

Morphologische Studien der Primärkolonisation von pellicelbeschichteten
Schmelzoberflächen am Beispiel von *Streptococcus mutans*

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

vorgelegt von
Andrea Kordes
aus
Arnsberg

2007

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. dent. Matthias Frentzen
2. Gutachter: PD Dr. med. dent. Ernst-Heinrich Helfgen

Tag der Mündlichen Prüfung: 20.12.2006

Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie am Zentrum für Zahn-, Mund-
und Kieferheilkunde der Universität Bonn
Direktor: Prof. Dr. Dr. Sören Jepsen

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn
http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1 Einführung	8
1.1 Einführung ins Thema	8
1.2 Grundlagen	9
1.1.1. Schmelzoberfläche	9
1.1.2. Pellikelbildung	9
1.3 Primäre Kolonisation von Zahnoberflächen	13
1.3.1 Primärkolonisatoren	13
1.3.1.1 S. mitis-Gruppe	13
1.3.1.1 S. mutans-Gruppe	14
1.3.2 Anlagerungsprozesse	15
1.3.3 Rolle des Speichels	19
1.3.4 Beeinflussung der Primärkolonisation	20
1.3.4.1 Lokale passive Immunisierung	20
1.3.4.2 Mukosale Immunisierung	21
1.3.4.3 „Replacement therapy“	23
1.3.4.4 Beeinflussung der bakteriellen Adhärenz- Mechanismen durch Milchproteine	24
1.4 Morphologische (ultrastrukturelle) Darstellungsmöglichkeiten der Adhärenzmechanismen	25
1.4.1 Lichtmikroskopie	25
1.4.2 Rasterelektronenmikroskopie	26
1.4.3 Transmissionselektronenmikroskopie	28
1.4.4 Rastertunnelmikroskopie	29
1.4.5 Rasterkraftmikroskopie	30
1.5 Ziel der Arbeit	35
2 Material und Methode	36
2.1 Herstellung von standardisierten Schmelzproben	36
2.2 Beschichtung der Schmelzproben mit einer Pellikel	38
2.2.1 Steril-Filtrieren von Speichel	38
2.2.2 Pellikelbeschichtung der Schmelzproben	39

2.3	Kolonisation der Schmelzproben mit <i>S. mutans</i>	40
2.3.1	Grundlagen	40
2.3.1.1	Bakterielles Wachstum	40
2.3.1.2	Prinzip der Trübungsmessung/Zelldichtemessung	41
2.3.2	Erstellung einer Wachstumskurve von <i>S. mutans</i>	42
2.3.2.1	Herstellung des Nährmediums	42
2.3.2.2	Herstellung einer Streptokokkensuspension zur Erstellung der bakteriellen Wachstumskurve	43
2.3.2.3	Erstellung der Wachstumskurve	43
2.3.3	Ergebnisse und Rückschlüsse für den weiteren Studienverlauf	46
2.3.4	Bakterielle Kontamination der pellicelbeschichteten Schmelzproben	47
2.4	Darstellung mit dem Rasterelektronenmikroskop	49
2.4.1	Auswertung der ersten Versuchsreihe und Rückschlüsse auf den weiteren Studienverlauf	50
2.5	Darstellung mit dem Rasterkraftmikroskop	52
2.5.1	Vorbereitung	52
2.5.2	Messungen mit dem FRT-MicroGlider®	54
2.6	Auswertung der AFM-Darstellung durch Mark III	57
2.6.1	Profilanalyse	58
2.6.2	Oberflächenanalyse	58
2.6.3	Vergleichende Untersuchungen mit dem REM	59
3	Ergebnisse	60
3.1	Rasterkraftmikroskopie	60
3.1.1	Profilanalyse	61
3.1.2	Oberflächenanalyse	62
3.2	Rasterelektronenmikroskopie	65
3.3	Vergleich der bakteriell kontaminierten Schmelzproben mit den Vorstufen (beschliffen, pellicelbeschichtet)	66
3.3.1	Morphologie	66

3.3.1.1 Morphologie der mit Silikon abgedichteten Seite	66
3.3.1.2 Morphologie der mit Speichel kontaminierten Seite	67
3.3.2 Profilanalyse	67
3.3.3 Analyse der Rauigkeit	69
4 Diskussion	71
4.1 Primäre Ergebnisse	71
4.2 Bewertung der Darstellungsformen	71
4.3 Bewertung der Ergebnisse	72
4.4 Ausblick	75
5 Zusammenfassung	76
6 Literaturverzeichnis	77
7 Anhang	83
7.3 Abbildungsverzeichnis	83
7.4 Herstellerverzeichnis	85
Danksagung	98

1 Einleitung

1.1 Einführung

Karies und entzündliche Parodontalerkrankungen sind die häufigsten Zivilisationserkrankungen in den industrialisierten, westlichen Ländern. In beiden Fällen handelt es sich um mikrobiell induzierte chronische Erkrankungen. In Folge der Veränderungen von ökologischen Verhältnissen in der Mundhöhle kommt es zur Ausbildung aggressiver Biofilme, die direkt durch ihre Stoffwechselprodukte (z.B. Säuren, Toxine) orale Hart- und Weichgewebe schädigen, diese mikrobiell zersetzen, oder indirekt durch Entzündungsreaktionen zerstören können. Grundlage für die Ausbildung dieser Biofilme ist die Adhäsion der oralen Mikroflora auf oralen Oberflächen.

Alle oralen Oberflächen sind mit einem Pellikelsystem, das aus Strukturelementen des Speichels aufgebaut wird, ausgekleidet. Dieses Pellikelsystem stellt die erste Barriere für die orale Mikroflora dar bzw. moduliert über Adhäsionssysteme die Anlagerung von Pionierkeimen auf oralen Oberflächen. Die Identifizierung von Interaktionsmechanismen zwischen der oralen Mikroflora, dem Speichel und dem Pellikelsystem in der Mundhöhle stellt eine wesentliche Grundlage zum Verständnis der Bildung von Biofilmen dar.

Der ultrastrukturelle Aufbau der Pellikel ist bis heute noch weitgehend unbekannt, insbesondere auch die Adhäsions- bzw. Inhibitionssysteme, die zu einer Regulierung des Biofilmaufbaus führen. Die Strukturaufklärung und Isolierung solcher Zielstrukturen ist eine wichtige Grundlage zum Aufbau neuer biotechnologischer Therapiekonzepte zur Prävention und Behandlung von Karies und entzündlichen Parodontalerkrankungen. Hierzu sind Untersuchungen zur Nano-Struktur der Pellikel sowie der Adhäsionssysteme der oralen Mikroflora notwendig.

Die Studie wurde mit Unterstützung von CEMBIO [Centrum für Molekulare Biotechnologie der Universität Bonn; Projektbereich: Biofilme in der Mundhöhle] durchgeführt.



1.2 Grundlagen

1.2.1 Schmelzoberflächen

Zahnschmelz besteht zum größten Anteil aus mineralisierten Bestandteilen (95 Gew%), wie Kalzium, Phosphat, in kleineren Mengen auch Karbonat, Magnesium, Natrium und Spurenelementen. Im Rahmen der Schmelzreifung bilden sich auf der Basis von Kalziumphosphat Hydroxylapatit-Kristalle ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), die in eine organische Matrix eingebettet sind. Dieser ausgereifte Zahnschmelz ist die am stärksten mineralisierte und härteste Substanz des menschlichen Körpers. Auf der Vickers-Härte-Skala erreicht sie einen Wert von 300 - 400 VH. Durch Einlagerung von Fluoriden kann die Widerstandsfähigkeit gegenüber Säureangriffen von Nahrungsbestandteilen oder Stoffwechselleistungen der aufgelagerten Mikroorganismen gesteigert werden (Heidemann 1999, Klimm 1997).

1.2.2 Pellikelbildung

Auf einer (gründlich gereinigten) Schmelzoberfläche bildet sich innerhalb weniger Sekunden ein dünnes Häutchen, das in der englischen Literatur als „acquired salivary pellicle“ (aufgelagertes Schmelzoberhäutchen) beschrieben wird (Hannig & Bößmann 1989, Einfeldt 1978, Klimm 1997). Innerhalb von 2 h wird innerhalb der Pellikel ein Gleichgewicht zwischen Adsorption und Desorption von Proteinen erreicht (Lendenmann et al. 2000).

In elektronenmikroskopischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Pellikel, die den Schmelz oder kleine Hydroxylapatit-Plättchen bedeckt, kein homogener Film ist, sondern granuläre und globuläre Strukturen aufweist. Fluoreszenzmikroskopisch lässt sich meist eine Dreischichtung darstellen (Frentzen 1982). Die Pellikel kann den Schmelz auch in Form von Filamenten penetrieren, dies wird dann als „subsurface“-Pellikel bezeichnet. Sie findet sich überwiegend an den Approximalflächen (Lendenmann et al. 2000).

Die frühe Pellikel bildet sich vor allem durch selektive Adsorption von Speichelbestandteilen (Glykoprotein, Amylase, Lactoferrin, Lysozym, sekretorisches Ig A, Ig G und IgM, sowie Albumin), aber auch Gingivasulkusflüssigkeit und ausgeschiedene bakterielle Produkte, wie Glykosyltransferasen und Glukane, sind in der erworbenen Pellikel nachweisbar (Klimm 1997, Lendenmann et al. 2000, Marsh & Martin 2003).

Der primäre Pellikelbildungsprozess ist nach zwei Stunden weitgehend abgeschlossen. Es stellt sich eine bakterienfreie, membranartige Struktur

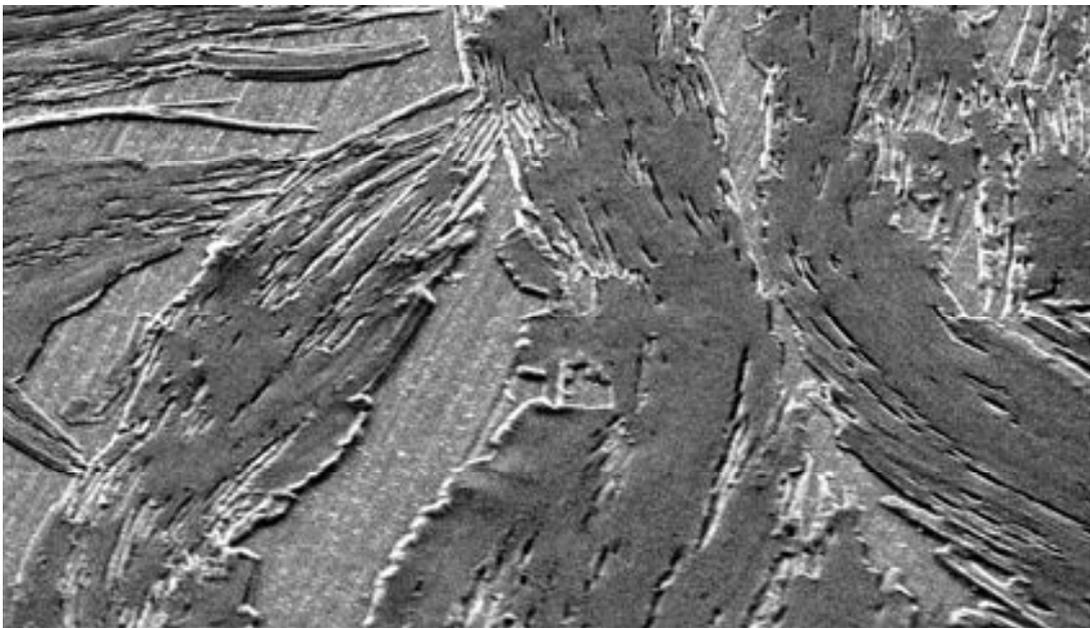


Abb. 1:
Schmelzprobe nach 6 h Speichelkontakt mit sterilfiltriertem Speichel: man erkennt die Pellikelbildung bei unvollständiger Bedeckung der Schmelzoberfläche, u. U. bedingt durch Präparationsartefakte; REM x2000

mit mannigfachem ultrastrukturellen Erscheinungsbild dar, welches ständige Reifungs-, Umbildungs- und Komplettierungsvorgänge widerspiegelt. Das Spektrum der Dicke natürlicher Pellikel schwankt zwischen wenigen Nanometern bis hin zu mehreren Mikrometern. Individuelle Speichelzusammensetzung (Proteingehalt) und schwankende Sekretionsmenge wirken sich modifizierend auf Pellikelmorphologie und -funktion aus (Hannig 2003).

Es gibt zwei Theorien zum Bildungsmechanismus der Pellikel (Einfeldt 1978):

1. Die Glykoproteinmoleküle des Speichels sind in ihrer Polypeptidstruktur so gefaltet, dass das Molekül globulär wird. Die ionisierten Säuregruppen dieses Moleküls zeigen vielfach zur Oberfläche, so dass eine starke negative Ladung entsteht. Im Speichel werden die Glykoproteinmoleküle durch gegenseitiges Abstoßen der negativen Ladungen in Lösung gehalten. Durch Enzyme der Speichelbakterien wird Neuraminsäure synthetisiert, welche die stärkste negative Ladung besitzt; somit verliert das Glykoproteinmolekül seine negative Ladung und kann auf der Zahnoberfläche ausfällen, wo es die Pellikel bildet.
2. Auch bei der zweiten Theorie spielen die stark negativen Ladungen aus dem Glykoproteinmolekül eine wichtige Rolle. Diese Moleküle haben eine starke Affinität zum Hydroxylapatit. Außerdem wurde festgestellt, dass die Pellikel gleiche Proportionen von Sialinsäuremolekülen enthält wie die Glykoproteine des Speichels. Die Ausfällung der Pellikel könnte dann aufgrund der elektrostatischen Anziehung zwischen den negativ geladenen Sialinsäuremolekülen und den positiv geladenen Calcium-Ionen der Zahnoberfläche erfolgen.

Beide Theorien unterstützen die These, dass die Pellikel bis zu $1 \cdot m$ dick wird, dann aber nicht mehr weiterwächst. Dies ist vermutlich zurückzuführen auf die Neutralisation des positiven Kraftfeldes um den Zahn herum, wenn eine Proteinschicht von $1 \cdot m$ dem Schmelz anliegt.

Durch direkte oder indirekte Wechselwirkung von Phosphatgruppen und Ca^{2+} -Ionen der Schmelzoberfläche mit funktionellen Gruppen von Makromolekülen des Speichels über Kalziumbrücken kommt es zur Anheftung der Pellikel an die Schmelzoberfläche (Klimm 1997). Die Pellikel ist eine semipermeable „dauerselektive“ Membran. Sie reduziert die Diffusi-

onsrate von Ca^{2+} - und PO_4 -Ionen, sowie der Milchsäure und schützt so den Zahnschmelz vor Säureeinwirkung (Hannig 2003).

Die Pellikel ist jedoch auch Voraussetzung für die bakterielle Anhaftung am Zahn, da ihre „Klebrigkeit“ bewirkt, dass – zunächst nur einzelne – Bakterien haften bleiben, die anschließend proliferieren und somit eine Grundlage für die Plaquebildung schaffen (Einfeldt 1978). Bei steigender Primärbesiedlung durch Bakterien geht die klare Struktur der Pellikel verloren. Durch weitere bakterielle Besiedlung kommt es zu Einbrüchen in der Pellikel, die zu einer Abnahme der Dicke führen (Frentzen 1982).

Nach Frentzen (1982) ist die Pellikel in ihrer Reifungsphase ein ionotropes Gel, aufgebaut in drei Schichten. Unter- und Oberseite des Zahnoberhäutchens sind dabei z. B. stärker mit Immunglobulinen besetzt als der Mittelteil. Diese können zu einer Adhärenzminderung beitragen. Darüber hinaus gaben sie als Indikator bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen Auskunft über den Umwandlungsvorgang vom ionotropen Gel in der Reifungsphase zu einer sehr dünnen, unstrukturierten Schicht nach bakterieller Besiedelung.

Innerhalb der erworbenen Pellikel fördern prolinreiche Proteine und Statherin die Adhärenz einiger Streptokokkus-Mutans-Stämme. Die adsorbierten bakteriellen Glykosyltransferasen sind auch in der Pellikel noch in der Lage ihre Funktion auszuüben und die aus Saccharose gebildeten Glukane können an Glukanbindungsproteine auf Bakterien, z.B. Mutans-Streptokokken, binden. Hierbei haben die Glukane, die von den an der Zahnoberfläche adsorbierten GTFs synthetisiert werden, i. d. R. eine andere chemische Struktur als das von frei lebenden Bakterien gebildete Produkt (Marsh & Martin 2003).

1.3 Primäre Kolonisierung von Zahnoberflächen

1.3.1 Primärkolonisatoren

Das erste Zellmaterial, das an der Zahnoberfläche anheftet, besteht aus bakteriellen Kokken und wenigen Epithelzellen bzw. polymorphkernigen Leukozyten. Die Bakterien lagern sich als einzelne Zellen oder als Aggregate von Mikroorganismen sowohl auf als auch in der Pellikel ein (Theilade 1989). Die Pionierkeime schaffen durch metabolische Aktivitäten adäquate oder inadäquate Lebensbedingungen für nachfolgende Mikroorganismen (Klimm 1997). Sie haften innerhalb weniger Stunden selektiv an die Pellikel. Hierbei handelt es sich vorwiegend um *S. sanguis*, später folgen weitere Streptokokken, Aktinomyceten und Veillonellen (Hellwig et al. 1999). Die junge Plaque ist grampositiv (Lie 1979). Obligat anaerobe Arten werden in diesem Stadium nur selten nachgewiesen.

Die Pionierkolonisatoren vermehren sich in den ersten 4 Stunden der Plaquebildung sehr schnell und bilden Mikrokolonien, die in eine bakterielle extrazelluläre Matrix und Polysaccharide zusammen mit zusätzlichen Schichten von adsorbierten Proteinen und Glykoproteinen aus dem Speichel eingebettet werden. Das Wachstum der einzelnen Mikrokolonien führt schließlich zur Ausbildung eines mikrobiellen Biofilms auf der Zahnoberfläche (Marsh & Martin 2003).

Die Erstbesiedelung der pellikelbedeckten Zahnoberflächen beginnt in den Vertiefungen der Schmelzoberfläche (Lie 1979). Mutans-Streptokokken und Mitglieder der *S. mitis*-Gruppe findet man am häufigsten auf Zahnoberflächen, da sie eine starke Affinität zu harten Oberflächen besitzen. Vor dem Zahndurchbruch sind diese Organismen in der Mundhöhle meist nicht zu isolieren (Marsh & Martin 2003).

1.3.1.1 *S.-mitis*-Gruppe

Vorwiegend Mitglieder der *S.-mitis*-Gruppe machen die Pionierkeime der pellikelbedeckten Schmelzoberfläche aus. Die wichtigsten Vertreter dieser Gruppe sind *S. sanguis*, *S. mitis* und *S. oralis*. *S. sanguis* und *S. oralis*

haben den größten Anteil der anheftenden Bakterien in der noch jungen Plaque. *S. sanguis* bildet eine Protease, die IgA spalten kann. Auch die Bildung von extrazellulärem Glukan aus Saccharose wurde Mitgliedern der *S.-mitis*-Gruppe nachgewiesen. *S. sanguis* gilt jedoch als nicht azidogen, so dass trotz einer zahlenmäßigen Überlegenheit von Mikroorganismen dieser Gruppe auf dem Zahn das kariogene Potential geringer ausgeprägt ist als bei Mutans-Streptokokken. Kariöse Läsionen, an denen *S. sanguis* beteiligt ist, befinden sich meist in den Fissuren.

1.3.1.2 *S.-mutans*-Gruppe

Mutans-Streptokokken (hier v. a. *S. mutans* und *S. sobrinus*) gelten nur bedingt als Pionierkeime bei der Plaquebildung, sind jedoch in der frühen Plaqueflora zu finden. Die Fähigkeit von Mutans-Streptokokken an der Schmelzoberfläche irreversibel zu adhären und so das Biotop Zahn zu kolonisieren stellt die entscheidende Voraussetzung für die Etablierung eines pathogenen Biofilms auf der Zahnoberfläche. Ihr Hauptvertreter und Namensgeber *S. mutans* gilt als wesentlicher Initiator der Karies. In epidemiologischen Studien wurde er als Haupterreger bei der Ätiologie von Schmelzkaries bei Kindern und jungen Erwachsenen, von Wurzelkaries in der älteren Bevölkerung und der „nursing bottle caries“ bei Kleinkindern nachgewiesen (Hannig 2001, Marsh & Martin 2003).

1924 konnte *S. mutans* erstmalig von Clarke aus kariösen Läsionen isoliert werden, wenige Zeit später auch bei einem Fall von infektiöser Endokarditis. Es handelt sich um grampositive Kokken mit einem Durchmesser von 0,5 - 0,75 μm . Sie treten paarweise oder in kurzen Ketten auf. Manchmal nehmen sie die Form von Kurzstäbchen an. Das kariogene Potential von *S. mutans* ist gekoppelt an die Fähigkeit sich in großen Massen an die Zähne zu akkumulieren sowie aus Bausteinen des Zuckers Säuren zu produzieren (Marsh & Martin 2003, Klimm 1997).

S. mutans kann in Anwesenheit von Zucker mit Hilfe spezifischer Glykosyltransferasen extrazelluläre Polysaccharide (Glukane) synthetisieren.

Diese fördern die Akkumulation von Mikroorganismen an den verschiedenen festen Oberflächen der Mundhöhle, führen zu einer festen Anhaftung der Mikroorganismen an den Zahnoberflächen und somit zur Etablierung einer adhäsiven und hochgradig kariogenen Plaque (Gibbons RJ 1980, Hellwig et al. 1999). Sie dienen darüber hinaus als bakterielles Energiedepot und modulieren die Permeabilität des Biofilms (Hannig 2003).

Neben den genannten Eigenschaften besitzen Mutans-Streptokokken verschiedene Oberflächenproteine, die für die irreversible Anhaftung des Bakteriums an der pellicelbedeckten Zahnoberfläche verantwortlich sind. Zu diesen so genannten bakteriellen Adhäsinen zählen Proteine mit einem Molekulargewicht von 185 bis 210 kDa, die als SA I/II (surface antigen I/II) bezeichnet werden (Hannig 2003). Diese sind in der Zellwand verankert und besitzen verschiedene Bindungsstellen für Rezeptoren. Weitere bakterielle Adhäsine sind Glykosyltransferasen.

1.3.2 Anlagerungsprozesse

Grundlage für die Besiedelung der Zahnoberfläche durch bakterielle Mikrokolonien und deren Wachstum ist die Ausbildung einer Pellicel (s. o.). Die initiale Kolonisierung der pellicelbeschichteten Zahnoberfläche erfolgt zunächst durch einzelne Bakterienzellen, gefolgt von Wachstum in Form von Mikrokolonien (Madigan et al. 2001). Üblicherweise geschieht dies über einen direkten Kontakt zwischen der Bakterienzellwand und der Pellicel (Carassi et al. 1989). Der Anlagerungsmechanismus erfolgt in zwei Phasen:

1. Eine reversible Phase, in welcher die Bakterien locker anheften und später:
2. Eine irreversible Phase, während derer die Anheftung gefestigt wird.
(Gibbons & van Houte 1975, 1980, Theilade 1989)

Hierbei kommt es initial zur Anheftung einzelner Mikroorganismen an die Pellicel über van-der-Waals-Kräfte und elektrostatische Kräfte (Heide-

mann 1999, Quirynen & Bollen 1995). Über Kalziumbrücken kann die Wechselwirkung zwischen negativ geladener Pellikeloberfläche und ebenfalls negativ geladener Bakterienoberfläche begünstigt werden (Klimm 1997, Gibbons 1984). Sie wird durch den pH-Wert und ionische Kräfte des Speichels beeinflusst, sowie von makroskopischen, physikochemischen Charakteristika der Zahnoberfläche (z.B. Oberflächenladung, Oberflächenspannung oder die Hydrophobizität der pellicelbeschichteten Zahnoberfläche und der anhaftenden Mikroorganismen) bestimmt (Scheie 1994). Die oben erwähnten Kräfte reichen jedoch nicht aus, einen direkten Kontakt der Bakterienzelle mit der festen Zahnoberfläche zu gewährleisten. Die Mikroorganismen sind in dieser Phase vermutlich ca. 100 • von der Oberfläche entfernt (Gibbons 1984, 1971). Bei diesem Trennungsabstand können die Mikroorganismen reversibel in einem schwachen Anziehungszustand festgehalten werden. Mit der Zeit wird diese Wechselwirkung irreversibel, da sich Adhäsine auf der Zelloberfläche an spezifischen, über Kurzstrecken wirksamen, Wechselwirkungen beteiligen. Damit dies stattfinden kann, müssen Wasserfilme zwischen den interagierenden Oberflächen entfernt werden. Eine wichtige Rolle der Zellhydrophobizität und hydrophober Bestandteile von Zelloberflächen ist ihr dehydratisierender Effekt auf diesen Wasserfilm, wodurch sich die Oberflächen einander so weit annähern können, dass über Kurzstrecken wirksame Interaktionen stattfinden können (Marsh & Martin 2003).

Die Wechselwirkungen zwischen Mikro- und Makroorganismus, sowie den Mikroorganismen untereinander sind vielfältig. Dabei kommt es in der Folge zur irreversiblen Anlagerung. An diesem hochspezifischen und selektiven Prozess sind neben Bindungsmolekülen der Bakterienoberfläche (Adhäsine) und den Oberflächenstrukturen der Primärkoloniatoren auch Rezeptoren der Pellikeloberfläche beteiligt.

Die Mikroorganismen haften über ihren Fimbrienbesatz an der Pellikeloberfläche (Abb. 2). Hieran befinden sich die bakteriellen Adhäsine (Lektine, Lipoteichonsäuren, Glykosyltransferasen), die durch spezifische In-

teraktionen an Rezeptormolekülen in der Pellicel zur irreversibeln Adhärenz der Bakterien an der Oberfläche beitragen (Hannig 2003, Klimm 1997).

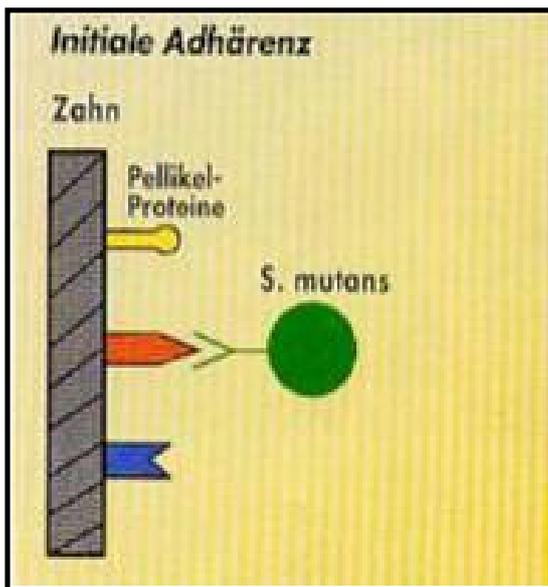


Abb. 2: Mechanismus der initialen Adhärenz von *S. mutans* an die Zahnoberfläche: Das Bakterium haftet über seinen Fimbrienbesatz an die Rezeptoren der Zahnoberfläche (aus: Hannig 2004)

Zu den bedeutendsten Adhäsinen gehören die oben schon erwähnten SA-I/II-Adhäsine, die in der Zelloberfläche verankert sind und bei den meisten oralen Streptokokken vorkommen. Diese linearen Polypeptide haben komplexe Strukturen, sind multifunktionelle Adhäsine und haben mehrere verschiedene Bindungsstellen für Rezeptoren. Eigenständige Bereiche auf diesen Peptiden binden an menschliche Glykoproteine im Speichel, an andere Mikroorganismen und Calcium. Weitere bakterielle Adhäsine sind Glukosyltransferasen (GTFs); diese GTFs können mit Rezeptoren in der Pellicel, wie blutgruppenspezifischen Proteinen, oder mit adsorbierten Dextranen und Glukanen interagieren. Letztere können auch mit Glukanbindungsproteinen reagieren, die von anderen Streptokokken exprimiert werden. Auch die auf vielen grampositiven Mundhöhlenbakterien vorhandenen Lipoteichonsäuren (LTAs) sind in den Anlagerungsprozess involviert. LTA kann mit blutgruppenspezifischen Substan-

zen in der Pellikel interagieren. Da in der erworbenen Pellikel Antikörper nachweisbar sind, wirken möglicherweise auch eine Reihe von Antigenen indirekt als Adhäsine. Ebenso kann Lysozym in der Pellikel an Rezeptoren für Proteine auf den Bakterien binden. Von einigen Adhäsinen ist bekannt, dass sich an einem Ende ein Lipid befindet (d.h. sie sind Lipoproteine), mit dessen Hilfe sie in der Zellmembran befestigt sind. Diese können an eine immobilisierte Substanz (z.B. ein adsorbiertes Zucker- oder Peptidmolekül) in der erworbenen Pellikel oder auf der Zelloberfläche eines anderen Bakteriums binden und so die Anheftung erleichtern (Marsh & Martin 2003).

Die Adhärenz der Mikroorganismen an die Pellikel ist jedoch nur dann

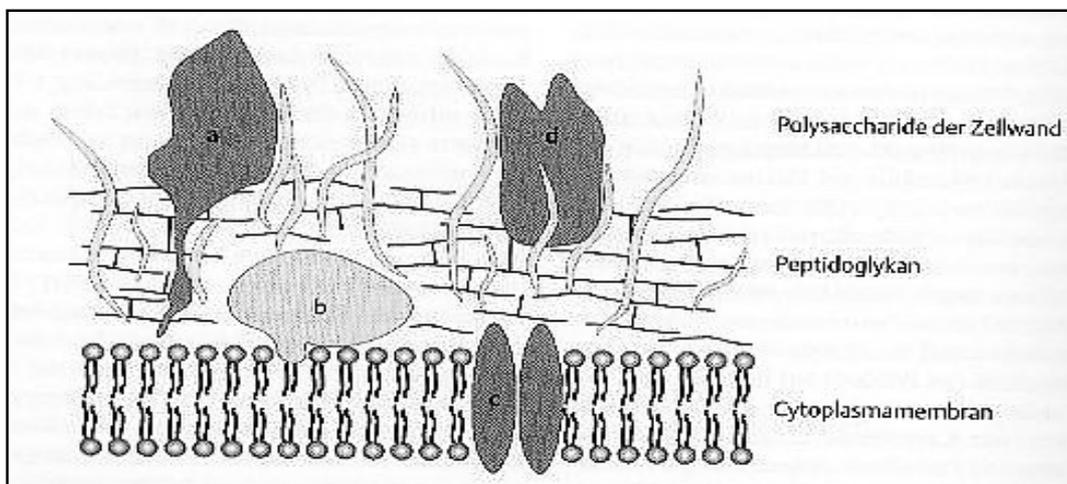


Abb. 3: schematische Darstellung der Zelloberfläche einer Streptokokkenzelle, auf der Adhäsine und Rezeptoren zu sehen sind, die bei der Adhärenz und dem Zuckertransport eine Rolle spielen. Polypeptide, die in der Zellwand verankert sind (a), Polypeptide, die in der Membran verankert sind (b), Transmembranpolypeptide (c), extrazelluläre Polypeptide (z.B. GTF) (d); (aus: Marsh & Martin 2003)

möglich, wenn die Eigenschaften von Adhäsine und Pellikelrezeptor übereinstimmen.

Als Liganden der Pellikel gelten saure prolinreiche Proteine, Statherin, Amylase, Lysozym, Albumin, Immunglobuline, Glykosyltransferasen und Glukane, sie fördern innerhalb der Pellikel auf dem Schmelz die Adhärenz von Mikroorganismen, u. a. von *S. mutans*. Die Glykosyltransferasen in

der Pellikel sind darüber hinaus weiterhin in der Lage ihre Funktion auszuüben. Die so aus Saccharose gebildeten Glukane können an Glukanbindungsproteine auf Bakterien, wie z.B. Mutans-Streptokokken, binden (Marsh & Martin 2003, Klimm 1997).

1.3.3 Rolle des Speichels

Die Rolle des Speichels bei der mikrobiellen Adhäsion wird oft vernachlässigt. Dabei adsorbieren alle Oberflächen in der Mundhöhle, auch die der Mikroorganismen, Speichelproteine und bilden damit einen Proteinfilm, der die Oberflächeneigenschaften verändert und Oberflächenstrukturen maskiert. Deshalb sind die adhäsionsfördernden Effekte der Oberflächeneigenschaften von Zähnen oder Mikroorganismen vermutlich limitiert.

Speichel erfüllt auch eine Transportfunktion. Nur wenige orale Bakterienarten sind beweglich. Durch den Speichelfluss können sie passiv an die Zahnoberfläche transportiert werden (Marsh & Martin 2003).

Darüber hinaus kann Speichel Kalzium-Ionen zur Verfügung stellen, die die Möglichkeit haben, Kalzium-Brücken zwischen negativ geladener Zahnoberfläche und Bakterienoberfläche auszubilden (unspezifische Bindungen). Ferner enthält der Speichel Komponenten, die die mikrobielle Adhäsion sowohl fördern als auch hemmen können (Scheie 1994).

Einige Speichelkomponenten können Mikroorganismen aggregieren. Diese Eigenschaft unterstützt verschiedene Speichelbestandteile bei der bakteriellen Adhäsion an pellikelbeschichteten Zahnoberflächen und übertragen die Spezifität auf den Adhäsionsprozess der Primärkolonisatoren (Ericson & Magnusson 1976). Ein Beispiel: Glykoproteine des Speichels, die Oligosaccharide enthalten, können in der Pellikel als Rezeptoren für orale Streptokokken fungieren und das prolinreiche Speichelprotein 1 und Statherin werden mit Rezeptoren für Typ 1 Fimbrien von *A. viscosus* in Zusammenhang gebracht (Gibbons & Querechi 1978, Gibbons et al. 1988, Scheie 1994).

Es scheint paradox zu sein: derselbe Speichelbestandteil dient - innerhalb der Pellikel - als Rezeptor für die bakterielle Anhaftung; ist er jedoch im Speichel gelöst, hemmt er die mikrobielle Anhaftung durch Bindung an die bakteriellen Adhäsine (Scheie 1994).

1.3.4 Beeinflussung der primären bakteriellen Anlagerung

S. mutans spielt eine entscheidende Rolle bei der Kariesentstehung. Maßgebliche Virulenzfaktoren der Mutans-Streptokokken sind bakterielle Adhäsine, Glykosyltransferasen und azidogene Eigenschaften.

Aus diesem Grund wird in der Kariesprävention vor allem nach Verfahren und Stoffen gesucht, die die Adhärenz und/oder die Stoffwechselaktivität von *S. mutans* so beeinflussen, dass letztendlich die Kariesentstehung durch Mutans-Streptokokken verhindert, mindestens jedoch minimiert wird.

In diesem Zusammenhang sollen einige vielversprechende Ansätze aufgezeigt werden:

1.3.4.1 Lokale passive Immunisierung

Das Prinzip der lokalen passiven Immunisierung beruht auf der Überlegung, dass Antikörper, die Wechselwirkungen mit den molekularen Mechanismen der *S. mutans*-Adhärenz eingehen, nach der Applikation auf den gereinigten Zahnschmelz in der Pellikelschicht angereichert werden und dadurch der bakteriellen Anhaftung und Kolonisation direkt entgegenwirken können. Hierzu sind jedoch vergleichsweise große Mengen von Antikörpern nötig, die spezifisch gegen die Oberflächenadhäsine von *S. mutans* gerichtet sein müssen. Mit einem Verfahren zur gentechnischen Transformation von Tabakpflanzen konnte erreicht werden, entsprechende Mengen sekretorischer IgA- und IgG-Antikörper zu produzieren, die gegen die Oberflächenadhäsine (SA I/II) der Bakterien gerichtet sind. In Studien von Ma et al. (1998) ist der murine, monoklonale Antikörper Guy's 13, der spezifisch an das SA I/II-Protein von *S. mutans* bin-

det, erfolgreich zur Vorbeugung der *S. mutans*-Kolonisierung und Entstehung der Karies eingesetzt worden. Die Wirksamkeit dieser Antikörper wurde sowohl im Tiermodell wie auch an menschlichen Probanden nachgewiesen, die nach Applikation der Antikörper im Gegensatz zu einer Placebo-Gruppe einen bis zu zweijährigen Schutz vor der Rekolonisierung von *S. mutans* aufwiesen. Die applizierten Antikörper lassen sich auf der Zahnoberfläche überraschenderweise nur für 3 Tage nachweisen, die intraorale Wiederbesiedlung von *S. mutans* kann jedoch über viele Monate gehemmt sein. Vermutlich resultiert dies aus einer Verschiebung im Gleichgewicht der oralen Mikroflora, wodurch die Inhibition von *S. mutans* begünstigt wird. Da murine Antikörper in der klinischen Anwendung durch das Hervorrufen von allergischen Reaktionen limitiert sind, ist man dazu übergegangen, die murinen Sequenzen durch ihre humanen Gegenstücke zu ersetzen; darüber hinaus kann auch der Einsatz von Antikörper-Fragmenten eine Immunantwort provozieren. Die Lokalapplikation von pflanzlichen sIgA/G Antikörpern stellt einen vielversprechenden Ansatz für die sichere Immunisierung gegen *S. mutans* dar, denn unerwünschte klinische, hämatologische oder serologische Nebenwirkungen sind im Rahmen der Antikörper-Applikation auf die Zahnoberfläche bislang nicht festgestellt worden (Hannig 2004, 2003, 2001, Küpper et al. 2005).

In Vergleichsstudien mit CHX und den aus den Tabakpflanzen synthetisierten Antikörpern konnte jedoch keine erhöhte Wirksamkeit der pflanzlichen Antikörper auf *S. mutans* nachgewiesen werden. Es wurde jedoch auch festgehalten, dass zu einer Steigerung der Wirksamkeit u. U. lediglich Frequenz, Konzentration oder die Anzahl der Verabreichungen erhöht werden müssen (Weintraub et al. 2004).

1.3.4.2 Mukosale Immunisierung

Eine aktive Immunisierung des Menschen gegen Karies ist nicht möglich, da hierbei durch Kreuzreaktionen nicht nur Antikörper gegen die Karies-

bakterien, sondern auch gegen menschliches Herzmuskelgewebe gebildet würden (Hannig 2004). Auf der Suche nach Alternativen wurde jedoch festgestellt, dass mit dem Speichel sekretorische Antikörper (sIgA) gegen *S. mutans* sezerniert werden, wenn eine entsprechende Stimulation des mukosalen Immunsystems – zu dem u. a. der Waldeyersche Rachenring gehört – in der Mundhöhle erfolgt. Diese Antikörper dienen zur spezifischen Immunabwehr von intraoralen Krankheitserregern. Angeregt wird das mukosale Immunsystem über die intranasale oder tonsilläre Applikation von Antigenen in Form eines Sprays.

Antigene zur mukosalen Immunisierung sind neben den bakteriellen Oberflächenadhäsinen auch Enzyme (Glykosyltransferasen) aus dem Stoffwechsel von *S. mutans*. Diese begünstigen durch die Synthese von extrazellulären Polysacchariden die Etablierung von *S. mutans* im Biofilm an der Zahnoberfläche. Durch mukosale Immunisierung lässt sich eine sekretorische Immunantwort induzieren, die auf eine Blockade der Virulenzfaktoren (Adhäsine und Glykosyltransferasen) von *S. mutans* ausgerichtet ist (Childers et al. 2002). Mittels Applikation von Antigenen kann die intraorale Kolonisation mit *S. mutans* auf immunologischem Weg verhindert werden, ohne eine Kreuzreaktion mit dem Herzmuskelgewebe hervorzurufen (Hajishengallis & Michalek 1999). Die Produktion von sIgA ist hierbei jedoch variabel und oft sehr gering ausgeprägt. Daher ist es erforderlich die Immunantwort mit Hilfsstoffen zu verstärken. Liposome oder zeitgleiche Co-Immunisierung mit verschiedenen Antigenen können die lokale Verfügbarkeit der Antigene erhöhen bzw. die Immunantwort des mukosalen Immunsystems steigern.

Unerwartete Nebenwirkungen infolge einer Immunisierung gegen Mutans-Streptokokken sind letztlich jedoch nur dann mit hoher Wahrscheinlichkeit auszuschließen, wenn die Antikörper nicht vom körpereigenen Immunsystem gebildet werden, sondern in Form von Mundspüllösungen verabreicht oder direkt auf die Zahnoberfläche appliziert werden.

Im Tierversuch konnte die Wirksamkeit der aktiven Immunisierung bereits nachgewiesen werden, beim Menschen zeigte sich jedoch noch nicht in allen Fällen eine zufriedenstellende Wirkung. Um eine wirksame Kariesprävention mittels mukosaler Immunisierung zu erzielen, bedarf es also noch weiterer Studien (Hannig 2004, 2003, 2001).

Sowohl die lokale passive wie auch die aktive Immunisierungsstrategie zielen auf eine Modifikation der Biofilmbildung an der Zahnoberfläche ab.

1.3.4.3 „Replacement therapy“

Eine Arbeitsgruppe um Jeffrey Hillman entwickelte im Rahmen von kariesprotektiven Studien die „replacement therapy“. Hierbei handelt es sich nicht um ein Immunisierungsverfahren, sondern um den Austausch von *S. mutans* durch einen gentechnisch veränderten, nicht pathogenen Bakterienstamm (Hillman et al. 2002). Dieser Austauschbakterienstamm soll im Biofilm die ökologische Nische, die normalerweise von *S. mutans* besetzt wird, selektiv und dauerhaft kolonisieren. Durch die gentechnische Manipulation (Mangel an Lactatdehydrogenase, dafür erhöhte Alkoholdehydrogenase-Aktivität zur Kompensation des metabolischen Ungleichgewichtes des Bakteriums) ist die *S. mutans*-Variante nicht mehr in der Lage Milchsäure zu produzieren, stattdessen bildet sie vermehrt Äthanol als Stoffwechselendprodukt, so dass die Gesamtmenge der sauren Stoffwechselmetaboliten reduziert ist. Um den natürlichen *S. mutans*-Stamm dauerhaft aus dem Biofilm verdrängen zu können, wurde der zur Substitution konzipierte Effektorstamm zudem mit der Fähigkeit ausgestattet, das antibakteriell wirksame Peptid Mutacin zu bilden. Mutacin hemmt das Wachstum aller anderen *Mutans*-Streptokokken und begünstigt dadurch die selektive Kolonisation der Zahnoberfläche durch den Austauschstamm. Im Tierexperiment wurde die antikariogene Wirkung dieser „*S. mutans*-Austauschtherapie“ bereits nachgewiesen, klinische Studien am Menschen sollen folgen (Hannig 2003, 2004).

Aus der Möglichkeit, Adhäsionsmechanismen von *S. mutans* zu kontrollieren, resultiert nicht zwangsläufig eine langfristige Kariesprophylaxe. Da an der Kariesentstehung sehr viele unterschiedliche Bakterienstämme beteiligt sind, deren Virulenzfaktoren durch eine Vielzahl spezifischer Antikörper blockiert werden müssen, um einen umfassenden kariesprotektiven Effekt zu erzielen (Hannig 2001).

1.3.4.4 Beeinflussung der bakteriellen Adhärenzmechanismen durch Milchproteine

und so das Wachstum von kariogenen Bakterien wie *S. mutans* u. a. Auch die Milch und aus ihr hergestellte Produkte können die primäre Anlagerung der Kariesbakterien beeinflussen. Wissenschaftler und Produkt-Entwickler haben durch Isolation verschiedener Bestandteile die Beeinflussung der Kariesentwicklung nachgewiesen.

Dass Molkereiprodukte kariespräventiv wirken können, wurde schon in den späten 1950er Jahren festgestellt. Shaw et al. (1959) beobachteten, dass Milch, Eiscreme und Käse die Kariesinzidenz bei Ratten herabsenkten.

Vor allem die größte Protein-Fraktion der Milch, das Casein, kann die bakterielle Adhäsion der Primärkolonisatoren beeinflussen. Casein liegt in Form von Micellen vorwiegend als Calcium-Phosphat-stabilisierter Komplex vor. Diese Caseinophosphopeptide (CPPs) können, ebenso wie Glukomakroproteine (GMPs), in die Pellikel eingebaut werden und so die Adhärenz von *S. sobrinus* und *S. mutans* reduzieren. Darüber hinaus können sie direkt an die Bakterienzellwände binden hemmen.

Auch im Verbund mit amorphem Calcium-Phosphat (ACP) beeinflusst CPP bakterielle Anlagerungsmechanismen. Der gebildete CPP-ACP-Komplex konkurriert mit Calcium um die Calcium-bindenden Rezeptoren der Plaque. Das reduziert die Kalziumbrücken zwischen Pellikel und adhärennten Zellen sowie zwischen den Zellen untereinander, wodurch hohe

Konzentrationen extrazellulären Kalziums existieren können, die einen bakteriostatischen oder bakteriziden Effekt auf odontopathogene Bakterien haben.

Schüpbach et al. (1996) spekulieren, dass durch den Einbau von CPP und GMP in die Pellikel und die damit verbundene selektive Hemmung der Streptokokken-Adhäsion am Zahn, die Plaque so moduliert wird, dass eine Kariesreduktion resultiert. Dies geschieht durch eine Umwandlung der mikrobiellen Population in der Plaque. Hierbei kommt es zu einer Verschiebung von einer kariogenen – vorherrschend von *S. mutans* und *S. sanguis* bevölkerten – Population zu einer weniger kariogenen Plaque, in der sich vorwiegend Actinomyceten finden.

Darüber hinaus zeigen auch andere Milch-Bestandteile gegen *S. mutans* gerichtete Eigenschaften: Lactoferrin hemmt die Adhärenz von *S. mutans* an die Rezeptoren des pellikelbedeckten Schmelzes. Lactoperoxidase und Lysozym schränken den Metabolismus von *S. mutans* ein. Sie arbeiten bei der Hemmung des Glucose-Metabolismus von *S. mutans* zusammen und reduzieren so die Säureproduktion in der Plaque (Aimutis 2004, Rose 2000, Guggenheim et al. 1999).

1.4 Morphologische (ultrastrukturelle) Darstellungsmöglichkeiten der Adhärenzmechanismen

1.4.1 Lichtmikroskopie

Die einfachste Darstellungsmöglichkeit kleiner Strukturen ist die Vergrößerung dieser mit Hilfe der Lichtmikroskopie. Hierbei wird ein reelles Bild der Probe erzeugt. Durch die Wellenlänge des sichtbaren Lichtes ist die Auflösung des Lichtmikroskops jedoch beschränkt auf etwa 0,3 μm . Eine Erhöhung der Auflösung kann durch UV-Licht oder die Ölimmersionsmikroskopie erreicht werden (Gerlach 1985).

Eine besondere Form der Lichtmikroskopie ist die Laser-Fluoreszenz-Mikroskopie. Ein konfokales Laserscanning-Mikroskop (CLSM) tastet einzelne Punkte der Probe auch weit unter der Oberfläche ab und filtert

durch geeignete Blenden störendes Streulicht heraus. Hierbei wird (Laser-)Licht durch das Objektiv eines Mikroskops fokussiert, die getroffenen Moleküle werden zur Fluoreszenz angeregt. Aus der Fluoreszenzstrahlung, die sich mit einem Detektor (z. B. CCD-Chip) auffangen lässt, kann dann durch Rasterung ein 3D-Bild der Zelle erstellt werden. Durch die gezielte Fokussierung des Lichts wird eine Erhöhung der Auflösung erreicht, da Streulicht ausgeblendet wird. Mit diesem Verfahren wurden schon Auflösungen von $0,1 \mu\text{m}$ erreicht, in der Theorie sind sogar 10 nm möglich (Schade 1993).

1.4.2 Rasterelektronenmikroskopie

Bei der Rasterelektronenmikroskopie wird das Bild der Probe indirekt erzeugt, d. h. nicht der gleiche Strahl, der die Probe trifft, erzeugt ein virtuelles Bild auf dem Schirm oder Okular, sondern die von der abgerasterten Probe emittierten Sekundär- und Rückstreuelektronen werden zur Bildgebung verwendet.

Hierbei sind die beiden wesentlichen Prozesse:

1. Durch elastische Streuung der Primärelektronen in der Probe werden diese in ihrer Richtung abgelenkt und können die Probe auch wieder verlassen. Die Energie dieser Rückstreuelektronen ist der Energie der Primärelektronen vergleichbar.
2. Durch unelastische Streuung der auftreffenden Primärelektronen werden Sekundärelektronen im Material ausgelöst. Deren Energie ist wesentlich niedriger als die Energie der Primärelektronen. Auch Rückstreuelektronen, die sich in der Probe ausbreiten, können Streuelektronen erzeugen.

Rückstreu- und Sekundärelektronen werden im Rasterelektronenmikroskop mit verschiedenen Detektoren aufgenommen. Eine positive Vorspannung des Detektors für die Sekundärelektronen „saugt“ diese Elektronen zum Detektor.

Mit zunehmender Neigung der Probenoberfläche zum auftreffenden Strahl kann die Ausbeute an Sekundär- und Rückstreuelektronen erhöht werden. So entsteht der zu beobachtende Topographiekontrast.

Da der Elektronenstrahl an den Luftmolekülen gestreut würde, kann das REM nur im Vakuum betrieben werden. Mit einem zweistufigen Pumpensystem wird ein Vakuum von $<10^{-4}$ mbar erzeugt. Jeder Probenwechsel erfordert somit das Fluten und erneute Evakuieren der Vakuumkammer. Mit dem REM können Vergrößerungen der Probe bis zu 150000fach erzeugt werden. Die erreichbare Auflösung wird durch den Spot, auf den der Elektronenstrahl fokussiert werden kann, bestimmt. Der Spotdurch-

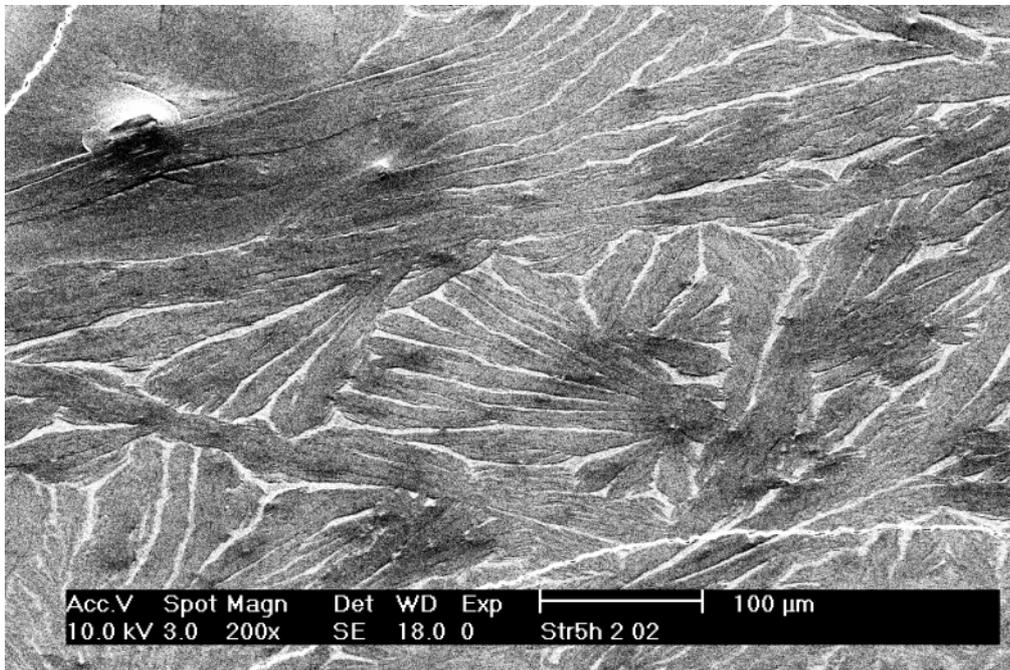


Abb. 4: rasterelektronenmikroskopische Darstellung einer mit Speichel beschichteten, getrockneten Schmelzprobe; REM x200

messer liegt bei einigen Nanometern. Damit ermöglichen rasterelektronenmikroskopische Messungen die Untersuchung von Strukturmerkmalen, die mit einem Lichtmikroskop nicht mehr wahrgenommen werden können. Rasterelektronenmikroskope haben zudem einen etwa um den Faktor 100 größeren Tiefenschärfebereich als Lichtmikroskope. Sie erzeugen Bilder, die einen hervorragenden dreidimensionalen Eindruck von

der Oberfläche vermitteln. Tatsächlich ist aber mit dem REM keine quantitative Höhenmessung möglich.

Die zu untersuchenden Proben müssen jedoch bestimmten Anforderungen genügen:

- Die Proben dürfen nicht ausgasen, da sonst das erforderliche Vakuum zerstört würde
- Die Probenoberfläche muss elektrisch leitend sein, damit Oberflächenladungen abgeführt werden können. Ansonsten führt der auftreffende Elektronenstrahl sehr schnell zu einer Aufladung der Probenoberfläche. Nichtleitende Proben können durch Bedampfen mit geeigneten Materialien (hier: Palladium) leitfähig gemacht werden (Ohnsorge & Holm 1973).

1.4.3 Transmissionselektronenmikroskopie

Die Transmissionselektronenmikroskopie erlaubt die Untersuchung von Strukturen im Inneren der Probe. Durch die geringe Wellenlänge des Elektronenstrahls kann mit Transmissionselektronenmikroskopen, wie auch bei Rasterelektronenmikroskopen, eine Auflösung von bis zu 100.000facher Vergrößerung erreicht werden. Während die Proben beim REM mit dem Elektronenstrahl abgerastert werden, werden sie im TEM durchstrahlt. Hierzu müssen jedoch ultradünne Schnitte der Proben angefertigt werden.

Für ein optimales Ergebnis sollten die Ultradünnschnitte ca. 60-70 nm dick sein. So können die Elektronen den Schnitt passieren, werden aber gleichzeitig von den Strukturen der Probe ausreichend gebeugt, um ein Bild entstehen zu lassen. Mit an die Schnitte gebundenen Schwermetallionen kann die Elektronenbeugung und damit der Kontrast verstärkt werden. Die elektronenmikroskopischen Bilder werden über eine im TEM eingebaute Kamera erfasst.

Für die Untersuchung der Morphologie einzelner Proben ist es wichtig, vollständige Schnittserien herzustellen, um eine dreidimensionale Struktur der Probe rekonstruieren zu können (www.zoosyst-berlin.de 2005).

1.4.4 Rastertunnelmikroskopie

Das Rastertunnelmikroskop verbindet ein extrem hohes Auflösungsvermögen mit der Möglichkeit, Oberflächenstrukturen zerstörungsfrei abzutasten. Im Unterschied zu konventionellen Mikroskopietechniken wird hierbei nicht eine Strahlung analysiert, die von der Probe reflektiert oder gestreut wird bzw. diese durchdringt, sondern vielmehr wird die Oberfläche des zu untersuchenden Objekts mit einer Sonde berührungslos abgetastet. Durch dieses Vorgehen ist das räumliche Auflösungsvermögen des Mikroskops nicht mehr durch die Wellenlänge der verwendeten Strahlung begrenzt, sondern es lassen sich extrem kleine Strukturen bis hin zu einzelnen Atomen sichtbar machen. Für die Entwicklung des Rastertunnelmikroskops erhielten Gerd Binnig und Heinrich Rohrer 1986 den Nobelpreis.

Bei der Messung wird eine sehr feine Metallspitze – im Idealfall bestehend aus nur einem Atom – dicht an die Probenoberfläche herangeführt. Obwohl sich beide Körper nicht berühren, können Elektronen aufgrund des quantenmechanischen Tunneleffekts den Abstand zwischen Probe und

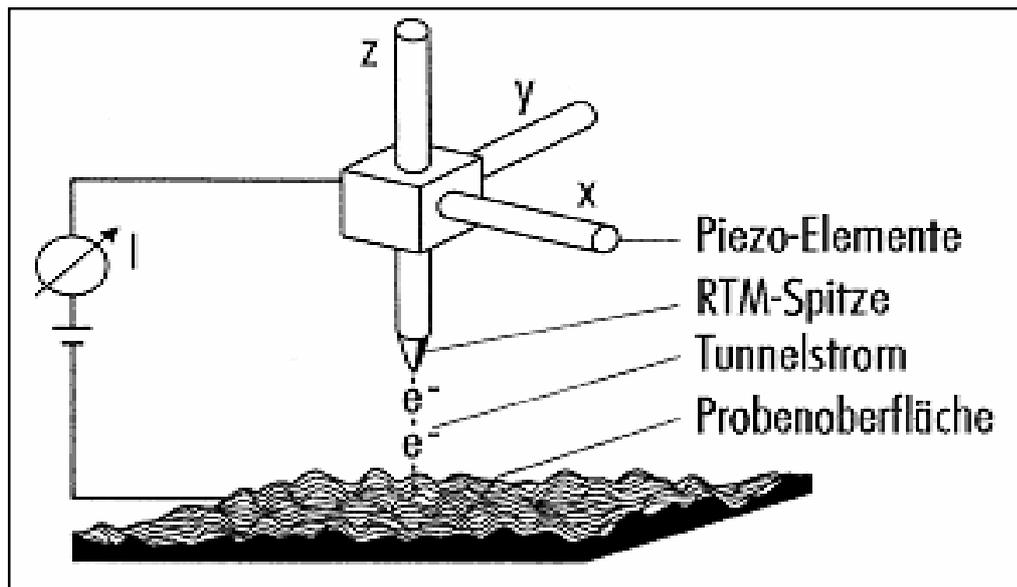


Abb. 5: Funktionsprinzip eines Rastertunnelmikroskops
(www.deutsches-museum.de 2005)

Metallspitze „überspringen“. Wird zwischen beiden Körpern eine Spannung angelegt, erhält diese Elektronenbewegung eine Vorzugsrichtung – ein Tunnelstrom beginnt zu fließen. Die Größe dieses Stromes hängt sowohl vom Abstand zwischen Metallspitze und Probe als auch von der Elektronendichte an der untersuchten Stelle ab.

Damit ein Tunnelstrom fließen kann, muss die Probenoberfläche elektrisch leitfähig sein, gegebenenfalls muss die Leitfähigkeit mittels Goldbedampfung sichergestellt werden. Gold hat eine sehr gleichmäßige Elektronenverteilung, d. h. die Elektronendichte an der Oberfläche ist näherungsweise konstant. Bei konstanter Elektronendichte hängt die Größe des Tunnelstroms nur noch vom Abstand zwischen Abtastspitze und Probe ab. In der Darstellung zeigen helle und dunkle Bereiche Erhöhungen bzw. Vertiefungen in der Goldoberfläche.

Das gesamte Bild der Oberfläche entsteht durch schrittweises „Abrastern“ der Probe. Hierfür muss die Sondenspitze hinreichend langsam und genau über die Probe gezogen werden. Für diese genaue Steuerung sind spezielle Bauteile erforderlich. Man verwendet hierzu Piezoelemente. Wird an einem Piezokristall (z.B. Quarz oder Turmalin) eine Spannung angelegt, so verformt sich dieser ein wenig. Die Größe der Verformung ist annähernd proportional zur angelegten Spannung. Auf diese Weise ist es ohne weiteres möglich, winzige Verschiebungen um Bruchteile eines Tausendstelmmillimeters zu bewirken bzw. diese exakt zu messen (Morris et al. 2001).

1.4.5 Rasterkraftmikroskopie

Die Rasterkraftmikroskopie (AFM – „atomic force microscopy“) ermöglicht hochauflösende Topographie-Messungen. Hierbei entstehen durch Abtasten der Probenoberflächen mit hochsensiblen Sensoren sehr detaillierte Bilder. Der wichtigste Teil des AFM ist daher die Tastspitze. Sie wird mit sehr kleiner, konstanter Auflagekraft über die Probenoberfläche geführt,

wobei es zu Wechselwirkungen zwischen den Atomen der sehr feinen Tastspitze und den Atomen der zu untersuchenden Oberfläche kommt. Die Tastspitze ist in der Regel aus Silikon oder Silikon-Nitriden gefertigt und hat ein extrem geformtes, hochsensibles Tastende. Sie ist das Herzstück des AFM und am vorderen Ende eines Cantilevers, der als Federarm mit sehr niedriger Federkonstante wirkt, befestigt.

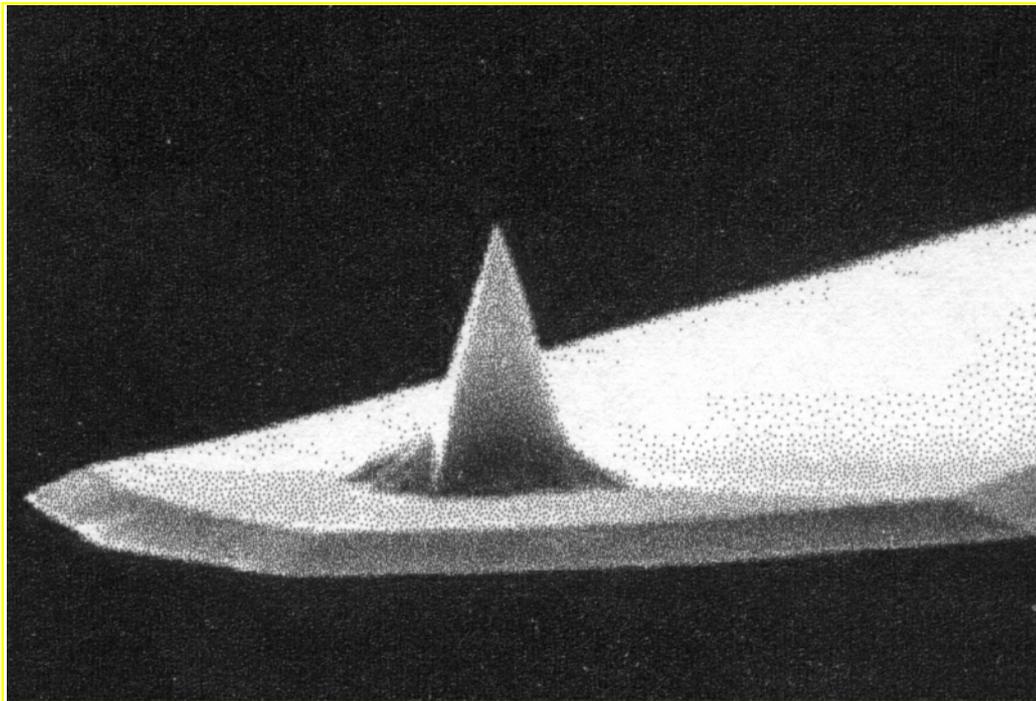


Abb. 6: Cantilever mit integrierter Silikon-Tastspitze des AFM-Sensors, (Pointprobe®, nanosensors, Neuchatel, Schweiz)

Die geringe Federkraftkonstante des Cantilevers erlaubt es dem AFM die Kraft zwischen Tastspitze und Probe mit großer Präzision zu bestimmen. Eine weitere wichtige Eigenschaft des AFM ist der Scan-Mechanismus. Dieser Mechanismus basiert auf dem piezoelektrischen Effekt. Der piezoelektrische Effekt ist die Entstehung einer Potentialdifferenz über entgegengesetzten Seiten verschiedener nicht-leitender Kristalle (piezoelektrische Kristalle) als Resultat des Anlegens einer Spannung und einer hohen Empfindlichkeit. Durch Piezostellelemente wird die zu untersuchen-

de Probe in x- und y-Richtung gescannt und der z-Abstand zwischen Tastspitze und Messobjekt eingestellt (Morris et al. 2001).

Eine weitere wichtige Eigenschaft des AFM ist der Aufzeichnungsmechanismus. Beim Abrastern der Probe wird die Tastspitze mit sehr kleiner Auflagekraft über die Oberfläche geführt. Die Änderung der Oberflächenhöhe führt zu einer Auslenkung der Tastspitze. Die Messung der Auslenkung geschieht über ein optisches Interferometer.

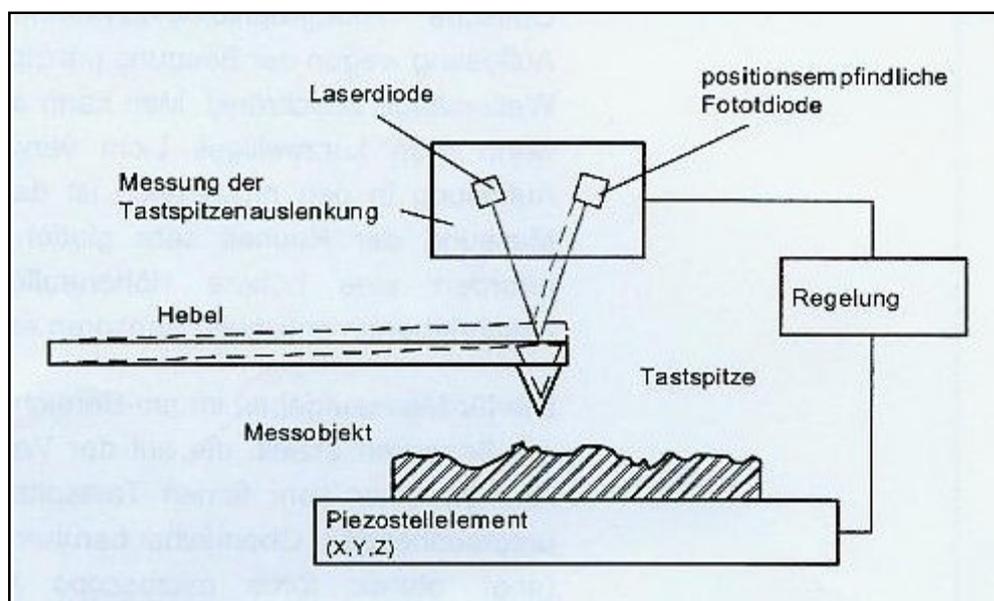


Abb. 7 : Funktionsprinzip der Rasterkraftmikroskopie (FRT, Bergisch-Gladbach, Deutschland)

Hierzu wird ein Laserstrahl auf den Cantilever gerichtet und in eine segmentierte Photodiode reflektiert (siehe Abb. 8). Die Differenzen der Photoströme der einzelnen Segmente geben die Verkippung des Lichtstrahls und damit den Verbiegungswinkel des Cantilevers wieder. Bewegt man nun die Spitze über die Oberfläche (oder bewegt man die Probe unter der Spitze weg), so bewegt sich mit ihr der Reflektor sowie der reflektierte Strahl auf und ab. Kleinste Unebenheiten der Probe werden durch Auf- und Abbewegungen der Spitze in Winkeländerungen des reflektierten Strahls und damit geänderte Lichtverhältnisse in den Segmenten der

Photodiode umgesetzt. Durch Projektion werden also geringste Niveauunterschiede aufgedeckt.

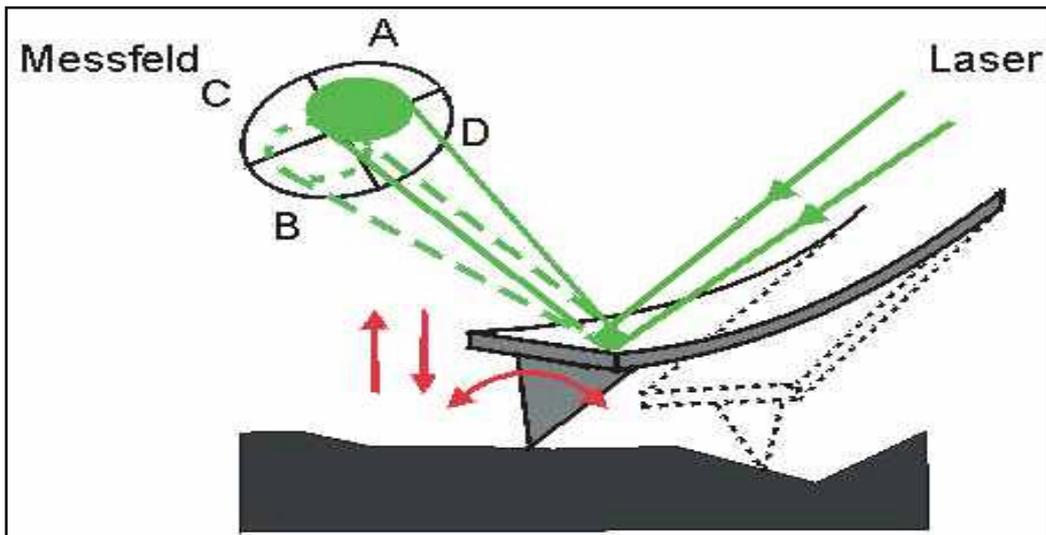


Abb. 8: Prinzip der Messung der Auslenkung beim Abrastern einer Probe durch das Rasterkraftmikroskop (www.zoologie-skript.de 2005)

Im Kontaktmodus wird die Auslenkung des Cantilevers, und folglich die Auflagekraft der Spitze auf die Probe, über eine rückgekoppelte Regelschleife konstant gehalten. Das Auslenkungssignal und die z-Position der Rastereinheit werden als Funktion der x- und y-Position auf der Probe als Bild dargestellt. Aus der z-Position ergibt sich die topographische Karte des untersuchten Probenbereiches.

Die Auflösung, die sich mit der Rasterkraftmikroskopie erreichen lässt, hängt sehr stark von den Eigenschaften der Probenoberfläche ab. Die Größe des Wechselwirkungsbereiches zwischen Spitze und Probe sowie die Reichweite der Wechselwirkung bestimmen das Auflösungsvermögen (Morris et al. 2001, Tschernin 2003).

Mit dem AFM ist jedoch in jedem Fall eine Auflösung zu erreichen, die bislang kein anderer Sensor erreichen kann. Somit sind sehr genaue Topographiemessungen – auch in der Höhe – möglich. Zudem ist es möglich, biologische Proben zu untersuchen, die keiner aufwendigen Vorbehandlung zu unterziehen sind, da dieses Messverfahren sowohl auf leitenden als auch auf nichtleitenden Oberflächen arbeitet.

Ergänzend zum AFM kann ein chromatischer Weißlichtsensor (CWL) eingesetzt werden. In Abb. 9 ist der Effekt der chromatischen Abberation, der in der Photographie und der optischen Messtechnik normalerweise sehr störend ist und aufwendige Linsensysteme zur Korrektur erfordert, dargestellt. Im Messkopf des chromatisch kodierenden Sensors ermöglicht dieser Effekt dagegen hochaufgelöste Topographiemessungen. Der chromatische Sensor vermisst mit hoher Auflösung und Genauigkeit berührungslos die Oberfläche eines Messobjektes; das Grundprinzip ist eine punktuelle Abstandsmessung mit Weißlicht (Abb. 9).

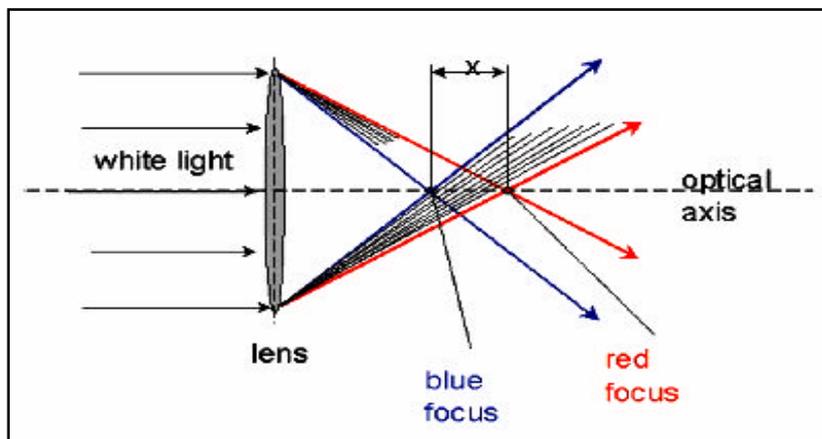


Abb. 9: Prinzip der Weißlichtmessung (FRT, Bergisch Gladbach, Deutschland)

Weißes Licht wird mit einem Messkopf mit stark wellenlängenabhängiger Brennweite auf die Oberfläche fokussiert. Das Spektrum des an der Oberfläche gestreuten Lichts zeigt im Spektrometer einen Peak, aus dessen Wellenlänge die Höhe auf der Probe bestimmt wird. Der Sensor wird für hoch aufgelöste und genaue Profil-, Topographie- und Rauheitsmessungen eingesetzt.

Der MicroGlider® (FRT GmbH, Bergisch-Gladbach, Deutschland) kombiniert beide Messmethoden (Abb. 10). Dies ermöglicht sowohl die Untersuchung großer Bereiche mit geringerer Auflösung als auch die kleinerer Bereiche mit höchster Auflösung. Das Gerät arbeitet mit einem chromatischen Weißlichtsensor in Kombination mit einem AFM, beide fest montiert. Ohne die Messanlage zu wechseln, kann die komplette Probe mit

dem optischen Sensor gemessen werden. Daneben erlaubt das AFM Untersuchungen in nm-Auflösung.



Abb. 10: Kombination der Messköpfe beim FRT MicroGlider®

1.5 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist die Suche nach einem geeigneten hochauflösenden Darstellungsverfahren für Anlagerungsmechanismen von Primärkoloniatoren an die Zahnoberfläche unter Nativ-Bedingungen.

Am Beispiel von *S. mutans* soll eine Methode zum Aufbau eines Modellsystems entwickelt werden, in dem die Adhäsionsprozesse möglichst real beobachtet werden können.

Vergleichend zur Rasterelektronenmikroskopie wird die Technologie der Rasterkraftmikroskopie angewandt. Hierbei soll ermittelt werden, ob es möglich ist, die Adhäsion der Bakterien an der pellicelbeschichteten Schmelzoberfläche ohne vorherige Trocknungsprozesse darzustellen.

2 Material und Methode

Standardisierte Schmelzoberflächen (hochrein, plan, Grundstruktur nicht verändert) sollen unter definierten Bedingungen mit einer Pellikelstruktur beschichtet werden, auf welcher anschließend eine Primärkolonisation mit *S. mutans* herbeigeführt wird.

2.1 Herstellung von standardisierten Schmelzproben

Aus einer Reihe von extrahierten, feucht gelagerten Zähnen mit gut erhaltenen Kronen wurden zur Erstellung der Schmelzproben Zähne herausgesucht, an denen mindestens eine der Flächen kariesfrei und nach Möglichkeit flach war. Diese wurden unter fließendem Wasser mit einem Schleifsystem (HSS 88, Wassermann-Dental-Maschinen GmbH, Hamburg, Deutschland) zu kleinen Quadern (ca. 3 x 3 x 1,5 mm) geformt, wobei bei jedem Zahn die flache, kariesfreie Schmelzoberfläche nicht bearbeitet wurde. Die intakte Schmelzoberfläche (3 x 3 mm) diente im späteren Versuch der Simulation der Zahnoberfläche.

Eine flexible Silikonform (Flexitime® Correct Flow, Heraeus Kulzer, Dormagen, Deutschland) diente als Vorgabe für den Kunststoff, in den die Schmelzproben zur besseren Handhabung eingebettet wurden. Diese Formen wurden mit Hilfe eines sechseckigen Formkörpers (9 mm in der Diagonalen, 5 mm hoch) hergestellt. Zur Einbettung der Schmelzproben wurde der Kunststoff (Arabesk Flow®, VOCO GmbH, Cuxhaven, Deutschland) zunächst bis zur Hälfte der Form eingespritzt und mit einer Halogen-Lampe (Kerr Hawe, Bioggio, Schweiz) 20 Sekunden gehärtet. Anschließend konnte weiterer Kunststoff bis zum oberen Rand der Form eingefüllt und der Schmelzquader leicht eingedrückt werden, so dass die unbehandelte Schmelzoberfläche ca. 0,5 – 1 mm über den Kunststoff hinausragte. Mit der Halogen-Lampe (Kerr Hawe, Bioggio, Schweiz) wurde der Kunststoff erneut für 30 s ausgehärtet. Nach dem Entfernen aus der Form wurde wiederum von oben und unten jeweils für 20 s mit der Lampe nachgehärtet.

Die Proben konnten nun in eine aus Technovit® (Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland) bestehende Negativ-Form gesetzt werden. Diese wies die Maße der Silikonform auf und diente als Haltevorrichtung der Schmelzprobekörper in der Mikroschleifeinheit. Nach dem Einspannen der Proben in die Mikroschleifeinheit (EXACT Apparatebau GmbH, Norderstedt, Deutschland) konnten diese im Nassschleifverfahren grob vorgepoliert werden. Dafür wurden die Proben für 1½ Minuten mit Schleifpapier der Körnung 1200 (Struers® GmbH, Willich, Deutschland) bearbeitet.

Wurden die Proben nicht sofort benötigt, wurden sie nach diesem Präparationsschritt für die Bedarfsentnahme in 0,9%iger Kochsalzlösung bei ca. 4°C aufbewahrt. Um die Keimzahl in der Kochsalzlösung gering zu halten, wurde Natriumacid (0,01%) zugegeben.



Abb. 11: Standardisierte Schmelzprobe für die Versuchsreihen: Kariesfreier Schmelz eingebettet in Kunststoff, nach dem ersten Schleifvorgang

Kurz vor dem eigentlichen Versuchsbeginn wurde die benötigte Anzahl der grob vorgeschliffenen Proben für den Feinschliff aus dem Aufbewahrungsgefäß entnommen. Auch hierbei wurden die Proben wie auch schon beim Grob-Schliff mit der Negativform in die Mikroschleifeinheit (EXACT Apparatebau GmbH, Willich, Deutschland) eingespannt, dieses Mal jedoch mit

Schleifpapier der Körnung 4000 für 4 Minuten unter ständigem Wasserzufluss poliert.

Die so polierten Proben wurden in sterilem Aqua dest. gesammelt und anschließend in einem mit destilliertem Wasser gefüllten Ultraschall-Bad (Compact high-performance ultrasonic cleaning system, L&R[®] Mfg. Co. Kearny, USA) für 5 min gereinigt. Danach wurden die Proben unter der biologischen Werkbank mit jeweils 1000 µl Aqua dest. vorsichtig abgespült und in eine sterile Petri-Schale zum Trocknen gelegt. Die Abdeckung der Petri-Schale erfolgte mit einem sterilen Filter-Papier. Die Trocknungsphase unter der sterilen Werkbank betrug ca. 20 h.

2.2 Beschichtung der Schmelzproben mit einer Pellikel

Untersuchungen zu dieser Arbeit hatten gezeigt, dass die günstigsten Ergebnisse bezüglich der Pellikelbildung mit steril-filtrierte Speichel zu erzielen waren (Hartmann et al 2005). Es wurde Naturspeichel verwendet.

2.2.1 Steril-Filtrieren von Speichel

Von einem gesunden Individuum wurde ca. 2 h nach der letzten Mahlzeit stimulierter Gesamtspeichel gesammelt. Zur Speichelstimulation wurde auf einem Paraffin-Block gekaut, der so erzeugte Speichel in einem Becher aufgefangen und gesammelt. Anschließend wurde der Speichel durch einen Papierfilter (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland) vorfiltriert. In einem zweiten Schritt wurde der Speichel durch Filtereinheiten mit 0,8 µm Porengröße (FP 30/0,8CA, Schleicher und Schuell, Dassel, Deutschland) gepresst und gesammelt.

Der vorbehandelte Speichel wurde anschließend unter der biologischen Werkbank mittels steriler Einmalspritze durch sterile Filtereinheiten mit einer Porengröße von 0,45 µm (Syringe Filter, SFCA, Nalge Company, Rochester New York, USA) gefiltert und in einem verschließbaren, zuvor sterilisierten Kunststoffgefäß aufgefangen. Aus vorangegangenen Studien war bekannt, dass ab einer Filterporengröße von 0,45 µm keine Mikroorganismen

im Speichel mehr nachweisbar waren, der Speichel also als steril gelten kann.

Für den Versuch werden insgesamt 40 ml dieses steril-filtrierte Speichels benötigt. Die Aufbewahrung bis zum Versuchsbeginn (max. 24 h) erfolgte im Kühlschrank bei 4°C.

2.2.2 Pellikelbeschichtung der Schmelzproben

Ein größeres Glasgefäß (Durchmesser ca. 7 cm, Fassungsvermögen, 250 ml, J. Weck GmbH & Co. KG, Wehr, Deutschland) wurde mit 20 ml des steril-filtrierte Speichels befüllt und unter der biologischen Werkbank mit 15 vorbereiteten und getrockneten Schmelzproben bestückt. Anschließend wurde das Glas mit den Schmelzproben in ein 37°C warmes Schüttelbad (Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland) gesetzt, damit sich



Abb. 12: Versuchsaufbau zur Pellikelbeschichtung: Schmelzproben in steril-filtrierte Speichel im Schüttelbad

unter möglichst realen Bedingungen eine Pellikelformation bilden konnte.

Nach 6 h wurden die Schmelzproben aus dem Speichelbad entnommen, vorsichtig mit 500 µl Aqua dest. unter der biologischen Werkbank abgespült und kurz auf einem sterilen Filterpapier zum Trocknen gelegt.

Die einzelnen Arbeitsschritte des Versuchsaufbaus für die Pellikelbeschichtung der Schmelzproben wurden in vorangegangenen Untersuchungen entwickelt und überprüft.

2.3 Kolonisation der Schmelzproben mit *S. mutans*

2.3.1 Grundlagen

2.3.1.1 Bakterielleres Wachstum

Induziert man bakterielles Wachstum in einem geschlossenen System (Röhrchen, sog. „Batch-Kultur“) erhält man eine für diese Zellpopulation typische Wachstumskurve (Madigan et al. 2001). Die Bedingungen in diesem System ändern sich dauernd: Die Nährstoffkonzentration sinkt, die Zellbiomasse nimmt dagegen zu (Fritsche 2002).

Nach Überimpfung der Mikroorganismen in frisches Medium beginnt deren Wachstum nicht sofort. Es kommt zunächst zu einer Anpassung an das Milieu - die sog. Anlauf- bzw. lag-Phase [englisch: to lag = anpassen] (Madigan et al. 2001, Fritsche 2002).

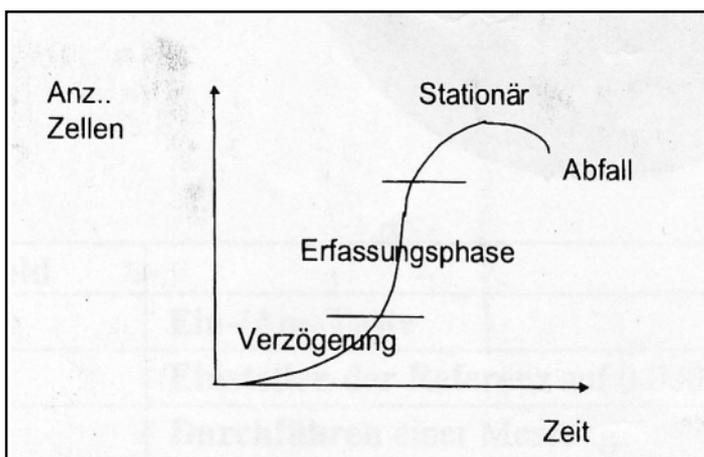


Abb. 13: Typische Wachstumskurve einer Bakterienkolonie (nach: Biochrome, Cambridge, England)

In dieser Phase synthetisieren die Zellen Ribosomen und Enzyme, die für die Verwertung der vorliegenden Nährstoffe im beimpften Nährmedium notwendig sind. Die Dauer ist abhängig vom Alter der Population der eingeimpften Zellen und der Zusammensetzung des Kulturmediums (Fritsche 2002). Da

jedoch in der vorliegenden Studie aus einer aktiven Streptokokken-Kultur in dasselbe Nährmedium überimpft wurde, entfällt die Anlaufphase und es kam direkt zu einer kurzen Beschleunigungsphase. Hieran schließt sich die Phase des exponentiellen Wachstums an. Die Zellzahl verdoppelt sich in regelmäßigen Abständen. Die Wachstumsrate bleibt so lange konstant bis ein essentieller Nährstoff ins Minimum gerät (Munk 2002, Fritsche 2002). Die Geschwindigkeit des exponentiellen Wachstums variiert stark. Sie wird durch Temperatur und Zusammensetzung des Nährmediums sowie von genetischen Merkmalen der Mikroorganismen beeinflusst (Madigan et al. 2001). Bei schnell wachsenden Bakterien und günstigen Temperaturen tritt die Limitation der exponentiellen Phase innerhalb eines Tages ein. Durch Nährstoffverbrauch und Anhäufung von hemmenden Stoffwechselprodukten geht das bakterielle Wachstum in die stationäre Phase über (Fritsche 2002). Das Wachstum der Population wird begrenzt: Einige Mikroorganismen sterben ab, manche Mikroorganismen können während der stationären Phase langsam weiter wachsen. Dadurch befinden sich Zelltod und langsamer Zuwachs im Gleichgewicht, die Zellzahl bleibt gleich (Madigan et al. 2001, Fritsche 2002). Bei Inkubation über die stationäre Phase hinaus verschiebt sich dieses Gleichgewicht zu Gunsten der absterbenden Zellen. In der Wachstumskurve lässt sich die Absterbephase ausmachen. Das Absterben der Mikroorganismen ist häufig mit Autolyse verbunden und verläuft ebenfalls exponentiell. Jedoch ist die Geschwindigkeit hierbei viel geringer als beim exponentiellen Wachstum (Madigan et al. 2001).

2.3.1.2 Prinzip der Trübungsmessung/Zelldichtemessung

Um Wachstumsraten einer Bakterienkultur zu erfassen, kann man sich der Trübungsmessung bedienen. Eine Trübung von Bakteriensuspensionen entsteht, weil Zellen das Licht, das durch die Suspension fällt, streuen. Diese Streuung des Lichts fällt umso stärker aus, je mehr Zellen sich in der Suspension befinden. Durch das Wachstum der Bakterien in ihrem Nährmedium und die dadurch entstehende Zellzunahme kommt es also zu einer Ein-

trübung des Nährmediums. Bei der Messung mit einem Spektralphotometer, wie es unser Zelldichtemessgerät darstellt, wird die Menge an Licht gemessen, die nach dem Durchleiten durch die Probe austritt ohne gestreut zu werden. Bei einzelligen Mikroorganismen sind die gemessenen Werte proportional zur Zellmasse und somit auch zur Zellzahl. Durch das Anlegen einer Eichkurve können für jeden Mikroorganismus individuell von den gemessenen Dichtewerten auf Zellmasse oder Zellzahl Rückschlüsse gezogen werden (Madigan et al. 2001).

Da bei der Trübungs- bzw. Dichtemessung nicht in das bakterielle Wachstum eingegriffen wird, lässt sich die Wachstumskurve mit einer relativ hohen Genauigkeit erstellen.

2.3.2 Erstellung einer Wachstumskurve von *S. mutans*

2.3.2.1 Herstellung des Nährmediums

In einem Glasgefäß wurde 1 l Aqua dest. auf 60°C erwärmt. In dieser vorgewärmten Flüssigkeit wurden 17,5 g eines Pulvers zur Herstellung der Antibiotika-Nachweis-Bouillon Nr. 3 (CH.B.-3014367, CM287, Fa. Oxoid LTD, Basingstoke, Hampshire, England) vollständig gelöst. Das so hergestellte AB-

- | |
|---|
| <p>à Antibiotika-Nachweis-Bouillon Nr. 3
(AB-Medium III)
typische Zusammensetzung in g/l:
(pH 7,9 ±0,2)</p> <ul style="list-style-type: none">• Fleischpepton 5,0• Hefeextrakt 1,5• Fleischextrakt 'Lab-Lemco' 1,5• Glucose 1,0• Natriumchlorid 3,5• Dikaliumhydrogenphosphat 3,68 |
|---|

Abb. 14: Zusammensetzung des Nährmediums (AB-Medium III)

Medium wird anschließend in dem Glasgefäß für 15 Minuten bei 121°C autoklaviert (Varioklav Dampfsterilisator, H+P Labortechnik GmbH, Ober-schleißheim, Deutschland). Alternativ kann jedoch auch eine definierte Menge direkt auf Glasröhrchen verteilt und in der Folge wie oben autoklaviert werden.

2.3.2.2 Herstellung einer Streptokokkensuspension zur Erstellung der bakteriellen Wachstumskurve

Die von der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland) gelieferten Streptokokken des Stammes Clarke 1924 DSM 20523 wurden auf eine Agarplatte überimpft und im Brutschrank bei 37°C bebrütet. Nach der Koloniebildung wurden einzelne Streptokokkenkolonien mit der Impföse auf eine weitere Agarplatte übertragen und wiederum bebrütet. In der Folge konnten die Streptokokken in ein Glasröhrchen mit Nährmedium (AB-Medium III, Oxoid LTD, Basingstoke, Hampshire, England) überimpft werden, welches anschließend in einem Schüttelbad (Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland) bei einer konstanten Temperatur von 37°C bebrütet wurde. Von dieser Lösung wurden nun kontinuierlich ca. alle 2 Tage (montags, mittwochs, freitags) 50 µl Streptokokkensuspension entnommen und in ein steriles Glasröhrchen mit 5 ml frischem Nährmedium überimpft.

Aufgrund von Voruntersuchungen wurde eine optimale Bebrütungsdauer der Streptokokkensuspension in frischer Nährlösung vor den eigentlichen Versuchen von 16,5 h bei 37°C angenommen.

2.3.2.3 Erstellung der Wachstumskurve

Unter sterilen Bedingungen (biologische Werkbank) wurden 6 Reagenzgläser mit jeweils 5 ml der autoklavierten Nährlösung (AB-Medium III, Oxoid LTD,

Basingstoke, Hampshire, England) befüllt und beschriftet [Röhrchen 0: Referenz, Röhrchen I-V: zu beimpfende Röhrchen]. Um optimale Ausgangsbedingungen zu schaffen, kamen zunächst alle befüllten Röhrchen für 5 Minuten bei 37°C in ein Schüttelbad (Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland). Anschließend wurden die Röhrchen I-V unter der biologischen

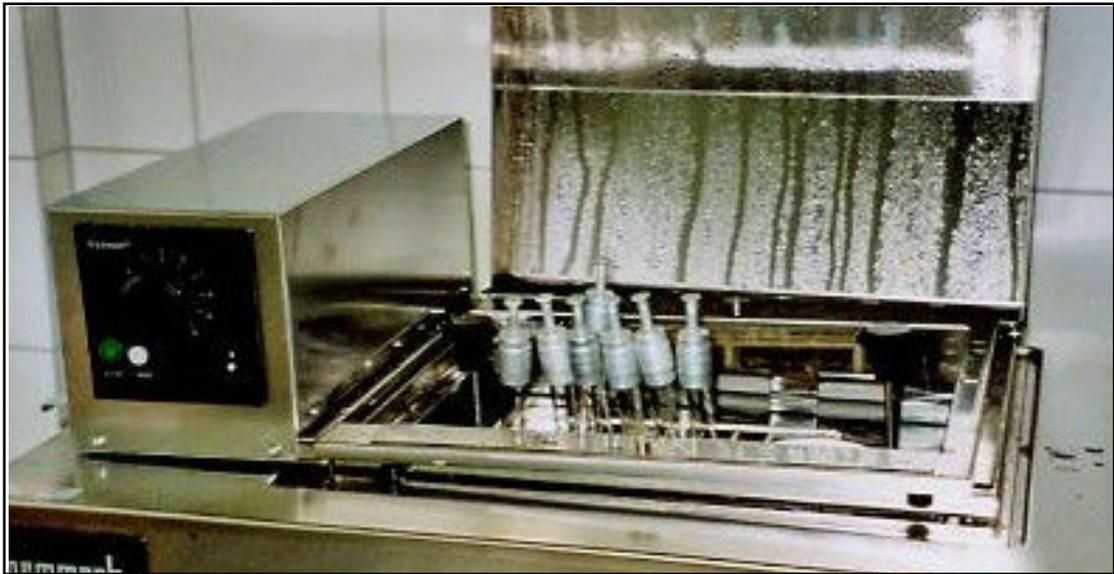


Abb. 15: Versuchsaufbau zur Erstellung einer bakteriellen Wachstumskurve: die Reagenzgläser enthalten mit Streptokokken beimpftes Nährmedium; für bessere Wachstumsbedingungen stehen sie im Schüttelbad bei 37°C

Werkbank mit jeweils 50 µl Streptokokkensuspension versetzt, die Glasränder über einem Bunsenbrenner abgeflammt, verschlossen und der Inhalt durch vorsichtiges Schütteln vermischt.

Zur Beurteilung der Ausgangszelldichte wurden alle Reagenz-Gläser bei 600 nm in einem Zelldichtemessgerät (WPA CO 8000, Biochrom, Cambridge, England) untersucht (Abb. 16). Nach jeder Messung wurden die Proben wieder in das Schüttelbad gestellt und kontinuierlich bei 37°C weiter bebrütet. In der Folge wurde diese Messung, einschließlich der Referenz, stündlich über einen Zeitraum von 30 Stunden wiederholt, die Werte aufgenommen (Tab. 1) und ein Diagramm (Abb. 44) erstellt. Vor jeder Messung wurden die Proben-Röhrchen mit einem weichen Zellstofftuch vorsichtig trocken gewischt, um Messfehler durch Wassertropfen zu vermeiden.

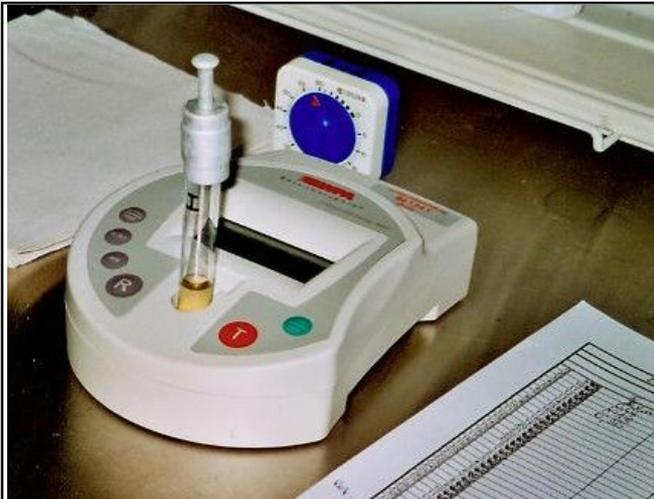


Abb. 16: Durchführungsprinzip der Zelldichtemessung der beimpften Nährlösung

Zur Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wurde der Versuch mit veränderten Ausgangskonzentrationen wiederholt (Versuch 2):

Hierfür wurden vor Versuchsbeginn 18 möglichst gleich dicke und unverkratzte Glasröhrchen mit jeweils 5 ml AB-Medium III (Oxoid LTD, Basingstoke, Hampshire, England) befüllt und alles gemeinsam im Dampfsterilisator (Varioklav Dampfsterilisator, H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim, Deutschland) autoklaviert.

Im Anschluss daran wurden unter der biologischen Werkbank jeweils 5 der vorbereiteten Glasröhrchen mit Streptokokken-Suspensionen von 25 μ l, 50 μ l und 100 μ l beimpft und beschriftet. Somit konnte das Wachstumsverhalten auch bei veränderten Ausgangskonzentrationen im AB-Medium beobachtet werden.

Da die verwendete Bakterienkultur schon seit einiger Zeit in Verwendung war bzw. schon länger immer wieder überimpft wurde, wurden zum Vergleich 3 der vorbereiteten Glasröhrchen mit 50 μ l einer frischen Bakterienkultur beimpft. Diese Streptokokken sind am Vortag nach dem Ernten von einer Agarplatte direkt in Nährlösung (AB-Medium III, Oxoid LTD, Basingstoke, Hampshire, Großbritannien) überführt und ebenfalls 16,5 Stunden bebrütet worden.

Die Zelldichtemessung verlief wie oben beschrieben (Tab. 2).

2.3.3 Ergebnisse und Rückschlüsse für den weiteren Studienverlauf

Um eine bessere Vergleichbarkeit der Werte zu erzielen, wurden diese für die Auswertungen der beiden Versuchsreihen gemittelt (Tab. 3) und die gemittelten Werte in einem Diagramm dargestellt (Abb. 17).

Die in einem Diagramm dargestellten Dichtewerte (Abb. 17) zeigen in allen Versuchsreihen das typische Bild einer bakteriellen Wachstumskurve mit minimaler Beschleunigungsphase, exponentieller Wachstumsphase, kurzer Plateauphase und schließlich einer Absterbephase. Eine Anlaufphase lässt sich nicht ausmachen. Dieses war jedoch zu erwarten, da die verwendeten Streptokokken aus einer aktiven Kultur in das gleiche Nährmedium überführt worden sind. Somit musste keine Anpassung an veränderte Kulturbedingungen stattfinden.

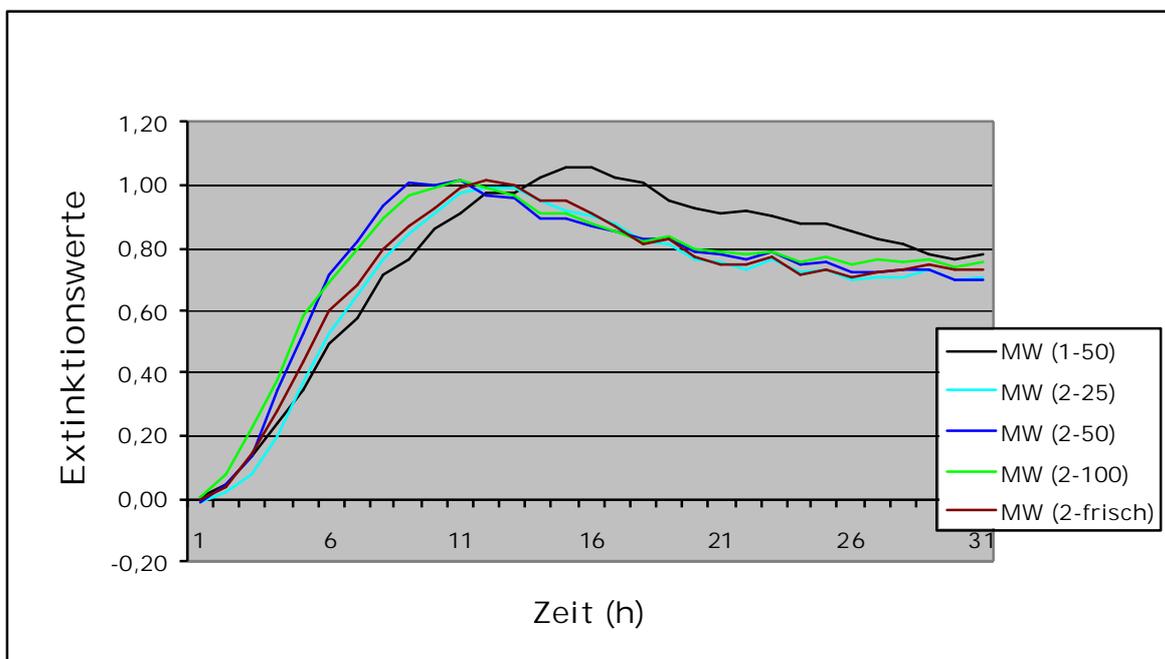


Abb. 17: ermittelte Wachstumskurve von *S. mutans*; erstellt aus den gemittelten Daten aller Zelldichtemessungen aus Versuch 1 und 2

Die Beschleunigungsphase ist in allen Versuchsreihen sehr kurz und beträgt im Mittel bis zu 2 Stunden. Im Anschluss daran steigen die gemessenen Extinktionswerte sprunghaft an bis sie ca. 9 - 15 Stunden nach der Beimpfung ihren höchsten Wert erreicht haben. Während dieser Phase findet

das – für uns relevante - exponentielle Wachstum statt. Die Kurve hat in dieser Phase ihren steilsten Verlauf. Die Plateauphase ist in allen Versuchsreihen nur sehr kurz auszumachen, da die Werte im Anschluss an den schnellen Anstieg fast direkt auch wieder abfallen. Der Werteabfall in der Absterbephase verläuft jedoch wesentlich langsamer als der Anstieg während des exponentiellen Wachstums. Das kann damit zusammenhängen, dass die Trübung auch durch Anhäufung bakterieller Stoffwechselprodukte oder durch die abgestorbenen Zellen selbst beeinträchtigt wird. Die Wachstumskurve wird zum Ende der Messungen also wieder flacher.

Exponentiell wachsende Zellen sind in der Regel am gesündesten und sollten daher für Untersuchungen auch aus dieser Phase entnommen werden (Madigan et al. 2001). Aus diesem Grund wurden für die weiteren Versuche die Bakterien nach 7,5 Stunden entnommen. Zu diesem Zeitpunkt befanden sich die Streptokokken – wie in Abb. 18 ersichtlich – im letzten Drittel der exponentiellen Phase. Bei der Inokulation wurden somit möglichst viele aktive und gesunde Zellen überimpft, so dass optimale Bedingungen für den weiteren Versuchsaufbau geschaffen werden können.

2.3.4 Bakterielle Kontamination der pellicelbeschichteten Schmelzproben

Zunächst wurden zwei mit 5 ml AB-Medium III (Oxoid LTD., Basingstoke, Hampshire, England) gefüllte und autoklavierte Glasröhrchen unter der sterilen Werkbank mit jeweils 50 µl Streptokokken-Suspension beimpft und bei 37°C im Schüttelbad (Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland) für 7,5 h bebrütet.

Im Anschluss daran wurde die bebrütete Bakteriensuspension unter der biologischen Werkbank in ein sterilisiertes Zentrifugenröhrchen umgefüllt und zentrifugiert. Daraufhin wurde – ebenfalls unter sterilen Bedingungen - der Überschuss vorsichtig abpipettiert, das Röhrchen mit 5 ml Tris-Puffer zum Waschen aufgefüllt und mittels 1000 µl-Pipette vorsichtig hoch- und runterpipettiert bis die Flüssigkeit einheitlich trüb war. Dieser Vorgang wurde nach erneutem Zentrifugieren wiederholt. Abschließend wurde noch ein-

mal zentrifugiert und der Überschuss abpipettiert. Daraufhin wurde dem Bakterienpellet 5 ml frischer steril-filtrierter Speichel zugegeben. Damit sich Bakterien und Speichel gut durchmischen, wurde auch hier noch einmal vorsichtig durchpipettiert.

Die oben genannten Arbeitsschritte zur Erstellung der Streptokokkensuspension sollten mit den unter 2.2.2 beschriebenen Arbeitsschritten so koordiniert werden, dass die Produkte im Folgenden zeitgleich weiterverarbeitet werden konnten. Zu den 7,5 h Bebrütungsdauer der Streptokokken sollten zusätzlich ca. 30 Minuten für das Herauswaschen der Streptokokken aus dem Nährmedium eingeplant werden. Die Schmelzproben sollten zum Zeitpunkt der bakteriellen Kontamination ca. 6 h in steril-filtrierte Speichel im Schüttelbad verbracht haben, damit sich eine Pellicel ausbilden kann.

Nachdem die gewaschenen Streptokokken mit ca. 5 ml des frischen, steril-filtrierte Speichels vermischt worden sind, wurden die restlichen 15 ml des frischen, steril-filtrierte Speichels in ein sterilisiertes Glasgefäß (Sturzglas, ¼ l, J. Weck GmbH & Co. KG, Wehr, Deutschland) gegeben. Das Speichel-Streptokokken-Gemisch wurde hinzugefügt und durch leichtes Schütteln mit dem Speichel vermischt. Anschließend konnten die leicht angetrockneten Schmelzproben hinein gegeben und alles mit dem Deckel einer Petri-Schale abgedeckt wieder in das 37°C warme Schüttelbad gegeben werden.

Nach einer festgelegten Inkubationszeit konnten die Proben aus dem Speichelbad entnommen und untersucht werden.

Um für die aufwendige Untersuchung mit dem AFM optimale Bedingungen zu schaffen, wurden diese Schritte vorab mehrfach mit unterschiedlichen Inkubationszeiten durchgeführt und nach einer Trocknungsdauer von mind. 20 h zunächst mit dem REM untersucht.

Hierzu erfolgte die Entnahme der Proben aus dem Speichelbad nach 1 und 5 h, anschließend wurden sie in einer Petri-Schale unter der biologischen Werkbank zum Trocknen abgelegt und für den Trocknungsvorgang mit einem sterilen Filterpapier abgedeckt.

2.4 Darstellung mit dem Rasterelektronenmikroskop

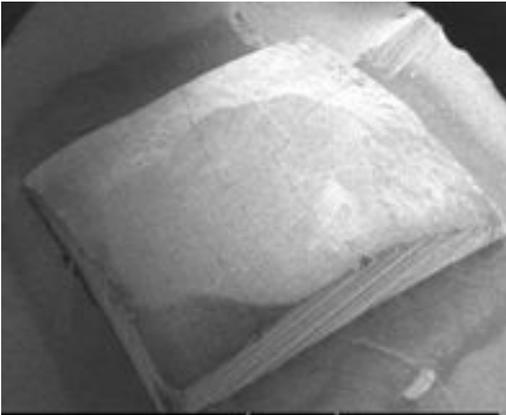


Abb. 18: Schmelzprobe unter dem Rasterelektronenmikroskop; REM x20

Zur Vorbereitung der Schmelzproben für die Raster-Elektronen-Mikroskopie sollten diese im Anschluss an die Versuche zunächst ca. 20 h, besser 24 h, unter der biologischen Werkbank trocknen, ehe sie – ebenfalls unter sterilen Bedingungen – mit einer doppelseitigen Klebefolie auf Probenteller (PLANO GmbH, Wetzlar, Deutschland) geklebt wurden. Da die Schmelzproben im Durchmesser relativ gering sind und um bei der späteren Untersuchung mit dem REM Zeit zu sparen, konnten 2 - 3 Schmelzproben der gleichen Versuchsgruppe auf einen Teller geklebt werden. Die Probenteller wurden schließlich zur Verbesserung der Leitfähigkeit mit einem Streifen Leit C[®] (PLANO GmbH, Wetzlar, Deutschland) beschickt, der jeweils von der Probe bis zum Tellerrand reichte. Anschließend wurden die beklebten Probenteller mit Palladium (BOC Ltd, Crawley, Sussex, England) gesputtert, um sie dann unter dem Rasterelektronenmikroskop (XL Series, Philips, Eindhoven, Niederlande) begutachten zu können. Die elektronenmikroskopischen Bilder wurden mit einem Winkel von 40° aufgenommen. Dabei wurden repräsentative Abschnitte der Proben in der Regel in den Vergrößerungen x200, x2000, x3500 und x6000 gespeichert. In einigen Fällen wurden auch Vergrößerungen von x500, x1000 bzw. x12000 angefertigt, um Details umfassender beurteilen zu können.

2.4.1 Auswertung der ersten Versuchsreihen und Rückschlüsse auf den weiteren Studienverlauf

Für die bakterielle Kontamination der Schmelzproben wurden jeweils 5 Schmelzproben vorbereitet und entsprechend den Vorgaben 1 bzw. 5 h der Streptokokkensuspension ausgesetzt.

Der Vergleich der Proben nach einstündiger Speichel- und Bakterienkontamination bei 3500facher Vergrößerung (Abb. 19, 20 und 45) zeigt deutlich die Schleifspuren der Vorbereitung. Darüber hinaus ist eine Beschichtung erkennbar, die sich eher inhomogen präsentiert. Es scheint, als sei ein vorher homogener Überzug eingerissen und hätte sich daraufhin zusammengezogen.

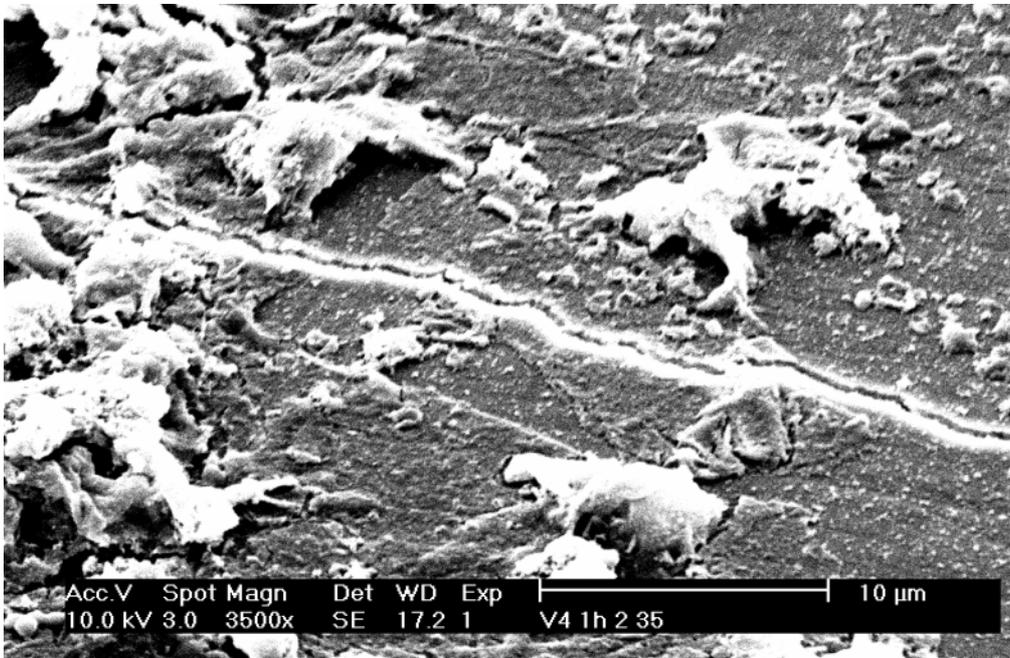


Abb. 19:

Pellikelbeschichtete Schmelzprobe nach 5 h Pellikelbildung im Speichelbad und anschließender bakterieller Kontamination in der Streptokokkensuspension für 1 h, es zeigt sich ein eher inhomogener Überzug der Schmelzoberfläche, Streptokokken lassen sich nicht definitiv ausmachen;

Probe 2, REM x3500

In Abb. 20 erkennt man darüber hinaus eine kleine Anzahl kugelförmiger Gebilde.

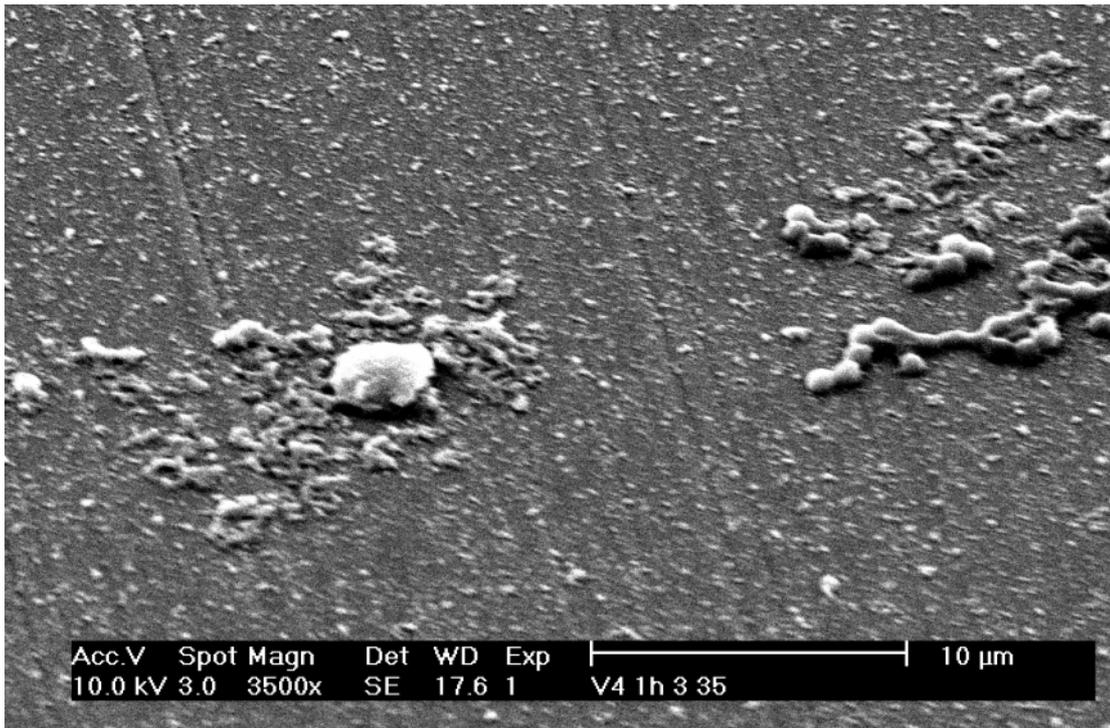


Abb. 20:

Pellikelbeschichtete Schmelzprobe nach 5 h Pellikelbildung im Speichelbad und anschließender bakterieller Kontamination in der Streptokokkensuspension für 1 h, die Schmelzoberfläche ist von einer feingranulierten Schicht bedeckt, darüber hinaus liegen ihr kugelförmige Gebilde auf, die die Form und Größe von Streptokokkus mutans aufweisen; Probe 3, REM x3500

Bei den 5 h-Proben sind auf jeder Probe deutliche Auflagerungen zu erkennen (Abb. 21 und 46). Diese zeigen sich als kugelförmige Gebilde von ca. 0,5 – 1 µm Größe in kleineren Anhäufungen. Sie haben jedoch von Probe zu Probe ein unterschiedliches Aussehen. Man sieht sie konfluiert (Abb. 21 und 46 a, b, c und e), im Anschluss an zellarme Schichtreste (Abb. 46 a) oder aber auch in einem Fall als kleine flache Plättchen (Abb. 46 d). Auf der Schmelzoberfläche lassen sich teilweise dunkle Flecken erkennen, die jedoch nicht größer als die Auflagerungen selbst sind.



Abb. 21:

Pellikelbeschichtete Schmelzprobe nach 5 h Pellikelbildung im Speichelbad und anschließender bakterieller Kontamination mit Streptokokkensuspension für 5 h, die Schmelzoberfläche ist mit einer feingranulierten Schicht bedeckt auf der kugelige Zellen auflagern, Form und Größe der Zellen lassen auf die Anlagerung von *S. mutans* schließen; Probe 5, REM, 3500x

Größe und Form der aufgelagerten Zellhaufen lassen darauf schließen, dass es sich hierbei um die verwendeten Streptokokken handelt. Da diese auf allen Proben zu erkennen sind, wurde für den Hauptversuch eine Kontaminationszeit von 5 h in bakteriell kontaminiertem Speichel beschlossen.

2.5 Darstellung mit dem Rasterkraftmikroskop

2.5.1 Vorbereitung

Nach dem Festlegen der optimalen Versuchsbedingungen wurden die so behandelten Schmelzproben mit einem Raster-Kraft-Mikroskop (MikroGlider®, FRT GmbH, Bergisch-Gladbach, Deutschland) untersucht.

Die Fahrtzeit zur Firma FRT wurde in die Vorbereitung mit einbezogen, da die Messungen leider nicht in der Universität durchzuführen waren. Insgesamt 5 Schmelzproben wurden wie in den Vorversuchen festgelegt vorbereitet. Für den Transport wurde das Glas mit der Speichelsuspension und den Schmelzproben in eine Styroporbox verpackt, die mit einem Wärme-Akku

ausgefüllt war. So konnte annähernd die Temperatur gehalten werden und durch die Bewegungen beim Transport konnten die Proben weiterhin gut mit Speichel umspült werden.

Kurz vor der Untersuchung unter dem Rasterkraftmikroskop (MikroGlider®, FRT GmbH, Bergisch-Gladbach, Deutschland) wurde eine Schmelzprobe entnommen, die Unterseite kurz auf einem Gaze-Läppchen abgetropft und mit Sekundenkleber vorsichtig auf einem Glasträger befestigt, welcher auf dem Rastertisch des Messgerätes fixiert wurde (Abb. 22).

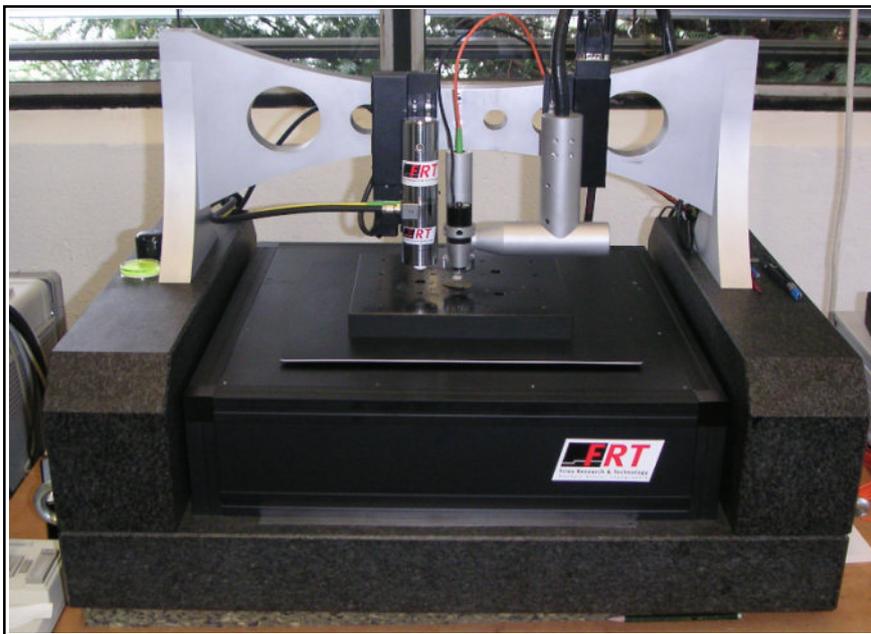


Abb. 22: Versuchsaufbau der Messungen mit dem FRT MikroGlider®. Beide Messköpfe sind deutlich zu erkennen, auf dem Probenhalter ist eine Schmelzprobe befestigt

2.5.2 Messungen mit dem FRT MicroGlider®

Zunächst wurden Aufnahmen mit dem Weißlichtsensor bei einer Kantenlänge von 6 x 6 mm und einer Auflösung von 50 x 50 Bildpunkten erstellt, um eine grobe Position für die weiteren Messungen festzulegen.

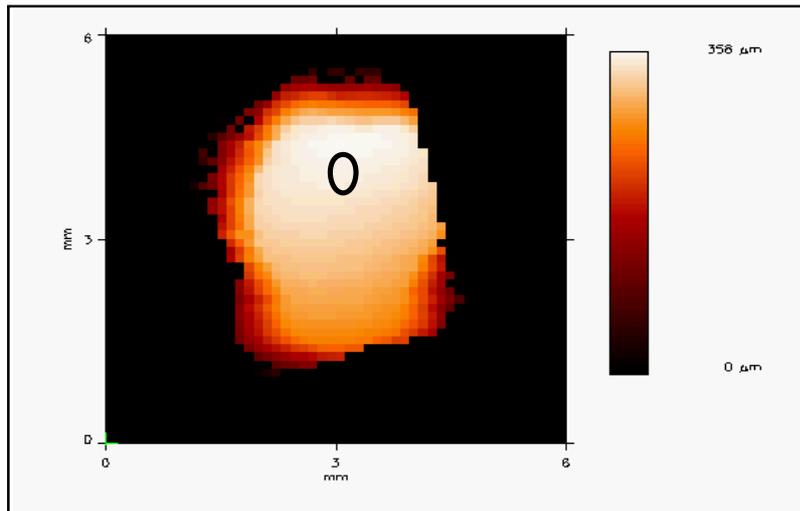


Abb. 23:
Grobe Orientierungsaufnahme einer bakteriell kontaminierten Schmelzprobe des MicroGliders® mit dem Weißlichtsensor, die Höhenabstufungen der Probe werden mit unterschiedlichen Rottönen sichtbar gemacht, der Kreis markiert den Aufnahmeort für die weiteren Aufnahmen, die im Folgenden gezeigt werden, CWL, 6x6 mm, 50x50 Bildpunkte

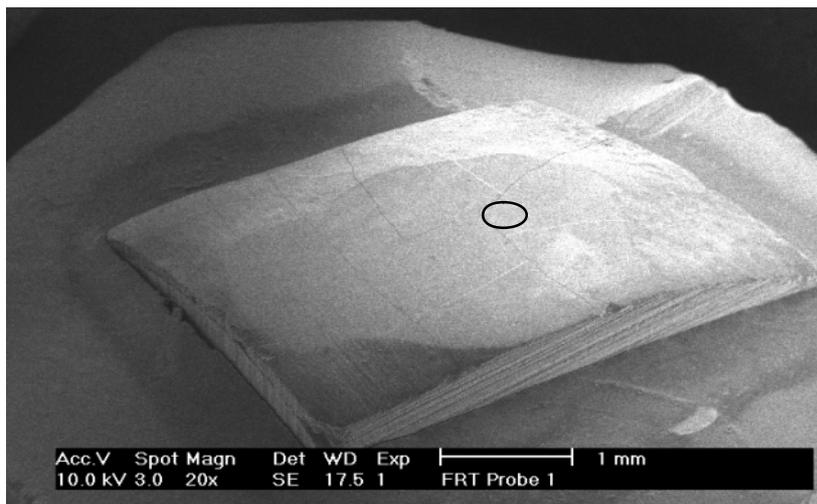


Abb. 24:
Vergleichende Orientierungsaufnahme der bakteriell kontaminierten Schmelzprobe, ein Vergleich mit den Darstellungen des MicroGliders® ist gut möglich, auch hier markiert der Kreis den Ort für die späteren Aufnahmen mit dem AFM und ihrer Vergleichsdarstellungen mit dem REM, die im Folgenden gezeigt werden; REM x20

Anschließend konnte eine Übersichtsaufnahme mit einer Kantenlänge von 250 x 250 μm erstellt werden. Diese diente vor allem dem späteren Reproduzieren der Position, um diese auch unter stärkeren Vergrößerungen im Raster-Elektronen-Mikroskop wieder finden zu können.

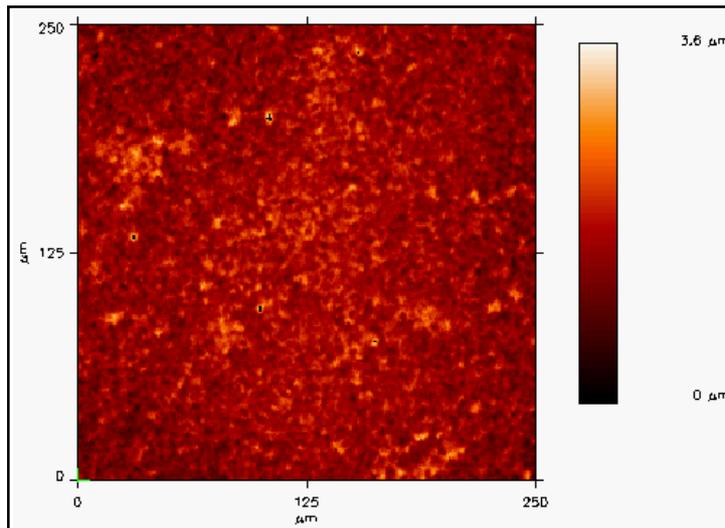


Abb. 25:
Übersichtsaufnahme der bakteriell kontaminierten Schmelzprobe mit dem Weißlichtsensor des MicroGliders®, helle Flecken markieren Erhebungen der Schmelzprobe, dies lässt auf das Vorhandensein von aufgelagerten Strukturen schließen; CWL, 250x250 μm , 256x256 Bildpunkte

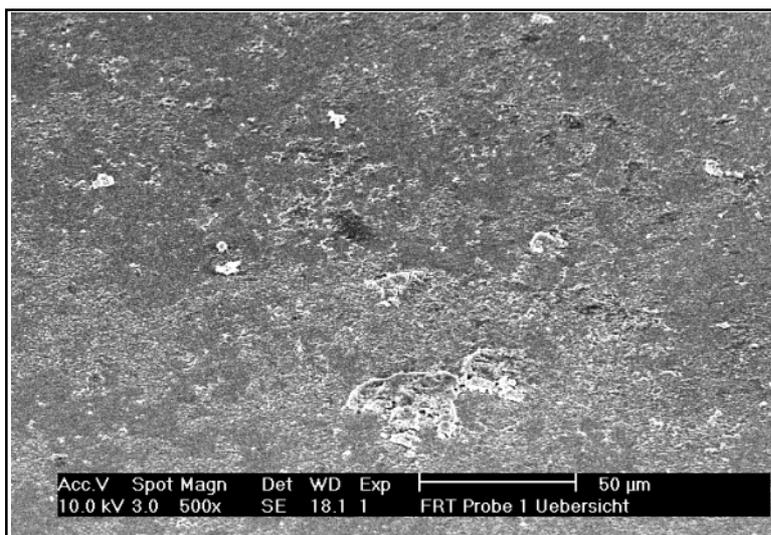


Abb. 26:
Vergleichende Übersichtsaufnahme der bakteriell kontaminierten Schmelzprobe mit dem Rasterelektronenmikroskop, Auflagerungen sind auf der Schmelzoberfläche deutlich zu erkennen; REM x500

In der Folge wurden die Proben mit der Tastspitze der AFM-Sonde (Pointprobe®, Nanosensors, Neuchatel, Schweiz) bei einer Auflagekraft von ca. 1 mN abgerastert und die Oberflächenstruktur in kleineren Messfeldern (69 x 69 μm und 10 x 10 μm) jeweils bei einer Grenzwellenlänge von 5 μm und einer Auflösung von 256 x 256 Bildpunkten dargestellt.

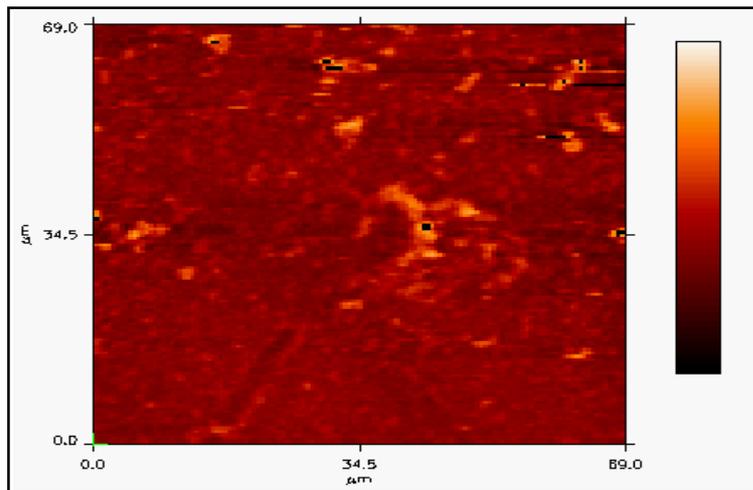


Abb. 27:

Darstellung der abgerasterten Schmelzprobe nach Aufbereitung der Rohdaten des AFM, je nach Höhe der Auflagerungen erscheint das Bild heller und dunkler, schwarze Punkte entstehen durch Messfehler der Tastspitze; AFM, 69x69 μm , 256x256 Bildpunkte

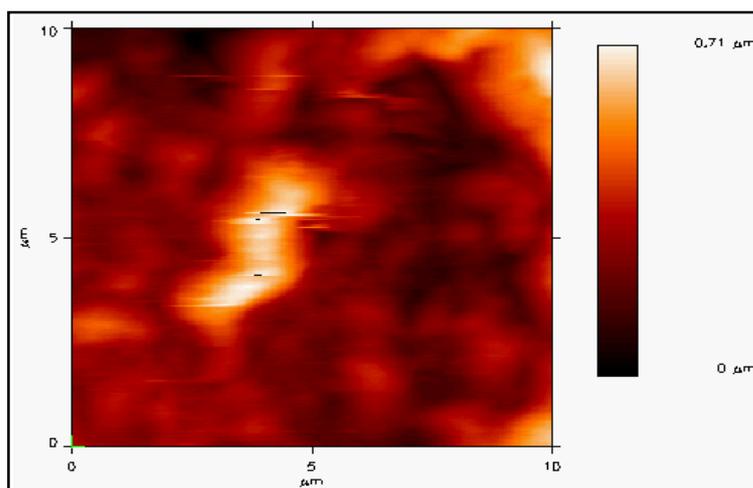


Abb. 28:

Hochaufgelöste Darstellung des abgerasterten Probenausschnitts der Schmelzprobe durch das AFM nach Aufbereitung der Rohdaten, der helle Fleck in der Bildmitte markiert eine Auflagerung von bis zu ca. 0,7 μm Höhe, darum herum etwas dunklere Flecken auf schwarzem Untergrund; AFM, 10 x 10 μm , 256 x 256 Bildpunkte

Diese Auflösungen entsprachen einer Vergrößerung im Rasterelektronenmikroskop von x2000 und x12000. Die Tastspitze der Sonde (Pointprobe®, Nanosensors, Neuchatel, Schweiz) hatte einen maximalen Radius von 15 nm und übertrug die Oberflächenstrukturen durch ein optisches Interferometer.

2.6 Aufbereitung der AFM-Darstellung durch Mark III

Die mit dem AFM gemessenen Rohdaten wurden mit einer speziellen Software (FRT Mark III, FRT GmbH, Bergisch-Gladbach, Deutschland) aufbereitet. So können die Grafiken in der Aufsicht (Abb. 27, 28) oder morphologisch im 3D-Format (Abb. 29) dargestellt werden.

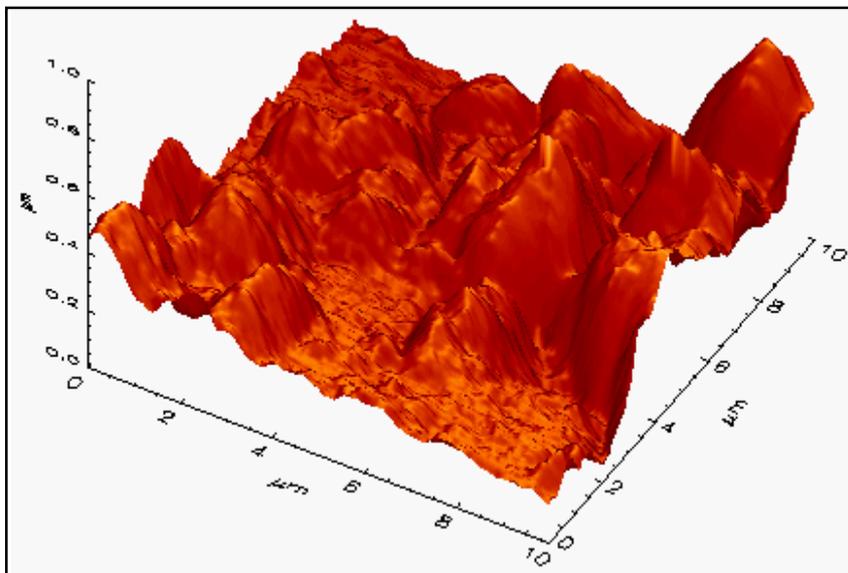


Abb. 29:

3D-Darstellung der hochaufgelösten AFM-Rohdaten der abgerasterten Schmelzprobe; die helleren Flecken aus der Rohdatendarstellung (Abb. 28) zeigen sich hier als dreidimensionale Erhebungen; Aufbereitung der Rohdaten durch die Analysefunktionen des Softwareprogramms Mark III

Mit Hilfe der Analysesoftware des Programms ist es darüber hinaus möglich, die Oberflächenbeschaffenheit der Proben zu untersuchen. Dabei errechnet die Software über die Rohdaten der AFM-Messung Rauigkeitswerte und kann Profilanalysen durchführen.

2.6.1 Profilanalyse

Zur Bestimmung von Höhe, Breite oder Länge der Auflagerungen, ist es sinnvoll die Profilanalysefunktion zu nutzen. Hierzu wird eine Linie durch die zu betrachtende Stelle der Probe in den Rohdaten gezogen. Die Analysesoftware erstellt aus den extrahierten Daten ein Diagramm, welches zu den gewünschten Informationen führt.

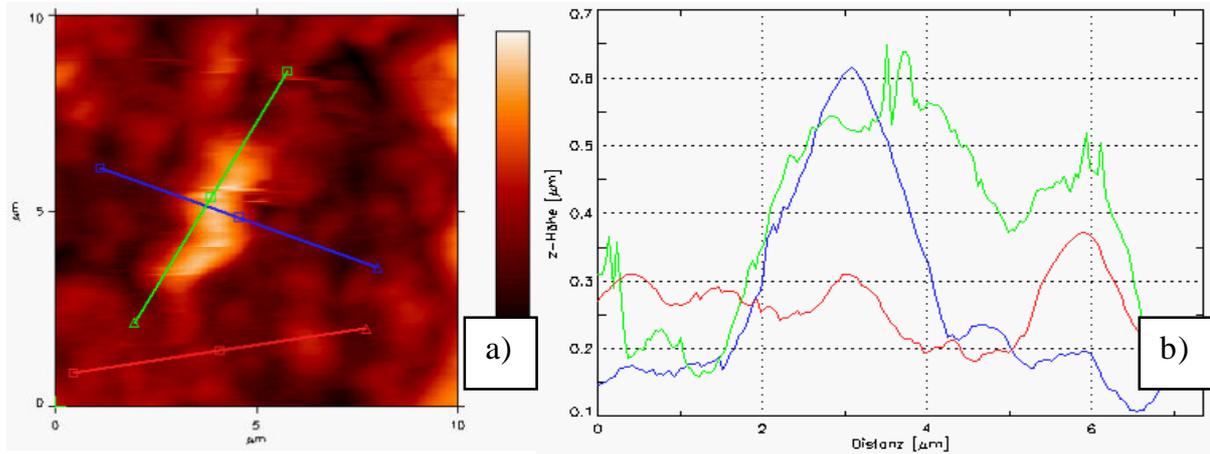


Abb. 30: Rohdatenbild des AFM mit Lage der Profillinien (a) sowie die Darstellung der Profile in einem Diagramm (b)

2.6.2 Oberflächenanalyse

In der Oberflächenanalyse wird der Verlauf der Schmelzprobenoberflächen profilometrisch erfasst und ausgewertet. Dies geschieht mit Hilfe von spezifischen Kennwerten, die die verschiedenen Oberflächenstrukturen miteinander vergleichbar machen.

In diesem Zusammenhang interessiert im Wesentlichen die Analyse der Rauheitsdaten. Hierzu müssen die Rohdaten zunächst in Rauheit und Welligkeit getrennt werden. Durch Filter, die die langwelligen (hochfrequenten) von den kurzwelligen (niederfrequenten) Oberflächenanteilen trennen, entsteht aus den Rohdaten das rauheitsgefilterte Profil, welches nur die kurzwelligen Oberflächenanteile enthält. So können die Oberflächenkennwerte für die Rauheit ermittelt werden. Interessant sind hier vor allem die über die Fläche

gemittelten Werten für die gemittelte Rautiefe (sRz), die maximale Rautiefe ($sRmax$), die Glättungstiefe (sRp) und die maximale Riefentiefe (sRv).

Die gemittelte Rautiefe gibt Auskunft über die durchschnittliche vertikale Oberflächenzerklüftung. Hierbei wird der Abstand der Profilspitzen zu den Profiltälern dargestellt. Werden diese Einzelmessstrecken über die Fläche gemittelt, ergibt sich sRz .

Die maximale Rautiefe errechnet sich aus dem Abstand von der höchsten Profilspitze zum tiefsten Profiltal.

Als Glättungstiefe wird der Abstand der höchsten Profilerhebung zur mittleren Fläche bezeichnet.

Die maximale Riefentiefe schließlich errechnet sich aus dem Abstand der mittleren Fläche zum tiefsten Profiltal.

In einer Tabelle zusammengefasst sind die so ermittelten Werte vergleichbar.

2.6.3 Vergleichende Untersuchung mit dem REM

Im Anschluss an die Auswertung der kontaminierten Schmelzproben durch das AFM und die zugehörige Software wurden die Proben für eine vergleichende Untersuchung mit dem REM aufbereitet. Dafür wurden sie wie unter 2.4 beschrieben getrocknet, auf Probenteller geklebt, gesputtert und unter dem REM untersucht. So konnten die Proben im Hinblick auf die verwendeten Aufnahmeverfahren verglichen werden.

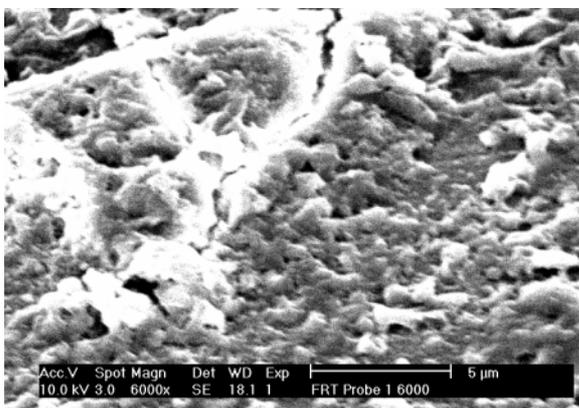


Abb. 31:

Morphologische Darstellung des zuvor unter dem AFM abgerasterten Schmelzprobenausschnittes mit dem REM, die 6000fache Vergrößerung entsprechen ungefähr der Auflösung des AFM bei $10 \times 10 \mu\text{m}$ und 256×256 Bildpunkten

3 Ergebnisse

Im Rahmen der Untersuchungen wurden die Schmelzproben mit verschiedenen Techniken dargestellt. Hierzu wurden verschiedene Darstellungsformen der AFM-Technik genutzt, die es neben der reinen Darstellung ermöglichen, die Proben darüber hinaus (profilo-)metrisch auszuwerten. Die Ergebnisse wurden rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen gegenübergestellt.

Beispiele für die genutzten Darstellungsformen sind im Abbildungsverzeichnis (Abb. 47) aufgeführt.

3.1 Rasterkraftmikroskopie (morphologisch, 3D)

Da alle Proben und Ausschnitte ein ähnliches Aussehen zeigen, soll hier exemplarisch nur jeweils ein Ausschnitt pro Probe ausgewertet werden.

Morphologisch erkennt man in allen 3 Ausschnitten einen deutlich hellen Fleck im Zentrum des Ausschnitts (Abb. 48, siehe Bildanhang), der in seinem größten Durchmesser ca. 0,7 bzw. 0,8 μm (Abb. 48 a und c) sowie 0,4 μm (Abb. 48 b) breit ist. Um diesen Fleck herum befinden sich weitere kleinere, etwas weniger helle Flecke.

Auffällig bei den Proben 1 und 3 ist das Vorherrschen einiger sehr dunkler Zonen um die sehr helle Fläche im Zentrum. Im Gegensatz dazu ist die Umgebung in Probe 2 nur ein wenig dunkler als der hellste Fleck.

Die Auftragung der Rohdaten in ein 3D-Diagramm (Abb. 32 und 49) zeigt,

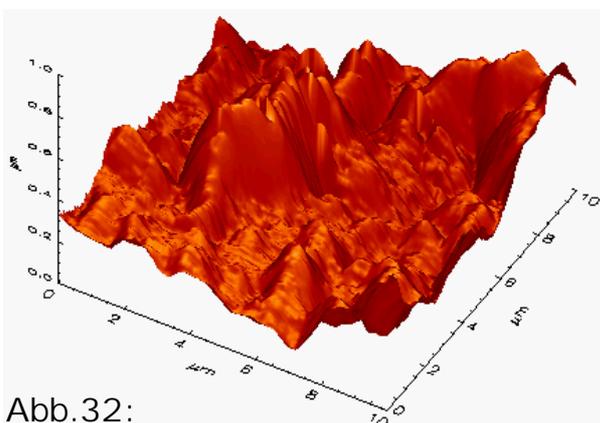


Abb.32:

morphologische Darstellung des Probenabschnittes P01-04 in 3D, man erkennt eine deutlich ausgeprägt wellige Oberfläche mit Spitzen bei bis zu 0,8 μm ; AFM, 10 x 10 μm , 256 x 256 Bildpunkte

dass die hellen Flecken Erhebungen innerhalb der Ausschnitte darstellen. Diese sind in den Proben 1 und 3 deutlich stärker ausgeprägt als in Probe 2. Um diese Erhebungen herum ist keine einheitlich flache Umgebung zu erkennen, sie ist geprägt von weiteren, wenn auch niedrigeren, Erhebungen und Wellen.

3.1.1 Profilanalyse

Die morphologischen Erscheinungsbilder können durch die Profilanalyse bestätigt werden. Bei der Profilanalyse wurde je ein Profil in einer überwiegend dunkel erscheinenden Zone gezogen und je 2 möglichst senkrecht aufeinander stehende Profile durch den hellsten Fleck bzw. die größte Erhebung.

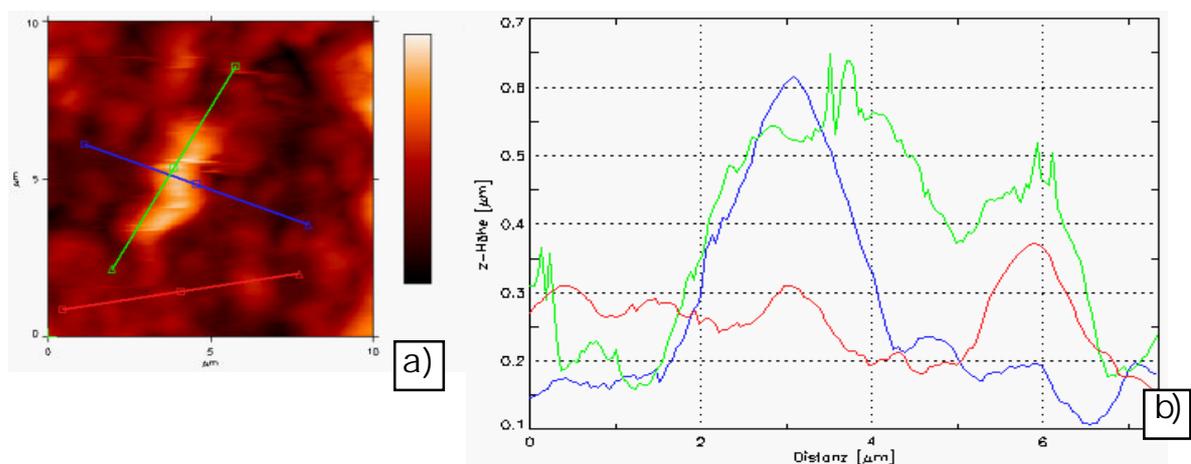


Abb. 33:
Rohdatenbild des Probenausschnittes P01-04 mit dem Verlauf der Profillinien für die Profilanalyse (a) und grafische Darstellung der gezogenen Profile in einem Diagramm (b)

Die Auswertung der Profile (Abb. 50-52) zeigt, dass die Auflagerung aus Probe 2 deutlich niedriger ist als in den übrigen Proben. Somit sind in Probe 2 auch die Unterschiede zwischen der höchsten Erhebung und der tiefsten Furche viel geringer als in den Proben 1 und 3, was zu geringeren Kontrastunterschieden im AFM führt.

Vermisst man die Erhebungen, die sich als Kurve in der Profilanalyse zeigen, so ist die auffällige Auflagerung in Probe 1 ca. $2,7\ \mu\text{m}$ breit, $6,3\ \mu\text{m}$ lang und bis zu $0,65\ \mu\text{m}$ hoch (Abb. 50 b). Vor und hinter dieser Erhebung weist das Profil sehr niedrige Werte auf ($0,10\ \mu\text{m}$ bis $0,18\ \mu\text{m}$). Das Profil, das in Probe 1 durch die dunklere, also tiefer liegende, Ebene gezogen worden ist, zeigt keine so großen Höhenunterschiede. Es stellt sich in seichten Wellen dar, die sich im Profilverlauf zwischen ca. $0,18 - 0,37\ \mu\text{m}$ bewegen. Der Profilverlauf der Erhebung verläuft jedoch auch nicht in einer gleichmäßigen Kurve. Man erkennt deutlich kleinere Profilabweichungen, die zu einem gezackten Profil im Profil führen.

Der Profilverlauf in Probe 3 (Abb. 52 b) verläuft im Prinzip sehr ähnlich. Da dort der zentrale helle Fleck jedoch aus mehreren, nebeneinander angeordneten Erhebungen besteht, verlaufen die aufeinander gestellten Profile nicht senkrecht zueinander. Es ist jedoch ein großer Höhenunterschied zum Profilverlauf der dunklen Zonen zu erkennen. Dieser bewegt sich in einer Spanne von $0,06\ \mu\text{m} - \text{ca. } 0,43\ \mu\text{m}$, während der höchste Punkt der Erhebung bei ca. $0,83\ \mu\text{m}$ liegt. Man kann deutlich die verschiedenen Erhebungen innerhalb des „hellen Flecks“ erkennen, deren höchste Punkte sich alle in einem Bereich von ca. $0,6\ \mu\text{m}$ bis ca. $0,8\ \mu\text{m}$ befinden.

3.1.2 Oberflächenanalyse

Zur Auswertung der Rauheitsdaten empfiehlt sich eine Beschränkung auf die Daten der hochaufgelösten Bilder des AFM, da hier die größte Aussagekraft zu erwarten ist.

Die gemittelte Rautiefe (sRz) beträgt bei den gemessenen Ausschnitten der Schmelzproben zwischen $0,137$ und $0,894\ \mu\text{m}$ (Tab. 4). Im Mittel bewegt sich sRz bei $0,405\ \mu\text{m}$. Streicht man bei der Berechnung jedoch den höchsten ($0,894\ \mu\text{m}$, P01-06a) und den geringsten ($0,137\ \mu\text{m}$, P01-06b) Wert, so lässt sich der realistischere Mittelwert $0,384\ \mu\text{m}$ errechnen. Dies zeigt auch Abb. 36. Lediglich Probe 1 zeigt große Schwankungen, die in der korrigierten Mittelwertberechnung nicht berücksichtigt werden.

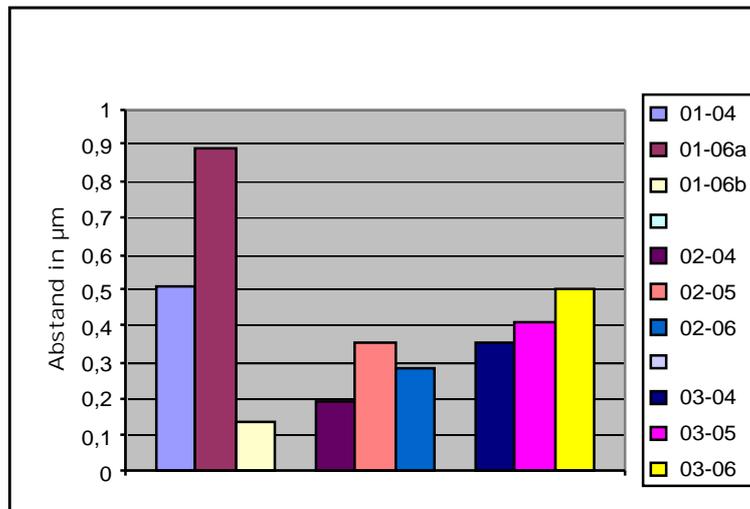


Abb. 34:
Gemittelte Rautiefe (sRz); graphische Darstellung der ermittelten Daten aller Proben für sRz

Auch bei der Ermittlung von der maximalen Rautiefe lassen sich der jeweils höchste (1,163 μm , P01-06a) und niedrigste (0,137 μm , P01-06b) Wert in den Ausschnitten aus Probe 1 feststellen (Tab. 5, Abb. 35). Mittelt man die Werte für sRmax über alle Ausschnitte und streicht auch hier die „Extremwerte“, so pendelt sich der Mittelwert wie bei der gemittelten Rautiefe bei ca. 0,5 μm ein.

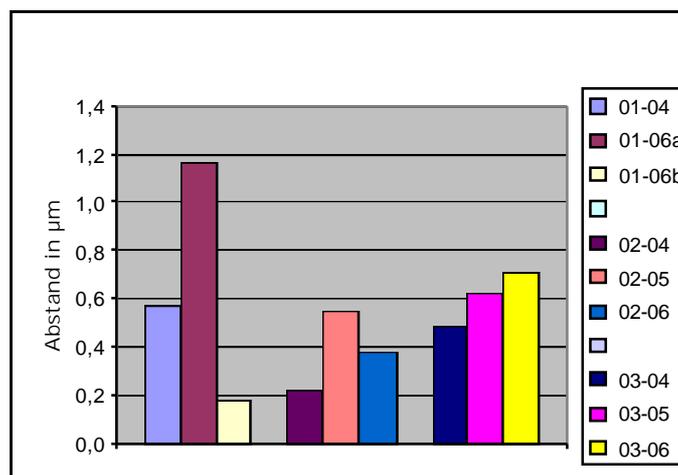


Abb. 35:
Maximale Rautiefe (sRmax); graphische Darstellung der ermittelten Daten aller Proben für sRmax

Der Abstand der höchsten Profilerhebung zur mittleren Fläche wird als Glättungstiefe (sRp) bezeichnet. Der Trend der vorherigen Rauheitsmessungen

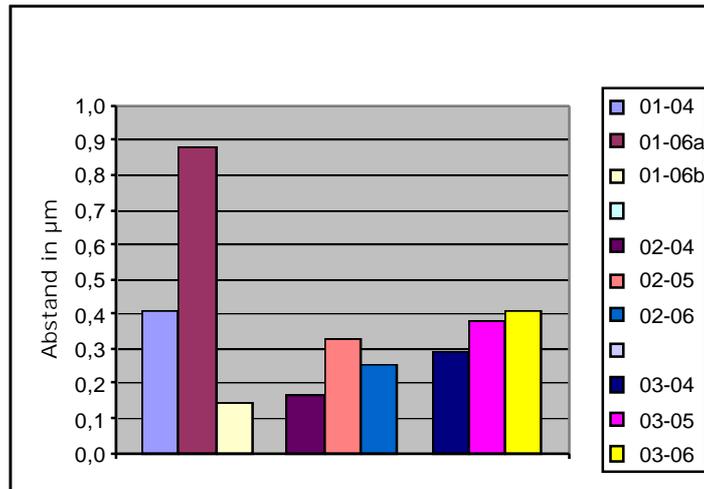


Abb. 36:
Glättungstiefe (sRp); grafische Darstellung der ermittelten Daten aller Proben für sRp

gen scheint sich auch hier fortzusetzen, wobei die Werte aller Auswertungsformen zusammenhängen. Die Ausschnitte der Proben 2 und 3 zeigen einen relativ einheitlichen Abstand (Abb. 36), Probe 1 hat wiederum den höchsten (0,412 μm , P01-06a) und auch den niedrigsten (P01-06b) Wert aufzuweisen (Tab. 6). Im Mittel (die Ausreißer wurden bei der Berechnung gestrichen) lag die Glättungstiefe der Probenausschnitte bei 0,322 μm .

Ein ähnliches Bild zeigt die Auswertung der maximalen Riefentiefe (Abb. 37,

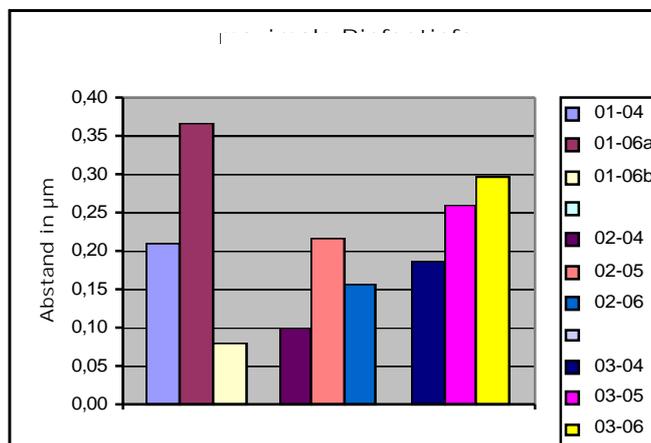


Abb. 37:
Maximale Riefentiefe (sRv); grafische Darstellung der ermittelten Daten aller Proben für sRv)

Tab. 7). Auch hier weist Probe 1 Maximal- (0,367 μm , P01-06a) und Minimalwert (0,078 μm , P01-06b) auf, wobei in diesem Fall die Unterschiede zum Mittelwert (0,204) der restlichen Proben nicht sehr groß sind und maximal 0,163 μm betragen.

3.2 Rasterelektronenmikroskopie

Die Proben zeigen auch unter dem REM ein relativ einheitliches Bild (Abb. 38 und 53). Die hellen Flecken der AFM-Rohdaten zeigen sich im REM als

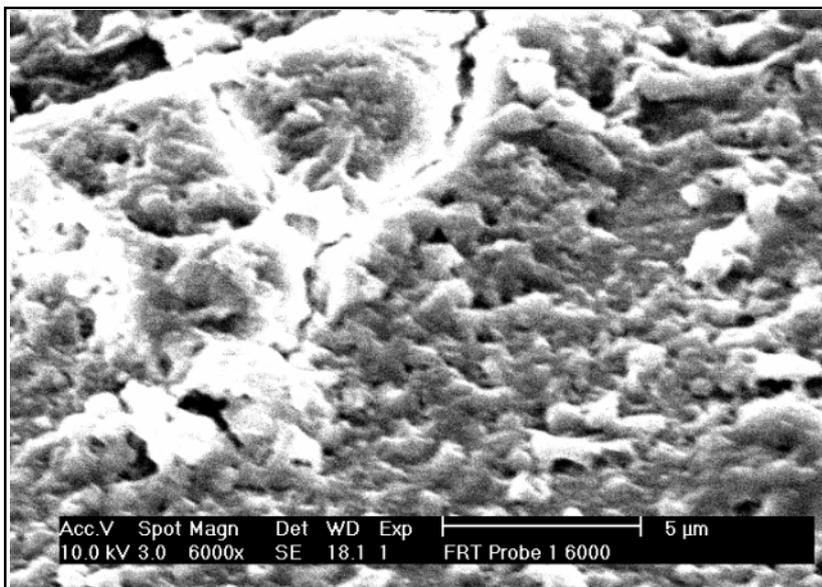


Abb. 38:

Schmelzprobe nach 5 h Pellicelbildung im Speichelbad und anschließend bakterieller Kontamination für 5 h in der Streptokokken-Suspension, es sind deutliche, konfluierende Auflagerungen zu erkennen; REM x6000

Anhäufungen kleiner kugelliger Zellen. Bei einer 6000fachen Vergrößerung lässt sich erkennen, dass diese Kugeln bei einer Größe von ca. 0,5 – 1 μm häufig ineinander übergehen und so größere, homogene Zellhaufen bilden. Die Schmelzoberfläche ist in vielen Fällen nicht mehr zu sehen, da sich darauf ein weitgehend einheitlicher Zellrasen gebildet hat. Darauf haben sich die größeren Zellhaufen aufgelagert.

Die Zellhaufen in den Proben 1 und 3 sind deutlich stärker ausgeprägt als in Probe 2. Dies erklärt die geringere Höhe in der 3D-Darstellung der zweiten Probe. Bei dieser ist deutlich zu erkennen, dass die durchscheinende

Schmelzoberfläche lediglich mit einer Zellschicht bedeckt ist. In den Proben 1 und 3 überwiegt als Untergrund ein Zellrasen, wobei die Schmelzoberfläche an einigen Stellen jedoch weiterhin durchscheint.

3.3 Vergleich der bakteriell kontaminierten Schmelzproben mit den Vorstufen (beschliffen, pellicelbeschichtet)

Zum Vergleich mit bakteriell kontaminierten Proben wurden Vorversuche zur Pellicelbildung auf den vorbehandelten Schmelzproben durchgeführt. Um die Bildung der Pellicel nachvollziehen zu können, wurde dabei die Hälfte der Probe mit dünnfließendem Silikon (President, Light Body, Coltène Whaledent GmbH & Co. KG, Langenau, Deutschland) abgedeckt. Die Schmelzproben blieben 6 h im Speichelbad. Anschließend wurde auch hier die Auswertung mit dem REM und dem AFM durchgeführt.

3.3.1 Morphologie

3.3.1.1 Morphologie der mit Silikon abgedichteten Seite

Betrachtet man die Bilder aus dem REM (Abb. 54 e), sieht man deutlich die Schleifspuren, die während der Vorbehandlung auf den Schmelzproben entstanden sind. Auch in den Rohdaten (Abb. 54 a) und dem 3D-Profil (Abb. 39) der AFM-Auswertung sind regelmäßige Erhebungen und Vertiefungen zu erkennen, die die Schleifspuren im Oberflächenprofil darstellen. Darüber hin-

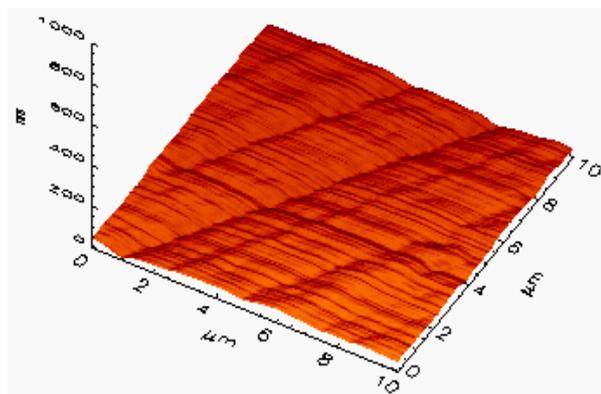


Abb. 39: morphologische (3D-) Darstellung eines zuvor mit Silikon abgedeckten Schmelzprobenausschnittes Z01-PR nach 6 h in der Speichelsuspension, die Schleifspuren der unbehandelten Schmelzproben lassen sich gut erkennen; AFM, 10 x 10 µm, 256 x 256 Bildpunkte

aus lassen sich jedoch keinerlei Auflagerungen ausmachen.

3.3.1.2 Morphologie der mit Speichel kontaminierten Seite

Nach Kontamination der Schmelzoberfläche mit Speichel für 6 h erkennt man unter dem REM (Abb. 55 e) eine unregelmäßige Oberfläche. Diese entsteht durch viele einzelne fragmentähnliche Auflagerungen, die von einer dünnen durchgängigen Schicht bedeckt zu sein scheinen. Die Schleifspuren der Vorbehandlung lassen sich unter den unregelmäßigen Auflagerungen nur noch schwer ausmachen.

Auch im 3D-Profil (Abb. 40) ist im Gegensatz zu den mit Silikon abgedeckten Ausschnitten eine wesentlich unregelmäßigere Oberfläche zu erkennen.

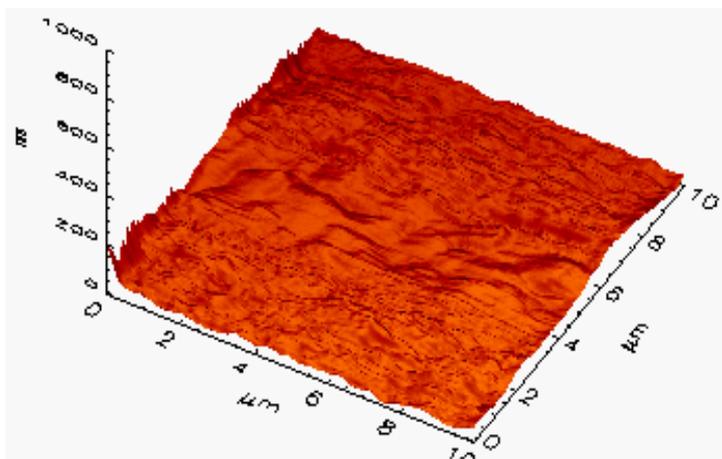


Abb. 40:

morphologische (3D-) Darstellung eines Schmelzprobenausschnittes Z01-SP nach 6 h in der Speichelsuspension, es lassen sich feingranulierte, homogene Auflagerungen ausmachen; AFM, 10 x 10 µm, 256 x 256 Bildpunkte

3.3.2 Profilanalyse

Das Profil der mit Silikon abgedichteten Seite ist zwischen 20 und 35 nm hoch, die Kurve der mit Speichel kontaminierten Seite der Probe liegt zwischen 30 und 55 nm. Dies lässt auf eine Auflagerung auf der sauberen Schmelzoberfläche schließen, da das Profil der Probe Z01-SP (Abb. 42) über der Höhe von Z01-PR (Abb. 41) liegt. Diese Auflagerung ist ca. 25 nm dick.

Im Vergleich zu den bakteriell kontaminierten Proben, die eine Höhe des Profilverlaufs von bis zu 800 nm (Abb. 50-52) aufweisen, sind die Profile der Vorstufen eher geradlinig mit wenig Ausschlag nach oben oder unten.

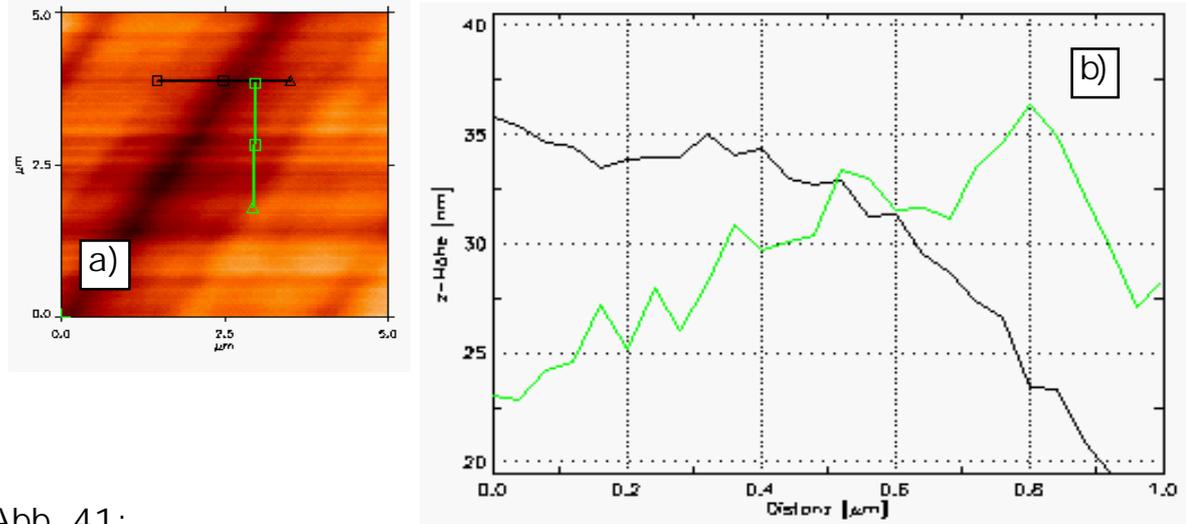


Abb. 41:

Profilanalyse: Rohdaten des Probenausschnittes Z01-PR mit dem Verlauf der Profillinien senkrecht aufeinander stehend (a), grafische Darstellung des Profilverlaufs in einem Diagramm (b); die Profile liegen im Bereich von 20-35 nm und verlaufen mit sehr geringen Schwankungen

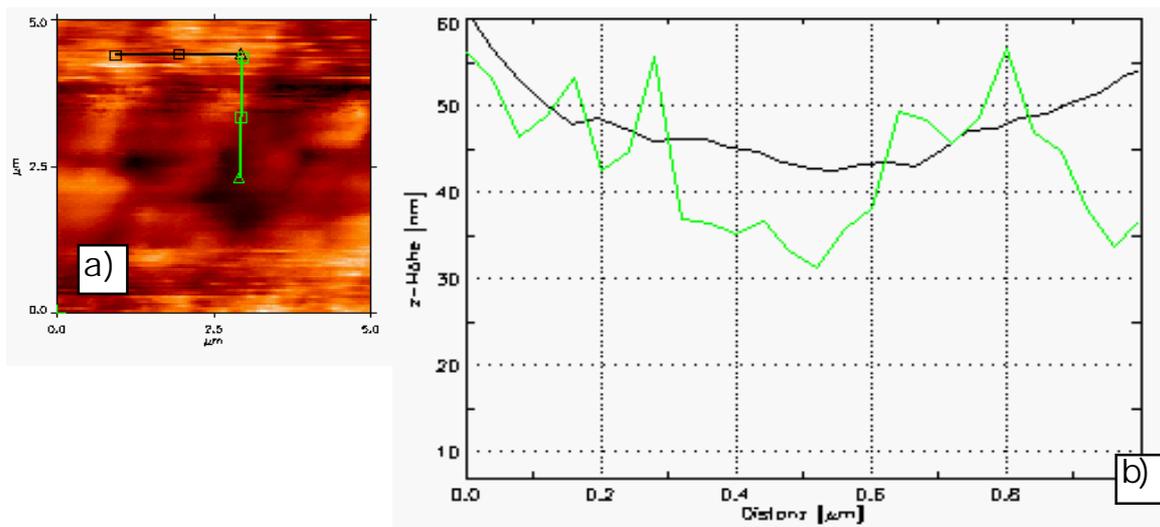


Abb. 42:

Profilanalyse: Rohdaten des Probenausschnittes Z01-SP mit dem Verlauf der Profillinien senkrecht aufeinander stehend (a), grafische Darstellung des Profilverlaufs in einem Diagramm (b); die Profile liegen bei 30 – 60 nm und weisen geringe Schwankungen auf

3.3.3 Analyse der Rauigkeit

Die rauheitsgefilterten Daten des AFM lassen im Wesentlichen kleinere Werte erkennen als die Daten der Proben, die zusätzlich bakteriell kontaminiert wurden.

Für den Vergleich dieser Schmelzproben bzw. -ausschnitte mit den zusätzlich bakteriell kontaminierten Schmelzproben sind die Werte für die durchschnittliche Oberflächenzerklüftung (gemittelte Rautiefe, sRz) am aussagekräftigsten. Hierbei können Rückschlüsse auf die Dicke der Auflagerungen gezogen werden.

sR_{max} , sR_p und sR_v haben für die Vergleichbarkeit der Proben und daraus resultierende Rückschlüsse wenig Bedeutung.

Die Ausschnitte aus Probe 1 zeigen für die zuvor mit dünnfließendem Silikon

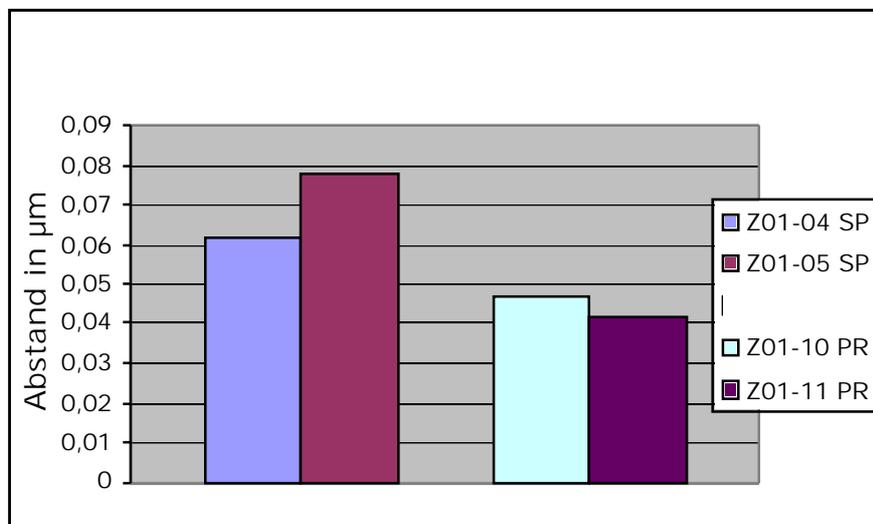


Abb. 43:

Gemittelte Rautiefe; grafische Darstellung der ermittelten Daten aller Proben der Vorstufen (mit Silikon abgedeckte Schmelzproben, mit Speichel kontaminierte Schmelzproben) für die gemittelte Rautiefe (sRz) der Vergleichsproben

abgedeckte Seite einen sRz -Wert von 0,047-0,042 μm (Tab. 7). Die dem Speichel ausgesetzten Ausschnitte der Probe 1 haben von der höchsten Profilerhebung bis ins tiefste Profiltal einen über die Fläche des Ausschnitts gemittelten Abstand von 0,062 μm bzw. 0,078 μm . Vergleicht man zunächst diese Werte miteinander (Abb. 43), kann man darauf schließen, dass das sich bil-

dende Schmelzoberhäutchen ca. 15-25 nm dick ist. Beim Vergleich mit den sRz-Werten der bakteriell kontaminierten Schmelzproben (Abb. 44) lässt sich feststellen, dass das Oberflächenprofil der bakteriell kontaminierten Schmelzproben deutlich stärker zerklüftet ist. Der durchschnittliche Abstand zwischen höchster Erhebung und tiefstem Tal beträgt hier 0,405 μm . Legt man den sRz-Wert der lediglich mit Speichel in Berührung gekommenen Schmelzoberflächen zugrunde, kann man davon ausgehen, dass die bakteriell bedingten Auflagerungen also ca. 0,3 μm betragen. Im Vergleich mit dem höchsten und tiefsten gemessenen Wert liegt die Schichtdicke der Auflagerungen zwischen 0,05 μm und 0,82 μm .

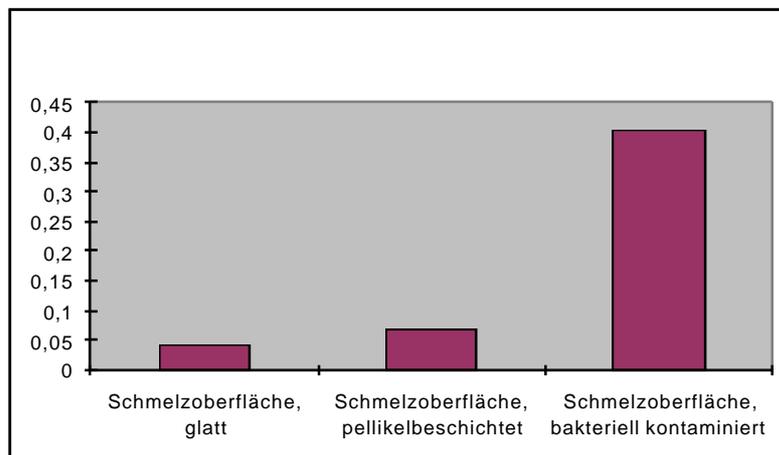


Abb. 44:
Gemittelte Rautiefe (sRz); Vergleich der gemittelten Daten von sRz aller Versuchsreihen

4 Diskussion

4.1 Primäre Ergebnisse

Mit den vorliegenden Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass es möglich ist auf einer definierten Oberfläche (hier: Zahnschmelz) eine Pellikel zu induzieren und diese anschließend bakteriell zu kontaminieren. Somit konnte ein Modell-System entwickelt werden, welches es ermöglicht, Anlagerungsmechanismen der Primärkolonisatoren von Zahnoberflächen genauer zu untersuchen.

4.2 Bewertung der Darstellungsformen

Mittels Rasterelektronenmikroskopie konnten bereits in verschiedenen Studien Vorgänge bei der Pellikelbildung und Plaqueakkumulation beschrieben werden (z. B. Hannig 1998, Berthold 1979, Lie 1979, Sukontapatipark et al. 2001). Hierbei wurden z. B. bei Sukontapatipark et al. (2001) deutliche Bilder der Plaqueakkumulation mit runden Kokken und Stäbchen beobachtet. In diesem Zusammenhang wird zudem die große Tiefenschärfe und die Möglichkeit der dreidimensionalen Darstellungsform des REM angesprochen. Allerdings können die Mikroorganismen nicht direkt identifiziert werden sondern werden lediglich auf morphologischer Basis klassifiziert (Carassi et al. 1989).

Auch die Technik der Rasterkraftmikroskopie ermöglicht hochauflösende Darstellungen von Probenoberflächen, die bisherigen morphologischen Vorstellungen entsprechen. Die morphologische Darstellung wird durch das Aufbereiten der Daten mit spezieller Software möglich. Die abgerasterten Proben können so z. B. dreidimensional dargestellt werden. Durch Darstellungen bis in den Nanometer-Bereich lassen sich mit dem AFM auch feine Strukturen bzw. Oberflächenveränderungen sichtbar machen (Núñez et al. 2005). Das Verfahren der Rasterkraftmikroskopie ist damit mit Darstellungen des Raster-Elektronen-Mikroskops vergleichbar.

Hauptvorteil des AFM gegenüber dem REM ist die Darstellung der zu untersuchenden Proben unter natürlichen Bedingungen, speziell auch im wässri-

gen Milieu (Mavrocordatus et al. 2004, Núñez et al. 2005). Die Proben müssen zudem nicht chemisch fixiert, gefärbt, geschnitten oder unter Vakuum – wie z. B. im REM – dargestellt werden (Núñez et al. 2005). Durch die Verwendung der noch feuchten Proben beugt man außerdem Fehlerquellen durch Trocknungsartefakte vor.

Durch das Abrastern der Proben mit dem AFM erhält man Bilder der äußeren Oberfläche mit Abweichungen bis in den Nanometerbereich. Damit kann die Rasterkraftmikroskopie wichtige Informationen über äußerliche Strukturen wie Fimbrien, Fibrillen und Geißeln geben. Darüber hinaus ist das AFM äußerst sensibel auf Unterschiede in Struktur und Eigenschaften der Zellmembran, da die Tastspitze mit der Oberfläche der Probe reagieren kann. Wechselwirkungen der Tastspitze mit der Probenoberfläche erlauben zusätzlich Auskünfte über Struktur, Adhäsion und Elastizität der Probe (Núñez et al. 2005). Vadillo-Rodriguez et al. (2004) untersuchten über diese Wechselwirkungen die Adhäsion von *S. mitis* an Oberflächen.

Durch die mitgelieferte Software erschließt sich ein weiterer Vorteil der Rasterkraftmikroskopie. Spezielle Analysefunktionen machen es möglich, die abgerasterten Rohdaten so aufzubereiten, dass Oberflächenstrukturen direkt (profilo-)metrisch erfasst werden können. Diese Analysen sind bei der Rasterelektronenmikroskopie nur indirekt möglich und sehr aufwendig.

4.3 Bewertung der Ergebnisse

In einer rasterelektronischen Studie zu Reaktionen der Pellikel (Hannig 1998) wurden ähnlich wie in der vorliegenden Studie Schmelzprobenkörper mit paraffin-stimuliertem und steril-filtrierte Speichel untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass die in-vitro Pellikel weitgehend mit der Oberflächenmorphologie der in-vivo auf Zahnschmelz gebildeten Pellikelschichten, die u. a. von in den von Lie (1979) zusammengefassten Studien rasterelektronenmikroskopisch dargestellt wurden, übereinstimmt. Die Pellikel wird als feingranuläre Oberflächenbedeckung mit globulären Auflagerungen beschrieben (Hannig 1998) oder als dichte Schicht runder Klumpen,

auch Pilz-Muster genannt, mit mittlerer elektronischer Dichte, die einer kontinuierlichen basalen Schicht aufliegt (Berthold 1979). Die morphologische Analyse der untersuchten Schmelzproben (z. B. Abb. 46e) zeigt deutlich eine feingranuläre Bedeckung der Schmelzoberfläche, die Schleifspuren der Vorbereitung sind nicht mehr zu erkennen. Dies lässt darauf schließen, dass es gelungen ist, auf den standardisierten Schmelzproben die Auflagerung einer Pellikel zu induzieren.

Sukontapatipark et al. (2001) haben bei einer rasterelektronischen Studie zur bakteriellen Kontamination an Zähnen mit festsitzenden Apparaturen schon in einer frühen Phase der supragingivalen Plaque-Akkumulation Kokken auf allen Proben dargestellt. In unseren rasterelektronischen Abbildungen (Abb. 53 a-c) lassen sich überlagernde kokkoide Auflagerungen erkennen, was auf die Anlagerung von *S. mutans* an die Schmelzoberflächen schließen lässt. In diesen Abbildungen wie auch in den REM-Darstellungen aus den Vorversuchen sind teilweise die Schleifspuren der Schmelzprobenvorbereitung wieder zu erkennen. Vor allem in den Abbildungen der Vorversuche (Abb. 45, 46) ist die Pellikelschicht oft durchbrochen und die Schleifspuren sind erkennbar. Dies kann auf eine chemische Degeneration der Pellikel durch die Mikroorganismen zurückgeführt werden, in einigen Fällen kann es auch zu einer konfluierenden Struktur zwischen Zellwand und Pellikel gekommen sein, wie es bei Lie (1979) beschrieben wird.

Für die Rasterelektronenmikroskopie müssen die Proben zunächst getrocknet, gesputtert und anschließend unter Vakuum betrachtet werden. Bei diesem Vorgang kann es zu Trocknungsartefakten kommen, die die Darstellung der bakteriellen Anlagerung verfälschen können. Als alternatives Darstellungsverfahren bot sich daher die Rasterkraftmikroskopie an. Núñez et al. (2005) bezeichnen die Rasterkraftmikroskopie als eine kraftvolle Technik um biologische Proben im Mikro- und Nanometerbereich unter nichtzerstörenden Bedingungen darzustellen. Mittels AFM-Technik ist es möglich kleinere Bakterienmerkmale wie Fimbrien, Fibrillen und Geißeln, Unebenheiten und Krater, Ausscheidungen und Zelltrümmer mit hoher Auflösung zu erfor-

schen. Die Bakterien können dabei nicht nur einzeln sondern in Gruppen, Populationen und gemischten Gemeinschaften, bei verschiedenen Konzentrationen und Wachstumsbedingungen untersucht werden. Eine Gruppe um Mavrocordatis (2004) stellte einen vielseitigen Einsatzbereich des AFM fest und entdeckte das AFM als ideales, komplementäres Werkzeug für die morphologische Untersuchung, da es die Beobachtung von Partikeln in ihrer natürlichen Umgebung mit atomarer Auflösung erlaubt. Somit ist es möglich, bakterielles Wachstum auch in wässrigen Phasen zu untersuchen. Für Arnold & Bailey (2000) erwies sich das AFM als nützliches Instrument zur Identifikation der Faktoren, die im bakteriellen Anlagerungsprozess eine Rolle spielen. Es kann dazu genutzt werden, die Oberflächenmorphologie zu bestimmen und Unterschiede der pathogenen Mikroorganismen aufzuzeigen, die in einem Oberflächenbiofilm vorkommen.

Bei der Auswertung der bakteriell kontaminierten Proben mit dem AFM lassen sich deutliche Erhebungen auf der Probenoberfläche darstellen. Im Vergleich mit den pellicelbeschichteten Proben sind diese Auflagerungen 0,05–0,82 μm hoch. In der Literatur hat *S. mutans* i. d. R. einen Durchmesser von 0,5–0,75 μm (Marsh & Martin 2003), somit könnte es sich bei den Auflagerungen tatsächlich um *S. mutans* handeln. Diese scheinen teilweise schon aggregiert bzw. bedecken nicht die vollständige Probenoberfläche, womit sich die große Spanne der Höhe bei den Auflagerungen erklären lässt. Die Auflagerungen stellen sich als „Hügel“ in den 3D-Bildern des AFM dar. Dies macht einen großen Nachteil der AFM-Technik sichtbar: Es lassen sich lediglich topographische Ansichten der Probenoberfläche darstellen, da die Tastspitze nur die äußere Schicht abrastern kann und nicht in tiefere, unter sich gehende Stellen eindringt.

Zur Analyse von bakterieller Anlagerung ist demnach auch weiterhin eine Kombination aus AFM und REM sinnvoll. Mittels AFM können Wachstumsvorgänge in wässriger Lösung beobachtet werden. Werden interessante Veränderungen unter dem AFM ausgemacht, können die Proben zu diesem Zeitpunkt der wässrigen Phase entnommen, getrocknet, gesputtert und un-

ter dem REM morphologisch genauer betrachtet und untersucht werden. Somit kann auch der Faktor Zeit minimiert werden, der bei einer reinen REM-Untersuchung sehr hoch wäre.

4.4 Ausblick

Durch gezielte Weiterentwicklung des oben genannten Modell-Systems könnte es möglich werden, die Anlagerungsmechanismen der Mikroorganismen an die Zahnoberfläche bzw. die Pellikel auch über einen längeren Zeitraum zu beobachten. Die Zukunfts-Form unseres Modell-System könnte in einer Einheit von AFM und Versuchskammer bestehen. Hierzu könnte der Probenhalter des AFM in eine Brutkammer integriert werden. Diese würde bei einer konstanten Temperatur von 37°C den mit den Primärkolonisatoren kontaminierten Speichel enthalten. Die zu untersuchende Probe müsste nach der Beschichtung mit einer Pellikel fest auf dem Probenhalter befestigt werden, so dass das Messfeld der AFM-Sonde auch bei mehreren Messungen immer wieder reproduzierbar ist. Durch Bewegung der Brutkammer kann es zu einem Umspülen der Proben mit bakteriell kontaminiertem Speichel kommen. Somit werden die Voraussetzungen für einen Anlagerungsprozess der Primärkolonisatoren an die Zahnoberfläche geschaffen, der durch regelmäßiges Abrastern der Probe sichtbar gemacht werden könnte.

5 Zusammenfassung

Karies ist eine der häufigsten Infektionskrankheiten der Welt. Um Karieserkrankungen verhindern zu können, ist es notwendig die Anlagerungsmechanismen der kariesinduzierenden Mikroorganismen zu kennen. Am Beispiel von *S. mutans* sollte ein Modell-System entwickelt werden, mit dem die bakteriellen Anlagerungsmechanismen an der Zahnoberfläche durch geeignete hochauflösende Darstellungsverfahren im Nativzustand beobachtet werden können.

Für das Versuchsmodell wurde zunächst auf planen, hochreinen Schmelzproben eine Pellikel induziert. Anschließend wurden die pellikelbeschichteten Schmelzproben für 6 h bei 37°C im Schüttelbad mit *S. mutans* kontaminiert, bevor sie mittels Rasterkraftmikroskopie analysiert werden konnten. Nach dem Abrastern wurden die Proben getrocknet, gesputtert und zusätzlich rasterelektronenmikroskopisch untersucht.

Die Auflagerungen der Schmelzproben zeigten im REM ein kokkoides Erscheinungsbild. Die (profilo-)metrische Analyse der AFM-Software zeigte eine Höhe der Auflagerungen von bis zu 0,8 µm, mit einer Breite von bis zu 2,7 bzw. 6,2 µm. Dies lässt darauf schließen, dass es gelungen ist, eine bakterielle Kontamination der Schmelzproben mit *S. mutans* zu erzielen. Das AFM ermöglicht eine hochauflösende Darstellung der kontaminierten Schmelzproben auch in wässrigem Milieu. Die Analysesoftware kann darüber hinaus die abgerasterten Proben (profilo-)metrisch auswerten. Die AFM-Ergebnisse wurden mit dem REM gegengeprüft. Unter Berücksichtigung der Präparationsartefakte konnten die AFM-Ergebnisse unter morphologischen Gesichtspunkten bestätigt werden. Die höhere Tiefenschärfe des REM ermöglicht die detailgenaue Darstellung der Oberflächenstruktur.

Mit dem verwendeten AFM-System ist es möglich Anlagerungsmechanismen auf Schmelzoberflächen in bakteriell kontaminiertem Speichel unter Nativbedingungen in hoher Auflösung zu beobachten. Dieses Modellsystem kann genutzt werden, um auf nanoskopischer Ebene Manipulationen bakterieller Adhäsionsprozesse morphologisch darzustellen.

6 Literaturverzeichnis

1. Aimutis WR
Bioactive properties of milk proteins with particular focus on anticario-
genesis
J Nutr 2004; 134; 989S-995S
2. Arnold JW, Bailey GW
Surface finishes on stainless steel reduce bacterial attachment and
early biofilm formation: scanning electron and atomic force microscopy
study
Poultry Science 2000; 79; 1839-1845
3. Campbell LK, Knox KW, Wicken AJ
Influence of growth conditions on adherence of Streptococcus mutans
Ingbritt to saliva-coated hydroxyapatite
Infect Immun 1983; 39; 445-448
4. Carrassi A, Santarelli G, Abati S
Early plaque colonization on human cementum
J Clin Dent 1989; 16; 265-267
5. Childers NK, Tong G, Dasanyake AP, Kirk K, Michalek SM
Humans immunized with Streptokokkus mutans antigens by mucosal
routes
J Dent Res 2002; 81; 48-52
6. de Jong MH, van der Hoeven JS, van Os JH, Olivje JH
Growth of Oral Streptococcus Species and Actinomyces viscosus in
Human Saliva
Appl Environment Microbiol 1984; 47, 901-904
7. de Jong MH, van der Hoeven JS, van Os
Growth of micro-organisms from supragingival dental plaque on saliva
agar
J Dent Res 1986; 65; 85-88
8. Einfeldt, H
Pellikel und Plaque – Ihre Entstehung und Bedeutung
ZWR 1978 Mar 10; 87; 221-223
9. Ericson T, Magnusson I
Affinity for hydroxyapatite of salivary substances inducing aggregation
of oral streptococci
Caries Res 1976; 10; 8-18

10. Frentzen M
Über die immunologische Struktur des Zahnoberhäutchens unter besonderer Berücksichtigung von Umwandlungsprozessen bei bakterieller Besiedlung
Dtsch Zahnärztl Z 1982; 37; 377-380
11. Fritsche W
Mikrobiologie
3. überarbeitete Auflage 2002, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg-Berlin
12. Gerlach, D
Das Lichtmikroskop
2. überarbeitete Auflage 1985, Thieme Verlag, Stuttgart-New York
13. Gibbons RJ
Adhesion of bacteria to the surfaces of the mouth
In: Berkeley RCW, Lynch JM, Melling J, Rutter PR, Vincent B (Eds)
Microbial adhesion to surfaces
Chichester, Ellis Howood; 351-378 (1980)
14. Gibbons RJ
Microbial Ecology – Adherent interactions which may affect ecology in the mouth
J Dent Res 1984; 63; 378-385
15. Gibbons RJ, Cohen L, Hay DI
Strains of streptococcus mutans and streptococcus sobrinus attach to different pellicle receptors
Infect Immun 1986; 52; 555-561
16. Guggenheim B, Schmid R, Aeschlimann JM, Berrocal R, Neeser JR
Powdered milk micellar casein prevents oral colonization by streptococcus sobrinus and dental caries in rats: a basis for the caries-protective effect of dairy products
Caries Res 1999; 33; 446-454
17. Hajishengallis G, Michalek SM
Current status of a mucosal vaccine against dental caries
Oral Microbiol Immunol 1999; 14; 1-20
18. Hannig M
Neue Aspekte in der Kariesprophylaxe
ZM 2004; 94; 1804-1806

19. Hannig M
Immunisierung gegen Karies und „replacement therapy“
ZMK 2003; 19; 7-11
20. Hannig M
Neues zum Thema Immunisierung gegen Karies
ZM 2001; 91; 1136-1141
21. Hannig M
Die protektive Wirkung der Pellikel bei der Schmelzerosion durch verschiedene Säuren
ZWR 1998; 107; 421-426
22. Hannig M, Bößmann K
Pellicula dentis (I) Ultrastrukturelle Vielfalt als Ausdruck komplexer Bildung und Reifung
Die Quintessenz 1989; 7; 1319-1327
23. Hannig M, Bößmann K
Pellicula dentis (II) Ultrastrukturelle Vielfalt als Ausdruck komplexer Bildung und Reifung
Die Quintessenz 1989; 8; 1485-1489
24. Hartmann M, Keusgen M, Nikitin P, Frentzen M
Spectral-phase interference – a new toll to detect dynamics of dental pellicle formation
NanoBio Europe, International Congress & Exhibition on Nanobiotechnology
Münster, 22.-24.09.2005
25. Heidemann D (Hrsg)
Kariesätiologie und Diagnose
In: Praxis der Zahnmedizin Bd 2
4. Auflage 1999
Urban und Schwarzenberg
26. Hellwig E, Klimek J, Attin T
Ätiologie, Histologie und Epidemiologie der Karies und anderer Zahnhartsubstanzdefekte
In: Einführung in die Zahnerhaltung
2. Auflage 1999
Urban & Fischer Verlag, München-Jena
27. Hillman JD, Yaphe BJ, Johnson KP
Colonization of the human oral cavity by a strain of streptococcus mutants in humans
J Dent Res 1972; 51; 515-518

28. Klimm W
Kariologie – Ein Leitfaden für Studierende und Zahnärzte
Carl Hansen Verlag München Wien, 1997
29. Küpper MB, Huhn M, Spiegel H, Ma JKC, Barth S, Fischer R, Finnern R
Generation of human antibody fragments against *Streptococcus mutans* using a phage display chain shuffling approach
BMC Biotechnology 2005; 5:4
30. Lendenmann U, Grogan J, Oppenheim FG
Saliva and dental pellicle – a review
Adv Dent Res 2000; 14; 22-28
31. Lie T
Morphologic studies on dental plaque formation
Acta Odontol. Scand. 1979 ; 37 ;73-85
32. Ma JKC, Hikmat BY, Wycoff K, Vine ND, Cargelegue D, Yu L, Hein MB, Lehner T
Characterisation of a recombinant plant monoclonal secretory antibody and preventive immunotherapy in humans
Nature Medicine 1998; 4; 601-606
33. Madigan MT, Martinko JM, Parker J (Goebel H, Hrsg)
Brock – Mikrobiologie, Spektrum Lehrbuch
Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg – Berlin, 2001
34. Marsh P, Martin MV
Orale Mikrobiologie
Georg-Thieme-Verlag Stuttgart, 2003
35. Mavrocordatos D, Pronk W, Boller M
Analysis of environmental particles by atomic force microscopy, scanning and transmission electron microscopy
Wat Sci Techn 2004; 50; 9-18
36. Morris VJ, Kirby AR, Gunning AP
Atomic force microscopy for biologists
Imperial College Press London, 2001
37. Munk K
Grundstudium Biologie – Mikrobiologie
Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg Berlin, Gustav Fischer, 2001

38. Newman HN
The organic films on enamel surfaces
Brit dent J 1973 Aug 7; 135 (3); 106-111
39. Núñez ME, Martin MO, Chan PH, Duong LK, Sindhurakar AR, Spain EM
Atomic force microscopy of bacterial communities
Methods Enzymol 2005; 397; 256-268
40. Ohnsorge J, Holm R
Scanning Electron Microscopy – An Introduction for Physicians and Biologists
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1973
41. Pratt-Terpstra JH, Weerkamp AH, Busscher HJ
The effects of pellicle formation on streptococcal adhesion to human enamel and artificial substrata with various surface free-energies
J Dent Res 1989; 68; 463-467
42. Quirynen M, Bollen CML
The influence of surface roughness and surface-free energy on supra- and subgingival plaque formation in man
J Periodontol 1995; 22; 1-14
43. Rölla G, Robrish SA, Bowen WH
Interaction of hydroxyapatite and protein-coated hydroxyapatite with streptococcus mutans and streptococcus sanguis
Acta path microbiol scand Sect. B; 1977; 85; 341-346
44. Rose RK
Binding characteristics of streptococcus mutans for calcium and casein phosphopeptide
Caries Res 2000; 34; 427-231
45. Schade KH
Lichtmikroskopie: Technologie und Anwendung
Verlag Moderne Industrie, Landsberg/Lech, 1993
46. Scheie AA
Mechanisms of dental plaque formation
Adv Dent Res 1994; 8; 246-253
47. Schüpbach P, Neeser JR, Golliard M, Rouvet M, Guggenheim B
Incorporation of caseinoglycomacropptide and caseinophospho-peptide into the salivary pellicle inhibits adherence of Streptococcus mutans
J Dent Res 1996; 75; 1779-1788

48. Shaw JH, Ensfield BJ, Wollman DH
Studies on the relation of dairy products to dental caries in caries-susceptible rats
J Nutr 1959; 67; 253-273
49. Sukontapatipark W, El-Agroudi MA, Selliseth NJ, Thunold K, Selvig KA
Bacterial colonization associated with fixed orthodontic appliances. A scanning electron microscopy study
Europ J Orthod 2001; 23; 475-484
50. Theilade J
Structure of dental plaque
Textbook of clinical periodontology
Munksgaard, Kopenhagen 1989; 99-105
51. Tschernin M
Oberflächeneigenschaften von Zahnrestaurationsmaterialien
Med. Diss, München 2003
52. Vadillo-Rodriguez V, Busscher HJ, Norde W, de Vries J, van der Mei HC
Relation between macroscopic and microscopic adhesion of *Streptococcus mitis* strains to surfaces
Microbiology 2004; 150; 1915-1022
53. Weintraub JA, Hilton JF, White JM, Hoover CI, Wycoff KL, Yu L, Larrick JW, Featherstone JDB
Clinical trial of a plant-derived antibody on recolonization of mutans streptococci
Caries Res 2005; 39; 241-250

Internetliteratur:

- I. www.deutsches-museum.de/ausstell/meister/rtm.htm, 20.12.2005
- II. www.zoologie-skript.de/methoden/, 20.12.2005
- III. www.zoosyst-berlin.de/methoden/TEM.html, 20.12.2005

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

‰	Promille
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
3D	dreidimensional
A. viscosus	Actinomyces viscosus
Abb.	Abbildung
AB-Medium III	Antibiotika-Nachweis-Boullion Nr. 3
ACP	amorphes Calciumphosphat
AFM	Rasterkraftmikroskop („atomic force microscop“)
Anz.	Anzahl
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ca ²⁺	Kalzium-Ionen
CLSM	konfokales Laser-Scanning Mikroskop
cm	Centimeter
CPP	Caseinphosphopeptid
CWL	konfokaler Weißlichtsensor
d. h.	das heißt
g	Gramm
Gew %	Gewichtsprozent
GMP	Glukomakropeptid
GTF	Glukosyltransferase
h	Stunde
i. d. R.	in der Regel
IgA, IgG, IgM	Immunglobulin A, G, M
kDa	Kilo-Dalton
LTA	Lipoteichonsäure

mbar	Millibar
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MW	Mittelwert
nm	Nanometer
PO ₄ ⁻	Phospat-Ionen
REM	Rasterelektronenmikroskop
RTM	Rastertunnelmikroskop
s	Sekunde
S. mutans, S. mitis,...	Streptokokkus mutans, Streptokokkus mitis,...
s. o.	siehe oben
SA I/II	Surface-Antigen I/II
slgA	sekretorisches Immunglobulin A
sog.	sogenannte(r)
sRmax	maximale Rautiefe
sRp	Glättungstiefe
sRv	maximale Riefentiefe
sRz	gemittelte Rautiefe
Tab.	Tabelle
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
u. a.	unter anderem
u. U.	unter Umständen
UV-Licht	ultraviolettes Licht
v. a.	vor allem
VH	Vickershärte
z. B.	zum Beispiel

7.2 Abbildungsverzeichnis

Zelldichtemessung einer Streptokokkenkolonie								
Messung Nr.	Uhrzeit	Zeit (h)	Probe I	Probe II	Probe III	Probe IV	Probe V	MW
1	9:45	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00
2	10:45	1	0.02	0.06	0.06	0.03	0.03	0.04
3	11:45	2	0.13	0.12	0.17	0.11	0.14	0.13
4	12:45	3	0.23	0.22	0.28	0.23	0.26	0.24
5	13:45	4	0.36	0.30	0.35	0.35	0.36	0.34
6	14:45	5	0.51	0.45	0.49	0.51	0.53	0.50
7	15:45	6	0.59	0.52	0.60	0.58	0.58	0.57
8	16:45	7	0.75	0.68	0.67	0.72	0.74	0.71
9	17:45	8	0.79	0.74	0.75	0.77	0.79	0.77
10	18:45	9	0.87	0.82	0.86	0.87	0.87	0.86
11	19:45	10	0.93	0.85	0.87	0.93	0.94	0.90
12	20:45	11	0.99	0.94	0.91	1.01	1.02	0.97
13	21:45	12	1.02	0.93	0.94	0.95	1.03	0.97
14	22:45	13	1.05	0.97	0.99	1.05	1.07	1.03
15	23:45	14	1.08	1.02	1.03	1.05	1.09	1.05
16	0:45	15	1.08	1.03	1.04	1.04	1.09	1.06
17	1:45	16	1.06	0.99	0.99	1.03	1.06	1.03
18	2:45	17	1.05	0.98	1.02	1.01	1.03	1.01
19	3:45	18	1.00	0.93	0.97	0.94	0.96	0.95
20	4:45	19	0.97	0.89	0.94	0.93	0.94	0.93
21	5:45	20	0.91	0.88	0.91	0.90	0.97	0.92
22	6:45	21	0.94	0.90	0.88	0.93	0.97	0.92
23	7:45	22	0.90	0.87	0.88	0.91	0.94	0.90
24	8:45	23	0.88	0.85	0.86	0.89	0.92	0.88
25	9:45	24	0.87	0.84	0.88	0.90	0.91	0.88
26	10:45	25	0.83	0.80	0.83	0.90	0.87	0.85
27	11:45	26	0.77	0.78	0.82	0.87	0.84	0.83
28	12:45	27	0.76	0.76	0.81	0.84	0.84	0.81
29	13:45	28	0.74	0.72	0.78	0.79	0.81	0.78
30	14:45	29	0.72	0.71	0.76	0.78	0.79	0.76
31	15:45	30	0.74	0.71	0.78	0.81	0.81	0.78

Tab 1: Erste Versuchsreihe (Versuch1) zur Erstellung einer Wachstumskurve für *S. mutans*; Daten der Zelldichtemessungen

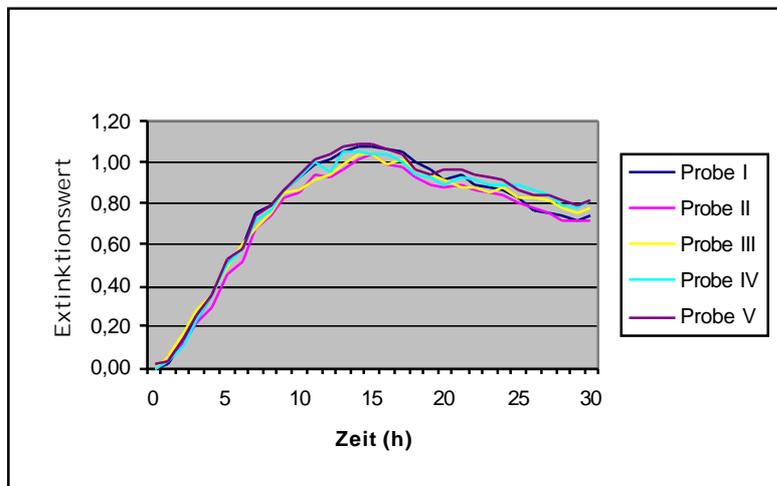


Abb. 44: Vorläufig ermittelte Wachstumskurve von *S. mutans*; erstellt aus den Daten der ersten Zelldichtemessungen (siehe Tab. 1, Versuch 1)

Nr.	t (h)	Fr. I	Fr. II	Fr. III	25µl I	25µl II	25µl III	25µl IV	25µl V	50µl I	50µl II	50µl III	50µl IV	50µl V	100µl I	100µl II	100µl III	100µl IV	100µl V
0		0,02	0,02	0,02	0,03	0,04	0,00	0,00	0,02	0,00	0,00	-0,01	-0,02	0,01	0,02	0,02	0,01	0,00	0,00
1	0	0,00	0,00	-0,01	0,00	0,00	-0,02	0,00	-0,02	-0,01	-0,02	-0,01	0,01	-0,02	-0,01	0,02	0,00	0,01	0,00
2	1	0,04	0,04	0,03	0,02	0,03	0,01	0,03	0,00	0,02	0,04	0,05	0,08	0,03	0,08	0,07	0,08	0,07	0,08
3	2	0,14	0,16	0,14	0,09	0,09	0,07	0,10	0,07	0,13	0,13	0,15	0,13	0,15	0,21	0,22	0,22	0,22	0,24
4	3	0,28	0,27	0,29	0,19	0,22	0,20	0,18	0,20	0,30	0,36	0,36	0,37	0,36	0,42	0,37	0,36	0,38	0,36
5	4	0,44	0,42	0,45	0,32	0,38	0,38	0,38	0,39	0,48	0,48	0,54	0,58	0,57	0,60	0,58	0,56	0,59	0,56
6	5	0,61	0,61	0,58	0,51	0,52	0,50	0,54	0,55	0,64	0,68	0,73	0,76	0,75	0,71	0,69	0,69	0,69	0,66
7	6	0,69	0,68	0,68	0,65	0,67	0,63	0,69	0,62	0,74	0,77	0,85	0,88	0,87	0,86	0,81	0,77	0,79	0,77
8	7	0,80	0,81	0,78	0,74	0,80	0,74	0,79	0,74	0,87	0,89	0,97	1,01	0,93	0,95	0,94	0,86	0,87	0,85
9	8	0,86	0,89	0,85	0,79	0,87	0,81	0,89	0,84	0,93	1,00	1,03	1,10	0,99	1,02	0,97	0,92	0,97	0,96
10	9	0,93	0,95	0,89	0,84	0,95	0,89	0,94	0,92	0,97	1,00	1,01	1,07	0,97	1,02	0,97	0,96	0,98	1,02
11	10	0,99	1,02	0,95	0,94	1,02	0,96	1,01	0,96	1,02	1,00	1,02	1,07	0,97	1,00	0,98	1,00	1,07	1,02
12	11	1,02	1,03	0,99	0,93	1,02	0,99	1,02	0,97	0,98	0,94	0,97	1,02	0,94	0,99	0,98	0,97	1,01	1,01
13	12	0,99	1,02	0,99	0,92	1,05	0,99	1,02	0,98	1,01	0,93	0,93	1,03	0,90	0,93	0,94	0,96	1,01	0,97
14	13	0,95	0,97	0,93	0,89	0,97	0,94	0,96	0,98	0,89	0,85	0,90	0,96	0,86	0,89	0,90	0,89	0,96	0,93
15	14	0,93	0,98	0,95	0,87	0,95	0,93	0,95	0,90	0,89	0,87	0,92	0,95	0,85	0,92	0,89	0,90	0,92	0,94
16	15	0,91	0,94	0,89	0,87	0,93	0,91	0,91	0,89	0,88	0,83	0,88	0,93	0,81	0,87	0,87	0,89	0,87	0,90
17	16	0,86	0,87	0,87	0,81	0,91	0,88	0,90	0,86	0,84	0,82	0,85	0,93	0,82	0,87	0,84	0,83	0,82	0,90
18	17	0,81	0,82	0,80	0,75	0,84	0,83	0,84	0,82	0,81	0,80	0,83	0,89	0,82	0,84	0,80	0,81	0,81	0,87
19	18	0,83	0,85	0,80	0,76	0,84	0,78	0,84	0,84	0,81	0,81	0,84	0,90	0,80	0,86	0,80	0,81	0,82	0,90
20	19	0,76	0,81	0,75	0,71	0,78	0,73	0,79	0,79	0,77	0,75	0,79	0,87	0,78	0,82	0,78	0,77	0,80	0,83
21	20	0,73	0,79	0,72	0,69	0,77	0,72	0,79	0,78	0,76	0,75	0,80	0,85	0,73	0,80	0,76	0,76	0,79	0,82
22	21	0,74	0,78	0,72	0,67	0,77	0,67	0,79	0,78	0,76	0,74	0,79	0,83	0,72	0,80	0,76	0,75	0,79	0,80
23	22	0,77	0,80	0,74	0,70	0,80	0,72	0,80	0,79	0,78	0,77	0,80	0,83	0,73	0,81	0,75	0,78	0,79	0,83
24	23	0,71	0,75	0,69	0,64	0,77	0,68	0,76	0,76	0,73	0,71	0,76	0,81	0,71	0,79	0,70	0,73	0,76	0,78
25	24	0,74	0,75	0,70	0,65	0,77	0,70	0,77	0,77	0,72	0,75	0,76	0,83	0,71	0,78	0,73	0,75	0,78	0,81
26	25	0,71	0,73	0,68	0,65	0,72	0,67	0,72	0,76	0,71	0,68	0,74	0,80	0,68	0,77	0,70	0,72	0,76	0,77
27	26	0,73	0,74	0,69	0,65	0,74	0,65	0,75	0,74	0,69	0,68	0,74	0,80	0,70	0,77	0,71	0,74	0,78	0,79
28	27	0,74	0,75	0,69	0,66	0,74	0,65	0,74	0,76	0,70	0,68	0,74	0,80	0,70	0,77	0,71	0,74	0,77	0,78
29	28	0,76	0,78	0,70	0,67	0,77	0,67	0,76	0,76	0,70	0,69	0,75	0,80	0,70	0,78	0,71	0,76	0,78	0,78
30	29	0,73	0,78	0,68	0,64	0,74	0,64	0,72	0,73	0,66	0,65	0,72	0,77	0,69	0,75	0,69	0,74	0,75	0,76
31	30	0,75	0,77	0,67	0,65	0,75	0,64	0,76	0,75	0,65	0,67	0,71	0,79	0,69	0,76	0,70	0,74	0,78	0,78

Tab. 2: Zweite Versuchsreihe (Versuch 2) zur Reproduzierbarkeit der Wachstumskurve von *S. mutans*; Daten der Zelldichtemessungen aller Proben (Fr=frische Bakterien in der Suspension, 25 µl, 50 µl, 100 µl = 25, 50, 100 µl Bakterien in der Suspension)

Vergleichstabelle Mittelwerte (Versuch 1 und 2)						
Messung Nr.	Zeit (h)	MW (1-50)	MW (2-25)	MW (2-50)	MW (2-100)	MW (2-frisch)
1	0	0.00	-0.01	-0.01	0.00	0.00
2	1	0.04	0.02	0.04	0.08	0.04
3	2	0.13	0.08	0.14	0.22	0.15
4	3	0.24	0.20	0.35	0.38	0.28
5	4	0.34	0.37	0.53	0.58	0.44
6	5	0.50	0.52	0.71	0.69	0.60
7	6	0.57	0.65	0.82	0.80	0.68
8	7	0.71	0.76	0.93	0.89	0.80
9	8	0.77	0.84	1.01	0.97	0.87
10	9	0.86	0.91	1.00	0.99	0.92
11	10	0.90	0.98	1.02	1.01	0.99
12	11	0.97	0.99	0.97	0.99	1.01
13	12	0.97	0.99	0.96	0.96	1.00
14	13	1.03	0.95	0.89	0.91	0.95
15	14	1.05	0.92	0.90	0.91	0.95
16	15	1.06	0.90	0.87	0.88	0.91
17	16	1.03	0.87	0.85	0.85	0.87
18	17	1.01	0.82	0.83	0.83	0.81
19	18	0.95	0.81	0.83	0.84	0.83
20	19	0.93	0.76	0.79	0.80	0.77
21	20	0.92	0.75	0.78	0.79	0.75
22	21	0.92	0.74	0.77	0.78	0.75
23	22	0.90	0.76	0.78	0.79	0.77
24	23	0.88	0.72	0.74	0.75	0.72
25	24	0.88	0.73	0.75	0.77	0.73
26	25	0.85	0.70	0.72	0.74	0.71
27	26	0.83	0.71	0.72	0.76	0.72
28	27	0.81	0.71	0.72	0.75	0.73
29	28	0.78	0.73	0.73	0.76	0.75
30	29	0.76	0.69	0.70	0.74	0.73
31	30	0.78	0.71	0.70	0.75	0.73

Tab. 3:
Versuchsreihen zur Erstellung einer Wachstumskurve für *S. mutans*, gemittelte Daten der Zelldichtemessungen (Versuch 1 und 2)

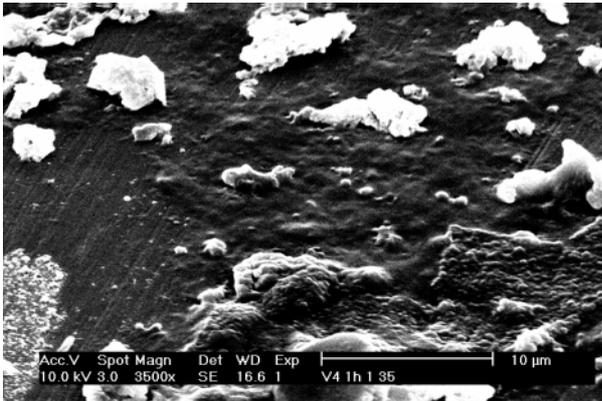


Abb. 45 a: Probe 1



Abb. 45 b: Probe 2

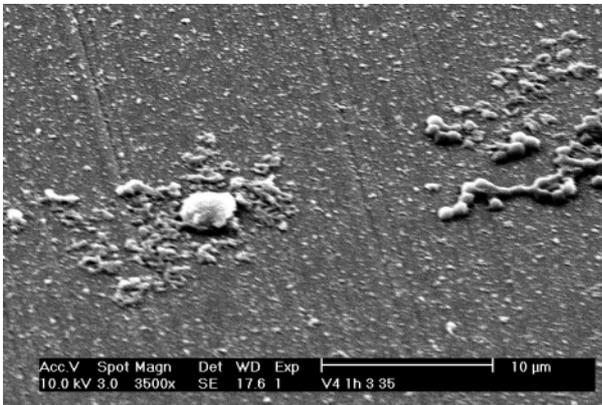


Abb. 45 c: Probe 3

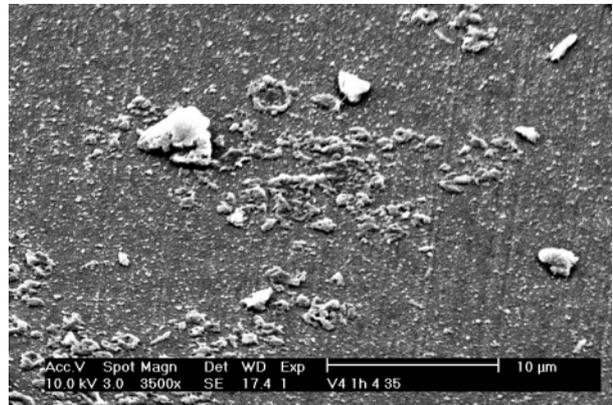


Abb. 45 d: Probe 4

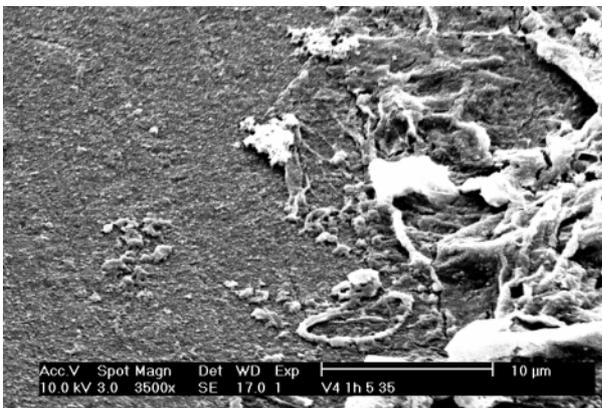


Abb. 45 e: Probe 5

Abb. 45 a-e:
Auswertung der Vorversuche: Pelli-
kelbeschichtete Schmelzproben nach
5 h Pelliikelbildung im Speichelbad
und anschließender bakterieller Kon-
tamination in der Streptokokken sus-
pension für 1 h, es zeigt sich ein eher
inhomogener Überzug der Schmelz-
oberfläche, Streptokokken lassen
sich nicht definitiv ausmachen; REM
x3500

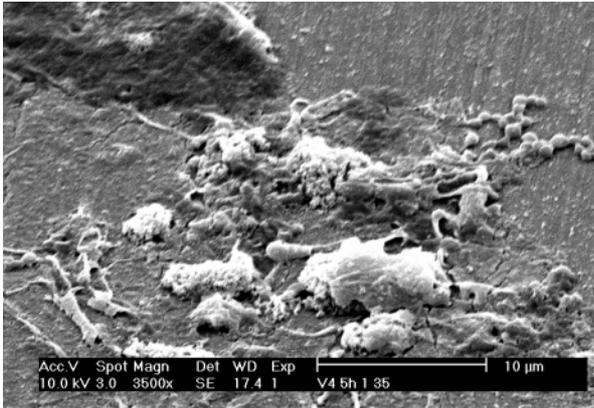


Abb. 46 a: Probe 1

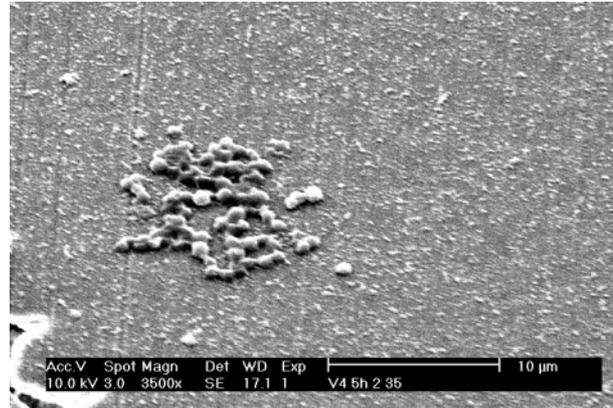


Abb. 46 b: Probe 2

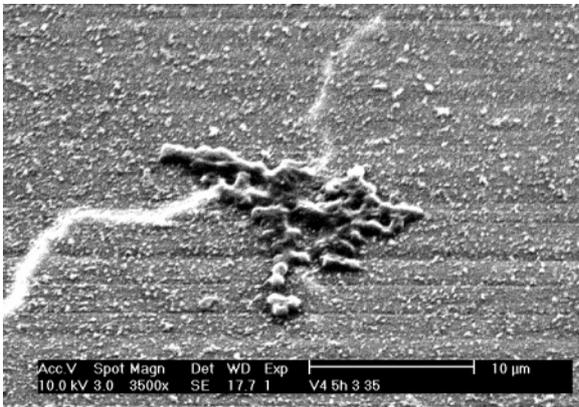


Abb. 46 c: Probe 3

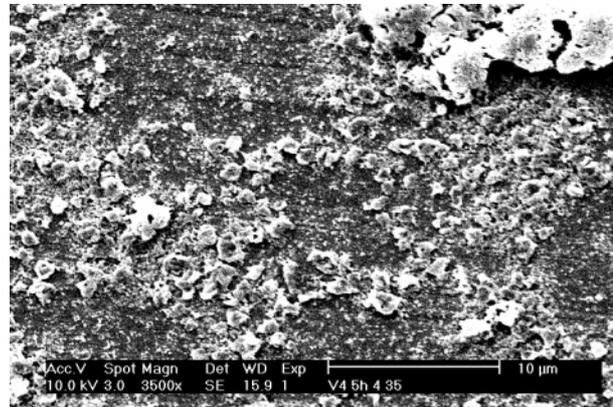


Abb. 46 d: Probe 4

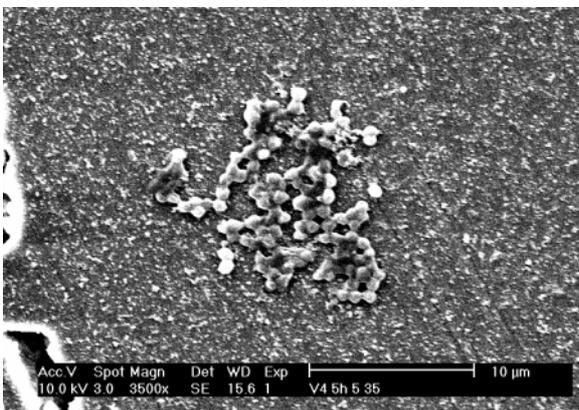
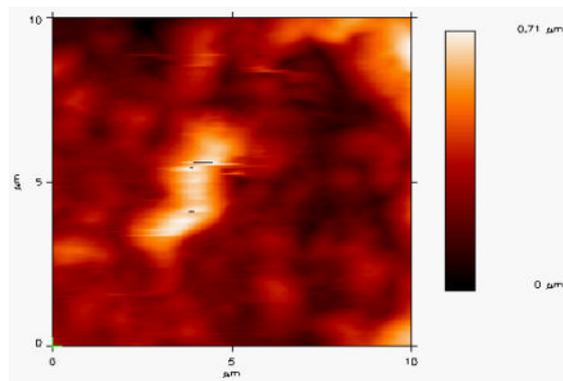


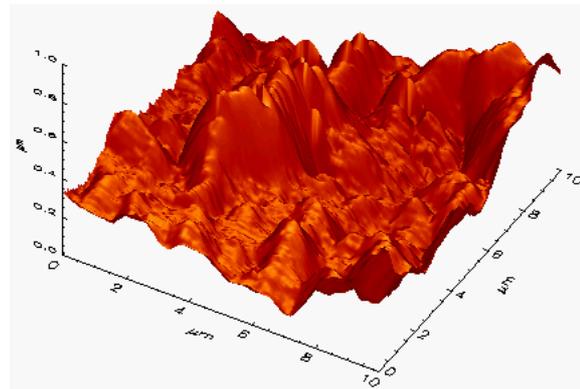
Abb. 46 e: Probe 5

Abb. 46 a-e:
Auswertung der Vorversuche: Pelli-
kelbeschichtete Schmelzproben nach
5 h Pelliikelbildung im Speichelbad
und anschließender bakterieller Kon-
tamination mit Streptokokkensus-
pension für 5 h, die Schmelzoberflä-
che ist mit einer feingranulierten
Schicht bedeckt auf der kugelige Zellen
auflagern, Form und Größe der
Zellen lassen auf die Anlagerung von
S. mutans schließen; REM, 3500x

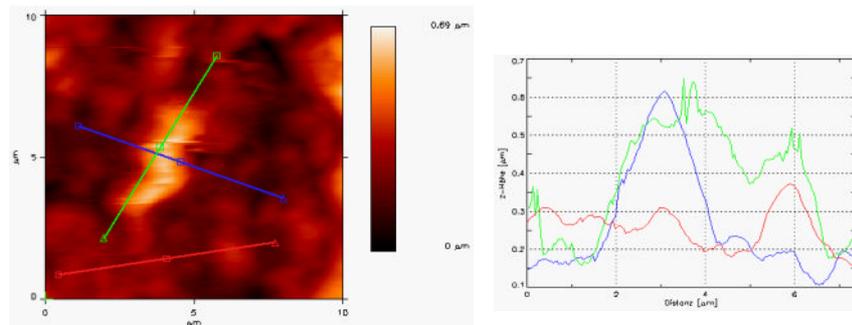
AFM-Rohdaten



3D-Darstellung



Profilanalyse



REM-Darstellung

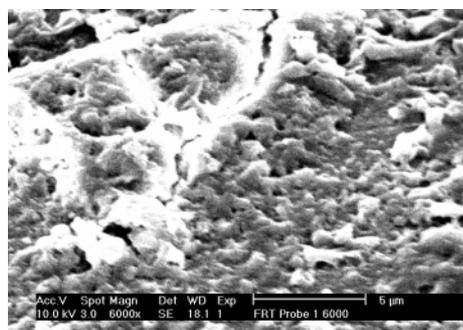


Abb. 47: Übersicht über die genutzten hochauflösenden Darstellungs- und Analyseformen im Rahmen der Studie

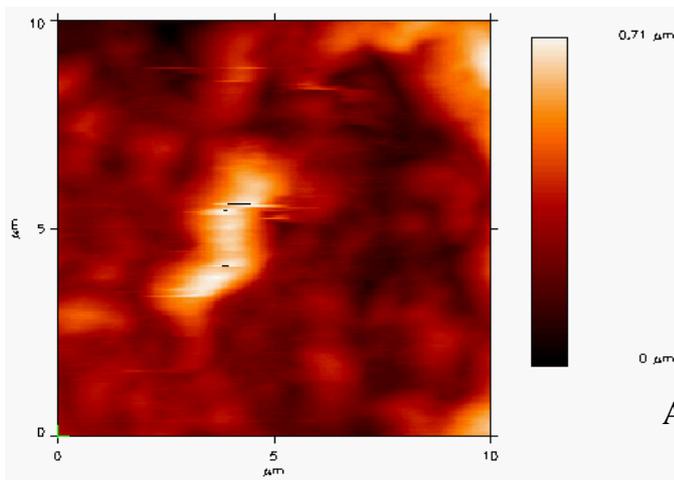


Abb. 48a: P01-04

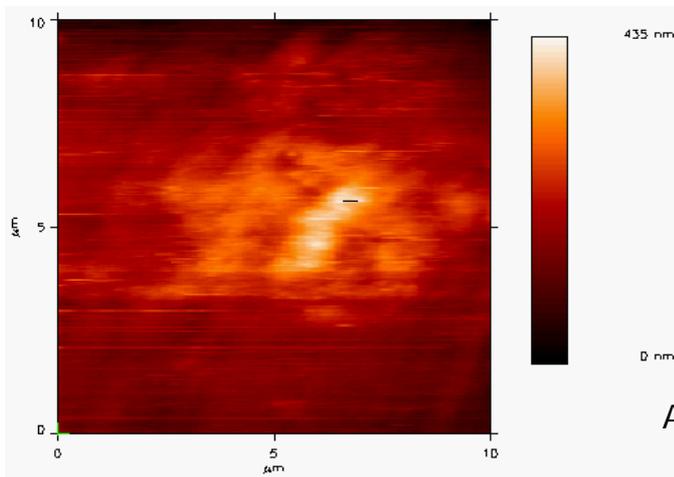


Abb. 48b: P02-04

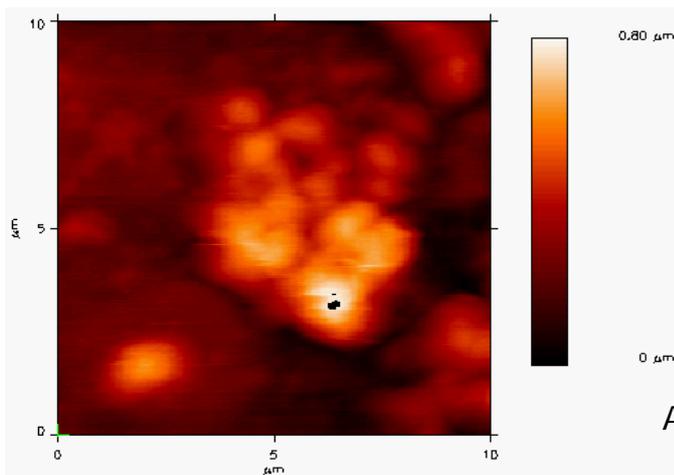


Abb. 48c: P03-04

Abb. 48 a-c:

Darstellung der Rohdaten der einzelnen Probenabschnitte, höhere Probenabschnitte werden heller dargestellt, tiefere dunkel; deutlich sind in allen Proben sehr helle Flecken zu erkennen; AFM, 10 x 10 μm , 256 x 256 Bildpunkte

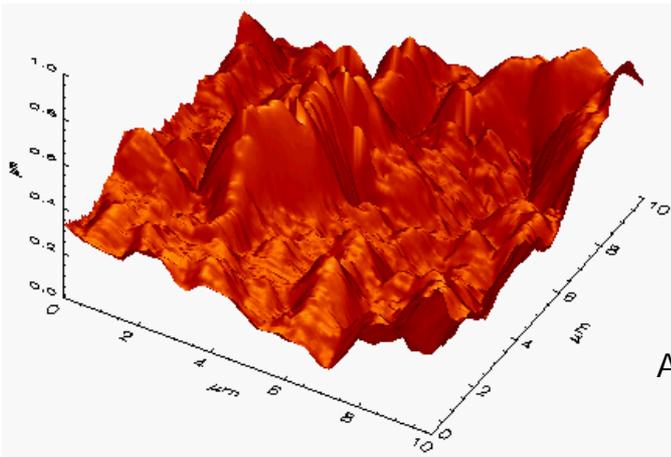


Abb. 49a: P01-04

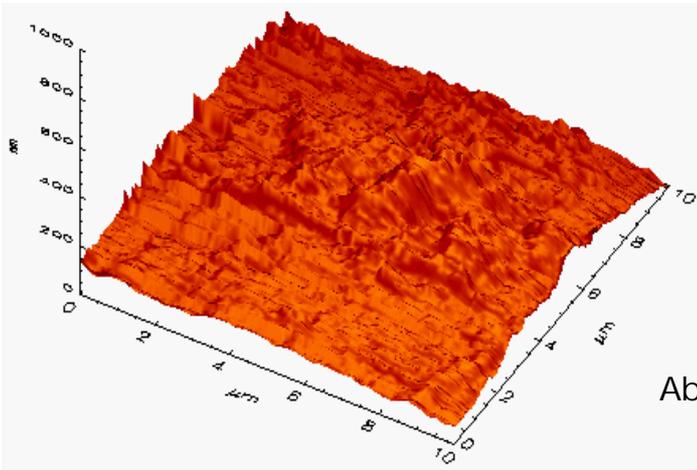


Abb. 49b: P02-04

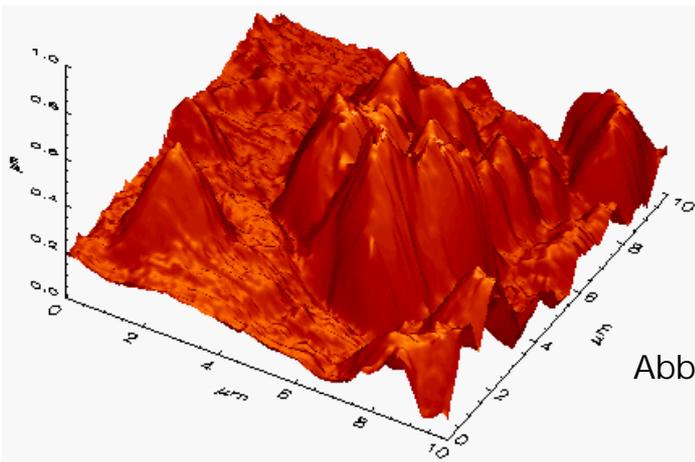


Abb. 49c: P03-04

Abb. 49 a-c:
 morphologische Darstellung der einzelnen Probenabschnitte in 3D, man erkennt eine deutlich ausgeprägt wellige Oberfläche mit Spitzen bei bis zu $0,8 \mu\text{m}$; AFM, $10 \times 10 \mu\text{m}$, 256×256 Bildpunkte

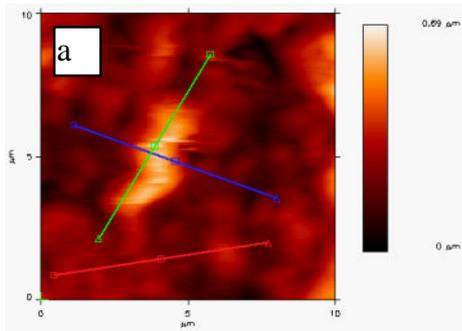


Abb. 50 a + b: P01-04

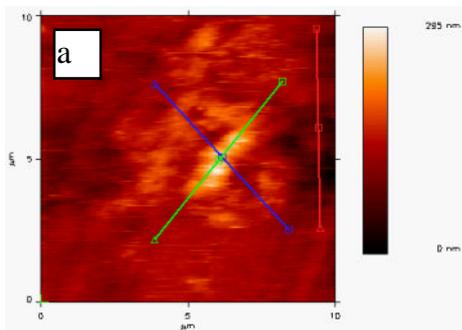
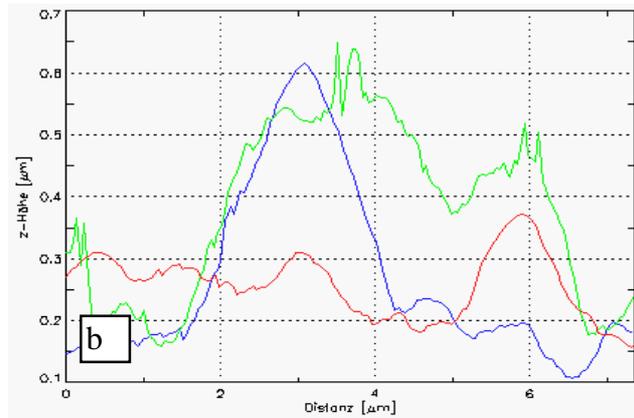


Abb. 51 a + b: P02-04

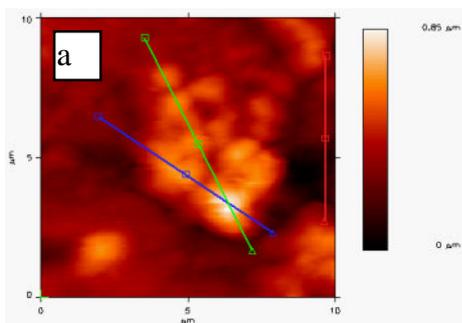
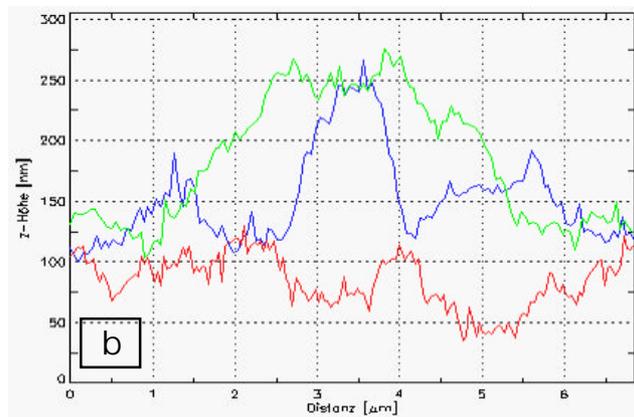


Abb. 52 a + b: P03-04

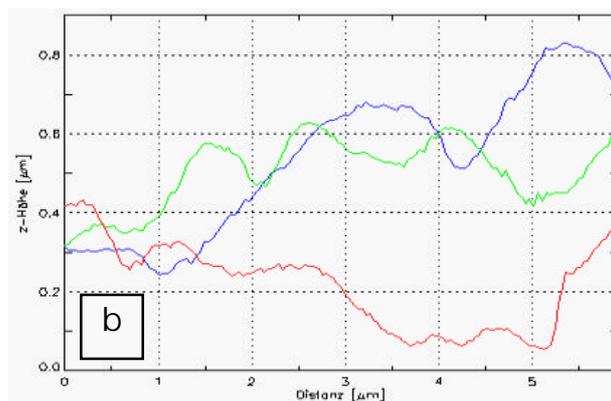


Abb. 50-52:
 Rohdatenbild der einzelnen Probenausschnitte mit dem Verlauf der Profillinien für die Profilanalyse (a) und grafische Darstellung der gezogenen Profile in einem Diagramm (b)

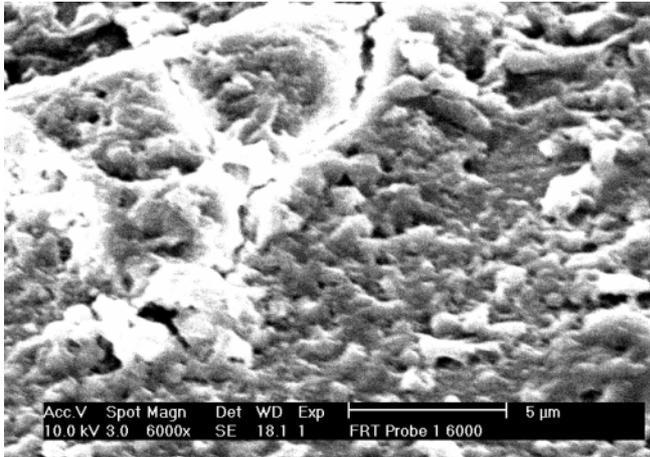


Abb. 53 a: P01-04

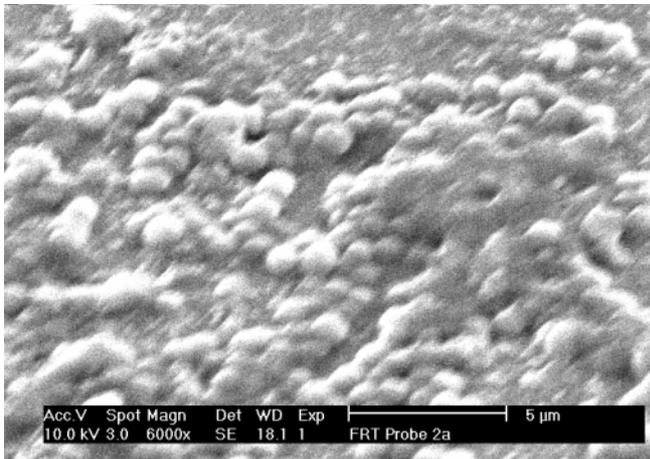


Abb. 53 b: P02-04

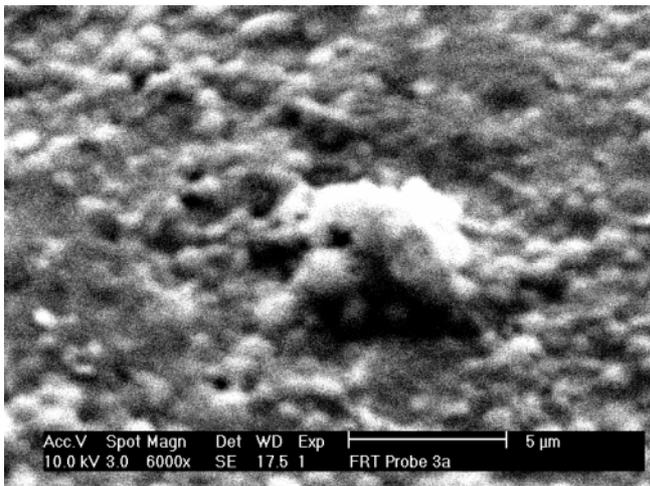


Abb. 53 c: P03-04

Abb. 53 a-c:
Schmelzproben nach 5 h Pellicelbildung im Speichelbad und anschließend bakterieller Kontamination für 5 h in der Streptokokken-Suspension, es sind deutliche, konfluierende Auflagerungen zu erkennen; REM x6000

gemittelte Rautiefe	
sRz, AFM 10 μ m	
Probe	Abstand in μ m
01-04	0,509
01-06a	0,894
01-06b	0,137
02-04	0,191
02-05	0,357
02-06	0,285
03-04	0,357
03-05	0,414
03-06	0,506

Tab. 4:
gemittelte Rautiefen der AFM-
Ausschnitte

maximale Rautiefe	
sRmax, AFM 10 μ m	
Probe	Abstand in μ m
01-04	0,567
01-06a	1,163
01-06b	0,173
02-04	0,227
02-05	0,550
02-06	0,373
03-04	0,481
03-05	0,623
03-06	0,707

Tab. 5:
maximale Rautiefen der AFM-
Ausschnitte

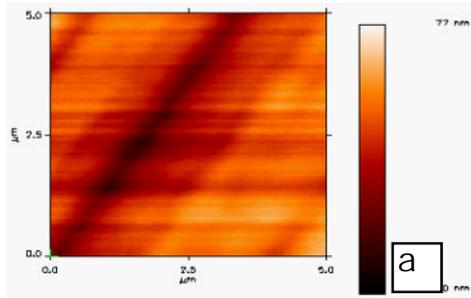
Glättungstiefe	
sRp, AFM 10 μ m	
Probe	Abstand in μ m
01-04	0,412
01-06a	0,878
01-06b	0,148
02-04	0,170
02-05	0,332
02-06	0,257
03-04	0,295
03-05	0,381
03-06	0,410

Tab. 6:
Glättungstiefen der AFM-
Ausschnitte

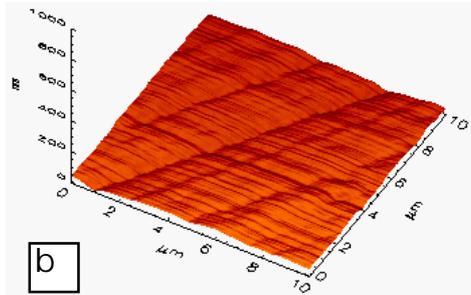
maximale Riefentiefe	
sRv, AFM 10 μ m	
Probe	Abstand in μ m
01-04	0,211
01-06a	0,367
01-06b	0,078
02-04	0,099
02-05	0,217
02-06	0,157
03-04	0,187
03-05	0,260
03-06	0,297

Tab. 7:
maximale Riefentiefe der AFM-
Ausschnitte

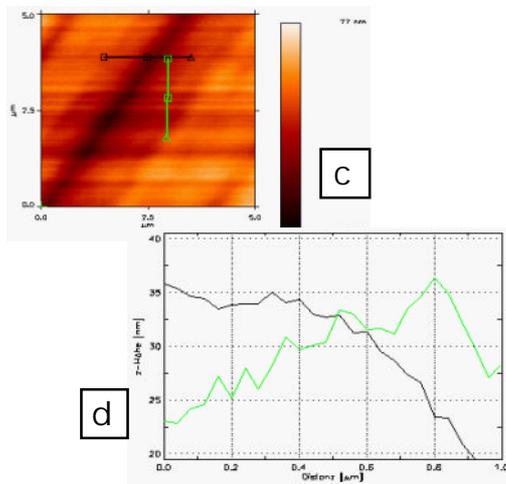
Rohdaten



3D



Profilanalyse



REM

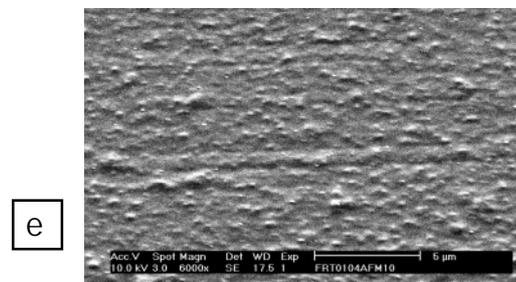
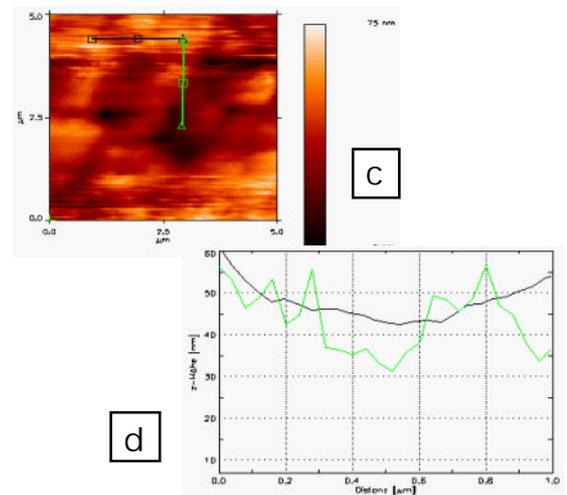
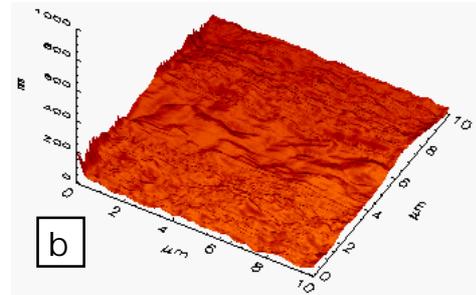
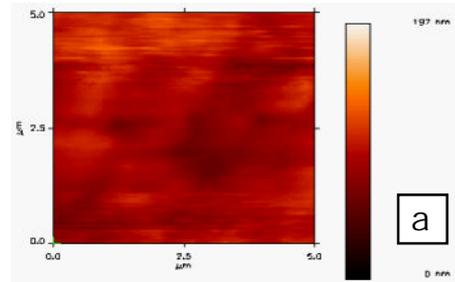
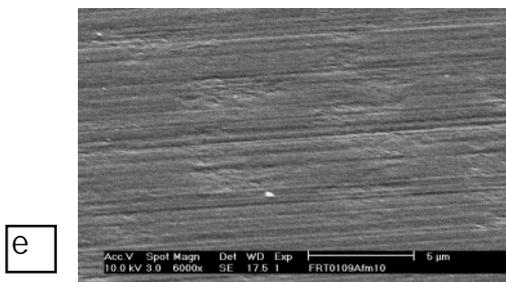


Abb. 54 a-e:
Übersicht aller Darstellungs- und Analyseformen bei Probe Z01-PR;
Schmelzprobe mit President abgedeckt für 6 h im Speichelbad;
AFM, 10 x 10 μm , 256 x 256 Bildpunkte + REM, x6000

Abb. 55 a-e:
Übersicht aller Darstellungs- und Analyseformen bei Probe Z01-SP;
Schmelzprobe, nicht abgedeckt für 6 h im Speichelbad;
AFM, 10 x 10 μm , 256 x 256 Bildpunkte + REM, x6000

7.3 Herstellerverzeichnis

1. Biochrom, Cambridge, England
2. BOC Ltd., Crawley (Sussex), England
3. Coltène Whaledent GmbH & Co. KG, Langenau, Deutschland
4. DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland
5. EXACT Apparatebau GmbH, Norderstedt, Deutschland
6. FRT GmbH – Fries Research & Technology, Bergisch-Gladbach, Deutschland
7. H + P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim, Deutschland
8. Heraeus Kulzer, Dormagen, Deutschland
9. J. Weck GmbH & Co. KG, Wehr, Deutschland
10. Kerr Hawe, Bioggio, Schweiz
11. L & R® Mfg. Co., Kearny, USA
12. Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
13. Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
14. Nalge Company, Rochester (NY), USA
15. Oxoid LTD, Basingstoke (Hampshire), England
16. Philips, Eindhoven, Niederlande
17. Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland
18. Schleicher und Schuell, Dassel, Deutschland
19. Struers® GmbH, Willich, Deutschland
20. Voco GmbH, Cuxhaven, Deutschland
21. Wassermann Dental-Maschinen GmbH, Hamburg, Deutschland

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Doktorarbeit unterstützt haben.

Herrn Prof. Dr. Matthias Frentzen danke ich für die freundliche Überlassung des Themas und für die hilfreiche Betreuung während aller Phasen dieser Arbeit.

Frau M. Lange danke ich für die Unterstützung beim Umgang mit den technischen Geräten im Labor und für die großartige Hilfe bei der Durchführung manch langwieriger Versuchsreihe.

Bei Frau Hanke bedanke ich mich für die Hilfestellung bei der Literaturrecherche.

Frau Judith Friedrich und Frau Andrea Zolper danke ich für viele hilfreiche Tipps und für die Unterstützung während so mancher „Nachtschicht“.

Ich danke auch Frau Carmen Weirauch. Sie hat für diese Arbeit wertvolle Vorarbeit im Rahmen ihrer Studie gemacht und mich wunderbar in das Thema eingewiesen.

Vor allem aber möchte ich meinen Eltern danken, die mich in allen Phasen meines Lebens so großartig unterstützt haben. Für ihr Verständnis und das Mutmachen insbesondere auch in schlechten Phasen danke ich Ihnen ganz herzlich.

Meinem Vater ein weiterer Dank für die zeitintensive Durchsicht meiner Manuskripte.