

**Untersuchungen zum Wachstumsverhalten und zur  
Säureproduktion kariogener Mikroorganismen bei  
Anwendung von Steviosid- und Rebaudiosid A-Produkten**

**– Eine Pilotstudie –**

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

**Anna Christine Ackermann**

aus Eitorf

2017

Angefertigt mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. dent. Matthias Frentzen
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Werner Götz

Tag der Mündlichen Prüfung: 27.09.2017

Aus der Poliklinik für Parodontologie, Zahnerhaltung und Präventive Zahnheilkunde im  
Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-  
Universität Bonn,

Direktor: Prof. Dr. Dr. Søren Jepsen

Für meine Familie



# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	7
1. Einleitung	9
1.1 Allgemeine Einführung	9
1.2 Zuckeraustausch / Zuckerersatzstoffe	13
1.2.1 Übersicht über Zuckerersatzstoffe	13
1.2.2 Quantitative Aspekte des Zuckerkonsums	17
1.3 Grundlagen der Kariesentstehung	18
1.4 Steviosid und Rebaudiosid A als Zuckerersatzstoffe	22
1.4.1 Literaturübersicht für ihre Anwendung in der Zahnheilkunde	26
1.5 Ziel der Arbeit	29
2. Material und Methode	30
2.1 Material	30
2.1.1 Mikroorganismen	30
2.1.2 Vorbereitende Maßnahmen	31
2.2 Verhalten von Mikroorganismen in einer Batch-Kultur	33
2.3 Bestimmung der optischen Dichte	35
2.4 Bestimmung des pH-Wertes	36
2.5 Datenerfassung, Auswertung, Statistik	37
3. Ergebnisse	38
3.1 Ergebnisse der Wachstumsversuche	38
3.1.1 Streptokokkus sobrinus	38
3.1.2 Streptokokkus mutans	40
3.1.3 Streptokokkus salivarius	41
3.1.4 Streptokokkus sanguinis	44
3.1.5 Gegenüberstellung der Ergebnisse der Wachstumsversuche	46
3.2 Ergebnisse der pH-Wert-Messungen	48
3.2.1 Streptokokkus sobrinus	48
3.2.2 Streptokokkus mutans	50
3.2.3 Streptokokkus salivarius	52
3.2.4 Streptokokkus sanguinis	54
3.2.5 Vergleich der pH-Wert-Änderung der einzelnen Mikroorganismen untereinander	56
3.2.6 Zusammenfassende Darstellung des speziesbezogenen Vergleichs der pH-Wert-Veränderung in den verschiedenen Testmedien	61
4. Diskussion	64

4.1	Bakterielles Wachstum unter Zusatz von Steviosid- bzw. Rebaudiosid A-Produkten .....	64
4.2	Beeinflussung der Wachstumsparameter durch Zusatz von Steviosid- und Rebaudiosid A-Produkte.....	65
4.3	Einfluss von Steviosid- und Rebaudiosid A-Produkten auf den pH-Wert der Kulturen .....	66
4.4	Ausblick.....	68
5.	Zusammenfassung .....	70
6.	Anhang .....	71
6.1	Abbildungsverzeichnis .....	71
6.2	Tabellenverzeichnis .....	75
7.	Literaturverzeichnis.....	77
8.	Danksagung.....	87

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADI	englisch, Acceptable Daily Intake, erlaubte Tagesdosis, ETD
ANOVA	englisch, Analysis of variance; Varianzanalyse
Aqua dest.	destilliertes Wasser
BHI	englisch, Brain-Heart-Infusion; Hirn-Herz-Bouillon
Bio	In der Lebensmittelindustrie gebräuchliche Abkürzung für biologisch
BMEL	Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft
$\text{Ca}^{2+}\text{PO}_4^{3-}$	Kalziumphosphat
DGE	Deutsche Gesellschaft für Ernährung
DMS V	5. Deutsche Mundgesundheitsstudie
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EFSA	englisch, European Food Safety Authority; Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit
EG	Europäische Gemeinschaft
E-Nummern	englisch, edible; von der Europäischen Union vergebene Nummern für Lebensmittelzusatzstoffe
EPS	extrazelluläre Polysaccharide
ETD	erlaubte Tagesdosis
FAO	englisch, Food and Agriculture Organization of the United Nations; Ernährungs- und Landwirtschaftsorganisation der Vereinten Nationen
FTF	Fruktosyltransferase
G 1, ...	Gruppe 1, ...
GBP	Glukan-bindendes-Protein
GTF	Glykosyltransferase

HPLC	englisch, high performance liquid chromatography, Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IPS	intrazelluläre Polysaccharide
JECFA	englisch, Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives; Gemeinsamer FAO/WHO-Sachverständigenausschuss für Lebensmittelzusatzstoffe
M	Molare Masse
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
MO	Mikroorganismen
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
Reb. A	Rebaudiosid A
RKI	Robert Koch-Institut
<i>S. mutans</i> , <i>S. sobrinus</i>	<i>Streptokokkus mutans</i> , <i>Streptokokkus sobrinus</i>
SCF	englisch, Scientific Committee on Food; Wissenschaftlicher Lebensmittelausschuss der EU-Kommission
Stevia	von der Lebensmittelindustrie verwendeter Sammelbegriff für Steviolglykoside
Sväq	Stevioläquivalent
vergl.	vergleiche
WHO	englisch, World Health Organization; Weltgesundheitsorganisation
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer

# 1. Einleitung

## 1.1 Allgemeine Einführung

Die epidemiologisch häufigsten Krankheitsbilder in der zahnmedizinischen Praxis, Karies und Parodontitis, sind auch aus ökonomischer Sicht die bedeutendsten pathologischen Geschehen des stomatognathen Systems [RKI, 2015].

Die Kosten für restaurative und wiederherstellende Maßnahmen des durch Karies und Parodontitis zerstörten bzw. verlorengegangenen Zahnmaterials bilden den Hauptanteil der insgesamt im Gesundheitssystem für zahnärztliche Behandlungen entstehenden Kosten. Diese Belastungen der Solidargemeinschaft in der BRD belaufen sich auf jährlich ca. 11 Mrd. Euro [Brauckhoff *et al.*, 2009]. Die gesundheitsökonomische Relevanz ist somit immens. Eine Verminderung der Prävalenz dieser biofilmassoziierten Erkrankungen durch weiterführende, zielgerichtete Präventionsmaßnahmen unter effizientem Einsatz der Ressourcen ist erstrebenswert.

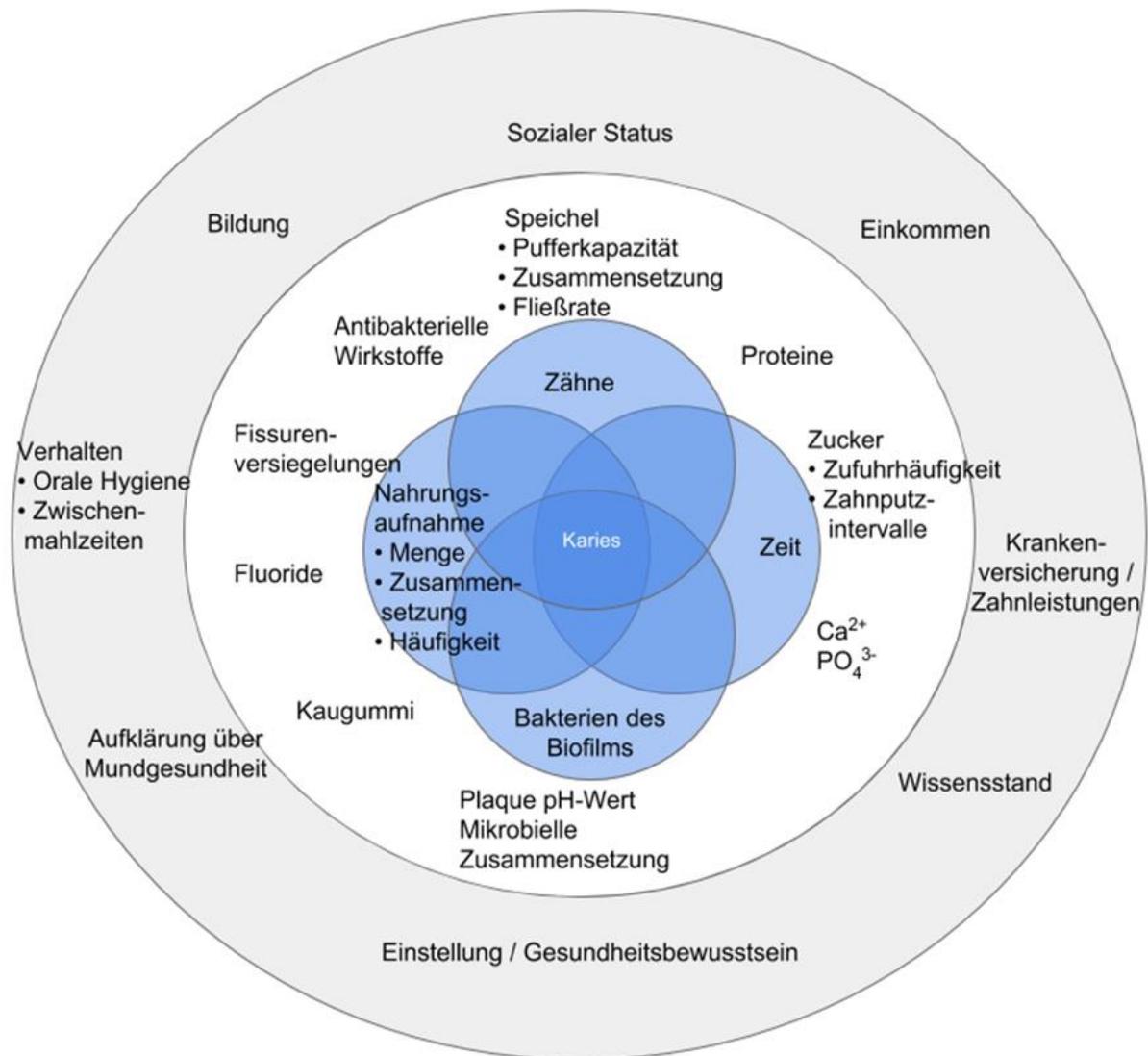
Archäologische Forschungen lassen die Schlussfolgerung zu, dass die Menschheit seit der neolithischen Revolution der Jungsteinzeit und der sich daraus ergebenden Umstellung der Ernährung und im Weiteren auch der mikrobiologischen Flora der Mundhöhle an Parodontitis leidet. Die Karies hingegen scheint sich erst signifikant seit der industriellen Revolution des 19. Jahrhunderts ausgebreitet zu haben [Adler *et al.*, 2013].

Die insgesamt hohe Kariesprävalenz der Gesamtpopulation in Deutschland [DMS V] ist letztendlich eine Begleiterscheinung des zivilisatorischen Fortschritts [Jordan und Micheelis, 2016]. Durch Präventions- und frühzeitige Interventionsmaßnahmen konnte die Mundgesundheit in den letzten 50 Jahren zwar zunehmend verbessert werden, die ehrgeizigen Ziele der DMS V können jedoch nur erreicht werden, wenn an den verschiedenen Einflussfaktoren der Kariesätiologie angesetzt wird.

Die Entstehung der Karies basiert auf der Existenz verschiedener, sich gegenseitig beeinflussender Parameter. Keyes beschrieb 1962 die primären, kariesauslösenden Faktoren. Zu ihnen gehören Zähne, Mikroorganismen und Substrat [Keyes, 1962]. Da der Umfang der Demineralisation von der Einwirkzeit der durch die oralen

Mikroorganismen gebildeten Säuren auf die exponierte Zahnhartsubstanz abhängig ist, ergänzte König diese Einflussgrößen 1987 um den Faktor „Zeit“.

Die komplexen Beziehungen zwischen gesundem Milieu der mikrobiologischen Flora und deren Veränderung hin zu einer Kariesinitialisierung bzw. Progression wurden 1990 von Fejerskov und Manji um einige sozioökonomische Faktoren erweitert (Abb. 1).



**Abb. 1:** Kariesauslösende Faktoren; auf das Individuum bezogene Faktoren im äußeren, Faktoren des oralen Milieus im mittleren Ring und direkt kariesbedingende Faktoren im Zentrum der Grafik [modifiziert nach Fejerskov und Manji, 1990]

Der für den Zahnschmelz (pH 5,5) bzw. für das Dentin (pH 6,5) kritische Wert der H<sup>+</sup>-Ionenkonzentration muss ausreichend lange erreicht oder unterschritten werden, um Schäden durch Demineralisationsvorgänge zu ermöglichen [König, 1987].

Karies entsteht und schreitet fort durch die Verstoffwechslung vorwiegend niedermolekularer Kohlenhydrate durch in Biofilmen assoziierte, fakultativ pathogene orale Mikroorganismen. Sie bauen die über die Nahrung aufgenommenen Kohlenhydrate hauptsächlich über anaerobe Glykolyse ab.

Die metabolischen Endprodukte dieses Abbaus sind organische Säuren, die nach einer gewissen Zeit das pH-Milieu der Zähne senken. Dies führt zur Herauslösung der anorganischen Anteile und so zur kariösen Zerstörung der Zahnhartsubstanz. Moynihan und Kelly zeigten 2014, dass es einen evidenzbasierten Zusammenhang zwischen der Menge an aufgenommenen Zuckern und der Entstehung von Karies in allen Altersgruppen gibt.

Aus dem Mundgesundheitsbericht der Weltgesundheitsorganisation (WHO) von 2003 wird deutlich, dass die Industrieländer im Zeitraum zwischen 1980 und 2000 die Kariesinzidenz deutlich verringern konnten [Petersen, 2003]. Dieser „caries-decline“ wurde vor allem durch die Verwendung von Fluoriden insbesondere in Zahnpasten, Speisesalz und Trinkwasser in den letzten Jahrzehnten erreicht [Ziller und Oesterreich, 2007]. Hinzu kommt die zunehmende Verbreitung von individual- und gruppenprophylaktischen Leistungen sowie ein verbessertes Mundhygieneverhalten [Gülzow *et al.*, 2006; Marthaler, 2004; Pieper und Schulte, 2004].

In den Schwellenländern beobachtet die WHO im selben Zeitraum einen deutlichen Anstieg der „Karieslast“<sup>1</sup>, der auf die Veränderungen der Nahrungsgewohnheiten, insbesondere der gestiegenen Verfügbarkeit raffinierter Zucker bei gleichzeitig schlechter zahnärztlicher Versorgung und dadurch mangelhafte Therapie- und Prophylaxemöglichkeiten zurückzuführen ist. Sozioökonomische Ungleichheiten bei der Teilhabe an Gesundheitschancen (vergl. dazu auch Abb.:1) verstärken die asymmetrische Krankheitsverteilung in der Weltbevölkerung [Baelum *et al.*, 2007]. Die

---

<sup>1</sup> Folge/Schwere einer Karieserkrankung, nicht näher definierter Begriff im Zusammenhang mit Mundgesundheitsstudien; in der englischsprachigen Literatur als „burden of caries“ bezeichnet und in etwa mit der Beschreibung des DMF-T Index gleichzusetzen

auf den vier Säulen Ernährungsberatung und -lenkung, Mundhygiene, Fluoridierung und Fissurenversiegelung basierende Kariesprophylaxe wird in Deutschland seit Jahren erfolgreich umgesetzt. Vor allem seit der Einführung der Individual- und Gruppenprophylaxe, zu deren Mitfinanzierung seit 1989 die Krankenkassen durch § 21 und 22 Sozialgesetzbuch verpflichtet sind, konnte die präventive Versorgung der Schulkinder strukturell effektiv verbessert werden [Pieper, 2009].

Trotzdem kann eine Kariespolarisation<sup>2</sup> bei Kindern und Jugendlichen in der BRD beobachtet werden [Micheelis und Schiffner, 2006]. Die insgesamt positive Entwicklung wird durch verschiedene Faktoren ermöglicht. Zum einen durch den bereits erwähnten flächendeckenden Einsatz fluoridhaltiger Zahnpasten und Zahnpflegeprodukte [Gülzow *et al.*, 2006]. Außerdem durch die Anwendung fluoridhaltigen Salzes und von Fluoridtabletten, die, obwohl systemisch angewendet, nach Ablauf der Zahnhartsubstanzbildung hauptsächlich lokal wirksam sind [Marinho *et al.*, 2003] und durch Diffusion Calcium-Hydroxylapatit gegen das stabilere Fluorid-Hydroxylapatit austauschen. Die kariespräventive Wirkung der Fluoride ist in der Zahnmedizin evidenzbasiert [Marinho, 2009].

Auch die Fissurenversiegelung kurz nach Durchbruch der bleibenden Molaren leistet einen kariespräventiven Effekt zur Reduktion der höchsten Kariesgefährdung im Kindes- und Jugendalter. Ahovuo-Saloranta *et al.* zeigten 2008 anhand eines systematischen Cochrane Reviews eine gesicherte Evidenz für die kariesprotektive Effektivität der Fissuren- und Grübchenversiegelung.

Zum anderen verändert sich das kollektive, gesellschaftliche Bewusstsein durch zahnärztliche Aufklärung, jahrelange individual- und gruppenprophylaktische Maßnahmen und einen generellen Trend hin zu einem gesteigerten Gesundheits- und auch Mundhygienebewusstsein [Bratthall, 1996]. Der durch verschiedene Medien, insbesondere das Internet, vorinformierte Patient nutzt das Wissen um eine sorgfältige Mundhygiene und wird bei seinen regelmäßigen Kontrolluntersuchungen darin bestärkt und unterstützend beraten.

Auch die Ernährungsberatung und -lenkung spielt eine wichtige Rolle in den (zahn-) ärztlichen prophylaktischen Bemühungen.

---

<sup>2</sup> Krankheitsverteilung, bei der wenige Individuen eine hohe Karieslast auf sich vereinigen, während die große Mehrheit gesund ist

Das steigende Interesse an gesunder Ernährung spiegelt sich unter anderem im stetig wachsenden „Bio“-Segment der Lebensmittelindustrie und der Nachfrage nach zuckerreduzierten und zuckerfreien Produkten wider [Brand, 2006].

Die Verwendung von Zuckersubstituten vermindert die Menge und die Frequenz der Zuckerimpulse und somit deren kariogenes Potential. Daher ist der Einsatz von Zuckeraustausch- und Zuckerersatzstoffen ein wichtiger Bestandteil zahngesunder Ernährung [Gehring, 1990]. In der Vergangenheit sind verschiedene mögliche, nicht-kariogene Süßstoffe erforscht und neue laborchemisch synthetisiert worden.

Die nicht kalorischen Zuckerersatzstoffe aus der Steviapflanze, Steviosid und Rebaudiosid A, sind bisher aus Sicht der Zahnheilkunde nur wenig erforscht. Mit diesen, in der Bundesrepublik Deutschland seit Dezember 2011 zugelassenen Stoffen, beschäftigt sich die vorliegende Arbeit.

## **1.2 Zuckeraustausch / Zuckerersatzstoffe**

### **1.2.1 Übersicht über Zuckerersatzstoffe**

Um Zucker in der Nahrung zu ersetzen und so zum einen die Kohlenhydrataufnahme insgesamt und zum anderen die Anzahl der Zuckerimpulse zu reduzieren, werden seit Jahrzehnten süße Ersatzstoffe eingesetzt.

Der Begriff „Zucker“ wird oftmals als Synonym für Saccharose, also üblichen Haushaltszucker verwendet [Zero, 2004], er ist eigentlich ein Sammelbegriff für alle Monosaccharide (Einfachzucker), Disaccharide (Zweifachzucker), Oligosaccharide (Mehrfachzucker) und Polysaccharide (Vielfachzucker) unserer Nahrung.

Die für die Ernährung anteilmäßig wichtigsten Monosaccharide sind Glukose und Fruktose.

Saccharose, Maltose und Laktose gehören zu den oft eingesetzten Disacchariden. Stärke ist ein natürliches Polysaccharid. Alle Mono- und Disaccharide diffundieren leicht in den Biofilm [Klimek und Hellwig, 1999]. Von den dort anwesenden Bakterien werden sie dann

über Glykolyse zu Pyruvat und weiter zu sauren Endprodukten, größtenteils Laktat umgesetzt. „Über die Kariogenität der Stärke wird nach wie vor diskutiert. Der Verzehr von roher, unbearbeiteter Stärke führt nur zu einem schwachen pH-Abfall in der Plaque“ [Klimek und Hellwig, 1999].

Um die verschiedenen Zucker und Süßungsmittel und deren kariesauslösendes Potential bewerten zu können, wurden verschiedene Versuchsmodelle entwickelt.

Zu ihnen gehören:

- *In-vitro* Modelle
- Tierversuche
- *In-vivo* Monitoring (humane Plaque pH-Methode)
- Intraorale De- und Remineralisationsmodelle [Matsukubo, 2006].

Zur Förderung der Mundgesundheit muss die Kariogenität der Substitute nicht vorhanden oder als äußerst niedrig zu bewerten sein. Bei den in der Bundesrepublik zugelassenen „Süßstoffen“ werden grundsätzlich zwei Gruppen unterschieden:

**Zuckeraustauschstoffe** haben einen gewissen kalorischen Wert; zu ihnen gehören die Monosaccharide Sorbose und Fruktose, sowie die Zuckeralkohole (Polyole).

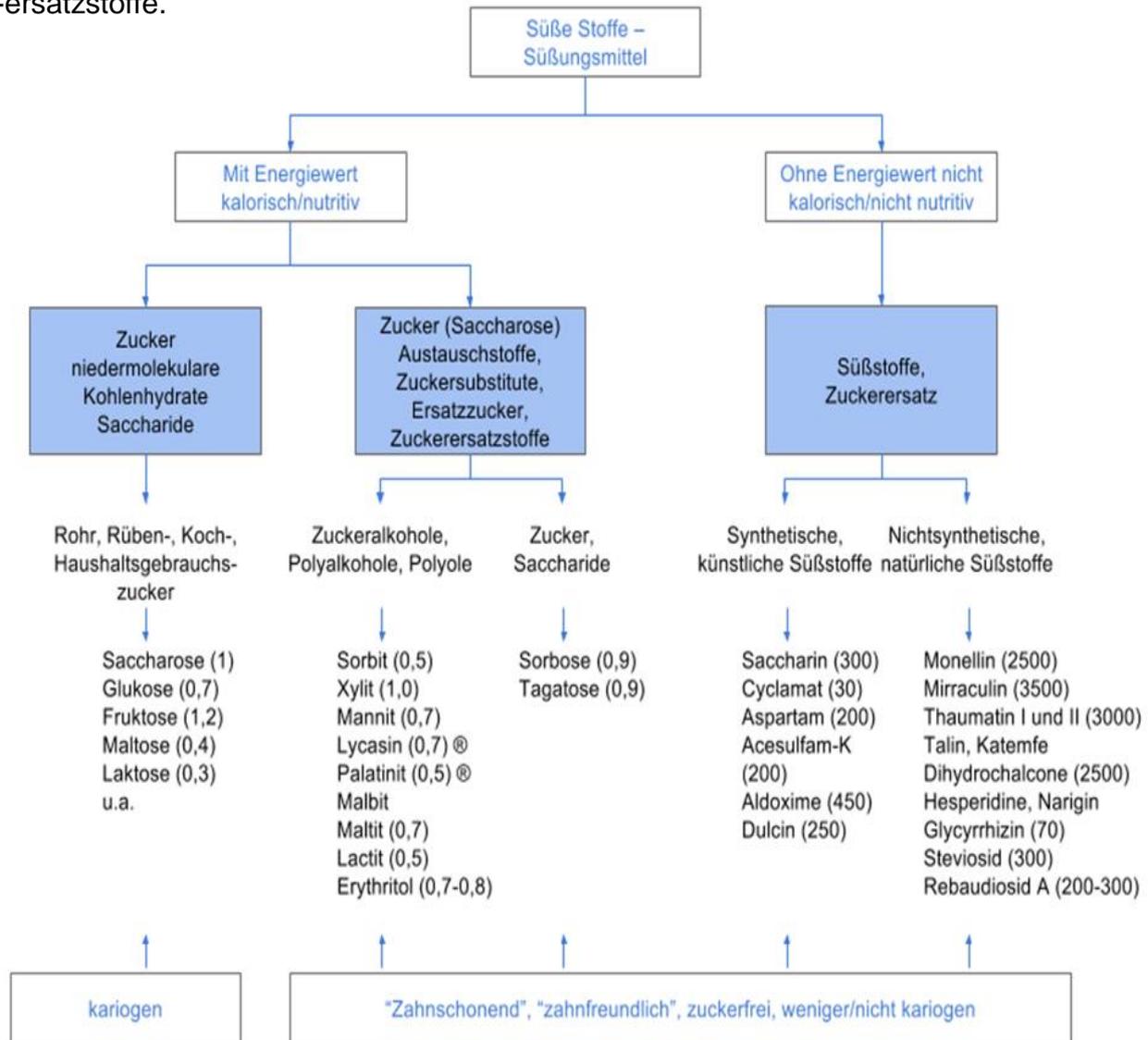
Zuckeralkohole lassen sich chemisch durch Reduktion von Kohlenhydraten erzeugen.

Zu den am häufigsten verwendeten Zuckeralkoholen gehören Xylit, Sorbit, Mannit, Maltit, Lactit, sowie Lycasin<sup>®</sup> und Palatinit<sup>®</sup> [van Loveren, 2004].

Seit einiger Zeit gewinnt auch Erythrit an Bedeutung. Der Zuckeralkohol ist in der Lage einen bitteren Beigeschmack z.B. von Steviosiden zu kaschieren, wodurch bessere Geschmacksergebnisse erzielt werden [Matsukubo, 2006]. Erythrit zeigte in einigen Studien eine ähnlich plaquehemmende Wirkung wie der seit Jahren bewährte Zuckeralkohol Xylit [Mäkinen *et al.*, 2005], wobei der Wirkungsmechanismus von Xylit in der effektiven Hemmung der extrazellulären Polysaccharidsynthese besteht [Söderling, 2009]. Die genauen Effekte von Erythrit sind noch nicht im Detail bekannt.

**Zuckerersatzstoffe** haben keinen Energiewert, sie können chemisch synthetisiert oder aus natürlichen, pflanzlichen Stoffen gewonnen werden. Der häufig verwendete

Ersatzstoff Aspartam<sup>3</sup> wird chemisch synthetisiert. Es handelt sich dabei um einen Dipeptidester aus den Aminosäuren L-Asparaginsäure und L-Arginin [Ikeda, 1982]. Auf dem Markt sind auch Kombinationen der Zuckerersatzstoffe, beispielsweise Acesulfam-K und Aspartam, Aspartam und Saccharin oder Sucralose und Acesulfam-K [Bloomgarden, 2011]. Neotam wird zwar industriell hergestellten Lebensmitteln zugefügt, ist aber nicht für den Endverbraucher im Einzelhandel verfügbar [Shwide Slavin *et al.*, 2012]. Abbildung 2 gibt einen Überblick über Zucker, Zuckeraustausch und -ersatzstoffe.



**Abb. 2:** Übersicht über Zuckeraustausch- und Zuckerersatzstoffe in Relation zum Süßungsgrad von Saccharose [modifiziert nach Einwag und Naujoks, 1993]

<sup>3</sup> Die weitverbreitete Verwendung von Aspartam wird mitunter aufgrund möglicher unerwünschter Wirkungen kritisiert. Das Scientific Committee on Food (SCF) hat 2013 in einer Veröffentlichung zum Thema „Reevaluierung der Sicherheit von Aspartam“ in dieser Hinsicht bestehende Bedenken jedoch nicht bestätigt [EFSA, 2013].

Steviosid und Rebaudiosid A gehören zu den sogenannten natürlichen Zuckerersatzstoffen, da die Wirkstoffe pflanzlichen Ursprungs sind. Sie werden durch chemische Extraktion aus den Blättern der Steviastaude gewonnen.

Seit Dezember 2011 ist Stevia als erste Pflanze überhaupt der Novel-Food-Verordnung der EU unterstellt. Steviolglykoside wurden als Lebensmittelzusatzstoff E 960 in der EU und somit in Deutschland zugelassen [Amtsblatt der Europ. Union 2011, Verordnung (EG Nr. 1131/2011)].

Gegenüber anderen Zuckerersatzstoffen verfügen Stevioldside über gewisse Vorteile, denn sie sind hitzestabil bis 200 °C, säurestabil und vergären nicht [Kinghorn und Soejarto, 1991]. Tabelle 1 zeigt eine Übersicht der in der EU zugelassenen Süßstoffe.

**Tab. 1:** Übersicht über in der Europäischen Union zugelassene Süßstoffe [dge.de, 2007]; die hier untersuchten Steviolglykoside Steviosid und Rebaudiosid A sind als Lebensmittelzusatzstoff E 960 aufgelistet.

<b>Süßstoff</b>	<b>E-Nr.</b>	<b>ADI-Wert nach SCF [mg/kg Körpergewicht]</b>	<b>Brennwert [kcal/g]</b>
Acesulfam K	E 950	0 - 9	0
Aspartam	E 951	0 - 40	4
Cyclamat	E 952	0 - 7	0
Saccharin	E 954	0 - 5	0
Sucralose	E 955	0 - 15	0
Thaumatococin	E 957	Keine Beschränkung	4
Neohesperidin	E 959	0 - 5	~0
Steviolglykoside	E 960	0 - 4	~0
Neotam	E 961	0 - 2	~0
Aspartam-Acesulfamsalz	E 962	Keine Beschränkung	~0

### 1.2.2 Quantitative Aspekte des Zuckerkonsums

Essen ist nicht nur überlebensnotwendig, sondern auch eine wichtige Quelle von Bedürfnisbefriedigung im täglichen Leben [Westenhöfer und Pudel, 1993]. Das durch ein süßes Geschmackserlebnis hervorgerufene angenehme Genussgefühl, das selbst kleinste Kinder deutlich von anderen Geschmackssensationen unterscheiden können, ist laut Steiner als ein (angeborener) Reflex zu betrachten [Steiner, 1979]. Daher ist es nicht verwunderlich, dass der pro Kopf Verbrauch von Saccharose in Deutschland seit ungefähr vierzig Jahren auf einem konstant hohen Niveau von ca. 35 kg pro Jahr stagniert. Innerhalb Europas liegt Deutschland damit im oberen Mittelfeld. Der höchste pro Kopf-Verbrauch der EU wird mit 48 kg jährlich in Belgien erreicht [BMEL, 2016].

Die deutsche Gesellschaft für Ernährung empfiehlt Frauen täglich ca. 270 g und Männern 340 g Kohlenhydrate zu sich zu nehmen [DGE, 2015]. Aus der aktuellen WHO-Stellungnahme „Population nutrient intake goals for preventing diet-related chronic diseases“ geht hervor, dass von diesen Werten die Aufnahme von freien Zuckern maximal 10 % des gesamten Kohlenhydratanteils ausmachen sollte [WHO, 2015]. Die tatsächlich aufgenommene Menge an „Zucker“ liegt in der BRD mit ca. 96 g/d deutlich über dem Ernährungsziel von Frauen (27 g) bzw. Männern (34 g). In den USA wird eine durchschnittliche tägliche Einnahme von rund 130 g pro Person und Tag erreicht. Die Nützlichkeit eines Zuckerersatzstoffes darf nicht nur hinsichtlich der Kariogenität dieses Stoffes betrachtet werden, sondern sollte Ernährungsaspekte, toxikologische, ökonomische und technische Aspekte mit einbeziehen [Ma und Blanksma, 2015].

### 1.3 Grundlagen der Kariesentstehung

Seit der Erstbeschreibung von *Streptokokkus mutans* durch Clarke 1924, wurde der Zusammenhang zwischen oralen Mikroorganismen und der Entstehung kariöser Läsionen intensiv erforscht, so dass stetig mehr Faktoren der Pathogenese aufgeklärt werden konnten [Clarke, 1924].

Nach wie vor gelten *Mutans*-Streptokokken als sehr potente Kariesförderer. In der Fachliteratur werden sie oftmals als „Hauptverursacher“ der Karies bezeichnet. Daher gilt die durch Clarke gewonnene Erkenntnis als wichtiger Grundstein in der zahnmedizinischen Literatur. Durch jahrelange Forschung konnten weitreichende Einsichten über weitere kariesverursachende Faktoren erlangt werden. Tanzer *et al.* fanden für ihre Übersichtsarbeit zum Thema „Beweise für die Beteiligung von Mikroorganismen in frühen und etablierten Läsionen der Karies“ bereits im Jahr 2001 insgesamt 2.730 Veröffentlichungen [Tanzer *et al.*, 2001]. Zur Aufklärung der genauen Abläufe vom gesunden Zustand bis zur klinisch sichtbaren, pathologischen Zerstörung der Zahnhartsubstanz wurden, nach der chemo-parasitären Theorie Millers aus dem Jahr 1892, im 20. Jahrhundert neue Hypothesen zur Kariogenese aufgestellt [Miller, 1892]. Die beiden Haupttheorien wurden 1976 durch Loesches „spezifische Plaquehypothese“ und 1986 durch Theilade „unspezifische Plaquehypothese“ aufgestellt [Loesche, 1976; Theilade, 1986].

Die spezifische Plaquehypothese geht davon aus, dass nur wenige der zahlreichen Mikroorganismen der menschlichen Mundhöhle direkt an der Pathogenese der Karies beteiligt sind. Diese Hypothese stützt sich auf den Grundgedanken der Henle-Koch-Postulate, wonach es eine direkte Ursache-Wirkungs-Beziehung zwischen einem, eine Infektion auslösenden Erreger und dem daran erkrankten Wirt gibt.

Obwohl es einen unbestreitbaren Einfluss von *Mutans*-Streptokokken auf die Entstehung und die Progression der Karies gibt, kann Karies tatsächlich auch ohne spezifische, besonders kariogene Mikroorganismen entstehen [Marsh, 1989].

In seine „unspezifische Plaquehypothese“ wollte Theilade einbeziehen, dass die dentale Plaque als eine mikrobielle Gemeinschaft funktioniert. Der Fokus liegt hier mehr auf der Quantität der Plaque und den Interaktionen der in ihr organisierten Bakterienarten.

Die residente Mikroflora unterhält mitnichten eine rein passive Beziehung zum Wirt. Sie ist direkt und indirekt an der regulären, physiologischen Entwicklung des Wirts und der Aufrechterhaltung des gesunden Zustandes beteiligt, indem sie das Abwehrsystem des Wirts unterstützt und die Kolonisation exogener Mikroorganismen hemmen kann [Marsh, 2000]. Orale Biofilme existieren normalerweise im Gleichgewicht mit der Wirtsabwehr [Stoodley *et al.*, 2002]. Welche Faktoren führen also zu einer Verschiebung dieses Gleichgewichtes? Marsh [1991, 1994] formulierte die „ökologische Plaquehypothese“, um klinische Beobachtungen mit Ergebnissen mikrobiologischer Untersuchungen in Einklang zu bringen. Sie vereinen darin Ansätze sowohl aus der unspezifischen, als auch aus der spezifischen Plaquehypothese. Eine Veränderung einer der Schlüsselfaktoren kann eine Veränderung der residenten Plaquemikroflora hin zu einer kariogeneren Flora fördern und so das Gleichgewicht in Richtung Demineralisation verschieben [Marsh, 1991]. Die Grundpfeiler dieser Hypothese besagen, die Selektion „pathogener“ Bakterien ist eine direkte Reaktion auf Veränderungen in der Umgebung, die Krankheit (sowohl Karies als auch Parodontitis) benötigt keinen speziellen, die Krankheit auslösenden Erreger, vielmehr ist eine Reihe von Mikroorganismen mit entsprechenden Eigenschaften in der Lage, die Pathogenese voranzutreiben [Marsh, 2003]. Wenn sich nun durch veränderte Rahmenbedingungen, wie die häufige Zufuhr niedermolekularer Kohlenhydrate, das Milieu in der Plaque verschiebt, können einige Bakterienarten einen Vorteil entwickeln. Bei neutralem pH-Wert in der Plaque machen potentiell pathogene Mikroorganismen nur einen kleinen Anteil an den insgesamt vorhandenen Spezies aus, sodass sie klinisch nicht relevant sind und sich der Re- und Demineralisierungsprozess im Gleichgewicht befindet. Der nach der Zufuhr niedermolekularer Kohlenhydrate stattfindende Abfall des pH-Wertes unter den kritischen Wert pH 5,5; kann bei hoher Frequenz dieser Zufuhr dazu führen, dass eine pH-Wert-Absenkung über einen längeren Zeitraum stattfindet. Säuretolerante und säureausscheidende Mikroorganismen wie *Mutans-Streptokokken* und Lactobazillen entwickeln einen Standortvorteil. Sie können nun ihr kariogenes Potential entfalten.

Die Adhäsion ist ein wichtiger ökologischer Schlüsselfaktor für das Bestehen der Bakterien auf der Zahnoberfläche und somit das Überleben [Jenkinson & Lamont, 1997]. *Streptokokkus mutans* (*S. mutans*) kann Saccharose-abhängig und Saccharose-unabhängig adhären. Über das Oberflächen-Adhesin P1 können *Mutans-*

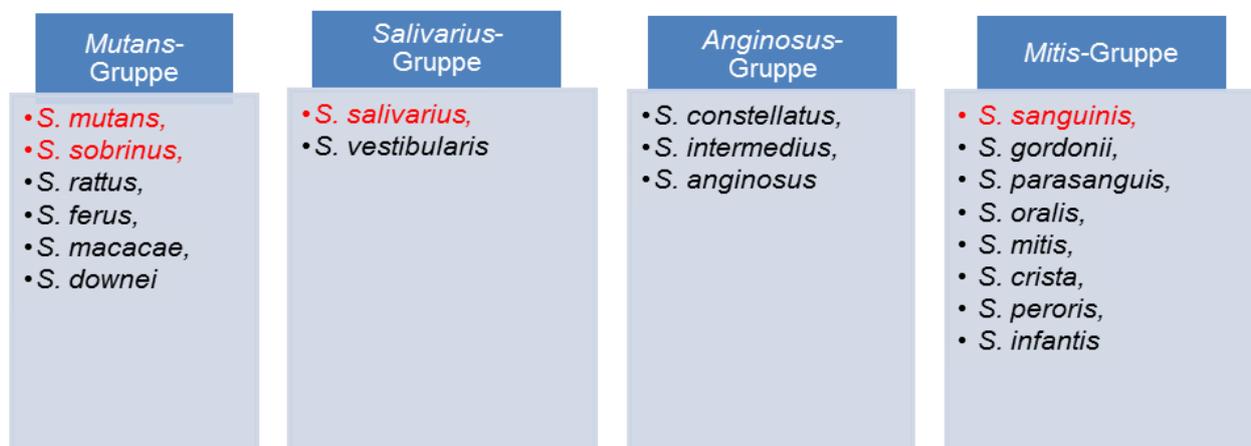
*Streptokokken* unabhängig von der Verfügbarkeit von Saccharose über das Glykoprotein gp 340 des erworbenen Pellikels auf der Zahnoberfläche adhären. Wenn Saccharose verfügbar ist, kann diese über die bakterielle Glykosyltransferase (GTF) zu wasserunlöslichem Glukan verstoffwechselt werden. So kann eine Adhäsion an die Zahnoberfläche über Glukan-bindende-Proteine erfolgen [Ahn *et al.*, 2008].

Kariogene Mikroorganismen wie *S. mutans*. sind in der Lage aus Kohlenhydraten extra- und intrazelluläre Polysaccharide zu synthetisieren. Intrazelluläre Polysaccharide (IPS) dienen als endogene Energiequelle in Zeiten geringer oder ausbleibender Kohlenhydratzufuhr. Sie fördern die Kariesbildung, indem sie die Expositionszeit der Säuren auf die Zahnhartsubstanz verlängern und einen schnelleren Abfall des pH-Wertes in der Plaquematrix ermöglichen [Tanzer *et al.*, 1976].

Karies wird heutzutage als multifaktorielle, biofilmassoziierte Erkrankung verstanden.

Für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche wurden Bakterienstämme ausgewählt, die potente Säurebildner und säuretolerant sind, mitunter verfügen sie zudem über eine Vielzahl zusätzlicher Virulenzfaktoren. Sie gelten alle als potente, kariogene Mikroorganismen.

60 – 90 % der die gereinigten Zahnoberflächen besiedelnden Bakterien sind Streptokokken [Nyvad und Kilian, 1987]. Die oralen Streptokokken sind in vier Hauptgruppen unterteilt, die in Abbildung 3 dargestellt sind. Streptokokken sind kugelförmige bis ellipsoide, grampositive Zellen mit einem Durchmesser von 0,5 - 2,0 µm, die kettenförmig hintereinander gelagert sein können [Miksits und Hahn, 2008].



**Abb. 3:** Die derzeit anerkannten Arten oraler Streptokokken; darunter die für die vorliegende Arbeit verwendeten Spezies -rot hervorgehoben- nach Marsh, 2003.

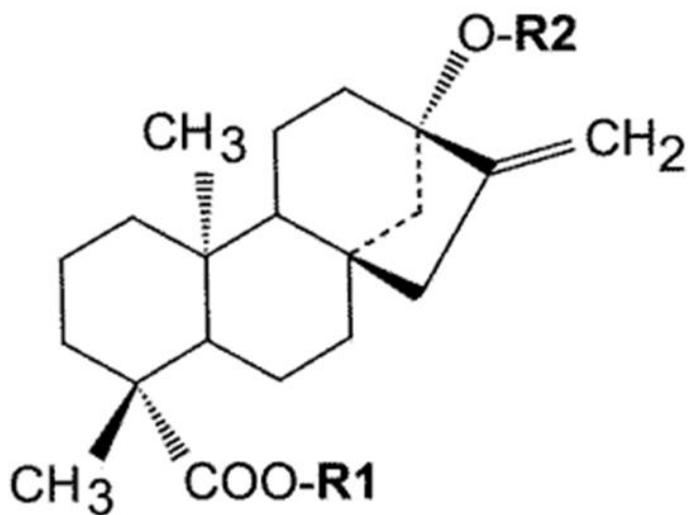
Für die Versuche der vorliegenden Arbeit wurden aus der Gruppe der *Mutans-Streptokokken*: *S. mutans* Clarke 1924 und *S. sobrinus* sowie *S. salivarius* und *S. sanguinis* (ehem. *sanguis*) aus der Gruppe der *Mitis-Streptokokken* ausgewählt.

Sie besitzen jeweils spezielle Eigenschaften, (Virulenzfaktoren) die sie für die Initialisierung bzw. die Progression der Karies prädestinieren.

Extrazelluläre Polysaccharide (EPS) spielen laut Paes Leme eine Hauptrolle in der Entstehung der Karies. Sie fördern die selektive bakterielle Adhäsion, dienen als Matrixproteine des Biofilms und fördern die Azidogenität innerhalb des Biofilms [Paes Leme *et al.*, 2006]. *Mutans-Streptokokken*, *S. sanguis* und *S. salivarius* sind in der Lage, mit Hilfe ihrer bakteriellen Glykosyltransferase (GTF) bzw. Fruktosyltransferase (FTF), aus Saccharose lösliche und unlösliche extrazelluläre Polysaccharide „EPS“ (Glukane und Fruktane) zu bilden [Hamade und Slade, 1980]. Diese EPS fördern die bakterielle Adhäsion an die Zahnoberfläche und die Akkumulation von Mikroorganismen, sie stellen Masse für die integralen Strukturen zum Aufbau des Biofilms bereit und steigern die Azidogenität der Biofilmmatrix [Paes Leme *et al.*, 2006]. EPS steigern die Masse und Durchlässigkeit der Biofilmmatrix und ermöglichen so, die Substratzufuhr per Diffusion zu erhöhen [Dibdin und Shellis, 1988]. *Mutans-Streptokokken* und *S. sanguinis* sind zudem in der Lage, glykogenähnliche Speicherpolymere, sogenannte Intrazelluläre Polysaccharide (IPS) als endogene Kohlenhydratquelle zu synthetisieren. Diese können in Zeiten verminderter Substratzufuhr als Energiequelle genutzt werden [Busuioc *et al.*, 2009]. Diese Bildung von Säuren aus endogenen Substratquellen verursacht einen verstärkten und verlängerten Abfall des pH-Wertes und fördert so die Schmelzdemineralisation [Zero *et al.*, 1986]. *Lactobazillen* und *Mutans-Streptokokken* haben einen kompetitiven Vorteil gegenüber weniger kariogenen Arten im Bereich niedriger pH-Werte [Bradshaw und Marsh, 1998]. Sie schleusen saure Metabolite ihres Stoffwechsels aus der Zelle heraus und besitzen zudem eine membranständige H<sup>+</sup>-ATPase, um aktiv Protonen zu sezernieren [Bender *et al.*, 1986]. Zusätzlich verfügen *Mutans-Streptokokken* über Bakteriozine, mit denen sie potentiell kompetitive Spezies hemmen können [Van der Hoeven *et al.*, 1979].

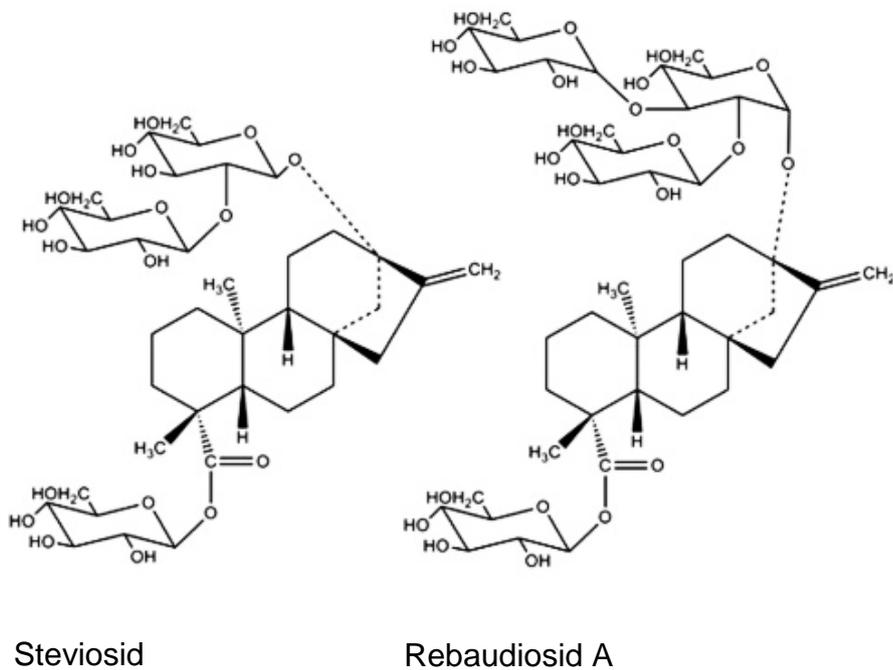
## 1.4 Steviosid und Rebaudiosid A als Zuckerersatzstoffe

*Stevia rebaudiana* wurde Anfang des 20. Jahrhunderts erstmals durch Moses Bertoni beschrieben. Das krautige Staudengewächs stammt ursprünglich aus der Grenzregion zwischen Brasilien und Paraguay. In ihren Blättern enthält die Steviapflanze eine Vielzahl süßer Stoffe, sogenannte Steviolglykoside. Steviosid und Rebaudiosid A konnten 1931 von Bridel und Lavielle isoliert werden [Bridel und Lavielle, 1931]. Der chemische Aufbau aller Steviolglykoside leitet sich vom Steviol ab, sie unterscheiden sich in den, dem Steviolkern in Position C - 13 (R1) und C - 19 (R2) als Reste angehängten, Zuckern [Shibata *et al.*, 1995], (Abb. 4).



**Abb. 4:** Aufbau des Steviols; in Position R1 und R2 befinden sich Wasserstoffatome [Geuns, 2002]

Abbildung 5 zeigt die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Steviolderivate Steviosid und Rebaudiosid A.



**Abb. Nr. 5:** Darstellung der Strukturformeln von Steviosid und Rebaudiosid A [Geuns, 2003], sie unterscheiden sich vom Grundgerüst des Steviols durch die in Position R1 und R2 angehängten Reste (vergl. Abb. 4 und Tab. 2).

Kennelly isolierte 2002 die süßen Bestandteile Steviosid, Rebaudiosid A - F und Dulcosid A [Kenelly, 2002]. Tabelle 2 zeigt die jeweiligen in Position R1 und R2 angehängten Zuckerreste der verschiedenen Steviolglykoside.

**Tab. 2:** Durch die in den Positionen R1 und R2 angehängten Reste an das Grundgerüst des Steviols entstehen die folgenden Steviolglykoside [Geuns, 2003a]

Trivialname des Steviolglykosids	R1	R2
Steviol	H	H
Steviolbiosid	H	$\beta$ -Glc $\beta$ -Glc (2-1)
Steviosid	$\beta$ -Glc	$\beta$ -Glc $\beta$ -Glc (2-1)
Rubusosid	$\beta$ -Glc	$\beta$ -Glc
Rebaudiosid A	$\beta$ -Glc	$\beta$ -Glc $\beta$ -Glc (2-1)   $\beta$ -Glc (3-1)
Rebaudiosid B	H	$\beta$ -Glc $\beta$ -Glc (2-1)   $\beta$ -Glc (3-1)
Rebaudiosid C (Dulcosid B)	$\beta$ -Glc	$\beta$ -Glc $\beta$ -Rha (2-1)   $\beta$ -Glc (3-1)
Rebaudiosid D	$\beta$ -Glc $\beta$ -Glc (2-1)	$\beta$ -Glc $\beta$ -Glc (2-1)   $\beta$ -Glc (3-1)
Rebaudiosid E	$\beta$ -Glc $\beta$ -Glc (2-1)	$\beta$ -Glc $\beta$ -Glc (2-1)
Rebaudiosid F	$\beta$ -Glc	$\beta$ -Glc $\beta$ -Xyl (2-1)   $\beta$ -Glc (3-1)
Rulcosid A	$\beta$ -Glc	$\beta$ -Glc $\beta$ -Rha (2-1)

Steviosid und Rebaudiosid A sind aufgrund ihrer geschmacklichen Eigenschaften die für den Einsatz als Zuckerersatzstoff wichtigsten Steviolglykoside. Durch Züchtung werden Arten erzeugt, die einen besonders hohen Gehalt der gewünschten Stoffe aufweisen. Die Konzentration der Glykoside in den Blättern variiert zwischen 4 – 20 % der Trockenmasse. Für die Verwendung auf dem europäischen Markt muss ein Mindest-Steviolglykosidgehalt von 10 % erreicht werden, um gleichbleibende Qualität zu garantieren. Die Reinheit der Steviolglykoside selbst muss, für die Verwendung als Lebensmittelzusatzstoff, laut der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit mindestens 95 % betragen [EFSA, 2010].

Die Zuckerreste, welche über  $\beta$ -glykosidische Bindungen an den Steviolkern gebunden sind, können aufgrund ihrer zu großen Molekularstruktur intestinal nicht enzymatisch gespalten werden [Geuns, 2004]. Erst im Kolon können sie bakteriell zu Steviol und Zuckerresten abgebaut werden [Koyama *et al.*, 2003a; Geuns, 2003a]. Steviol wird im Dickdarm teilweise resorbiert, dann in der Leber in Steviolglucuronid umgewandelt und größtenteils renal ausgeschieden [Koyama *et al.*, 2003b]. Ein kleiner Teil wird in Form von Steviolbiosid oder Steviol mit dem Stuhl ausgeschieden [Geuns, 2007]. Da die einzelnen Steviolglykoside über unterschiedliche Molekulargewichte verfügen, wird der Begriff „Stevioläquivalent“ (SvÄq) verwendet. Man misst die Menge des letztendlich im Dickdarm entstehenden Steviols und zieht so Rückschlüsse auf die ursprünglich aufgenommene Menge an Steviolglykosiden. Durch den JECFA wurde 2008 ein ADI äquivalent der erlaubten Tagesdosis (ETD) von 0 - 4 mg/kg Körpergewicht für Stevioläquivalente als unbedenklich festgelegt [JECFA, 2008], er wird durch die folgende Formel bestimmt (1):

$$\text{Stevioläquivalent} = \frac{M(\text{Steviol})}{M(\text{Steviolglykosid})} \quad (1)$$

M = Molare Masse

M (Steviol) = 318,44 g/mol,

M (Steviosid) = 804,38 g/mol,

M (Rebaudiosid A) = 966,43g /mol (Molmassen nach Geuns, 2011)

Ausnahme ist der Einsatz von Steviolglykosiden in Tafelsüßen, er unterliegt keiner expliziten Restriktion in Bezug auf die Höchstmenge [Besrukow, 2016].

Es konnte bisher kein freies Steviol im menschlichen Blutkreislauf nachgewiesen werden. Laut einer Studie von Terai *et al.* wirkt Steviol schwach mutagen auf bestimmte Bakterienspezies [Terai *et al.*, 2002]. Diese Wirkung konnte im Tierversuch [Sekihashi *et al.*, 2002] nicht nachgewiesen werden.

Steviolglykoside sind bis zu 300-mal süßer als Saccharose in einer vergleichbaren 0,4 prozentigen wässrigen Lösung [Brambilla *et al.*, 2014].

In Japan wird Stevia sowohl als Blattextrakt, als auch in Form von extrahierten Steviolglykosiden seit Jahren zum Süßen von Getränken, Süßwaren, Gemüse, Meeresfrüchten und anderen Lebensmitteln verwendet [Mizutani *et al.*, 2002].

In Deutschland dürfen Steviolglykoside für 30 Lebensmittelkategorien wie Schokolade, Konfitüre und Erfrischungsgetränke verwendet werden.

Trotz der bereits jahrzehntelangen Erfahrung mit Steviosiden existiert vergleichsweise wenig Literatur mit zahnmedizinischem Forschungshintergrund.

#### **1.4.1 Literaturübersicht für ihre Anwendung in der Zahnheilkunde**

Wissenschaftliche Veröffentlichungen zum Thema „Stevioside/Rebaudioside“ im Zusammenhang mit „Karies“ finden sich in den medizinischen Datenbanken erstmals Ende der 1970er Jahre. Sie stammen aus Japan (Yabu M, Takase M, Toda K, Tanimoto K, Yasutake A. Studies on Stevioside, natural sweetener. Effect on the growth of some oral microorganisms. Hiroshima Daigaku Shigaku Zasshi 1977; 9 (1): 12-17 und Ikeda T. Okada H, Motada R. Effect of Stevioside of certain metabolisms of Streptococcus mutans. Nihon Univ. J. Oral Science 1978; (4) 24). Dort werden bereits seit Jahrzehnten Steviolglykoside als Zuckerersatzstoffe eingesetzt. Die genauen Inhalte sind nicht öffentlich zugänglich, lediglich die Abstracts der erstgenannten Studie wurden in englischer Sprache, die vollständige Arbeit ausschließlich auf Japanisch veröffentlicht. Die Erforschung der für die Zahnmedizin relevanten Eigenschaften von Steviosiden und Rebaudiosiden wurde in den letzten Jahren intensiviert. Dies spiegelt sich in der steigenden Anzahl der Veröffentlichungen wider. Zu den wichtigsten Arbeiten gehört in

diesem Zusammenhang „Evaluation of the cariogenic potential of the intense natural sweeteners stevioside and rebaudioside A.“ (Das S, Das AK, Murphy RA, Punwani IC, Nasution MP, Kinghorn AD. *Caries Res* 1992; 26 (5): 363-366.). Sie weist *in vivo* anhand eines Tierversuchs mit Ratten nach, dass weder Steviosid, noch Rebaudiosid A kariogen sind. Die Tabelle (3) gibt einen Überblick zu bisherigen Veröffentlichungen.

Inhaltlich lässt sie sich wie folgt zusammenfassen:

- Steviosid wurde *in vitro* bzw. *in vivo* mit *L. plantarum* („1.“), *L. casei* („1.“), *S. mutans* („1.“, „2.“, „3.“, „6.“) und *S. sobrinus* („5.“) getestet
- Extrakte aus den ganzen Blättern von *Stevia rebaudiana bertonii* wurden an *S. mutans* („7.“, „9.“, „13.“) und *L. azidophilus* („7.“, „9.“) und *S. sobrinus* („9.“) erforscht.
- Rebaudiosid A wurde *in vivo* sowohl mit *S. sobrinus* („5.“) untersucht, als auch auf die Wirkung von Multispezies-Biofilmbildung und Plaque pH-Wert hin überprüft („11.“).
- „Stevia“, als im jeweiligen Text nicht näher definiertes Steviolglykosid wurde hinsichtlich seiner Auswirkungen auf *S. mutans* hinsichtlich Biomasse, Bakterienmenge, extra- und intrazellulärer Polysaccharidsynthese in der Plaque erforscht, auch die Mikrohärtigkeit des mit diesem Biofilm belegten Zahnschmelzes wurde ermittelt („10.“).
- Effekte der Steviolglykoside auf Multispezies- („4.“, „6.“, „8.“, „11.“, „12.“) und Monokultur-Biofilme („5.“, „10.“) wurden untersucht.

In keiner Veröffentlichung konnte nachgewiesen werden, dass Steviosid, Rebaudiosid A, oder Stevia-Blattextrakte von oralen Mikroorganismen zu Säuren metabolisiert werden können. Mehrfach wurde vermutet, dass es eine Beeinträchtigung der intrabakteriellen Polysaccharid-Synthese durch Steviolglykoside geben könnte („1.“, „2.“, „4.“, „10.“).

In fast allen Publikationen fehlen Angaben zur genauen chemischen Zusammensetzung der für die Versuche verwendeten Steviolglykoside, bzw. sind die Angaben lückenhaft, oft werden Begriffe wie „nicht kariogen“ gleichgesetzt mit einer Hemmung des bakteriellen Wachstums, obwohl aus der Veröffentlichung nicht hervorgeht, dass dies differenziert untersucht wurde.

	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.
	Yabu et al.	Ikeda et al.	Berry + Henry	Pinheiro et al.	Das et al.	Zanela et al.	Chavarria et al.	Rumiantsev et al.	Gamboa + Chavez	Giacaman et al.	Brambilla et al.	Giongo et al.	Ajagam. et al.
	1977	1978	1981	1987	1992	2002	2008	2011	2012	2013	2014	2014	2014
Steviosid	X	X	X		X	X		X			X	X	
Reb. A					X						X		
„Blattextrakt“				X			X		X				X
„Stevia“										X			
Plaque				X		X					X		
<i>S. mutans</i>	X	X	X			X	X		X	X			X
<i>S. sobrinus</i>					X				X				
<i>L. azido-</i> <i>philus</i>							X		X				X
<i>L. plantarum</i>	X								X				
<i>L. casei</i>	X								X				
<i>In vitro</i>	X		X	X			X	X	X	X	X		X
<i>In vivo</i>					X	X					X	X	
Tierversuch					X								
pH-Wert		X	X					X		X	X	X	
Anzahl d. MO						X				X			
OD	X		X										
Bemerkung			Poster				Poster						
Oberflächen- Mikrohärte										X			

**Tab. 3:** Bisherige Veröffentlichungen zum Thema „Steviolglykoside und Karies“ (1977 - 2016)

## 1.5 Ziel der Arbeit

In der bis heute veröffentlichten Literatur zum Thema „Einsatz von Steviosiden in der Zahnmedizin“ gibt es Hinweise darauf, dass Steviosid und Rebaudiosid A nicht kariogen sind und eventuell sogar hemmend auf die oralen Mikroorganismen wirken können. Das Ziel der Untersuchungen ist es, die grundlegenden Effekte der Steviolglykoside auf Wachstum und Säureproduktion der potentiell dentalpathogenen Spezies *S. mutans*, *S. sanguinis*, *S. salivarius*, *S. sobrinus* *in vitro* systematisch zu untersuchen. Von Bedeutung war dabei auch die Kombination der natürlichen Zuckerersatzstoffe mit niedermolekularen Kohlenhydraten, um mögliche bakteriostatische Effekte zu erfassen.

Zum Verhalten der Streptokokken interessierten für die vorliegende Arbeit folgende Fragestellungen:

- inwieweit das Wachstum der Mikroorganismen in Steviosid- und Rebaudiosidlösungen grundsätzlich stattfindet,
- inwiefern kann eine Kombination mit Glukose die Parameter des bakteriellen Wachstumsverhalten beeinflussen,
- ob ein Abfall des pH-Wertes bei Zugabe von Steviosid oder Rebaudiosid A beobachtet werden kann,
- ob in der Kombination mit Glukose und den zu testenden Steviolglykosiden eine zeitliche Veränderung in einem möglichen Abfall des pH-Wertes (Verzögerung/Beschleunigung) erfasst werden kann,
- gibt es Unterschiede zwischen den einzelnen Spezies in den untersuchten Medien?

## 2. Material und Methode

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Mikroorganismen

Um die Effekte der Zuckerersatzstoffe auf Wachstum und Säureproduktion oraler Mikroorganismen zu untersuchen, wurden vier biofilm-assoziierte Bakterienspezies ausgewählt. Bei den verwendeten Mikroorganismen handelt es sich um die in dentalen Biofilmen regelmäßig anzutreffenden Spezies oraler Streptokokken: *Streptokokkus mutans* Clarke 1924 (DSMZ, DSM 20523), *Streptokokkus sanguinis* White and Niven 1946 (DSMZ, DSM 20068), *Streptokokkus sobrinus* Coykendall 1983 (DSMZ, DSM 20742) und *Streptokokkus salivarius* Andrewes and Horder 1906 (DSMZ, DSM 20067) Sie wurden allesamt bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen in Braunschweig (DSMZ) bezogen. Im automatischen Mikrobiologie-Analysegerät BD Phoenix™ wurde die Reinheit der Kulturen geprüft.

Das Wachstum der Mikroorganismen wurde in fünffacher Ausführung (n = 5) je Stamm untersucht, die negative Kontrolle in doppelter Ausführung. Die verschiedenen Gruppen sind in Tab. 4 aufgezeigt.

**Tab. 4:** Versuchsgruppen und Wirkstoff/e in verwendeter Konzentration

Gruppe Nummer	Wirkstoff/e	Konzentration
Gruppe 1	Negative Kontrolle	
Gruppe 2	Glukose 0,5 %	
Gruppe 3	Glukose 0,5 % +	Steviosid 0,5 %
Gruppe 4	Glukose 0,5 % +	Rebaudiosid A 0,04 %
Gruppe 5	Steviosid 0,5 %	
Gruppe 6	Rebaudiosid A 0,04 %	

### 2.1.2 Vorbereitende Maßnahmen

Die Mikroorganismen wurden zunächst als Vorkulturen in steriler „Hirn-Herz-Bouillon“ (heipha Dr. Müller GmbH) kultiviert. Tabelle 5 zeigt die Zusammensetzung des Mediums Hirn-Herz-Bouillon (BHI, engl.: Brain-Heart-Infusion).

**Tab. Nr. 5:** Zusammensetzung der Hirn-Herz-Bouillon, Fa. heipha Dr. Müller GmbH; eine basale Glukosemenge von 2 g/l ist bereits enthalten

<b>Zusammensetzung pro Liter</b>	
Hirninfusion	12,5 g
Herzinfusion	5 g
Pepton	10 g
NaCl	5 g
Phosphat	2,5 g
Glukose	2 g
<b>pH 7,4 ± 0,2</b>	

In durch 20 min bei 121°C im Dampfsterilisator (Varioklav Dampfsterilisator, H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim, Deutschland) autoklavierte Reagenzgläser wurden jeweils 5 ml Hirn-Herz-Bouillon pipettiert. Anschließend wurde die steril filtrierte Glukose (Carl Roth GmbH & Co. KG), der Steviosid-Ansatz (Vita Natura Ltd. & Co. KG; enthält 62 % Rebaudiosid A, 25 % Steviosid, 6 % Rebaudiosid C, 6 % Rebaudiosid B, D, F, 1 % andere Steviolglykoside) und der Rebaudiosid A-Ansatz (Stevia GmbH & Co. KG, enthält 97 % Rebaudiosid A), teilweise in Kombination, hinzugefügt (Tab. 6). Wässrige Glukoselösungen von 0,4 - 0,5 % werden als angenehm süß empfunden [Brambilla, 2014], daher wurde für die vorliegende Arbeit eine 0,5 % Konzentration gewählt. Rebaudiosid A wurde aufgrund seiner geringeren Löslichkeit auf eine Endkonzentration von 0,04 % verdünnt. Negative Kontrollen wurden in doppelter Ausführung (n = 2) durchgeführt.

**Tab. 6:** Die Bereitung der verschiedenen Testmedien aus dem angesetzten Basismedium

Zucker/ Zuckerersatzstoff	Stocklösu ng [%]	Stocklösung (Zusammense tzung)	Zur Hirn-Herz-Bouillon hinzugefügte Menge der Stocklösung [ $\mu$ l/50 ml]	Endkonzentration [%]
<b>Steviosid</b>	50	5g /10 ml	500	0,5
<b>Rebaudiosid A</b>	0,4	200mg/ 50 ml	5000	0,04
<b>Glukose</b>	50	5g /10 ml	500	0,5
<b>Glukose+Steviosid</b>	50/50	5g/10 ml +5g/10 ml	500+500	0,5+0,5
<b>Glukose+ Rebaudiosid A</b>	50/0,4	5g/10 ml+ 200 mg /50 ml	500+5000	0,5+0,04

Die Vorkulturen wurden (nach 14 Stunden Wachstum) durch Hinzufügen frischer Hirn-Herz-Bouillon auf eine optische Dichte von 0,8 - 1,0 eingestellt.

Um die Versuche zu starten, wurde zum Zeitpunkt 0, unmittelbar vor der Messung der optischen Dichte, jeweils eine Menge von 50  $\mu$ l der Suspension mit den vorbereiteten Mikroorganismen in die, im Schüttelwasserbad auf 37°C vorgewärmten, Röhrchen mit den Testmedien pipettiert. Jede einzelne Probe enthielt demnach 50  $\mu$ l in Hirn-Herz-Bouillon kultivierte Mikroorganismen mit einem jeweiligen Zusatz von Glukose, Steviosid oder Rebaudiosid A, beziehungsweise eine Kombination von Süßstoffen mit einem Volumen von insgesamt 5 ml Flüssigmedium. Die Versuche wurden in fünffacher Ausführung n = 5 durchgeführt. Die Proben wurden über den beobachteten Zeitraum von 52 h bei 37°C im Schüttelwasserbad (Memmert GmbH &Co KG Schwabach, Deutschland, Abb. 6) kultiviert. Als Blankwert diente BHI-Medium.

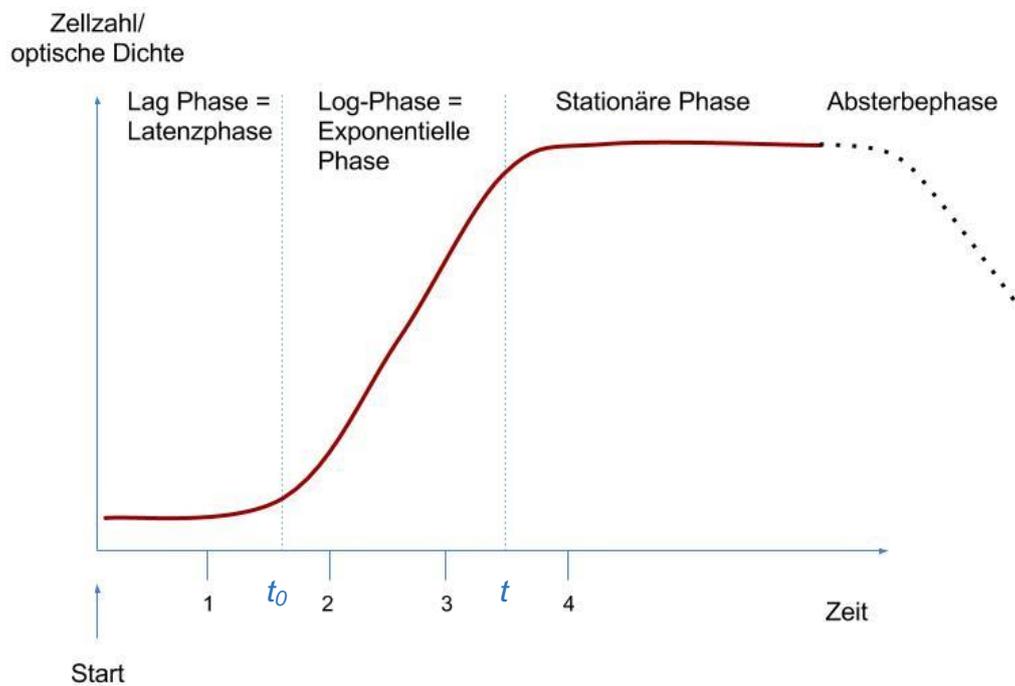


**Abb. 6:** Das für die Wachstumsversuche verwendete Schüttelwasserbad mit Kulturröhrchen, Fa. Memmert

## 2.2 Verhalten von Mikroorganismen in einer Batch-Kultur

In den für die vorliegende Arbeit durchgeführten Versuchen wird das Verhalten der Mikroorganismen in einem statischen System, einer sogenannten Batch-Kultur, betrachtet. Deren ideale Wachstumskurve ist in Abbildung 7 aufgezeigt. Während der Kulturzeit bleibt das Medium durch äußere Einflüsse unberührt. Die Temperatur des Wasserbads in den Versuchen betrug konstant 37°C. Zunächst herrscht für die Bakterien ein Überangebot an Substrat. In der ersten Phase des Wachstums, Lag-Phase, setzen Regulationsprozesse ein. Enzyme und Transporter für die Nahrungsaufnahme und –verwertung werden induziert [Cypionka, 2010]. Die Biomasse nimmt nur leicht zu. Im Gegensatz zu höher differenzierten Lebewesen sind die oralen Mikroorganismen in der Lage, mit ihrer gesamten Oberfläche Nahrung aufzunehmen [Gehring, 1990], sodass sie sehr effektiv Substrat aufnehmen und verstoffwechseln können. Diese Anlaufphase dauert an, bis die maximale Teilungsrate erreicht ist. Die Bakterien wachsen mit einer für die vorliegenden Bedingungen charakteristischen

## Wachstumsphasen in der Batch-Kultur



**Abb. 7:** Ideale Wachstumskurve einer Batch Kultur

Generationszeit ( $t_d$ ). Das Wachstum während der Log-Phase erfolgt exponentiell. Die Zellteilungsrate ist nun maximal. Während des exponentiellen Wachstums der Log-Phase kann die Wachstumsrate  $\mu$  als ein Maß für die Geschwindigkeit des Zellwachstums der Zellkultur in dieser Phase berechnet werden. Sie wird folgendermaßen bestimmt (2):

$$\mu = (\ln x_t - \ln x_0) / (t - t_0) \quad (2)$$

$\mu$  = Wachstumsrate

$x_t$  = optische Dichte der Zellkultur zum Zeitpunkt  $t$

$x_0$  = optische Dichte der Zellkultur zum Zeitpunkt  $t_0$

$t$  = Zeitpunkt des maximalen exponentiellen Wachstums

$t_0$  = Zeitpunkt des Beginns der exponentiellen Phase

Die Generationszeit (Verdopplungszeit)  $t_d$  ist die Zeitspanne, innerhalb derer sich die Zellmasse innerhalb der Kultur verdoppelt (3):

$$td = \ln 2 / \mu \quad (3)$$

Die Wachstumsrate und  $t_d$  sind für jeden Stamm spezifische Größen, sie sind abhängig von den Kulturbedingungen und vom verwendeten Medium.

Die bakterielle Proliferation endet, wenn essentielles Substrat zur Neige geht, oder sich anreichernde Stoffwechselprodukte die weitere Vermehrung hemmen. In der stationären Phase wächst die Kultur effektiv nicht mehr. Es stellt sich ein dynamisches Gleichgewicht zwischen sterbenden und durch Zellteilung neu entstehenden Zellen ein. Wenn die vorhandenen Nährstoffe endgültig verbraucht sind, die maximale Populationsdichte der Spezies erreicht ist, der Sauerstoffgehalt des Mediums sinkt oder sich bakterielle Toxine anhäufen, beginnt die Absterbephase [Cypionka, 2010].

### 2.3 Bestimmung der optischen Dichte

Unter Wachstum versteht man die Zunahme der lebenden Masse, bestehend aus Zellmasse und Zellzahl. Bei einzelligen Organismen besteht das Wachstum in einer Zunahme der Zellzahl. Prokaryonten vermehren sich durch Zellteilung, wobei die Tochterzellen die gleiche Größe wie die ursprüngliche Mutterzelle aufweisen. Bei Standardzellen mit ausgeglichenem Wachstum kann man statt der Zellzahl auch die Zellmasse oder eine ihr proportionale Größe wie die Trübung (optische Dichte= Extinktion) bestimmen [Fuchs, 2014]. Die Messung der Zelldichte erfolgte durch das optische Verfahren der Extinktionsmessung mit dem Zelldichte-Messgerät (Biochrom WPA CO8000 Biowave Zelldichte-Messgerät, Biochrom AG) bei einer optischen Dichte von 600 nm ( $OD_{600nm}$ ). Insgesamt wurden Werte zu Wachstum und Säureproduktion über einen Zeitraum von 52 h erfasst. Das Wachstum der Mikroorganismen wurde in den ersten 24 Stunden stündlich und danach zu den Zeitpunkten 28 h, 32 h, 40 h, 44 h, 48 h und 52 h bestimmt. Optische Dichten größer als 2.0 können vom Photometer nicht bestimmt werden. Vor jeder Messreihe wurde das Zelldichtemessgerät mit einem Kulturröhrchen, welches lediglich BHI-Medium enthielt, „geblankt“.

## 2.4 Bestimmung des pH-Wertes

Die Säureproduktion wurde mit einer pH-Elektrode (Mettler Toledo FE20-Kit - FiveEasy™ pH electrode, Abb. 8) gemessen. Im Zeitraum 0 - 24 h wurde der pH-Wert der Kulturen alle zwei Stunden gemessen. Danach zu den definierten Zeitpunkten 28 h, 32 h, 40 h, 44 h, 48 h und 52 Stunden. Vor der Messung wurde die pH-Elektrode des pH-Meters jeweils mit Pufferlösungen der definierten pH-Werten 4 und 7 kalibriert. Die Messung erfolgt dann durch Eintauchen in das Kulturröhrchen. Nach jeder Messung wurde die Elektrode mit Aqua dest. gereinigt und mit Ethanol 70 % desinfiziert.



**Abb. 8:** pH-Elektrode Fa. Mettler Toledo, kalibriert auf pH 7,0 vor Anwendung in den Kulturröhrchen

## 2.5 Datenerfassung, Auswertung, Statistik

Zur digitalen Bearbeitung der erhobenen Messdaten wurden Wertetabellen und Wachstumskurven, sowie die Graphen zur Bestimmung der pH-Werte mit „Microsoft Excel 2010“ erstellt. Die Darstellungen anhand von „Box-Whisker-Plots“ und die Balkendiagramme für die statistische Auswertung wurden mit „Prism5“ von „Graph Pad“ erarbeitet. Die statistische Auswertung der pH-Werte zu den Zeitpunkten 4, 8 und 24 Stunden erfolgte über einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit folgendem Tukey-Test bei einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$ .

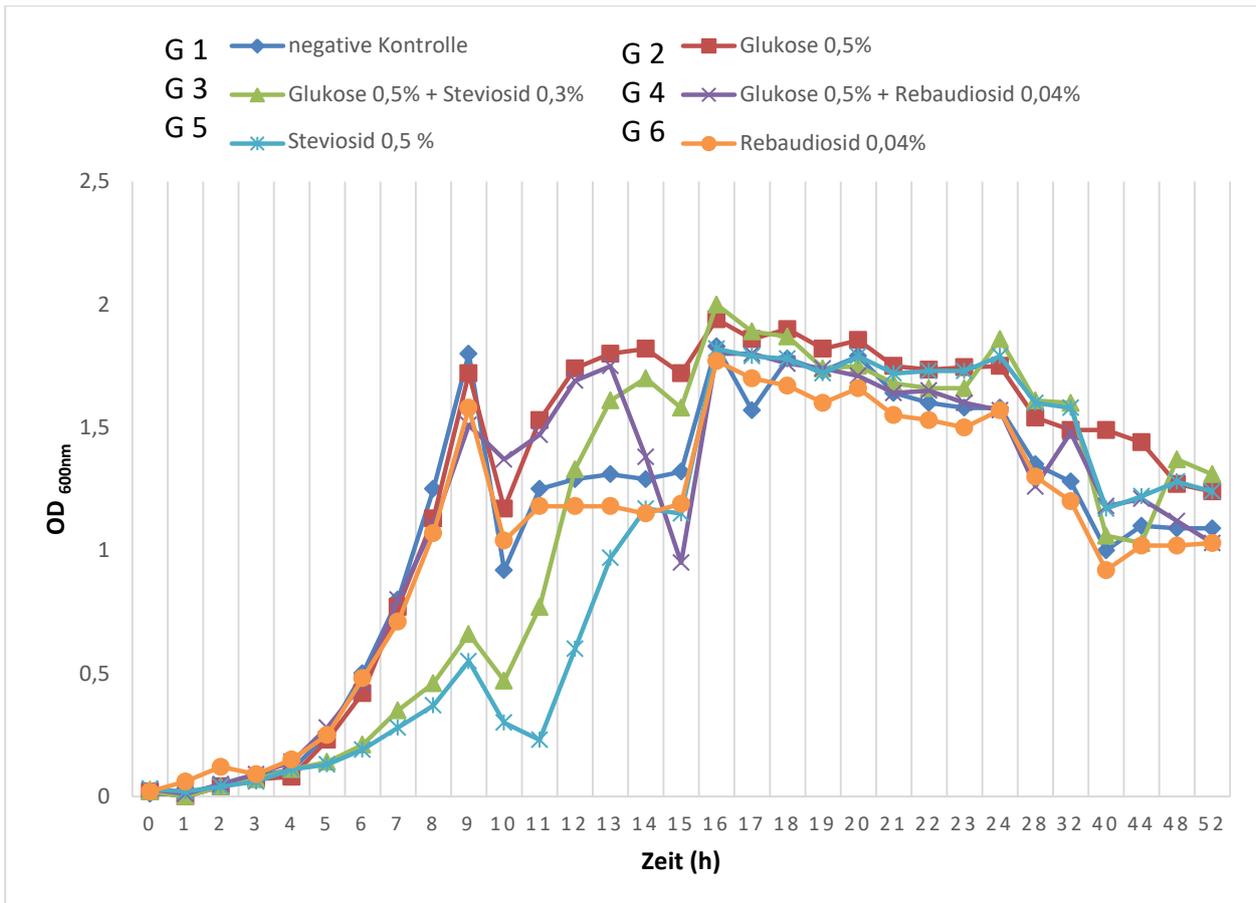
## 3. Ergebnisse

### 3.1 Ergebnisse der Wachstumsversuche

Die Ergebnisse der Wachstumsversuche zeigen keine Anhaltspunkte für Fremd- oder Kreuzkontamination. Nachdem die Reinheit der Spezies vor Beginn der Untersuchungen vollautomatisiert in BD Phönix™ sichergestellt wurde, wurden sie im Nachhinein durch Ausstreichen auf Blutagarplatten erneut auf Reinheit überprüft.

#### 3.1.1 Streptokokkus sobrinus

Abb. 9 zeigt das Wachstumsverhalten von *Streptokokkus sobrinus* in Hirn-Herz-Bouillon mit den jeweiligen untersuchten Zusätzen. Die Medianwerte der optischen Dichte bei 600 nm wurden gegen die Zeit aufgetragen. Das Wachstum der Kultur zeigt eine Gliederung in Lag-, Log-, stationäre und Absterbephase. Die Gruppen (3) und (5) mit Steviosidzusatz zeigen eine, im Vergleich zu den anderen Gruppen, etwa doppelt so lange Lag-Phase von ca. zehn Stunden. Die Gruppen negative Kontrolle (1), Glukose 0,5 % (2) sowie Glukose 0,5 % und Rebaudiosid A 0,04 % (4) erreichen die Phase des exponentiellen Wachstums bereits nach 4 – 5 h. Die Messung zum Zeitpunkt 10 h nach Inokulation zeigt im Median aller Gruppen eine verringerte optische Dichte. Dieser Einbruch in der Wachstumskurve wird im weiteren Verlauf in allen Gruppen überwunden. Die Gruppen (3) und (5) erreichen die Log-Phase nach 10 h, die Dauer des exponentiellen Wachstums ist in allen Gruppen ähnlich und liegt zwischen 5 - 6 h. Die in der Log-Phase bestimmten Wachstumsraten zeigen die kleinsten Werte in Gruppe (3) ( $\mu = 0,31 \text{ h}^{-1}$ ) und (5) ( $\mu = 0,33 \text{ h}^{-1}$ ), gefolgt von den Kulturen mit Zusatz von Rebaudiosid A (Gruppe (6):  $\mu = 0,45 \text{ h}^{-1}$  und Gruppe (4):  $\mu = 0,48 \text{ h}^{-1}$ ), wie Tabelle 7 zeigt. Die Generationszeit  $t_d$  in der Flüssigkultur ist mit  $t_d = 2,16 \text{ h}$  in Gruppe (3) und  $t_d = 2,04 \text{ h}$  in Gruppe (5) am längsten.



**Abb. 9:** Bestimmung der optischen Dichte für *S. sobrinus* (n = 5), G(ruppe) 1 – G(ruppe) 5. Gut ersichtlich ist die, in den Gruppen (3) und (5) im Vergleich zu den anderen Gruppen, etwa doppelt so lange Lag-Phase von ca. 10 Stunden.

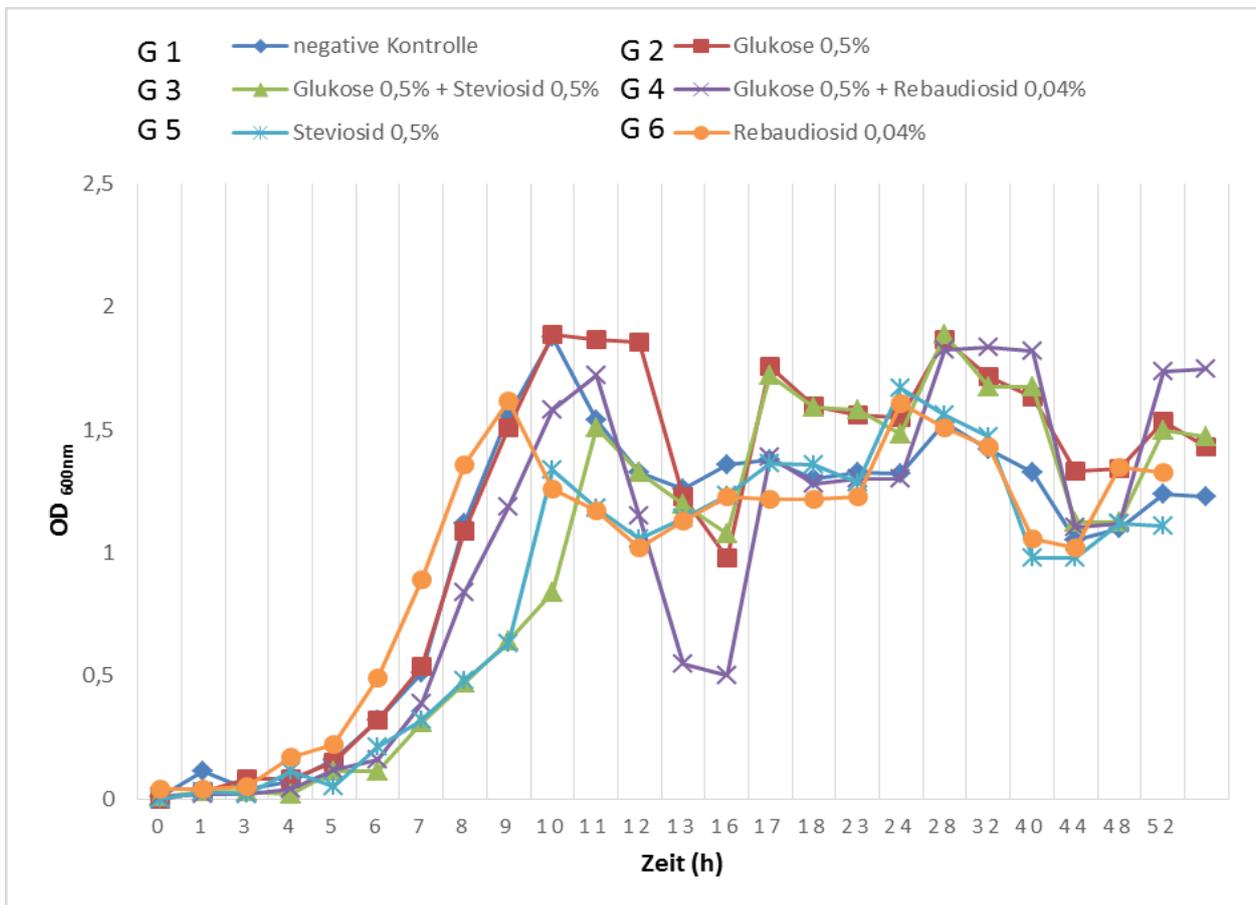
Die stationäre Phase ist zwischen 16 h und 24 h in allen Gruppen recht stabil, in Gruppe sechs sind die erreichten Medianwerte der optischen Dichte hier am kleinsten. Ab dem Zeitpunkt 28 h sinkt die optische Dichte, alle Gruppen gehen in die Absterbephase über.

**Tab. 7:** Dargestellt sind die Länge der Lag-Phasen, Wachstumsraten und Verdopplungszeiten von *S. sobrinus*. Die Wachstumsraten zeigen die kleinsten Werte in Gruppe (3) ( $\mu = 0,31 \text{ h}^{-1}$ ) und (5) ( $\mu = 0,33 \text{ h}^{-1}$ ), den Gruppen mit Steviosidzusatz.

<i>S. sobrinus</i>	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4	Gruppe 5	Gruppe 6
Länge der Lag-Phase (h)	4	4	10	4	10	5
Wachstumsrate $\mu$ ( $\text{h}^{-1}$ )	0,56	0,6	0,31	0,48	0,33	0,45
Verdopplungszeit $t_d$ (h)	1,24	1,23	2,16	1,46	2,04	1,5

### 3.1.2 Streptokokkus mutans

Die Latenzphase der Flüssigkulturen von *S. mutans* erstreckt sich in allen sechs Gruppen über die ersten fünf Stunden der Wachstumsmessungen, dies wird in Abbildung 10 verdeutlicht. Im Zeitraum von 5 h bis 10 h durchlaufen sie die Log-Phase, wobei die Gruppen (3) und (5) mit Steviosidzusatz bei anfänglich langsamerem Wachstum nach 11 h OD Werte vergleichbar mit den übrigen Testmedien  $\sim 1,8$  OD erreichen. Die Wachstumsraten aller Gruppen liegen im Bereich zwischen  $\mu = 0,36 \text{ h}^{-1}$  in Gruppe (3) und  $\mu = 0,52 \text{ h}^{-1}$  in Gruppe (5). Die Generationszeit  $t_d$  erreicht in Gruppe (5) mit  $t_d = 1,34 \text{ h}$  die schnellste Verdopplung, dargestellt in Tab. 8.



**Abb. 10:** Gezeigt wird die Bestimmung der optischen Dichte für *S. mutans* ( $n = 5$ ), G(ruppe) 1 – G(ruppe) 6. Die Lag-Phase ist in allen Gruppen ähnlich ausgeprägt, sie dauert circa 5 Stunden an.

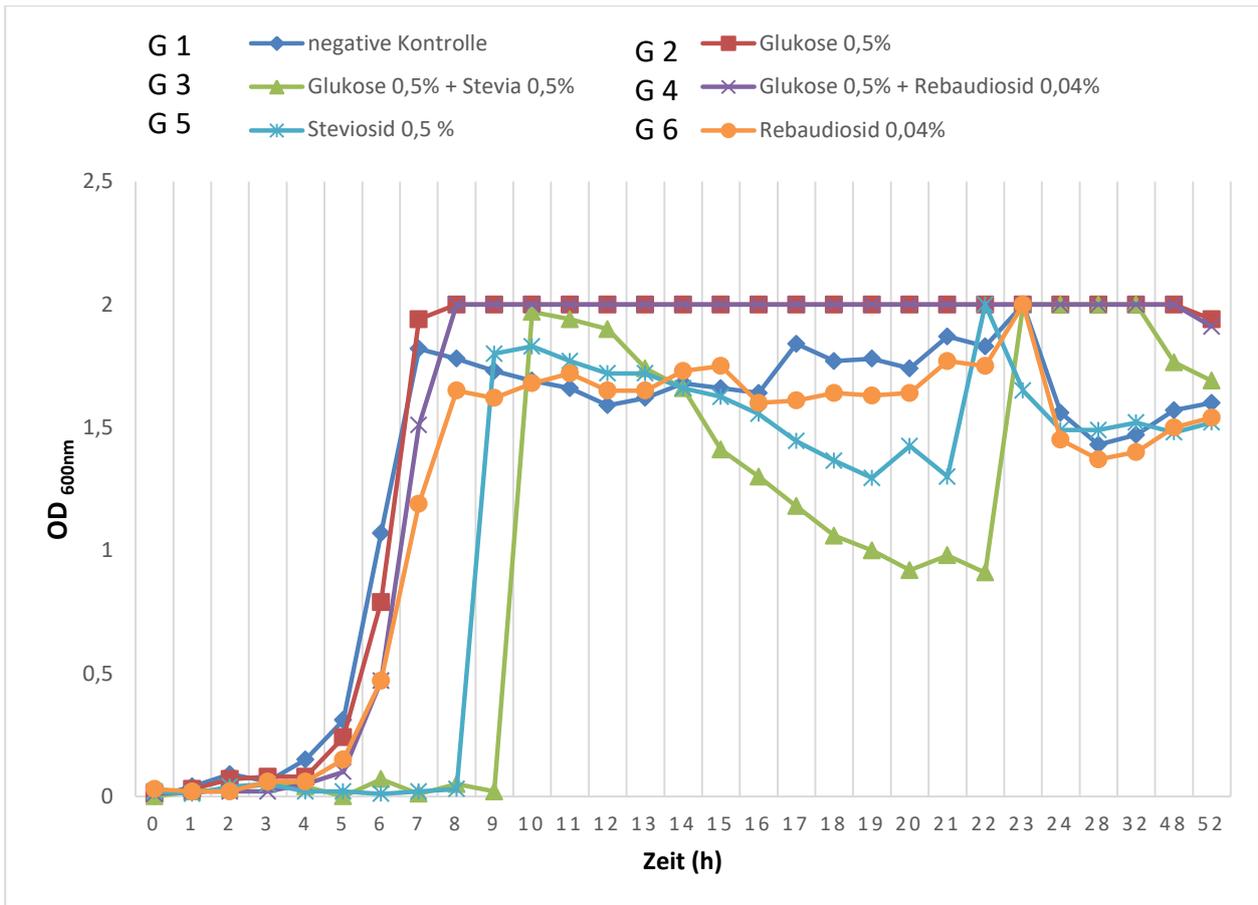
**Tab. 8:** Aufgezeigt wird die Länge der Lag-Phasen, Wachstumsraten und Verdopplungszeiten von *S. mutans*. Die Wachstumsraten dieses Stamms sind in allen Medien vergleichsweise ähnlich, sie liegen im Bereich zwischen  $\mu = 0,36 \text{ h}^{-1}$  in Gruppe (3) und  $\mu = 0,52 \text{ h}^{-1}$  in Gruppe (5).

<i>S. mutans</i>	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4	Gruppe 5	Gruppe 6
Länge der Lag-Phase (h)	5	5	5	5	5	5
Wachstumsrate $\mu$ ( $\text{h}^{-1}$ )	0,43	0,43	0,36	0,48	0,52	0,41
Verdopplungszeit $t_d$ (h)	1,57	1,56	1,92	1,4	1,34	1,62

Die statische Phase unterliegt in allen Gruppen deutlichen Schwankungen im Median der OD. Sie endet nach ca. 30 h für alle Kulturen mit dem Beginn der Absterbephase.

### 3.1.3 Streptokokkus salivarius

Während in den Gruppen (1), (2), (4) und (6) das exponentielle Wachstum der Log-Phase nach ca. 4 - 5 h einsetzt, zeigen Gruppe (3) und (5) ähnlich längere Latenzphasen (8 - 9 h), wie bereits bei *S. sobrinus* für die Gruppen (3) und (5) mit Steviosidzusatz beobachtet (vergl. dazu Abb. 11). In allen getesteten Zusammensetzungen sind die Wachstumsraten von *S. salivarius* höher als bei den anderen getesteten Spezies. Innerhalb eines im Vergleich zu den anderen Spezies recht kurzen Zeitraumes von ca. 1 h werden in Gruppe (3) und (5) in der exponentiellen Phase deren maximale Werte der optischen Dichte erreicht.



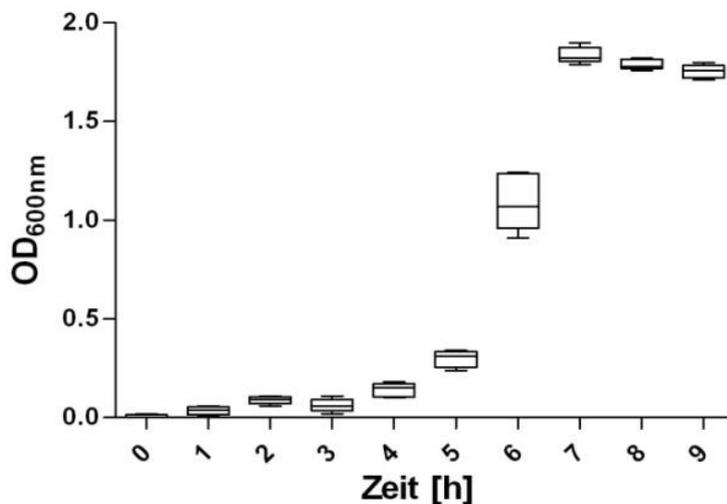
**Abb. 11:** Dargestellt ist hier die Bestimmung der optischen Dichte für *S. salivarius* ( $n = 5$ ), für die G(ruppe) 1 – G(ruppe) 6, analog zu den Ergebnissen mit *S. sobrinus* zeigen auch hier die Gruppen (3) und (5) ähnlich längere Latenzphasen (8 - 9 h) als die der Vergleichsmedien.

Die Wachstumsraten für die Gruppen (3) und (5) sind mit  $\mu = 4,58 \text{ h}^{-1}$  (3) und  $\mu = 4,08 \text{ h}^{-1}$  (5) am größten. Tab. 9 zeigt die Längen der einzelnen Lag-Phasen, der Wachstumsraten und Verdopplungszeiten von *S. salivarius*.

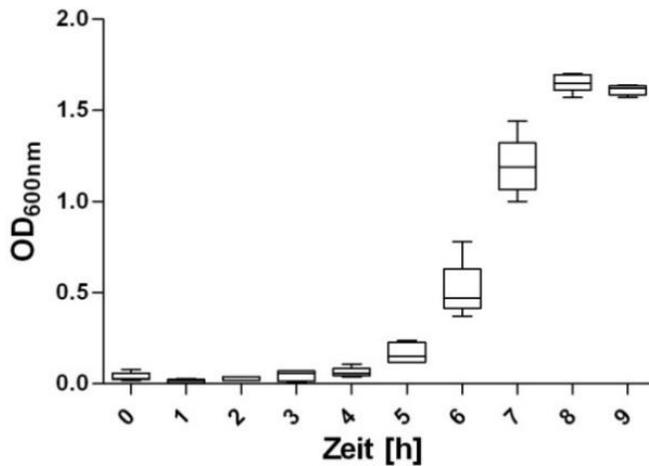
**Tab. 9:** Länge der Lag-Phasen, Wachstumsraten und Verdopplungszeiten von *S. salivarius*. Die Wachstumsraten von *S. salivarius* sind insgesamt größer als die der anderen getesteten Spezies, insbesondere die der Gruppen (3) und (5) sind mit  $\mu = 4,58 \text{ h}^{-1}$  (3) und  $\mu = 4,08 \text{ h}^{-1}$  (5) deutlich erhöht.

<i>S. salivarius</i>	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4	Gruppe 5	Gruppe 6
Länge der Lag-Phase (h)	4	5	9	5	8	5
Wachstumsrate $\mu$ ( $\text{h}^{-1}$ )	0,82	1,03	4,58	1	4,08	0,8
Verdopplungszeit $t_d$ (h)	0,82	0,65	0,14	0,68	0,17	0,87

Die Auftragung des Medians in der Wachstumskurve erlaubt zunächst keine Aussage über die Verteilung der Werte. Der Interquartilsabstand als Maß für die Streuung ermöglicht in der Darstellung mit Bloxplots eine Aussage zur Verteilung der Messdaten, der Median ist als Querstrich in der Box dargestellt. Die erhobenen Werte sind insgesamt recht homogen. Allerdings ist die Abweichung der einzelnen Messwerte während der Log-Phase größer als in den übrigen Wachstumsphasen. Dies wird in der Darstellung anhand von Box-Whisker-Plots verdeutlicht, exemplarisch für die Gruppen (1) und (6) im Zeitraum 0 - 9 h in Abb. 12 und 13 dargestellt.



**Abb. 12:** Box-Whisker-Plots von *S. salivarius* für Gruppe (1), die Darstellung anhand von Box-Whisker-Plots verdeutlicht hier die, während der exponentiellen Wachstumsphase auftretende, etwas höhere Streuung der Werte für die optische Dichte.

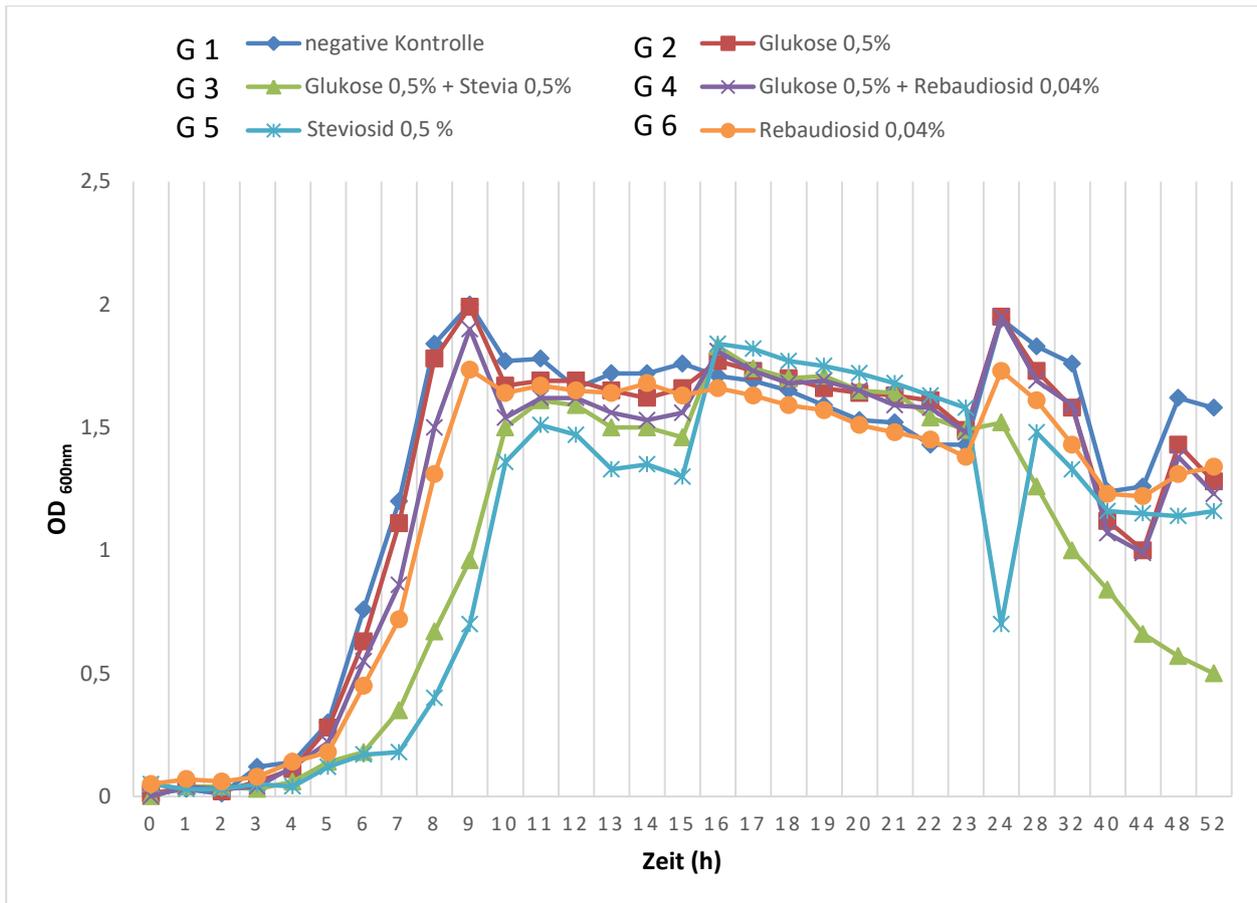


**Abb. 13:** Box-Whisker-Plots von *S. salivarius* für Gruppe (6), auch hier zeigt sich in der Darstellung anhand von Box-Whisker-Plots eine etwas erhöhte Streuung der Werte für die optische Dichte während der Log-Phase des bakteriellen Wachstums. Insgesamt ergeben die gemessenen Werte ein einheitliches Bild.

Gruppe (2) und (4) erreichen nach bereits 7 h den maximal messbaren Wert von  $OD_{\max} = 2$  in dem hier verwendeten Versuchsaufbau und halten die statische Phase im Vergleich zu allen anderen Kulturen stabil bis zum Beginn der Absterbephase, die nach ca. 48 h einsetzt.

### 3.1.4 Streptokokkus sanguinis

Die Lag-Phase der Bakterienkulturen mit Steviosidzusatz in Gruppe (3) und (5) ist, wie in Abb. 14 dargestellt, ähnlich wie in den Testreihen mit *S. sobrinus* und *S. salivarius*, verlängert. Die Latenzphase der Gruppen (1), (2), (4) und (6) endet nach 4 - 5 h, die exponentielle Phase geht in diesen Gruppen zum Zeitpunkt 9 h nach Animpfung in die stationäre Phase über, während Gruppe (3) und (5) die Log-Phase nach 10 h verlassen. Die Wachstumsraten aller Kulturen unterscheiden sich nur geringfügig, sie liegen zwischen  $\mu = 0,52 \text{ h}^{-1}$  in Gruppe (3) und  $\mu = 0,66 \text{ h}^{-1}$  in Gruppe (5), Tabelle 10 gibt einen Überblick der Wachstumsparameter von *S. sanguinis*.



**Abb. 14:** Bestimmung der optischen Dichte für *S. sanguinis* (n = 5), G(ruppe) 1 – G(ruppe) 6, auch hier ist analog zu den Beobachtungen der Kulturen von *S. sobrinus* und *S. salivarius* die Lag-Phase der Gruppen (3) und (5) etwas verlängert (6 - 7 h).

Die Generationszeiten sind ebenfalls ähnlich, sie liegen zwischen  $t_d = 1,03$  h. in Gruppe (5) und  $t_d = 1,31$  in Gruppe (3). Die Kulturen gehen nach 24 h in die Absterbephase über.

**Tab. 10:** Länge der Lag-Phasen, Wachstumsraten und Verdopplungszeiten von *S. sanguinis*; die Wachstumsraten aller Kulturen sind relativ homogen, sie liegen zwischen  $\mu = 0,52$  h<sup>-1</sup> in Gruppe (3) und  $\mu = 0,66$  h<sup>-1</sup> in Gruppe (5).

<i>S. sanguinis</i>	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4	Gruppe 5	Gruppe 6
Länge der Lag-Phase (h)	4	4	6	5	7	5
Wachstumsrate $\mu$ (h <sup>-1</sup> )	0,6	0,58	0,52	0,54	0,66	0,57
Verdopplungszeit $t_d$ (h)	1,1	1,2	1,31	1,29	1,03	1,21

### 3.1.5 Gegenüberstellung der Ergebnisse der Wachstumsversuche

Die Länge der Lag-Phase ist für alle Mikroorganismen in der negativen Kontrolle fast identisch, sie liegt bei 4 - 5 h. Mit Zusatz von Glukose (2) und Rebaudiosid (4), (6) liegen die Anlaufphasen ebenfalls im Bereich von 4 - 5 h, mit Zusatz von Steviosid (3), (5) verlängern sich die Lag-Phasen der untersuchten Spezies teilweise deutlich.

Die Wachstumsraten aller getesteten Bakterienarten sind in den Gruppen der negativen Kontrolle (1), mit Glukose (2), sowie mit Rebaudiosid (4) und (6) sehr ähnlich und liegen zwischen 0,43 - 1,03 ( $\text{h}^{-1}$ ). Mit Zusatz von Steviosid (3) und (5) ist die Wachstumsrate von *S. salivarius* stark erhöht.

Die Verdopplungszeiten der negativen Kontrolle liegen zwischen 0,82 - 1,57 h, sie sind ähnlich der Zeiten für alle Mikroorganismen mit Glukose (2) 0,65 - 1,56 h, genauso in Gruppe (4) 0,68 - 1,46 h und (6) 0,87 - 1,62 h. Mit Steviosid (3) und (5) sind die Generationszeiten für *S. sobrinus*, *S. mutans* und *S. sanguinis* verlängert, für *S. salivarius* sind sie verkürzt 0,14 h und 0,17 h. Tabelle 11 a - c zeigt eine Übersicht der ermittelten Wachstumsparameter.

**Tab. 11:** Vergleich der Wachstumsparameter der untersuchten Mikroorganismen in den Gruppen 1 - 6, stark abweichende Werte sind fett markiert

Tab. 11 a: Länge der Lag-Phasen

	<i>S. sobrinus</i>	<i>S. mutans</i>	<i>S. salivarius</i>	<i>S. sanguinis</i>
negative Kontrolle	4	5	4	4
Glukose 0,5 %	4	5	5	4
Glukose 0,5 % + Steviosid 0,5 %	<b>10</b>	5	<b>9</b>	6
Glukose 0,5 % + Rebaudiosid A 0,04 %	4	5	5	5
Steviosid 0,5 %	<b>10</b>	5	<b>8</b>	7
Rebaudiosid A 0,04 %	5	5	5	5

Tab. 11 b: Wachstumsrate  $\mu$  ( $\text{h}^{-1}$ )

	<i>S. sobrinus</i>	<i>S. mutans</i>	<i>S. salivarius</i>	<i>S. sanguinis</i>
negative Kontrolle	0,56	0,43	0,82	0,6
Glukose 0,5 %	0,6	0,43	1,03	0,58
Glukose 0,5 % + Steviosid 0,5 %	<b>0,31</b>	0,36	<b>4,58</b>	0,52
Glukose 0,5 % + Rebaudiosid A 0,04 %	0,48	0,48	1	0,54
Steviosid 0,5 %	<b>0,33</b>	0,52	<b>4,08</b>	0,66
Rebaudiosid A 0,04 %	0,45	0,41	0,8	0,57

Tab. 11 c: Verdopplungszeit td (h)

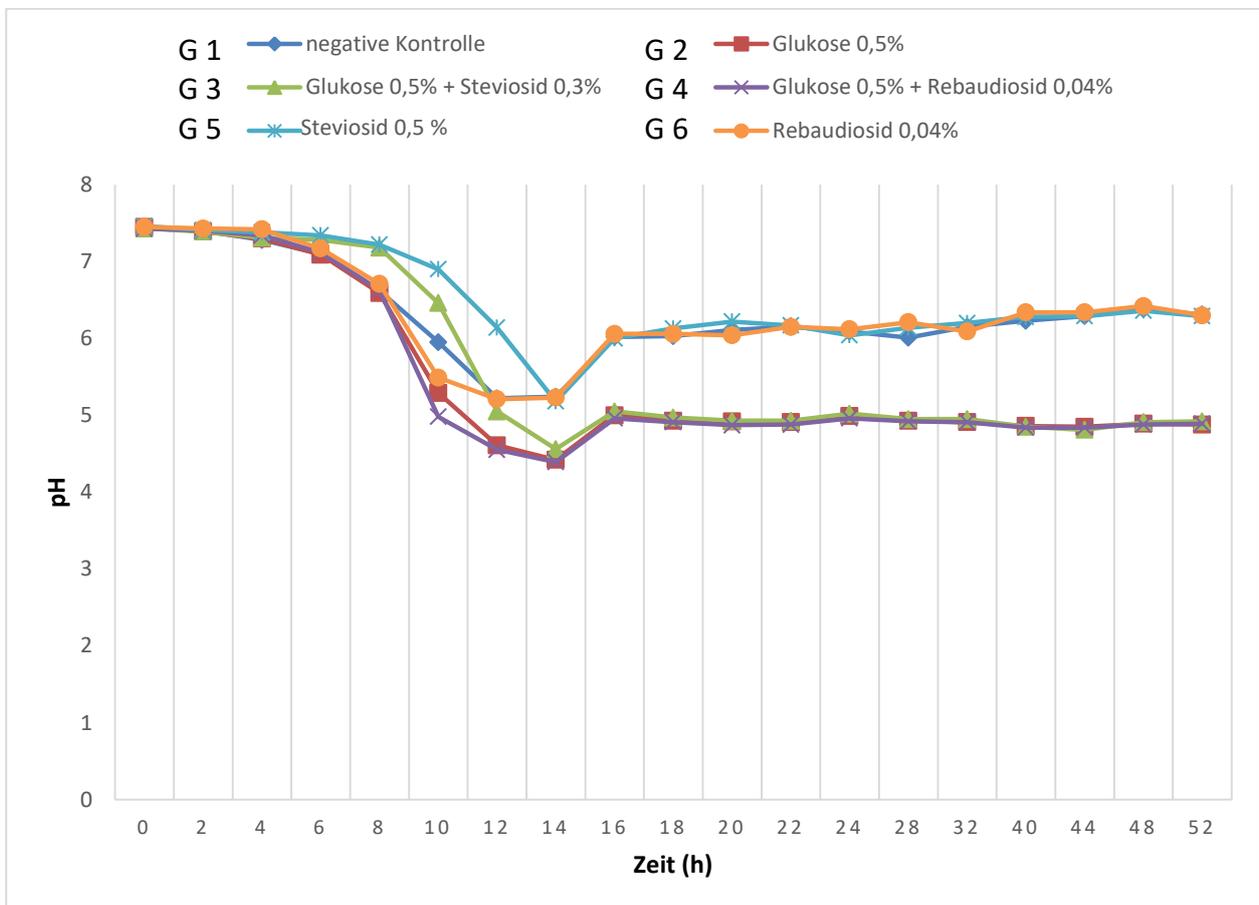
	<i>S. sobrinus</i>	<i>S. mutans</i>	<i>S. salivarius</i>	<i>S. sanguinis</i>
negative Kontrolle	1,24	1,57	0,82	1,1
Glukose 0,5 %	1,23	1,56	0,65	1,2
Glukose 0,5 % + Steviosid 0,5 %	<b>2,16</b>	1,92	<b>0,14</b>	1,31
Glukose 0,5 % + Rebaudiosid A 0,04 %	1,46	1,4	0,68	1,29
Steviosid 0,5 %	<b>2,04</b>	1,34	<b>0,17</b>	1,03
Rebaudiosid A 0,04 %	1,5	1,62	0,87	1,21

---

## 3.2 Ergebnisse der pH-Wert-Messungen

### 3.2.1 Streptokokkus sobrinus

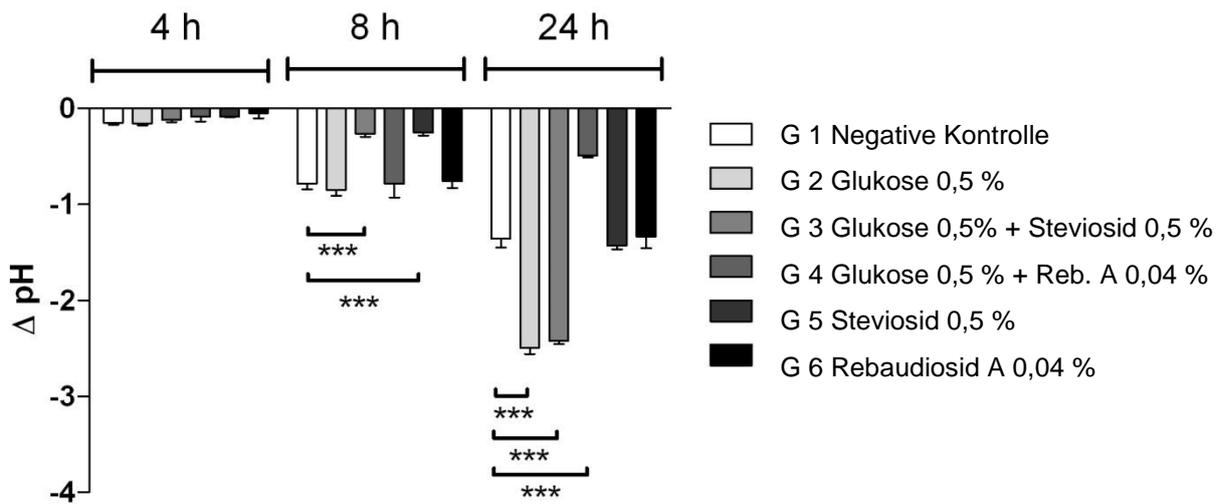
Der pH-Wert-Verlauf der *S. sobrinus*-Kulturen im BHI-Medium mit den jeweiligen Zusätzen ist in Abb. 15 zu sehen. In den Gruppen (5) und (3) mit Steviosid, sinkt der pH-Wert im Messbereich zwischen 8 und 12 h langsamer als in der Gruppe der negativen Kontrolle (1). In allen Medien wird der geringste pH-Wert im Median nach 14 h erreicht. Gruppe 5 (Steviosid 0,5 %) unterschreitet mit einem pH-Wert von 5,18 im Median den der Gruppe (1), negative Kontrolle, mit einem pH-Wert von 5,24 geringfügig.



**Abb. 15:** Bestimmung des pH-Wertes von *S. sobrinus* (n = 5), G(ruppe) 1 – G(ruppe) 6, die Gruppen ohne Glukosezusatz etablieren nach circa 16 h einen recht konstanten pH-Wert im Bereich von >pH 6, der pH-Wert der Gruppe (3) fällt langsamer im Vergleich mit den übrigen Kulturen, denen Glukose 0,5 % zugesetzt wurde.

Nach circa 16 h stabilisieren sich die pH-Werte von Gruppe (5), Gruppe (6) und Gruppe (1) bei Werten über pH 6. Währenddessen bleiben die Gruppen (2), (3) und (4), die zugesetzte Glukose enthalten, bis zum Ende der zeitlichen Erfassung im pH-Bereich unter 5.

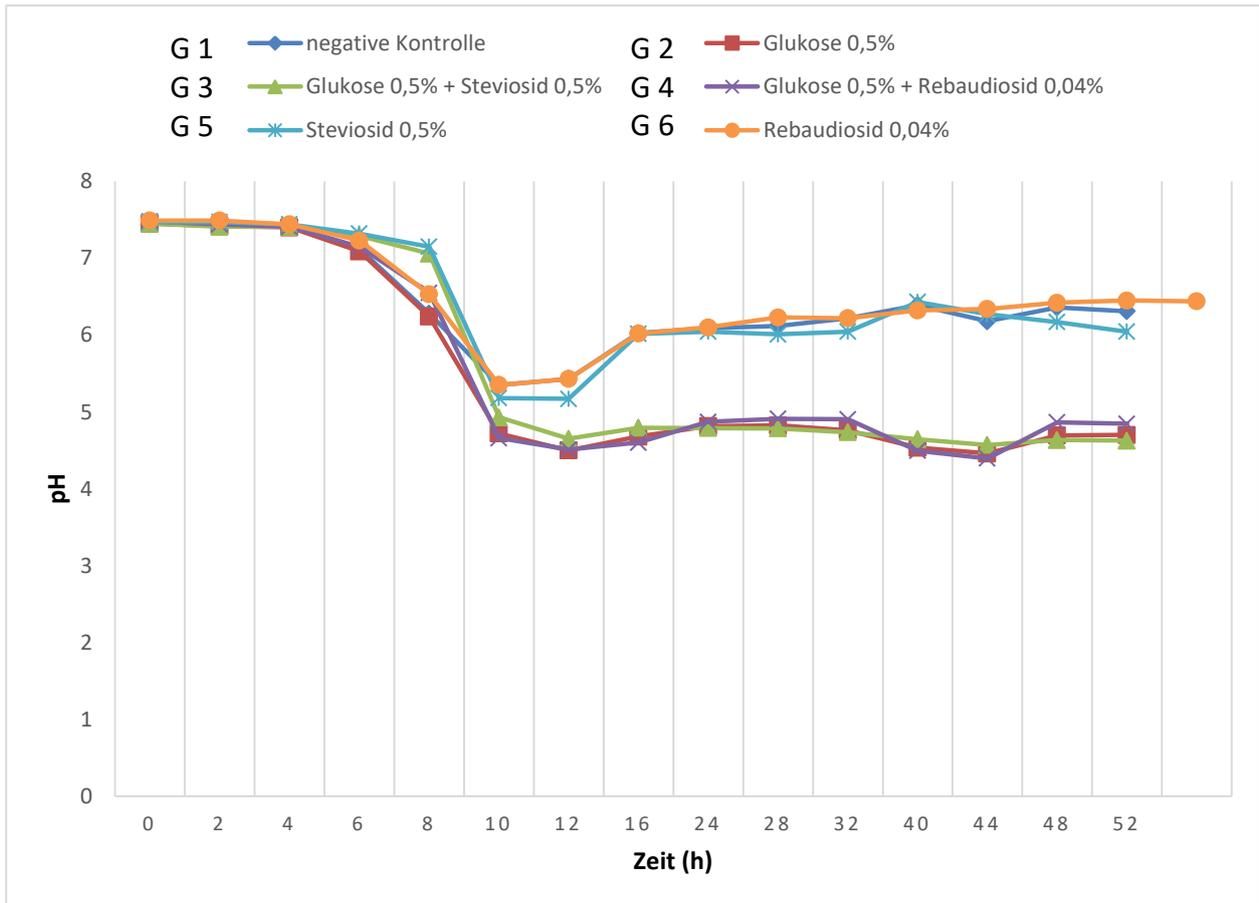
Die Auswertung der pH-Wert-Änderungen nach 4, 8 und 24 Stunden ergab hoch signifikante Unterschiede nach acht Stunden in den Gruppen (3) und (5). In den Gruppen (2), (3) und (5) zeigte sich nach 24 Stunden eine signifikante pH-Wert-Änderung, wobei sie in den Gruppen zwei und drei  $\Delta pH$  signifikant erhöht, in Gruppe 4 erniedrigt sich  $\Delta pH$ . Die Gruppen fünf und sechs zeigen nach 24 Stunden einen dem Referenzwert der negativen Kontrolle sehr ähnlichen Verlauf (vergl. dazu Abb. 16, die die Änderungen des pH-Wertes von *S. sobrinus* in den Gruppen 1 - 6 nach 4, 8 und 24 h zeigt).



**Abb. 16:** Änderungen des pH-Wertes von *S. sobrinus* in den Gruppen 1 - 6 nach 4, 8 und 24 h Inkubation. Signifikante Unterschiede bei einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  sind mit „\*“ markiert, bei  $p < 0,01$  sind sie mit „\*\*“ und bei einem Signifikanzniveau von  $p < 0,001$  mit „\*\*\*“ markiert. Die Auswertung von  $\Delta pH$  ergab signifikante Unterschiede nach acht Stunden in den Gruppen (3) und (5).

### 3.2.2 Streptokokkus mutans

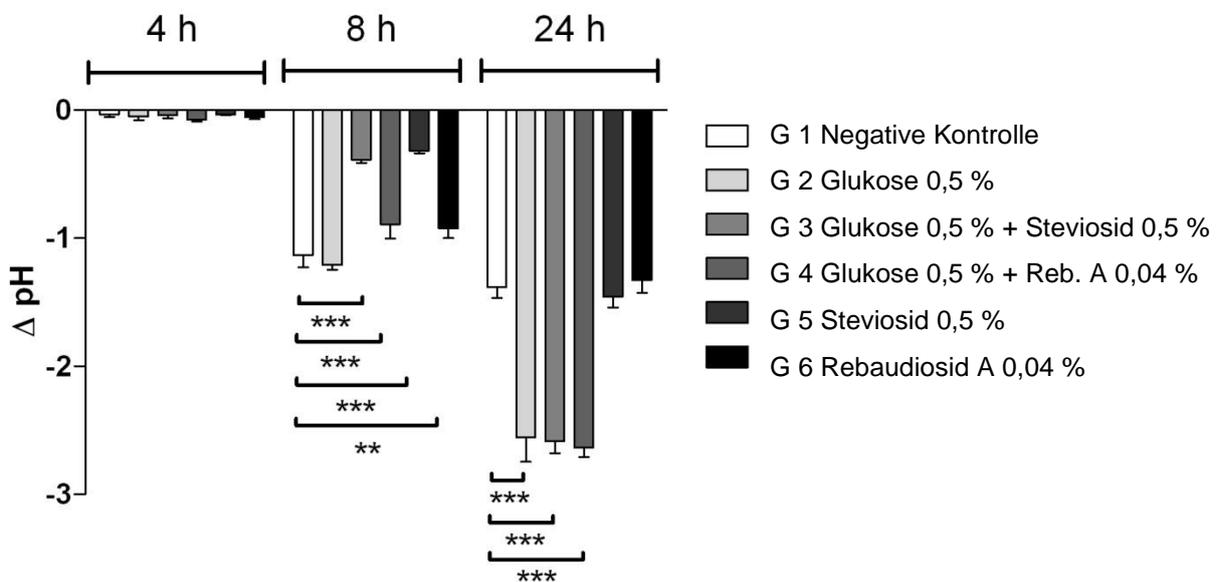
Abb. 17 zeigt den Verlauf des pH-Wertes der Flüssigkultur von *S. mutans* mit den verschiedenen Zusätzen der Gruppen (1) bis (6). In Gruppe (3) und (5) und sinkt der pH-Wert langsamer als in den anderen Gruppen.



**Abb. 17:** Bestimmung des pH-Wertes für *S. mutans* (n = 5), G(ruppe) 1 – G(ruppe) 6, auch hier zeigt sich der pH-Wert in den Gruppen ohne Glukosezusatz nach circa 16 h stabil bei Werten über pH 6. Der niedrigste pH-Wert in diesen Medien fällt im Vergleich weniger stark ab.

Dies zeigt auch die statistische Untersuchung der pH-Wert-Änderung, die in Abb. 18 aufgezeigt ist. Die Auswertung von  $\Delta pH$  ergibt nach 4 h keine signifikanten Unterschiede in allen Gruppen. Nach 8 h zeigen sich signifikante Veränderungen in den Gruppen (3), (4), (5) und (6), die Gruppen (3) und (5) zeigen dabei signifikant kleinere Werte für  $\Delta pH$  im Vergleich zur Referenz (zum Start der Messungen) und zur negativen Kontrolle.

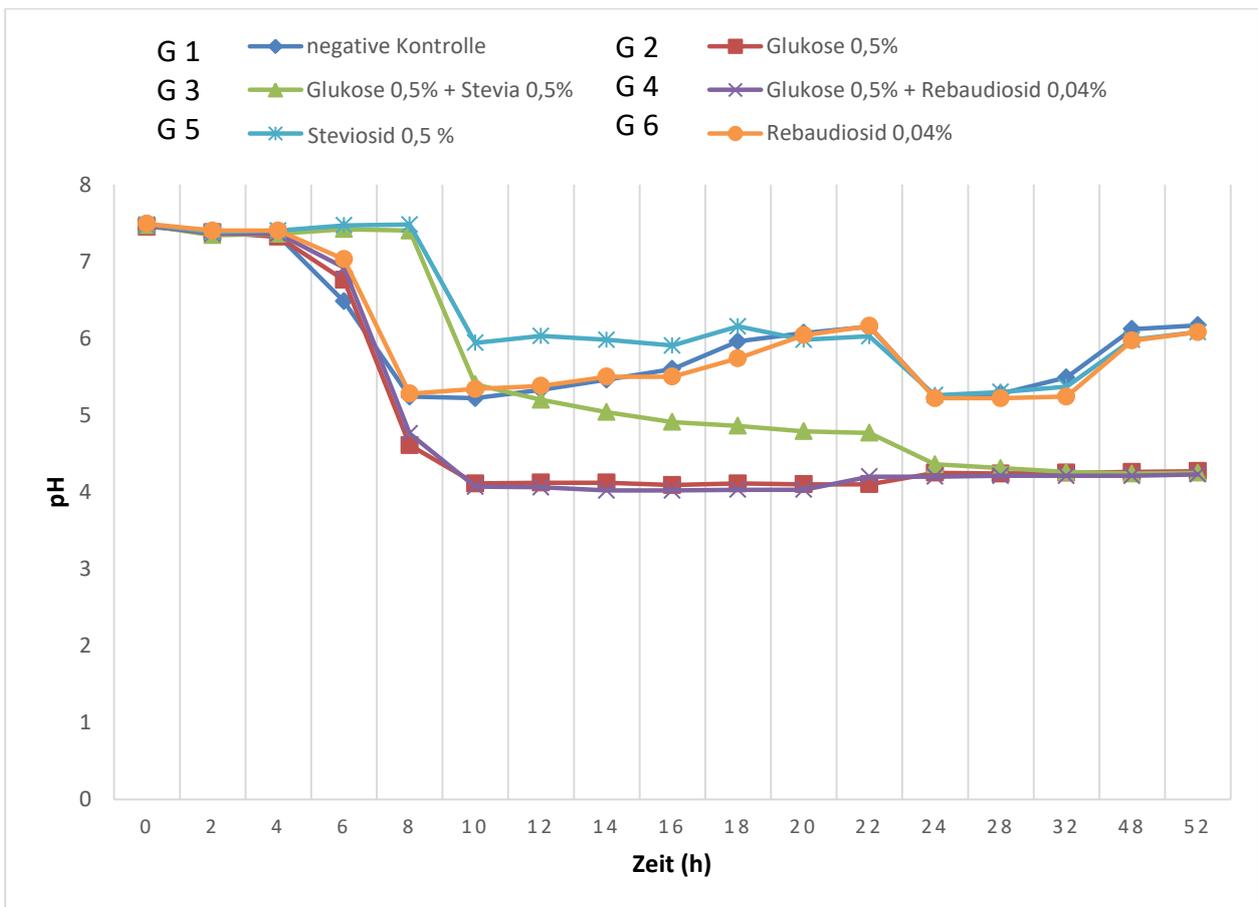
Zwischen 8 und 10 h und sinkt der pH-Wert in den Lösungen mit Glukosezusatz bis zum Ende der Messung nach 52 h auf Werte um pH 4,6. Zu diesem Zeitpunkt hat sich der pH-Wert der negativen Kontrolle (1), der Steviosidlösung 0,5 % (5) und der Rebaudiosidlösung 0,04 % (6) bei Werten über pH 6 stabilisiert. Die Analyse der pH-Wert-Änderung nach 24 h ergibt signifikant erhöhte Werte in den Gruppen (2), (3) und (4). Die Kulturen mit Steviosid 0,5 % (5) und Rebaudiosid A 0,04 % (6) verhalten sich zu diesem Zeitpunkt nicht signifikant anders als der Referenzwert der negativen Kontrolle (1).



**Abb. 18:** Änderungen des pH-Wertes von *S. mutans* in den Gruppen 1 - 6 nach 4, 8 und 24 h Inkubation. Signifikante Unterschiede bei einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  sind mit „\*“ markiert, bei  $p < 0,01$  sind sie mit „\*\*“ und bei einem Signifikanzniveau von  $p < 0,001$  mit „\*\*\*“ markiert. Die Analyse der pH-Wert-Änderung nach einem Tag zeigt signifikant erhöhte Werte in den Gruppen (2), (3) und (4).

### 3.2.3 Streptokokkus salivarius

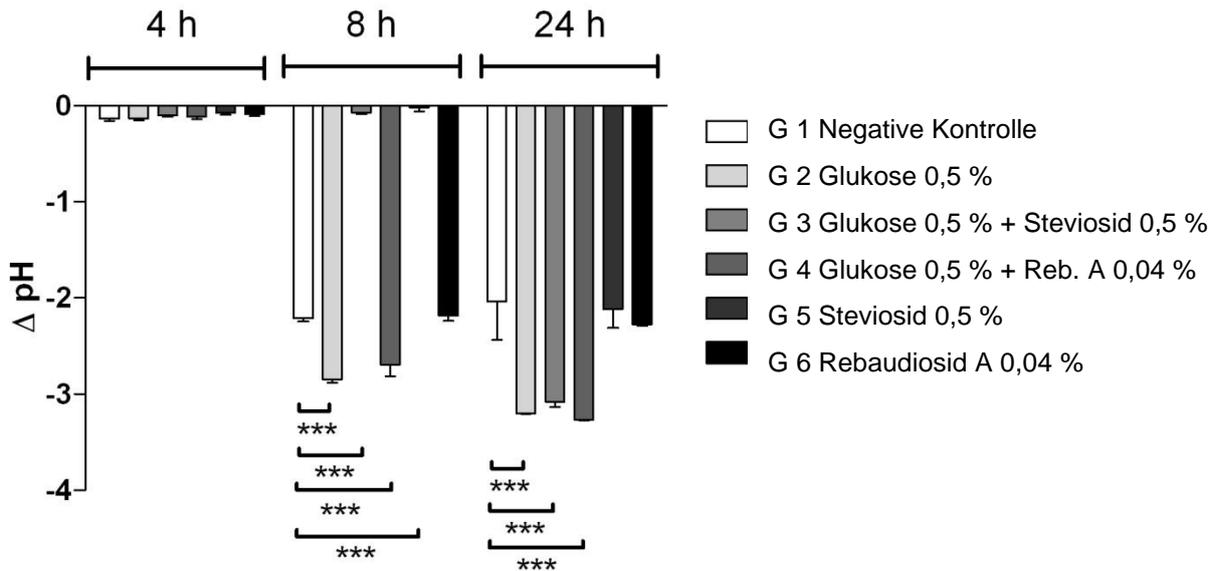
Abb. 19 zeigt den Verlauf des pH-Wertes der Flüssigkultur von *S. salivarius* mit den verschiedenen Zusätzen der Gruppen eins bis sechs. In Gruppe (3) und (5) sinkt der pH-Wert langsamer als in den anderen Gruppen, dies zeigt sich auch in der statistischen Untersuchung der pH-Wert-Änderung, die in Abb. 20 aufgezeigt ist.



**Abb. 19:** Bestimmung des pH-Wertes für *S. salivarius* (n = 5), G(ruppe) 1 – G(ruppe) 6, veranschaulicht wird hier das langsamere Absinken des pH-Wertes in den Gruppe (3) und (5) verglichen mit den anderen Medien. Gruppe (3) erreicht nach circa 24 h ähnlich niedrige pH-Werte wie die anderen glukosehaltigen Lösungen.

Nach 8 h zeigt sich in den Gruppen (2), (3), (4) und (5)  $\Delta pH$  signifikant verändert, wobei die Werte in den Gruppen mit Steviosid (3) und (5) signifikant niedriger sind, als in den

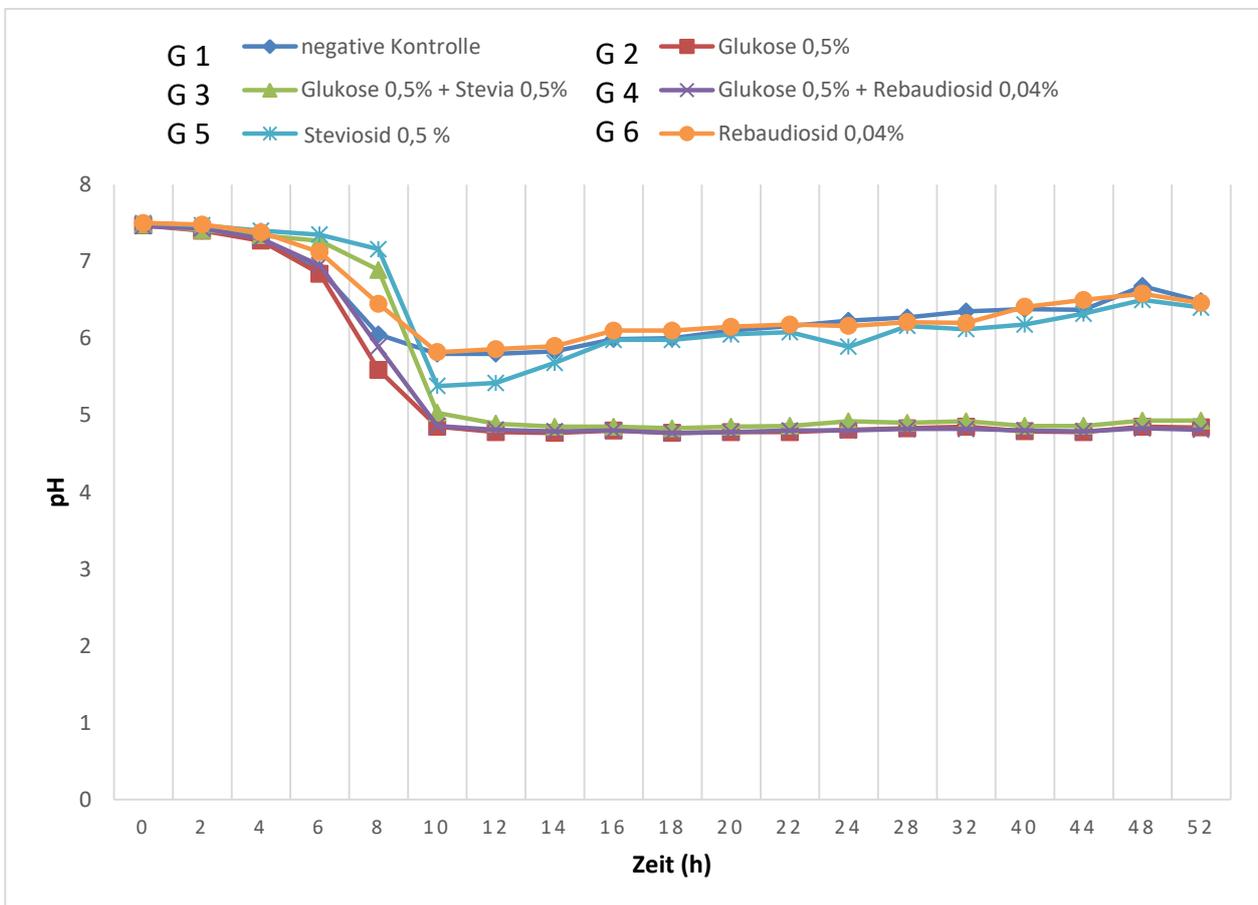
Gruppen (2) und (4). Nach 24 h sind die Werte für  $\Delta pH$  in den Gruppen (2), (3), und (4) signifikant höher als die Referenz. Zwischen 8 und 10 h sinkt der pH-Wert in Kombination mit Glukose bis zum Ende der Messung nach 52 h auf pH 4,25; zu diesem Zeitpunkt hat sich der pH-Wert der negativen Kontrolle (1), der Steviosidlösung 0,5 % (5) und der Rebaudiosidlösung 0,04 % (6) bei Werten über pH 6 stabilisiert.



**Abb. 20:** Änderungen des pH-Wertes von *S. salivarius* in den Gruppen 1 - 6 nach 4, 8 und 24 h Inkubation. Signifikante Unterschiede bei einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  sind mit „\*“ markiert, bei  $p < 0,01$  sind sie mit „\*\*“ und bei einem Signifikanzniveau von  $p < 0,001$  mit „\*\*\*“ markiert. Die Auswertung nach 8 h dokumentiert, dass sich  $\Delta pH$  in (2), (3), (4) und (5) signifikant verändert, wobei die Werte in den Gruppen mit Steviosid (3) und (5) signifikant niedriger sind, als in den Gruppen (2) und (4).

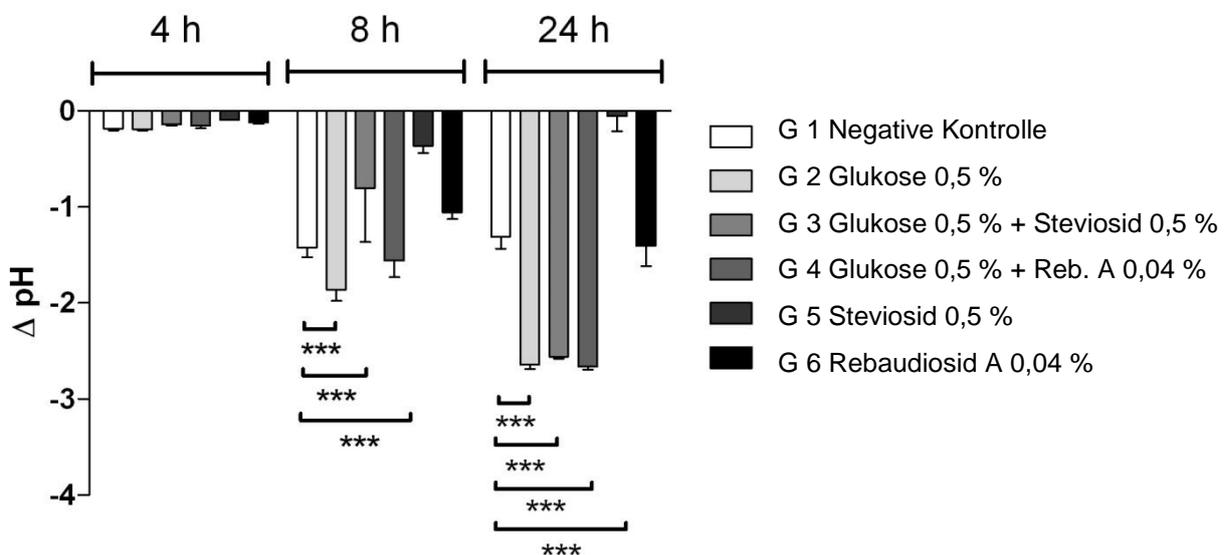
### 3.2.4 Streptokokkus sanguinis

Der Verlauf des pH-Wertes von *S. sanguinis* ist in Abb. 21 dargestellt. Wie in den Flüssigkulturen von *S. mutans*, *S. sobrinus* und *S. salivarius* ebenfalls beschrieben, sinkt der pH-Wert in den Gruppen (3) und (5) im Zeitraum zwischen 8 - 10 h langsamer als die negative Kontrolle (1). Nach 10 h gleicht der Verlauf dem aller anderen glukosehaltigen Lösungen und stabilisiert sich bei Werten unter pH 5. Die Gruppen (1), (5) und (6) zeigen den geringsten pH-Wert-Abfall und stabilisieren sich bei Werten um pH 6.



**Abb. 21:** Bestimmung des pH-Wertes für *S. sanguinis* (n = 5), G(ruppe) 1 – G(ruppe) 6, die Kulturen mit Zusatz von Glukose 0,5 % erreichen nach ca. 10 h einen konstant niedrigen, den Wert pH 5 knapp unterschreitenden, Medianwert.

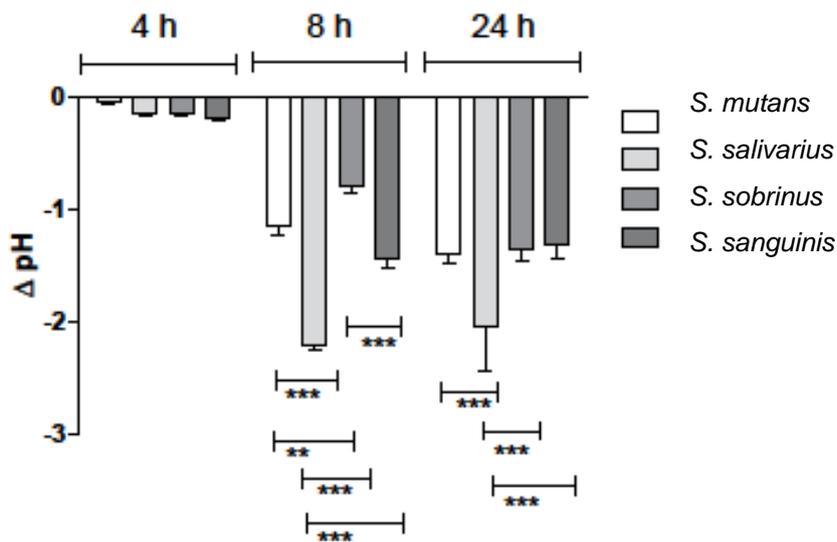
Die in Abb. 22 gezeigte Auswertung der pH-Wert-Änderung in den Flüssigkulturen mit *S. sanguinis* zeigt nach 8 h eine signifikante Veränderung von  $\Delta pH$  in den Gruppen (2), (3) und (5). Ähnlich wie in Kulturen der anderen getesteten Spezies zeigen die Gruppen mit Steviosidzusatz (3) und (5) signifikant erniedrigte pH-Wert-Veränderungen zu diesem Zeitpunkt. Nach 24 h zeigen sich signifikante Veränderungen in den Gruppen (2), (3), (4) und (5). Außer in Gruppe (5) sind die Veränderungen des pH-Wertes signifikant erhöht. Auch Gruppe (3) zeigt zu diesem Zeitpunkt eine deutlich erhöhte pH-Wert-Änderung. Für Gruppe (6) werden in keiner Kultur signifikante Veränderungen des pH-Wertes zur Referenz der negativen Kontrolle statistisch ermittelt.



**Abb. 22:** Änderungen des pH-Wertes von *S. sanguinis* in den Gruppen 1 - 6 nach 4, 8 und 24 h Inkubation. Signifikante Unterschiede bei einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  sind mit „\*“ markiert, bei  $p < 0,01$  sind sie mit „\*\*“ und bei einem Signifikanzniveau von  $p < 0,001$  mit „\*\*\*“ markiert. Nach 24 h zeigen sich hoch signifikante Veränderungen in den Gruppen (2), (3), (4) und (5).

### 3.2.5 Vergleich der pH-Wert-Änderung der einzelnen Mikroorganismen untereinander

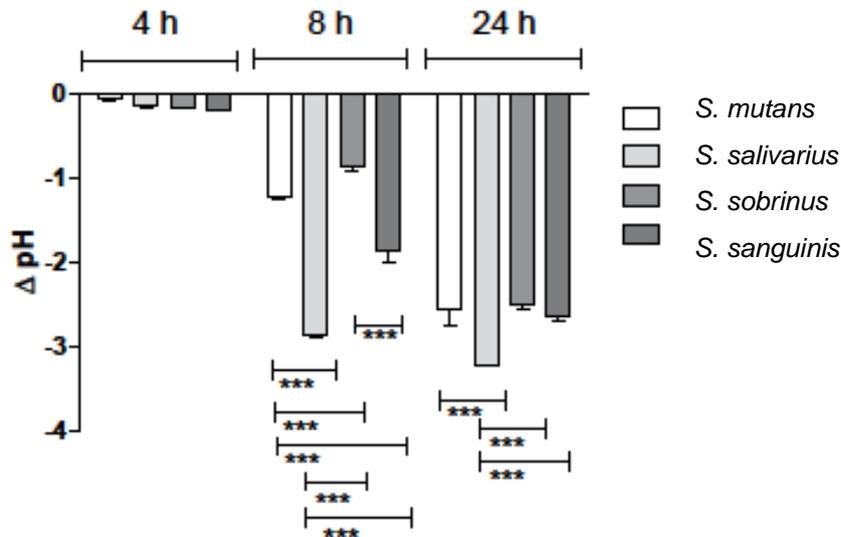
Wie in Abb. 23 gezeigt, sind nach 4 h keine signifikanten Unterschiede in  $\Delta pH$  zwischen den Spezies in BHI-Medium ohne Zusätze erkennbar. Nach 8 h ist  $\Delta pH$  zwischen den Spezies signifikant verschieden. Nach 24 h hebt sich *S. salivarius* im Vergleich mit den weiteren untersuchten Mikroorganismen signifikant ab, die anderen Spezies verhalten sich statistisch ähnlich.



**Abb. 23:** Änderungen der pH-Werte der Mikroorganismen nach 4, 8 und 24 h Inkubation im Vergleich untereinander im Medium der negativen Kontrolle. Signifikante Unterschiede bei einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  sind mit „\*“ markiert, bei  $p < 0,01$  sind sie mit „\*\*“ und bei einem Signifikanzniveau von  $p < 0,001$  mit „\*\*\*“ markiert. Nach 8 h ist  $\Delta pH$  zwischen allen untersuchten Spezies signifikant verschieden, zu diesem Zeitpunkt werden in allen Medien (Gruppen 1 - 6) ähnliche Beobachtungen gemacht.

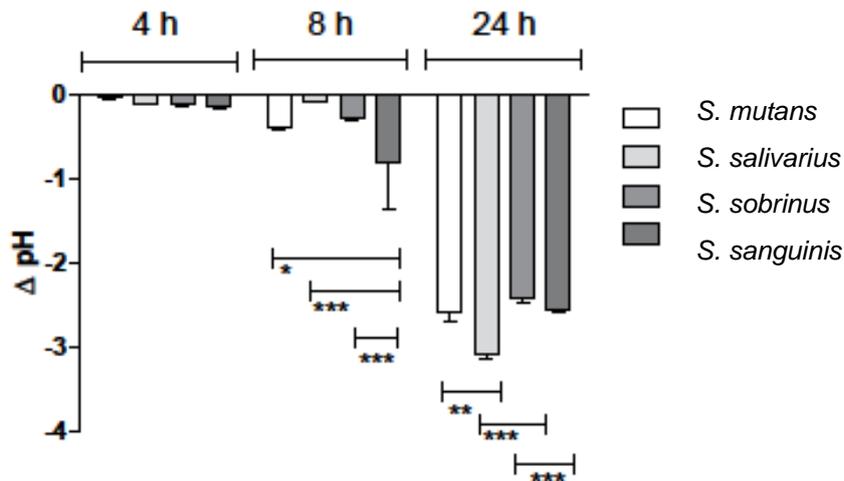
Nach 4 h im Medium mit Glukosezusatz sind keine signifikanten Unterschiede ersichtlich, nach 8 h zeigt sich in der Statistik ein heterogenes Bild die Spezies unterscheiden sich untereinander signifikant; *S. salivarius* zeigt die größte Veränderung von  $\Delta pH$ , während *S. sobrinus* den geringsten  $\Delta pH$  zeigt. Nach 24 h verhalten sich *S. mutans*, *S. sobrinus* und *S. sanguinis* ohne statistisch relevante Abweichungen zueinander.

Die pH-Wert-Änderung im Medium mit 0,5 % Glukose ist nach 24 h für *S. salivarius* signifikant erhöht im Vergleich zu den anderen eingesetzten Mikroorganismen, wie Abb. 24 zeigt.



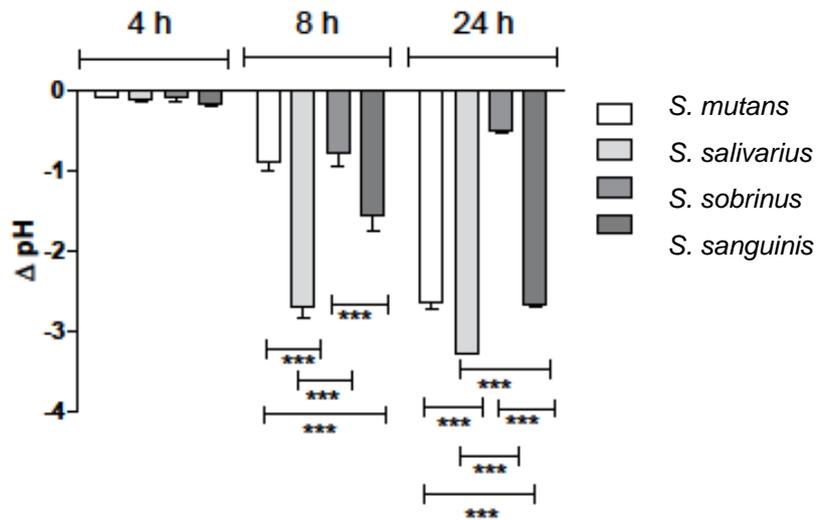
**Abb. 24:** Änderungen der pH-Werte der Mikroorganismen nach 4, 8 und 24 h Inkubation im Vergleich untereinander im Medium mit Zusatz von 0,5 % Glukose. Signifikante Unterschiede bei einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  sind mit „\*“ markiert, bei  $p < 0,01$  sind sie mit „\*\*“ und bei einem Signifikanzniveau von  $p < 0,001$  mit „\*\*\*“ markiert. Veranschaulicht wird hier, dass *S. salivarius* die größte Veränderung von  $\Delta pH$  und *S. sobrinus* den geringsten  $\Delta pH$  in der Messung nach 8 h aufweist.

Auch im Medium mit Zusatz von Glukose 0,5 % und Steviosid 0,5 % zeigen sich nach 4 h keine signifikanten Unterschiede, nach 8 h ergibt sich statistisch ein uneinheitliches Bild; wie in Abb. 25 gezeigt. Die statistische Untersuchung nach 24 h zeigt signifikante Abweichungen von  $\Delta pH$  des *S. salivarius* im Vergleich mit den anderen untersuchten Spezies.



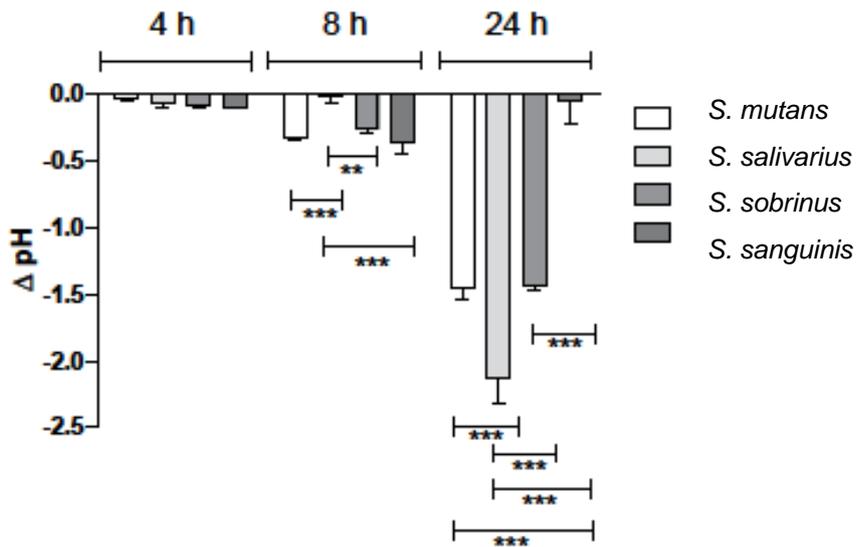
**Abb. 25:** Änderungen der pH-Werte der Mikroorganismen nach 4, 8 und 24 h Inkubation im Vergleich untereinander im Medium mit Zusatz von Glukose 0,5 % und Steviosid 0,5 %. Signifikante Unterschiede bei einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  sind mit „\*“ markiert, bei  $p < 0,01$  sind sie mit „\*\*“ und bei einem Signifikanzniveau von  $p < 0,001$  mit „\*\*\*“ markiert. Auch hier wird eine signifikante Abweichung von  $\Delta pH$  des *S. salivarius* im Vergleich mit den anderen untersuchten Spezies nach 24 h ermittelt.

Auch in der Untersuchung des Mediums mit Zusatz von Glukose 0,5 % und Rebaudiosid A 0,04 % sind nach 4 h keine signifikanten Unterschiede aufgetreten. Nach 8 h jedoch zeigt sich eine nicht einheitliche Verteilung zwischen den Spezies; *S. salivarius* und *S. sanguinis* zeigen größere Werte für  $\Delta pH$ , die sich signifikant von den weiteren Spezies unterscheiden. Ihr pH-Wert sinkt im Vergleich mit den anderen Stämmen stärker ab. Nach 24 h zeigt sich, wie Abb. 26 aufzeigt, statistisch ein geringer  $\Delta pH$  für *S. sobrinus* im Vergleich zu allen anderen Mikroorganismen und für *S. salivarius* ein erhöhter  $\Delta pH$ .



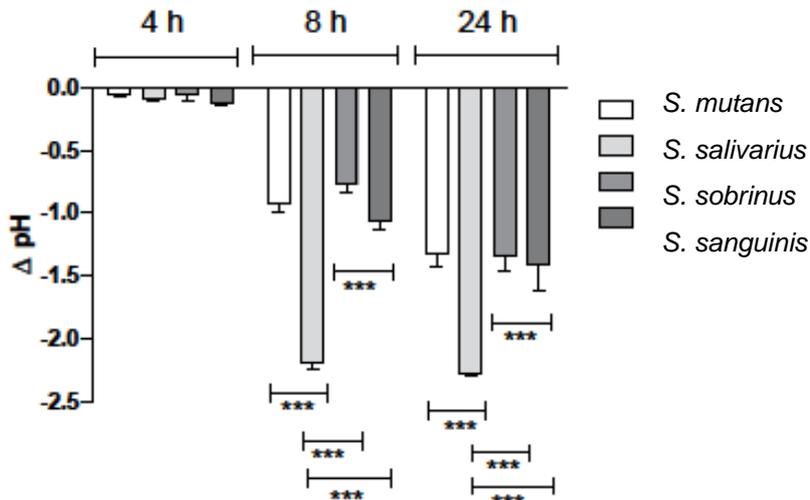
**Abb. 26:** Änderungen der pH-Werte der Mikroorganismen nach 4, 8 und 24 h Inkubation im Vergleich untereinander im Medium mit Zusatz von Glukose 0,5 % und Rebaudiosid 0,04 %. Signifikante Unterschiede bei einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  sind mit „\*“ markiert, bei  $p < 0,01$  sind sie mit „\*\*“ und bei einem Signifikanzniveau von  $p < 0,001$  mit „\*\*\*“ markiert. Statistisch wird nach 24 h ein geringerer  $\Delta pH$  für *S. sobrinus* im Vergleich zu allen anderen Mikroorganismen festgestellt, während  $\Delta pH$  für *S. salivarius* erhöht ist.

Auch im Medium mit Steviosidzusatz 0,5 % sind nach 4 h keine statistischen Unterschiede erkennbar. Nach 8 h zeigt sich  $\Delta pH$  von *S. salivarius* signifikant niedriger, als die pH-Wert-Änderung der anderen Spezies. Nach 24 h zeigt *S. salivarius* ein signifikant höheren und *S. sanguinis* einen niedrigeren  $\Delta pH$  als alle anderen Spezies der Untersuchungen (Abb. 27).



**Abb. 27:** Änderungen der pH-Werte der Mikroorganismen nach 4, 8 und 24 h Inkubation im Vergleich untereinander im Medium mit Zusatz von Steviosid 0,5 %. Signifikante Unterschiede bei einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  sind mit „\*“ markiert, bei  $p < 0,01$  sind sie mit „\*\*“ und bei einem Signifikanzniveau von  $p < 0,001$  mit „\*\*\*“ markiert. In dieser Analyse zeigt sich nach 24 h  $\Delta pH$  für *S. salivarius* signifikant erhöht, *S. sanguinis* weist nach einem Tag einen im Vergleich niedrigeren  $\Delta pH$  auf.

Im Medium mit Zusatz von Rebaudiosid A können, ähnlich wie in allen anderen Medien nach 4 h, keine signifikanten Veränderungen von  $\Delta pH$  zu diesem Zeitpunkt beobachtet werden. Nach 8 h unterscheiden sich die pH-Wert-Änderungen von *S. salivarius* und *S. sanguinis* signifikant von *S. mutans* und *S. sobrinus* (vergl. Abb. 28); nach 24 h ist ebenfalls für *S. salivarius* und *S. sanguinis*  $\Delta pH$  signifikant erhöht.



**Abb. 28:** Änderungen der pH-Werte der Mikroorganismen nach 4, 8 und 24 h Inkubation im Vergleich untereinander im Medium mit Zusatz von Rebaudiosid A 0,04 %. Signifikante Unterschiede bei einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  sind mit „\*“ markiert, bei  $p < 0,01$  sind sie mit „\*\*“ und bei einem Signifikanzniveau von  $p < 0,001$  mit „\*\*\*“ markiert. Für *S. salivarius* und *S. sanguinis* ist  $\Delta pH$  jeweils nach 24 h signifikant erhöht.

### 3.2.6 Zusammenfassende Darstellung des speziesbezogenen Vergleichs der pH-Wert-Veränderung in den verschiedenen Testmedien

#### Negative Kontrolle (1):

Nach 4 h sind keine signifikanten Unterschiede in  $\Delta pH$  zwischen den Spezies ersichtlich, nach 8 h ist  $\Delta pH$  in (1) zwischen den Spezies signifikant verschieden. *S. salivarius* hebt sich nach 24 h im Vergleich signifikant ab, die anderen Spezies verhalten sich statistisch ähnlich.

#### Glukose 0,5 % (2):

Im Medium mit Glukose treten nach 4 h keine signifikanten Unterschiede auf, nach 8 h zeigt sich ein heterogenes Bild, die Spezies unterscheiden sich untereinander signifikant;

*S. salivarius* zeigt die größte pH-Wert-Änderung, der pH-Wert sinkt stärker als bei den anderen Spezies. *S. sobrinus* weist den geringsten  $\Delta pH$  auf.

Nach 24 h zeigen sich keine statistisch relevanten Abweichungen zwischen *S. mutans*, *S. sobrinus* und *S. sanguinis*. *S. salivarius* zeigt eine signifikante Abweichung von den anderen Spezies in  $\Delta pH$ .

#### Glukose 0,5 % und Steviosid 0,5 % (3):

In diesem Medium zeigen sich ebenfalls nach 4 h keine signifikanten Unterschiede in der Änderung des pH-Wertes. Nach 8 h ist eine nicht einheitliche Verteilung zwischen den Spezies ersichtlich; *S. salivarius* und *S. sanguinis* zeigen größere Werte für  $\Delta pH$ , sie unterscheiden sich signifikant von den weiteren Spezies. Ein geringer  $\Delta pH$  für *S. sobrinus* im Vergleich zu allen anderen Mikroorganismen und ein erhöhter  $\Delta pH$  für *S. salivarius* wird nach 24 h Inkubation ermittelt. Auch hier sinkt der pH-Wert für *S. salivarius* stärker als für die übrigen eingesetzten Bakterienstämme.

#### Glukose 0,5 % und Rebaudiosid A 0,04 % (4):

Auch im Medium mit Glukose 0,5 % und Rebaudiosid A 0,04 % sind nach 4 h keine signifikanten Unterschiede zwischen den Mikroorganismen ersichtlich. Nach 8 h zeigt sich eine inhomogene Verteilung zwischen den Spezies; *S. salivarius* und *S. sanguinis* zeigen größere Werte für  $\Delta pH$ , sie unterscheiden sich signifikant von den weiteren Spezies. *S. sobrinus* weist im Vergleich zu allen anderen Mikroorganismen nach 24 h einen geringeren  $\Delta pH$  auf, während für *S. salivarius* ein erhöhter  $\Delta pH$  nach 24 h ermittelt wird.

#### Steviosid 0,5 % (5):

Nach 4 h sind auch in diesem Medium mit Steviosidzusatz keine statistischen Unterschiede ersichtlich. Weiterhin ist  $\Delta pH$  von *S. salivarius* nach 8 h signifikant niedriger, als die der anderen Spezies zu diesem Zeitpunkt. Schließlich zeigt *S. salivarius* nach 24 h ein signifikant höheres und *S. sanguinis* einen signifikant niedrigeren  $\Delta pH$  als alle anderen Spezies.

Rebaudiosid A 0,04 % (6):

Es zeigen sich keine signifikanten Veränderungen von  $\Delta pH$  zum Zeitpunkt 4 h nach Beginn der Inkubation. Hiernach unterschieden sich die pH-Wert-Änderungen von *S. salivarius* und *S. sanguinis* nach 8 h signifikant von *S. mutans* und *S. sobrinus*. Bei der Untersuchung von  $\Delta pH$  nach einem Tag sind die Werte für *S. salivarius* und *S. sanguinis* signifikant erhöht.

## 4. Diskussion

### 4.1 Bakteriellles Wachstum unter Zusatz von Steviosid- bzw. Rebaudiosid A-Produkten

Kalorienarme Zuckerersatzstoffe finden für den täglichen Gebrauch immer mehr Beachtung. Daher ist es aus zahnärztlicher Sicht wichtig herauszufinden, welche Auswirkungen diese Stoffe auf das orale Mikrobiom, insbesondere die kariesverursachenden Spezies haben. Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, ob grundsätzlich Wachstum der Mikroorganismen in Steviosid- bzw. Rebaudiosidlösungen stattfinden kann. Dazu wurden vier Arten oraler Streptokokken bei, für die Spezies optimalen, Bedingungen untersucht. Sie sind an das für sie besonders günstige Habitat der menschlichen Mundhöhle angepasst. Die Körpertemperatur beim gesunden Erwachsenen liegt zwischen 36,5 und 37,2°C. Für den vorliegenden Versuchsaufbau wurden die Mikroorganismen bei 37°C kultiviert, dies ermöglicht eine optimale Enzymaktivität. Die Anzucht erfolgte in Monokulturen und nur das planktonische Wachstum wurde in den Flüssigkulturen untersucht. Die Fähigkeit zur Aggregation und die Bildung komplexer Biofilme ist aber grundsätzlich auch bedeutend für das kariesverursachende Potential der vorliegenden Spezies [Borges, 2013].

Da die Anzucht der getesteten, anspruchsvollen Keime ohne Zusatz einer Kohlenhydratquelle nicht möglich ist, enthalten alle Gruppen, auch die Gruppen der negativen Kontrollen, einen geringen Glukosezusatz über das verwendete Medium Hirn-Herz-Bouillon (vergl. Tab. 5). Aufgrund dieser basalen Glukosekonzentration wird in allen Gruppen eine Ansäuerung beobachtet, dies gilt es bei der Auswertung der Ergebnisse zu berücksichtigen. Die beschriebenen Experimente wurden unter aeroben Bedingungen durchgeführt. Obwohl die oralen Streptokokken fakultative Anaerobier sind und in der Plaque oftmals wenig Sauerstoff zur Verfügung steht, konnte in der Literatur kein Unterschied im Glukoseabbau beobachtet werden [Bramstedt und Trautner, 1971]. Daher ist die aerobe Anzucht als Fehlerquelle vernachlässigbar.

Die Untersuchung der Mikroorganismen in diskontinuierlichen Batch-Kulturen zeigt einen idealen Entwicklungsverlauf mit deutlich abgrenzbaren Phasen der bakteriellen Wachstumsprozesse, die in der dentalen Plaque ständig nebeneinander ablaufen. Die

Anzucht der kariogenen Mikroorganismen gelang in allen Kulturen. Die Ergebnisse ließen sich durch die kontinuierliche Untersuchung über einen Gesamtzeitraum von 52 h deutlich herausarbeiten und die verschiedenen Stadien des bakteriellen Wachstums anschaulich machen.

#### **4.2 Beeinflussung der Wachstumsparameter durch Zusatz von Steviosid- und Rebaudiosid A-Produkte**

Es zeigte sich weiterhin, dass die Parameter des Bakterienwachstums durch Zugabe von Steviosidpräparaten für alle untersuchte Spezies beeinflusst wurden. Die Latenzphase war in den Gruppen mit Steviosidzusatz teilweise länger als im Vergleich zu glukosehaltigen Medien und der negativen Kontrolle, für *S. sobrinus* und *S. salivarius* circa doppelt so lang wie in den anderen Medien. Die Wachstumsraten werden durch Steviosidzusatz bei *S. sobrinus* und *S. mutans* teilweise verringert (vergl. Tab. 7 und 8). Es konnte aber beobachtet werden, dass dieses initial verlangsamte Wachstum „aufgeholt“ werden kann. Die Streptokokken scheinen nach einer gewissen Anpassungsphase Glukose ähnlich schnell verstoffwechseln zu können wie die Vergleichskulturen ohne Steviosidzusatz. Sind Steviolglykoside in der Lage, die Enzyminduktion in der Lag-Phase zu beeinflussen? Es gibt keine Nachweise in der Literatur, dass Streptokokken Stevioside aufspalten oder ins Zellinnere aufnehmen können. Dies wurde von einigen Autoren vermutet (vergl. 1.3.2). Oder werden womöglich die Zuckertransportmechanismen der Bakterienzellen beeinträchtigt? Auch die Kulturen der negativen Kontrollen erreichen die stationäre Phase. Diese ist in den Ansätzen mit Steviosid- und Rebaudiosid A-Zusatz weniger stabil und der maximale Wert der optischen Dichte ( $OD_{Max}$ ) ist geringer ausgeprägt. Im Moment des stärksten bakteriellen Wachstums, während der exponentiellen Wachstumsphase, sind die Mikroorganismen nicht in der Lage ausschließlich mit Steviosid- oder Rebaudiosid A-Zusatz ihr volles Wachstumspotential zu entfalten. In dieser Messung wird lediglich erfasst, dass in diesem Fall die maximal gemessene optische Dichte niedriger ist, als im Vergleich mit den Medien, denen Glukose zugesetzt wurde. Nicht erfasst werden Werte oberhalb von  $OD_{max} = 2$ , das bedeutet, das Wachstum könnte in einigen Kulturen bedeutend stärker ausgefallen sein.

Es zeigen sich unterschiedliche Effekte von Steviosid auf die einzelnen Mikroorganismen, während alle Spezies unter Zusatz von Steviosid eine verlängerte Lag-Phase aufweisen sind die Verdopplungsraten für *S. sobrinus*, *S. mutans* und *S. sanguinis* im mit Steviosid angereicherten Medium verlängert; ihre Wachstumsraten weitestgehend ähnlich der negativen Kontrolle. *S. salivarius* zeigt mit Zusatz von Steviosid eine höhere Wachstumsrate und eine verkürzte Generationszeit.

Zu bedenken ist hierbei, dass kommerziell erzeugte Steviaprodukte nicht hochrein sind. Zu einem späteren Zeitpunkt fand für einen weiteren Versuchsaufbau eine HPLC-Analyse eines der in der vorliegenden Untersuchung verwendeten Steviolglykosidproduktes statt. „VitaNatura“ (Vita Natura, Bonn) enthält 62 % Rebaudiosid A, 25 % Steviosid, 6 % Rebaudiosid C, 6 % Rebaudiosid B, D und F und zu einem Prozent andere Steviolglykoside [Frentzen *et al.* 2015a]. Zum Zeitpunkt der Untersuchung war es das freiverkäufliche Produkt mit der höchsten erhältlichen Reinheit für Steviosid in Deutschland. Die Untersuchung ist insofern relevant, als dass es in dieser Form dem Endverbraucher zur Verfügung steht und konsumiert wird.

### **4.3 Einfluss von Steviosid- und Rebaudiosid A-Produkten auf den pH-Wert der Kulturen**

Der pH-Wert lag in allen Medien zum Start der Messungen im Bereich pH 7,4; dies liegt etwas oberhalb des mittleren pH-Wertes im Gesamtspeichel, der zwischen pH 6,75 - 7,25 angegeben wird, im pH-Bereich von stimuliertem Speichel [Marsh, 2003]. Für die Gruppen mit Steviosidzusatz konnte in allen untersuchten Stämmen ein im Vergleich zur Referenz der negativen Kontrolle signifikant langsamerer Abfall des pH-Wertes im Zeitraum von 8 – 12 h festgestellt werden. Bei allen Mikroorganismen zeigt sich nach ca. 16 Stunden der pH-Wert der Gruppen mit Steviosid 0,5 % (5) und Rebaudiosid A 0,04 % (6) stabil bei Werten um pH 6, ähnlich der negativen Kontrolle und oberhalb des für den Zahnschmelz kritischen Wertes von pH 5,7. Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, dass das Wachstum und die Säureproduktion der getesteten Spezies durch Steviolglykoside nicht vollständig verhindert, aber verzögert werden kann. Steviosid und

Rebaudiosid A sind nicht kariogener als die negative Kontrolle, wobei die erwähnte basale Glukosekonzentration des BHI-Mediums hier für das notwendige Wachstum und die damit verbundene Ansäuerung wahrscheinlich hauptverantwortlich ist. Steviosid mit einer Konzentration von 0,5 % verlangsamt auch in Kombination mit Glukose das Absinken des pH-Wertes in einem bestimmten Zeitraum signifikant. Dies ist ein Hinweis auf einen über die nicht-kariogene Eigenschaft hinausgehenden, möglichen kariostatischen Effekt. Steviosid könnte hier hemmend auf den bakteriellen Stoffwechsel wirken. Dies konnte für Rebaudiosid A in der verwendeten 0,04 prozentigen Konzentration nicht gezeigt werden. Die Resultate sind größtenteils vergleichbar mit denen der negativen Kontrolle. Die geringere Konzentration geht auf die niedrige Löslichkeit von Rebaudiosid A in 37°C warmem, destiliertem Wasser zurück. Hier wäre eine weitere Untersuchung von höher konzentriertem Wirkstoff interessant, um die Effekte mit denen von äquimolaren Steviosidlösungen vergleichen zu können.

Beim Vergleich der Mikroorganismen untereinander ergeben sich nach 4 h Inkubationszeit keine signifikanten Unterschiede in  $\Delta pH$  zwischen den einzelnen Spezies. Nach 8 h liegt ein statistisch inhomogenes Bild vor, es gibt große Unterschiede in der pH-Wert-Änderung der analysierten Bakterien. Die statistische Untersuchung nach 24 h zeigt ein für *S. salivarius* in allen Medien signifikant größeren  $\Delta pH$ , dies zeigt das, nach extrem niedrigem Wachstum in den ersten acht Stunden, gesteigerte Wachstum der Kultur und eine höhere Säureproduktion von *S. salivarius* nach Vollendung der Anpassungsphase als durch die anderen Keime.

Verständlicherweise lassen sich die im vorliegenden *in-vitro*-Versuch mit isolierten Stämmen erlangten Ergebnisse nicht direkt auf die Verhältnisse in der menschlichen Plaque übertragen. Sie geben aber Hinweise auf die Fähigkeiten und das mögliche kariogene Potential der untersuchten Bakterien bei Anwendung der Zuckeraustauschstoffe *in vivo*.

## 4.4 Ausblick

Der Abbau von Steviolglykosiden durch die Kolonflora ist bereits aufgeklärt (vergl. 1.3). Zum jetzigen Zeitpunkt gibt es noch keine Nachweise für die Aufnahme und Verstoffwechslung von Steviolglykosiden durch das orale Mikrobiom. Aktuelle Untersuchungen von Besrukow deuten an, dass Steviolglykoside vielleicht konzentrationsabhängig von oralen Streptokokken aufgenommen werden können [Besrukow, 2016]. Von dem weitverbreiteten Zuckerersatzstoff Xylitol ist aufgeklärt, dass er zwar in die (Bakterien-) Zelle aufgenommen wird, dort aber durch kompetitive Hemmung der für die Glykolyse obligatorischen Phosphofruktokinase die weitere Glykolyse verhindert [Assev und Rölla, 1986]. Wäre ein ähnlicher Weg, also die Hemmung der Glykolyse selbst oder der Zuckertransportsysteme der Mikroorganismen durch Steviolglykoside denkbar? Hierzu wäre es von großem Interesse, die genaueren intrabakteriellen Mechanismen der beobachteten Hemmung durch Steviolglykoside zu erforschen.

Im Sinne einer gewünschten Entwicklung von der kurativen hin zu einer noch stärker präventiv ausgerichteten Zahnheilkunde gewinnt die individuelle Risikoanalyse und Beratung des Patienten für die tägliche klinische Praxis durch Zahnärzte und zahnmedizinisches Fachpersonal an Bedeutung. In Übereinstimmung mit früheren Beobachtungen, die von einer durch die Anwendung von Fluoriden begünstigten Entwicklung berichten, wonach das Auftreten von Kavitäten sich in ein höheres Lebensalter verlagert [Sheiham, 2001], zeigen die neuesten epidemiologischen Untersuchungen der Gesamtbevölkerung [DMS V, 2016] einen Trend auf, hin zu einer bis ins hohe Lebensalter erhaltenen, vollständigen Dentition [Jordan und Micheelis, 2016]. Dies geht einher mit einer Zunahme der Inzidenz von Wurzelkaries. In systematischen Querschnittsanalysen konnte gezeigt werden, dass in allen Altersgruppen ein direkter Zusammenhang zwischen der Menge an aufgenommenen Zuckern und der Entstehung von Karies existiert [Monyhan und Kelly, 2014]. Freiliegende Wurzeloberflächen sind, aufgrund ihres gegenüber Schmelz und Dentin verminderten kritischen pH-Wertes von 6,7 [Laurisch, 2004], durch (bakterielle) Säureangriffe besonders gefährdete Prädilektionsstellen. Auf individueller Ebene sollte im Hinblick auf eine alternde Population über die Beziehung zwischen Ernährung und

(Wurzel-) Karies in der zahnärztliche Ernährungsberatung und –lenkung bei Patienten mit erhöhtem Risiko aufgeklärt werden. Über die Fluoridierung hinaus sollte auch auf die Möglichkeit der Substitution von freien Zuckern hingewiesen werden. Gleiches gilt für die Entwicklung der „hidden caries“. Als solchermaßen „versteckte Karies“ werden Läsionen bezeichnet, die, obwohl sie bereits das Dentin infiltriert haben, eine makroskopisch intakte Oberfläche zeigen und vorwiegend erst durch röntgenologische Kontrolle diagnostiziert werden können [Lussi und Schaffner, 2002]. Diese, im klinischen Alltag schwierig zu erfassende Art der Karies, ist ein erhebliches Problem für die Zahnheilkunde, da es kaum möglich ist sie in standardisierten Verfahren zu diagnostizieren und einen entsprechenden genormten Behandlungsplan zu etablieren [Weerheijm *et al.*, 1989]. Darüber hinaus kann die „hidden caries“ in epidemiologischen Studien nicht erfasst werden.

Steviolglykoside können in dieser Hinsicht einen wichtigen Beitrag leisten. Auch für die Reduktion der Zuckeraufnahme beim Genuss von Erfrischungsgetränken bieten sich die bereits auf dem Markt erhältlichen Produkte mit „Stevia“ durchaus an, hier sollte der Verbraucher aber auf den niedrigen pH-Wert und die dadurch möglichen Erosionen aufmerksam gemacht werden [Frentzen *et al.*, 2015b].

## 5. Zusammenfassung

Die Effekte von Steviosid- und Rebaudiosid A-Produkten auf das Wachstum und die Säureproduktion der oralen Streptokokken *S. mutans*, *S. sanguinis*, *S. sobrinus* und *S. salivarius* wurden *in vitro*, in planktonischen Kulturen, über einen Zeitraum von 52 h untersucht. Das Wachstum wurde durch Extinktionsmessung, Bestimmung der optischen Dichte, mit einem Zelldichte-Messgerät erfasst. Es wurde in den ersten 24 Stunden stündlich und danach zu den Zeitpunkten 28 h, 32 h, 40 h, 44 h, 48 h und 52 h bestimmt. Die Entwicklung des pH-Wertes wurde mit einer pH-Elektrode gemessen. Im Zeitraum 0 - 24 h wurde der pH-Wert der Kulturen alle zwei Stunden gemessen, danach zu den definierten Zeitpunkten 28 h, 32 h, 40 h, 44 h, 48 h und 52 Stunden.

Es konnte gezeigt werden, dass sich das bakterielle Wachstum initial für alle getesteten Spezies verlangsamt und die Maximalwerte der optischen Dichte unter Verwendung von Steviolglykosiden geringer ausgeprägt sind als in den Vergleichsgruppen. Auch die Wachstumsrate und die Generationszeit werden beeinflusst. Die Generationszeiten von *S. sobrinus*, *S. mutans* und *S. sanguinis* sind durch Zusatz von Steviosid verlängert, ihre Wachstumsraten liegen im Bereich der negativen Kontrolle. *S. salivarius* reagiert auf Steviosidzusatz mit einer erhöhten Wachstumsrate und verkürzten Generationszeiten, er ist der potenteste Säurebildner nach 1 Tag Wachstum. Es wurde ein langsamerer pH-Wert-Abfall bei Zusatz von Steviosid und Rebaudiosid A in den Bakterienkulturen festgestellt. Im Zeitraum bis 12 h war dieser Abfall signifikant langsamer für alle Spezies mit Zusatz von Steviosid. Bei allen Mikroorganismen zeigt sich nach ca. 16 h der pH-Wert der Gruppen mit Steviosid und Rebaudiosid A stabil bei Werten um pH 6, ähnlich der negativen Kontrolle und oberhalb des für den Zahnschmelz kritischen Wertes von pH 5,7. Es zeigt sich ein hemmender Effekt auf das planktonische Wachstum und die Säureproduktion sowie ein Hinweis auf mögliche kariostatische Wirkung von Steviosid in der hier verwendeten Konzentration, der für Rebaudiosid A nicht beobachtet werden konnte. Die Ergebnisse der Versuchsreihen geben aufschlussreiche Anhaltspunkte zur Bewertung des kariogenen Potentials der untersuchten Zuckerersatzstoffe. Sie erwiesen sich als nicht kariogener als die negative Kontrolle und möglicherweise kariostatisch. Die weiterführende Analyse und Aufklärung der genauen intrabakteriellen Prozesse, auch mögliche klinische Untersuchungen *in vivo*, wären sicherlich aus zahnheilkundlicher Sicht von großem Interesse.

## 6. Anhang

### 6.1 Abbildungsverzeichnis

- Abb. Nr. 1: Kariesauslösende Faktoren; auf das Individuum bezogene Faktoren im äußeren, Faktoren des oralen Milieus im mittleren Ring und direkt kariesbedingende Faktoren im Zentrum der Grafik [modifiziert nach Fejerskov und Manji, 1990]
- Abb. Nr. 2: Übersicht über Zuckeraustausch- und Zuckerersatzstoffe in Relation zum Süßungsgrad von Saccharose [modifiziert nach Einwag und Naujoks, 1993]
- Abb. Nr. 3: Die derzeit anerkannten Arten oraler Streptokokken; darunter die für die vorliegende Arbeit verwendeten Spezies -rot unterlegt- nach Marsh, 2003
- Abb. Nr. 4: Aufbau des Steviols; in Position R1 und R2 befinden sich Wasserstoffatome [Geuns, 2003]
- Abb. Nr. 5: Darstellung der Strukturformeln von Steviosid und Rebaudiosid A [Geuns, 2003], sie unterscheiden sich vom Grundgerüst des Steviols durch die in Position R1 und R2 angehängten Reste (vergl. Abb. 4 und Tab. 2).
- Abb. Nr. 6: Das für die Wachstumsversuche verwendete Schüttelwasserbad mit Kulturröhrchen, Fa. Memmert
- Abb. Nr. 7: Ideale Wachstumskurve einer Batch Kultur
- Abb. Nr. 8: pH-Elektrode Fa. Mettler Toledo, kalibriert auf pH 7,0 vor Anwendung in den Kulturröhrchen Text
- Abb. Nr. 9: Bestimmung der optischen Dichte für *S. sobrinus* ( n = 5),G (ruppe) 1 – G (ruppe) 5. Gut ersichtlich ist die, in den Gruppen (3) und (5) im Vergleich zu den anderen Gruppen, etwa doppelt so lange Lag-Phase von ca. 10 Stunden.
- Abb. Nr. 10: Gezeigt wird die Bestimmung der optischen Dichte für *S. mutans* ( N = 5),G (ruppe) 1 – G (ruppe) 6. Die Lag-Phase ist in allen Gruppen ähnlich ausgeprägt, sie dauert circa 5 Stunden an.

- Abb. Nr. 11: Dargestellt ist hier die Bestimmung der optischen Dichte für *S. salivarius* (n = 5), für die G (ruppe) 1 – G (ruppe) 6, analog zu den Ergebnissen mit *S. sobrinus* zeigen auch hier die Gruppen (3) und (5) ähnlich längere Latenzphasen (8 - 9 h) als die der Vergleichsmedien
- Abb. 12: Box-Whisker-Plots von *S. salivarius* für Gruppe (1), die Darstellung anhand von Box-Whisker-Plots verdeutlicht hier die, während der exponentiellen Wachstumsphase auftretende, etwas höhere Streuung der Werte für die optische Dichte
- Abb. 13: Box-Whisker-Plots von *S. salivarius* für Gruppe (6), auch hier zeigt sich in der Darstellung anhand von Box-Whisker-Plots eine etwas erhöhte Streuung der Werte für die optische Dichte während der Log-Phase des bakteriellen Wachstums. Insgesamt ergeben die gemessenen Werte ein einheitliches Bild.
- Abb. Nr. 14: Bestimmung der optischen Dichte für *S. sanguinis* (n = 5), G (ruppe) 1 – G (ruppe) 6, auch hier ist analog zu den Beobachtungen der Kulturen von *S. sobrinus* und *S. salivarius* die Lag-Phase der Gruppen (3) und (5) etwas verlängert (6 - 7 h).
- Abb. Nr. 15: Bestimmung des pH-Wertes von *S. sobrinus* (n = 5), G (ruppe) 1 – G (ruppe) 6, die Gruppen ohne Glukosezusatz etablieren nach circa 16 h einen recht konstanten pH-Wert im Bereich von >pH 6, der pH-Wert der Gruppe (3) fällt langsamer im Vergleich mit den übrigen Kulturen, denen Glukose 0,5 % zugesetzt wurde.
- Abb. Nr. 16: Änderungen des pH-Wertes von *S. sobrinus* in den Gruppen 1 - 6 nach 4, 8 und 24 h Inkubation. Signifikante Unterschiede bei einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  sind mit „\*“ markiert, bei  $p < 0,01$  sind sie mit „\*\*“ und bei einem Signifikanzniveau von  $p < 0,001$  mit „\*\*\*“ markiert. Die Auswertung von  $\Delta pH$  ergab hoch signifikante Unterschiede nach acht Stunden in den Gruppen (3) und (5).
- Abb. Nr. 17: Bestimmung des pH-Wertes für *S. mutans* (n = 5), G (ruppe) 1 – G (ruppe) 6, auch hier zeigt sich der pH-Wert in den Gruppen ohne Glukosezusatz nach circa 16 h stabil bei Werten über pH 6. Der niedrigste pH-Wert in diesen Medien fällt im Vergleich weniger stark ab.

- Abb. Nr. 18: Änderungen des pH-Wertes von *S. mutans* in den Gruppen 1 - 6 nach 4, 8 und 24 h Inkubation. Signifikante Unterschiede bei einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  sind mit „\*“ markiert, bei  $p < 0,01$  sind sie mit „\*\*“ und bei einem Signifikanzniveau von  $p < 0,001$  mit „\*\*\*“ markiert. Die Analyse der pH-Wert-Änderung nach einem Tag zeigt hoch signifikant erhöhte Werte in den Gruppen (2), (3) und (4).
- Abb. Nr. 19: Bestimmung des pH-Wertes für *S. salivarius* ( $n = 5$ ), G(ruppe) 1 – G(ruppe) 6, veranschaulicht wird hier das langsamere Absinken des pH-Wertes in den Gruppe (3) und (5) verglichen mit den anderen Medien. Gruppe (3) erreicht nach circa 24 h ähnlich niedrige pH-Werte wie die anderen glukosehaltigen Lösungen.
- Abb. Nr. 20: Änderungen des pH-Wertes von *S. salivarius* in den Gruppen 1 - 6 nach 4, 8 und 24 h Inkubation. Signifikante Unterschiede bei einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  sind mit „\*“ markiert, bei  $p < 0,01$  sind sie mit „\*\*“ und bei einem Signifikanzniveau von  $p < 0,001$  mit „\*\*\*“ markiert. Die Auswertung nach 8 h dokumentiert, dass sich  $\Delta pH$  in (2), (3), (4) und (5) hoch signifikant verändert, wobei die Werte in den Gruppen mit Steviosid (3) und (5) signifikant niedriger sind, als in den Gruppen (2) und (4).
- Abb. Nr. 21: Bestimmung des pH-Wertes für *S. sanguinis* ( $n = 5$ ), G (ruppe) 1 – G (ruppe) 6, die Kulturen mit Zusatz von Glukose 0,5 % erreichen nach ca. 10 h einen konstant niedrigen, den Wert pH 5 knapp unterschreitenden, Medianwert.
- Abb. Nr. 22: Änderungen des pH-Wertes von *S. sanguinis* in den Gruppen 1 - 6 nach 4, 8 und 24 h Inkubation. Signifikante Unterschiede bei einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  sind mit „\*“ markiert, bei  $p < 0,01$  sind sie mit „\*\*“ und bei einem Signifikanzniveau von  $p < 0,001$  mit „\*\*\*“ markiert. Nach 24 h zeigen sich hoch signifikante Veränderungen in den Gruppen (2), (3), (4) und (5).

- Abb. 23: Änderungen der pH-Werte der Mikroorganismen nach 4, 8 und 24 h Inkubation im Vergleich untereinander im Medium der negativen Kontrolle. Signifikante Unterschiede bei einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  sind mit „\*“ markiert, bei  $p < 0,01$  sind sie mit „\*\*“ und bei einem Signifikanzniveau von  $p < 0,001$  mit „\*\*\*“ markiert. Nach 8 h ist  $\Delta pH$  zwischen allen untersuchten Spezies signifikant verschieden, zu diesem Zeitpunkt wurden in allen Medien (Gruppen 1 - 6) ähnliche Beobachtungen gemacht.
- Abb. 24: Änderungen der pH-Werte der Mikroorganismen nach 4, 8 und 24 h Inkubation im Vergleich untereinander im Medium mit Zusatz von 0,5 % Glukose. Signifikante Unterschiede bei einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  sind mit „\*“ markiert, bei  $p < 0,01$  sind sie mit „\*\*“ und bei einem Signifikanzniveau von  $p < 0,001$  mit „\*\*\*“ markiert. Veranschaulicht wird hier, dass *S. salivarius* die größte Veränderung von  $\Delta pH$  und *S. sobrinus* den geringsten  $\Delta pH$  in der Messung nach 8 h aufweist.
- Abb. 25: Änderungen der pH-Werte der Mikroorganismen nach 4, 8 und 24 h Inkubation im Vergleich untereinander im Medium mit Zusatz von Glukose 0,5 % und Steviosid 0,5 %. Signifikante Unterschiede bei einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  sind mit „\*“ markiert, bei  $p < 0,01$  sind sie mit „\*\*“ und bei einem Signifikanzniveau von  $p < 0,001$  mit „\*\*\*“ markiert. Auch hier wird eine hoch signifikante Abweichung von  $\Delta pH$  des *S. salivarius* im Vergleich mit den anderen untersuchten Spezies nach 24 h ermittelt.
- Abb. 26: Änderungen der pH-Werte der Mikroorganismen nach 4, 8 und 24 h Inkubation im Vergleich untereinander im Medium mit Zusatz von Glukose 0,5 % und Rebaudiosid 0,04 %. Signifikante Unterschiede bei einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  sind mit „\*“ markiert, bei  $p < 0,01$  sind sie mit „\*\*“ und bei einem Signifikanzniveau von  $p < 0,001$  mit „\*\*\*“ markiert. Statistisch wird nach 24 h ein geringerer  $\Delta pH$  für *S. sobrinus* im Vergleich zu allen anderen Mikroorganismen festgestellt, während  $\Delta pH$  für *S. salivarius* erhöht ist.

- Abb. 27: Änderungen der pH-Werte der Mikroorganismen nach 4, 8 und 24 h Inkubation im Vergleich untereinander im Medium mit Zusatz von Steviosid 0,5 %. Signifikante Unterschiede bei einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  sind mit „\*“ markiert, bei  $p < 0,01$  sind sie mit „\*\*“ und bei einem Signifikanzniveau von  $p < 0,001$  mit „\*\*\*“ markiert. In dieser Analyse zeigt sich nach 24 h  $\Delta pH$  für *S. salivarius* signifikant erhöht; *S. sanguinis* weist nach einem Tag einen im Vergleich niedrigeren  $\Delta pH$  auf.
- Abb. 28: Änderungen der pH-Werte der Mikroorganismen nach 4, 8 und 24 h Inkubation im Vergleich untereinander im Medium mit Zusatz von Rebaudiosid A 0,04 %. Signifikante Unterschiede bei einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  sind mit „\*“ markiert, bei  $p < 0,01$  sind sie mit „\*\*“ und bei einem Signifikanzniveau von  $p < 0,001$  mit „\*\*\*“ markiert. Für *S. salivarius* und *S. sanguinis* ist  $\Delta pH$  jeweils nach 24 h signifikant erhöht.

## 6.2 Tabellenverzeichnis

- Tab. Nr. 1: Übersicht über in der Europäischen Union zugelassene Süßstoffe [dge.de, 2007]; die hier untersuchten Steviolglykoside Steviosid und Rebaudiosid A sind als Lebensmittelzusatzstoff E 960 aufgelistet.
- Tab. Nr. 2: Durch die in den Positionen R1 und R2 angehängten Reste an das Grundgerüst des Steviols entstehen die folgenden Steviolglykoside [Geuns, 2003a]
- Tab. Nr. 3: Bisherige Veröffentlichungen zum Thema „Steviolglykoside und Karies“ (1977 - 2016)
- Tab. Nr. 4: Versuchsgruppen und Wirkstoff/e in verwendeter Konzentration
- Tab. Nr. 5: Zusammensetzung der Hirn-Herz-Bouillon, Fa. heipha Dr. Müller GmbH; eine basale Glukosemenge von 2 g/l ist bereits enthalten
- Tab. Nr. 6: Die Bereitung der verschiedenen Testmedien aus dem angesetzten Basismedium

- Tab. Nr. 7: Dargestellt sind die Länge der Lag-Phasen, Wachstumsraten und Verdopplungszeiten von *S. sobrinus*. Die Wachstumsraten zeigen die kleinsten Werte in Gruppe (3) ( $\mu = 0,31 \text{ h}^{-1}$ ) und (5) ( $\mu = 0,33 \text{ h}^{-1}$ ), den Gruppen mit Steviosidzusatz.
- Tab. Nr. 8: Hier aufgezeigt wird die Länge der Lag-Phasen, Wachstumsraten und Verdopplungszeiten von *S. mutans*. Die Wachstumsraten dieses Stamms sind in allen Medien vergleichsweise ähnlich und liegen im Bereich zwischen  $\mu = 0,36 \text{ h}^{-1}$  in Gruppe (3) und  $\mu = 0,52 \text{ h}^{-1}$  in Gruppe (5).
- Tab. Nr. 9: Länge der Lag-Phasen, Wachstumsraten und Verdopplungszeiten von *S. salivarius*. Die Wachstumsraten von *S. salivarius* sind insgesamt größer als die der anderen getesteten Spezies, insbesondere die der Gruppen (3) und (5) sind mit  $\mu = 4,58 \text{ h}^{-1}$  (3) und  $\mu = 4,08 \text{ h}^{-1}$  (5) deutlich erhöht.
- Tab. Nr. 10: Länge der Lag-Phasen, Wachstumsraten und Verdopplungszeiten von *S. sanguinis*; die Wachstumsraten aller Kulturen sind relativ homogen, sie liegen zwischen  $\mu = 0,52 \text{ h}^{-1}$  in Gruppe (3) und  $\mu = 0,66 \text{ h}^{-1}$  in Gruppe (5).
- Tab. Nr. 11: Vergleich der Wachstumsparameter der untersuchten Mikroorganismen in den Gruppen 1 - 6, stark abweichende Werte sind fett markiert

## 7. Literaturverzeichnis

1. Adler CJ, Dobney K, Weyrich LS, Kaidonis J, Walker AW, Haak W, Bradshaw CJ, Townsend G, Sołtysiak A, Alt KW, Parkhill J, Cooper A. Sequencing ancient calcified dental plaque shows changes in oral microbiota with dietary shifts of the Neolithic and Industrial revolutions. *Nat Genet* 2013; 45: 450–455
2. Ahn SJ, Ahn SJ, Wen Z, Brady T, Jeannine L, Burne RA. Characteristics of biofilm formation by *Streptococcus mutans* in the presence of saliva. *Infect Immun* 2008; 76: 4259–4268
3. Ahovuo-Saloranta A, Hiiri A, Nordblad A, Worthington H, Mäkelä M. Pit and fissure sealants for preventing dental decay in the permanent teeth of children and adolescents. *Cochrane Database Syst Rev.* 2008
4. Ajagannavar SL, Shamarao S, Battur H, Tikare S, Al-Kheraif AA, Al Sayed MS. Effect of aqueous and alcoholic Stevia (*Stevia rebaudiana*) extracts against *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus acidophilus* in comparison to chlorhexidine: An in vitro study. *J Int Soc Prev Community Dent* 2014; 116-121
5. Amtsblatt der Europäischen Union 2011 Verordnung Nr.1131/2011 des Europäischen Parlaments zu Steviolglykosiden. [online]  
<http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:295:0205:0211:DE:PDF> online Quelle aufgerufen: 10.04.2013
6. Assev S, Röllä G. Further studies on the growth inhibition of *Streptococcus mutans* OMZ 176 by xylitol. *Acta Path Micro Scand Section B: Microbiology* 1986; 94: 97-102
7. Baelum V, van Palenstein Helderma W, Hugoson A, Yee R, Fejerskov O. A global perspective on changes in the burden of caries and periodontitis: implications for dentistry. *J Oral Rehabil* 2007; 34: 872-906
8. Bender GR, Sutton SV, Marquis RE. Acid tolerance, proton permeabilities, and membrane ATPases of oral streptococci. *Infect Immun* 1986; 53: 331-338
9. Berry CW, Henry CA. Effect of stevioside on the growth and acid production of *Streptococcus mutans* [Poster ORCA 1981]. *J Dent Res* 1981; 60: 430

10. Besrukow P. Einfluss von Steviolglykosiden auf Mikroorganismen dentaler Biofilme und orale Zellkulturen. Examensarbeit, Institut für Ernährungs- und Lebensmittelwissenschaften der Landwirtschaftlichen Fakultät, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, 2016
11. Bloomgarden ZT. Nonnutritive sweeteners, fructose, and other aspects of diet. *Diab Care* 2011; 34: 46-51
12. Borges A, Abreu AC, Malheiro J, Saavedra MJ, Simões M. Biofilm prevention and control by dietary phytochemicals. *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education. Formatex* 2013; 32-41
13. Bradshaw DJ, Marsh PD. Analysis of pH-driven disruption of oral microbial communities in vitro. *Caries Res* 1998; 32: 456-462
14. Brambilla E, Cagetti MG, Ionescu A, Campus G, Lingström P. An in vitro and in vivo comparison of the effect of *Stevia rebaudiana* extracts on different caries-related variables: a randomized controlled trial pilot study. *Caries Res* 2014; 48: 19–23
15. Bramstedt F, Trautner K. Zuckeraustauschstoffe und Biochemie der Zahnplaques. *Dtsch Zahnärztl Z* 1971; 26: 1135-1144
16. Brand KW. Von der Agrarwende zur Konsumwende? Effekte der Ausweitung des Bio-Markts entlang der Wertschöpfungskette. *Ernähr Umsch* 53 2006; 7: 267-271
17. Bratthall D, Hänsel-Petersson G, Sundberg H. Reasons for the caries decline: what do the experts believe? *Eur J Oral Sci.* 1996; 104: 416-422
18. Brauckhoff G, Kocher T, Holtfreter B, Bernhardt O, Splieth C, Biffar R, Saß AC. Mundgesundheit [Gesundheitsberichterstattung - Themenhefte, Juli 2009] Heft 47 - Mundgesundheit aus der Reihe "Gesundheitsberichterstattung des Bundes" Robert Koch-Institut Juli 2009. [online] <http://www.gbe-bund.de> online Quelle aufgerufen: 05.03.2013
19. Bridel, M, Lavielle R. The sweet principle of Kaa-he-e (*Stevia rebaudiana*). *J. Pharm. Chem* 1931; 14: 99-154
20. Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft, BMEL (Hrsg). 2016. [online] [www.berichte.bmelv-statistik.de/DFT-9100030-000.pdf](http://www.berichte.bmelv-statistik.de/DFT-9100030-000.pdf). Statistisches Jahrbuch über Ernährung, Landwirtschaft und Forsten (Jahrgänge 1956-2012) online Quelle aufgerufen: 06.02.2016

21. Busuioc M, Mackiewicz K, Buttaro BA, Piggot PJ. Role of intracellular polysaccharide in persistence of *Streptococcus mutans*. J Bacteriol 2009; 191: 7315-7322
22. Chavarria N, Gamboa FO, Escribano S, Vitery R. Inhibitory Activity of Stevia rebaudiana against *Lactobacillus acidophilus* and *Streptococcus mutans* [Poster ORCA Jun 2008]. Caries Res 2008; 42: 185-238
23. Clarke JK. On the Bacterial Factor in the Aetiology of Dental Caries. Br J Exp Pathol 1924; Jun 5: 141-147
24. Cypionka, H (Hrsg). Grundlagen der Mikrobiologie. 4. Auflage. Springer-Verlag, Heidelberg u. a. O., 2010; 110
25. Das S, Das AK, Murphy RA, Punwani IC, Nasution MP, Kinghorn AD. Evaluation of the cariogenic potential of the intense natural sweeteners stevioside and rebaudioside A. Caries Res 1992; 26: 363–366
26. Deutsche Gesellschaft für Ernährung (Hrsg). Position der Deutschen Gesellschaft für Ernährung. WHO-Guideline (2015): Sugars intake for adults and children. Deutsche Gesellschaft für Ernährung e. V. Bonn, 2015
27. Deutsche Gesellschaft für Ernährung (Hrsg): Süßstoffe in der Ernährung. 2007 DGEInfo (04/2007) 55-58 [online] <https://www.dge.de/wissenschaft/weiterepublikationen/fachinformationen/suessstoffe-in-der-ernaehrung/> online Quelle aufgerufen: 12.04.2015
28. Dibdin GH, Shellis RP. Physical and biochemical studies of *Streptococcus mutans* sediments suggest new factors linking the cariogenicity of plaque with its extracellular polysaccharide content. J Dent Res. 1988; Jun 67: 890-895
29. Einwag J, Naujoks R. Prophylaxe der Karies. In: Ketterl W. (Hrsg). Praxis der Zahnheilkunde- Zahnerhaltung II. München, Wien, Baltimore: Urban und Schwarzenberg, 3. Auflage 1993; 12
30. European Food Safety Authority (EFSA). Scientific Opinion on the re-evaluation of aspartame (E 951) as a food additive. EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (Hrsg). EFSA Journal 2013; 11(12): 3496-3759
31. European Food Safety Authority (EFSA). Scientific Opinion on the safety of steviol glycosides for the proposed uses as a food additive. EFSA Journal 2010; 8: 1537-1621

32. Fejerskov O, Manji F. Risk assessment in dental caries. In: Bader JD, (Hrsg) Risk assessment in dentistry. Chapel Hill: University of North Caroline Dental Ecology; 1990: 215–222
33. Frentzen M, Bröring S, Kraus D. Stevia as an Innovative Oral Health Solution. In: The World of Food Ingredients 2015b; 34-35
34. Frentzen M, Pierog S, Hoppe T, Schiermeyer B, Kraus D. The Effect of Stevia rebaudiana Extracts on Oral Biofilms. Stevia: Growth in Knowledge and Taste. 2015a Euprint, Heverlee
35. Fuchs, G (Hrsg). Allgemeine Mikrobiologie. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2014; 239
36. Gamboa F, Chaves M. Antimicrobial potential of extracts from Stevia rebaudiana leaves against bacteria of importance in dental caries. Acta Odontol Latinoam 2012; 25: 171–175
37. Gehring F. Kariesprophylaxe durch den Einsatz von Zuckerersatzstoffen. Zahnärztl Mitt 1990; Apr 16 80: 900-910
38. Geuns JMC, Augustijns P, Mols R, Buyse JG, Driessen B. Metabolism of stevioside in pigs and intestinal absorption characteristics of stevioside, rebaudioside A and steviol. Food Chem Toxicol 2003a; Nov 41: 1599-1607
39. Geuns JMC, Buyse J, Vankeirsbilck A, Temme EHM. Stevioside Metabolism by Human Volunteers. Proc Soc Exp Biol Med. 2007; 232: 164-173
40. Geuns JMC, Buyse J, Vankeirsbilck A, Temme L. About the safety of stevioside used as a sweetener. J Food Agric Environ. 2004; 290-291
41. Geuns JMC, Driessen B, Geers R, Buyse JG. Metabolism of stevioside in pigs. Exp Biol Med 2007; 164
42. Geuns JMC. Molecules of interest Stevioside. Phytochem 2003b; 913-921
43. Geuns JMC. Safety Evaluation of Stevia and stevioside. In: Ur-Rahman A. (Hrsg). Studies in Natural Product Chemistry Vol. 27. Amsterdam: Elsevier, 2002: 299-319
44. Giacaman RA, Campo P, Muñoz-Sandoval C, Castro RJ. Cariogenic potential of commercial sweeteners in an experimental biofilm caries model on enamel. Arch Oral Biol 2013; Sep 58: 1116–1122
45. Giongo FC, Bruna M, Parolo CC, Carlén A, Maltz M. Effects of lactose containing stevioside sweeteners on dental biofilm acidogenicity. Braz Oral Res 2014; Aug 28: 1-6

46. Gülzow HJ, Hellwig E, Hetzer G (Hrsg). Leitlinie „Fluoridierungsmaßnahmen“. Arbeitsgemeinschaft der wissenschaftlichen medizinischen Fachgesellschaften Köln, 2006
47. Hamada S, Slade HD. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. Microbiol Rev 1980; Jun 44: 331-384
48. Ikeda T, Okada H, Motada R. Effect of Stevioside of certain metabolisms of *Streptococcus mutans*. Nihon Univ J Oral Sci 1978; 24
49. Ikeda T. Sugar substitutes: reasons and indications for their use. Int Dent J 1982; 32: 33-43
50. JECFA Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (Hrsg). Compendium of Food Additive Specifications. In: FAO JECFA Monographs. 5 (2008) Sixty-ninth meeting, Rom, Italien, 17–26 Juni 2008
51. Jenkinson HF, Lamont RJ. Streptococcal adhesion and colonization. Crit Rev Oral Biol Med 1997; 8: 175-200
52. Jordan R und Micheelis W. Fünfte Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS V). Materialienreihe Band 35, 617 Seiten, Köln: Deutscher Ärzteverlag, 2016
53. Kennelly EJ. Sweet and non-sweet constituents of *Stevia rebaudiana* (Bertoni). In: Kinghorn AD (Hrsg). *Stevia the genus Stevia*. Medicinal and Aromatic Plants-Industrial profiles. London and NY: Taylor and Francis, vol. 19, 2002; 68-85
54. Keyes PH. Recent advances in dental caries research. Int Dent J 1962; 12: 443-464
55. Kinghorn AD, Soejarto DD. Stevioside. In: O'Brian Nabors L, Gelardi RC (Hrsg). *Alternative Sweeteners*. New York: Dekker, 2. Auflage 1991; 157-171.
56. Klimek J, Hellwig E. Kariesätiologie und –Diagnose. In: Heidemann D (Hrsg). *Kariologie und Füllungstherapie. Praxis der Zahnheilkunde*. München- Wien-Baltimore: Urban und Schwarzenberg in Elsevier, 4. Auflage 1999; 25
57. König KG. *Karies und Parodontopathien. Ätiologie und Prophylaxe*. Stuttgart: Thieme, 1987; 21-72
58. Koyama E, Kitazawa K, Ohori Y, Izawa O, Kakegawa K, Fujino A, Ui M. In vitro metabolism of the glycosidic sweeteners, stevia mixture and enzymatically modified stevia in human intestinal microflora Food Chem Toxicol. 2003; b 41: 359-374

59. Koyama E, Sakai N, Ohori Y, Kitazawa K, Izawa O, Kakegawa K, Ui M. Absorption and metabolism of glycosidic sweeteners of stevia mixture and their aglycone, steviol, in rats and humans. *Food Chem Toxicol.* 2003; a 41: 875-883
60. Laurisch Lutz. Diagnostik und Therapie der Wurzelkaries. *Quintessenz Team J* 34 2004; 267-280
61. Loesche WJ. Chemotherapy of dental plaque infections. *Oral Sci Rev* 1976; 9: 63-107
62. Lussi A.; Schaffner M. Diagnose und Therapie der Karies. *Schweiz Med Forum* 2002; 166-170
63. Ma MS, Blanksma NG. Stevia in the strijd tegen cariës. *Ned Tijdschr Tandheelk* 2015; 122: 51-55
64. Mäkinen KK, Saag M, Isotupa KP, Olak J, Nömmela R, Söderling E, Mäkinen PL. Similarity of the Effects of Erythritol and Xylitol on Some Risk Factors of Dental Caries. *Caries Res* 2005; 39: 207-215
65. Marinho VC, Higgins JP, Sheiham A, Logan S. Fluoride toothpastes for preventing dental caries in children and adolescents. *Cochrane Database Syst Rev.* 2003
66. Marinho VC. Cochrane reviews of randomized trials of fluoride therapies for preventing dental caries. *Eur Arch Paediatr Dent.* 2009; 10: 183-191
67. Marsh PD, Martin MV. *Orale Mikrobiologie*: Stuttgart, New York: Thieme, 2003; 24
68. Marsh PD. Host defenses and microbial homeostasis: role of microbial interactions. *J Dent Res* 1989; 68: 1567-1575
69. Marsh PD. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res* 1994; Jul 8: 263-271
70. Marsh PD. Role of the oral microflora in health and disease. *Microb Ecol Health Dis* 2000; 12: 130-137
71. Marsh PD. The significance of maintaining the stability of the natural microflora of the mouth. *Br Dent J.* 1991; Sep 21 171: 174-177
72. Marthaler TM. Changes in dental caries 1953-2003. *Caries Res.* 2004; 38: 173-181
73. Matsukubo T, Takazoe I. Sucrose substitutes and their role in caries prevention. *Int Dent J* 2006; Jun 56: 119-130

74. Micheelis W. Zusammenfassung der Vierten Deutschen Mundgesundheitsstudie (DMS IV). In: Micheelis W, Schiffner U (Hrsg). Vierte Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS IV). Köln: Deutscher Zahnärzte Verlag, 2006; 17-21
75. Miksits K, Hahn H. Basiswissen medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. In: Miksits K, Hahn H, Hrsg. 4., vollst. aktualisierte Aufl. Berlin [u.a.]: Springer, 2008; 119
76. Miller WD. Die Mikroorganismen der Mundhöhle, und die örtlichen und allgemeinen Erkrankungen welche durch dieselben hervorgerufen werden. Leipzig: Georg Thieme, 1892
77. Mizutani K, Tanaka O. Use of Stevia rebaudiana sweeteners in Japan. Stevia, the Genus Stevia. Med Aromat Plants Indus Prof 2002; 19: 178-195
78. Moynihan PJ, Kelly SA. Effect on caries of restricting sugars intake: systematic review to inform WHO guidelines. J Dent Res 2014; Jan 93: 8-18
79. Nyvad B, Kilian M. Microbiology of the early colonization of human enamel and root surfaces in vivo. Scand J Dent Res. 1987; Oct 95: 369-380
80. Paes Leme AF, Koo H, Bellato CM, Bedi G, Cury JA. The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation -new insight. J Dent Res. 2006; 85: 878-887
81. Petersen PE. The World Oral Health Report 2003: continuous improvement of oral health in the 21st century - the approach of the WHO Global Oral Health Programme. Community Dent Oral Epidemiol 2003; 31: 3- 24
82. Pieper K, Schulte AG. The decline in dental caries among 12-year old children in Germany between 1994 and 2000. Community Dent Health 2004; 21: 199-206
83. Pieper K. Epidemiologische Begleituntersuchungen zur Gruppenprophylaxe 2009. Gutachten der Deutsche Arbeitsgemeinschaft für Jugendzahnpflege e.V. (DAJ) Bonn, 2010

84. Pinheiro CE, de Oliveira SS, da Silva SM, Poletto MI, Pinheiro CF. Efeito dos extratos de guaraná e de Stévia Rebaudiana Bertoni (folhas), e do esteviosídeo, sobre a fermentação e a síntese de polissacarídeos extracelulares insolúveis da placa dentária. Rev Odontol Univ Sao Paulo 1987; 1: 9–13
85. Robert Koch-Institut (Hrsg). Gesundheit in Deutschland. Mund und Zahngesundheit. Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Gemeinsam getragen von RKI und Destatis. RKI, Berlin 2015
86. Rumiantsev VA, Beliaev VV, Zubtsov VA, Esaian LK, Namestnikova IV: Sugar of substitute stevioside in chewing gum: comparative double blind controllable study. Stomatol (Mosk) 2011; 90: 18-21
87. Sekihashi K, Saitoh H, Sasaki Y. Genotoxicity studies of stevia extract and steviol by the comet assay. J Toxicol Sci 2002; 27 1
88. Sheiham A, Steele JG, Marcenes W, Lowe C, Finch S, Bates CJ, Walls AWG. The relationship among dental status, nutrient intake, and nutritional status in older people. J Dent Res 2001; 80: 408-413
89. Shibata H, Sawa Y, Oka T, Sonoke S, Kim KK, Yoshioka M. Steviol and steviol-glycoside: glucosyltransferase activities in Stevia rebaudiana Bertoni-purification and partial characterization. Arch Biochem Biophys 1995; Aug 20 321: 390-396
90. Shvide-Slavin C, Swift C, Ross T. Nonnutritive sweeteners: Where are we today? Diab Spectr 25.2 2012; 104-110
91. Söderling EM. Xylitol, *mutans streptococci*, and dental plaque. Adv Dent Res. 2009; 21: 74-78
92. Steiner JE. Human facial expressions in response to taste and smell stimulation. Adv Child Dev Behav 1979; 13: 257-295
93. Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW. Biofilms as complex differentiated communities. Annu Rev Microbiol 2002; Vol. 56: 187-209
94. Tanzer JM, Freedman ML, Woodiel FN, Eifert RL, Rinehimer LA. Association of *Streptococcus-mutans* virulence with synthesis of intracellular polysaccharide. J Dent Res 1976; 55: 173-173
95. Tanzer JM, Livingston J, Thompson AM. The microbiology of primary dental caries in humans. J Dent Educ 2001; Okt 65: 1028-1037

96. Terai T, Ren H, Mori G, Yamaguchi Y, Hayashi T. Mutagenicity of steviol and its oxidative derivatives in *Salmonella typhimurium* TM677. *Chem Pharm Bull* 2002; 50: 1007-1010
97. Theilade E. The non-specific theory in microbial etiology of inflammatory periodontal diseases. *J Clin Periodontol*. 1986; Nov 13: 905-911
98. van der Hoeven JS, Rogers AH. Stability of the resident microflora and the bacteriocinogeny of *Streptococcus mutans* as factors affecting its establishment in specific pathogen-free rats. *Infect Immunol* 1979; Feb 23: 206-213
99. Van Loveren C. Sugar Alcohols: What is the evidence for Caries-Preventive and Caries-Therapeutic Effects? *Caries Res* 2004; 38: 286-293
100. Verordnung (EU) Nr. 1131/2011 Der Kommission vom 11. November 2011 zur Änderung von Anhang II der Verordnung (EG) Nr. 1333/2008 des Europäischen Parlaments und des Rates hinsichtlich Steviolglykosiden. *Amtsblatt der Europäischen Union*, 12. November 2011; L 295/205
101. Weerheijm KL, Van Amerongen WE, Eggink CO. The clinical diagnosis of occlusal caries: a problem. *ASDC J Dent Child* 1989; 56: 196-200.
102. Westenhoefer J, Pudiel V. Pleasure from food: importance for food choice and consequences of deliberate restriction. *Appetite* 1993; 20: 246-249
103. WHO (Hrsg). Guideline: Sugars intake for adults and children. World Health Organization, Genf: 2015 [online] [www.who.int/nutrition/publications/guidelines/sugars\\_intake/en/](http://www.who.int/nutrition/publications/guidelines/sugars_intake/en/). Online Quelle aufgerufen: 11.01.2016
104. Yabu M, Takase M, Toda K, Tanimoto K, Yasutake A. Studies on Stevioside, natural sweetener. Effect on the growth of some oral microorganisms. *Hiroshima Daig Shig Zasshi* 1977; 9: 12–17
105. Zanela NLM, Borro Bijella MFT, Da Silva Rosa OP. The Influence of mouthrinses with antimicrobial solutions on the inhibition of dental plaque and on the levels of *mutans streptococci* in children. *Pesqui Odontol Bras* 2002; 16: 101-106
106. Zero DT van Houte J, Russo J. Enamel demineralization by acid produced from endogenous substrate in oral streptococci. *Arch Oral Biol* 1986; 31: 229-234
107. Zero DT. Sugars- The Arch criminal? *Caries Res* 2004; 38: 277-285

108. Ziller S, Oesterreich D. Dental Public Health in Deutschland - Eine Bestandsaufnahme. Präz Gesundheitsf 2007; 31- 38

## 8. Danksagung

Herrn Prof. Dr. Matthias Frentzen möchte ich sehr herzlich für die überaus freundliche, professionelle und inspirierende Unterstützung bei der Planung des Themas, der Vorbereitung der mikrobiologischen Tests, Durchführung und Abfassung der vorliegenden Arbeit danken.

Bei Frau MTA Beate Schiermeyer-Dunkhase möchte ich mich für ihre kompetente und liebenswürdige Hilfe bei der Vorbereitung und Durchführung der mikrobiologischen Testreihen im Labor und die für mich in Kauf genommenen unorthodoxen Arbeitszeiten ganz herzlich bedanken.

Großer Dank gilt auch Frau Tatjana Hoppe, die mich mit ihrer mikrobiologischen Expertise und mit ihrem umfangreichen Fachwissen tatkräftig unterstützt hat.

Meiner Familie und meinem Freund möchte ich für die motivierende Unterstützung während des Studiums und der Verfassung dieser Dissertation herzlich Danke sagen. Meinem Bruder Lukas Ackermann M. Sc. möchte ich sehr herzlich für seine Hilfe bei der Überarbeitung des Layouts und der Formatierung danken.