

1 Einleitung und Problemstellung

1.1 Definition und Bedeutung bakterieller Biofilme

In der Natur gibt es zwei grundsätzlich verschiedene Formen mikrobieller Lebensweise. Wachsen Bakterien frei schwebend in Suspensionen, so wird von planktonischem Wachstum gesprochen, besiedeln Keime feste Oberflächen, so wird dies als mikrobielle Biofilmbildung bezeichnet [1]. Letztere stellt die weitaus häufigere Kolonisierungsform dar.

Ein bakterieller Biofilm kann definiert werden als eine Akkumulation einzelner Bakterienzellen und Mikrokolonien an der Grenzfläche zwischen zwei verschiedenen Phasen, eingebettet in eine meist hochhydrierte, hauptsächlich anionische Matrix aus bakteriellen Exopolysacchariden und anderen organischen Makromolekülen [2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,21,27]. Biofilme stellen ein eigenes Ökosystem dar, das sensibel auf Umweltreize reagiert [12,13,23] und sogar funktionell mit Geweben höherer Organismen [12,14,15] verglichen werden kann.

Die Bedeutung solcher bakterieller Biofilme nimmt vor allem in der Medizin immer mehr zu. Vor einigen Jahren wurde noch von einzelnen Erregern als zentrale Infektionsquelle ausgegangen, heute ist bekannt, dass die Pathogenität von „polybakteriellen Lebensgemeinschaften“ die der darin enthaltenen Einzelkeime weit übertrifft. Derartige bakterielle Ökosysteme sind unter anderem verantwortlich für die Entstehung vieler chronischer Infektionen [16,17] oder stellen bei in den Körper eingebrachten Fremdmaterialien wie Kathetern, Herzschrittmachern, Implantaten oder Endoskopen ein besonderes Infektionsrisiko dar [18,19,20]. Probleme, die durch Biofilme verursacht werden, sind aber nicht nur in der Medizin zu finden. Sie finden sich auch in Wassersystemen, z.B. in Trinkwasserleitungen, den Kühlsystemen von Atomkraftwerken, in Kläranlagen und selbst in Ölpipelines wieder [21].

Auch die Zahnbeläge des Menschen stellen mikrobiologisch einen komplex aufgebauten bakteriellen Biofilm dar [22,23,24,25,26,27,28], der entscheidend die Ätiologie der beiden häufigsten Infektionskrankheiten des Menschen überhaupt beeinflusst: Karies und Parodontitis [11,14,29,30,31,32,33,34,35,36].

Die Wissenschaft ist deshalb schon seit Jahrzehnten mit der Forschung nach effizienten Mitteln zur Biofilm-Ablösung, -Zerstörung oder Vermeidung der Entstehung beschäftigt [37]. Bislang häufigstes Verfahren zur Biofilmentfernung ist die mechanische Reinigung bakteriell besiedelter Oberflächen. Da dies in den meisten Fällen aufgrund der schweren Zugänglichkeit vieler Biofilme nur schwer bzw. gar nicht gelingt, besteht seit langem ein großes Interesse daran, die mechanische Reinigung durch Kombination mit Ultraschall, magnetischen und/oder elektrischen Feldern zu verbessern [1,6,38,39,40,41,42,43,44,45].

1.2 Struktur und Aufbau von Biofilmen

Mikromorphologisch ist ein Biofilm keine homogene Masse, sondern besteht aus Zellnestern mit charakteristischer Maiskolben-, Rosetten oder Stoppelbürstenstruktur [26]. Keime in Biofilmen sind in der Regel von einer extrazellulären Matrix umschlossen, deren Bestandteile entweder von den Zellen selbst oder aus der Umgebung stammen [4,10]. Der anionische Matrixanteil besteht aus Polysacchariden [13,35] und dient als Kohlenhydratreserve. Weiterhin trägt er zur Struktur, Stabilität und Verankerung des Biofilms an Oberflächen bei [10,12]. Leere Zwischenräume und Wasserkanäle in der Matrix sorgen dafür, dass potenziell wachstumsbegrenzende Faktoren, wie Nährstoffe und Sauerstoff, besser eindringen können, sowie Abfallprodukte den Biofilm auf diesem Weg verlassen können [8,13]. Zusätzlich wurde mit Hilfe von Mikroelektroden und chemischen Sonden gezeigt, dass es innerhalb eines Biofilms über relativ kurze Strecken hinweg (wenige μm) beträchtliche Gradienten für wichtige Faktoren wie pH-Wert oder Redoxpotential geben kann [48]. Dies erzeugt innerhalb des Biofilms eine

räumliche und zeitliche Heterogenität, was selbst empfindlichen Bakterien erlaubt, trotz vordergründig feindlichen oder nicht kompatiblen Umweltbedingungen dennoch zu überleben.

Makromorphologisch ähneln Biofilme oft pilz- oder tulpenförmigen Strukturen [4,13,46,47]. Ausschlaggebend für die konkrete Erscheinungsform sind sowohl endogene Faktoren der im Biofilm lebenden Einzelkeime, wie beispielsweise Zellmorphologie, Motilität und Ausmaß der extrazellulären Matrixbildung, als auch exogene Faktoren wie Nährstoffangebot und Diffusionsgradienten in und aus dem Biofilm [48].

1.3 Mechanismus der Plaquebildung

Anheftung, Wachstum, Ablösung und erneute Anheftung von Bakterien sind ein Teil eines kontinuierlichen und dynamischen Vorgangs, um einen mikrobiellen Biofilm ständig neu zu organisieren. Es lassen sich am Beispiel der dentalen Plaque sieben stochastisch voneinander unabhängig ablaufende Phasen der Biofilmbildung beschreiben [7,11,14,21,49,50]:

- Pellikelbildung durch Adsorption von Wirts- oder bakteriellen Makromolekülen aus dem Speichel an die gereinigte Zahnoberfläche: Entweder binden diese, in der Mehrheit negativ geladenen Moleküle direkt an positive Kalziumionen des Schmelzes oder mittels freier Ca^{++} Ionen aus dem Speichel an negative Phosphatgruppen der Zahnhartsubstanz. Dieses exogene Zahnoberhäutchen aus Glycoproteinen, Serumproteinen, sauren prolinreichen Proteinen, Enzymen, sowie Immunglobulinen [23], ist 0,1-1 μ m dick, und bildet sich schon nach wenigen Sekunden des Speichelkontakts. Durch weitere Interaktion zwischen Makromolekülen des Speichels und dem negativ geladenen Apatit der Zahnschmelzoberfläche, sowie durch die enzymatische Abspaltung bestimmter Kohlenhydratanteile, wird diese initial elektrostatische Bindung nachfolgend irreversibel [51].

- Anheftung von Mikroorganismen an die mit dem Pellicel überzogene Zahnoberfläche: *Streptococcus sanguinis* gilt neben anderen grampositiven Kokkenbakterien als bedeutendster Frühbesiedler und Koloniebildner [23,25,52,53,54,55]. Aktinomyceten, andere Streptokokken, Prevotellen, Captnocytophagen, Propionibakterien und Veillonellen gehören ebenso zu den sogenannten Pionierkeimen [56].
- Es treten physiochemische Wechselwirkungen zwischen der Bakterienzellwand und Pellicelmolekülen auf, so dass durch das Zusammenspiel von van-der-Waals Kräften und elektrostatischer Abstoßung ein Bereich mit schwacher Nettoanziehung entsteht, der eine reversible Anheftung von Pionierkeimen ermöglicht [50].
- Zusätzlich werden spezifische stereochemische Wechselwirkungen zwischen spezifischen Bindungsstellen, den sogenannten Adhäsinen auf der mikrobiellen Zelloberfläche und Rezeptoren des erworbenen Pellicels beobachtet. Dies führt zu einer in der Regel irreversiblen Anheftung der Bakterien [26,34,57,58].
- Die Vielfalt der Plaquemikroflora nimmt durch Koadhärenz oder Koaggregation der Mikroorganismen an bereits angeheftete Zellen zu. Unter Koadhäsion versteht man die spezifische Haftung zwischen zwei genetisch identischen Bakterienarten. Koaggregation beinhaltet die Erkennung und Anhaftung zwischen genetisch unterschiedlichen Bakterienarten [10].
- Darauf folgend tritt eine Vervielfältigung der angehefteten Organismen ein, was zu einem konfluenten Wachstum und somit zu einem mit bloßem Auge sichtbaren Biofilm führt [10,56]. Auch die Bildung von extrazellulären Polymeren sorgt für eine zusätzliche Massenzunahme des Biofilms.
- Die Ablösung von Zellen aus dem adhärerten Biofilm zurück in die planktonische Phase im Speichel ermöglicht die Besiedelung von neuen

Standorten. Üblicherweise finden sich bakterielle Konzentrationen im Speichel von bis zu 10^8 koloniebildenden Einheiten (KBE) / ml.

1.4 Die besondere Resistenz von Biofilmen

In Biofilmen organisierte Bakterien verhalten sich nicht mehr wie Einzeller, sondern weisen Merkmale und Resistenzmechanismen eines mehrzelligen Organismus auf. Sie entwickeln durch verschiedenste Mechanismen erstaunliche Fähigkeiten und erlangen auf diese Weise eine im Vergleich zum Einzelbakterium enorm erhöhte Pathogenität sowie Virulenz [26]. So nimmt beispielsweise die Resistenz gegenüber antimikrobiellen Substanzen bei Keimen, die in Biofilmen wachsen, im Vergleich zu denen mit planktonischer Lebensweise, um das 20- bis 5000fache zu [10,20,59,60].

- Makroskopisch und mikroskopisch strukturelle Besonderheiten

Nur ein makroskopisch intakter Biofilm weist diese besondere Resistenz auf [61]. Biofilme, die durch starkes Rütteln oder Ultraschallbehandlung in ihrer dreidimensionalen Struktur zerstört bzw. stark verändert wurden, zeigen die gleiche Empfindlichkeit gegenüber antimikrobiellen Substanzen wie planktonisch wachsende Keime [12,46].

Mikroskopisch wird der Biofilm in zwei Bereiche untergliedert: die Filmbasis mit dicht gepackten Zellen, die eng in Kontakt mit einer direkt auf einer Oberfläche adsorbierten Schicht stehen. Sie sind physiologisch inaktiv, da nur Nährstoffe ankommen, die die oberen Schichten passieren können [10,61]. Hier erfolgt der Stofftransport durch Diffusion.

Den zweiten Bereich stellt eine oberflächliche, viskoelastische und stoffwechselaktivere Filmschicht dar, die mit der flüssigen Phase in Verbindung steht und aufgrund ihrer inhomogeneren porösen Struktur mehr Flüssigkeit und weniger Zellen enthält. In dieser Schicht funktioniert ein Transport advektiv [36,21]. Die dort wachsenden Keime weisen eine höhere Teilungsrate auf, sind

metabolisch aktiver und in der Regel größer als gleichartige Keime in tieferen Schichten [10,62].

Durch diese strukturellen Eigenschaften des Biofilms sind auch stark antimikrobiell wirksame Substanzen normalerweise nicht in der Lage alle Organismen in ausreichender Konzentration zu erreichen oder zu vernichten.

- Die Matrix

Die extrazelluläre Matrix oder Glykokalix ist ein oft diskutierter Grund für die besondere Resistenz von Biofilmen [4,13,63]. Strukturen der bakteriellen Zellwände, die Produktion spezifischer Enzyme und von Polysacchariden, sowie strukturelle Varianzen der Matrix selbst innerhalb des Biofilms, können Antiseptika hemmen und inaktivieren [11,61]. Die Ioneninteraktion zwischen der negativ geladenen Matrix und den häufig positiv geladenen Antiseptika stellt eine Diffusionsbarriere dar [46]. Die polyanionische Glykokalix fungiert somit als molekulares Sieb [10,11,15,35,59]. Sie schützt zudem gegen Austrocknung, erhöht die Haftung der Bakterien auf Oberflächen und stabilisiert den gesamten Biofilm [51].

- Veränderung der Genexpression

Eine reduzierte Empfindlichkeit des Biofilms resultiert auch aus einem veränderten Phänotyp der im Film wachsenden Bakterien [10,26,34,63]. Durch Repression und Induktion bestimmter Gene synthetisieren im Biofilm wachsende Bakterien diverse Enzyme, die ihnen besondere metabolische sowie proteolytische Fähigkeiten geben [12,58]. Als Ursache für die veränderte Genexpression kommen sog. Auto-Inducers in Frage. Diese Botenstoffe regen nach Bindung an Rezeptoren in der Oberfläche der Zellwände der Mikroorganismen die Produktion von Stoffen an, welche die bakterielle Resistenz wesentlich erhöhen können. Dieser Vorgang wird als Quorum sensing bezeichnet. Die Wirksamkeit dieser Botenstoffe ist konzentrationsabhängig. Sie kommt daher fast ausschließlich beim Wachstum in Biofilmen

zum Tragen, wo der für die Aktivierung der spezifischen Virulenzgene notwendige Schwellenwert aufgrund der sehr hohen Besiedlungsdichte sehr rasch erreicht wird. Diese selbst generierten chemischen Signale einzelner Bakterien als Teil ihrer Zell-Zell Kommunikation sorgen somit für einen resistenteren und widerstandsfähigeren Biofilm [51,61].

1.5 Ablösungs- und Zerstörungsmöglichkeiten von oralen Biofilmen

Die Möglichkeiten zur Entfernung von Biofilmen auf der Zahnoberfläche beschränken sich neben dem Einsatz von Chemotherapeutika und Antibiotika üblicherweise auf die mechanische Entfernung mit Handinstrumenten. Darüber hinaus ist jedoch auch schon experimentell versucht worden, Biofilme durch weitere physikalisch-chemische Methoden zu zerstören.

So werden, wie bereits erwähnt, zur Unterstützung der Antiseptika elektrische [4,14,61,64] und magnetische Felder [40,44] sowie Ultraschall [65,66] verwendet. Deshalb wird vom so genannten bioelektrischen [41], bio-magnetischen oder bioakustischen Effekt gesprochen.

Der bioelektrische Effekt beeinflusst im Sinne einer Elektrophorese die Ladung der Polymere in der Matrix und bewirkt so eine schnellere, bzw. leichtere Diffusion polarer Moleküle. In diesem Zusammenhang wurde eine höhere Permeabilität der Biofilmbakterien für Antiseptika festgestellt [20,66,67].

Möglicherweise stört ein angelegtes elektrisches Feld auch die komplizierten und teilweise noch unerforschten Wechselwirkungen der Keime im Biofilm, was ebenfalls eine leichtere Entfernbarekeit zu Folge hätte. Dies wird weitgehend durch eine klinisch-experimentelle Studie bestätigt: Mit einer elektrischen Zahnbürste, die zugleich mittels eines TiO_2 Halbleiters und Gegenelektrode im Griff auf photoelektrochemischem Weg ein E-Feld erzeugte, konnte eine bessere Reinigung der Zahnoberflächen erzielt werden, als mit der selben Zahnbürste ohne Photostrom [68].

2. Ziel der Studie

Ziel der Studie war es, in einem *in vitro* Modell zu untersuchen, inwieweit die Effizienz mechanischer Plaquentfernung durch die zeitgleiche Aufschaltung eines Gleichstroms niedriger Spannung verbessert werden kann und welche Effekte des elektrischen Feldes auf den Biofilm darüber hinaus zu beobachten sind.

3 Material und Methode

3.1 Methode

3.1.1 Übersicht Versuchsaufbau

Alle Versuche wurden an Monokulturen von *Streptococcus sanguinis* (DSM NR: 20068) durchgeführt. *S. sanguinis* ist ein typischer Vertreter der gesunden oralen Mikroflora und erfüllt durch die reproduzierbare Ausbildung homogener Biofilme *in vitro* in besonderem Maße die experimentellen Anforderungen.

In einem *in vitro* Aufbau wurde die Biofilmbildung von *Streptococcus sanguinis* auf Titanprobenkörpern induziert. Als Probenkörper dienten in der hauseigenen Werkstatt hergestellte Titanplättchen mit einem Durchmesser von 15,5 mm und einer Dicke von 0,6 mm, entsprechend dem Innendurchmesser einer kommerziell erhältlichen 24-Well-Schale. In diese wurden die Titanplättchen eingebracht, mit aerobem Bakterienkulturmedium (Schädler-Medium) überschichtet und anschließend mit einer definierten Menge einer *Streptococcus sanguinis* Suspension beimpft. In eine 24-Well-Schale konnten so passgenau alle für jeden Einzelversuch notwendigen Probenkörper eingebracht werden. Nach 48 Stunden aerober Bebrütung bei 37° Celsius wurde der aufgewachsene Biofilm standardisiert mittels modifizierter zahnärztlicher Handinstrumente entfernt. Während in der Kontrollgruppe eine rein mechanische Entfernung der Biofilme erfolgte, wurden in den Testgruppen die zahnärztlichen Handinstrumente durch Anlegen einer elektrischen Spannung variabler Höhe als Elektroden benutzt und die Effektivität der Biofilmentfernung in Abhängigkeit von der angelegten Spannung und anderen Parametern bewertet. Die Analyse der Effizienz der Biofilmbilösung erfolgte durch die Messung der noch verbliebenen Biomasse auf den Titanplättchen. Dies geschah automatisiert, nach Anfärbung, mittels eines Fluoreszenzphotometers. Das Fluoreszenzphotometer ermöglichte durch die gewonnenen

Rohdaten eine graphische Darstellung der unterschiedlichen Biofilmverteilung bzw. Farbstoffintensität auf jedem einzelnen Plättchen. Mittels unterschiedlich starker Lichtreflexionen von der Biofilmoberfläche ermittelte das Photometer zueinander im Verhältnis stehende Zahlenwerte, die die unterschiedlich starke Biofilmdichte wiedergaben.

3.1.2 Versuchsgrundlagen

3.1.2.1 Modifikation der Handinstrumente

Zur Biofilmentfernung wurden drei verschiedene parodontale Edelstahlhandinstrumente verwendet: Eine stumpfe Marquis PCP 12 Parodontalsonde, ein scharfer Jaquard-Scaler (Hu-Friedy, SM 26) sowie eine flächig scharfe Hirschfeld Parodontalfeile (siehe Abb. 3.1 und 3.3). Diese wurden durch Einschweißen in einen nichtleitenden Schrumpfschlauch isoliert. Nur jeweils 2 bis 3 mm im Bereich der Arbeitsspitze des jeweiligen Instruments blieben als Kontaktfläche unisoliert. Am kontralateralen Ende des Instruments wurde durch ein geschnittenes Gewinde und entsprechende Gegenmuttern eine Befestigung für die Litzen eines Stromleiterkabels geschaffen.

Trotz der vorbeschriebenen Modifikationen blieben die Instrumente im Autoklaven effektiv sterilisierbar.

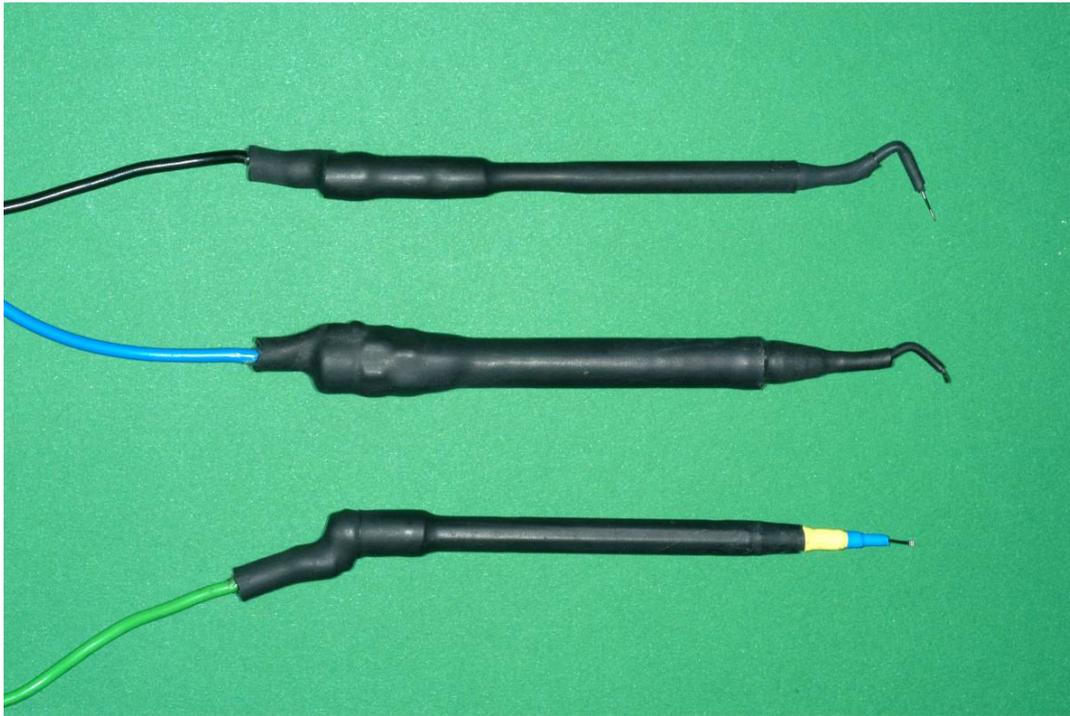


Abb. 3.1 isolierte und modifizierte zahnärztliche Handinstrumente; von oben: parodontal-Sonde, Scaler, Hirschfeldfeile

3.1.2.2 Herstellung der Probenkörper

Die in der hauseigenen Werkstatt hergestellten und noch unbehandelten Titanrohlinge wurden vor der Sterilisation einem speziellen Ultraschallsäuberungsprozess unterzogen (siehe auch Tabelle 8.2): Je 10 Plättchen wurden mittels einer eigens konstruierten Haltevorrichtung, die das Plättchen über einen gebogenen Draht in der randständigen Bohrung fixierte, in ein 500 ml fassendes Becherglas gehängt. Die Prüfkörper wurden dann Schritt für Schritt mit nachfolgend beschriebenen Flüssigkeiten im Ultraschallbad gereinigt.

Nach einem 10minütigen Waschdurchgang in 2%igem Natriumlaurylsulfat (sodiumdodecylsulfate; SDS), folgten 10 Minuten mit Reinstwasser. Nach weiteren 10 Minuten in einem 5%igem Tensid (Extran®) schlossen sich zwei

10minütige Reinstwasserbäder an. Abschließend wurde das Becherglas für je 10 Minuten mit Isopropanol und nachfolgend mit Reinstwasser gefüllt.

Auf diese Weise wurde eine nahezu 100%ig reine, nicht polierte Plättchenoberfläche ohne zusätzliche Mikroverunreinigungen erzielt.

3.1.2.3 Der Schaltkreis der Versuchsanordnung

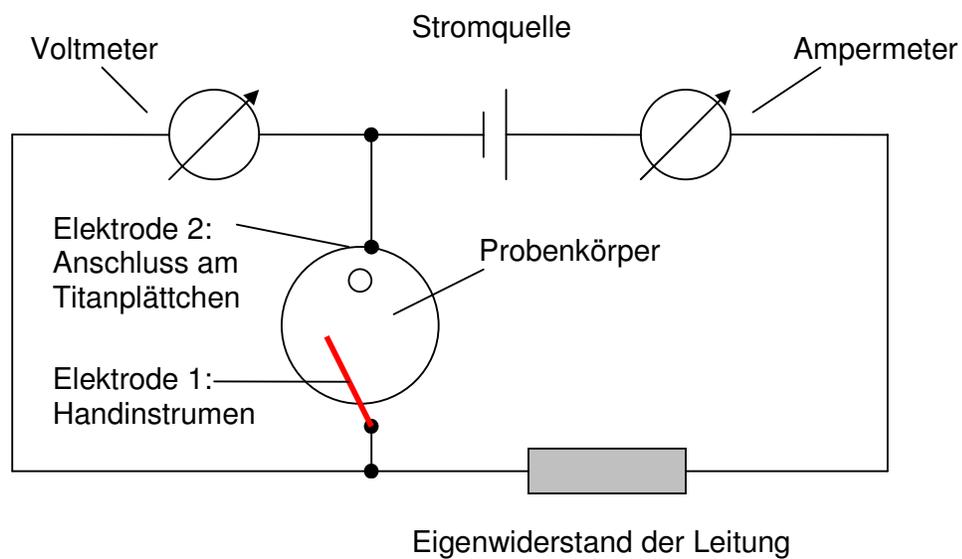


Abb. 3.2 Schaltkreisskizze

3.1.3 Vorversuche

3.1.3.1 Wachstumsversuche

In zahlreichen Vorversuchen wurden die Homogenität und die Reproduzierbarkeit der angezüchteten *Streptococcus sanguinis* Biofilme optimiert.

In einer eintägigen Vorkultur wurde in einem 20 ml Deckelglas in einem Brutschrank bei 37° Celsius eine *S. sanguinis*-Suspension angezüchtet. Als Kulturmedium wurde zunächst Thioglycolat verwendet. Die zuvor

beschriebenen Titanrohlinge wurden in 24-Well-Schalen verbracht, mit 2 ml Kulturmedium überschichtet und eine definierte Menge der *Streptococcus sanguinis*-Suspension hinzugegeben. Anschließend erfolgte eine Inkubation von 3, 6, 24 oder 48 Stunden. Dies geschah in einem Brutschrank bei 37° Celsius unter leichter Bewegung der 24-Well-Schalen. Alternativ wurden Plättchen ohne Bewegung inkubiert. Sowohl die Bakterienkonzentration in der Vorkultur als auch die Saccharosekonzentration im Medium wurden variiert. Klebsiellen- und Staphylokokken-Monokulturen wurden neben den Streptokokken ebenfalls auf Homogenität und Reproduzierbarkeit untersucht, aber auf Grund der schlechteren Konstanz der Biofilmbildung sowie des für die Mundhöhle untypischen Genus nicht weiter verfolgt.

Bei vergleichenden Untersuchungen der Nährmedien Thioglycolat, LB und Schädler (siehe 3.2.4), stellte sich letzteres ohne weiteren Saccharosezusatz als am besten geeignet dar. Die Biofilmbildung wurde weiterhin dadurch optimiert, dass die Plättchen nach zwei 24stündigen Übernachtkulturen für weitere 24 Stunden in einem Brutschrank ohne Bewegung bebrütet wurden.

3.1.3.2 Unterschiedliche Parameter

Nach erfolgreicher Inkubation wurden neben einigen unterschiedlichen Bekratzungsgeometrien (siehe Abb. 3.3) verschiedene Anschlussmöglichkeiten der Elektroden am Plättchen, bzw. an den Handinstrumenten, sowie unterschiedliche Abspülmethode, getestet. Andere Parameter wie Bekratzungszeit, Wahl des Bekratzungsinstruments, Stromstärke, Spülmedium, Höhe der Spannung und Polung wurden in Bezug auf die Biofilmbilösung optimiert. Hier stellte sich heraus, dass eine vollständige Behandlung eines Plättchens ohne Absetzen des Handinstruments wegen des konstant bleibenden elektrischen Feldes sowie einer gleichmäßigen „Applikation“ des Stromes anderen Bekratzungsschemata vorzuziehen war (Abb. 3.3 Fall e). Nach mikroskopischer Auswertung der bekratzten Plättchen hinterließ der

Scaler (siehe Abb. 3.4) wegen seiner typischen Bauart die, im Vergleich zu den anderen Instrumenten, deutlichsten und am exaktesten definierten Spuren durch den Biofilm. Hier konnte man ferner die Auswirkungen der Ladungseffekte auf den Biofilm in Bereichen zwischen zwei Kratzspuren erkennen (siehe Abb. 3.6).

Die Schaltung des Stromkreises wurde so eingerichtet, dass das Behandlungsinstrument selbst eine Elektrode darstellte, und eine Krokodilklemme an der Bohrung des Rohlings (siehe Abb. 3.5) die andere. Versuche mit einem an zwei Krokodilklemmen angeschlossenen Plättchen stellten sich als ungünstiger dar, da die Arbeitsspitze des Handinstruments auf diese Weise nicht die erwünschten Stromflussdichten und Ladungseffekte erzielen konnte. Stromstärken wurden zwischen 200 mA und bis zu 5 A gewählt. Je nach Versuch betrug die angelegte Spannung zwischen 0.5 V und 6 V.

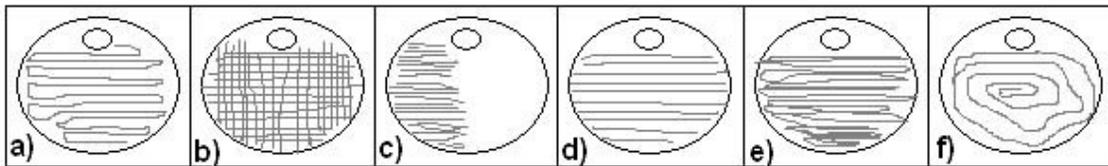


Abb. 3.3 Unterschiedliche Bekratzungsschemata der Titanplättchen (a-f)



Abb.3.4 isolierte Arbeitsspitze des Scalers



Abb. 3.5 Krokodilklemme als Gegenelektrode

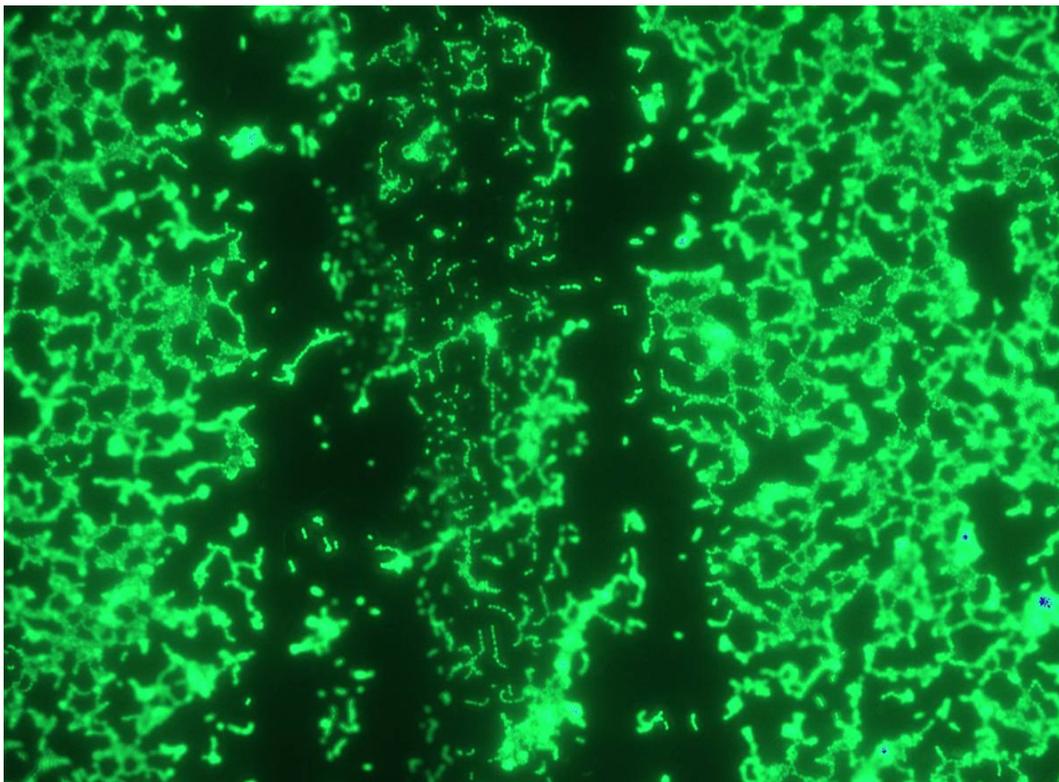


Abb. 3.6 Veränderung der Biofilmdichte zwischen zwei Kratzspuren bei 40facher Vergrößerung unter dem Fluoreszenzmikroskop

3.1.3.3 Konditionierung der Probenplättchen

Mit dem Terminus Konditionierung werden die Schritte nach dem Bekratzen der Probenkörper bis zum Färbeprozess des Biofilms zusammengefasst.

Diese unterschiedlichen Schritte richteten sich zunächst nach der Färbemethode. Während bei der standardmäßig verwendeten Tot-Färbung unmittelbar nach dem Versuch alle Probenkörper mit Formaldehyd fixiert, und danach mehreren unterschiedlichen Wasch- und Trocknungsreihen unterzogen wurden, stand bei der weniger häufig verwendeten Lebend-Tot-Färbung eine zweite 24-Well-Schale mit dem schon vorbereiteten Farbstoffgemisch bereit, in die alle Titanplättchen einer Versuchsreihe unverzüglich nach ihrer Bekratzung gegeben werden mussten. Hier war eine digitale Datenauswertung mit dem Fluoreszenzphotometer nicht möglich, da dieses nur die Lichtblitzreflexionen

von getrockneten Plättchenoberflächen messen konnte. Sowohl die Tot-Farbstoff-Konzentrationen, als auch die Trocknungsmethoden, wurden dahingehend optimiert, dass pro Plättchen 2 ml des mit TRIS Puffer auf 1:10000 verdünnten Syber-Green I (MoBiTec, Göttingen) pipettiert wurden, und der Farbstoff nach 15minütiger Einwirkzeit durch dreimaliges Waschen aller Probenkörper mit TRIS Puffer entfernt werden konnte.

Der fluoreszierende Tot-Farbstoff Syber-Green I ermöglicht ein Sichtbarmachen doppelsträngiger DNA. Der Vorteil gegenüber anderen Färbemethoden besteht laut Herstellerangaben darin, dass auch kleinste Mengen DNA aufgrund der hohen Empfindlichkeit und Spezifität deutlich kenntlich gemacht werden können. Der lichtempfindliche Farbstoff besitzt bei 23° Celsius ein pH Optimum zwischen pH 7,5 und pH 8,0. Neben zwei Absorptionsmaxima bei 290 nm und 380 nm weist der Farbstoff ein Exzitationsmaximum bei 497 nm auf. Sein Emissionsmaximum liegt bei 520 nm (siehe auch 5.1.2).

3.1.3.4 Rohdatennahme und Mikroskopauswertung

Die zur Rohdatennahme vorbereitete 24-Well-Schale wurde ohne Abdeckung durch das Fluoreszenzmessgerät (Tecan, Crailsheim) eingelesen. Das Setup der Bedienungssoftware Magellan 3 (Gauss, Hamburg) wurde so konfiguriert, dass 25 Messwerte pro Plättchen erfasst wurden (geometrische Verteilung der Einzelmesspunkte siehe Abb. 3.7).

Um nahezu den gesamten Probenkörper analysieren zu können, wurden zuerst die exakten Abmessungen der Well-Schale eingegeben. Da das Photometer mit Lichtblitzen arbeitete, musste, um verfälschte Werte zu vermeiden, sichergestellt werden, dass diese genau in die Vertiefungen der Schale und so direkt auf den Biofilm trafen. Anschließend erfolgte die Einstellung der Exzitations - und Emissionswellenlängen auf den Farbstoff Syber-Green I mit speziellen Filtern (Exzitationsfilter 485 nm, Emissionsfilter 535 nm). Nach Abschluss der Messung wurde aus den Einzelmesswerten ein

Durchschnittswert pro Prüfkörper errechnet, der den Mittelwert der 25 Einzelmessungen darstellte. Hierbei richtete sich die Höhe des Zahlenwertes (0 - 65000) nach der Intensität der Färbung und somit nach der Höhe der Bakteriedichte bzw. der Biofilmdichte. Als Einheit für die Intensität wird hier die relative Fluoreszenz Unit [RFU] verwendet.

Die jeweiligen Intensitätswerte der durch Fluoreszenz induzierten Reflexion von der Probenkörperoberfläche einer Versuchsreihe (4 mal 25 = 100) können so gleichgesetzt werden mit der Dichte des Biofilmbewuchses einer ganzen Versuchsreihe mit je vier Probenkörpern.

Die sog. Wachstumskontrolle, die bei jedem Versuch als vollständige Versuchsreihe mit durchgeführt wurde, diente dazu, eine Aussage über die Biofilmmhomogenität der Plättchen des jeweiligen Versuchs treffen zu können und ging nicht in die genauere Analyse der Ergebnisse ein.

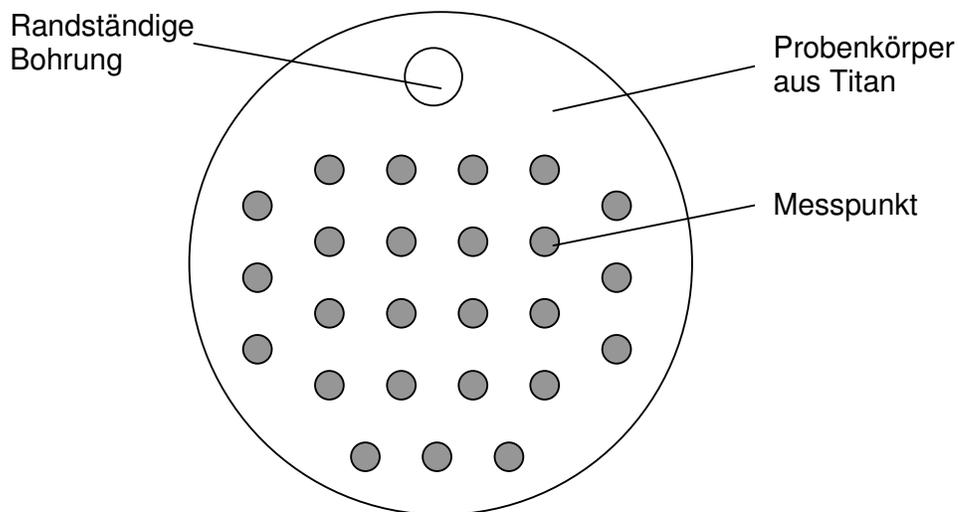


Abb. 3.7 Skizze der Messgeometrie der 25 Messpunkte des Fluoreszenzphotometers für jedes Titanplättchen

3.1.4 Versuche

3.1.4.1 Vorkulturen

10 µl der aufgetauten *Streptococcus sanguinis* Bakteriensuspension wurden unter der Sterilbank zu 2 ml Schädler Medium in ein steriles Glasröhrchen und anschließend in einen Brutschrank bei 37° Celsius gegeben. Nach 24 Stunden wurden 200 µl dieser ersten Übernachtkultur ebenfalls unter der Sterilbank entnommen, und mit 50 ml Schädler Medium in eine 100 ml fassende autoklavierte Glasdeckelflasche gegeben. Die zweite Übernachtkultur wurde wiederum für 24 Stunden bei 37° Celsius in den Brutschrank gestellt.

3.1.4.2 Inkubation der Plättchen

Die autoklavierten Titanplättchen wurden unter der Sterilbank in eine ebenfalls sterile 24-Well-Schale eingebracht. Pro Plättchen wurden je 2 ml der zweiten Übernachtkultur mit einer Pipette aufgetragen. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Proben über 24 Stunden im Brutschrank bei 37° Celsius.

3.1.4.3 Mechanische Entfernung des Biofilms

Unter der Sterilbank wurde zuerst das Nährmedium mit einer Pipette abgesaugt ohne die Oberfläche der Probenkörper zu berühren. Danach erfolgten zwei Waschdurchgänge, bei denen man mit einer sterilen Pipette je 2 ml PBS (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung, Apotheke des Universitätsklinikums) auf die Plättchen gab, und dieses nach ca. 1 Minute wieder absaugte.

Das erste Plättchen der jeweiligen Versuchsreihe wurde aus der 24-Well-Schale genommen und mit einer sterilen Krokodilklemme, die gleichzeitig auch

als Gegenelektrode diente und über ein Kabel mit dem Stromgenerator verbunden war, in der Bohrung fixiert und festgehalten. Unter Zuhilfenahme einer 20 ml Einmalspritze wurde das fixierte Plättchen mit 5 ml PBS bzw. 5 ml 0,1%iger Chlorhexidindigluconat Lösung (CHX) sanft abgespült und war somit bereit für den Bekratzungsprozess: Mit dem Handinstrument, das die andere Elektrode darstellte, konnte das Plättchen nun beliebig bekratzt bzw. behandelt werden. Je nach Versuchsparameter erfolgte am Ende des jeweiligen Behandlungsprozesses ein zweites Abspülen des Plättchens mit 5 ml der verwendeten Spüllösung.

Immer 4 Plättchen stellten - wie schon erwähnt - eine Versuchsreihe dar, in der die Parameter Behandlungszeit, Stromstärke, voreingestellte Spannung, Polung, Spülmedien, Spülzeitpunkt oder Behandlungsinstrument konstant gehalten wurden. Neben den 4 Titanrohlingen der unbehandelten Biofilmkontrolle waren so pro 24-Well-Schale maximal 5 zeitgleich ablaufende Versuchsreihen möglich (siehe Abb. 3.8).

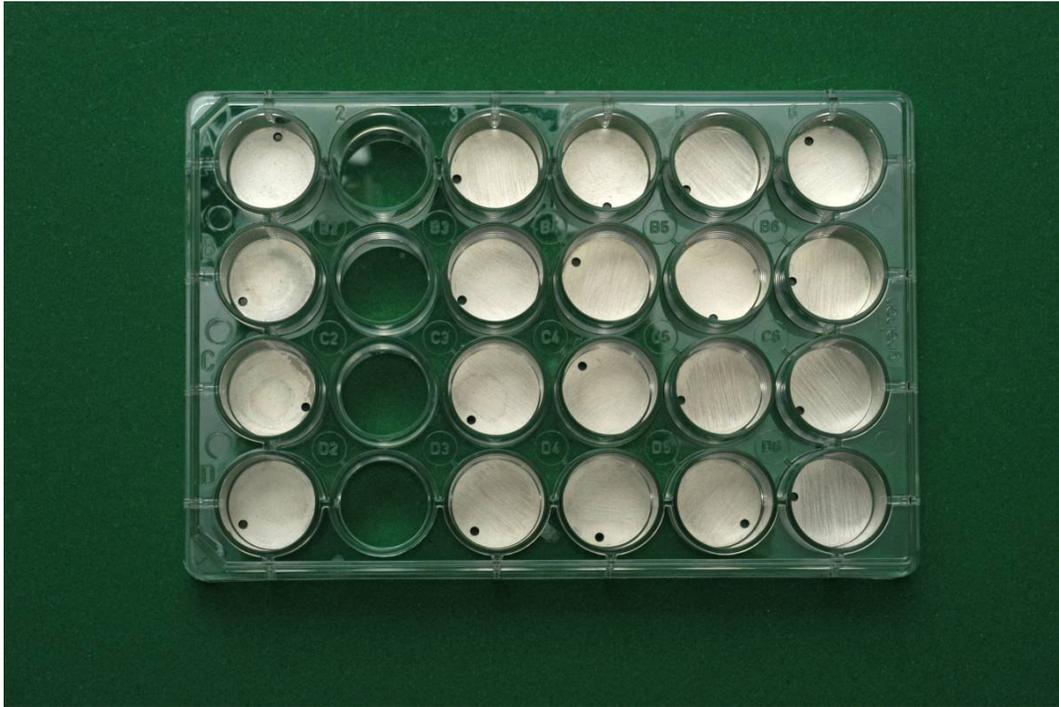


Abb. 3.8 24-Well-Schale mit bekratzten Titanplättchen

3.1.4.4 Konditionierung der Probenkörper

Nachdem die Behandlung abgeschlossen war, wurde das PBS vorsichtig abgesaugt und jedes Plättchen mit ca. 2 ml 3,7%igem Formaldehyd überschichtet. Nach 10minütiger Inkubationszeit erfolgten zwei Waschküchungen mit PBS sowie eine Trocknung mittels Alkohol: Für jeweils 5 Minuten wurden je 2 ml 50%iges und anschließend 99%iges Ethanol auf alle Plättchen gegeben. Nach dem Absaugen des Alkohols wurde die 24-Well-Schale ohne Deckel für 10 Minuten unter einen Abzug gelegt, um die Titanplättchen vollständig zu trocknen.

Zur Farbstoffvorbereitung wurden 50 µl des aufgetauten und gut gevortexten Syber-Green I mit 50 ml TRIS Puffer verdünnt. Für die Fluoreszenzfärbung wurden je 2 ml des vorbereiteten Gemisches auf die Titanprobekörper pipettiert. Die 24-Well-Schale wurde wegen der Lichtempfindlichkeit des Farbstoffes mit

einer Aluminiumfolie abgedeckt und zur Inkubation 10 Minuten unter die Sterilbank gestellt.

Nach Absaugen des Farbstoffes mit Pasteurpipetten wurden alle Plättchen einer fünfmaligen TRIS Waschung unterzogen. Nach einer weiteren zehnminütigen Trocknungsphase unter der Sterilbank standen die Titanplättchen zur Auswertung und Rohdatenermittlung bereit.

3.1.5 Auswertung

3.1.5.1 Rohdatennahme, Mikroskop

Das Fluoreszenzphotometer incl. Exzitations – und Emissionsfilter wurde wie oben erwähnt optimal auf den verwendeten Farbstoff abgestimmt und war so konfiguriert, dass jedes Plättchen nahezu komplett mit 25 Messwerten abgetastet wurde. Die restlichen Einstellungen, sowie das Begutachten bei 10, 40, und 100facher Vergrößerung und das Photographieren der Plättchen bzw. des Biofilms unter dem Fluoreszenzmikroskop, entsprachen den Vorversuchen.

3.1.5.2 Statistik

Aufgrund der nicht normalverteilten Daten erfolgte die statistische Analyse mit Hilfe des Mann-Witney-U-Tests für unabhängige Proben [69]. Das Signifikanzniveau (p) wurde auf $p \leq 0,05$ festgelegt. Auf ein tendenziell teststärkeres parametrisches Verfahren wurde aufgrund der Unsicherheit über die Verteilungseigenschaften der abhängigen Variablen bewusst verzichtet.

3.2 Materiallisten

3.2.1 verwendete Bakterienstämme

Tabelle 3.1 Bakterienstammliste

Bakterienstamm	Hersteller	Ort
Streptococcus sanguinis; biotype 1, serologische Gruppe H.Murein A11.6, DSM NR: 20068	deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen	Braunschweig
Klebsiella pneumoniae; Stamm 3091	Institut für molekulare Infektionsbiologie	Würzburg
Staphylococcus epidermidis; Stamm Rp62A	Institut für molekulare Infektionsbiologie	Würzburg

3.2.2 verwendete Geräte

Tabelle 3.2 Geräteliste

Gerät	Hersteller	Ort
Autoklav	Melag	Berlin
Brutschrank	Heraeus	Hanau
Digitalkamera auf Mikroskop	Intas Imaging Instruments	Göttingen
Erlenmeyer Kolben	Versand Hartenstein	Würzburg
Folienschweißgerät Hygropac	Dürr	Biegtheim-Bissingen

3 Material und Methode

Heizplatte RCT basic	IKA Werke	Staufen
Glas Laborflaschen	Schott	Mainz
Hirschfeldfeile 9-10	HU Friedy	Leimen
Krokodilklemmen	Hirschmann	Neckarteuzlingen
Laserscanning Mikroskop Axiovert 100	Carl-Zeiss	Jena
Lichtmikroskop Axiolab	Carl-Zeiss	Jena
Motor Pipette Accu-Jet	Brandt	Wertheim
PH-Meter	Ino Lab, WTW	Weilheim
Photometer SpectraFluorPlus	Tecan	Crailsheim
Pinzette, BD 520	Aesculap	Melsungen
Glas Pipetten	Eppendorf	Hamburg
Scaler SM 26	HU Friedy	Leimen
Schüttler Novotron	Infors	Bottmingen-CH
Software Magellan III	Gauss Interprise	Hamburg
Sterilbank Lamin Air HB2427	Heraeus	Hanau
Stromgenerator PS-303D	Conrad Elektronik	Hirschau
Vortex	Heidolph	Schwabach
Waage	Scaltec Instruments	Weiligenstadt
WHO Sonde PCB 12	HU Friedy	Leimen

3.2.3 verwendete Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3.3 Verbrauchsmaterialienliste

Verbrauchsmaterialien	Hersteller	Ort
Autoklaventüten Hygrofol	Dürr	Biegtheim-Bissingen
Desinfektionsmittel Dibromol farblos	Tommsdorff	Alsdorf
DNA Farbstoff Syber Green I	MoBiTec	Göttingen
Einmal Pipetten 10,25 ml	Greiner	Frickenhausen
Einmal Spritzen 20,50 ml	Braun	Melsungen
Eppendorf-Caps	Eppendorf	Hamburg
Titanplättchen: Titan Grade 2; Durchmesser 15,5mm, Dicke 0,6mm	Hauseigene Werkstatt	Würzburg
Pasteur Pipetten	Versand Hartenstein	Würzburg
Pipettenspitzen	Eppendorf	Hamburg
Zellkultur Platte 24-Well	Greiner	Frickenhausen

3.2.4 verwendete Chemikalien

Tabelle 3.4 Chemikalienliste

Chemikalien	Hersteller	Ort
Chlorhexidingluconat 0,1%	Glaxo Smith Kline Consumer Healthcare	Bühl
Formaldehyd 37%	Merck	Darmstadt
KCl	Merck	Darmstadt
KH ₂ PO ₄	Merck	Darmstadt
NaCl	Merck	Darmstadt
NaCl ₂ HPO ₄	Riedel de Häen	Seelze
Pepton/Trypton	Becton Dickinson	Heidelberg / Sparks-USA
LB Nährmedium: 2g Yeast Extrakt, 4g Tryptone, 2g NaCl ad 400ml Aqua dest.	Becton Dickinson	Heidelberg / Sparks-USA
Schädler Nährmedium (Fertigmedium)	Becton Dickinson	Heidelberg / Sparks-USA
SDS 2%	Apotheke des Universitätsklinikums	Würzburg
Trimethylamin	Sigma-Aldrich	Taufkirchen
Thioglycolat Nährmedium (Fertigmedium)	Becton Dickinson	Heidelberg / Sparks-USA

4 Ergebnisse

4.1 Einfluss von unterschiedlich starken elektrischen Feldern auf die Biofilmbablösung

Die Ergebnisse der Biofilmbablösung bei angelegtem E-Feld im Vergleich zur Bekratzung ohne E-Feld sind nachfolgend in den Abbildungen 4.1.1 und 4.1.2 dargestellt. Einen direkten Vergleich der Ablösungseffektivität unterschiedlich starker E-Felder durch verschieden hohe angelegte Spannungen zeigt die Abb. 4.1.3. Die Bekratzungszeit von 60 Sekunden, die Polung (Instrumentenspitze = Anode) sowie das Spülmedium PBS blieben in 4.1 konstant.

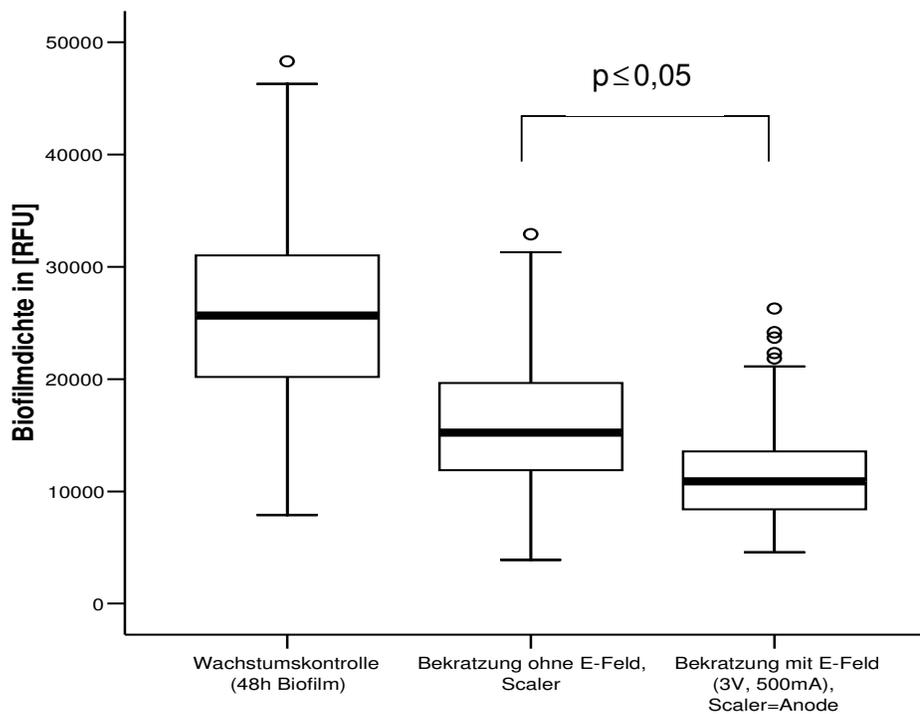


Abb. 4.1.1 Mechanische Reduktion der Biofilmmasse unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes von 3 V, 500 mA im Vergleich zu den Kontrollen

Abb. 4.1.1 zeigt die auf den Titanplättchen über Fluoreszenz zu messende Biomasse der Wachstumskontrolle, nach 60 Sekunden mechanischem Bekratzen mit einem Scaler, sowie nach 60 Sekunden mechanischem Bekratzen mit einem Scaler und angelegtem E-Feld (3 V, 500 mA, Instrumentenspitze = Anode).

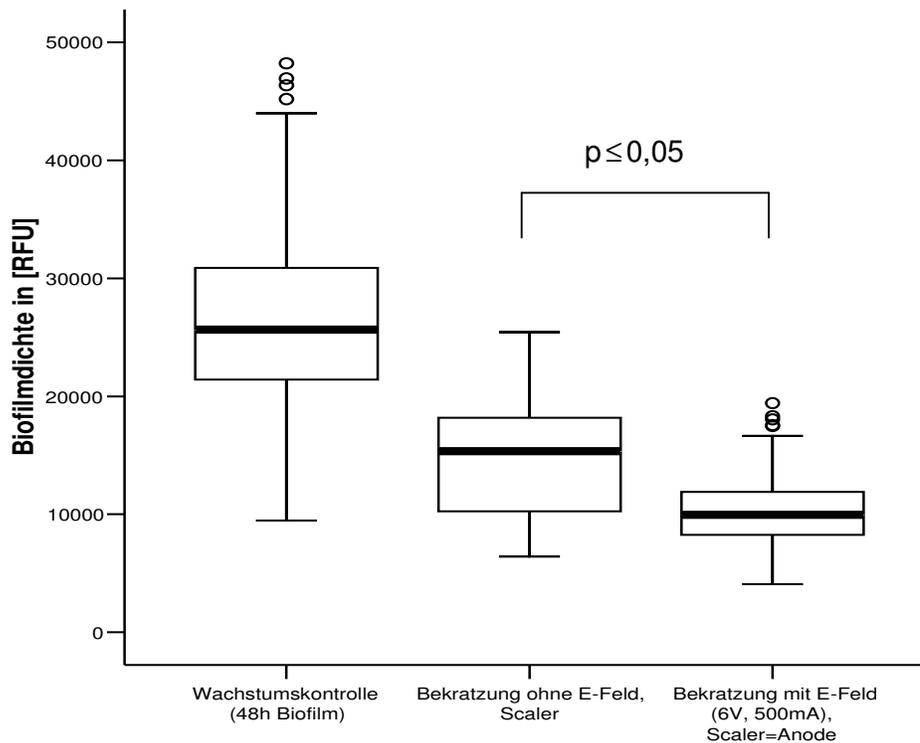


Abb. 4.1.2 Mechanische Reduktion der Biofilmmasse unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes von 6 V, 500 mA im Vergleich zu den Kontrollen

Abb. 4.1.2 zeigt die auf den Titanplättchen über Fluoreszenz zu messende Biomasse der Wachstumskontrolle, nach 60 Sekunden mechanischem Bekratzen mit einem Scaler, sowie nach 60 Sekunden mechanischem Bekratzen mit einem Scaler und angelegtem E-Feld (6 V, 500 mA, Instrumentenspitze = Anode).

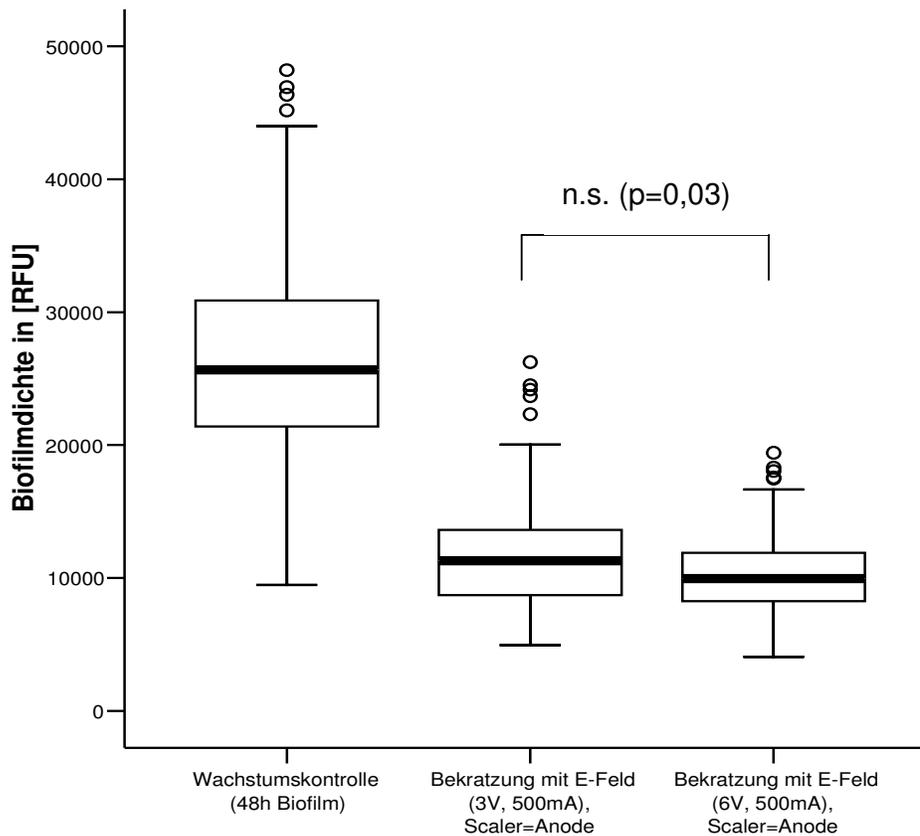


Abb. 4.1.3 Mechanische Reduktion der Biofilmmasse unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes von 3 V, 500 mA im Vergleich zu 6 V, 500 mA

Abb. 4.1.3 zeigt die auf den Titanplättchen über Fluoreszenz zu messende Biomasse der Wachstumskontrolle, nach 60 Sekunden mechanischem Bekratzen mit einem Scaler und angelegtem E-Feld (3 V, 500 mA, Instrumentenspitze = Anode), sowie nach 60 Sekunden mechanischem Bekratzen mit einem Scaler und angelegtem E-Feld (6 V, 500 mA, Instrumentenspitze = Anode).

Die Analyse der Ablösung des *Streptococcus-sanguinis* Biofilms von den Titanplättchen bei verschiedenen hoch eingestellten Spannungen zeigt, dass nach

60sekündigem Bekratzen bei angelegtem E-Feld eine signifikante Verbesserung der Ablösungseffektivität von bis zu 15% gegenüber der Kontrolle ohne angelegtem elektrischen Feld zu beobachten war. Die Höhe der angelegten Spannung zeigte bei konstant gehaltener Stromstärke keinen signifikanten Einfluss auf die Ablösungseffektivität des Biofilms.

4.2 Einfluss der Polung auf die Biofilmbablösung

In den nachfolgenden Diagrammen 4.2.1 und 4.2.2 wird dargestellt, welchen Einfluss eine unterschiedliche Polarität bzw. unterschiedliche Anschlussmöglichkeiten der Elektroden am Handinstrument bzw. am Titanplättchen auf die Ablösungseffektivität haben. Die Bekratzungszeit von 60 Sekunden, das Design des Handinstruments (Scaler), sowie das Spülmedium PBS blieben hier konstant.

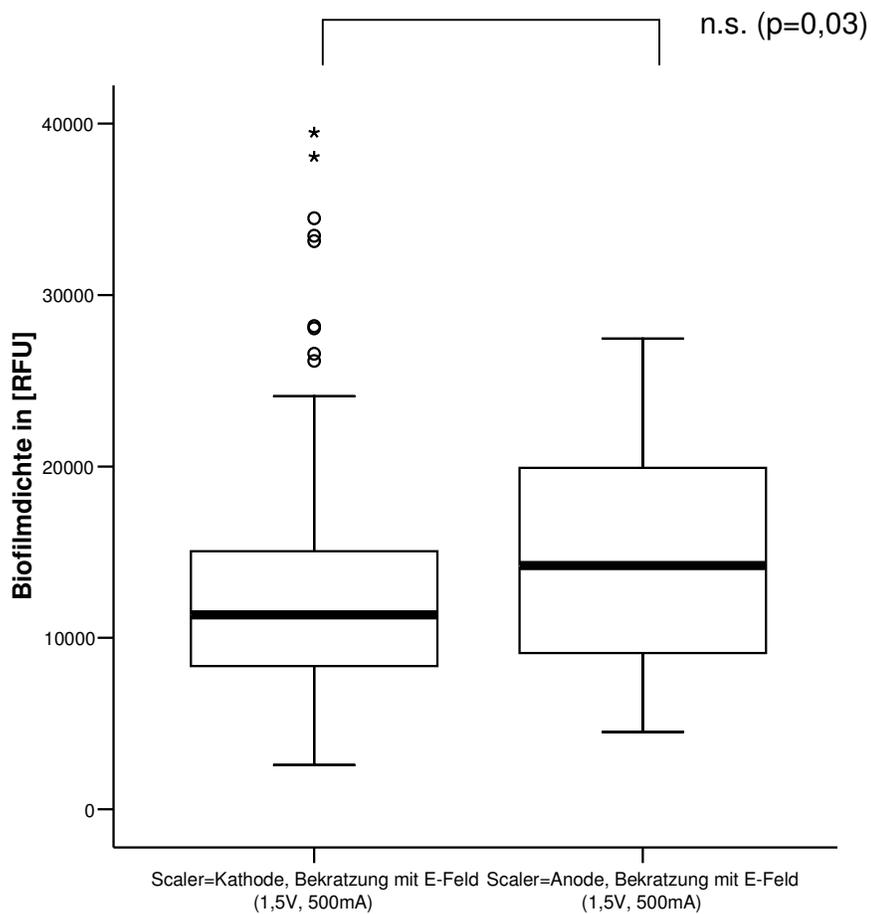


Abb. 4.2.1 Restliche Biofilmmasse nach mechanischer Bekratzung unter dem Einfluss elektrischer Felder unterschiedlicher Polung bei 1,5 V und 500 mA

Abb. 4.2.1 zeigt die auf den Titanplättchen über Fluoreszenz zu messende Biomasse nach mechanischer Bekratzung mit einem negativ geladenem Scaler und nach mechanischer Bekratzung mit einem positiv geladenem Scaler. Die Parameter für das angelegte E-Feld betragen 1,5 V und 500 mA.

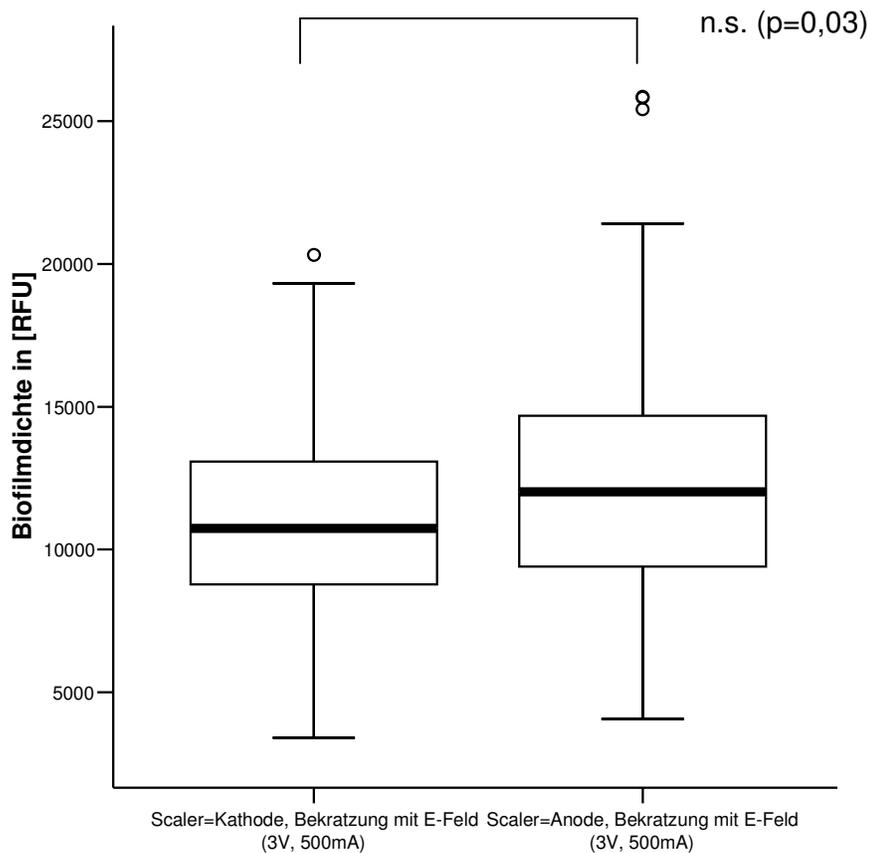


Abb. 4.2.2 Restliche Biofilmmasse nach mechanischer Bekratzung unter dem Einfluss elektrischer Felder unterschiedlicher Polung bei 3 V und 500 mA

Abb. 4.2.2 zeigt die auf den Titanplättchen über Fluoreszenz zu messende Biomasse nach mechanischer Bekratzung mit einem negativ geladenen Scaler

und nach mechanischer Bekratzung mit einem positiv geladenen Scaler. Die Parameter für das angelegte E-Feld betragen 3 V und 500 mA.

Die Ergebnisanalyse von 4.2.1 und 4.2.2 verdeutlicht, dass die Flussrichtung bzw. die Polarität des Gleichstromes keinen signifikanten Einfluss auf die Biofilmlösung hat. Bei einem negativ geladenen Handinstrument und somit bei einem positiv geladenen Probenträger ist lediglich in der Tendenz eine leicht stärkere Ablösung des Biofilms zu beobachten.

4.3 Einfluss des Instrumentendesigns auf die Biofilmbablösung

In der Abb. 4.3.1 sind die Ergebnisse der Analyse der Effektivität der Biofilmentfernung in Abhängigkeit des Designs des zur Ablösung verwendeten Handinstruments dargestellt. Die Bekratzungszeit von 60 Sekunden sowie das Spülmedium PBS blieben in 4.3 konstant. Die Instrumentenspitze stellte hier die Kathode dar.

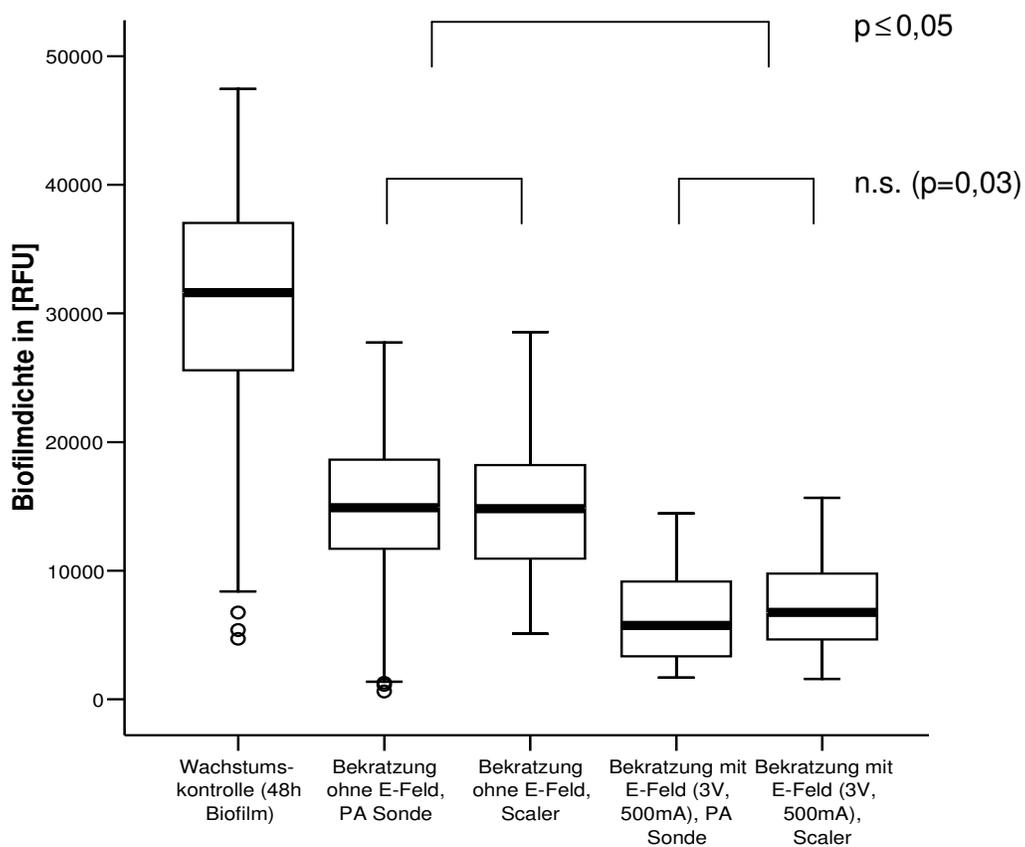


Abb. 4.3.1 Wachstumskontrolle, mechanische Biofilmentfernung ohne E-Feld jeweils mit unterschiedlichen Instrumenten sowie mechanische Biofilmentfernung mit E-Feld und unterschiedlichen Handinstrumenten (E-Feld: 3 V, 500 mA)

In Abb. 4.3.1 wird die über Fluoreszenz gemessene Biomasse der Wachstumskontrolle, nach 60sekündiger Bekratzung des Titanprobenkörpers mit einer Parodontalsonde und nach 60sekündiger Bekratzung mit einem Scaler ohne angelegtem E-Feld dargestellt. Gegenübergestellt werden die Ergebnisse 60sekündiger Bekratzung mit einer Parodontalsonde sowie mit einem Scaler mit angelegtem E-Feld (3 V, 500 mA).

Die Analyse der Abb. 4.3.1 zeigt, dass sich Scaler und Parodontalsonde nicht signifikant in ihrer Ablösungseffektivität voneinander unterscheiden.

Eine generell effizientere Ablösung des Biofilms bei gleichzeitig angelegtem E-Feld wird, wie schon in 4.1 illustriert, auch durch diese Ergebnisse anschaulich bewiesen.

4.4 Einfluss der Bekratzungszeit auf die Biofilmbilösung

In der Abb. 4.4.1 sind die Ergebnisse der Analyse der Effektivität der Biofilmentfernung in Abhängigkeit von der Bekratzungszeit (60 und 120 Sekunden) dargestellt. Das Bekratzungsinstrument (Scaler) sowie das Spülmedium PBS blieben in 4.4 konstant. Die Instrumentenspitze stellte die Kathode dar.

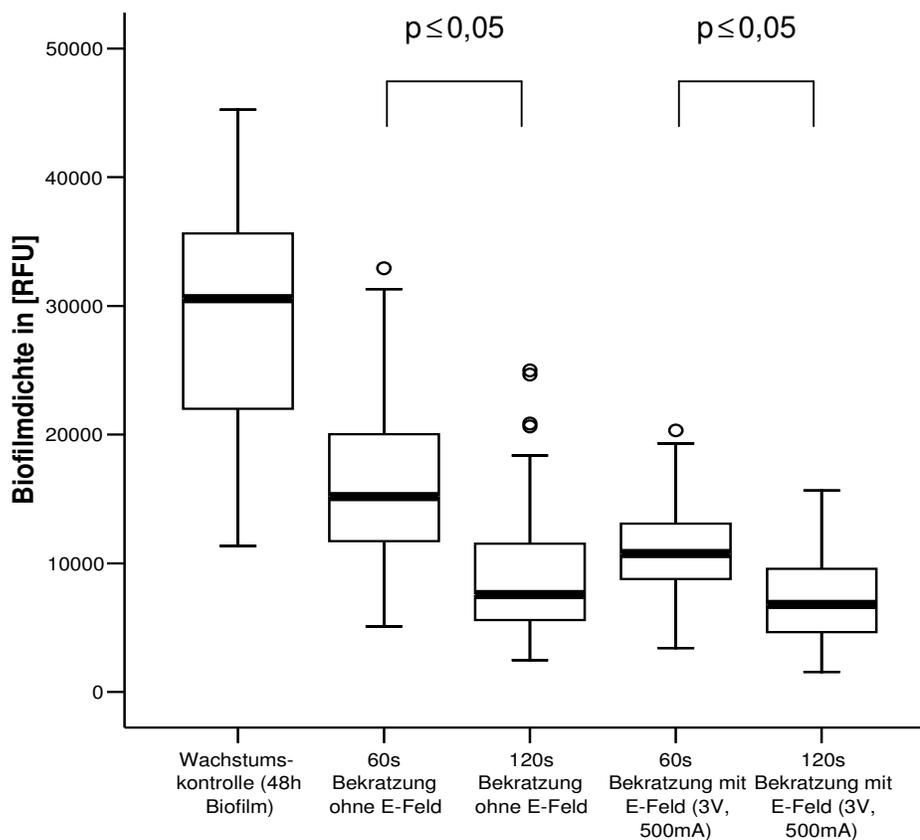


Abb. 4.4.1 Wachstumskontrolle, 60sekündige und 120sekündige mechanische Biofilmentfernung ohne E-Feld und 60 sowie 120sekündige mechanische Biofilmentfernung mit E-Feld (3 V, 500 mA)

In Abb. 4.4.1 wird die über Fluoreszenz gemessene Biomasse der Wachstumskontrolle, nach 60sekündiger Bekratzung des Titanprobenkörpers sowie nach 120sekündiger Bekratzung ohne angelegtem E-Feld dargestellt. Zusätzlich zeigt die Abbildung 4.4.1 graphisch die Ergebnisse 60sekündiger sowie 120sekündiger Bekratzung mit angelegtem E-Feld (3 V, 500 mA).

Die Analyse der Ergebnisse in 4.4 zeigt, dass die abgelöste Biomasse bei verdoppelter Bekratzungszeit signifikant ansteigt. Nach 120 Sekunden Bekratzung sind die Unterschiede in der abgelösten Biofilmmasse mit und ohne angelegtem elektrischen Feld deutlich geringer ausgeprägt als bei 60 Sekunden Bekratzung mit und ohne E-Feld.

4.5 Einfluss des Spülmediums auf die Biofilmbablösung

In der folgenden Abbildung 4.5.1 wird der unterschiedliche Einfluss auf die Ablösungseffektivität des Biofilms bei mechanischem Bekratzen unter angelegtem E-Feld zwischen der standardmäßig verwendeten PBS Spülung und einer 0,1%igen CHX Lösung als Spülmedium dargestellt. Die Bekratzungszeit von 60 Sekunden, das Bekratzungsinstrument (Scaler) sowie die Einstellungen am Stromgenerator von 1,5 V und 500 mA blieben in 4.5 konstant. Die Instrumenten-spitze stellte die Anode dar.

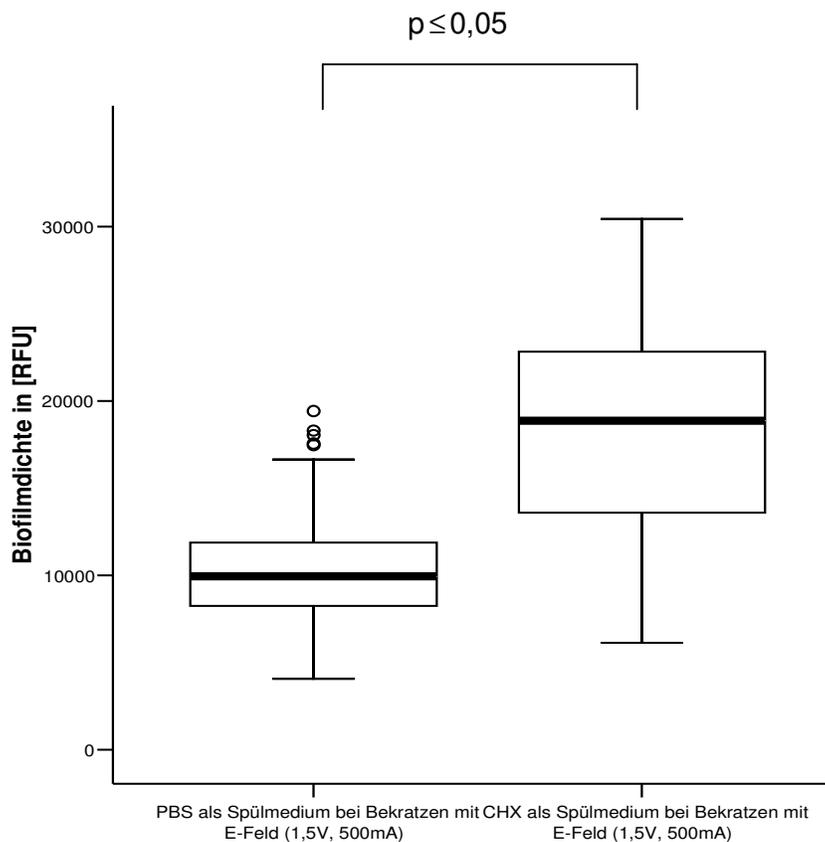


Abb. 4.5.1 Restliche Biofilmmasse nach mechanischer Bekratzung unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes (1,5 V, 500 mA) unter Verwendung unterschiedlicher Spülmedien: links PBS, rechts CHX

In Abb. 4.5.1 wird die über Fluoreszenz gemessene Biomasse nach 60sekündiger Bekratzung des Titanprobenkörpers bei angelegtem E-Feld unter Verwendung der PBS Spüllösung sowie nach 60sekündiger Bekratzung des Titanprobenkörpers bei angelegtem E-Feld unter Verwendung einer CHX Spüllösung dargestellt.

Die Analyse der Ergebnisse verdeutlicht, dass mit PBS gespülte Probenkörper eine signifikant höhere Effizienz der mechanischen Biofilmreduktion bei einem gleichzeitig angelegten elektrischen Feld aufweisen, als Probenkörper, die mit CHX gespült wurden.

5 Diskussion

5.1 Material

5.1.1 Titan als Oberfläche für bakterielle Besiedlung

In Experimenten mit *in vitro* Biofilmmodellen kommen neben Titan häufig Hydroxyl- oder Glasplättchen sowie diverse Füllungswerkstoffe (Komposite, Amalgame, etc.) zur Anwendung. Da Hydroxylapatit, Glas und Kunststoffe eine starke Eigenfluoreszenz aufweisen und eine Auswertung der Probenkörper im Fluoreszenzphotometer geplant war, wurde als Oberfläche für die hier dargestellten Untersuchungen ein bereits etablierter Titanplättchenträger verwendet.

Titan wird seit vielen Jahren sowohl legiert als auch unlegiert in den verschiedensten Bereichen der Technik und Medizin eingesetzt und zeichnet sich besonders durch seine gute Biokompatibilität aus. Titan gilt als reaktives Metall, das auf seiner Oberfläche spontan eine sehr resistente, ca. 2-10 nm dicke Oxidschicht ausbildet [70]. Diese besteht aus TiO , TiO_2 und TiO_3 , wobei das TiO_2 das häufigste Oxid darstellt [71]. Bei Verletzung der Passivierungsschicht, wie hier beim Bekratzen der Plättchen, verbleibt die Oberfläche kurzfristig in einem aktiven Zustand, um sich dann innerhalb von Sekunden wieder oxidisch umzuwandeln [72]. Eine vollständige Wiederausbildung der Oxidschicht kann nur unter aeroben Bedingungen erfolgen. Der im Wasser gelöste Sauerstoff ist aber im Allgemeinen ausreichend für eine - zumindest teilweise - Ausbildung des Oxids. Beim Bekratzen der Plättchen ist also immer mit einer evtl. unvollständigen oder nichtstöchiometrischen Oxidschicht zu rechnen, wobei letztere die gleiche elektrische Leitfähigkeit zeigt wie Passivschichten auf Kobalt - oder Eisenbasislegierungen. Durch die geringe Dicke und die hohe Störstellendichte wird in den Oxidschichten bereits mit einer angelegten Spannung von ca. 10 bis

100 mV die Durchbruchfeldstärke erreicht und die isolierenden Eigenschaften gehen lokal verloren. Insgesamt wird also immer ein gewisser Spannungsabfall über der Oxidschicht zu beobachten sein.

Diese elektrischen Oberflächeneigenschaften des Titans können daher reversibel oder irreversibel die Konformation anhaftender Biomakromoleküle an der Grenzfläche zum bakteriellen Biofilm, verändern [73].

In der vorliegenden Arbeit wurde reines Titan - Grade 2 - unpoliert und ohne spezielle Vorbehandlung verwendet. Die Beschaffenheit einer optimal biokompatiblen Oberfläche von Titanprobenkörpern wird kontrovers diskutiert. Einerseits wird eine möglichst raue Oberfläche gefordert, weil sich darauf ein Biofilm am besten bilden kann [26,32,74], andererseits wird zum Teil nicht die Rauigkeit, sondern die Hydrophobie der Oberfläche als ausschlaggebend erachtet [75]. Einigkeit herrscht hinsichtlich der Oberflächenladung. Eine hohe freie Energie [32], bzw. eine positiv geladene Oberfläche, ist für bakterielle Anheftung förderlich [74].

5.1.2 Farbstoff

Syber-Green-I stellt einen hoch sensitiven fluoreszierenden DNA Farbstoff dar. Er gehört in die Gruppe der Totfarbstoffe.

Prinzipiell wären auch die Anwendung anderer die bakterielle DNA markierende Farbstoffe möglich gewesen. Ausschlaggebend für die Wahl dieses Farbstoffes war zum einen seine einfache Handhabung und seine hohe Sensibilität, auch geringe Mengen DNA sicher zu färben. Zum anderen passte er durch sein Exzitationsmaximum von 497 nm und Emmissionsmaximum von 520 nm am besten zu den vorhandenen optischen Filtern des Fluoreszenzmessgerätes, welche ihre jeweiligen Maxima bei 485 nm und 535 nm besitzen.

5.2 Methode

5.2.1 Biofilmmodell

Wegen seiner großen Bedeutung als Pionierkeim bei der Entstehung oraler bakterieller Biofilme wurde in der vorliegenden Versuchsanordnung als Modellkeim *Streptococcus sanguinis* DSM 20068 in einer Monokultur verwendet. *Streptococcus sanguinis* gehört innerhalb der Gattung der Streptococcaceae in die Gruppe der oralen Streptokokken, auch Viridans Streptokokken genannt, zur Mitis - oder Oralis-Gruppe. Als fakultativer Anaerobier bildet er sowohl lösliche als auch unlösliche extrazelluläre Glukane und gehört zu den initialen Besiedlungskeimen auf Oberflächen im oralen Bereich [7,23,32,33,54,55,80]. Sein Vorkommen beschränkt sich nicht nur auf die supragingivale Plaque, sondern erstreckt sich auch auf subgingivale Bereiche [52,76]. Von Relevanz bei der Bakterienstammauswahl war außerdem, dass *Streptococcus sanguinis* besser als andere Stämme (z.B. *S. mutans*, *S. mitis*, *S. salivarius*) an Oberflächen adhärert und mechanisch stabile Biofilme ausbildet [53]. Der Keim erreicht durch einen relativ hohen metabolischen Quotienten rasch hohe Zellzahlen [77,81] und ist somit gut als Testkeim für ein Biofilmmodell geeignet [30].

In der Literatur wird häufig die Verwendung polymikrobieller Biofilmmodelle gefordert [14,61,78]. Nur diese könnten das komplexe mikrobielle Geschehen in der Mundhöhle annähernd physiologisch korrekt abbilden [36,46,79] und somit eine in vivo Situation simulieren [57,80,81].

Da es sich im vorliegenden Fall jedoch um eine Pilotstudie handelt, die zunächst nur prinzipielle Grundmechanismen analysieren soll, wurde bewusst ein möglichst einfaches und leicht reproduzierbares Modell gewählt. Der in den Versuchsreihen auf Titan Plättchen kultivierte Biofilm stellt mit 48h Inkubationszeit einen jungen Biofilm dar [80], der aufgrund seiner relativen Homogenität reproduzierbar auszuwerten war.

5.2.2 Versuchsaufbau

Trotz sorgfältigen Rüttelns der ausplattierten Aussaatproben und wegen der unvermeidlich auftretenden Schwankungen der Keimzahl pro Well-Schale sind die am Ende der zeitlich limitierten Wachstumsphase gemessenen Werte der Biofilmmasse nur innerhalb einer Versuchsreihe direkt vergleichbar.

Eine Standardisierung des Versuchsaufbaus konnte nicht zu 100% gewährleistet werden, da der Bekratzungs- und Spülvorgang der Titanprobenkörper nicht durch eine Roboterkonstruktion erfolgte. Da aber im Rahmen dieser Studie mehr als 300 Plättchen allein in Vorversuchen manuell bekratzt wurden, kann von einem ausreichend standardisierten Vorgehen ausgegangen werden.

5.2.3 Auswertung

Das Fluoreszenzmessgerät ermöglichte es, die Dichte und Homogenität des bakteriellen Biofilms graphisch wiederzugeben. Durch einen qualitativen Vergleich dichter und weniger dicht von Biofilm bewachsener Areale auf dem Titanplättchen entstanden so die Rohdaten der verschiedenen Versuchsreihen. Absolutwerte konnten mit dieser Messmethode nicht erzielt werden, da es aus technischen Gründen keine absoluten Zahlenwerte für Fluoreszenz gibt.

Hieraus resultiert die Einheit [RFU] für die Intensität der Fluoreszenz (RFU = relative Fluoreszenz-Units), welche im vorliegendem Versuch die Biofilmdichte beschreibt.

Vor jeder Messung wurde eine automatische Eichung der empfindlichen Lichtblitzsensoren des Fluoreszenzmessgerätes durchgeführt, so dass Versuchsreihen eines Versuches nur mit Versuchsreihen anderer Versuche annähernd verglichen werden konnten, wenn beide Versuche mit den RFU Werten ihrer Wachstumskontrolle ein annähernd gleiches Level erreichten.

Eine Betrachtung unter dem Fluoreszenzmikroskop erlaubte es, die rein quantitativ erhobenen Messwerte des Fluoreszenzphotometers für jedes Plättchen individuell zu relativieren. Hier fiel auf, dass sich die Streptokokken bevorzugt an Randstrukturen und Kanten des Titanplättchens, besonders im Bereich der Bohrung akkumulierten. Deutlich erhöhte Einzelmesswerte bis hin zu stark erhöhten Durchschnittswerten eines ganzen Plättchens konnten auf diesem Weg herausgefunden und erklärt werden.

Als Fehlerquellen bei der Fluoreszenzmessung kamen neben dem bevorzugten Kantenbewuchs der Streptokokken ein insgesamt inhomogener Biofilm, ein Biofilmwachstum in mehreren Schichten oder Farbstoffartefakte wie übermäßige Farbakkumulationen am Plättchenrand sowie Mikroverunreinigungen des Plättchens selbst in Frage.

5.3 Ergebnisse

5.3.1 Vorversuche

Die Vielzahl der Ergebnisse der Vorversuche, die über einen Zeitraum von ca. einem Jahr gesammelt wurden, hatte primär die Etablierung des Biofilmmodells zum Ziel.

Frühzeitige Erfolge einer verbesserten mechanischen Biofilmreduktion durch ein zeitgleich angelegtes elektrisches Feld bekräftigten die Vermutung, dass ein gewisser Ladungseinfluss, der sog. „Ladungseffekt“, die Integrität des Biofilms schwächen bzw. zerstören könne. Durch feinere Abstimmungen der Stromstärke und Reduzierung der Vorspannung sowie zahlreiche Veränderungen im Versuchsaufbau bezüglich der Inkubationszeiten des Biofilms, gelang es schließlich, das Versuchsprotokoll insoweit zu optimieren, dass gezielte, standardisierte Bekratzungsversuche an homogen mit Biofilm bewachsenen Titanplättchen reproduzierbar durchgeführt werden konnten.

Der zu Beginn der Arbeit für einen homogenen Bewuchs der Probenkörper festgestellte Vorteil eines schwach eingestellten Schüttlers, der sich im Inneren eines Brutschranks befand, erwies sich für die Versuche als nicht entscheidend. Des Weiteren benötigten die Streptokokken keinen Saccharosezusatz im Nährmedium, um sich effizienter zu vermehren.

Neben der Etablierung der gesamten Methode stellten diese zwei Tatsachen zusammen mit dem entwickelten Zeitplan für das Inkubationsprotokoll sowie die Verwendung einer Spülung der Probenkörper vor und nach dem Bekratzen die wesentlichen Erfolge der Vorversuche und die Grundlagen für die Versuche dar.

5.3.2 Versuche

5.3.2.1 Der Einfluss des elektrischen Feldes

Verwendet wurde ein einfach gehaltener Versuchsaufbau, bestehend aus einem Gleichstromkreis, der aus einem Generator mit einstellbarer Spannungs- und Strombegrenzung gespeist wurde. Die Einstellung des Generators war zwar nur in groben Schritten möglich, eine feinere Abstimmung war für diese Arbeit aber nicht Voraussetzung.

Die auf dem Display des Generators angezeigten Spannungswerte wurden sowohl direkt am Austritt des Gehäuses, als auch an der Instrumentenspitze bzw. auf dem Titanplättchen mit einem separaten Messgerät verifiziert um den Einfluss von Spannungsabfall in den Zuleitungen zu eliminieren. Standard-einstellungen des Generators waren 3 V Vor- bzw. Ausgangsspannung bei maximal 500 mA Stromstärke (Variationen siehe 4.).

Bei Berührung der Titanoberfläche mit der Arbeitsspitze des Handinstruments entstand annähernd ein Kurzschluss und die Spannung fiel auf Werte bis auf wenige mV ab. Diese Restspannung kann durch die Annahme einer dünnen resistiven Schicht zwischen Spitze und Oberfläche erklärt werden. Eine

permanente niederohmige Verbindung (Kurzschluss) zwischen Arbeitsspitze und Titan ist wegen der Oxidschicht des Titans, und der ständigen Bewegung des Instruments sehr unwahrscheinlich.

Da bei Bewegung der Arbeitsspitze in einzelnen Fällen ein Lichtbogen sichtbar wurde, kann aus dieser Beobachtung und der Kenntnis der elektrischen Durchbruchfeldstärke in Luft von ca. 10 kV/cm (bei Atmosphärenbedingungen) und einer Lichtbogenbrennspannung von ca. 100 V/cm die tatsächliche elektrische Feldstärke zwischen diesen beiden Grenzen grob nach oben und unten eingegrenzt werden.

Bei den im vorliegenden Versuch kleinen Abständen (wenige μm) zwischen Titanoberfläche und Arbeitsspitze ist zwar gemäß der Paschen-Kurve die aktuelle Durchbruchfeldstärke deutlich größer als 10 kV/cm, allerdings ergibt sich durch die Feldlinienkonzentration um die Spitze des Scalers selbst eine erhebliche Verringerung der realen Durchbruchfeldstärke, so dass durch die beiden gegenläufigen Effekte die obige Abschätzung der tatsächlichen Feldstärke realistisch ist.

Für genauere Werte der Feldstärke bzw. Spannung müsste über die genannten Korrekturen hinaus auch die präzise Zusammensetzung der Medien zwischen Spitze und Titanoberfläche ermittelt werden, da sich auch ein dünner Feuchtigkeitsfilm zwischen Spitze und Oberfläche befand. Der genaue Abstand sowie exakte Werte der tatsächlich anliegenden Spannung sind für die Interpretation der Ergebnisse nicht von entscheidender Relevanz.

Es kann aber als gesichert gelten, dass im Spalt zwischen Spitze und Oberfläche sowohl hohe elektrische Feldstärken als auch Stromdichten auftreten.

Insgesamt kann geschlossen werden, dass abhängig von der Feldstärke und von der spezifischen Ladung der jeweiligen Zelle bzw. des jeweiligen Strukturproteins eine gewisse Kraft auf den Biofilm bzw. auf die Matrix oder auf die Bakterien selbst ausgeübt wird. Anzunehmen ist auch, dass durch den Ladungseinfluss des E-Feldes und die thermische Wirkung der hohen

Stromdichten Strukturveränderungen im Biofilm und Konformationsänderungen einzelner Proteine der Matrix stattfinden.

Ähnlich mechanistische und wenig konkrete Interpretationen über Ladungseinflüsse auf Biofilme finden sich vereinzelt auch in der Literatur wieder [1,17], wo davon ausgegangen wird, dass eine Verbesserung der mechanischen oder chemischen Ablösung bzw. Zerstörung bakterieller Biofilme nur durch ein zeitgleich angelegtes elektrisches oder magnetisches Feld erreicht werden kann.

Es kann also gesagt werden, dass anlehnend an die Ergebnisse anderer Studien mit ähnlichem Versuchsaufbau [39,41,64,68] hier eine deutliche Verbesserung der mechanischen Ablösung durch die zeitgleiche Aufschaltung eines elektrischen Feldes erreicht werden konnte. Neu ist, dass diese effizientere Ablösung durch ein über das Handinstrument angelegtes elektrisches Feld direkt erfolgte, und nicht indirekt über unter Spannung gesetzte Elektrolytlösungen [1,43,44] stattfand.

Die Polung des Stromkreises spielte bei den im Versuchsaufbau verwendeten Feldstärken keine ausschlaggebende Rolle für die Biofilmablösung. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten, relativ starken elektrischen Ströme könnten durch ihre thermische Wirkung bereits erheblich für die Zerstörung des Biofilmes verantwortlich sein, was einen eventuell vorhandenen Effekt der Richtung des elektrischen Feldes maskieren würde.

Daher ist eine separate Untersuchung des Einflusses der Messparameter Feldstärke und Stromdichte, sowie die Verwendung von Wechselstrom verschiedener Frequenzen in weiteren Studien geplant.

5.3.2.2 Der Einfluss verschiedener Behandlungsinstrumente

Zu Beginn der Experimente wurden ein scharfer Jaquard-Scaler (Hu-Friedy, SM 26), eine stumpfe Marquis PCP 12 Parodontalsonde sowie eine flächig scharfe Hirschfeld Parodontalfeile modifiziert (siehe 3.1.2.1).

In den Versuchen kam die Hirschfeldfeile nicht mehr zur Verwendung, weil sich ihr flächig breites Arbeitsende in den Vorversuchen sowohl für eine präzisere punktuelle E-Feld Applikation als auch für eine mikroskopische Kratzspurenanalyse als nachteilig darstellte. Hier ließen sich unter dem Mikroskop sehr breite sowie sich überlagernde Spuren durch den Biofilm im Vergleich zu den anderen Instrumenten erkennen.

Zwischen Scaler und Parodontalsonde zeichneten sich schon in den Vorversuchen relativ geringe Unterschiede in der Biofilmablösungseffizienz ab. In den Versuchsergebnissen wurde dies in 4.3.1 verifiziert. Gründe für die nicht signifikanten Unterschiede in der Effizienz der Biofilmablösung beider Instrumente sind in der ähnlichen Geometrie des jeweiligen Arbeitsendes und der jeweils kleinen Auflagefläche auf dem Probenkörper zu suchen. Da es sich im vorliegenden Experiment um einen planen Probenträger handelte, dessen Oberfläche bekratzt wurde, spielten die typischen Vorteile des Scalers, in Nischen und punktuell an gebogenen Zahnoberflächen zu reinigen, keine entscheidende Rolle.

5.3.2.3 Der Einfluss der Bekratzungszeit

Bei kritischer Betrachtung des Einflusses der Bekratzungs- bzw. der Behandlungszeit auf die Biofilmreduktion muss diskutiert werden, ob die deutliche Reduktion des Biofilms nach der doppelten Zeit (120 Sekunden) in erster Linie durch länger anhaltende Ladungseffekte, oder durch die länger andauernde mechanische Ablösung selbst erreicht wurde. Letzteres scheint

realistischer, da das Reduktionsverhältnis ohne E-Feld und mit E-Feld annähernd gleich ist (siehe 4.4).

Je länger das Entfernen des Biofilms dauert, desto mehr scheint der Effekt der reinen mechanischen Ablösung in den Vordergrund zu treten bzw. je schneller es gelingt, den Biofilm mit entsprechenden Instrumenten bei angelegtem elektrischen Feld zu erreichen, desto effizienter kann die mechanische Ablösung erfolgen. Ein linearer Zusammenhang zwischen Bekratzungszeit und Biofilmreduktion konnte in dieser Arbeit jedoch nicht beobachtet werden.

5.3.2.4 Der Einfluss des Spülmediums

In den Vorversuchen traten zu Beginn der Studie vermehrt große Schwankungen bei den Messwerten der jeweils gleichen Versuchsreihe auf. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Probenkörper weder vor noch nach dem Bekratzen ab gespült.

Es lag daher nahe, anzunehmen, dass sich beim erstmaligen Herausnehmen des Probenkörpers unmittelbar vor dem Bekratzen in der jeweiligen Kammer der Wellschale frei schwimmende Streptokokken-Konglomerate bzw. Kolonien zusätzlich auf der Biofilm- bzw. Titanoberfläche ablagerten.

Man musste auch davon ausgehen, dass beim Zurücklegen des Probenkörpers in die Wellschale durch den Kratzvorgang abgelöste oder noch nicht auf der Biofilmoberfläche adhärierte Bakterien in der jeweiligen Kammer der Wellschale wieder auf die Titanoberfläche gelangten und so eine reproduzierbare Auswertung verfälschten und unmöglich machten.

Nach Meinung des Autors trugen aber die durch den Kratzvorgang selbst losgelösten Biofilmfragmente den größten Anteil an den anfänglichen Schwankungen der Messwerte.

Um diese Verfälschungen zu vermeiden, und für reproduzierbarere Verhältnisse zu sorgen, wurde jedes Titanplättchen unmittelbar vor und nach dem Bekratzen mit 5-10 ml PBS oder CHX ab gespült (siehe 3.1.4.3).

CHX in 0,1%iger Lösung als Alternative zur standardmäßig verwendeten PBS Spülung stellte sich vor allem deswegen als ungünstiger in Bezug auf die Biofilmauflösung dar, weil es durch seine in diesen Experimenten „biofilmverklebende“ Wirkung zu deutlich höheren Fluoreszenzintensitätswerten führte (siehe 4.5). Unter dem Mikroskop stellte sich heraus, dass bei mit CHX gespülten Probenkörpern eindeutig ein dickerer Restbiofilm sowie eine vermehrte Farbstoffaufnahme des auf den Probenkörpern verbliebenen Biofilms zu erkennen war.

Ob es sich hier lediglich um gesteigerte Farbstoffreaktionen mit dem Biofilm oder um die oben angesprochene Biofilmverklebende Wirkung des CHX handelte, kann nicht eindeutig gesagt werden.

Die verwendete CHX Spülung wies darüber hinaus eine, bedingt durch ihre Elektrolytzusammensetzung, schlechtere elektrische Leitfähigkeit auf als die PBS Spülung. Ein möglicher Einfluss der Elektrolytzusammensetzung der Spülmedien auf die Biofilmauflösung konnte in dieser Studie nicht gezeigt werden, da das E-Feld bzw. der Stromkreis gleichzeitig über Elektrolyt, Biofilm und Titanprobenkörper geschlossen wurde.

6 Zusammenfassung

Bakterielle Biofilme spielen eine zentrale Rolle in der Ätiologie von Karies und der Erkrankungen des Zahnhalteapparates. Die regelmäßige mechanische Entfernung supra - sowie subgingivaler Zahnbeläge nimmt daher eine zentrale Stellung in der Therapie und Prävention dieser Erkrankungen ein. Aufgrund der vielfältigen bakteriellen Adhäsionsmechanismen gestaltet sich in der klinischen Praxis die effektive Entfernung bakterieller Biofilme häufig als sehr schwierig und zeitaufwändig.

Aus diesem Grund wurden zahlreiche Versuche unternommen, die rein mechanische Reinigung in ihrer Effektivität durch den Einsatz zusätzlicher chemischer oder physikalischer Verfahren zu steigern. Zu den noch relativ unerforschten Phänomenen gehört der Einfluss elektrischer Ladungen und Felder auf das bakterielle Adhäsionsverhalten.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, in einem in vitro Biofilmmodell zu untersuchen, inwieweit die Effizienz mechanischer Plaqueentfernung durch die zeitgleiche Aufschaltung eines Gleichstroms niedriger Spannung verbessert werden kann.

Als Modellkeim zur Herstellung eines monomikrobiellen Biofilms wurde *Streptococcus sanguinis* DSM 20068 benutzt. Als Studienoberflächen zur Biofilmbildung wurden standardisierte Reintitanplättchen verwendet. Diese wurden mit *S. sanguinis* Kulturen beimpft und anschließend im Brutschrank 48 Stunden inkubiert bis ein geschlossener bakterieller Biofilm auf der Oberfläche entstanden war.

In einer standardisierten in vitro Versuchsanordnung wurde über ein modifiziertes Handinstrument, das zur mechanischen Bekratzung der biofilmbedeckten Titanplättchen verwendet wurde, ein Gleichstromkreis geschlossen. Ebenso wurden der Einfluss weiterer Parameter wie Spülmedium oder Form der Instrumentenarbeitspitze auf die Effizienz der Biofilmentfernung

untersucht. Die angelegten Spannungen differierten zwischen 1,5 V und 6 V bei einer konstant gehaltenen Stromstärke von 500 mA.

Bei einer angelegten Spannung im Bereich von 6 V und 500 mA Stromstärke war eine signifikant stärker ausgeprägte Reduktion des Biofilms im Vergleich zur Kontrolle ohne angelegtem elektrischen Feld zu beobachten.

Die Richtung des Gleichstromes, die Stärke des elektrischen Feldes sowie das Design des Handinstruments hatten beim vorliegenden Versuchsaufbau keinen signifikanten Einfluss auf die Biofilmreduktion.

7. Literaturverzeichnis

- 1 **Costerton JW, Ellis B.**
Mechanism of electrical enhancement of efficiency of antibiotics in killing
biofilm bacteria
Antimicrob Agents Chemother 1994; 38(12): 2803-9.
- 2 **Hoyle BD, Costerton JW, Jass J**
The biofilm glycocalyx as a resistance factor
J Antimikrob Chemoth 26(1) 1-5 (1990)
- 3 **Gilbert P**
The value of in –vitro models to the study of biofilms
Cardiff 13-16 (1995)
- 4 **Costerton JW**
Introduction to biofilm
International J Antimikrob Agents 11(3-4)217-221, 237-239 (1999)
- 5 **Mc Kee AS, Mc Dermind AS, Ellwood DC, Marsh PD**
The establishment of reproducible, complex communities of oral bacteria
in the chemostat using defined inocula
J Dent Res 66(8) 1315-1320 (1985)
- 6 **Keevil CW, Bradshaw DJ, Dowsett AB, Feary TW**
Microbial Film formation: dental plaque deposition on acrylic tiles using
continuous culture techniques
J Appl Bacteriol 62(2) 129-138 (1987)
- 7 **Marsh PD**
Microbiological aspects of the chemical control of plaque and gingivitis
J Dent Res 71(7) 1431-1438 (1992)
- 8 **Bryers JD**
Bacterial biofilms

- 9 Curr Opin Biotech 4(2) 197-204 (1993)
Wimpenny JW
Laboratory growth systems in biofilm research
Cells and Materials 6(1-3) 221-232 (1996)
- 10 **Stickler D**
Biofilms
Curr Opin Microbiol 2(3) 270-275 (1999)
- 11 **Schierholz JM, Beuth J, König D, Nürnberger A, Pulverer G**
Antimicrobial substances and effects on sessile bacteria
Bacteriol 289(2) 165-177 (1999)
- 12 **Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-
Scott HM**
Microbial Biofilms
Annu Rev Microbiol 49 711-745 (1995)
- 13 **Costerton JW, Lewandowski Z, DeBeer D, Caldwell D, Korber D,
James G**
Biofilms, the customized microniche
J Bacteriol 176(8) 2137-2142 (1994)
- 14 **Costerton JW**
Overview of microbial biofilms
J Int Microbiol Biot 15(3) 137-140 (1995)
- 15 **Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP**
Bacterial biofilms: common cause of persistent infections
Science 284(5418) 1318-1322 (1999)
- 16 **Hoyle BD, Costerton JW**
Bacterial resistance to antibiotics: the role of biofilms
Prog Drug Res 37 91-105 (1991)
- 17 **Johnson LL, Peterson RV, Pitt WG**
Treatment of bacterial biofilms on polymeric biomaterials using antibiotics
and ultrasound

- J Biomat Sci-Polym E 9(11) 1177-1185 (1998)
- 18 **Anwar H, Costerton JW**
Enhanced activity of combination of Tobramycin and Piperacillin for eradication of sessile biofilm cells of *pseudomonas aeruginosa*
Antimicrob Agents Chem 34(9) 1666-1671 (1990)
- 19 **Wattanakaroon W, Stewart PS**
Electrical enhancement of *streptococcus gordonii* biofilm killing by gentamicin
Archives of Oral Biology 45(2) 167-171 (2000)
- 20 **Costerton JW**
Cleaning techniques for medical devices: biofilms
Biomed Tech 31(3) 222-226, 247 (1997)
- 21 **Peyton BM, Characklis WG**
Microbial biofilms and biofilm reactors
Bioprocess Technol 20 187-231 (1995)
- 22 **Wilson M, Patel H, Fletcher J**
Susceptibility of biofilms of *streptococcus sanguinis* to chlorhexidine gluconate and cetylpyrimidinum chloride
Oral Microbiol Immun 11(3) 188-192 (1996)
- 23 **Liljemark WF, Bloomquist CG, Reilly BE, Bernards CJ, Townsend DW, Pennock AT**
Growth dynamics in a natural biofilm and its impact on oral disease management
Adv Dent Res 11(1) 14-23 (1997)
- 24 **Thrower Y, Pinney RJ., Wilson M**
Susceptibilities of *actinobacillus actinomycetemcomitans* biofilms to oral antiseptics
J Med Microbiol 46(5) 425-429 (1997)
- 25 **Embleton JV, Newman HN, Wilson M**

- Influence of growth mode and sucrose on susceptibility of *streptococcus sanguinis* to amine fluorides and amine fluoride-inorganic fluoride combinations
Appl Environ Microb 64(9) 3503-3506 (1998)
- 26 **Bradshaw DJ, Marsh PD**
Use of continuous flow techniques in modelling dental plaque biofilms
Method Enzymol 310 279-296 (1999)
- 27 **Marsh PD**
Microbiologic aspects of dental plaque and dental caries
Dent Clin North Am 43(4) 599-614 (1999)
- 28 **Kinniment SL, Wimpenny JW, Adams D, Marsh PD**
Development of a steady-state oral microbial biofilm community using the constant-depth film fermenter
Microbiology 142(3) 631-638 (1996)
- 29 **Hardie JM, Bowden GH**
Bacterial flora of dental plaque
Brit Med Bull 31(2) 131-136 (1975)
- 30 **Appelbaum B, Golup E, Holt SC, Rosnan B**
In vitro studies of dental plaque formation: adsorption of oral streptococci to hydroxyapatite
Infect Immun 25(2) 717-728 (1979)
- 31 **Gjeramo P**
Chlorhexidine and related compounds
J Dent Res 68 1602-1608 (1989)
- 32 **Scheie AA**
Mechanismus of dental plaque formation
Adv Dent Res 8(2) 246-253 (1994)
- 33 **Marsh PD, Bradshaw DJ**
Dental plaque as a biofilm
Int Dent J 49(4) 399-406 (1993)

- 34 **Bowden GH, Hamilton IR**
Survival of oral bacteria
Crit Rev Oral Biol M 9(1) 54-85 (1998)
- 35 **Gottenbos B, van der Mei HC, Bussher HJ**
Models for studying initial adhesion and surface growth in biofilm formation on surfaces
Method Enzymol 310 523-534 (1999)
- 36 **Wilson M**
Use of constant depth film fermenter in studies of biofilms and oral bacteria
Method Enzymol 310 264-279 (1999)
- 37 **Marsh PD**
Antimicrobial strategies in the prevention of dental caries
Caries Res 27(1) 72-76 (1993)
- 38 **Pitten FA, Doering S, Kramer A, Rosin M**
In vitro assay for the screening of the plaque-reducing activity of antimicrobial agents
Arzneim Forsch Drug Res 53(3) 182-187 (2003)
- 39 **Ueshima M, Tanaka S, Nakamura S, Yamashita K**
Manipulation of bacterial adhesion and proliferation by surface charges of electrically polarized hydroxyapatite
Inc J Biomed Mater Res 60 578-584 (2002)
- 40 **Benson DE, Grissom CB**
Magnetic field enhancement of antibiotic activity in biofilm forming *Pseudomonas aeruginosa*
Asajo Journal 40(3) M371-6 (1994)
Antimicrob Agents Chemother 38(12) 2803-9
- 41 **Stoodley P, deBeer D, Lappin-Scott HM**
Influence of electric fields and pH on biofilm structure as related to the bioelectric effect

- Antimicrob Agents Chemother 41(9) 1876-9 (1997)
- 42 **Stewart PS, Costerton JW**
Antibiotic resistance of bacteria in biofilms
Lancet 358(9267) 135-138 (2001)
- 43 **Stewart PS, Wattanakaroon W, Goodrum L, Fortun SM**
Electrolytic generation of oxygen partially explains electrical enhancement of tobramycin efficiency against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm
Antimicrob Agents Chemother 43(2) 292-6 (1999)
- 44 **Wellman N, Fortun SM, McLeod BR**
Bacterial biofilms and the bioelectric effect
Antimicrobial Agents and Chemotherapy 40(9) 2012-4 (1996)
- 45 **Rose RK, Turner SJ**
Extracellular volume in streptococcal model biofilms: effects of pH, calcium and fluoride
Biochemical Biophysics Acta 1379(2) 185-90 (1998)
- 46 **Dibdin G, Wimpenny J**
Steady-state biofilm: practical and theoretical models
Method Enzymol 310 296-322 (1999)
- 47 **Roberts SK, Bass C, Brading M, Lappin-Scott H, Stoodley P**
Biofilm formation and structure: what's new? S.15-35
In: Newman HN, Wilson M (Editors)
Dental plaque revisited, oral biofilms in health and disease
BioLine (1999)
- 48 **Wimpenny JW**
Responses of microorganisms to physical and chemical gradients
Philos T Roy Soc B 297(1088) 497-515 (1982)
- 49 **Hellwig E, Klimek J, Attin T**
Einführung in die Zahnerhaltung
Urban und Schwarzenberg, München-Wien-Baltimore, (1995)

- 50 **Marsh PD, Martin MV**
Oral Microbiology
Georg Thieme Verlag, Stuttgart (2003)
- 51 **Sanderink RBA, Weber C**
Plaque S.301-315
In: Sanderink RBA, Bernhardt H, Knoke M, Meyer J, Weber C, Weiger R
(Editors) Orale Mikrobiologie und Immunologie
Quintessenz Verlags-GmbH, Berlin (2004)
- 52 **Rosan B, Appelbaum B, Campbell LK, Knox KW, Wicken AJ**
Chemostat studies of the effect of environmental control on
streptococcus sanguis adherence to hydroxyapatite
Infect Immun 35(1) 64-70 (1982)
- 53 **Rosan B, Malamud D, Appelbaum B, Golub E**
Characteristic differences between saliva-dependent aggregation and
adhesion of streptococci
Infect Immun 35(1) 86-90 (1982)
- 54 **Kolenbrander PE, Andersen RN, Kazmerzak K, Wu R, Palmer RJ Jr.**
Spatial organisation of oral bacteria in biofilms
Method Enzymol 310 322-332 (1999)
- 55 **Wilson M, Patel H, Noar JH**
Effect of chlorhexidine on multi-species biofilms
Curr Microbiol 36(1) 13-18 (1998)
- 56 **Masius H**
Untersuchungen zur Ökologie oraler Mikroorganismen in subgingivalen
Biofilmen mit Hilfe der Fluoreszenz in situ-Hybridisierung
Diplomarbeit, Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Charite, Humboldt-
Universität Berlin (2001)
- 57 **Pratten J, Smith AW, Wilson M**
Response of single species biofilms and microcosm dental plaques to
pulsing with chlorhexidine

- 58 J Antimicrob Chemoth 42(4) 453-459 (1998)
Amano A, Nakagawa I, Hamada S
Studying the initial phase of biofilm formation: molecular interaction of
host proteins and bacterial surface components
Method Enzymol 310 501-513 (1999)
- 59 **Kharazemi A, Giwercman B, Hoiby N**
Robbins device in biofilm research
Method Enzymol 310 207-215 (1999)
- 60 **Brown MR, Allison DJ, Gilbert P**
Resistance of bacterial biofilms to antibiotics: a growth-rate related
effect?
J Antimicrob Chemoth 22(6) 777-780 (1988)
- 61 **Gilbert P, Das J, Foley I**
Biofilm susceptibility to antimicrobials
Adv Dent Res 11(1) 160-167 (1997)
- 62 **Anwar H, Strap JL, Costerton JW**
Establishment of aging biofilms: possible mechanism of bacterial
resistance to antimicrobial therapy
Antimicrob Agents Chemoth 36(7) 1347-1351 (1992)
- 63 **Gilbert P, Collier PJ, Brown MR**
Influence of growth rate on susceptibility to antimicrobial agents: biofilms,
cell cycle, dormancy and stringent response
Antimicrob Agents Ch 34(10) 1865-1868 (1990)
- 64 **Schulz K, Pitten FA, Tschilschke W, Bernhardt H, Kocher T**
Einfluss des bioelektrischen Effekts auf die Plaque
Dtsch Zahnärztl Z 55 490-493 (2000)
- 65 **Williams RG, Pitt W**
In vitro response of *E.coli* to antibiotics and ultrasound at various
insonation intensities
J Biomat Sci-Polym E Appl 12(1) 20-30 (1997)

- 66 **Quian Z, Sagers RD, Pitt WG**
The effect of ultrasonic frequency upon enhanced killing of *P.aeruginosa*
biofilms
Ann Biomed Eng 25(1) 69-76 (1997)
- 67 **Khoury AE, Lam K, Ellis B, Costerton JW**
Prevention and control of bacterial infections associated with medical
devices
Asajo J 38(3) M174-178 (1992)
- 68 **Weiger R**
Klinisch-experimentelle Untersuchung über die Wirksamkeit der „Denta-
Solar“ mit integriertem Halbleiter aus TiO₂
Inaugural-Dissertation, Universitätsklinik für Zahn-, Mund- und Kiefer-
heilkunde, Poliklinik für Zahnerhaltung, Tübingen (1987)
- 69 **Mann HB, Whitney DR**
On a test of whether one of two random variables is stochastically larger
than the other
The Annals of mathematical statistics 18 50-60 (1947)
- 70 **Sibum H**
Titan und Titanlegierungen – vom Rohstoff bis zum Halbfertigfabrikat
S.245-258
In: Peters M, Leyens C (Editors), Titan und Titanlegierungen
Wiley-VCH, Weinheim (2002)
- 71 **Albrektsson T, Branemark PI, Hansson HA, Kasemo B, Larsson K,
Lundström I, McQueen D, Skalak R**
The interface zone of inorganic implants in vivo: titanium implant in the
bone
Ann Biomed Eng 11 S.1ff (1983)
- 72 **Brown D**
All you wanted to know about titanium, but were afraid to ask
British Dental Journal 182 (10) 393-394 (1997)

- 73 **Thull R**
Konstruktion und Oberflächengestaltung zementfrei implantierbarer
Hüftkopfprothesen S.539
In: Stuhler T, Hüftkopfnekrose
Springer Verlag Berlin-Heidelberg (1991)
- 74 **Apilanez I, Gutierrez A, Diaz M**
Effect of surface materials on initial biofilm development
Bioresource Technol 66(3) 225-230 (1998)
- 75 **Eginton PJ, Gibson H, Holah J, Handley PS, Gilbert P**
Strength of adhesion of bacteria to surfaces in biofilms S.61-64
In: Wimpenny J, Handley P, Gilbert P, Lappin-Scott H (Editors)
Life and Death of Biofilm
BioLine, Cardiff (1995)
- 76 **Millward TA, Wilson M**
The effect of chlorhexidine on *Streptococcus sanguinis* biofilms
Microbios 58 (236-237) 155-164 (1989)
- 77 **Bowden GH**
Controlled environment model for accumulation of biofilms of oral
bacteria
Method Enzymol 310 216-224 (1999)
- 78 **Bradshaw DJ, Marsh PD, Schilling KM, Cummins D**
A modified chemostat system to study the ecology of oral biofilms
J Appl Bacteriol 80(2) 124-130 (1996)
- 79 **Sissons CH**
Artificial dental plaque biofilm models
Adv Dent Res 11(1) 110-126 (1997)
- 80 **Larsen T, Fiehn NE**
Resistance of *Streptococcus sanguinis* biofilms to antimicrobial agents
APMIS 104(4) 280-284 (1996)

- 81 **Bowden GH, Li YH**
Nutritional influences on biofilm development
Adv Dent Res 11 81-99 (1997)