

## **2. Material und Methode**

### **2.1 Herstellung von Biofilmen**

#### **2.1.1 Materialien**

##### ***Bakterienstamm***

Eingesetzt wurde *Streptococcus sanguis* DSM 20068. Diese Streptokokken-Spezies ist von großer Bedeutung, da es sich hierbei um einen Primärkeim bei der Entstehung dentaler Plaque handelt.

##### ***Nährmedium***

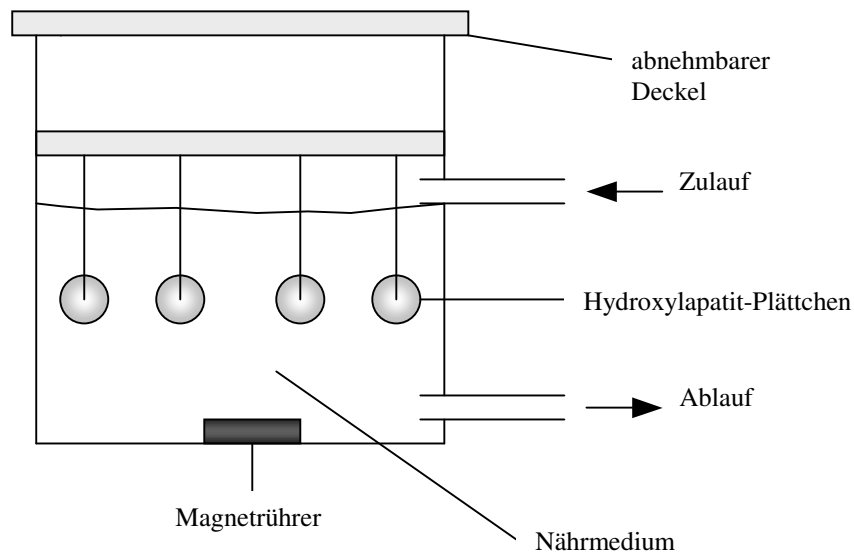
Als Wachstumsmedium für *S. sanguis* diente eine vor dem Versuch autoklavierte Hirn-Herz-Bouillon (BHI, s. Anhang), die mit 1% Saccharose supplementiert war.

##### ***Probekörper***

Die *S. sanguis*-Biofilme wurden auf keramischen Hydroxylapatit (HA)-Plättchen (Ø 13 mm, Dicke 1,5 mm, s. Anhang) gezüchtet. Als Gesamtoberfläche errechnet sich nach der Formel  $A = \pi d (d/2 + h)$  ein Wert von 18,07 mm<sup>2</sup>. Die Plättchen wurden mit einem Diamantschleifkörper (Ø 1 mm) unter Wasserkühlung an einer dentalen Einheit mittig durchbohrt. Durch das Loch konnte mittels eines Baumwollfadens eine Schlaufe geknotet werden, über die die Probekörper in der Wachstumskammer aufgehängt wurden.

### **Wachstumsammer**

Das Reaktionsgefäß (Abbildung 1) wurde selbst konstruiert. Es handelte sich dabei um ein Glasgefäß mit einem Durchmesser von 9 cm und einer Höhe von 10 cm. Da mit der kontinuierlichen Flusskultur-Technik (cfc = continuous flow culture technique) gearbeitet wurde, war im oberen Bereich ein Zulauf für das Nährmedium vorhanden.



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung der Wachstumsammer

Als Zulauf wurde ein sich konisch verjüngendes Glasröhrchen eingesetzt, auf das der Zuleitschlauch aufgesteckt wurde. In Bodennähe befand sich ein Glasrohr als Ablauf, das im Durchmesser auf einen autoklavierbaren Gummischlauch von ca. 8 cm Länge abgestimmt war. An den Gummischlauch wurde ein selbst konstruierter Glashahn angeschlossen. Mit ihm konnte zum einen der Ablauf verschlossen werden, so dass das komplette Gefäß den weiteren Versuchen zugeführt werden konnte, ohne das Nährmedium

ablassen zu müssen. Des weiteren diente der Hahn als Adapter zwischen dem Ablauf der Wachstumskammer und dem Schlauchsystem für die ableitende Peristaltikpumpe. Das Reaktionsgefäß wurde durch eine aufgelegte Glasplatte verschlossen. Im oberen Drittel der Wand befand sich ein Vorsprung, auf den ein Glaskreuz mit 8 Streben aufgelegt wurde. An diesen Streben wurden die Probekörper mittels Baumwollbindfäden aufgehängt. An jede Strebe konnten zwei Plättchen angebracht werden. Damit ergab sich eine Probekörperzahl von insgesamt 16 Stück pro Versuch.

Im Gefäß befand sich außerdem ein magnetischer Rührstab, der jeweils schon vor dem Autoklavierungsvorgang während der Aufbereitung des Testgefäßes zugefügt wurde.

#### ***Vorratsbehälter für das Nährmedium***

Als Vorratsgefäß für das Nährmedium diente eine Glasbürette. Diese hatte eine obere verschließbare Öffnung zum Befüllen vor bzw. während des Versuches. Mittels eines Glashahnes konnte der Ablauf des Nährmediums durch das abgehende Glasrohr unterbrochen werden. Am Ende des Glasrohres war ein ca. 8 cm langes Stück eines autoklavierbaren Gummischlauches angebracht. Dieser Schlauch diente als Adapter zur Aufnahme eines weiteren Glashahnes. Das eine Ende des Glashahnes passte im Durchmesser in den eben genannten Gummischlauch. Am anderen Ende war der Durchmesser reduziert, abgestimmt auf das anzuschließende Schlauchsystem der zuleitenden Peristaltikpumpe.

#### ***Peristaltikpumpe***

Für die Steuerung der Zufuhr und der Ableitung des Nährmediums diente jeweils ein Sondomat<sup>®</sup> der Firma Fresenius (s. Anhang). Dieser konnte ml-genau eingestellt werden. Das für dieses Gerät benötigte

Schlauchsystem wurde modifiziert, indem die Anschlüsse für die Flasche bzw. die Flexüle abgetrennt wurden. Der verbleibende Schlauch passte dann genau auf den oben beschriebenen Glashahn und auf die Zuführöffnung am Reaktionsgefäß.

### **2.1.2 Versuchsaufbau**

Die Versuchsanordnung war in drei Etagen gegliedert.

In der mittleren Etage spielte sich die eigentliche Biofilmherstellung ab. Dazu wurde die Wachstumskammer am Ablauf mit dem oben beschriebenen Glashahn verschlossen. Es folgte die Überimpfung des Keimes unter einer Laminarbox. Als günstig hatte sich erwiesen, im Vorfeld des Versuches Kunststoffperlen mit dem Keim zu beimpfen. Für die Biofilmherstellung wurde dann eine Perle mittels einer sterilen Pinzette in die Wachstumskammer überführt. Anschließend wurde das Gefäß mit BHI-Nährmedium befüllt, so dass alle HA-Plättchen ca. 1 cm mit dem Medium bedeckt waren. In unserem Testgefäß entsprach das einem Volumen von  $V = 350$  ml.

Die Wachstumskammer wurde in einen Brutschrank gestellt, in dem ein Magnetrührer untergebracht war. Durch den Magnetrührer wurde eine gleichmäßige Durchmischung des Inhaltes der Wachstumskammer mit dem zugeführten Nährmedium über die gesamte Zeit der Versuchsdauer gewährleistet. Dabei war zu beachten, dass Interferenzen des Magnetrührers zu einer Laufunruhe des magnetischen Rührstabs führen konnten, in deren Folge der Rührstab an die Plättchen schlagen konnte. Das musste durch die Wahl eines kleineren magnetischen Rührstabs bzw. einer niedrigeren

Rührgeschwindigkeit vermieden werden, um die Biofilmentstehung nicht zu behindern.

Der Brutschrank wurde auf eine Temperatur von 37 °C eingestellt. Durch je eine Öffnung im Dach bzw. im Boden des Brutschrankes wurde die Zu- bzw. Ableitung des Nährmediums gewährleistet. Legte man beim zuführenden Schlauchsystem eine Schleife in den Brutschrank, konnte sichergestellt werden, dass das zugeleitete Nährmedium vor Erreichen der Wachstumskammer auf die Temperatur der Versuchsanordnung (37 °C) erwärmt wurde. Es wurden somit Temperaturschwankungen im Reaktionsgefäß vermieden, die eine Auswirkung auf das Wachstum der Biofilme haben konnten.

Die obere Etage der Versuchsanordnung enthielt den Komplex der Zuführung des Nährmediums. Dazu wurde die in einem Stativ stehende Bürette mit dem Nährmedium befüllt. Über einen selbst konstruierten Glashahn wurde das Schlauchstück, das sich an der Bürette befand, mit dem Schlauchsystem der Peristaltikpumpe verbunden. Das Schlauchsystem musste dazu modifiziert werden, indem die Anschlüsse für die Flasche bzw. die Flexüle mit einer Schere abgetrennt wurden. Danach wurde der Schlauch durch die obere Öffnung des Brutschrankes mit der Wachstumskammer verbunden und die Peristaltikpumpe zwischengeschaltet. Die Pumpe wurde auf eine gleichmäßige Förderleistung von  $F = 10 \text{ ml/h}$  eingestellt. Damit ergab sich nach der Formel  $D = F/V \text{ [h}^{-1}\text{]}$  eine Verdünnungsrate von  $10/350 = 0,029/\text{h}$ .

In der unteren Etage befand sich die Ausleitung des Wachstumsmediums. Über den oben schon beschriebenen selbst konstruierten Glashahn wurde das Schlauchsystem der zweiten

Peristaltikpumpe mit dem Abfluss des Gefäßes verbunden. Auch hier musste der Schlauch durch Entfernung des Flaschenanschlusses modifiziert werden. Über das im Boden des Brutschrankes befindliche Loch wurde der Schlauch nach außen und über die zwischengeschaltete Pumpe in ein Auffangbehältnis geleitet. Die Peristaltikpumpe wurde ebenfalls auf eine Fördermenge von 10 ml/h eingestellt.

Innerhalb von 48 h formierten sich die *S. sanguis*-Zellen auf den HA-Plättchen zu einem Biofilm. In dieser Zeit wurde lediglich der Vorratsbehälter mit frischem Nährmedium nachgefüllt.

## **2.2 Antiseptikatestung**

Nach 48 h wurden die HA-Plättchen mit dem Biofilmbewuchs aseptisch aus der Kammer entnommen, im Kulturmedium geschwenkt, um nicht adhärente Zellen zu entfernen, und den weiteren Versuchsreihen zugeführt.

In jeder Versuchsreihe wurden immer drei HA-Plättchen mit einer jeweils gleichen Konzentration und einer gleich langen Einwirkdauer eines bestimmten Antiseptikums behandelt. Zur Kontrolle wurden je nach Versuch ein oder drei Plättchen jeweils nur mit dem entsprechenden Neutralisationsmittel und ein oder zwei Plättchen nur mit steriler Ringerlösung behandelt (s. Tabellen 8 – 13 im Anhang). Als Testgefäße dienten sterile Reagenzröhrchen.

Die HA-Plättchen wurden für eine vorgegebene Zeit in je 1 ml des zu testenden Antiseptikums einer vorgegebenen Konzentration überführt. Danach wurden die Plättchen in je 10 ml des entsprechenden

Neutralisationsmittels gegeben und nach 30 min Einwirkzeit in je 1 ml Phosphatpuffer gebracht. Die Biofilme wurden durch 30 s Durchmischen auf dem Vortexmixer und 30 s Behandlung im Ultraschallbad von den HA-Plättchen abgelöst. Von jeder Probe wurde eine geeignete Verdünnungsreihe im Phosphatpuffer hergestellt und anschließend mit einem Spiral Plater auf einer Columbia Blut-Agar-Platte ausplattiert.

Zur Darstellung der unterschiedlichen Wirksamkeit von Antiseptika auf Biofilmzellen und planktonische Zellen wurden aus dem Testgefäß Proben von je 1 ml Keimsuspension entnommen. Jeweils zwei Proben wurden mit der gleichen Konzentration und der gleichen Einwirkzeit eines bestimmten Antiseptikums im Doppelansatz behandelt. Auch hier wurden zur Kontrolle je zwei Proben nur mit dem entsprechenden Neutralisationsmittel und je zwei Proben nur mit steriler Ringerlösung behandelt. Das Antiseptikum wurde in doppelter Konzentration gegenüber den Versuchsreihen mit den Biofilmen verwendet, um im Versuchsansatz die gleiche Konzentration zu erhalten wie bei den Biofilmen. Die Proben wurden für die gleiche vorgegebene Zeit wie die Biofilme in je 1 ml des jeweils doppelt konzentrierten Antiseptikums pipettiert. Von jeder Probe wurde 1 ml in jeweils 9 ml des entsprechenden Neutralisationsmittels überpipettiert. Nach einer 30-minütigen Einwirkzeit wurde von jeder Probe jeweils 1 ml in je 1 ml Phosphatpuffer überführt und eine geeignete Verdünnungsreihe hergestellt. Die Verdünnungen wurden mit einem Spiral Plater auf einer Columbia Blut-Agar-Platte ausplattiert.

Nach aerober Bebrütung von 48 h bei 37 °C wurden die Kolonien auf den Blutplatten gezählt. Da der Spiral Plater nur ein Volumen von

37,3 µl ausplattiert, musste das Ergebnis der Auszählung nach folgender Formel auf das Volumen von 1 ml korrigiert werden:

$$\text{KbE/ml} = \Sigma/0,0373$$

KbE = kolonienbildende Einheit  
Σ = Summe der Kolonien auf einer Platte

Die nach Auszählung der Kolonien und nach obiger Formel berechneten Werte der planktonischen Proben bedurften einer nochmaligen Korrektur mittels eines bestimmten Faktors:

Durch das Überpipettieren der planktonischen Proben (je 1 ml) in das jeweilige Antiseptikum (1 ml) entstand eine Verdünnung von 1:1. Von diesem Zell-Antiseptikumgemisch wurde wiederum 1 ml in 9 ml des entsprechenden Neutralisationsmittels überführt, was einer Verdünnung von 1:10 entspricht. Aus dem Neutralisationsmittel wurden je 1 ml in den Puffer pipettiert, bevor eine geeignete Verdünnungsreihe zum Ausplattieren hergestellt werden konnte. Das führt zu einer weiteren 1:1 Verdünnung der planktonisch gelösten Zellen. Somit ergibt sich ein Korrekturfaktor von  $2 \times 10 \times 2 = 40$ . Dieser Faktor wurde zum einen für die planktonischen Proben verwendet, die mit dem jeweiligen Antiseptikum behandelt wurden. Zum anderen musste er aber auch auf die Ergebnisse derjenigen Proben angewendet werden, die für den Validierungsversuch zur Überprüfung der Toxizität des jeweiligen Neutralisationsmittels hergestellt wurden. Dabei war die Vorgehensweise so wie bei den Antiseptika, um die Ergebnisse vergleichen zu können. Es wurde an Stelle des Antiseptikums jedoch sterile Ringerlösung benutzt.

Für die Ergebnisse der Leerwerte, also der planktonischen Proben, die nur mit steriler Ringerlösung behandelt wurden, entfällt die 1:10 Verdünnung im Neutralisationsmittel. Die beiden 1:1 Verdünnungen



in der Ringerlösung (an Stelle des Antiseptikums) und im Puffer bleiben jedoch erhalten. Dadurch ergibt sich ein Korrekturfaktor von  $2 \times 2 = 4$ .

Zur Bestimmung der antimikrobiellen Effizienz der Antiseptika wurden Reduktionsfaktoren errechnet (Beschreibung s. Abschnitt **3.6 Ergebnisse**). Für die Darstellung statistischer Unterschiede (vergl. Tabellen 1 – 3 im Abschnitt **3.6 Ergebnisse**) wurde der nicht-parametrische Test nach Wilcoxon mit  $\alpha = 0,05$  (zweiseitig) verwendet. Sämtliche Berechnungen wurden mit Microsoft Excel und SPSS für Windows 98 durchgeführt.

Folgende Antiseptika wurden in den Versuchen verwendet:

	Zeit				Konzentration
	Plättchen		plankton. Proben (doppelte Konz.)		
	5 min	30 min	5 min	30 min	
<b>Chlorhexidin-digluconat</b>	0,1%	0,1%	0,2%	0,2%	
	1%	1%	2%	2%	
<b>PVP-Iod</b>	1,5%	1,5%	3%	3%	
	7,5%	7,5%	-	-	
<b>Octenidin</b>	0,05%	0,05%	0,1%	0,1%	
	0,1%	0,1%	-	-	

- Chlorhexidindigluconat 2% (w/w)  
Mixtur der Universitäts-Apotheke  
enthält 2 g Chlorhexidindigluconat ad 100 g Aqua
- Betaisodona<sup>®</sup> Mund-Antiseptikum  
Mundipharma GmbH, 65549 Limburg (Lahn)  
enthält Polyvidon-Iod (PVP-Iod) 7,5% (w/v): 7,5 g ad 100 g  
Lösung mit Hilfsstoffen (Ethanol, Menthol, Methylsalicylat,  
Glycerol, Saccharin-Natrium, Natriummonohydrogenphosphat)
- Mucosan<sup>®</sup>  
Antiseptica Chemisch-Pharmazeutische Produkte GmbH, Pulheim,  
Deutschland  
VP-Nr.: VP 102/10  
Ch.-B.: WA-001  
enthält Octenidin 0,1%, Ethanol (94%) 5,0%, Milchsäure (80%)  
1,5%