

Modell zur vitalmikroskopischen Biofilmobservation am Beispiel von
Streptococcus mutans

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

Matthias Bach
Schwelm

2009

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Matthias Frentzen
2. Gutachter: Prof. Dr. Helmut Stark

Tag der Mündlichen Prüfung: 02.10.2009

Aus der Poliklinik für Parodontologie, Zahnerhaltung und Präventive Zahnheilkunde 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 unter http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	7
EINFÜHRUNG.....	9
EINFÜHRUNG INS THEMA	9
AUFBAU UND STRUKTUR ORALER BIOFILME	11
<i>Zahnoberfläche</i>	11
<i>Speichel</i>	12
<i>Pellikel</i>	14
<i>Plaque</i>	17
Initiale Plaque.....	18
Mittelalte Plaque.....	18
Alte Plaque mit Milieuverschiebung	19
Beeinflussung der Bakterienadhäsion.....	19
S. Mutans-Bindungsmechanismen	20
Impfung – Die aktive Immunisierung.....	20
Lokale passive Immunisierung	21
Mukosale Immunsierung	21
Replacement Therapy	22
UNTERSUCHUNGSTECHNIKEN ZUR ANALYSE VON BIOFILMEN	22
<i>Einführung</i>	22
<i>Lichtmikroskope</i>	23
<i>Fluoreszenzmikroskope</i>	23
<i>Konfokale Laserrastermikroskope (CLSM)</i>	24
<i>Vitalfluoreszenz</i>	25
<i>Elektronenmikroskope</i>	25
<i>Ziel der Studie</i>	26
MATERIAL UND METHODE.....	27
MIKROORGANISMEN.....	27
VERHALTEN VON MIKROORGANISMEN IN GESCHLOSSENEN SYSTEMEN	27
KAMMERN/OBJEKTTRÄGER.....	29
MIKROSKOP UND SOFTWARE.....	31
PELLIKELBILDUNG.....	32
HERSTELLUNG DES NÄHRMEDIUMS.....	33
GEWINNUNG DER MIKROORGANISMEN	33
FÄRBEN DER BAKTERIEN.....	34

VERSUCHSABLAUF	36
AUSWERTUNG	37
<i>Auswertung mit LSM</i>	37
<i>Statistische Auswertung</i>	37
ERGEBNIS	38
DISKUSSION	48
PRIMÄRE ERGEBNISSE	48
BEWERTUNG DER DARSTELLUNGSFORM	48
PROBLEM DER QUANTIFIZIERUNG	49
AUSBLICK.....	50
ZUSAMMENFASSUNG.....	51
ANHANG	52
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	52
LITERATURVERZEICHNIS	64
HERSTELLERVERZEICHNIS	74

Abkürzungsverzeichnis

1	°C	Grad Celsius
2	µl	Mikroliter
3	µm	Mikrometer
4	µm ²	Quadratmikrometer
5	2D / 3D	zwei- / dreidimensional
6	Abb.	Abb.
7	AB-Medium III	Antibiotika-Nachweis-Boullion Nr. 3
8	Aqua dest.	Destilliertes Wasser
9	CLSM	konfokales Laser-Scanning Mikroskop
10	EB	Ethidiumbromid
11	EM	Elektronenmikroskop
12	EPs	extrazelluläre Polysaccharide
13	FDA	Fluoresceindiacetat
14	g	Gramm
15	GBP	Glukan-bindendes-Protein
16	Gew %	Gewichtsprozent
17	GTF	Glykosyltransferase
18	h	Stunde
19	HAKs	Hydroxylapatitkristalle
20	IgA, IgG, IgM, IgY usw.	Immunglobulin A, G, M, Y usw.
21	KHN	Knoop-hardness-numbers
22	LDH	Laktatdehydrogenase
23	ml	Milliliter
24	mM	Millimol
25	mm	Millimeter
26	mosmol/L	Milliosmolarität
27	nm	Nanometer
28	PRPs	prolin-reiche Proteine
29	REM	Rasterelektronenmikroskop
30	s	Sekunde
31	S. Mutans, S. Mitis,...	Streptokokkus mutans, Streptokokkus mitis,...

32	SA I/II	Surface-Antigen I/II
33	Sap1	Cystatin SA-III pellicle precursor
34	sIgA	sekretorisches Immunglobulin A
35	Tab.	Tabelle
36	TEM	Transmissionselektronenmikroskop
37	UV-Licht	ultraviolettes Licht

Einführung

Einführung ins Thema

Schätzungsweise 65 % aller vorkommenden Infektionserkrankungen in der industrialisierten Welt gehen auf Biofilme zurück. Sie verursachen außerdem Millionenschäden in Industrie und Technik durch Besiedelung von Tanks und Leitungssystemen aller Art, z. B. durch mikrobiell induzierte Korrosion (Jenkinson and Lappin-Scott, 2001). Einfache Systeme zur Simulation und Observation von Biofilmen können zu ihrem grundlegenden Verständnis beitragen. Ziel dieser Untersuchung war es ein solches System zu evaluieren.

Die Organisation von Biofilmen hat Vorteile für das einzelne Bakterium. Sie erlauben die Speicherung von Nährstoffen, um natürliche Limitation auszugleichen. Ferner erlauben sie Stoffwechselsynergien und dienen dem Schutz gegen Austrocknen, Scherkräften, antimikrobiellen Agenzien und Phagozytose (Schade, 2005). Die Entfernung und Abtötung von Biofilmen ist chemisch-mechanisch am effizientesten, aber z.B. in Rohrsystemen in den meisten Fällen nur mit unverhältnismäßigem Aufwand durchführbar. Die ausschließlich chemische Reinigung führt häufig nur zur Abtötung der oberflächlich gelegenen Keime (Gilbert et al., 1997). Der Biofilm bleibt am Ort, ist weiterhin pathogen und dient frei flotierenden Mikroorganismen als Anlagerungsstelle.

Laut WHO (World Health Organisation) leiden 60 – 90 % der Schulkinder weltweit an kariösen Läsionen. Parodontalerkrankungen werden bei 5 – 20 % der Erwachsenen mittleren Alters gefunden (WHO, 2007). Bei der Entstehung dieser beiden Erkrankungen spielt die Anwesenheit von säuretoleranten Mikroorganismen, die in oralen Biofilmen vorkommen, eine herausragende Rolle (van Houte, 1994).

Die Mundhöhlenoberflächen sind mit einem Film aus Speichelprodukten, dem sog. Pellikel, bekleidet. Entdeckt und benannt wurde es 1963 von Dawes.

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



Das Pellikel besitzt Schutzfunktionen, ermöglicht jedoch auf der anderen Seite pathogenen Keimen Adhäsion an der Zahnoberfläche.

Orale Mikroorganismen binden an das Pellikel und bilden ihrerseits Biofilme (dentale Plaque). Die Produkte ihrer Stoffwechselleistung können Hart- und Weichgewebe direkt schädigen oder Wirtsreaktionen hervorrufen, die bei entsprechender Prädisposition zu irreversibler Schädigung u. a. des Zahnhalteapparats führt. Antonie van Leeuwenhoek (1632 - 1723) beschrieb als Erster die dentale Plaque, von der er damals annahm, dass sie hauptsächlich aus Speiseresten bestehe. Er veröffentlichte seinerzeit erstmalig Zeichnungen von Bakterien aus menschlichen Zahnbelägen.

Die Mundhöhle bietet den Mikroorganismen günstige Verhältnisse. Gleichbleibende Temperatur, konstante Feuchtigkeit, die regelmäßige Zufuhr von Nährstoffen und die Vielzahl an Nischen führen zu einer komplexen Flora. Neben Bakterien findet man auch Hefen und Protozoen, die ein Gleichgewicht bilden, das elementar ist für die Aufrechterhaltung der Mundgesundheit. Wird dieses Gleichgewicht gestört (z.B. durch mangelhafte Mundhygiene oder Antibiotika), kann es zu pathologischen Folgeerscheinungen kommen (z.B. Infektion mit *Candida albicans*, Gingivitis, Parodontitis oder Karies). Die meisten Infektionen der Mundhöhle gehen auf eine Verschiebung in der Flora und nicht durch von außen hinzugetretene Keime zurück. Die alleinige Anwesenheit von kariogenen oder pathogenen Keimen jedoch ist nicht gleichbedeutend mit einer Infektion (Marsh, 2006).

Über die Zusammensetzung von oraler Plaque gibt es bereits viele Erkenntnisse. Aufgrund unzureichender technischer Möglichkeiten wurde jedoch die Morphologie der oralen Biofilme bisher unzureichend untersucht. Neue Techniken, wie die konfokalen Fluoreszenzmikroskopie in Kombination mit geeigneten Färbemethoden, bieten die Möglichkeit, Biofilme räumlich und zeitlich in ihrer Entwicklung zu untersuchen ohne sie zu zerstören (Roderfeld et al., 2003; Watson, 1991). Ähnlich einer Tomographie können Schnittbilder durch feste oder feuchte Proben angefertigt werden. Mit Hilfe von Tot/Lebend-Färbungen (Vitalfluoreszenz oder auch Live/Dead stains) ließe sich, im geeigneten Versuchsaufbau, auch die Auswirkung von Medikamenten auf die dentale Plaque ermitteln und topographisch aufschlüsseln. Ein solcher, an orale Mikroorganismen angepasster, Versuchsaufbau sollte im Rahmen der vorliegenden Studie erprobt werden.

Aufbau und Struktur oraler Biofilme

Zahnoberfläche

Der Zahnschmelz ist ein Zellprodukt, kein Gewebe, und bedeckt den größten Teil der freien Zahnoberfläche. Von Ameloblasten gebildet, ist er mit einer Dichte von 2,8 bis 3,0 g/cm³ und einer Härte von 250 bis 390 KHN (Knoop-hardness-numbers) die härteste Substanz des menschlichen Körpers.

Schmelzproben weisen einen anorganischen Anteil von 93 bis 98 Gew % auf. Der Wasseranteil schwankt zwischen 1,5 und 4%. In geringen Mengen sind organische Substanzen zu finden, die während des Mineralisationsprozesses zurückbleiben.

Die Reifung von ektodermalen Zellen zu Ameloblasten beginnt in der embryonalen Entwicklung und wird durch wechselseitige Induktion mit den benachbarten Präodontoblasten gesteuert.

Die Schmelzbildung verläuft in drei Schritten:

1. Produktion der Schmelzmatrix und initiale Mineralisation
2. Resorption von Wasser und organischen Matrixbestandteilen
3. Sekundäre Mineralisation

Der relative Anteil an anorganischer Substanz wird in jedem Schritt erhöht. Im Gegensatz dazu ist der Anteil organischer Bestandteile äußerst gering und enthält, anders als Knochen, kein Kollagen. Im Rahmen der posteruptiven Schmelzreifung lagern sich Minerale aus dem Speichel in den Schmelz des durchgebrochenen Zahnes ein. Fehlstellen können so ausgeglichen werden.

Der Schmelz ist nicht homogen aufgebaut, sondern weist je nach Region unterschiedliche strukturelle Merkmale auf.

Im Bereich der kleinsten enthaltenen Strukturen findet man nanofibrilläre Hydroxylapatitkristalle [HAK] mit Durchmessern von ca. 30 - 40 nm. Die nanofibrillären HAKs liegen in Gruppen zusammen und bilden Fibrillen mit Durchmessern von ca. 80 - 130 nm, diese liegen wiederum in größeren Verbänden, den Kristallfasern zusammen (ca. 800 nm). Aus diesen Kristallfasern sind die sog. Schmelzprismen (Durchmesser ca. 5 - 8 µm und Länge von ca. 9 µm) und die interprismatische Substanz zusammengesetzt.

Während die nanofibrilläre HAKs weitgehend parallel in den Fibrillen liegen, divergieren die Achsen der Fibrillen je nach Lage im Prisma bis zu 30° . Zentral liegen die Fibrillen parallel zum Prisma und sind peripher nach außen geneigt (Cui and Ge, 2007; Meckel et al., 1965). Im rechten Winkel zur Achse angeschnitten, offenbart sich ein hexagonaler, rombohedraler bis schlüssellochförmiger Querschnitt. Dicht gepackt liegen die parallelen Fasern von weniger dichten, weil divergierenden, Fasern umfaßt.

Auch im Größeren findet man Unterschiede in der Schmelzstruktur. In der ersten Schicht, die dem Dentin aufliegt, finden wir homogenes Material, das durch gleichgerichtete Kristalle und das Fehlen von Tomes'schen Fortsätzen charakterisiert ist.

Der Schmelzkern weist Tomes'sche Fortsätze auf und läßt Prismenstäbe und interprismatische Substanz erkennen. Die Schmelzprismen verlaufen nicht gradlinig, sondern geschwungen. Dies führt zum optischen Phänomen der Hunter-Schreger-Faserstreifung und zu einer höheren Widerstandskraft des Materials.

Die zur Mundhöhle gewandte Schmelzschicht ist prismenfrei und durch abwechselnde Vertiefungen und Vorwölbungen geprägt, welche beim frisch durchgebrochenen Zahn mit bloßem Auge erkennbar sind. Diese sog. Perikymatien gehen beim physiologischen Gebrauch des stomatognathen Systems durch Abrasion, Attrition und Erosion verloren.

Speichel

Speichel ist das Sekret der drei großen, paarig angelegten, und den kleinen Speicheldrüsen. Er benetzt die Strukturen der Mundhöhle kontinuierlich. In der Mundhöhle vermischen sich der Speichel der einzelnen Drüsen, Bakterien, Epithelzellen sowie zelluläre und nichtzelluläre Bestandteile der Sulkusflüssigkeit und bilden den sogenannten Mischspeichel. Die drei großen paarigen Speicheldrüsen sind die Ohrspeicheldrüse (Glandula parotis), die Unterkieferdrüse (Glandula submandibularis) und die Unterzungendrüse (Glandula sublingualis). Außer ihnen existieren noch die kleineren Drüsen in der Schleimhaut von Lippe, Wange, Gaumen und Zunge. Die Speichel der einzelnen Drüsen unterscheiden sich in der Menge der Sekretion und in der Zusammensetzung.

Die Speichelbildung ist zweiphasig:

Die Sekretion des Primärspeichels findet in den Acini der Drüsen statt: Natrium- und Chloridionen werden aktiv in das Lumen der Acini sezerniert. Aufgrund des osmotischen Druckes tritt in der Folge auch Wasser über.

In den Speicheldrüsengängen kommt es zur Modifikation des Primärspeichels. Bei geringer Flussrate ist der Speichel hypoton (80 - 90 mosmol/L) und nähert sich bei hoher Flußrate der Osmolarität von Plasma an. Speichel ist ein von der Drüse und dem Zeitpunkt individuell abhängig zusammengesetztes Sekret (Speckmann, 1999). Die täglich von einem gesunden Erwachsenen produzierte Speichelmenge beträgt ca. 0,5 – 1,5 l (Schmidt et al., 2000). Die Sekretionsmenge und Speichelzusammensetzung hängen auch von Geschlecht, Alter und Ernährung des Individuums ab. Sie werden durch äußere und innere Reize reguliert und erfordern zugleich die Regulation der Speicheldrüsendurchblutung, die bei Bedarf um das fünffache gesteigert werden kann.

Die Speichelzusammensetzung:

Speichelbestandteile sind Wasser (95 - 99 %), anorganische und organische Substanzen. Die Varianz in den beiden letztgenannten Gruppen ist sehr stark.

Anorganische Bestandteile sind z.B. Natrium, Kalium, Kalzium, Phosphat, Chlorid, Magnesium, Hydrogenkarbonat und Fluorid.

Zu den organischen Anteilen zählen in der Hauptsache Enzyme, Proteine, Glykoproteine, Lipide und Proteinfragmente.

Es sind heute etwa 25 bis 35 verschiedene Proteine in stimuliertem Speichel identifiziert. Prolinreiche Proteine [PRPs] (Gibbons et al., 1988) und Amylase (Ptyalin) sind am häufigsten vertreten (Azen, 1978). Amylase spaltet Stärke, Glykogen und anderen Glukosepolymeren in Dextrine. Sie arbeitet nur in Anwesenheit von Kalzium und bei einem pH-Optimum von 5,6 – 6,9. Saure Speisen können daher die Verstoffwechselung von Stärke vor dem Eintritt in den Magen behindern.

PRPs und das kleine Protein Statherin hemmen das Ausfallen von Kalziumphosphat (Moreno et al., 1979). PRPs binden mit hoher Affinität an Hydroxylapatit (Bennick et al., 1979; Hay, 1967) und fixieren Calciumionen (Bennick et al., 1983a; Bennick et al., 1983b). Sie verhindern dadurch Kristallbildung in der mit Kalziumionen übersättigten Lösung. Orale Mikroorganismen können an PRPs und andere Speichelproteine binden (Gillece-Castro et al., 1991; Levine et al., 1987).

Lysozym wirkt durch die Lyse von Bakterienzellwänden bakterizid. Es wirkt nur auf grampositive Bakterien, da es Murein spaltet und den gramnegativen Mikroorganismen dieser Zellwandbestandteil fehlt (Jenkins, 1978). Auch Laktoferrin und das Laktoperoxidasesystem wirken antibakteriell.

Speichel dient der Reinigung der Mundhöhle und schützt die Mundschleimhäute und Lippen vor Austrocknung. Er wirkt als Gleitmittel bei der Nahrungsaufnahme und Stimmbildung. Speichel transportiert Geschmacksstoffe zu ihren Rezeptoren und Antigene zu den lymphatischen Organen des Waldeyer'schen Rings.

Er besitzt zwei wichtige Puffersysteme, den Phosphat- und den Bikarbonatpuffer. Der Bikarbonatpuffer spielt eine wichtige Rolle während einer kariogenen Attacke. Bikarbonat diffundiert durch die Plaque und neutralisiert organische Säuren (Lehmann K, 1998). Der Phosphatpuffer hingegen hat keine entscheidende Funktion in der Säurebildungsphase. Durch Speichel werden nicht nur körpereigene, sondern auch körperfremde Stoffe (z. B. Medikamente) ausgeschieden.

Die verminderte Speichelsekretion wird als Hyposiali bezeichnet. Ist die Speichelsekretion stark vermindert bis komplett ausgefallen spricht man von Xerostomie, der Mundtrockenheit. Beide Erkrankungen können weitreichende Folgen für die Zahngesundheit und Lebensqualität des betroffenen Patienten haben (Imfeld, 1984). Ursachen für den verminderten Speichelfluss können z. B. mangelnde Flüssigkeitszufuhr, die Nichtanlage oder Fehlbildung von Speicheldrüsen, das Sjögren-Syndrom, Diabetes mellitus, das Parkinson-Syndrom, Sarkoidose, Angst, Depression und Streß, Nebenwirkungen von Medikamenten oder die Bestrahlung von Tumoren im Kopf-Hals-Bereich sein (Newbrun, 1989). Die Therapie ist in Abhängigkeit der Krankheitsursache zu wählen. So können diätische Veränderungen positiven Einfluss ausüben oder xerogene Medikamente umgestellt werden. Beim Sjögren-Syndrom kann die Sekretion mit Pilocarpin und Cevimelin stimuliert werden. Die Xerostomie nach Radiatio ist zur Zeit noch unbefriedigend therapierbar. Die Patienten produzieren häufig so wenig Speichel, dass sie Speichelersatzpräparate zuführen müssen.

Pellikel

Auf allen freien und gereinigten Oberflächen der Mundhöhle bildet sich in vivo innerhalb weniger Minuten ein wenige Nanometer bis zu 1 µm dickes Häutchen, das Pellikel (Hannig and

Bossmann, 1989a; Hannig and Bossmann, 1989b; Tinanoff et al., 1976). Dawes et al. gaben ihm 1963 den Namen "the acquired pellicle" und beschrieben es als azellulären und bakterienfreien Film. Im deutschsprachigen Raum werden die Bezeichnungen „Schmelzoberhäutchen“, „erworbenes Schmelzoberhäutchen“ oder „Zahnoberhäutchen“ synonym verwendet.

Seit seiner Entdeckung im Jahre 1839 wurde über die Herkunft des Pellikels spekuliert. Die Adsorption von Speichelproteinen am Zahnschmelz ist heute als Entstehungsmechanismus allgemein anerkannt. Sie löst damit die seit Mitte des 19. Jahrhunderts geltende Vorstellung der embryonalen Herkunft ab.

Da sich die Proteinkonzentrationen im Speichel und im Pellikel unterscheiden gehen wir heute von einer selektiven Adsorption von Proteinen an die Zahnoberfläche aus. Die Immobilisierung führt bei manchen Proteinen zur Veränderung der Tertiär- und Sekundärstruktur. Trotzdem ist enzymatische Aktivität im Pellikel nachgewiesen. Eine Erklärung dafür bieten die sehr großen mizellenartigen globulären Proteine (100 - 200 nm Durchmesser), die in den Ohrspeicheldrüsen gebildet werden und Amylase und Lysozyme enthalten. Aufgrund ihrer Größe ist nur ein geringer Teil von Strukturveränderungen betroffen und enzymatisch aktive Kompartimente bleiben von den Veränderungen unberührt. Wir finden ebenso Enzyme bakteriellen Ursprungs, wie die Glykosyltransferase im Pellikel. Diese soll die Anlagerung von *Streptokokkus mutans* durch direkte Bindung und Bildung extrazellulärer Glukane unterstützen. Aber auch körpereigene Enzyme, wie die Amylase, können positive Eigenschaften für die Bakterien besitzen in dem sie, wie in diesem Beispiel, deren Stoffwechsel unterstützen (Hannig et al., 2005).

Die unterschiedlichsten Proteine und deren Fragmente bilden das Pellikel. U. a. wurden Poly-Ig-Rezeptor, IgA, IgM, IgG, Laktoferrin, Lysozym, high-molecular-weight mucin, Karbon-Anhydrasen, Albumin, Complement C3/C3c, α -Amylase, Cystatin S, Lipocalin-1, Cystatin SN1 (isoform 1), Cystatin SN2 (isoform 2), Cystatin SA-III pellicle precursor (Sap1), Calgranulin B, saure und glykosylierte PRPs, low-molecular-weight mucin, Statherin, Histatin 1, Glukosyltransferase und Proteinfragmente in in vitro und/oder in vivo gewonnenen Pellikeln nachgewiesen (Lendenmann et al., 2000; Li et al., 2004a; Li et al., 2004b)

Neben Proteinen finden sich in Pellikelproben u.a. Aminosäuren, Kohlenhydrate, Bestandteile und Produkte der Sulkusflüssigkeit, abgeschilfter Zellen und Bakterien in Pellikelproben. Hannig definiert das Pellikel jedoch als bakterienfrei (Hannig et al., 2005).

Die starken Schwankungen in der Speichelzusammensetzung (Dawes and MacPherson, 1993; Sas and Dawes, 1997) schlagen sich in divergierenden Zusammensetzungen des Pellikels nieder.

Außerdem unterscheidet sich die Pellikelzusammensetzung beim selben Individuum lokal und in Abhängigkeit der Oberfläche (Material und Struktur) auf der die Adsorption stattfand.

Sonju und Rolla zeigten 1973, dass die Pellikelstärke innerhalb von 60 Minuten linear ansteigt und sich im Folgenden kaum noch verändert. Sie kommen daher zu dem Schluß, dass sich ein Gleichgewicht zwischen Adsorption und Desorption einstellt. Im Pellikel finden jedoch kontinuierlich chemische, teils enzymatische, Umbauvorgänge statt (Hannig et al., 2005). Ergo verändert sich die Pellikelstruktur stetig: ein junges Pellikel weist eine von globulären und glomerulären Strukturen geprägte Oberfläche auf. Auf Hydroxylapatitscheiben fand Lie nach zweistündiger Lagerung in der Mundhöhle granuläre Strukturen mit Durchmessern zwischen 25 und 125 nm, die teils stilartig mit der Probenoberfläche verbunden waren (Lie, 1977). Beim reifen Pellikel hingegen ist die Oberfläche eher homogen (Sonju and Rolla, 1973). Auch Verkalkungen speziell im Bereich der lingualen Flächen wurden beobachtet.

Das Pellikel liegt dem Zahnschmelz jedoch nicht nur auf, sondern dringt auch, in Form von Filamenten, in ihn ein. Dieses sogenannte "subsurface pellicle" ist hauptsächlich an den Approximalflächen lokalisiert (Hannig and Bossmann, 1989a; Leach and Saxton, 1966; Tinanoff et al., 1976).

Zur Entstehung des Pellikels gibt es zwei Theorien:

1. Die Glykoproteine des Speichels liegen in globulärer Form vor und sind aufgrund ihrer peripher liegenden Säurereste polar. Sie bleiben daher in Lösung. Durch das bakterielle Enzym Neuraminidase verlieren die Glykoproteine ihre Säurereste und fallen auf den Oberflächen der Mundhöhle aus (Leach and Saxton, 1966).

2. Das Pellikel entsteht durch elektrostatische Anziehung zwischen der sauren Oberfläche der Glykoproteine und dem positiv geladenen Kalzium des Hydroxylapatits der Zahnhartsubstanz. Die finale Stärke des Pellikels von ca. 1µm beruht auf der Neutralisation des elektromagnetischen Feldes (Sonju and Rolla, 1973).

Da sich beide Mechanismen nicht gegenseitig ausschließen, ist auch ihre Kombination vorstellbar.

Für den Menschen hat das Pellikel auch schützende Eigenschaften. Die Abrasion von Zahnhartsubstanz unter Verwendung fluoridhaltiger Zahnpasta ist bei pellikelgeschützten Zähnen geringer als bei pellikelfreien (Hannig and Bossmann, 1988). Der Glaube an einen mechanischen Schutz des Zahnes während der Kau- und Parafunktion durch eine Schmierwirkung ist weit verbreitet, wissenschaftlich jedoch nicht belegt.

Das Pellikel vermindert den Mineralverlust im sauren Milieu. Diese Schutzwirkung beschränkt sich gleichwohl auf kurze und schwache Säureexposition (C Hannig et al., 2004; Hannig et al., 2006; M Hannig et al., 2004; Hara et al., 2006). Sie scheint dennoch in vivo auszureichen, da trotz der ansteigenden Verbreitung von säurehaltigen Getränken kein Anstieg in der Fallzahl von Erosionen zu verzeichnen ist (Lendenmann et al., 2000).

Ein Zusammenhang zwischen Pellikelzusammensetzung und Kariesaktivität ist nachgewiesen, eine Interpretation mit praktischem Wert steht allerdings noch aus (Vitorino et al., 2006).

Auch wenn gezeigt wurde, dass Mikroorganismen kein Pellikel benötigen um die Zahnoberfläche zu besiedeln, modifiziert es die Zusammensetzung der Flora. So bindet *Streptokokkus mutans* langsamer und in geringerer Zahl an Glassoberflächen, wenn diese mit künstlich erzeugtem Pellikel aus zentrifugiertem humanem Speichel überzogen sind. Umgekehrt verhielt es sich im selben Versuch mit *S. Criteus*, *S. Rattus* und *S. Sobrinus*, die bei Anwesenheit eines Pellikels initial schneller adsorbierten (Busscher et al., 1992).

Auch auf kieferorthopädischen Brackets ist unterschiedlich ausgeprägte Anbindung von Bakterien beobachtet worden. Auf mit Pellikel beschickten Brackets wurden vermehrt *S. Gordonii* und vermindert *S. Mutans* identifiziert (Ahn et al., 2002).

Plaque

Als Plaque wird ein dentaler Biofilm bezeichnet (Costerton, 1997). Erstmals beschrieben wurde er 1898 von Black (Black, 1898). Plaque besteht u.a. aus Speichelbestandteilen, lebenden und toten Bakterien, abgeschilfertem Zellen, Nahrungsbestandteilen und den Produkten der enthaltenen Zellen. Plaque kann sich auf allen freiliegenden Zahn- und Restaurationsflächen bilden, ihre Entstehung beginnt dabei meist an sog. Prädilektionsstellen (Zahnzwischenräume, Zahnhälse, freiliegende Wurzeloberflächen, Fissuren, Grübchen und im Bereich des marginalen Sulkus).

Plaque ist ein ätiologischer Faktor der Karies, der parodontalen Erkrankungen (Embleton et al., 1998; Hardie and Bowden, 1975) und systemischer Erkrankungen (Loesche and Lopatin, 1998). In der menschlichen Plaque wurden mehr als 500 verschiedene Keime nachgewiesen (Rosan and Lamont, 2000), wobei durchschnittlich nur acht verschiedene Spezies identifiziert werden. Die mikrobiologische Zusammensetzung ist indes nicht immer gleich, sie variiert in verschiedenen Arealen der Mundhöhle (Marsh, 1999; Marsh and Bradshaw, 1995).

Initiale Plaque

Die Plaqueentstehung beginnt beim gereinigten Zahn mit der Entstehung des Pellikels. Der Kontakt zwischen Pellikel und Keim entsteht durch Braun'sche Molekularbewegung, Sedimentation, Strömung und aktive Bewegung motiler Keime. Innerhalb von wenigen Minuten adsorbieren einzelne Mikroorganismen am Pellikel, welches sie in der Folgezeit abbauen. Unter den Primärkolonisatoren befinden sich vorwiegend grampositive Kokken (*S. Sangius*, *S. Mitis*, *S. mutans*) und Aktinomyzeten (Ronstrom et al., 1977; Van Houte et al., 1970). Andere Autoren gehen davon aus, dass es sich bei den ersten Bakterien, die adhärieren, auch um tote Mikroorganismen handeln könnte, die ein Gerüst für die folgenden Bakterien bilden (Netuschil et al., 1998). In einer klinischen Studie konnte gezeigt werden, dass die Vitalität tatsächlich initial sehr niedrig (18 %) ist und später ansteigt (auf 62 %) (Weiger et al., 1995). Die Verteilung der verschiedenen Mikroorganismen auf der Zahnoberfläche unterscheidet sich signifikant von der im Speichel, was für die selektive Bindung zwischen bestimmten Mikroorganismen und den Pellikelproteinen spricht (Hellwig E., 2003).

Die initiale Plaque besteht in der Hauptsache aus grampositiven Kokken und wenigen Stäbchen. Auch Filamente und Anaerobier können nachgewiesen werden, ihre Anzahl ist aber gering.

Mittelalte Plaque

Zusätzlich zu weiteren Streptokokken, Aktinomyzeten und Veillonellen, die sich am Pellikel oder an den Primärkolonisatoren anlagern, kommt es zur Vermehrung durch Zellteilung.

Ortsständige Mikroorganismen ändern ihr Genexpressionsmuster und passen ihren Stoffwechsel der Situation im Verbund an. Das führt zu einem phänotypischen Wandel und zu Keimen, die vermehrt extrazelluläre Polysaccharide [EPs] (Gupta et al., 2006) und Toxine bilden (Koch, 2002). EPs vernetzen die Bakterien untereinander und unterstützen den Halt an der Zahnoberfläche und die Adhäsion weiterer Mikroorganismen. Von den Mikroorganismen sezernierte Saccharasen und Speichelenzyme bilden aus Zuckern der Nahrung lösliche Mono- und Oligosaccharide, die in der Plaque verstoffwechselt werden können und unlösliche Polysaccharide, die den Biofilm stabilisieren. Das Material zwischen den Zellen wird auch interzelluläre Matrix oder Plaquematrix genannt. An der Oberfläche wechseln Mikroorganismen

zwischen sesshafter und planktonischer Form, in Speichelsuspension, hin und her (Rudney, 2000).

Alte Plaque mit Milieuverschiebung

Wird die Plaque in ihrer Entwicklung nicht durch äußere Einflüsse gestört, setzt die Entwicklung fort. Einzelne Plaquekolonien verschmelzen miteinander und auch ihre Stärke nimmt zu. Die interzelluläre Matrix sorgt nun für so große Stabilität, dass der Biofilm nicht mehr durch die natürlichen Reinigungsmechanismen in der Mundhöhle entfernt werden kann. Wurde früher von einer kompakten homogenen Masse ausgegangen, wurden in Untersuchungen mit konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopen ein komplexes Kanal- und Hohlräumssystem gefunden, das mit Flüssigkeit gefüllt ist, die vermutlich zirkuliert (Wood et al., 2000). Die Dichte der Biomasse steigt in Richtung der Zahnoberfläche an, was eine Erklärung für die schlechte Penetration der Plaque mit Desinfizienzien oder Färbemitteln sein könnte (Robinson et al., 2006).

Während der zweiwöchigen Ausreifungsphase verschiebt sich das Bakterienmilieu. Der Anteil an Kokken sinkt von 80-90% auf 30-40%, während der von Stäbchen auf über 40% steigt. Auch Filamente, Fusiforme und bewegliche Stäbchen gewinnen auf Kosten der Kokken an Bedeutung. Es werden nun auch vermehrt Anaerobier gefunden (Loe et al., 1965; Ritz, 1967). Auch in Bezug auf die Gramfärbung sind Veränderungen zu verzeichnen. Der Anteil von gram-negativen Stäbchen steigt auf über 19% (Helderman, 1981). Diese Entwicklungen führen zu erhöhter Resistenz und Virulenz des Biofilms.

Menschen entwickeln Plaque unterschiedlich schnell. Dabei ist der Unterschied in der Initialphase am größten. Schon ab dem dritten Tag herrscht, bis auf den Umstand, dass schnelle Plaquebildner mehr interzelluläre Matrix aufweisen, große Ähnlichkeit (Zee et al., 1997).

Beeinflussung der Bakterienadhäsion

S. Mutans wird eine herausragende Rolle bei der Entstehung der Karies zugeschrieben. Seine Virulenz begründet sich auf drei Eigenschaften (Shimazaki et al., 2001):

1. Über Oberflächenproteine, sog. Adhäsine, bindet *S. mutans* an das Pellikel.

2. Sein Enzym Glykosyltransferase produziert unlösliche EPs, die S. Mutans Adhäsionunterstützen und ihm als Substratspeicher dienen.
3. S. Mutans ist azidogen und säuretolerant. Selbst im sauren Milieu werden saure Stoffwechselprodukte aktiv sezerniert.

S. Mutans-Bindungsmechanismen

S. mutans bindet initial an auf Oberflächen der Mundhöhle angelagerte oder sich in Lösung befindliche Speichelbestandteile. Das sind nicht nur von den Speicheldrüsen produzierte Speichelkomponenten, sondern können auch andere Bakterien oder bakteriellen Ursprungs sein. Andere Bindungspartner werden mit der Nahrung aufgenommen, gelangen als Teil der Sulkusflüssigkeit oder durch Refluxerkrankungen in die Mundhöhle. S. Mutans stellt auf seiner Oberfläche Rezeptoren aus, um Bindungen einzugehen. Fimbrien, Zellfortsätze auf seiner Oberfläche, sorgen für erhebliche Oberflächen- und Reichweitenvergrößerung. Der Rezeptor kann, wenn es zu Kontakt kommt, an einen Liganden binden (Gibbons, 1989). Die größte Rezeptorgruppe sind in der Antigen I/II-Familie zusammengefaßt (SA I/II), andere heißen P1, Spa und PAc. Sie binden an PRPs, Glykoproteine und SAG (parotid salivary agglutinin glycoprotein). Das Glukan-bindende-Protein (GBP) bindet an Glukane (Hannig, 2001; Jenkinson and Lamont, 1997).

In der Vergangenheit wurden verschiedene Ansätze entwickelt, um die Virulenz von S. Mutans zu reduzieren oder ganz auszuschalten. Die folgenden Abschnitte geben hierzu eine Übersicht.

Impfung – Die aktive Immunisierung

Bei der aktiven Immunisierung werden Antigene oder abgeschwächte Toxine in den zu impfenden Organismus eingebracht. Das Immunsystem erkennt die Antigene und beginnt mit der Produktion von Antikörpern. Kommt es zum nächsten Kontakt zwischen Organismus und Noxe wird sie durch die zuvor gebildeten Antikörper markiert und von der Immunabwehr abgeschaltet. Schon in den siebziger Jahren wurden erste Versuche zur Impfung gegen S. Mutans unternommen (Bowen et al., 1975) und die kurz bevorstehende Marktreife angekündigt. Im Tierversuch konnten auch Erfolge verzeichnet werden (Kruger et al., 2004; Taubman et al., 1995), die sich jedoch nicht so einfach auf den Menschen übertragen ließen. Gravierendstes

Problem waren die auftretenden Kreuzreaktionen. Serumantikörper gegen eingepflichte S. Mutans-Fragmente markierten auch Herzmuskelgewebe. In den letzten Jahren ist es daher etwas still geworden um die aktive Immunisierung.

Lokale passive Immunisierung

Der Grundgedanke der lokalen passiven Immunisierung beruht auf der Blockierung der S. Mutans- Adhäsine oder deren Liganden durch in die Mundhöhle eingebrachte Antikörper. Die Adhäsion auf der Zahnoberfläche und die Akkumulation, wichtige Faktoren der Kariogenität von S. Mutans, sollen so unterbunden werden. Im Falle der lokalen passiven Immunisierung werden die Antikörper von außen in die Mundhöhle eingebracht und können die Zahnoberflächenbesiedelung mit S. Mutans reduzieren (Ma et al., 1987). Verschiedene Ansätze zur Gewinnung der Antikörper werden zur Zeit verfolgt. Einige Forschergruppen greifen auf IgY aus Hühnereigelb (Kruger et al., 2004), andere auf Pflanzen (z.B. Tabak) zurück (Ma et al., 1994; Weintraub et al., 2005). Nachteile des Verfahrens liegen in der Notwendigkeit zur regelmäßigen Substitution der Antikörper, ihrer hohen Spezifität und der möglichen Auslösung von allergischen Reaktionen. Erste klinische Studien verliefen ohne Komplikationen durch Nebenwirkungen; die gewünschte Wirkung konnte jedoch auch nicht gezeigt werden (Weintraub et al., 2005).

Mukosale Immunisierung

In den Speicheldrüsen werden sekretorische Antikörper (sIgA) gegen S. Mutans gebildet. Liganden der Antikörper sind auch hier charakteristische Oberflächenproteine und die GTF. Stimulus für die Sekretion ist der Antigenkontakt an den ortsständigen lymphatischen Geweben. Die Menge an sIgA im Speichel ist jedoch sehr gering und muß zur effektiveren Bekämpfung von S. Mutans zusätzlich stimuliert werden. Dies geschieht mit Hilfe von Spülungen oder Sprays. Ziel der mukosalen Immunisierung ist nicht die Elimination von S. Mutans, sondern die Ausschaltung ihrer Virulenzfaktoren. Mikroorganismen in planktonischer Form werden von sIgA relativ gut erreicht, aufgrund seiner Größe diffundiert es jedoch schlecht in die Plaque (Hannig, 2001).

Replacement Therapy

Die Theorie hinter der Replacement Therapy ist die Verdrängung von *S. Mutans* durch einen nicht kariogenen Keim. Ein *S. Mutans*-Stamm ohne kariogene Eigenschaften und mit Vorteil bei der Besiedelung von Zahnoberflächen sollte geschaffen werden. Eine Forschergruppe um Hillman begann mit der Modifikation. Als Ursprungsstamm wurde JH 1140 gewählt. Er produziert Mutacin 1140, ein Lantibiotikum (lanthionin-containing antibiotic), das sich gegen ein breites Spektrum Gram-positiver Keime richtet (Smith et al., 2003). Mutacin 1140 sollte dem modifizierten Keim einen Vorteil bei der Besiedelung der Mundhöhle verschaffen. Der Genabschnitt mit den Informationen zur Laktatdehydrogenase (LDH), dem milchsäureproduzierenden Enzym von *S. mutans*, wurde entfernt. Um einem Stoffwechselungleichgewicht vorzubeugen ersetzte man LDH durch die Alkoholdehydrogenase. Der entstandene Keim namens BCS3-L1 produziert keine Milch- und insgesamt signifikant weniger Säure als sein Ursprungsstamm JH 1140. Im Tierversuch konnte gezeigt werden, dass BCS3-L1 Zahnoberflächen ebenso aggressiv kolonisiert wie JH 1140. Des Weiteren konnten nach sechs Monaten keine Veränderungen an inneren Organen der Versuchstiere festgestellt werden. Eine Rückbildung zur Milchsäurebildungsfähigkeit wurde nach sechs Monaten nicht beobachtet (Hillman et al., 2000). Die Ergebnisse sprachen für eine gute Kontrollierbarkeit. Jedoch birgt eine Infektion mit gentechnisch veränderten Mikroorganismen erhebliche Risiken. Insbesondere fürchteten die Forscher Endokartinfektionen. Daher wurde der Stamm vor ersten klinischen Versuchen am Menschen noch weiter modifiziert, um eine schnelle Eliminierung im Falle von unerwünschten Nebenwirkungen zu ermöglichen. Der neue Stamm, A2JM, ist von exogenen d-Alanin-Quellen abhängig und gilt als genetisch stabil (Hillman et al., 2007). Klinische Studien am Menschen werden seit langem angekündigt, stehen jedoch noch aus.

Untersuchungstechniken zur Analyse von Biofilmen

Einführung

Die Untersuchungstechniken zur Analyse von Biofilmen haben sich seit der Erstbeschreibung der Plaque im Jahre 1898 durch Black stetig entwickelt. Mit der Untersuchung ihrer makroskopischen optischen Eigenschaften begann die Biofilmforschung am Beispiel der oralen

Plaque. Es folgten die mikroskopische Analyse und weitere Untersuchungen von z. B. Dichte, der chemischen Zusammensetzung und des pH-Werts. Sie setzten jedoch stets kollektivierte Plaquematerialien voraus und gingen daher fast immer mit der Zerstörung der Plaquestruktur einher. Im letzten Jahrhundert wurden diese Untersuchungsmethoden modifiziert und exakter. Sie erlaubten tiefere Einblicke in immer kleiner werdende Teilbereiche der Plaque, bis die Forschung sich wieder der Biofilmstruktur zuwandte. Im Folgenden finden Sie eine Übersicht der wichtigsten optischen Untersuchungsmethoden der letzten 150 Jahre.

Lichtmikroskope

Zu Beginn der Biofilmforschung wurden einfache Durchlichtmikroskope verwendet. Dabei wird eine Probe auf einem Objektträger ausgestrichen oder nach Fixation im Dünnschnitt optisch untersucht. Die Probe darf dabei eine probenspezifische Stärke nicht überschreiten, um noch genügend Licht passieren zu lassen. Zur Untersuchung von lichtundurchlässigen Proben können Auflichtmikroskope verwendet werden. Sie erfassen das vom Objekt reflektierte Licht. Das Auflösungsvermögen von Lichtmikroskopen ist durch die Wellenlänge des sichtbaren Lichtes auf ca. $0,3 \mu\text{m}$ limitiert.

Auch inverse Mikroskope gehören der Gruppe der Lichtmikroskope an. Bei ihnen liegt das Objektiv unter dem Objektisch. Die Anordnung erlaubt eine grössere Dicke der Objekte.

Die einfache lichtmikroskopische Untersuchung ermöglichte erste Aussagen über die Struktur der Plaquebestandteile und die Unterteilung der Mikroorganismen nach Färbbarkeit und Form.

Fluoreszenzmikroskope

Bei Fluoreszenzmikroskopen handelt es sich zumeist um inverse Auflichtmikroskope. Laser oder Quecksilberdampflampen geben Licht einer definierten Wellenlänge ab und regen dadurch die Fluoreszenz von natürlich oder künstlich in die Probe eingebrachten Stoffen an. Diese sogenannten Fluorochrome geben dann eine ihnen spezifische Eigenstrahlung ab, die heute meist digital aufgezeichnet wird. Mit spezifischen Markern können Zellen, Zellverbände oder auch einzelne Moleküle markiert und nachgewiesen werden.

Verschiedene Fluorochrome werden angewandt um die Mikroorganismen einer Probe in tote und lebende zu unterteilen. Über die Verlässlichkeit solcher Färbungen darf jedoch gestritten werden.

Konfokale Laserrastermikroskope (CLSM)

Eine spezielle Art der Fluoreszenzmikroskopie ist die konfokale Laserrastermikroskopie (CSLM - confokal laser scanning microscope). Konfokal bedeutet, dass Lichtquelle und Detektor auf die selbe Schicht der Probe fokussieren. Dazu sind zwei Blenden nötig, eine für die Lichtquelle und eine für den Detektor (pinhole).

Als Lichtquelle dienen hier wie bei normalen Fluoreszenzmikroskopen Laser oder Quecksilberdampflampen, die fluoreszierende Farbstoffe anregen. Mit Hilfe der Illuminationslochblende wird, anders als beim Durchsichtmikroskop, nur ein kleiner Bereich um die fokussierte Schicht bestrahlt. Das vermeidet Streulicht, das sonst in den anderen Schichten entsteht. Hier liegt ein Vorteil gegenüber dem konventionellen Fluoreszenzmikroskop, das die Streustrahlung der gesamten Probe aufnimmt. Aufgefangen wird nur die Fluoreszenz der fokussierten Schicht, die bei minimaler Blendenöffnung bis zu 1 μm dünn sein kann und senkrecht zum Strahlengang steht. Die verbesserte Technik schlägt sich in höherer Auflösung (1,4-fach) und verbessertem Kontrast (bis zu 100-fach) im Vergleich zu konventionellen Fluoreszenzmikroskopen nieder (Roderfeld et al., 2003). Das Bild entsteht wie beim Rastermikroskop aus den einzelnen Punkten.

In der Regel stehen mehrere Kanäle zur Verfügung. So können z. B. verschiedene Farbstoffe und Phasenkontrast simultan gescannt und gegebenenfalls später digital zusammengesetzt werden. Die digitale Erfassung erlaubt eine verlustfreie Konservierung und Bearbeitung der Daten. Mit geeigneter Software können sukzessiv gewonnene Schnittbilder, sogenannte z-stacks (oder stacks), später zu dreidimensionalen Abbildern der Probe rekonstruiert und digital verarbeitet werden. Das „z“ steht hier für die Achse im Koordinatensystem, in der der Fokus in der Regel verschoben wird.

Das CLSM erlaubt die Untersuchung feuchter Proben und den Verzicht auf ihre Fixierung, so dass die sonst übliche Zerstörung oder Devitalisation des Biofilmes ausbleibt. Der Biofilm kann so über lange Zeiträume vital erhalten werden. Zur Beobachtung von vitalen Biofilmen verwendet man Kammersysteme mit stabilem Flüssigkeitsgehalt oder in Fließkammern, durch die kontinuierlich Medium hindurchfließt. Kammern mit stabilem Flüssigkeitsgehalt sind einfacher zu entwickeln, haben aber den Nachteil, dass das System kippt, wenn essentielle Nährstoffe zur Neige gehen oder schädliche Stoffwechselprodukte an Einfluß gewinnen. Der

Fließkammeraufbau ist komplexer, er erlaubt aber die Konstanthaltung des Mediums und bietet mehr Eingriffsmöglichkeiten. Die Strömung allerdings kann bei „Aufwuchsversuchen“ als Nachteil angesehen werden.

Vitalfluoreszenz

Die Vitalfluoreszenzuntersuchung (Live/Dead stain, Tot/Lebend-Färbung) von dentalen Biofilmen geht auf Netuschil zurück. Das Ziel war die Unterscheidung toter von lebenden Mikroorganismen in einer Probe durch Markierung mit spezifischen Farbstoffen. Er dokumentierte 1983 erstmals Vitalfluoreszenz unter Verwendung von Fluoresceindiacetat [FDA] und Ethidiumbromid [EB]. FDA ist farblos und muß vom Keim aufgenommen und enzymatisch zu einem Fluorogen verstoffwechselt werden. Die Funktionsfähigkeit des Stoffwechselapparats läßt auf einen intakten Keim schließen. EB ist ein relativ großes Molekül ($394,32 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) und bindet spezifisch an Nukleinsäuren. Diese kann EB nur über Defekte in der Zellwand erreichen. Heute ist die Vitalfluoreszenz eine anerkannte Methode zur Unterscheidung toter von lebenden Mikroorganismen (Auschill et al., 2001; Netuschil et al., 1998; Weiger et al., 1995).

Elektronenmikroskope

Elektronenmikroskope [EMs] sind in Ruhebild-EMs und Raster-EMs und in Reflexion-EMs und Transmissions-EMs zu unterscheiden. Bei Ruhebild-EMs wird das Objekt mit einem festehenden, ausgedehnten Elektronenstrahl bestrahlt, während ein Raster-EM das Objekt zeilenweise scannt. Bei Reflexions-EMs wird die vom Objekt reflektierte und beim Transmissions-EM die das Objekt passierende Strahlung erfaßt. Zwei Arten von Elektronen verlassen das Objekt. Nicht oder elastisch abgelenkte Teilchen mit hoher Energie, die sog. Primärelektronen, und durch nichtelastische Wechselwirkung aus dem Objekt herausgeschleuderte energiearme Teilchen, sog. Sekundärelektronen. EMs besitzen zwei Detektoren, je einen für jede Elektronenart. Sekundärelektronen bewegen sich relativ langsam und werden von einem positiv geladenen Detektor aufgesogen, während die Primärelektronen gerade auf einen zweiten Detektor treffen. Zum Absaugen der energiearmen Elektronen ist es notwendig eine Spannung zwischen Objekt und Detektor anzulegen. Dies zieht wiederum die

Notwendigkeit eines leitfähigen Objektes nach sich. Ist das Objekt nicht von sich aus leitfähig, so muß es durch eine geeignete Beschichtung leitfähig gemacht werden. Diese Präparation ist als Nachteil anzusehen, da durch die Manipulation am Objekt Artefakte entstehen können.

Da Luftmoleküle im Strahlengang mit den Elektronen in Wechselwirkung treten würden, finden die Untersuchungen im Vakuum statt. Das Auflösungsvermögen vom EMs beträgt ca. 0,1 nm. Es liegt damit deutlich über dem von Lichtmikroskopen. Ein weiterer Vorteil gegenüber konventionellen Mikroskopen ist die hohe Tiefenschärfe. Die Darstellung erfolgt heute in Echtzeit am Computer (Ohnsorge and Holm, 1978).

Ziel der Studie

Ziel der vorliegenden Studie ist es einen Versuchsaufbau zu entwickeln und zu analysieren, mit dem sich reproduzierbare Biofilme herstellen und beobachten lassen und der die Möglichkeit der Manipulation an deren Entwicklung bietet.

Die chemische und mikrobielle Zusammensetzung von Biofilmen ist relativ gut erforscht. Die Untersuchungen haben jedoch in der Regel die Zerstörung der Morphologie des Biofilms zur Folge. Die CLSM bietet prinzipiell die Möglichkeit vitale Proben zu analysieren (Netuschil et al., 1998), daher sollte diese Technik als Grundlage für das zu entwickelnde System dienen.

Material und Methode

Mikroorganismen

Als wichtige strukurbestimmende Spezies aus dem Spektrum oraler Biofilmmikroorganismen wurde *Streptokokkus mutans* Clarke 1924 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland) ausgewählt.

Streptokokken spielen eine herausragende Rolle bei der Entstehung von oralen Biofilmen und der Erkrankungen der Zähne und des Zahnhalteapparates. Sie können häufig in großen Mengen aus frühen Kariesläsionen isoliert werden (Marsh, 1999) und ihre Anzahl dient der Einschätzung des Kariesrisikos bei vielen Testverfahren (Sanchez-Garcia et al., 2008; Seibert et al., 2002; Smiech-Slomkowska and Jablonska-Zrobek, 2007). Morphologisch handelt es sich um 0,5 - 0,75 µm große Kokken, die einzeln oder in Clustern vorkommen. Die gram-positiven Keime können jedoch auch in Stäbchenform vorkommen.

Die hohe Kariesaktivität ist einerseits auf die Verstoffwechslung von Kohlenhydraten zu Säuren bei gleichzeitiger Säuretoleranz zurückzuführen. Andererseits erlaubt die Produktion von unlöslichen extrazellulären Polysacchariden [EPs] die Kolonisation der Zahnoberfläche und widersteht den natürlichen Reinigungsmechanismen der Mundhöhle. In substratarmen Zeiten werden die EPs teilweise wieder aufgespalten und dem Energiestoffwechsel zugeführt (Hellwig E., 2003). Die Möglichkeit der Substratspeicherung macht *S. Mutans* zeitweise unabhängig von der menschlichen Nahrungsaufnahme und erhöht die Kariogenität. Die EPs bilden die Plaquematrix, deren Morphologie als äußerst komplex beschrieben wird und der man eine zunehmend größere Rolle im Biosystem Plaque zuschreibt (Wood et al., 2000).

Verhalten von Mikroorganismen in geschlossenen Systemen

Mikroorganismen in geschlossenen Systemen, sog. batch-cultures, durchlaufen vier Phasen (s. Abb.1). Nach der Beimpfung des frischen Mediums erfolgt die Anpassung der Mikroorganismen an die neue Situation in der Anlauf- oder lag-Phase. Die Dauer dieses Prozesses hängt vom Nährmedium und dem Alter der Population ab. Die Mikroorganismen bilden Ribosomen und Enzyme um das Nährstoffangebot zu nutzen (Cypionka, 1999). Nicht alle Mikroorganismen sind

zur Vermehrung befähigt, so dass es zu einer Abnahme der Lebendkeimzahl kommen kann (W Fritsche, 2002).

Auf die Anlaufphase folgt die exponentielle Phase, in der sich die Mikroorganismen exponentiell vermehren. Diese Phase dauert an bis ein essentieller Nährstoff zur Neige geht oder ein Zellprodukt weitere Vermehrung hemmt und ist daher abhängig vom Kulturmilieu (Madigan MT, 2001). Mikroorganismen vermehren sich in der exponentiellen Phase um das 10^3 - bis 10^5 -fache.

In der stationären Phase oder Plateauphase bleibt die Gesamtzahl der Mikroorganismen relativ konstant. Es kann jedoch zu Verschiebungen von lebenden zu toten Mikroorganismen kommen. Die lebenden Mikroorganismen bleiben stoffwechselaktiv und führen kontinuierlich zu Veränderungen im Nährmilieu.

Die stationäre Phase geht in die Absterbephase über. Mikroorganismen sterben ab und lösen sich teilweise auf (W Fritsche, 2002).

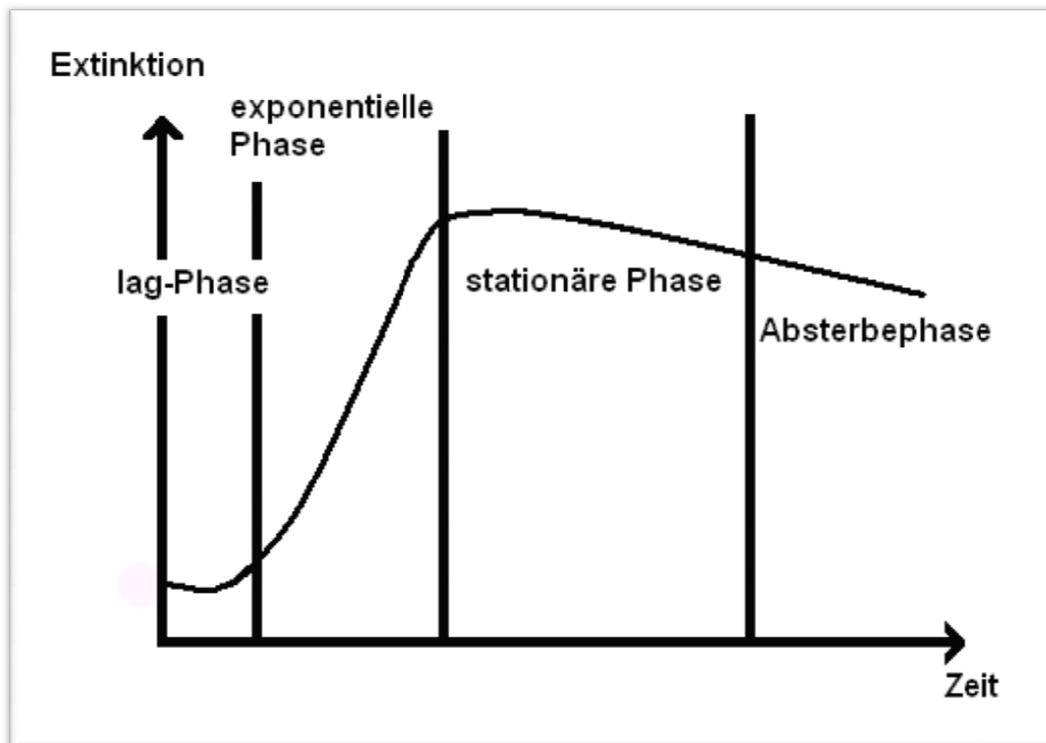


Abb. 1: Typische Wachstumskurve einer batch-Kultur. Die Entwicklung der Bakterienkultur nach der Überimpfung in neues Medium läuft in vier Phasen ab. Die im Versuch verwandten Bakterien befanden sich in der stationären Phase.

Kammern/Objektträger

Als Objektträger wurden steril verpackte Kammern (LAB - TEK[®] Chambered coverglass w/cvr #1 German borosilicate sterile, Nalge Nunc, Naperville, USA) (s. Abb. 2) verwendet. Die Kammern besitzen einen Boden aus Borosilikatglas, Wände und Deckel sind aus Polysteren gefertigt. Es konnte gezeigt werden, dass kein signifikanter Unterschied zwischen dem Plaquewachstum auf Glas oder Schmelz besteht (Netuschil et al., 1998). Aufgrund der Oberflächenspannung ist eine Mindestprobenmenge erforderlich, um optischen Verzerrungen im Randbereich vorzubeugen. Vom Hersteller werden die hier verwendeten zweikammerigen Träger für Proben von 1,2 ml bis 2 ml empfohlen. Da im Versuch nur ein kleiner, zentral gelegener Ausschnitt der Probe untersucht wurde, gab es trotz der verwendeten 1 ml - Proben keine Verzerrungsartefakte.



Abb. 2: Die im Versuch verwendete Probenkammer. Der Boden besteht aus Borosilikatglas und erlaubt die uneingeschränkte Untersuchung des Kammerinhalts mit inversen Mikroskopen.

Der zum Mikroskop gehörende Schlitten, mit Thermostat, Heizung und Gaszufuhr (Carl Zeiss Lightmicroscopy, Göttingen, Deutschland) (s. Abb. 3), erlaubt konstante Temperatur- und Atmosphären-pH-Werte über den gesamten Versuchszeitraum. Da es sich um ein geschlossenes System handelt ist der Flüssigkeitsverlust durch Verdunstung gering.



Abb. 3: Beheizbarer Objektschlitten mit CO₂-Atmosphäre und Reglereinheit. An der Reglereinheit ist die Temperatur einzustellen. Im Objektschlitten befindet sich das Thermostat.

Mikroskop und Software

Verwendet wurde ein Zeiss LSM 510 Meta Mikroskop mit Scanneinheit Axiovert 100 M (s. Abb. 4) und LSM-Software (Carl Zeiss Lightmicroscopy, Göttingen, Deutschland). Das inverse Mikroskop ist mit einem computergesteuerten Objektisch ausgestattet.



Abb. 4: Zeiss LSM 510 Meta mit Axiovert Scannereinheit. Der Computer rechts im Bild dient der Steuerung und Programmierung, sowie Lagerung und Auswertung der Bildinformation.

Die LSM-Software dient der Kontrolle des Mikroskops und der Bearbeitung und Auswertung der gewonnenen Bildinformation. Das Mikroskop ist programmierbar und gestattet die Aufnahme des selben stacks zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Die Lasereinheit schaltet computergesteuert zu und ab, um unnötige Belichtung und Ausbleichen der Farbstoffe zu vermeiden. Auch der Detektor wird über die Software gesteuert. Für jeden Kanal lassen sich Lochblende und Empfindlichkeit separat einstellen und für spätere Versuche abspeichern.

Die Ausgabe der Bildinformation erfolgt in Verzeichnisddateien, die über die Exportroutine verlustfrei in tif-Dateien ausgegeben werden können.

Pellikelbildung

Zur Durchführung der Versuche sollten die Probenkammeroberflächen den Bedingungen in der Mundhöhle angepaßt werden. Voraussetzung hierzu ist die Generierung einer Pellikelstruktur aus Speichelbestandteilen. Der Speichel eines Probanden wurde mittels Parafin stimuliert und gesammelt. Die Gewinnung fand morgens, nach Frühstück und normalen Mundhygienemassnahmen, statt. Anschliessend wurde der Speichel vorfiltriert (FP 30/1,2CA, Schleicher und Schuell, Dassel, Deutschland) und abschließend steril filtriert (FP 30/0,45 CA-S, Schleicher und Schuell, Dassel, Deutschland). In Versuchskammern wurde 1 ml des sterilfiltrierten Speichels bei 37° C vier Stunden lang im Temperierschrank (Mettmert GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland) inkubiert (s. Abb. 5). In dieser Zeit adhärere Speichelproteine an den Kammeroberflächen und formen ein Pellikel (Kordes, 2006). Im Anschluß wurde die flüssige Phase des Speichels verworfen.



Abb. 5: Temperierschrank zur Pellikelherstellung.

Herstellung des Nährmediums

Zuerst wurde 1 l Aqua dest. auf 60° C erwärmt. In der vorgewärmten Flüssigkeit werden 17,5 g des Pulvers zur Herstellung der Antibiotika-Nachweis-Bouillon Nr. 3 (CH.B.-3014367, CM287, Fa. Oxoid LTD, Basingstoke, Hampshire, England) gelöst (Inhaltsstoffe s. Tab. 1). Das so hergestellte AB-Medium wird anschließend in dem Glasgefäß für 15 min. bei 121° C autoklaviert (Varioklav Dampfsterilisator, H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim, Deutschland). Alternativ kann jedoch auch eine definierte Menge direkt auf Glasröhrchen verteilt und portionsweise autoklaviert werden.

<u>Antibiotika-Nachweis-Bouillon Nr. 3 (AB-Medium III)</u>	
Typische Zusammensetzung:	Fleischpepton 5,0 g/l
	Hefeextrakt 1,5 g/l
	Fleischextrakt „Lab-Lemco“ 1,5 g/l
	Glucose 1,0 g/l
	Dikaliumhydrogenphosphat 3,68 g/l
	Natriumchlorid 3,5 g/l
	Kaliumdihydrogenphosphat 1,32 g/l

Tab. 1 Inhaltsstoffe der Antibiotika-Nachweisbouillon Nr. 3

Gewinnung der Mikroorganismen

Die Mikroorganismen wurden morgens in steriles AB-Medium überimpft und bei 37 °C im Wasserschwenkbad (Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland) angesetzt (s. Abb. 6). Frühere Versuche ergaben, dass sie sich in den ersten Stunden vermehren und nach ca. 6 Stunden die Plateauphase erreichen, in der ihre Anzahl relativ stabil bleibt (Kordes, 2006). Die Untersuchungen stützen sich auf Ergebnisse der Spektralphotometrie und ermitteln nicht die Anzahl von Zellen im Medium, sondern die Lichtdurchlässigkeit der Probe. Das Verfahren ist

jedoch wissenschaftlich anerkannt (Fritsche, 2002). Vor der Entnahme der Mikroorganismen wurde die Extinktion ermittelt. In allen Versuchen lag die gemessene Extinktion zwischen 0,8 und 1. Entnommen wurden 1 ml der Suspension aus dem Bereich 1 cm unter der Suspensionsoberfläche. Der Transport fand in isolierten Boxen statt.



Abb. 6: Schüttelbad zur Gewinnung der Mikroorganismen. In verschlossenen Reagenzgläsern durchlaufen die Populationen hier die lag- und die exponentielle Phase.

Färben der Bakterien

1 ml der Bakterien in Suspension wurden mit 3 μ l LIVE/DEAD BacLight L7012 (Invitrogen corporation, Carlsbad, USA) (s. Abb.7) vermischt und 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Färbelösung setzt sich aus gleichen Teilen SYTO 9 dye, 3.34 mM, 300 μ l Lösung in Dimethyl-Sulfoxid und Propidiumjodid, 20 mM, 300 μ l Lösung in Dimethyl-Sulfoxid zusammen. Vor der Präparation des Farbstoffes müssen die Komponenten aufgetaut werden, da ihre Lagerung bei -20 °C erforderlich ist.



Abb. 7: Das Färbe-Kit enthält neben den Farbstoffen auch Immersionsöl. Aufgrund der Lagerung bei -20°C müssen die Farbstoffkomponenten für den Versuch aufgetaut werden.

Lebende Zellen nehmen Syto 9 auf und verstoffwechseln es zum fluoreszierenden Endprodukt. Dieses kann die Zelle nicht mehr verlassen. Bakterien mit intaktem Stoffwechsel erscheinen bei Anregung des Farbstoffes im CLSM grün. In Zellen mit Zellwanddefekten dringt Propidiumjodit ein und bindet an Nukleinsäuren. Durch die Akkumulation von Farbstoff am Nucleoid (Kernäquivalent) erscheinen sie im CLSM rot. Einige Mikroorganismen enthalten beide Farbstoffe und fluoreszieren daher grün und rot oder in der Überlagerung gelb (s. Abb. 8 links). Laut Herstellerangaben liegen die Emissionsmaxima für Syto 9 bei 480 – 500 nm und für Propidiumjodit bei 490 – 635 nm. Am oder im Pellicel akkumuliert keiner der beiden Farbstoffe (s. Abb. 8 rechts).

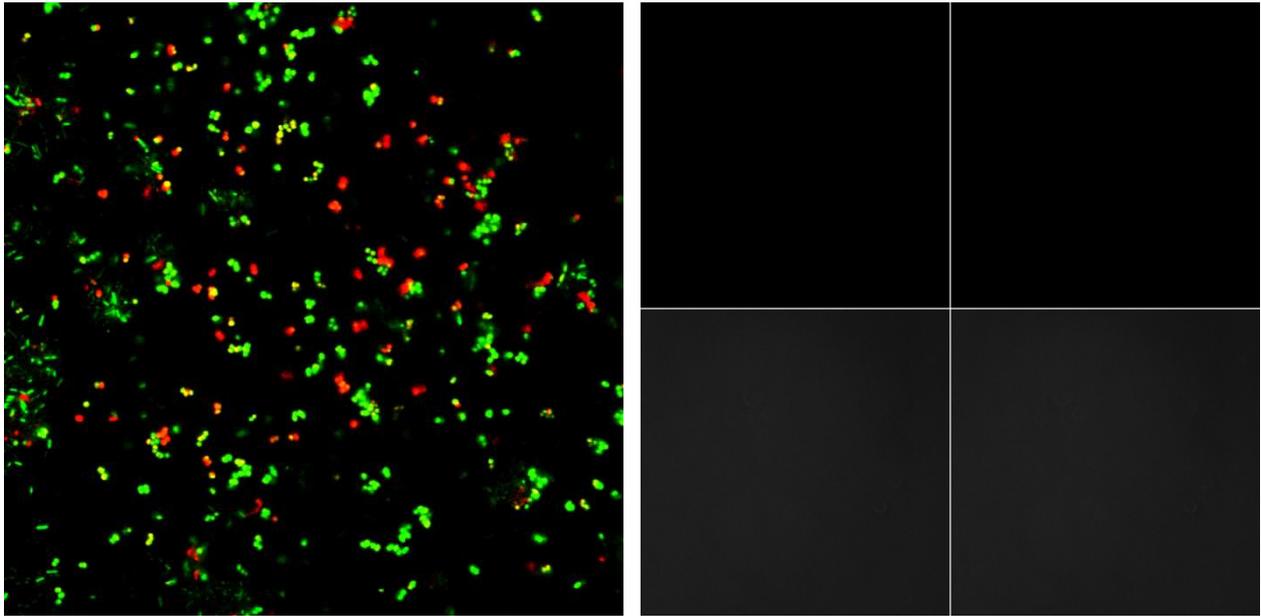


Abb. 8: Rechts: Beispiel der Vitalfluoreszenz. Grüne Streptokokken haben Syto 9 akkumuliert, während Propidiumjodit in jene mit Zellwanddefekten eingedrungen ist. Einige Streptokokken enthalten beide Farbstoffe und erscheinen im Mehrkanalbild gelb. Links: Pellikelbeschichtete Kammer AB-Medium und Färbung. Es sind durch die gesamte Probe keine Fluoreszenzemissionen zu erkennen.

Versuchsablauf

Die morgens angesetzten Bakterien wurden angefärbt und in eine pellikelbeschichtete Probenkammer überführt. Während der fünfstündigen Untersuchungsphase wurde die Probe bei konstanten 37 °C gehalten.

Mit Hilfe der LSM-Software wurde eine Position in der Probe gespeichert, die sicher unter der Pellikeloberfläche lag. Ausgehend von dieser wurden sodann je 15 Schnittbilder durch die Probe in 2 µm Abstand angefertigt. Die Software ermöglicht es immer wieder automatisch die Ausgangsposition aufzusuchen. Die Aufnahmen wurden mit einer Auflösung von 1024 x 1024 Pixeln und 63 - facher Objektivvergrößerung hergestellt. Das entspricht einer untersuchten Fläche von 146,2 µm². Zur Anregung der Fluorochrome wurden ein Argon-Laser (Wellenlänge 488 nm) und ein Helium-Neon-Laser (Wellenlänge 543 µm) verwendet. Eine Aufnahme in dieser Konfiguration dauert 2,1 s. In halbstündigen Abständen fanden die Aufzeichnungen statt. Die

Auswertung der Bilddateien wurde mit der Software LSM vorgenommen. Der Versuch wurde fünfmal wiederholt.

Auswertung

Auswertung mit LSM

Die Software LSM (Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland) erlaubt die Zählung von Pixeln eines Bildes und deren Zuordnung zu einer von 255 Graustufen oder 0. Jeder Kanal (hier: Grün u. Rot) wird einzeln gelesen und in Graustufen gewandelt, dann wird jedem Pixel ein Grauwert von 0 bis 255 zugeordnet. Die Ausgabe erfolgt über eine txt-Datei, die sich problemlos in einen Tabellenkalkulator importieren läßt. Da die Sensibilität des Detektors so eingestellt wird, dass der Hintergrund den Grauwert 0 hat, entsprechen allen Pixeln auf denen Mikroorganismen angefärbt wurden 1 - 255. Nach der Bearbeitung ergeben sich pro Versuch zwei Tabellen mit den positiv gemessenen Pixeln pro Kanal, aufgeschlüsselt nach Schicht und Zeitpunkt der Untersuchung (s. Tab. 3 – 12). Zur besseren Übersicht wurden zu allen Tabellen Grafiken erstellt (s. Abb. 9 - 18).

Statistische Auswertung

Um die erhobenen Daten besser zu veranschaulichen wurden sie mit SPSS-Statistics (SPSS-Software, München, Deutschland) auf Normalverteilung überprüft (s. Tab. 12). Außerdem wurden mit Excel (Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) für jede Schicht Median, Interquartilbereich und das erste bis vierte Quartil ermittelt (s. Tab. 13). Auch hier wurden aus Gründen der verbesserten Übersicht Grafiken (Boxplots, s. Abb. 21 - 25) erstellt.

Ergebnis

In den kammerbodennahen Probenschichten sammelten sich schon zu Beginn der fünfstündigen Versuchsdauer große Mengen Mikroorganismen. In allen Versuchen stieg die Zahl der fluoreszierenden Pixel ausgehend vom Kammerboden an, erreichte im Abstand von 4 - 14 μm vom Pellikel ihr Maximum und fiel dann langsam ab. Diese Verteilung finden wir zu jedem Untersuchungszeitpunkt und bei jeder Versuchreihe wieder. Die folgenden graphischen Darstellungen (Abb. 9 – 18) zeigen die Verteilung der vitalen und avitalen Mikroorganismen der fünf untersuchten Proben.

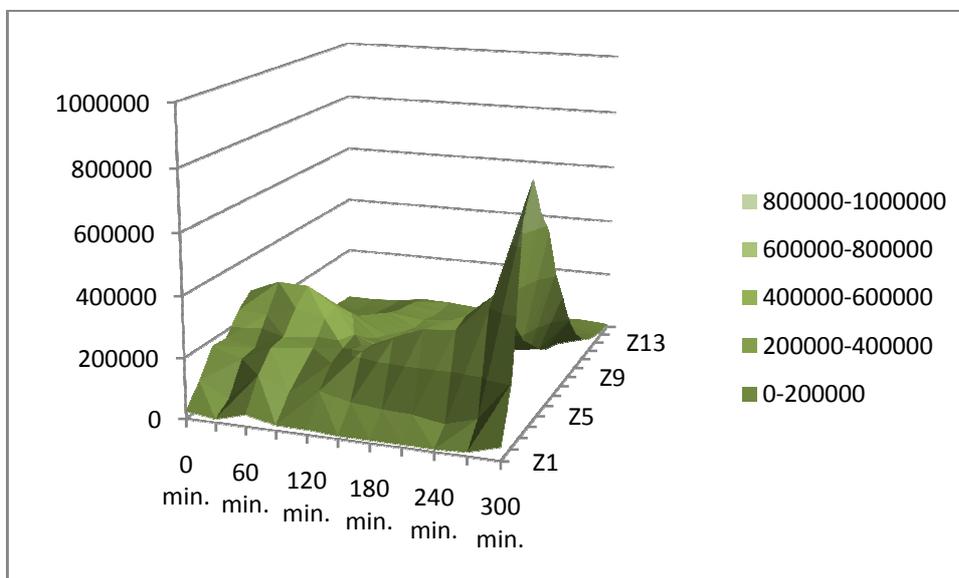


Abb. 9: Die graphische Darstellung von Tab. 3 zeigt die Verteilung der vitalen Mikroorganismen der ersten Probe. X - Achse: Zeit in min., Y - Achse: Schichten Z1 - Z15, Z - Achse: Anzahl der positiv gemessenen Pixel.

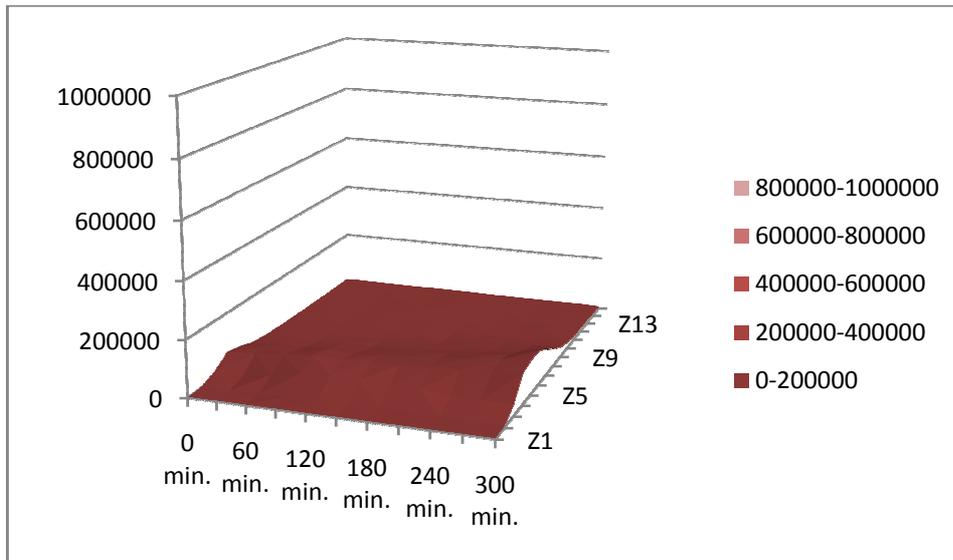
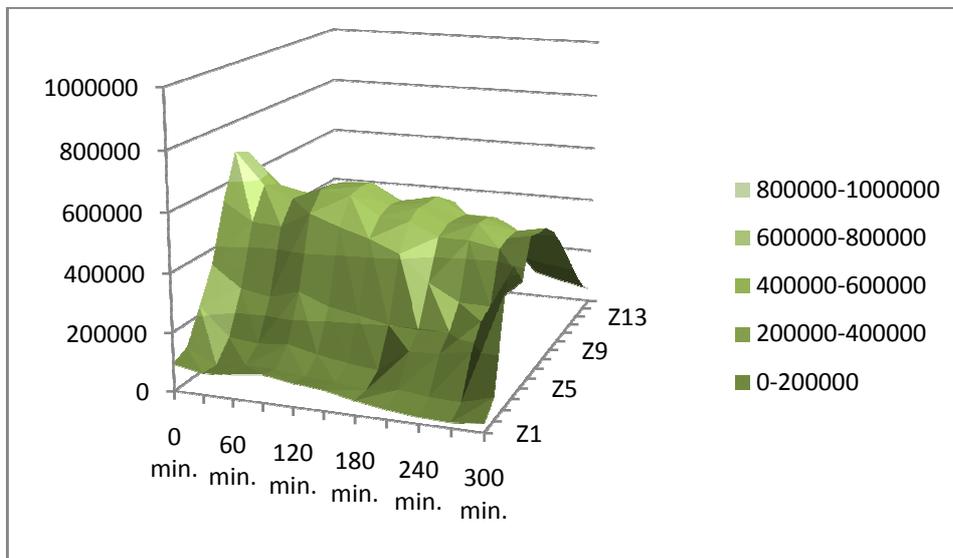


Abb. 10: Die graphische Darstellung von Tab. 4 zeigt die Verteilung der avitalen Mikroorganismen der ersten Probe. X - Achse: Zeit in min., Y - Achse: Schichten Z1 - Z15, Z - Achse: Anzahl der positiv gemessenen Pixel.



Ab. 11: Die graphische Darstellung von Tab. 5 zeigt die Verteilung der vitalen Mikroorganismen der zweiten Probe. X - Achse: Zeit in min., Y - Achse: Schichten Z1 - Z15, Z - Achse: Anzahl der positiv gemessenen Pixel.

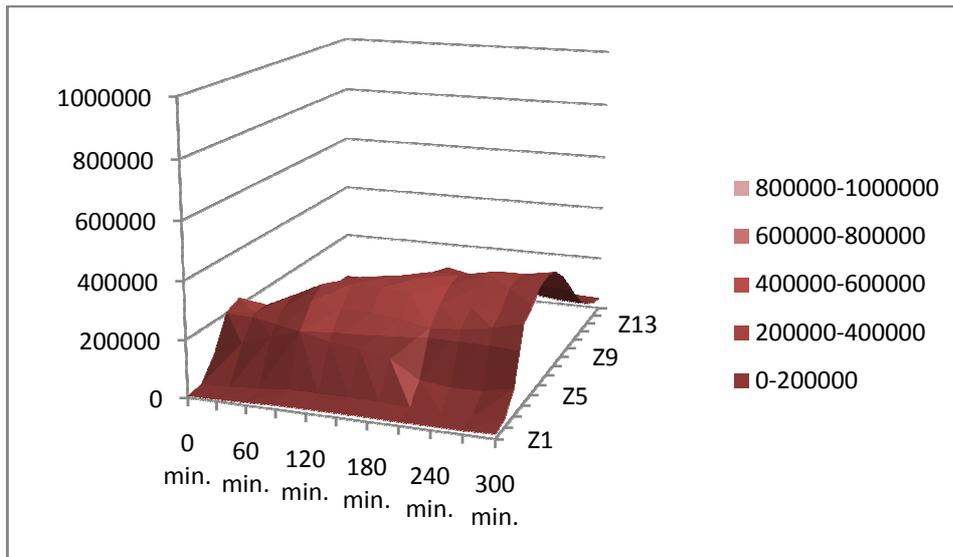


Abb. 12: Die graphische Darstellung von Tab. 6 zeigt die Verteilung der avitalen Mikroorganismen der zweiten Probe. X - Achse: Zeit in min., Y - Achse: Schichten Z1 - Z15, Z - Achse: Anzahl der positiv gemessenen Pixel.

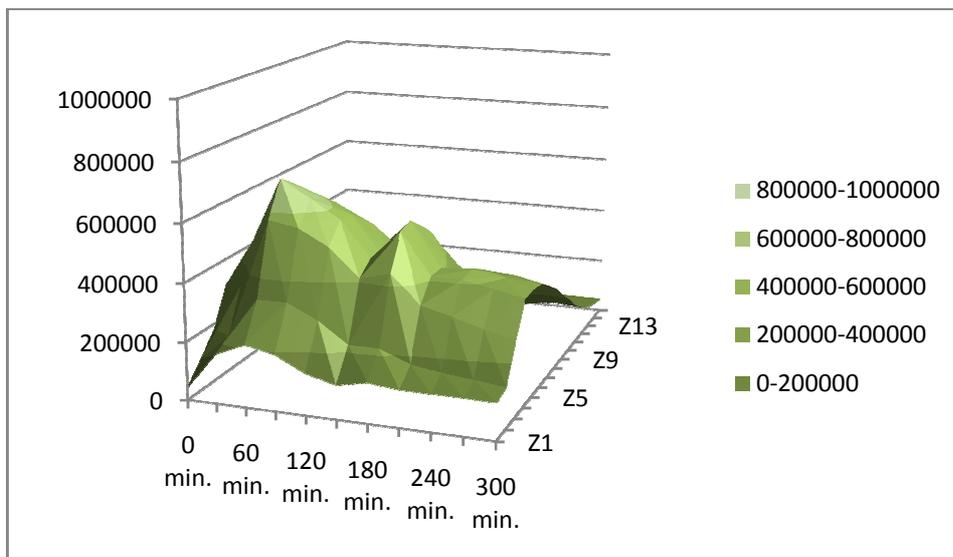


Abb. 13: Die graphische Darstellung von Tab. 7 zeigt die Verteilung der vitalen Mikroorganismen der dritten Probe. X - Achse: Zeit in min., Y - Achse: Schichten Z1 - Z15, Z - Achse: Anzahl der positiv gemessenen Pixel.

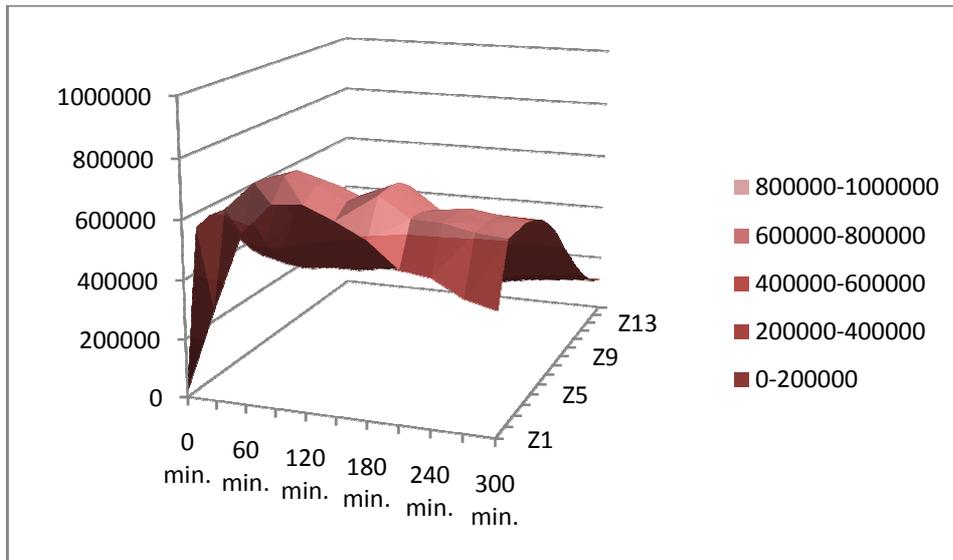


Abb. 14: Die graphische Darstellung von Tab. 8 zeigt die Verteilung der avitalen Mikroorganismen der dritten Probe. X - Achse: Zeit in min., Y - Achse: Schichten Z1 - Z15, Z - Achse: Anzahl der positiv gemessenen Pixel.

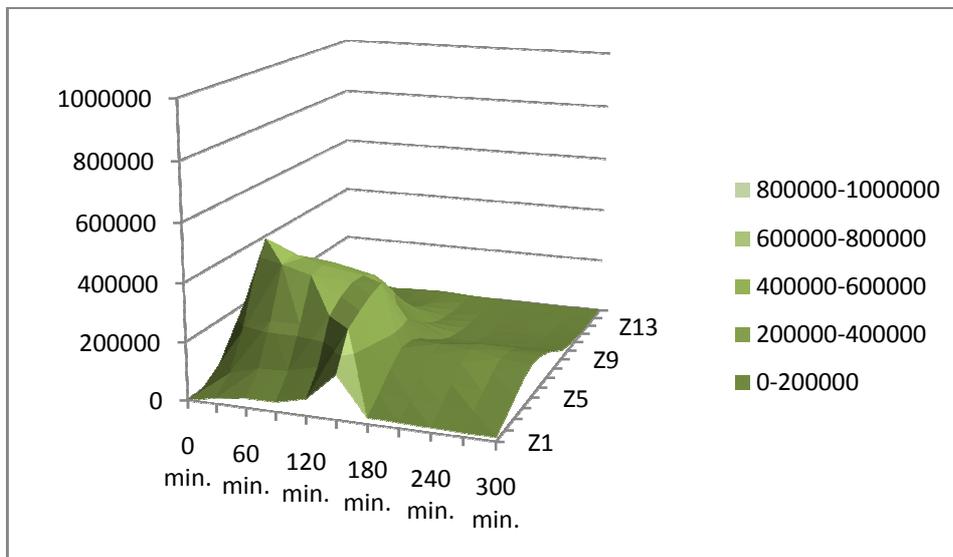


Abb. 15: Die graphische Darstellung von Tab. 9 zeigt die Verteilung der vitalen Mikroorganismen der vierten Probe. X - Achse: Zeit in min., Y - Achse: Schichten Z1 - Z15, Z - Achse: Anzahl der positiv gemessenen Pixel.

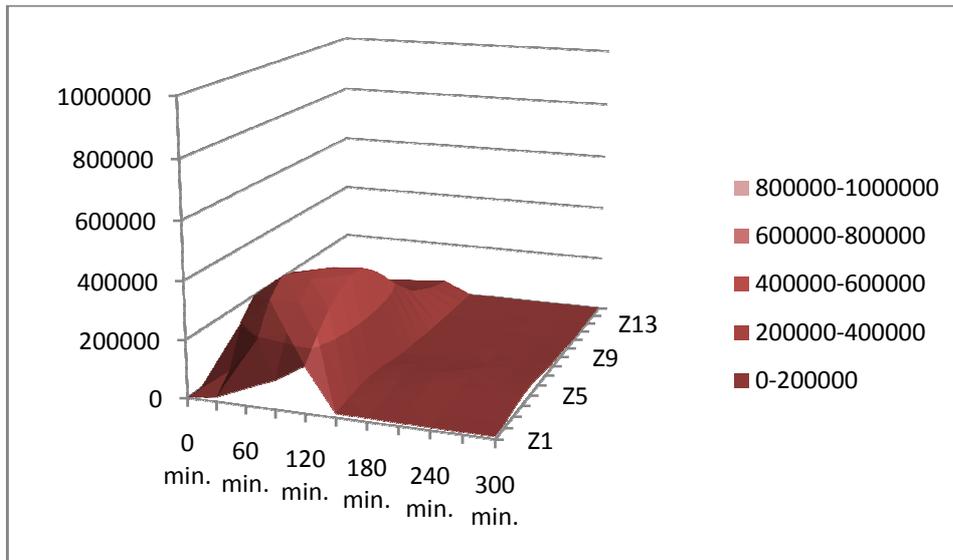


Abb. 16: Die graphische Darstellung von Tab. 10 zeigt die Verteilung der avitalen Mikroorganismen der vierten Probe. X - Achse: Zeit in min., Y - Achse: Schichten Z1 - Z15, Z - Achse: Anzahl der positiv gemessenen Pixel.

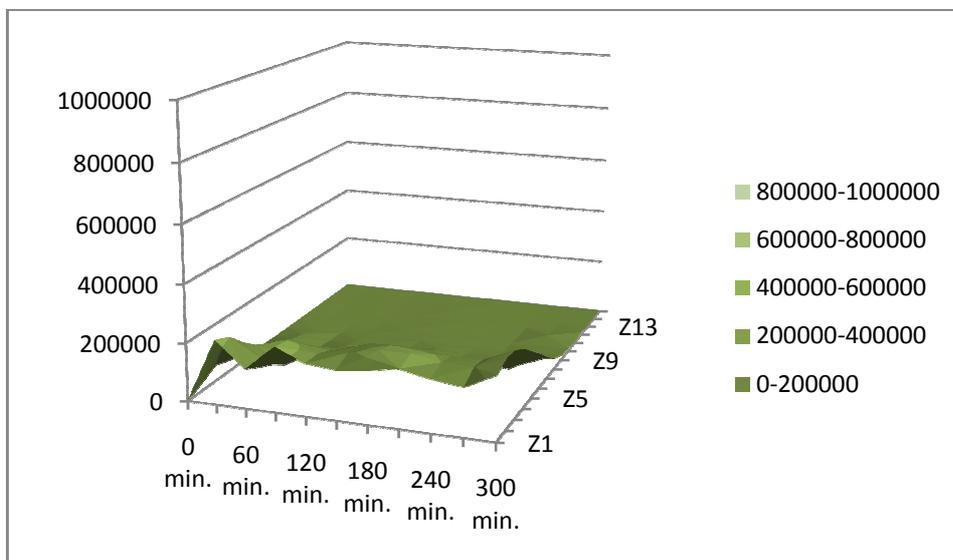


Abb. 17: Die graphische Darstellung von Tab. 11 zeigt die Verteilung der vitalen Mikroorganismen der fünften Probe. X - Achse: Zeit in min., Y - Achse: Schichten Z1 - Z15, Z - Achse: Anzahl der positiv gemessenen Pixel.

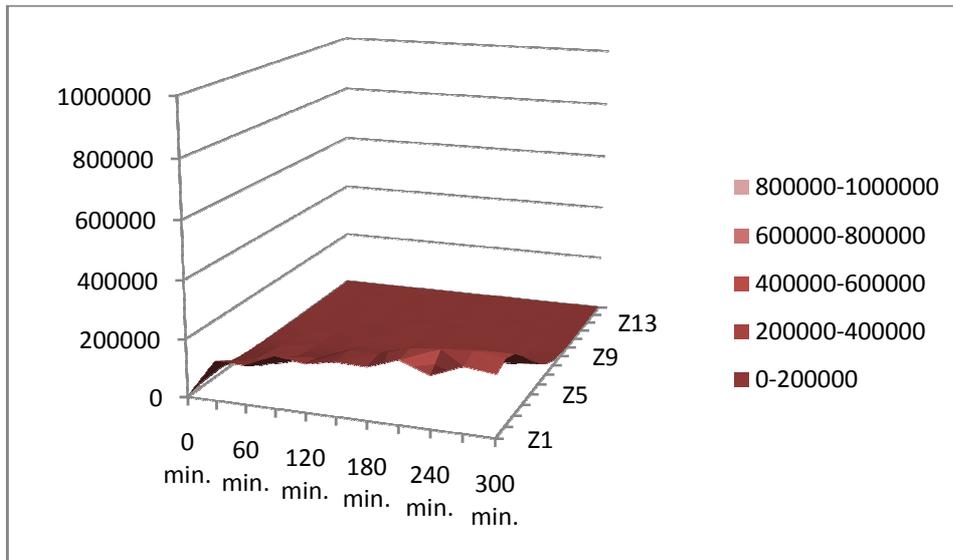


Abb. 18: Die graphische Darstellung von Tab. 12 zeigt die Verteilung der avitalen Mikroorganismen der fünften Probe. X – Achse: Zeit in min., Y - Achse: Schichten Z1 - Z15, Z - Achse: Anzahl der positiv gemessenen Pixel.

Die Streptokokken haben keine Möglichkeit der Eigenbewegung, aufgrund der Braun'schen Molekularbewegung bewegen sich planktonische Mikroorganismen trotzdem ununterbrochen. Dass sie jedoch in Kammerbodennähe ortständig sind lässt den Schluss zu, dass sie über Adhäsionsmechanismen mit dem Pellikel verbunden sind. Hier kann man im zeitlichen Verlauf einzelne Aggregate von Streptokokken beobachten (s. Abb. 12). Viele Aggregate enthalten lebende und tote Mikroorganismen.

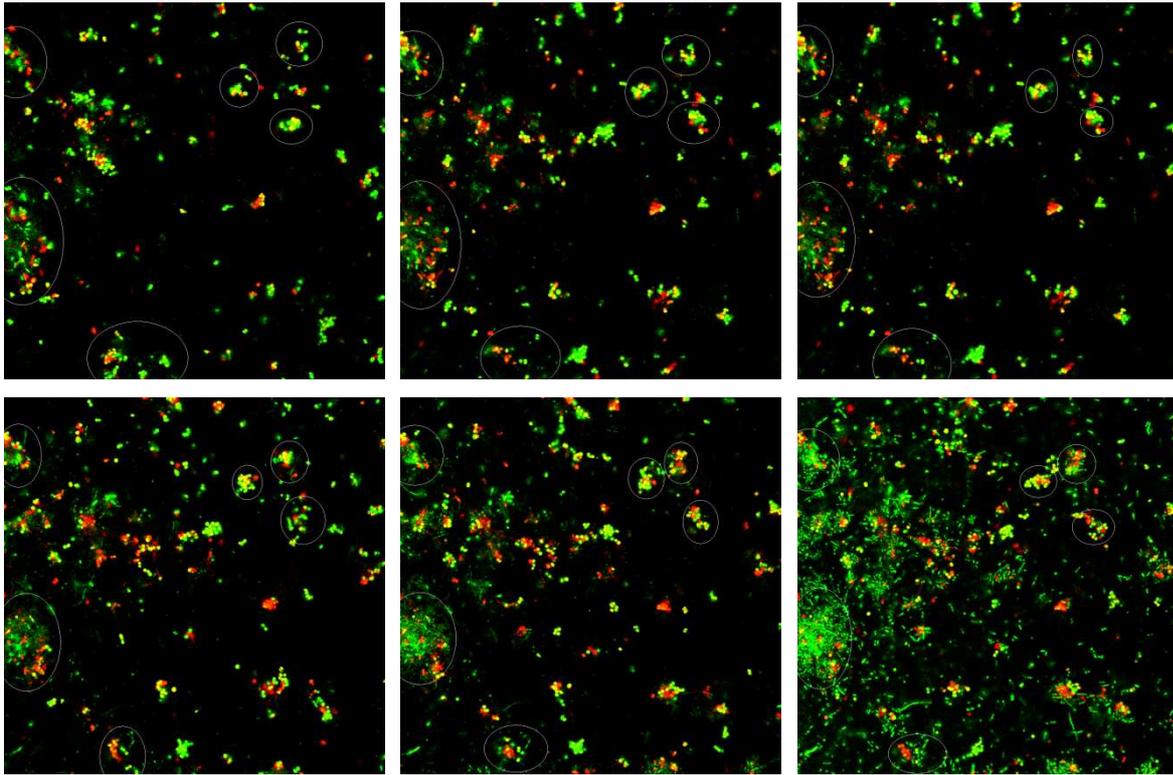


Abb. 19: Vitalfluoreszenz einer Schicht (6 µm über Kammerboden) im zeitlichen Verlauf. Die markierten Aggregate sind über 2,5 Stunden ortsständig.

Von Versuch zu Versuch ergaben sich erhebliche Unterschiede in der Intensität der Fluoreszenz (0 - 779395 bei 1048576 Bildpunkten) und dem Verhältnis zwischen vitalen und nichtvitalen Mikroorganismen (0,07 % bis 99 % vitale Fluoreszenz im Schnittbild s. Abb. 22). Eine wiedererkennbare Verteilung von toten und lebenden Mikroorganismen konnte nicht festgestellt werden, jedoch blieb die Verteilung von toten und lebenden Mikroorganismen für den einzelnen Versuch charakteristisch.

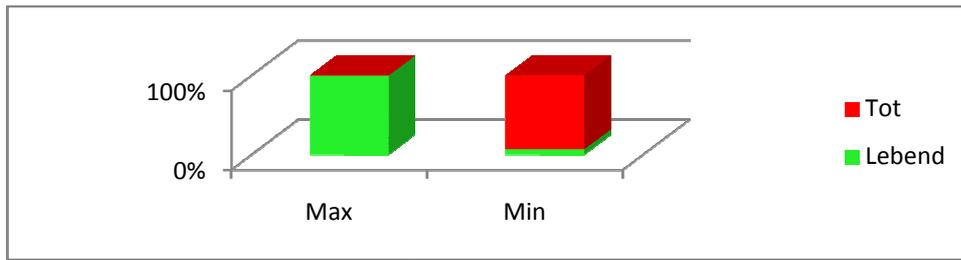


Abb. 20: Maximaler Anteil Lebendfluoreszenz im Verhältnis zu Totfluoreszenz (Max) und minimaler Anteil Lebendfluoreszenz im Verhältnis zu Totfluoreszenz anhand zweier Stichproben.

Die statistische Auswertung nach Shapiro-Wilk ergab, dass die Bakterien in einer Schicht über den gesamten Versuchszeitraum nicht in allen Versuchreihen normalverteilt sind. Um die Verteilung der Fluoreszenz in den einzelnen Schichten miteinander zu vergleichen wurden daher die Mediane herangezogen und Boxplots erstellt (s. Abb. 21 - 25). Auch hier wird deutlich, dass die Fluoreszenz intensität vom Pellikel ansteigt und nach 2 – 14 μm ihr Maximumerreicht.

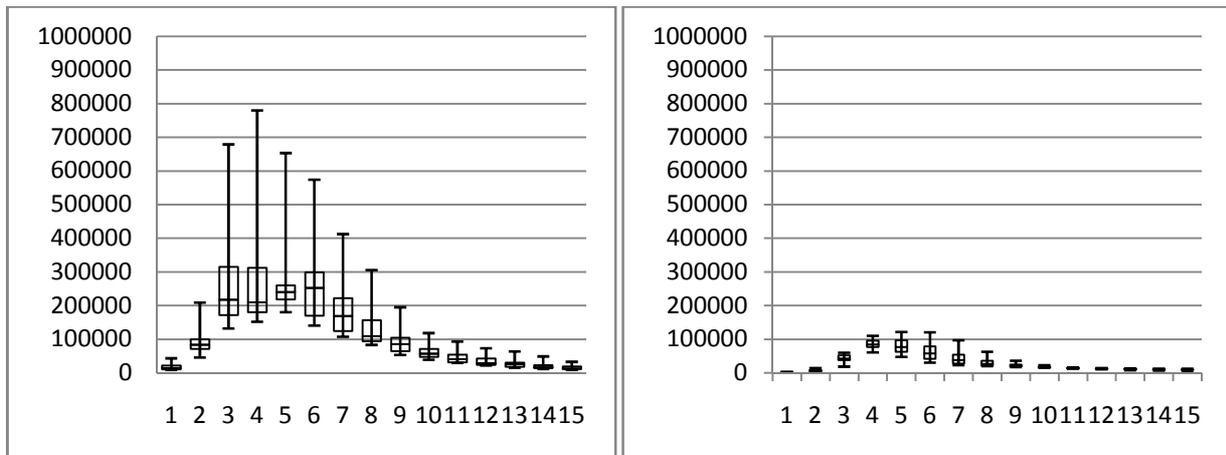


Abb. 21: Zeigt die Verteilung der Fluoreszenz gemessen in Pixeln (Y – Achse) in den Schichten 1 – 15 (X – Achse) über den gesamten Versuchszeitraum. Der Kasten zeigt den Bereich, in dem 50 % der gemessenen Werte liegen und wird durch den Median geteilt. Die Whiskers (\top , \perp) geben Maximal- und Minimalwert an. Links Versuch 1, vitale Fluoreszenz; rechts Versuch 1 avitale Fluoreszenz.

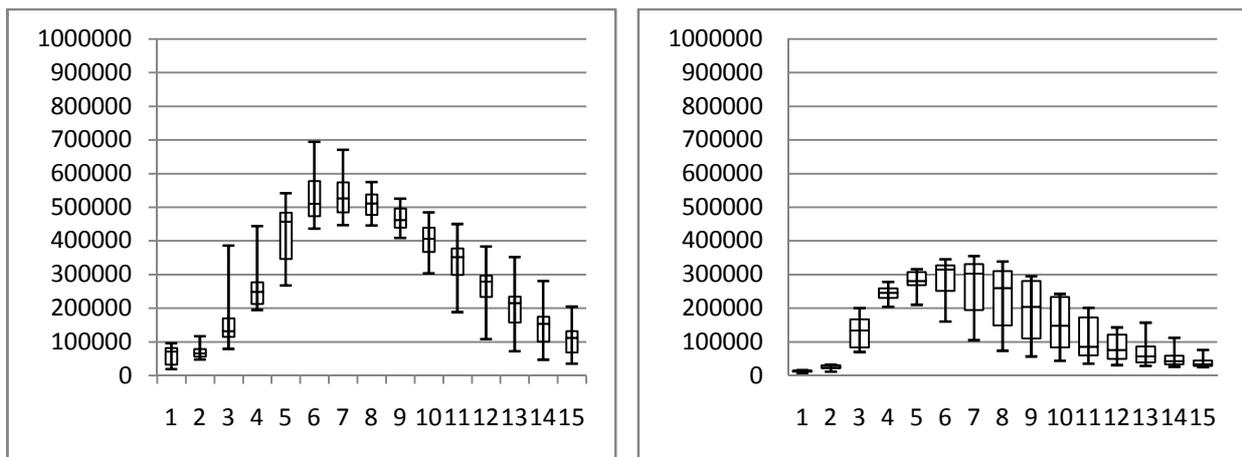


Abb. 22: Zeigt die Verteilung der Fluoreszenz gemessen in Pixeln (Y – Achse) in den Schichten 1 – 15 (X – Achse) über den gesamten Versuchszeitraum. Der Kasten zeigt den Bereich, in dem 50 % der gemessenen Werte liegen und wird durch den Median geteilt. Die Whiskers (\top , \perp) geben Maximal- und Minimalwert an. Links Versuch 2, vitale Fluoreszenz; rechts Versuch 2 avitale Fluoreszenz.

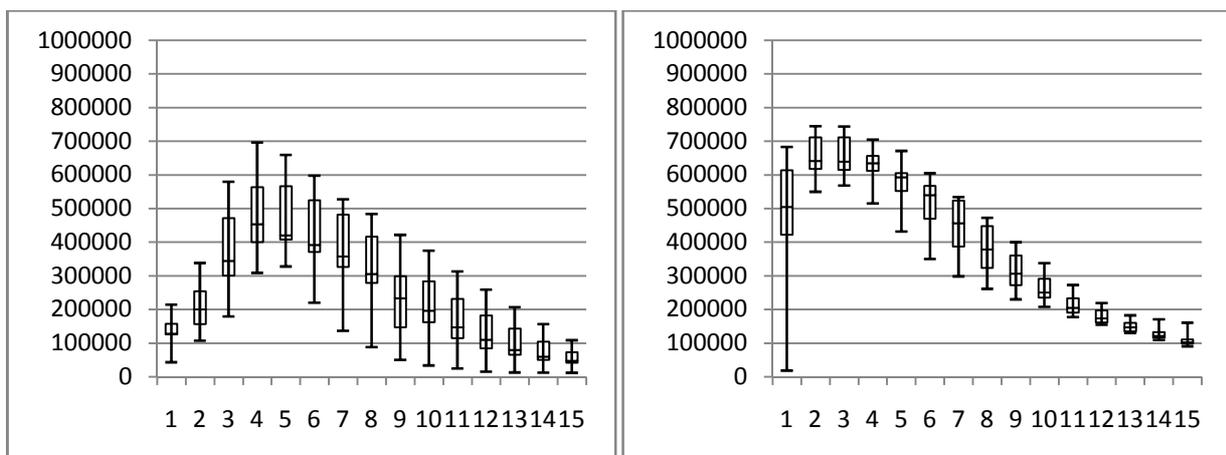


Abb. 23: Zeigt die Verteilung der Fluoreszenz gemessen in Pixeln (Y – Achse) in den Schichten 1 – 15 (X – Achse) über den gesamten Versuchszeitraum. Der Kasten zeigt den Bereich, in dem 50 % der gemessenen Werte liegen und wird durch den Median geteilt. Die Whiskers (\top , \perp) geben Maximal- und Minimalwert an. Links Versuch 3, vitale Fluoreszenz; rechts Versuch 3 avitale Fluoreszenz.

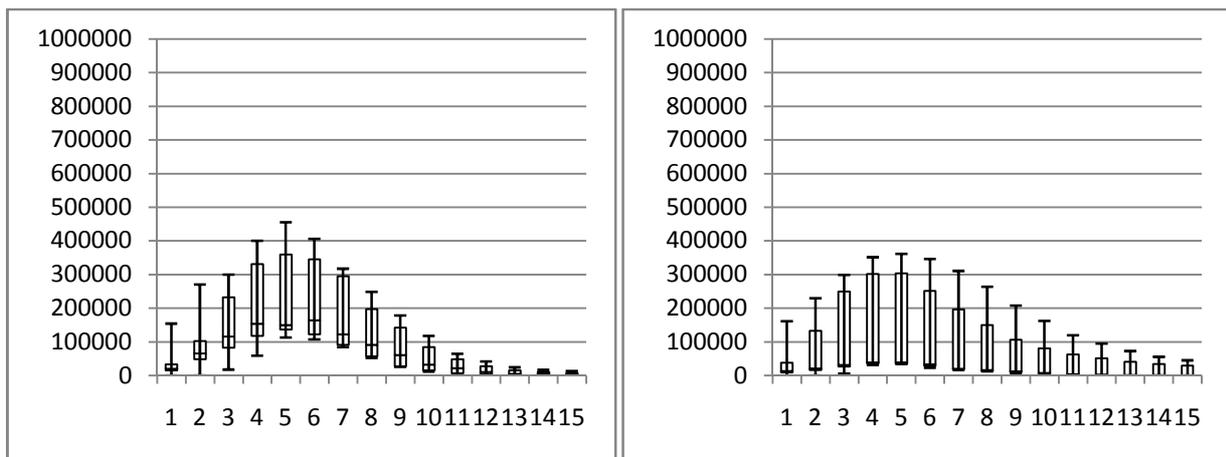


Abb. 24: Zeigt die Verteilung der Fluoreszenz gemessen in Pixeln (Y – Achse) in den Schichten 1 – 15 (X – Achse) über den gesamten Versuchszeitraum. Der Kasten zeigt den Bereich, in dem 50 % der gemessenen Werte liegen und wird durch den Median geteilt. Die Whiskers (\top , \perp) geben Maximal- und Minimalwert an. Links Versuch 4, vitale Fluoreszenz; rechts Versuch 4 avitale Fluoreszenz.

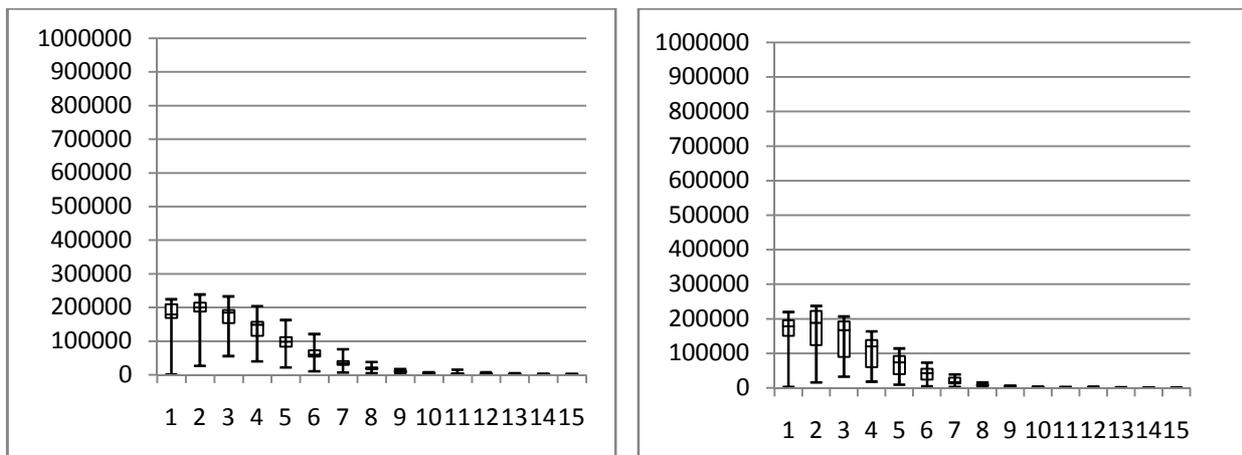


Abb. 25: Zeigt die Verteilung der Fluoreszenz gemessen in Pixeln (Y – Achse) in den Schichten 1 – 15 (X – Achse) über den gesamten Versuchszeitraum. Der Kasten zeigt den Bereich, in dem 50 % der gemessenen Werte liegen und wird durch den Median geteilt. Die Whiskers (\top , \perp) geben Maximal- und Minimalwert an. Links Versuch 5, vitale Fluoreszenz; rechts Versuch 5 avitale Fluoreszenz.

Diskussion

Primäre Ergebnisse

Die Ergebnisse der Versuchsreihe entsprechen, ausgehend von ihrer Vitalverteilung, klinischen Studien von Ausschill, Hein und Netuschil et al. (Auschill et al., 2001; Hein, 2004; Netuschil et al., 1998). Die Aggregation von toten und lebenden Mikroorganismen ist deutlich sichtbar und bestätigt klinische Untersuchungen. Teilergebnisse vorausgegangener Studien nach denen hauptsächlich tote Mikroorganismen zu den Primäkolonisatoren gehören, können allerdings nicht bestätigt werden. Das kurze Zeitintervall vom Kontakt der Bakteriensuspension bis zur Adhäsion erster Keime am Pellikel spiegelt klinische Studien wider (Hannig et al., 2007). Ergo ist ein Modell-Versuch zur vitalmikroskopischen Observation von Biofilmen am Beispiel von *S. Mutans* gelungen. Zu bemerken bleibt die Varianz der erzeugten Biofilme. Trotz standartisierter Verfahren und Mikroorganismen in Monokultur ist die hohe Variabilität auffällig.

Bewertung der Darstellungsform

Die CLSM in Kombination mit Vitalfärbung gewinnt in der Biofilmforschung aber auch in anderen Forschungsgebieten immer mehr an Bedeutung. In der Zahnmedizin scheiterten morphologische Untersuchungen der Plaque häufig an der Zerstörung der Probe bei ihrer Kollektivierung. CLSM bietet die Möglichkeit eine Probe zerstörungsfrei optisch und Schicht für Schicht zu durchschreiten. Angefärbte Mikroorganismen lassen sich gut identifizieren und, soweit sie ortsständig sind, auch zu späteren Zeitpunkten wieder aufsuchen. Nach einer langen Phase ohne neue Erkenntnis über die Morphologie der Plaque hat die CLSM eine neue Perspektive eröffnet und zur Korrektur alter Vorstellungen beigetragen. Der komplexe Aufbau der oralen Plaque konnte erst lange nach ihrer Erstbeschreibung bildlich erfaßt werden und verdrängt die Plaque als „homogene Masse“. Die CLSM ist eine sinnvolle Ergänzung zu anderen Verfahren, wie Raster-Elektronen-Mikroskopie und Raster-Kraft-Mikroskopie, und trägt eine weitere Perspektive zur vollständigen Abbildung der Wirklichkeit bei.

Ein Nachteil liegt im System der Laserfluoreszenzmikroskopie: sichtbar gemacht wird der Farbstoff und nicht die Strukturen in der Probe. Ein reelles Bild kann nicht erzeugt werden. Als weiteres Manko ist das Rasterbildverfahren bei der Observation von beweglichen Objekten

anzusehen. Das Abfahren der Probe benötigt bei angemessener Auflösung fast zwei Sekunden pro Schicht und in der planktonischen Phase bewegen sich einzelne Mikroorganismen relativ schnell (ca. 30 $\mu\text{m}/\text{h}$ linear durch Braun'sche Molekularbewegung sind möglich). Die CLSM steht heute trotz der geringeren Auflösung mit den traditionellen Verfahren auf einer Stufe (Wood et al., 2000). Die Vielzahl von aktuellen Studien bestätigt dies.

Problem der Quantifizierung

Die Zählung von Mikroorganismen im intakten Biofilm stellt seit Beginn der Biofilmforschung eine große Herausforderung dar. Ein Problem liegt in der Morphologie der Biofilme, der Aggregation der einzelnen Mikroorganismen. Das zweite Problem ist die Färbung.

Mikroorganismen liegen nur teilweise in der gescannten Schicht, überlappen in der 2D-Aufsicht und sind nicht homogen angefärbt, was das Ergebnis verfälscht. Auch die softwaregestützte Ermittlung der Pixelzahlen erlaubt zunächst keinen Rückschluß auf die Zahl der Mikroorganismen, da ihre Entsprechung in Bildpunkten nicht eindeutig ist. Die Entwicklung in einer Schicht kann jedoch über den Versuchszeitraum verglichen werden.

Live/Dead-Färbungen basieren auf der Annahme, dass tote Mikroorganismen den Farbstoff für die Lebendmarkierung nicht verstoffwechseln können und ihre Zellwände durchlässig für den Farbstoff für die Totmarkierung sind. Richtig ist jedoch, dass auch Populationen, die nach der Färbung tot erscheinen auf Agarplatten neue Kolonien bilden (Renyé et al., 2004). Die Färbemethode ist also nicht absolut zuverlässig. Ein weiterer Nachteil der Vitalfluoreszenz ist die Anfärbung unterschiedlicher Kompartimente in der Zelle. Der grüne Farbstoff verteilt sich im Zytosol, während der rote Farbstoff am Zellkern akkumuliert. Bei ausreichender Vergrößerung könnten tote und lebende Zellen unterschiedlich groß erscheinen und die Quantifizierung negativ beeinflussen. Auch das Ausbleichen der Fluorochrome beeinflusst den Versuchsaufbau. Das Filmen der Mikroorganismen über mehrere Stunden ist nicht möglich, weil die Intensität der Fluoreszenz dann abnehmen würde und mit frühen Aufnahmen nicht mehr vergleichbar wäre.

Aktuelle Studien arbeiten in der Regel mit einer softwaregestützten Quantifizierung, die nicht die Anzahl der Mikroorganismen ausgibt, sondern die Bildpunkte, die fluoreszieren, zählt. Jeder Bildpunkt muß einer von zwei Gruppen zugeordnet werden. In der ersten Gruppe befinden sich alle Pixel, auf denen ein Teil eines Bakteriums zu sehen ist. Die zweite Gruppe von Pixeln bildet keine Bakterien ab, sondern stellt den Hintergrund dar. Da einige Farbstoffe in unterschiedlicher

Intensität in der gesamten Probe vorkommen, ist die Anwesenheit von Farbstoff als Entscheidungskriterium nicht ausreichend. Um zu entscheiden zu welcher Gruppe ein Bildpunkt gehört benötigt die Software einen Schwellenwert (Threshold), der beide Gruppen anhand der Fluoreszenzintensität definiert. Der Schwellenwert kann rechnerisch ermittelt oder optisch-manuell festgelegt werden. Vorteil der rechnerischen Tresholdbestimmung ist die Reproduzierbarkeit, wobei es auch hier unumgänglich ist, dass Parameter manuell und unter optischer Kontrolle eingestellt werden müssen. Der Schwellenwert ist ein Wert zwischen 0 und 255 und in unserem Versuchsaufbau stets 1. Die zu Beginn eines Versuches fixierten Parameter wurden auch über den Versuch nicht verändert um Vergleichbarkeit zu gewährleisten.

Ausblick

In Zukunft wird der Versuchsaufbau genutzt werden können um die Auswirkung von Medikamenten auf die Entwicklung von Biofilmen im Labor zu erforschen. Zum einen müssen daher die Wirkung antibakterieller Agenzien und zum anderen das Blockieren von Adhäsinen im Biofilmmodell mit den Ergebnissen klinischer Studien verglichen werden.

Zusammenfassung

Schätzungsweise 65 % aller Infektionskrankheiten weltweit gehen auf Biofilme zurück. Zur Bekämpfung dieser Erkrankungen ist das Verständnis der Biofilmentstehung und -entwicklung notwendig. Mit Hilfe der Laserfluoreszenzmikroskopie (CLSM) wurde ein Versuchsaufbau entwickelt, der die dreidimensionale Observation eines vitalen Biofilms über längere Zeiträume erlaubt. Die Untersuchung kommt ohne Zerstörung oder Fixation aus und ermöglicht daher die Beobachtung eines weitgehend natürlichen Biofilms. Mit Hilfe des CLSM werden, ähnlich einer Tomographie, Schnittbilder der Probe angefertigt. Werden diese später zusammengefügt entsteht ein räumliches digitales Abbild der Probe.

Auf sterilen Kammern mit Boden aus Borosilikatglas wurde mit steril gefiltertem Speichel ein Pellikel erzeugt. Die Bildung des Pellikels erfolgte bei 37° C über vier Stunden. Anschließend wurde 1 ml, mit LIVE/DEAD BacLight gefärbte Streptokokkus-mutans-Suspension in die Kammer gegeben. Die Bakterien befanden sich zum Zeitpunkt der Untersuchung in der Plateauphase. Die Bakterienzahl blieb also über dem Versuchszeitraum relativ konstant.

Mittels CLSM wurde die Probe jede halbe Stunde über einen Zeitraum von fünf Stunden untersucht und Schnittbilder vom Kammerboden bis in eine Höhe von 28 µm oberhalb des Pellikels erstellt. Durch die Färbung konnten tote von lebenden Bakterien unterschieden werden. Der Versuch wurde fünf mal wiederholt und die Schnittbilder mit Hilfe der LSM-Software quantifiziert.

Die erzeugten Biofilme zeigten jeder für sich genommen eine charakteristische Bakteriendichte und Verteilung von toten und lebenden Bakterien, wiesen jedoch untereinander große Unterschiede auf. Allen Versuchen gemein ist ein starker Anstieg der Bakteriendichte mit Maximum in 4 – 12 µm Abstand vom Pellikel und einem drauf folgenden langsamen Abfall. Die Mikroorganismen bilden teilweise stabile und ortständige Aggregate, die auf eine Adhäsion am Pellikel schliessen lassen.

Es konnte gezeigt werden, dass der Biofilm unter Laborbedingungen mit in vivo gewonnenen Biofilmen vergleichbar ist. Der Versuchsaufbau ist also zur Biofilmsimulation und Observation geeignet.

Anhang

Abbildungsverzeichnis

Versuch 1 grüner Kanal											
	0 min.	30 min.	60 min.	90 min.	120 min.	150 min.	180 min.	210 min.	240 min.	270 min.	300 min.
Z1	24467	11494	38835	17683	16720	9809	9264	10015	8190	14115	42917
Z2	91767	45374	133949	87212	107049	83251	73301	68473	51433	81945	208143
Z3	177285	144626	193810	131269	165906	216664	267819	310291	319062	390261	678506
Z4	173534	151333	201061	174150	184971	209631	254157	288679	334991	421263	779395
Z5	239674	235266	268688	243035	198913	179631	211075	223857	250182	306172	652878
Z6	280935	320788	316700	254102	159616	140045	161606	176494	203816	252047	573794
Z7	168488	232224	231196	211610	128435	106699	115768	119183	146575	176096	412020
Z8	97144	159664	152779	167057	108958	82755	85590	89730	105885	130260	305134
Z9	52978	106369	102238	141815	84656	60059	55246	68987	74411	85394	194556
Z10	38488	68875	72629	117791	65120	49656	39752	44862	50939	56237	117850
Z11	28969	48243	59472	92411	46066	38463	31585	30476	30128	40895	70490
Z12	23501	34692	42382	72622	46016	28484	23757	21844	21336	27043	42658
Z13	17887	25280	34070	63578	30888	28255	14617	16791	16305	20131	25521
Z14	15331	16640	22333	48482	23804	23355	11622	12465	11548	15263	14634
Z15	11460	11058	17476	32563	28246	20414	8589	10207	12428	14803	9040

Tab. 2: Ergebnisse der Auswertung mit LSM Versuch 1, Kanal: grün. Z1 bis Z15 markieren die Probenschichten, aufgetragen gegen die Zeit in Minuten

Versuch 1 roter Kanal											
	0 min.	30 min.	60 min.	90 min.	120 min.	150 min.	180 min.	210 min.	240 min.	270 min.	300 min.
Z1	964	929	1382	2459	2793	2309	2053	2094	1922	2035	1993
Z2	2415	2177	3725	9103	13833	9852	7850	6998	6094	6484	5593
Z3	21599	18219	35562	53326	59275	55899	50519	49777	42505	42052	39692
Z4	60687	63444	73102	84140	80699	81755	86100	92350	98178	101418	109643
Z5	47222	57048	56791	70300	67946	76866	85128	89854	103134	109043	120895
Z6	30360	36207	36653	47007	46179	57694	66290	73136	83961	94657	120452
Z7	22625	25195	25194	30586	29910	37744	43786	49672	58033	67075	96386
Z8	19532	20022	21019	21934	24102	26371	30017	34816	36366	44042	62334
Z9	17105	17423	17793	19663	18766	19491	18695	23968	25118	29126	35600
Z10	16294	16264	15366	16954	15221	16559	14975	16063	18258	19385	22149
Z11	14677	14735	14015	15716	13570	13409	12715	12660	12958	15629	13302
Z12	13542	13292	12965	13702	13662	13207	11564	10465	10999	10998	9834
Z13	12836	12568	12210	12168	11349	11901	9890	9742	9400	10268	7820
Z14	12194	11882	11209	11299	10374	10966	8985	8791	8394	8810	6523
Z15	11694	11079	10326	10301	10276	10196	8299	7730	8222	8479	5813

Tab. 3: Ergebnisse der Auswertung mit LSM Versuch 1, Kanal: rot. Z1 bis Z15 markieren die Probenschichten, aufgetragen gegen die Zeit in Minuten

Versuch 2 grüner Kanal											
	0 min.	30 min.	60 min.	90 min.	120 min.	150 min.	180 min.	210 min.	240 min.	270 min.	300 min.
Z1	93089	73242	82605	95718	79569	70359	48573	32560	22358	18753	31483
Z2	116350	67485	79360	77967	64946	59349	48292	61949	51233	47306	78075
Z3	228125	131075	121733	131007	107454	90685	79176	155940	159556	178804	386012
Z4	344765	270749	253259	282414	241518	222506	201593	195022	201447	248147	444057
Z5	541499	478524	470676	525332	488327	457368	415165	327912	271348	267663	364549
Z6	694157	582374	544775	584263	572759	509990	502183	456794	454885	436174	488487
Z7	670721	565635	529547	581248	581342	526315	524032	478798	489185	446807	473698
Z8	557507	510984	510777	566583	574674	515489	518271	471654	481417	445702	465935
Z9	433876	444342	468303	516607	525663	475120	518226	461513	456997	409053	427163
Z10	303688	366183	405482	454575	472796	408172	484944	405224	423506	365078	366575
Z11	188236	260460	341947	394034	392980	361216	450051	351721	358256	304569	293351
Z12	108269	176912	265261	316589	309712	278205	383199	281016	283613	246071	219139
Z13	72114	130480	207948	239940	228545	215384	309813	351721	215716	168401	146102
Z14	46946	92596	155453	180305	167939	153097	241801	281016	152340	107501	86179
Z15	35118	66685	124664	137864	114498	111527	168759	204455	94815	70197	49251

Tab. 4: Ergebnisse der Auswertung mit LSM Versuch 2, Kanal: grün. Z1 bis Z15 markieren die Probenschichten, aufgetragen gegen die Zeit in Minuten

Versuch 2 roter Kanal											
	0 min.	30 min.	60 min.	90 min.	120 min.	150 min.	180 min.	210 min.	240 min.	270 min.	300 min.
Z1	5141	6210	9599	13900	14014	14883	14389	12958	12992	12952	15456
Z2	11149	14075	21708	32266	30970	31699	29537	23746	22190	22677	28980
Z3	84712	133817	169697	200081	176679	163488	141750	81409	69536	71201	93442
Z4	203714	212142	236890	274594	259158	258223	244985	227127	233914	251209	278128
Z5	224876	210160	257494	307197	315773	315331	302947	278963	280630	280864	306437
Z6	160369	160485	216453	285897	314856	325300	331455	314995	324232	328248	345049
Z7	104844	113512	157731	230781	277898	302217	324176	323562	340197	336965	354989
Z8	73438	85083	120538	175981	232345	259133	286938	300307	319315	321203	338637
Z9	56530	61339	89665	129120	179330	203739	286938	264382	281967	279830	294709
Z10	43898	47588	68644	97136	124280	148018	242362	206372	234799	233623	233321
Z11	35174	39758	52352	71195	85086	110972	200962	67031	181227	176757	168235
Z12	30865	33551	43101	54488	60823	75951	142872	111940	129592	127999	114250
Z13	28645	30267	36220	41337	47202	56764	99677	157031	91640	80549	75956
Z14	26198	26576	29908	35852	36859	42354	70588	111940	62208	55346	52412
Z15	24532	25242	26085	29468	29549	32573	49975	75684	44598	43011	38999

Tab. 5: Ergebnisse der Auswertung mit LSM Versuch 2, Kanal: rot. Z1 bis Z15 markieren die Probenschichten, aufgetragen gegen die Zeit in Minuten

Versuch 3 grüner Kanal											
	0 min.	30 min.	60 min.	90 min.	120 min.	150 min.	180 min.	210 min.	240 min.	270 min.	300 min.
Z1	42955	170567	214319	194242	143089	116756	137741	127424	126981	126996	125608
Z2	106803	199407	335529	337752	288733	218140	217296	177582	161809	151129	139130
Z3	178677	344043	579371	560471	505962	411904	436883	342488	316044	285274	260652
Z4	308399	473488	696126	636455	573736	453238	552966	411138	410782	389977	367779
Z5	327432	419534	659278	613953	567388	440407	564431	412265	418133	402658	369800
Z6	219987	307469	597526	581190	525609	406275	522206	380111	391338	382469	360466
Z7	136150	203294	521059	527210	484862	357646	477409	327541	356984	348880	325313
Z8	87669	142982	437821	483523	426867	304759	406204	268905	297037	308437	287460
Z9	55086	91391	49670	421402	368414	248727	343072	202370	224267	253554	233386
Z10	33463	59419	287493	374363	312169	200899	279334	152802	171816	196374	187681
Z11	24368	37382	237528	313044	249534	151320	225423	108340	121501	146332	138422
Z12	15078	30096	191925	258965	204283	115616	172244	74918	92520	109475	98154
Z13	12453	26922	148646	206348	162034	92023	136638	59921	69838	78959	72129
Z14	12283	22221	101407	156492	125502	74520	105908	45400	54328	59593	56278
Z15	11421	18153	66407	108289	89926	56775	78612	38473	46827	46815	44654

Tab. 6: Ergebnisse der Auswertung mit LSM Versuch 3, Kanal: grün. Z1 bis Z15 markieren die Probenschichten, aufgetragen gegen die Zeit in Minuten

Versuch 3 roter Kanal											
	0 min.	30 min.	60 min.	90 min.	120 min.	150 min.	180 min.	210 min.	240 min.	270 min.	300 min.
Z1	18189	305086	572220	675259	682988	639625	588135	504349	491407	434969	409199
Z2	549558	618936	715659	744407	720251	678710	707330	641244	637802	615824	606673
Z3	567749	600734	709860	743273	714301	674272	712637	638643	634124	621100	607014
Z4	514884	525564	634079	681747	676679	634713	704817	621768	635152	615685	607861
Z5	444530	431507	525939	588189	611184	578365	670823	595943	611042	598160	593002
Z6	374067	349943	434041	504769	539013	511502	604473	540610	567615	566021	567989
Z7	323377	298054	351625	422433	456059	433133	533824	471956	523172	524105	526627
Z8	287735	261064	293759	353154	378647	359506	449361	394585	446361	466862	471961
Z9	254708	229651	244498	291622	306394	289734	365501	315408	354772	393081	399468
Z10	233394	207390	209688	240984	251812	237011	294605	250248	287894	322034	337367
Z11	213148	185714	177337	195173	204504	186120	242487	195954	224531	256055	272319
Z12	197891	173074	156791	164351	171633	155002	195431	154035	180711	204252	218530
Z13	182229	158925	134169	135045	140587	133117	159264	130120	146469	160513	170530
Z14	170604	149776	115516	114840	121483	111958	129576	108957	120309	128942	136280
Z15	160491	140736	102494	96860	99600	90322	101804	93790	104807	107574	113515

Tab. 7: Ergebnisse der Auswertung mit LSM Versuch 3, Kanal: rot. Z1 bis Z15 markieren die Probenschichten, aufgetragen gegen die Zeit in Minuten

Versuch 4 grüner Kanal											
	0 min.	30 min.	60 min.	90 min.	120 min.	150 min.	180 min.	210 min.	240 min.	270 min.	300 min.
Z1	0	19839	32330	33620	57793	154182	21364	18655	16249	14285	12853
Z2	2	70852	100459	103855	131794	270600	65410	58648	49262	46940	40689
Z3	17592	182999	232710	231675	272329	299778	115197	103715	89995	74658	69150
Z4	58640	335735	400231	371962	310637	325217	153704	142431	128939	105136	96590
Z5	132178	455021	409117	380965	330133	337930	149436	148014	140212	121487	113126
Z6	163923	406127	362294	363191	326725	231672	122842	120901	128082	115395	107327
Z7	122439	317387	288250	309615	301973	175562	88285	84465	92094	92041	89703
Z8	90745	245260	207926	186990	248573	121599	54561	51963	54185	57698	61507
Z9	60503	155778	127538	170828	178382	79224	28348	25625	26520	26726	30336
Z10	31944	94513	74089	113369	117846	44595	14956	11934	12310	14373	17258
Z11	21235	57919	37750	60488	64442	21297	5479	3993	5235	6329	8770
Z12	14153	41800	21047	34142	36924	9779	1851	1241	3058	1563	3767
Z13	10047	24155	10692	18999	20527	4453	1398	765	1456	327	1436
Z14	7711	16679	5457	11807	11628	3977	1148	205	296	225	255
Z15	6667	13355	3374	8712	9122	3770	1074	493	214	174	27

Tab. 8: Ergebnisse der Auswertung mit LSM Versuch 4, Kanal: grün. Z1 bis Z15 markieren die Probenschichten, aufgetragen gegen die Zeit in Minuten

Versuch 4 roter Kanal											
	0 min.	30 min.	60 min.	90 min.	120 min.	150 min.	180 min.	210 min.	240 min.	270 min.	300 min.
Z1	61	15766	58566	99831	161143	13681	12600	10727	9366	8918	8201
Z2	157	70636	193776	227073	229620	26355	20176	18974	15586	15086	14605
Z3	5419	209808	298196	298800	289134	33758	30529	30121	26542	25419	24180
Z4	38453	272540	351281	349096	329526	37316	36456	39180	35150	33424	31831
Z5	65775	266426	339114	361406	350790	34694	35354	38788	37676	33820	33846
Z6	53657	210264	292533	338681	346362	23218	27974	28394	32547	28431	29242
Z7	38398	157604	233774	294840	310642	16120	17895	19305	19532	19088	19739
Z8	25013	118399	181244	237384	263415	12274	13191	14225	12131	13078	15781
Z9	15635	83548	127557	179107	207999	5944	7679	8380	9089	9159	11920
Z10	8405	62998	97662	134633	162234	2532	3326	4033	5005	5428	6955
Z11	5340	50752	74482	100839	119346	1011	1346	1967	1901	2043	3813
Z12	3500	43379	59180	79110	95038	369	565	701	1160	1087	1810
Z13	2619	35474	46050	60329	72652	70	234	276	550	527	567
Z14	2320	29971	37029	46041	55557	52	76	74	81	199	148
Z15	2048	27174	30578	36735	45161	12	27	21	14	48	97

Tab. 9: Ergebnisse der Auswertung mit LSM Versuch 4, Kanal: rot. Z1 bis Z15 markieren die Probenschichten, aufgetragen gegen die Zeit in Minuten

Versuch 5 grüner Kanal											
	0 min.	30 min.	60 min.	90 min.	120 min.	150 min.	180 min.	210 min.	240 min.	270 min.	300 min.
Z1	482	222093	136290	224087	179113	170583	183378	199465	178877	165859	218517
Z2	26104	200840	107596	212562	180491	195099	215195	217688	200204	197120	238266
Z3	55200	150174	83213	169697	156960	185080	199900	196288	188508	188616	232640
Z4	39597	109133	48568	130524	121909	162227	167077	148535	150930	151898	203604
Z5	21530	81300	34716	91823	85042	120441	125930	98250	103323	102717	162316
Z6	9910	59070	21386	53644	54473	80872	87653	64506	63629	55499	120778
Z7	6141	33174	15167	33465	25442	42555	49797	37337	38796	33584	75489
Z8	3985	19804	6823	17691	17691	16397	23653	17678	19243	25502	37697
Z9	3227	7980	4371	7944	9757	12339	11030	7723	6786	15113	16807
Z10	3130	3751	2223	3271	7279	6841	6265	4542	3190	6316	7501
Z11	2702	1608	1971	2393	3345	5566	4880	2641	1709	15113	3952
Z12	3192	1557	2203	1573	3289	3344	3262	2167	1474	2357	7501
Z13	2157	1658	1942	1254	1980	4247	2533	1985	1179	2430	3166
Z14	2187	942	1037	348	882	1985	2209	1527	1247	1866	2155
Z15	2188	939	1228	688	1179	754	1657	1170	1007	1216	2256

Tab. 10: Ergebnisse der Auswertung mit LSM Versuch 5, Kanal: grün. Z1 bis Z15 markieren die Probenschichten, aufgetragen gegen die Zeit in Minuten

Versuch 5 roter Kanal											
	0 min.	30 min.	60 min.	90 min.	120 min.	150 min.	180 min.	210 min.	240 min.	270 min.	300 min.
Z1	2638	136605	134830	177829	165283	183902	180754	215832	178877	219761	208467
Z2	15937	103641	100362	145113	150729	188531	190555	221876	230044	237277	224177
Z3	32663	71711	73868	106502	122796	169291	167700	186087	198811	206686	205191
Z4	18378	43915	41860	76437	86297	120620	130193	129104	146599	160017	163588
Z5	9351	32346	29397	46807	54464	73862	89495	80872	96404	104977	114494
Z6	4762	21138	16381	26590	29617	42398	55024	47665	56758	61717	72989
Z7	2903	9524	10742	15574	15134	16986	27138	25924	32580	34011	38966
Z8	1782	6500	4538	8113	7939	7349	10282	11514	14261	12058	16021
Z9	1419	2752	3475	3588	6504	6037	6021	5406	4716	3901	6705
Z10	1052	1328	1764	1712	4218	2905	4141	3642	2521	2684	3406
Z11	1146	546	1257	1450	1830	2737	2865	1651	1384	2130	2869
Z12	1012	561	990	677	1966	1199	2930	887	1412	1110	3406
Z13	575	627	956	850	1048	1113	1403	1046	993	1596	1894
Z14	1278	300	781	235	548	586	1513	956	903	807	1412
Z15	740	516	1243	430	738	332	1179	450	744	474	1294

Tab. 11: Ergebnisse der Auswertung mit LSM Versuch 5, Kanal: rot. Z1 bis Z15 markieren die Probenschichten, aufgetragen gegen die Zeit in Minuten

	Schicht	Kolmogorov-Smirnov(a)			Shapiro-Wilk		
		Statistik	df	Signifikanz	Statistik	Df	Signifikanz
Versuch 1 grün	Z1	0,254	11	0,045	0,795	11	0,008
	Z2	0,245	11	0,063	0,833	11	0,026
	Z3	0,202	11	,200(*)	0,804	11	0,01
	Z4	0,227	11	0,119	0,72	11	0,001
	Z5	0,333	11	0,001	0,595	11	0
	Z6	0,214	11	0,171	0,815	11	0,015
	Z7	0,209	11	0,195	0,806	11	0,011
	Z8	0,218	11	0,152	0,762	11	0,003
	Z9	0,21	11	0,188	0,848	11	0,041
	Z10	0,22	11	0,142	0,816	11	0,015
	Z11	0,203	11	,200(*)	0,852	11	0,045
	Z12	0,208	11	,200(*)	0,825	11	0,02
	Z13	0,205	11	,200(*)	0,77	11	0,004
	Z14	0,255	11	0,045	0,717	11	0,001
	Z15	0,219	11	0,147	0,842	11	0,034
Versuch 1 rot	Z1	0,24	11	0,076	0,915	11	0,282
	Z2	0,106	11	,200(*)	0,957	11	0,734
	Z3	0,16	11	,200(*)	0,921	11	0,328
	Z4	0,124	11	,200(*)	0,974	11	0,92
	Z5	0,12	11	,200(*)	0,963	11	0,804
	Z6	0,169	11	,200(*)	0,93	11	0,414
	Z7	0,181	11	,200(*)	0,866	11	0,068
	Z8	0,19	11	,200(*)	0,835	11	0,027
	Z9	0,295	11	0,008	0,809	11	0,012
	Z10	0,244	11	0,066	0,839	11	0,031
	Z11	0,178	11	,200(*)	0,909	11	0,236
	Z12	0,247	11	0,06	0,862	11	0,062
	Z13	0,184	11	,200(*)	0,923	11	0,349
	Z14	0,173	11	,200(*)	0,93	11	0,414
	Z15	0,24	11	0,075	0,928	11	0,392
Versuch 2 grün	Z1	0,199	11	,200(*)	0,897	11	0,172
	Z2	0,198	11	,200(*)	0,869	11	0,074
	Z3	0,235	11	0,09	0,79	11	0,007
	Z4	0,22	11	0,142	0,832	11	0,025
	Z5	0,199	11	,200(*)	0,912	11	0,257
	Z6	0,148	11	,200(*)	0,928	11	0,394
	Z7	0,16	11	,200(*)	0,941	11	0,536
	Z8	0,158	11	,200(*)	0,943	11	0,551
	Z9	0,171	11	,200(*)	0,933	11	0,441
	Z10	0,137	11	,200(*)	0,957	11	0,735
	Z11	0,169	11	,200(*)	0,965	11	0,832
	Z12	0,161	11	,200(*)	0,956	11	0,724
	Z13	0,16	11	,200(*)	0,972	11	0,908
	Z14	0,154	11	,200(*)	0,958	11	0,743
	Z15	0,128	11	,200(*)	0,971	11	0,892
Versuch	Z1	0,329	11	0,002	0,807	11	0,012

2 rot	Z2	0,193	11	,200(*)	0,897	11	0,172
	Z3	0,208	11	,200(*)	0,9	11	0,184
	Z4	0,094	11	,200(*)	0,97	11	0,888
	Z5	0,215	11	0,165	0,867	11	0,072
	Z6	0,316	11	0,003	0,761	11	0,003
	Z7	0,216	11	0,159	0,838	11	0,03
	Z8	0,178	11	,200(*)	0,882	11	0,111
	Z9	0,226	11	0,12	0,859	11	0,056
	Z10	0,206	11	,200(*)	0,861	11	0,058
	Z11	0,196	11	,200(*)	0,879	11	0,102
	Z12	0,2	11	,200(*)	0,896	11	0,164
	Z13	0,157	11	,200(*)	0,885	11	0,12
	Z14	0,173	11	,200(*)	0,851	11	0,045
	Z15	0,128	11	,200(*)	0,971	11	0,892
	Versuch 3 grün	Z1	0,22	11	0,141	0,907	11
Z2		0,197	11	,200(*)	0,916	11	0,29
Z3		0,168	11	,200(*)	0,962	11	0,8
Z4		0,169	11	,200(*)	0,952	11	0,669
Z5		0,251	11	0,051	0,899	11	0,179
Z6		0,199	11	,200(*)	0,94	11	0,52
Z7		0,181	11	,200(*)	0,918	11	0,305
Z8		0,175	11	,200(*)	0,934	11	0,452
Z9		0,15	11	,200(*)	0,937	11	0,485
Z10		0,152	11	,200(*)	0,963	11	0,806
Z11		0,172	11	,200(*)	0,959	11	0,754
Z12		0,18	11	,200(*)	0,962	11	0,796
Z13		0,169	11	,200(*)	0,956	11	0,72
Z14		0,173	11	,200(*)	0,961	11	0,784
Z15		0,157	11	,200(*)	0,97	11	0,889
Versuch 3 rot	Z1	0,169	11	,200(*)	0,877	11	0,096
	Z2	0,159	11	,200(*)	0,951	11	0,662
	Z3	0,187	11	,200(*)	0,94	11	0,525
	Z4	0,217	11	0,155	0,902	11	0,193
	Z5	0,284	11	0,014	0,851	11	0,044
	Z6	0,224	11	0,129	0,875	11	0,09
	Z7	0,191	11	,200(*)	0,889	11	0,136
	Z8	0,18	11	,200(*)	0,921	11	0,331
	Z9	0,124	11	,200(*)	0,944	11	0,565
	Z10	0,221	11	0,138	0,923	11	0,344
	Z11	0,172	11	,200(*)	0,916	11	0,284
	Z12	0,156	11	,200(*)	0,925	11	0,365
	Z13	0,171	11	,200(*)	0,914	11	0,271
	Z14	0,194	11	,200(*)	0,871	11	0,081
	Z15	0,276	11	0,019	0,783	11	0,006
Versuch 4 grün	Z1	0,328	11	0,002	0,653	11	0
	Z2	0,217	11	0,155	0,816	11	0,015
	Z3	0,204	11	,200(*)	0,93	11	0,408
	Z4	0,247	11	0,06	0,869	11	0,076

	Z5	0,312	11	0,004	0,818	11	0,016
	Z6	0,241	11	0,073	0,82	11	0,017
	Z7	0,253	11	0,048	0,765	11	0,003
	Z8	0,24	11	0,076	0,813	11	0,014
	Z9	0,251	11	0,052	0,811	11	0,013
	Z10	0,233	11	0,098	0,819	11	0,017
	Z11	0,224	11	0,13	0,818	11	0,016
	Z12	0,226	11	0,121	0,831	11	0,024
	Z13	0,241	11	0,073	0,832	11	0,025
	Z14	0,222	11	0,136	0,853	11	0,047
	Z15	0,213	11	0,176	0,865	11	0,067
Versuch 4 rot	Z1	0,384	11	0	0,684	11	0
	Z2	0,339	11	0,001	0,713	11	0,001
	Z3	0,375	11	0	0,711	11	0,001
	Z4	0,392	11	0	0,678	11	0
	Z5	0,34	11	0,001	0,701	11	0
	Z6	0,342	11	0,001	0,722	11	0,001
	Z7	0,343	11	0,001	0,725	11	0,001
	Z8	0,354	11	0	0,727	11	0,001
	Z9	0,357	11	0	0,734	11	0,001
	Z10	0,364	11	0	0,734	11	0,001
	Z11	0,365	11	0	0,732	11	0,001
	Z12	0,368	11	0	0,731	11	0,001
	Z13	0,367	11	0	0,73	11	0,001
	Z14	0,364	11	0	0,727	11	0,001
	Z15	0,363	11	0	0,724	11	0,001
Versuch 5 grün	Z1	0,287	11	0,012	0,74	11	0,002
	Z2	0,318	11	0,003	0,736	11	0,001
	Z3	0,212	11	0,178	0,871	11	0,081
	Z4	0,189	11	,200(*)	0,908	11	0,233
	Z5	0,198	11	,200(*)	0,945	11	0,578
	Z6	0,221	11	0,14	0,944	11	0,569
	Z7	0,175	11	,200(*)	0,937	11	0,491
	Z8	0,215	11	0,166	0,921	11	0,324
	Z9	0,175	11	,200(*)	0,963	11	0,807
	Z10	0,208	11	0,198	0,89	11	0,14
	Z11	0,268	11	0,027	0,645	11	0
	Z12	0,306	11	0,005	0,733	11	0,001
	Z13	0,183	11	,200(*)	0,903	11	0,201
	Z14	0,177	11	,200(*)	0,913	11	0,265
	Z15	0,281	11	0,016	0,87	11	0,078
Versuch 5 rot	Z1	0,235	11	0,09	0,769	11	0,004
	Z2	0,182	11	,200(*)	0,898	11	0,175
	Z3	0,218	11	0,149	0,9	11	0,182
	Z4	0,192	11	,200(*)	0,92	11	0,319
	Z5	0,129	11	,200(*)	0,958	11	0,749
	Z6	0,133	11	,200(*)	0,971	11	0,895
	Z7	0,177	11	,200(*)	0,956	11	0,723
	Z8	0,14	11	,200(*)	0,986	11	0,991

Z9	0,162	11	,200(*)	0,942	11	0,543
Z10	0,157	11	,200(*)	0,943	11	0,561
Z11	0,16	11	,200(*)	0,931	11	0,417
Z12	0,251	11	0,05	0,824	11	0,02
Z13	0,214	11	0,169	0,936	11	0,47
Z14	0,126	11	,200(*)	0,954	11	0,698
Z15	0,223	11	0,133	0,865	11	0,067

* Dies ist eine untere Grenze der echten Signifikanz.

a Signifikanzkorrektur nach Lilliefors

Tab. 12: Tests auf Normalverteilung nach Kolmogorov-Smirnov und Shapiro-Wilk.
Überprüft wurden die Werte einer Schicht (Z1 – Z15) jeweils über den gesamten Versuchszeitraum

		MIN	1. Quartil	Median	3. Quartil	MAX	IQR
Versuch 1 grün	Z1	8190	9912	14115	21075	42917	11163
	Z2	45374	70887	83251	99408	208143	28521
	Z3	131269	171595,5	216664	314676,5	678506	143081
	Z4	151333	179560,5	209631	311835	779395	132274,5
	Z5	179631	217466	239674	259435	652878	41969
	Z6	140045	169050	252047	298817,5	573794	129767,5
	Z7	106699	123809	168488	221403	412020	97594
	Z8	82755	93437	108958	156221,5	305134	62784,5
	Z9	52978	64523	84656	104303,5	194556	39780,5
	Z10	38488	47259	56237	70752	117850	23493
	Z11	28969	31030,5	40895	53857,5	92411	22827
	Z12	21336	23629	28484	42520	72622	18891
	Z13	14617	17339	25280	29571,5	63578	12232,5
	Z14	11548	13549,5	15331	22844	48482	9294,5
Z15	8589	10632,5	12428	18945	32563	8312,5	
Versuch 1 rot	Z1	929	1652	2035	2201,5	2793	549,5
	Z2	2177	4659	6484	8476,5	13833	3817,5
	Z3	18219	37627	42505	51922,5	59275	14295,5
	Z4	60687	76900,5	84140	95264	109643	18363,5
	Z5	47222	62497	76866	96494	120895	33997
	Z6	30360	41416	57694	78548,5	120452	37132,5
	Z7	22625	27552,5	37744	53852,5	96386	26300
	Z8	19532	21476,5	26371	35591	62334	14114,5
	Z9	17105	18244	19491	24543	35600	6299
	Z10	14975	15714,5	16294	17606	22149	1891,5
	Z11	12660	13130	13570	14706	15716	1576
	Z12	9834	10998,5	12965	13417	13702	2418,5
	Z13	7820	9816	11349	12189	12836	2373
	Z14	6523	8800,5	10374	11254	12194	2453,5
Z15	5813	8260,5	10196	10313,5	11694	2053	
Versuch 2 grün	Z1	18753	32021,5	70359	81087	95718	49065,5
	Z2	47306	55291	64946	78021	116350	22730
	Z3	79176	114593,5	131075	169180	386012	54586,5

	Z4	195022	212049,5	248147	276581,5	444057	64532
	Z5	267663	346230,5	457368	483425,5	541499	137195
	Z6	436174	472640,5	509990	577566,5	694157	104926
	Z7	446807	483991,5	526315	573441,5	670721	89450
	Z8	445702	476535,5	510984	537889	574674	61353,5
	Z9	409053	439109	461513	495863,5	525663	56754,5
	Z10	303688	366379	405482	439040,5	484944	72661,5
	Z11	188236	298960	351721	377098	450051	78138
	Z12	108269	232605	278205	296662,5	383199	64057,5
	Z13	72114	157251,5	215384	234242,5	351721	76991
	Z14	46946	100048,5	153097	174122	281016	74073,5
	Z15	35118	68441	111527	131264	204455	62823
Versuch 2 rot	Z1	5141	11275,5	12992	14201,5	15456	2926
	Z2	11149	21949	23746	30253,5	32266	8304,5
	Z3	69536	83060,5	133817	166592,5	200081	83532
	Z4	203714	230520,5	244985	258690,5	278128	28170
	Z5	210160	268228,5	280864	306817	315773	38588,5
	Z6	160369	251175	314995	326774	345049	75599
	Z7	104844	194256	302217	330570,5	354989	136314,5
	Z8	73438	148259,5	259133	309811	338637	161551,5
	Z9	56530	109392,5	203739	280898,5	294709	171506
	Z10	43898	82890	148018	233472	242362	150582
	Z11	35174	59691,5	85086	172496	200962	112804,5
	Z12	30865	48794,5	75951	121124,5	142872	72330
	Z13	28645	38778,5	56764	86094,5	157031	47316
	Z14	26198	32880	42354	58777	111940	25897
	Z15	24532	27776,5	32573	43804,5	75684	16028
Versuch 3 grün	Z1	42955	126294,5	127424	156828	214319	30533,5
	Z2	106803	156469	199407	253436,5	337752	96967,5
	Z3	178677	300659	344043	471422,5	579371	170763,5
	Z4	308399	400379,5	453238	563351	696126	162971,5
	Z5	327432	407461,5	419534	565909,5	659278	158448
	Z6	219987	370288,5	391338	523907,5	597526	153619
	Z7	136150	326427	356984	481135,5	527210	154708,5
	Z8	87669	278182,5	304759	416535,5	483523	138353
	Z9	49670	146880,5	233386	298313	421402	151432,5
	Z10	33463	162309	196374	283413,5	374363	121104,5
	Z11	24368	114920,5	146332	231475,5	313044	116555
	Z12	15078	83719	109475	182084,5	258965	98365,5
	Z13	12453	64879,5	78959	142642	206348	77762,5
	Z14	12283	49864	59593	103657,5	156492	53793,5
	Z15	11421	41563,5	46827	72509,5	108289	30946
Versuch 3 rot	Z1	18189	422084	504349	613880	682988	191796
	Z2	549558	617380	641244	711494,5	744407	94114,5
	Z3	567749	614057	638643	711248,5	743273	97191,5
	Z4	514884	611773	634079	655915,5	704817	44142,5
	Z5	431507	552152	593002	604601	670823	52449
	Z6	349943	469405	539013	566818	604473	97413
	Z7	298054	387029	456059	523638,5	533824	136609,5

	Z8	261064	323456,5	378647	447861	471961	124404,5
	Z9	229651	272221	306394	360136,5	399468	87915,5
	Z10	207390	235202,5	250248	291249,5	337367	56047
	Z11	177337	190646,5	204504	233509	272319	42862,5
	Z12	154035	160571	173074	196661	218530	36090
	Z13	130120	134607	146469	159888,5	182229	25281,5
	Z14	108957	115178	121483	132928	170604	17750
	Z15	90322	98230	102494	110544,5	160491	12314,5
Versuch 4 grün	Z1	0	15267	19839	32975	154182	17708
	Z2	2	48101	65410	102157	270600	54056
	Z3	17592	82326,5	115197	232192,5	299778	149866
	Z4	58640	117037,5	153704	330476	400231	213438,5
	Z5	113126	136195	149436	359447,5	455021	223252,5
	Z6	107327	121871,5	163923	344509,5	406127	222638
	Z7	84465	90872	122439	295111,5	317387	204239,5
	Z8	51963	56129,5	90745	197458	248573	141328,5
	Z9	25625	27537	60503	141658	178382	114121
	Z10	11934	14664,5	31944	84301	117846	69636,5
	Z11	3993	5904	21235	47834,5	64442	41930,5
	Z12	1241	2454,5	9779	27594,5	41800	25140
	Z13	327	1417	4453	14845,5	24155	13428,5
	Z14	205	275,5	3977	9669,5	16679	9394
	Z15	27	353,5	3374	7689,5	13355	7336
Versuch 4 rot	Z1	61	9142	12600	37166	161143	28024
	Z2	157	15336	20176	132206	229620	116870
	Z3	5419	25980,5	30529	249471	298800	223490,5
	Z4	31831	35803	38453	301033	351281	265230
	Z5	33820	35024	38788	302770	361406	267746
	Z6	23218	28412,5	32547	251398,5	346362	222986
	Z7	16120	19196,5	19739	195689	310642	176492,5
	Z8	12131	13134,5	15781	149821,5	263415	136687
	Z9	5944	8734,5	11920	105552,5	207999	96818
	Z10	2532	4519	6955	80330	162234	75811
	Z11	1011	1934	3813	62617	119346	60683
	Z12	369	894	1810	51279,5	95038	50385,5
	Z13	70	401,5	567	40762	72652	40360,5
	Z14	52	78,5	199	33500	55557	33421,5
	Z15	12	24	97	28876	45161	28852
Versuch 5 grün	Z1	482	168221	179113	208991	224087	40770
	Z2	26104	187795	200204	213878,5	238266	26083,5
	Z3	55200	153567	185080	192452	232640	38885
	Z4	39597	115521	148535	157062,5	203604	41541,5
	Z5	21530	83171	98250	111882	162316	28711
	Z6	9910	54058,5	59070	72689	120778	18630,5
	Z7	6141	29308	33584	40675,5	75489	11367,5
	Z8	3985	17037,5	17691	21728,5	37697	4691
	Z9	3227	7254,5	7980	11684,5	16807	4430
	Z10	2223	3230,5	4542	6578,5	7501	3348
	Z11	1608	2182	2702	4416	15113	2234

	Z12	1474	1870	2357	3275,5	7501	1405,5
	Z13	1179	1800	1985	2481,5	4247	681,5
	Z14	348	989,5	1527	2070	2209	1080,5
	Z15	688	973	1179	1442,5	2256	469,5
Versuch 5 rot	Z1	2638	150944	178877	196184,5	219761	45240,5
	Z2	15937	124377	188531	223026,5	237277	98649,5
	Z3	32663	90185	167700	192449	206686	102264
	Z4	18378	60176	120620	138396	163588	78220
	Z5	9351	39576,5	73862	92949,5	114494	53373
	Z6	4762	23864	42398	55891	72989	32027
	Z7	2903	12938	16986	29859	38966	16921
	Z8	1782	6924,5	8113	11786	16021	4861,5
	Z9	1419	3531,5	4716	6029	6705	2497,5
	Z10	1052	1738	2684	3524	4218	1786
	Z11	546	1320,5	1651	2433,5	2869	1113
	Z12	561	938,5	1110	1689	3406	750,5
	Z13	575	903	1046	1258	1894	355
	Z14	235	567	807	1117	1513	550
Z15	332	462	738	961,5	1294	499,5	

Tab. 13: Aus den Tabellen zwei bis zwölf wurden für jede Schicht (Z1 – Z15) Minimum, 1. Quartil, Median, 3. Quartil, Maximum und der Interquartile Abstand (IQR) ermittelt, um daraus Boxplots zu erstellen (s. Abb. 21 - 25).

Literaturverzeichnis

1. Ahn SJ, Kho HS, Lee SW, Nahm DS. Roles of salivary proteins in the adherence of oral streptococci to various orthodontic brackets. *J Dent Res* 2002; 81: 411-415
2. Auschill TM, Arweiler NB, Netuschil L, Brex M, Reich E, Sculean A. Spatial distribution of vital and dead microorganisms in dental biofilms. *Arch Oral Biol* 2001; 46: 471-476
3. Azen EA. Genetic protein polymorphisms in human saliva: an interpretive review. *Biochem Genet* 1978; 16: 79-99
4. Bennick A, Cannon M, Madapallimattam G. The nature of the hydroxyapatite-binding site in salivary acidic proline-rich proteins. *Biochem J* 1979; 183: 115-126
5. Bennick A, Chau G, Goodlin R, Abrams S, Tustian D, Madapallimattam G. The role of human salivary acidic proline-rich proteins in the formation of acquired dental pellicle in vivo and their fate after adsorption to the human enamel surface. *Arch Oral Biol* 1983a; 28: 19-27
6. Bennick A, Kells D, Madapallimattam G. Interaction of calcium ions and salivary acidic proline-rich proteins with hydroxyapatite. A possible aspect of inhibition of hydroxyapatite formation. *Biochem J* 1983b; 213: 11-20
7. Black GV. Dr Black's conclusions reviewed again. *Dent Cosmos* 1898; 40
8. Bowen WH, Cohen B, Cole MF, Colman G. Immunization against dental caries. *Br Dent J* 1975; 139: 45-58

9. *Busscher HJ, Doornbusch GI, Van der Mei HC. Adhesion of mutants streptococci to glass with and without a salivary coating as studied in a parallel-plate flow chamber. J Dent Res 1992; 71: 491-500*
10. *Costerton JW. Cleaning techniques for medical devices: biofilms. Biomed Instrum Technol 1997; 31: 222-226, 247*
11. *Cui FZ, Ge J. New observations of the hierarchical structure of human enamel, from nanoscale to microscale. J Tissue Eng Regen Med 2007; 1: 185-191*
12. *Cypionka H. Grundlagen der Mikrobiologie. Berlin Heidelberg New York: Springer Verlag, 1999*
13. *Dawes C, MacPherson LM. The distribution of saliva and sucrose around the mouth during the use of chewing gum and the implications for the site-specificity of caries and calculus deposition. J Dent Res 1993; 72: 852-857*
14. *Embleton JV, Newman HN, Wilson M. Influence of growth mode and sucrose on susceptibility of *Streptococcus sanguis* to amine fluorides and amine fluoride-inorganic fluoride combinations. Appl Environ Microbiol 1998; 64: 3503-3506*
15. *Fritsche. Mikrobiologie. Heidelberg-Berlin: Spektrum Akademischer Verlag, 2002*
16. *Fritsche W. Mikrobiologie. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag GmbH - Berlin, 2002*
17. *Gibbons RJ. Bacterial adhesion to oral tissues: a model for infectious diseases. J Dent Res 1989; 68: 750-760*
18. *Gibbons RJ, Hay DI, Cisar JO, Clark WB. Adsorbed salivary proline-rich protein 1 and statherin: receptors for type 1 fimbriae of *Actinomyces viscosus* T14V-J1 on apatitic surfaces. Infect Immun 1988; 56: 2990-2993*

19. *Gilbert P, Das J, Foley I. Biofilm susceptibility to antimicrobials. Adv Dent Res 1997; 11: 160-167*
20. *Gillece-Castro BL, Prakobphol A, Burlingame AL, Leffler H, Fisher SJ. Structure and bacterial receptor activity of a human salivary proline-rich glycoprotein. J Biol Chem 1991; 266: 17358-17368*
21. *Gupta A, Epstein JB, Sroussi H. Hyposalivation in elderly patients. J Can Dent Assoc 2006; 72: 841-846*
22. *Hannig C, Attin T, Hannig M, Henze E, Brinkmann K, Zech R. Immobilisation and activity of human alpha-amylase in the acquired enamel pellicle. Arch Oral Biol 2004; 49: 469-475*
23. *Hannig C, Becker K, Hausler N, Hoth-Hannig W, Attin T, Hannig M. Protective effect of the in situ pellicle on dentin erosion-an ex vivo pilot study. Arch Oral Biol 2007; 52: 444-449*
24. *Hannig C, Hannig M, Attin T. Enzymes in the acquired enamel pellicle. Eur J Oral Sci 2005; 113: 2-13*
25. *Hannig C, Hannig M, Rehmer O, Braun G, Hellwig E, Al-Ahmad A. Fluorescence microscopic visualization and quantification of initial bacterial colonization on enamel in situ. Arch Oral Biol 2007; 52: 1048-1056*
26. *Hannig M. Neues zum Thema Immunisierung gegen Karies. Zahnärztliche Mitteilungen 2001; 10/2001: 28*
27. *Hannig M, Bossmann K. Dental pellicle (1). Ultrastructural variety as expression of complex formation and maturation. Quintessenz 1989a; 40: 1319-1327*

28. Hannig M, Bossmann K. *Dental pellicle (2). Ultrastructural variety as expression of complex formation and maturation. Quintessenz 1989b; 40: 1485-1489*
29. Hannig M, Bossmann K. *The importance of the resistance of the pellicle to abrasion in tooth cleansing with fluoridated tooth pastes. Dtsch Zahnärztl Z 1988; 43: 880-883*
30. Hannig M, Fiebiger M, Guntzer M, Dobert A, Zimehl R, Nekrashevych Y. *Protective effect of the in situ formed short-term salivary pellicle. Arch Oral Biol 2004; 49: 903-910*
31. Hara AT, Ando M, Gonzalez-Cabezas C, Cury JA, Serra MC, Zero DT. *Protective effect of the dental pellicle against erosive challenges in situ. J Dent Res 2006; 85: 612-616*
32. Hardie JM, Bowden GH. *Bacterial flora of dental plaque. Br Med Bull 1975; 31: 131-136*
33. Hay DI. *The adsorption of salivary proteins by hydroxyapatite and enamel. Arch Oral Biol 1967; 12: 937-946*
34. Hein N. *Dreidimensionale Struktur- und Vitalitätsverteilung oraler bakterieller Biofilme (Dentaler Plaque), Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i. Br., 2004.*
35. Helderman VP. *Longitudinal microbial changes in developing human supragingival and subgingival dental plaque. Archives of Oral Biology 1981; Volume 26: Pages 7-12*
36. Hellwig E. KJ, Attin T. *Einführung in die Zahnerhaltung. München, Jena: Urban und Fischer, 2003*
37. Hillman JD, Brooks TA, Michalek SM, Harmon CC, Snoep JL, van Der Weijden CC. *Construction and characterization of an effector strain of Streptococcus mutans for replacement therapy of dental caries. Infect Immun 2000; 68: 543-549*

38. Hillman JD, Mo J, McDonell E, Cvitkovitch D, Hillman CH. Modification of an effector strain for replacement therapy of dental caries to enable clinical safety trials. *J Appl Microbiol* 2007; 102: 1209-1219
39. Imfeld T. Oligosialia and xerostomia. I. Basic principles, epidemiology, etiology, pathology. *Schweiz Monatsschr Zahnmed* 1984; 94: 741-754
40. Jenkins GN. *The physiology and biochemistry of the mouth*. Oxford: Blackwell Scientific Publ, 1978
41. Jenkinson HF, Lamont RJ. Streptococcal adhesion and colonization. *Crit Rev Oral Biol Med* 1997; 8: 175-200
42. Jenkinson HF, Lappin-Scott HM. Biofilms adhere to stay. *Trends Microbiol* 2001; 9: 9-10
43. Koch C. Early infection and progression of cystic fibrosis lung disease. *Pediatr Pulmonol* 2002; 34: 232-236
44. Kordes A. *Morphologische Studien der Primärkolonisation von pellicelbeschichteten Schmelzoberflächen am Beispiel von Streptococcus mutans*, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität zu Bonn, 2006.
45. Kruger C, Pearson SK, Kodama Y, Vacca Smith A, Bowen WH, Hammarstrom L. The effects of egg-derived antibodies to glucosyltransferases on dental caries in rats. *Caries Res* 2004; 38: 9-14
46. Leach SA, Saxton CA. An electron microscopic study of the acquired pellicle and plaque formed on the enamel of human incisors. *Arch Oral Biol* 1966; 11: 1081-1094
47. Lehmann K HE. *Einführung in die restaurative Zahnheilkunde* München: Urban & Schwarzenberg, 1998

48. *Lendenmann U, Grogan J, Oppenheim FG. Saliva and dental pellicle--a review. Adv Dent Res 2000; 14: 22-28*
49. *Levine MJ, Reddy MS, Tabak LA, Loomis RE, Bergey EJ, Jones PC, Cohen RE, Stinson MW, Al-Hashimi I. Structural aspects of salivary glycoproteins. J Dent Res 1987; 66: 436-441*
50. *Li J, Helmerhorst EJ, Troxler RF, Oppenheim FG. Identification of in vivo pellicle constituents by analysis of serum immune responses. J Dent Res 2004a; 83: 60-64*
51. *Li J, Helmerhorst EJ, Yao Y, Nunn ME, Troxler RF, Oppenheim FG. Statherin is an in vivo pellicle constituent: identification and immuno-quantification. Arch Oral Biol 2004b; 49: 379-385*
52. *Lie T. Scanning and transmission electron microscope study of pellicle morphogenesis. Scand J Dent Res 1977; 85: 217-231*
53. *Loe H, Theilade E, Jensen SB. Experimental Gingivitis in Man. J Periodontol 1965; 36: 177-187*
54. *Loesche WJ, Lopatin DE. Interactions between periodontal disease, medical diseases and immunity in the older individual. Periodontol 2000 1998; 16: 80-105*
55. *Ma JK, Lehner T, Stabila P, Fux CI, Hiatt A. Assembly of monoclonal antibodies with IgG1 and IgA heavy chain domains in transgenic tobacco plants. Eur J Immunol 1994; 24: 13113-8*
56. *Ma JK, Smith R, Lehner T. Use of monoclonal antibodies in local passive immunization to prevent colonization of human teeth by Streptococcus mutans. Infect Immun 1987; 55: 1274-1278*

57. Madigan MT MJ, Parker J (Goebel H, Hrsg). *Brock – Mikrobiologie, Spektrum Lehrbuch. Heidelberg – Berlin: Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg – Berlin, 2001*
58. Marsh PD. *Dental plaque as a biofilm and a microbial community - implications for health and disease. BMC Oral Health 2006; 6 Suppl 1: 14*
59. Marsh PD. *Microbiologic aspects of dental plaque and dental caries. Dent Clin North Am 1999; 43: 599-614*
60. Marsh PD, Bradshaw DJ. *Dental plaque as a biofilm. J Ind Microbiol 1995; 15: 169-175*
61. Meckel AH, Griebstein WJ, Neal RJ. *Structure of mature human dental enamel as observed by electron microscopy. Arch Oral Biol 1965; 10: 775-783*
62. Moreno EC, Varughese K, Hay DI. *Effect of human salivary proteins on the precipitation kinetics of calcium phosphate. Calcif Tissue Int 1979; 28: 7-16*
63. Netuschil L, Reich E, Unteregger G, Sculean A, Brex M. *A pilot study of confocal laser scanning microscopy for the assessment of undisturbed dental plaque vitality and topography. Arch Oral Biol 1998; 43: 277-285*
64. Newbrun E. *Dental research: problems, progress, and prognosis. J Dent Res 1989; 68: 1377-1378*
65. Ohnsorge J, Holm R. *Rasterelektronenmikroskopie. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1978*
66. Renye JA Jr., Piggot PJ, Daneo-Moore L, Buttaro BA. *Persistence of Streptococcus mutans in stationary-phase batch cultures and biofilms. Appl Environ Microbiol 2004; 70: 6181-6187*

67. Ritz HL. *Microbial population shifts in developing human dental plaque. Arch Oral Biol* 1967; 12: 1561-1568
68. Robinson C, Strafford S, Rees G, Brookes SJ, Kirkham J, Shore RC, Watson PS, Wood S. *Plaque biofilms: the effect of chemical environment on natural human plaque biofilm architecture. Arch Oral Biol* 2006; 51: 1006-1014
69. Roderfeld M, Matern S, Roeb E. *Confocal laser scanning microscopy: a deep look into the cell. Dtsch Med Wochenschr* 2003; 128: 2539-2542
70. Ronstrom A, Edwardsson S, Atistrom R. *Streptococcus sanguis and streptococcus salivarius in early plaque formation on plastic films. J Periodontal Res* 1977; 12: 331-339
71. Rosan B, Lamont RJ. *Dental plaque formation. Microbes Infect* 2000; 2: 1599-1607
72. Rudney JD. *Saliva and dental plaque. Adv Dent Res* 2000; 14: 29-39
73. Sanchez-Garcia S, Gutierrez-Venegas G, Juarez-Cedillo T, Reyes-Morales H, Solorzano-Santos F, Garcia-Pena C. *A simplified caries risk test in stimulated saliva from elderly patients. Gerodontology* 2008; 25: 26-33
74. Sas R, Dawes C. *The intra-oral distribution of unstimulated and chewing-gum-stimulated parotid saliva. Arch Oral Biol* 1997; 42: 469-474
75. Schade R. *Entwicklung eines in vitro-Systems zur Prüfung der initialen Plaqueadhärenz an dentalen Biomaterialien, Friedrich-Schiller-Universität Jena, 2005.*
76. Schmidt RF, Thews G, Lang F. *Physiologie des Menschen. Berlin: Springer Berlin, 2000*
77. Seibert W, Farmer-Dixon C, Bolden T, Stewart JH. *Streptococcus mutans levels and caries prevalence in low-income schoolchildren. J Tenn Dent Assoc* 2002; 82: 19-22

78. Shimazaki Y, Mitoma M, Oho T, Nakano Y, Yamashita Y, Okano K, Nakano Y, Fukuyama M, Fujihara N, Nada Y, Koga T. Passive immunization with milk produced from an immunized cow prevents oral recolonization by *Streptococcus mutans*. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001; 8: 1136-1139
79. Smiech-Slomkowska G, Jablonska-Zrobek J. The effect of oral health education on dental plaque development and the level of caries-related *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* spp. *Eur J Orthod* 2007; 29: 157-160
80. Smith L, Zachariah C, Thirumoorthy R, Rocca J, Novak J, Hillman JD, Edison AS. Structure and dynamics of the lantibiotic mutacin 1140. *Biochemistry* 2003; 42: 10372-10384
81. Sonju T, Rolla G. Chemical analysis of the acquired pellicle formed in two hours on cleaned human teeth in vivo. Rate of formation and amino acid analysis. *Caries Res* 1973; 7: 30-38
82. Speckmann Du. *Physiologie*. München: Urban und Fischer Verlag, 1999
83. Taubman MA, Holmberg CJ, Smith DJ. Immunization of rats with synthetic peptide constructs from the glucan-binding or catalytic region of mutans streptococcal glucosyltransferase protects against dental caries. *Infect Immun* 1995; 63: 3088-3093
84. Tinanoff N, Glick PL, Weber DF. Ultrastructure of organic films on the enamel surface. *Caries Res* 1976; 10: 19-32
85. van Houte J. Role of micro-organisms in caries etiology. *J Dent Res* 1994; 73: 672-681
86. Van Houte J, Gibbons RJ, Banghart SB. Adherence as a determinant of the presence of *Streptococcus salivarius* and *Streptococcus sanguis* on the human tooth surface. *Arch Oral Biol* 1970; 15: 1025-1034

87. Vitorino R, de Moraes Guedes S, Ferreira R, Lobo MJ, Duarte J, Ferrer-Correia AJ, Tomer KB, Domingues PM, Amado FM. Two-dimensional electrophoresis study of *in vitro* pellicle formation and dental caries susceptibility. *Eur J Oral Sci* 2006; 114: 147-153
88. Watson TF. Applications of confocal scanning optical microscopy to dentistry. *Br Dent J* 1991; 171: 287-291
89. Weiger R, Netuschil L, von Ohle C, Brex M. Microbial vitality of supragingival dental plaque during initial stages of experimental gingivitis in humans. *J Periodontal Res* 1995; 30: 204-209
90. Weintraub JA, Hilton JF, White JM, Hoover CI, Wycoff KL, Yu L, Larrick JW, Featherstone JD. Clinical trial of a plant-derived antibody on recolonization of mutans streptococci. *Caries Res* 2005; 39: 241-250
91. WHO, 2007: Fact sheet No. 318.
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs318/en/index.html> (21.05.2008)
92. Wood SR, Kirkham J, Marsh PD, Shore RC, Nattress B, Robinson C. Architecture of intact natural human plaque biofilms studied by confocal laser scanning microscopy. *J Dent Res* 2000; 79: 21-27
93. Zee KY, Samaranayake LP, Attstrom R. Scanning electron microscopy of microbial colonization of 'rapid' and 'slow' dental-plaque formers *in vivo*. *Arch Oral Biol* 1997; 42: 735-742

Herstellerverzeichnis

Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland

Nalge Nunc, Naperville, USA

Carl Zeiss Lightmicroscopy, Göttingen, Deutschland

Schleicher und Schuell, Dassel, Deutschland

Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland

Invitrogen corporation, Carlsbad, USA

Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland

SPSS-Software, München, Deutschland

Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland