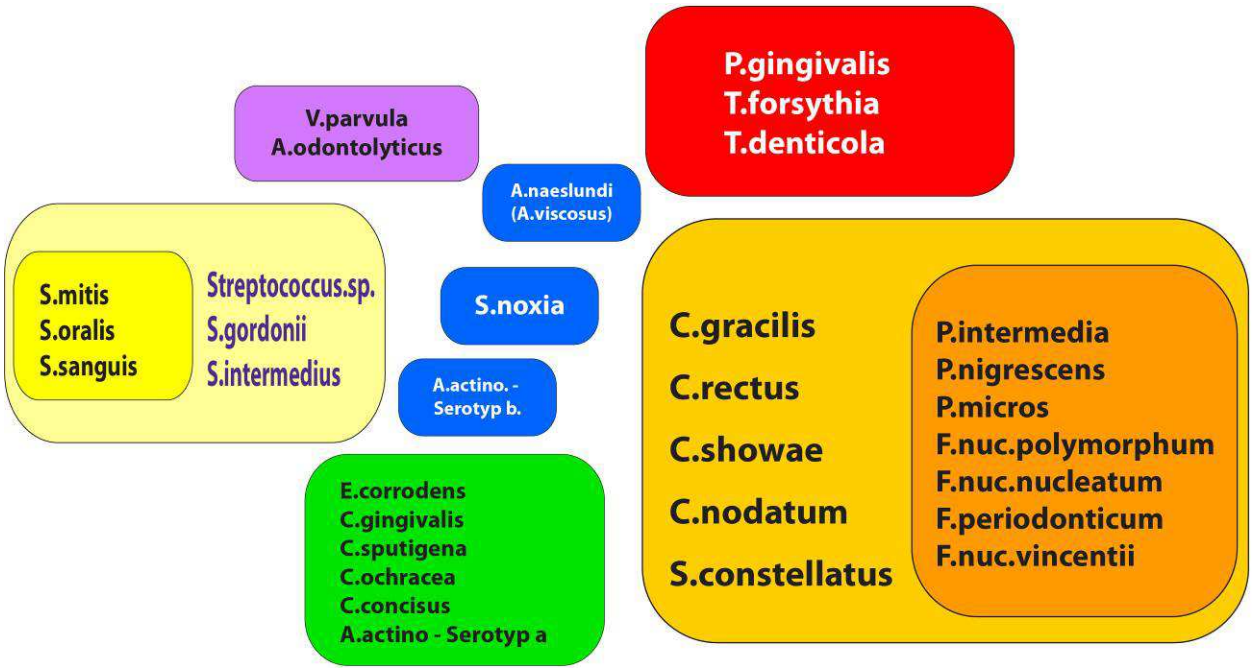


Abb. 3: Subgingivale mikrobielle Komplexe
(Abbildung modifiziert nach Socransky et al. 1998 [Socransky et al., 1998])

2.2 Dentale Plaque als Biofilm

Die kausale Bedeutung der Mikroorganismen in der Ätiologie von Karies und Parodontopathien ist in der zahnmedizinischen Wissenschaft bereits seit Jahrzehnten bekannt [Lindhe et al., 1973; Löe et al., 1965; Pratten et al., 1998b; Sbordone & Bortolaia, 2003; Wilson, 1996].

Erkenntnisse über die zugrundeliegenden Mechanismen der Plaquebildung sind die Voraussetzung, um die Entstehung und Progredienz dieser Erkrankungen besser verstehen und somit effektive Strategien für ihre Prävention und Therapie entwickeln zu können.

2.2.1 Definition des Biofilms

Biofilme werden als eng verbundene ökologische Gemeinschaften betrachtet, die entstehen, um einer Anhäufung von Mikroorganismen das Überleben als Ganzer zu sichern. Eine solche komplexe Gemeinschaft kann z. B. aus Akkumulationen von pro- und eukaryontischen Einzellebewesen, extrazellulären polymeren Substanzen (EPS), multivalenten Kationen, biogenischen und anorganischen Partikeln, sowie kolloidalen und gelösten Komponenten bestehen [Costerton & Lewandowski, 1997]. Der Anteil an

EPS in Biofilmen beträgt im Allgemeinen zwischen 50 und 90 % [Brown et al., 1988; Keevil et al., 1987; Marsh, 1999; Schierholz et al., 1999].

Biofilme entstehen, wenn Mikroorganismen sich an Grenzflächen zwischen zwei verschiedenen Phasen (fest, flüssig, gasförmig) ansiedeln. Sie sind in der Natur ubiquitär und bilden sich überwiegend in wässrigen Systemen, entweder auf der Wasseroberfläche oder auf der Grenzfläche zu einer festen Phase [Donlan & Costerton, 2002; Overman, 2000]. Die Grenzfläche, auf der sich der Biofilm bildet, wird als Substratum bezeichnet (siehe Abb. 4). Die Mikroorganismen sind in eine durch die Bakterien selbst produzierte extrazelluläre Matrix polymerer Moleküle eingebettet, die eine dauerhafte und feste Haftung auf der Unterlage vermittelt [Costerton & Lewandowski, 1997; Costerton et al., 1995]. Die als Biofilm organisierten Bakterien zeigen in Bezug auf Zellwachstum und Genexpression andere Phänotypen als planktonische Bakterien [Donlan & Costerton, 2002; O'Toole et al., 2000; Sauer et al., 2002]. In diesen Gemeinschaften zu leben bietet den Mikroorganismen entscheidende ökologische Vorteile gegenüber dem planktonischen Zustand [Costerton et al., 1987].

Biofilme sind für 65 % aller vorkommenden Infektionserkrankungen in der industrialisierten Welt verantwortlich [Costerton et al., 1999; Hoyle & Costerton, 1991]. Aus hygienischer Sicht sind sie als Infektionsquellen von Bedeutung, da sie einen geschützten Lebensraum für Krankheitserreger darstellen. Die Keime können sich dort ansiedeln, vermehren und persistieren [Costerton, 1997].

2.2.2 Morphologie des Biofilms

Die Grundeinheiten des Biofilms sind Mikrokolonien, die aus verschiedenen Bakterienarten bestehen können und makromorphologisch oft pilz- oder säulenförmig aussehen [Costerton, 1995; Costerton, 1999; Costerton et al., 1994]. Die Kolonieform ist abhängig von den Bakterienspezies (Zellmorphologie, Motilität, Produktion extrazellulären Materials) und dem sie umgebenden Milieu (im wesentlichen Diffusionsgradienten) [Wimpenny, 1982]. Mikromorphologisch ist der Biofilm also keine homogene Masse, sondern besteht aus in eine Matrix eingebetteten Untereinheiten mit charakteristischem Aussehen wie Maiskolben-, Rosetten- und Stoppelbürstenstruktur [Kolenbrander, 2000; Marsh & Bradshaw, 1995]. Dazwischen liegen Kanäle, die ein System bilden und in denen ein konvektiver Flüssigkeitsstrom fließt [Costerton et al., 1994; Wood et al., 2000]. Diese Kanäle ermöglichen den Austausch und Transport von Nährstoffen und Stoff-

wechselprodukten in tiefere Schichten des Biofilms, sowie die Homöostase innerhalb des Biofilms [Costerton et al., 1995; Overman, 2000]. Umgekehrt verlassen Abfallprodukte der Zellen auf diesem Weg den Biofilm. Dabei herrscht zwischen den Kanälen und der Umgebung ein Konzentrationsgefälle.

Die aufgelockerte Struktur vieler Biofilme begünstigt auch den Austausch biochemischer Informationen (quorum sensing) zwischen den vielfältigen Bakterienarten im Biofilm. Außerdem ergänzen sich einige Mikroorganismen in ihren Nährstoffanforderungen. Ein Beispiel dafür sind anaerobe Bakterien, die in sauerstoffhaltiger Umgebung vorkommen. Durch die physischen Interaktionen (Ko-Aggregation) mit aeroben und solchen Spezies, die fakultativ Sauerstoff konsumieren und ein mikroanaerobes Ambiente erzeugen, wird das Überleben der anaeroben Bakterien ermöglicht. Die Stoffwechselprodukte einiger Mikroorganismen sind somit Voraussetzung für die Entwicklung anderer Bakterien und sichern deren Existenz [Kolenbrander, 2000], was auch als metabolische Kooperativität bezeichnet wird [Costerton et al., 1995; Page et al., 1997].

Man geht davon aus, dass die Biofilmbildung eine universelle Bakterienstrategie darstellt, die als Schutzmechanismus zu bewerten ist [Bowden & Hamilton, 1998; Brown & Gilbert, 1993; Costerton et al., 1987; Marsh & Bradshaw, 1995]. Gottenbos et al. definieren den Schutzmechanismus präziser als ein System, das den Stressfaktor der Nährstoffzufuhr reguliert [Gottenbos et al., 1999]. Außerdem sichert diese Art des Wachstums den Bakterien ein Überleben, wenn sie toxischen Substanzen wie z. B. Antiseptika ausgesetzt sind [Schierholz et al., 1999]. Genau in diesem Punkt liegt das medizinische Problem begründet: sind Biofilme erst einmal entstanden, so sind sie nur sehr schwer wieder zu entfernen [Liljemark et al., 1997].

2.2.3 Extrazelluläre polymere Substanzen

Die Produktion von EPS ist eine generelle Eigenschaft pro- und eukaryonter Mikroorganismen. Diese mikrobiellen Populationen sind ubiquitär (z. B. im Boden, in wässriger Umgebung, auf Pflanzengewebe, bei Tier und Mensch, sowie auf technischen Systemen wie Filter etc.) [Costerton et al., 1987; Costerton et al., 1995].

EPS bestehen aus Biopolymeren (Polysaccharide, Proteine, Lipide, Nukleinsäuren), die in der Lage sind, in Verbindung mit Wasser Hydrogele zu bilden. Während der Biofilm wächst, werden von den Bakterien kontinuierlich Exopolymere synthetisiert, wodurch

eine dreidimensionale, gelartige, hochgradig hydrierte und oft geladene extrazelluläre Matrix entsteht. Die Matrix ist nicht nur wichtig als ein physischer Teil des Gerüsts, das die Struktur von Biofilmen bestimmt, sie ist auch biologisch aktiv und kann Nährstoffe, Wasser, essentielle Enzyme und andere Substanzen anreichern, die von einzelnen Bakterien in die Matrix sezerniert wurden [Allison, 2003; Branda et al., 2005; Marsh, 2004]. Oft werden von der Matrix auch anorganische Partikel oder Gasbläschen eingeschlossen. Die Gasphase kann je nach Art der Mikroorganismen mit Stickstoff, Kohlenstoffdioxid, Methan oder Schwefelwasserstoff angereichert sein.

Es wird vermutet, dass die Mikroorganismen in dieser gelartigen Matrix eingebettet und mehr oder minder immobilisiert sind. Auf diese Weise wird eine Mikroumgebung für sesshafte Zellen geschaffen, die durch die Eigenschaften der EPS bestimmt wird. Die Matrix ist hauptsächlich für die strukturelle und funktionelle Integrität des Biofilms verantwortlich und wird als Schlüsselkomponente der physiochemischen und biologischen Eigenschaften angesehen. Sie fungiert unter anderem als Puffer gegen die Umwelt, z. B. als Temperaturpuffer, UV-Schutz, Austrocknungsschutz, Antibiotikaschutz, Schutz gegen Biozide etc., und hält den Biofilm zeitlich konstant zusammen, wodurch Nährstoffkreisläufe und Gentransfer ermöglicht werden.

2.2.4 Charakteristika der dentalen Plaque

Die Zahnplaque stellt sich als strukturierter, zäher, gelblich-grauer und zum Teil klebriger Zahnbelag dar, in dem Bakterien in einer organischen Matrix aus Speichelglykoproteinen und extrazellulären Bakterienprodukten eingebettet sind. Zahnplaque wird heutzutage als dentaler Biofilm bezeichnet [Marsh, 2004; Marsh, 2005; Rudney, 2000], denn sie besitzt dieselbem speziellen Eigenschaften wie andere im menschlichen Körper und in der Umwelt vorkommenden Biofilme [Ten Cate, 2006]. Dentale Plaque stellt sich als ein sehr komplexer, gut organisierter Biofilm dar, der aus mehr als 500 verschiedenen Bakterienspezies bestehen kann [Kolenbrander, 2000; Rosan & Lamont, 2000]. Er lässt sich durch im Mund stattfindende Selbstreinigungsprozesse wie Wangen- und Zungenbewegungen und permanenten Speichelfluss nicht von der Zahnoberfläche entfernen [Listgarten, 1994].

Es wird zwischen supra- und subgingivaler Plaque differenziert. Die supragingivale Plaque befindet sich am koronalen Rand des Gingivasaumes (siehe Abb. 1). Breitet sich die supragingivale Plaque apikalwärts in die Sulkusregion aus, spricht man von

subgingivaler Plaque. Die subgingival gelegene Plaque setzt sich aus zwei Anteilen zusammen: einer der Zahnoberfläche anhaftenden Schicht und einer epithelwärts liegenden, nicht-adhärenten Schicht. Die adhärente Plaque kann verkalken, das heißt mineralisiert werden und so subgingivalen Zahnstein bilden, während die nicht-adhärente Schicht aufgrund ihrer Zusammensetzung und Vitalität für die Progression der parodontalen Entzündung verantwortlich gemacht wird.

2.3 Entstehung und Entwicklung des dentalen Biofilms

Auf einer sauberen Zahnoberfläche verlaufen die verschiedenen Phasen der Plaquebildung immer nach dem gleichen, sich wiederholenden Muster.

In der ersten Phase erfolgt die Adsorption von Speichelglykoproteinen an die Zahnoberfläche und ein Pellikel wird gebildet. Anschließend adhärieren erste Bakterien aus dem Speichel am Pellikel und eine Primärflora entwickelt sich. Dann erfolgt die Plaquereifung und Entwicklung zu einer pathogenen Mikroflora.

Im Folgenden werden diese Phasen näher beschrieben (siehe Abb. 4).

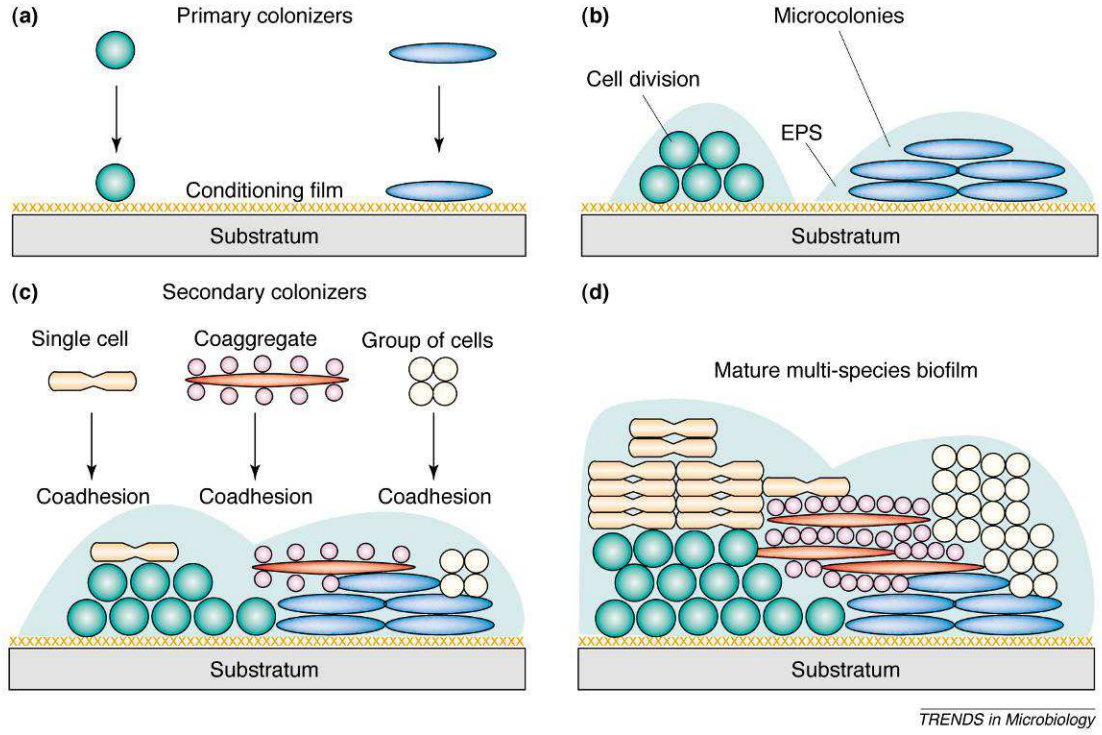


Abb. 4: Biofilm (nach Rickard et al. 2003 [Rickard et al., 2003])

Die Abbildungen a bis d zeigen eine schematische Darstellung der Entstehung eines Biofilmes mittels primärer und sekundärer Kolonisation durch Bakterien und Zellbestandteile.

Konditionierung der Zahnoberfläche

Sobald die gereinigte Zahnoberfläche dem Speichel ausgesetzt ist, bildet sich durch unmittelbare Adsorption von Speichelproteinen ein ca. 0,1 - 1,3 µm dicker, azellulärer Film. Dies geschieht durch das Zusammenwirken physikalischer Kräfte der geladenen Gruppen der Speichelkomponenten und der Kalzium- und Phosphatgruppen des Apatits der Zahnhartsubstanz. Andere physikalische Kräfte wie Ionenbindungen, hydrophobe Wechselwirkungen und Van-der-Waals-Kräfte tragen ebenfalls zur Bindung der Speichelmoleküle an die Schmelzoberfläche bei [Weerkamp et al., 1988]. Das Pellikel, eine Vorstufe der eigentlichen Zahnplaque, ist eine unstrukturierte azelluläre Schicht aus Glykoproteinen, Muzinen und Enzymen des Speichels [Hannig, 1999; Jenkinson & Lamont, 1997], die die Zahnoberfläche konditioniert. Die Zusammensetzung dieses exogenen Zahnoberhäutchens bestimmt die bakterielle Kolonisation der Zahnoberfläche, indem die Bestandteile als Rezeptorstrukturen für die Adhäsion oraler Bakterien dienen [Marsh, 2003; Marsh, 2004; Rosan & Lamont, 2000]. Das Pellikel wird innerhalb von 24 Stunden von vorwiegend gram-positiven, fakultativ anaeroben Kokken (*Streptococcus spp.*) und Stäbchen (*Actinomyces spp.*) kolonisiert [Li et al., 2004; Listgarten, 1994; Rosan & Lamont, 2000].

Primäre Adhäsion

Nach der Entstehungsphase wird das Pellikel durch chemische und enzymatische Veränderungen der adsorbierten Proteine sowie infolge von Auf- und Einlagerungen weiterer Speichelkomponenten und Bakterienprodukten einem Reifungsprozess unterzogen [Hannig, 1999], wobei die mikrobielle Besiedlung der Zahnoberflächen schon nach wenigen Minuten beginnt [Rönström et al., 1975; Socransky et al., 1977].

Zuerst schaffen physikochemische Wechselwirkungen zwischen der mikrobiellen Zelloberfläche und dem pellikelumkleideten Zahn ein Gebiet mit schwacher Anziehungskraft, was eine reversible Adhäsion erleichtert [Busscher & Van der Mei, 1997]. Anschließend können starke Wechselwirkungen zwischen spezifischen Molekülen auf der Bakterienzelloberfläche (Adhäsine) und komplementären Rezeptoren im Pellikel zu einer irreversiblen Anhaftung (Attachment) führen [Jenkinson & Lamont, 1997; Marsh, 2004; Rosan & Lamont, 2000] und so den mikrobiellen Tropismus für bestimmte Zahnoberflächen erklären [Gibbons, 1989; Marsh, 2003; Marsh, 2004]. Unter Tropismus (altgriechisch: Wendung) versteht man die Hinwendung eines Organismus zu einer bestimmten Sorte von Zellen oder bestimmten Geweben als Reaktion auf einen Reiz.

Orale Bakterien besitzen allgemein mehr als einen Typ von Adhäsinen auf ihrer Zelloberfläche und können deshalb an vielfachen Wechselwirkungen sowohl mit Wirtsmolekülen als auch mit ähnlichen Rezeptoren auf anderen Bakterien (Ko-Adhäsion) teilnehmen [Marsh, 2004].

Da die ersten Besiedler der Zahnoberfläche einer hohen Sauerstoffkonzentration und den Selbstreinigungsmechanismen der Mundhöhle wie permanentem Speichelfluss und Schlucken widerstehen müssen, bildet sich der dentale Biofilm bevorzugt auf von Selbstreinigungskräften geschützten Oberflächen [Marsh, 1999].

Sekundäre Adhäsion

Im weiteren Verlauf etablieren sich gram-negative Kokken sowie gram-positive und -negative Stäbchen und fusiforme Bakterien. Nach etwa einer Woche ungestörter Plaqueakkumulation können Spirochäten nachgewiesen werden. Die weitere Anheftung der neuen Bakterienspezies erfolgt hauptsächlich durch die Ko-Aggregation von Bakterien in Suspension und die Ko-Adhäsion zwischen suspendierten und bereits im Biofilm haftenden Bakterien [Kolenbrander, 2000]. Die vermehrte Produktion extrazellulärer Polysaccharide wirkt sich zusätzlich positiv auf die Anbindung neuer Bakterien aus. Die Ko-Adhäsion sorgt für die Erweiterung der bakteriellen Vielfalt und für die räumliche und funktionelle Organisation der Mikroorganismen im Biofilm [Marsh, 2003]. Damit Zunahme der Zellschichten die Sauerstoffkonzentration sinkt und die Plaque einen anaeroben Charakter annimmt, wird die Voraussetzung für das Überleben anaerober Mikroorganismen geschaffen und die metabolische Aktivität der beteiligten Bakterien des Konsortiums begünstigt [Marsh, 2004]. Aufgrund der intensiven Kooperation der Bakterienzellen können Nährstoffe produziert und Abfälle eliminiert werden [Costerton & Lewandowski, 1997].

Interzelluläre Kommunikation

In der Biofilmgemeinschaft ist der Informationsaustausch zwischen den Bakterienzellen zur Etablierung bakterieller Ökosysteme und zur Anpassung an die ständig wechselnden Umgebungsbedingungen sehr wichtig. Diese interzelluläre Kommunikation wird auch als „quorum sensing“ bezeichnet und erfolgt durch Diffusion von Signalmolekülen [Marsh, 2004; Ten Cate, 2006].

Das Hauptziel des Informationsaustausches zwischen den Bakterien ist die Regulierung der Genexpression [Shapiro, 1998]. Durch enge interzelluläre Kommunikation zwischen

den Bakterien kann auch ein Genaustausch induziert werden. Die dabei übermittelten Informationen ermöglichen es den im Biofilm organisierten Mikroorganismen, ihren Phänotyp zu verändern [DuPont, 1997].

Ablösung (Detachment)

In einem späteren Stadium der Biofilmentwicklung kommt es zum Detachment-Phänomen, bei dem sich Teile des Biofilms ablösen [Stoodley et al., 2002]. Einige der in den Biofilmen integrierten Bakterien produzieren Enzyme, welche die Adhäsine, die für die Bindung der Bakterien an die Zahnoberfläche verantwortlich sind, hydrolysieren können. Auf diese Weise können andere Oberflächen der Mundhöhle neu kolonisiert werden [Costerton et al., 1999; Marsh, 2003]. Die Freisetzung einzelner Bakterien oder ganzer Teilstücke aus dem Biofilm spielen bei der Übertragung von Infektionen eine wichtige Rolle. So wurden beispielsweise die Transmission des kariogenen Keimes *S. mutans* von der Mutter auf das Kind [Gripp & Schlagenhauf, 2002] und die Übertragung parodontopathogener Keime zwischen Ehepartnern [Asano et al., 2003; Asikainen et al., 1997] beschrieben.

2.4 Eigenschaften von Mikroorganismen in Biofilmen

Die in Biofilmen organisierten Bakterien zeigen andere phänotypische Eigenschaften als ihre planktonische Lebensform [Costerton & Lewandowski, 1997; Donlan & Costerton, 2002; DuPont, 1997; Gilbert et al., 1997; O'Toole et al., 2000]. Bereits nach Anhaftung an eine Oberfläche kann sich die Genexpression der Organismen deutlich verändern, woraus ein anderer Phänotyp resultiert [Barnett, 2003; Marsh, 2005].

Die Organisation im Biofilm ermöglicht es bestimmten Spezies, auch an Standorten zu wachsen, an denen sie allein nicht überleben könnten. Der Metabolismus von früh kolonisierenden Bakterienspezies verändert das Milieu der Umgebung so, dass die Bedingungen für Anhaftung und Wachstum von spät kolonisierenden (und meist auch anspruchsvolleren) Bakterien geschaffen werden. Auf diese Weise werden die mikrobielle Diversität der Mikroflora und die Standortauswahl vergrößert. Auch die metabolische Vielfalt und Wirksamkeit wird gesteigert: Moleküle, die sich dem Katabolismus einzelner Bakterien entziehen, können häufig durch die mikrobiellen Konsortien gespalten werden [Marsh, 2005].

Wichtige klinische Folgen sowohl der strukturellen Organisation der Biofilme als auch des veränderten Musters der Genexpression sind die höhere Resistenz gegenüber Abwehrmechanismen des Wirtes [Page et al., 1997] und die reduzierte Empfindlichkeit der Zellen gegenüber antimikrobiellen Substanzen [Ceri et al., 1999; Gilbert et al., 1997; Stewart, 2002; Stewart & Costerton, 2001].

2.4.1 Erhöhte Resistenz gegenüber antimikrobiellen Substanzen

Die Mechanismen der erhöhten Resistenz von Biofilmen gegenüber antimikrobiellen Substanzen sind noch immer das Thema zahlreicher Untersuchungen und Diskussionen [Barnett, 2003; Gilbert et al., 2002; Marsh, 2005; Schaudinn et al., 2009; Stewart & Costerton, 2001].

Bei planktonischen Bakterienzellen finden sich Resistenzmechanismen z. B. durch Mutationen an Bindungsstellen für Medikamente, die Anwesenheit von Efflux-Pumpen oder die Produktion modifizierender Enzyme. Zusätzlich zu den beschriebenen Effekten werden planktonische Bakterien weniger empfindlich gegenüber Antiseptika, wenn sie als Biofilm auf einer Oberfläche wachsen [Marsh, 2005].

Da die antibakteriellen Moleküle zuerst die komplexe extrazelluläre Polysaccharidmatrix durchdringen müssen, um die Bakterienzellen zu erreichen, kann die Wirkung eines Medikaments durch die Biofilmstruktur eingeschränkt werden [Gilbert et al., 1997]. Die Matrix funktioniert einerseits als eine Barriere z. B. gegen die Diffusion einiger Antiseptika, andererseits ist sie aufgrund des aufgelockerten Biofilmaufbaus und des hydrophilen Milieus permeabel. Positiv geladene antibakterielle Moleküle können mit negativ geladenen Polymeranteilen der oberen Biofilmschichten reagieren, so dass eine weitere Penetration nicht möglich ist und die Mikroorganismen in den tieferen Schichten relativ geschützt sind [Marsh, 2005; Nichols et al., 1988].

Die antimikrobiellen Substanzen können auch durch in der Biofilmmatrix in konstanter Konzentration gebunde Neutralisationsenzyme wie z. B. β-Lactamase oder IgA-Protease inaktiviert werden [Allison, 2003].

Ein weiterer Resistenzmechanismus beruht auf dem langsameren Wachstum der Bakterien eines Biofilms [Donlan & Costerton, 2002]. Da die Häufigkeit der Zellteilung verringert ist, sind diese Bakterien weniger empfindlich gegen antibakterielle Wirkstoffe, die insbesondere die Zellteilung beeinflussen.

Auch die Veränderung des Phänotyps der Bakterien im Biofilm kann zu einer reduzierten Empfindlichkeit gegenüber Hemmstoffen führen [Sauer et al., 2002]. Außerdem wird vermutet, dass die Umgebung in den Tiefen des Biofilms für die optimale Wirkung von einigen Arzneien ungünstig ist [Gilbert et al., 2002]. Zurzeit ist nicht klar, ob nur einige oder alle diese Effekte für die beobachtete Resistenz von Zellen in Biofilmen verantwortlich sind.

2.5 Therapie der Parodontalerkrankungen

Die kausale Therapie der Parodontitis ist auf die Eliminierung der Infektion und die Reduktion der pathogenen Mikroorganismen der dentalen Plaque mit anschließender Ausheilung der erkrankten Gewebe ausgerichtet [Bollen et al., 1998; Magnusson et al., 1994; Slots & Ting, 1999]. Die mechanische Therapie der Parodontopathien mit der Entfernung der supragingivalen und subgingivalen Plaque (Scaling), der Wurzeloberflächenglättung (Root planing) und der Entfernung entzündlichen Granulationsgewebes sowohl im offenen, als auch im geschlossenen Verfahren stellt heute die Hauptsäule der Parodontaltherapie dar [O'Leary, 1986; Sculean et al., 2004]. Dennoch kann die adjuvante Verabreichung von Lokaltherapeutika in der Hygienephase, in der operativen Phase und in der Erhaltungsphase den Erfolg der Parodontaltherapie sichern helfen [Mandel, 1994; Newman, 1998].

2.5.1 Wirkungsweise oraler Antiseptika

Antiplaquemittel sind orale Antiseptika, die einen klinisch nachgewiesenen antibakteriellen Effekt gegen dentale Plaque haben und somit Erkrankungen der Mundhöhle wie z. B. Karies und Gingivitis vorbeugen können. Sie werden deshalb sowohl in der Prophylaxe als auch in der Therapie eingesetzt [Pitten et al., 2000].

Eine mögliche Applikationsform oraler Antiseptika sind Mundspüllösungen. Nach Baehni & Takeuchi (2003) können diese Antiplaquemittel hinsichtlich ihrer unterschiedlichen Wirkungsprinzipien wie folgt unterteilt werden [Baehni & Takeuchi, 2003]:

a.) Störung der primären Adhäsion der oralen Bakterien auf der Zahnoberfläche und Vorbeugung der Biofilmbildung
b.) Behinderung der sekundären Adhäsionsmechanismen (Ko-Aggregation und Ko-Adhäsion) bzw. Beeinträchtigung der Vitalität der Bakterien, um das weitere Wachstum von Kolonien zu verhindern
c.) Beseitigung oder Zerstörung des vorhandenen Biofilms

Die Wirkung antibakterieller Mundspüllösungen auf planktonische Bakterien ist mit derjenigen auf in Biofilmen lebende Mikroorganismen nicht vergleichbar [Barnett, 2003; Gilbert et al., 1997; Lewis, 2001; Pitten et al., 2003]. Diese Tatsache hat zur Folge, dass die Wirkung oraler Antiseptika in Systemen mit planktonischen Mikroorganismen nur begrenzt Informationen liefern, die auf die Biofilmsituation übertragbar sind. Zuverlässige Aussagen über die Effektivität einer Substanz auf Biofilme lassen sich vor allem aus Untersuchungen am komplexen Biofilm selbst treffen.

2.6 Antibakterielle Mundspüllösungen

Der antiseptischen, antiphlogistischen und kariesprotektiven Wirkung von Mundspüllösungen wird in der heutigen Zeit zunehmende Bedeutung beigemessen, da Ergebnisse kontrollierter Studien zeigen, dass eine mechanische Plaquereduktion auf der Zahnoberfläche und besonders im Interdentalbereich durch die Zahnbürste oder andere Hilfsmittel (Interdentalraumbürste, Zahnseide, Zahnhölzer etc.) nicht oder nur unvollständig erreicht werden kann [Van der Weijden & Hioe, 2005]. Für die Plaquereduktion ist von Bedeutung, dass die angewandten antibakteriellen Mittel eine gute antiseptische Wirkung aufweisen. Dabei sollten möglichst keine oder nur geringe lokale oder systemische Nebenwirkungen und mikrobielle Resistenzentwicklungen auftreten [Baehni & Takeuchi, 2003; Newman, 1998].

Die Effektivität unterschiedlicher antibakterieller Mundspüllösungen gegen dentale Plaque konnte in zahlreichen Studien gezeigt werden [Arweiler et al., 2002; Arweiler et al., 2001; Jenkins et al., 1994a; Lang et al., 1998; Rosin et al., 2002; Sekino & Ramberg, 2005]. Dabei wurden die einzelnen Wirkstoffe mehrfach in verschiedenen Zusammensetzungen getestet, um durch Ausnutzung synergetischer Effekte der Einzelkomponenten eine Verbesserung der Effektivität der Antiplaquemittel zu erreichen.

In gebrauchsfertigen Mundspüllösungen werden vor allem folgende Stoffgruppen eingesetzt [Addy, 1986; Ciancio, 1986; Eley, 1999; Mandel, 1988; Marsh, 1992]:

- Bisbiguanide (z. B. Chlorhexidin, Alexidin, Octenidin)
- Phenolderivate (z. B. Thymol, Phenol, Eukalyptol, Triclosan)
- Schwermetallsalze (z. B. Zink, Zinn, Kupfer, Kalium)
- Fluoride (z. B. Aminfluorid, Zinnfluorid)
- Quaternäre Ammoniumbasen (z. B. Cetylpyridin, Hexetidin)
- Enzyme (z. B. Mutanase, Glukanase, Dextranase)
- Pflanzenextrakte (z. B. Sanguinarin, Kamille, Salbei)
- Alkohol als Lösungsmittel

Im Folgenden sollen die Charakteristika der in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Wirkstoffe kurz erläutert werden.

2.6.1 Bisbiguanide Antiseptika

Verschiedene Bisbiguanide wie zum Beispiel Chlorhexidin, Alexidin und Octenidin besitzen Antiplaque-Aktivität. Sie sind in der Lage, durch Beschädigung der Zellwand eine breite Auswahl von Mikroorganismen zu zerstören. Das bekannteste bisbiguanide Antiseptikum ist das Chlorhexidindigluconat. Die Antiplaque-Eigenschaften von Chlorhexidin sind im Vergleich mit anderen Agentien unübertroffen. Es hat größere und länger anhaltende antibakterielle Effekte als andere Antiseptika mit ähnlicher oder größerer Antiplaque-Aktivität [Eley, 1999].

Chlorhexidin

Chlorhexidin (CHX) ist als ein synthetisches, kationisches Detergens eine hoch wirksame antimikrobielle Substanz mit breitem Wirkungsspektrum. Es gehört zur Stoffgruppe der Bisbiguanide und liegt in reiner Form als weißes geruchloses Pulver vor. Es wird in Form von Spüllösungen, als Zusatz zu Zahnpasten sowie als Lack oder Gel angeboten und findet sowohl im Rahmen der häuslichen Mundhygiene als auch im professionellen Bereich Anwendung. Als sogenannter Goldstandard [Jones, 1997; Marsh, 1992] in der Gingivitis- und Parodontitistherapie ist es das wohl am intensivsten untersuchte zur Plaqueinhibition und Entzündungshemmung im oralen Bereich eingesetzte Antiseptikum [Addy, 1986; Brecx, 1997; Greenstein et al., 1986; Hoffmann et al., 2001; Lang & Brecx, 1986].

Das Spektrum der auf CHX sensitiven Mikroorganismen erstreckt sich über eine breite Spanne gram-positiver und gram-negativer Bakterien, sowie Sporen und Dermatophyten [Marsh, 1992; Stanley et al., 1989]. Daneben konnten in In-vitro-Studien auch antivirale Eigenschaften gegen einige Viren der Mundhöhle wie z. B. *Herpes-simplex-Virus* und *Hepatitis-B-Virus* aufgezeigt werden [Bernstein et al., 1990; Quirynen et al., 2002].

CHX wirkt in Konzentrationen von ca. 100 µg/ml (100 ppm) bakterizid und besitzt noch bei Konzentrationen unter 1 µg/ml (1 ppm) bakteriostatische Eigenschaften. Obwohl andere antimikrobielle Mittel zum Teil einen größeren bakterioziden Effekt auf Speichelbakterien haben, hat CHX ihnen gegenüber den Vorteil lang anhaltender Substantivität, da es an den harten und weichen intraoralen Geweben binden kann [Bonesvoll & Gjermo, 1978; Bonesvoll et al., 1974].

Die hohe Affinität zu oralen Oberflächen führt zur Retention des Wirkstoffs an den Schleimhäuten und Zähnen und damit zu einer verlängerten Einwirkzeit. Das dikationische Chlorhexidinmolekül lagert sich in Form von elektrostatischen Wechselwirkungen und Ionenbindungen an die anionischen Sulfat-, Phosphat- und Carboxylat-Gruppen des Pellikels und an Speichelproteine an und wirkt so der Plaquebildung entgegen [Jenkins et al., 1994a]. Dieser Depoteffekt hält 7 h, wahrscheinlich jedoch mehr als 12 h an [Netuschil et al., 1989]. Die antibakterielle Wirkung lässt sich außerdem durch die starke Anziehungskraft der negativ geladenen Bakterienzelloberfläche auf das kationische Chlorhexidinmolekül erklären. Nach Adsorption wirkt CHX durch die Veränderung der Integrität der Zellmembran direkt auf den Stoffwechsel der Bakterien, aber auch indirekt plaquehemmend durch die Besetzung der für die Bakterien für eine Anlagerung wichtigen anionischen Gruppen an die Pellikel [Quirynen et al., 2002].

In niedrigen Konzentrationen erhöht CHX die Permeabilität der Zellmembran. Dies führt zu einem erhöhten Ausstrom intrazellulärer Substanzen und löst einen bakteriostatischen Effekt aus. In höheren Konzentrationen penetriert CHX die Zellwand und die Plasmamembran der Bakterien und verursacht über die Präzipitation des Zytoplasmas den Tod der Zelle [Stanley et al., 1989].

Das am häufigsten angewandte Derivat des Chlorhexidins ist das Chlorhexidindigluconat (Chlorhexamed®). In dieser Form ist es wasserlöslich und lässt sich somit gut als Mundspüllösung einsetzen. Eine Erwärmung der Lösung soll die plaquehemmende Wirkung verbessern [König et al., 2002]. Die Anwendungskonzentra-

tion im Mundhöhlenbereich liegt bei 0,1 - 0,2 %. Die regelmäßige Anwendung sollte 2 Wochen nicht überschreiten, da vor allem bei längerem Gebrauch unerwünschte Nebenwirkungen wie beispielsweise Schleimhautdesquamationen, Geschmacksirritationen [Addy et al., 1995; Mandel, 1988] und gelbbraune Verfärbungen an Zähnen, zahnfarbenen Restaurationen und der Zunge auftreten können [Albers et al., 1985; Greenstein et al., 1986]. Ebenso wurden vermehrte Zahnsteinbildung [Overholser et al., 1990] sowie nicht selten Zungen- und Schleimhautbrennen oder allergische Reaktionen beobachtet [Addy, 1986; Lang et al., 1998]. Diese negativen klinischen Effekte sind ebenso wie die positiven dosisabhängig [Albers et al., 1985; Jenkins et al., 1994a]. Die Nebenwirkungen sind vollständig reversibel, können aber besonders bei längerfristiger Anwendung das Wohlbefinden des Patienten beeinträchtigen. Deshalb wurde schon sehr frühzeitig nach Alternativen zu Chlorhexidin gesucht.

2.6.2 Phenolderivate

Ätherische Öle (Phenole) sind seit ihrer Einführung als Antiseptika durch Lister im Jahre 1867 seit mehr als 130 Jahren in Gebrauch [Mandel, 1988]. Aufgrund ihrer niedrigen Toxizität und ihrer antibakteriellen Eigenschaften werden phenolische Zusammensetzungen entweder allein oder in Kombination sowohl in Antiseptiken und Desinfektionsmitteln, als auch in Zahnpasten, Mundspüllösungen oder Lutschtabletten verwendet.

Listerine®

Listerine® ist das älteste und bekannteste Produkt der Stoffgruppe der Phenole. Die ätherischen Öle Thymol und Eukalyptol sind zusammen mit Menthol, Methylsalicylat und Benzoesäure die wesentlichsten Inhaltsstoffe. Außerdem ist mit ca. 27 % ein relativ hoher Anteil an Ethanol enthalten.

Basierte seine Anwendung zunächst auf empirischen Erkenntnissen, gehört Listerine® inzwischen weltweit zu den wissenschaftlich am besten dokumentierten Mundhygiene-Produkten. In den letzten zwei Jahrzehnten wurden zahlreiche mikrobiologische und klinische Studien durchgeführt, seine antibakterielle Effektivität in der Mundhöhle wird jedoch oft widersprüchlich beurteilt [Brecx et al., 1990; Maruniak et al., 1992].

Netuschil *et al.* beschreiben, dass Listerine® vor allem im frühen Stadium der Plaquebildung wirkt [Netuschil et al., 1995]. Der plaquehemmende Effekt wird auf seine bakteriziden Eigenschaften zurückgeführt, die sowohl in In-vitro- als auch

In-vivo-Studien gezeigt werden konnten [DePaola et al., 1996; Fine et al., 1985; Jenkins et al., 1994b; Pan et al., 2000; Riep et al., 1999; Ross et al., 1989; Sekino & Ramberg, 2005]. Die klinische Wirkung von Listerine® wird primär über die Schädigung der Bakterienzelloberfläche durch Denaturierung von Proteinen in der Bakterienzellwand vermittelt, was letztlich zum Zelltod führt [Kubert et al., 1993]. Listerine® beeinflusst die Plaqueproliferation und vermindert die Plaquetoxizität durch Extraktion der Lipopolysaccharide [Fine et al., 1985]. Durch Hemmung der Prostaglandin-Synthese, Verminderung der Chemotaxis neutrophiler Granulozyten und Unterdrückung der Sauerstoff-Radikal-Bildung hat es auch Einfluss auf Entzündungsabläufe [Azuma et al., 1986].

In mikrobiologischen Untersuchungen ist nachgewiesen worden, dass Listerine® innerhalb einer Einwirkzeit von 30 Sekunden sowohl gegen gram-positive als auch gegen gram-negative orale Bakterien und gegen Hefen wirksam ist [Fine et al., 2005; Ross et al., 1989]. Ebenfalls nachgewiesen wurde eine klinisch relevante Reduktion oraler Viren für mindestens 30 Minuten nach der Anwendung [Meiller et al., 2005]. In-vitro-Untersuchungen zeigen, dass Listerine® nicht nur bei planktonischen, sondern auch bei biofilmbildenden Bakterien wirksam ist [Fine et al., 2001; Pan et al., 1999].

In der Literatur werden auch bei Langzeitanwendungen keine unerwünschten Begleiterscheinungen wie Zahnverfärbungen, Geschmacksirritationen, erhöhte Zahnsteinbildung oder eine Verschiebung des Gleichgewichts der Mundflora beschrieben [Gordon et al., 1985; Overholser et al., 1990; Ross et al., 1989]. Die allgemeine Beurteilung der Mundschleimhaut ergab in einer Studie von De Paola et al. keinerlei negative Beeinflussung der oralen Weichgewebe [DePaola et al., 1989].

Als Nebenwirkung für Listerine® beschreiben Addy et al. das gelegentliche Auftreten von Erosionen an Zahnschmelz und Dentin [Addy et al., 1991]. Der scharfe Geschmack, der wahrscheinlich auf die hohe Alkoholkonzentration zurückzuführen ist, wird von Probanden als unangenehm empfunden und beeinflusst das kooperative Verhalten des Patienten negativ [Bolanowski et al., 1995]. Auch von Arweiler et al. werden die hohe Alkoholkonzentration, sowie die hohe Spülmenge (2 x 20 ml täglich) und der pH-Wert (ph < 5) als negativ eingestuft [Arweiler et al., 2001].

Während in vielen klinischen Studien die plaque- und gingivitisreduzierende Wirkung von Listerine® im Vergleich mit entsprechenden Kontrolllösungen gezeigt werden konn-

te [Fine et al., 1985; Gordon et al., 1985; Mandel, 1988], wurden in anderen Studien keine In-vivo-Effekte festgestellt [Brecx et al., 1992; Brecx et al., 1990; Maruniak et al., 1992]. Verglichen mit den antibakteriellen und plaquebildungshemmenden Eigenschaften von Chlorhexidin und Meridol® scheint Listerine® weniger effektiv zu sein [Netuschil et al., 1995; Shapiro et al., 2002; Siegrist et al., 1986]. Die Verweilzeit der Wirksubstanzen und ihre Retention in der Mundhöhle (Substantivität) ist als mangelhaft einzustufen [Netuschil et al., 1997]. Auch ist nicht hinreichend geklärt, inwiefern der als Lösungsmittel dienende Alkohol, der denaturierend auf die Bakterienzelle einwirkt, zum antibakteriellen Effekt beiträgt.

2.6.3 Metallsalze

Die Wirkung von Metallionen wie zum Beispiel Zink, Zinn oder Kupfer auf dentale Plaque ist seit längerem bekannt und wiederholt untersucht worden. Es konnte eine plaquehemmende Aktivität gezeigt werden, welche die des Chlorhexidins jedoch nicht erreicht [Eley, 1999].

Als Nebenwirkungen werden ein metallischer Geschmack und die Neigung zu gelblich-braunen Zahnverfärbungen beschrieben, die möglicherweise durch Reaktionen mit den SH-Gruppen der Pellikel hervorgerufen werden.

Die plaquehemmende Effektivität der Metallionen kann durch eine Kombination mit anderen antiseptisch wirkenden Substanzen wie z. B. dem Pyrimidinderivat Hexetidin oder mit Fluorid bzw. Aminfluorid deutlich über die Einzelwirkung der Bestandteile hinaus verbessert werden [Brecx et al., 1992].

2.6.4 Fluoride

Fluoride und Fluoridverbindungen werden seit Jahrzehnten erfolgreich in der Prophylaxe eingesetzt. Fluorid hemmt die Aktivität spezieller Enzyme des Bakterienstoffwechsels, vermindert die Säureproduktion und stört den enzymabhängigen Glukosetransport in die Bakterienzelle, wodurch der bakterielle Metabolismus und somit die Plaquebildung entscheidend beeinträchtigt werden [Tinanoff, 1990]. In höheren, aber therapeutisch kaum anwendbaren Konzentrationen wirken Fluoride auch bakterizid [Gehring, 1983]. Dabei spielen die Bakterienart, deren Säuretoleranz und damit der umgebende pH-Wert eine entscheidende Rolle. In mikrobiologischen Untersuchungen

konnte ein signifikanter Rückgang von Stäbchen, Spirochäten, Filamenten und Fusiformen, jedoch auch ein signifikanter Anstieg von Kokken gezeigt werden [Mengel et al., 1996].

Die in der Zahnmedizin relevanten Fluoridverbindungen liegen in ionisch gebundener Form vor, wobei zwischen organischen Aminfluoriden und anorganischen Fluoridverbindungen unterschieden wird. Zu den letzteren zählen Natriumfluorid (NaF), Zinnfluorid (SnF_2) und Zinkfluorid (ZnF_2). Diese Fluoride besitzen kaum Substantivität [Netuschil et al., 1997], zeichnen sich jedoch durch ein erhöhtes Diffusionsvermögen aus. Daraus resultieren einerseits eine erhöhte Anreicherung von Fluoriden im Oberflächenschmelz, andererseits auch verbesserte antibakterielle und damit auch plaquehemmende Eigenschaften, da nur das freie Fluoridion durch einfache Diffusion in die Bakterienzelle gelangen und hier deren Metabolismus stören kann. Zinnfluorid ist außerdem in der Lage, die Plaqueansammlung zu reduzieren, in dem es die Adhäsion der Plaquebakterien am Zahnschmelz behindert und die Kohäsion dieser Mikroorganismen modifiziert [Tinanoff et al., 1980].

Aminfluoride, unter denen das Olafluor das gebräuchlichste ist, zeichnen sich durch eine spezielle Molekülstruktur aus. Hierbei ist das Fluoridion an eine langkettige Aminocarbonsäure gebunden, die den Aminfluoriden amphiphile Eigenschaften verleiht. Somit können sie, ähnlich wie Tenside, die Oberflächenspannung des Speichels herabsetzen und die gesamte Mundhöhlenoberfläche mit einem homogenen Film benetzen [Schmid, 1983].

Meridol®

Angeregt durch die Untersuchungen von McDonald et al. [McDonald et al., 1978] über die separat betrachtete Wirkung von Aminfluorid (AmF) und Zinnfluorid (SnF_2) auf die Plaquebildung und Gingivitis beim Beagle-Hund, berichteten Mühlemann et al. erstmals über den Einsatz einer kombinierten AmF/SnF_2–Lösung (250 ppm F^-) [Mühlemann et al., 1981]. In der Mundspüllösung Meridol® wird der antimikrobielle Effekt des Zinnfluorids mit dem kariesprophylaktischen Potenzial des Aminfluorids 297 (Olafluor) kombiniert und stabilisiert [Mengel et al., 1996; Zimmermann et al., 1993]. Aus den Eigenschaften der Einzelkomponenten ergibt sich eine hohe Wirksamkeit. Während der letzten Jahre wurde diese Wirkstoffkombination sowohl in klinischen Kurzzeitstudien [Arweiler et al., 2001; Netuschil et al., 1995; Riep et al., 1999] als auch in Langzeitstudien [Bánóczy et al., 1989; Brecx et al., 1993; Brecx et al., 1990; Mengel et al., 1996;

Zimmermann et al., 1993] als ein antibakterielles und somit plaqueinhibierendes Mittel bewertet.

Zinnfluorid ist eine anorganische Fluoridverbindung. Die Freisetzung der Zinnionen vor Ort erfolgt durch Calcium aus dem Speichel und führt zur Inaktivierung der Plaquebakterien, indem die Zinnionen direkt in deren Stoffwechsel eingreifen und diesen hemmen [Baehni & Takeuchi, 2003]. Durch die Herabsetzung des Bakterienmetabolismus, der Hemmung der Bakterienaggregation und -agglomeration wird die Etablierung der Bakterienflora nachhaltig reduziert [Gross & Tinanoff, 1977; Tinanoff, 1990]. Dieses Wirkprinzip wird durch die antibakterielle Wirkung des Aminfluorids verstärkt. In wässriger Lösung stabilisiert das Aminfluorid das Zinnfluorid durch Komplexbildung [Mühlemann et al., 1981]. Aminfluorid ist eine organische Fluoridverbindung mit Tensidcharakter, die den Bakterienstoffwechsel verringert und die Bakterienmembran funktionell beeinflusst. Das Plaquewachstum wird gehemmt und vorhandene Plaquereste werden inaktiviert und teilweise aufgelöst. Die oberflächenaktiven Eigenschaften des Aminfluorids bewirken eine gute Retention, woraus sich eine verlängerte Verweildauer und Einwirkzeit in der Mundhöhle ergibt.

Die stärkste Wirkung von Meridol® wird zwischen zwei und drei Stunden nach Anwendung registriert, nach vier bis fünf Stunden konnte noch eine deutliche antibakterielle Wirkung nachgewiesen werden [Netuschil et al., 1997]. Der antibakterielle Effekt sinkt jedoch mit der Zeit, was durch fehlende oder nur geringe Substantivität zu erklären ist [Brecx et al., 1990].

Das Wirkprinzip des Meridols® ist dem des Chlorhexidins ähnlich. In geringen Konzentrationen wirkt es bakteriostatisch und in höheren bakterizid [Netuschil et al., 1997; Tsao et al., 1982; Wilson et al., 1996], wobei es jedoch die Effektivität des CHX nicht erreicht [Gross & Tinanoff, 1977; Künzel et al., 1990; Netuschil et al., 1995; Shapiro et al., 2002]. In vergleichenden Studien zeigte Meridol® gegenüber Listerine® eine ähnliche oder sogar bessere antibakterielle Wirkung [Brecx et al., 1992; Brecx et al., 1990; Netuschil et al., 1995; Shapiro et al., 2002]. In einer klinischen Kurzzeitstudie zeigte es jedoch geringere plaquehemmende Eigenschaften als Listerine® [Riep et al., 1999]. Auf Grund der Inaktivierung der gingivitisassoziierten Bakterien durch Aminfluorid/Zinnfluorid wird der entzündungshemmende Effekt verstärkt und die Wiederherstellung einer gesunden Mundflora unterstützt. Die Wirkstoffkombination ist in der

Lage, die natürliche Regeneration von entzündetem Zahnfleisch zu unterstützen [Zimmermann et al., 1993].

Der AmF/SnF_2–Mundspüllösung ist eine gute gustatorische Akzeptanz zuzusprechen [Künzel et al., 1990]. Unerwünschte Nebenwirkungen wie Zahn- oder Zungenverfärbungen, Geschmacksbeeinträchtigungen, Schleimhautreizungen oder Ulzerationen durch Meridol® werden kaum beobachtet, weshalb es zur Langzeitanwendung empfohlen wird [Albers et al., 1985; Brecx et al., 1993; Künzel et al., 1990; Zimmermann et al., 1993].

2.6.5 Quarternäre-Ammonium-Verbindungen

Quarternäre-Ammonium-Verbindungen, wie zum Beispiel Cetylpyridinium-Chlorid (CPC) und Hexetidin, haben eine mäßige plaquehemmende Wirkung [Ciancio, 1986]. Obwohl sie zunächst eine bessere orale Retention und eine dem Chlorhexidin äquivalente antibakterielle Aktivität haben, sind Plaquehemmung und Gingivitisprävention weniger effektiv. Als Grund dafür wird die schnelle Resorption durch die orale Mukosa und die damit verbundene geringe Substantivität *in vivo* angegeben [Bonesvoll & Gjermo, 1978; Bonesvoll et al., 1974]. Auch wurde nachgewiesen, dass die antibakteriellen Eigenschaften dieser Verbindungen durch Adsorption auf einer Oberfläche erheblich reduziert werden. Die kationischen Gruppen jedes Moleküls binden an Rezeptoren der Mukosa und verursachen so die mukosale Retention. Aufgrund der monokationischen Natur dieser Moleküle sind dadurch aber nur wenige ungebundene Stellen für die antibakterielle Funktion verfügbar [Eley, 1999]. Durch den Gebrauch höherer Konzentrationen oder häufigere Anwendung kann zwar die Wirksamkeit erhöht werden, dabei werden jedoch auch die unerwünschten Nebenwirkungen wie Verfärbungen, Brennen und Schleimhautirritationen verstärkt [Mandel, 1988].

Hexoral®

Hexoral® mit dem Wirkstoff Hexetidin hat ein breites Wirkungsspektrum gegen Erreger von Mund- und Racheninfektionen. Hexetidin ist eine kationische oberflächenaktive Substanz, die durch ihre positive Ladung intensive Wechselwirkungen mit den negativ geladenen Anteilen des Schmelzes sowie den Proteinen des Speichels eingeht. Die orale Retention liegt zwischen 1 und 3 Stunden, weshalb ihm lediglich eine schwache plaquehemmende Wirkung zugesprochen wird [Roberts & Addy, 1981]. Der plaque- und gingivitishemmende Effekt wird durch den amphiphilen Charakter der Hexetidinmoleküle bestimmt. Die lipophilen Molekülstrukturen lagern sich in die bakteri-

ellen Zellwände ein und beeinträchtigen deren Funktion. Außerdem spielen die Störung der Aktivität bestimmter Enzyme, die Denaturierung bakterieller Proteine sowie die Behinderung der bakteriellen Adsorption auf der Zahnoberfläche eine Rolle. Die erhöhte Effizienz des Hexetidins bei gleichzeitiger Einwirkung von Zinksalzen erklärt sich durch deren puffernde Wirkung gegenüber negativ geladenen Proteinen des Speichels, welche ansonsten schnell zu einer Absättigung und Komplexierung des Wirkstoffes führen. Die Kombination von Hexetidin mit Zink verbessert durch die so entstehende synergistische Wirkung die plaquehemmenden Aktivitäten [Eley, 1999].

Hexetidin wirkt als Breitspektrum-Antiseptikum sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gegen gram-positive und gram-negative Bakterien und gegen Hefen (z. B. Candida albicans) [Roberts & Addy, 1981; Wile et al., 1986]. In klinischen Studien zeigte Hexetidin im Vergleich zu Kontrollgruppen eine statistisch signifikante Hemmung und Reduktion supragingivaler Plaque und gingivaler Entzündung [Sharma et al., 2003; Williams et al., 1987]. Nach der Anwendung eines 0,2 %igen Hexetidin-Sprays konnte infolge des direkten Kontakts eine signifikante Plaquehemmung festgestellt werden [Bokor, 1996]. Als Lösung zum Gurgeln wirkt Hexetidin intensiver, zum Beispiel auf die Streptokokken im Pharynx und in den Tonsillen [Saxer & Mühlemann, 1983].

Bezüglich Nebenwirkungen führt Hexetidin zu geringfügigen externen Zahnverfärbungen, die im Vergleich zu Chlorhexidin jedoch bei erheblich weniger Probanden auftraten [Sharma et al., 2003]. In höheren Konzentrationen, z. B. als 0,1 %ige Lösung, verursacht es orale Ulzerationen [Bergenholtz & Hänström, 1974].

3 Ziele der Untersuchung

Die dentale Plaque ist einer der prominentesten Biofilme des Menschen und von erheblicher Bedeutung für die Entstehung parodontaler Erkrankungen [Marsh, 2005; Ten Cate, 2006]. Sowohl die Behandlung als auch die Prävention parodontaler Erkrankungen sind auf die dentale Plaque als Biofilm fokussiert.

Mundspüllösungen werden schon seit langem zur Reduktion von dentalem und parodontalem Biofilm angewandt und auf ihre antimikrobiellen Eigenschaften hin getestet. Dabei sind eine hohe antiseptische Wirksamkeit bei minimalen lokalen oder systemischen Nebenwirkungen und das Ausbleiben einer mikrobiellen Resistenzentwicklung von Bedeutung. Lösungen mit Chlorhexidindiglukonat kommen häufig zur Anwendung, da sie sich durch ihre starke antimikrobielle Wirksamkeit und eine hohe Substantivität auszeichnen. Aus der Vielzahl an Präparaten, die heute auf dem Markt angeboten werden, muss der behandelnde Zahnarzt für die unterstützende Parodontitistherapie das Produkt auswählen, das am effektivsten gegen parodontopathogene Keime wirkt.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Wirkung verschiedener kommerziell erhältlicher Mundspüllösungen auf parodontale Biofilme mit mikroskopischen Methoden darzustellen und zu vergleichen. Dabei kamen konventionelle kulturmikrobiologische Verfahren in Kombination mit der Rasterelektronenmikroskopie zum Einsatz. Untersucht wurde die antimikrobielle Wirkung auf Multispeziesbiofilme aus In-vivo-Material (supra- und subgingivale Plaque) über einen Zeitraum von 21 Tagen.

Zu Beginn der Studie galt es jedoch der Frage nachzugehen, in welchem Medium, auf welchem Biofilmträger und unter welchen Bedingungen Biofilme *in vitro* kultivierbar sind. Dazu wurde das Wachstumsverhalten von acht verschiedenen Monospezieskulturen unter anaeroben Bedingungen in verschiedenen Nährmedien auf speziellen Deckgläschen getestet. Im Anschluss daran wurden diese Monospezieskulturen zu einem In-vitro-Multispeziesbiofilm zusammengeführt. Somit sollten ideale Wachstumsbedingungen für Multispeziesbiofilme eruiert werden.

4 Material und Methode

4.1 Gewinnung komplexer Multispeziesbiofilme

Die Grundlagen der beschriebenen Versuche wurden im Rahmen umfangreicher Vorversuche erarbeitet. Diese umfassten vor allem die Ermittlung eines geeigneten Nährmediums, das für die Kultivierung eines möglichst großen Spektrums oraler Bakterienspezies, aerober wie anaerober, in einem Multispeziesbiofilm geeignet sein würde. Außerdem wurden die zentralen Parameter der Versuche wie Standardisierung der Protokolle, optimale Versuchsdauer, Reproduzierbarkeit sowie die Grundlagen der Auswertung etabliert.

4.1.1 Bakterienstämme

Für die Kultivierung der Mono- und Multispeziesbiofilme wurden folgende Bakterienstämme ausgewählt:

- *Actinomyces naeslundii* (DSMZ 43325)
- *Fusobacterium nucleatum subspecies polymorphum* (DSMZ 20482)
- *Micromonas micros (Peptostreptococcus migros)* (DSMZ 20468)
- *Porphyromonas gingivalis* (DSMZ 20709; ATCC 53977)
- *Prevotella intermedia* (DSMZ 20706)
- *Prevotella nigrescens* (DSMZ 13386; ATCC 33563)
- *Streptococcus mutans* (DSMZ 20523)
- *Selenomonas sputigena* (DSMZ 20758)

Die Keime wurden in lyophilisierter Form von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ GmbH, Braunschweig, Germany) und der American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, USA) kommerziell erworben, bzw. vom Labor von H. K. Kuramitsu (State University at Buffalo, Buffalo, N. Y., USA) freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

4.1.2 Herstellung der Monospezieskulturen

Um von einem einheitlichen Pool an Bakterien ausgehen zu können, wurden Bakterienstocks angelegt. Zur Herstellung eines Stocks wurden die Bakterien zunächst 24 bis 48 h auf Columbia-Blutagar-Platten (Sifin GmbH, Berlin), die mit 5 % Schafsblut supplementiert waren, mit sterilen Impfösen ausgestrichen und anaerob bei einer Atmosphäre von 5 % Kohlendioxid (CO_2), 10 % Wasserstoff (H_2) und 85 % Stickstoff (N_2) inkubiert (Anaerobierwerkbank Modell MAKS MG 500, Hersteller Whitley, UK). Dann wurden die Kolonien mit sterilen Impfösen geerntet, in 800 µl Einfriermedium in ein Eppendorfgefäß (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) eingebracht und bei − 80 °C eingefroren. Das Einfriermedium setzte sich aus Dimethylsulfoxid (DMSO) und 20 %iger Glyzerinlösung (in A. bidest.) zusammen (beides Merck, Darmstadt, Germany). Von diesen Stocks wurden die Bakterien zu Beginn des jeweiligen Versuchs aufgetaut.

Die für die Versuche benötigten, aufgetauten Bakterienstämme wurden mit einer sterilen Impföse dem Eppendorfgefäß entnommen und auf Columbia-Blutagar-Platten ausgestrichen. Die Inkubation der Bakterienstämme in den Anzuchtgefäßen erfolgte unter anaeroben Bedingungen bei 37 °C, bis sich Koloniewa chstum zeigte.

Nach 48 h wurden einzelne Kolonien in flüssigem Nährmedium in Erlenmeyerkolben resuspendiert. Die so gewonnene Suspension wurde ohne weitere Aufbereitung zur Biofilmherstellung verwendet.

4.1.3 Nährmedien

Für die Anzucht von oralen Mono- und Multispeziesbiofilmen musste ein Nährmedium gefunden werden, in dem möglichst viele der oben aufgeführten Bakterien unter anaeroben Bedingungen kultivierbar sind.

Um ein solches gemeinsames Wachstum der Testkeime zu ermöglichen, wurden verschiedene Medien wie modifiziertes Todd-Hewitt-Bouillon (Becton Dickinson, Sparks, USA), modifiziertes PYG-Medium (Peptone Yeast Extract Glucose Medium, DSMZ GmbH, Braunschweig, Germany) und Tryptikase-Soja-Bouillon mit Hefeextrakt (Becton Dickinson, Sparks, USA), die nach Herstellerangaben zubereitet wurden, getestet (siehe Tab. 1). Alle Medien wurden durch Autoklavieren sterilisiert und in sterile Infusionsflaschen (1 l) abgefüllt. Vor jedem Versuch wurden die Medien mindestens 24 h unter anaeroben Bedingungen vorreduziert.

Medium	Supplement
Todd-Hewitt-Bouillon	Hefeextrakt (5 g/l), Cystein (0,75 g/l), Haemin (5 mg/l) und Vitamin K (200 µl/l)
PYG-Medium	Hefeextrakt (10 g/l), Cystein (0,5 g/l), Haemin (5 mg/l) und Vitamin K (200 µl/l)
Trypticase-Soja-Bouillon	Hefeextrakt (3 g/l)

Tab. 1: Zusammensetzung der verwendeten Medien (nach DSMZ)

4.1.4 Biofilmträger

Als Probeplättchen kamen Thermanox®-Deckgläschen (Thermanox®coverslips, Nunc Inc., IL, USA) zur Anwendung. Um für die verschiedenen Bakterienkulturen möglichst gleiche Versuchsbedingungen zu schaffen, wurden 24-Well-Platten (Well-Durchmesser 1,5 cm, Fläche ca. 10 cm², Nunc GmbH, Dänemark) verwendet (siehe Abb. 5). Damit konnte der Effekt der verschiedenen Mundspüllösungen unter gleichen Wachstumsbedingungen der Biofilme auf einer Platte untersucht werden.

Thermanox®-Deckgläschen mit einem Durchmesser von 13 mm wurden unter sterilen Bedingungen mit einer sterilen Pinzette in die 24-Well-Platten gelegt, jeweils ein Deckgläschen pro Well.

4.2 Kultivierung von In-Vitro-Multispeziesbiofilmen

Es galt herauszufinden, ob und auf welche Art und Weise die genannten Bakterienstämme unter gleichen Kulturbedingungen sowohl einzeln als auch zusammen in einem Medium auf den Thermanox®-Deckgläschen wachsen. Dazu wurden verschiedene Nährmedien (siehe Tab. 1) unter anaeroben Bedingungen mit je einem Bakterienstamm beimpft und bei 37 ℃ in Erlenmeyerkolben für 48 h inkubiert, wobei nach 24 h etwa 75 % des Mediums durch frisches ersetzt wurden.

Ein Medium, in dem die Mehrzahl der Bakterienstämme als einzelne Wachstum zeigten (siehe Ergebnisse Kap. 5.1.2), wurde für die Kultivierung des Multispeziesbiofilms evaluiert. Die dafür verwendeten Spezies waren: *P. gingivalis, P. intermedia, A. naeslundii, F. nucleatum subspecies polymorphum* und *S. mutans.*

Zur Herstellung des Multispeziesbiofilms wurden jeweils gleiche Volumina (500 µl) der vorkultivierten Monospeziesbiofilme vereinigt, auf 20 ml mit frischem Medium aufgefüllt

und bei 37 ℃ in Erlenmeyerkolben für 48 h anaerob inkubiert. Vor der Inokulation wurde der in der Vorkultivierung entstandene Biofilm aufgewirbelt und in Suspension gebracht. Das Inokulumvolumen (250 µl) wurde auf die Thermanox®-Deckgläschen in den 24-well-Platten gegeben, mit 1 ml frischem Medium bedeckt und bei 37 ℃ anaerob inkubiert. Alle 24 h wurde 1 ml Medium entfernt und frisches Medium zugeführt.

Nach einer Inkubationszeit von 5 Tagen wurden die entstandenen Multispeziesbiofilme fixiert und für die Rasterelektronenmikroskopie aufbereitet (siehe Kap. 4.6).

4.3 Entnahme und Weiterkultivierung von In-vivo-Multispeziesbiofilmen

Patienten mit initialer Parodontitis der Abteilung für Parodontologie und Synoptische Zahnmedizin der Zahnklinik der Charité Berlin wurden mündlich und schriftlich über ihre Erkrankung, die Behandlungsmöglichkeiten und die folgende Untersuchung aufgeklärt. Der Patient wurde darüber informiert, dass die Plaqueentnahme wissenschaftlichen Zwecken dient und ihm daraus kein Diagnose- oder Behandlungsvorteil entsteht. Voraussetzung war die Freiwilligkeit der Teilnahme und die Kenntnisnahme, dass die Nichtteilnahme zu keinem Behandlungsnachteil führt. Nach erfolgter Einwilligung wurden supra- und subgingivale Plaqueproben mittels einer sterilen Kürette (M23A, GX4, A. Deppeler, Schweiz) von füllungs- und kariesfreien Approximal- bzw. Bukkalflächen von Zähnen mit mindestens 6 mm Taschentiefe gewonnen. Die dentalen Biofilmproben wurden sofort in 1 ml vorreduziertes Medium überführt, das bei Umgebungstemperatur (circa 20 ℃) aufbewahrt wurde.

Die so gewonnenen Proben wurden bei 37 ℃ für 48 h anaerob in Erlenmeyerkolben vorkultiviert, um die Einstellung eines neuen Gleichgewichtes zwischen den im Medium überlebenden Bakterienspezies zu ermöglichen. Nach 24 h wurde frisches Medium supplementiert.

Nach der Vorkultivierung wurden jeweils 250 µl der oralen Biofilmspezies als Inokulumvolumen zu je 750 µl Medium hinzugefügt und auf den Thermanox®-Deckgläschen in 24-Well-Platten bei 37 ℃ anaerob inkubiert. Auch hier wurde der in den 48 h der Vorkultivierung entstandene Biofilm vor der Inokulation aufgewirbelt und damit in Suspension gebracht.

Alle 24 h erfolgte ein Mediumwechsel, wobei 75 % des Mediums vorsichtig mit einem langsamen Pippettenhub entfernt und frisches Medium hinzugefügt wurde.

4.4 Wirkung einer Mundspüllösung auf In-vivo-Multispeziesbiofilme

In diesem Versuch sollte voerst nur die Wirkung einer einzelnen Mundspüllösung (Listerine®) auf Multispeziesbiofilme aus In-vivo-Material getestet und das Verfahren validiert werden. Dazu erfolgte die Untersuchung der Biofilmproben von vier verschiedenen Patienten, die wie in Kap. 4.3.1. dargestellt entnommen und vorkultiviert wurden.

Pro Patient wurde der Biofilm auf fünf Thermanox®-Deckgläschen angezüchtet, wobei zwei davon als Kontrolle dienten. Nachdem sich nach 7 Tagen ein makroskopisch deutlich sichtbarer Biofilm etabliert hatte, wurden die Biofilme in den folgenen 21 Tagen täglich 30 Sekunden mit Listerine® bzw. mit Kontrolllösung behandelt (siehe Abb. 5). Als Kontrolllösung diente eine sterile, phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS - phosphate buffered saline, pH 7,2). Für die Behandlung des Biofilms wurde zunächst das Medium entnommen, 1 ml der Mundspüllösung vorsichtig auf den Biofilm gegeben und nach einer Einwirkzeit von 30 Sekunden wieder sorgfältig abgenommen. Anschließend wurde wieder frisches Medium supplementiert.

Nach 21 Tagen wurden die Proben wie in Kap. 4.6 beschrieben fixiert und im Rasterelektronenmikroskop (REM) untersucht.

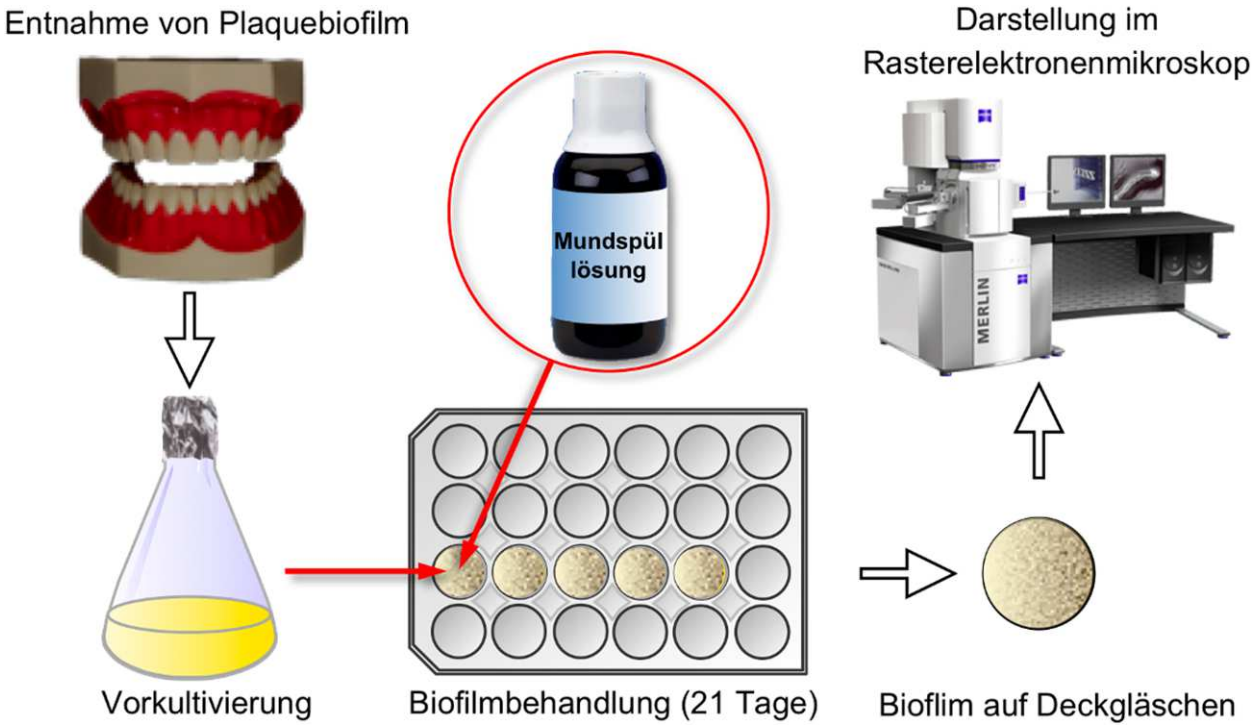


Abb. 5: Schema des Versuchsablaufs

4.5 Vergleich der Wirkung verschiedener Mundspüllösungen auf In-vivo-Multispeziesbiofilme

Für diesen Versuch wurden von sieben Patienten (Alter: 23 - 30 Jahre, Durchschnittsalter 26,5 Jahre) wie im Kap. 4.3 beschrieben, parodontale Plaqueproben entnommen und *in vitro* weiterkultiviert (siehe Abb. 5). Die auf je fünf Thermanox®-Deckgläschen angezogenen Plaquebiofilme eines jeden Patienten wurden mit vier verschiedenen Mundspüllösungen (siehe Prüfsubstanzen, Kap. 4.7) und einer Kontrolllösung (PBS) behandelt. Dazu wurde das Medium entnommen, 1 ml der Mundspüllösung vorsichtig auf den Biofilm gegeben und nach der Einwirkzeit von 30 Sekunden wieder sorgfältig abgenommen. Anschließend wurde wieder frisches Medium supplementiert. Nach drei Wochen Behandlung erfolgte die Fixierung und anschließende Untersuchung der Biofilme im REM wie in Kap. 4.6 dargestellt wird.

4.6 Darstellung von Biofilmen mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie

Als Rasterelektronenmikroskop (REM) (englisch: scanning electron microscope (SEM)) bezeichnet man ein Elektronenmikroskop, bei dem ein Elektronenstrahl zeilenweise

über das zu vergrößernde Objekt geführt wird, wobei die Rückstreuung von Sekundärelektronen zur Erzeugung eines Bildes des Objekts genutzt wird. Die auf diese Weise erhaltenen Bilder sind Abbildungen der Objektoberfläche mit einer Auflösung von 1 nm.

Um die Thermanox®-Deckgläschen inklusive des auf ihnen haftenden Biofilms elektronenmikroskopisch untersuchen zu können, wurden sie nach der Fixierung und Entwässerung mit einer dünnen, leitenden Metallschicht belegt, um elektrostatische Aufladungen, die zu Bildverzerrungen führen, zu vermeiden. Die einzelnen Schritte von der Vorbereitung bis zur Mikroskopierung werden im Folgenden beschrieben:

In der Anaerobierkammer wurden 800 µl des Mediums entfernt und vorsichtig 1 ml Karnovskylösung (s.u.) [Karnovsky, 1965] zugegeben. Dann wurden die fixierten Proben ausgeschleust und bei 4 ºC aufbewahrt.

Die nach Morris J. Karnovsky benannte Lösung wird wie folgt hergestellt:

2 g Paraformaldehydpulver (4 %) (Merck, Darmstadt, Germany) werden in 25 ml A. bidest. bei 60 ℃ unter Rühren und Erwärmen gelö st. Anschließend erfolgt die Zugabe von 300 µl (1 Mol) Natronlauge (NaOH) und die Inkubation der Lösung, bis sich das Paraformaldehyd vollständig gelöst hat und die Lösung klar ist. Nach Abkühlen der Lösung werden 5 ml eines 25 %igen Glutaraldehyds (Serva Feinbiochemica GmbH & CoKG, Heidelberg, Germany) supplementiert. Das Volumen wird mit PBS auf 50 ml aufgefüllt. Nach Einstellen des pH 7,2 mit 1 Mol Salzsäure (HCl) wird die Lösung sterilfiltriert (0,2 µm Porengröße) und anschließend bei 4 ℃ gelagert.

Die Entwässerung der Proben erfolgte über eine aufsteigende Ethanolreihe. Die Thermanox®-Deckgläschen wurden nacheinander für jeweils 20 min in 40 %-, 60 %-, 80 %- und dreimal in 100 %-igem Ethanol (C_2H_6O) inkubiert. Anschließend erfolgte die Kritische-Punkt-Trocknung in Kohlendioxid (CO_2) bei 65 bar und 40 ℃ im Kritischen-Punkt-Trocknungsgerät (Modell CPD 030, Balzers, Lichtenstein). Die 10 nm dicke Goldbedampfung (Sputtercoating) der Proben erfolgte bei 4 ℃ im Sputterungsgerät (Modell E 5100, Polaron Instruments, UK). Bis zur Untersuchung im REM lagerten die Proben in einem Exsikkator (NALGENE; Hamburg, Germany).

Die Aufnahmen wurden mit dem Elektronenmikroskop LEO 1530 Field Emission Scanning Electron Microscope (LEO-Elektronenmikroskopie GmbH, Germany) bei einer Betriebsspannung von 5 KV (Kilovolt) angefertigt. Bei Proben, die sich im Elektronenstrahl instabil verhielten, wurde die Betriebsspannung auf 2 - 3 KV herabgesetzt. Die mikro-

skopischen Aufnahmen der Biofilme erfolgten bei 65.- bis 100.000facher Vergrößerung. Für die weitere Auswertung wurden alle Bilder digital im TIF-Format gespeichert.

4.6.1 Standardisiertes Protokoll für die Bilddokumentation im REM

Die Darstellung der mit Biofilm bewachsenen Thermanox®-Deckgläschen (Kontrolle und Vergleich) erfolgte im REM. Dabei wurde für jede Probe ein standardisiertes Aufnahmenprotokoll abgearbeitet. Die Deckgläschen wurden anhand von vier Standardfeldern pro Biofilmträger (siehe Abb. 6) mit verschiedenen Aufnahmevergrößerungen (siehe unten 1. - 3.) dokumentiert. Der Arbeitsabstand im REM betrug für Übersichtsaufnahmen 15 mm, für Regionalaufnahmen 10 mm und für Detailaufnahmen 5 mm.

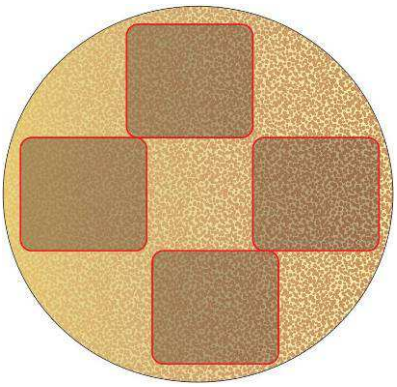


Abb. 6: Vier Standardfelder auf einem Deckgläschen

1. **Übersichtsaufnahme**
   Mit minimaler Vergrößerung (~ 60 − 100fach) wird die prozentuale Belegungsfläche der Biofilmträger ermittelt.

2. **Ausschnittsvergrößerung (Regionalaufnahme)**
   In diesen Aufnahmen mit mittlerer Vergrößerung (~ 1000 − 2500fach) sind Makrokolonien des Biofilms erkennbar. Bei dieser Vergrößerung kann auch die Dicke des Biofilms (einschichtig, mehrschichtig, vielschichtig) abgeschätzt werden.

3. **Detailaufnahmen**
   In dieser Aufnahmevergrößerung (> 9000fach) sind die einzelnen Bakterienmorphologien deutlich erkennbar.

4.6.2 Standardisierte Auswertung der REM-Bilder

Für die vergleichende Auswertung wurden die gespeicherten Bilddateien der Biofilmproben nach einem standardisierten Auswertungsprotokoll auf folgende Parameter hin untersucht:

Bakterielle Morphotypen

Die Aufgabe der visuellen Auswertung war, möglichst alle bakteriellen Morphotypen zu identifizieren, um die Morphodiversität darstellen zu können. Das Auszählen der bakteriellen Morphotypen wurde von einem einzigen Untersucher durchgeführt. Dabei war die Anzahl der auszuzählenden Morphotypen auf sechs Grundmorphotypen beschränkt. Ausgezählt wurden Kokken, Kurzstäbchen, mittellange Stäbchen, Langstäbchen, pleomorphe Stäbchen und begeißelte Stäbchen. Pro Probe erfolgte eine Auszählung von je drei verschiedenen Detailaufnahmen, wobei immer auf einer Standardfläche von 100 µm² ausgezählt wurde [Schaudinn, 2009]. Von den drei so gewonnenen Messwerten wurde aufgrund der geringen Probenzahl anschließend der Median gebildet und diese Zahl als Bakterienmenge pro Morphotyp vermerkt. Die Anzahl der einzelnen Morphotypen wurde im Anschluß mit der medianen Biofilmdicke multipliziert und auf eine Standardfläche von 1 cm² hochgerechnet.

Der Median (50. Perzentil) ist ein Häufigkeitsmittel. Er ist derjenige Wert, der eine der Größe der Einzelwerte nach geordnete Reihe so halbiert, dass jeder Teil 50 % der Verteilung enthält. Der Median $\tilde{x}$ einer Probe (x_1, x_2, x_n) von *n* ungeraden Messwerten ist $\tilde{x}$ = x (n+1)/2. Somit ergibt der Median von Aufnahme 1 (x_1), Aufnahme 2 (x_2) und Aufnahme 3 (x_3) die Bakterienmenge des ausgezählten Morphotyps.

Mediane Biofilmdicke

Der Versuchsparameter Biofilmdicke ergab sich aus der durchschnittlichen Schichthöhe des Biofilms, also der Anzahl der Bakterienschichten. Diese wurde auf den Aufnahmen mit mittlerer Vergrößerung aufgrund von Messungen an drei verschiedenen Stellen bestimmt. Von den drei erhaltenen Messwerten pro Biofilmträger wurde wiederum der Median ermittelt und mit den Werten der Bakterienmenge pro Morphotyp auf das Gesamtvolumen hochgerechnet.

Prozentuale Belegungsfläche

Es erfolgte eine Abschätzung, wieviele Prozent des Deckgläschens (5 %, 10 %, 25 %, 33 %, 50 %, 66 %, 75 %, 90 %, 95 %) mit Biofilm belegt sind. Dieser Wert wurde an-

schließend mit dem Gesamtvolumen multipliziert und ergab somit den prozentualen Anteil der einzelnen Morphotypen an der Gesamtmenge der Bakterien auf einem Probeplättchen.

Gesamtbakterienmenge

Pro Probe konnten somit sechs Werte ermittelt werden, die in der Summe die Gesamtbakterienmenge pro Biofilmträger ergaben.

Jedem ausgezählten Morphotyp wurden ein Symbol und eine Farbe zugeordnet. Die Ergebnissdaten wurden in Tabellen graphisch dargestellt.

Formel zur Errechnung der:

1. **Menge der einzelnen Morphotypen**

   Bakterienmenge pro Morphotyp x mediane Biofilmdicke x prozentuale Belegungsfläche = Gesamtvolumen pro Morphotyp.

2. **Gesamtbakterienmenge**

   Summe der Gesamtvolumina (pro Morphotyp)

3. **Prozentualer Anteil der einzelnen Morphotypen**

   Das Gesamtvolumen pro Morphotyp (1.) multipliziert mit 100 % und dividiert durch die Summe der Gesamtvolumina (2.) ergibt den prozentualen Anteil der einzelnen Morphotypen.

4.7 Prüfsubstanzen

Auf Grund der Vielfalt der auf dem Markt existierenden Mundspüllösungen beschränkte sich die vorliegende Studie auf vier Präparate, die unterschiedliche Wirkstoffgruppen (Chlorhexidindigluconat, Phenolderivate, Hexetidin, Zinnfluoride) repräsentieren. Im Folgenden werden diese Substanzen und ihre Zusammensetzung tabellarisch vorgestellt.

4.7.1 Chlorhexamed Forte® 0,2 %

(GlaxoSmithKline Consumer Healthcare GmbH & Co Kg, München, Germany)

Deklarierte Indikationen:

- Keimzahlverminderung im Mundraum
- Vorübergehende unterstützende Therapie zur mechanischen Reinigung bei bakteriell bedingten Entzündungen des Zahnfleisches und der Mundschleimhaut
- bei eingeschränkter Mundhygienefähigkeit

Wirkstoffe	Funktion
Chlorhexidindigluconat	Antiseptischer Wirkstoff (0,2 g)
Glycerol	Lösungsmittel/Konservierungsmittel
Wasser	Lösungsmittel
Ethanol	Lösungsmittel
Macrogol-Glycerolhydroxistearat	Emulgator (senkt die Oberflächenspannung)
Aromastoffe	Geschmacksstoffe
Cochenillerot A (E124)	Farbstoff

Tab. 2: Zusammensetzung von Chlorhexamed Forte® 0,2 %

4.7.2 Listerine®

(Warner-Lambert, Consumer Healthcare Products, Freiburg, Germany)

Deklarierte Indikationen:

- Ergänzung der täglichen Mundhygiene
- Mundgeruch
- Parodontitisschutz

Wirkstoffe	Funktion
Eukalyptol, Menthol, Thymol	Antiseptische Wirkstoffe
Methylsalicylat	Antimikrobieller Wirkstoff
Wasser	Lösungsmittel
Alkohol	Lösungsmittel
Poloxamer 407	Lösungsvermittler
Benzoesäure	pH-Regulator, Konservierungsmittel
Natrium Benzoat	pH-Regulator, Konservierungsmittel
Saccharinnatrium	Süßstoff
Sorbitol	Süßstoff
Aromastoffe	Geschmacksstoffe
CI 42053	Farbstoff

Tab. 3: Zusammensetzung von Listerine®

4.7.3 Hexoral®

(Pfizer Pharma GmbH, Berlin, Germany)

Deklarierte Indikationen:

- Entzündliche und infektiöse Affektionen im Mund und Rachenraum
- grippale Infekte, Angina tonsillaris, Pharyngitis, Gingivitis, Stomatitis, Aphten

Wirkstoffe	**Funktion**
Hexetidin	Antiseptischer Wirkstoff
Methylsalicylat	Antimikrobieller Wirkstoff
Polysorbat 60	Lösungsmittel/Konservierungsmittel
Wasser	Lösungsmittel
Ethanol	Lösungsmittel
Citronensäure-Monohydrat	pH-Regulator, Konservierungsmittel
Saccharin-Natrium	Süßstoff
Aromastoffe	Geschmacksstoffe
Levomenthol	Aromatikum
Anis-, Nelken-, Eucalyptus-, Pfefferminzöl	Aromastoffe
Azorubin (E 122)	Farbstoff

Tab. 4: Zusammensetzung von Hexoral®

4.7.4 Meridol®

(Gaba GmbH, Lörrach, Germany)

Deklarierte Indikationen:

- bei erschwerter Mundhygiene
- Mundtrockenheit
- zur Unterstützung bei Parodontalbehandlungen
- wenn keine Möglichkeit der mechanischen Plaquebeseitigung besteht

Wirkstoffe	**Funktion**
Olafluor	Antiseptischer Wirkstoff
Zinnfluorid	Antiseptischer Wirkstoff
PVP	Stabilisator (Polyvinylpyrrolidon)
PEG-40 Hydrogenated Castor Oil	Emulgator
Wasser	Lösungsmittel
Aromastoffe	Geschmacksstoffe
Xylitol	Süßstoff
Sodium Sacharin	Süßstoff
CI 42051 (Ariavitblau)	Farbstoff

Tab. 5: Zusammensetzung von Meridol®

5 Ergebnisse

5.1 Kultivierung von In-vitro-Multispeziesbiofilmen

5.1.1 Testkultivierung

Die Testkultivierung diente dazu, die gleiche Zusammensetzung für alle Folgeversuche zu garantieren. Durch gleiche Kulturbedingungen werden Reproduzierbarkeit und vergleichbare Ergebnisse gewährleistet.

5.1.2 Nährmedien

In der vorliegenden Untersuchung wurden verschiedene Medien getestet, um möglichst viele verschiedene Bakterienspezies in einem Medium gleichzeitig kultivieren zu können. Als Wachstumsmedium für die Biofilme diente eine modifizierte Todd-Hewitt-Bouillon, die mit Hefeextrakt (5 g/l), Cystein (0,75 g/l), Haemin (5 mg/l) und Vitamin K (200 µl/l) supplementiert war [Dorn et al., 1998; Leung et al., 1998].

5.1.3 Biofilmzusammensetzung

Im Todd-Hewitt-Medium konnte ein bakterielles Ko-Wachstum der Bakterienspezies *P. gingivalis, P. intermedia, A. naeslundii, F. nucleatum subspecies polymorphum* und *S. mutans* ermöglicht werden. Die kontinuierliche Kultivierung von Reinkulturen aller fünf Bakterienstämme sicherte eine stets ausreichende Zahl von Bakterien zur Inokulation von Mischkulturen für eine Plaquesimulation. Während *A. naeslundii* und *S. mutans* deutlich dem supragingivalen Bereich sowie *P. gingivalis* und *P. intermedia* dem subgingivalen Bereich zugeordnet werden können, ist *F. nucleatum subspecies polymorphum* eher am Übergang vom supra- zum subgingivalen Bereich der parodontalen Läsion zu finden [Kolenbrander, 2000].

Die entstandenen Biofilme sind in Abb. 7 beispielhaft dargestellt.

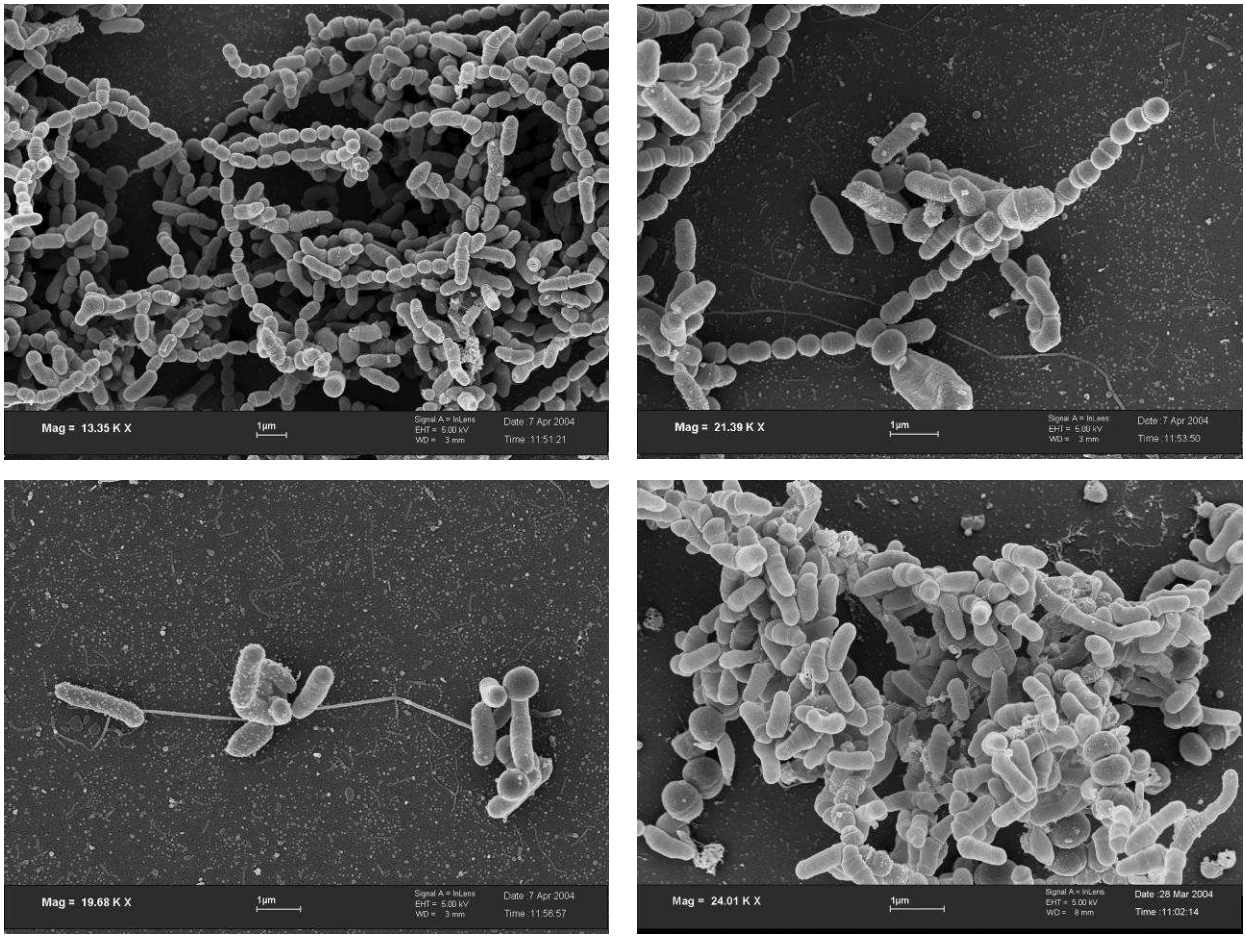


Abb. 7: In-vitro-Multispeziesbiofilm

5.2 Kultivierung von In-vivo-Multispeziesbiofilmen

Aufgrund der veränderten Wachstumsbedingungen (insbesondere des Nährstoffangebotes) beim Überimpfen der *in vivo* gewonnenen Bakterienproben in das Vorkultivierungsmedium verändert sich die Zusammensetzung der Bakterienflora: die vorher sub- und supragingivale Speziesmischung verschiebt sich hauptsächlich hin zu Kokken und Actinomyceten sowie einigen Stäbchen, also hin zur Zusammensetzung des Biofilms im gesunden Sulkus, auf Approximalflächen, Fissuren und Glattflächen von Zähnen und zu bei Gingivitis im Sulkus vorherrschenden Actinomycesarten und Stäbchen.

5.3 Wirkung einer Mundspüllösung (Listerine®) auf In-vivo-Multispeziesbiofilme

In diesem Vorversuch wurde die Wirkung der Prüfsubstanz Listerine® auf die Biofilmbildung nach einem Zeitintervall von 21 Tagen mittels REM untersucht. Dabei wurde der Effekt der Mundspüllösung im Vergleich zur Kontrolllösung (PBS) bewertet. 20 Biofilmproben auf Thermanox®-Deckgläschen konnten analysiert werden. Auf den unbehandelten Biofilmträgern zeigten sich bezüglich Bakterienzusammensetzung und Wachstumsstärke des Biofilms von Proband zu Proband unterschiedlich dichte Biofilme. Auf den behandelten Deckgläschen waren nur hin und wieder ein Bakterium oder eine kleine Kolonie zu finden. Da in dieser Testreihe lediglich vier Probanden untersucht wurden, erfolgte keine statistische Auswertung der Daten.

Die Wirkung der genannten Mundspüllösung ist in Abb. 8 dargestellt, die zur besseren Veranschaulichung aus Einzelbildern unterschiedlicher Zeitpunkte (vor und nach der Behandlung) zusammengestellt ist.

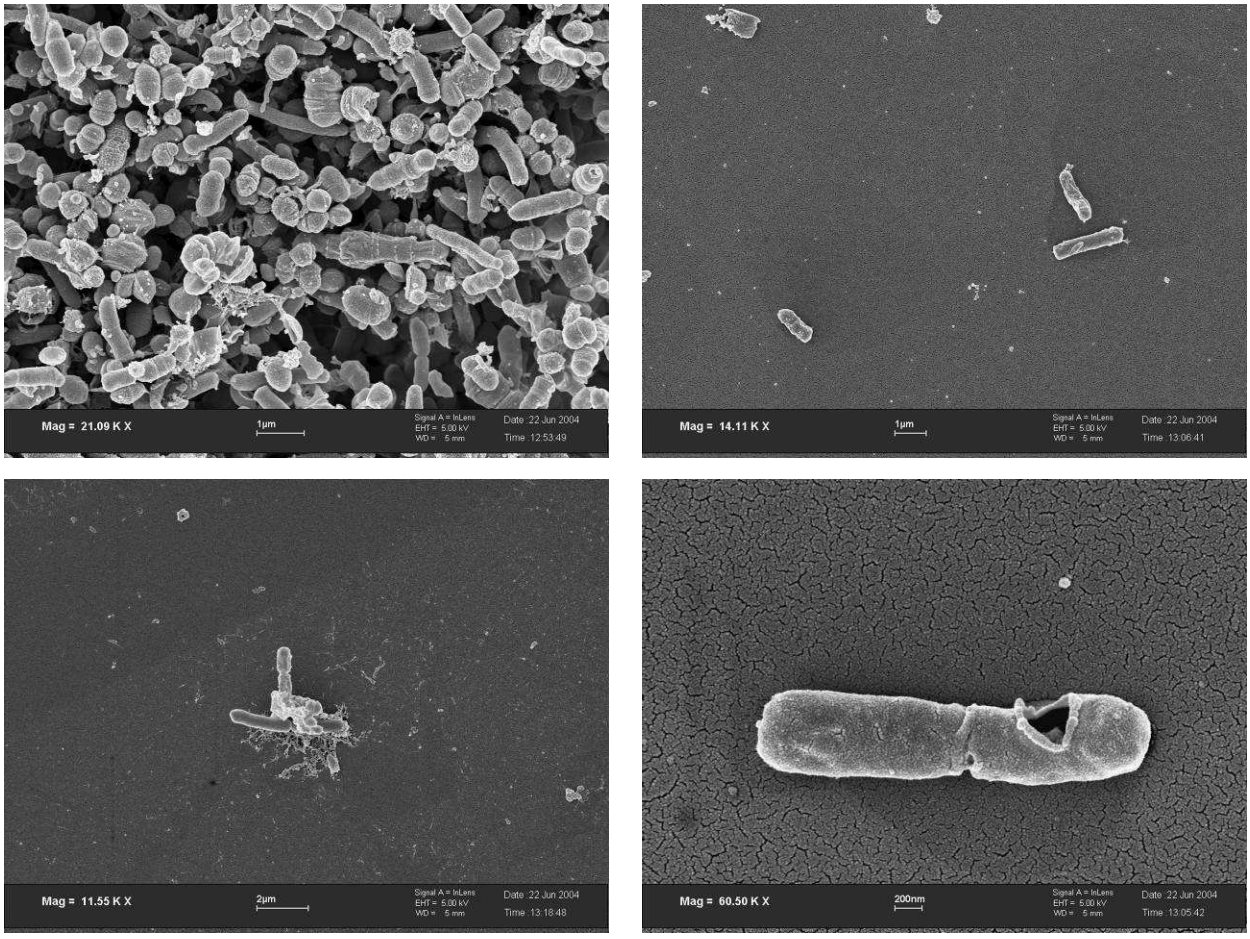


Abb. 8: Biofilm vor und nach der Wirkung der Mundspüllösung Listerine®

5.4 Vergleichende Wirkung verschiedener Mundspüllösungen auf In-vivo-Multispeziesbiofilme

Alle den sieben Probanden *in vivo* entnommenen Biofilmproben zeigten nach der In-vitro-Kultivierung ein Biofilmwachstum. Auch nach der Überimpfung dieser Biofilmproben auf die 24-Well-Platten mit den Thermanox®-Plättchen etablierte sich auf allen Deckgläschen der Biofilm neu. Somit konnten alle Biofilme mit je einer Mundspüllösung bzw. der Kontrolllösung behandelt und anschließend im REM untersucht und ausgewertet werden.

Bei der mikroskopischen Untersuchung zeigten die mit den verschiedenen Mundspüllösungen behandelten Biofilmproben unterschiedlich starkes Wachstum (Biofilmdicke) und eine unterschiedliche Zusammensetzung der Bakterienmorphotypen. Durch das systematische Abrastern der Oberfläche mit dem REM konnten die verschieden starken Ansammlungen adhärierter Bakterien dokumentiert werden. Dabei stellte sich der Biofilm meistens als mehrere Mikrometer dick dar.

Während bei den unbehandelten Proben durchschnittlich 10 − 15 unterschiedliche Morphotypen in unterschiedlichen Häufigkeiten erkennbar waren, zeigten sich auf den behandelten Biofilmträgern nur wenige Morphotypen: hin und wieder ein einzelnes Bakterium oder eine kleine Bakterienkolonie. Weite Bereiche der Oberfläche waren bakterienfrei. Die überwiegend vorhandenen Morphotypen waren Kokken. Aggregationen und Koaggregationen verschiedener Morphotypen konnten oftmals beobachtet werden.

Der Vergleich akkumulierter Bakterien auf den verschiedenen Biofilmträgern zeigt eine Änderung der phänotypischen Eigenschaften des Biofilms in Abhängigkeit von der Mundspüllösung.

5.5 Darstellung von Biofilmwachstum mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie

Auf den folgenden Abbildungen sind neben den Kontrollbildern die mikroskopischen Bilder der mit den vier verschiedenen Mundspüllösungen behandelten Multispeziesbiofilmproben beispielhaft für einen Probanden (Proband 1) dargestellt. Dabei werden verschiedene Vergrößerungen (a = Übersicht, b = Regional, c = Detail) gezeigt (siehe Abb. 9 –13 a-c).

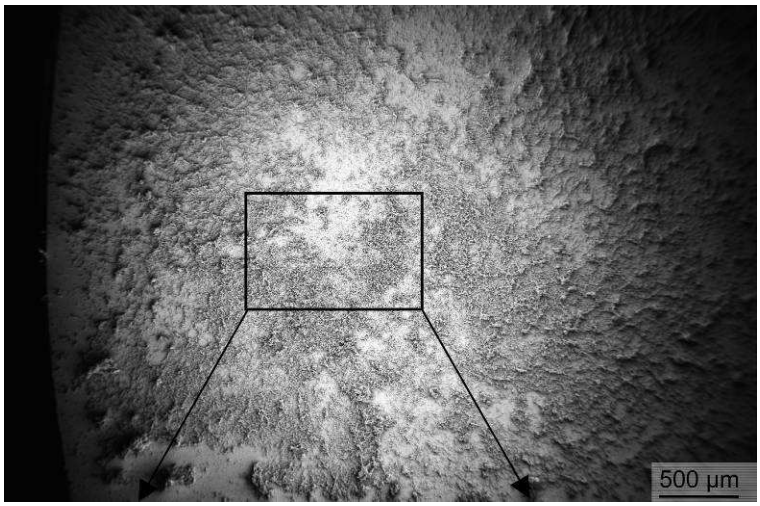
In der Übersichtsaufnahme (minimale Vergrößerung: ~ 60 − 100fach) wurde die prozentuale Belegungsfläche des Biofilmträgers, also die Verteilung des Biofilms auf dem Deckgläschen, ermittelt. Eine erste Angabe zur Schichtstärke der Bakterienkolonien ist hier ebenfalls möglich.

In der Ausschnittsvergrößerung bzw. der Regionalaufnahme (mittlere Vergrößerung: ~ 1000 − 2500fach) sind die Biofilmschichten sowie einzelne Bakterienkolonien erkennbar. Bei dieser Vergrößerung konnte auch die Dicke bzw. Höhe des Biofilms (einschichtig, mehrschichtig, vielschichtig) abgeschätzt werden.

In den Detailaufnahmen (Vergrößerung: > 9000fach) sind die einzelnen Bakterienmorphologien deutlich erkennbar.

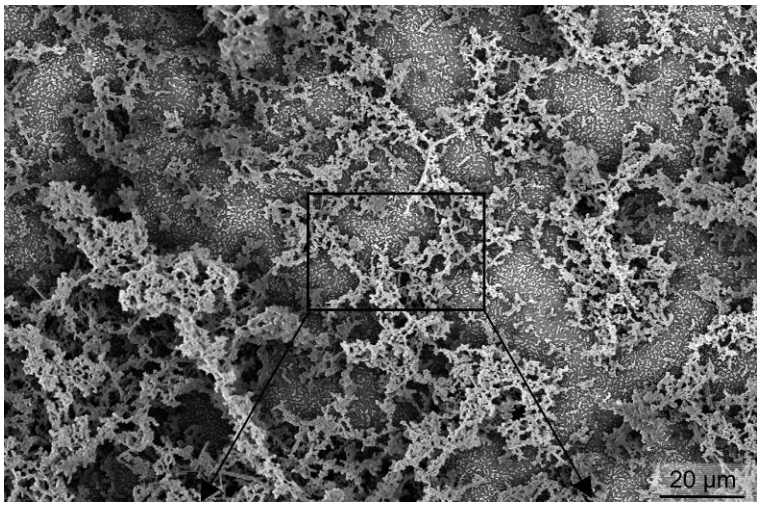
5.5.1 In-vivo-Multispeziesbiofilm, behandelt mit Kontrolllösung (PBS)

Die Darstellung des mit PBS behandelten Plaquebiofilms zeigt eine lockere Belegung des Deckgläschens. Im Detail sind verschiedene Bakterienmorphotypen erkennbar, die Koloniewachstum zeigen.



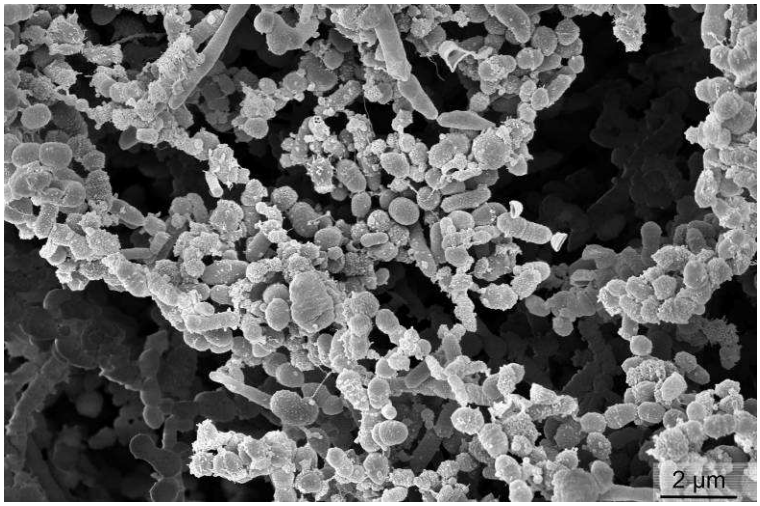
a) Übersichtsaufnahme

Die gesamte Oberfläche des Deckgläschens ist beinahe vollständig mit einem vielschichtigen Biofilm bedeckt.



b) Regionalaufnahme

Der mehr- und vielschichtige Biofilm untergliedert sich in zahlreiche Kolonien verschiedener Größen.



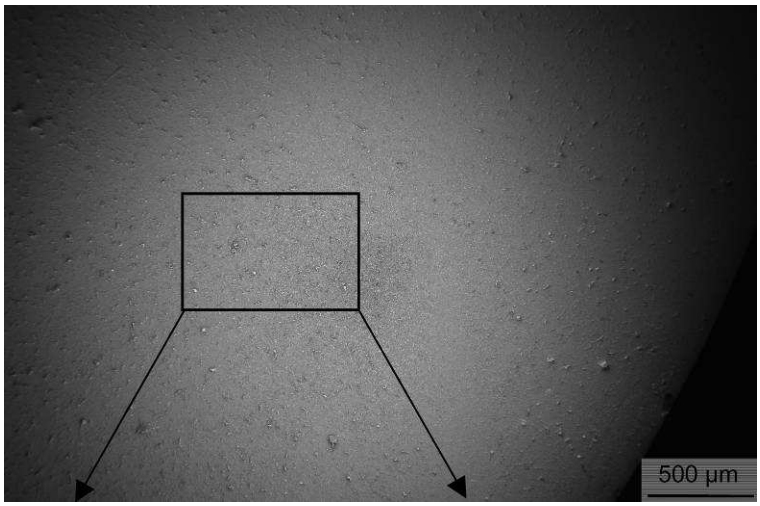
c) Detailaufnahme

Die Kolonien weisen eine große bakterielle Vielfalt auf. Hierzu gehören verschiedene Morphotypen wie Kokken, gerade Kurzstäbchen und pleomorphe Stäbchen unterschiedlicher Länge.

Abb. 9: Biofilm, behandelt mit Kontrolllösung (PBS)

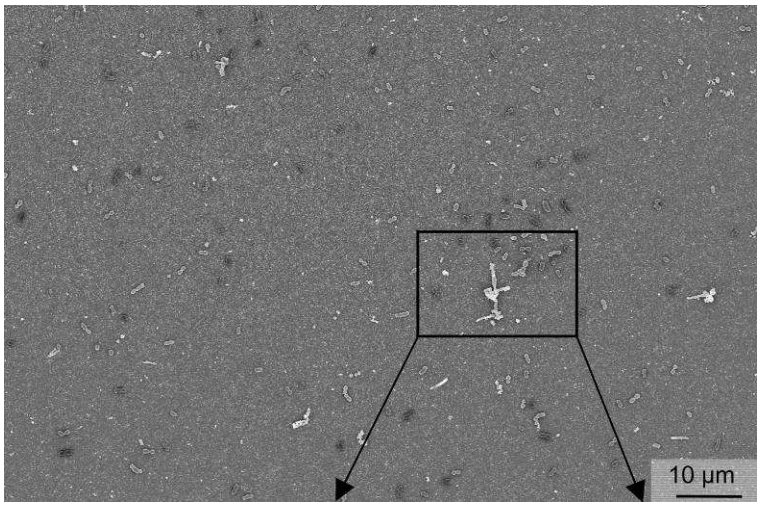
5.5.2 In-vivo-Multispeziesbiofilm, behandelt mit Chlorhexamed Forte® 0,2 %

Auf dem mit Chlorhexamed Forte® 0,2 % behandelten Biofilmcarrier befindet sich ein dünner Biofilm mit vereinzelten kleinen Bakterienkolonien. Weite Bereiche der Oberfläche sind nahezu bakterienfrei.



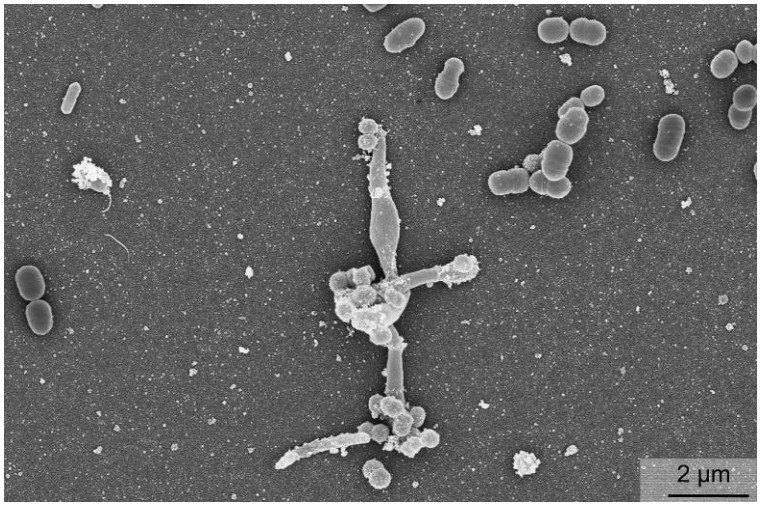
a) Übersichtsaufnahme

Auf diesem Deckgläschen ist der Biofilm kaum erkennbar was auf eine nur partielle, einschichtige Belegung hinweist.



b) Regionalaufnahme

Auf diesem Ausschnitt aus der Übersichtsaufnahme (Rechteck) sind nur vereinzelte Bakterien und eine kleine Kolonie zu sehen.



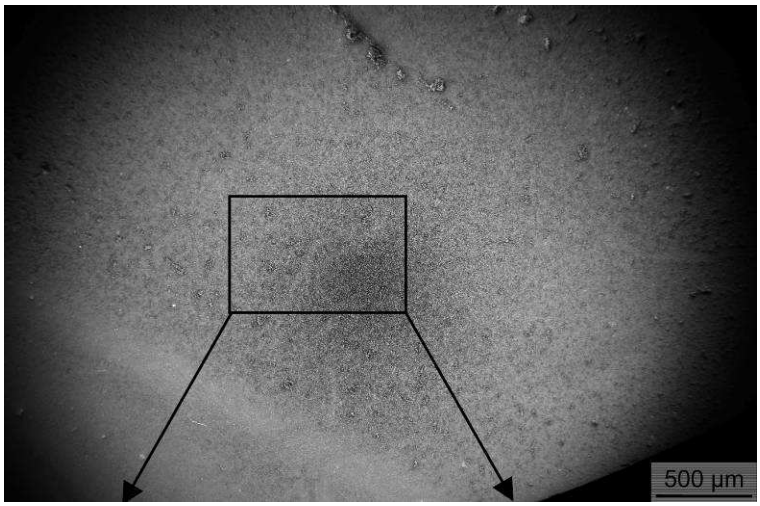
c) Detailaufnahme

Dieses Bild zeigt die Bakterienkolonie aus der Regionalaufnahme (Rechteck). Zu erkennen sind überwiegend Kokken sowie einige Kurz- und Langstäbchen.

Abb. 10: Biofilm, behandelt mit Chlorhexamed Forte® 0,2 % (CHX)

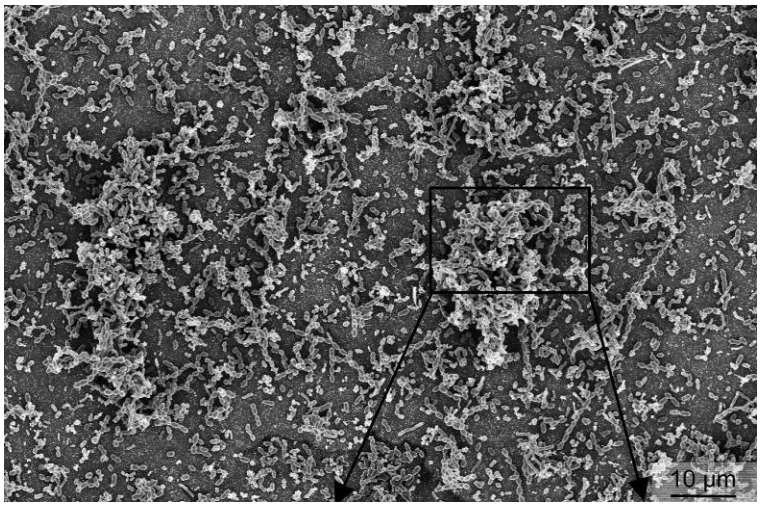
5.5.3 In-vivo-Multispeziesbiofilm, behandelt mit Listerine®

Der mit Listerine behandelte Biofilm zeigt eine deutlich geringere Belegung des Biofilmcarriers mit größeren Bakterienkolonien. Auf der Carrieroberfläche wechseln sich Stellen sehr dichter Besiedlung mit Stellen geringerer Bedeckung ab.



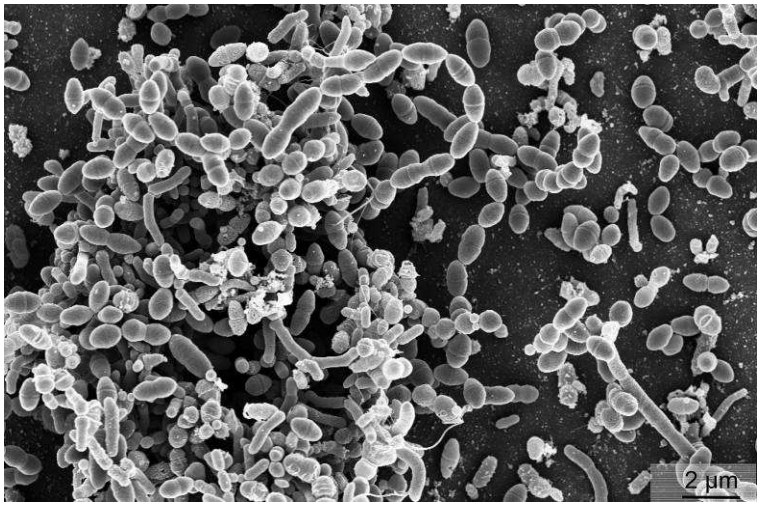
a) Übersichtsaufnahme

Die Übersicht zeigt ein nur gering belegtes Deckgläschen, das nur wenige Kolonien aufweist. Der Biofilm ist ein- bis mehrschichtig.



b) Regionalaufnahme

Die Mehrzahl der Kolonien setzen sich aus wenigen Bakterienschichten zusammen. Der Raum zwischen den Kolonien ist mit einem vorwiegend einschichtigen Bakterienrasen belegt.



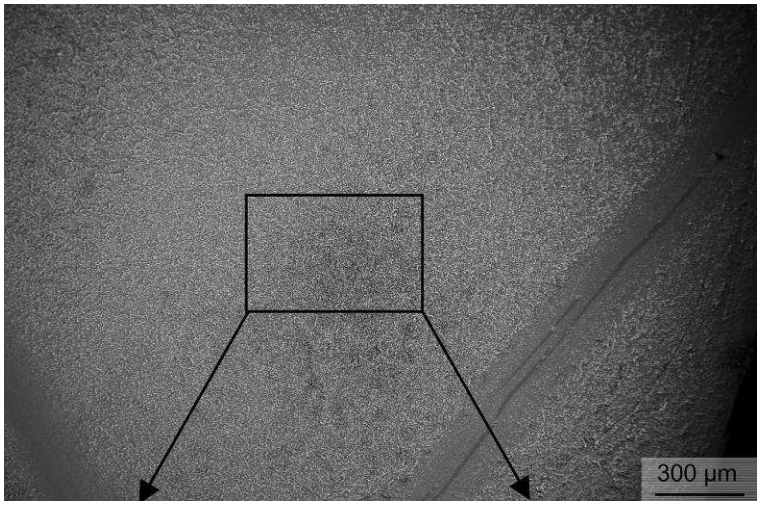
c) Detailaufnahme

Diese Bakterienkolonie ist aus verschiedenen Morphotypen zusammengesetzt, wobei Kokken dominieren. Die Adhäsion zwischen einzelnen Bakterien und die Bildung von kleineren und größeren Aggregaten ermöglicht ein komplexes Wachstum.

Abb. 11: Biofilm, behandelt mit Listerine®

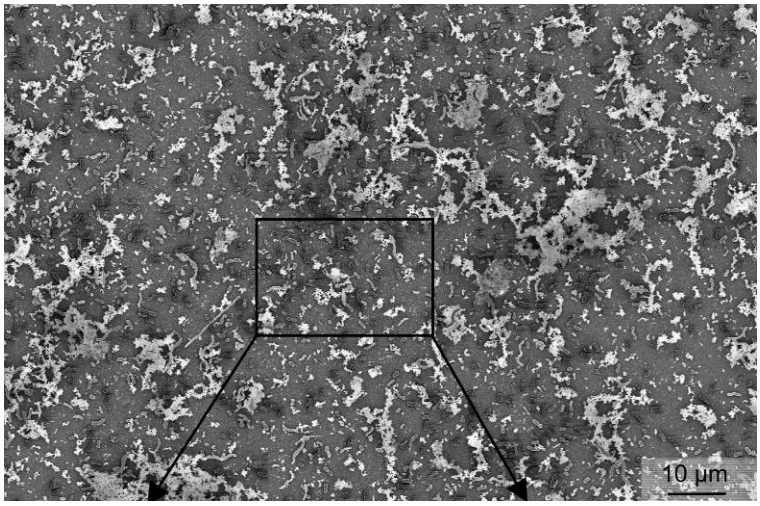
5.5.4 In-vivo-Multispeziesbiofilm, behandelt mit Meridol®

Der mit Meridol® behandelte Biofilm ist gleichmäßig über den Carrier verteilt und weist eine sehr dichte, homogene Struktur auf. Die Verteilung der adhärierten Bakterien ist regelmäßiger als bei den Vergleichslösungen.



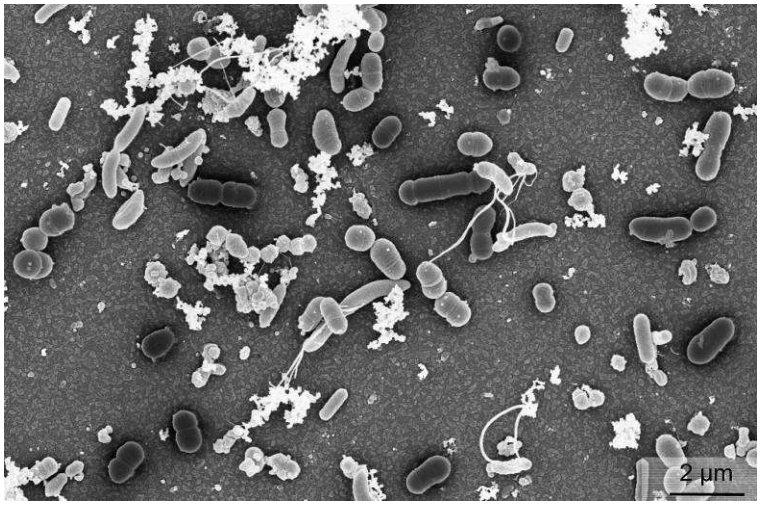
a) Übersichtsaufnahme

Dieses Deckgläschen zeigt einen dichten und gleichmäßigen Biofilm auf der gesamten Oberfläche. Die Biofilmdicke ist mehr- bis vielschichtig.



b) Regionalaufnahme

Hier ist der hauptsächlich mehrschichtige Biofilm in aufgelockerter Struktur erkennbar. Zahlreiche Aggregate verschiedener Spezies führen zur Koloniebildung, zwischen denen der Boden des Deckgläschens zu sehen ist.



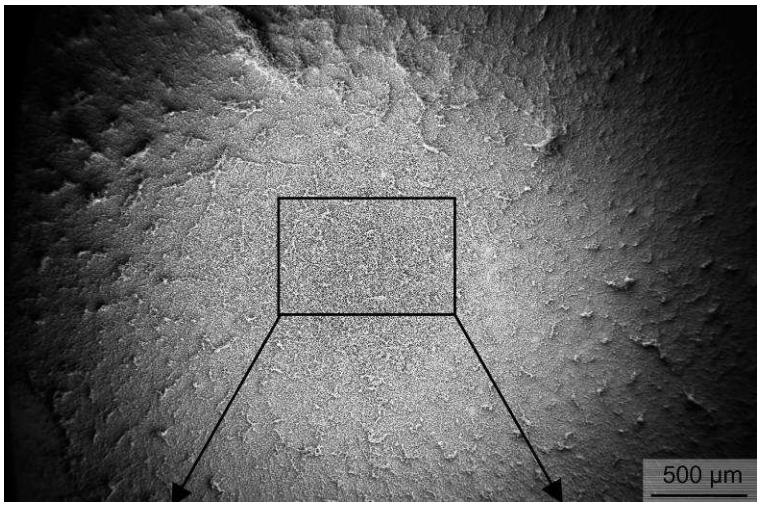
c) Detailaufnahme

Auf dem Bild sind die einzelnen Morphotypen im Detail gut erkennbar. Deutlich zu sehen sind interbakterielle Co-Aggregationen einzelner Spezies. Es sind mehrheitlich Kokken und Kurzstäbchen vorhanden.

Abb. 12: Biofilm, behandelt mit Meridol®

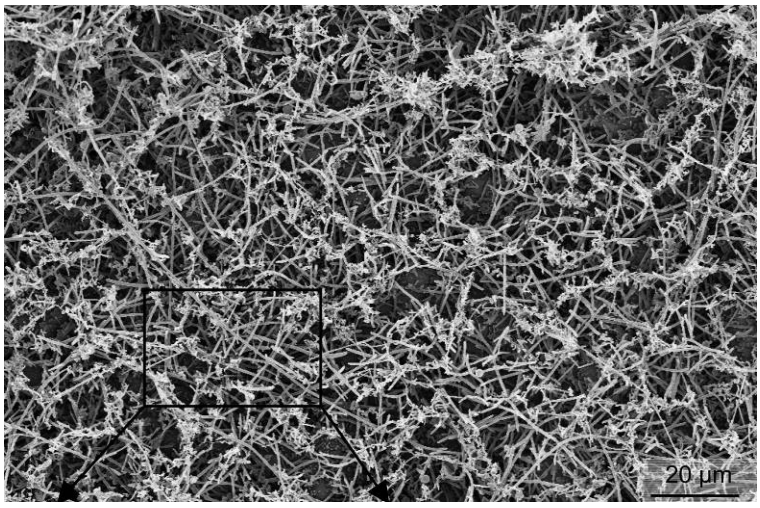
5.5.5 In-vivo-Multispeziesbiofilm, behandelt mit Hexoral®

Auf dem mit Hexoral® behandelten Biofilmcarrier ist ein gleichmäßiger, dick verteilter Biofilm erkennbar. Die Besiedlung ist teilweise so dicht, dass die einzelnen Bakterienschichten nicht mehr voneinander zu unterscheiden sind.



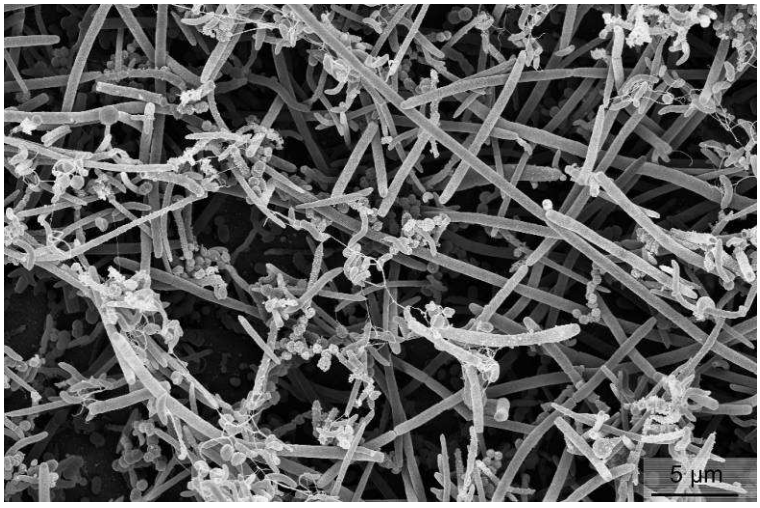
a) Übersichtsaufnahme

Auf diesem Deckgläschen ist der sehr dichte Biofilm auf die gesamte Fläche verteilt. Die hohe Biofilmdicke ist deutlich erkennbar.



b) Regionalaufnahme

Durch starke Akkumulation der Bakterienspezies werden zahlreiche Kolonien gebildet und es entsteht ein mehr- und vielschichtiger Biofilm. Diese komplexe Koloniebildung durchdringt mehrere Biofilmschichten.



c) Detailaufnahme

Die einzelnen Morphotypen sind durch die sehr dichte Belegung des Deckgläschens nur teilweise zu erkennen. Langstäbchen dominieren, es sind aber auch Kokken und Kurzstäbchen vorhanden.

Abb. 13: Biofilm, behandelt mit Hexoral®

5.6 Bakterielle Morphotypen

Mikrobiologen haben mehr als 40 Formen von Bakterien beschrieben, die nur einen sehr kleinen Bruchteil der mikrobiellen Welt darstellen [Liu et al., 2001]. Bei der Untersuchung der in dieser Arbeit hergestellten mikroskopischen Aufnahmen der Biofilme wurde eine große Anzahl unterschiedlicher bakterieller Morphotypen gefunden. Es wurden möglichst viele verschiedene Morphotypen ausgewählt und beispielhaft dargestellt. Die Auswahl beruhte auf bestimmten Kriterien wie z. B. der morphologischen Unterscheidbarkeit, der Diversität und dem wiederholten Vorkommen.

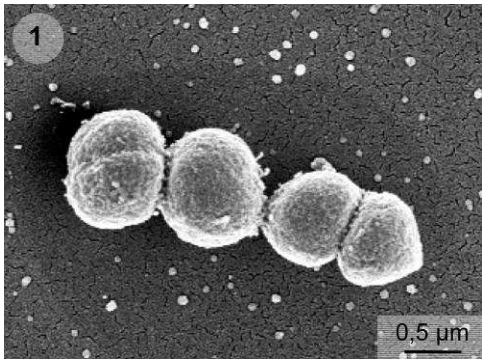
In Anlehnung an Liu und Dazzo, die mit Hilfe eines computergestützen Bildanalyseverfahrens 11 verschieden Morphotypen unterscheiden und darstellen konnten [Liu et al., 2001], wurden auch die in dieser Untersuchung gefundenen Morphotypen nach Form und Struktur der Zelloberfläche unterschieden. Dabei können die Bakterien grob in drei Gruppen, nämlich in Kokken, Stäbchen und Filamente eingeteilt werden. Innerhalb dieser Gruppen gibt es zahlreiche Unterformen wie z. B. gerade (kurz, mittel, lang), gebogen, ellipsoid, keulenförmig, verzweigt/unverzweigt oder auch pleomorph. Auch die Struktur und Beschaffenheit der Oberfläche wurde als Unterscheidungskriterium hinzugezogen. Unter diesen Auswahlkriterien konnten auf den Biofilmträgern insgesamt 15 verschiedene Morphotypen gefunden und einzeln bildhaft dargestellt werden (Abb. 14-17).

Zur besseren Übersicht und zum späteren Auszählen und Vergleichen wurden alle Morphotypen sechs Grundtypen mit entsprechenden Symbolen und Farben zugeteilt. Diese Grundmorphotypen sind:

1. kokkoide Bakterien
2. Kurzstäbchen (mit einem Verhältnis der Länge zur Breite von ≤ 1 : 2)
3. Mittellange Stäbchen
   (mit einem Verhältnis der Länge zur Breite von > 1 : 2 - 1 : 7)
4. Langstäbchen (mit einem Verhältnis der Länge zur Breite von ≥ 1 : 7)
5. pleomorphe Bakterien
6. begeißelte Bakterien

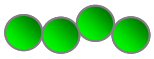
Morphotyp	Symbol + Farbe	Morphotyp	Symbol + Farbe
Kokken		Langstäbchen	
Kurzstäbchen		Pleomorphe Bakt.	
Mittellange Stäb.		Begeißelte Bakt.	

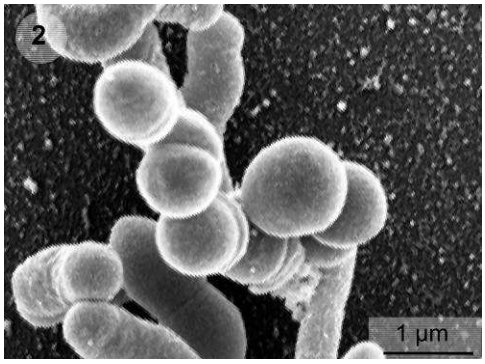
Tab. 6: Morphotypen und ihre Symbole



Der **Morphotyp 1** ist eine runde bis ovale Kokke mit einer rauhen Zelloberfläche, was eine EPS-Kapsel vermuten lässt. Vorkommen paarweise oder als Ketten.

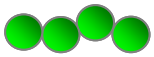
Abmessung: 0,7 x 0,9 µm

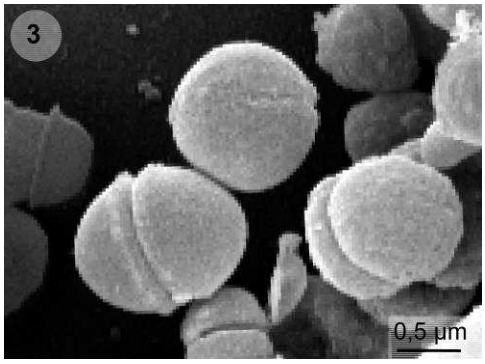
Symbol: 



Der **Morphotyp 2** ist eine runde Kokke mit glatter Zelloberfläche. Häufig in Ketten oder in Clustern vorkommend.

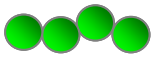
Abmessung: 0,6 x 0,6 µm

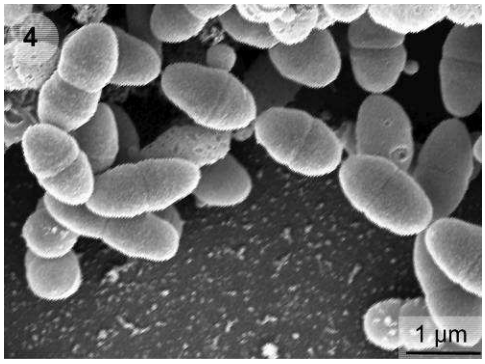
Symbol: 



Der **Morphotyp 3** ist eine einzeln vorkommende Diplokokke mit rauher Zelloberfläche.

Abmessung: 0,9 x 1,1 µm

Symbol: 



Der **Morphotyp 4** ist eine in Ketten angeordnete Diplokokke. Sie weist eine glatte Zelloberfläche auf.

Abmessung: 0,8 x 1,4 µm

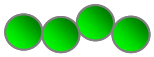
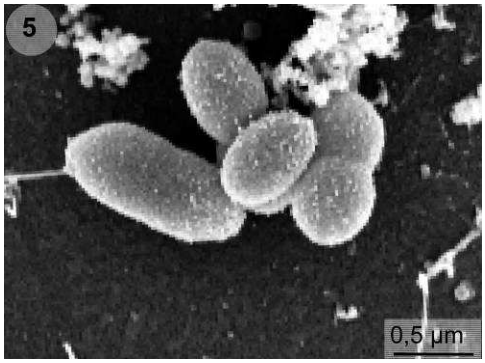
Symbol: 

Abb. 14: Morphotypen 1 - 4

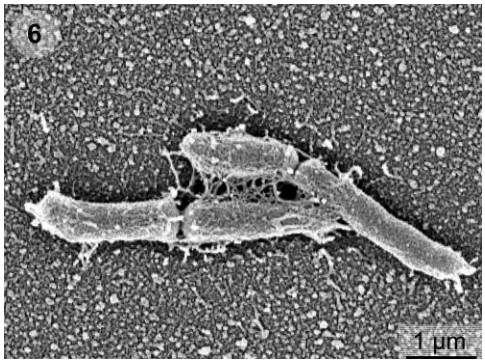


Der **Morphotyp 5** ist ein gerades Kurzstäbchen mit glatter Zelloberfläche und runden Polkappen.

Er kommt paarweise als Ketten oder in Clustern vor.

Abmessung: 0,5 x 0,7 µm

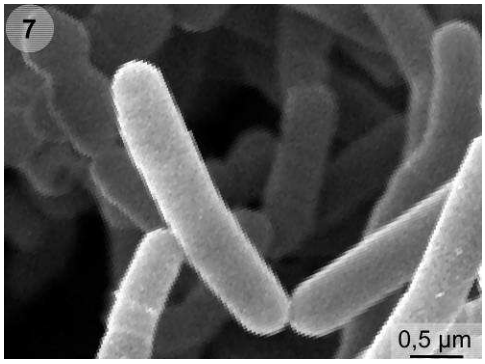
Symbol:



Der **Morphotyp 6** ist ein kurzes Stäbchen mit abgerundeten Polkappen. Jede Zelle ist mit einer EPS-Kapsel umgeben. Sie kommen meist in Clustern vor, die in EPS eingebettet sind.

Abmessung: 0,6 x 1,6 µm

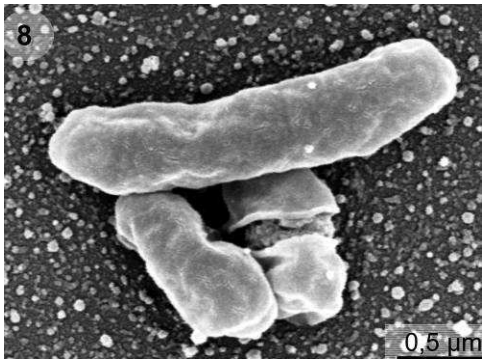
Symbol:



Der **Morphotyp 7** ist ein mittellanges gerades Stäbchen mit glatter Zelloberfläche und abgerundeten Polkappen. Er kommt einzeln, als kurze Ketten oder in kleinen Clustern vor.

Abmessung: 0,5 x 2,8 µm

Symbol:

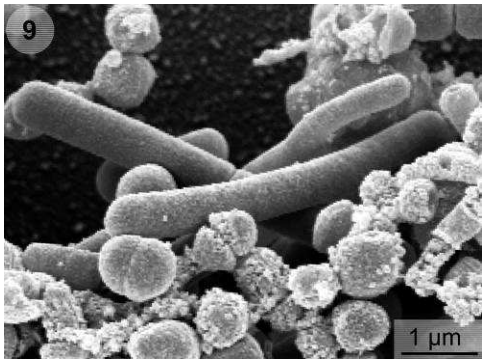


Der **Morphotyp 8** ist ein mittellanges, gerades oder seitlich gebogenes Stäbchen mit rauher Zelloberfläche. Die Polkappen sind abgerundet. Die Zellen kommen isoliert, paarweise, in kurzen verzweigten Ketten oder in Clustern vor.

Abmessung: 0,5 x 2,3 µm

Symbol:

Abb. 15: Morphotypen 5 - 8

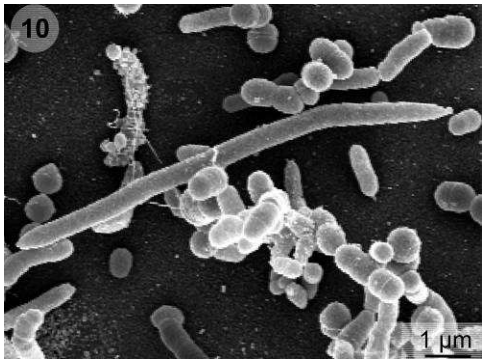


Der **Morphotyp 9** ist ein gerades Langstäbchen

mit glatter Zelloberfläche und runden bis rechteckigen Polkappen. Dieser Morphotyp ist einzeln oder in Clustern vorkommend.

Abmessung: 0,5 x 4,4 µm

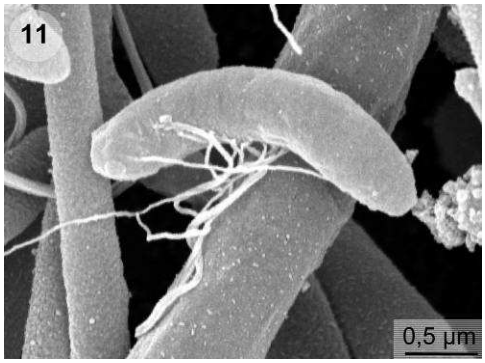
Symbol:



Der **Morphotyp 10** ist ein Langstäbchen mit glatter Zelloberfläche und stricknadelförmigen Enden. Dieser Morphotyp kommt einzeln, in Ketten und als parallel wachsende, dichte Cluster vor.

Abmessung: 0,4 x 9,7 µm

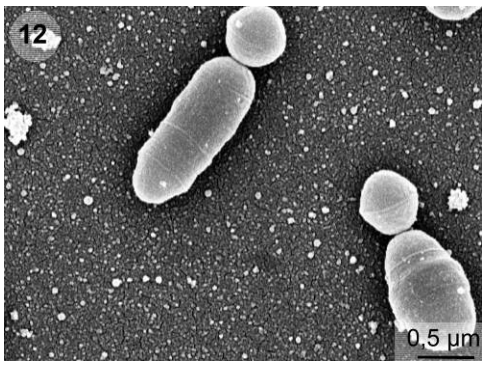
Symbol:



Der **Morphotyp 11** ist ein halbmondförmiges Stäbchen mit glatter Zelloberfläche. In der Mitte der konkaven Seite inseriert ein Bündel von 10 - 15 Geißeln. Dieser Morphotyp kommt einzeln oder in kleinen Gruppen vor.

Abmessung: 0,5 x 2,2 µm

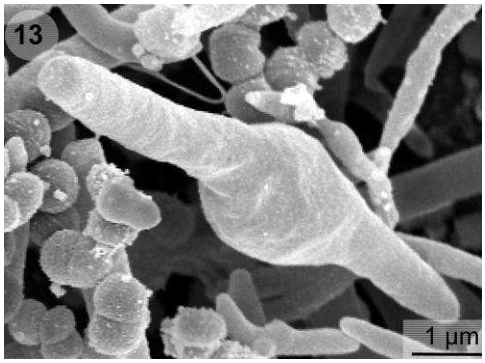
Symbol:



Der **Morphotyp 12** ist ein gerades oder bisweilen gebogenes, pleomorphes Stäbchen mit glatter Zelloberfläche. An den runden Polkappen können kokkoide Formen angehängt sein. Einzeln und in Paaren, selten in Ketten vorkommend.

Abmessung: 0,6 x 2 µm; Symbol:

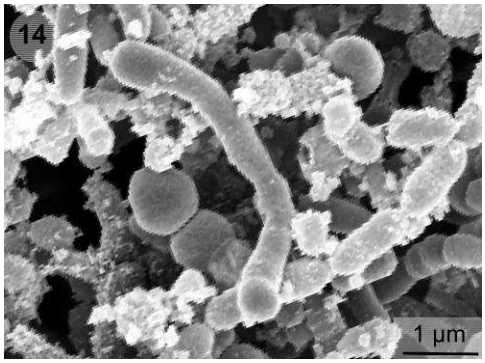
Abb. 16: Morphotypen 9 - 12



Der **Morphotyp 13** ist ein pleomorphes Stäbchen von variabler Länge mit glatter Zelloberfläche. Die zentrale Verdickung geht in sich verjüngende stäbchenförmige Enden über.

Abmessung: 1,7 x 6 µm;

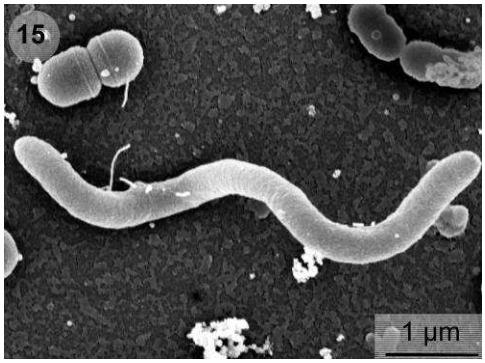
Symbol:



Der **Morphotyp 14** ist ein pleomorphes Stäbchen mit glatter Zelloberfläche, dessen Enden sich trommelschlegelförmig darstellen.

Abmessung: 0,5 x 4,1 µm

Symbol:



Der **Morphotyp 15** ist ein langes schraubiges Stäbchen mit glatter Zelloberfläche und sich verjüngenden Enden. Er kommt einzeln und als dichte, ineinander verwobene Cluster vor.

Abmessung: 0,4 x 5,1 µm

Symbol:

Abb. 17: Morphotypen 13 – 15

5.7 Deformierte Bakterien

Unter dem Einfluss der Mundspüllösungen verändern sich die Oberflächen der Bakterien bedingt durch Lyse und darauffolgenden Einstülpungen der Zelloberfläche.

In den folgenden Abbildungen wird die Wirkung der Prüfsubstanzen auf die äußere Bakterienstruktur dargestellt. Die rasterelektronenmikroskopischen Bilder zeigen deformierte Bakterien mit veränderter Zelloberfläche (Abb. 19 - 21)

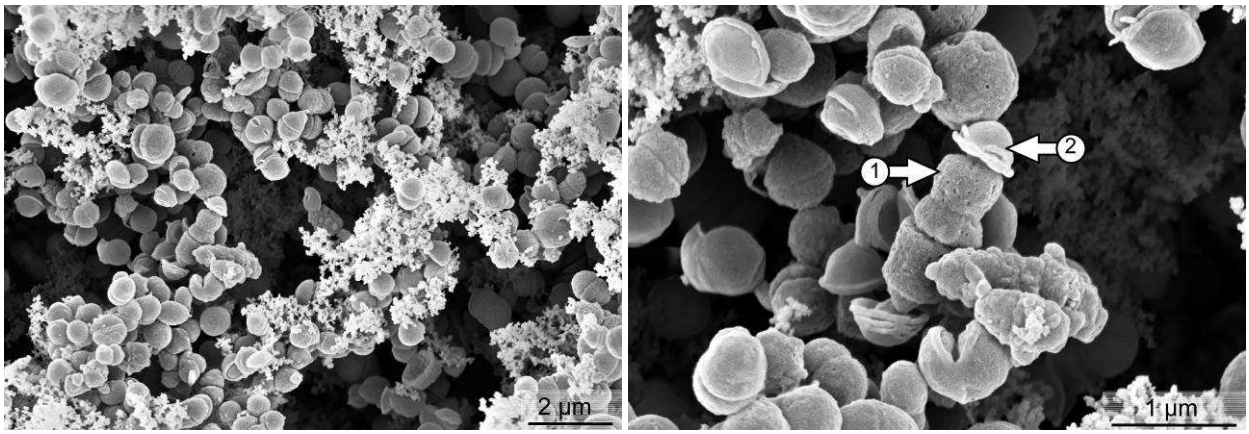


Abb. 18: Deformierte Kokken

Nach der Behandlung des Biofilms mit der Mundspüllösung Meridol® ist bei vielen Kokken entblößtes Zytoplasma sichtbar (Pfeil 1), während die Zellwand sich wie „abgepellt“ darstellt (Pfeil 2).

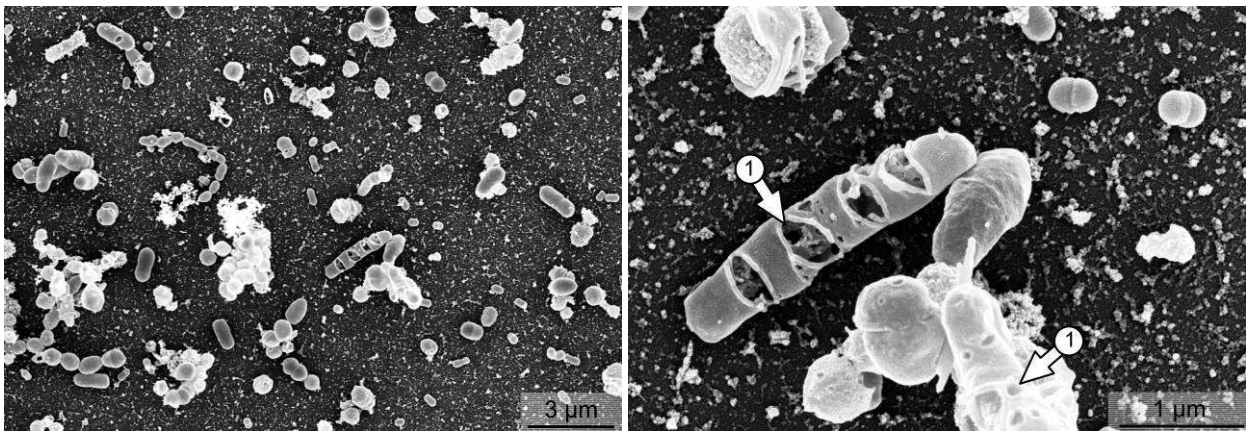


Abb. 19: Deformierte Kurzstäbchen

Zellwände ganz unterschiedlicher Morphotypen weisen deutliche Perforationen auf (Pfeile 1).

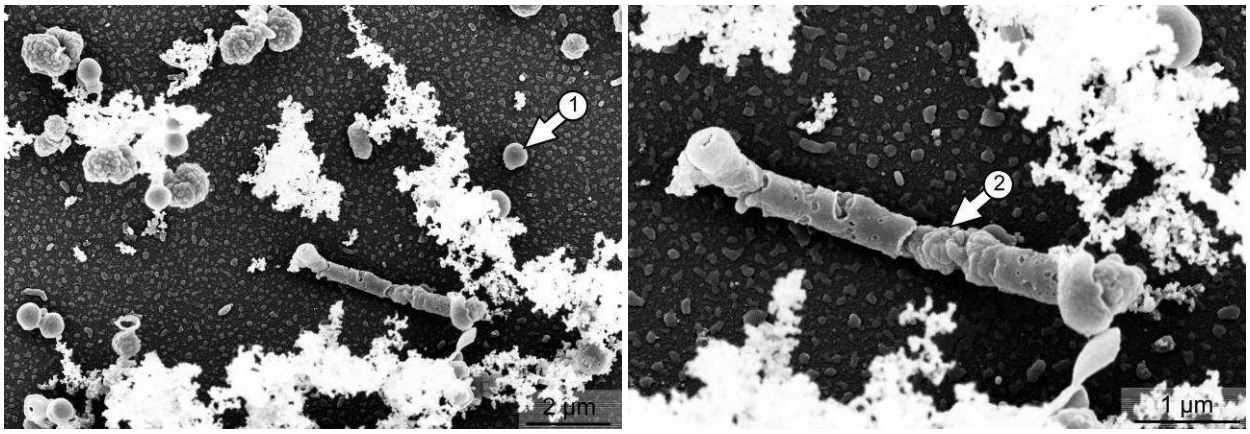


Abb. 20: Deformierte Langstäbchen

Während einige Bakteriengruppen keine sichtbaren Schäden in der Zellwand aufweisen (Pfeil 1), zeigen andere (z. B. Langstäbchen, Pfeil 2) deutliche Spuren nach der Behandlung mit einer Mundspüllösung.

5.8 Absolute Bakterienmenge und Änderung der bakteriellen Zusammensetzung der In-vivo-Multispeziesbiofilme mit und ohne Behandlung mit Mundspüllösungen

Die semiquantitative Auswertung der Biofilme mittels REM erlaubt einen Vergleich der Biofilmbesiedlung der Thermanox®-Deckgläschen nach Inkubation und Behandlung. Die Methodik ist für die Korrelation der Biofilmbesiedlung mit dem Einfluss der verschiedenen Mundspüllösungen geeignet. Aufgrund der methodenbedingten Trocknung der Proben sind jedoch Rückschlüsse auf den Aufbau und die Architektur der akkumulierten Biofilmschichten nur bedingt möglich.

Die *in vitro* kultivierten parodontalen Biofilme der verschiedenen Patienten unterscheiden sich deutlich sowohl in ihrer morphotypischen Zusammensetzung als auch den Gesamtbakterienmengen der unbehandelten Kontrollproben. Die vergleichenden rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen der Biofilmproben nach 21 Tagen Behandlung zeigen, dass eine Abhängigkeit der Biofilmakkumulation von der verwendeten Mundspüllösung besteht. Die Wirkung der verschiedenen Mundspüllösungen auf die jeweiligen Patientenbiofilme zeigte neben der allgemeinen Verringerung der Gesamtbakterienzahl auch weitere deutliche Unterschiede. So variierte die prozentuale Belegungsfläche der Deckgläschen ebenso wie die Anzahl der Biofilmschichten und die Morphotypen in den Biofilmen abhängig vom Probanden in größerem Umfang. Die pro-

zentuale Belegungsfläche des Biofilms auf dem Deckgläschen variierte bei den sieben Probanden von 5 bis 95 %. Die Dicke der mit Mundspüllösung behandelten Biofilme war im Vergleich zu derjenigen der Kontrollbiofilme geringer, wobei die durch Chlorhexamed Forte® 0,2 % erzielte Reduktion der totalen Bakterienmenge bei der Mehrheit der Probanden am deutlichsten ist. Auch die morphotypische Zusammensetzung des Biofilms veränderte sich unter dem Einfluss der Prüfsubstanzen bei den verschiedenen Probanden in unterschiedlichem Ausmaß.

In den folgenden Tabellen werden sowohl die Daten der prozentualen Anteile der einzelnen Morphotypen im direkten Vergleich der Probanden (Abb. 21), als auch der Gesamtbakterienmengen pro Proband deskriptiv dargestellt (Abb. 22 bis 28).

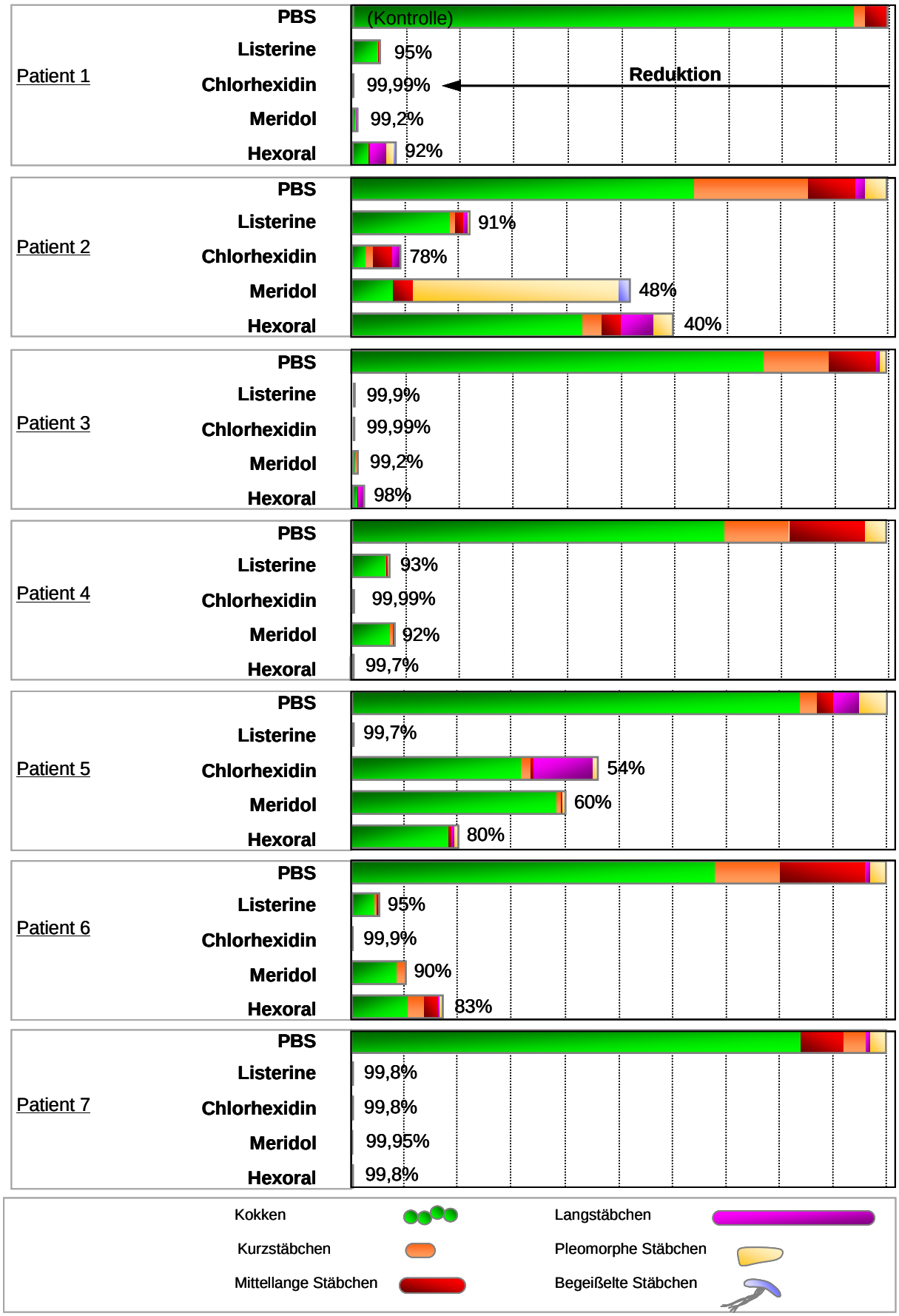


Abb. 21: Relative Reduktion in % im direkten Probandenvergleich

Gesamtbakterienmenge

Proband 1

Auf den mit Biofilm belegten Deckgläschen des Probanden 1 sind die unterschiedlichen Wirkungen der Prüfsubstanzen deutlich zu erkennen (siehe Abb. 22). Die 5 x 10E9 Bakterien des Kontrollbiofilms (PBS) setzen sich zu 94 % aus Kokken und zu geringen Anteilen aus Kurzstäbchen (2 %) und mittellangen Stäbchen (4 %) zusammen. Der mit Listerine® behandelte Biofilm des Probanden 1 weist hingegen nur eine Gesamtbakterienmenge von 3 x 10E8 mit einem mit 93 % ähnlich hohen Anteil an Kokken wie die Kontrolle und ähnlich geringen Anteilen an Stäbchen und begeißelten Bakterien auf (1 - 2 %). Demnach hat hier eine gleichmäßige Reduktion aller Morphotypen stattgefunden. Die Biofilmbildung auf dem mit Chlorhexamed Forte® 0,2 % behandelten Thermanox®-Deckgläschen ist mit einer Gesamtbakterienmenge von 8 x 10E5 geringer als auf den übrigen Deckgläschen. Im Vergleich zur Kontrolle finden sich erstaunlich wenige Kokken (25 %), dafür aber vermehrt Kurz- und Langstäbchen (beide 25 %). Auf den mit Meridol® und Hexoral® behandelten Deckgläschen ist die Gesamtbakterienanzahl mit 4 x 10E7 (MER) und 4 x 10E8 (HEX) ebenfalls reduziert, wobei auch hier eine Veränderung der morphotypischen Zusammensetzung stattgefunden hat. Während die Kokken bei Meridol® um 30 % und bei Hexoral® um 57 % reduziert wurden, finden sich im Vergleich zur Kontrolle jetzt auch Langstäbchen, pleomorphe und begeißelte Stäbchen. Unter der Behandlung der Biofilme mit Meridol® erhöhte sich der prozentuale Anteil an Kurzstäbchen (4 %) und mittellangen Stäbchen (8 %), während bei Hexoral® die Anzahl der mittellangen Stäbchen gleich blieb (4 %) und die Kurzstäbchen gar nicht mehr zu finden waren.

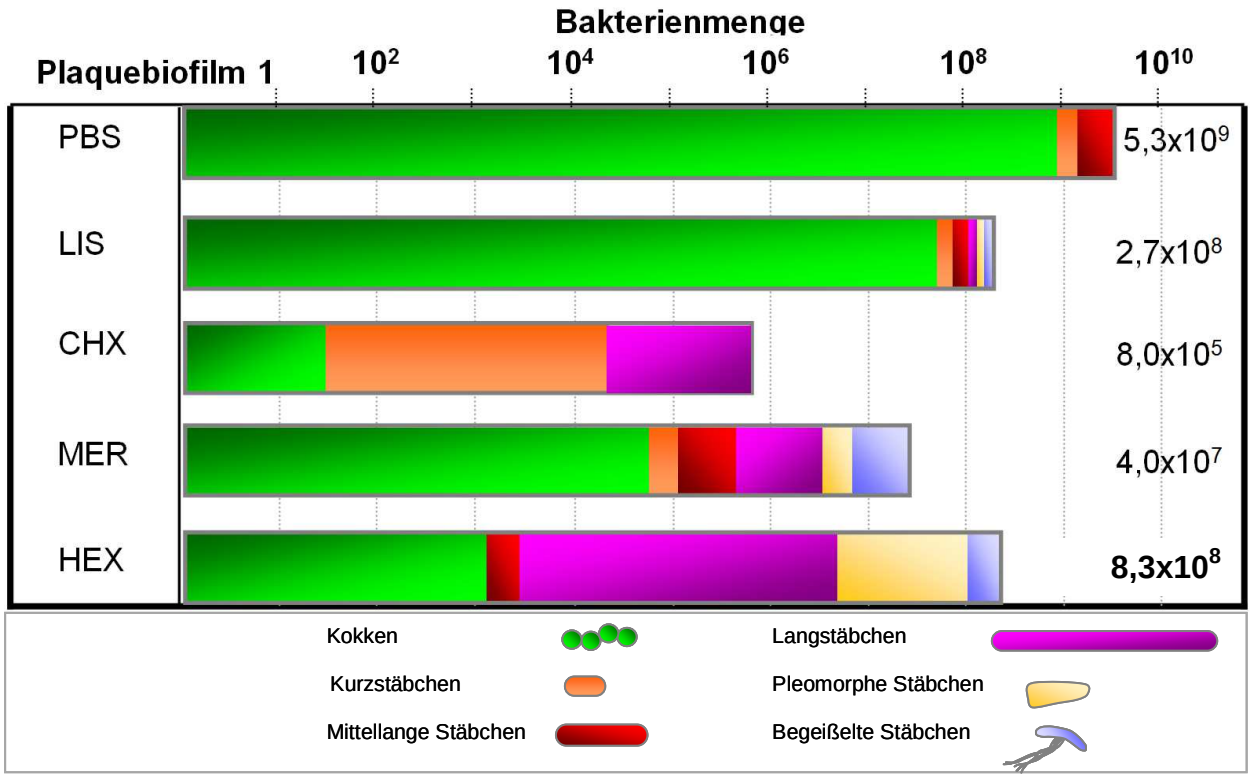


Abb. 22: Gesamtbakterienmenge Plaquebiofilm Proband 1

Proband 2

Bei Proband 2 liegen die Werte der absoluten Bakterienreduktion bei allen Testlösungen nahe beieinander (siehe Abb. 23). Die Gesamtbakterienmenge der Kontrolle (PBS) ist mit 1 x 10E9 nur leicht höher als die Gesamtbakterienzahlen auf den behandelten Deckgläschen (1 x 10E8 unter CHX bis 8 x 10E8 unter HEX). Der Kontrollbiofilm ist bei Proband 2 zu 64 % aus Kokken, zu 21 % aus Kurzstäbchen, zu 9 % aus mittellangen Stäbchen und zu geringen Anteilen aus Langstäbchen (2 %) und pleomorphen Stäbchen (4 %) zusammengesetzt. Der unterschiedliche Einfluss der verschiedenen Testlösungen auf die morphotypische Zusammensetzung des Biofilms ist auch hier gut erkennbar. Während im Vergleich zur Kontrolle bei Chlorhexamed Forte® (29 %) und Meridol® (15 %) eine deutliche Reduktion der Kokken und eine Verschiebung der mikrobiellen Gemeinschaft in Richtung anderer Morphotypen wie z. B. bei Chlorhexamed Forte® mehr mittellangen Stäbchen (40 %) und Langstäbchen (14 %) bzw. bei Meridol® mehr pleomorphen Stäbchen (74 %) und begeißelten Stäbchen (4 %) stattgefunden hat, ist die reduzierende Wirkung auf die verschiedenen Spezies bei Listerine® und Hexoral® eher gleichmäßig. Nach der Behandlung mit den beiden letzt-

genannten Lösungen ist der prozentuale Anteil der Kokken allerdings leicht angestiegen (84 % LIS, 72 % HEX).

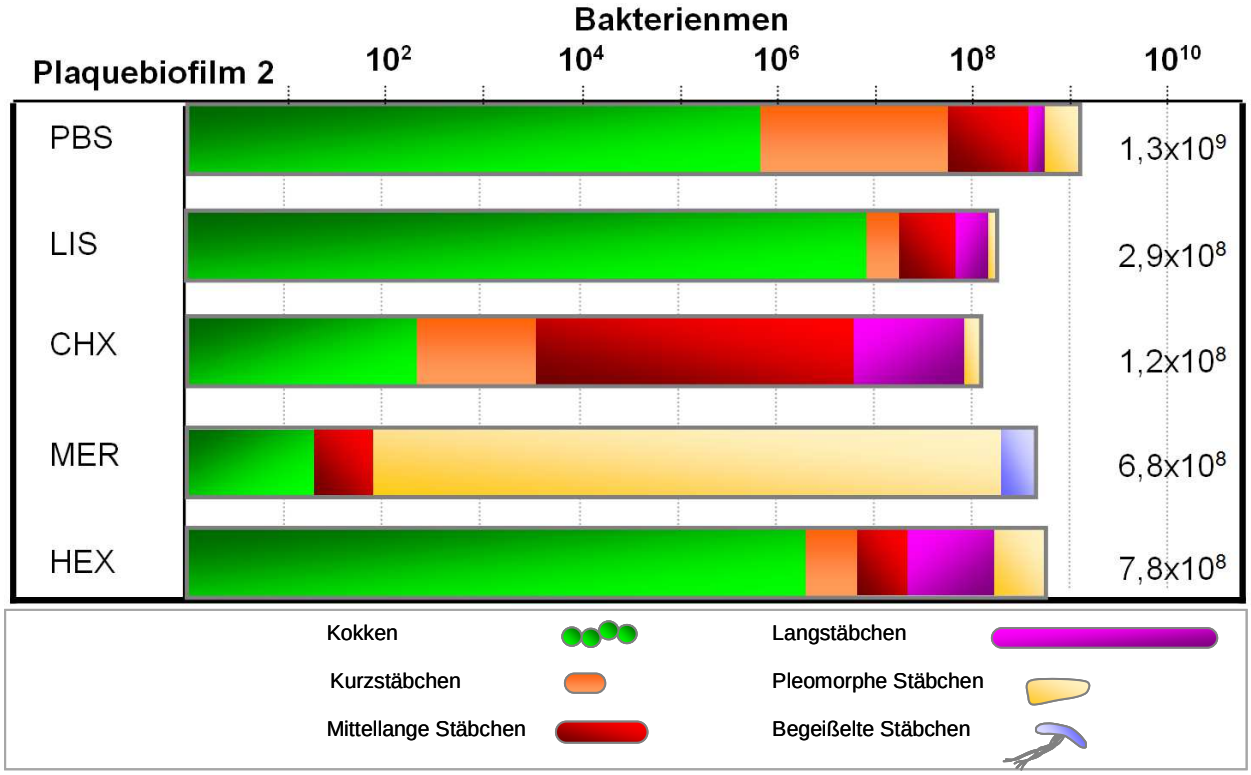


Abb. 23: Gesamtbakterienmenge Plaquebiofilm Proband 2

Proband 3

Die Gesamtbakterienmenge des Kontrollbiofilms liegt bei Proband 3 mit 5 x 10E10 höher als bei den übrigen Probanden (siehe Abb. 24). Der Biofilm der Kontrolle (PBS) ist zu 77 % aus Kokken, zu 12 % aus Kurzstäbchen, zu 9 % aus mittellangen Stäbchen und zu je 1 % aus Langstäbchen und pleomorphen Stäbchen zusammengesetzt. Bei diesem Probanden variieren die Wirkungen der Prüfsubstanzen auf die Biofilme wiederum stärker. Nach der Behandlung der Biofilme mit Listerine® (5 x 10E8), Meridol® (4 x 10E8) und Hexoral® (9 x 10E8) war die Anzahl der an der Oberfläche adhärierten Bakterien höher als auf dem mit Chlorhexamed Forte® behandelten Biofilmträger (5 x 10E6). Bis auf Listerine® führten alle Testlösungen zu einer Verschiebung der mikrobiellen Zusammensetzung der Biofilme. Unter der Wirkung von Listerine® wurde der Anteil der in der Kontrolle vorhandenen 77 % Kokken zwar um 22 % erhöht, dafür konnte der Phänotyp Kurzstäbchen auf 1 % verringert werden und die mittellangen und langen Stäbchen waren sogar gar nicht mehr vorhanden. Der Anteil an pleomorphen Stäbchen blieb bei 1 %. Die mengenmäßigen Anteile der Morphotypen veränderten sich unter

dem Einfluss von Chlorhexamed Forte®, Meridol® und Hexoral® hingegen deutlich. Der kokkale Anteil ist bei diesen Proben wesentlich geringer (68 % CHX, 49 % MER, 42 % HEX), dafür treten bei Meridol® beispielsweise mehr Kurzstäbchen (27 %) und bei Hexoral® mehr Langstäbchen (47 %) auf. Letztere sind bei Meridol® gar nicht mehr vorhanden. Auf dem mit Chlorhexamed Forte® behandelten Biofilmträger sind die Kurz- und mittellangen Stäbchen zwar gleichmäßig reduziert worden (beide auf 8 %), dafür wurden die Langstäbchen mit 8 % und die pleomorphen und begeißelten Stäbchen mit je 4 % mengenmäßig mehr.

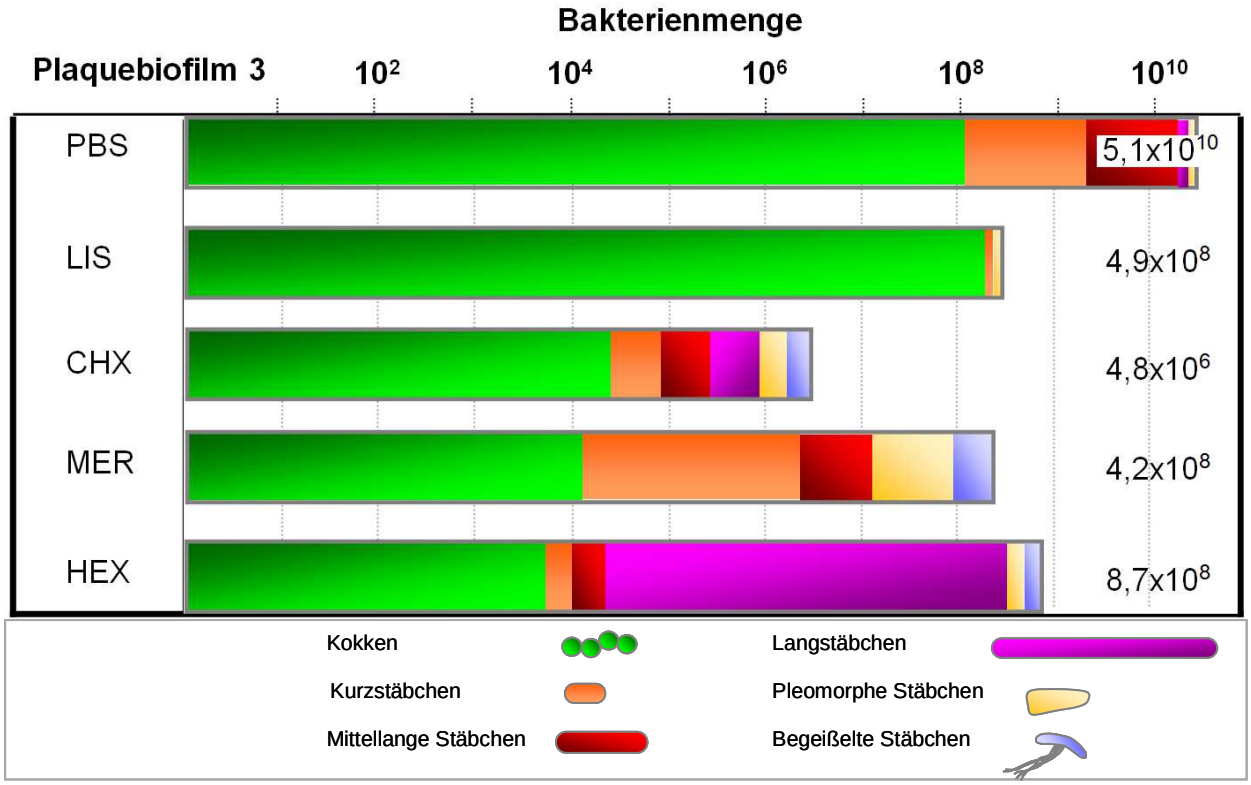


Abb. 24: Gesamtbakterienmenge Plaquebiofilm Proband 3

Proband 4

Der unterschiedliche Einfluss der vier Testlösungen sowohl auf die Gesamtbakterienmenge als auch auf die Zusammensetzung der vorhandenen Spezies ist auch bei Proband 4 sehr deutlich (siehe Abb. 25). Bei diesem Probanden ist der Anteil der Kokken im unbehandelten Biofilm mit 70 % geringer als bei den vorherigen Patientenbiofilmen und es sind weder Langstäbchen noch begeißelte Stäbchen zu finden. Die übrigen Morphotypen haben mit 12 % (Kurzstäbchen), 14 % (mittellange Stäbchen) und 4 % (pleomorphe Stäbchen) einen vergleichsweise geringen Anteil an der Gesamtbakterienmenge von 3 x 10E9. Nach 21 Tagen Behandlung waren nur auf den mit Listerine®

behandelten Biofilmträgern noch 3 % pleomorphe Stäbchen vorhanden. Der Anteil kokkaler Mikroorganismen auf den Deckgläschen war bei Listerine® mit 90 % ebenso wie bei Meridol® mit 90 % und Hexoral® mit 96 % deutlich und bei Chlorhexamed Forte® mit 75 % leicht angestiegen. Die Behandlung der Biofilme mit Chlorhexamed Forte® erzielte bei diesem Probanden sowohl die deutlichste Reduktion der Gesamtbakterienanzahl (4 x 10E5) als auch eine vollständige Reduktion der mittellangen und der pleomorphen Stäbchen. Unter dem Einfluss von Chlorhexamed Forte® fand jedoch eine Verschiebung hin zu mehr Kurzstäbchen (25 %) statt, während diese Morphotypen ebenso wie die mittellangen Stäbchen durch die Behandlung mit anderen Testlösungen eher gleichmäßig reduziert wurden.

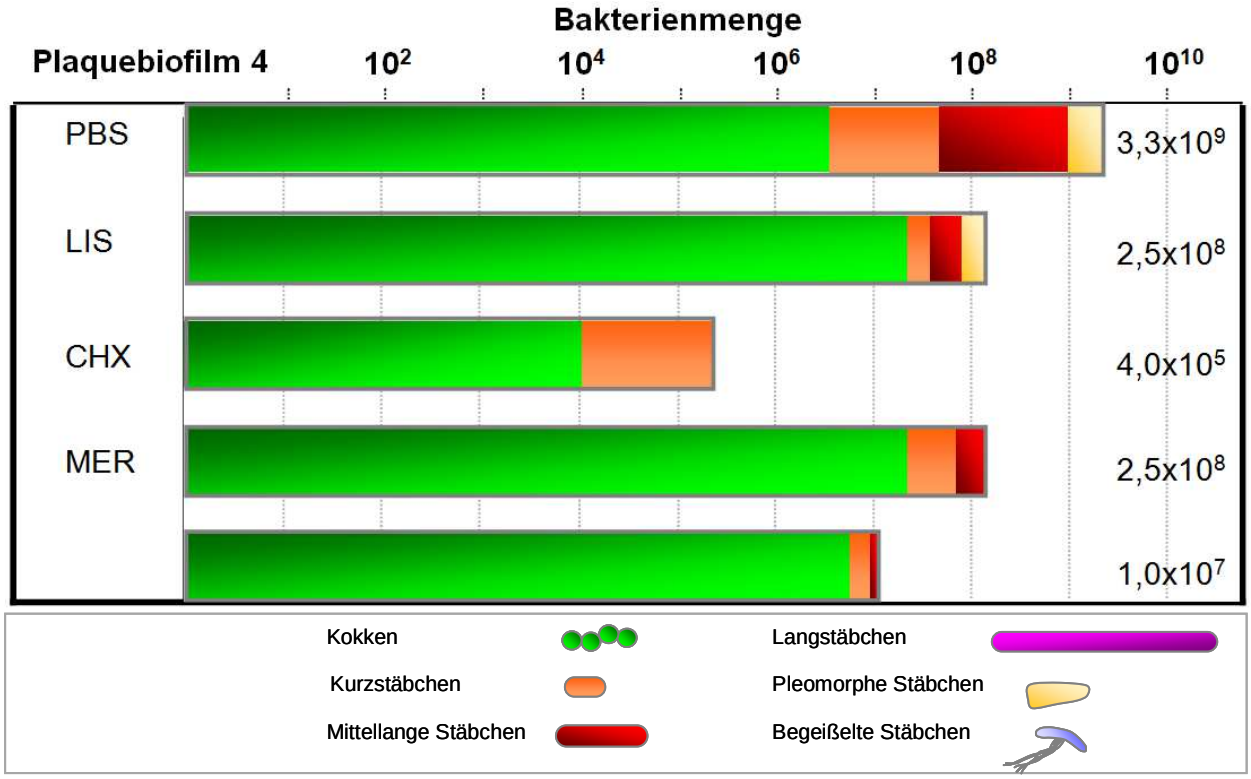


Abb. 25: Gesamtbakterienmenge Plaquebiofilm Proband 4

Proband 5

Bei Proband 5 zeigt sich die Anzahl der Gesamtbakterienmenge auf den mit den Prüfsubstanzen behandelten Proben im Vergleich zur gleichzeitig getesteten Kontrolle deutlich verringert (siehe Abb. 26). Die 5 x 10E10 Bakterien des Kontrollbiofilms (PBS) setzen sich zu 84 % aus Kokken und zu geringen Anteilen aus Kurzstäbchen (4 %), mittellangen Stäbchen (8 %), Langstäbchen (1 %) und pleomorphen Stäbchen (3 %) zusammen. Meridol® reduzierte die Bakterienmenge bei diesem Probanden am stärksten (3 x

10E7), während Listerine®, Chlorhexamed Forte® und Hexoral® eine ähnliche reduzierende Wirkung zeigten. Vergleichbare Ergebnisse zeigen sich auch hinsichtlich des Einflusses auf die morphotypische Zusammensetzung der Biofilme. Im Vergleich zur Kontrolle fand bei allen Testlösungen eine gleichmäßige Reduktion der Kurzstäbchen statt, nur bei dem mit Meridol® behandelten Biofilm konnte mit 93 % ein höherer Anteil als vor der Behandlung registriert werden. Bei Chlorhexamed Forte® und Meridol® sind nach Behandlung keine Langstäbchen mehr vorhanden, bei Listerine® und Hexoral® ist ihr Anteil mit je 3 % jedoch leicht angestiegen. Die prozentualen Anteile der übrigen Morphotypen sind, mit Ausnahme von Meridol®, unter dem Einfluss der Mundspüllösungen tendenziell leicht erhöht worden.

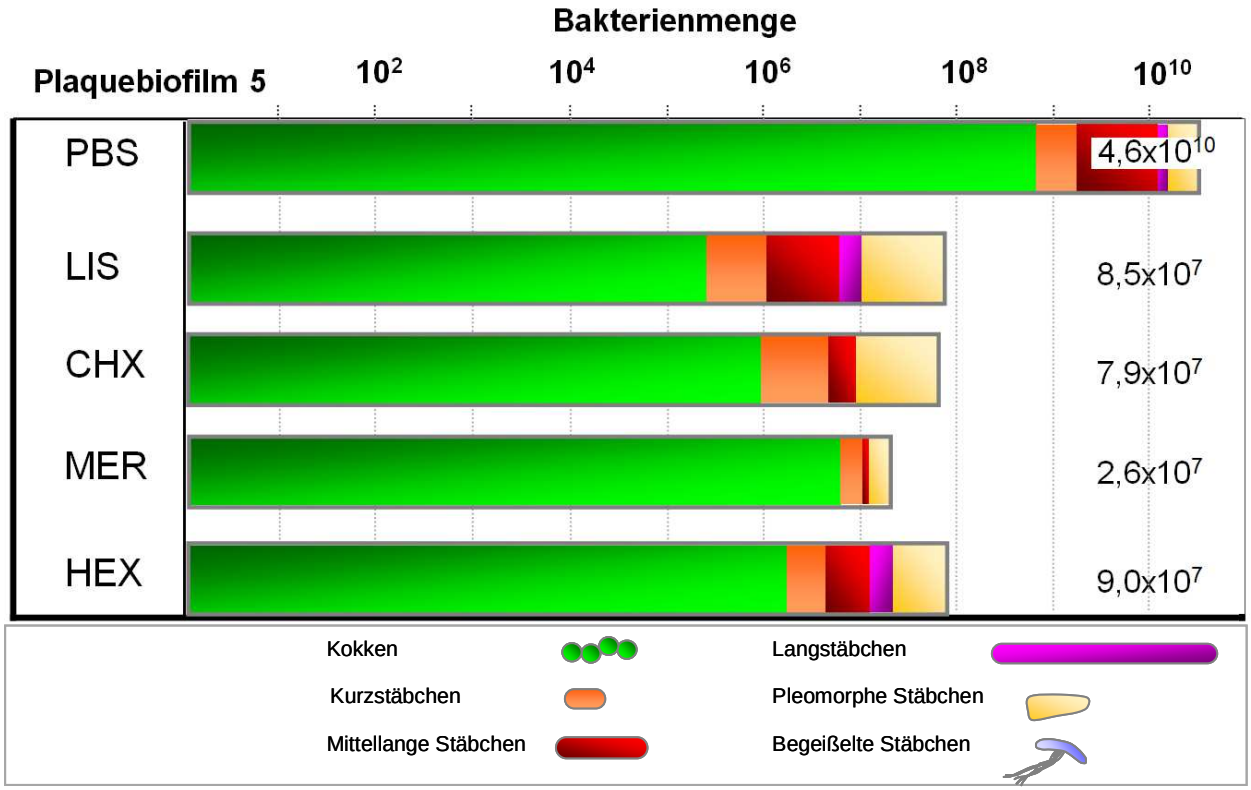


Abb. 26: Gesamtbakterienmenge Plaquebiofilm Proband 5

Proband 6

Auf den biofilmbelegten Deckgläschen des Probanden 6 zeigen sich nach der Behandlung mit den vier Testlösungen sehr unterschiedliche Resultate (siehe Abb. 27). Der Kontrollbiofilm mit einer Gesamtbakterienmenge von 3 x 10E9 ist mit 68 % Kokken, 12 % Kurzstäbchen, 16 % mittellangen Stäbchen, 1 % Langstäbchen und 3 % pleomorphen Stäbchen ähnlich zusammengesetzt wie der unbehandelte Biofilm des Probanden 4. Ebenso wie bei diesem Probanden erzielte auch bei Proband 6 die Mundspüllösung

Chlorhexamed Forte® die stärksten Effekte. Auf dem behandelten Biofilm sind sowohl die Reduktion der Gesamtbakterienmenge auf 3 x 10E6, als auch die deutliche Reduktion der Kokken (33 %) und mittellangen Stäbchen (2 %), sowie die vollständige Reduktion der Langstäbchen durch Chlorhexamed Forte® zu erkennen. Der Anteil an Kurz- und pleomorphen Stäbchen liegt mit 45 % und 20 % hingegen höher als bei allen anderen Vergleichsbiofilmen dieses Probanden. Unter dem Einfluss von Listerine® und Hexoral® ist die morphotypische Zusammensetzung des Biofilms weitgehend gleich geblieben, wobei nur auf den mit Hexoral® behandelten Deckgläschen noch Langstäbchen (2 %) zu finden sind. Bei Listerine® erhöhte sich der Anteil an Kokken im behandelten Biofilm zwar auf 84 %, alle anderen Morphotypen wurden aber gleichmäßig reduziert. Die Behandlung durch Meridol® zeigte bei diesem Probanden die stärkste Veränderung der phänotypischen Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaft. Auf diesem Biofilmträger finden sich im Vergleich zur Kontrolle keine mittellangen Stäbchen, Langstäbchen und pleomorphen Stäbchen mehr. Dafür fand ein Wechsel hin zu anteilsmäßig mehr Kokken (83 %) und Kurzstäbchen (17 %) statt.

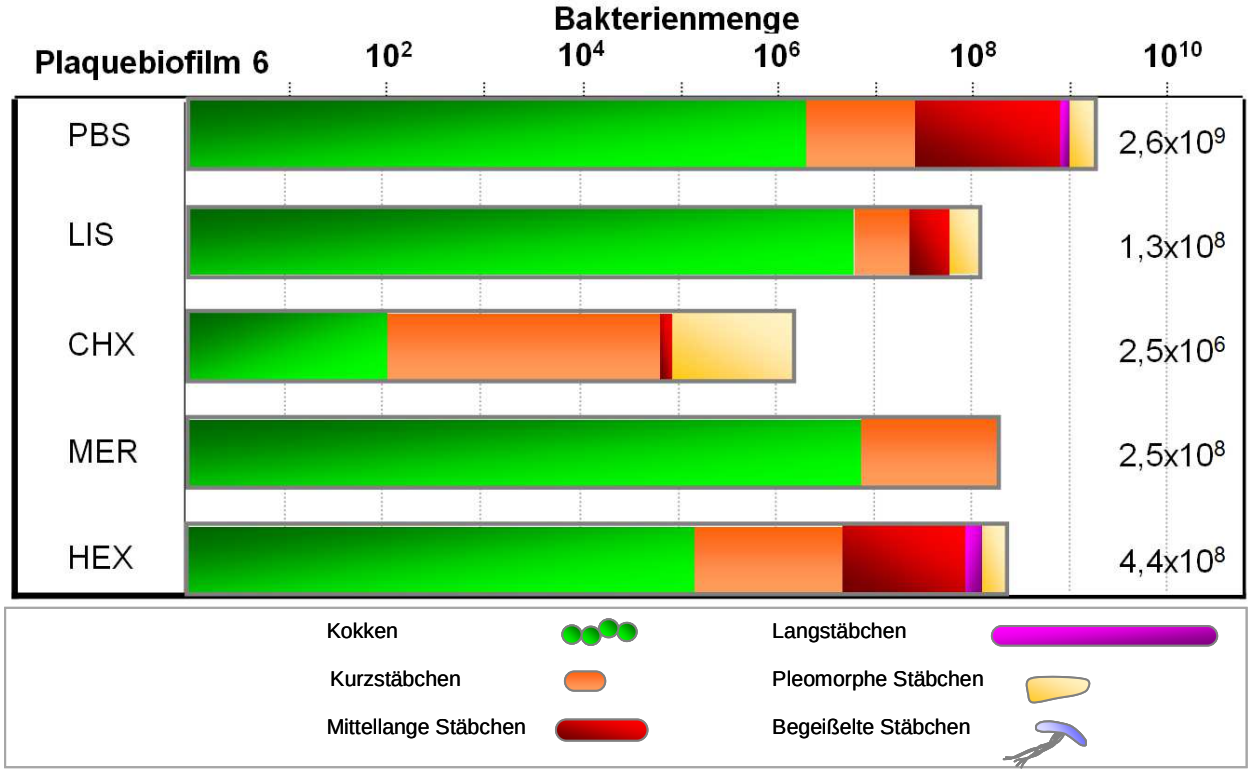


Abb. 27: Gesamtbakterienmenge Plaquebiofilm Proband 6

Proband 7

Im unbehandelten Biofilm (PBS) des Probanden 7 sind 84 % Kokken, 3 % Kurzstäbchen, 3 % mittellange Stäbchen, 5 % Langstäbchen und 5 % pleomorphe Stäbchen zu finden (siehe Abb. 28). Die Reduktion dieser Bakterien mit einer Gesamtmenge von 3 x 10E8 durch die Behandlung mit Listerine® ist am deutlichsten (9 x 10E6), während die Gesamtbakterienmenge durch die Wirkung von Chlorhexamed Forte® und Meridol® kaum verringert wurde (je 1 x 10E8). Durch die Behandlung mit Listerine® fand jedoch eine Verschiebung (shift) der Zusammensetzung der Bakterien statt. Sowohl Kokken (95 %) als auch Kurzstäbchen (5 %) wurden anteilsmäßig mehr, während die anderen im Kontrollbiofilm vorhandenen Morphotypen hier nicht mehr zu finden sind. Auch unter dem Einfluss von Meridol® (97 %) und Hexoral® (91 %) wurde der Anteil kokkaler Mikroorganismen durch die Behandlung höher, allein durch Chlorhexamed Forte® (70 %) konnten sie reduziert werden. Auf dem mit Chlorhexamed Forte® behandelten Probeplättchen waren sehr viel mehr Langstäbchen (24 %) als im unbehandelten Biofilm vorhanden, bei Meridol® waren diese nicht mehr zu finden. Während Chlorhexamed Forte® und Meridol® eine Veränderung der morphotypischen Zusammensetzung der Biofilme bewirkten, wurden die Stäbchen durch den Einfluss von Hexoral® gleichmäßig reduziert. Kurzstäbchen sind auf dem mit Hexoral® behandelten Biofilmträger gar nicht mehr vorhanden.

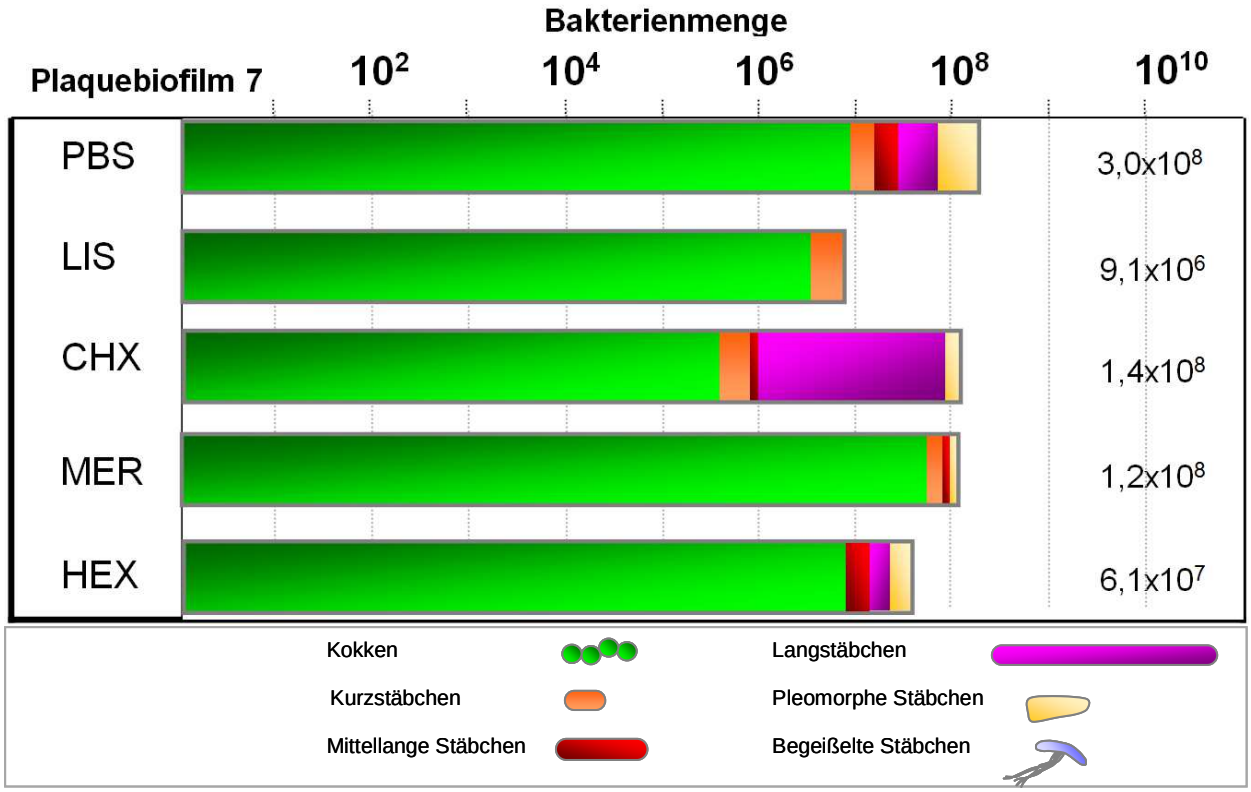


Abb. 28: Gesamtbakterienmenge Plaquebiofilm Proband 7

Zusammenfassung der Tabellen

Nach 21 Tagen Behandlung der Patientenbiofilme *in vitro* konnten aufgrund der durch individuelle Unterschiede im Ansprechverhalten auf die Mundspüllösungen hervorgerufenen hohen Streuung zwischen der negativen Kontrolllösung (PBS) und den anderen vier Mundspüllösungen nur geringe Unterschiede beobachtet werden. Die Wirkung der Prüfsubstanzen auf die Gesamtbakterienmenge der Biofilme variiert, jedoch beträgt bei dem Großteil der analysierten Proben der quantitative Unterschied im Vergleich zur Kontrolllösung etwa eine Zehnerpotenz weniger Bakterien.

Beim direkten Vergleich zwischen den einzelnen Mundspüllösungen ist eine Tendenz zu unterschiedlichen Wirkungen zu erkennen. Der antimikrobielle Effekt von Chlorhexamed Forte® war bezüglich der Gesamtbakterienmenge bei allen Proben ausgeprägter als bei den übrigen Testlösungen. Unter dem Einfluss von Listerine® werden die Bakterien nicht selektiv abgetötet, die Bakterienzahl wird vielmehr relativ gleichmäßig reduziert und die mikrobielle Gemeinschaft somit nicht oder nur sehr wenig verschoben (geringer shift). Chlorhexamed Forte®, Meridol® und Hexoral® bewirken dagegen eine selektive Abtötung einzelner Spezies und somit eine Verschiebung der Bakte-

riengemeinschaft in eine bestimmte Richtung, d. h. die ursprüngliche Balance zwischen den Spezies ist nicht mehr vorhanden.

Nach der visuellen Begutachtung ist der Anteil Stäbchen, speziell Langstäbchen (Fusobakterien), beispielsweise auf den mit Listerine® im Unterschied zu mit den anderen drei Testlösungen behandelten Oberflächen der Probeplättchen tendenziell niedriger. Der Phänotyp Kokken dagegen wird unter Listerine® weniger stark reduziert als unter Chlorhexamed Forte®, Meridol® und Hexoral®.

Die Biofilme der Probanden reagierten unterschiedlich auf die Testlösungen.

Bei Proband 1 ist unter Chlorhexamed Forte®, Meridol® und Hexoral® eine Bakterienreduktion und eine deutliche Verschiebung (shift) zu erkennen, während bei Listerine® weniger Reduktion der Bakterien, dafür aber kaum Änderung in der Zusammensetzung zu erkennen ist (siehe Abb. 22). Bei Proband 2 wurden die Bakterien im Vergleich zur Kontrolle bei allen vier Lösungen kaum reduziert. Eine Verschiebung der mikrobiellen Gemeinschaft in Richtung anderer Morphotypen ist bei Chlorhexamed Forte® und bei Meridol® deutlich zu erkennen, während die reduzierende Wirkung auf die verschiedenen Spezies bei Listerine® und Hexoral® eher gleichmäßig ist (siehe Abb. 23). Bei Proband 3 variiert die Wirkung der Prüfsubstanzen auf die Gesamtbakterienmenge der Biofilme wiederum stärker. Nach der Behandlung wies die Anzahl der Bakterien auf den mit Chlorhexamed Forte® behandelten Biofilmträgern eine stärkere Reduktion auf als bei Listerine®, Meridol® und Hexoral®. Bis auf Listerine® führten alle Testlösungen zu einer Verschiebung der mikrobiellen Zusammensetzung der Biofilme (siehe Abb. 24). Bei Proband 4 erzielte nach 21 Tagen Behandlung Chlorhexamed Forte® sowohl die deutlichste Reduktion der Gesamtbakterienanzahl als auch eine vollständige Reduktion der mittellangen und der pleomorphen Stäbchen. Unter dem Einfluss von Chlorhexamed Forte® fand jedoch eine Verschiebung der Morphotypen statt, während durch die Behandlung mit den anderen Testlösungen eher gleichmäßig reduziert wurde (siehe Abb. 25). Bei Proband 5 zeigt sich die Anzahl der Gesamtbakterienmenge auf den mit den Prüfsubstanzen behandelten Proben im Vergleich zur gleichzeitig getesteten Kontrolle deutlich verringert, wobei Meridol® die stärkste reduzierende Wirkung zeigte. Vergleichbare Ergebnisse zeigen sich auch hinsichtlich des Einflusses auf die morphotypische Zusammensetzung der Biofilme, beispielsweise fand bei allen Testlösungen (außer Meridol®) eine gleichmäßige Reduktion der Kurzstäbchen statt. Bei Chlorhexamed Forte® und Meridol® sind nach Behandlung keine Langstäbchen mehr

vorhanden, bei Listerine® und Hexoral® ist ihr Anteil jedoch leicht angestiegen (siehe Abb. 26). Bei Proband 6 zeigen sich nach der Behandlung mit den vier Testlösungen sehr unterschiedliche Resultate. Dabei erzielte die Mundspüllösung Chlorhexamed Forte® die stärkste Reduktion der Gesamtbakterienmenge, jedoch ist eine Verschiebung deutlich sichtbar. Unter dem Einfluss von Listerine® und Hexoral® ist die morphotypische Zusammensetzung des Biofilms weitgehend gleich geblieben. Die Behandlung durch Meridol® zeigte bei diesem Probanden die stärkste Veränderung der Zusammensetzung der Biofilme (siehe Abb. 27). Bei Proband 7 ist die Reduktion der Bakterien unter Listerine® am stärksten, während die Gesamtbakterienmenge durch die Wirkung von Chlorhexamed Forte® und Meridol® kaum verringert wurde. Durch die Behandlung mit Listerine® fand jedoch eine Verschiebung (shift) der Bakterien statt, jedoch bewirkten auch Chlorhexamed Forte® und Meridol® eine geringfügige Veränderung der morphotypischen Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaft (siehe Abb. 28).

Wegen der großen interindividuellen Variabilität sind die beschriebenen Unterschiede statistisch nicht signifikant.

6 Diskussion

6.1 Studiendesign

Die von Dr. Costerton im Jahre 1995 aufgestellte Behauptung, Karies und parodontale Erkrankungen seien Biofilminfektionen, ist mittlerweile wissenschaftlich anerkannt [Wang, 2010]. In der Zahnmedizin werden seit vielen Jahren antimikrobielle Substanzen zur Prävention und Behandlung von Karies und parodontalen Erkrankungen erfolgreich eingesetzt und stellen eine wertvolle Ergänzung zu manuellen Therapiemaßnahmen dar [Barnett, 2003; Pitten et al., 2003; Shapiro et al., 2002]. Die beinahe unüberschaubare Auswahl an Präparaten, welche dem Anwender heutzutage zur Verfügung stehen, enthalten verschiedene Wirkstoffe. Dabei steht das Chlorhexidin mit seiner hervorragenden antimikrobiellen Wirksamkeit medizinisch im Mittelpunkt [Auschill et al., 2005]. In der Literatur sind zahlreiche Studien zu finden, in denen verschiedene Agentien sowohl *in vivo* als auch *in vitro* getestet wurden (siehe Kap. 2.6).

Die vorliegende Studie wurde durchgeführt, um den Einfluss der Mundspüllösungen Chlorhexamed Forte®, Listerine®, Hexoral® und Meridol® auf dentale Biofilme *in vitro* zu untersuchen. Ein möglicher plaquehemmender Einfluss dieser antibakteriellen Substanzen sollte durch den Vergleich mit einer Kontrolllösung (PBS-Lösung) eruiert werden. Grundvoraussetzung war zunächst die Herstellung von Biofilmen. Die Weiterentwicklung antibakterieller Substanzen erfordert In-vitro-Modelle, die die Wirksamkeitsprüfung an Biofilmen einfach und reproduzierbar ermöglichen [Zelver et al., 1999]. Hintergrund der vorliegenden Studie war es, ein möglichst einfaches und praktisches Modell zu entwickeln, mit dem schnell reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden können.

6.1.1 Biofilmmodelle

Für die Gewinnung von Biofilmen stehen der Wissenschaft verschiedene Methoden zur Verfügung, wobei hauptsächlich zwischen In-vivo- und In-vitro-Modellen unterschieden wird, die je nach Fragestellung gezielt eingesetzt werden können [Sissons, 1997; Wimpenny, 1997].

Die medizinische Mikrobiologie konzentrierte sich in der Vergangenheit zunächst darauf, einzelne Spezies überhaupt erst *in vitro* zu isolieren, anzuzüchten und in ihrer pathogenetischen Bedeutung zu charakterisieren. Bei entsprechender Kultivierung können somit selektive Betrachtungen einzelner Bakterienspezies erfolgen. Diese „Non-Biofilm"-Kultursysteme bildeten lange die Eckpfeiler der oralen Mikrobiologie, verlieren jedoch gegenüber den in der neueren Forschung verwendeten Biofilmen mit ihren komplexen Wechselbeziehungen immer mehr an Bedeutung [Sissons, 1997; Ten Cate, 2006]. In den letzten Jahren wurde nach und nach akzeptiert, dass die in Biofilmen organisierten Bakterien oft ganz unterschiedliche Phänotypen mit anderen Eigenschaften hervorbringen als die in Planktonkultur oder auf Agarplatten wachsenden Bakterien (z. B. keine genotypische oder räumliche Heterogenität) [Brown et al., 1988; Donlan & Costerton, 2002; Marsh & Bradshaw, 1995; Schaudinn et al., 2009; Shen et al., 2009].

Laborbasierte Modelle ermöglichen die Züchtung und Analyse von künstlichen Biofilmen. Die bakterielle Zusammensetzung dieser „Multispezies"-Kulturen ist dabei beliebig gestaltbar [Kinniment et al., 1996a]. Um diesen künstlichen Biofilmkomplexen ähnliche Bedingungen wie in ihrer natürlichen Umgebung zu bieten, können beispielsweise Biofilmreaktoren eingesetzt werden [Guggenheim et al., 2001; Shapiro et al., 2002; Ten Cate, 2006]. Mit Hilfe dieser Modelle werden Untersuchungen zur Plaquestruktur [Hope & Wilson, 2006; Netuschil et al., 1998; Pratten et al., 2000] und zur räumlichen Anordnung der Mikroorganismen durchgeführt [Auschill et al., 2001]. Darüber hinaus besteht im Labor auch die Möglichkeit, natürliches Zellmaterial beziehungsweise bereits intraoral gewonnene Biofilme zu kultivieren („microcosm") [Pratten et al., 1998a; Sissons et al., 1996; Wimpenny, 1997].

Verschiedene Plaque-Biofilm-Modelle wurden entwickelt, um die Plaqueformation, die Plaquestruktur und die antimikrobielle Empfindlichkeit der Plaquebiofilme untersuchen zu können [Walker & Sedlacek, 2007]. Guggenheim et al. entwickelten ein „Multispezies"-Biofilmmodell, um die Zusammensetzung supragingivaler Plaque nachzuahmen und ihre Struktur zu untersuchen [Guggenheim et al., 2001; Guggenheim et al., 2004]. Hope und Wilson entwickelten ein Modell, in dem das Wachstum subgingivaler Plaque auf Hydroxylappatit-Scheiben in einem Biofilmreaktor mit konstanter Tiefe (CDFF - constant depth film fermenter) untersucht werden konnte [Hope & Wilson, 2006]. Der Einsatz der „Mikrokosmos"-Modelle des CDFF und der „Artificial mouth"-Modelle mit dem Ziel, die Plaque unter möglichst lebensnahen Bedingungen unbeeinflusst wachsen zu lassen, ist

auf die Analyse der funktionellen Interaktionen in einer Biofilmgemeinschaft ausgerichtet und erfordert Langzeitversuche bis zu einigen Wochen [Sissons, 1997]. Als Inokulum werden sehr oft Plaqueisolate eingesetzt, um eine Multispeziesplaque, wie sie unter In-vivo-Bedingungen wächst, zu garantieren [Sissons, 1997].

Die Entwicklung von In-vitro-Systemen zur Simulation der dentalen Plaque ermöglicht den kontrollierbaren Einsatz und die Konstanz definierter Ausgangsparameter (insbesondere die Art der Bakterienkultur [Sissons, 1997], die Temperatur, den pH-Wert und den Sauerstoffgehalt), je nach Design schnelle und kostengünstige Prüfungen [Pitten et al., 2003] sowie die mikroskopische Beobachtung [Singleton et al., 1997]. Ein weiterer Vorteil der laborbasierten Modelle ist die Standardisierbarkeit der Untersuchungsbedingungen sowie die Möglichkeit, gleichzeitig eine große Anzahl von Biofilmen zu gewinnen. Die Standardisierbarkeit schafft die Grundlage für den Vergleich von Studienergebnissen aus verschiedenen Laboratorien.

Die Möglichkeiten der umfassenden Simulation physiologischer Gegebenheiten der Mundhöhle und speziell der parodontalen Tasche sind bei einem In-vitro-Modell allerdings begrenzt [Wecke et al., 2000; Wimpenny, 1982]. Faktoren wie die bakterielle Koaggregation verschiedener Spezies, die Turnover-Rate (Entfernung und Neubildung von Plaque) sowie die verschiedenen endogenen Faktoren (z. B. der Einfluss des Speichels) können hierbei nicht oder nur teilweise berücksichtigt werden. Darüber hinaus kann das Keimspektrum im künstlichen Modell sowohl was den Umfang als auch was die Struktur betrifft, nicht ausreichend simuliert werden. Letztlich sind auch die vielseitigen und ständig schwankenden Bedingungen der Mundhöhle, die eine dynamische Anpassung und Selektion der in ihr lebenden Keime verursachen, sehr komplex [Hall-Stoodley & Stoodley, 2002; Herles et al., 1994]. Die adäquate Wiedergabe der physiologischen Mundflora in einem In-vitro-Modell ist daher kaum realisierbar. Damit wird impliziert, dass ein Modell niemals eine komplexe Situation imitieren kann [Fine, 1995] und somit eine Übertragung der In-vitro-Ergebnisse auf die In-vivo-Situation nicht zulässig ist. Aus diesem Grund ist die direkte Simulation der Mundhöhle durch ein Modell auch nicht beabsichtigt [McKee et al., 1985]. Es müssen lediglich gewisse Parameter erfüllt sein, die für den Versuch von Interesse sind [Herles et al., 1994; McKee et al., 1985]. Dazu werden auf der Basis bekannter Daten Modellbedingungen zu physikochemischen und mikrobiologischen Parametern der Mundhöhle und der Plaquemikroflora kreiert, die so weit wie möglich praxisnah, reproduzierbar und gleich-

zeitig praktikabel und interpretierbar sind [Bradshaw & Marsh, 1999]. Unabhängig von der Komplexität, aber abhängig von der zu untersuchenden Fragestellung muss man das geeignete Modell aus dem vielseitigen Angebot heraussuchen [Wimpenny, 1997]. Das Verhältnis von Anspruch und methodischem Kompromiss entscheidet dabei über die Qualität der Ergebnisse und ihrer In-vivo-Relevanz.

Da jedoch auch für In-vivo-Studien kein allgemeingültiges Konzept besteht, führt die hohe Varianz und Fülle von Parametern dazu, dass die Ergebnisse nur schwer oder teilweise gar nicht vergleichbar sind. Für einen Vergleich von In-vitro- mit In-vivo-Ergebnissen ist es unbedingt notwendig, wesentliche Testbedingungen, wie die Materialauswahl, Inkubationszeiten und die angewanten Analyseverfahren, zu standardisieren. Dies gilt insbesondere für eine Studie zur In-vivo-Validierung eines In-vitro-Modells. So können vergleichende In-vitro-/In-vivo-Studien bei der Anwendung standardisierter Testverfahren übereinstimmende Ergebnisse erzielen.

In-vivo-Studien natürlicher dentaler Plaque sowohl im Tierexperiment als auch in der menschlichen Mundhöhle sind stark eingeschränkt. Komplizierte ethische Fragestellungen einschließlich des Problems der gingivitisinduzierenden Plaqueanhäufung und Probleme mit dem Zugang und der Sammlung der Plaque stellen beträchtliche Schwierigkeiten dar [Sissons, 1997]. In den letzten Jahrzehnten sind jedoch immer feinere experimentelle Methoden zur Charakterisierung dentaler Biofilme entwickelt worden, die uns heute sehr detaillierte Informationen über den Biofilmaufbau liefern. Bei In-vivo-Modellen beispielsweise, bei denen der Biofilm auf herausnehmbaren Trägermaterialien entsteht, kann sichergestellt werden, dass die dentale Plaque beim Entfernen aus der Mundhöhle weitestgehend intakt bleibt und so den weiteren Untersuchungen zur Verfügung steht [Auschill et al., 2001; Wood et al., 2000; Zaura-Arite et al., 2001]. Schutz und Stabilität zur Gewinnung intakter Biofilme bieten in der Mundhöhle fixierbare Trägersysteme, in denen die Trägermaterialien eingelassen werden können. Als Trägersysteme dienen beispielsweise auf Zahnoberflächen geklebte dünne Kunstofffolien [Theilade, 1964] oder kieferorthopädische Brackets, in denen Schmelzplättchen als Trägermaterial befestigt werden [Meyerowitz et al., 1991]. Wecke et al. etablierten im Jahr 2000 eine neue Technik, bei der Polytetrafluorethylene, Gold und Dentin als Trägermaterialien fungieren [Wecke et al., 2000]. Diese verschiedenen Materialien konnten auf speziellen Trägern direkt in parodontale Taschen von Parodontitispatienten eingebracht und somit die subgingivale bakterielle Besiedlung analysiert werden. Ebenso finden sich in der Li-

teratur zahlreiche Schienenmodelle, die mittlerweile ein etabliertes herausnehmbares Trägersystem darstellen [Nyvad & Kilian, 1987; Zaura-Arite & Ten Cate, 2000].

6.1.2 Biofilmgewinnung

Obwohl alle der oben genannten Modelle unser Verständnis für dentale Biofilme und deren Entstehung, Organisation und Wachstum stark vorangetrieben haben, wurde doch in keinem direkt die Frage gestellt, wie dentale Plaque *in vitro* heranreift und auf die Wirkung verschiedener Antiseptika reagiert.

Für unsere Studie entwickelten wir ein einfaches, reproduzierbares Modell, das die In-vivo-Zusammensetzung der dentalen Plaque imitiert und mit dessen Hilfe ihre Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen antimikrobiellen Substanzen getestet werden kann.

In der vorliegenden Studie wurden Plaqueproben von Zähnen mit mindestens 6 mm Sondierungstiefe entnommen und anschließend in vorreduziertem Medium bei Umgebungstemperatur (circa 20 °C) aufbewahrt. Die bei der Entnahme stattfindende Veränderung der physiologischen Aktivität (Enzymexpression, Proteinbiosynthese etc.) der Bakterien wird dadurch minimiert. Die mechanische Entfernung der subgingivalen Plaque vom Zahn bedeutet zwar die Zerstörung der dreidimensionalen Struktur des Biofilms [Wecke et al., 2000], diese *in situ* gewachsene Lebensgemeinschaft kann sich jedoch in dem neuem Medium und auf neuem Untergrund neu adaptieren [Walker & Sedlacek, 2007]. Bei Walker et al. formte sich nach der Behandlung mit Ultraschall und der Verwirbelung im Vortex sogar wieder ein neuer Biofilm [Walker & Sedlacek, 2007]. Die Einstellung eines neuen Gleichgewichts zwischen den überlebenden Bakterienspezies im Medium ist also möglich.

Die Inkubationszeiten für die In-vitro-Testung unterscheiden sich je nach verwendetem Modell und Fragestellung deutlich. Eine wichtige Voraussetzung für unser Modell war, dass die Zeitspanne für die Organisation eines neuen Biofilms ausreichend groß war, so dass die Fortsetzung der Kolonisation auf vernünftige Weise erfolgen konnte. Idealerweise entspricht diese Zeitspanne den Vorgängen *in vivo* [Walker & Sedlacek, 2007]. Nach Auschill et al. (2001) liegt bereits nach 48 Stunden Inkubationszeit ein stabiler, ausgereifter Zustand der Plaque vor [Auschill et al., 2001]. Auch Herles et al. (1994) halten 48 Stunden Bebrütung für ausreichend, obwohl die Anzahl der Keime während 72 Stunden zunimmt [Herles et al., 1994].

Nach den 48 Stunden Vorkultivierung wurden die Plaqueisolate als Inokulum in das Medium eingebracht und auf Thermanox®-Deckgläschen in 24-well-Platten bei 37 ℃ anaerob inkubiert, um Multispeziesbiofilme, wie sie unter In-vivo-Bedingungen wachsen, anzuzüchten [Sissons, 1997]. Vor der Inokulation wurde der in den 48 Stunden Vorkultivierung entstandene Biofilm aufgewirbelt und damit in Suspension gebracht, so dass nicht nur die planktonischen Bakterien aus dem Überstand, sondern alle Zellen des vorher entstandenen dentalen Biofilms verwendet wurden.

Der Charakter der dentalen Plaque als Multispeziesbiofilm ist gerade bei der Einwirkung von Antiseptika auf die Plaquemikroflora von großer Bedeutung [Sissons et al., 1996; Wilson et al., 1996]. Bakterien, die in einem Biofilmverbund an einer Oberfläche haften, exprimieren andere Gene und verhalten sich vollkommen anders als freischwimmende Monokulturen (z.B. koordinierter Stoffwechsel und Abbau von Stoffen) [Costerton et al., 1999; Donlan & Costerton, 2002; Marsh & Bradshaw, 1995; Romero et al., 2008]. Aufgrund dieser Unterschiede weisen Biofilmbakterien im Vergleich zur gleichen, planktonisch gewachsenen Spezies eine 100- bis 1000-fach erhöhte Resistenz gegenüber antimikrobiellen Substanzen auf [Ceri et al., 1999; Romero et al., 2008]. Die Einzelbakterien in planktonischer oder auch disperser Phase befinden sich ungeschützt in einer wässrigen Umgebung, in der sie dem Angriff von Hemmstoffen direkt ausgesetzt sind. Dies hat wesentliche Auswirkungen auf die einzusetzende Wirkstoffkonzentration [Decker et al., 2003], aber auch auf die Dauer der Anwendung (siehe Kap. 6.8.1.) [Baehni & Takeuchi, 2003; Pitten et al., 2003].

Bei der Langzeitanwendung sollten antimikrobielle Substanzen favorisiert werden, deren Eigenschaften auf anderen als den bakteriziden oder bakteriostatischen beruht. Die Wahl sollte dabei auf Agentien treffen, die effektiv die Anhaftung und Kolonisation der Bakterien verhindern können. P.C. Baehni und Y. Takeuchi stellten in ihrer Arbeit 2003 verschiedene Möglichkeiten dar, wie diese Antiplaqueeigenschaften aussehen können (siehe auch Kap. 2.5.2) [Baehni & Takeuchi, 2003]. In den folgenden Abbildungen sind diese verschiedenen Wirkungsweisen in modifizierter Form dargestellt.

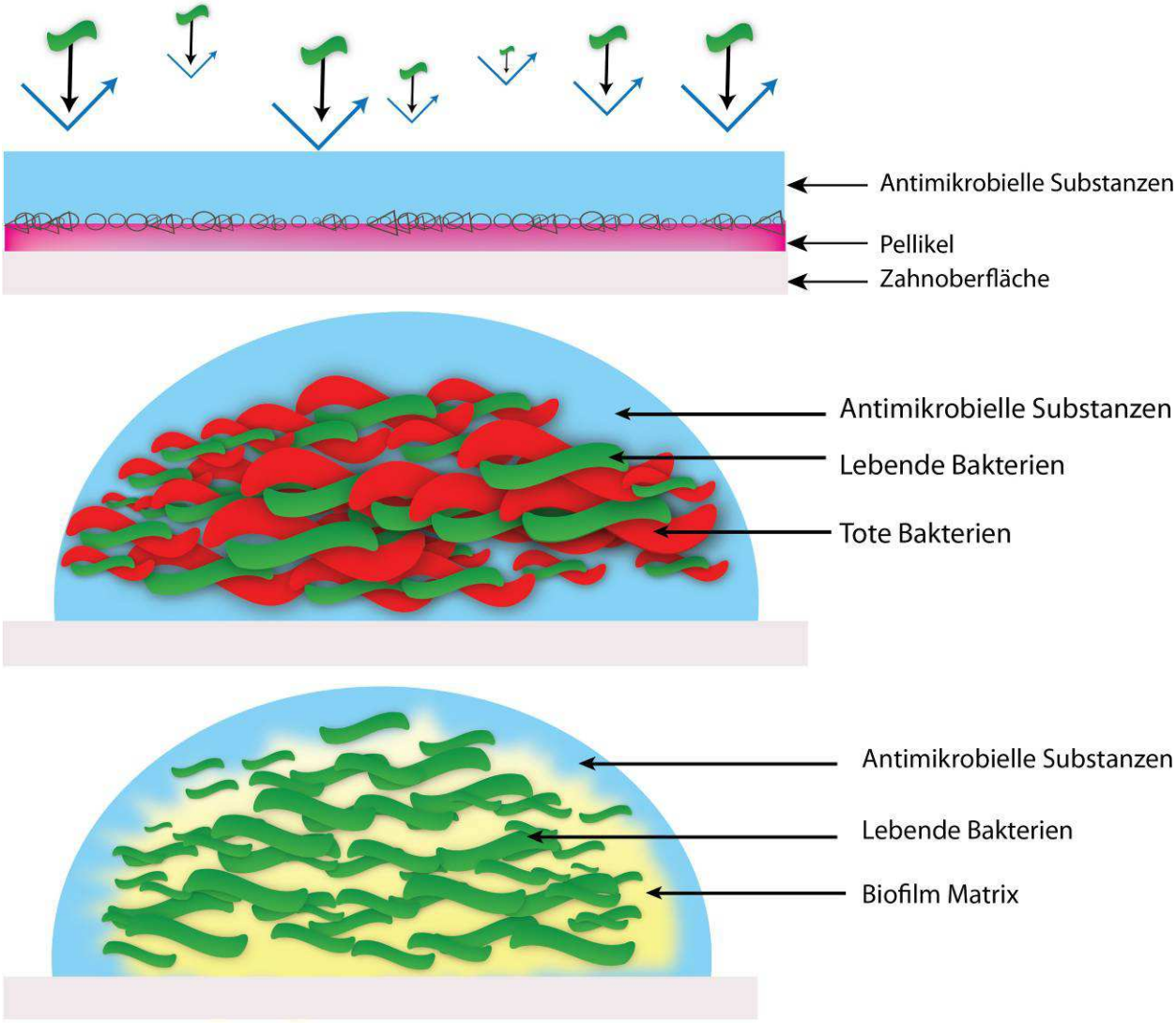


Abb. 29: Kontrolle des dentalen Biofilms durch antimikrobielle Substanzen
(modifiziert nach P.C. Baehni und Y. Takeuchi 2003 [Baehni & Takeuchi, 2003])

6.1.3 Anzahl der Probanden

Eine größere Anzahl Probanden wäre statistisch sicherlich aussagekräftiger gewesen, hätte den zeitlichen Rahmen dieser Doktorarbeit jedoch gesprengt. Auch in ähnlichen Biofilmstudien kamen jeweils nur vier [Nyvad & Kilian, 1987] bis acht Probanden [Arweiler et al., 2004; Walker & Sedlacek, 2007; Wood et al., 2000] bzw. auch nur einzelne Zähne [Gorur et al., 2009] zum Einsatz.

6.1.4 Nährmedium

In der Literatur kommen die verschiedensten Medien zur Kultivierung von Bakterien zur Anwendung. Nach McKee et al. haben die Medien in In-vitro-Modellen eine große Bedeutung [McKee et al., 1985] und sollten für vergleichende Untersuchungen eine möglichst definierte Zusammensetzung aufweisen [Bowden, 1999]. In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass in einem Medium verschiedene Bakterien wachsen können [Dorn et al., 1998; Guggenheim et al., 2001; Kamaguchi et al., 2001; Walker & Sedlacek, 2007; Yamaguchi et al., 1998].

In allen drei in dieser Studie getesteten Medien konnte bakterielles Ko-Wachstum festgestellt werden, wobei in der modifizierten Todd-Hewitt-Bouillon die besten Ergebnisse erzielt wurden. Deshalb wurde es sowohl zur weiteren Herstellung von Multispeziesbiofilmen als auch zur Generierung des *in vivo* entnommenen Biofilms verwendet [Gorur et al., 2009].

Der Todd-Hewitt-Bouillon wurde Hefeextrakt (5 g/l), Cystein (0,75 g/l), Haemin (5 mg/l) und Vitamin K (200 µl/l) supplementiert, was deutlich kohlenhydratlimitierten Bedingungen entspricht [McKee et al., 1985]. Durch die Verwendung von Cystein und Hefe-Extrakt standen jedoch auch die notwendigen Aminosäureanteile zur Fermentierung bereit. Die gewählten Medienbedingungen gewährleisten eine stabile bakterielle Mischkultur. Die Schwierigkeiten der Standardisierung eines Mediums, das künstlichen Speichel enthält, konnten auf diese Weise umgangen werden. Die Speichelzusammensetzung ist nämlich extrem komplex [Wilson et al., 1998].

Bezüglich des Nährmediums liegen in einem Modellversuch allgemein vielfältige Fehlerquellen versteckt, die es erschweren, Ergebnisse mit der In-vivo-Situation zu vergleichen. Die Flussrate und Zusammensetzung des natürlichen Mediums Speichel sind nicht konstant, denn sie variieren u. a. in Verbindung mit der Nahrungsaufnahme [Pitten et al., 2003]. Außerdem befindet sich auf den Zähnen nur ein dünner Speichelfilm. Die Biofilme sind daher nicht von einem Nährmedium mit großem, konstantem Volumen umgeben [Bowden, 1999]. Realistischer wäre das Beträufeln der Testkörper mit dem entsprechenden Medium [Wimpenny, 1997].

Die Plaquebiofilme in dieser Studie wurden 21 Tage lang mit den verschiedenen Antiseptika behandelt. Der Mediumwechsel erfolgte alle 24 Stunden.

6.1.5 Trägermaterial und Wachstumsbedingungen

Zur Untersuchung der Wirkung verschiedener antimikrobieller Substanzen unter nahezu physiologischen Bedingungen mit anschließendem Mikroskopieren der Proben eignet sich insbesondere ein Modell, bei dem der Biofilm auf Trägermaterialien entsteht. Bei der Auswahl eines geeigneten Trägermaterials sind mögliche Interaktionen der Oberfläche mit der äußeren Umgebung zu bedenken. In der Literatur finden sich eine Reihe von Studien, in denen Hydroxylapatit-Plättchen als Probekörper zur Imitation der Zahnoberfläche eingesetzt werden, da ihre chemische Zusammensetzung der des Zahnschmelzes sehr ähnlich ist [Bradshaw & Marsh, 1999; Guggenheim et al., 2001; Herles et al., 1994; Hope & Wilson, 2006; Shen et al., 2009; Thurnheer et al., 2004; Walker & Sedlacek, 2007]. Eine natürliche Oberfläche wie der Zahnschmelz setzt bei niedrigem pH-Wert Phosphat- und Hydroxylionen frei (Demineralisation) und kann somit im Gegensatz zu einer inerten Oberfläche wie Glas oder Kunststoff die Mineralzusammensetzung des Biofilms beeinflussen [Deng et al., 2004]. Glas und Kunststoff als Probekörpermaterialien bieten bei anschließenden mikroskopischen Untersuchungen außerdem den Vorteil, dass sie keine Eigenfluoreszenz besitzen [Arweiler et al., 2004; Auschill et al., 2005]. In der vorliegenden Studie kam Thermanox® als Trägermaterial zum Einsatz, da mit einer solchen Oberfläche eine stärkere Annäherung an die physiologischen Gegebenheiten gewährleistet ist.

Thermanox® ist ein ca. 0,18 mm dickes, transparentes Spezialplastik mit einer Eigenfluoreszenz von 380 - 545 nm. Die für die Zellkultur entwickelten, mit Gamma-Strahlen sterilisierten Deckgläser sind sehr vorteilhaft für mikroskopische Färbungen, direkt für Mikroskoppräparationen verwendbar und können mitsamt den Proben in Mikrotomen oder Kryostaten geschnitten werden. Sie widerstehen Alkoholen, Lösungsmitteln und autofluoreszierenden Substanzen und können Extremtemperaturen von – 70 °C bis + 150 °C standhalten. Die vom Hersteller angegebene Behandlung mit Plasmagas soll die Dichte von Hydroxylgruppen auf der Materialoberfläche und damit die Zelladhäsion verbessern, was zu einer höheren Proliferationsrate auf diesem Material führt.

Um für die verschiedenen Bakterienkulturen/Plaqueisolate möglichst gleiche Versuchsbedingungen zu schaffen, wurden 24-well-Platten genutzt. Die Thermanox®-Deckgläschen wurden unter sterilen Bedingungen einzeln in je ein Well eingelegt. Damit konnte eine geschützte Reifung der Biofilme unter gleichen Wachstumsbedingungen sichergestellt werden. Die in dieser Studie gewählte Temperatur von 37 °C im Brut-

schrank der Anaerobierkammer entspricht der mittleren Temperatur in der Mundhöhle. Die Begasung mit einem Stickstoff-Kohlendioxid-Gemisch (95:5) liefert die notwendigen anaeroben Verhältnisse für die Bakterienspezies. Dieses Modell bietet den Vorteil des konstanten Umgebungsmillieus (anaerob) inklusive konstanter Begasung, sowie die Möglichkeit der parallelen Testung mehrerer Proben.

Es zeigte sich, dass das Trägermaterial generell keinen Einfluss auf Dicke und Vitalität des Biofilms ausübt [Arweiler et al., 2004]. Die elektronenmikroskopische Analyse der verschiedenen Thermanox®-Deckgläschen ergab, das das Trägermaterial keinen großen Einfluss auf die Kolonisation hatte [Wecke et al., 2000].

6.2 Zusammensetzung der In-Vitro-Multispeziesbiofilme

Die Kolonisation pathogener Bakterien in parodontalen Läsionen wird im Allgemeinen als der entscheidende erste Schritt bei der Entwicklung parodontaler Erkrankungen angesehen [Moore et al., 1987; Yamaguchi et al., 1998]. In tieferen Schichten der Plaque sind Streptokokken, Aktinomyceten und Gram-positive Bakterien dominant, während Gram-negative wie Aktinobacillen und Fusobakterien nahe der Oberfläche dominieren [Listgarten, 1976].

Die für die Integration in unser Biofilmmodell gewählten Bakterien sind üblicherweise in supra- und subgingivaler Plaque zu finden. Die zur Herstellung des Multispeziesbiofilms verwendeten Spezies waren *P. gingivalis, P. intermedia, A. naeslundii , F. nucleatum subspecies polymorphum* und *S. mutans.*

Rickard et al. haben die Rolle der Koaggregation beim Wachstum von Multispeziesbiofilmen beschrieben [Rickard et al., 2003]. Wichtig bei der Biofilmbildung ist zum Beispiel die Funktion bestimmter Mikroorganismen wie z. B. *F. nucleatum,* die als Koaggregationsbrücken für nicht selbst haftende früh- und spätansiedelnde bzw. aerobe und anaerobe Bakterien agieren [Kolenbrander et al., 2002]. Die Gram-negativen Fusobakterien können mit allen bisher untersuchten oralen Spezies koaggregieren [Kolenbrander, 2000]. *P. gingivalis* und *T. denticola* beispielsweise sind robuste Koaggregationspartner von *F. nucleatum* [Kolenbrander, 2000; Kolenbrander et al., 2002]. Überdies ist der Frühbesiedler *F. nucleatum* immer zugegen, wenn sich auch der Spätbesiedler *P. gingivalis* angesiedelt hat, der wiederum mit vielen oralen Bakterien koaggregieren kann [Kamaguchi et al., 2001]. Die Aggregation und Koaggregation von

Bakterien verschiedener Spezies konnten auch in anderen In-vitro-Untersuchungen gezeigt werden [Kolenbrander, 1988; Marsh, 2004].

In jüngster Zeit wird der Biofilmcharakter der dentalen Plaque, die aus einer Vielzahl verschiedener Bakterienspezies besteht, mehr und mehr in den Vordergrund gerückt. In der Literatur wird überall auf den Multispezies-Charakter von Biofilmen hingewiesen [Costerton, 1995; Costerton et al., 1995; Gilbert et al., 1997; Herles et al., 1994]. Von entscheidender Bedeutung ist dabei, dass mehrere Bakterienarten eine Symbiose eingehen können und somit ein anderes Verhalten zeigen als Monospezieskulturen. Beispielhaft hierfür sind eine erhöhte Resistenz [Bradshaw & Marsh, 1999] oder eine allgemeine Leistungsverbesserung [Costerton, 1995]. Daher wird häufig gefordert, eine Keimsuspension aus meheren verschiedenen Keimen einzusetzen, wobei diese das in der Mundhöhle vorkommende Spektrum möglichst breit gefächert abdecken sollte [Sissons, 1997; Ten Cate & Marsh, 1994; Wilson et al., 1998]. Nur so kann auf die In-vivo-Situation zurückgeschlossen werden, da eine Multispezieskultur die Natur am ehesten imitiert [Pratten et al., 1998a].

Es erscheint zweifelhaft, dass In-vitro-Modelle mit Monokulturen oraler Mikroorganismen die Wirkung antibakterieller Agenzien auf dentale Plaque [Pitten et al., 2003] ausreichend nachweisen können, da die heterogene Struktur einer etablierten Plaque mit ihren protektiven Interaktionen eine weit höhere Resistenz gegen entsprechende Substanzen zeigt als eine Monokultur [Davey & Costerton, 2006; Gilbert et al., 1997; Zaura-Arite et al., 2001].

Bei der Isolierung von Bakterienstämmen aus der Natur und ihrer Überführung in Monospezies-In-Vitro-Systeme (wie z. B. die DSMZ-Stämme) konnte gezeigt werden, dass bis zu 37 % des Genoms der enthaltenen Bakterien verloren gehen können (Resistenzen, im Genom integrierte Phagen, Adaptationsgene an das jeweilige Habitat, etc.). [Davey & Costerton, 2006]. Biofilme aus diesen Bakterienstämmen sind, selbst wenn sie einen gemischten Biofilm gebildet haben, empfindlicher gegenüber Antibiotika oder anderen Detergentien.

Das Problem der Anzucht eines Multispeziesbiofilms mit DSMZ-Stämmen liegt in der begrenzten Mischbarkeit der Spezies. Verschiedene Forschergruppen etablierten Bakterienkonsortien aus fünf bis sechs oralen Bakterienspezies, die auch die Basis der vor-

liegenden Arbeit bilden [Guggenheim et al., 2001; Herles et al., 1994; Shapiro et al., 2002; Thurnheer et al., 2004; Thurnheer et al., 2003].

Komplexere Bakterienkulturen wurden von der Arbeitsgruppe um P. D. Marsh etabliert [McKee et al., 1985]. Das als „Marsh"-Konsortium bekannt gewordene Modell umfasst 9 - 11 Spezies (*S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. gordonii*, *S. oralis*, *A. naeslundii*, *L. casei*, *Neisseria subflava*, *V. dispar*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella nigrescens*, *F. nucleatum*) und ist die Basis für viele Untersuchungen mit „Mikrokosmos"-Modellen [Kinniment et al., 1996a; Kinniment et al., 1996b; McKee et al., 1985; Sissons, 1997]. Die bakterielle Diversität dieser für replikative Modelle angewandten Bakterienpopulationen wird nur noch von natürlichen Isolaten der Plaque-Mikroflora übertroffen, die im Modell des *Artificial mouth* Anwendung finden [Sissons, 1997]. Für das in dieser Arbeit entwickelte Multispeziesmodell wurde das Konsortium aus fünf Bakterienspezies gewählt, da es verschiedene Vorteile aufweist:

- Die Mischkultur ist im Todd-Hewitt-Medium biotechnologisch beherrschbar.
- Es bietet eine im Vergleich mit der natürlichen Plaqueflora ausreichende Diversität.
- Es stellt ein hinreichend adäquates System für die Untersuchung der Wirkung antibakterieller Agenzien auf die dentale Plaque dar, da sowohl supragingivale Erstbesiedler (*A. naeslundii*, *S. mutans* als pathologischer Markerkeim) als auch die koaggregierende Spezies *F. nucleatum* vertreten sind. *P. gingivalis* und *P. intermedia* zählen zu den späten, subgingival vorkommenden Besiedlern, die sowohl bei der Koaggregation mit frühen Streptokokken und Fusobakterien als auch bei der Produktion von EPS eine große Rolle spielen [Davey & Costerton, 2006] [Wang, 2010].

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass das Wachstum und die Zusammensetzung der dentalen Plaque in einem In-vitro-Testsystem und damit auch im vorgestellten eigenen Modell durch Hunderte von Parametern beeinflusst werden. In der Folge ist davon sicher auch die Wirksamkeit der antimikrobiellen Substanzen betroffen.

6.3 Zusammensetzung der In-vivo-Multispeziesbiofilme

Ein deutlicher Vorteil des in dieser Studie angewandten Modells ist der Erhalt der natürlichen Zusammensetzung der individuellen Plaquebiofilme der verschiedenen Probanden. Auf diese Weise konnte eine erhöhte Empfindlichkeit der Bakterien gegenüber an-

tibakteriellen Substanzen, wie sie bei den DSMZ-Stämmen vorhanden ist, weitgehend ausgeschlossen werden. Ebenso kann davon ausgegangen werden, dass das Genom der Bakterien bei der einmaligen Überführung von *in vivo* zu *in vitro* weitestgehend intakt geblieben ist.

Nach der Behandlung mit den Mundspüllösungen verändern sich sowohl die Dicke der Biofilmschichten als auch die morphologische Zusammensetzung der verschiedenen Biofilme bei jedem Probanden deutlich. Diese Beobachtung ist in ähnlicher Form schon von der Arbeitsgruppe um Arweiler et al. (2004) gemacht worden [Arweiler et al., 2004].

Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist der systematische intraindividuelle Vergleich akkumulierter Bakterien auf den verschiedenen Thermanox®-Deckgläschen, was von entscheidender Bedeutung bei der Betrachtung der individuellen Wirkung sein kann. So zeigte sich eine Änderung der phänotypischen Eigenschaften des Biofilms in Abhängigkeit von der Mundspüllösung.

6.4 REM-Untersuchung von Biofilmen

Die Mikroskopie ist eine der wichtigsten Techniken in der mikrobiellen Ökologie, da sie die direkteste Methode ist, um mikrobielle Gemeinschaften zu untersuchen [Liu et al., 2001]. Entwicklungen in der fortgeschrittenen Mikroskopie und molekularen Mikrobiologie haben es den Wissenschaftlern ermöglicht, mikrobielle, biofilmvermittelte Erkrankungen wie beispielsweise die Parodontitis besser und genauer zu untersuchen und zu charakterisieren [Schaudinn et al., 2009].

Die moderne Bestimmung der bakteriellen Flora mittels Clusteranalyse (die die Beziehung zwischen verschiedenen Arten untersucht) konnte zeigen, dass einige Spezies in der parodontalen Tasche nicht einzeln existieren, sondern Komplexe bilden [Socransky et al., 1998]. Die Elektronenmikroskopie ermöglicht es, die Komplexität humaner Plaquebiofilme zu untersuchen und strukturelle oder räumliche Arrangements verschiedener bakterieller Morphotypen zu zeigen, die z. B. als „Maiskolben“- oder „Stoppelbürsten“- Struktur bekannt sind und beschrieben wurden [Kolenbrander, 2000; Marsh & Bradshaw, 1995; Wecke et al., 2000].

Die in dieser Studie gewonnenen Biofilme wurden mit dem Rasterelektronenmikroskop untersucht. Es wurden REM-Bilder repräsentativer Areale der mit Biofilm belegten Träger angefertigt und in Anlehnung an die Studie von C. Schaudinn (2009) ausgewertet

[Schaudinn, 2009]. Die Elektronenmikroskopie liefert exzellente Informationen über die verschiedenen bakteriellen Morphotypen und deren räumliche Verteilung im Biofilm [Wecke et al., 2000]. Die mikroskopischen Verfahren der Scanning- oder Transmissions-Elektronenmikroskopie erfordern in der Regel eine aufwändige Vorbehandlung und Fixierung der Proben. Dadurch können Veränderungen der komplexen Struktur und der Organisation des Biofilms sowie Artefakte entstehen [Donlan & Costerton, 2002; Wood et al., 2000]. Entwicklungen in der „confocalen laser scanning"-Mikroskopie (CLSM) erlauben es den Wissenschaftlern hingegen, lebende und voll hydratisierte bakterielle Populationen zu untersuchen, wie sie in vielen natürlichen und pathogenen Ökosystemen wachsen [Lawrence et al., 1991; Wecke et al., 2000]. Die Analyse nativer Biofilme mit dem CLSM ist nicht invasiv, da sie ohne Fixierung und im vollständig hydratisierten Zustand der Biofilme möglich ist [Lawrence & Neu, 1999], wodurch die Entstehung methodisch bedingter Artefakte minimiert werden kann.

Bei der in dieser Studie durchgeführten Untersuchung der REM-Bilder waren sowohl einzelne Kokken, Stäbchen und Filamente, als auch kleine Anhäufungen und Gruppen von Kokken über die gesamte Trägeroberfläche verteilt zu erkennen. Man kann jedoch nicht genau sagen, ob die beobachteten Bakterien alle Erstbesiedler waren oder ob die Koaggregation zwischen bestimmten Bakterienspezies zum Teil erst nach der Biofilmentnahme stattgefunden hat. Eine Hypothese lautet, dass die Bakterienzellen entweder sofort nach der Entfernung von der Zahnoberfläche wieder miteinander koaggregierten, oder dass sie gar nicht richtig voneinander bzw. von der Polysaccharidmatrix des Biofilms getrennt waren [Walker & Sedlacek, 2007]. Kolenbrander et al. postulierten, dass die Entwicklung supragingivaler Plaque auf einer Folge verschiedener Ereignisse beruht, an denen Erstbesiedler, brückenbildende Mikroorganismen und Zweit- bzw. Spätbesiedler beteiligt sind. [Kolenbrander, 2000]. Die Vermutung liegt also nahe, das alle nach der Vorkultivierung *in vitro* beobachteten Bakterienspezies schon in den In-vivo-Biofilmproben enthalten waren.

6.5 Wirkungsweise der antimikrobiellen Substanzen

6.5.1 Einwirkzeit

In der vorliegenden Studie wurde die Wirkung der antimikrobiellen Substanzen einmal täglich mit einer Einwirkzeit von 30 Sekunden auf die In-vivo-Multispeziesbiofilme unter-

sucht. Diese Einwirkzeit ist als realistisch anzusehen, da die meisten auf dem Markt befindlichen Mundspüllösungen diese Spülauer bei der Anwendung empfehlen. In einer Studie von Pitten et al. 2003 wurde eine Einwirkzeit der Testsubstanzen auf Biofilme von 5 bzw. 30 Minuten gewählt [Pitten et al., 2003]. Diese Anwendungsdauer ist im täglichen Gebrauch von Mundspüllösungen als eher unrealistisch zu betrachten. In anderen Untersuchungen ist nachgewiesen worden, dass orale Antiseptika innerhalb einer Einwirkzeit von 30 Sekunden wirksam sind [Fine et al., 2005; Meiller et al., 2005; Riep et al., 1999; Ross et al., 1989].

6.5.2 Anwendungsform

Die in der vorliegenden Studie untersuchten oralen Antiseptika repräsentieren unterschiedliche Wirkstofftypen (Chlorhexidin, Phenolderivate, Hexetidin Zinnfluoride). Zur Anwendung kamen die Substanzen Chlorhexamed Forte® 0,2 % (Chlorhexidindigluconat), Listerine® (Phenolderivat), Hexoral® (Hexetidin) und Meridol® (Zinnfluorid). Zu beachten ist, dass die Substanzen nicht in ihrer reinen Form getestet wurden, sondern in einem gebrauchsfertigen Präparat inkorporiert waren (siehe Kap. 4.5). Pratten et al. (1998) weisen darauf hin, dass Vergleiche zwischen verschiedenen Mundspüllösungen schwierig sind, weil sie Zusatzstoffe wie Fluoride etc. enthalten, die die Effektivität des Mittels erhöhen oder verringern können [Pratten et al., 1998a]. Thrower et al. (1997) haben beobachtet, dass reine Antiseptika immer etwas wirkungsvoller waren als Fertigprodukte, da andere Inhaltsstoffe die Wirksamkeit vermindern können [Thrower et al., 1997]. Riep et al. (1999) benennen noch andere Faktoren wie beispielsweise Inhaltsstoffe aus Zahnpasten, die die klinische Aktivität von Mundspüllösungen beeinflussen können [Riep et al., 1999]. Die bloße Existenz einer bekannten Substanz in einer Flasche mit Mundspüllösung sagt aufgrund der potenziellen Wechselwirkungen negativer und positiver (synergistischer) Art zwischen den verschiedenen Bestandteilen in einer gebrauchsfertigen Lösung nichts über ihre tatsächliche Wirkung gegen dentale Plaque *in vivo* aus. [Arweiler et al., 2001].

6.5.3 Wirkung

In den Ergebnistabellen sind die Daten zur direkten Wirkung von Chlorhexamed Forte®, Listerine®, Hexoral® und Meridol® zusammengefasst. Alle vier Substanzen entfalten eine offensichtliche Wirkung sowohl auf die Gesamtbakterienmenge als auch auf die Bio-

filmzusammensetzung. Die Zusammensetzung der subgingivalen Mikroflora zeigte keine signifikanten Veränderungen. Unter den getesteten Substanzen war Chlorhexamed Forte® das effektivste Mittel bezüglich der Biofilmreduktion. Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen anderer In-vitro-Systeme in der Literatur überein [Brecx et al., 1990; Fine, 1995; Netuschil et al., 1989; Pratten et al., 1998a; Pratten et al., 1998b; Schierholz et al., 1999].

Wie bei Chlorhexamed Forte® ist auch bei Listerine® eine gute Wirkung zu registrieren. Dies stimmt mit Literaturangaben zur antibakteriellen Wirkung von Listerine® überein. In einer Studie von Fine (2001) wurde nachgewiesen, dass Listerine® gegen biofilmbildende Bakterien hochwirksam ist [Fine et al., 2001]. Netuschil et al. (1995) zeigten, dass Listerine® vor allem im frühen Stadium der Plaquebildung wirksam ist [Netuschil et al., 1995]. Im Übrigen wird jedoch auf die geringe Substantivität und die geringe antimikrobielle Wirkung hingewiesen. Von den Probanden wird vor allem der scharfe Geschmack, der wahrscheinlich auf die hohe Alkoholkonzentration (lt. Herstellerangaben ca. 20 %) zurückzuführen ist, als unangenehm empfunden [Bolanowski et al., 1995]. Arweiler et al. (2001) bezeichnen die hohe Alkoholkonzentration, die hohe Spülmenge 2 x 20 ml täglich und den pH-Wert < 5 als negativ [Arweiler et al., 2001].

Verglichen mit Chlorhexamed Forte® hat Hexoral® einen sehr geringen plaquehemmenden Effekt [Bergenholtz & Hänström, 1974; Roberts & Addy, 1981; Shapiro et al., 2002]. Außerdem war der antimikrobielle Effekt von Chlorhexamed Forte® während des gesamten Versuchszeitraumes ausgeprägter als bei Meridol®. In vorangegangenen Studien, in denen Meridol® direkt mit Chlorhexamed® (Chlorhexidin) verglichen wurde, zeigte Chlorhexidin den besseren Effekt [Brecx et al., 1992; Brecx et al., 1993; Brecx et al., 1990; Netuschil et al., 1997; Netuschil et al., 1995; Riep et al., 1999]. Chlorhexidin hat eine längere Retentionszeit und somit eine höhere Substantivität als Meridol® [Netuschil et al., 1997]. Als Nebenwirkungen des Chlorhexidins werden relativ häufig Verfärbungen der Zähne angegeben. Sie werden bei Meridol® ebenfalls gefunden, jedoch in signifikant geringerem Ausmaß [Brecx et al., 1993; Netuschil et al., 1997].

Die Wirkung von Chlorhexamed® ist so stark, dass es als „chemische Zahnbürste“ genutzt werden könnte. Aufgrund seiner Nebenwirkungen und des massiven Eingriffs in die Ökologie der oralen Flora ist der Dauergebrauch von Chlorhexidin jedoch nicht angezeigt [Netuschil et al., 1997]. Seit einiger Zeit sind in Deutschland allerdings auch

0,06-prozentige Chlorhexidindigluconatlösungen (z. B. CORSODYL® Zahnfleisch-Forte) auf dem Markt, die zur längerfristigen Anwendung geeignet sind und bei denen die Verfärbungen nach 6 Monaten mit denen der zinnfluoridhaltigen Meridol®-Mundspüllösung vergleichbar sind [Seemann, 2001].

Beim direkten Vergleich zwischen den einzelnen Mundspüllösungen sind jedoch auch unterschiedliche Wirkungen zu erkennen. Unter dem Einfluss von Listerine® werden die Bakterien nicht selektiv abgetötet, vielmehr wird die Bakterienzahl relativ gleichmäßig reduziert und damit die mikrobielle Gemeinschaft nicht oder nur sehr wenig verschoben. Chlorhexamed®, Meridol® und Hexoral® bewirken dagegen ein selektives Abtöten einzelner Spezies und somit eine Verschiebung der Bakteriengemeinschaft in eine bestimmte Richtung, d. h. die ursprüngliche Balance zwischen den Spezies ist nicht mehr vorhanden − eine Wirkung, die jedoch nicht wünschenswert ist [Marsh, 1992].

6.5.4 Klinische Anwendung antimikrobieller Susbstanzen

Das grundsätzliche Problem beim Einsatz antibakterieller Substanzen zur lokalen chemischen Beeinflussung der Plaque (zusätzlich zur mechanischen Reinigung) ist, dass man immer noch nicht genau weiß, gegen welche oralen Mikroorganismen sich die Maßnahmen richten sollen. Da man derzeit davon ausgehen muss, dass sich sowohl die Gingivitis als auch die Parodontitis als opportunistische Infektionen darstellen, sollte das angewandte chemische Mittel ein breites Wirkungsspektrum haben [Marsh, 1992]. Für die Wirkung oraler Antiseptika, insbesondere von Mundspüllösungen, sind die Spezifität gegenüber oralen Mikroorganismen, die Effizienz ihrer antibakteriellen Wirkung, die Substantivität der Agenzien (d. h. die Fähigkeit, trotz des Speichelflusses für einen längeren Zeitraum in wirksamer Konzentration im Mund zu verbleiben, bzw. die Dauer der Wirkung *in vivo*), die toxikologische Sicherheit und die chemische Stabilität von grundlegender Bedeutung [Lang & Brecx, 1986].

Für eine gute Substantivität müssen folgende Forderungen erfüllt sein: ausreichende Retention in der Mundhöhle, ausreichende Adhäsion an oralen Oberflächen und längere Verweildauer und somit längere Wirkung im Oralraum. Um einen Antiplaque-Effekt und vor allem eine Antigingivitis-Wirkung entfalten zu können, ist eine ausreichende Substantivität von zwingender Bedeutung. Sie ist nur bei wenigen Mitteln gegeben [Netuschil et al., 1997]. Basierend auf ihrer Substantivität werden orale Chemotherapeutika als antibakterielle Agentien der ersten oder zweiten Generation klassifiziert.

Chemotherapeutika der ersten Generation weisen verglichen mit Substanzen der zweiten Generation keine oder eine geringere Substantivität auf [Brecx, 1997]. Sowohl CHX- als auch AmF/SnF-Mundspüllösungen werden als Chemotherapeutika zweiter Generation mit einer hohen Substantivität eingestuft. Diese Lösungen rufen allerdings zugleich ungünstige Nebenwirkungen an den übrigen Geweben der Mundhöhle hervor, was wiederum die Compliance (Mitarbeit) des Patienten stark beeinflussen kann (siehe Prüfsubstanzen, Kap. 4.7).

Beim Einsatz von Antiseptika muss grundsätzlich unterschieden werden, ob supra- oder subgingivale Plaquebakterien beeinflusst werden sollen. Antimikrobielle Substanzen und plaquehemmende Agenzien in Mundspüllösungen und Zahnpasten, die zur Hemmung bakterieller Plaquebildung und somit zur Prävention oder Beseitigung (chronischer) Gingivitiden verwendet werden, können nur supragingivale Plaque beeinflussen [Eley, 1999]. Sie sollten von speziell gegen subgingivale Plaque gerichteten Agenzien klar abgegrenzt werden, da diese erst einen Zugang zur parodontalen Tasche benötigen, um dort − in ausreichend hoher Konzentration − ihre Wirkung entfalten zu können. Die subgingivalen Antiseptika werden bei chronischen Zahnfleischentzündungen bzw. Parodontitiden angewandt und können bei professioneller Applikation kombiniert mit Selbstanwendung gute Effekte erzielen [Quirynen et al., 2002].

Grundsätzlich gilt jedoch, dass die nachweislich effiziente chemische Plaquebeeinflussung die mechanische Zahnreinigung nicht ersetzen, sondern sie nur unterstützen kann. Das betrifft besonders Problemzonen wie Interdentalräume oder schlecht zugängliche Gebissabschnitte. Daher kann die chemische Plaquekontrolle nur als Ergänzung zu mechanischen Maßnahmen gesehen werden [Quirynen et al., 2002].

7 Zusammenfassung

Die Mundhöhle ist ein Lebensraum mit idealen Voraussetzungen für die Besiedlung durch eine Vielzahl von Mikroorganismen, deren Organisation in Plaqueschichten auf den Zahnoberflächen das typische Beispiel eines bakteriellen Biofilms darstellt [Marsh & Bradshaw, 1995]. Durch ständig wechselnde Umgebungsbedingungen und äußere Einflussfaktoren wie eine ungesunde Ernährungsweise, Krankheiten, immunologische Fehlfunktionen und ungenügende Mundhygiene wird das in der dentalen Plaque herrschende Gleichgewicht gestört, was zu pathologischen Plaquebildungsprozessen führen kann [Marsh, 1999]. Weil die dentale Plaque als Biofilm dadurch eine pathogenetische Relevanz bekommt, ist es von grundsätzlicher Bedeutung, die Ausreifung und das ungestörte Plaquewachstum zu verhindern oder wenigstens zu reduzieren.

In der Zahnmedizin werden antimikrobielle Substanzen wie zum Beispiel Mundspüllösungen seit vielen Jahren erfolgreich zur Prävention und Behandlung von Karies und parodontalen Erkrankungen eingesetzt und stellen somit eine wertvolle Ergänzung zu manuellen Therapiemaßnahmen dar [Barnett, 2003; Gottenbos et al., 1999; Pitten et al., 2003; Shapiro et al., 2002]. Antimikrobielle Agenzien können außerdem als begleitende Maßnahmen zur Mund- und Zahnpflege entscheidend zur Bekämpfung pathologischer Plaquebildungsprozesse und zur Verbesserung der Mundhygiene beitragen [Marsh, 1999; Pitten et al., 2003; Shapiro et al., 2002]. Sowohl die Behandlung als auch die Prävention parodontaler Erkrankungen sind in erster Linie auf die dentale Plaque als Biofilm fokussiert.

Um klinisch relevante Resultate zur Verfügung stellen zu können, ist es notwendig, Multispeziesbiofilmmodelle *in vitro* zu entwickeln, da mit diesen antimikrobielle Substanzen besser untersucht werden können [Shen et al., 2009; Wilson, 1996]. Viele Studien haben gezeigt, dass Bakterien in einem Biofilmverbund gegenüber Antiseptika weniger empfindlich sind als Monospezieskulturen bzw. Bakterien in Suspensionen („planktonische Bakterien“) [Bradshaw & Marsh, 1999; Costerton et al., 1999; Donlan & Costerton, 2002; Marsh & Bradshaw, 1995; Pitten et al., 2003; Romero et al., 2008]. Der Charakter der dentalen Plaque als Multispeziesbiofilm spielt deshalb gerade bei der Einwirkung

antimikrobieller Substanzen auf die bakterielle Mikroflora eine große Rolle [Sissons et al., 1996; Wilson et al., 1996]. Nur mit einer Multispezieskultur kann auf die In-vivo-Situation zurückgeschlossen werden, da sie die Natur am ehesten imitiert [Pratten et al., 1998a].

Das in der vorliegenden Studie erarbeitete Modell erlaubt die Untersuchung oraler, *in vitro* gewachsener Multispeziesbiofilme und deren Reduktion nach Anwendung verschiedener kommerziell erhältlicher Mundspüllösungen. Bei den Testsubstanzen handelt es sich um Chlorhexamed Forte® 0,2 % (Chlorhexidindigluconat), Listerine® (Phenolderivat), Hexoral® (Hexetidin) und Meridol® (Zinnfluorid). Die auf speziellen Thermanox®-Deckgläschen kultivierten Multispeziesbiofilme wurden anschließend mit elektronenmikroskopischen Methoden dokumentiert. Ein Vorteil dieser Methode ist der systematische Vergleich akkumulierter Bakterien auf den Biofilmträgern, was bei der Betrachtung der individuellen Wirkung der Testsubstanzen von entscheidender Bedeutung ist.

Die Auswertung der Biofilme auf den einzelnen Biofilmträgern ergab ein sehr heterogenes Bild, was sowohl die Zusammensetzung als auch die relative Häufigkeit der Bakterien anbelangt. Auch wenn die Morphotypen der verschiedenen Multispeziesbiofilme eines Probanden weitgehend übereinstimmten, so variierten die prozentualen Anteile aufgrund der Wirkung der Testsubstanzen erheblich. Ebenso zeigte sich eine Änderung der phänotypischen Eigenschaften des Biofilms in Abhängigkeit von der Mundspüllösung. Während Chlorhexamed Forte®, Meridol® und Hexoral® eine selektive Abtötung einzelner Morphotypen und somit eine Veränderung der Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaft bewirken, wird unter dem Einfluss von Listerine® die Bakterienzahl relativ gleichmäßig reduziert.

Insgesamt konnten nur wenige allgemeingültige Zusammenhänge zwischen der zweifellos vorhandenen Wirkung der antimikrobiellen Substanzen und der Gesamtbakterienmenge bzw. der Zusammensetzung der mikrobiologischen Gemeinschaft festgestellt werden. Die mit Mundspüllösung behandelten Patientenbiofilme zeigten im Vergleich zu derjenigen der Kontrollbiofilme deutlich geringere Gesamtbakterienmengen, wobei die durch Chlorhexamed Forte® 0,2 % erzielte Reduktion der Bakterienmenge bei der Mehrheit der Probanden am deutlichsten ist.

Die Ergebnisse dieser Studie, in der antimikrobielle Mundspüllösungen gegen Multispeziesbiofilme verschiedener Probanden getestet wurden, zeigen die unterschiedlichen Wirkmechanismen dieser Substanzen *in vitro*. Weitere Studien sollten der Frage nachgehen, ob die unterschiedlichen Wirkungen der Mundspüllösungen auf Multispeziesbiofilme auch *in vivo* bestätigt werden können.

8 Summary

The oral cavity is a habitat with ideal conditions for colonization by a variety of microorganisms, whose organization in plaque layers on dental surfaces shows a typical example of a bacterial biofilm [Marsh & Bradshaw, 1995]. Due to constantly changing environmental conditions and external influences such as unhealthy diet, disease, immunological dysfunction and poor oral hygiene, the prevailing balance in the dental plaque is disturbed, which can lead to pathological plaque formation processes [Marsh, 1999]. This causes the dental plaque as a biofilm to obtain a pathogenetic relevance. It is therefore of fundamental importance to prevent or at least reduce the maturation and undisturbed plaque growth.

In dentistry, antimicrobial substances such as mouthwashes have successfully been used for many years for the prevention and treatment of dental caries and periodontal diseases and therefore represent a valuable supplement to manual therapy measures [Barnett, 2003; Gottenbos et al., 1999; Pitten et al., 2003; Shapiro et al., 2002]. In addition, antimicrobial agents as accompanying measures to the oral and dental care can contribute significantly to fight pathological plaque formation processes and to improve the oral hygiene [Marsh, 1999; Pitten et al., 2003; Shapiro et al., 2002]. Both the treatment and the prevention of periodontal diseases are primarily focused on dental plaque as a biofilm.

To provide clinically relevant results it is necessary to develop multispecies biofilm models *in vitro*. These facilitate the examination of antimicrobial substances [Shen et al., 2009; Wilson, 1996]. Many studies have shown that bacteria in a biofilm formation are less sensitive towards antiseptics than monospecies cultures or those in suspension (planktonic bacteria) [Bradshaw & Marsh, 1999; Costerton et al., 1999; Donlan & Costerton, 2002; Marsh & Bradshaw, 1995; Pitten et al., 2003; Romero et al., 2008]. Therefore, the character of the dental plaque biofilm as a multispecies biofilm plays a major role on the effect of antimicrobial substances on the bacterial microflora [Sissons et al., 1996; Wilson et al., 1996]. Only with a multispecies culture conclusions can be drawn on the in vivo situation, since it comes closest to nature [Pratten et al., 1998a].

The model developed in the present study allows the investigation of oral, *in vitro* grown multispecies biofilms and their reduction after application of various commercially available mouthwashes. The test substances are Chlorhexamed Forte® 0.2% (chlorhexidine), Listerine® (phenol derivative) Hexoral® (hexetidine) and Meridol® (stannous fluoride).

The multispecies biofilms cultured on special Thermanox® coverslips were subsequently documented with electron microscopical methods. An advantage of this method is the systematic comparison of accumulated bacteria on the biofilm carriers, which is essential when considering the individual effect of the test substances.

The evaluation of the biofilms on their biofilm carriers led to a very heterogeneous picture, with regard to both the composition and the relative abundance of the bacteria. Even though the morphotypes of the different multispecies biofilms of one and the same subject coincided to a large extent, their proportional shares varied considerably due to the effect of the test substances. Furthermore, a change in the phenotypic characteristics of the biofilm appeared as a result of the mouthwashes used. While Chlorhexamed Forte®, Meridol® and Hexoral® cause a selective elimination of individual morphotypes and therefore a change in composition of the bacterial community, the number of bacteria is reduced relatively even when using Listerine®.

In all, only a few generally valid correlations could be ascertained between the undoubtedly existing effect of antimicrobial substances on the total bacteria amount and the composition of the microbial community. The patients' biofilms treated with mouthwash showed a much lower total bacteria count than the control biofilms, whereby the achieved reduction of the bacterial amount is clearest in the majority of those test biofilms having used Chlorhexamed Forte® 0.2%.

The results of this study in which antimicrobial mouth rinses were tested against multispecies biofilms of different test persons, show the different effects of these substances *in vitro*. Further studies should address the question whether the different effects of mouthwashes can also be confirmed on multispecies biofilms *in vivo*.

Literaturverzeichnis

Addy, M. (1986). Chlorhexidine compared with other locally delivered antimicrobials. A short review. *J Clin Periodontol*, 13, 957-964.

Addy, M., Loyn, T. & Adams, D. (1991). Dentine hypersensitivity - effects of some proprietary mouthwashes on the dentine smear layer: a SEM study. *J Dent*, 19, 148-152.

Addy, M., Moran, J., Newcombe, R. & Warren, P. (1995). The comparative tea staining potential of phenolic, chlorhexidine and anti-adhesive mouthrinses. *J Clin Periodontol*, 22, 923-928.

Albers, H. K., John, I. & Maas, J. (1985). Clinical comparison of plaque development and inflammatory processes in the marginal gingiva using chlorhexidine, amine/tin fluoride and acetylsalicylic acid-containing mouthwashes. *Quintessenz*, 36, 2325-2337.

Allison, D. G. (2003). The biofilm matrix. *Biofouling*, 19, 139-150.

Arweiler, N. B., Hellwig, E., Sculean, A., Hein, N. & Auschill, T. M. (2004). Individual vitality pattern of in situ dental biofilms at different locations in the oral cavity. *Caries Res*, 38, 442-447.

Arweiler, N. B., Henning, G., Reich, E. & Netuschil, L. (2002). Effect of an amine-fluoride-triclosan mouthrinse on plaque regrowth and biofilm vitality. *J Clin Periodontol*, 29, 358-363.

Arweiler, N. B., Netuschil, L. & Reich, E. (2001). Alcohol-free mouthrinse solutions to reduce supragingival plaque regrowth and vitality. A controlled clinical study. *J Clin Periodontol*, 28, 168-174.

Asano, H., Ishihara, K., Nakagawa, T., Yamada, S. & Okuda, K. (2003). Relationship between transmission of Porphyromonas gingivalis and fimA type in spouses. *J Periodontol*, 74, 1355-1360.

Asikainen, S., Chen, C., Alaluusua, S. & Slots, J. (1997). Can one acquire periodontal bacteria and periodontitis from a family member? *J Am Dent Assoc*, 128, 1263-1271.

Auschill, T. M., Arweiler, N. B., Netuschil, L., Brecx, M., Reich, E. & Sculean, A. (2001). Spatial distribution of vital and dead microorganisms in dental biofilms. *Arch Oral Biol*, 46, 471-476.

Auschill, T. M., Hein, N., Hellwig, E., Follo, M., Sculean, A. & Arweiler, N. B. (2005). Effect of two antimicrobial agents on early in situ biofilm formation. *J Clin Periodontol*, 32, 147-152.

Azuma, Y., Ozasa, N., Ueda, Y. & Takagi, N. (1986). Pharmacological studies on the anti-inflammatory action of phenolic compounds. *J Dent Res*, 65, 53-56.

Baehni, P. (1995). Microbiological diagnosis in periodontics. Microbiological diagnosis in periodontics: why, how, when? *Schweiz Monatsschr Zahnmed*, 105, 798-808.

Baehni, P. C. & Takeuchi, Y. (2003). Anti-plaque agents in the prevention of biofilm-associated oral diseases. *Oral Dis*, 9 Suppl 1, 23-29.

Bánóczy, J., Szöke, J., Kertész, P., Töth, Z., Zimmermann, P. & Gintner, Z. (1989). Effect of amine fluoride/stannous fluoride-containing toothpaste and mouthrinsings on dental plaque, gingivitis, plaque and enamel F-accumulation. *Caries Res*, 23, 284-288.

Barnett, M. L. (2003). The role of therapeutic antimicrobial mouthrinses in clinical practice: control of supragingival plaque and gingivitis. *J Am Dent Assoc*, 134, 699-704.

Beikler, T., Schnitzer, S., Abdeen, G., Ehmke, B., Eisenacher, M. & Flemmig, T. F. (2006). Sampling strategy for intraoral detection of periodontal pathogens before and following periodontal therapy. *J Periodontol*, 77, 1323-1332.

Bergenholtz, A. & Hänström, L. (1974). The plaque-inhibiting effect of hexetidine (Oraldene)-mouthwash compared to that of chlorhexidine. *Community Dent Oral Epidemiol*, 2, 70-74.

Bernstein, D., Schiff, G., Echler, G., Prince, A., Feller, M. & Briner, W. (1990). In vitro virucidal effectiveness of a 0.12%-chlorhexidine gluconate mouthrinse. *J Dent Res*, 69, 874-876.

Bokor, M. (1996). The effect of hexetidine spray on dental plaque following periodontal surgery. *J Clin Periodontol*, 23, 1080-1083.

Bolanowski, S. J., Gescheider, G. A. & Sutton, S. V. (1995). Relationship between oral pain and ethanol concentration in mouthrinses. *J Periodontal Res*, 30, 192-197.

Bollen, C. M., Mongardini, C., Papaioannou, W., Van Steenberghe, D. & Quirynen, M. (1998). The effect of a one-stage full-mouth disinfection on different intra-oral niches. Clinical and microbiological observations. *J Clin Periodontol*, 25, 56-66.

Bonesvoll, P. & Gjermo, P. (1978). A comparision between chlorhexidine and some quaternary ammonium compounds with regard to retention, salivary concentration and plaque-inhibiting effect in the human mouth after mouth rinses. *Arch Oral Biol*, 23, 289-294.

Bonesvoll, P., Lokken, P. & Rolla, G. (1974). Influence of concentration, time, temperature and pH on the retention of chlorhexidine in the human oral cavity after mouth rinses. *Arch Oral Biol*, 19, 1025-1029.

Bowden, G. H. (1999). Controlled environment model for accumulation of biofilms of oral bacteria. *Methods Enzymol*, 310, 216-224.

Bowden, G. H. & Hamilton, I. R. (1998). Survival of oral bacteria. *Crit Rev Oral Biol Med*, 9, 54-85.

Bradshaw, D. J. & Marsh, P. D. (1999). Use of continuous flow techniques in modeling dental plaque biofilms. *Methods Enzymol*, 310, 279-296.

Branda, S. S., Vik, S., Friedman, L. & Kolter, R. (2005). Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol*, 13, 20-26.

Brecx, M. (1997). Strategies and agents in supragingival chemical plaque control. *Periodontol 2000*, 15, 100-108.

Brecx, M., Brownstone, E., MacDonald, L., Gelskey, S. & Cheang, M. (1992). Efficacy of Listerine, Meridol and chlorhexidine mouthrinses as supplements to regular tooth cleaning measures. *J Clin Periodontol*, 19, 202-207.

Brecx, M., Macdonald, L. L., Legary, K., Cheang, M. & Forgay, M. G. (1993). Long-term effects of Meridol and chlorhexidine mouthrinses on plaque, gingivitis, staining, and bacterial vitality. *J Dent Res*, 72, 1194-1197.

Brecx, M., Netuschil, L., Reichert, B. & Schreil, G. (1990). Efficacy of Listerine, Meridol and chlorhexidine mouthrinses on plaque, gingivitis and plaque bacteria vitality. *J Clin Periodontol*, 17, 292-297.

Brown, M. R., Allison, D. G. & Gilbert, P. (1988). Resistance of bacterial biofilms to antibiotics: a growth-rate related effect? *J Antimicrob Chemother*, 22, 777-780.

Brown, M. R. & Gilbert, P. (1993). Sensitivity of biofilms to antimicrobial agents. *J Appl Bacteriol*, 74 Suppl, 87S-97S.

Busscher, H. J. & Van der Mei, H. C. (1997). Physico-chemical interactions in initial microbial adhesion and relevance for biofilm formation. *Adv Dent Res*, 11, 24-32.

Ceri, H., Olson, M. E., Stremick, C., Read, R. R., Morck, D. & Buret, A. (1999). The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *J Clin Microbiol*, 37, 1771-1776.

Ciancio, S. C. (1986). Chemotherapeutic agents and periodontal therapy. Their impact on clinical practice. *J Periodontol*, 57, 108-111.

Costerton, J. W. (1995). Overview of microbial biofilms. *J Ind Microbiol*, 15, 137-140.

Costerton, J. W. (1997). Cleaning techniques for medical devices: biofilms. *Biomed Instrum Technol*, 31, 222-226, 247.

Costerton, J. W. (1999). Introduction to biofilm. *Int J Antimicrob Agents*, 11, 217-221; discussion 237-219.

Costerton, J. W., Cheng, K. J., Geesey, G. G., Ladd, T. I., Nickel, J. C., Dasgupta, M. & Marrie, T. J. (1987). Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol*, 41, 435-464.

Costerton, J. W. & Lewandowski, Z. (1997). The Biofilm Lifestyle. *Advances in Dental Research*, 11, 192-195.

Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R. & Lappin-Scott, H. M. (1995). Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol*, 49, 711-745.

Costerton, J. W., Lewandowski, Z., DeBeer, D., Caldwell, D., Korber, D. & James, G. (1994). Biofilms, the customized microniche. *J Bacteriol*, 176, 2137-2142.

Costerton, J. W., Stewart, P. S. & Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284, 1318-1322.

Darveau, R. P., Tanner, A. & Page, R. C. (1997). The microbial challenge in periodontitis. *Periodontol 2000*, 14, 12-32.

Davey, M. E. & Costerton, J. W. (2006). Molecular genetics analyses of biofilm formation in oral isolates. *Periodontol 2000*, 42, 13-26.

Decker, E. M., Weiger, R., von Ohle, C., Wiech, I. & Brecx, M. (2003). Susceptibility of planktonic versus attached Streptococcus sanguinis cells to chlorhexidine. *Clin Oral Investig*, 7, 98-102.

Deng, D. M., Buijs, M. J. & Ten Cate, J. M. (2004). The effects of substratum on the pH response of Streptococcus mutans biofilms and on the susceptibility to 0.2% chlorhexidine. *Eur J Oral Sci*, 112, 42-47.

DePaola, L. G., Minah, G. E., Overholser, C. D., Meiller, T. F., Charles, C. H., Harper, D. S. & McAlary, M. (1996). Effect of an antiseptic mouthrinse on salivary microbiota. *Am J Dent*, 9, 93-95.

DePaola, L. G., Overholser, C. D., Meiller, T. F., Minah, G. E. & Niehaus, C. (1989). Chemotherapeutic inhibition of supragingival dental plaque and gingivitis development. *J Clin Periodontol*, 16, 311-315.

Donlan, R. M. & Costerton, J. W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*, 15, 167-193.

Dorn, B. R., Leung, K. L. & Progulske-Fox, A. (1998). Invasion of human oral epithelial cells by Prevotella intermedia. *Infect Immun*, 66, 6054-6057.

DuPont, G. A. (1997). Understanding dental plaque; biofilm dynamics. *J Vet Dent*, 14, 91-94.

Eley, B. M. (1999). Antibacterial agents in the control of supragingival plaque - a review. *Br Dent J*, 186, 286-296.

Fine, D. H. (1995). Chemical agents to prevent and regulate plaque development. *Periodontol 2000*, 8, 87-107.

Fine, D. H., Furgang, D. & Barnett, M. L. (2001). Comparative antimicrobial activities of antiseptic mouthrinses against isogenic planktonic and biofilm forms of Actinobacillus actinomycetemcomitans. *J Clin Periodontol*, 28, 697-700.

Fine, D. H., Furgang, D., Sinatra, K., Charles, C., McGuire, A. & Kumar, L. D. (2005). In vivo antimicrobial effectiveness of an essential oil-containing mouth rinse 12 h after a single use and 14 days' use. *J Clin Periodontol*, 32, 335-340.

Fine, D. H., Letizia, J. & Mandel, I. D. (1985). The effect of rinsing with Listerine antiseptic on the properties of developing dental plaque. *J Clin Periodontol*, 12, 660-666.

Gehring, F. (1983). Effect of amine fluoride and sodium fluoride on the germs of plaque flora. *Dtsch Zahnarztl Z*, 38 Suppl 1, S36-40.

Genco, R. J. (1996). Current view of risk factors for periodontal diseases. *J Periodontol*, 67, 1041-1049.

Gibbons, R. J. (1989). Bacterial adhesion to oral tissues: a model for infectious diseases. *J Dent Res*, 68, 750-760.

Gilbert, P., Das, J. & Foley, I. (1997). Biofilm susceptibility to antimicrobials. *Adv Dent Res*, 11, 160-167.

Gilbert, P., Maira-Litran, T., McBain, A. J., Rickard, A. H. & Whyte, F. W. (2002). The physiology and collective recalcitrance of microbial biofilm communities. *Adv Microb Physiol*, 46, 202-256.

Gordon, J. M., Lamster, I. B. & Seiger, M. C. (1985). Efficacy of Listerine antiseptic in inhibiting the development of plaque and gingivitis. *J Clin Periodontol*, 12, 697-704.

Gorur, A., Lyle, D. M., Schaudinn, C. & Costerton, J. W. (2009). Biofilm removal with a dental water jet. *Compend Contin Educ Dent*, 30 Spec No 1, 1-6.

Gottenbos, B., Van der Mei, H. C. & Busscher, H. J. (1999). Models for studying initial adhesion and surface growth in biofilm formation on surfaces. *Methods Enzymol*, 310, 523-534.

Greenstein, G., Berman, C. & Jaffin, R. (1986). Chlorhexidine. An adjunct to periodontal therapy. *J Periodontol*, 57, 370-377.

Greenstein, G. & Lamster, I. (1997). Bacterial transmission in periodontal diseases: a critical review. *J Periodontol*, 68, 421-431.

Gripp, V. C. & Schlagenhauf, U. (2002). Prevention of early mutans streptococci transmission in infants by professional tooth cleaning and chlorhexidine varnish treatment of the mother. *Caries Res*, 36, 366-372.

Gross, A. & Tinanoff, N. (1977). Effect of SnF2 mouthrinse on initial bacterial colonization of tooth enamel. *J Dent Res*, 56, 1179-1183.

Guggenheim, B., Giertsen, E., Schüpbach, P. & Shapiro, S. (2001). Validation of an in vitro biofilm model of supragingival plaque. *J Dent Res*, 80, 363-370.

Guggenheim, B., Guggenheim, M., Gmür, R., Giertsen, E. & Thurnheer, T. (2004). Application of the Zurich biofilm model to problems of cariology. *Caries Res*, 38, 212-222.

Haffajee, A. D., Cugini, M. A., Tanner, A., Pollack, R. P., Smith, C., Kent, R. L., Jr. & Socransky, S. S. (1998). Subgingival microbiota in healthy, well-maintained elder and periodontitis subjects. *J Clin Periodontol*, 25, 346-353.

Haffajee, A. D. & Socransky, S. S. (1994). Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol 2000*, 5, 78-111.

Hall-Stoodley, L. & Stoodley, P. (2002). Developmental regulation of microbial biofilms. *Curr Opin Biotechnol*, 13, 228-233.

Hannig, M. (1999). Ultrastructural investigation of pellicle morphogenesis at two different intraoral sites during a 24-h period. *Clin Oral Investig*, 3, 88-95.

Haraszthy, V. I., Hariharan, G., Tinoco, E. M., Cortelli, J. R., Lally, E. T., Davis, E. & Zambon, J. J. (2000). Evidence for the role of highly leukotoxic Actinobacillus actinomycetemcomitans in the pathogenesis of localized juvenile and other forms of early-onset periodontitis. *J Periodontol*, 71, 912-922.

Herles, S., Olsen, S., Afflitto, J. & Gaffar, A. (1994). Chemostat flow cell system: an in vitro model for the evaluation of antiplaque agents. *J Dent Res*, 73, 1748-1755.

Hoffmann, T., Bruhn, G., Richter, S., Netuschil, L. & Brecx, M. (2001). Clinical controlled study on plaque and gingivitis reduction under long-term use of low-dose chlorhexidine solutions in a population exhibiting good oral hygiene. *Clin Oral Investig*, 5, 89-95.

Hope, C. K. & Wilson, M. (2006). Biofilm structure and cell vitality in a laboratory model of subgingival plaque. *J Microbiol Methods*.

Hoyle, B. D. & Costerton, J. W. (1991). Bacterial resistance to antibiotics: the role of biofilms. *Prog Drug Res*, 37, 91-105.

Jenkins, S., Addy, M. & Newcombe, R. G. (1994a). Dose response of chlorhexidine against plaque and comparison with triclosan. *J Clin Periodontol*, 21, 250-255.

Jenkins, S., Addy, M., Wade, W. & Newcombe, R. G. (1994b). The magnitude and duration of the effects of some mouthrinse products on salivary bacterial counts. *J Clin Periodontol*, 21, 397-401.

Jenkinson, H. F. & Lamont, R. J. (1997). Streptococcal adhesion and colonization. *Crit Rev Oral Biol Med*, 8, 175-200.

Jones, C. G. (1997). Chlorhexidine: is it still the gold standard? *Periodontol 2000*, 15, 55-62.

Kamaguchi, A., Nakayama, K., Ohyama, T., Watanabe, T., Okamoto, M. & Baba, H. (2001). Coaggregation of Porphyromonas gingivalis and Prevotella intermedia. *Microbiol Immunol*, 45, 649-656.

Karnovsky, M. J. (1965). A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. . *J Cell Biol*, 137A-138A.

Keevil, C. W., Bradshaw, D. J., Dowsett, A. B. & Feary, T. W. (1987). Microbial film formation: dental plaque deposition on acrylic tiles using continuous culture techniques. *J Appl Bacteriol*, 62, 129-138.

Kinane, D. F. & Hart, T. C. (2003). Genes and gene polymorphisms associated with periodontal disease. *Crit Rev Oral Biol Med*, 14, 430-449.

Kinniment, S. L., Wimpenny, J. W., Adams, D. & Marsh, P. D. (1996a). Development of a steady-state oral microbial biofilm community using the constant-depth film fermenter. *Microbiology*, 142 (Pt 3), 631-638.

Kinniment, S. L., Wimpenny, J. W., Adams, D. & Marsh, P. D. (1996b). The effect of chlorhexidine on defined, mixed culture oral biofilms grown in a novel model system. *J Appl Bacteriol*, 81, 120-125.

Kolenbrander, P. E. (1988). Intergeneric coaggregation among human oral bacteria and ecology of dental plaque. *Annu Rev Microbiol*, 42, 627-656.

Kolenbrander, P. E. (2000). Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems. *Annu Rev Microbiol*, 54, 413-437.

Kolenbrander, P. E., Andersen, R. N., Blehert, D. S., Egland, P. G., Foster, J. S. & Palmer, R. J., Jr. (2002). Communication among oral bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*, 66, 486-505, table of contents.

König, J., Storcks, V., Kocher, T., Bössmann, K. & Plagmann, H. C. (2002). Anti-plaque effect of tempered 0.2% chlorhexidine rinse: an in vivo study. *J Clin Periodontol*, 29, 207-210.

Kornman, K. S., Page, R. C. & Tonetti, M. S. (1997). The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. *Periodontol 2000*, 14, 33-53.

Kubert, D., Rubin, M., Barnett, M. L. & Vincent, J. W. (1993). Antiseptic mouthrinse-induced microbial cell surface alterations. *Am J Dent*, 6, 277-279.

Künzel, W., Stößer, L. & Schulz, E. (1990). Plaqueinhibition durch Aminfluorid/Zinnfluorid. [Plaque prevention with amine fluoride/tin fluoride]. *Quintessenz*, 41, 1813-1824.

Lang, N. P. & Brecx, M. C. (1986). Chlorhexidine digluconate–an agent for chemical plaque control and prevention of gingival inflammation. *Journal of Periodontal Research*, 21, 74.

Lang, N. P., Hase, J. C., Grassi, M., Hämmerle, C. H., Weigel, C., Kelty, E. & Frutig, F. (1998). Plaque formation and gingivitis after supervised mouthrinsing with 0.2% delmopinol hydrochloride, 0.2% chlorhexidine digluconate and placebo for 6 months. *Oral Dis*, 4, 105-113.

Lawrence, J. R., Korber, D. R., Hoyle, B. D., Costerton, J. W. & Caldwell, D. E. (1991). Optical sectioning of microbial biofilms. *J Bacteriol*, 173, 6558-6567.

Lawrence, J. R. & Neu, T. R. (1999). Confocal laser scanning microscopy for analysis of microbial biofilms. *Methods Enzymol*, 310, 131-144.

Leung, K. P., Subramaniam, P. S., Okamoto, M., Fukushima, H. & Lai, C. H. (1998). The binding and utilization of hemoglobin by Prevotella intermedia. *FEMS Microbiol Lett*, 162, 227-233.

Lewis, K. (2001). Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 45, 999-1007.

Li, J., Helmerhorst, E. J., Leone, C. W., Troxler, R. F., Yaskell, T., Haffajee, A. D., Socransky, S. S. & Oppenheim, F. G. (2004). Identification of early microbial colonizers in human dental biofilm. *J Appl Microbiol*, 97, 1311-1318.

Liljemark, W. F., Bloomquist, C. G., Reilly, B. E., Bernards, C. J., Townsend, D. W., Pennock, A. T. & LeMoine, J. L. (1997). Growth dynamics in a natural biofilm and its impact on oral disease management. *Adv Dent Res*, 11, 14-23.

Lindhe, J., Hamp, S. E. & Loe, H. (1973). Experimental periodontitis in the beagle dog. *Int Dent J*, 23, 432-437.

Listgarten, M. A. (1976). Structure of the microbial flora associated with periodontal health and disease in man. A light and electron microscopic study. *J Periodontol*, 47, 1-18.

Listgarten, M. A. (1994). The structure of dental plaque. *Periodontol 2000*, 5, 52-65.

Listgarten, M. A., Schifter, C. C. & Laster, L. (1985). 3-year longitudinal study of the periodontal status of an adult population with gingivitis. *J Clin Periodontol*, 12, 225-238.

Liu, J., Dazzo, F. B., Glagoleva, O., Yu, B. & Jain, A. K. (2001). CMEIAS: a computer-aided system for the image analysis of bacterial morphotypes in microbial communities. *Microb Ecol*, 41, 173-194.

Löe, H., Theilade, E. & Jensen, S. B. (1965). Experimental gingivitis in man. *J Periodontol*, 36, 177-187.

Machtei, E. E., Dunford, R., Hausmann, E., Grossi, S. G., Powell, J., Cummins, D., Zambon, J. J. & Genco, R. J. (1997). Longitudinal study of prognostic factors in established periodontitis patients. *J Clin Periodontol*, 24, 102-109.

Magnusson, I., Low, S. B., McArthur, W. P., Marks, R. G., Walker, C. B., Maruniak, J., Taylor, M., Padgett, P., Jung, J. & Clark, W. B. (1994). Treatment of subjects with refractory periodontal disease. *J Clin Periodontol*, 21, 628-637.

Mandel, I. D. (1988). Chemotherapeutic agents for controlling plaque and gingivitis. *J Clin Periodontol*, 15, 488-498.

Mandel, I. D. (1994). Antimicrobial mouthrinses: overview and update. *J Am Dent Assoc*, 125 Suppl 2, 2S-10S.

Marsh, P. D. (1992). Microbiological aspects of the chemical control of plaque and gingivitis. *J Dent Res*, 71, 1431-1438.

Marsh, P. D. (1999). Microbiologic aspects of dental plaque and dental caries. *Dent Clin North Am*, 43, 599-614, v-vi.

Marsh, P. D. (2003). Plaque as a biofilm: pharmacological principles of drug delivery and action in the sub- and supragingival environment. *Oral Dis*, 9 Suppl 1, 16-22.

Marsh, P. D. (2004). Dental plaque as a microbial biofilm. *Caries Res*, 38, 204-211.

Marsh, P. D. (2005). Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life-style. *J Clin Periodontol*, 32 Suppl 6, 7-15.

Marsh, P. D. & Bradshaw, D. J. (1995). Dental plaque as a biofilm. *J Ind Microbiol*, 15, 169-175.

Maruniak, J., Clark, W. B., Walker, C. B., Magnusson, I., Marks, R. G., Taylor, M. & Clouser, B. (1992). The effect of 3 mouthrinses on plaque and gingivitis development. *J Clin Periodontol*, 19, 19-23.

McDonald, J. L., Jr., Schemehorn, B. R. & Stookey, G. K. (1978). Influence of fluoride upon plaque and gingivitis in the beagle dog. *J Dent Res*, 57, 899-902.

McKee, A. S., McDermid, A. S., Ellwood, D. C. & Marsh, P. D. (1985). The establishment of reproducible, complex communities of oral bacteria in the chemostat using defined inocula. *J Appl Bacteriol*, 59, 263-275.

McLean, R. J., Whiteley, M., Hoskins, B. C., Majors, P. D. & Sharma, M. M. (1999). Laboratory techniques for studying biofilm growth, physiology, and gene expression in flowing systems and porous media. *Methods Enzymol*, 310, 248-264.

Meiller, T. F., Silva, A., Ferreira, S. M., Jabra-Rizk, M. A., Kelley, J. I. & DePaola, L. G. (2005). Efficacy of Listerine Antiseptic in reducing viral contamination of saliva. *J Clin Periodontol*, 32, 341-346.

Mengel, R., Wissing, E., Schmitz-Habben, A. & Flores-de-Jacoby, L. (1996). Comparative study of plaque and gingivitis prevention by AmF/SnF2 and NaF. A clinical and microbiological 9-month study. *J Clin Periodontol*, 23, 372-378.

Meyerowitz, C., Featherstone, J. D., Billings, R. J., Eisenberg, A. D., Fu, J., Shariati, M. & Zero, D. T. (1991). Use of an intra-oral model to evaluate 0.05% sodium fluoride mouthrinse in radiation-induced hyposalivation. *J Dent Res*, 70, 894-898.

Mombelli, A. (1994). Periodontal diagnosis. The role of microbiology. *Schweiz Monatsschr Zahnmed*, 104, 48-57.

Moore, L. V., Moore, W. E., Cato, E. P., Smibert, R. M., Burmeister, J. A., Best, A. M. & Ranney, R. R. (1987). Bacteriology of human gingivitis. *J Dent Res*, 66, 989-995.

Moore, W. E. & Moore, L. V. (1994). The bacteria of periodontal diseases. *Periodontol 2000*, 5, 66-77.

Mühlemann, H., Saxer, U. & Mörmann, W. (1981). Reduction of plaque and gingivitis by stannous fluoride stabilized with amine fluoride. *Caries Res*, 15, 186.

Murawel, P. (2005). Die mRNA-Expression spezifischer Marker der parodontalen Heilung in murinen MC3T3-E1-Zellen und humanen parodontalen Ligamentfibroblasten nach Stimulation mit Schmelzmatrixproteinen und Wachstumsfaktoren aus Thrombozytenkonzentrat. *Zahnmedizinische Dissertation*, Humboldt Universität Berlin.

Netuschil, L., Rauh, T. & Riethe, P. (1997). Substantivität und antibakterielle Wirkung von Aminfluorid/ Zinnfluorid in situ. *Parodontologie*, 1, 7-16.

Netuschil, L., Reich, E. & Brecx, M. (1989). Direct measurement of the bactericidal effect of chlorhexidine on human dental plaque. *J Clin Periodontol*, 16, 484-488.

Netuschil, L., Reich, E., Unteregger, G., Sculean, A. & Brecx, M. (1998). A pilot study of confocal laser scanning microscopy for the assessment of undisturbed dental plaque vitality and topography. *Arch Oral Biol*, 43, 277-285.

Netuschil, L., Weiger, R., Preisler, R. & Brecx, M. (1995). Plaque bacteria counts and vitality during chlorhexidine, meridol and listerine mouthrinses. *Eur J Oral Sci*, 103, 355-361.

Newman, H. N. (1998). The rationale for chemical adjuncts in plaque control. *Int Dent J*, 48, 298-304.

Nichols, W. W., Dorrington, S. M., Slack, M. P. & Walmsley, H. L. (1988). Inhibition of tobramycin diffusion by binding to alginate. *Antimicrob Agents Chemother*, 32, 518-523.

Nyvad, B. & Kilian, M. (1987). Microbiology of the early colonization of human enamel and root surfaces in vivo. *Scand J Dent Res*, 95, 369-380.

O'Leary, T. J. (1986). The impact of research on scaling and root planing. *J Periodontol*, 57, 69-75.

O'Toole, G., Kaplan, H. B. & Kolter, R. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol*, 54, 49-79.

Overholser, C. D., Meiller, T. F., DePaola, L. G., Minah, G. E. & Niehaus, C. (1990). Comparative effects of 2 chemotherapeutic mouthrinses on the development of supragingival dental plaque and gingivitis. *J Clin Periodontol*, 17, 575-579.

Overman, P. R. (2000). Biofilm: a new view of plaque. *J Contemp Dent Pract*, 1, 18-29.

Page, R. C. (1986). Gingivitis. *J Clin Periodontol*, 13, 345-359.

Page, R. C. & Baab, D. A. (1985). A new look at the etiology and pathogenesis of early-onset periodontitis. Cementopathia revisited. *J Periodontol*, 56, 748-751.

Page, R. C. & Beck, J. D. (1997). Risk assessment for periodontal diseases. *Int Dent J*, 47, 61-87.

Page, R. C., Offenbacher, S., Schroeder, H. E., Seymour, G. J. & Kornman, K. S. (1997). Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontol 2000*, 14, 216-248.

Pan, P., Barnett, M. L., Coelho, J., Brogdon, C. & Finnegan, M. B. (2000). Determination of the in situ bactericidal activity of an essential oil mouthrinse using a vital stain method. *J Clin Periodontol*, 27, 256-261.

Pan, P. H., Finnegan, M. B., Sturdivant, L. & Barnett, M. L. (1999). Comparative antimicrobial activity of an essential oil and an amine fluoride/stannous fluoride mouthrinse in vitro. *J Clin Periodontol*, 26, 474-476.

Paster, B. J., Boches, S. K., Galvin, J. L., Ericson, R. E., Lau, C. N., Levanos, V. A., Sahasrabudhe, A. & Dewhirst, F. E. (2001). Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol*, 183, 3770-3783.

Paster, B. J., Olsen, I., Aas, J. A. & Dewhirst, F. E. (2006). The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. *Periodontol 2000*, 42, 80-87.

Patters, M. R., Anerud, K., Trummel, C. L., Kornman, K. S., Nalbandian, J. & Robertson, P. B. (1983). Inhibition of plaque formation in humans by octenidine mouthrinse. *J Periodontal Res*, 18, 212-219.

Patters, M. R., Nalbandian, J., Nichols, F. C., Niekrash, C. E., Kennedy, J. E., Kiel, R. A. & Trummel, C. L. (1986). Effects of octenidine mouthrinse on plaque formation and gingivitis in humans. *J Periodontal Res*, 21, 154-162.

Peyton, B. M. & Characklis, W. G. (1995). Microbial biofilms and biofilm reactors. *Bioprocess Technol*, 20, 187-231.

Pitten, F. A., Doering, S., Kramer, A. & Rosin, M. (2003). In vitro assay for the screening of the plaque-reducing activity of antimicrobial agents. *Arzneimittelforschung*, 53, 182-187.

Pitten, F. A. & Kramer, A. (1999). Antimicrobial efficacy of antiseptic mouthrinse solutions. *Eur J Clin Pharmacol*, 55, 95-100.

Pitten, F. A., Splieth, C. & Kramer, A. (2000). Prophylactic and therapeutic application of antimicrobial agents in the oral cavity. *Pharmazie*, 55, 635-639.

Pratten, J., Andrews, C. S., Craig, D. Q. & Wilson, M. (2000). Structural studies of microcosm dental plaques grown under different nutritional conditions. *FEMS Microbiol Lett*, 189, 215-218.

Pratten, J., Smith, A. W. & Wilson, M. (1998a). Response of single species biofilms and microcosm dental plaques to pulsing with chlorhexidine. *J Antimicrob Chemother*, 42, 453-459.

Pratten, J., Wills, K., Barnett, P. & Wilson, M. (1998b). In vitro studies of the effect of antiseptic-containing mouthwashes on the formation and viability of Streptococcus sanguis biofilms. *J Appl Microbiol*, 84, 1149-1155.

Quirynen, M., Teughels, W., De Soete, M. & Van Steenberghe, D. (2002). Topical antiseptics and antibiotics in the initial therapy of chronic adult periodontitis: microbiological aspects. *Periodontol 2000*, 28, 72-90.

Ramfjord, S. P., Emslie, R. D., Greene, J. C., Held, A. J. & Waerhaug, J. (1968). Epidemiological studies of periodontal diseases. *Am J Public Health Nations Health*, 58, 1713-1722.

Rateitschak, K. H. (1994). Wandlungen in der Parodontologie. *Stomatol*, 91, 9-18.

Rickard, A. H., Gilbert, P., High, N. J., Kolenbrander, P. E. & Handley, P. S. (2003). Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. *Trends Microbiol*, 11, 94-100.

Riep, B. G., Bernimoulin, J. P. & Barnett, M. L. (1999). Comparative antiplaque effectiveness of an essential oil and an amine fluoride/stannous fluoride mouthrinse. *J Clin Periodontol*, 26, 164-168.

Roberts, W. R. & Addy, M. (1981). Comparison of the in vivo and in vitro antibacterial properties of antiseptic mouthrinses containing chlorhexidine, alexidine, cetyl pyridinium chloride and hexetidine. Relevance to mode of action. *J Clin Periodontol*, 8, 295-310.

Romero, R., Schaudinn, C., Kusanovic, J. P., Gorur, A., Gotsch, F., Webster, P., Nhan-Chang, C. L., Erez, O., Kim, C. J., Espinoza, J., Goncalves, L. F., Vaisbuch, E., Mazaki-Tovi, S., Hassan, S. S. & Costerton, J. W. (2008). Detection of a microbial biofilm in intraamniotic infection. *Am J Obstet Gynecol*, 198, 135 e131-135.

Rönström, A., Attström, R. & Egelberg, J. (1975). Early formation of dental plaque on platic films. 1. Light microscopic observations. *J Periodontal Res*, 10, 28-25.

Rosan, B. & Lamont, R. J. (2000). Dental plaque formation. *Microbes Infect*, 2, 1599-1607.

Rosin, M., Welk, A., Kocher, T., Majic-Todt, A., Kramer, A. & Pitten, F. A. (2002). The effect of a polyhexamethylene biguanide mouthrinse compared to an essential oil rinse and a chlorhexidine rinse on bacterial counts and 4-day plaque regrowth. *J Clin Periodontol*, 29, 392-399.

Ross, N. M., Charles, C. H. & Dills, S. S. (1989). Long-term effects of Listerine antiseptic on dental plaque and gingivitis. *J Clin Dent*, 1, 92-95.

Rudney, J. D. (2000). Saliva and dental plaque. *Adv Dent Res*, 14, 29-39.

Sauer, K., Camper, A. K., Ehrlich, G. D., Costerton, J. W. & Davies, D. G. (2002). Pseudomonas aeruginosa displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J Bacteriol*, 184, 1140-1154.

Saxer, U. P. & Mühlemann, H. R. (1983). Synergistic antiplaque effects of a zinc fluoride/hexetidine containing mouthwash. A review. *SSO Schweiz Monatsschr Zahnheilkd*, 93, 689-704.

Sbordone, L. & Bortolaia, C. (2003). Oral microbial biofilms and plaque-related diseases: microbial communities and their role in the shift from oral health to disease. *Clin Oral Investig*, 7, 181-188.

Schaudinn, C. (2009). Charakterisierung von subgingivalen Biofilmen von Patienten mit aggressiver Parodontitis vermittels der Rasterelektronenmikroskopie, Transmissionselektronenmikroskopie und konfokaler Laser Scanning Mikroskopie. *Naturwissenschaftliche Dissertation*, Technische Universität Berlin.

Schaudinn, C., Gorur, A., Keller, D., Sedghizadeh, P. P. & Costerton, J. W. (2009). Periodontitis: an archetypical biofilm disease. *J Am Dent Assoc*, 140, 978-986.

Schierholz, J. M., Beuth, J., König, D., Nürnberger, A. & Pulverer, G. (1999). Antimicrobial substances and effects on sessile bacteria. *Zentralbl Bakteriol*, 289, 165-177.

Schmid, H. (1983). Chemistry and surface effects of amine fluoride. *Dtsch Zahnarztl Z*, 38 Suppl 1, S9-13.

Sculean, A., Schwarz, F., Berakdar, M., Romanos, G. E., Brecx, M., Willershausen, B. & Becker, J. (2004). Non-surgical periodontal treatment with a new ultrasonic device (Vector-ultrasonic system) or hand instruments. *J Clin Periodontol*, 31, 428-433.

Seemann, R. (2001). Halitosis - ein lösbares Problem. *Zahnärztlicher Anzeiger München*, 47, 4-7.

Sekino, S. & Ramberg, P. (2005). The effect of a mouth rinse containing phenolic compounds on plaque formation and developing gingivitis. *J Clin Periodontol*, 32, 1083-1088.

Seymour, G. J., Gemmell, E., Reinhardt, R. A., Eastcott, J. & Taubman, M. A. (1993). Immunopathogenesis of chronic inflammatory periodontal disease: cellular and molecular mechanisms. *J Periodontal Res*, 28, 478-486.

Shapiro, J. A. (1998). Thinking about bacterial populations as multicellular organisms. *Annu Rev Microbiol*, 52, 81-104.

Shapiro, S., Giertsen, E. & Guggenheim, B. (2002). An in vitro oral biofilm model for comparing the efficacy of antimicrobial mouthrinses. *Caries Res*, 36, 93-100.

Sharma, N. C., Galustians, H. J., Qaqish, J., Charles, C. H., Vincent, J. W. & McGuire, J. A. (2003). Antiplaque and antigingivitis effectiveness of a hexetidine mouthwash. *J Clin Periodontol*, 30, 590-594.

Sheiham, A. (1997). Is the chemical prevention of gingivitis necessary to prevent severe periodontitis? *Periodontol 2000*, 15, 15-24.

Shen, Y., Qian, W., Chung, C., Olsen, I. & Haapasalo, M. (2009). Evaluation of the effect of two chlorhexidine preparations on biofilm bacteria in vitro: a three-dimensional quantitative analysis. *J Endod*, 35, 981-985.

Siegrist, B. E., Gusberti, F. A., Brecx, M., Weber, H. P. & Lang, N. P. (1986). Efficacy of supervised rinsing with chlorhexidine digluconate in comparison to phenolic and plant alkaloid compounds. *J Periodont Res*, 60-73.

Singleton, S., Treloar, R., Warren, P., Watson, G. K., Hodgson, R. & Allison, C. (1997). Methods for microscopic characterization of oral biofilms: analysis of colonization, microstructure, and molecular transport phenomena. *Adv Dent Res*, 11, 133-149.

Sissons, C. H. (1997). Artificial dental plaque biofilm model systems. *Adv Dent Res*, 11, 110-126.

Sissons, C. H., Wong, L. & Cutress, T. W. (1996). Inhibition by ethanol of the growth of biofilm and dispersed microcosm dental plaques. *Arch Oral Biol*, 41, 27-34.

Slots, J. (1986). Bacterial specificity in adult periodontitis. A summary of recent work. *J Clin Periodontol*, 13, 912-917.

Slots, J. & Ting, M. (1999). Actinobacillus actinomycetemcomitans and Porphyromonas gingivalis in human periodontal disease: occurrence and treatment. *Periodontol 2000*, 20, 82-121.

Socransky, S. S. & Haffajee, A. D. (2005). Periodontal microbial ecology. *Periodontol 2000*, 38, 135-187.

Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Cugini, M. A., Smith, C. & Kent, R. L., Jr. (1998). Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*, 25, 134-144.

Socransky, S. S., Manganiello, A. D., Propas, D., Oram, V. & Van Houte, J. (1977). Bacteriological studies of developing supragingival dental plaque. *J Periodontal Res*, 12, 90-106.

Stanley, A., Wilson, M. & Newman, H. N. (1989). The in vitro effects of chlorhexidine on subgingival plaque bacteria. *J Clin Periodontol*, 16, 259-264.

Stewart, P. S. (2002). Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *Int J Med Microbiol*, 292, 107-113.

Stewart, P. S. & Costerton, J. W. (2001). Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet*, 358, 135-138.

Stoodley, P., Cargo, R., Rupp, C. J., Wilson, S. & Klapper, I. (2002). Biofilm material properties as related to shear-induced deformation and detachment phenomena. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 29, 361-367.

Takeuchi, Y., Umeda, M., Sakamoto, M., Benno, Y., Huang, Y. & Ishikawa, I. (2001). Treponema socranskii, Treponema denticola, and Porphyromonas gingivalis are associated with severity of periodontal tissue destruction. *J Periodontol*, 72, 1354-1363.

Ten Cate, J. M. (2006). Biofilms, a new approach to the microbiology of dental plaque. *Odontology*, 94, 1-9.

Ten Cate, J. M. & Marsh, P. D. (1994). Procedures for establishing efficacy of antimicrobial agents for chemotherapeutic caries prevention. *J Dent Res*, 73, 695-703.

Theilade, J. (1964). Electron microscopic study of calculus attachment to smooth surfaces. *Acta Odontol Scand*, 22, 379-387.

Thrower, Y., Pinney, R. J. & Wilson, M. (1997). Susceptibilities of Actinobacillus actinomycetemcomitans biofilms to oral antiseptics. *J Med Microbiol*, 46, 425-429.

Thurnheer, T., Gmür, R. & Guggenheim, B. (2004). Multiplex FISH analysis of a six-species bacterial biofilm. *J Microbiol Methods*, 56, 37-47.

Thurnheer, T., Gmür, R., Shapiro, S. & Guggenheim, B. (2003). Mass transport of macromolecules within an in vitro model of supragingival plaque. *Appl Environ Microbiol*, 69, 1702-1709.

Tinanoff, N. (1990). Review of the antimicrobial action of stannous fluoride. *J Clin Dent*, 2, 22-27.

Tinanoff, N., Hock, J., Camosci, D. & Hellden, L. (1980). Effect of stannous fluoride mouthrinse on dental plaque formation. *J Clin Periodontol*, 7, 232-241.

Tsao, T. F., Newman, M. G., Kwok, Y. Y. & Horikoshi, A. K. (1982). Effect of Chinese and western antimicrobial agents on selected oral bacteria. *J Dent Res*, 61, 1103-1106.

Van der Weijden, G. A. & Hioe, K. P. (2005). A systematic review of the effectiveness of self-performed mechanical plaque removal in adults with gingivitis using a manual toothbrush. *J Clin Periodontol*, 32 Suppl 6, 214-228.

Van Palenstein Helderman, W. H. (1981). Microbial etiology of periodontal disease. *J Clin Periodontol*, 8, 261-280.

Van Winkelhoff, A. J., Loos, B. G., Van der Reijden, W. A. & Van der Velden, U. (2002). Porphyromonas gingivalis, Bacteroides forsythus and other putative periodontal pathogens in subjects with and without periodontal destruction. *J Clin Periodontol*, 29, 1023-1028.

Walker, C. & Sedlacek, M. J. (2007). An in vitro biofilm model of subgingival plaque. *Oral Microbiol Immunol*, 22, 152-161.

Wang, P. L. (2010). Roles of oral bacteria in cardiovascular diseases--from molecular mechanisms to clinical cases: Treatment of periodontal disease regarded as biofilm infection: systemic administration of azithromycin. *J Pharmacol Sci*, 113, 126-133.

Wecke, J., Kersten, T., Madela, K., Moter, A., Gobel, U. B., Friedmann, A. & Bernimoulin, J.-P. (2000). A novel technique for monitoring the development of bacterial biofilms in human periodontal pockets. *FEMS Microbiol Lett*, 191, 95-101.

Weerkamp, A. H., Uyen, H. M. & Busscher, H. J. (1988). Effect of zeta potential and surface energy on bacterial adhesion to uncoated and saliva-coated human enamel and dentin. *J Dent Res*, 67, 1483-1487.

Wile, D. B., Dinsdale, J. R. & Joynson, D. H. (1986). Hexetidine ('Oraldene'): a report on its antibacterial and antifungal properties on the oral flora in healthy subjects. *Curr Med Res Opin*, 10, 82-88.

Williams, M. J., Adams, D., Hillam, D. G. & Ashley, K. C. (1987). The effect of hexetidine 0.1% in the control of dental plaque. *Br Dent J*, 163, 300-302.

Wilson, M. (1996). Susceptibility of oral bacterial biofilms to antimicrobial agents. *J Med Microbiol*, 44, 79-87.

Wilson, M., Patel, H. & Fletcher, J. (1996). Susceptibility of biofilms of Streptococcus sanguis to chlorhexidine gluconate and cetylpyridinium chloride. *Oral Microbiol Immunol*, 11, 188-192.

Wilson, M., Patel, H. & Noar, J. H. (1998). Effect of chlorhexidine on multi-species biofilms. *Curr Microbiol*, 36, 13-18.

Wimpenny, J. W. (1982). Responses of microorganisms to physical and chemical gradients. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 297, 497-515.

Wimpenny, J. W. (1997). The validity of models. *Adv Dent Res*, 11, 150-159.

Wood, S. R., Kirkham, J., Marsh, P. D., Shore, R. C., Nattress, B. & Robinson, C. (2000). Architecture of intact natural human plaque biofilms studied by confocal laser scanning microscopy. *J Dent Res*, 79, 21-27.

Yamaguchi, T., Kasamo, K., Chuman, M., Machigashira, M., Inoue, M. & Sueda, T. (1998). Preparation and characterization of an Actinomyces naeslundii aggregation factor that mediates coaggregation with Porphyromonas gingivalis. *J Periodontal Res*, 33, 460-468.

Zaura-Arite, E. & Ten Cate, J. M. (2000). Effects of fluoride- and chlorhexidine-containing varnishes on plaque composition and on demineralization of dentinal grooves in situ. *Eur J Oral Sci*, 108, 154-161.

Zaura-Arite, E., Van Marle, J. & Ten Cate, J. M. (2001). Conofocal microscopy study of undisturbed and chlorhexidine-treated dental biofilm. *J Dent Res*, 80, 1436-1440.

Zelver, N., Hamilton, M., Pitts, B., Goeres, D., Walker, D., Sturman, P. & Heersink, J. (1999). Measuring antimicrobial effects on biofilm bacteria: from laboratory to field. *Methods Enzymol*, 310, 608-628.

Zimmermann, A., Flores-de-Jacoby, L., Pan, P. & Pan, P. (1993). Gingivitis, plaque accumulation and plaque composition under long-term use of Meridol. *J Clin Periodontol*, 20, 346-351.

Danksagung

Mit dem Abschluss dieser Dissertation gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Dr. Jean-Pierre Bernimoulin für die Überlassung des interessanten Dissertationsthemas und die Möglichkeit, die Arbeit im Rahmen des von ihm ins Leben gerufenen Graduiertenkollegs: „Ätiopathogenese und Therapie der Parodontitis“ zu erstellen. Unter seiner Leitung konnte ich fundiertes Wissen im Fachgebiet der Parodontologie erlangen. Der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) danke ich für die dreijährige finanzielle Unterstützung im Rahmen des Graduiertenkollegs.

Großer Dank gilt meinem Tutor Christoph Schaudinn für seine intensive Hilfe bei der Planung und Durchführung meiner Experimente. Ich möchte ihm für seine stets unkomplizierte und verständliche Art danken. Durch offene Kritik und fachliche Diskussionen unterstützte er mich in allen Phasen der Erstellung der vorliegenden Arbeit. Ich danke ihm für die motivierenden Worte und für seine Geduld.

Für die praktische Hilfe danke ich der MTA Verena Kanitz, die mich im Labor immer sehr hilfsbereit unterstützte. Mein Dank gilt auch Dr. Madela und den Kollegen des Robert Koch Instituts Berlin für die Möglichkeit zur Nutzung des Rasterelektronenmikroskops und die geduldige Betreuung bei der Durchführung der Aufnahmen.

Bei Oberarzt Dr. Peter Purucker, Dr. Peggy Weishaupt und Dr. Thilo Schmidt-Rogge bedanke ich mich für die persönliche Anteilnahme und die antreibenden Worte, die zum Gelingen meiner Dissertation beitrugen. Dr. Dogan Kaner möchte ich zudem noch meinen Dank für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse aussprechen.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie, besonders meiner Mutter Doris Heinrich und meinem Mann Dr. André Steiner für die unermüdliche Hilfe, liebevolle Unterstützung und das unbegrenzte Verständnis.

Lebenslauf

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

Erklärung

„Ich, Kristin Steiner, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift zum Thema: *Charakterisierung der Wirkung antimikrobieller Substanzen auf Multispeziesbiofilme mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie*, selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, den 30.10.2011

Kristin Steiner