

Die Wirkung gasförmigen Ozons auf oralpathogene Bakterienspezies


Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der

Universitätsmedizin der Universität Rostock
(Institut für Medizinische Mikrobiologie)



Rostock, 2017

vorgelegt von:

Constanze Born

aus Lübeck

geboren am 08.03.1985 in Dresden

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Andreas Podbielski,
Universitätsklinikum Rostock (AöR), Institut für Medizinische
Mikrobiologie, Virologie und Hygiene
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Jan Rupp, Universitätsklinikum Lübeck (AöR),
Klinik für Infektiologie und Mikrobiologie
3. Gutachter: Prof. Dr. med. Karin Kraft, Universitätsklinikum Rostock (AöR),
Lehrstuhl für Naturheilkunde

Datum der Einreichung: 25.7.2016

Tag der öffentlichen Verteidigung: 14.2.2017

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
1. Einleitung	1
1.1. Karies	1
1.1.1. Historischer Überblick zu Diagnose und Behandlungsmethoden	1
1.1.2. Karies heute in Deutschland	1
1.1.3. Plaque als Biofilmmodell	2
1.1.4. Pathomechanismus der Karies-Genese	4
1.1.5. Behandlungsmethoden der Karies	5
1.2. Ozon	5
1.2.1. Geschichtliche Entwicklung der Ozon-Anwendung	5
1.2.2. Eigenschaften des Ozons	6
1.3. Bedeutung von Ozon und Natriumhypochlorit in der nicht-mechanischen zahnmedizinischen Behandlung	6
1.3.1. Ozon	6
1.3.2. Natriumhypochlorit	7
1.4. Der Ozongenerator HealOzone 2130C	7
1.4.1. Aufbau, Funktion und Wirkungsweise des HealOzone 2130C	7
1.5. Zielstellung der Dissertation	10
2. Material und Methoden	11
2.1. Bakterienstämme	11
2.2. Kultivierungsbedingungen	12
2.3. Stammhaltung	12
2.4. Nährmedien und Zusätze zur Untersuchung der Biofilmbildung	13
2.5. Puffer und Lösungen	13
2.6. Chemikalien	14
2.7. Farbstoffe für die Fluoreszenzmikroskopie	14
2.8. Laborgeräte und Software	14
2.9. HealOzone 2130C-Aufbau, Funktion und Wirkungsweise des Ozongenerators	15
2.10. Protokoll zur Biofilmbildung	16
2.11. Optimierung der Biofilmbildung	16
2.12. Bestimmung der Biofilm-Masse mittels Safraninfärbung	16
2.13. Bestimmung der Biofilm-Lebendkeimzahlen	16
2.14. Bestimmung der Wachstumskinetik- Aufnahme einer Wachstumskurve	17
2.15. Nachweis einer für diverse Arbeitsschritte notwendigen Sterilität	18
2.16. Funktionsnachweis des HealOzone-Ozongenerators	19
2.17. Wirkung von Natriumthiosulfat und Natriumhypochlorit	20
2.18. Untersuchung der Ozonwirkung unter aeroben Bedingungen	21
2.18.1. Ozonapplikation und Wirkung von Natriumthiosulfat	21
2.18.2. Kombinierte Behandlung der Biofilme mit Natriumhypochlorit, Natriumthiosulfat und Ozon	22
2.18.3. Untersuchung der Wirkung von Ozon auf planktonische Zellen	23
2.18.4. Untersuchung der Ozonwirkung unter anaeroben Bedingungen	23
2.19. Dokumentation von Biofilmstrukturen	24
2.19.1. Fluoreszenzmikroskopie	24
2.19.2. Rasterelektronenmikroskopie	25

INHALTSVERZEICHNIS

2.20. Statistische Auswertung.....	26
3. Ergebnisse	27
3.1. Biofilmbildung der ausgewählten Teststämme in BHI-Medium.....	27
3.1.1. Biofilmbildung der <i>S. mutans</i> -Teststämme	27
3.1.2. Biofilmbildung der <i>E. faecalis</i> -Teststämme.....	27
3.2. Bestimmung des Biofilmwachstums in BHI mit verschiedenen Mucin-Konzentrationen	28
3.3. Untersuchung des Einflusses von Natriumhypochlorit und Natriumthiosulfat auf die Lebensfähigkeit und Biofilmbildung von <i>S. mutans</i> und <i>E. faecalis</i>	30
3.3.1. Überlebensfähigkeit von <i>S. mutans</i> unter Verwendung von NaOCl und Na ₂ S ₂ O ₃	30
3.3.2. Überlebensfähigkeit von <i>E. faecalis</i> unter Verwendung von NaOCl und Na ₂ S ₂ O ₃	32
3.4. Ergebnisse der fluoreszenzmikroskopischen Analysen	33
3.4.1. Resultate der Fluoreszenzmikroskopie für <i>S. mutans</i>	34
3.4.2. Resultate der Fluoreszenzmikroskopie für <i>E. faecalis</i>	35
3.5. Untersuchung zur Keimverschleppung unter Verwendung des Ozongenerators HealOzone™ (KaVo, Biberach, Germany)	37
3.6. <i>In vitro</i> Ozon-Applikation unter aeroben Verhältnissen.....	39
3.6.1. Die Wirkung von Ozon auf das Isolat <i>S. mutans</i> DSM 20523	39
3.6.2. Die Wirkung von Ozon auf das Isolat <i>E. faecalis</i> 1942	42
3.7. Kombinierte Behandlung der Biofilme mit Ozon, Natriumhypochlorit und Natriumthiosulfat unter aeroben Verhältnissen	43
3.7.1. Resultate der sequentiellen Wirkung von Ozon und Natriumhypochlorit auf <i>S. mutans</i> DSM 20523	44
3.7.2. Resultate der sequentiellen Wirkung von Ozon und Natriumhypochlorit auf <i>E. faecalis</i> 1942	46
3.8. Ergebnisse der Rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung nach <i>in vitro</i> Ozon-Applikation auf <i>S. mutans</i> - bzw. <i>E. faecalis</i> -Biofilmstrukturen unter aeroben Verhältnissen	47
3.8.1. Ergebnisse der REM-Analyse von <i>S. mutans</i> DSM 20523	48
3.8.2. Ergebnisse der REM-Analysen von <i>E. faecalis</i> 1942	53
3.9. <i>In vitro</i> Ozon-Applikation unter anaeroben Bedingungen.....	58
3.9.1. Ergebnisse der Ozon-Applikation auf Kulturen von <i>P. micra</i> ATCC 33270	59
3.9.2. Ergebnisse der Ozon-Applikation auf <i>F. nucleatum</i> ATCC 25586	61
3.10. Ergebnisse der Rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung nach <i>in vitro</i> Ozon-Applikation auf <i>P. micra</i> -Biofilmstrukturen unter anaeroben Verhältnissen	63
3.11. Untersuchung der Wirkung von Ozon auf planktonische Bakterien	65
3.11.1. Ergebnisse der Wirkung von Ozon auf planktonische Zellen des <i>S. mutans</i> Stamms DSM 20523	65
3.11.2. Ergebnisse der Wirkung von Ozon auf planktonische Zellen des <i>E. faecalis</i> Stamms 1942	65
4. Diskussion.....	67
4.1. Untersuchungen zur Biofilmbildung in Gegenwart von Mucin.....	67
4.2. Verwendung von Natriumhypochlorit	68
4.3. Verwendung und Wirkung des Natriumthiosulfats	69
4.4. Die Effektivität der Applikation gasförmigen Ozons auf oralpathogene Bakterienspezies....	70

INHALTSVERZEICHNIS

4.5.	Einfluss des von den Teststämmen gebildeten Biofilms	74
4.6.	Effektivität der sequentiellen Applikation gasförmigen Ozons und NaOCl auf aerobe und anaerobe oralpathogene Bakterienspezies in Biofilmen-Strukturen	75
4.7.	Schlussfolgerung.....	76
5.	Zusammenfassung	78
6.	Literaturverzeichniss.....	79
7.	Anhang.....	86
7.1.	zu 3.3. Untersuchung des Einflusses von Natriumhypochlorit und Natriumthiosulfat auf die Lebensfähigkeit und Biofilmbildung von <i>S. mutans</i> und <i>E. faecalis</i>	86
7.1.1.	zu 3.3.1. Überlebensfähigkeit von <i>S. mutans</i> 4300 und <i>S. mutans</i> 6178 unter Verwendung von NaOCl und Na ₂ S ₂ O ₃	86
7.1.2.	zu 3.3.2. Überlebensfähigkeit von <i>E. faecalis</i> DSMZ 20478 und <i>E. faecalis</i> 1904 unter Verwendung von NaOCl und Na ₂ S ₂ O ₃	88
7.2.	zu 3.4. Ergebnisse der fluoreszenzmikroskopischen Analysen	90
7.2.1.	zu 3.4.1. Resultate der Fluoreszenzmikroskopie für <i>S. mutans</i> 4300 und <i>S. mutans</i> 6178	90
7.2.2.	zu 3.4.2. Resultate der Fluoreszenzmikroskopie für <i>E. faecalis</i> DSMZ 20478 und <i>E. faecalis</i> 1904	92
7.3.	zu 3.6. in vitro Ozon-Applikation unter aeroben Verhältnissen	94
7.3.1.	zu 3.6.1. Die Wirkung von Ozon auf <i>S. mutans</i> 4300 und <i>S. mutans</i> 6178.....	94
7.3.2.	zu 3.6.2. Die Wirkung von Ozon auf die Isolate <i>E. faecalis</i> DSMZ 20478 und <i>E. faecalis</i> 4300	97
7.4.	zu 3.7. Kombinierte Behandlung der Biofilme mit Ozon, Natriumhypochlorit und Natriumthiosulfat unter aeroben Verhältnissen	100
7.4.1.	zu 3.7.1. Resultate der sequentiellen Wirkung von Ozon und Natriumhypochlorit auf <i>S. mutans</i> 4300 und <i>S. mutans</i> 6178	100
7.4.2.	zu 3.7.2.Resultate der sequentiellen Wirkung von Ozon und Natriumhypochlorit auf <i>E. faecalis</i> DSMZ 20478 und <i>E. faecalis</i> 1904	103
7.5.	zu 3.8 Ergebnisse der Rasterelektronenmikroskopienach in vitro Ozon-Applikation auf <i>S. mutans</i> - bzw. <i>E. faecalis</i> -Biofilmstrukturen unter aeroben Verhältnissen	106
7.5.1.	zu 3.8.1. Ergebnisse der REM-Analyse von <i>S. mutans</i> 6178	106
7.5.2.	zu 3.8.2. Ergebnisse der REM-Analysen von <i>E. faecalis</i> 1904 und <i>E. faecalis</i> DMZ 20478	111
7.6.	zu 3.10. Ergebnisse der Rasterelektronenmikroskopie nach in vitro Ozon-Applikation auf <i>F. nucleatum</i> ATCC 25586-Kulturen unter anaeroben Verhältnissen.....	120
8.	Thesen	126
9.	Danksagung.....	127
10.	Selbstständigkeitserklärung	128

INHALTSVERZEICHNIS**Abkürzungsverzeichnis**

%	Prozent
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	Brain Heart Infusion
bzw.	Beziehungsweise
bzgl.	Bezüglich
CHX	Chlorhexidin
CO_2	Kohlendioxid
D	Deutschland
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EPS	Extrazelluläre polymere Schicht
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (lat., und andere)
etc.	<i>et cetera</i> (lat., und die übrigen)
g	Gramm
h	Stunde
H_2	Wasserstoff
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
$\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$	Reinstwasser
HClO	hypochlorige Säure
i. F. v.	im Fall von
<i>i. v.</i>	Intravenös
KBE	Koloniebildende Einheit
KBE/ ml	Koloniebildende Einheit pro Milliliter
LKZ	Lebendkeimzahl
m	Meter
MDG	Millennium Development Goal

INHALTSVERZEICHNIS

min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
N ₂	Stickstoff
Na ₂ S ₂ O ₃	Natriumthiosulfat
NK	Negativkontrolle
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
o. g.	oben genannten
O ₂	Sauerstoff
O ₃	Ozon
OD ₄₉₂	Optische Dichte bei 492nm
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
pH	<i>potentia Hydrogenii</i> (lat., <i>potentia</i> „Kraft“; <i>Hydrogenium</i> „Wasserstoff“)
ppm	<i>parts per million</i> ("Teile einer Million")
rpm	<i>revolutions per minute</i> (engl., „Umdrehungen pro Minute“)
s	Sekunde
<i>spp.</i>	<i>species pluralis</i> (lat., mehrere Spezies)
t _{AP}	Applikationszeit
u. a.	unter anderem
USA	<i>United States of America</i>
UV	Ultraviolett
v. Chr.	vor Christus
VBNC	<i>viable but not culturable</i> (engl., lebend, aber nicht kultivierbar)
w/ v	Masse pro Volumen
z. B.	zum Beispiel

1. Einleitung

1.1. Karies

1.1.1. Historischer Überblick zu Diagnose und Behandlungsmethoden

Die Zahnfäule, wie Karies auch umgangssprachlich genannt wird, begleitet die Menschheit wahrscheinlich schon seit ihren Ursprüngen. So kann zumindest aus der Tatsache geschlossen werden, dass bei entsprechender Diät auch Tiere Karies entwickeln können. Die erste historisch belegte Erwähnung im Zusammenhang mit Menschen findet die Zahnfäule in Schriften aus Mesopotamien um 1600 v. Chr.¹⁹ Historiker gehen jedoch davon aus, dass Karies schon sehr viel früher zu den chronischen Krankheiten der Menschheit gehörte. Mit beginnender Sesshaftigkeit und dem Konsum von Kohlenhydraten, welche das hauptsächliche Nahrungssubstrat für kariesverursachende Bakterien bilden, wurde Karies prävalent. Die weltberühmte prähistorische Mumie „Ötzi“ war nach neueren computertomografischen Analysen ebenso an Karies erkrankt.^{11,12}

Bevor Antoni van Leeuwenhoek (1632–1723) das erste Mal in seinem primitiven Mikroskop „Animaculae“ (kleine Tierchen) erblickte, verbanden die Menschen Zahnschmerzen mit dem Zahnwurm, einem bösen Dämon, der sich in den Zähnen und Zahnzwischenräumen einnistet. Die Ursache von Zahnschmerzen beschäftigte schon die fröhe Medizin, die in ihren Anfängen eine untrennbare Einheit aus religiösem, magischem und medizinisch-therapeutischem Denken bildete.⁴⁶ Der Zahnschmerz quälte und wurde auf Grund seiner Eigenschaft als einschneidendes Erlebnis in die menschliche Empfindlichkeit nicht selten in Schrift, Bild und Stein den kommenden Generationen vermacht. So kann man die Zahnfäule als eine Kulturkrankheit betrachten. Seitdem Karies die Menschheit plagt, versucht diese der Komplikationen in Form der Schmerzen und weiterreichenden Superinfektionen Herr zu werden.

1.1.2. Karies heute in Deutschland

Die Ernährung beeinflusst unsere Gesellschaft in vielerlei Hinsicht. Chronische Erkrankungen wie z. B. die Karies sind vor allem Erkrankungen der industriellen Gesellschaften. Folgeerkrankungen der Karies reichen von einer entzündlichen Affektion des Pulpa (Endodontitis) bis hin zu irreversiblen Schäden der sensiblen Versorgung, Zahnausfall und Penetration durch die orale Mundflora in das Blutsystem (Bakterämie) mit metastatischen Abszessen und im Extremfall einer Sepsis.¹⁰⁷ Angesichts der bedenklichen Prognosen hat die Weltgesundheitsorganisation in den achtziger Jahren die Verbesserung der Zahngesundheit und die Bekämpfung von Karies in die Millennium Development Goals (MDG) aufgenommen.⁸⁴

1.1.3. Plaque als Biofilmmodell

Bis zu 90 % aller Bakterienpopulationen sind in Gemeinschaften, die heute als Biofilm bezeichnet werden, organisiert. Der Begriff Biofilm wurde erst im späten 20. Jahrhundert durch den kanadischen Mikrobiologen J. William Costerton geprägt.²² Bakterien, die in Biofilmen verbunden sind, unterscheiden sich von planktonischen Bakterien insbesondere dadurch, dass sich in Biofilmen (1) eine interne Heterogenität entwickelt, (2) eine Struktur-/ Funktions-Verbindung unter den teilhabenden Zellen existiert und dass (3) die gesamte Population auf Umgebungsveränderungen reagieren können.^{20,28}

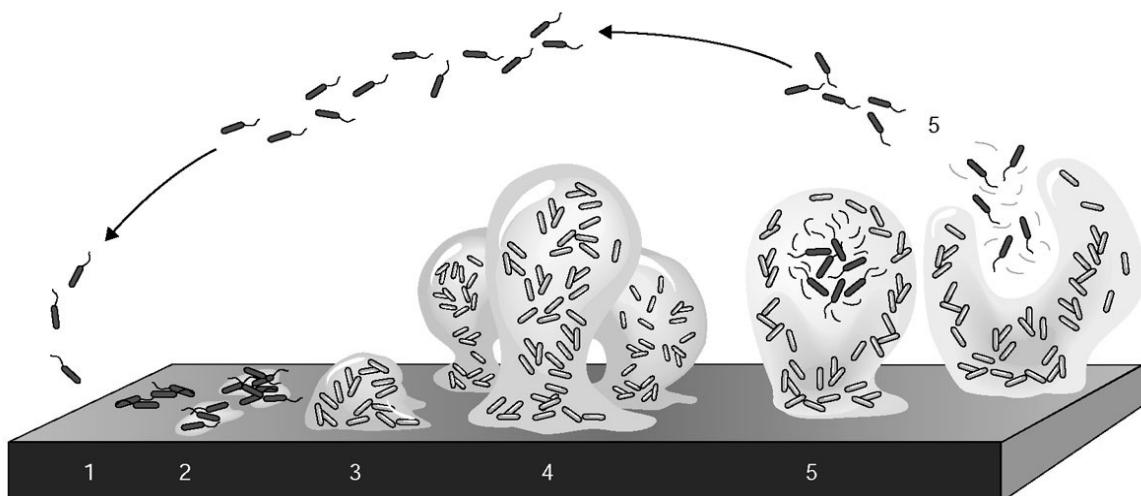


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Stadien der Biofilmbildung. In der ersten Phase (1) lagern sich freischwimmende, planktonische Zellen reversibel an der Oberfläche an. Aus dieser losen Ansammlung von Bakterien kommt es zu einer irreversiblen Verbindung mit der Oberfläche (2), welche sich hauptsächlich auf die Ausbildung einer extrapolsacchariden Matrix zurückführen lässt. In der nächsten Phase (3) kommt es zur Ausbildung eines frühen reifen Biofilms, der durch ein mehrschichtiges Wachstum charakterisiert ist. Der späte, reife Biofilm (4) zeichnet sich durch eine komplexe mehrschichtige Biofilmstruktur aus. In der letzten Phase der Biofilmbildung (5) kommt es schließlich zur Alterung, Ablösung (Dispersion) und Verteilung von einzelnen Bakterien, sodass neue Biofilmstrukturen gebildet werden können.^{95,106}

Der Begriff Biofilm charakterisiert eine Gemeinschaft von Mikroorganismen, die an einer Oberfläche haftet. Gesteinsoberflächen, pflanzliche wie auch tierische Oberflächen, synthetische Stoffe, keramische und metallische Oberflächen dienen als Anhaftungsfläche.¹⁰³ In der ersten Phase der Biofilmbildung haften sich planktonische, freischwimmende Zellen reversibel an einer Oberfläche an. O'Toole und Kolter beschrieben anhand von *Pseudomonas aeruginosa* eine reversible Oberflächenaggregation mit der Hilfe von Typ-IV-Pili und Flagellen.⁷⁹ Die anschließend von den Zellen induzierte Ausbildung einer Schleimschicht – eine extrazelluläre Matrix aus Polysacchariden¹¹² – überführt die primär reversibel gebundenen Zellen in einen irreversibel gebundenen frühen Biofilm. Die Sekretion der extrazellulären

Matrix formt zusätzlich einen Schutzmantel um die Zellen.⁵⁸ Reife Biofilme bilden eine dreidimensionale und dynamische Struktur,^{68,111} die entlang von Oberflächen wachsen können, die Partikel und andere Bakterien aus der Umgebung in den Zellverband inkorporieren können und von der sich einzelne Zellen aus dem nunmehr festen adhärenten Verband lösen können (Dispersion).^{96,103} Diese komplexen Abläufe der Biofilmbildung, die Bildung der EPS (extrazelluläre polymere Substanzen), die jedes Bakterium im Biofilm bilden kann,³⁴ und der Zellaggregation wird über das *Quorum sensing*, eine chemische Kommunikation der Bakterien untereinander,^{24,34,96} reguliert. Die Fähigkeit der Biofilmbildung bietet für Bakterien einen strategischen Vorteil gegenüber schädigenden Umwelteinflüssen wie Austrocknung, pH-Wert-Schwankungen, Toxine und Antibiotika.^{23,36} Die meisten Biofilme bestehen zu ca. 10 % aus Bakterienmasse. Die Matrix zwischen den Bakterienzellen, auch extrazelluläre polymere Schicht (EPS) genannt, kann bis zu 90 % der Gesamtmasse ausmachen.³⁴ Die EPS besteht zu großen Anteilen aus Polysacchariden, die Wasser binden können.¹⁰⁴ Adhäsion, Aggregation bakterieller Zellen, Kohäsion des Biofilms, Wasserretention, Austausch genetischer Information, Nahrungsquelle und ein „Schutzwall“ sind hier beispielhaft für die Funktionen der EPS zu nennen (Anhang, Tab. 29).

Biofilme als Lebensgemeinschaften verschiedener Mikroorganismenarten haben in der Natur einzigartige Eigenschaften. Die in dieser Gemeinschaft lebenden Keime sind resistenter gegenüber Antibiotika als ihre planktonisch lebenden Spiegelbilder. Sie sichern sich auf Grund der Komplexität der Biofilmstruktur und der „Aufgabenteilung“ im Verband das Überleben unter widrigen Bedingungen.^{3,23,103} Die höhere Widerstandsfähigkeit von Bakterien in Biofilmen gegenüber Antibiotika beruht wahrscheinlich auf der Biofilmmatrix, die als Barriere durch positiv geladene Antibiotika nur schwerlich überwunden werden kann.⁶⁸

In der Zahnmedizin wird der ausdifferenzierte, reife Biofilm auf den Zahnoberflächen als Plaque bezeichnet.^{98,107} In der Plaque bilden die fakultativ anaeroben Streptokokken die zahlenmäßig stärkste Bakterienpopulation.⁹⁸ Diese werden in der Literatur direkt mit der Kariesgenese assoziiert.⁹⁸ Eine Reduktion oder Eliminierung von *Streptococcus mutans* steht demnach im Vordergrund einer erfolgreichen Kariestherapie.

Die Spezies zeichnet sich durch eine starke Adhärenz an Glykoproteinstrukturen des Zahnschmelzoberhäutchens sowie durch die Produktion extrazellulärer Polysaccharide aus, welche die Lebensgrundlage bzw. wiederum Adhärenzgrundlage für andere Bakterien bilden.⁵⁶ Die Fähigkeit, Kohlenhydrate zu verstoffwechseln, garantiert *Streptococcus mutans* spp. u. a. eine rasche Vermehrung in der oralen Umgebung. Diese Bakterien tragen Adhäsine an ihrer Oberfläche, die mit verschiedenen Arten von Speichel-Rezeptor-Strukturen in Wechselwirkung

EINLEITUNG

treten können.⁹³ Streptokokken können mit den Pelliceln (eine Schicht aus Proteinen und Glykoproteinen, die die orale Oberfläche permanent bedecken) der Zahnoberfläche interagieren und sich niederlassen.⁵⁶ Aufgrund dieser Eigenschaft werden sie als sogenannte Primärkolonisierer bezeichnet. Ein weiterer Faktor, der die Dominanz von *S. mutans* in kariogener Plaque hervorhebt, ist die Produktion von Glukosyltransferasen (Gtfs), die eine kritische Rolle in der Entwicklung einer pathogenen dentalen Plaque spielen.¹⁵ Streptokokken wachsen bei optimalen Bedingungen rasch und sind in der Lage innerhalb kürzester Zeit einen dichten Zellrasen zu bilden, der im Inneren auf Grund der Dichte und dem fehlenden Sauerstoffzufluss anaerob ist und Adhärenzmöglichkeiten für weitere Bakterienspezies wie z. B. *Aggregatibacter spp.*^{12,69}, *Parvimonas spp.* oder *Fusobacterium spp.* bildet.¹⁰⁷ Diese werden als Spätkolonisierer bezeichnet.

Fusobakterium spp. bilden hierbei ein Bindeglied zwischen den fakultativ anaeroben Erstkolonisierern und den obligat anaeroben Bakterien,^{55,98} da sie die Fähigkeit besitzen, Verbindungen mit Primär- und Spätkolonialisierer einzugehen. Ihre Stellung in der Kariogenese ist zum jetzigen Zeitpunkt umstritten. Sie lassen sich jedoch in den Tiefen reifer Biofilme, wo anaerobe Verhältnisse herrschen, nachweisen. Anaerobier wurden in manifesten parodontitischen Erkrankungen isoliert, sodass ihnen eine Rolle bei der Entstehung bzw. Aufrechterhaltung der Parodontitis zugerechnet werden kann.¹⁰²

Eine weitere Spezies, die in dieser Arbeit verwendet wurde, ist *Enterococcus faecalis*. Das Bakterium zählt nicht zu den klassischen Erstkolonisierern, hat jedoch auf Grund seiner Eigenschaften, im aeroben Milieu zu agieren und ebenso Kohlenhydrate zu verstoffwechseln, ähnliche Fähigkeiten wie *Streptococcus mutans*. *Enterococcus faecalis* findet sich häufig in Wurzelkanalkulturen,¹¹⁵ aber auch häufig in abgeschirmten und versiegelten Hohlräumen.¹⁰⁰ Eine orale Infektion mit *Enterococcus faecalis* kann durch die Nahrungsaufnahme stattfinden.¹⁰⁹ Sekundärkaries kann häufig mit einer *Enterococcus faecalis*-Infektion assoziiert werden. Auf Grund der Widerstandsfähigkeit des Keims ist eine orale Infektion mit *Enterococcus faecalis* schwer zu behandeln.⁴⁴ Ein Ansatz könnte dementsprechend die Behandlung mit Ozon bieten.

1.1.4. Pathomechanismus der Karies-Genese

Bakteriell produzierte organische Säuren verursachen die Demineralisation des Zahnschmelzes bzw. des Hartgewebes Dentin und Zement.⁹⁸ Aufbauend auf dieser chemisch-parasitären Kariestheorie von W. D. Miller (1853–1907) schritt die Erforschung der Karies voran. W. D. Miller hatte zwar den Zusammenhang zwischen der Anwesenheit von Säuren und Bakterien erkannt, aber erst der amerikanische Zahnarzt Greene Vardiman (1836–1915) begriff die

Bedeutung der Anwesenheit von Bakterien und lokalisierter Karies.⁹² Der Kariesbildung geht eine Besiedlung mit kariogenen Bakterien wie z. B. *Streptococcus mutans* und anderen oralpathogenen Streptokokken voraus. Diese und weitere Bakterien der Mundhöhle bilden den sogenannten Plaque, einen Biofilm, wie unter 1.1.3. beschrieben. Bei Anwesenheit von Saccharose fermentieren die Bakterien dieses Molekül zu organischen Säuren wie Laktat und Ameisensäure. Überwiegt die Säureproduktion gegenüber der protektiven, neutralisierenden und remineralisierenden Funktion des Speichels und liegt der pH-Wert in dem bakteriellen Plaque dauerhaft unter einem kritischen Wert,¹⁰⁷ führt dies zu einer Schädigung der Zahnhartsubstanzen Dentin und Zement (Demineralisation). Der andauernde niedrige pH-Wert führt zudem zu einer Selektion säuretoleranter Bakterien wie z. B. Lactobazillen, Fusobakterien, Aktinomyzeten und Veilonellen.^{50,68,69}

1.1.5. Behandlungsmethoden der Karies

Das oberste Behandlungsprinzip der Karies ist die Prävention. Dazu zählt insbesondere die Mundhygiene, die bei regelmäßiger Anwendung die Manifestation von Plaque verhindern soll. Ein weiterer Präventionsansatz beruht auf der Ernährung. Kariogene Bakterien verstoffwechseln Kohlenhydrate (Saccharose) zu organischen Säuren (s. auch 1.1.4.). Werden Kohlenhydrate durch die Ernährung zugeführt, steigt bei oraler Besiedlung mit Streptokokken folglich das Risiko an Karies zu erkranken. Andere Nahrungsbestandteile wie Proteine, Fette, Vitamine und Mineralien haben kein solch kariogenes Potential.⁹⁸ Insbesondere bei Säuglingen und Kleinkindern stellt sich die Gefahr des *Nursing-Bottle-Syndrom*. Die lange Kontaktzeit von Schnullern und Nuckelflaschen im Mund von Säuglingen oder Kleinkindern erhöht in Verbindung mit der Gabe süßer Getränke die Gefahr, schon früh an Karies zu erkranken.⁶¹

Neben der regelmäßigen Mundhygiene als Präventionsmaßnahme kann die bereits manifeste Karies mittels mechanischer Eradikation und Defektdeckung der Läsion mit Amalgam oder modernen Kompositen aus Kunststoffen und Silikaten weitestgehend unter Kontrolle gebracht werden. Derzeit ist die mechanische Kariestherapie die effektivste Methode der Kariesbehandlung.⁹⁸ Mit der im Folgenden geschilderten Ozontherapie soll eine schmerz- und stressfreie Alternative angeboten werden.

1.2. Ozon

1.2.1. Geschichtliche Entwicklung der Ozon-Anwendung

Schon im 19. Jahrhundert machte man sich die stark oxidativen Eigenschaften des Ozons zu Nutze. Hier war Werner von Siemens (1816–1892) der erste, der Ozon zur Trinkwasserdesinfektion anwendete. Auch heute noch wird in vielen Städten das Trinkwasser mit Ozon aufbereitet.⁶⁵ Während des 1. Weltkriegs gewann die Ozonbehandlung von stark verschmutzten

Kriegswunden an Bedeutung. Soldaten mit dem von *Clostridium perfringens* verursachten Krankheitsbild des Gasbrands konnten mit Hilfe dieses Therapieansatzes erfolgreich behandelt werden.⁶⁵

Die Begeisterung für die Verwendung von Ozon unter den europäischen Ärzten stieg rasant an. Zu Zweifeln an dieser Therapieform kam es jedoch, nachdem es zunehmend ernstzunehmende Zwischenfällen wie z. B. Gasembolien bei Ozon *i. v.* Applikation bzw. die vorgeschlagenen Therapien uneinheitliche Ergebnisse zeigten.^{5,14} Die Therapieoption „Ozon“ rückte somit wieder in den Hintergrund.

1.2.2. Eigenschaften des Ozons

Die Behandlung mit Ozon gehört zu den alternativen, nicht invasiven Behandlungskonzepten. Ozon besteht aus drei Atomen Sauerstoff und wird in der Literatur auch als „Trisauerstoff“ oder „aktiver Sauerstoff“ bezeichnet (O_3). Ozon ist 1,6 mal dichter und 10 mal löslicher in Wasser als Sauerstoff (O_2) und hat ein ausgeprägtes Oxidationspotential, welches 1,5 mal stärker ist als das von Chlor. Das molekulare Gewicht beträgt 47,98 g/Mol. In seiner gasförmigen Form ist es instabil und kann somit schlecht gelagert werden. Die Halbwertzeit beträgt 40 min bei 20 °C.¹³ Ab 0,01 ppm kann Ozon als nelken-, heu- und/oder chlorähnlicher Geruch wahrgenommen werden.³⁰

1.3. Bedeutung von Ozon und Natriumhypochlorit in der nicht-mechanischen zahnmedizinischen Behandlung

1.3.1. Ozon

Ozon wird auf Grund seiner Eigenschaften als potentiell schmerzlose Alternative zur mechanischen Kariestherapie propagiert. Wegen der für andere Anwendungen tatsächlich nachgewiesenen bakteriziden, viruziden und fungiziden Eigenschaften findet Ozon eine breite Anwendung u. a. in der Trinkwasseraufbereitung,⁷⁵ der Aufbereitung von Schwimmbadwasser und Konservierung von Obst und Lebensmitteln.^{25,80} In der Zahnmedizin erlangte die Therapie mit Ozon bisher keinen bedeutenden Stellenwert. Die Datenlage^{1,5} zu Ozonanwendungen ist umstritten, gleich in welchem Ansatz sie auch angeboten wurden. Deswegen erlangte die Ozontherapie nie die Bedeutung anderer therapeutischer Konzepte. Zum einen steht die wissenschaftliche Öffentlichkeit dem starken Oxidations- und Reizpotenzial der Ozontherapie kritisch gegenüber, da diese Parameter insbesondere bei inkorrektener Anwendung dieser Therapie mehr Schaden als Nutzen für den zu behandelnden Organismus bewirken können. Zum anderen hat die inadäquate Herangehensweise einiger Anwender diese Therapie in Verruf gebracht. Ozon wurde über viele Jahrzehnte nicht wirkungsgerichtet sondern dosisorientiert angewendet. Bocci sammelte 2006 in einer umfassenden Veröffentlichung die Gründe, warum

die Ozontherapie in der Öffentlichkeit Skepsis hervorrief. Dazu gehören u. a. (1) die Toxizität des Ozons, (2) die Anwendung unpräziser Ozongeneratoren, (3) offenkundige „Scharlatanerie“ der Anwender, (4) mangelnde Korrelation zwischen *in vitro* und *in vivo* Resultaten, (5) fehlende Standardisierung der Vorgehensweise, (6) mangelndes Interesse des distribuierenden Gesundheitssystems, (7) fehlende Forschungsgelder und letztlich auch (8) die grundlegende Skepsis der wissenschaftlichen und ärztlichen Öffentlichkeit gegenüber der Anwendung von Ozon.¹⁴

1.3.2. Natriumhypochlorit

Eines der ältesten Antiseptika in der Kariesbehandlung ist das Natriumhypochlorit (NaOCl). NaOCl ist ein Natriumsalz der hypochlorigen Säure (HClO) und ein starkes Oxidans. Es ist u. a. auch unter dem veralteten Begriff der „unterchlorigen Säure“ bekannt oder auch als sogenanntes *Eau de Labarraque*. Der Eigename *Eau de Labarraque* lässt sich auf den französischen Apotheker Antoine Germaine Labarraque (1777–1850) zurückverfolgen. Er soll sich als erster mit kommerziellen Zielen die Eigenschaften der Natriumhypochloritlösung zu Eigen gemacht haben und verkaufte das Agens als Desinfektionsmittel ab 1822 in Paris. Die eindeutig desinfizierende Wirkung der Lösung trug dazu bei, dass NaOCl eine rasche Verbreitung während des ersten Weltkrieges als Antiseptikum erfuhr.

1.4. Der Ozongenerator HealOzone 2130C

1.4.1. Aufbau, Funktion und Wirkungsweise des HealOzone 2130C

Ozon entsteht auf natürlichem Weg in der Atmosphäre, wenn Sauerstoff durch kurzwellige UV-Strahlung (ca. 182 nm) in atomaren Sauerstoff gespalten wird. Dabei formieren drei Sauerstoffmoleküle den sogenannten „Trisauerstoff“, das Ozon.⁶⁰



Abbildung 2: HealOzone 2130C Ozongenerator

Der Ozongenerator mit dem darin befindlichen UV-Strahler bildet das Kernstück des HealOzone 2130C Gerätes (Abb. 2). In Abbildung 3 sind der Aufbau und die Funktion des Ozongenerators im Detail beschrieben. Umgebungssauerstoff, der durch einen Lufttrockner (Abb. 3 Punkt 3) angesaugt wird, wird zunächst von Feuchtigkeit befreit. Ein Differenzdruckmesser (Abb. 3 Punkt 2) prüft auf Leckagen im System. Sind keine vorhanden, wird der Ozongenerator (Abb. 3 Punkt 1) aktiviert. Im Ozongenerator wird der in der angesaugten Umgebungsluft befindliche Sauerstoff zu freien Sauerstoffatomen dissoziiert. Die freien Sauerstoffatome formieren sich nun nicht zu einem aus zwei Sauerstoffatomen bestehenden Sauerstoffmolekül (O_2), sondern mit Hilfe des UV-Strahlers zu einem aus drei Sauerstoffatomen bestehenden Ozonmolekül (O_3). Das erzeugte Ozon kann dann mit Hilfe eines Handstücks (Abb. 3 Punkt 8) auf die gewünschte Fläche appliziert werden. Die Geschwindigkeit des Ozon-Luftgemisches bei Austritt aus dem Handstück beträgt 5 m/s. Die dabei erzeugte kinetische Energie der Teilchen soll die therapeutische Tiefenwirkung unterstützen. In der mit dem Handstück verbundenen Silikonkappe (Abb. 3 Punkt 9) findet der Ozonaustausch 100mal pro Sekunde statt. Damit soll eine ständige Anwesenheit des Oxidationsmittels garantiert werden.

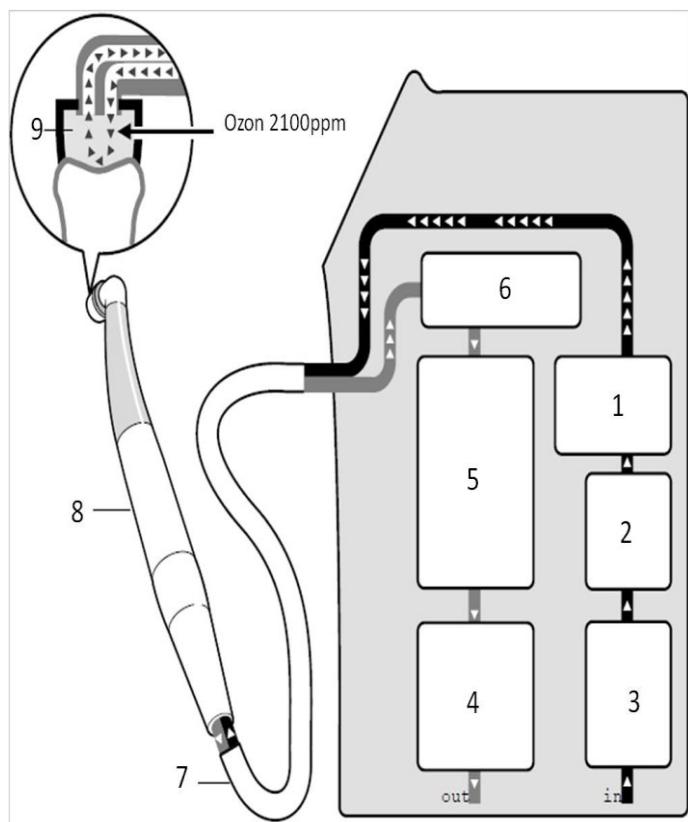


Abbildung 3: Aufbau und Funktion des HealOzone 2130C Ozongenerators. Die im Lufttrockner (3) getrocknete Umgebungsluft wird über den Differenzdrucksensor (2) dem Ozongenerator (1) zugeführt. Über einen angeschlossenen Schlauch (7) mit Handstück (8) kann über eine Silikonkappe (9) das erzeugte Ozon auf die gewünschte Stelle appliziert werden. Nach Abschluss des Vorgangs wird das Ozon aus der Silikonkappe abgesaugt und über den Feuchtabschneider (6), der verhindern soll, dass Feuchtigkeit in das ableitende System gelangt und über den Ozonneutralisator (5) abgeleitet. Die Vakuumpumpe (4) garantiert während des gesamten Prozesses einen Unterdruck, sodass kein Ozon aus dem Kreislauf entweichen kann. Weitere Informationen über den Produktaufbau können den Herstellerangaben - KaVo HealOzone Produktinformation – entnommen werden.

Lynch und Baysan, beides Befürworter

der Ozontherapie, haben sowohl in *in vivo* als auch in *in vitro*-Studien eine deutliche Reduktion oralpathogener Bakterienspezies durch die Verwendung von Ozon beobachtet. Im Jahr 1999 veröffentlichten sie erste Versuchsergebnisse, die mit Hilfe eines neuartigen Ozongenerators der Firma HealOzone produziert wurden. In diesen ersten Veröffentlichungen wie auch zu späteren Zeitpunkten zeigten sie, dass gasförmiges Ozon eine deutliche Keimzahlreduktion schon nach kurzem Ozonkontakt bewirken kann.^{8,9} In klinischen Studien wurde u. a. das breite Anwendungsspektrum des HealOzon-Generators, zu dem neben der Behandlung kariöser Läsionen auch die Behandlung von Aphten und Herpes labiales sowie die Desinfektion von Kronenstümpfen gehört,⁵⁴ genannt. Der HealOzone 2130C Ozongenerator erweist sich in der Praxis als kleine und kaum Lärm erzeugende Behandlungseinheit. Das Risiko eines Ozonaustritts ist für den Patienten sowie für den Behandler nachweislich als vernachlässigbar zu betrachten. Millar et al. wiesen in einer klinischen Simulation anhand eines Phantomkopfes nach, dass mit dem KaVo HealOzone 2130 Ozongenerator nach einer Behandlung bis zu 40 s kein Ozon im Behandlungsbereich nachweisbar war.⁷¹

1.5. Zielstellung der Dissertation

Die für die Karies und Endodontitis verantwortlichen Bakterien wachsen auf der Zahnoberfläche und in den natürlichen Dentinkanälen in Form von Biofilmen. Diese Organisationsform schützt sie vor mechanisch-biochemischen Einflüssen sowie im weiteren Sinne vor therapeutischen Maßnahmen. Effizient gegen die Erreger dieser Krankheiten gerichtete Therapieformen bedürfen daher einer Kombination von mechanischen und chemischen Maßnahmen, um eine lokale Sanierung und ggf. Heilung zu gewährleisten.

In bisherigen Studien zu den beiden o. g. zahnmedizinischen Erkrankungen konnte ein keimreduzierender Effekt von Ozon beobachtet werden. Die meisten dieser Studien fußten in ihrem Versuchsaufbau auf *in vivo*-Studien mit sukzessiv angeschlossener konventioneller Behandlungsanwendung, bzw. auf *in vitro*-Studien unter Verwendung von Monospezies-Biofilmen.^{39,51,85,86}

Die bisher veröffentlichten *in vitro*-Studien wurden dabei mit unterschiedlich alten Biofilmen von *Actinomyces naeslundii*, *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Lactobacillus paracasei*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus sobrinus* und *Veillonella dispar* sowie mit planktonischen Zellen der genannten Spezies unter Verwendung von in Wasser gelöstem und gasförmigen Ozon an extrahierten Zähnen bzw. Zellulose-Nitrat-Filtern oder Glasperlen getestet.^{9,32,49,73,74,94} Die Ozonexpositionszeiten variierten dabei zwischen 10 Sekunden und 20 Minuten, was zu keiner bzw. einer geringen bis hin zu einer deutlichen Keimzahlreduktion führte.^{1,5,6,47,77} Die Ergebnisvarianz zwischen verschiedenen Versuchsansätzen wurde durch die häufig kurz gewählten Einwirkzeiten, die Sequenz und die Abstände der Ozon-Applikation, aber auch die Anwesenheit von zu viel Kulturflüssigkeit bedingt.⁶⁶ Die *in vitro*-Wirkung einer Ozontherapie ist daher weiterhin umstritten.⁷⁰

In der vorliegenden Dissertation sollte die potentiell antikariöse Wirkung von Ozon, welches mit Hilfe des von KaVo angebotenen Ozongenerators HealOzon 2130C generiert wird, untersucht werden. Das Gerät von KaVo hat eine fixe Ozondosierung von 2100 ppm +/- 10 %, arbeitet geräuscharm und ist durch seine geringe Größe sehr gut für die ambulante Kariesbehandlung geeignet. Wie oben beschrieben wurden seit der Markteinführung 2003 in mehreren Publikationen divergente Ergebnisse publiziert. In der vorliegenden Arbeit sollte unter standardisierten Bedingungen untersucht werden, inwiefern gasförmiges Ozon ein potentes bakterizides Mittel gegen Keime bzw. Pathogene der Mundhöhle ist. Dazu sollte sowohl die Wirkung des Ozon auf Biofilme als auch auf planktonische Zellen der fakultativ anaeroben Bakterienstämme *Streptococcus mutans* und *Enterococcus faecalis*, sowie der

obligat anaeroben Bakterienstämme *Fusobacterium nucleatum* und *Parvimonas micra* untersucht werden. Für die Bestimmung der Regenerationsfähigkeit der Teststämme und der bakteriziden Potenz von Ozon sollte der Versuchsaufbau mit verschiedenen, aber genau definierten Untersuchungszeitpunkten (zweizeitig), sowie Ozon-Expositionszeiten (60 s, 120 s, 180 s und 300 s) erfolgen. Zusätzlich sollte die Wirkung von Natriumhypochlorit (NaOCl) in einer Konzentration von 5 %, wie es in der konventionellen Stomatologie als Spül- und Desinfektionsmittel verwendet wird, in Kombination mit gasförmigem Ozon untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1. Bakterienstämme

In der nachfolgenden Tabelle 1 sind alle in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme, deren Charakteristika, Vorkommen und Herkunft/ Referenz aufgeführt.

Tabelle 1: Verwendete Bakterien mit Angaben des Stammes, einer Kurzcharakteristik und der Herkunft/ Referenz.

Stamm	Kurzcharakteristik	Herkunft/Referenz
<i>Streptococcus mutans</i>	fakultativ anaerob, grampositive Kettenkokken, Vorkommen auf der Haut und den Schleimhäuten, Erreger von Karies aber auch Endokarditis	<ul style="list-style-type: none"> • DSM 20523 • Klinisches Isolat Nr. 4300 der UMR-Stammsammlung • Klinisches Isolat Nr. 6178 der UMR-Stammsammlung
<i>Enterococcus faecalis</i>	fakultativ anaerob, grampositive Diplokokken, Teil der physiologischen Darmflora, Erkrankungsmanifestationen hauptsächlich bei (lokal) gestörter Abwehr	<ul style="list-style-type: none"> • DSMZ 20478 • Klinisches Isolat Nr. 1942 der UMR-Stammsammlung • Klinisches Isolat Nr. 1904 der UMR-Stammsammlung
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	obligat anaerob, gramnegatives, nicht sporenbildendes Stäbchenbakterium, Paradontitiserreger	<ul style="list-style-type: none"> • ATCC 25586
<i>Parvimonas micra</i>	obligat anaerob, grampositive Kokken, Paradontitiserreger	<ul style="list-style-type: none"> • ATCC 33270
<i>Escherichia coli</i>	fakultativ anaerob, gramnegatives, sporenloses, peritrich begeißeltes Stäbchen, klassischer Fäkalkeim, Erkrankungen je nach genetischer Determination des E.coli-Stamms	<ul style="list-style-type: none"> • DH5α, Kontrollstamm der UMR-Stammsammlung

2.2. Kultivierungsbedingungen

Die Anzucht der fakultativ anaeroben Bakterien (*S. mutans*, *E. faecalis* und *E. coli*) erfolgte in Brain-Heart-Infusion Medium (BHI, Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England). Als Festmedien dienten sowohl BHI-Agar-Platten, für deren Herstellung dem Medium 1,5 % [w/v] Agar zugesetzt wurden, als auch Columbia-Blut-Agar-Platten (Columbia Agar mit 5 % Schafsblood, Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England).

Brain Heart Infusion Medium (BHI) (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England)

BHI	37 g
H ₂ O _{reinst}	ad 1 l

Zur Anzucht der obligat anaeroben Bakterien (*Fusobacterium nucleatum*, *Parvimonas micra*) in Flüssigkulturen wurde bzgl. des Sauerstoffgehalts vorreduziertes BHI-Medium mit 0,25 % Glutamat versetzt und verwendet. Als Festmedium dienten für diese Bakterien vorreduzierte Columbia-Blut-Agar-Platten.

Glutamat-Stamm-Lösung (5 % [w/v], 250 ml)

Glutamat	12,5 g
H ₂ O _{reinst}	ad 250 ml

Das BHI-Medium wurde zur Sterilisation bei 121 °C autoklaviert. Die hitzelabile Lösung Glutamat wurde mittels Sterilfilter (PVDF-Membranfilter, Porengröße 0,2 µm, Braun, Melsungen, D) nach dem Abkühlen des autoklavierten Mediums auf < 50 °C zugesetzt.

Die Anzucht der fakultativ anaeroben Bakterien erfolgte aerob bei 37 °C und 5 % CO₂, während die obligat anaeroben Bakterien bei 37 °C strikt anaerob (80 % N₂, 10 % CO₂, 10 % H₂) mit Hilfe einer Anaerobenbox (miniMACS anaerobic workstation, DWS Meintrupp, Lähden-Holte, D) kultiviert wurden. Als Kulturgefäß dienten 50 ml Falkonröhrchen. Nach 24 h Inkubation der fakultativ anaeroben und 72 h Inkubation der obligat anaeroben Bakterien wurden die Zellen geerntet. Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation der Kulturgefäße (Heraeus Variofuge 3.0, 4500 x g, 10 min, 4 °C). Kulturen auf BHI- oder Columbia-Blut-Agar-Platten wurden aerob bei 5 % CO₂ bzw. anaerob (80 % N₂, 10 % CO₂, 10 % H₂) bei 37 °C über 48 h bzw. 72–96 h bebrütet.

2.3. Stammhaltung

Zur längerfristigen Aufbewahrung der Bakterien wurde das *MicrobankTM System* (Pro-Lab Diagnostics, Neston, England) nach Vorgaben des Herstellers genutzt. Die Lagerung der Stämme erfolgte bei -80 °C. Die Rekultivierung erfolgte auf Columbia-Blut-Agar-Platten, die

für die obligat anaeroben Bakterien vorreduziert verwendet wurden. Die beimpften Platten der fakultativ anaeroben Bakterien wurden bei 37 °C und 10 % CO₂, die der obligat anaeroben Bakterien bei 37 °C und 80 % N₂, 10 % CO₂, und 10 % H₂ bebrütet.

2.4. Nährmedien und Zusätze zur Untersuchung der Biofilmbildung

Brain Heart Infusion Medium (BHI) (s. 2.2)

BHI	37 g
H ₂ O _{reinst}	ad 1 l

Brain Heart Infusion Medium mit verschiedenen Mucin-Konzentrationen (BHI + Mucin)

BHI	37 g
Mucin	0,1 % [w/v], 0,5 % [w/v], 1 % [w/v]
H ₂ O _{reinst}	ad 1 l

Das Medium wurde zur Sterilisation bei 121 °C autoklaviert. Für Untersuchungen zur Wirkung verschiedener Mucin-Konzentrationen wurde dem BHI-Medium 0,1 % [w/v] Mucin, 0,5 % [w/v] bzw. 1 % [w/v] Mucin zugesetzt.

2.5. Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen wurden hauptsächlich von MERCK (Darmstadt, D), SIGMA (Taufkirchen, D), J.T.BAKER (Philippburg, USA) und ROTH GmbH (Karlsruhe, D) bezogen. Methodenspezifische Puffer, Lösungen und Enzyme werden in den entsprechenden Protokollen aufgeführt. Die folgenden, allgemeinen Puffer und Lösungen wurden bei mehreren Methoden verwendet.

10 x PBS-Puffer (phosphate buffered saline, 1 l)

NaCl	1,37 M
KCl	0,027 M
KH ₂ PO ₄	0,015 M
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	0,079 M
H ₂ O _{reinst}	ad 1000 ml
pH 7,4	

Der 10x PBS-Puffer wurde bei 121 °C autoklaviert. Zur Herstellung einer 1x PBS-Lösung wurde 10x PBS 1:10 in Wasser (H₂O_{reinst}) verdünnt, der pH überprüft (pH 7,4) und der Puffer ebenfalls autoklaviert.

Glutardialdehydlösung (2,5 %)

9 ml 0,1 M Natriumphosphatpuffer (pH 7,4)

1 ml 25 % Glutardialdehyd-Lösung (Merck, Darmstadt, D)

2.6. Chemikalien

In der vorliegenden Arbeit wurden die verwendeten Chemikalien, soweit nicht gesondert aufgeführt, von den nachfolgend aufgeführten Firmen verwendet:

<i>Chemikalie</i>	<i>Hersteller</i>
Agar technical No. 3	Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England
Brain-Heart-Infusion	Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England
Cystein	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ethanol 96 %	Zentralapotheke Universitätsklinikum Rostock
Galaktose	Merck KGaA, Darmstadt
Glutardialdehydlösung (25 %)	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck KGaA, Darmstadt
Di-Kaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4)	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumiodid (KI)	Merck KGaA, Darmstadt
Kristallviolett	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Mucin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumchlorid (NaCl)	Carl-Roth GmbH + Co., Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat x H_2O	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhydrochlorid (NaOCl)	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumthiosulfat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)	Merck KGaA, Darmstadt
Safranin Pulver	Certistain; J. T. Baker (Deventer, Holland)
Salzsäure (HCl)	Merck KGaA, Darmstadt
Stärke	Merck KGaA, Darmstadt
Wasserstoffperoxid (H_2O_2)	Merck KGaA, Darmstadt

2.7. Farbstoffe für die Fluoreszenzmikroskopie

Live/ Dead BacLight Bacterial Viability Kit Invitrogen, Darmstadt

2.8. Laborgeräte und Software

<i>Laborgerät</i>	<i>Hersteller</i>
Analysenwaage Typ BP 4100S	Sartorius Göttingen, D

Brutschrank Typ B6060	Heraeus, Hamburg, D
Brutschrank HeraCell	Heraeus, Hamburg, D
CO ₂ -Inkubator Serie CB	Binder, Tuttlingen, D
Elektronenmikroskop DSM 960A	Carl Zeiss, Jena, D
Fluoreszenzmikroskop BX60	Olympus, Hamburg, D
HealOzone Grundgerät 2130C	KaVo.Dental Excellence., Biberach/ Riß, D
HealOzone Endo-Handstück 2131C plus	KaVo.Dental Excellence., Biberach/ Riß, D
Kühlzentrifuge Typ Heraeus Variofuge 3.0	Heraeus, Hamburg, D
Kritisch-Punkt-Trockner	Emitech, Ashford, UK
Lyophilisator Alpha 1-4	Christ Laborgeräte, Osterode, D
miniMACS anaerobic workstation	DWS Meintrupp, Lähden-Holte, D
pH-Meter MP220	Denver Instrument GmbH, Weilheim, D
pH-Meter ino-Lab® pH720	WTW GmbH, Weilheim, D
REAXtop Reagenzglasschüttler	HeidolphInstruments GmbH, Schwabach, D
Schlauchpumpe ECOLINE VC-360	ISMA TEC. Wertheim-Mondfeld, D
Spektrophotometer SmartSpec TM 3000	Bio-Rad-Laboratories, Hercules, USA
Tecan Microplate Reader infinite® 200	Tecan Trading GmbH, Männedorf, CH
Tecan Spectra Reader Classic	Tecan Trading GmbH, Männedorf, CH
Vortex-Genie Touch Mixer	Scientific Industries, Bohemia, USA
Wipptisch	Biometra WT 17, Göttingen, D

Folgende Software wurde im Verlauf der Arbeiten genutzt:

Programm	Hersteller
Citavi 3.0.12.	Swiss Academic Software GmbH, Wädenswil, CH
Easy Win Screening Software	Tecan Trading GmbH, Männedorf, CH
Metavue	Molecular Devices, Downingtown, USA
Microsoft Office Programme 2007 und 2010 (Excel, PowerPoint, Word)	Microsoft©, Redmont, USA
SPSS 19.0	IBM Corp. Released 2010. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 19.0. Armonk, NY: IBM

2.9. HealOzone 2130C-Aufbau, Funktion und Wirkungsweise des Ozongenerators

Zur Funktionsweise des Ozongenerators siehe Einleitung (Abschnitt 1.4.1).

2.10. Protokoll zur Biofilmbildung

Die fakultativ anaeroben Bakterien wurden in BHI bzw. die obligat anaeroben in BHI + 0,25 % Glutamat unter aeroben 37 °C, 5 % CO₂ bzw. anaeroben Bedingungen (37 °C, 80 % N₂, 1 % CO₂, 10 % H₂) bis zum Erreichen der stationären Wachstumsphase angezogen, zentrifugiert (Heraeus Variofuge 3.0, 10 min, 4000 rpm, 4 °C) und die Bakteriensedimente mit 1x PBS (pH 7,4) gewaschen. Für jede Spezies wurde eine Suspension mit einer optischen Dichte bei 600 nm (OD 600) eingestellt, die etwa 1 x 10⁸ Zellen/ml entsprach und anschließend in unbeschichtete 24-Well Zellkultur-Platten oder 96-Well Mikrotiter-Platten (Greiner Bio-One, Frickehausen) überführt. Die Biofilmkulturen wurden unter statischen Kulturbedingungen gemäß der maximalen Biofilmmasse, die in den Vorversuchen (s. Abschnitt 3.1.1. und 3.1.2.) ermittelt wurde, 72 Stunden (*E. faecalis* spp.) bzw. für 24 Stunden (*S. mutans* spp.) bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert bzw. bei Verwendung der obligat anaeroben Stämme für 72 Stunden bei 37 °C unter anaeroben Bedingungen (80 % N₂, 10 % CO₂, 10 % H₂) bebrütet. Die Atmosphäre des anaeroben Inkubators (DWS Meintrupp, Lähden-Holte, D) war mit Wasserdampf gesättigt, um ein Austrocknen der Kulturen zu vermeiden.

2.11. Optimierung der Biofilmbildung

Um die Gegebenheiten der Mundhöhle zu simulieren, wurden dem verwendeten BHI-Medium Mucin zugesetzt. Um eine möglichst optimale Ausbeute an Biofilm zu erhalten, wurden verschiedene Mucin-Konzentrationen (0,1 %, 0,5 % und 1 %) untersucht.

2.12. Bestimmung der Biofilm-Masse mittels Safraninfärbung

Die Bestimmung der Biofilm-Masse erfolgte mittels Safraninfärbung. Dazu wurden die Biofilmkulturen in unbeschichteten 96-Well Mikrotiter-Platten angezogen. Nach der entsprechenden Inkubationszeit wurde das Flüssigmedium entfernt und die Vertiefungen mit 200 µl 1x PBS (pH 7,4) vorsichtig gewaschen. Die Vertiefungen wurden nach dem Waschen mit 200 µl 0,1 % Safranin O [w/v] für 15 min bei Raumtemperatur gefärbt, anschließend mit 200 µl 1x PBS (pH 7,4) gewaschen und schließlich luftgetrocknet. Die Biofilm-Masse wurde durch Messung der Absorption bei 492 nm mit Hilfe eines Spektralphotometer (Tecan Spectra Reader Classic, Tecan Trading AG) quantifiziert. Als Negativ-Kontrolle diente ein Bakterienfreier BHI-Mucin-Ansatz.

2.13. Bestimmung der Biofilm-Lebendkeimzahlen

Die Bestimmung der Lebendkeimzahl (LKZ) dient der quantitativen Erfassung aller vermehrungsfähigen Mikroorganismen. Zur Bestimmung der Lebendkeimzahlen (LKZ) von *S. mutans* spp., *E. faecalis* spp., *E. coli*, *P. micra* und *F. nucleatum* wurden unbeschichtete 24-

Well Zellkultur-Platten verwendet. Nach Inkubation der Biofilmkulturen wurde das Nährmedium entfernt und die Vertiefungen vorsichtig mit 1 ml 1x PBS (pH 7,4) gewaschen. Anschließend wurden die Biofilme von der besiedelten Oberfläche sorgfältig abgekratzt und in 1 ml 1x PBS überführt. Im nächsten Schritt wurde eine serielle Verdünnungsreihe dieser Suspension bis zu einer Verdünnung von 10^{-8} gefertigt. Dazu wurden 100 µl der Ausgangssuspension in 900 µl 1x PBS (pH 7,4) ($=10^{-1}$) überführt. Die Suspension wurde mittels eines Vortex (Scientific Industries, Bohemia, USA) gut vermengt und wiederum 100 µl dieser Suspension in das nächste Reaktionsgefäß mit 900 µl 1x PBS (pH 7,4) gegeben ($=10^{-2}$) bis zu einer Verdünnung von 10^{-8} . Anschließend wurde die Verdünnungsreihe mit Hilfe eines sterilen Spatels auf Columbia-Blut-Agar-Platten oder BHI-Agar-Platten gleichmäßig aufgebracht und je nach Bakterienstamm bei $37^{\circ}\text{C} / 5\% \text{CO}_2$ bzw. $37^{\circ}\text{C} 10\% \text{H}_2/ 10\% \text{CO}_2/ 80\% \text{N}_2$ inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Kolonien per visueller Inspektion und händischer Protokollierung gezählt.

2.14. Bestimmung der Wachstumskinetik- Aufnahme einer Wachstumskurve

Zur Bestimmung der Wachstumskinetik wurden die Wachstumskurven der einzelnen Teststämme bestimmt. Die Bakterien wurden in BHI-Medium einer Übernachtkultur angezogen, zentrifugiert (Heraeus Variofuge 3.0, 10 min, 4000 rpm, 4°C) und die Bakteriensedimente mit 1x PBS (pH 7,4) gewaschen. Anschließend wurde für jede Spezies eine Suspension mit einer optischen Dichte bei 600 nm (OD 600) eingestellt, die etwa 1×10^8 Zellen/ml entsprach. Die Suspension wurde nun in einem Verhältnis 1:10 in frisches BHI-Medium überführt und bei $37^{\circ}\text{C}/ 5\% \text{CO}_2$ bzw. $37^{\circ}\text{C} 10\% \text{H}_2/ 10\% \text{CO}_2/ 80\% \text{N}_2$ inkubiert. Alle 60 Minuten erfolgte die Messung der optischen Dichte bei 600 nm mit dem Spektrophotometer SmartSpec TM 3000 (Bio-Rad-Laboratories, Hercules, USA) bis zum Erreichen der stationären Phase. Als Kontrolle diente Bakterien-freies BHI-Medium.

Das Wachstum einer Bakterienkultur lässt sich in vier Phasen aufteilen. Die erste Phase ist die sogenannte lag-Phase oder Latenzphase. Obwohl in dieser Phase ideale Wachstumsbedingungen (Temperatur, Substratangebot) vorliegen, bleibt die Menge der Bakterien über einen gewissen Zeitraum konstant. In dieser Phase widmen sich die Zellen der Enzyminduktion sowie der Zelladhärenz. Planktonische Zellen, frei bewegliche Zellen, gelten hierbei als Erstkolonialisierer.⁶³ Sind ausreichend Enzyme zur Reproduktion gebildet, tritt die Kultur in die log-Phase oder auch exponentielle Phase. Es kommt nun zu einer exponentiellen Vermehrung der Zellen und somit zu einem raschen Anstieg der Population. Mehrere Faktoren führen in der Transitionsphase zu einer Verlangsamung des Kulturwachstums wie z. B. abnehmendes Substratangebot durch Verbrauch, Akkumulation nicht abbaubarer Metaboliten

(z. B. Säuren, die bei der Zuckervergärung entstehen) oder reduziertes Sauerstoffangebot. In der stationären Phase (auch als reife Kultur bezeichnet) nimmt der Anteil der vermehrungsfähigen Zellen innerhalb der Bakterienpopulation langsam ab. Dies erklärt sich zum einen durch ein Hunger-bedingtes Absterben der Zellen, zum anderen durch das Überwechseln in einen nur noch durch Spezialmethoden kultivierbaren (viable but non-culturable, VBNC) Zustand.^{99,107} Voraussetzung für das reproduzierbare und typische Wachstum in der logarithmischen Phase ist, dass die Bakterienkultur unter konstanter Temperatur inkubiert wird.¹⁰⁷

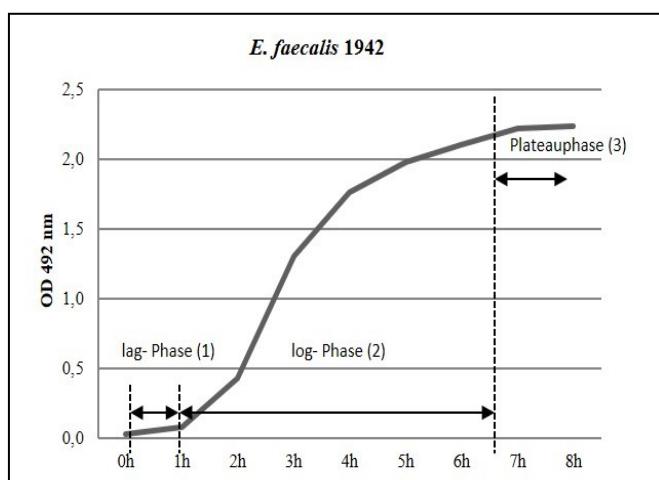


Abbildung 4: Beispiel einer Wachstumskurve anhand der Wachstumskinetik von *E. faecalis* 1942. In der lag- oder Latenzphase (1) bleibt die Menge der Bakterien trotz idealem Nährstoffangebotes konstant. In der log- Phase (2) tritt eine exponentielle Vermehrung und somit eine rasche Vermehrung der Bakterien ein. Das Kulturwachstum verlangsamt sich bei u. a. abnehmendem Substratangebot, Akkumulation nicht abbaubarer Metabolite oder reduziertem Sauerstoffangebot, sodass die Bakterienpopulation in die Plateauphase (3) eintritt und dort nur langsam an Zahl von kultivierbaren Bakterien verliert.

2.15. Nachweis einer für diverse Arbeitsschritte notwendigen Sterilität

Die Applikation des Ozons auf die Zellkulturen in den Kavitäten einer 24-Kavitäten Zellkultur-Platte erfolgte mit einer Gummipropfenschablone (KaVo Dental Excellence, Biberach/ Riß, D). Diese enthielt eine mediane, kreisrunde Öffnung und wurde mittels einer desinfizierten Pinzette auf die Oberfläche der Kavität gelegt. Der Gummipropf sollte in den Versuchen für jeweils eine Versuchsreihe genutzt werden. Um zu überprüfen, dass bei der Applikation von Ozon keine Keimverschleppung erfolgt, wurde nachfolgend beschriebene Versuchsreihe mit *Escherichia coli* DH5α durchgeführt. *E. coli* DH5α wurde in BHI-Medium bis zum Erreichen der stationären Wachstumsphase bei 37 °C und 5 % CO₂ angezogen, zentrifugiert (Heraeus Variofuge 3.0, 10 min, 4000 rpm, 4 °C) und die Bakteriensedimente mit 1x PBS (pH 7,4) gewaschen. Anschließend wurde die Suspension auf eine optischen Dichte bei 600 nm (OD600) eingestellt, die etwa 1x 10⁸ Zellen/ml entsprach.

MATERIAL UND METHODEN

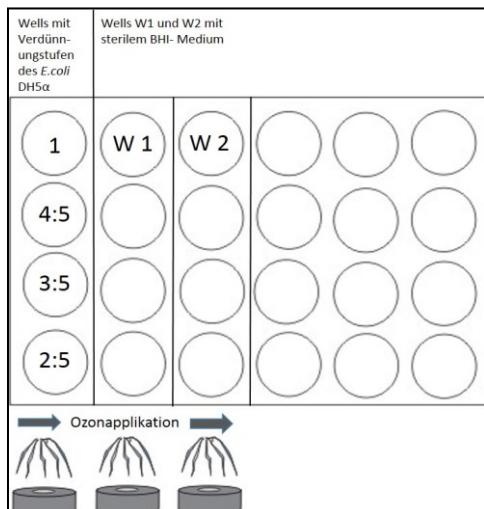


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. In den linksäußeren Wells befindet sich die eingestellte Bakteriensuspension des *E. coli* DH5α in unterschiedlichen Bakterien-PBS-Verhältnissen. Für je eine Reihe wurde ein Gummipropfen verwendet und dann sukzessive Well 1 und Well 2 behandelt. Dieses Verfahren wurde für jede Reihe durchgeführt.

Die Abbildung 5 stellt schematisch den Versuchsaufbau zur Untersuchung der Keimverschleppung verschieden konzentrierter *E. coli* DH5α – Suspensionen in steriles BHI-Medium bei wiederholter Nutzung der Gummipropfenschablone dar. Nach Auflegen der Gummipropfenschablone wurde diese je Reihe auf die 2. und 3. Kavität aufgelegt. Die 24-Näpfchen Zellkultur-Platte wurde anschließend bei 37 °C für 24 h bebrütet und die Kavitäten auf Wachstum des *E. coli* - Stammes und damit Verschleppung durch die Gummipropfenschablone überprüft.

2.16. Funktionsnachweis des HealOzone-Ozongenerators

Die Ozonproduktion des Ozongenerators wurde mit einem qualitativen Ozonnachweis unter Verwendung von Kaliumiodid und Stärke nachgewiesen. Ozon kann anhand eines Farbumschlages sichtbar gemacht werden. Die Reaktion basiert auf der oxidierenden Eigenschaft des Ozons. Die in wässriger Lösung vorliegenden Iodid-Ionen des Kaliumiodids werden durch die oxidative Eigenschaft des Ozons zu elementaren Iod oxidiert. Anschließend kommt es in Anwesenheit der Stärke zur Iod- Stärke- Reaktion, in welcher die Stärke als blauer Farbumschlag sichtbar gemacht wird.

Für das Experiment wurden eine frische 5 %-ige Stärkelösung und 1 %-ige Iodidlösung in destilliertem Wasser hergestellt. Die Lösungen wurden zusammen in einem Verhältnis von 5:1 in die Kavitäten einer 24-Kavitäten Zellkulturplatte gegeben und Ozon wurde anschließend mit Hilfe des HealOzone 2310C Ozongenerators (KaVo Dental Excellence, Biberach/ Riß, D) in zeitlichen Applikationsdosen von 60 s, 120 s, 180 s und 300 s eingeleitet. Gemäß der applizierten Ozondosis färbte sich die in den Kavitäten befindliche Lösung rosa bis pupurn (s. Abb. 6).

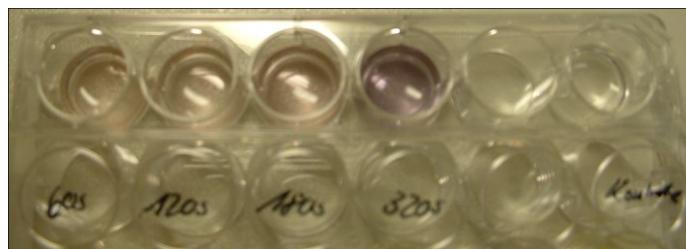


Abbildung 6: Funktionsnachweis des HealOzone 2130C Ozongenerators: Eine 24-Well Zellkultur-Platte wurde mit 1 %iger Iod- und 5 %iger Stärkelösung in einem Verhältnis von 5:1 beschickt, und anschließend für 60, 120, 180 und 300 Sekunden mit Ozon behandelt. Die Abbildung zeigt die Verfärbung der Suspension durch Oxidation der Iodid-Ionen zu elementaren Iod mit anschließender Iod-Stärke-Reaktion.

2.17. Wirkung von Natriumthiosulfat und Natriumhypochlorit

Tilton et al. beschrieben 1977 die erfolgreiche Blockierung der antibakteriellen Silberwirkung mit Hilfe von Natriumthiosulfat. Angelehnt an diese Ergebnisse wurde die dort vorgeschlagene Dosierung von 1,46 g/ 1000 ml (ca. 0,0092 M) für die Versuche der vorliegenden Arbeit übernommen.¹⁰⁸

Natriumthiosulfat wurde jeweils frisch am Tag des Versuches in 1x PBS (pH 7,4) gelöst (= Na₂S₂O₃/ PBS). Parallel zum Natriumthiosulfatansatz wurde arbeitstäglich eine 5 % Natriumhypochloritlösung zubereitet. Die Anwendung des Natriumhypochlorits diente als Positivkontrolle. Das NaOCl wurde ebenso wie das Natriumthiosulfat in 1x PBS (pH 7,4) gelöst (NaOCl/ PBS). Zur Untersuchung der Antidot-Wirkung des Natriumthiosulfats wurden die Biofilme der fakultativ anaeroben Bakterienspezies nach Waschen und Entfernen der Flüssigkeiten über einen definierten Zeitraum von jeweils 15 Minuten mit Na₂S₂O₃/PBS bzw. mit NaOCl/ PBS plus Na₂S₂O₃/ PBS behandelt. Als Kontrolle diente die Behandlung der Biofilme mit reinem PBS (pH 7,4). Nach den Kontaktzeiten wurden die Lösungen von den Biofilmen abgehoben und verworfen. In der Versuchsgruppe A (Abb. 7, Reihe A) erfolgte sofort nach Abschluss der Applikation der Lösungen die Bestimmung der Lebendkeimzahl. Bei den Proben der Reihe B (Abb. 7, Reihe B) wurden diese mit frischem BHI-Mucin-Medium versetzt und bei 37 °C/ 5 % CO₂ für 24 bzw. 72 Stunden inkubiert. Nach den entsprechenden Inkubationszeiten erfolgte die Bestimmung der Lebendkeimzahlen. Eine schematische Darstellung der Kavitätenfüllung ist in Abbildung 7 dargestellt.

MATERIAL UND METHODEN

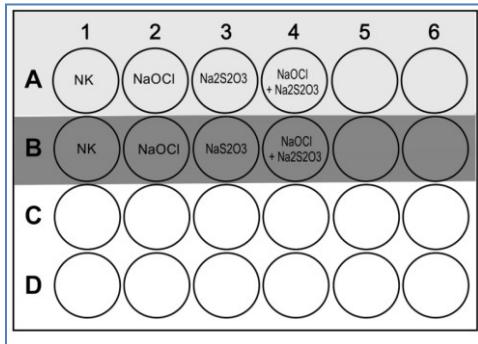


Abbildung 7: Schematische Darstellung der $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ / PBS bzw. NaOCl-Applikation. Bei Proben der Reihe A erfolgte sofort nach der Behandlung die Bestimmung der KBE/ ml. Bei Proben der Reihe B erfolgte nach 24 h die Bestimmung der KBE/ ml. Die Applikationszeit erfolgte jeweils mit 15 min. Legende/ Abkürzungen: NK (Negativkontrolle), $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (Natriumthiosulfat), PBS (*Phosphate Buffered Saline*), NaOCl (Natriumhypochlorit)

Der gleiche Versuchsansatz wurde für eine Applikationszeit von $t = 60$ s durchgeführt und in die Durchführung der aeroben Versuche integriert.

2.18. Untersuchung der Ozonwirkung unter aeroben Bedingungen

2.18.1. Ozonapplikation und Wirkung von Natriumthiosulfat

Die wie unter 2.16. angesetzten Biofilme wurden nach unten dargestelltem Schema (Abb. 8) alleinig mit Ozon für 60 s, 120 s, 180 s und 300 s bzw. mit Ozon für 60 s, 120 s, 180 s, 300 s und sofort im Anschluss mit Natriumthiosulfat (Applikationszeit 60 s) behandelt. Nach jedem Schritt wurde das entsprechende Agens entfernt und nach Abschluss des jeweilig letzten Schrittes wurde 1x PBS (pH 7,4) auf die Biofilme gegeben. Die Ermittlung einer ersten Keimzahlkinetik erfolgte unmittelbar nach Durchführung des Versuchs zum Zeitpunkt 0 und zum anderen nach einer 24-stündigen Bebrütungszeit bei $37^\circ\text{C}/ 5\% \text{CO}_2$. Die Kavitäten der Versuchsreihe, aus der die Lebendkeimzahl nach der 24-stündigen Inkubationszeit ermittelt wurde, wurden nach Abschluss der Behandlung mit einem frischen BHI-Mucin-Medium versehen. Ein unbehandelte Vertiefung diente als Negativkontrolle und ein mit einer 5 %-igen Natriumhypochloritlösung versehene Vertiefung als Positivkontrolle.

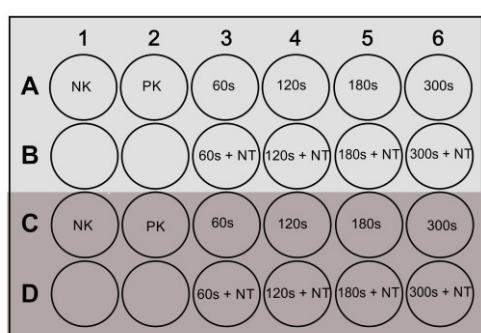


Abbildung 8: Schematische Darstellung zur aeroben Ozonapplikation. Die Biofilme in den einzelnen Kavitäten der 24-Well Zellkultur-Platten wurden mit den unter 3.1. genannten Substanzen versetzt – Reihe A und B: Die Bestimmung der KBE/ ml erfolgte direkt nach der Untersuchung. Ozonapplikation mit 60 s (A3), 120 s (A4), 180 s (A5), 300 s (A6), mit O_3 und anschließend $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (60 s) für 60 s (B3), 120 s (B4), 180 s (B5) und 300 s (B6), NaOCl 5 % (60 s) diente als Positivkontrolle (A2 und C2) und eine Kultur unbehandelt als Negativkontrolle (A1 und C1). Mit den Reihen C und D wurde gleich verfahren; es erfolgte eine Inkubation für 24 Stunden und anschließende eine Bestimmung der KBE/ ml. Legende/ Abkürzungen: NK (Negativkontrolle), $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (Natriumthiosulfat), NaOCl (Natriumhypochlorit), O_3 (Ozon)

2.18.2. Kombinierte Behandlung der Biofilme mit Natriumhypochlorit, Natriumthiosulfat und Ozon

Analog zu dem Versuchsaufbau im Abschnitt 2.17.1. wurde direkt nach der Ozonexposition mit 60 s bzw. 120 s eine 5 %-igen Natriumhypochloritlösung und im Anschluss eine Natriumthiosulfatlösung auf die Biofilme aufgetragen. Die Applikationszeiten des Natriumhypochlorits und Natriumthiosulfats betrugen jeweils 60 s.

Wie schon in dem vorhergehenden Versuch wurde nach jedem Schritt das entsprechende Agens entfernt. Nach Abschluss des jeweilig letzten Schrittes wurde 1x PBS (pH 7,4) auf die Biofilme gegeben. Auch hier wurde die erste Lebendkeimzahl der untersuchten Biofilme direkt nach Abschluss der Untersuchung zum Zeitpunkt 0 h durchgeführt und nach einer 24- stündigen Bebrütungszeit bei 37 °C/ 5 % CO₂. Die Versuchsreihe, deren Lebendkeimzahl nach der 24-stündigen Inkubationszeit ermittelt wurde, wurde nach Abschluss der Behandlung mit einem frischen BHI-Mucin-Medium versehen. Eine unbehandelte Vertiefung diente als Negativkontrolle und eine mit einer 5%-igen Natriumhypochloritlösung versehene Vertiefung als Positivkontrolle. In diesem Versuch wurde noch eine zweite Positivkontrolle mit NaOCl und Na₂S₂O₃ hinzugefügt, um die Antidot- Wirkung des Na₂S₂O₃ zu untersuchen. Die Applikationszeiten blieben mit jeweils 60 s unverändert.

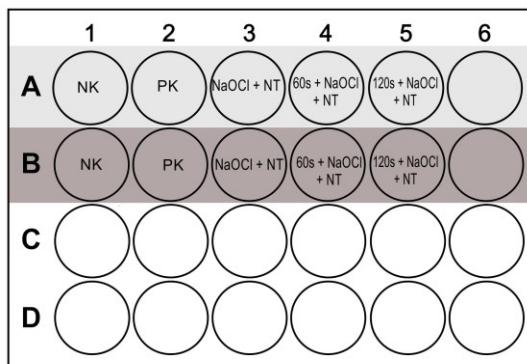


Abbildung 9: Schematische Darstellung zur aeroben Ozonapplikation. Die Biofilme in den einzelnen Kavitäten der 24-Näpfchen Zellkultur-Platten wurden analog zu Versuch 2.17.1 nach einer Ozonapplikation von 60 s und 120 s mit Natriumhypochlorit (tap 60 s) und im Anschluss mit Natriumthiosulfat (tap 60 s) behandelt. Als Negativkontrolle diente eine unbehandelte Vertiefung. In diesem Versuch wurden zwei Positivkontrollen etabliert: Die erste alleinig mit NaOCl und eine zweite mit NaOCl und Na₂S₂O₃. Reihe A: Bestimmung der KBE/ ml direkt nach der Untersuchung. Negativkontrolle (A1), Positivkontrolle (A2), NaOCl und Na₂S₂O₃ (A3), Ozonapplikation mit 60 s/ NaOCl/ Na₂S₂O₃ (A4), Ozonapplikation (O₃) mit 120 s/ NaOCl/ Na₂S₂O₃ (A5). Mit der Reihe B wurde gleich verfahren; es erfolgte eine Inkubation für 24 h und anschließend die Bestimmung der KBE/ ml. Legende/ Abkürzungen: NK (Negativkontrolle), Na₂S₂O₃ (Natriumthiosulfat), NaOCl (Natriumhypochlorit), O₃ (Ozon)

2.18.3. Untersuchung der Wirkung von Ozon auf planktonische Zellen

Neben der Untersuchung der Wirkung von Ozon auf Biofilmstrukturen sollte auch der Effekt dieses Agens auf planktonische Zellen, speziell in der exponentiellen Wachstumsphase, bestimmt werden. Für diesen Versuch wurden zunächst Wachstumsbestimmungen mit *S. mutans* DSM 20523 und *E. faecalis* 1942 in BHI-Mucin-Medium durchgeführt.

Die Ozon-Behandlung beider Stämme erfolgte in der ermittelten exponentiellen Wachstumsphase Phase in BHI-Mucin-Medium (Applikationszeit (t_{AP}) für *S. mutans* DSM 20523 nach einer Wachstumszeit von $t = 5$ h und für *E. faecalis* 1942 nach $t = 3$ h). Die festgesetzten Zeitpunkte der Untersuchung entsprachen dabei der visuellen Mitte der exponentiellen Phase der vorher ermittelten Wachstumskurve. Zum Zeitpunkt der Untersuchung wurde 1 ml der jeweiligen Bakteriensuspension in eine sterile, unbeschichtete Kavität einer 24-Well Zellkultur-Platte überführt und anschließend jeweils für 60 bzw. 300 s mit O_3 behandelt. Im Anschluss wurde die Lebendkeimzahl aller Proben bestimmt. Zusätzlich wurde eine unbehandelte Kontrolle derselben Zeitpunkte mitgeführt.

- a) Negativkontrolle, unbehandelt *S. mutans* bzw. *E. faecalis*
- b) $O_3 t_{AP} = 60$ s *S. mutans* bzw. *E. faecalis*
- c) $O_3 t_{AP} = 300$ s *S. mutans* bzw. *E. faecalis*

2.18.4. Untersuchung der Ozonwirkung unter anaeroben Bedingungen

Die Biofilme der obligaten Anaerobier *Parvimonas micra* und *Fusobacterium nucleatum* wurden nach dem in Abschnitt 2.10. beschriebenen Protokoll zur Biofilmbildung kultiviert (s. 2.10.). Zunächst wurde von beiden Bakterienisolaten einen Übernachtkultur in BHI-Medium + Glutamat angezogen. Im Anschluss erfolgte die Herstellung einer Bakteriensuspension 1:10 in BHI-Mucin 0,1 %. Von der hergestellten Bakteriensuspension wurde jeweils 1000 µl in ein Well einer 24-Kavitäten Zellkultur-Platte überführt und für 72 h inkubiert (80 % N_2 , 10 % CO_2 , 10 % H_2). Am Tag des Versuchs (nach 72 h Inkubation) wurden das $Na_2S_2O_3$ und das $NaOCl$ mit anaerob gelagertem 1x PBS (pH 7,4) frisch zubereitet. Die Konzentrationen wurden analog zu den oben beschriebenen Untersuchungen gewählt (Natriumthiosulfat 1,46 g/ 1000 ml 1x PBS (pH 7,4); $NaOCl$ 5 %/ 1x PBS (pH 7,4)).

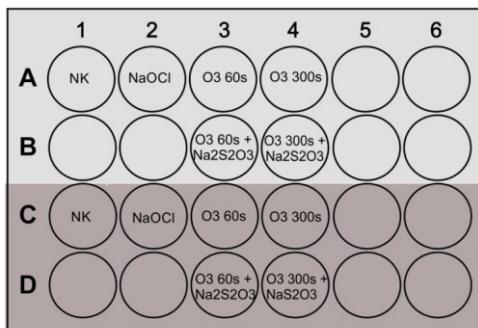


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Ozonapplikation auf die obligat anaeroben Keime. Reihe A und B. Die Bestimmung der KBE/ ml erfolgte direkt nach der Untersuchung. Ozonapplikation mit 60 s (A3), 300 s (A4), mit Ozon und anschließend $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ für 60 s (B3) und 300 s (B4), NaOCl 5 % diente als Positivkontrolle (A1 und C1) und eine unbehandelte Kultur als Negativkontrolle (A2 und C2). Mit den Reihen C und D wurde gleich verfahren. Es erfolgte eine Inkubation für 24 Stunden und anschließende eine Bestimmung der LKZ/ ml. Legende/ Abkürzungen: NK (Negativkontrolle), $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (Natriumthiosulfat), NaOCl (Natriumhypochlorit), O3 (Ozon)

In diesem Experiment wurde zuerst die Behandlung der Negativkontrolle und der Positivkontrolle durchgeführt. Als Negativkontrolle diente eine unbehandelte Kavität. Als Positivkontrolle wurde ein Biofilm mit einer 5%-igen Natriumhypochloritlösung versehen.

Zunächst wurde das Medium entfernt, die Biofilme mit 1x PBS (pH 7,4) vorsichtig gespült, und anschließend mit O₃ behandelt. Das nächste Näpfchen wurde zunächst mit Ozon und im Anschluss mit Natriumthiosulfat für 60 s behandelt. Nach jedem Schritt wurde das entsprechende Agens entfernt und nach Abschluss des jeweilig letzten Schrittes wurde 1x PBS (pH 7,4) auf die Biofilme gegeben. Im Anschluss erfolgte sukzessiv die Behandlung der restlichen Biofilmkulturen nach dem in Abbildung 10 genannten Schema.

Die Lebendkeimzahlen wurden direkt nach der Behandlung (Zeitpunkt 0 h) und zum anderen nach 24 h anaerober Bebrütungszeit bei 37 °C ermittelt. In letzterem Fall wurden die Biofilme mit BHI-Mucin-Medium anstelle von PBS inkubiert.

2.19. Dokumentation von Biofilmstrukturen

2.19.1. Fluoreszenzmikroskopie

Für die Fluoreszenzmikroskopie wurde eine Lebend-/Totfärbung mit dem *BacLight Bacterial Viability Kit* (*Invitrogen, Darmstadt*) durchgeführt. Damit konnten zum einen die Bakterien an sich sichtbar gemacht und zum anderen eine Aussage über deren Vitalität getroffen werden. Die Biofilme wurden in unbeschichteten 24-Kavitäten Zellkultur-Platten aerob bzw. anaerob kultiviert. Dabei befand sich in jeder Vertiefung ein rundes, steriles, unbeschichtetes Plastikdeckgläschen (Durchmesser 13 mm, Nunc, Wiesbaden, D), welches nach der jeweiligen Bebrütungsdauer aus den Kavitäten herausgenommen und für die Mikroskopie verwendet werden konnte. Nach einer Inkubationszeit von 24 bzw. 72 Stunden wurde das Nährmedium entfernt und die Biofilme vorsichtig mit 1 ml 1x PBS (pH 7,4) gewaschen. Im Nachfolgenden wurden die Farblösung (Syto9/ Propidiumiodid 1:1) 1:1000 in 1x PBS (pH 7,4) verdünnt und auf die Biofilme gegeben. Nach einer 10-15-minütigen Inkubation im Dunkeln erfolgte die

fluoreszenzmikroskopische Dokumentation mit dem Fluoreszenzmikroskop BX60 unter Verwendung der Filter U-MWB (Ex 470–490, Em 520 nm), U-MWU (Ex 330–385 nm, Em 420 nm) und U-MWG (Ex 510–550 nm, Em 590 nm) (Olympus, Hamburg, D) sowie die Bildddokumentation mittels einer angeschlossenen Digitalkamera (Leica, Solms, D).

Die Lebend-Tod-Färbung basiert auf dem Zusammenspiel zweier Farbstoffe – dem grün fluoreszierenden SYTO 9 und dem rot fluoreszierenden Propidiumiodid. Die beiden Farbstoffe unterscheiden sich in ihrer Fähigkeit die Zellwände lebender Zellen zu passieren. SYTO 9 kann sowohl tote als auch lebende Zellen markieren. Propidiumiodid kann dahingegen als kationisches Molekül nicht die intakte Cytoplasmamembran lebender Zellen durchdringen, sondern nur die Membran beschädigter Zellen. Dort lagert es sich an die DNA an und lässt die Zelle rot fluoreszieren.⁹⁹ Daher erscheinen lebende Bakterien unter dem Fluoreszenzmikroskop als grüne, beschädigte bzw. toten Bakterien als rote Strukturen.

2.19.2. Rasterelektronenmikroskopie

In Anlehnung an die Präparation der Biofilmstrukturen für die Fluoreszenzmikroskopie wurden auch hier die Mono-Spezies- Kulturen für die Versuche mit den fakultativ anaeroben Bakterien bzw. den obligat anaeroben Bakterien in unbeschichtete 24-Näpfchen Zellkultur-Platten mit je einem runden, sterilen, unbeschichteten Plastikdeckgläschen (Durchmesser 13 mm, Nunc, Wiesbaden, D) pro Vertiefung inokuliert. Nach dem jeweiligen experimentellen Ansatz zur Ozonapplikation wurden die Proben direkt im Anschluss oder nach einer aeroben oder anaeroben Inkubation von 24 Stunden bzw. 72 Stunden für die Rasterelektronenmikroskopie vorbereitet. Dazu wurde das Nährmedium entfernt, die Proben vorsichtig mit 1x PBS (pH 7,4) gewaschen und anschließend für mindestens 24 Stunden bei 4 °C in 2,5 % Glutardialdehyd-Lösung (9 ml 0,1 M Natriumphosphatpuffer [pH 7,4], 1 ml 25 % Glutardialdehyd-Lösung [Merck, Darmstadt, D]) fixiert. Die fixierten Proben wurden dann im Elektronenmikroskopischen Zentrum der Universität Rostock (EMZ, Uniklinik Rostock) wie folgt weiterbehandelt: Die Fixationslösung wurde entfernt und die Deckgläschen 3mal mit 0,1 M Natriumphosphatpuffer (pH 7,4) gewaschen. Anschließend wurden die Proben in einer aufsteigenden Ethanolreihe getrocknet (5 min 30 %, 5 min 50 %, 10 min 70 %, 15 min 90 %, 2mal 10 min 100 %). Nachfolgend wurden die Proben einer „Kritischen-Punkt-Trocknung“ (Kritischer-Punkt-Trockner, Emitech, Ashford, UK) nach Herstellerangaben unterworfen. Die getrockneten Proben wurden schließlich mit 10 nm Gold beschichtet und anschließend mit dem Elektronenmikroskop Zeiss DSM 960A analysiert.

2.20. Statistische Auswertung

Um eine statistische Auswertung durchführen zu können, wurde der jeweilige Versuchsaufbau mit mindestens drei unabhängigen biologischen Replikaten und jeweils einem technischen Replikat pro einzelnen Versuch ausgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte unter der Zuhilfenahme von SPSS 19.0 und Microsoft Office Excel 2007. In der deskriptiven Statistik erfolgte die Ermittlung der Mittelwerte, der Standardabweichung und Standardfehler sowie der Konfidenzintervalle. Der Mann-Whitney-Test (U-Test) diente dem statistischen Vergleich. Der Schwellenwert für das Signifikanzniveau wurde hier mit $p = 0,05$ festgelegt. Bei einer 100 %-igen Eradizierung erfolgte keine Berechnung der Signifikanzen. Die Auswertung der fluoreszenzmikroskopischen und rasterelektronmikroskopischen Aufnahmen erfolgte deskriptiv.

3. Ergebnisse

3.1. Biofilmbildung der ausgewählten Teststämme in BHI-Medium

Vor Versuchsbeginn wurden die ausgewählten Teststämme von *S. mutans* und *E. faecalis* auf die Fähigkeit zur Biofilmbildung in dem verwendeten Nährmedium Brain-Heart-Infusion (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England) untersucht. Hierzu wurde das Verfahren einer indirekten Biozellmassenbestimmung – der Safranin-Assay – gewählt.

Die Bestimmung der Biofilm-Masse erfolgte an drei aufeinanderfolgenden Tagen. Eine $OD_{492nm} > 0,01$ bis $< 0,05$ wurde als Anhalt für einen einschichtigen Monolayer und ab einer $OD_{492nm} > 0,05$ als eine mehrschichtige Biofilmbildung gewertet.¹⁰²

3.1.1. Biofilmbildung der *S. mutans*-Teststämme

Wie die Abbildung 1 zeigt, waren alle drei getesteten *S. mutans*-Isolate unter den gewählten Bedingungen in der Lage mehrschichtige Biofilmstrukturen zu bilden, wobei für den Stamm *S. mutans* 6178 eine Abnahme der Biofilm-Masse nach 72 Stunden zu beobachten war. Anhand der erhaltenen Daten zu den Biofilm-Massen wurden nachfolgende Ozon-Untersuchungen an 24 Stunden alten Biofilmen von *S. mutans* 4300 und *S. mutans* 6178 bzw. an 48 Stunden alten Biofilmen von *S. mutans* DSM 20523 durchgeführt .

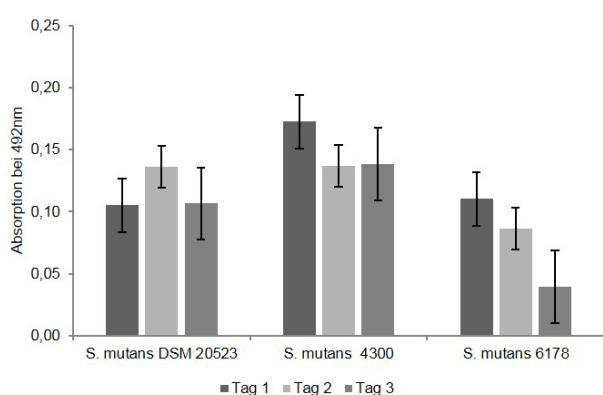


Abbildung 11: Darstellung der Biofilm-Massen nach Safranin-Färbung und OD_{492} Messung der verschiedenen *S. mutans*-Isolate in BHI-Medium nach 24 h (Tag 1), 48 h (Tag 2) und 72 h (Tag 3) nach Inkubation bei 37 °C/ 5 % CO₂. Nach 24 h Inkubation konnte bei den Bakterienstämmen *S. mutans* 4300 und *S. mutans* 6178 in diesen Testreihen maximal mehrschichtige Zellrasen detektiert werden. Bei dem Bakterienstamm *S. mutans* DSM 20523 tritt dies nach 48 Stunden ein. Den untersuchten Bakterienstämmen ist eine Ausbildung eines mehrschichtigen Zellrasens nach einer Inkubation von 24 Stunden gemeinsam.

3.1.2. Biofilmbildung *E. faecalis*-Teststämme

Mit gleicher Methodik wie für die 3 *S. mutans*-Stämmen wurden auch 3 *E. faecalis*-Stämme untersucht. Alle drei Isolate bildeten in dem gewählten Medium BHI zunächst eine *monolayer*, also einen einschichtigen Bakterienzellrasen, aus, während mehrschichtige Strukturen erst nach 72 h ($OD_{492} > 0,05$) detektiert werden konnten (s. Abb. 12). Dabei verhielten sich alle drei *E. faecalis*-Isolate annähernd gleich.

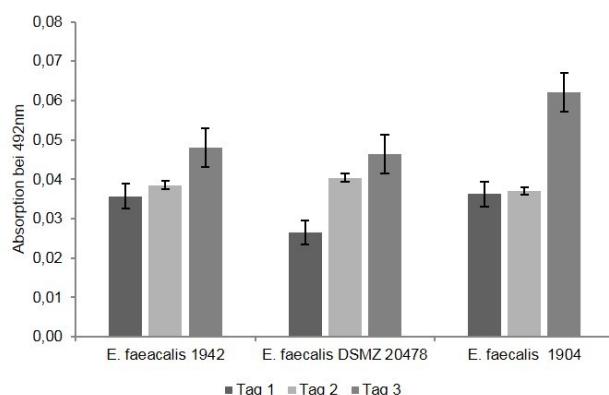


Abbildung 12: Darstellung der Biofilmmassen nach Safranin-Färbung und OD₄₉₂-Messung der verschiedenen *E. faecalis*-Isolate in BHI-Medium nach 24 h (Tag 1), 48 h (Tag 2) und 72 h (Tag 3) Inkubation bei 37 °C/ 5 % CO₂. Nach 72 h Inkubation konnte bei allen 3 Bakterienstämmen mehrschichtige Biofilmstrukturen detektiert werden.

3.2. Bestimmung des Biofilmwachstums in BHI mit verschiedenen Mucin-Konzentrationen

Um die Versuche den realen Umgebungsbedingungen in der Mundhöhle anzunähern, wurden die *in vitro*-Untersuchungen mit dem Nährmedium BHI (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England) und dem Zusatz Mucin durchgeführt. Mucin wird von mukösen Drüsen der Mundhöhle sezerniert und dient auf der oralen Schleimhaut als eine protektive Barriere gegen chemische und mechanische Einflüsse.^{64,88} Therapeutisch wie auch zu Forschungszwecken wird Mucin zur Herstellung künstlichen Speichels benutzt.⁸³

In Vorversuchen wurde geprüft, bei welcher Mucin-Konzentration die zu testenden Stämme noch in der Lage waren, Biofilm-Strukturen zu bilden. Dazu wurde BHI mit aufsteigenden Mucin Konzentrationen von 0,1 %, 0,5 % und 1 % versetzt und die Biofilmbildung der verschiedenen Stämme getestet. Die Quantifizierung der Biofilm-Masse erfolgte wiederum mittels Safranin-Färbung.

Die verschiedenen *S. mutans*-Stämme konnten unter Verwendung von 0,1 % Mucin eine mehrschichtige Biofilmstruktur ausbilden. Höhere Konzentrationen verhinderten diesen Phänotyp jedoch. Alle 3 *S. mutans*-Stämme konnten in BHI-Medium mit 0,5 % bzw. 1 % Mucin nur noch einschichtige Zellrasen (Monolayer) bilden (s. Abb. 13).

Die gewählten 3 *E. faecalis*-Stämme konnten in BHI und Mucin unabhängig von der Mucin-Konzentration nur noch einschichtige Bakterienzellrasen bilden (s. Abb. 14). Aufgrund dieser Resultate wurden zur Simulation der realen Bedingungen in der Mundhöhle alle nachfolgenden Experimente mit BHI plus 0,1 % Mucin durchgeführt.

ERGEBNISSE

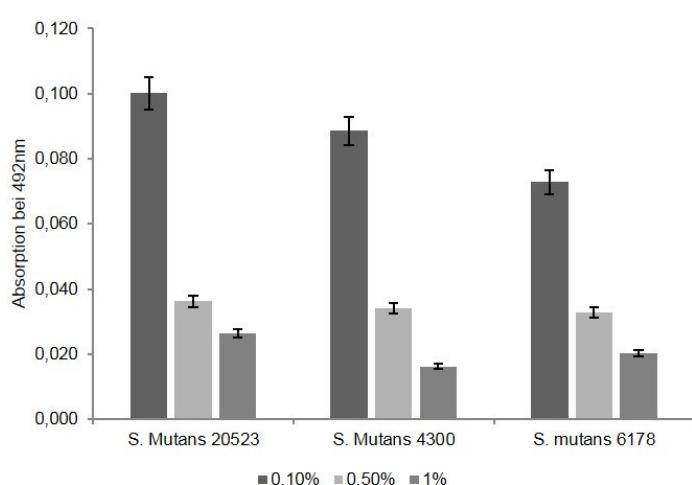


Abbildung 13: Darstellung der Biofilmmasse nach Safraninfärbung und OD₄₉₂-Messung der verschiedenen *S. mutans*-Isolate in BHI-Medium mit verschiedenen Mucin-Konzentrationen. Die Inkubation beträgt 24 bzw. 48 Stunden bei 37 °C/ 5 % CO₂. Unter Verwendung einer 0,1 % BHI-Mucin-Lösung konnte ein mehrschichtiges Biofilmwachstum für alle getesteten *S. mutans*-Stämme erreicht werden.

Tabelle 2: Analyse der Biofilm-Bildung der *S. mutans*-Isolate in BHI-Medium mit aufsteigenden Mucinkonzentrationen mit Berechnung der Standardabweichung, Standardfehler und Konfidenzintervalle für den Mittelwert.

Mucinkonzentration in %	n	Mittelwert der OD ₄₉₂ - Messung	Standard- abweichung	Standard- fehler	95 % Konfidenzintervall für Mittelwert	
					Untergrenze	Obergrenze
a. <i>S. mutans</i> DSM 20523						
0,1	6	0,107	0,009	0,004	0,097	0,116
0,5	6	0,038	0,011	0,004	0,027	0,049
1	6	0,014	0,003	0,001	0,011	0,016
b. <i>S. mutans</i> Klinisches Isolat 4300						
0,1	6	0,090	0,026	0,011	0,063	0,117
0,5	6	0,032	0,006	0,003	0,025	0,039
1	6	0,018	0,002	0,001	0,016	0,020
c. <i>S. mutans</i> Klinisches Isolat 6178						
0,1	6	0,085	0,016	0,007	0,068	0,102
0,5	6	0,032	0,010	0,004	0,021	0,043
1	6	0,020	0,008	0,003	0,012	0,028

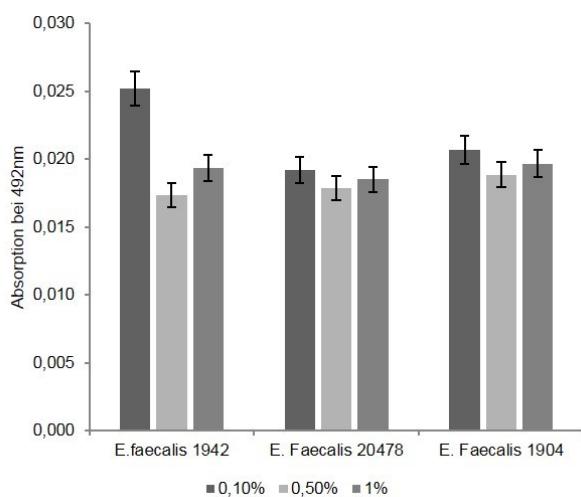


Abbildung 14: Darstellung der Biofilmbildung nach Safraninfärbung und OD₄₉₂-Messung der verschiedenen *E. faecalis*-Isolate in BHI-Medium mit verschiedenen Mucin-Konzentrationen. Die Inkubation beträgt 24 Stunden bei 37 °C/ 5 % CO₂. Unter Verwendung einer 0,1 % Mucin-BHI-Lösung zeigte sich eine Ausbildung eines einschichtigen Biofilmlayers.

Tabelle 3: Analyse der Biofilm-Bildung der *E. faecalis*- Isolate in BHI-Medium mit aufsteigenden Mucinkonzentrationen mit Berechnung der Standardabweichung, Standardfehler und Konfidenzintervalle für den Mittelwert.

Mucinkonzentration in %	N	Mittelwerte der OD ₄₉₂ - Messung	Standard- abweichung	Standard- fehler	95 % Konfidenzintervall für Mittelwert	
					Untergrenze	Obergrenze
a. <i>E. faecalis</i> 1942						
0,1	6	0,023	0,002	0,001	0,021	0,026
0,5	6	0,017	0,001	0,000	0,016	0,017
1	6	0,019	0,003	0,001	0,016	0,022
b. <i>E. faecalis</i> DSMZ 20478						
0,1	6	0,022	0,001	0,000	0,021	0,023
0,5	6	0,022	0,004	0,002	0,017	0,026
1	6	0,018	0,003	0,001	0,015	0,021
c. <i>E. faecalis</i> 1904						
0,1	6	0,019	0,004	0,002	0,015	0,024
0,5	6	0,019	0,004	0,002	0,015	0,023
1	6	0,017	0,001	0,001	0,015	0,018

3.3. Untersuchung des Einflusses von Natriumhypochlorit und Natriumthiosulfat auf die Lebensfähigkeit und Biofilmbildung von *S. mutans* und *E. faecalis*

NaOCl besitzt oxidierende wie auch hydrolysierende Eigenschaften, wirkt bakterizid sowie proteolytisch. Zur Wunddesinfektion werden NaOCl-Lösungen schon seit 1915 genutzt; seit den frühen zwanziger Jahren des letzten Jahrhunderts wird es ebenso in der Endodontie verwendet.²¹

NaOCl diente in der vorliegenden Dissertation als Positivkontrolle einer bakteriziden Wirkung. Dies wurde in entsprechenden Vorversuchen (s. 3.3.1) an allen zu testenden Stämmen zunächst überprüft. Parallel dazu wurde Na₂S₂O₃ verwendet. Diese Substanz besitzt reduzierende Eigenschaften und wurde in der vorliegenden Dissertation zum Neutralisieren, als sogenannter *Neutralizer*, der verwendeten Oxidantien Ozon und NaOCl verwendet.¹⁰⁸ In entsprechenden Vorversuchen wurde zunächst überprüft, ob das Reduktionsmittel Na₂S₂O₃ einen oder keinen bakteriziden Effekt hat bzw. eine neutralisierende Wirkung besitzt. Die Versuchsreihen mit beiden Substanzen fußen auf den für die eigentliche Ozon-Untersuchung gewählten Untersuchungszeitpunkten direkt nach der Applikation (0 h) und 24 Stunden nach Ozon-Applikation. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte Kulturen.

3.3.1. Überlebensfähigkeit von *S. mutans* unter Verwendung von NaOCl und Na₂S₂O₃

Für die Bestimmung der Überlebensfähigkeit unter Verwendung von NaOCl und Na₂S₂O₃ wurden die untersuchten Teststämme (24 h bzw. 48 h alten Biofilme) Raumluft (1), NaOCl (2),

ERGEBNISSE

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (3) und NaOCl mit nachgeschalteter Zugabe von $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, (4) für jeweils 15 min ausgesetzt. Die Überlebensfähigkeit wurde anhand der Bestimmung der Lebendkeimzahlen (LKZ) sowohl direkt nach bzw. 24 Stunden nach Substanz-Zugabe bestimmt. Die Abbildung 5 spiegelt am Beispiel von *S. mutans* 20523 die Ergebnisse der für die verschiedenen *S. mutans*-Teststämme wieder.

Für jeden der drei Teststämme, der nur mit $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (3) behandelt wurde, ließ sich keine Änderung der LKZ im Vergleich zur Negativkontrolle Raumluft ermitteln (*p*-Wert 0,121). Bei den Teststämmen, die zunächst mit NaOCl und anschließend mit $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ behandelt wurden, ließ sich dagegen kein Wachstum detektieren. Diese Ergebnisse änderten sich auch nach 24-stündiger Inkubation der Proben nicht: $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ hatte keinen neutralisierenden Einfluss auf das Wachstum der *S. mutans*-Stämme (*p*-Wert 0,827) nach einer Kontaktzeit mit 15 Minuten. Bei den Proben, die nur mit NaOCl für 15 Minuten behandelt konnte weder in der unmittelbaren Bestimmung nach Behandlung noch nach 24 Stunden Inkubation Kolonie-bildende Einheiten detektiert werden.

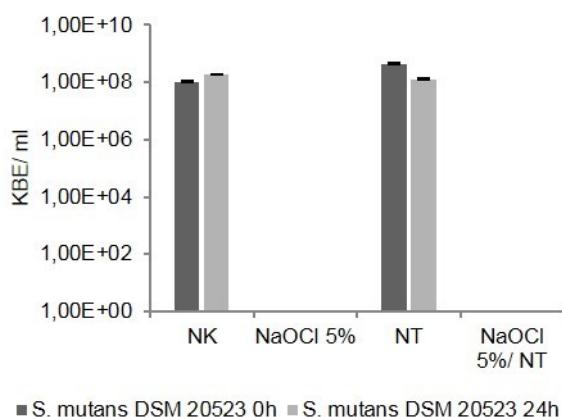


Abbildung 15: Bestimmung der Lebendkeimzahlen mit *S. mutans* DSM 20523. Die Untersuchungen wurden direkt nach der Behandlung mit dem jeweiligen Agens und nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden durchgeführt. In den Proben, welche mit NaOCl 5 % behandelt wurden, konnten an beiden Messzeitpunkten keine Kolonien bestimmt werden. Gleiches gilt für die Proben, die mit NaOCl 5 % und nachfolgend $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ behandelt wurden. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ alleine hatte keinen wachstumshemmenden Effekt auf die Kolonien. NK - Negativkontrolle, NT - $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

ERGEBNISSE

Tabelle 4: Der Einfluss von Chlorbleiche (Natriumhypochlorit) und einem Oxidationsschutzmittel (Natriumthiosulfat) auf die Keimzahl von Biofilm-assoziierten Bakterien am Beispiel von *S. mutans* DSM 20523. Die Keimzahlen pro ml suspendiertem Biofilm werden als exponentielle Werte auf der Basis von 10 dargestellt.^a Es erfolgte keine statistische Auswertung bei einer 100%igen Eradizierung.

Wert	n	Mittel- werte der Keimzahl messung	Standard- abweich- ung	Standard- fehler	95 % Konfidenzintervall für Mittelwert		
					Unter- grenze	Ober- grenze	p-Wert
a. <i>S. mutans</i> DSM 20523, Messzeitpunkt = 0h							
Negativ- kontrolle	2	1,06E+08	7,07E+07	5,00E+07	-5,29E+08	7,41E+08	
NaOCl 5 %	2	0	0	0	0	0	- ^a
Na ₂ S ₂ O ₃	2	4,40E+08	6,36E+07	4,50E+07	-1,32E+08	1,01E+09	0,121
NaOCl 5 % Na ₂ S ₂ O ₃	2	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	- ^a
b. <i>S. mutans</i> DSM 20523, Messzeitpunkt = 24 h							
Negativ- kontrolle	3	1,88E+08	2,54E+08	1,46E+08	-4,42E+08	8,18E+08	
NaOCl 5 %	3	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	- ^a
Na ₂ S ₂ O ₃	3	1,29E+08	1,31E+08	7,54E+07	-1,95E+08	4,53E+08	0,827
NaOCl 5 % Na ₂ S ₂ O ₃	3	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	- ^a

3.3.2. Überlebensfähigkeit von *E. faecalis* unter Verwendung von NaOCl und Na₂S₂O₃

Mit den *E. faecalis*-Stämmen wurde in gleicher Weise wie mit den *S. mutans*-Stämmen verfahren. Die Teststämme (72 h alte Bakterienzellrasen) wurden zum Zeitpunkt Null ebenfalls Raumluft (1), Natriumhypochlorit (2), Natriumthiosulfat (3) und Natriumhypochlorit mit anschließender Natriumthiosulfatzugabe (4) ausgesetzt. Die Inkubationszeiten mit Natriumthiosulfat (2) und NaOCl/ Na₂S₂O₃ (4) betrug jeweils 15 Minuten. Die Probe 1 (Raumluft) diente auch hier wieder als Negativkontrolle. Das Ergebnis dieses Vorversuches war ähnlich wie für die *S. mutans*-Stämme (s. Abb. 6).

Auch hier hatte die Behandlung der Biofilm-Strukturen mit Na₂S₂O₃ keinen Einfluss auf die Kultivierbarkeit von *E. faecalis*. Unter dem Einfluss von NaOCl konnten die Bakterien dagegen nicht mehr kultiviert werden. Die Nachbehandlung der Proben mit Na₂S₂O₃ hatte hinsichtlich der Überlebensfähigkeit bzw. Kultivierbarkeit der *E. faecalis*-Stämme, wie auch bei den o. g. Versuchen mit den *S. mutans*-Stämmen, keinen neutralisierenden Effekt auf das NaOCl, so dass auch hier keine Keime kultiviert werden konnten.

ERGEBNISSE

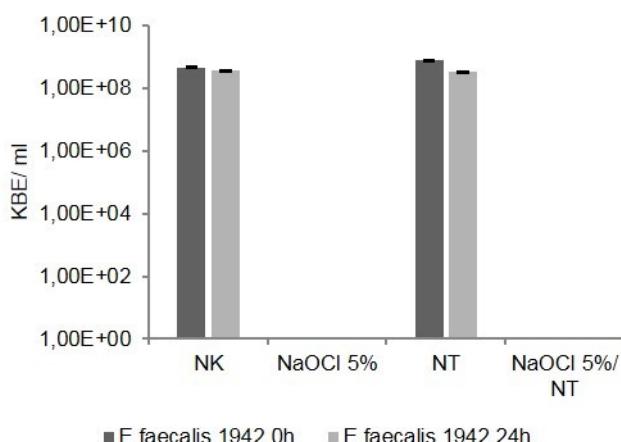


Abbildung 16: Bestimmung der Lebendkeimzahlen in den Vorversuchen mit *E. faecalis* 1942. In den Proben, welche mit NaOCl 5 % behandelt wurden, konnten an beiden Messzeitpunkten keine Kolonien bestimmt werden. Gleiches gilt für die Proben, die mit NaOCl 5 % und Na₂S₂O₃ behandelt wurden sind. Na₂S₂O₃ alleine hatte keinen wachstumshemmenden Effekt auf die Kolonien. NK - Negativkontrolle, NT - Na₂S₂O₃

Tabelle 5: Der Einfluss von Chlorbleiche (Natriumhypochlorit) und einem Oxidationschutzmittel (Natriumthiosulfat) auf die Keimzahl von Biofilm-assoziierten Bakterien am Beispiel von *E. faecalis* 1942. Die Keimzahlen pro ml suspendiertem Biofilm werden als exponentielle Werte auf der Basis von 10 dargestellt.^a Es erfolgte keine statistische Auswertung bei einer vollständigen Eradizierung.

	n	Mittelwerte der Keimzahl- messung	Standard- abweichung	Standard- fehler	95 % Konfidenzintervall für Mittelwert			p- Wert
					Untergren- ze	Obergren- ze		
a. <i>E. faecalis</i> 1942, Messzeitpunkt = 0 h								
Negativkontrolle	2	4,58E+08	2,44E+08	1,72E+08	-1,73E+09	2,65E+09	-	^a
NaOCl 5 %	2	0	0	0	0	0	-	^a
Na ₂ S ₂ O ₃	2	7,53E+08	1,73E+08	1,23E+08	-8,04E+08	2,31E+09	0,221	
NaOCl 5 % Na ₂ S ₂ O ₃	2	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,102	
b. <i>E. faecalis</i> 1942, Messzeitpunkt = 24 h								
Negativkontrolle	3	3,51E+08	1,43E+08	8,28E+07	-4,73E+06	7,07E+08	-	^a
NaOCl 5 %	3	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	-	^a
Na ₂ S ₂ O ₃	3	3,33E+08	5,25E+07	3,03E+07	2,03E+08	4,64E+08	0,83	
NaOCl 5 % Na ₂ S ₂ O ₃	3	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	3,00	

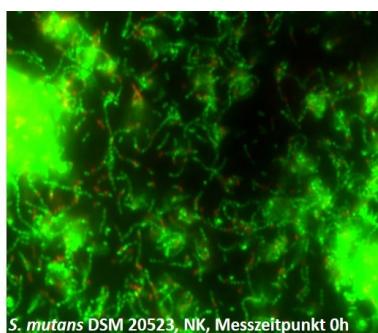
3.4. Ergebnisse der fluoreszenzmikroskopischen Analysen

Mit der Bestimmung der Lebendkeimzahl wurde eine quantitative Aussage zu den unter gegebenen Bedingungen kultivierbaren Bakterien gemacht. Mit der Fluoreszenzmikroskopie dagegen konnte unter Zuhilfenahme entsprechender Färbemethoden eine qualitative Aussage zu der Viabilität der Zellen gemacht werden. Analog zur Bestimmung der Lebendkeimzahl wurde in diesem Vorversuch die Anzucht und Behandlung der Biofilm-Strukturen durchgeführt (s. auch 3.3.1 und 3.3.2). Anschließend erfolgte die Fluoreszenzmikroskopie der Biofilm-Strukturen, die zuvor mit Hilfe einer Lebend-/ Tod-Färbung (*BacLight Bacterial Viability Kit, Invitrogen, Darmstadt*) angefärbt worden waren.

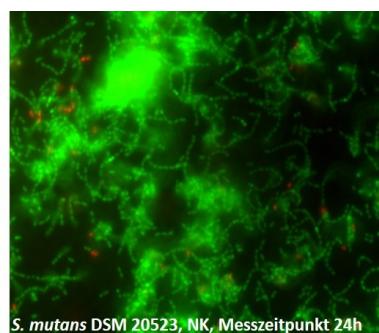
3.4.1. Resultate der Fluoreszenzmikroskopie für *S. mutans*

Die fluoreszenzmikroskopischen Analysen nach den verschiedenen Behandlungsstrategien zeigten, dass ein Unterschied in der Viabilität bei den mit $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ behandelten Proben gegenüber den mit NaOCl bzw. NaOCl und anschließend mit $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ behandelten Proben bestand.

Die Kulturen der Negativkontrolle wiesen in der fluoreszenzmikroskopischen Analyse einen dichten, mehrschichtigen Zellrasen (*multilayer*) mit vorwiegend grün gefärbten, also lebenden Zellen auf (s. Abb. 17–18). Für die Kulturen, die mit $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ behandelt wurden sind, konnte ein ähnliches Bild beschrieben werden (s. Abb. 21–22). Dagegen zeigten die Kulturen die nur bzw. erst mit NaOCl und anschließend mit $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (s. Abb. 19–20 und 23–24) inkubiert wurden, ein gegensätzliches Bild. In beiden Proben konnte zum einen eine deutliche Abnahme adhärenter Bakterien beobachtet werden, und zum anderen fluoreszierten die Bakterien gelblich bzw. orange, was für tote Zellen sprach. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen 24 Stunden nach Behandlung der Biofilm-Strukturen mit den entsprechenden Substanzen zeigten ähnliche Resultate.

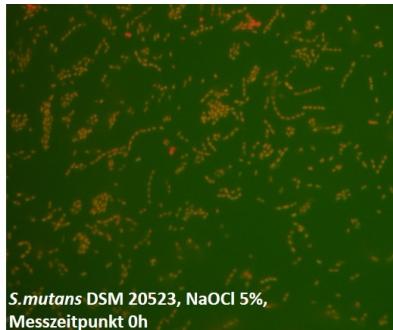


S. mutans DSM 20523, NK, Messzeitpunkt 0h

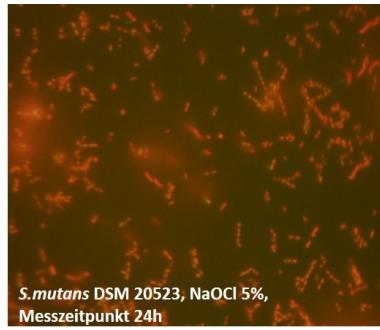


S. mutans DSM 20523, NK, Messzeitpunkt 24h

Abbildung 17–18: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von *S. mutans* DSM 20523, Negativkontrolle, direkt nach einer Luftexposition (0 h) und nach 24 h Erholungsphase, 100fache Vergrößerung



S. mutans DSM 20523, NaOCl 5%,
Messzeitpunkt 0h



S. mutans DSM 20523, NaOCl 5%,
Messzeitpunkt 24h

Abbildung 19–20: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von *S. mutans* DSM 20523, Positivkontrolle durch Exposition gegen NaOCl 5 %, direkt nach Behandlung (0 h) und nach 24 h Erholungsphase, 100fache Vergrößerung

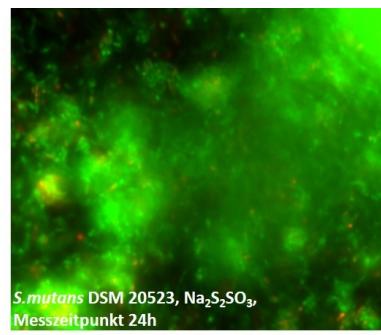
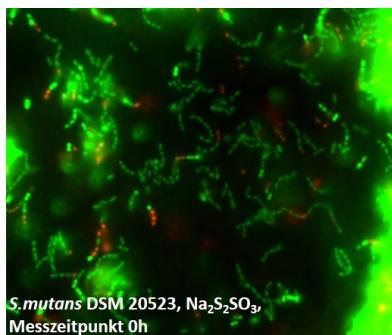


Abbildung 21–22:
Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von *S. mutans* DSM 20523 nach Exposition gegen Natriumthiosulfat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$), direkt nach Behandlung (0 h) und nach 24 h Erholungsphase, 100fache Vergrößerung

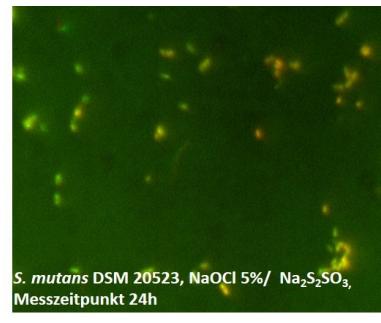
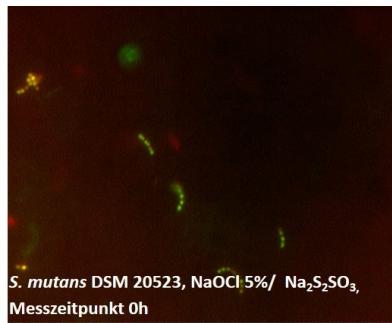


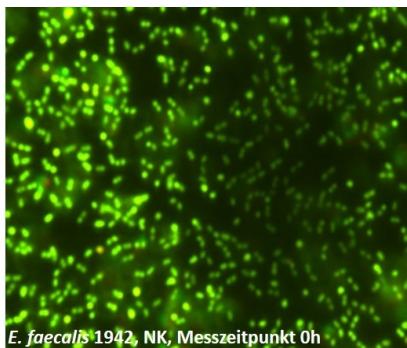
Abbildung 23–24:
Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von *S. mutans* DSM 20523, Exposition gegen Natriumhypochlorit (NaOCl) und Natriumthiosulfat (Na_2SO_3), direkt nach Behandlung (0 h) und nach 24 h Erholungsphase, 100fache Vergrößerung

3.4.2. Resultate der Fluoreszenzmikroskopie für *E. faecalis*

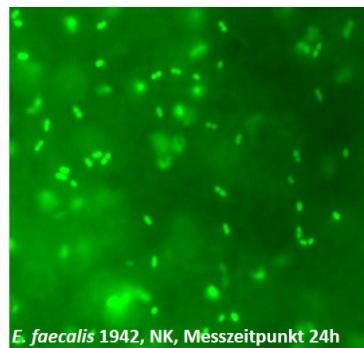
Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der Negativkontrolle sowie der Testkulturen, die mit $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ behandelt wurden, zeigten, ähnlich wie für *S. mutans* einen zusammenhängenden einschichtigen Zellrasen (*monolayer*) lebender, grün-fluoreszierender Zellen. Die Biofilm-Strukturen, die mit NaOCl und $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ behandelt wurden, zeigten in der unmittelbar anschließenden Untersuchung (Zeitpunkt 0 h nach Behandlung) einen weniger ausgeprägten Zellrasen. Der Zellverband war aufgelockert. Dennoch ließen sich hier eindeutig grün fluoreszierende und demnach intakte, vitale Zellen nachweisen. Nach 24-stündiger Inkubation wurden für die Negativkontrolle bzw. die mit $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ behandelten Proben kaum Änderung in der Viabilität oder Biofilm-Struktur detektiert (Abb. 25–26 und Abb. 29–30). Bei beiden

ERGEBNISSE

Proben zeigte sich ein, wenn auch weniger dicht ausgeprägter, einschichtiger Zellrasen und vereinzelt wurden gelb und rot-fluoreszierende Bakterienzellen dokumentiert. Die Proben, die mit NaOCl und anschließend Na₂S₂O₃ (Abb. 31–32) behandelt wurden, zeigten im Vergleich dazu eine deutliche verringerte Zellmasse mit nur vereinzelt nachweisbaren Zellen. Diese waren jedoch wie bereits direkt nach der Behandlung beobachtet grün fluoreszierend und demzufolge vital. Dies spricht für einen sogenannten VBNC-Status (*viable but non culturable*) der Bakterien.

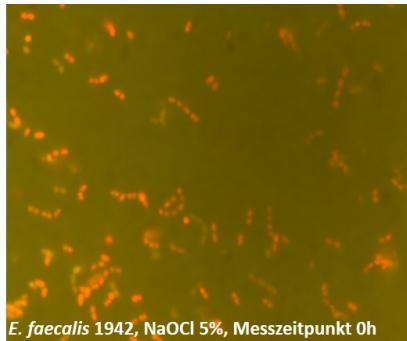


E. faecalis 1942, NK, Messzeitpunkt 0h

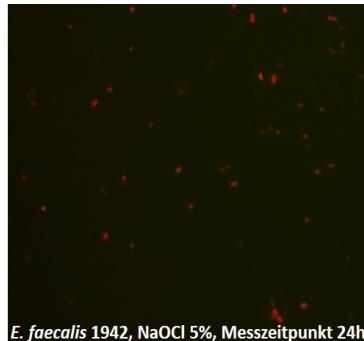


E. faecalis 1942, NK, Messzeitpunkt 24h

Abbildung 25–26: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von *E. faecalis* 1942 Negativkontrolle, direkt nach Luftexposition (0 h) und nach 24 h Erholungsphase, 100fache Vergrößerung

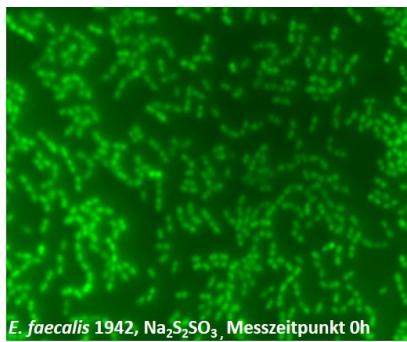


E. faecalis 1942, NaOCl 5%, Messzeitpunkt 0h

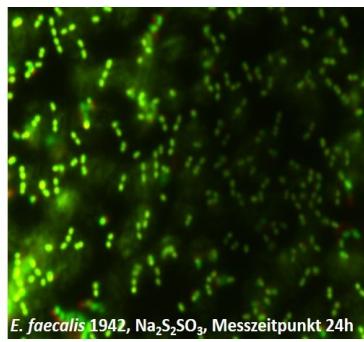


E. faecalis 1942, NaOCl 5%, Messzeitpunkt 24h

Abbildung 27–28: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von *E. faecalis* 1942, Positivkontrolle durch Exposition gegen NaOCl 5 %, direkt nach Behandlung (0 h) und nach 24 h Erholungsphase, 100fache Vergrößerung



E. faecalis 1942, Na₂S₂O₃, Messzeitpunkt 0h



E. faecalis 1942, Na₂S₂O₃, Messzeitpunkt 24h

Abbildung 29–30: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von *E. faecalis* 1942, Exposition gegen Natriumthiosulfat (Na₂S₂O₃), direkt nach Behandlung (0 h) und nach 24 h Erholungsphase, 100fache Vergrößerung

ERGEBNISSE

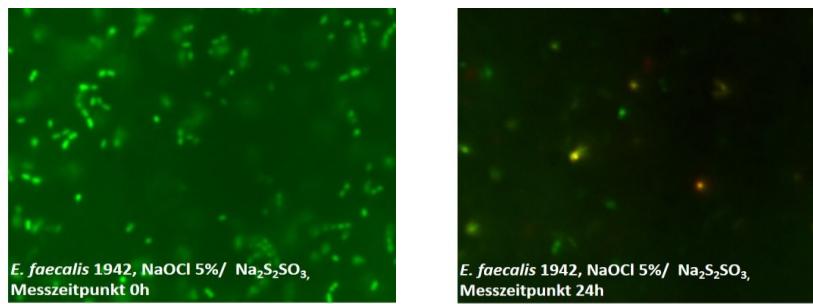


Abbildung 31–32: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von *E. faecalis* 1942, Exposition gegen Natriumhypochlorit (NaOCl) und Natriumthiosulfat (Na₂SO₃), direkt nach Behandlung (0 h) und nach 24 h Erholungsphase, 100fache Vergrößerung

3.5. Untersuchung zur Keimverschleppung unter Verwendung des Ozongenerators HealOzone™ (KaVo, Biberach, Germany)

Dieser Versuch sollte vor Beginn der Versuche mit dem KaVO-HealOzone-Ozongenerator (Biberach, Germany) durchgeführt werden, um zu überprüfen, ob es zu einer Keimverschleppung durch den verwendeten Gummipropfen kam. Hintergrund davon war unter anderem, dass mit dem mitgelieferten Verbrauchsmaterial auf Grund der Versuchsumfänge sparsam umgegangen werden musste, was wiederum

Mehrzahlverwendungen nach sich zog.

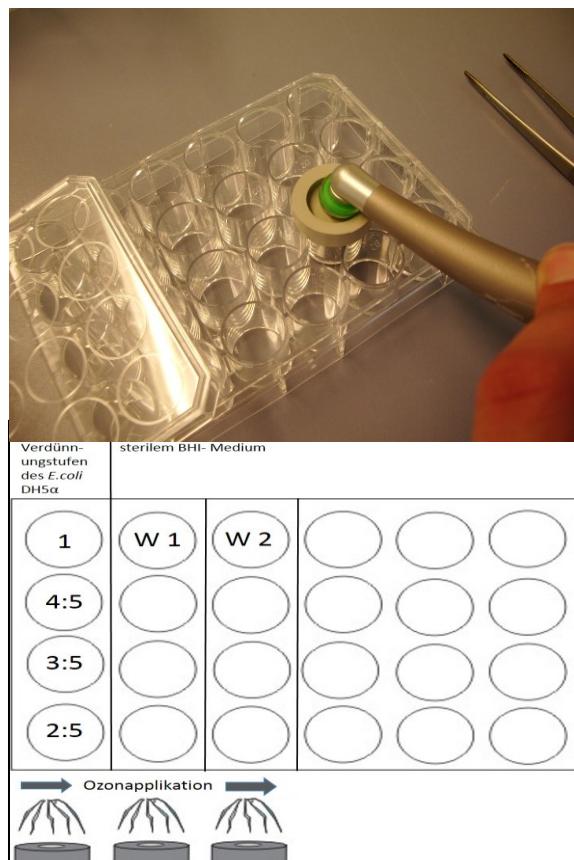


Abbildung 33: Versuchsaufbau zur Untersuchung der Keimverschleppung. In der ersten Kavität befand sich jeweils eine *E. coli* DH5α Bakteriensuspension. In der zweiten und dritten Kaviät einer Reihe befand sich steriles BHI-Medium.

Abbildung 34: Modus der Ozonapplikation unter Verwendung einer 24 Mikrotiter-Kavitätenplatte. Zum Abdichten des Nüpfchens wurde ein Gummipropfen mit einer medianen kreisrunden Öffnung auf die jeweilige Vertiefung gelegt. Unter einem konstanten, jedoch nicht zu kräftigen Druck wurde anschließend das Handstück, versehen mit einem Latexaufsatz, über die Öffnung gehalten und die Ozonapplikation durchgeführt.

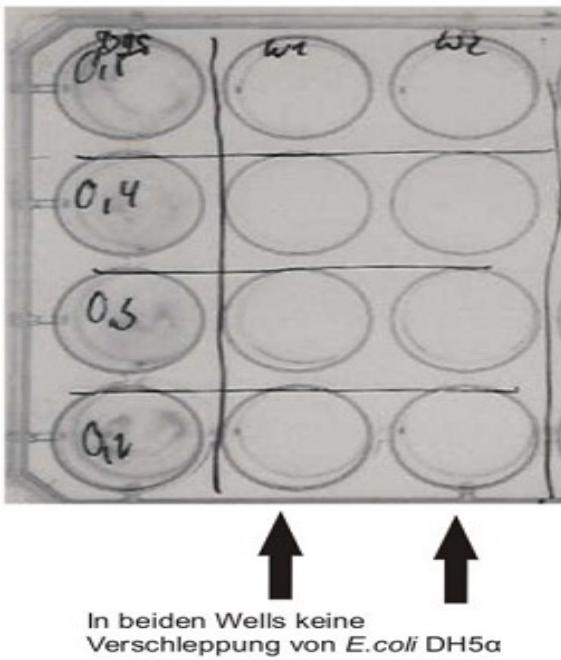


Abbildung 35: Ergebnis der Bestimmung der Biofilm-Masse in den einzelnen Kavitäten. Nach Durchführung der Ozonapplikation erfolgte die Bestimmung der Lebendkeimzahlen. Makroskopisch konnte keine Biofilmbildung im zweiten und dritten Nähfchen detektiert werden

Tabelle 6: Bestimmung der Lebendkeimzahlen im Keimverschleppungsversuch. Die Keimzahlen pro ml Flüssigmedium werden als exponentielle Werte auf der Basis von 10 dargestellt. In den von etwaigen Verschleppungen betroffenen Vertiefungen 1 und 2 konnte in der jeweiligen Testreihe mit unterschiedlichen Verdünnungen einer Ausgangssuspension von *E. coli* DH5α kein Wachstum registriert werden.

Verdünnungsstufen <i>E. coli</i> DH5α	n	Mittelwerte der Keimzahl in der Ursprungs-Kavität	Mittelwerte der Keimzahl in der Kavität 1	Mittelwerte der Keimzahl in der Kavität 2
1	2	6,98E+07	0,00E+00	0,00E+00
4:5	2	5,60E+07	0,00E+00	0,00E+00
3:5	2	5,45E+07	0,00E+00	0,00E+00
2:5	2	3,63E+07	0,00E+00	0,00E+00

Die nachfolgende Abbildungen 33 und 34 demonstrieren den Versuchsaufbau und den Modus der Handhabung. Die Abbildung 35 zeigt das Versuchsergebnis zur potentiellen Keimverschleppung. Das erste Nähfchen einer 24-Kavitäten Zellkultur-Platte enthielt den für die Versuche verwendeten *E. coli*-Stamm DH5α mit einer Keimzahl von 6,98E + 07 KBE/ ml. Reihe 2–4 wurden mit einer BHI-Medium verdünnten Bakteriensuspension in absteigender Konzentration befüllt. Die folgenden 2 Kavitäten einer jeden Reihe (Abb. 35) wurden mit steriles BHI-Medium gefüllt. Nun erfolgte die Ozonapplikation. In den präparierten Reihen konnte trotz unterbleibenden Austauschs der Schutzkappe des Applikators keine Verschleppung der Bakterien in die Nähfchen mit steriles Kulturmiedium dokumentiert werden (s. Abb. 34 und Tab. 6). Auf diesen Ergebnissen aufbauend konnten für alle weiteren Versuche die Gummipropfen des Applikators ohne Aufbereitung wiederholt genutzt werden ohne eine

Verschleppung der Keime von Kavität zu Kavität zu befürchten. Damit konnte teures Verbrauchsmaterial eingespart werden.

3.6. *In vitro* Ozon-Applikation unter aeroben Verhältnissen

Dieser Versuch bildet das Kernstück der vorliegenden Arbeit. Nachdem die Materialtauglichkeit und die Durchführbarkeit sowie die Funktionsfähigkeit des Ozongenerators überprüft wurde und die ausgewählten Teststämme auch unter Mucin-Zusatz mit dem ausgewählten Nährmedium BHI einen ausreichend dichten Biofilm (*S. mutans*) bzw. zumindest einschichtige Zellrasen (*E. faecalis*) etablieren konnten, wurde in den sich anschließenden *in vitro*-Versuchen die bakterizide Wirkung des Ozon getestet. Das Ozon wurde mit Hilfe des HealOzone Ozongenerators 2130C (KaVo, Biberach, Germany) mit einer Konzentration von 2100 ppm appliziert. Die Biofilm-Strukturen wurden unterschiedlichen Applikationszeiten ausgesetzt. Die Applikationszeiten betragen 60 Sekunden, 120 Sekunden, 180 Sekunden und 300 Sekunden. Direkt im Anschluss an die Behandlung bzw. nach einer Inkubation von 24 Stunden bei 5 % CO₂ wurde die Lebendkeimzahl bestimmt.

Die Versuche wurden mit den in den Vorversuchen ausgetesteten Kontrollen durchgeführt. So diente die Exposition gegenüber Raumluft wiederum als Vergleichsbedingung ohne desinfizierende Einwirkung („Negativkontrolle“). Als Bedingung mit maximal desinfizierender Einwirkung („Positivkontrolle“) wurden die Kulturen mit NaOCl behandelt. Da für die Ozonapplikation die kleinste Zeiteinheit 60 Sekunden betrug, wurde auch diese NaOCl-Behandlung mit einer Einwirkzeit von 60 Sekunden durchgeführt. Na₂S₂O₃ diente aufgrund seiner beschriebenen neutralisierenden Eigenschaft als *Neutralizer*¹⁰⁸ unmittelbar nach der Ozonbehandlung.

Die Untersuchungen wurden für alle *S. mutans*- und *E. faecalis*-Stämme durchgeführt. Nachfolgend werden die Ergebnisse exemplarisch für das Isolat *S. mutans* DSM 20523 und für das *E. faecalis*-Isolat 1942 beschrieben. Die Ergebnisse für die restlichen Stämme sind in entsprechenden Diagrammen und Tabellen im Anhang dieser Arbeit dargestellt.

3.6.1. Die Wirkung von Ozon auf das Isolat *S. mutans* DSM 20523

Die Abbildung 36 gibt die Ergebnisse der Ozonbehandlung von *S. mutans* DSM 20523 wieder. Für die Proben, die lediglich Raumluft ausgesetzt waren und entsprechend als Negativkontrolle dienten, konnte unmittelbar nach der ersten „Behandlung“ eine LKZ von 8,08E+08 KBE/ ml (Standardfehler 4,50E+08/ ml) ermittelt werden. Die Behandlung von *S. mutans* mit NaOCl 5 % für 60 Sekunden verhinderte dagegen die Bildung von Bakterienkolonien zur Bestimmung der LKZ nach der unmittelbaren Behandlung. Wie in den

ERGEBNISSE

Vorversuchen konnte auch hier nach 24 Stunden Inkubation keine koloniebildenden Einheiten nachgewiesen werden.

Bei den Proben, die nur mit Ozon bzw. mit Ozon und anschließend mit $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ behandelt wurden, konnte sowohl direkt nach der Behandlung als auch 24 Stunden danach kein signifikanter Unterschied in der LKZ zwischen den Applikationszeiten 60, 120, 180 und 300 Sekunden und auch nicht im Vergleich zur Negativkontrolle (s. Abb. 36, Tab. 7) detektiert werden.

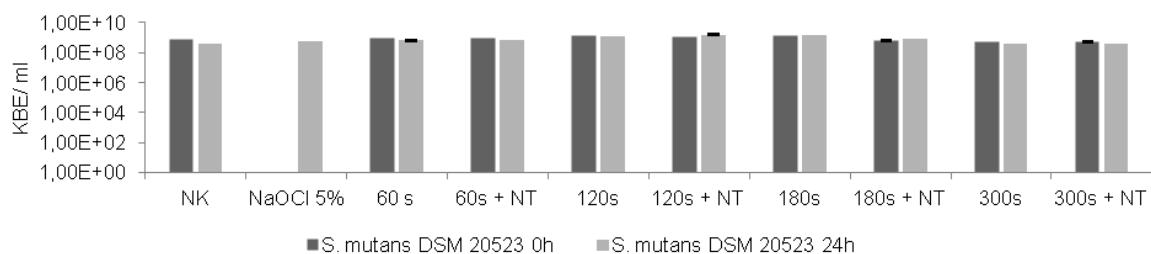


Abbildung 36: Ergebnisse der Bestimmung der LKZ von *S. mutans* DSM 20523 nach Ozon- bzw. NaOCl-Behandlung. Die Behandlung der Kulturen mit Ozon für 60 s, 120 s, 180 s und 300 s und eine nachfolgende Neutralisierung des Ozons durch $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ zeigte keine wesentliche Änderung der Lebendkeimzahlen. Die Applikation mit NaOCl 5 % wirkte dagegen eine Eradikation von *S. mutans* für den unmittelbaren Zeitpunkt nach Behandlung und nach einer Erholungsphase von 24 h. NK - Negativkontrolle, NT - Natriumthiosulfat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$).

Tabelle 7a und b: Ergebnisse der Behandlung von *S. mutans* DSM 20523 mit Ozon. Die Tabelle gibt die ermittelten Keimzahlen pro ml suspendiertem Biofilm sowie die Standardfehler und Signifikanzberechnung direkt nach Versuchsdurchführung und nach einer Erholungsphase von 24 h jeweils als exponentielle Werte auf der Basis von 10 wieder. ^a Es erfolgte keine statistische Auswertung bei einer vollständigen Erregereradikation.

Tabelle 7a	n	Mittelwerte der Keimzahl	Standard- abweichung	Standard- fehler	95 %		p-Wert
					Konfidenzintervall für Mittelwert	Unter- grenze	
a. <i>S. mutans</i> DSM 20523, Messzeitpunkt = 0 h							
Negativkontrolle	3	8,08E+08	7,79E+08	4,50E+08	-1,13E+09	2,74E+09	
NaOCl 5 %	3	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	- ^a
O₃60 s	3	8,67E+08	6,87E+08	3,97E+08	-8,41E+08	2,57E+09	0,827
O₃ 60 s + $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	3	9,82E+08	1,17E+09	6,77E+08	-1,93E+09	3,89E+09	0,827
O₃ 120 s	3	1,25E+09	1,22E+09	7,02E+08	-1,78E+09	4,27E+09	0,619
O₃ 120 s + $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	3	1,18E+09	1,16E+09	6,71E+08	-1,70E+09	4,07E+09	0,619
O₃ 180 s	3	1,28E+09	6,16E+08	3,56E+08	-2,49E+08	2,81E+09	0,619

ERGEBNISSE

O₃ 180 s +							
Na₂S₂O₃	3	6,38E+08	6,03E+08	3,48E+08	-8,59E+08	2,14E+09	0,827
O₃ 300 s	2	5,55E+08	1,48E+08	1,05E+08	-7,79E+08	1,89E+09	0,827
O₃ 300 s +							
Na₂S₂O₃	2	5,03E+08	4,35E+08	3,08E+08	-3,40E+09	4,41E+09	0,827

ERGEBNISSE

Tabelle 7b	n	Mittelwerte der Keimzahl	Standard- abweichung	Standard- fehler	95 % Konfidenzintervall für Mittelwert		p- Wert
					Unter- grenze	Ober- grenze	
b. <i>S. mutans</i> DSM 20523, Messzeitpunkt = 24 h							
Negativkontrolle	3	4,02E+08	2,67E+08	1,54E+08	-2,62E+08	1,07E+09	
NaOCl 5 %	3	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	- ^a
O₃ 60 s	3	6,45E+08	2,32E+08	1,34E+08	6,82E+07	1,22E+09	0,495
O₃ 60 s + Na₂S₂O₃	3	6,82E+08	7,03E+08	4,06E+08	-1,06E+09	2,43E+09	1,000
O₃ 120 s	3	1,18E+09	1,25E+09	7,23E+08	-1,93E+09	4,30E+09	0,495
O₃ 120 s + Na₂S₂O₃	3	1,57E+09	1,24E+09	7,16E+08	-1,51E+09	4,65E+09	0,495
O₃ 180 s	3	1,49E+09	1,15E+09	6,62E+08	-1,36E+09	4,34E+09	0,495
O₃ 180 s + Na₂S₂O₃	3	8,16E+08	1,88E+08	1,09E+08	3,49E+08	1,28E+09	0,495
O₃ 300 s	2	4,02E+08	1,39E+08	9,80E+07	-8,43E+08	1,65E+09	1,000
O₃ 300 s + Na₂S₂O₃	2	3,85E+08	1,42E+08	1,00E+08	-8,90E+08	1,66E+09	1,000

3.6.2. Die Wirkung von Ozon auf das Isolat *E. faecalis* 1942

Die Versuchsanordnung entsprach im Wesentlichen der für *S. mutans*. Es wurden jedoch 3 Tage alte Biofilm-Strukturen verwendet, da die Vorversuche eine höhere Biofilm-Masse nach dieser Inkubationszeit ergeben hatten. Im Vergleich zur Negativkontrolle (8,37E+08 KBE/ ml, Standardfehler 9,43E+07/ ml) konnte mit der Ozon-Applikation keine Änderung der LKZ erreichen. Dies zeigte sich auch nach einer 24-stündigen Inkubation der mit Ozon behandelten Proben. Eine signifikante Änderung der LKZ wurde lediglich bei den Proben, die mit NaOCl 5 % behandelt wurden, sowohl direkt nach der Applikation als auch nach 24-stündiger Inkubation erzielt (p-Wert 0,05).

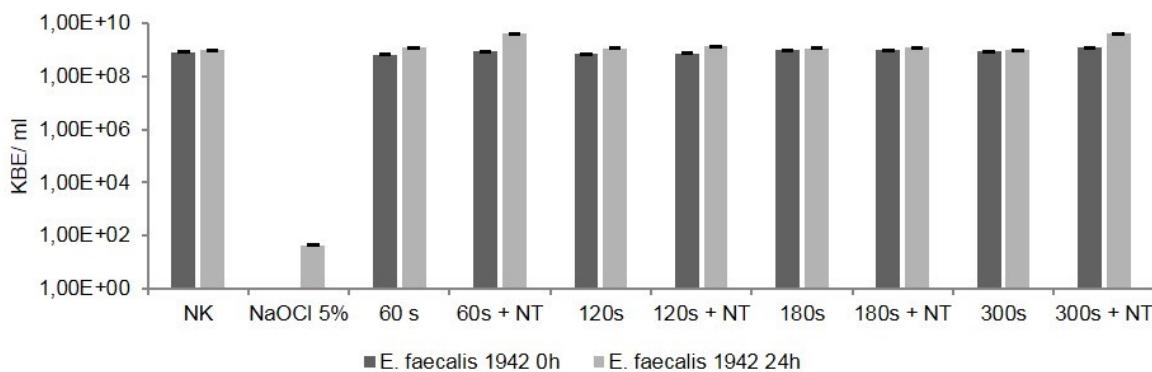


Abbildung 37: Ergebnisse der LKZ-Bestimmung von *E. faecalis* 1942. Die Behandlung der Kulturen mit Ozonapplikation 60 s, 120 s, 180 s und 300 s und eine nachfolgende Neutralisierung des Ozons zeigte keine Änderung der Lebendkeimzahlen. Die Applikation mit NaOCl 5 % konnte eine verminderte Lebendkeimzahl produzieren. Nach einer Erholungsphase von 24 h

ERGEBNISSE

erfolgte hier jedoch der erneute Nachweis eines Wachstums. Legende: NK - Negativkontrolle, NT - Natriumthiosulfat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$).

Tabelle 8: Ergebnisse der Behandlung von *E. faecalis* 1942 mit Ozon. Die Tabelle gibt die ermittelten Keimzahlen pro ml suspendierten Biofilm sowie die Standardfehler und Signifikanzberechnung direkt nach Versuchsdurchführung und nach einer Erholungsphase von 24 h als exponentielle Werte auf der Basis von 10 wieder.^a Es erfolgte keine statistische Auswertung bei einer vollständigen Erregereradikation.^b Statistische Signifikanz bei einem 5 % Signifikanzniveau.

	n	Mittelwerte der Keimzahl	Standard- abweichung	Standard- fehler	95 % Konfidenzintervall für Mittelwert		p- Wert
					Untergrenze	Obergrenze	
a. <i>E. faecalis</i> 1942, Messzeitpunkt = 0 h							
Negativkontrolle	3	8,37E+08	1,63E+08	9,43E+07	4,31E+08	1,24E+09	
NaOCl 5 %	3	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	- ^a
O₃ 60 s	3	6,42E+08	1,08E+08	6,22E+07	3,74E+08	9,09E+08	0,150
O₃ 60 s + Na₂S₂O₃	3	8,73E+08	1,53E+08	8,82E+07	4,94E+08	1,25E+09	0,827
O₃ 120 s	3	6,88E+08	3,55E+07	2,05E+07	6,00E+08	7,76E+08	0,150
O₃ 120 s + Na₂S₂O₃	3	7,38E+08	8,37E+07	4,83E+07	5,30E+08	9,46E+08	0,413
O₃ 180 s	3	9,67E+08	4,06E+08	2,35E+08	-4,29E+07	1,98E+09	0,827
O₃ 180 s + Na₂S₂O₃	3	9,83E+08	3,12E+08	1,80E+08	2,08E+08	1,76E+09	0,413
O₃ 300 s	3	8,59E+08	1,29E+08	7,42E+07	5,40E+08	1,18E+09	0,827
O₃ 300 s + Na₂S₂O₃	2	1,35E+09	2,12E+08	1,50E+08	-5,56E+08	3,26E+09	0,187
b. <i>E. faecalis</i> 1942, Messzeitpunkt = 24 h							
Negativkontrolle	3	9,60E+08	2,60E+08	1,50E+08	3,14E+08	1,61E+09	
NaOCl 5 %	3	4,27E+01	5,13E+01	2,96E+01	-8,48E+01	1,70E+02	0,05 ^b
O₃ 60 s	3	1,17E+09	4,26E+08	2,46E+08	1,15E+08	2,23E+09	0,827
O₃ 60 s + Na₂S₂O₃	3	4,04E+09	3,78E+09	2,18E+09	-5,35E+09	1,34E+10	0,225
O₃ 120 s	3	1,14E+09	5,59E+08	3,23E+08	-2,44E+08	2,53E+09	0,660
O₃ 120 s + Na₂S₂O₃	3	1,33E+09	6,71E+08	3,87E+08	-3,42E+08	2,99E+09	0,495
O₃ 180 s	3	1,15E+09	6,00E+08	3,46E+08	-3,38E+08	2,64E+09	0,827
O₃ 180 s + Na₂S₂O₃	3	1,19E+09	2,52E+08	1,46E+08	5,63E+08	1,82E+09	0,495
O₃ 300 s	3	9,59E+08	3,13E+08	1,80E+08	1,83E+08	1,74E+09	0,660
O₃ 300 s + Na₂S₂O₃	4	3,32E+09	4,40E+09	2,20E+09	-3,68E+09	1,03E+10	0,471

3.7. Kombinierte Behandlung der Biofilme mit Ozon, Natriumhypochlorit und Natriumthiosulfat unter aeroben Verhältnissen

Neben der Einzelbehandlung der Biofilmstrukturen mit Ozon und Natriumhypochlorit sollte untersucht werden, ob ein bakterizider Synergismus der verwendeten Oxidantien vorliegt.

Noetzel *et al.* postulierten 2009 unter Verwendung von *E. faecalis*-Kulturen,⁷⁶ dass die Kombination von Ozon und Natriumhypochlorit eine deutliche bakterizide Wirkung aufwies.

Von den Biofilmen wurden, wie in den vorangegangenen Versuchen, das durch die vorangegangene Inkubation verbrauchte Medium abgehoben. Die Biofilme wurden dann mit 1x PBS gespült. Anschließend wurde die LKZ bestimmt (Negativkontrolle) bzw. im Falle der Positivkontrolle der Biofilm einer 5 %-igen NaOCl-Lösung ausgesetzt. Des Weiteren wurden die Biofilme mit einer Behandlungskombination bestehend aus Ozon/ Natriumhypochlorit/ Natriumthiosulfat belastet. Die Biofilme wurden in diesem Versuchsansatz einer Ozon-Applikationszeit von 60 und 120 Sekunden ausgesetzt. Exemplarisch für dieses Versuchsvorgehen werden die Ergebnisse für die beiden Stämme *S. mutans* DSM 20523 und *E. faecalis* 1942 vorgestellt. Der verbleibende Datensatz ist im Anhang dieser Arbeit aufgeführt.

*3.7.1. Resultate der sequentiellen Wirkung von Ozon und Natriumhypochlorit auf *S. mutans* DSM 20523*

Für diese Untersuchung mit *S. mutans* DSM 20523 wurden wiederum 24 bzw. 48 Stunden alte Biofilme eingesetzt. Diese wurden im Falle der Negativkontrolle keiner Behandlung, im Falle der Positivkontrolle 60 Sekunden mit NaOCl 5 %, und im Falle der kombinierten Ozonbehandlung 60 bzw. 120 Sekunden mit dem Ozon und einer sich sofortig anschließenden Behandlung mit NaOCl 5 % für 60 Sekunden und einer nachfolgenden Behandlung mit Na₂S₂O₃ für 60 Sekunden unterzogen. Je ein Biofilm wurde nur mit einer Kombination aus NaOCl 5 % und anschließend Na₂S₂O₃ für je 60 Sekunden behandelt.

Für die Proben der Negativkontrolle konnte eine LKZ von 1,28E+09 KBE/ ml (Standardfehler 4,29E+08/ ml) bestimmt werden, während Biofilme, die mit NaOCl 5 % (Positivkontrolle) behandelt wurden, eine deutliche Keimzahlreduktion aufwiesen. In keiner dieser Kulturen konnte weder am ersten Tag noch am zweiten Tag der Zellzählungsversuche eine Lebendkeimzahl bestimmt werden. Die zuerst mit Ozon und im Anschluss mit NaOCl und Na₂S₂O₃ behandelten Biofilme zeigten bei *S. mutans* DSM 20523 eine Eradizierung unmittelbar nach der Durchführung des Versuchs. Nach einer 24-Stunden Inkubation konnte eine Keimzahl von 5,98E+08 (Standardfehler 1,86E+08) ermittelt werden. Die Proben, die für 60 und 120 Sekunden mit Ozon und anschließend mit NaOCl 5 % und Na₂S₂O₃ behandelt wurden, zeigten ebenfalls eine signifikante Keimzahlreduktion direkt nach Applikation. Allerdings konnten hier nach 24 Stunden Lebendkeimzahlen bei den Proben, die Ozon über 120 Sekunden, NaOCl und Na₂S₂O₃ exponiert wurden, ermittelt werden (O₃ 120 s/ NaOCl 5 %/ NT 24 h: 6,22E+02 KBE/ ml, Standardfehler 5,89E+02/ ml, p-Wert 0,05). Paradoxalemente

ERGEBNISSE

konnte bei den Proben, auf die über nur 60 Sekunden Ozon appliziert wurde, an beiden Ermittlungszeitpunkten der Lebendkeimzählungen eine Eradikation beobachtet werden.

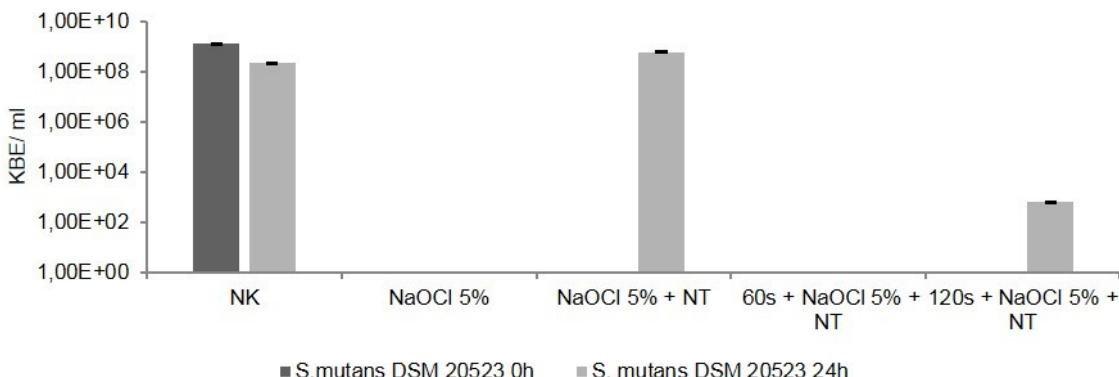


Abbildung 38: Ergebnisse der kombinierten Behandlung mit Ozon/ NaOCl/ Na₂S₂O₃ von *S. mutans* DSM 20523 direkt nach Durchführung des Versuchs und nach 24 Stunden Inkubationszeit. NK - Negativkontrolle, NT - Natriumthiosulfat (Na₂S₂O₃).

Tabelle 9: Ergebnisdarstellung und Statistik zur Exposition von *S. mutans* DSM 20523 gegenüber verschiedenen desinfizierenden Agenzien direkt nach der Exposition (0 h) und nach 24 Stunden Erholungsphase. Die Tabelle gibt die ermittelten Keimzahlen pro ml suspendierten Biofilm sowie die Standardfehler und Signifikanzberechnung direkt nach Versuchsdurchführung und nach einer Erholungsphase von 24 h als exponentielle Werte auf der Basis von 10 wieder.^a Keine statistische Auswertung bei einer 100 %igen Eradikation;^b Statistische Signifikanz bei einem 5 % Signifikanzniveau.

	n	Mittelwerte der Keimzahlen	Standard- abweichung	Standard- fehler	95 % Konfidenzintervall für Mittelwert		p- Wert
					Unter- grenze	Ober- grenze	
a. <i>S. mutans</i> DSM 20523, Messzeitpunkt = 0 h							
Negativkontrolle	3	1,28E+09	7,42E+08	4,29E+08	-5,68E+08	3,12E+09	
NaOCl 5 %	3	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	- ^a
NaOCl 5 %+ Na ₂ S ₂ O ₃	2	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	- ^a
O ₃ 60 s+ NaOCl 5 %+ Na ₂ S ₂ O ₃	3	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	- ^a
O ₃ 120 s NaOCl 5 %+ Na ₂ S ₂ O ₃	3	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	- ^a
b. <i>S. mutans</i> DSM 20523, Messzeitpunkt = 24 h							
Negativkontrolle	3	2,19E+08	1,13E+08	6,53E+07	-6,18E+07	5,00E+08	
NaOCl 5 %	3	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	- ^a
NaOCl 5 %+ Na ₂ S ₂ O ₃	3	5,98E+08	3,22E+08	1,86E+08	-2,00E+08	1,40E+09	0,127
O ₃ 60 s +NaOCl 5 %+ Na ₂ S ₂ O ₃	3	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	- ^a
O ₃ 120 s	3	6,22E+02	1,02E+03	5,89E+02	-1,91E+03	3,16E+03	0,05 ^b

ERGEBNISSE

+NaOCl 5 %
+Na₂S₂O₃

3.7.2. Resultate der sequentiellen Wirkung von Ozon und Natriumhypochlorit auf *E. faecalis* 1942

Für die Untersuchungen mit *E. faecalis* wurden 72 Stunden alte Biofilm-Strukturen verwendet. Exemplarisch werden nachfolgend die Ergebnisse für den Stamm *E. faecalis* 1942 dargestellt. Die Biofilm-Strukturen wurden wie bei *S. mutans* mit Raumluft (Negativkontrolle), für 60 Sekunden mit NaOCl 5 % (Positivkontrolle) bzw. für je 60 und 120 Sekunden mit Ozon und sofortig anschließend mit NaOCl 5 % und Na₂S₂O₃ mit jeweils 60 Sekunden Applikationszeit behandelt. Zum Vergleich wurden auch hier Proben nur mit NaOCl 5 % und anschließend Na₂S₂O₃ für jeweils 60 Sekunden behandelt.

Bei der Positivkontrolle konnten unmittelbar nach der Behandlung mit NaOCl keine KBE/ ml detektiert werden. Erst nach 24-stündiger Inkubation wurde eine LKZ von 4,27E+01 KBE/ ml (Standardfehler 2,96E+01/ ml, p-Wert 0,05) bestimmt. Die Exposition der Proben für 60 Sekunden mit Ozon und die sich sofort anschließende Behandlung mit NaOCl 5 % und nachfolgend Na₂S₂O₃ ergab bei den unmittelbar nachfolgend angefertigten Verdünnungsreihen keine auszählbaren Kolonien. Nach 24 Stunden Inkubation konnten bei den Proben O₃ 60 s/ NaOCl 5 %/ Na₂S₂O₃ ein Wachstum von 5,37E+03/ ml (Standardfehler 3,44E+03/ ml) registriert werden. Die Proben, die nur für 60 Sekunden mit NaOCl 5 % und nachfolgend Na₂S₂O₃ behandelt wurden, zeigten sowohl bei den unmittelbar ausplattierten Verdünnungsreihen (Tag 1 NaOCl 5 %/ Na₂S₂O₃: 7,68E+04 KBE/ ml, Standardfehler 5,10E+04/ ml) als auch nach 24 Stunden Inkubation der Proben Wachstum (Tag 2 NaOCl 5 %/ Na₂S₂O₃: 1,35E+06 KBE/ ml, Standardfehler 8,27E+05) .

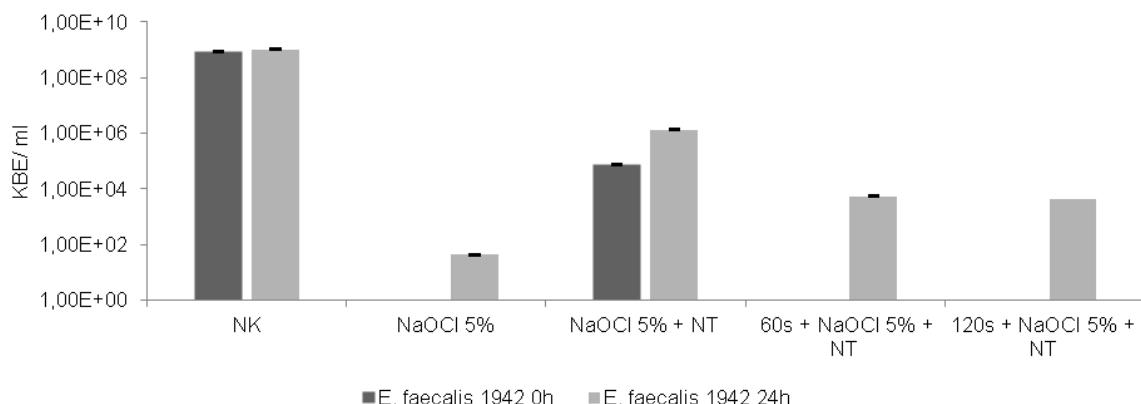


Abbildung 39: Ergebnisse der kombinierten Behandlung mit Ozon/ NaOCl/ Na₂S₂O₃ von *E. faecalis* 1942 direkt nach Durchführung des Versuchs und nach 24 Stunden Erholungsphase. NK - Negativkontrolle, NT - Natriumthiosulfat (Na₂S₂O₃).

ERGEBNISSE

Tabelle 10: Ergebnisdarstellung und Statistik zur Exposition *E. faecalis* 1942 gegenüber verschiedenen desinfizierenden Agenzien direkt nach der Exposition (0 h) und nach 24 Stunden Erholungsphase. Die Tabelle gibt die ermittelten Keimzahlen pro ml sowie die Standardfehler und Signifikanzberechnung direkt nach Versuchsdurchführung und nach einer Erholungsphase von 24 h als exponentielle Werte auf der Basis von 10 wieder.^a Keine statistische Auswertung bei einer 100 %igen Eradikation;^b Statistische Signifikanz bei einem 5 % Signifikanzniveau.

	n	Mittelwerte der Keimzahlen	Standardabweichung	Standardfehler	95 % Konfidenzintervall für Mittelwert		p-Wert
					Untergrenze	Obergrenze	
a. <i>E. faecalis</i> 1942, Messzeitpunkt = 0 h							
Negativkontrolle	3	8,37E+08	1,63E+08	9,43E+07	4,31E+08	1,24E+09	
NaOCl 5 %	3	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	- ^a
NaOCl 5 %+ Na ₂ S ₂ O ₃	3	7,68E+04	8,83E+04	5,10E+04	-1,42E+05	2,96E+05	0,05 ^b
O ₃ 60 s+							
NaOCl 5 %+ Na ₂ S ₂ O ₃	3	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	- ^a
O ₃ 120 s +							
NaOCl 5 %+ Na ₂ S ₂ O ₃	3	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	- ^a
b. <i>E. faecalis</i> 1942, Messzeitpunkt = 24 h							
Negativkontrolle	3	1,01E+09	1,38E+08	7,97E+07	6,67E+08	1,35E+09	
NaOCl 5 %	3	4,27E+01	5,13E+01	2,96E+01	-8,48E+01	1,70E+02	0,05 ^b
NaOCl 5 %+ Na ₂ S ₂ O ₃	3	1,35E+06	1,43E+06	8,27E+05	-2,21E+06	4,91E+06	0,05 ^b
O ₃ 60 s +							
NaOCl 5 %+ Na ₂ S ₂ O ₃	3	5,37E+03	5,95E+03	3,44E+03	-9,41E+03	2,01E+04	0,05 ^b
O ₃ 120s +							
NaOCl 5 %+ Na ₂ S ₂ O ₃	3	4,26E+03	3,62E+03	2,09E+03	-4,73E+03	1,32E+04	0,05 ^b

3.8. Ergebnisse der Rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung nach *in vitro* Ozon-Applikation auf *S. mutans*- bzw. *E. faecalis*-Biofilmstrukturen unter aeroben Verhältnissen

Bei der Rasterelektronenmikroskopie wird ein Elektronenstrahl über das zu vergrößernde Objekt geführt und die Wechselwirkung der Elektronen mit dem Objekt zur Erzeugung eines Bildes des Objekts genutzt. Vorteil der Rasterelektronenmikroskopie (REM) ist, dass man mit diesem Verfahren eine hohe Tiefenauflösung des gewünschten Objektes erzeugen kann.

Mit Hilfe der REM sollte nun überprüft werden, ob die Behandlung der Biofilm-Strukturen mit Ozon einen Einfluss auf die Bakteriedichte, Adhärenz und Oberflächenstruktur hatte. Im Nachfolgenden werden exemplarisch die REM-Aufnahmen für Biofilm-Strukturen der Bakterienstämme *S. mutans* DSM 20523 und *E. faecalis* 1942 ohne und nach Behandlung mit Ozon mit und ohne Natriumthiosulfat, sowie nur mit Natriumhypochlorit dargestellt (s. 3.9.1–

3.9.4). Für die Versuche wurden wie bei den oben beschriebenen Experimenten 24 bzw. 48 Stunden alte *S. mutans* und 72 Stunden alte *E. faecalis* Biofilme-Strukturen eingesetzt und die Behandlung der Proben mit NaOCl für 60 Sekunden bzw. die Ozonbehandlung für 60 und 300 Sekunden durchgeführt. Eine Applikationsdauer von 300 Sekunden wurde aufgrund der erhobenen Lebendkeimzahlen (s. 3.5) gewählt. Als Nährmedium wurde hier ebenso mit BHI und 0,1 % Mucin gearbeitet.

*3.8.1. Ergebnisse der REM-Analyse von *S. mutans* DSM 20523*

Der normale Phänotypus der Streptokokken ist kugel- bis eiförmig. Die einzelnen Bakterien lagern sich entweder paarförmig als Diplokokken oder in Kettenformation zusammen. In der Negativkontrolle (Abb. 40a+b), die lediglich mit PBS gespült und anschließend für die REM präpariert wurde, war sowohl kurz nach „Behandlung“ als auch 24 Stunden danach ein intaktes Gefüge der Zellen zueinander erkennbar. Der Zellrasen erschien dicht in mehreren Zellschichten und bedeckte die Oberfläche komplett. Die Zellen lagen in einer für sie typischen kettenförmigen Formation zusammen.

Im Gegensatz dazu zeigte die mit NaOCl 5 % behandelte Probe ein aufgebrochenes Zellgefüge mit nur vereinzelten Zellen auf der Oberfläche, die sich in einzelnen Ketten aber häufig auch Zellklumpen formierten (Abb. 41a). Die kristallförmigen Strukturen, die auf den Aufnahmen zu erkennen sind, sind vermutlich auf durch den Trocknungsprozesses kristallisiertes NaOCl zurückzuführen.

Die Aufnahmen, die von den Proben 24 Stunden nach Natriumhypochlorit-Behandlung aufgenommen wurden, zeigten vergleichsweise noch weniger Zellen auf der Oberfläche. Es konnten keinerlei Biofilm-Strukturen mehr detektiert werden (Abb. 41b).

Bei der Probe, die für 60 Sekunden mit NaOCl und anschließend mit Na₂S₂O₃ (Abb. 42a) behandelt wurde, konnten im Unterschied dazu unmittelbar nach der Behandlung auf der Oberfläche noch gleichmäßig verteilte Zellen beobachtet werden. Nach einer Inkubation von 24 Stunden wurde jedoch ein ähnliches Bild wie nach alleiniger NaOCl-Behandlung beobachtet: auch hier lagen die Zellen nur noch vereinzelt auf der Oberfläche (Abb. 42b).

Die Proben, die für 60 Sekunden dem O₃ (Abb. 43a+b) exponiert waren, zeigten dagegen durchgehend mehrschichtige Biofilm-Strukturen. Die Zellen bedecken die Oberfläche komplett. Nach einer Inkubation von 24 Stunden konnte keine Änderung der Biofilmstruktur im Vergleich zur initial behandelten Probe detektiert werden. Die zusätzliche Behandlung mit Na₂S₂O₃ hatte keinen Einfluss auf die Adhärenz der Zellen. Die Aufnahmen zeigen ähnliche Oberflächenstrukturen, wie sie nach alleiniger Ozon-Behandlung beobachtet werden konnten (Abb. 44a+b).

ERGEBNISSE

Dagegen zeigte die kombinierte Behandlung der Proben mit Ozon und NaOCl 5 % ein anderes Bild (Abb. 45a). Der Zellverband war nicht mehr vorhanden, es konnten keine Biofilm-Strukturen mehr detektiert werden, die Zellen lagen nur noch vereinzelt auf der Oberfläche. Einen Tag nach der Behandlung konnten demgegenüber wieder mehr adhärente Bakterien detektiert werden (Abb. 45b), wenngleich bei der Bestimmung der Lebendkeimzahl keine kultivierbaren Zellen vorhanden waren (= 0 KBE/ ml, s. Abb. 38). Dies war dennoch ein deutlicher Unterschied zu der nur mit NaOCl behandelten Probe nach 24-stündiger Bebrütung.

Ein ähnliches Ergebnis konnte für die Proben, die über 300 Sekunden mit O₃ behandelt wurden, beobachtet werden (Abb. 46–48). Hier bewirkte erst die kombinierte Behandlung von Ozon und Natriumhypochlorit die Zerstörung und Ablösung der Biofilm-Strukturen (Abb. 48a+b).

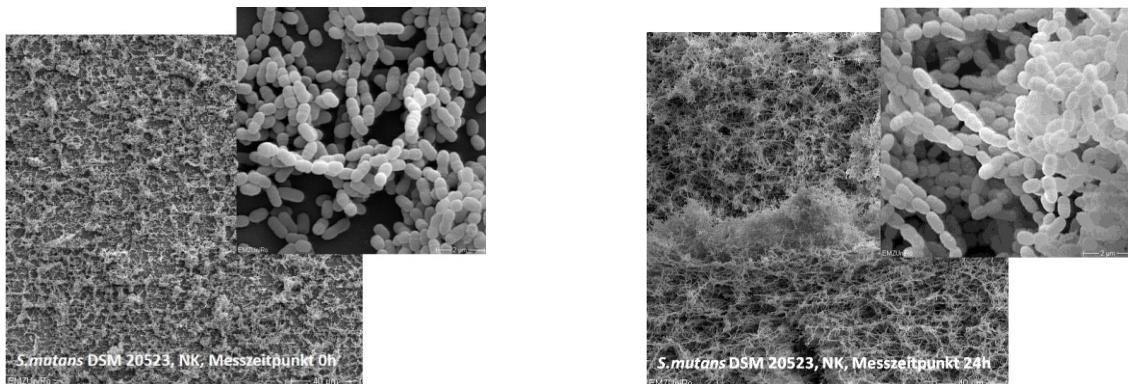


Abbildung 40a+b: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Negativkontrolle des *S. mutans* Stamms DSM20523. Vergrößerung 500x und 10.000x; Aufnahmen exemplarisch für die Messzeitpunkte 0 h und nach 24 h Erholungsphase. An beiden Tagen bildete sich an der Oberfläche ein mehrschichtiger Biofilm, der die Oberfläche komplett bedeckte.

ERGEBNISSE

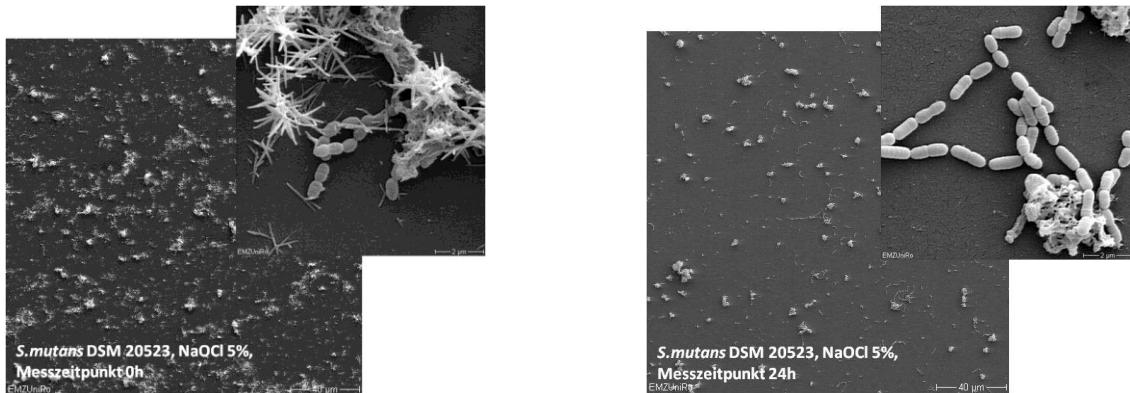


Abbildung 41a+b: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Positivkontrolle (NaOCl 5 %) des *S. mutans* Stamms DSM 20523. Vergrößerung 500x und 10.000x; Aufnahmen exemplarisch für die Messzeitpunkte 0 h und nach 24 h Erholungsphase. Unmittelbar nach der Untersuchung wurden an der Oberfläche gleichmäßig vereinzelte Zellen mit „Klumpenformation“ beobachtet. Die abgebildeten Kristalle sind als Artefakte der Natriumhypochloritbehandlung zu werten. Nach der 24-stündigen Erholungsphase ließen sich an der Oberfläche nur noch vereinzelte und im Vergleich zum Messzeitpunkt 0 h deutlich weniger Zellen auf der Oberfläche nachweisen.

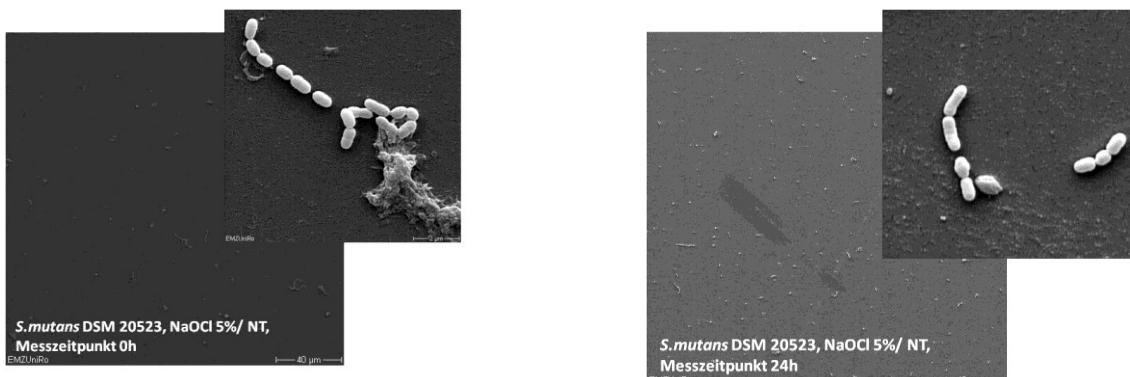


Abbildung 42a+b: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des Versuchsansatzes mit Exposition gegen NaOCl 5 % und Na₂S₂O₃ des *S. mutans* Stamms DSM 20523. Vergrößerung 500x und 10.000x; Aufnahmen exemplarisch für die Messzeitpunkte 0 h und nach 24 h Erholungsphase. Auf der Oberfläche ließen sich zu beiden Zeitpunkten lediglich vereinzelte, teilweise deformierte Zellen dokumentieren.

ERGEBNISSE

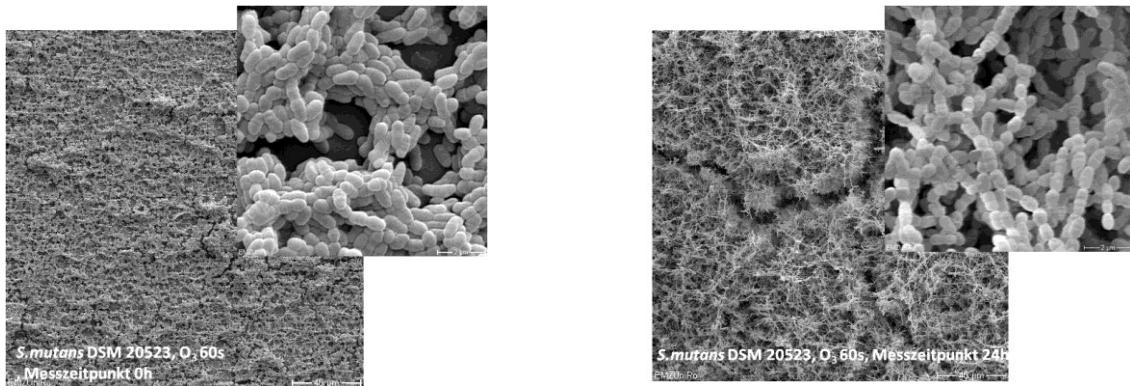


Abbildung 43a+b: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des Versuchsansatzes mit 60 s O₃–Exposition des *S. mutans* Stamms DSM 20523. Vergrößerung 500x und 10.000x; Aufnahmen exemplarisch für die Messzeitpunkte 0 h und nach 24 h Erholungsphase. Nach der O₃-Behandlung über 60 s konnte zu beiden Messzeitpunkten ein mehrschichtiger Zellrasen, der komplett die Oberfläche bedeckte, nachgewiesen werden.

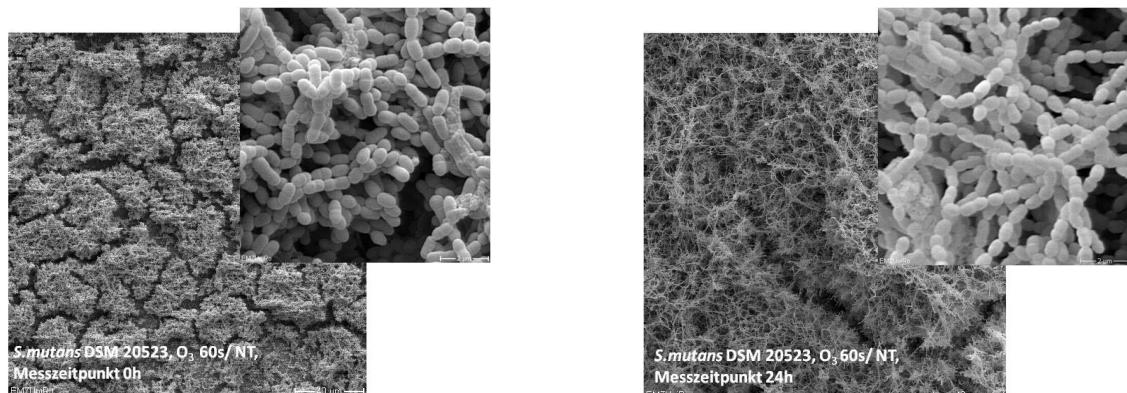


Abbildung 44a+b: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des Versuchsansatzes mit 60 s O₃ –Exposition und Na₂S₂O₃ – Behandlung des *S. mutans* Stamms DSM 20523. Vergrößerung 500x und 10.000x; Aufnahmen exemplarisch für die Messzeitpunkte 0 h und nach 24 h Erholungsphase. Nach der Behandlung mit O₃ über 60 s und nachfolgend mit Na₂S₂O₃ war zu beiden Messzeitpunkten ein mehrschichtiger Zellrasen, der komplett die Oberfläche bedeckte, nachweisbar.

ERGEBNISSE

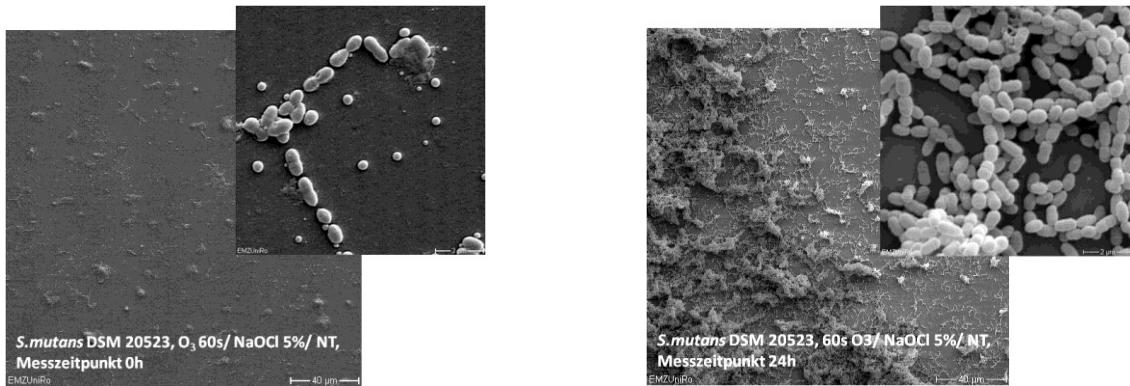


Abbildung 45a+b: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des Versuchsansatzes des *S. mutans* Stamms DSM 20523 mit O₃-Exposition über 60 s, sowie gegen NaOCl und Na₂S₂O₃. Vergrößerung 500x und 10.000x; Aufnahmen exemplarisch für die Messzeitpunkte 0 h und nach 24 h Erholungsphase. Unmittelbar nach der kombinierten Behandlung waren auf der Oberfläche vereinzelte, teils in Zellklumpen zusammen gelagerte, Zellen zu beobachten. Zum Messzeitpunkt 24 h zeigte sich eine Zunahme der Zellen. Die Oberfläche ist gleichmäßig und zum Teil mit mehrschichtigen Zellnestern besiedelt.

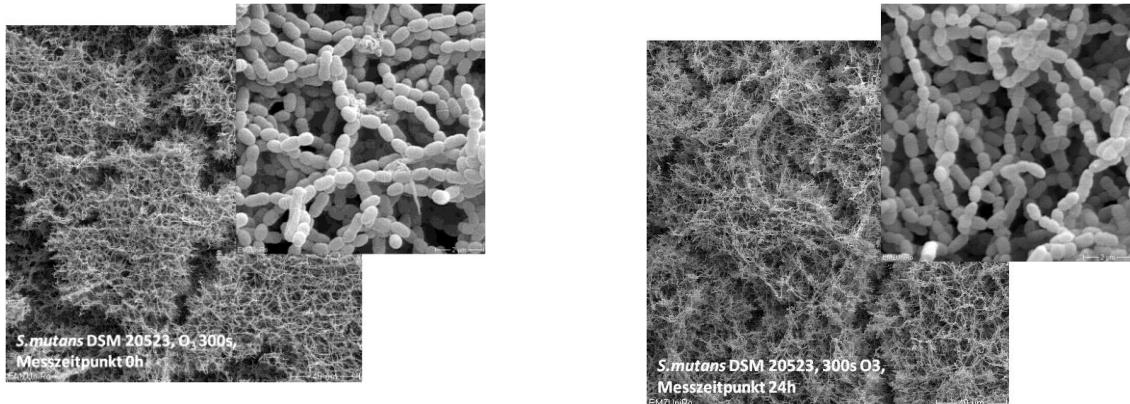


Abbildung 46a+b: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des Versuchsansatzes mit O₃-Exposition über 300 s des *S. mutans* Stamms DSM 20523. Vergrößerung 500x und 10.000x; Aufnahmen exemplarisch für die Messzeitpunkte 0 h und nach 24 h Erholungsphase. Nach der O₃-Behandlung über 300 s war zu beiden Messzeitpunkten ein mehrschichtiger Zellrasen, der komplett die Oberfläche bedeckte, nachweisbar.

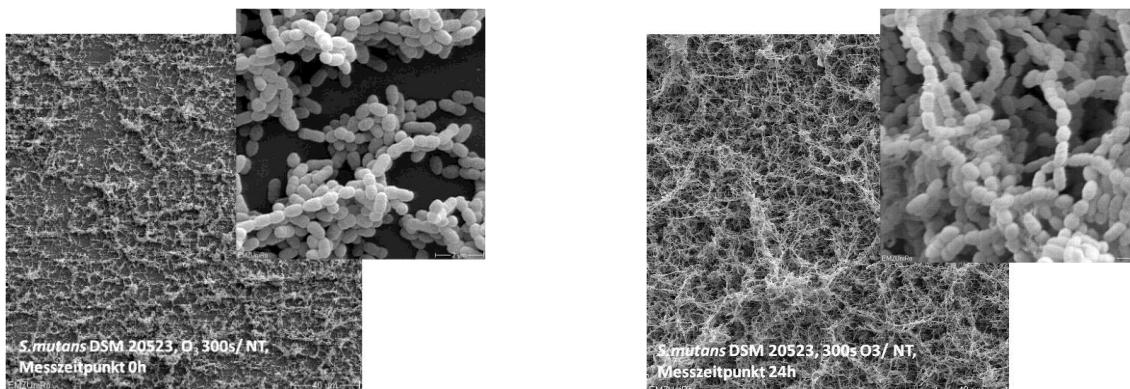


Abbildung 47a+b: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des Versuchsansatzes mit O₃-Exposition über 300 s und nachfolgend Na₂S₂O₃ des *S. mutans* Stamms DSM 20523. Vergrößerung 500x und 10.000x; Aufnahmen exemplarisch für die Messzeitpunkte 0 h und nach 24 h Erholungsphase. Nach der O₃-Behandlung über 300 s und nachfolgend mit Na₂S₂O₃ war zu beiden Messzeitpunkten ein mehrschichtiger Zellrasen, der komplett die Oberfläche bedeckte, nachweisbar.

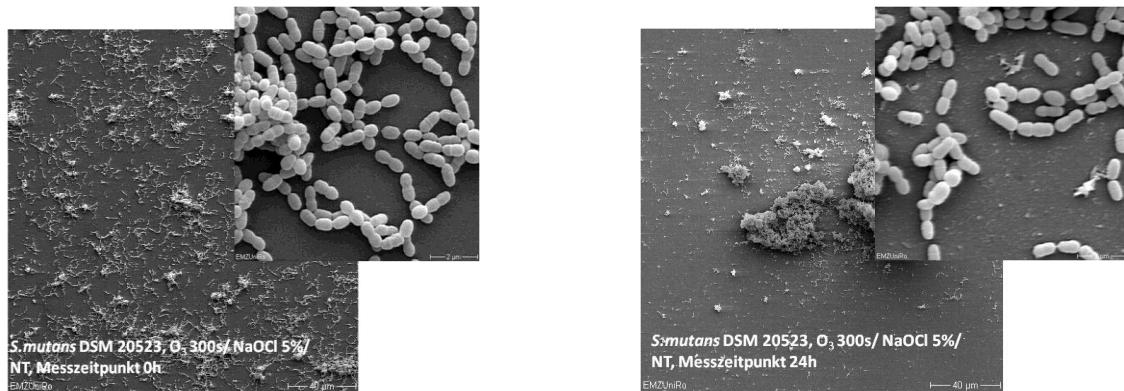


Abbildung 48a+b: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des Versuchsansatzes des *S. mutans* Stamms DSM 20523 mit O₃-Exposition über 300 s sowie nachfolgender, NaOCl und Na₂S₂O₃-Behandlung. Vergrößerung 500x und 10.000x; Aufnahmen exemplarisch für die Messzeitpunkte 0 h und nach 24 h Erholungsphase. Nach einer kombinierten Behandlung konnten unmittelbar danach auf der Oberfläche vereinzelte, teils in Zellklumpen zusammen gelagerte Zellen dokumentiert werden. Zum Messzeitpunkt 24 h nach Behandlung ist die Oberfläche gleichmäßig und zum Teil Zellklumpen besiedelt.

3.8.2. Ergebnisse der REM-Analyse von *E. faecalis* 1942

Das natürliche Biotop der Enterokokken befindet sich im Darmtrakt von Menschen und Tieren. In ihrer äußereren Erscheinungsform treten sie als längliche Kokken häufig in paariger Anordnung oder in Kettenformation auf.

In den elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Negativkontrolle von *E. faecalis* 1942 war zum Messzeitpunkt 0 h (Abb. 49a) eine gleichmäßige Verteilung von Zellen auf der Oberfläche erkennbar (*monolayer*). Nach einer weiteren Inkubationszeit von 24 Stunden (Abb. 49b) ließ sich im Vergleich zu Abb. 49a ein zusammenhängender einschichtiger Bakterienzellrasen erkennen. Nach einer Behandlung mit NaOCl 5 % über 60 s konnten direkt nach der Applikation keine bzw. nur einzelne adhärente Zellen detektiert werden (Abb. 50a).

Zum Messzeitpunkt 24 h (Abb. 50b) wurde dagegen eine gleichmäßige Oberflächenverteilung von adhärenten Zellen, ähnlich dem Bild bei Erhebung der Lebendkeimzahlen (s. Abb. 39), dokumentiert. In dem Versuchsansatz, in dem die Kultur zuerst mit NaOCl und anschließend mit Na₂S₂O₃ für jeweils 60 s Sekunden behandelt wurde, ließen sich unmittelbar nach der Behandlung ebenfalls nur vereinzelt Zellen auf der Oberfläche nachweisen (Abb. 51a). Zum Messzeitpunkt 24 h (Abb. 51b) konnten dahingegen erneut eine gleichmäßig Verteilung der Bakterienzellen, teilweise aber auch eine Art Klumpenbildung beobachtet werden.

Biofilmstrukturen von *E. faecalis*, die nur über 60 s mit O₃ behandelt wurden, zeigten direkt nach der Applikation einen weiterhin gleichmäßigen, teils mehrschichtigen Zellrasen (Abb. 52a). Nach 24 Stunden Inkubation lagen die Bakterienzellen dagegen eher in einem einschichtigen, aber weiterhin die gesamte Oberfläche bedeckenden Zellrasen (*monolayer*) vor. Teilweise schien aber die Behandlung mit Ozon zur Zellverklumpung geführt zu haben, wie es auch nach der NaOCl 5 % + Na₂S₂O₃-Behandlung beobachtet werden konnte (Abb. 52b). Für Kulturen, die mit O₃ und Na₂S₂O₃ behandelt wurden, war an beiden Messzeitpunkten ein einschichtiger, gleichmäßiger Zellrasen erkennbar (Abb. 53a+b). Die kombinierte Behandlung mit O₃, NaOCl und anschließend Na₂S₂O₃ zeigte direkt nach der Applikation nur vereinzelte Zellen auf der Oberflächen (Abb. 54a), ähnlich wie nach alleiniger NaOCl-Behandlung. Zum Messzeitpunkt nach 24 h wurde dagegen eine Zunahme der Zellmasse mit einer gleichmäßigen Verteilung auf der Oberfläche nachgewiesen (Abb. 54b).

Für die Kulturen, die mit 300 s O₃ behandelt wurden, war bei den Proben unmittelbar nach der Applikation eine gleichmäßige Verteilung mit einzelnen Zellklumpen ersichtlich (Abb. 55a). Zum Zeitpunkt der Bestimmung nach 24 Stunden (Abb. 55b) konnte eine Zunahme der Zellmasse mit einer gleichmäßigen Verteilung auf der Oberfläche dokumentiert werden. Nach der Behandlung mit 300 s O₃ und Na₂S₂O₃ konnte zu beiden zwischen dem Zeitpunkt 0 und nach 24-stündiger Inkubation keine offensichtlichen Unterschiede in der Adhärenz der Zellen und der Zellmasse beobachtet werden. Die Verteilung entsprach in etwa der nach alleiniger Ozonbehandlung für 300 s (Abb. 56a+b). In der Kombination O₃, NaOCl und Na₂S₂O₃ konnte, ähnlich wie bei der vorherigen Behandlung mit 60 Sekunden Ozon in dieser Kombination, in der Untersuchung kein zusammenhängender Zellrasen mehr gesehen werden (Abb. 57a). Nach 24 Stunden Inkubation wurde jedoch auch hier wieder ein zusammenhängender, einschichtiger Zellrasen dokumentiert (Abb. 57b).

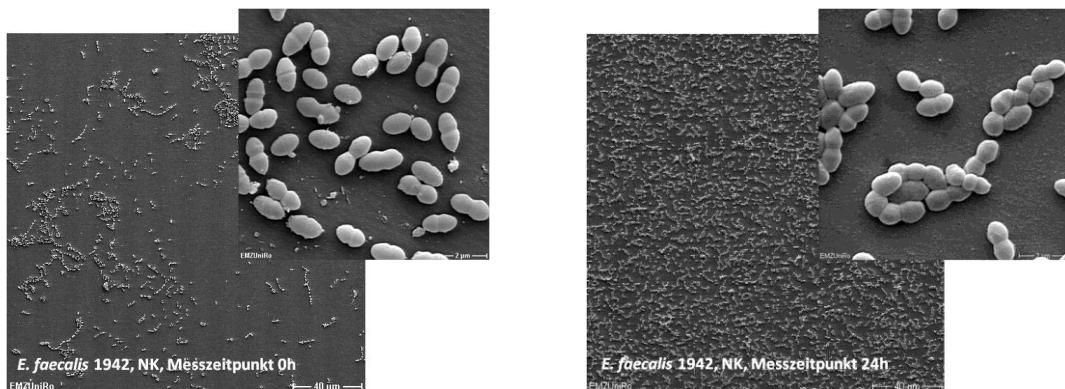


Abbildung 49a+b: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Negativkontrolle für den *E. faecalis* Stamm 1942. Vergrößerung 500x und 10.000x; Aufnahmen exemplarisch für die Messzeitpunkte 0 h und nach 24 h Erholungsphase. An beiden Messzeitpunkten bildete sich ein gleichmäßiger Bakterienzellrasen (*monolayer*) aus.

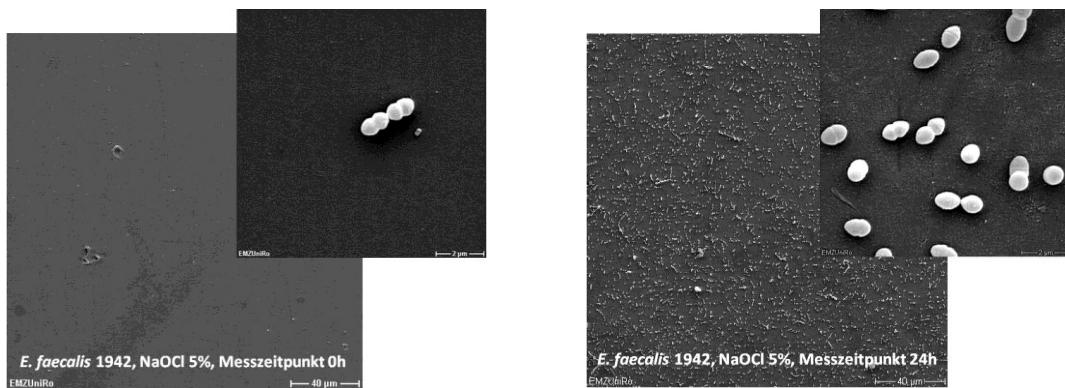


Abbildung 50a+b: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Positivkontrolle (NaOCl 5 %) für den *E. faecalis* Stamm 1942. Vergrößerung 500x und 10.000x; Aufnahmen exemplarisch für den Messzeitpunkt 0 h und nach 24 h Erholungsphase. Nach der NaOCl-Applikation ließen sich nur sehr vereinzelt Bakterienzellen nachweisen. Zum Messzeitpunkt nach 24 h Inkubation ließ sich ein einschichtiger, gleichmäßiger Zellrasen dokumentieren.

ERGEBNISSE

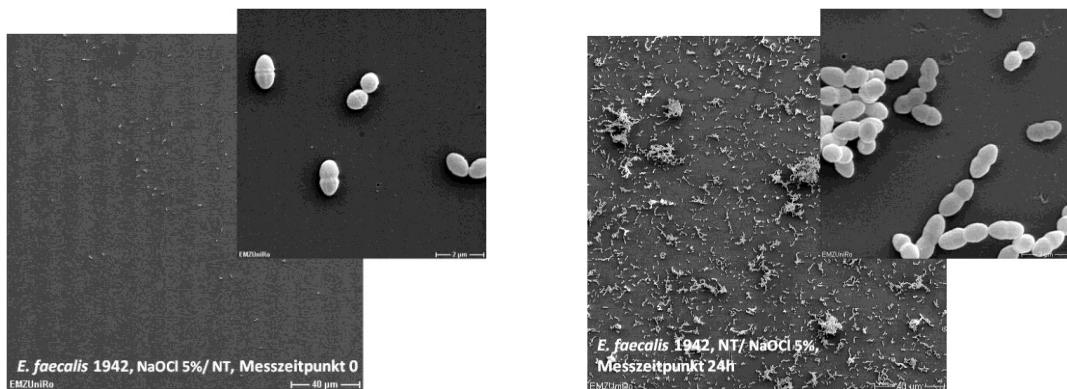


Abbildung 51a+b: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des Versuchsansatzes mit NaOCl 5 % und Na₂S₂O₃ (NT) für den *E. faecalis* Stamm 1942. Vergrößerung 500x und 10.000x; Aufnahmen exemplarisch für die Messzeitpunkte 0 h und nach 24 h Erholungsphase. Nach der NaOCl- und anschließenden Na₂S₂O₃-Applikation ließen sich nur vereinzelt Zellen nachweisen. Zum Messzeitpunkt nach 24 h Erholungsphase ließ sich ein einschichtiger, gleichmäßiger Zellrasen mit Zellklumpen dokumentieren.

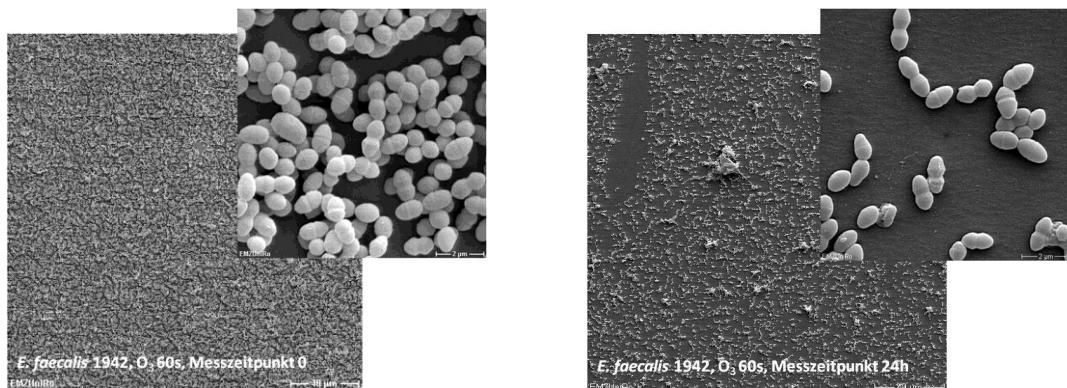


Abbildung 52a+b: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des Versuchsansatzes mit einer O₃-Exposition über 60 s für den *E. faecalis* Stamm 1942. Vergrößerung 500x und 10.000x; Aufnahmen exemplarisch für die Messzeitpunkte 0 h und nach 24 h Erholungsphase. An beiden Messzeitpunkten bildete sich ein gleichmäßiger monolayer aus.

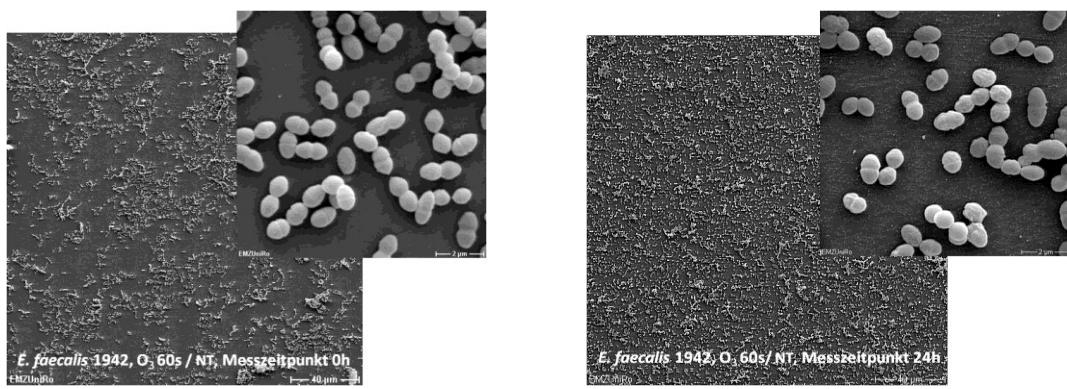


Abbildung 53a+b: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des Versuchsansatzes mit einer O₃ Exposition über 60 s und einer nachfolgenden Na₂S₂O₃-Behandlung für den *E. faecalis* Stamm 1942. Vergrößerung 500x und 10.000x;

ERGEBNISSE

Aufnahmen exemplarisch für die Messzeitpunkte 0 h und nach 24 h Erholungsphase. An beiden Messzeitpunkten bildete sich ein gleichmäßiger *monolayer* aus.

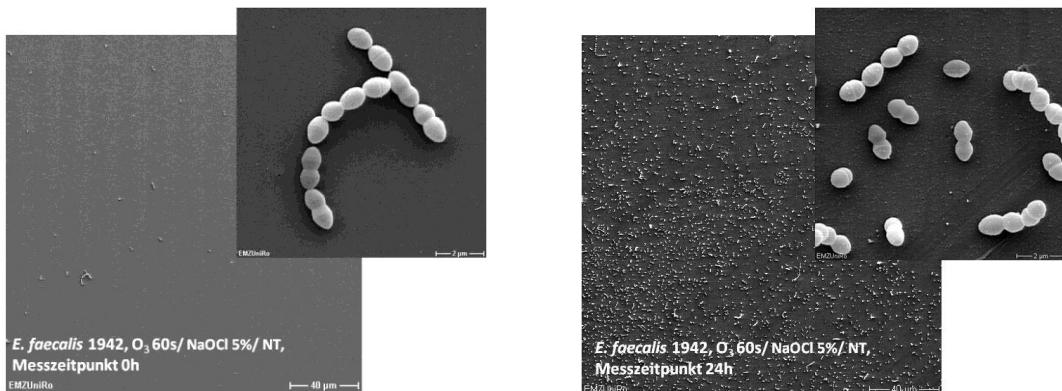


Abbildung 54a+b: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des Versuchsansatzes mit einer O₃-Exposition über 60 s und nachfolgenden NaOCl- und Na₂S₂O₃(NT)-Behandlungen für den *E. faecalis* Stamm 1942. Vergrößerung 500x und 10.000x; Aufnahmen exemplarisch für die Messzeitpunkte 0 h und nach 24 h Erholungsphase. Unmittelbar nach der kompletten Behandlung ließen sich nur vereinzelt Zellen nachweisen. Zum Messzeitpunkt nach 24 h Erholungsphase ließ sich ein einschichtiger, gleichmäßiger Zellrasen mit Zellklumpen dokumentieren.

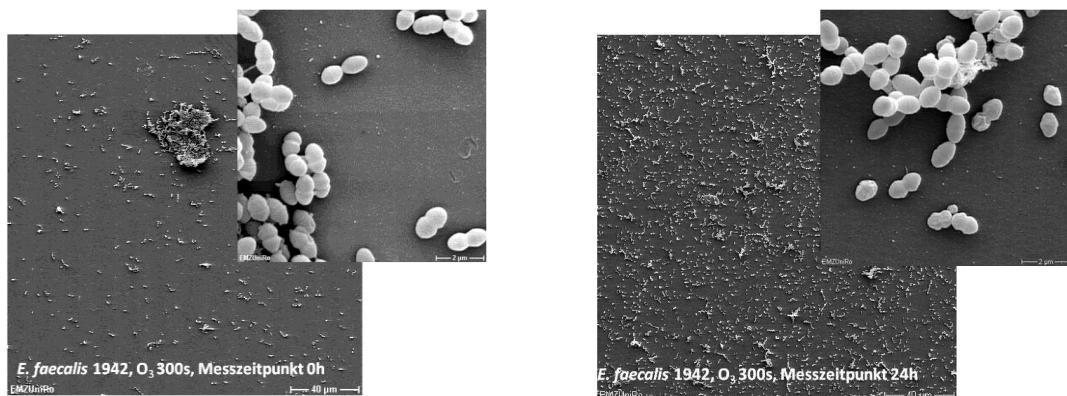


Abbildung 55a+b: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des Versuchsansatzes mit einer O₃-Exposition über 300 s für den *E. faecalis* Stamm 1942. Vergrößerung 500x und 10.000x; Aufnahmen exemplarisch für die Messzeitpunkte 0 h und nach 24 h Erholungsphase. Zum ersten Messzeitpunkt unmittelbar nach der O₃-Applikation ließen sich an der Oberfläche vereinzelt Zellen nachweisen, teilweise zu Zellklumpen aggregiert. Zum zweiten Messzeitpunkt konnte ein eher gleichmäßig verteilter *monolayer* nachgewiesen werden.

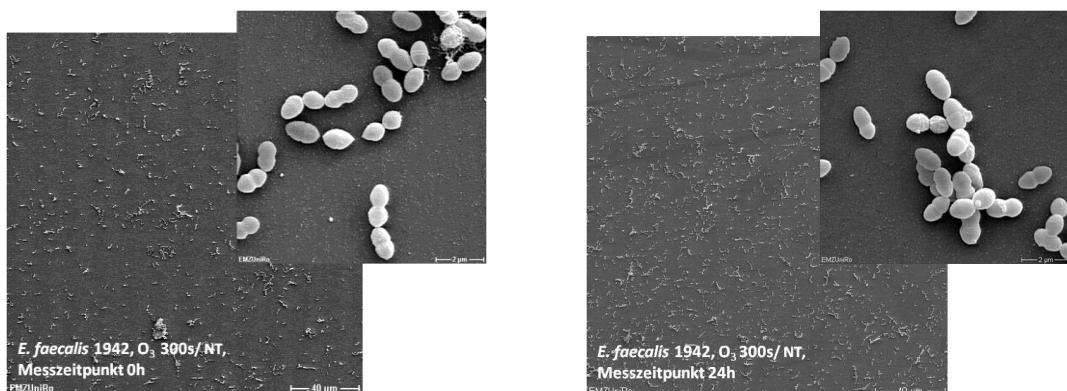


Abbildung 56a+b: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des Versuchsansatzes mit einer O₃-Exposition über 300 s und nachfolgenden Na₂S₂O₃ (NT)-Behandlung für den *E. faecalis* Stamm 1942. Vergrößerung 500x und 10.000x; Aufnahmen exemplarisch für die Messzeitpunkte 0 h und nach 24 h Erholungsphase. An beiden Messzeitpunkten bildete sich ein gleichmäßiger *monolayer* aus.

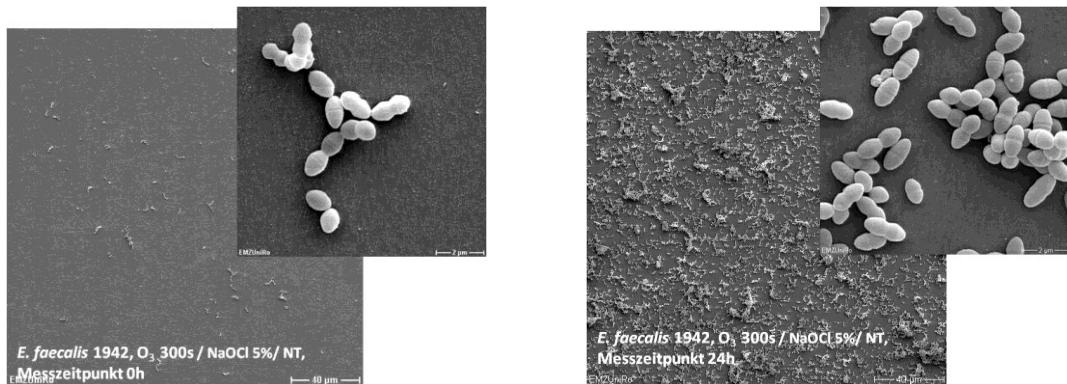


Abbildung 57a+b: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des Versuchsansatzes mit einer O₃-Exposition über 300 s und nachfolgenden 5 % NaOCl- und Na₂S₂O₃ (NT)-Behandlungen für den *E. faecalis* Stamm 1942. Vergrößerung 500x und 10.000x; Aufnahmen exemplarisch für die Messzeitpunkte 0 h und nach 24 h Erholungsphase. Unmittelbar nach der vollständigen Behandlung ließen sich nur vereinzelt Zellen nachweisen. Zum Messzeitpunkt nach 24 h Erholungsphase ließ sich ein einschichtiger, gleichmäßiger Zellrasen mit Zellklumpen dokumentieren.

3.9. *In vitro* Ozon-Applikation unter anaeroben Bedingungen

Neben den Untersuchungen der fakultativ anaeroben Keime *S. mutans* und *E. faecalis* wurden die Versuchsreihen der Ozon-Applikation mit und ohne Na₂S₂O₃ bzw. nur mit NaOCl an 72 h alten Kulturen der obligat anaeroben Spezies *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 und *Parvimonas micra* ATCC 33270 durchgeführt. Die Ozonapplikation musste auf Grund der Unmöglichkeit, das Gerät innerhalb der Anaerobierwerkbank aufzustellen und zu bedienen unter aeroben Bedingungen stattfinden. Es wurde jedoch versucht, die Aufenthaltsdauer der Teststämme außerhalb der für die Inkubation verwendeten anaeroben Atmosphäre (80 % N₂, 10 % CO₂, 10 % H₂) auf ein Minimum zu begrenzen.

3.9.1. Ergebnisse der Ozon-Applikation auf Kulturen von *P. micra* ATCC 33270

Bakterien der Spezies *Parvimonas micra* wachsen obligat anaerob und können nach Gramfärbung als grampositive Kokken wahrgenommen werden. Häufig wird *P. micra* als Pathogen in paro- und endodontaler Läsionen sowie apikalen Abszessen und im Rahmen einer Parodontitis^{26,62,90} identifiziert. Vianna *et al.* studierten 2005 die Zusammensetzung der Mikroflora in nekrotischen Wurzelkanäle und kamen zu dem Schluss, dass die Anwesenheit von *Parvimonas micra* als Pathogen aufgrund selektiver Kultivierungsmethoden unterschätzt wurde.¹¹⁰ Unter Verwendung eines Mikroarrays konnte aus 50 % der nekrotischen Wurzelkanälen *Parvimonas micra* identifiziert werden; unter ausschließlicher Anwendung der Standardkultivierungsmethode dagegen nur in 10 % der Wurzelkanäle.

In der hier durchgeführten Untersuchung der Ozonwirkung mussten die Untersuchungen mit Raumluft (Negativkontrolle) und die Ozon-Applikation unter aeroben Bedingungen durchgeführt werden, wodurch ein Einfluss des Luftsauerstoffs auf die Überlebensfähigkeit von *P. micra* nicht ausgeschlossen werden konnte.

Sowohl in der Negativkontrolle als auch nach einer weiteren 24-stündigen Inkubation der mit Raumluft behandelten Proben, konnten vergleichsweise keine signifikanten Veränderungen der Keimzahlen (Negativkontrolle 0 h 8,09E+06/ ml, Negativkontrolle 24 h: 2,58E+07/ ml) beobachtet werden. Die Positivkontrolle, die alleinig mit NaOCl 5 % behandelt wurde, zeigte unmittelbar nach der Behandlung keine (NaOCl 5 % 0 h 0,00E+00 KBE/ ml) bzw. 24 Stunden nach Behandlung nur wenige (NaOCl 5 % 24 h 1,59E+04 KBE/ ml) Kolonie-bildende Einheiten. Bei der Behandlung der Proben mit NaOCl und anschließender Neutralisierung mit Na₂S₂O₃ konnten dagegen sowohl bei den ausplattierten Proben unmittelbar nach Behandlung als auch 24 Stunden später keine Keime inzählbarer Menge detektiert werden.

Die Applikation von Ozon für 60 Sekunden bewirkte bei den Proben direkt nach Applikation mit einer im Vergleich zur Negativkontrolle ähnlichen LKZ von 5,45E+06 KBE/ ml (Standardfehler 3,45+06/ ml) keine signifikante Veränderung in der Lebensfähigkeit von *Parvimonas micra* (p-Wert 0,770). Ein annähernd gleiches Ergebnis konnte ebenso nach 24 Stunden Inkubation ermittelt werden (4,05E+07 KBE/ ml, p-Wert 0,616). Auch bei den Versuchsansätzen, die über 60 bzw. 300 Sekunden Ozon behandelt wurden, konnte keine signifikante Änderung der Lebendkeimzahl im Vergleich zur Negativkontrolle detektiert werden.

ERGEBNISSE

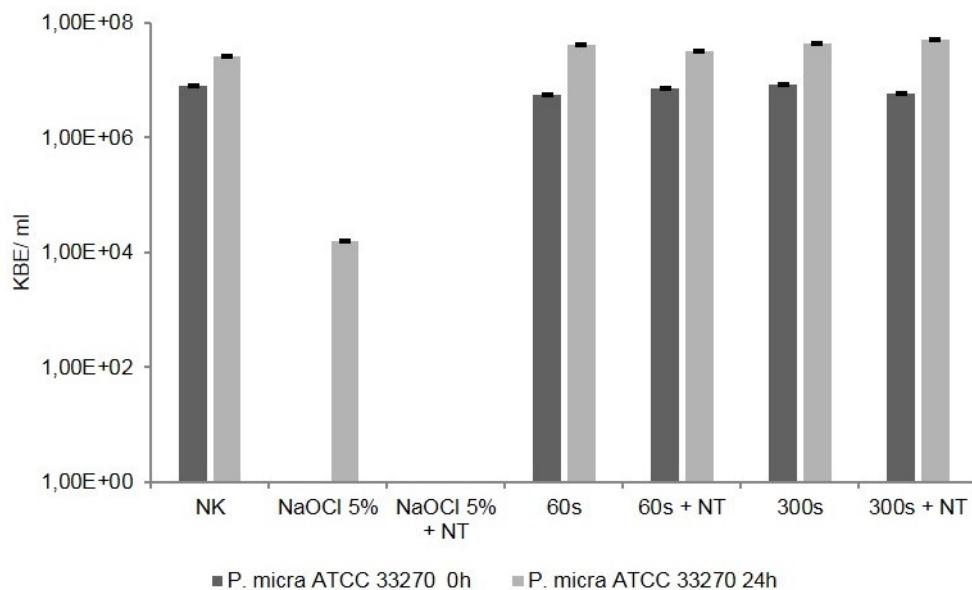


Abbildung 58: Ergebnis der Lebendkeimzählung von *P. micra* ATCC 33270 mit Angaben von LKZ in KBE/ ml und dem Standardfehler direkt nach der Versuchsdurchführung sowie nach 24 h Erholungszeit. NK - Negativkontrolle, NT - Natriumthiosulfat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$).

Tabelle 11a und b: Auswirkungen einer Ozonbehandlung bzw einer Exposition gegenüber Hypochlorid und Natriumthiosulfat von *Parvimonas micra*. Die Angabe der Werte erfolgt für die Zeitpunkte 0 h und 24 h.^a Es erfolgte keine statistische Auswertung bei einer 100 %-igen Radizierung.^b Statistische Signifikanz bei einem 5 %-igen Signifikanzniveau. NK - Negativkontrolle, NT - Natriumthiosulfat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$).

Tabelle 11a	n	Mittelwerte der Keim- zahlen	Standard- abweich- ung	Standar- dfehler	95 % Konfidenzintervall für Mittelwert		p-Wert
					Unter- grenze	Ober- grenze	
a. Bakterium = <i>P. micra</i> ATCC 33270, Messzeitpunkt = 0 h							
Negativkontrolle	3	8,09E+06	9,96E+06	5,75E+06	-1,66E+07	3,28E+07	
NaOCl 5 %	3	3,33E+01	5,77E+01	3,33E+01	-1,10E+02	1,77E+02	0,046 ^b
NaOCl 5 % + $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	3	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	- ^a
60 s	3	5,45E+06	5,97E+06	3,45E+06	-9,37E+06	2,03E+07	0,770
60 s + $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	3	7,18E+06	6,64E+06	3,83E+06	-9,31E+06	2,37E+07	0,827
300 s	3	8,37E+06	1,18E+07	6,81E+06	-2,09E+07	3,77E+07	0,827
300 s + $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	3	5,76E+06	7,15E+06	4,13E+06	-1,20E+07	2,35E+07	0,770

ERGEBNISSE

Tabelle 11b	n	Mittelwerte der Keimzahlen	Standard- abweichu- ng	Standard- fehler	95 % Konfidenzintervall für Mittelwert		p-Wert
					Untergrenze	Obergrenze	
b. Bakterium = <i>P. micra</i> ATCC 33270, Messzeitpunkt = 24 h							
Negativ- kontrolle	3	2,58E+07	1,60E+07	9,24E+06	-1,40E+07	6,55E+07	
NaOCl 5 %	3	1,59E+04	2,74E+04	1,58E+04	-5,22E+04	8,39E+04	0,046 ^b
NaOCl 5 % + Na₂S₂O₃	3	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	- ^a
60 s	3	4,05E+07	2,83E+07	1,63E+07	-2,99E+07	1,11E+08	0,616
60 s + Na₂S₂O₃	3	3,13E+07	1,61E+07	9,28E+06	-8,59E+06	7,13E+07	0,616
300 s	3	4,32E+07	3,31E+07	1,91E+07	-3,90E+07	1,25E+08	0,616
300 s + Na₂S₂O₃	3	5,10E+07	4,91E+07	2,83E+07	-7,09E+07	1,73E+08	0,827

3.9.2. Ergebnisse der Ozon-Applikation auf *F. nucleatum* ATCC 25586

Fusobacterium nucleatum ist ein gramnegatives Bakterium und Bestandteil der oralen Mikroflora. Das obligat anaerobe Bakterium spielt eine Schlüsselrolle in der Bildung komplexer Multispezies-Biofilme.^{55,56} *F. nucleatum* wird als mitverantwortlich für die Auslösung der Parodontitis eingestuft.⁴⁵

Die Behandlung von 72 h alten *F. nucleatum*-Kulturen erfolgte unter den auch für *P. micra* angewandten Bedingungen. Die mit Raumluft behandelten Proben (Negativkontrolle) wiesen ein Wachstum bis zu einer Dichte von 1,75E+07 KBE/ ml auf (Standardfehler 9,56E+06). Nach 24 Stunden Inkubationszeit wurde eine Keimmenge (in KBE/ ml) von 2,79E+07 (Standardfehler 2,48E+07) ermittelt. Bei der Positivkontrolle, die ausschließlich mit NaOCl 5 % behandelt wurde, konnten direkt nach der Untersuchung keine lebenden Keime gezählt werden. Nach 24 Stunden Bebrütung war dann eine LKZ von 5,00E+04 KBE/ ml zu messen (Standardfehler 5,00E+04). In den Proben, die zuerst mit NaOCl 5 % und anschließend mit Natriumthiosulfat behandelt wurden, wurden direkt im Anschluss an die Behandlung keine Kolonie-bildenden Einheiten registriert und nach einer Inkubation von 24 Stunden eine LKZ von 1,05E+05/ ml (Standardfehler 1,05E+05) bestimmt. In den Versuchsansätzen, die über 60 bzw. 300 Sekunden mit Ozon behandelt wurden, konnten sowohl am Tag der Ozonapplikation als auch nach 24 Stunden Inkubation keine signifikanten Veränderungen der Lebendkeimzahlen im Vergleich zur Negativkontrolle registriert werden. Nach der Neutralisierung mit Natriumthiosulfat der mit Ozon behandelten Kulturen konnte ebenso am Tag der Untersuchung sowie nach einer Inkubation von 24 Stunden ebenfalls keine signifikante Änderung der LKZ festgestellt werden.

ERGEBNISSE

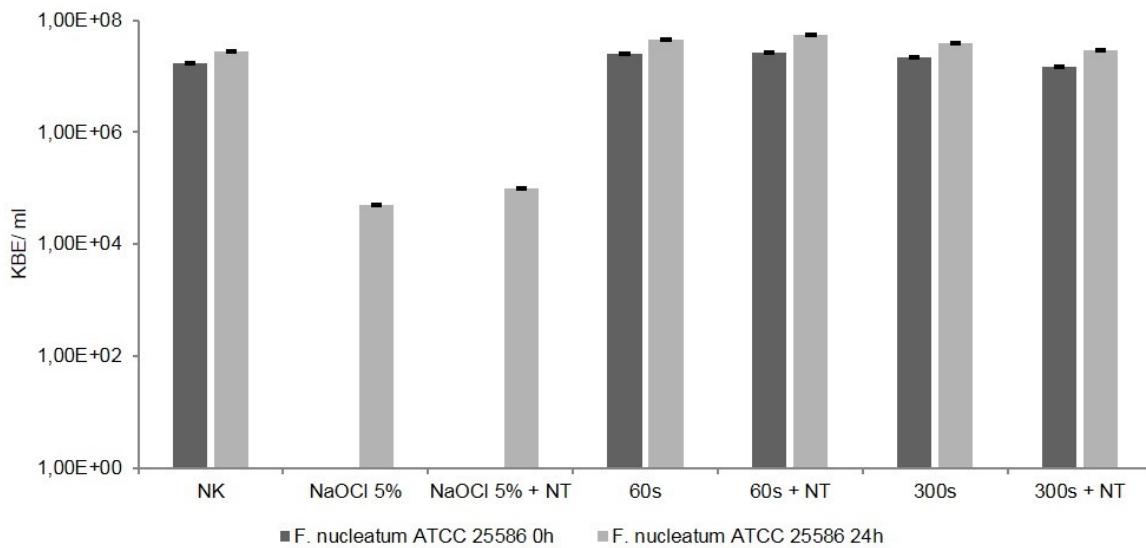


Abbildung 59: Ergebnisse der Behandlung von *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 mit Ozon, Natriumhypochlorit und Natriumthiosulfat. Die Angaben von Messwerten in der LKZ sowie der dabei ableitbaren Standardfehler direkt nach der Versuchsdurchführung sowie nach 24 Stunden Erholungsphase erfolgen in KBE/ ml. NK - Negativkontrolle, NT - Natriumthiosulfat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$).

Tabelle 12a und b: Auswirkungen einer Ozonbehandlung bzw einer Exposition gegenüber Natriumhypochlorit und Natriumthiosulfat von *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586. Die Angabe der Werte erfolgt für die Zeitpunkte 0 h und 24 h.^a Es erfolgte keine statistische Auswertung bei einer 100 %-igen Eradizierung,^b Statistische Signifikanz bei einem 5 %-igen Signifikanzniveau.

Tabelle 12a	n	Mittelwerte der Keim- zahlen	Standard- abweichu- ng	Standard- fehler	95 % Konfidenzintervall für Mittelwert		p-Wert
					Unter- grenze	Ober- grenze	
a. Bakterium = <i>Fusobacterium nucleatum</i> ATCC 25586, Messzeitpunkt = 0 h							
Negativ- kontrolle	3	1,75E+07	1,66E+07	9,56E+06	-2,36E+07	5,86E+07	-
NaOCl 5 %	3	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	- ^a
NaOCl 5 % + $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	3	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	- ^a
O₃ 60 s	3	2,49E+07	2,63E+07	1,52E+07	-4,04E+07	9,02E+07	0,827
O₃ 60 s + $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	3	2,71E+07	2,32E+07	1,34E+07	-3,05E+07	8,46E+07	0,827
O₃ 300 s	3	2,20E+07	1,84E+07	1,06E+07	-2,37E+07	6,76E+07	0,827
O₃ 300 s + $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	3	1,47E+07	1,39E+07	8,02E+06	-1,98E+07	4,93E+07	0,827

Tabelle 12b	n	Mittelwerte der Keimzahlen	Standard- abweich- ung	Standard- fehler	95 % Konfidenzintervall für Mittelwert		p-Wert
					Unter- grenze	Ober- grenze	
b. Bakterium = <i>F. nucleatum</i> ATCC 25586, Messzeitpunkt = 24 h							
Negativ- kontrolle	3	2,79E+07	4,30E+07	2,48E+07	-7,90E+07	1,35E+08	
NaOCl 5 %	3	5,00E+04	8,66E+04	5,00E+04	-1,65E+05	2,65E+05	0,138
NaOCl 5 % + Na₂S₂O₃	3	1,00E+05	1,73E+05	1,00E+05	-3,30E+05	5,30E+05	0,096
O₃ 60 s	3	4,43E+07	7,42E+07	4,28E+07	-1,40E+08	2,29E+08	0,770
O₃ 60 s + Na₂S₂O₃	3	5,60E+07	9,01E+07	5,20E+07	-1,68E+08	2,80E+08	0,770
O₃ 300 s	3	3,97E+07	6,10E+07	3,52E+07	-1,12E+08	1,91E+08	0,827
O₃ 300 s + Na₂S₂O₃	3	2,95E+07	4,48E+07	2,58E+07	-8,17E+07	1,41E+08	0,827

3.10. Ergebnisse der Rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung nach *in vitro* Ozon-Applikation auf *P. micra*-Biofilmstrukturen unter anaeroben Erhältnissen

Exemplarisch für die Versuchsreihe der Anaerobier wurden rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von *Parvimonas micra* nach Behandlung der Biofilm-Strukturen mit Ozon über 60 und 300 Sekunden angefertigt. Die Aufnahmen umfassten wie bei *S. mutans* und *E. faecalis* jeweils den Versuchszeitpunkt direkt nach Durchführung der Versuchsreihe sowie nach 24 Stunden Inkubation. Weitere Aufnahmen befinden sich im Anhang dieser Arbeit.

Die REM-Aufnahmen zeigen, dass *P. micra* unter den gewählten Bedingungen in der Lage war, einen einschichtigen Zellrasen (*monolayer*) zu bilden. Bei der Negativkontrolle konnten regelmäßig geformte *Parvimonas*-Kokken beobachtet werden. Die Behandlung der Bakterien mit Ozon über 60 Sekunden bewirkte eine deutliche Abnahme der adhärenten Zellen auf der Oberfläche bei der Untersuchung der Proben unmittelbar nach der Applikation. Einen Tag nach der Durchführung konnten dagegen ähnlich viele adhärente Zellen auf der Oberfläche detektiert werden wie für die Negativkontrolle zum gleichen Zeitpunkt. Die Applikation von Ozon für 300 Sekunden bewirkte ebenfalls eine Abnahme adhärenter Zellen auf der Oberfläche, wobei 24 Stunden nach Behandlung wiederum ein ähnliches Bild wie für die Negativkontrolle zum gleichen Zeitpunkt detektiert werden konnte.

ERGEBNISSE

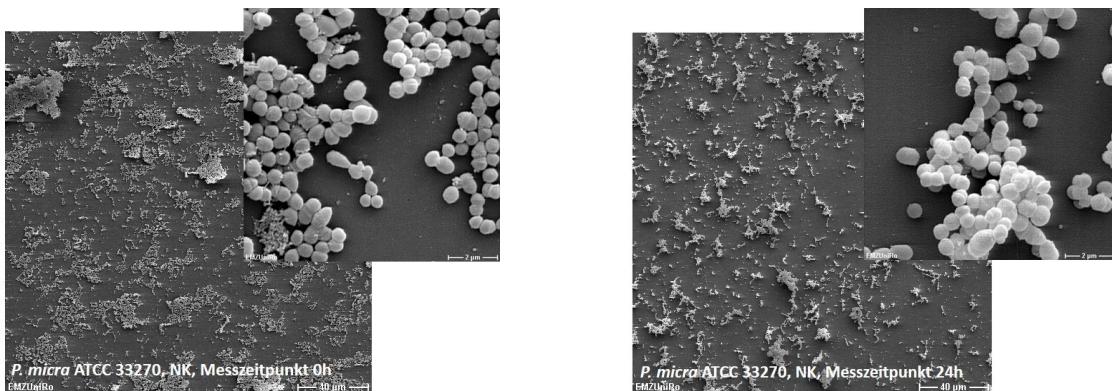


Abbildung 60a+b: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Negativkontrolle (NK) des *Parvimonas micra* Stamms ATCC 33270. Vergrößerung 500x und 10.000x; Aufnahmen exemplarisch für die Messzeitpunkte 0 h und nach 24 h Erholungsphase.

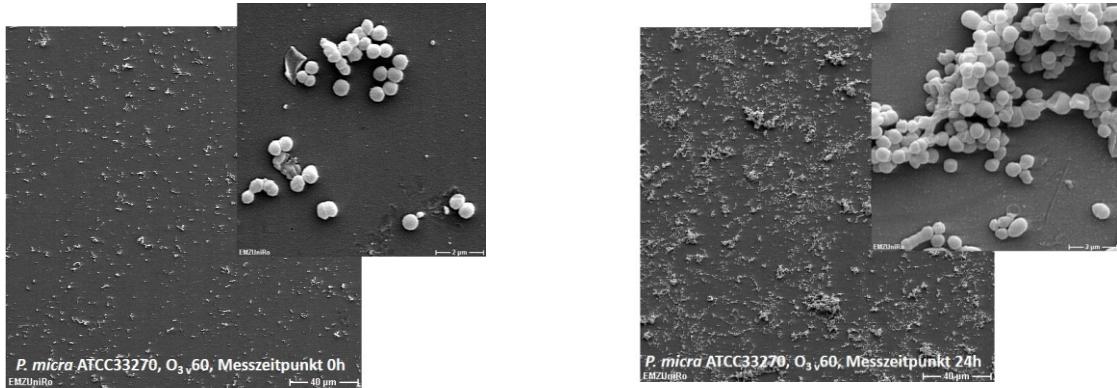


Abbildung 61a+b: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen nach einer O₃-Behandlung von *Parvimonas micra* Stamm ATCC 33270 über 60 s. Vergrößerung 500x und 10.000x; Aufnahmen exemplarisch für Tag 1 (0 h) und Tag 2 (24 h).

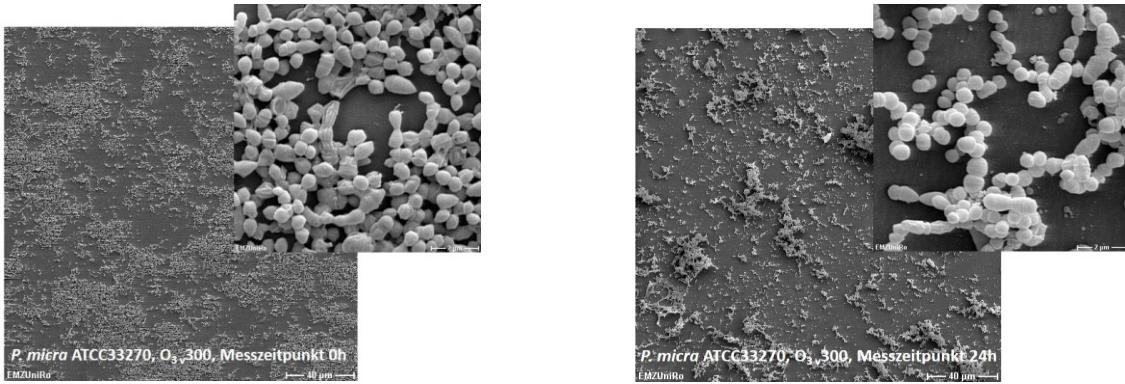


Abbildung 62a+b: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen nach einer O₃-Behandlung von *Parvimonas micra* Stamm ATCC 33270 über 300 s. Vergrößerung 500x und 10.000x; Aufnahmen exemplarisch für Tag 1 (0 h) und Tag 2 (24 h).

3.11. Untersuchung der Wirkung von Ozon auf planktonische Bakterien

Die bisherigen Versuche orientierten sich an der Ozon-Applikation auf Biofilm-Strukturen unter stationären Bedingungen. Um zu überprüfen, inwieweit Ozon einen Einfluss auf „frei schwimmende“ Bakterien hat, wurde Ozon auf planktonische Zellen angewandt. Hierbei sollten die Bakterien behandelt werden, die sich in der exponentiellen Phase befanden und entsprechend „fit“, d. h. im Rahmen ihrer maximalen metabolischen Leistungsphase besonders anpassungsfähig waren. Vor der Versuchsdurchführung wurden die Wachstumskurven der in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme bestimmt (Abb. 63). Als Versuchszeitpunkt wurde das erste Drittel der exponentiellen Phase gewählt. Entsprechend wurde für die Kultur von *S. mutans* DSM 20523 der Versuchszeitpunkt $t = 5$ h und für die *E. faecalis* 1942-Kulturen von $t = 3$ h definiert.

*3.11.1. Ergebnisse der Wirkung von Ozon auf planktonische Zellen des *S. mutans* Stamms DSM 20523*

Die Untersuchung zur Wirkung von Ozon auf planktonische Zellen wurde für *S. mutans* Stamm DSM 20523 nach einer Wachstumszeit von $t = 5$ h und einer OD₆₀₀ von 0,7 durchgeführt. Von der Kultur, die in 0,1 % Mucin/ BHI-Nährmedium, angezogen wurde, wurden 1 ml in ein Näpfchen einer 24-Kavitäten Zellkultur-Platte überführt und Ozon über 60 bzw. 300 Sekunden ausgesetzt. Eine unbehandelte Probe diente wiederum als Negativkontrolle (Keimzahl 4,42E+08 KBE/ ml, Standardfehler 5,46E+07). Sowohl die Kulturen, die über 60 Sekunden (Keimzahl 4,98E+08 KBE/ ml, Standardfehler 4,12E+07 KBE/ ml) als auch die über 300 Sekunden mit Ozon (Keimzahl 6,30E+08 KBE/ ml, Standardfehler 2,21E+08 KBE/ ml) behandelt wurden, zeigten keinen signifikanten Unterschied in ihrer Lebendkeimzahl im Vergleich zur Negativkontrolle (60 s-Versuch: p-Wert 0,513; 300 Sekunden-Versuch: p-Wert 0,564).

*3.11.2. Ergebnisse der Wirkung von Ozon auf planktonische Zellen des *E. faecalis* Stamms 1942*

Der Versuchszeitpunkt für die Behandlung von planktonischen Zellen von *E. faecalis* Stamm 1942 wurde entsprechend der Wachstumskurve nach einer Inkubationszeit von $t = 3$ h und einer OD₆₀₀ = 1,3 festgelegt. Analog zum Versuch mit dem *S. mutans*-Stamm erfolgte die Ozon-Behandlung an 1 ml einer *E. faecalis*-Kultur in 0,1 % Mucin/ BHI. Die Kulturen, die über 60 Sekunden (Keimzahl: 2,47E+08 KBE/ ml, Standardfehler 2,43E+0 KBE/ ml) bzw. 300 Sekunden (Keimzahl: 6,30E+08 KBE/ ml, Standardfehler 2,21E+08 KBE/ ml) mit Ozon behandelt wurden, zeigten im Vergleich zur Negativkontrolle (Keimzahl: 2,61E+08 KBE/ ml, Standardfehler 1,99E+07 KBE/ ml) keine signifikanten Unterschiede in ihrer Lebendkeimzahl

ERGEBNISSE

(60 s-Versuch: p-Wert 0,564; 300 s-Versuch: p-Wert 0,883). Wie bereits für *S. mutans* DSM 20523 unter 3.10.1. beschrieben, war wiederum kein Effekt des Ozons auf die Lebensfähigkeit der Bakterienzellen nachweisbar.

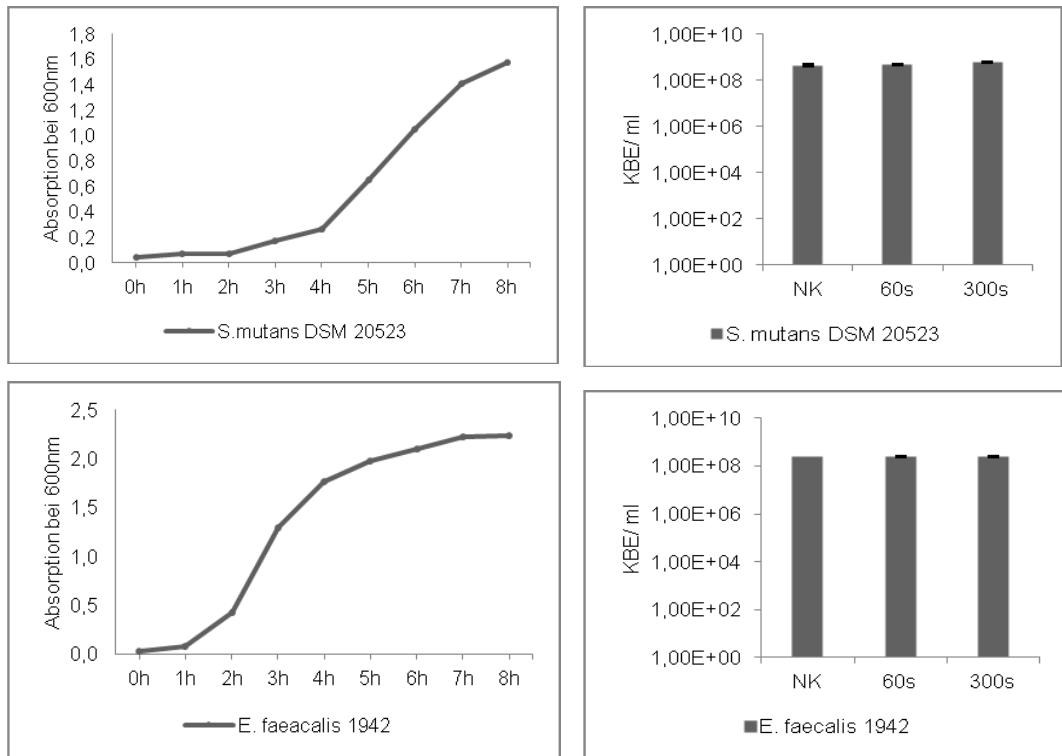


Abbildung 63-66: Wachstumskurve und LKZ/ml der Bakterienstämme *S. mutans* DSM 20523 und *E. faecalis* 1942. Der Versuchszeitpunkt wurde auf das vordere Drittel der exponentiellen Phase der beiden Stämme festgelegt, mit $t_{\text{Mutans} 20523} = 5 \text{ h}$ und $t_{\text{Faecalis} 1942} = 3 \text{ h}$. Als Applikationsdauer für Ozon wurden für beide Spezies 60 Sekunden und 300 Sekunden gewählt. NK - Negativkontrolle.

Tabelle 13: Ergebnisse der Ozoneinwirkung auf die planktonisch wachsenden Bakterienstämme *S. mutans* DSM 20523 und *E. faecalis* 1942 mit der Angabe von Lebendkeimzahlen sowie der zugehörigen Standardfehler und einer Signifikanzberechnung.

	n	Mittelwerte der Keimzahlen	Standardabweichung	Standardfehler	95 % Konfidenzintervall für Mittelwert		p-Wert
					Untergrenze	Obergrenze	
a. Bakterium = <i>S. mutans</i> DSM 20523							
Negativkontrolle	3	4,42E+08	9,45E+07	5,46E+07	2,07E+08	6,76E+08	
O₃ 60 s	3	4,98E+08	7,14E+07	4,12E+07	3,21E+08	6,75E+08	0,513
O₃ 300 s	2	6,30E+08	3,12E+08	2,21E+08	-2,17E+09	3,43E+09	0,564
b. Bakterium = <i>E. faecalis</i> 1942							
Negativkontrolle	4	2,61E+08	3,98E+07	1,99E+07	1,97E+08	3,24E+08	
O₃ 60 s	4	2,47E+08	4,87E+07	2,43E+07	1,70E+08	3,25E+08	0,564
O₃ 300 s	4	2,47E+08	6,38E+07	3,19E+07	1,45E+08	3,48E+08	0,883

4. Diskussion

Karies, auch Zahnhäule genannt, ist eine Krankheit, welche die Menschheit seit langem begleitet und deren Behandlung einen grundlegenden Einfluss auf die Erhaltung der Zahngesundheit hat. Die mechanische Kariestherapie gemäß dem Motto „drill and fill“ ist derzeit die effektivste Methode der Kariesbehandlung.⁹⁸ Mit der Ozontherapie soll eine schmerz- und stressfreie Alternative zumindest für frühe Kariesläsionen angeboten werden. Etablieren konnte sich die Ozontherapie in der Stomatologie bisher jedoch nicht, da u. a. die bisherige Studienlage uneinheitliche Ergebnisse lieferte. Allerdings könnte auf der Basis eines reproduzierbaren Nachweises einer tatsächlich bakteriziden Wirkung des Ozons eine schmerzlose, effektive und nachhaltig wirkende Behandlungsmethode entwickelt werden. Die Firma KaVo bietet mit dem HealOzone-Gerät einen Ozongenerator an, der eine fixe Dosis von 2100 ppm Ozon pro Volumeneinheit produziert. In der vorliegenden Arbeit wurde unter Nutzung des HealOzone Ozongenerators die Wirksamkeit des Ozons insbesondere auf Biofilmstrukturen von oralpathogenen Bakterienspezies getestet. Hierzu wurden u. a. verschiedene *Streptococcus mutans*-Stämme und andere oralpathogene Bakterien, die laut Literatur mit der Kariogenese assoziiert sind, verwendet. Ziel war dabei die Überprüfung einer bakteriziden Wirkung des Ozons und damit die Eröffnung der Option, Ozon zur Behandlung der Karies bzw. über den Weg einer Keimreduktion zur Modifikation des Kariesverlaufes einzusetzen zu können.^{43,98,107}

Die bisherigen erfolgreichen Behandlungsmethoden der Karies basieren grundlegend auf der mechanischen Eradikation der Bakterienmassen und des nekrotischen Materials. Allein mit dieser Methodik ist die Karies jedoch nicht zu heilen, sodass eine kombinierte Herangehensweise mit chemischen Therapeutika empfohlen wird. Flüssige Desinfektionsmittel wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Chlorhexidin (CHX) und Natriumhypochlorit (NaOCl) zeigen in der ausreichenden Dosierung^{16,21,31,41,91} und Applikationszeit⁸⁷ eine gute Wirksamkeit. Andere Optionen wie z. B. die alleinige Behandlung mit NaOCl beinhalten den Nachteil der Demineralisierung und würden bei mehrmaliger Behandlung bzw. bei hoher Dosis zur Destruktion des Zahns führen.^{21,82,97}

4.1. Untersuchungen zur Biofilmbildung in Gegenwart von Mucin

In der vorliegenden Arbeit konnte eine Biofilmbildung bzw. eine Monolayer-Bildung der oralpathogenen Stämme *Streptococcus mutans* spp. und *Enterococcus faecalis* spp. mit dem Wachstumsmedium BHI, das u. a. Glukose enthält, nachgewiesen werden. Um Bestandteile der oralen Umgebung zu simulieren, wurde dem BHI-Medium das Protein Mucin hinzugefügt. Mucine sind strukturgebende Bestandteile des körpereigenen Mucus (Schleim), der sich auf

den epithelialen Oberflächen der Schleimhäute befindet und ebenso Bestandteil der Saliva ist. Sie bilden einen wichtigen Bestandteil des körpereigenen Abwehrsystems und gewähren ein gesundes mikrobiologisches Gleichgewicht.³⁵ Bei einer 0,1 %-igen Mucinkonzentration konnte ein mehrschichtiges Biofilmwachstum von *Streptococcus mutans* und ein einschichtiges (monolayer) Wachstum von *Enterococcus faecalis* mittels Safraninassay und elektronenmikroskopischer Untersuchung belegt werden. Mit dieser Methode ist allerdings keine Aussage über die Vitalität und Vermehrungsfähigkeit der Bakterienzellen im Biofilm möglich. Der Grund für die bei höheren Mucin-Konzentrationen beobachtete Abnahme der Biofilmmasse kann auf der Basis dieser Untersuchungsmethoden also nicht mit hinreichender Genauigkeit geliefert werden. Laut der Fachliteratur ist von einer verminderten Oberflächenadhärenz auszugehen. Frenkel und Ribbeck wiesen 2014 nach, dass mit Saliva assoziiertes Mucin (MUC5B) zu einer verminderten Oberflächenhaftung von *Streptococcus mutans* führt. *S. mutans* liegt demnach aufgrund des MUC5B vermehrt in seiner planktonischen Form vor.³⁵ Solch ein Effekt konnte bereits durch Haley *et al.* gezeigt werden, die eine Inhibierung der Biofilmbildung von *Pseudomonas aeruginosa* durch Mucin nachgewiesen haben.³⁸ Kavanaugh *et al.* gelang 2014 der Nachweis, dass Mucin zu einer Unterdrückung der Virulenz von *Candida albicans* führt, indem die Adhärenz an Plastikoberflächen und an humanen Zellen reduziert wird.⁵³

4.2. Verwendung von Natriumhypochlorit

NaOCl ist das in der Zahnheilkunde am meisten verwendete und besten untersuchte Antiseptikum für die Anwendung am Patienten.^{31,37} NaOCl wirkt ätzend auf metallische Oberflächen sowie basisch und hyperton im Menschen,^{82,101,114} und hat zudem einen unangenehmen Geschmack.²¹ In der Zahnheilkunde wird die Verwendung von NaOCl – ohne Aussage zur Applikationsdauer – als 0,5 % bis 5,25 %-ige Lösung empfohlen. In *in vitro* Versuchen konnte allerdings nachgewiesen werden, dass die Wirkung des NaOCl nicht nur dosis- sondern auch zeitabhängig ist.⁴¹ In einer 2012 veröffentlichten Literaturreview von Marion *et al.* rangieren die Applikationszeiten zwischen 10 Sekunden und 335 Minuten.⁶⁷

In der vorliegenden Arbeit bewirkte die Anwendung einer 5 %-NaOCl-Lösung eine fast hundertprozentige Abtötung bzw. Wachstumsunterdrückung der getesteten Bakterienspezies. Letzteres war insbesondere für *E. faecalis* zu beobachten, da die Bakterien unmittelbar nach einer 60 sekündigen NaOCl-Applikation nicht replikationsfähig waren, nach einer 24-stündigen Erholphase dagegen schon. Diese scheinbare Diskrepanz erklärt sich dadurch, dass nicht nur die Inkubation in einem Antiseptikum sondern auch der schnelle Wechsel der zur Inkubation genutzten Medien für die Bakterien Stress darstellt, sodass Kombinationen aus

beiden Behandlungen besonders ausgeprägte Effekte auf die Bakterien haben. Wenn die Inkubation von *E. faecalis* im Antiseptikum über 15 Minuten durchgeführt wurde, war zu beiden Untersuchungszeitpunkten kein Wachstum registrierbar, was belegt, dass die Inkubationszeit relevant für die Wirkung ist und ein 15-minütiger Kontakt wahrscheinlich für alle Zellen tödlich wirkt. Da *S. mutans* auch nach einer Applikationszeit von 60 Sekunden und einer Erholungsphase von 24 Stunden nicht mehr kultivierbar war, sind diese Zellen offenbar empfindlicher gegenüber dem Hypochlorid. Damit kann in entsprechenden Versuchen *E. faecalis* als relevanter Indikatorkeim genutzt werden – chemische Agenzien, die gegen diese Spezies wirksam sind, wirken allemal auch auf *S. mutans*.

4.3. Verwendung und Wirkung des Natriumthiosulfats

Natriumthiosulfat ist ein Reduktionsmittel und wird in der Medizin als Antidot einer Cyanidvergiftung verwendet. Auch findet es seine Anwendung zur Neutralisierung von Chlor im Wasser.²⁷

In mehreren Studien wurde es in verschiedenen Konzentrationen zur Neutralisierung der oxidativen Wirkung von NaOCl verwendet.^{41,81,87} Eine Empfehlung der zu verwendenden bzw. am besten geeigneten Konzentration existiert jedoch nicht.

In Anlehnung an eine erfolgreiche Blockierung der Silberwirkung mit Natriumthiosulfat von Tilton *et al.* wurde eine Dosierung von 1.46 g/ 1000 ml PBS gewählt.¹⁰⁸ In den durchgeführten Ergebnissen konnte in der gewählten Dosierung keine Blockierung bzw. Neutralisierung mit Natriumhypochlorit erreicht werden. In den Vorversuchen wurde die zytotoxische Wirkung des Thiosulfates selbst ausgeschlossen. Es ist jedoch möglich, dass die gewählte Konzentration und die Expositionszeit zu niedrig gewählt wurden und nur ein geringer neutralisierender Effekt erzielt wurde. Hedge *et al.* schlussfolgerten 2012, dass zur Neutralisierung von 1 ml einer 5 %-igen Natriumhypochlorit-Lösung ca. 3,5 ml einer 5 %-igen Natriumthiosulfat-Lösung benötigt wird.⁴² Zum Zeitpunkt der Veröffentlichung waren die Versuche jedoch schon durchgeführt, sodass auf diese Erkenntnisse nicht zurückgegriffen werden konnte.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expositionszeit für NaOCl und Natriumthiosulfat in den Vorversuchen auf jeweils 15 Minuten festgelegt, um den bakteriziden Effekt des NaOCl zu untersuchen. In den weiteren Versuchen wurde die Applikationsdauer auf jeweils 60 Sekunden festgelegt, um den Versuchsablauf besser handhaben zu können. Es ist zu hinterfragen, ob a) diese Expositionszeit hätte prolongiert werden müssen und ob b) mit einer höheren Konzentration des Natriumthiosulfates hätte behandelt werden müssen.

4.4. Die Effektivität der Applikation gasförmigen Ozons auf oralpathogene Bakterienspezies

Das oxidative Potenzial des Ozons verursacht eine Destruktion der Zellmembran von Bakterien und Pilzen. Glykoproteine, Glykopeptide und Aminosäuren werden in ihrer Struktur verändert und es resultiert eine erhöhte Zellpermeabilität mit einer Verschiebung des Membranpotenzials und in der Folge ein Funktionsverlust der Zelle.^{5,14}

In der vorliegenden *in vitro* Studie konnte unter Verwendung des HealOzone Ozongenerators 2130C keine signifikante Keimzahlreduktion der oralpathogenen Bakterienspezies *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*, *Parvimonas micra* und *Fusobacterium nucleatum* mit der alleinigen Ozonapplikation bei Applikationszeiten von 60 s, 120 s, 180 s und 300 s erreicht werden.

Als eine mögliche Ursache der mangelnden Effektivität könnte die Funktionstüchtigkeit des Ozongenerators in Betracht gezogen werden. Wenngleich die Firma KaVo mit Lieferung des HealOzone Ozongenerators 2130C die Funktionsfähigkeit des Gerätes und vor allem die adäquate Produktion der angegebenen Ozonproduktion von 2100 ppm pro vom Gerät abgegebener Volumeneinheit garantiert.⁵⁹ Vor der Durchführung der Versuchsreihen konnte jedoch ein qualitativer Nachweis der Ozonproduktion erbracht werden (s. Methodenteil, 2.15.). Mit Hilfe einer Farbumschlagsreaktion wurde dabei das Vorhandensein von Ozon nachgewiesen und damit die prinzipielle Funktionstüchtigkeit des Generators gezeigt.

Der Kavo HealOzone Ozongenerator 2130C generiert den für die Ozonproduktion notwendigen Sauerstoff aus der Umgebungsluft. Es ist zu hinterfragen ob die Menge von 2100 ppm pro vom Gerät abgegebener Volumeneinheit generell ausreichend ist, um einen bakteriziden Effekt zu erreichen. Für eine Wirkung kritisch könnte auch sein, dass zwischen Ozonproduktion aus der Umgebungsluft und dem Ort der Ozonapplikation eine Wegstrecke von ca. 1,85 m Schlauchlänge liegt. Ein weiterer Störfaktor könnte der Modus der Ozonapplikation sein. Die Testreihen wurden mittels einer 24-Kavitäten-Mikrotiterplatte durchgeführt (s. 3.5.). Es ist möglich, dass die Abdichtung zwischen Gummipropfen, Mikrotiterplatte und Handstück unzureichend war und das Ozon vor Erreichen der Biofilmstrukturen entwich.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit reihen sich in die zwiespältigen Aussagen vorangegangener Studien zur Wirksamkeit des Ozons. Die Anzahl der *in vivo*^{42,50,39} und *in vitro*^{4,9,18,29,33,51,72,105} Studien zur Anwendung der Ozontherapie in der Zahnheilkunde ist überschaubar. Die Vergleichbarkeit der bisher veröffentlichten *in vitro* Studien ist aufgrund der

DISKUSSION

unterschiedlichen Methodik (u. a. Kultivierungsmethoden, verwendete Anzuchtsmedien, Modus der Ozonapplikation) eingeschränkt^{29,33,48,78,105}

Polydorou *et al.* berichten 2011 von einer signifikanten Keimzahlreduktion von *S. mutans* DSM 20523 an frisch exkavierten und gereinigten Zähnen nach einer einmaligen Ozonapplikation von 60 s unter Verwendung des KaVo HealOzone Ozongenerators 2130C. In dieser Studie wurde ein kleines Areal des exkavierten Zahnes mit einer Lösung des zu testenden Bakterienstamms kontaminiert und mit einem PYB-Medium ohne Zusatz von Mucin inkubiert. Nach der Behandlung erfolgte die Versiegelung der Kavität mit einem Kompomer. Die Keimzahlen wurden nach einer Inkubationszeit von 4 und 8 Wochen erhoben.⁸⁵ In der unbehandelten Kontrolle der Negativkontrolle und der Ozonkontrolle wurden zum Zeitpunkt vor der Ozonapplikation ähnliche Lebendkeimzahlen erhoben. Nach 4 Wochen und nach 8 Wochen Inkubation erfolgte die Erhebung der Lebendkeimzahlen in den unbehandelten und in den mit Ozon-behandelten Proben. Eine Erhebung der Lebendkeimzahlen direkt nach der Ozonexposition wurde nicht ermittelt und somit war keine Aussage über die unmittelbare Wirkung des Ozons verfügbar. Nach Aussagen der Untersucher konnte in dieser Studie eine signifikante Keimzahlreduktion in den Proben, welche mit 60 s Ozon behandelt wurden, registriert werden. Es zeigte sich jedoch auch in den unbehandelten Proben eine Abnahme der Lebendkeimzahl von 1×10^{11} KBE/ ml nach 4 und 8 Wochen im Vergleich zu den mit Ozon behandelten Proben, die nach den gewählten Inkubationszeiten eine Abnahme der Lebendkeimzahl von 1×10^{12} KBE/ ml zeigten. In den mit *Lactobacillus casei* DSM 20020 behandelten Zähne, die im gleichen Versuchsaufbau mit 60 s Ozon behandelt wurde, konnte die Keimzahl nicht reduziert werden. Im Gegenteil: Nach der Behandlung mit Ozon und einer Inkubation von 4 bzw. 8 Wochen wurden mehr Keime im Vergleich zur Negativkontrolle nachgewiesen. Auch wenn in diesem Versuchsaufbau im Vergleich zur vorliegenden Arbeit die Ozonapplikation mit einem deutlich geringeren Abstand zur Kavität erfolgte, konnte mit dem KaVo HealOzone 2130C kein erfolgreicher Nachweis einer Wirksamkeit des Ozongenerators der Firma KaVo erbracht werden.

Demgegenüber zu stellen sind die Studienergebnisse von Astorga, der 2013 den antibakteriellen Effekt gasförmigen Ozons mit unterschiedlichen Ozongeneratoren untersuchte.⁴ Der CurOzone X4®, ein Nachfolgemodell des KaVo HealOzone Ozongenerators 2130C, konnte keine Keimzahlreduktion der in der dortigen Studie verwendeten *Streptococcus mutans*-Stämme erreichen. Astorga verglich die Effektivität unterschiedlicher Ozongeneratoren (CurOzone X4®, Kavo; OL80A und OL80W, Yanco Industries) anhand von *S. mutans*-Kulturen mit einem Zellvolumen von 10^{16} KBE/ ml. Mit einer fixen

DISKUSSION

Ozonkonzentration von 2100 ppm +/- 10 % (32 g/ m³) und den Zeitabständen der Ozonapplikation von 15 Sekunden bis 4 Minuten konnte keine Keimzahlreduktion mit dem CurOzone X4® erzielt werden. Der CurOzone X4® unterscheidet sich zu seinem Vorgängermodell, dem HealOzone Ozongenerator 2130C, in der Produktion einer höheren Ozonkonzentration unter Verwendung von reinem Sauerstoff.⁴⁰ Die untersuchten Ozongeneratoren OL80A und OL80W (Yanco Industries) konnten mit unterschiedlicher Ozonkonzentrationen (2, 20 und 200 ppm) und unterschiedlichen Zeitabständen der Applikation von 10 Sekunden bis 240 Sekunden eine signifikante Keimzahlreduktion erreichen. Astorgas Ergebnissen zufolge ist der Erfolg einer Eradikation abhängig vom benutzten Ozongerät.⁴

Die alleinige Anwendung gasförmigen Ozons konnte auch in einer 2014 von Noites *et al.* durchgeföhrten Studie keine zufriedenstellende Keimzahlreduktion in einem mit *E. faecalis* und *C. albicans*-infizierten Zahnmodell erzielen. Die Kombination von Chlorhexidin (CHX) und Ozon ließ jedoch eine signifikante Reduktion der Keimzahl erkennen. Noites *et al.* empfehlen daher die Anwendung von Ozon in Kombination mit CHX.⁷⁸

Fagrell *et al.* zeigten in ihrer Studie 2008, dass ein bakterizider Effekt bei einer gasförmigen Ozonapplikation auf Kulturen von *Streptococcus mutans* und *Lactobacillus spp.* nachzuweisen und dieser dosisabhängig ist.³³ Die jeweilige Ozonapplikation erfolgte hier jedoch direkt auf die Kulturen, während in der aktuellen Studie das Ozon nicht direkt, sondern mit einem räumlichen Abstand, auf die am Boden des Wells liegenden Kulturen appliziert wurde, was ggf. die Wirkung des Ozons reduziert bzw. aufhebt.

Die meisten Studien fußten auf der Untersuchung der Ozonwirkung von Mono-Spezies-Biofilmen oder planktonischen Kulturen ohne Anwesenheit anderer eventuell die Ozonwirkung diskriminierender Substanzen wie z. B. Saliva. Johansson *et al.* applizierten gasförmiges Ozon unter Verwendung des HealOzone Ozongenerators 2130C auf Kulturen von *Actinomyces naeslundi*, *Lactobacillus casei* und *Streptococcus mutans* in Anwesenheit eines Salzpuffers oder humaner Saliva, die von einer Testperson gesammelt wurde. Das applizierte Ozon erwies sich ohne die Anwesenheit der Saliva nach einer Applikation von 10, 30 und 60 Sekunden als effektiv. Nach einer Ozonapplikation von 60 Sekunden wurde eine 100 %-ige Eradikation registriert. Wurde jedoch Saliva der Kultur hinzugesetzt, konnte nach der Ozonapplikation nur eine geringgradige Keimzahlreduktion beobachtet werden.⁵¹ Hier wie in der Studie von Johansson *et al* machte sich die protektive Wirkung der Mucine als wesentlicher Bestandteil der Saliva bemerkbar.

In der vorliegenden Arbeit mit dem HealOzone Ozongenerator wurde der Effekt von in Lösung gebrachtem Ozon nicht geprüft.^{2,17,48,74,94} Huth *et al.* konnten 2011 nicht nur einen antibakteriellen Effekt von gasförmigem, sondern auch von in Wasser gelöstem Ozon auf Periodontitis-assoziierte Bakterienspezies (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* und *Parvimonas micra*) in planktonischen Kulturen sowie in Biofilmkulturen nachweisen. Die Kulturen wurden in einer dafür angefertigten Glaskammer, die mit einem Ozongenerator (Ozonosan photonic; Dr. Hänsler, Iffezheim, Deutschland) verbunden war, mit Ozonkonzentrationen von 1 g/ m³ bis 53 g/ m³ behandelt. Die Effektivität war abhängig von der jeweiligen Spezies, dem verwendeten Agens (Ozon oder CHX) und der Konzentration. Dennoch war das Desinfektionsmittel CHX, welches in dieser Studie in einer Vergleichsgruppe getestet wurde, dem Ozon deutlich überlegen.⁴⁸ Estrela *et al.* 2007 konnten unter Verwendung von in Wasser gelöstem Ozon keine zufriedenstellende Reduktion der Keimzahl in *Enterococcus faecalis*-Biofilmen auf frisch exkavierten humanen Zähnen nachweisen.³² Ebenso konnten Hems *et al.* 2005 keinen bakteriziden Effekt bei einer Applikation gasförmigen Ozons und bei in Lösung gebrachtem Ozon an Biofilmen von *Enterococcus faecalis* erzielen.⁴⁴ Als Kontrollgruppe dienten in der von Hems *et al.* durchgeführten Studie Biofilme, die mit NaOCl 2,5 % behandelt wurden. Im Vergleich zu der mit Ozon behandelten Gruppe konnte so eine signifikante Keimzahlreduktion erreicht werden. Vergleicht man die Ergebnisse der aktuellen Studie mit denen von Hems *et al.* bzw. Huth *et al.*, so waren die verwendeten Antiseptika CHX und NaOCl dem Ozon in ihrer bakteriziden Wirkung deutlich überlegen.

Die Ergebnisse in den bisher veröffentlichten *in vivo* Studien sind ähnlich widersprüchlich. Huth *et al.* veröffentlichten 2005 eine kontrollierte, randomisierte klinische Studie mit 41 Patienten mit unterschiedlichem Kariesrisiko. Nach 3 Monaten konnte in der gesamten Kohorte, aber insbesondere in der Gruppe mit einem erhöhten Kariesrisiko, durch die Ozonbehandlung eine Reduktion der Karies festgestellt werden, wenn gleich keine statistische Signifikanz erreicht wurde.⁴⁷ So waren die Nachuntersuchungszeitpunkte in dieser Studie zu kurz gesetzt und die eingeschlossene Patientenpopulation sowohl zu gering als auch zu heterogen im Kariesrisiko gewählt.

Andere Autoren konnten ebenfalls keine signifikante Wirkung des gasförmigen Ozons nachweisen. So untersuchten Hauser-Gerspach *et al.* den Effekt einer einmaligen Ozonbehandlung mit 30 Sekunden bei einer Okklusalenkarie vor und nach Ozonapplikation, konnten aber keinen signifikanten Effekt feststellen.³⁹ 2004 schlussfolgerten Rickard *et al.* in einem von der Cochrane Library initiierten Review, dass die *in vivo* Ozon-Anwendung in der

Zahnheilkunde nicht empfohlen werden kann, da kein signifikanter Nachweis einer Therapieeffektivität gegen Karies existiert.⁸⁹

4.5. Einfluss des von den Teststämmen gebildeten Biofilms

Die Fähigkeit der Biofilmbildung bietet für die untersuchten Bakterienspezies einen strategischen Vorteil gegenüber schädigenden Umwelteinflüssen wie Austrocknung, pH-Wert-Schwankungen, Toxine und Antibiotika.^{23,36} Die in dieser Studie ermittelten Resultate können u. a. auf die Fähigkeit der Biofilm-assoziierten Bakterien zur Bildung großer Mengen an extrazellulären Polysacchariden in einer extrazellulären polymeren Schicht (EPS) zurückzuführen sein. Die Moleküle der EPS sind multipel und zudem je nach Teilschicht des Biofilms unterschiedlich geladen (Polyelektrolyte). Sie bilden somit einen Filter gegenüber jeglichen von außen wirkenden und geladenen Substanzen, die entweder abgestoßen oder neutralisierend gebunden werden. So sind Antibiotika wie z. B. Aminoglykoside und Polypeptide positiv geladen und können von einer negativ geladenen EPS „abgefangen“ werden.^{52,104} Demgegenüber werden die o. g. Antibiotika von einer positiv geladenen EPS abgestoßen.^{10,34} Oxidantien wie Ozon und NaOCl sind negativ geladene Partikel, die einem ähnlichen Effekt unterliegen. Deswegen zweifelten Müller *et al.* anhand ihrer Ergebnisse die Wirksamkeit gasförmigen Ozons zur Eliminierung reifer Biofilme an. Drei Tage alte 6-Spezies-Biofilme zeigten nach einer Ozonapplikation von 60 s keine Keimzahlreduktion. Die Autoren mutmaßten, dass reife, EPS-eingebettete Biofilme resistent gegenüber einer Ozonbehandlung sind.⁷²

Der Annahme, dass die Wirksamkeit des Ozons ausschließlich durch die EPS der Biofilme vermindert wurde, stehen die Ergebnisse der Ozonapplikation auf planktonische Zellen von *Streptococcus mutans* und *Enterococcus faecalis* gegenüber. Hier konnte trotz fehlender EPS keine signifikante Wirkung des Ozons auf die Überlebensfähigkeit der Bakterien erzielt werden. Daher können auch Bestandteile des Nährmediums, z. B. das Glykoprotein Mucin, zu den Ergebnissen beigetragen haben. Mucin kann als stark wasserbindendes Molekül eine Barriere mit unterschiedlichen Ladungen aufbauen und Ozonmoleküle abstoßen oder ggf. binden und somit die Effektivität des Ozons mindern.^{83,113}

Johansson *et al.* kamen in ihren Untersuchungen zu Effekten eines mit Salva versetztem Nährmedium zu einem ähnlichen Schluss. Die Arbeitsgruppe unterzog planktonische Zellen von *Acinetobacter naeslundii*, *Streptococcus mutans* und *Lactobacillus casei* in Saliva oder in einer Phosphat-Pufferlösung einer Applikation mit gasförmigen Ozon (KaVo HealOzone Ozongenerator 2130C). Nach 10 Sekunden Ozonexposition konnte bei den in Pufferlösung befindlichen planktonischen Kulturen bereits eine messbare Keimzahlreduktion registriert

werden, die nach 60 s Ozonapplikation eine Rate von drei Zehnerpotenzen erreichte. Die in Saliva befindlichen Bakterien wurden in gleichartigen Bedingungen in deutlich geringerem Umfang affiziert. Die Arbeitsgruppe untersuchte daraufhin die Proteine der Saliva vor und nach der Ozonapplikation mittels SDS-Elektrophorese. Nach der Ozonapplikation konnte gezeigt werden, dass die Proteinstruktur nach Ozoneinwirkung deutlich verändert vorlag. Sie schlussfolgerten, dass das Ozon die Proteinstrukturen der Saliva in der angewendeten Applikationszeit zwar beschädigte, die durch die Proteine geschaffene Barriere jedoch nicht durchbrach. Laut diesen Ergebnissen scheint Saliva eine Barrierefunktion gegenüber dem Ozon zu haben,⁵¹ was die mangelnde Effektivität der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Ozon-Applikation sowohl auf Biofilmstrukturen als auch auf planktonische Bakterien erklären kann.

Abschließend seien die hier gewählten Ozon-Applikationszeiten von maximal 300 Sekunden im Lichte der im Vorfeld des Versuchs vorhandenen Literatur betrachtet. Dieser Anwendungszeitraum entspricht der in einer zahnärztlichen Praxis pro betroffenem Zahn maximal denkbar zur Verfügung stehenden Behandlungszeit. In früheren Studien wurden Ozonapplikationen zwischen 10 und 240 Sekunden, bzw. 4 und 8 Wochen gewählt.^{4,9,18,29,33,51,78,85,105} Astorga konnte unter Verwendung des CurOzone X4® auch mit einer deutlich höheren Ozon-Konzentration als in dieser Studie nach 240 Sekunden keine Keimzahlreduktion nachweisen.⁴ Demgegenüber zu stellen sind die Resultate von Castillo *et al.*, die nach Applikationszeiten von 10, 20 und 40 Sekunden auf *Streptococcus mutans*-Kulturen eine deutliche Reduktion der Lebendkeimzahl erzielen konnten.¹⁸

4.6. Effektivität der sequentiellen Applikation gasförmigen Ozons und NaOCl auf aerobe und anaerobe oralpathogene Bakterienspezies in Biofilmen-Strukturen

Die kombinierte Applikation von Ozon und anschließender NaOCl-Applikation zeigte unter allen Versuchsbedingungen eine mindestens so starke, zumeist sogar eine ausgeprägtere Wirkung auf die Vermehrungsfähigkeit der Testbakterien als die alleinige NaOCl-Applikation. Es ist daher naheliegend, dass ein additiver oder gar synergistischer Effekt beider Oxidantien erzielt wurde.

2014 veröffentlichten Tachikawa *et al.* ähnliche Ergebnisse. Tachikawa bestimmte die LKZ von *Pseudomonas fluorescens*-Kulturen, die a) nur mit ozonierte Wasser, b) Wasserstoffperoxid (H_2O_2), c) Wasserstoffperoxid und anschließend ozonierte Wasser und d) ozonierte Wasser und anschließend mit Wasserstoffperoxid behandelt wurden. In diesem Ansatz konnte eine signifikante Reduktion der LKZ von *Pseudomonas fluorescens* unter der sequentiellen Applikation von ozonierte Wasser und anschließend von H_2O_2 beobachtet

DISKUSSION

werden. Den Effekt erklärten sich die Autoren u. a. mit der Bildung von Hydroxylradikalen und der Exfoliation der obersten EPS-Schicht, sodass sich die anschließende oxidierende Wirkung des H₂O₂ entfalten konnte. Unterstützt wurde diese These der Autoren mit Hilfe der konfokalen Laserscan-Mikroskopie (s. Abb. 67), in der sie mit Hilfe einer Lebend-Tod-Färbung die deutliche Zunahme toter Bakterien im Biofilm bei Einwirkung von zunächst Ozon und dann H₂O₂ im Vergleich zur umgekehrten Applikationsreihenfolge zeigen konnten.

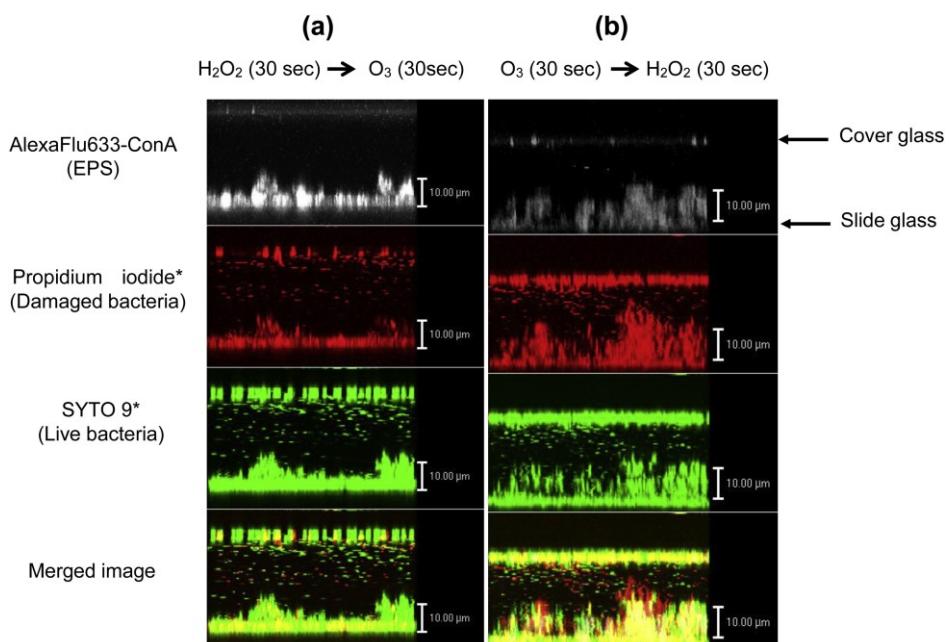


Abbildung 67: Darstellung der Vitalitätsveränderung von Biofilm-organisiertem *Pseudomonas fluorescens* nach der sequentiellen Applikation von (a) H₂O₂ und Ozon sowie (b) Ozon und H₂O₂. Die Darstellung der mit einer Lebend-Tot-Färbung kontrastierten Bakterienzellenerfolge mittels der konfokalen Laserscan-Mikroskopie (Tachikawa *et al.*, 2014). Bei Betrachtung der Propidium Iodid Färbung und der überlagerten Bilder (merged image) zeigt die Reihenfolge erst Ozon, dann H₂O₂ die größeren Abtötungseffekte auf die Bakterienzellen.

In Anlehnung an diese Ergebnisse kann ein Synergismus der Oxidantien Ozon und NaOCl postuliert werden. So kann Ozon einen (vor-)schädigenden Effekt auf die Zellen haben, der durch die anschließende Behandlung mit NaOCl verstärkt wird.

4.7. Schlussfolgerung

In der vorliegenden Studie konnte keine signifikante Keimzahlreduktion an Biofilmen und planktonischen Zellen der oralpathogenen Bakterienspezies *Streptococcus mutans* und *Enterococcus faecalis* mit der alleinigen Ozonapplikation und Expositionszeiten von 60 s, 120 s, 180 s und 300 s erreicht werden. Auch 72 Stunden alte Kulturen von *Parvimonas micra* ATCC 33270 und *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 zeigten kein Ansprechen auf eine Ozonbehandlung über 60 s und 300 s.

DISKUSSION

Die sequentielle Behandlung der Biofilme von *Streptococcus mutans* und *Enterococcus faecalis* mit Ozon und NaOCl führten dagegen zu einer Eradikation bzw. zumindest drastischen Reduktion kultivierbarer Zellen, was einen synergistischen Effekt beider Substanzen nahe legt. Mögliche Gründe für das Versagen der alleineigenen Ozonapplikation im Sinne einer Keimzahlreduktion können in der Schutzfunktion der EPS des Biofilms bzw. des Mucins im Kulturmedium und/oder in einer zu geringen Ozonmenge zu suchen sein.

5. Zusammenfassung

Problemstellung: Ozon wird in der Stomatologie als Therapiealternative bzw. -ergänzung zur mechanischen Kariestherapie umworben. Die bakterizide Effektivität ist jedoch aufgrund der divergenten Studienergebnisse umstritten. **Zielstellung:** Die bakterizide Effektivität gasförmigen Ozons sollte unter Verwendung eines kommerziell vertriebenen Ozongenerators der Firma KaVo mit einer fixen Dosierung von 2100 ppm pro Volumeneinheit und unterschiedlichen Applikationszeiten an Biofilmen und Kulturen planktonischer Zellen der oralpathogenen Bakterienspezies *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*, *Parvimonas micra* und *Fusobacterium nucleatum* untersucht werden. **Material und Methoden:** Biofilme der o. g. Bakterienarten wurden einer Ozonapplikation mit Zeitintervallen von 60 s, 120 s, 180 s und 300 s unterzogen. Unmittelbar nach der Ozonapplikation sowie nach einer Erholungsphase von 24 h wurde die Vitalität der Bakterien mittels Lebendkeimzählung und die Struktur des Biofilms mittels elektronenmikroskopischer Untersuchung bestimmt. Als „Negativkontrolle“ wurden unbehandelte Kulturen verwendet. Für eine „Positivkontrolle“ wurden Biofilme einer NaOCl 5 % Lösung ausgesetzt. In einem weiteren Versuch wurde die sequentielle Applikation von Ozon und anschließend mit NaOCl untersucht. Zur Neutralisierung des oxidativen Effektes wurde eine Na₂S₂O₃-Lösung verwendet. **Ergebnisse:** Mit der alleinigen Applikation gasförmigen Ozons konnte keine offensichtliche Keimzahlreduktion in Biofilmen oder in planktonischen Kulturen erreicht werden. Die sequentielle Behandlung der Biofilme mit Ozon und anschließend NaOCl zeigte dagegen eine signifikante Verminderung der Lebendkeimzahlen unter allen Untersuchungsbedingungen. Nach alleiniger Anwendung von NaOCl konnten unmittelbar nach der Applikation keine vermehrungsfähigen Bakterien nachgewiesen werden. Nach einer Erholungsphase von 24 Stunden waren jedoch teilungsfähige Bakterien zu registrieren. **Schlussfolgerung:** Der kommerziell vertriebene Ozongenerator der Firma KaVo Healozone 2130C eignet sich unter den gewählten Untersuchungsbedingungen nicht um oralpathogene Keime im hinreichenden Umfang abzutöten. Eine sequentielle Anwendung von zunächst Ozon gefolgt vom Antiseptikum NaOCl zeigte jedoch unter allen Versuchsbedingungen einen nachhaltige bakterizide Wirkung. **Klinische Bedeutung:** Eine ausschließliche Ozontherapie im Rahmen einer Kariesbehandlung muss deutlich verbessert werden, wenn sie erfolgreich sein soll. In einer Kombination mit anderen Therapieformen, z. B. der Applikation von Antisepika, könnte bereits jetzt ein Erfolg absehbar sein.

6. Literaturverzeichnis

1. Almaz ME, Sönmez IŞ. Ozone therapy in the management and prevention of caries. *Journal of the formosan medical association* 2013.
2. Arita M, Nagayoshi M, Fukuzumi T, et al. Microbicidal efficacy of ozonated water against *Candida albicans* adhering to acrylic denture plates. *Oral microbiology and immunology* 2005; **20**(4): 206–10.
3. Aslam S. Effect of antibacterials on biofilms. *American journal of infection control* 2008; **36**(10): S175.e9–S.e11.
4. Astorga F. Antibacterial effects of ozone on *Streptococcus mutans* [Diss.]: Faculty of The University of North Carolina at Chapel; 2013.
5. Azarpazhooh A. The application of ozone in dentistry: A systematic review of literature. *Journal of dentistry* 2008; **36**(2): 104–16.
6. Azarpazhooh A, Limeback H. Reply to Letter to the Editor. *Journal of dentistry* 2009; **37**(5): 411–2.
7. Baysan A, Beighton D. Assessment of the Ozone-Mediated Killing of Bacteria in Infected Dentine Associated with Non-Cavitated Occlusal Carious Lesions. *Caries research* 2007; **41**(5): 337–41.
8. Baysan A, Lynch E. Effect of ozone on the oral microbiota and clinical severity of primary root caries. *American journal of dentistry* 2004; **17**(1): 56–60.
9. Baysan A, Whiley RA, Lynch E. Antimicrobial Effect of a Novel Ozone-Generating Device on Micro-Organisms Associated with Primary Root Carious Lesions in vitro. *Caries research* 2000; **34**: 498–501.
10. Bitton G. Encyclopedia of environmental microbiology. New York: Wiley; 2002.
11. Bocci V. Is ozone therapy therapeutic? *Perspectives in biology and medicine* 1998; **42**(1): 131–43.
12. Bocci V. Biological and clinical effects of ozone. Has ozone therapy a future in medicine? *British journal of biomedical science* 1999; **56**(4): 270–9.
13. Bocci V, Borrelli E, Travagli V, Zanardi I. The ozone paradox: Ozone is a strong oxidant as well as a medical drug. *Medicinal research reviews* 2009; **29**(4): 646–82.
14. Bocci VA. Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art. *Archives of medical research* 2006; **37**(4): 425–35.
15. Bowen WH, Koo H. Biology of *Streptococcus mutans*-Derived Glucosyltransferases: Role in Extracellular Matrix Formation of Cariogenic Biofilms. *Caries research* 2011; **45**(1): 69–86.
16. Câmara AC, de Albuquerque MM, Aguiar CM, de Barros Correia ACR. In vitro antimicrobial activity of 0.5%, 1%, and 2.5% sodium hypochlorite in root canals instrumented with the ProTaper Universal system. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontology* 2009; **108**(2): e55–e61.
17. Cardoso M, Deoliveira L, Kogaito C, Jorge A. Effectiveness of ozonated water on *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, and endotoxins in root canals. *Oral surgery,*

- oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontology* 2008; **105**(3): e85–e91.
18. Castillo A, Galindo-Moreno P, Avila G, Valderrama M, Liébana J, Baca P. In vitro reduction of mutans streptococci by means of ozone gas application. *Quintessence international (Berlin, Germany : 1985)* 2008; **39**(10): 827–31.
 19. Celiberti P, Pazera P, Lussi A. The impact of ozone treatment on enamel physical properties. *American journal of dentistry* 2006; **19**(1): 67–72.
 20. Christensen BB, Sternberg C, Andersen JB, et al. Molecular tools for study of biofilm physiology. *Methods in enzymology* 1999; **310**: 20–42.
 21. Clarkson RM, Moule AJ. Sodium hypochlorite and its use as an endodontic irrigant. *Australian dental journal* 1998; **43**(4): 250–6.
 22. Costerton JW, Geesey GG, Cheng KJ. How bacteria stick. *Scientific American* 1978; **238**(1): 86–95.
 23. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science (New York, NY)* 1999; **284**(5418): 1318–22.
 24. Cvitkovitch DG, Li Y-H, Ellen RP. Quorum sensing and biofilm formation in Streptococcal infections. *The Journal of clinical investigation* 2003; **112**(11): 1626–32.
 25. Dehmlow R, editor. *Sauerstoff-Ozon-Therapien: Methoden und praktische Anwendungen*. München / Jena: Elsevier, Urban & Fischer; 2007.
 26. Didilescu AC, Rusu D, Anghel A, et al. Investigation of six selected bacterial species in endo-periodontal lesions. *International endodontic journal* 2012; **45**(3): 282–93.
 27. Dolge K. Chlorgasfilter. Sicherheit für die Wasserdesinfektion. 2011. http://www.dguv.de/medien/inhalt/praevention/fachbereiche/fb-gesundheitsdienst/baeder/documents/05_Dolge_Chlor-Notfallabsofrberm.pdf (accessed 09.12.15).
 28. Doyle RJ. *Biofilms*. San Diego: Academic Press; 1999.
 29. Dukić W, Jurić H, Andrasević AT, Kovacević V, Dukić OL, Delija B. The efficacy of gaseous ozone on some cariogenic bacteria. *Collegium antropologicum* 2013; **37**(1): 109–13.
 30. Elstner P, Lohs K, Stephan U. *Fachlexikon Toxikologie*. 4 ed. Berlin / Heidelberg: Springer; 2008.
 31. Estrela C, Estrela CRA, Barbin EL, Spanó JCE, Marchesan MA, Pécora JD. Mechanism of action of sodium hypochlorite. *Brazilian dental journal* 2002; **13**(2): 113–7.
 32. Estrela C, Estrela CRA, Decurcio DA, Hollanda ACB, Silva JA. Antimicrobial efficacy of ozonated water, gaseous ozone, sodium hypochlorite and chlorhexidine in infected human root canals. *International endodontic journal* 2007; **40**(2): 85–93.
 33. Fagrell TG, Dietz W, Lingström P, Steiniger F, Norén JG. Effect of ozone treatment on different cariogenic microorganisms in vitro. *Swedish dental journal* 2008; **32**(3): 139–47.
 34. Flemming H-C, Wingender J. The biofilm matrix. *Nature reviews Microbiology* 2010; **8**(9): 623–33.

35. Frenkel ES, Ribbeck K. Salivary Mucins Protect Surfaces from Colonization by Cariogenic Bacteria. *Applied and environmental microbiology* 2014; **81**(1): 332–8.
36. Fux CA, Stoodley P, Hall-Stoodley L, Costerton JW. Bacterial biofilms: a diagnostic and therapeutic challenge. *Expert review of anti-infective therapy* 2003; **1**(4): 667–83.
37. Guida A. Mechanism of action of sodium hypochlorite and its effects on dentin. *Minerva stomatologica* 2006; **55**(9): 471–82.
38. Haley CL, Kruczak C, Qaisar U, Colmer-Hamood JA, Hamood AN. Mucin inhibits *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation by significantly enhancing twitching motility. *Canadian journal of microbiology* 2014; **60**(3): 155–66.
39. Hauser-Gerspach I, Pfäffli-Savtchenko V, Dähnhardt JE, Meyer J, Lussi A. Comparison of the immediate effects of gaseous ozone and chlorhexidine gel on bacteria in cavitated carious lesions in children in vivo. *Clinical oral investigations* 2009; **13**(3): 287–91.
40. HealOzone. Funktionsprinzip CurOzone X4. 2011. <http://www.healozone.de/de/heal-ozone/healozone-x4/funktionsprinzip.html> (accessed 01.12.15).
41. Hecker S, Hiller K-A, Galler KM, Erb S, Mader T, Schmalz G. Establishment of an optimized ex vivo system for artificial root canal infection evaluated by use of sodium hypochlorite and the photodynamic therapy. *International endodontic journal* 2013; **46**(5): 449–57.
42. Hedge J, Bashetty K, Krishnakumar, Gulati U. Quantity of sodium thiosulfate required to neutralize various concentrations of sodium hypochlorite. *Asian journal of pharmaceutical and health sciences* 2012; **2**(3): 390–3.
43. Heidemann D, Becker J. Kariologie und Füllungstherapie. 4 ed. München / Jena: Elsevier, Urban & Fischer; 1999.
44. Hems RS, Gulabivala K, Ready D, Spratt DA. An in vitro evaluation of the ability of ozone to kill a strain of *Enterococcus faecalis*. *International endodontic journal* 2005; (38): 22–9.
45. Hendrickson EL, Wang T, Beck DAC, et al. Proteomics of *Fusobacterium nucleatum* within a model developing oral microbial community. *MicrobiologyOpen* 2014; **3**(5): 729–51.
46. Hubmann A. Der Zahnwurm. Die Geschichte eines volksheilkundlichen Glaubens [Diss.]: Universität Regensburg; 2008.
47. Huth KC, Paschos E, Brand K, Hickel R. Effect of ozone on non-cavitated fissure carious lesions in permanent molars. A controlled prospective clinical study. *American journal of dentistry* 2005; **18**(4): 223–8.
48. Huth KC, Quirling M, Lenzke S, et al. Effectiveness of ozone against periodontal pathogenic microorganisms. *European journal of oral sciences* 2011; **119**(3): 204–10.
49. Huth KC, Quirling M, Maier S, et al. Effectiveness of ozone against endodontopathogenic microorganisms in a root canal biofilm model. *International endodontic journal* 2009; **42**(1): 3–13.
50. Jenkinson HF, Lamont RJ. Oral microbial communities in sickness and in health. *Trends in microbiology* 2005; **13**(12): 589–95.

51. Johansson E, Claesson R, van Dijken JWV. Antibacterial effect of ozone on cariogenic bacterial species. *Journal of dentistry* 2009; **37**(6): 449–53.
52. Jolivet-Gougeon A, Bonnaure-Mallet M. Biofilms as a mechanism of bacterial resistance. *Drug Discovery Today: Technologies* 2014; **11**: 49–56.
53. Kavanaugh NL, Zhang AQ, Nobile CJ, Johnson AD, Ribbeck K. Mucins suppress virulence traits of *Candida albicans*. *mBio* 2014; **5**(6): e01911.
54. Kleinert T. HealOzone-Einsatz in der Zahnarztpraxis. *Quintessenz Team-Journal* 2004; **34**: 281–5.
55. Kolenbrander PE. Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems. *Annual Review of Microbiology* 2000; **54**: 413–37.
56. Kolenbrander PE, Palmer RJ, Periasamy S, Jakubovics NS. Oral multispecies biofilm development and the key role of cell–cell distance. *Nature reviews microbiology* 2010; **8**(7): 471–80.
57. Kollmuss M, Kist S, Obermeier K, Pelka A-K, Hickel R, Huth KC. Antimicrobial effect of gaseous and aqueous ozone on caries pathogen microorganisms grown in biofilms. *American journal of dentistry* 2014; **27**(3): 134–8.
58. Kuchma SL, O'Toole GA. Surface-induced and biofilm-induced changes in gene expression. *Current opinion in biotechnology* 2000; **11**(5): 429–33.
59. Kühnöl C. KaVo Healozone. Praxis Handbuch. Biberach / Riß: KaVo Dental GmbH; 2004.
60. Latscha HP, Mutz M. Chemie der Elemente: Chemie-Basiswissen IV. Berlin / Heidelberg: Springer; 2011.
61. Laurisch L. Individualprophylaxe: Diagnostik und Therapie des individuellen Kariesrisikos. 2., revised and extended ed. Köln: Deutscher Ärzte Verlag; 2000.
62. Lee JW, Choi BK, Yoo YJ, et al. Distribution of Periodontal Pathogens in Korean Aggressive Periodontitis. *Journal of periodontology* 2003; **74**(9): 1329–35.
63. Lembke C. *Streptococcus pyogenes*: Biofilmbildung und strukturelle Charakterisierung unter verschiedenen Wachstums- und Kulturbedingungen [Diss.]: Universität Rostock; 2009.
64. Linden SK, Sutton P, Karlsson NG, Korolik V, McGuckin MA. Mucins in the mucosal barrier to infection. *Mucosal immunology* 2008; **1**(3): 183–97.
65. Lynch E. Oxidative therapies – ozone and hydrogen peroxide: Safe, effective, low -cost treatments for many diseases, including HIV and cancer. p. 6.
66. Lynch E. Comment on "The application of ozone in dentistry: A systematic review of the literature". *Journal of dentistry* 2009; **37**(5): 406–10; author reply 11–2.
67. Marion J, Manhaes FC, Bajo H, Duque TM. Efficiency of different concentrations of sodium hypochlorite during endodontic treatment. Literature review. *Dental press endodontics* 2012; **4**(2): 32–7.
68. Marsh P, Martin MV. *Orale Mikrobiologie: 60 Tabellen*. Stuttgart / New York: Thieme; 2003.

69. Marsh PD. Dental plaque as a biofilm: the significance of pH in health and caries. *Compendium of continuing education in dentistry (Jamesburg, NJ : 1995)* 2009; **30**(2): 76–8, 80, 3–7; quiz 8, 90.
70. McComb D. No reliable evidence that ozone gas stops or reverses tooth decay. *Evidence-based dentistry* 2005; **6**(2): 34.
71. Millar B, Hodson N. Assessment of the safety of two ozone delivery devices. *Journal of dentistry* 2007; **35**(3): 195–200.
72. Müller P, Guggenheim B, Schmidlin PR. Efficacy of gasiform ozone and photodynamic therapy on a multispecies oral biofilm in vitro. *European journal of oral sciences* 2007; **(115)**: 77–80.
73. Nagayoshi M, Fukuizumi T, Kitamura C, Terashita M. Efficacy of ozone on survival and permeability of oral microorganisms. *Oral microbiology and immunology* 2004; **(19)**: 240–6.
74. Nagayoshi M, Kitamura C, Fukuizumi T, Nishihara T, Terashita M. Antimicrobial effect of ozonated water on bacteria invading dentinal tubules. *Journal of endodontics* 2004; **30**(11): 778–81.
75. Ngwenya N, Ncube EJ, Parsons J. Recent advances in drinking water disinfection: successes and challenges. *Reviews of environmental contamination and toxicology* 2013; **222**: 111–70.
76. Noetzel J, Nonhoff J, Bitter K, Wagner J, Neumann K, Kielbassa AM. Efficacy of calcium hydroxide, Er:YAG laser or gaseous ozone against Enterococcus faecalis in root canals. *American journal of dentistry* 2009; **22**(1): 14–8.
77. Nogales CG, Ferrari PH, Kantorovich EO, Lage-Marques JL. Ozone therapy in medicine and dentistry. *The journal of contemporary dental practice* 2008; **9**(4): 75–84.
78. Noites R, Pina-Vaz C, Rocha R, Carvalho MF, Gonçalves A, Pina-Vaz I. Synergistic antimicrobial action of chlorhexidine and ozone in endodontic treatment. *BioMed research international* 2014; **2014**: 592423.
79. O'Toole GA, Kolter R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular microbiology* 1998; **30**(2): 295–304.
80. Palou Ls, Crisosto CH, Smilanick JL, Adaskaveg JE, Zoffoli JP. Effects of continuous 0.3 ppm ozone exposure on decay development and physiological responses of peaches and table grapes in cold storage. *Postharvest biology and technology* 2002; **24**(1): 39–48.
81. Pappen FG, Qian W, Aleksejūnienė J, de Toledo Leonardo R, Leonardo MR, Haapasalo M. Inhibition of Sodium Hypochlorite Antimicrobial Activity in the Presence of Bovine Serum Albumin. *Journal of endodontics* 2010; **36**(2): 268–71.
82. Pashley EL, Birdsong NL, Bowman K, Pashley DH. Cytotoxic effects of NaOCl on vital tissue. *Journal of endodontics* 1985; **11**(12): 525–8.
83. Perez-Vilar J, Hill R. The Structure and Assembly of Secreted Mucins. *The journal of biological chemistry* 1999; **274**(45): 31751–4.
84. Petersen EP. Priorities for research for oral health in the 21st Century – the approach of the WHO Global Oral Health Programme. *Community Dental Health* 2005; **(22)**: 71–4.

85. Polydorou O, Halili A, Wittmer A, Pelz K, Hahn P. The antibacterial effect of gas ozone after 2 months of in vitro evaluation. *Clinical oral investigations* 2011.
86. Polydorou O, Pelz K, Hahn P. Antibacterial effect of an ozone device and its comparison with two dentin-bonding systems. *European journal of oral sciences* 2006; (114): 349–53.
87. Radcliffe CE, Potouridou L, Qureshi R, et al. Antimicrobial activity of varying concentrations of sodium hypochlorite on the endodontic microorganisms *Actinomyces israelii*, *A. naeslundii*, *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis*. *International endodontic journal* 2004; **37**(7): 438–46.
88. Raynal BDE, Hardingham TE, Sheehan JK, Thornton DJ. Calcium-dependent Protein Interactions in MUC5B Provide Reversible Cross-links in Salivary Mucus. *Journal of biological chemistry* 2003; **278**(31): 28703–10.
89. Rickard GD, Richardson R, Johnson T, McColl D, Hooper L. Ozone therapy for the treatment of dental caries. *The Cochrane database of systematic reviews* 2004; (3): CD004153.
90. Rôças IN, Siqueira JF, Debelian GJ. Analysis of Symptomatic and Asymptomatic Primary Root Canal Infections in Adult Norwegian Patients. *Journal of endodontics* 2011; **37**(9): 1206–12.
91. Rossi-Fedele G, de Figueiredo JAP, Steier L, Canullo L, Steier G, Roberts AP. Evaluation of the antimicrobial effect of super-oxidized water (Sterilox®) and sodium hypochlorite against *Enterococcus faecalis* in a bovine root canal model. *Journal of applied oral science : revista FOB* 2010; **18**(5): 498–502.
92. Ruby JD, Cox CF, Akimoto N, Meada N, Momoi Y. The Caries Phenomenon: A Timeline from Witchcraft and Superstition to Opinions of the 1500s to Today's Science. *International journal of dentistry* 2010; **2010**(2): 1–10.
93. Ruhl S, Sandberg AL, Cisar JO. Salivary receptors for the proline-rich protein-binding and lectin-like adhesins of oral actinomyces and streptococci. *Journal of dental research* 2004; **83**(6): 505–10.
94. Sadatullah S, Mohamed NH, Razak FA. The antimicrobial effect of 0.1 ppm ozonated water on 24-hour plaque microorganisms in situ. *Brazilian oral research* 2012; **26**(2): 126–31.
95. Sauer K. The genomics and proteomics of biofilm formation. *Genome biology* 2003; **4**(6).
96. Sauer K, Camper AK, Ehrlich GD, Costerton JW, Davies DG. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *Journal of bacteriology* 2002; **184**(4): 1140–54.
97. Scheck L. Infomappe KaVo HealOzone. 2005. <http://www.kavodental.ru/functions/csdownload3.aspx?id=9944&org=003&key=5ca3c9b0ff33a1ed22895478d66f3e55cb7efa461f1901ef770ca16161fd4637>. (accessed 01.12.15).
98. Schwenzer N, Ehrenfeld M, Reitemeier B. Einführung in die Zahnmedizin: 56 Tabellen. Stuttgart / New York: Thieme; 2006.

99. Siqueira JF, Jr. Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. *International endodontic journal* 2001; **34**(1): 1–10.
100. Siqueira JF, Jr., Rocas IN. Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics* 2004; **97**(1): 85–94.
101. Spencer HR, Ike V, Brennan PA. Review: the use of sodium hypochlorite in endodontics – potential complications and their management. *British dental journal* 2007; **202**(9): 555–9.
102. Standar K. In vitro Modelle oraler Biofilme [Diss.]: Universität Rostock; 2010.
103. Stephens C. Microbiology: breaking down biofilms. *Current biology : CB* 2002; **12**(4): R132–R4.
104. Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 2001; **358**(9276): 135–8.
105. Stoll R, Venne L, Jablonski-Momeni A, Mutters R, Stachniss V. The disinfecting effect of ozonized oxygen in an infected root canal: an in vitro study. *Quintessence international (Berlin, Germany : 1985)* 2008; **39**(3): 231–6.
106. Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW. Biofilms as complex differentiated communities. *Annual review of microbiology* 2002; **56**(1): 187–209.
107. Suerbaum S, Hahn H, Burchard G-D, Kaufmann SHE, Schulz TF, editors. Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. 7 ed. Berlin / Heidelberg: Springer; 2012.
108. Tilton RC, Rosenberg B. Reversal of the Silver Inhibition of Microorganisms by Agar. *Applied an environmental microbiology* 1978; **35**(6): 1116–20.
109. Traichel F. Zur Wurzelbehandlung mit dem Endox- Endometrie- System [Diss.]: Friedrich-Schiller-Universität Jena; 2008.
110. Vianna ME, Horz H-P, Gomes BPFA, Conrads G. Microarrays complement culture methods for identification of bacteria in endodontic infections. *Oral microbiology and immunology* 2005; **20**(4): 253–8.
111. Watnick P, Kolter R. Biofilm, city of microbes. *Journal of bacteriology* 2000; **182**(10): 2675–9.
112. Watnick PI, Kolter R. Steps in the development of a Vibrio cholerae El Tor biofilm. *Molecular microbiology* 1999; **34**(3): 586–95.
113. Wickström C, Svensäter G. Salivary gel-forming mucin MUC5B--a nutrient for dental plaque bacteria. *Oral microbiology and immunology* 2008; **23**(3): 177–82.
114. Zaura E, Buijs MJ, ten Cate JM. Effects of Ozone and Sodium Hypochlorite on Caries-Like Lesions in Dentin. *Caries research* 2007; **41**(6): 489–92.
115. Zoletti GO, Siqueira JF, Santos KRN. Identification of Enterococcus faecalis in root-filled teeth with or without periradicular lesions by culture-dependent and-independent approaches. *Journal of endodontics* 2006; **32**(8): 722–6.

ANHANG

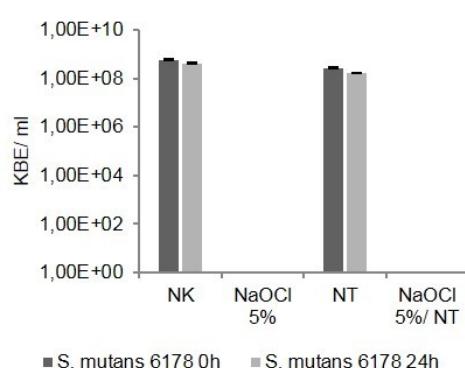


Abbildung 69: Bestimmung der Lebendkeimzahlen mit *S. mutans* 6178. Die Untersuchungen wurden direkt nach der Behandlung mit dem jeweiligen Agens und nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden durchgeführt. In den Proben, welche mit NaOCl 5 % behandelt wurden, konnten an beiden Messzeitpunkten keine Kolonien bestimmt werden. Gleiches gilt für die Proben, die mit NaOCl 5 % und nachfolgend Na₂S₂O₃ behandelt wurden. Na₂S₂O₃ alleine hatte keinen wachstumshemmenden Effekt auf die Kolonien. NK - Negativkontrolle, NT - Na₂S₂O₃-Tabelle

Tabelle 15: Der Einfluss von Chlorbleiche (Natriumhypochlorit) und einem Oxidationsschutzmittel (Natriumthiosulfat) auf die Keimzahl von Biofilm-assoziierten Bakterien am Beispiel von *S. mutans*. Die Keimzahlen pro ml suspendiertem Biofilm werden als exponentielle Werte auf der Basis von 10 dargestellt.^a Es erfolgte keine statistische Auswertung bei einer 100 %-igen Eradizierung.

n	Mittelwert	Standard-abweichung	Standard-fehler	95 % Konfidenzintervall für Mittelwert		
				Unter-grenze	Ober-grenze	p-Wert
a. Bakterium = <i>S.mutans</i> 6178, Messzeitpunkt = 0h						
Negativkontr olle	2	5,65E+08	2,97E+08	2,10E+08	-2,10E+09	3,23E+09
NaOCl 5%	2	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Na₂S₂O₃	2	2,73E+08	1,38E+08	9,75E+07	-9,66E+08	1,51E+09
NaOCl 5% + Na₂S₂O₃	3	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
b. Bakterium = <i>S.mutans</i> 6178, Messzeitpunkt = 24h						
Negativkontr olle	3	4,13E+08	5,60E+08	3,23E+08	-9,79E+08	1,80E+09
NaOCl 5%	3	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Na₂S₂O₃	3	1,65E+08	1,73E+08	1,00E+08	-2,65E+08	5,96E+08
NaOCl 5% + Na₂S₂O₃	3	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,037

ANHANG

7.1.2. zu 3.3.2. Überlebensfähigkeit von *E. faecalis* DSMZ 20478 und *E. faecalis* 1904 unter Verwendung von NaOCl und Na₂S₂O₃

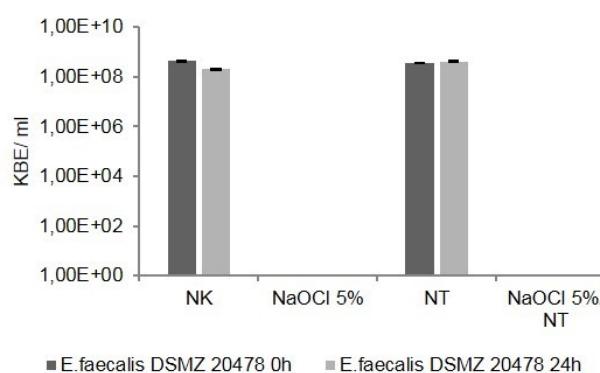


Abbildung 70: Bestimmung der Lebendkeimzahlen in den Vorversuchen mit *E. faecalis* DSMZ 20478. In den Proben, welche mit NaOCl 5 % behandelt wurden, konnten an beiden Messzeitpunkten keine Kolonien bestimmt werden. Gleches gilt für die Proben, die mit NaOCl 5 % und Na₂S₂O₃ behandelt wurden sind. Na₂S₂O₃ alleine hatte keinen wachstumshemmenden Effekt auf die Kolonien. NK - Negativkontrolle, NT - Na₂S₂O₃

Tabelle 16: Der Einfluss von Chlorbleiche (Natriumhypochlorit) und einem Oxidationsschutzmittel (Natriumthiosulfat) auf die Keimzahl von Biofilm-assoziierten Bakterien am Beispiel von *E. faecalis* DSMZ 20478. Die Keimzahlen pro ml suspendiertem Biofilm werden als exponentielle Werte auf der Basis von 10 dargestellt.^a Es erfolgte keine statistische Auswertung bei einer vollständigen Eradizierung.

	n	Mittelwert	Standard-abweichung	Standard-fehler	95 % Konfidenzintervall für Mittelwert			p-Wert
					Unter-grenze	Ober-grenze		
a. Bakterium = <i>E. faecalis</i> DSMZ 20478, Messzeitpunkt = 0h								
Negativkontrolle	2	4,30E+08	1,06E+08	7,50E+07	-5,23E+08	1,38E+09		
NaOCl 5%	2	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	- ^a	
Na ₂ S ₂ O ₃	2	3,55E+08	4,95E+07	3,50E+07	-8,97E+07	8,00E+08	0,439	
NaOCl 5% + Na ₂ S ₂ O ₃	2	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	- ^a	
b. Bakterium = <i>E. faecalis</i> DSMZ 20478, Messzeitpunkt = 24h								
Negativkontrolle	3	2,00E+08	1,58E+08	9,12E+07	-1,93E+08	5,92E+08		
NaOCl 5%	3	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	- ^a	
Na ₂ S ₂ O ₃	3	4,18E+08	1,56E+08	9,01E+07	3,06E+07	8,06E+08	0,127	
NaOCl 5% + Na ₂ S ₂ O ₃	3	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	- ^a	

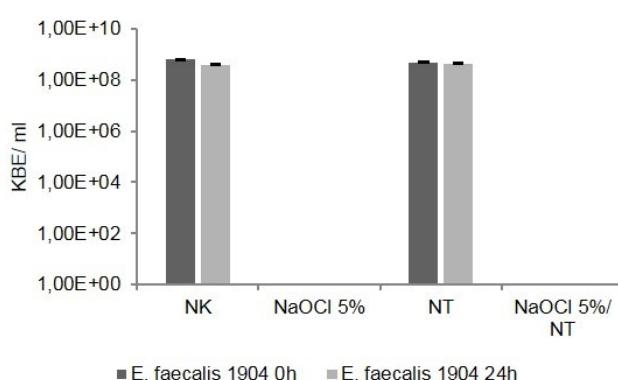


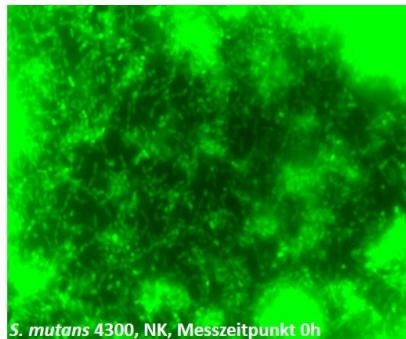
Abbildung 71: Bestimmung der Lebendkeimzahlen in den Vorversuchen mit *E. faecalis* 1904. In den Proben, welche mit NaOCl 5 % behandelt wurden, konnten an beiden Messzeitpunkten keine Kolonien bestimmt werden. Gleiches gilt für die Proben, die mit NaOCl 5 % und Na₂S₂O₃ behandelt wurden sind. Na₂S₂O₃ alleine hatte keinen wachstumshemmenden Effekt auf die Kolonien. NK - Negativkontrolle, NT - Na₂S₂O₃; Tabelle 20: Deskriptive Statistik exemplarisch am Beispiel von *E. faecalis* 1904. ^a Es erfolgte keine statistische Auswertung bei einer vollständigen Eradizierung.

Tabelle 17: Der Einfluss von Chlorbleiche (Natriumhypochlorit) und einem Oxidationsschutzmittel (Natriumthiosulfat) auf die Keimzahl von Biofilm-assoziierten Bakterien am Beispiel von *E. faecalis* 1904. Die Keimzahlen pro ml suspendiertem Biofilm werden als exponentielle Werte auf der Basis von 10 dargestellt.^a Es erfolgte keine statistische Auswertung bei einer vollständigen Eradizierung.

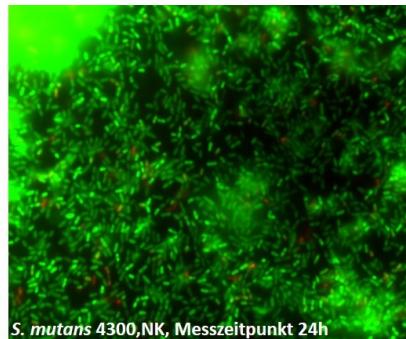
n	Mittelwert	Standard- abweichung	Standard- fehler	95 % Konfidenzintervall für Mittelwert		p-Wert
				Unter- grenze	Ober- grenze	
a. Bakterium = <i>E.faecalis</i> 1904, Messzeitpunkt = 0h						
Negativkontrolle	2	6,33E+08	3,29E+08	2,33E+08	-2,32E+09	3,59E+09
NaOCl 5%	2	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Na ₂ S ₂ O ₃	2	4,75E+08	1,41E+07	1,00E+07	3,48E+08	6,02E+08
NaOCl 5% + Na ₂ S ₂ O ₃	2	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
b. Bakterium = <i>E.faecalis</i> 1904, Messzeitpunkt = 24h						
Negativkontrolle	2	3,88E+08	8,84E+07	6,25E+07	-4,07E+08	1,18E+09
NaOCl 5%	2	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Na ₂ S ₂ O ₃	3	4,31E+08	5,62E+07	3,24E+07	2,92E+08	5,70E+08
NaOCl 5% + Na ₂ S ₂ O ₃	3	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00

7.2. zu 3.4. Ergebnisse der fluoreszenzmikroskopischen Analysen

7.2.1. zu 3.4.1. Resultate der Fluoreszenzmikroskopie für *S. mutans* 4300 und *S. mutans* 6178

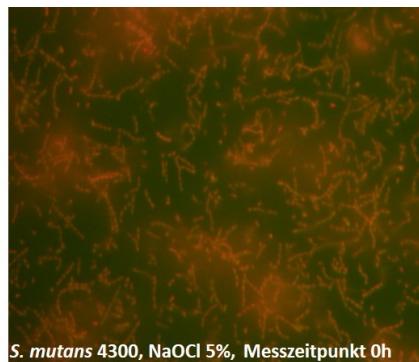


S. mutans 4300, NK, Messzeitpunkt 0h

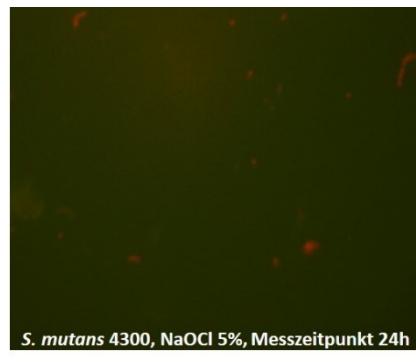


S. mutans 4300, NK, Messzeitpunkt 24h

Abbildung 72–73:
Fluoreszenzmikroskopische
Untersuchung von *S. mutans*
4300, Negativkontrolle,
direkt nach einer Luft-
exposition (0 h) und nach
24 h Erholungsphase,
100fache Vergrößerung

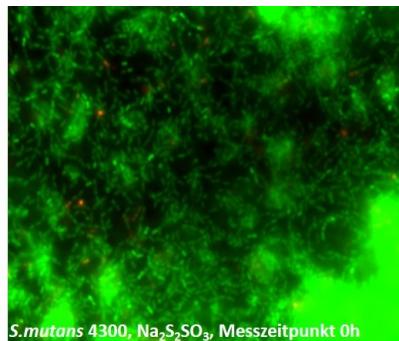


S. mutans 4300, NaOCl 5%, Messzeitpunkt 0h

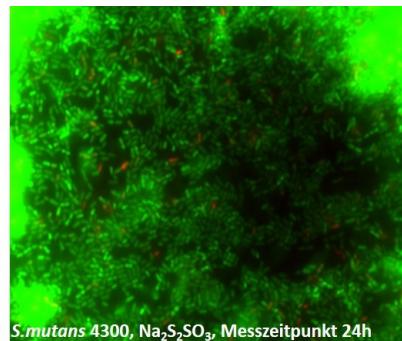


S. mutans 4300, NaOCl 5%, Messzeitpunkt 24h

Abbildung: 74–75: Fluores-
zenzmikroskopische Unter-
suchung von *S. mutans* 4300,
Positivkontrolle mit NaOCl
5 %, direkt nach Behandlung
(0 h) und nach 24 h
Erholungsphase, 100fache
Vergrößerung



S. mutans 4300, Na₂S₂O₃, Messzeitpunkt 0h



S. mutans 4300, Na₂S₂O₃, Messzeitpunkt 24h

Abbildung: 76–77: Fluores-
zenzmikroskopische Unter-
suchung von *S. mutans* 4300,
Natriumthiosulfat (Na₂S₂O₃),
direkt nach Behandlung (0 h)
und nach 24 h
Erholungsphase, 100fache
Vergrößerung

ANHANG

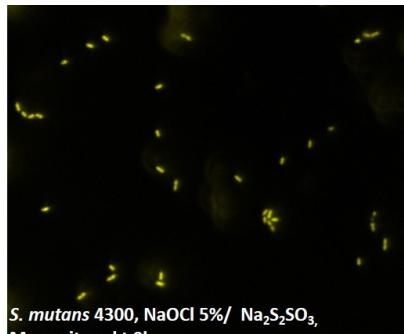
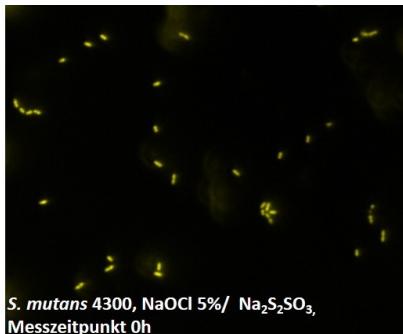


Abbildung 78–79:
Fluoreszenzmikroskopische
Untersuchung von *S. mutans*
4300, Exposition gegen
Natriumhypochlorit (NaOCl)
und Natriumthiosulfat
($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$), direkt nach
Behandlung (0 h) und nach
24 h Erholungsphase,
100fache Vergrößerung

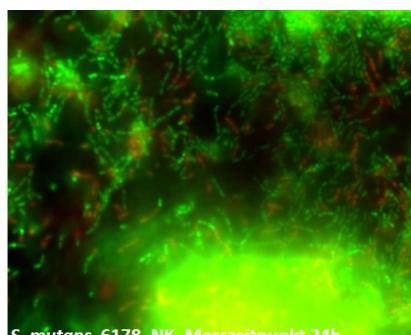
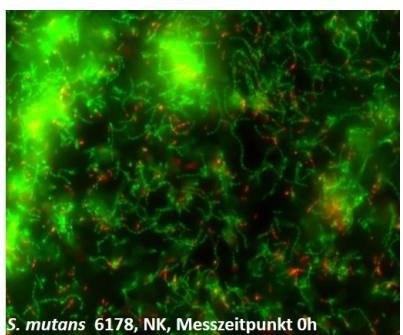


Abbildung 80–81:
Fluoreszenzmikroskopische
Untersuchung von *S. mutans*
DSM 6178, Negativkontrolle,
direkt nach einer
Luftexposition (0 h) und nach
24 h Erholungsphase,
100fache Vergrößerung

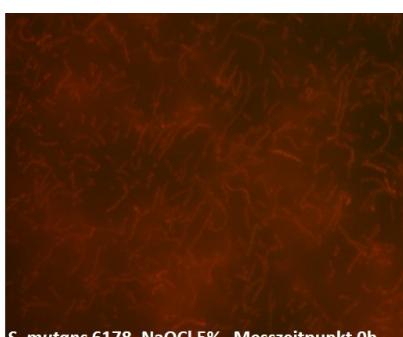


Abbildung 82–83:
Fluoreszenzmikroskopische
Untersuchung von *S. mutans*
6178, Positivkontrolle durch
Exposition gegen NaOCl 5 %,
direkt nach Behandlung (0 h)
und nach 24 h Erholungsphase,
100fache Vergrößerung

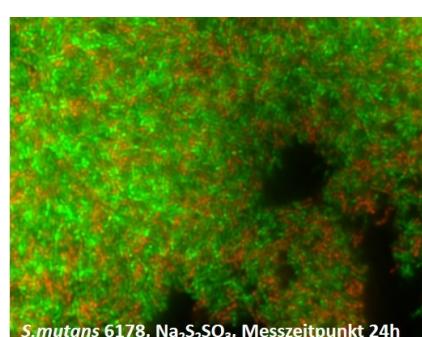
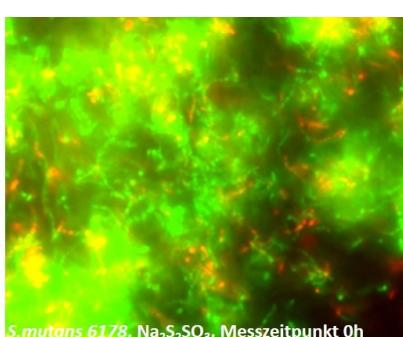
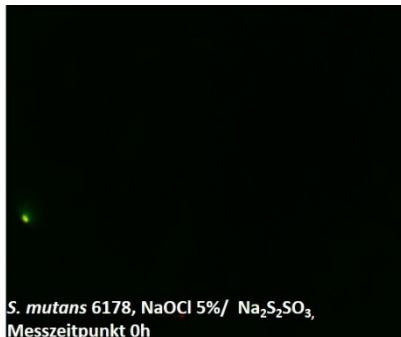
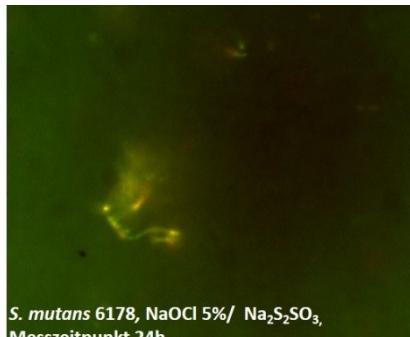


Abbildung 84–85:
Fluoreszenzmikroskopische
Untersuchung von *S. mutans*
6178 nach Exposition gegen
Natriumthiosulfat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$),
direkt nach Behandlung (0 h)
und nach 24 h Erholungsphase,
100fache Vergrößerung

ANHANG



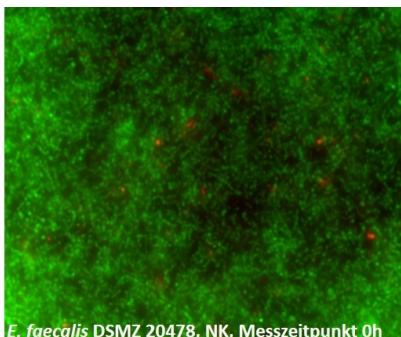
S. mutans 6178, NaOCl 5% / Na_2SO_3 ,
Messzeitpunkt 0h



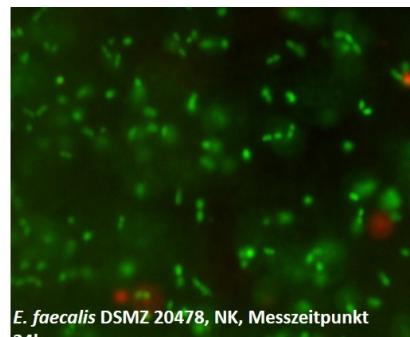
S. mutans 6178, NaOCl 5% / Na_2SO_3 ,
Messzeitpunkt 24h

Abbildung 86–87:
Fluoreszenzmikroskopische
Untersuchung von *S. mutans*
6178, Exposition gegen
Natriumhypochlorit (NaOCl)
und Natriumthiosulfat
(Na_2SO_3), direkt nach Behand-
lung (0 h) und nach 24 h
Erholungsphase, 100fache
Vergrößerung

7.2.2. zu 3.4.2. Resultate der Fluoreszenzmikroskopie für *E. faecalis* DSMZ 20478 und *E. faecalis* 1904

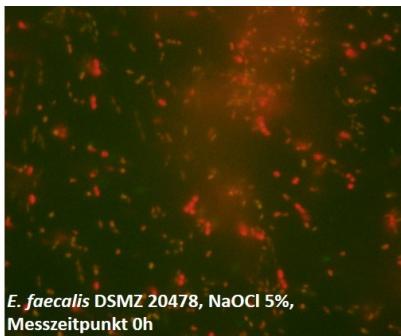


E. faecalis DSMZ 20478, NK, Messzeitpunkt 0h

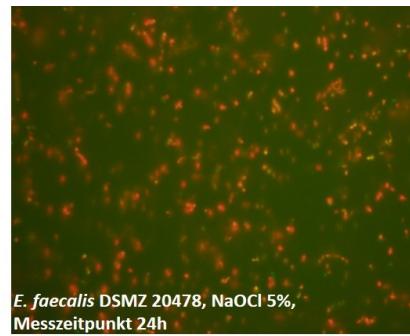


E. faecalis DSMZ 20478, NK, Messzeitpunkt
24h

Abbildung 88–89:
Fluoreszenzmikroskopische
Untersuchung von *E. faecalis*
DSMZ 20478
Negativkontrolle, direkt nach
Luftexposition (0 h) und nach
24 h Erholungsphase,
100fache Vergrößerung



E. faecalis DSMZ 20478, NaOCl 5%,
Messzeitpunkt 0h



E. faecalis DSMZ 20478, NaOCl 5%,
Messzeitpunkt 24h

Abbildung 90–91:
Fluoreszenzmikroskopische
Untersuchung von *E. faecalis*
DSMZ 20478,
Positivkontrolle durch
Exposition gegen NaOCl 5 %,
direkt nach Behandlung (0 h)
und nach 24 h
Erholungsphase, 100fache
Vergrößerung

ANHANG

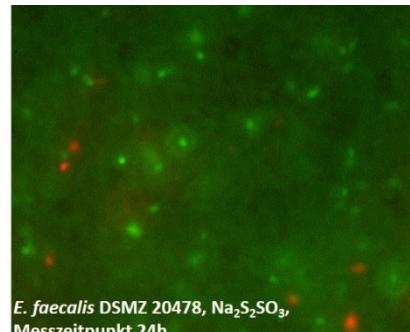
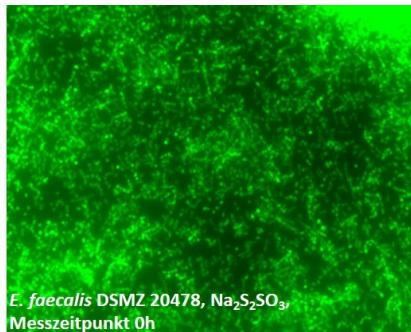


Abbildung 92–93:
Fluoreszenzmikroskopische
Untersuchung von *E. faecalis*
DSMZ 20478, Exposition
gegen Natriumthiosulfat
($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$), direkt nach
Behandlung (0 h) und nach
24 h Erholungsphase,
100fache Vergrößerung

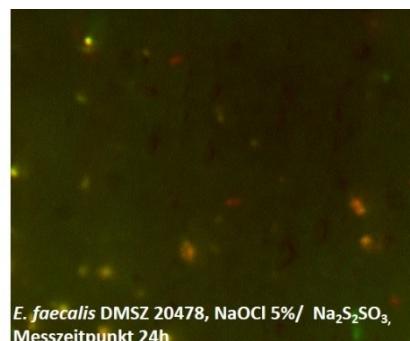
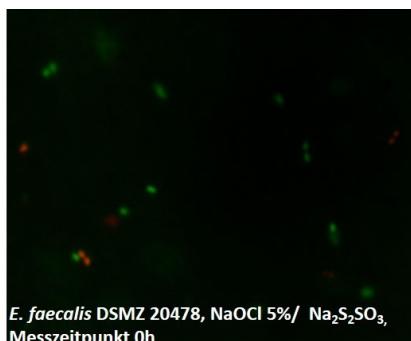


Abbildung 94–95:
Fluoreszenzmikroskopische
Untersuchung von *E. faecalis*
DSMZ 20478, Untersuchung
mit Natriumhypochlorit
(NaOCl) und
Natriumthiosulfat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$),
direkt nach Behandlung (0 h)
und nach 24 h Inkubation,
100fache Vergrößerung

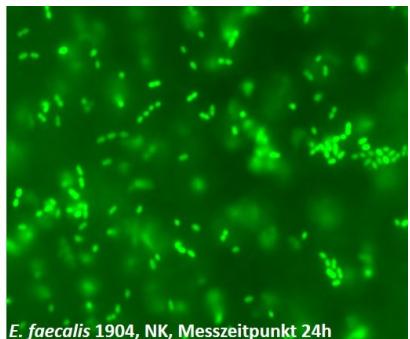
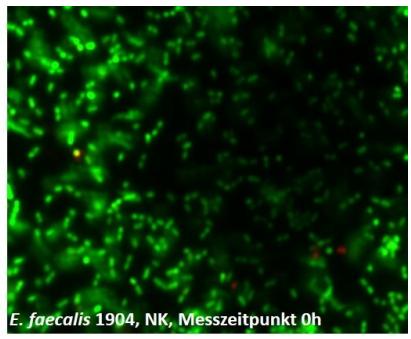


Abbildung 96–97:
Fluoreszenzmikroskopische
Untersuchung von
E. faecalis 1904 Negativ-
kontrolle, direkt nach Luft-
exposition (0 h) und nach 24 h
Erholungsphase, 100fache
Vergrößerung

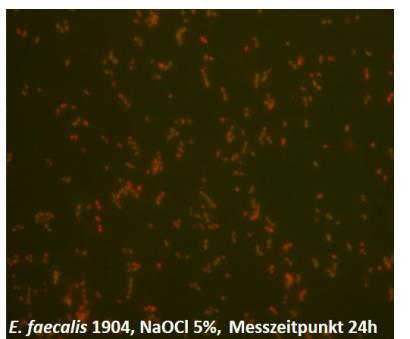
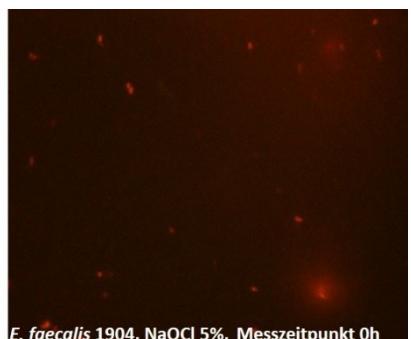


Abbildung 98–99:
Fluoreszenzmikroskopische
Untersuchung von *E. faecalis*
1904, Positivkontrolle durch
Exposition gegen NaOCl 5 %,
direkt nach Behandlung (0 h)
und nach 24 h Erholungs-
phase, 100fache Vergrößerung

ANHANG

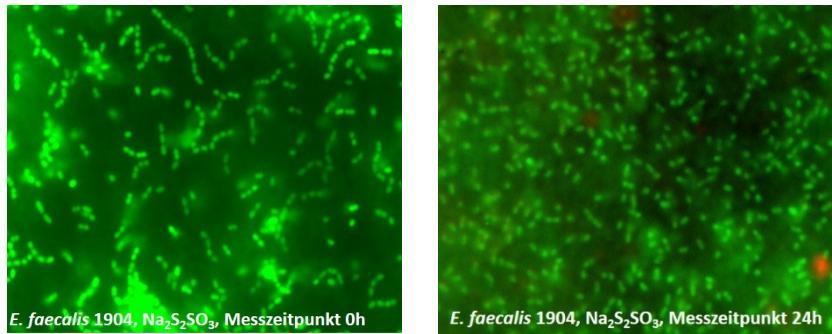


Abbildung 100–101: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von *E. faecalis* 1904, Exposition gegen Natriumthiosulfat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$), direkt nach Behandlung (0 h) und nach 24 h Erholungsphase, 100fache Vergrößerung

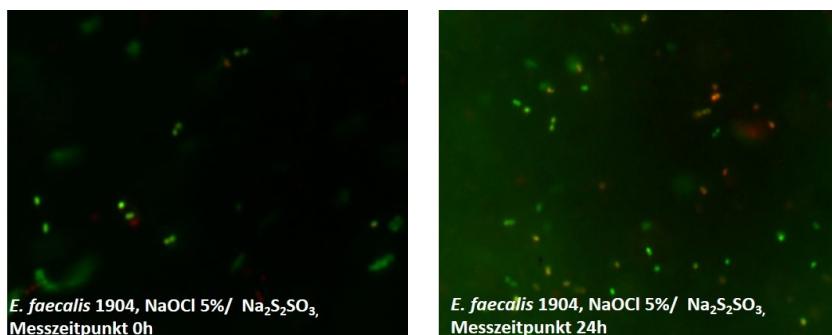


Abbildung 102–103: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von *E. faecalis* 1904, Exposition gegen Natriumhypochlorit (NaOCl) und Natriumthiosulfat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$), direkt nach Behandlung (0 h) und nach 24 h Erholungsphase, 100fache Vergrößerung

7.3. zu 3.6. *in vitro* Ozon-Applikation unter aeroben Verhältnissen

7.3.1. zu 3.6.1. Die Wirkung von Ozon auf *S. mutans* 4300 und *S. mutans* 6178

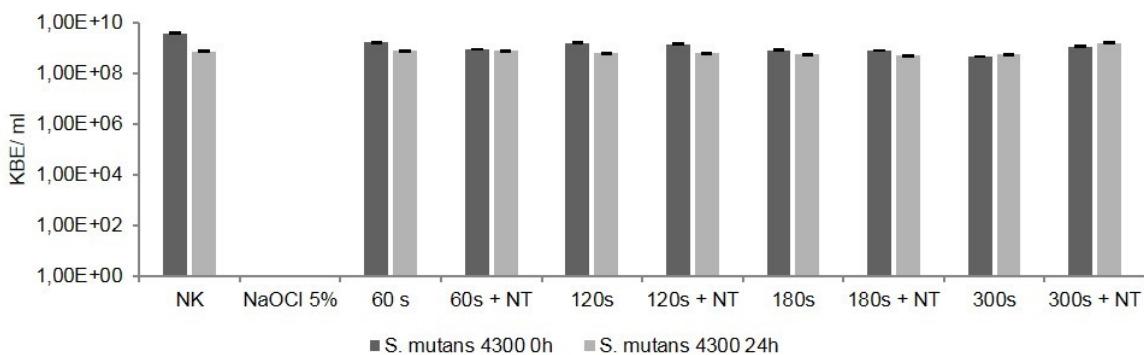


Abbildung 104: Ergebnisse der Bestimmung der LKZ von *S. mutans* 4300 nach Ozon- bzw. NaOCl-Behandlung. Die Behandlung der Kulturen mit Ozon für 60 s, 120 s, 180 s und 300 s und eine nachfolgende Neutralisierung des Ozons durch $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ zeigte keine wesentliche Änderung der Lebendkeimzahlen. Die Applikation mit NaOCl 5 % bewirkte dagegen eine Eradikation von *S. mutans* für den unmittelbaren Zeitpunkt nach Behandlung und nach einer Erholungsphase von 24 h. NK - Negativkontrolle, NT - Natriumthiosulfat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$).

ANHANG

Tabelle 18: Ergebnisse der Behandlung von *S. mutans* 4300 mit Ozon. Die Tabelle gibt die ermittelten Keimzahlen pro ml suspendiertem Biofilm sowie die Standardfehler und Signifikanzberechnung direkt nach Versuchsdurchführung und nach einer Erholungsphase von 24 h jeweils als exponentielle Werte auf der Basis von 10 wieder.^a Es erfolgte keine statistische Auswertung bei einer vollständigen Erregereradikation.

	n	Mittelwert	Standard- abweichung	Standard- fehler	95 % Konfidenzintervall für Mittelwert		p- Wert
					Untergrenze	Obergrenze	
a. Bakterium = <i>S. mutans</i> 4300, Messzeitpunkt = 0h							
Negativkontrolle	3	3,78E+09	4,64E+09	2,68E+09	-7,74E+09	1,53E+10	
NaOCl 5%	3	0,00E+00	2,28E+03	1,32E+03	-4,30E+03	7,03E+03	^a
O₃ 60s	3	1,71E+09	5,16E+08	2,98E+08	4,30E+08	2,99E+09	0,827
O₃ 60s + Na₂S₂O₃	3	9,04E+08	9,31E+08	5,38E+08	-1,41E+09	3,22E+09	0,275
O₃ 120s	3	1,59E+09	1,56E+09	8,99E+08	-2,28E+09	5,46E+09	0,513
O₃ 120s + Na₂S₂O₃	3	1,46E+09	2,00E+09	1,15E+09	-3,51E+09	6,42E+09	0,275
O₃ 180s	3	8,28E+08	6,01E+08	3,47E+08	-6,64E+08	2,32E+09	0,127
O₃ 180s + Na₂S₂O₃	3	8,1E+08	6,03E+08	3,48E+08	-6,87E+08	2,31E+09	0,275
O₃ 300s	2	4,68E+08	1,31E+08	9,25E+07	-7,08E+08	1,64E+09	0,083
O₃ 300s + Na₂S₂O₃	2	1,16E+09	5,87E+08	4,15E+08	-4,11E+09	6,43E+09	0,564
b. Bakterium = <i>S. mutans</i> 4300, Messzeitpunkt = 24h							
Negativkontrolle	3	7,28E+08	5,58E+08	3,22E+08	-6,59E+08	2,11E+09	
NaOCl 5%	3	0,00E+00	2,95E+08	1,70E+08	-4,14E+07	1,43E+09	^a
O₃ 60s	3	7,87E+08	4,45E+08	2,57E+08	-3,18E+08	1,89E+09	0,658
O₃ 60s + Na₂S₂O₃	3	7,77E+08	4,33E+08	2,50E+08	-2,98E+08	1,85E+09	0,827
O₃ 120s	3	6,32E+08	3,41E+08	1,97E+08	-2,15E+08	1,48E+09	0,827
O₃ 120s + Na₂S₂O₃	3	6,28E+08	1,03E+08	5,95E+07	3,72E+08	8,84E+08	0,513
O₃ 180s	3	5,68E+08	4,75E+08	2,74E+08	-6,12E+08	1,75E+09	0,827
O₃ 180s + Na₂S₂O₃	3	4,95E+08	3,96E+08	2,29E+08	-4,90E+08	1,48E+09	0,513
O₃ 300s	3	5,67E+08	3,47E+08	2,00E+08	-2,95E+08	1,43E+09	0,513
O₃ 300s + Na₂S₂O₃	3	1,59E+09	8,41E+08	4,86E+08	-5,05E+08	3,68E+09	0,275

ANHANG

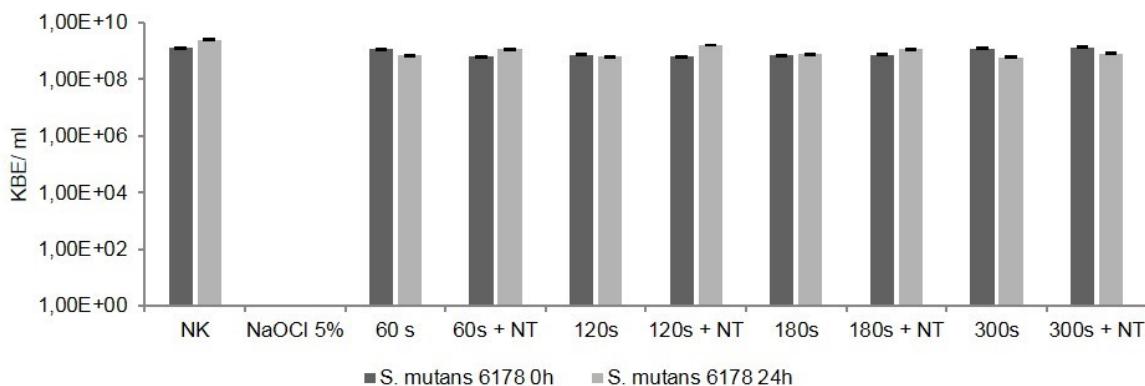


Abbildung 19a und b: Ergebnisse der Bestimmung der LKZ von *S. mutans* 6178 nach Ozon- bzw. NaOCl-Behandlung. Die Behandlung der Kulturen mit Ozon für 60 s, 120 s, 180 s und 300 s und eine nachfolgende Neutralisierung des Ozons durch Na₂S₂O₃ zeigte keine wesentliche Änderung der Lebendkeimzahlen. Die Applikation mit NaOCl 5 % bewirkte dagegen eine Eradikation von *S. mutans* für den unmittelbaren Zeitpunkt nach Behandlung und nach einer Erholungsphase von 24 h. NK - Negativkontrolle, NT - Natriumthiosulfat (Na₂S₂O₃).

Tabelle 19a und b: Ergebnisse der Behandlung von *S. mutans* 6178 mit Ozon. Die Tabelle gibt die ermittelten Keimzahlen pro ml suspendiertem Biofilm sowie die Standardfehler und Signifikanzberechnung direkt nach Versuchsdurchführung und nach einer Erholungsphase von 24 h jeweils als exponentielle Werte auf der Basis von 10 wieder.^a Es erfolgte keine statistische Auswertung bei einer vollständigen Erregereradikation.

Tabelle 19a	n	Mittelwert	Standard-abweichung	Standard-fehler	95 % Konfidenzintervall für Mittelwert		p-Wert
					Untergrenze	Obergrenze	
a. Bakterium = <i>S. mutans</i> 6178, Messzeitpunkt = 0h							
Negativkontrolle	3	1,27E+09	1,59E+09	9,16E+08	-2,67E+09	5,21E+09	
NaOCl 5%	3	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	- ^a
O₃ 60s	3	1,18E+09	1,65E+09	9,55E+08	-2,92E+09	5,29E+09	0,513
O₃ 60s + Na₂S₂O₃	3	6,21E+08	2,74E+08	1,58E+08	-6,04E+07	1,30E+09	0,658
O₃ 120s	3	7,42E+08	5,96E+08	3,44E+08	-7,40E+08	2,22E+09	0,827
O₃ 120s + Na₂S₂O₃	3	6,17E+08	1,95E+08	1,13E+08	1,33E+08	1,10E+09	0,513
O₃ 180s	3	7,00E+08	4,37E+08	2,52E+08	-3,86E+08	1,79E+09	0,827
O₃ 180s + Na₂S₂O₃	3	7,25E+08	6,03E+08	3,48E+08	-7,73E+08	2,22E+09	0,827
O₃ 300s	3	1,24E+09	1,44E+09	8,32E+08	-2,34E+09	4,82E+09	0,827
O₃ 300s + Na₂S₂O₃	3	1,37E+09	1,53E+09	8,82E+08	-2,42E+09	5,17E+09	1

ANHANG

Tabelle 19b	n	Mittelwert	Standard-abweichung	Standard-fehler	95 % Konfidenzintervall für Mittelwert		p-Wert
					Untergrenze	Obergrenze	
b. Bakterium = <i>S. mutans</i> 6178, Messzeitpunkt = 24h							
Negativkontrolle	3	2,42E+09	3,35E+09	1,93E+09	-5,90E+09	1,07E+10	
NaOCl 5%	3	1,37E+01	2,37E+01	1,37E+01	-4,51E+01	7,25E+01	0,046
O₃ 60s	3	7,03E+08	8,61E+07	4,97E+07	4,90E+08	9,17E+08	0,827
O₃ 60s + Na₂S₂O₃	3	1,16E+09	4,68E+08	2,70E+08	-1,27E+06	2,32E+09	0,513
O₃ 120s	3	6,13E+08	2,03E+08	1,17E+08	1,08E+08	1,12E+09	0,827
O₃ 120s + Na₂S₂O₃	3	1,61E+09	4,80E+08	2,77E+08	4,13E+08	2,80E+09	0,513
O₃ 180s	3	7,8E+08	3,52E+08	2,03E+08	-9,37E+07	1,65E+09	0,827
O₃ 180s + Na₂S₂O₃	3	1,13E+09	8,70E+08	5,02E+08	-1,03E+09	3,29E+09	0,827
O₃ 300s	3	6,08E+08	2,98E+08	1,72E+08	-1,31E+08	1,35E+09	0,513
O₃ 300s + Na₂S₂O₃	3	8,23E+08	2,81E+08	1,63E+08	1,24E+08	1,52E+09	0,827

7.3.2. zu 3.6.2. Die Wirkung von Ozon auf die Isolate *E. faecalis* DSMZ 20478 und *E. faecalis* 4300

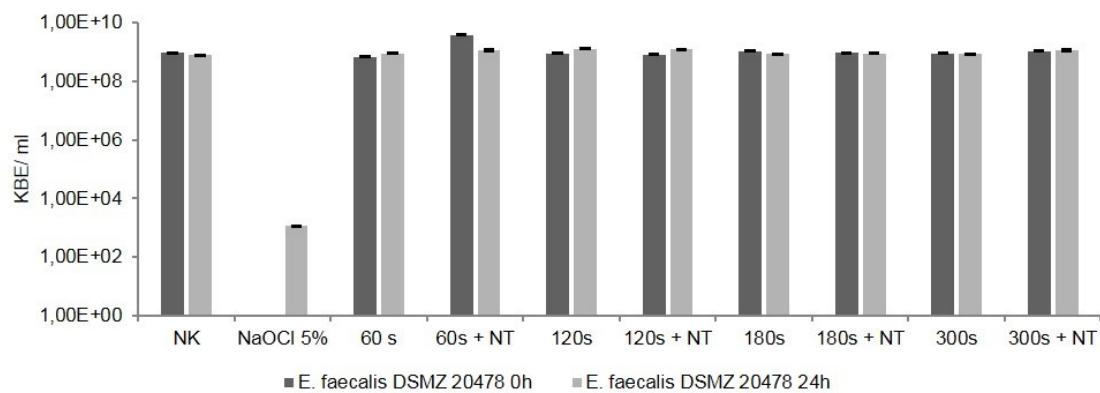


Abbildung 106: Ergebnisse der LKZ-Bestimmung von *E. faecalis* DSMZ 20478. Die Behandlung der Kulturen mit Ozonapplikation 60 s, 120 s, 180 s und 300 s und eine nachfolgende Neutralisierung des Ozons zeigte keine Änderung der Lebendkeimzahlen. Die Applikation mit NaOCl 5 % konnte eine verminderte Lebendkeimzahl produzieren. Nach einer Erholungsphase von 24 h erfolgte hier jedoch der erneute Nachweis eines Wachstums. Legende: NK - Negativkontrolle, NT - Natriumthiosulfat (Na₂S₂O₃).

ANHANG

Tabelle 20: Ergebnisse der Behandlung von *E. faecalis* DSMZ 20478 mit Ozon. Die Tabelle gibt die ermittelten Keimzahlen pro ml suspendierten Biofilm sowie die Standardfehler und Signifikanzberechnung direkt nach Versuchsdurchführung und nach einer Erholungsphase von 24 h als exponentielle Werte auf der Basis von 10 wieder.^a Es erfolgte keine statistische Auswertung bei einer vollständigen Erregereradikation.^b Statistische Signifikanz bei einem 5 % Signifikanzniveau.

	n	Mittelwert	Standard-abweichung	Standard-fehler	95 % Konfidenzintervall für Mittelwert		p-Wert
					Untergrenze	Obergrenze	
a. Bakterium = <i>E.faecalis</i> DSMZ 20478, Messzeitpunkt = 0h							
Negativkontrolle	3	9,32E+08	8,81E+07	5,09E+07	7,13E+08	1,15E+09	
NaOCl 5%	3	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,05
O₃ 60s	3	6,75E+08	2,53E+08	1,46E+08	4,67E+07	1,30E+09	0,077
O₃ 60s + Na₂S₂O₃	3	3,72E+09	5,36E+09	3,09E+09	-9,59E+09	1,70E+10	0,827
O₃ 120s	3	8,7E+08	3,55E+07	2,05E+07	7,81E+08	9,58E+08	0,275
O₃ 120s + Na₂S₂O₃	3	7,9E+08	3,91E+08	2,26E+08	-1,82E+08	1,76E+09	0,827
O₃ 180s	3	1,06E+09	3,72E+08	2,15E+08	1,30E+08	1,98E+09	0,827
O₃ 180s + Na₂S₂O₃	3	9,3E+08	4,37E+08	2,52E+08	-1,56E+08	2,02E+09	0,827
O₃ 300s	3	8,77E+08	1,01E+08	5,81E+07	6,27E+08	1,13E+09	0,513
O₃ 300s + Na₂S₂O₃	2	1,12E+09	2,83E+08	2,00E+08	-1,42E+09	3,66E+09	0,374
b. Bakterium = <i>E.faecalis</i> 20478, Messzeitpunkt = 24h							
Negativkontrolle	3	7,67E+08	4,73E+07	2,73E+07	6,49E+08	8,84E+08	
NaOCl 5%	2	1,17E+03	1,51E+03	1,07E+03	-1,24E+04	1,47E+04	0,046
O₃ 60s	3	8,87E+08	1,34E+08	7,75E+07	5,53E+08	1,22E+09	0,127
O₃ 60s + Na₂S₂O₃	3	1,13E+09	3,25E+08	1,88E+08	3,22E+08	1,94E+09	0,05
O₃ 120s	3	1,25E+09	6,17E+08	3,56E+08	-2,82E+08	2,78E+09	0,05
O₃ 120s + Na₂S₂O₃	3	1,23E+09	1,64E+08	9,46E+07	8,18E+08	1,63E+09	0,05
O₃ 180s	3	8,48E+08	6,75E+07	3,90E+07	6,81E+08	1,02E+09	0,127
O₃ 180s + Na₂S₂O₃	3	8,95E+08	4,09E+07	2,36E+07	7,93E+08	9,97E+08	0,05
O₃ 00s	3	8,27E+08	5,86E+07	3,38E+07	6,81E+08	9,72E+08	0,127
O₃ 300s + Na₂S₂O₃	4	1,09E+09	2,46E+08	1,23E+08	6,95E+08	1,48E+09	0,83

ANHANG

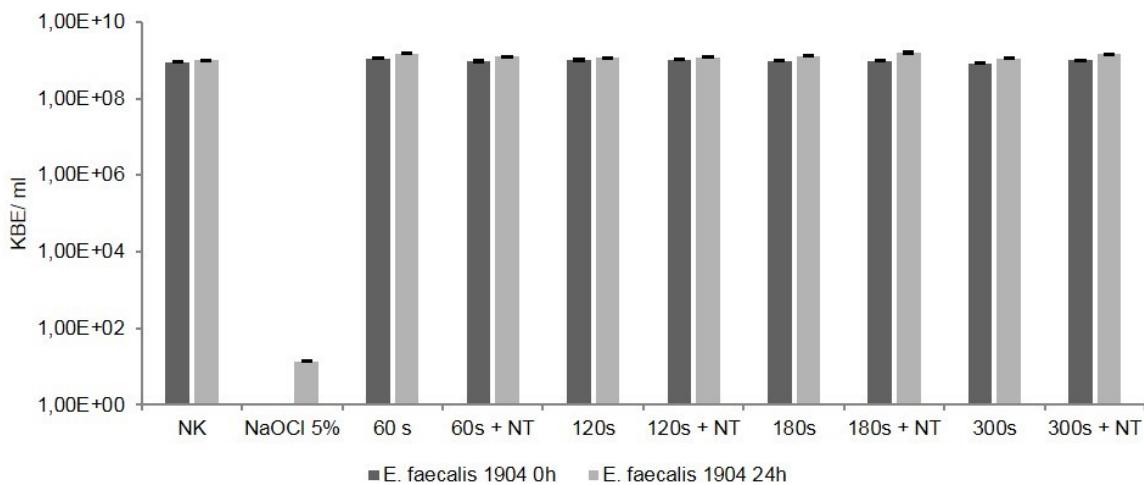


Abbildung 107: Ergebnisse der LKZ-Bestimmung von *E. faecalis* 1904. Die Behandlung der Kulturen mit Ozonapplikation 60 s, 120 s, 180 s und 300 s und eine nachfolgende Neutralisierung des Ozons zeigte keine Änderung der Lebendkeimzahlen. Die Applikation mit NaOCl 5 % konnte eine verminderte Lebendkeimzahl produzieren. Nach einer Erholungsphase von 24 h erfolgte hier jedoch der erneute Nachweis eines Wachstums. Legende: NK - Negativkontrolle, NT - Natriumthiosulfat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$).

Tabelle 21a und b: Ergebnisse der Behandlung von *E. faecalis* 1904 mit Ozon. Die Tabelle gibt die ermittelten Keimzahlen pro ml suspendierten Biofilm sowie die Standardfehler und Signifikanzberechnung direkt nach Versuchsdurchführung und nach einer Erholungsphase von 24 h als exponentielle Werte auf der Basis von 10 wieder.^a Es erfolgte keine statistische Auswertung bei einer vollständigen Erregereradikation.^b Statistische Signifikanz bei einem 5 % Signifikanzniveau.

Tabelle 21a	n	Mittel-wert	Standard-abweichung	Standard-fehler	95 % Konfidenzintervall für Mittelwert		
					Unter-grenze	Ober-grenze	p-Wert
a. Bakterium = <i>E. faecalis</i> 1904, Messzeitpunkt = 0h							
Negativkontrolle	3	8,92E+08	4,25E+07	2,46E+07	7,86E+08	9,97E+08	
NaOCl 5%	3	4,00E+00	6,93E+00	4,00E+00	-1,32E+01	2,12E+01	0,046
O₃ 60s	3	1,13E+09	3,58E+08	2,07E+08	2,37E+08	2,02E+09	0,268
O₃ 60s + Na₂S₂O₃	3	9,43E+08	2,83E+08	1,63E+08	2,41E+08	1,65E+09	0,513
O₃ 120s	3	1,01E+09	2,57E+08	1,48E+08	3,70E+08	1,65E+09	1
O₃ 120s + Na₂S₂O₃	3	1,05E+09	2,14E+08	1,24E+08	5,19E+08	1,58E+09	0,184
O₃ 180s	3	9,60E+08	2,34E+08	1,35E+08	3,78E+08	1,54E+09	0,513
O₃ 180s + Na₂S₂O₃	3	9,70E+08	8,72E+07	5,03E+07	7,54E+08	1,19E+09	0,268
O₃ 300s	3	8,37E+08	5,03E+07	2,91E+07	7,12E+08	9,62E+08	0,184
O₃ 300s + Na₂S₂O₃	3	9,95E+08	7,34E+07	4,24E+07	8,13E+08	1,18E+09	0,05

Tabelle 21b	n	Mittelwert	Standard-abweichung	Standardfehler	95 % Konfidenzintervall für Mittelwert		
					Untergrenze	Obergrenze	p-Wert
b. Bakterium = <i>E.faecalis</i> 1904, Messzeitpunkt = 24h							
Negativkontrolle	3	9,96E+08	6,17E+08	3,56E+08	-5,37E+08	2,53E+09	
NaOCl 5%	3	3,57E+05	2,21E+05	1,27E+05	-1,92E+05	9,05E+05	0,05
O₃ 60s	3	1,52E+09	1,03E+09	5,92E+08	-1,03E+09	4,06E+09	0,827
O₃ 60s + Na₂S₂O₃	3	1,22E+09	4,13E+08	2,38E+08	1,98E+08	2,25E+09	0,827
O₃ 120s	3	1,15E+09	1,36E+08	7,86E+07	8,08E+08	1,48E+09	0,827
O₃ 120s + Na₂S₂O₃	3	1,19E+09	9,02E+07	5,21E+07	9,69E+08	1,42E+09	0,513
O₃ 180s	3	1,29E+09	4,10E+08	2,37E+08	2,75E+08	2,31E+09	0,513
O₃ 180s + Na₂S₂O₃	3	1,57E+09	1,53E+08	8,82E+07	1,19E+09	1,95E+09	0,127
O₃ 300s	3	1,11E+09	2,08E+08	1,20E+08	5,93E+08	1,63E+09	0,827
O₃ 300s + Na₂S₂O₃	3	1,43E+09	2,08E+08	1,20E+08	9,16E+08	1,95E+09	0,275

7.4. zu 3.7. Kombinierte Behandlung der Biofilme mit Ozon, Natriumhypochlorit und Natriumthiosulfat unter aeroben Verhältnissen

7.4.1. zu 3.7.1. Resultate der sequentiellen Wirkung von Ozon und Natriumhypochlorit auf *S. mutans* 4300 und *S. mutans* 6178

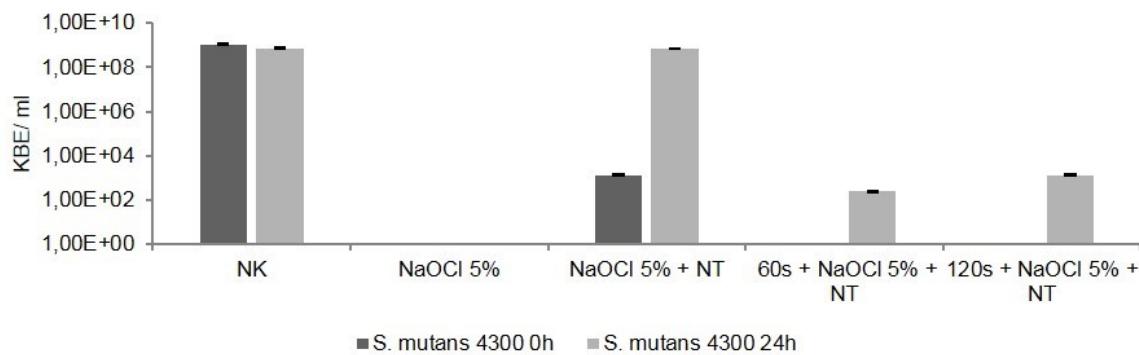


Abbildung 108: Ergebnisse der kombinierten Behandlung mit Ozon/ NaOCl/ Na₂S₂O₃ von *S. mutans* 4300 direkt nach Durchführung des Versuchs und nach 24 Stunden Inkubationszeit. NK - Negativkontrolle, NT - Natriumthiosulfat (Na₂S₂O₃).

Tabelle 22: Ergebnisdarstellung und Statistik zur Exposition von *S. mutans* 4300 gegenüber verschiedenen desinfizierenden Agenzien direkt nach der Exposition (0 h) und nach 24 Stunden Erholungsphase. Die Tabelle gibt die ermittelten Keimzahlen

ANHANG

pro ml suspendierten Biofilm sowie die Standardfehler und Signifikanzberechnung direkt nach Versuchsdurchführung und nach einer Erholungsphase von 24 h als exponentielle Werte auf der Basis von 10 wieder.^a Keine statistische Auswertung bei einer 100 %-igen Eradikation;^b Statistische Signifikanz bei einem 5 % Signifikanzniveau.

	n	Mittelwert	Standard- abweichung	Standard- fehler	95 % Konfidenzintervall für Mittelwert		
					Unter- grenze	Ober- grenze	p- Wert
a. Bakterium = <i>S. mutans</i> 4300, Messzeitpunkt = 0h							
Negativ- kontrolle	3	1,05E+09	5,12E+08	2,95E+08	-2,23E+08	2,32E+09	
NaOCl 5%	3	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	- ^b
NaOCl 5% + Na₂S₂O₃	3	1,37E+03	2,28E+03	1,32E+03	-4,30E+03	7,03E+03	0,05
O₃ 60s							
NaOCl 5% + Na₂S₂O₃	3	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	- ^b
O₃ 120s + NaOCl 5% + Na₂S₂O₃	3	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	- ^b
b. Bakterium = <i>S. mutans</i> 4300, Messzeitpunkt = 24h							
Negativ- kontrolle	3	7,01E+08	1,80E+08	1,04E+08	2,53E+08	1,15E+09	
NaOCl 5%	3	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	- ^b
NaOCl 5% + Na₂S₂O₃	3	6,92E+08	2,95E+08	1,70E+08	-4,14E+07	1,43E+09	0,827
O₃ 60s + NaOCl 5% + Na₂S₂O₃	3	2,40E+02	2,51E+02	1,45E+02	-3,83E+02	8,63E+02	0,05
O₃ 120s + NaOCl 5% + Na₂S₂O₃	3	1,37E+03	1,69E+03	9,74E+02	-2,82E+03	5,56E+03	0,05

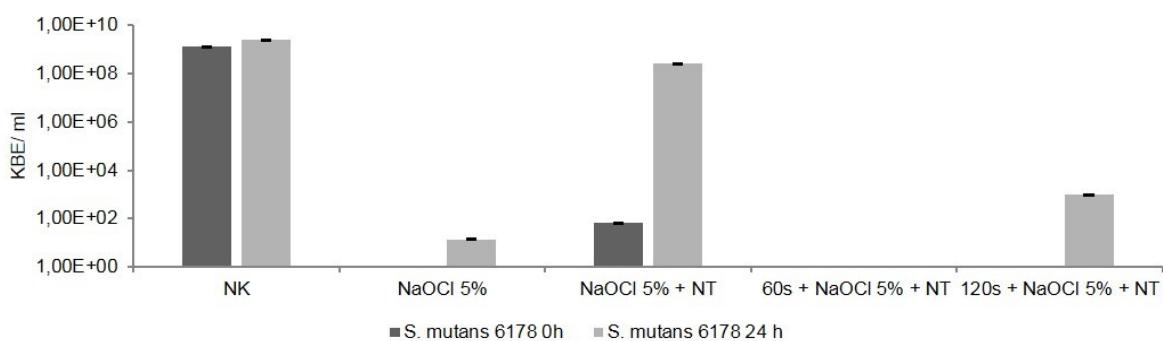


Abbildung 109: Ergebnisse der kombinierten Behandlung mit Ozon/ NaOCl/ Na₂S₂O₃ von *S. mutans* 6178 direkt nach Durchführung des Versuchs und nach 24 Stunden Inkubationszeit. NK - Negativkontrolle, NT - Natriumthiosulfat (Na₂S₂O₃).

ANHANG

Tabelle 23: Ergebnisdarstellung und Statistik zur Exposition von *S. mutans* 6178 gegenüber verschiedenen desinfizierenden Agenzien direkt nach der Exposition (0 h) und nach 24 Stunden Erholungsphase. Die Tabelle gibt die ermittelten Keimzahlen pro ml suspendierten Biofilm sowie die Standardfehler und Signifikanzberechnung direkt nach Versuchsdurchführung und nach einer Erholungsphase von 24 h als exponentielle Werte auf der Basis von 10 wieder.^a Keine statistische Auswertung bei einer 100 %igen Eradikation;^b Statistische Signifikanz bei einem 5 % Signifikanzniveau.

	n	Mittelwert	Standard-abweichung	Standard-fehler	95 % Konfidenzintervall für Mittelwert			p-Wert
					Untergrenze	Obergrenze		
a. Bakterium = <i>S. mutans</i> 6178, Messzeitpunkt = 0h								
Negativ-kontrolle	3	1,27E+09	1,59E+09	9,16E+08	-2,67E+09	5,21E+09		
NaOCl 5%	3	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	- ^b	
NaOCl 5% + Na₂S₂O₃	3	6,67E+01	1,15E+02	6,67E+01	-2,20E+02	3,54E+02	0,046 ^a	
O₃ 60s + NaOCl 5% + Na₂S₂O₃	3	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	- ^b	
O₃ 120s + NaOCl 5% + Na₂S₂O₃	3	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	- ^b	
b. Bakterium = <i>S. mutans</i> 6178, Messzeitpunkt = 24h								
Negativ-kontrolle	3	2,42E+09	3,35E+09	1,93E+09	-5,90E+09	1,07E+10		
NaOCl 5%	3	1,37E+01	2,37E+01	1,37E+01	-4,51E+01	7,25E+01	0,046 ^a	
NaOCl 5% + Na₂S₂O₃	3	2,54E+08	3,08E+08	1,78E+08	-5,11E+08	1,02E+09	0,127	
O₃ 60s + NaOCl 5% + Na₂S₂O₃	3	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	- ^b	
O₃ 120s + NaOCl 5% + Na₂S₂O₃	3	9,50E+02	9,66E+02	5,58E+02	-1,45E+03	3,35E+03	0,05 ^a	

7.4.2. zu 3.7.2. Resultate der sequentiellen Wirkung von Ozon und Natriumhypochlorit auf *E. faecalis* DSMZ 20478 und *E. faecalis* 1904

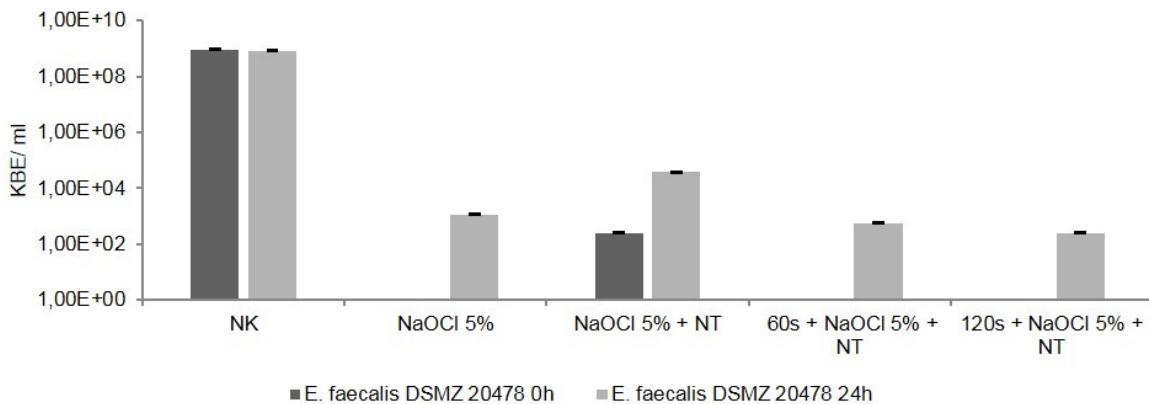


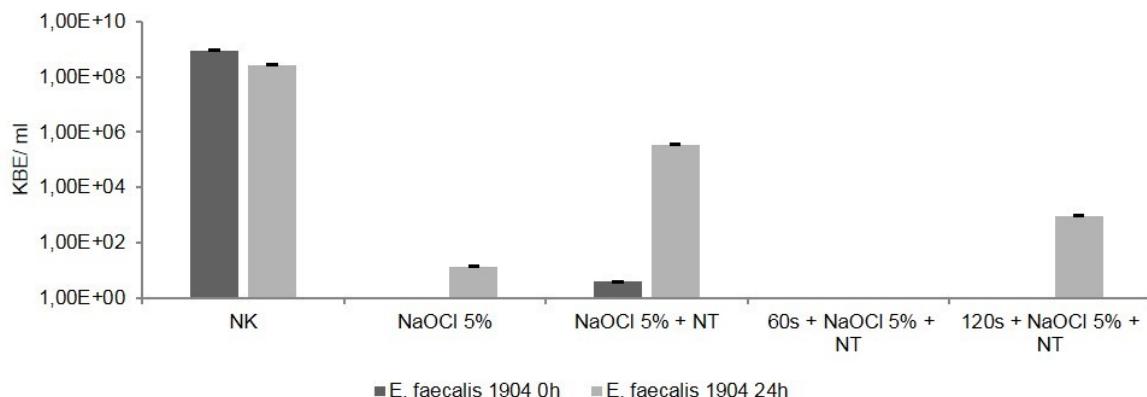
Abbildung 110: Ergebnisse der kombinierten Behandlung mit Ozon/ NaOCl/ Na₂S₂O₃ von *E. faecalis* DSMZ 20478 direkt nach Durchführung des Versuchs und nach 24 Stunden Erholungsphase. NK - Negativkontrolle, NT - Natriumthiosulfat (Na₂S₂O₃).

Tabelle 24a und b: Ergebnisdarstellung und Statistik zur Exposition *E. faecalis* DSMZ 20478 gegenüber verschiedenen desinfizierenden Agenzien direkt nach der Exposition (0 h) und nach 24 Stunden Erholungsphase. Die Tabelle gibt die ermittelten Keimzahlen pro ml sowie die Standardfehler und Signifikanzberechnung direkt nach Versuchsdurchführung und nach einer Erholungsphase von 24 h als exponentielle Werte auf der Basis von 10 wieder.^a Keine statistische Auswertung bei einer 100 %-igen Eradikation;^b Statistische Signifikanz bei einem 5 % Signifikanzniveau.

Tabelle 24a	n	Mittelwert	Standard-abweichung	Standard-fehler	95 % Konfidenzintervall für Mittelwert			p-Wert
					Unter-grenze	Ober-grenze		
a. Bakterium = <i>E. faecalis</i> DSMZ 20478, Messzeitpunkt = 0h								
Negativkontrolle	3	9,32E+08	8,81E+07	5,09E+07	7,13E+08	1,15E+09		
NaOCl 5%	3	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	- ^b	
NaOCl 5% + Na₂S₂O₃	3	2,44E+02	3,10E+02	1,79E+02	-5,27E+02	1,01E+03	0,05 ^a	
O₃ 60s + NaOCl 5% + Na₂S₂O₃	3	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	- ^b	
O₃ 120s + NaOCl 5% + Na₂S₂O₃	3	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	- ^b	

ANHANG

Tabelle 24b	n	Mittelwert	Standard-abweichung	Standard-fehler	95 % Konfidenzintervall für Mittelwert			p-Wert
					Unter-grenze	Ober-grenze		
b. Bakterium = <i>E.faecalis</i> DSMZ 20478, Messzeitpunkt = 24h								
Negativkontrolle	3	8,38E+08	5,48E+07	3,17E+07	7,02E+08	9,75E+08		
NaOCl 5%	2	1,17E+03	1,51E+03	1,07E+03	-1,24E+04	1,47E+04	0,83	
NaOCl 5% + Na₂S₂O₃	3	3,71E+04	2,95E+04	1,71E+04	-3,63E+04	1,10E+05	0,05 ^a	
O₃ 60s + NaOCl 5% + Na₂S₂O₃	3	5,67E+02	6,03E+02	3,48E+02	-9,31E+02	2,06E+03	0,05 ^a	
O₃ 120s + NaOCl 5% + Na₂S₂O₃	3	2,50E+02	4,33E+02	2,50E+02	-8,26E+02	1,33E+03	0,046 ^a	

Abbildung 111: Ergebnisse der kombinierten Behandlung mit Ozon/ NaOCl/ Na₂S₂O₃ von *E. faecalis* 1904 direkt nach Durch-

führung des Versuchs und nach 24 Stunden Erholungsphase. NK - Negativkontrolle, NT - Natriumthiosulfat (Na₂S₂O₃).

ANHANG

Tabelle 24: Ergebnisdarstellung und Statistik zur Exposition *E. faecalis* 1904 gegenüber verschiedenen desinfizierenden Agenzien direkt nach der Exposition (0 h) und nach 24 Stunden Erholungsphase. Die Tabelle gibt die ermittelten Keimzahlen pro ml sowie die Standardfehler und Signifikanzberechnung direkt nach Versuchsdurchführung und nach einer Erholungsphase von 24 h als exponentielle Werte auf der Basis von 10 wieder.^a Keine statistische Auswertung bei einer 100 %-igen Eradikation;^b Statistische Signifikanz bei einem 5 % Signifikanzniveau.

	n	Mittelwert	Standard-abweichung	Standard-fehler	95 % Konfidenzintervall für Mittelwert			p-Wert
					Unter-grenze	Ober-grenze		
a. Bakterium = <i>E.faecalis</i> 1904, Messzeitpunkt = 0h								
Negativkontrolle	3	8,92E+08	4,25E+07	2,46E+07	7,86E+08	9,97E+08		
NaOCl 5%	3	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	- ^b	
NaOCl 5% + Na₂S₂O₃	3	4,00E+00	6,93E+00	4,00E+00	-1,32E+01	2,12E+01	0,046 ^a	
O₃ 60s + NaOCl 5% + Na₂S₂O₃	3	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	- ^b	
O₃ 120s + NaOCl 5% + Na₂S₂O₃	3	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	- ^b	
b. Bakterium = <i>E.faecalis</i> 1904, Messzeitpunkt = 24h								
Negativkontrolle	3	2,66E+08	1,58E+07	9,13E+06	2,27E+08	3,06E+08		
NaOCl 5%	3	1,37E+01	2,37E+01	1,37E+01	-4,51E+01	7,25E+01	0,046 ^a	
NaOCl 5% + Na₂S₂O₃	3	3,57E+05	2,21E+05	1,27E+05	-1,92E+05	9,05E+05	0,05 ^a	
O₃ 60s + NaOCl 5% + Na₂S₂O₃	3	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	- ^b	
O₃ 120s + NaOCl 5% + Na₂S₂O₃	3	9,17E+02	1,01E+03	5,83E+02	-1,59E+03	3,43E+03	0,05 ^a	

7.5. zu 3.8 Ergebnisse der Rasterelektronenmikroskopienach *in vitro* Ozon-Applikation auf *S. mutans*- bzw. *E. faecalis*-Biofilmstrukturen unter aeroben Verhältnissen

7.5.1. zu 3.8.1. Ergebnisse der REM-Analyse von *S. mutans* 6178

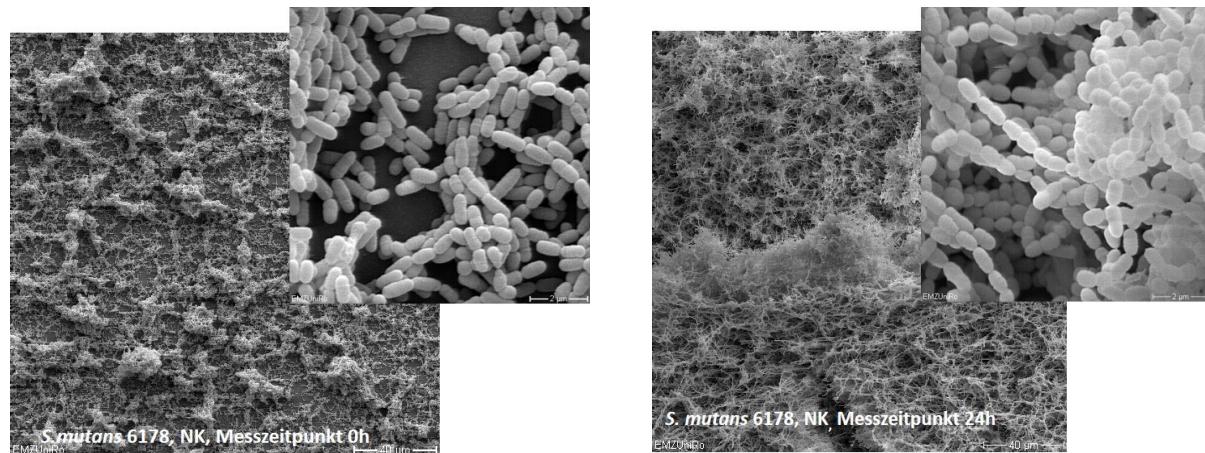


Abbildung 112 a+b: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Negativkontrolle des *S. mutans* Stamms 6178. Vergrößerung 500x und 10.000x; Aufnahmen exemplarisch für die Messzeitpunkte 0 h und nach 24 h Erholungsphase. An beiden Tagen bildete sich an der Oberfläche ein mehrschichtiger Biofilm, der die Oberfläche komplett bedeckte.

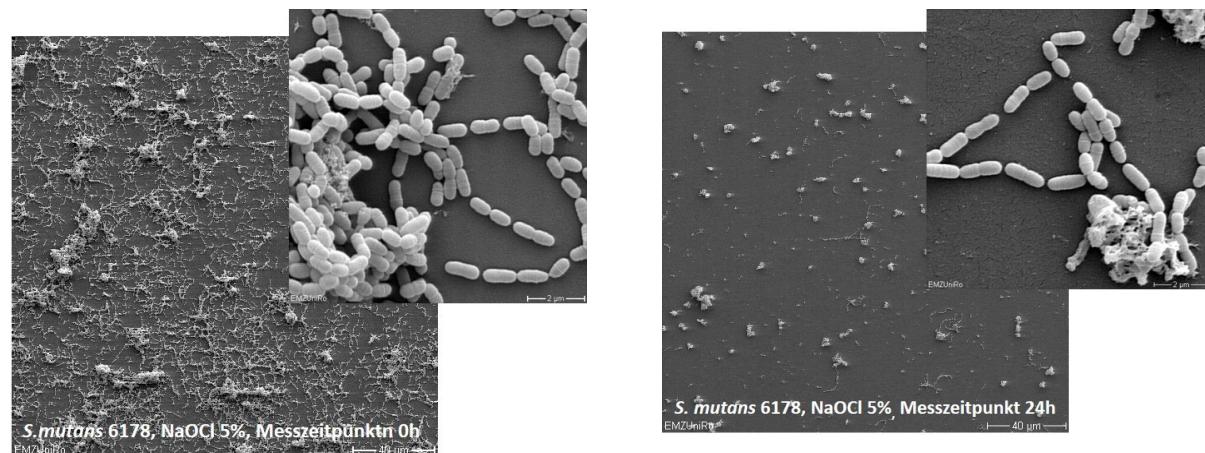


Abbildung 113 a+b: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Positivkontrolle (NaOCl 5 %) des *S. mutans* Stamms 6178. Vergrößerung 500x und 10.000x; Aufnahmen exemplarisch für die Messzeitpunkte 0 h und nach 24 h Erholungsphase. Unmittelbar nach der Untersuchung wurden an der Oberfläche gleichmäßig vereinzelte Zellen mit „Klumpenformation“ beobachtet. Die abgebildeten Kristalle sind als Artefakte der Natriumhypochloritbehandlung zu werten. Nach der 24-stündigen Erholungsphase ließen sich an der Oberfläche nur noch vereinzelte und im Vergleich zum Messzeitpunkt 0 h deutlich weniger Zellen auf der Oberfläche nachweisen.

ANHANG

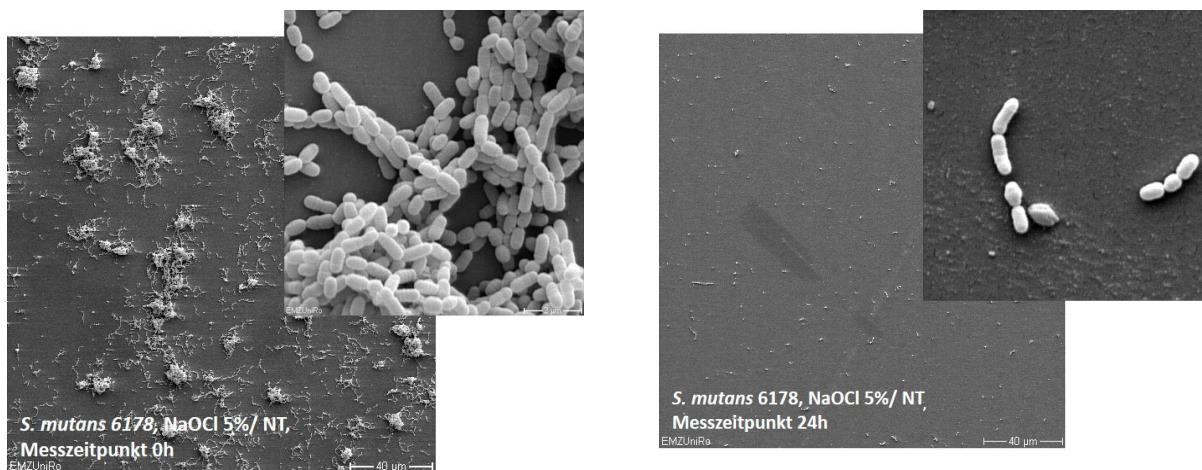


Abbildung 114 a+b: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des Versuchsansatzes mit Exposition gegen NaOCl 5 % und Na₂O₃ des *S. mutans* Stamms 6178. Vergrößerung 500x und 10.000x; Aufnahmen exemplarisch für die Messzeitpunkte 0 h und nach 24 h Erholungsphase. Auf der Oberfläche ließen sich zu beiden Zeitpunkten lediglich vereinzelte, teilweise deformierte Zellen dokumentieren.

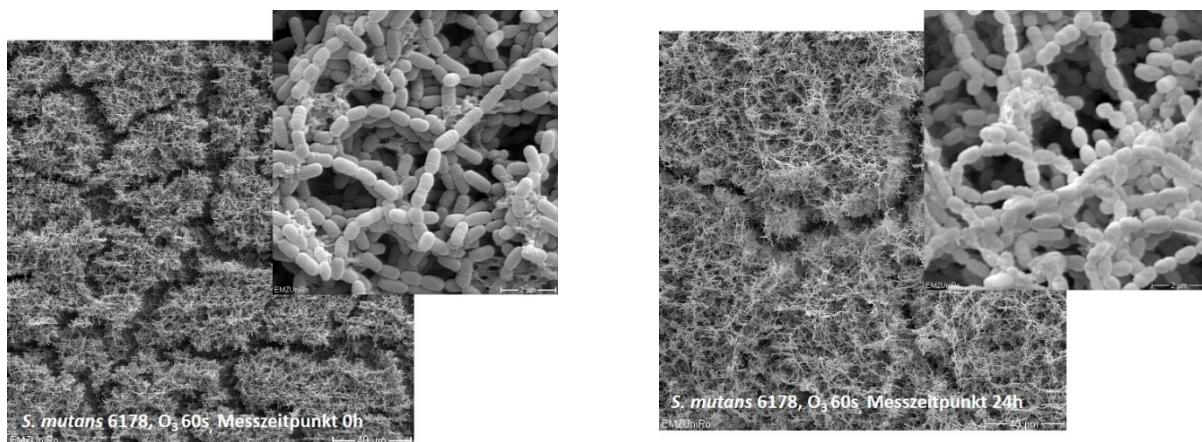


Abbildung 115 a+b: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des Versuchsansatzes mit 60 s O₃-Exposition des *S. mutans* Stamms 6178. Vergrößerung 500x und 10.000x; Aufnahmen exemplarisch für die Messzeitpunkte 0 h und nach 24 h Erholungsphase. Nach der O₃-Behandlung über 60 s konnte zu beiden Messzeitpunkten ein mehrschichtiger Zellrasen, der komplett die Oberfläche bedeckte, nachgewiesen werden.

ANHANG

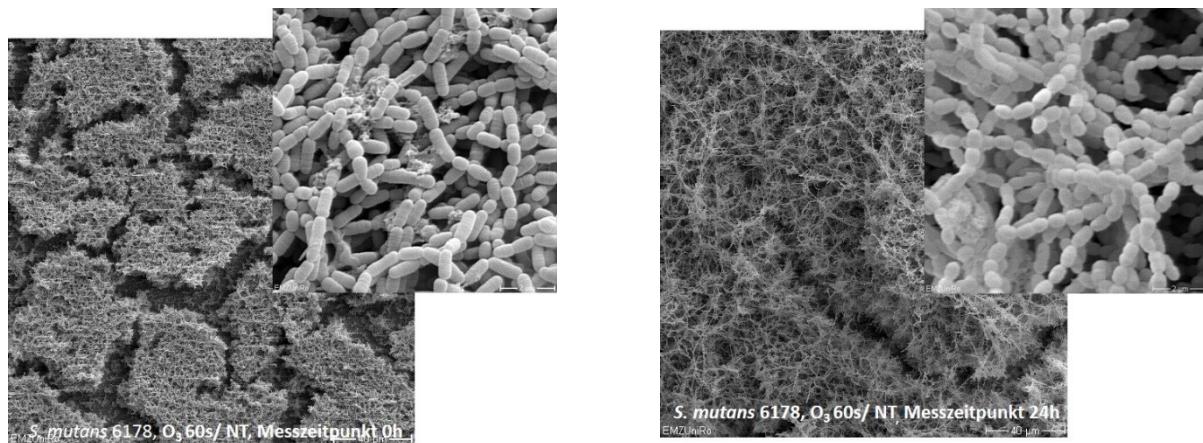


Abbildung 116 a+b: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des Versuchsansatzes mit 60 s O₃-Exposition und Na₂O₃-Behandlung des *S. mutans* Stamms 6178. Vergrößerung 500x und 10.000x; Aufnahmen exemplarisch für die Messzeitpunkte 0 h und nach 24 h Erholungsphase. Nach der Behandlung mit O₃ über 60 s und nachfolgend mit Na₂O₃ war zu beiden Messzeitpunkten ein mehrschichtiger Zellrasen, der komplett die Oberfläche bedeckte, nachweisbar.

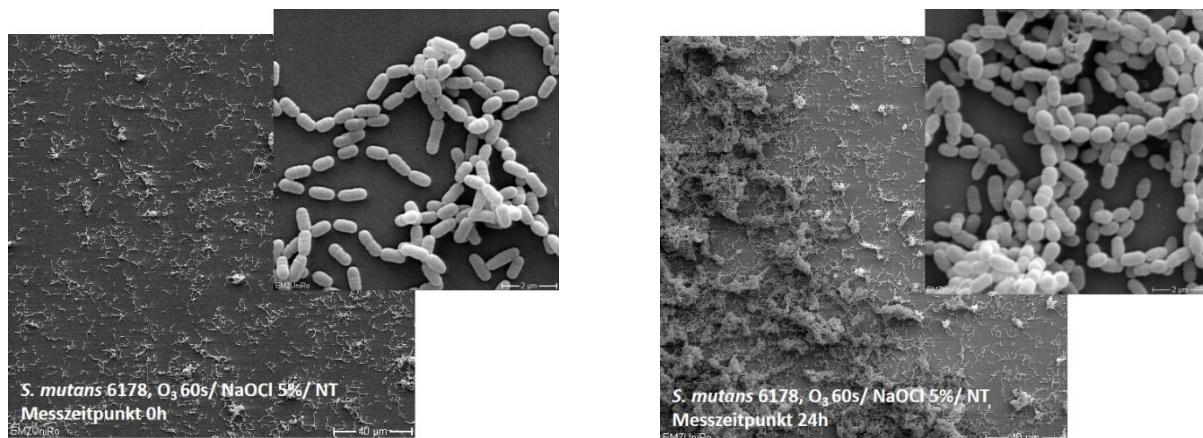


Abbildung 117 a+b: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des Versuchsansatzes des *S. mutans* Stamms 6178 mit O₃-Exposition über 60 s, sowie gegen NaOCl und Na₂O₃. Vergrößerung 500x und 10.000x; Aufnahmen exemplarisch für die Messzeitpunkte 0 h und nach 24 h Erholungsphase. Unmittelbar nach der kombinierten Behandlung waren auf der Oberfläche vereinzelte, teils in Zellklumpen zusammen gelagerte, Zellen zu beobachten. Zum Messzeitpunkt 24 h zeigte sich eine Zunahme der Zellen. Die Oberfläche ist gleichmäßig und zum Teil mit mehrschichtigen Zellnestern besiedelt.

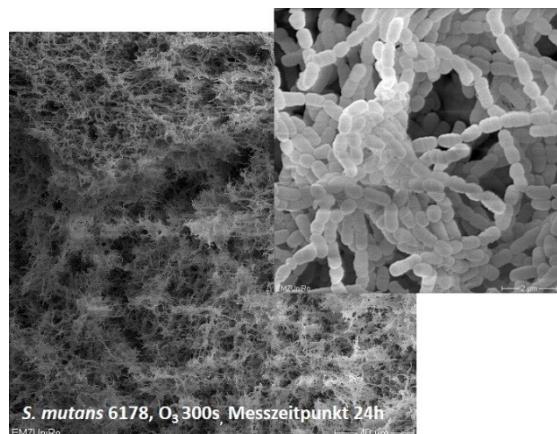
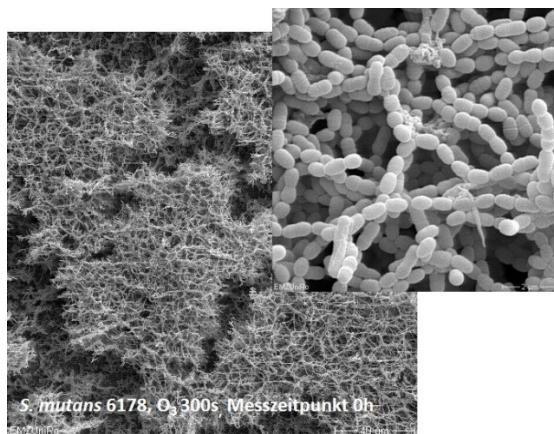


Abbildung 118 a+b: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des Versuchsansatzes mit O₃-Exposition über 300 s des *S. mutans* Stamms 6178. Vergrößerung 500x und 10.000x; Aufnahmen exemplarisch für die Messzeitpunkte 0 h und nach 24 h Erholungsphase. Nach der O₃-Behandlung über 300 s war zu beiden Messzeitpunkten ein mehrschichtiger Zellrasen, der komplett die Oberfläche bedeckte, nachweisbar.

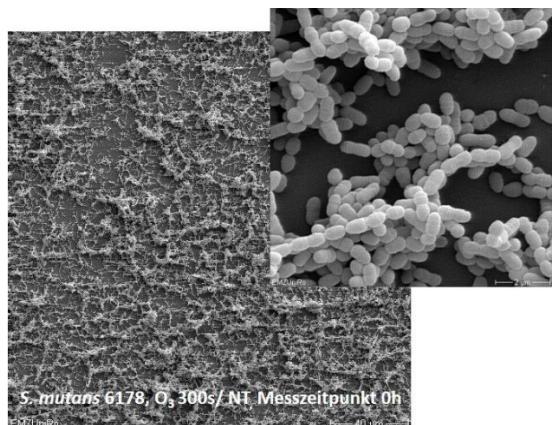


Abbildung 119: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des Versuchsansatzes mit O₃-Exposition über 300 s und nachfolgend NaS₂O₃ des *S. mutans* Stamms 6178. Vergrößerung 500x und 10.000x; Aufnahmen exemplarisch für den Messzeitpunkte 0. Nach der O₃-Behandlung über 300 s und nachfolgend mit NaS₂O₃ zum Messzeitpunkte ein mehrschichtiger Zellrasen, der komplett die Oberfläche bedeckte, nachweisbar.

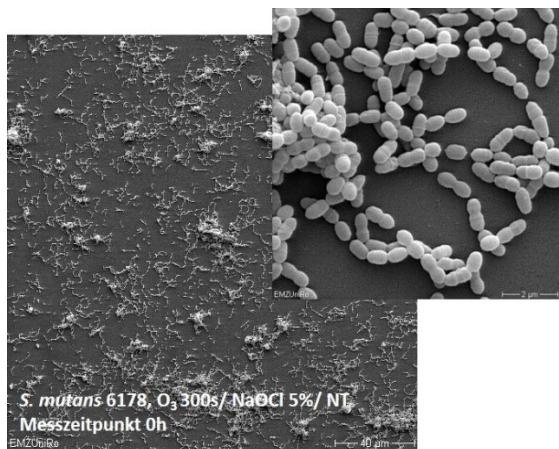


Abbildung 120: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des Versuchsansatzes des *S. mutans* Stammes 6178 mit O₃-Exposition über 300 s sowie nachfolgender, NaOCl und NaS₂O₃-Behandlung. Vergrößerung 500x und 10.000x; Aufnahmen exemplarisch für den Messzeitpunkte 0 h. Nach einer kombinierten Behandlung konnten unmittelbar danach auf der Oberfläche vereinzelte, teils in Zellklumpen zusammen gelagerte Zellen dokumentiert werden.

7.5.2. zu 3.8.2. Ergebnisse der REM-Analysen von *E. faecalis* 1904 und *E. faecalis* DMZ 20478

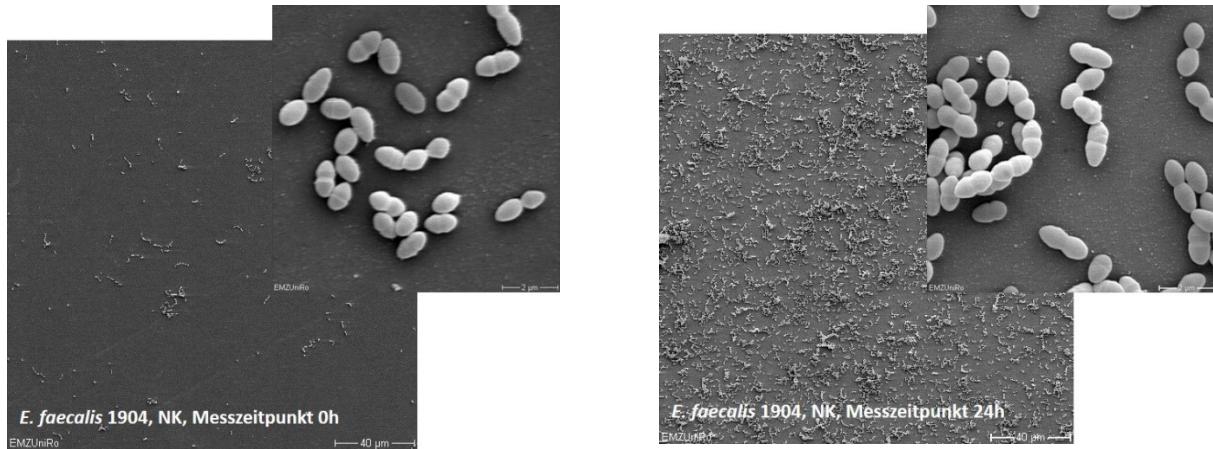


Abbildung 120 a+b: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Negativkontrolle für den *E. faecalis* Stamm 1904. Vergrößerung 500x und 10.000x; Aufnahmen exemplarisch für die Messzeitpunkte 0 h und nach 24 h Erholungsphase. An beiden Messzeitpunkten bildete sich ein gleichmäßiger Bakterienzellrasen (*monolayer*) aus.

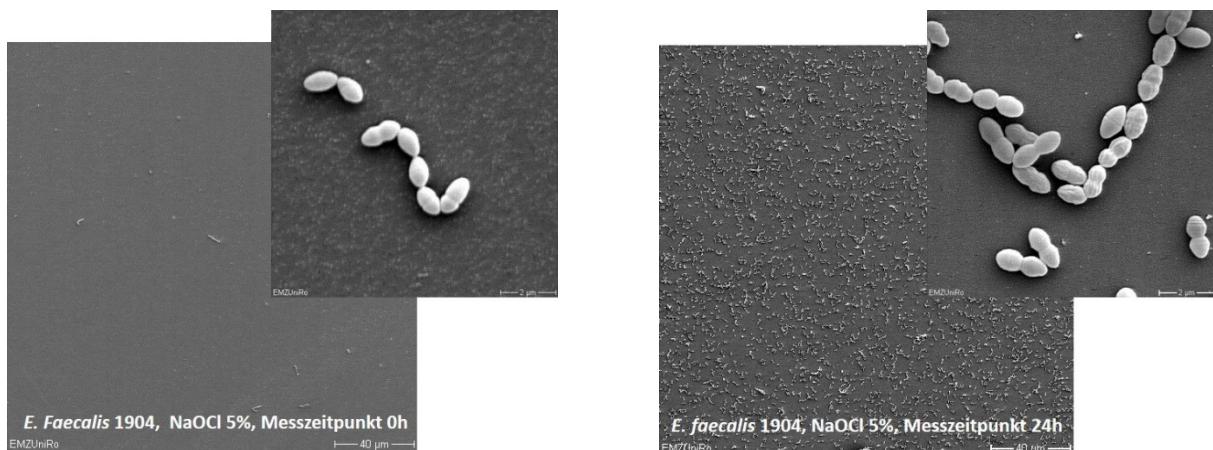


Abbildung 121 a+b: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Positivkontrolle (NaOCl 5 %) für den *E. faecalis* Stamm 1904. Vergrößerung 500x und 10.000x; Aufnahmen exemplarisch für den Messzeitpunkt 0 h und nach 24 h Erholungsphase. Nach der NaOCl-Applikation ließen sich nur sehr vereinzelt Bakterienzellen nachweisen. Zum Messzeitpunkt nach 24 h Inkubation ließ sich ein einschichtiger, gleichmäßiger Zellrasen dokumentieren.

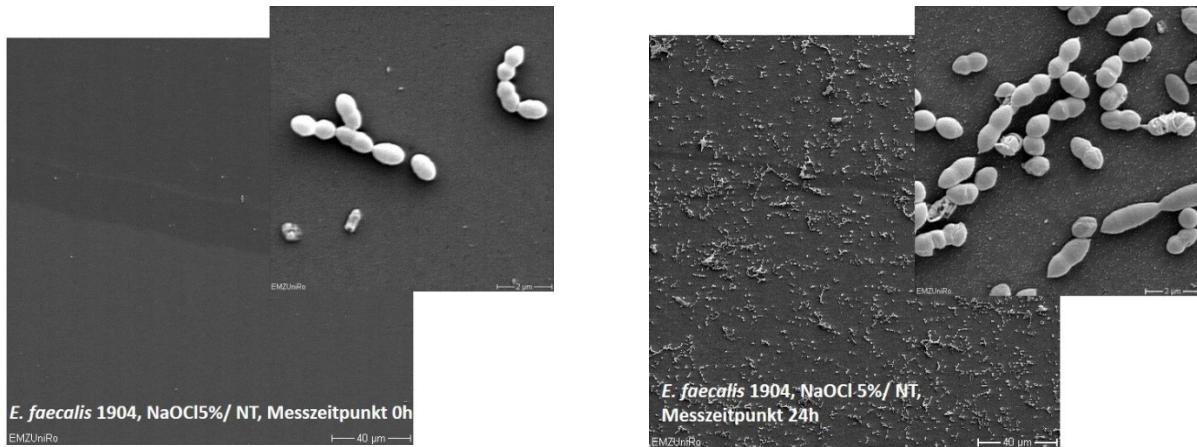


Abbildung 122 a+b: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des Versuchsansatzes mit NaOCl 5 % und Na₂S₂O₃ (NT) für den *E. faecalis* Stamm 1904. Vergrößerung 500x und 10.000x; Aufnahmen exemplarisch für die Messzeitpunkte 0 h und nach 24 h Erholungsphase. Nach der NaOCl- und anschließenden Na₂S₂O₃-Applikation ließen sich nur vereinzelt Zellen nachweisen. Zum Messzeitpunkt nach 24 h Erholungsphase ließ sich ein einschichtiger, gleichmäßiger Zellrasen mit Zellklumpen dokumentieren.

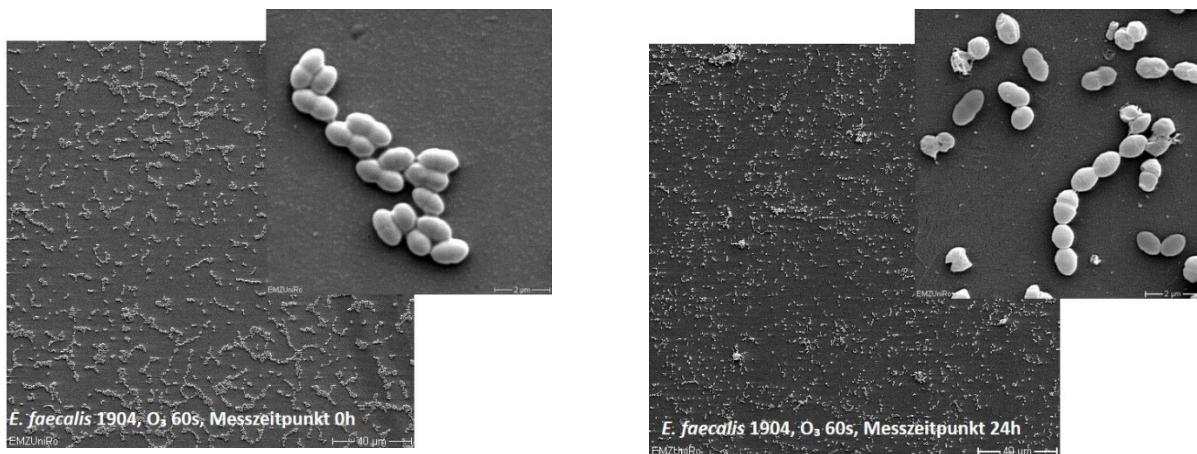


Abbildung 123 a+b: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des Versuchsansatzes mit einer O₃-Exposition über 60 s für den *E. faecalis* Stamm 1904. Vergrößerung 500x und 10.000x; Aufnahmen exemplarisch für die Messzeitpunkte 0 h und nach 24 h Erholungsphase. An beiden Messzeitpunkten bildete sich ein gleichmäßiger *monolayer* aus.

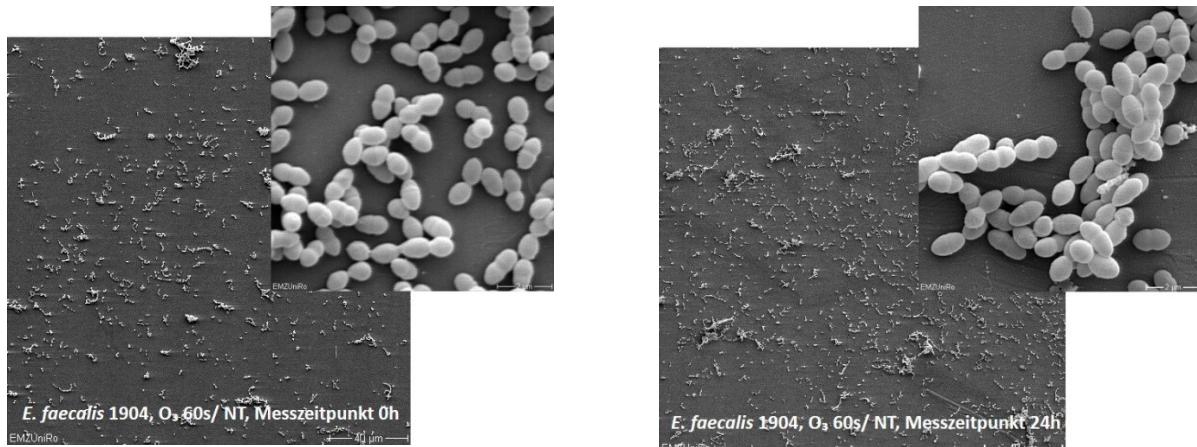


Abbildung 124 a+b: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des Versuchsansatzes mit einer O₃ Exposition über 60 s und einer nachfolgenden NaS₂O₃ (NT)-Behandlung für den *E. faecalis* Stamm 1904. Vergrößerung 500x und 10.000x; Aufnahmen exemplarisch für die Messzeitpunkte 0 h und nach 24 h Erholungsphase. An beiden Messzeitpunkten bildete sich ein gleichmäßiger *monolayer* aus.

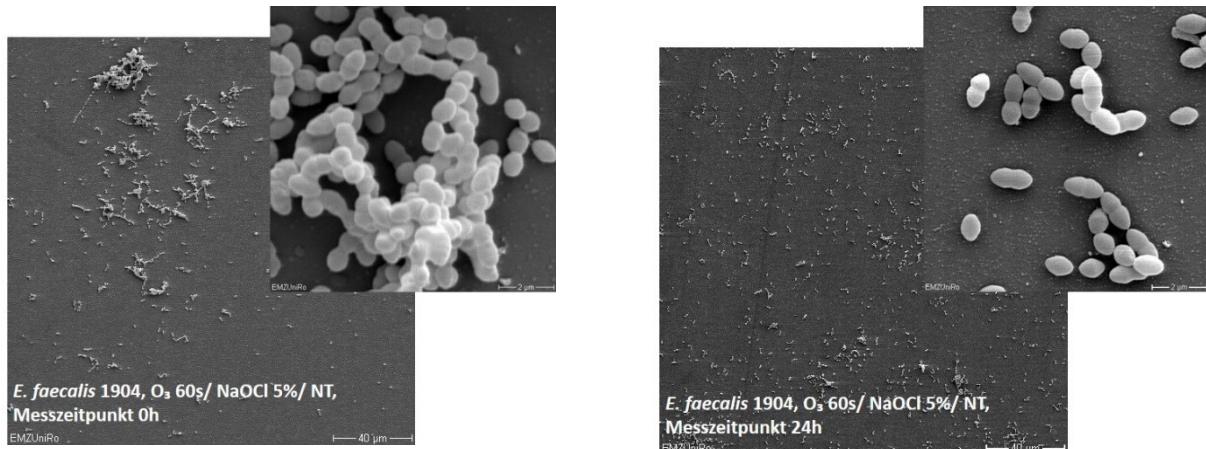


Abbildung 125 a+b: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des Versuchsansatzes mit einer O₃-Exposition über 60 s und nachfolgenden NaOCl- und NaS₂O₃ (NT)-Behandlungen für den *E. faecalis* Stamm 1904. Vergrößerung 500x und 10.000x; Aufnahmen exemplarisch für die Messzeitpunkte 0 h und nach 24 h Erholungsphase. Unmittelbar nach der kompletten Behandlung ließen sich nur vereinzelt Zellen nachweisen. Zum Messzeitpunkt nach 24 h Erholungsphase ließ sich ein einschichtiger, gleichmäßiger Zellrasen mit Zellklumpen dokumentieren.

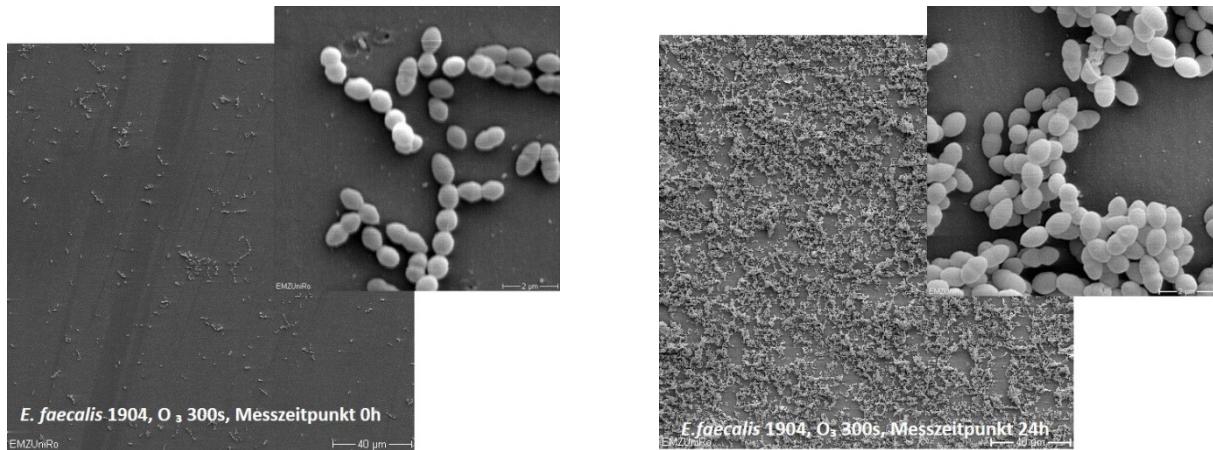


Abbildung 126 a+b: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des Versuchsansatzes mit einer O₃-Exposition über 300 s für den *E. faecalis* Stamm 1904. Vergrößerung 500x und 10.000x; Aufnahmen exemplarisch für die Messzeitpunkte 0 h und nach 24 h Erholungsphase. Zum ersten Messzeitpunkt unmittelbar nach der O₃-Applikation ließen sich an der Oberfläche vereinzelt Zellen nachweisen, teilweise zu Zellklumpen aggregiert. Zum zweiten Messzeitpunkt konnte ein eher gleichmäßig verteilter monolayer nachgewiesen werden.

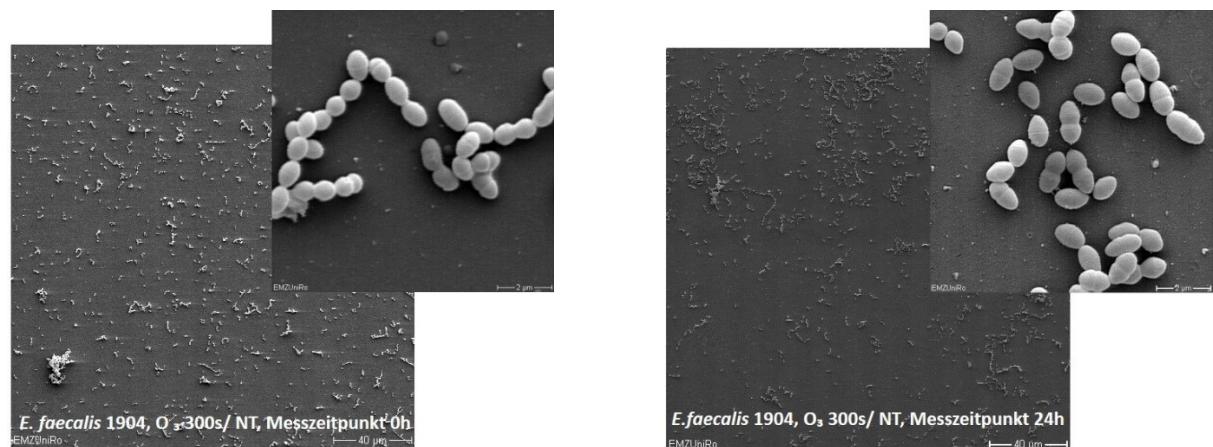


Abbildung 127 a+b: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des Versuchsansatzes mit einer O₃-Exposition über 300 s und nachfolgenden Na₂S₂O₃ (NT)-Behandlung für den *E. faecalis* Stamm 1904. Vergrößerung 500x und 10.000x; Aufnahmen exemplarisch für die Messzeitpunkte 0 h und nach 24 h Erholungsphase. An beiden Messzeitpunkten bildete sich ein gleichmäßiger monolayer aus.

ANHANG

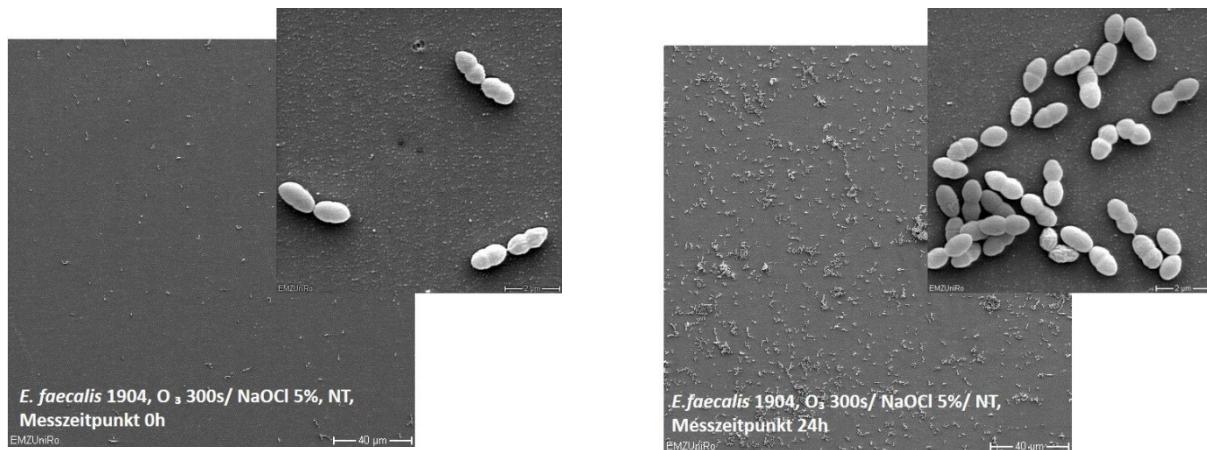


Abbildung 128 a+b: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des Versuchsansatzes mit einer O₃-Exposition über 300 s und nachfolgenden 5 % NaOCl- und Na₂S₂O₃ (NT)-Behandlungen für den *E. faecalis* Stamm 1904. Vergrößerung 500x und 10.000x; Aufnahmen exemplarisch für die Messzeitpunkte 0 h und nach 24 h Erholungsphase. Unmittelbar nach der vollständigen Behandlung ließen sich nur vereinzelt Zellen nachweisen. Zum Messzeitpunkt nach 24 h Erholungsphase ließ sich ein einschichtiger, gleichmäßiger Zellrasen mit Zellklumpen dokumentieren.

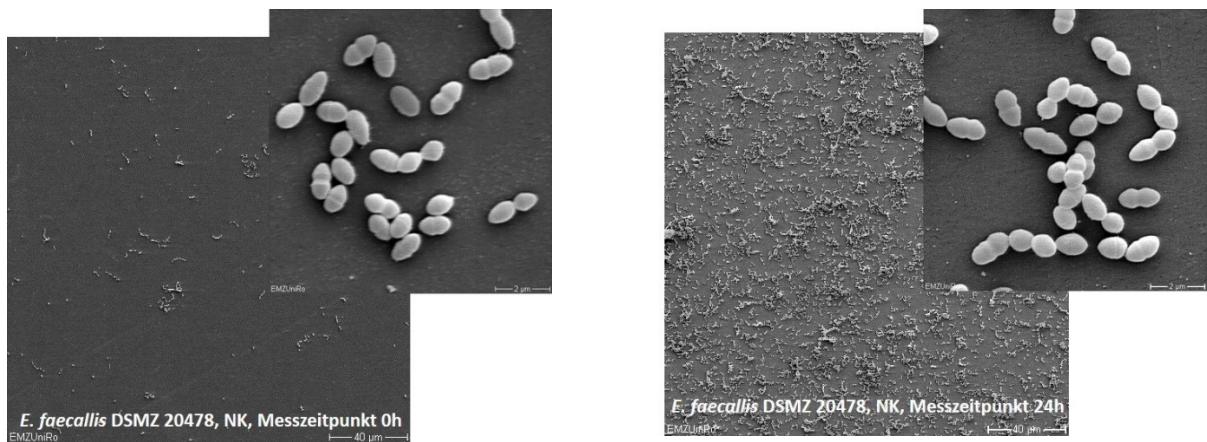


Abbildung 129 a+b: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Negativkontrolle für den *E. faecalis* Stamm DSMZ 20478. Vergrößerung 500x und 10.000x; Aufnahmen exemplarisch für die Messzeitpunkte 0 h und nach 24 h Erholungsphase. An beiden Messzeitpunkten bildete sich ein gleichmäßiger Bakterienzellrasen (*monolayer*) aus.

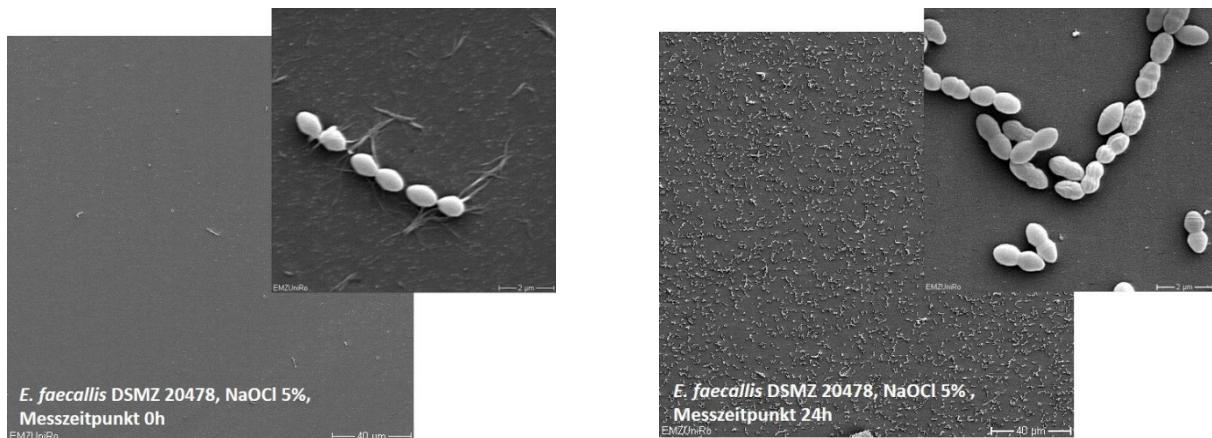


Abbildung 130 a+b: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Positivkontrolle (NaOCl 5 %) für den *E. faecalis* Stamm DSMZ 20478. Vergrößerung 500x und 10.000x; Aufnahmen exemplarisch für den Messzeitpunkt 0 h und nach 24 h Erholungsphase. Nach der NaOCl-Applikation ließen sich nur sehr vereinzelt Bakterienzellen nachweisen. Zum Messzeitpunkt nach 24 h Inkubation ließ sich ein einschichtiger, gleichmäßiger Zellrasen dokumentieren.

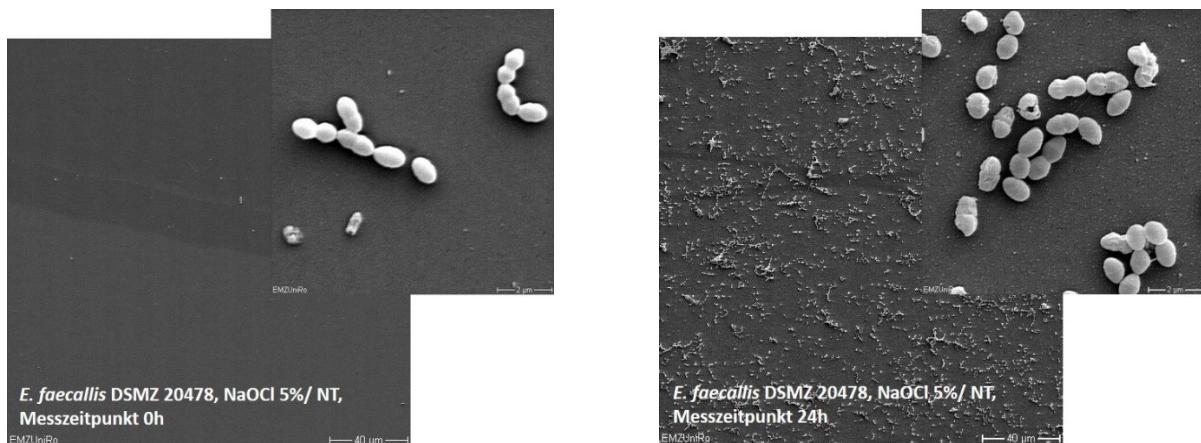


Abbildung 131 a+b: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des Versuchsansatzes mit NaOCl 5 % und Na₂S₂O₃ (NT) für den *E. faecalis* Stamm DSMZ 20478. Vergrößerung 500x und 10.000x; Aufnahmen exemplarisch für die Messzeitpunkte 0 h und nach 24 h Erholungsphase. Nach der NaOCl- und anschließenden Na₂S₂O₃-Applikation ließen sich nur vereinzelt Zellen nachweisen. Zum Messzeitpunkt nach 24 h Erholungsphase ließ sich ein einschichtiger, gleichmäßiger Zellrasen mit Zellklumpen dokumentieren.

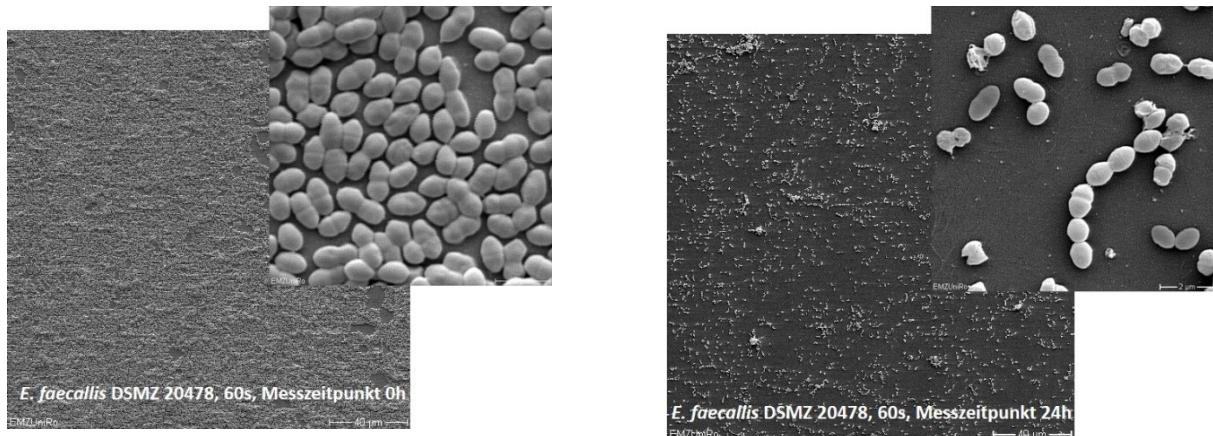


Abbildung 132 a+b: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des Versuchsansatzes mit einer O₃-Exposition über 60 s für den *E. faecalis* Stamm DSMZ 20478. Vergrößerung 500x und 10.000x; Aufnahmen exemplarisch für die Messzeitpunkte 0 h und nach 24 h Erholungsphase. An beiden Messzeitpunkten bildete sich ein gleichmäßiger *monolayer* aus.

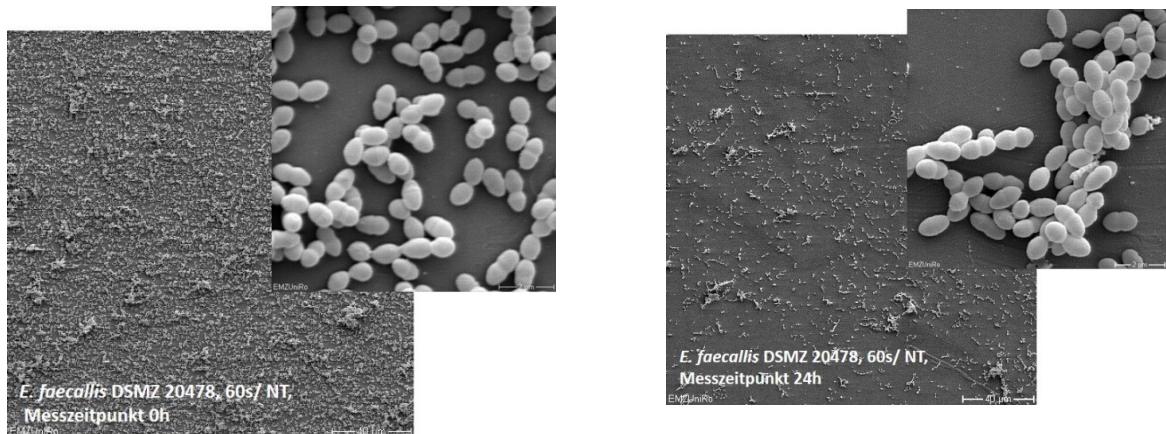


Abbildung 133 a+b: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des Versuchsansatzes mit einer O₃ Exposition über 60 s und einer nachfolgenden NaS₂O₃ (NT)-Behandlung für den *E. faecalis* Stamm DSMZ 20478. Vergrößerung 500x und 10.000x; Aufnahmen exemplarisch für die Messzeitpunkte 0 h und nach 24 h Erholungsphase. An beiden Messzeitpunkten bildete sich ein gleichmäßiger *monolayer* aus.

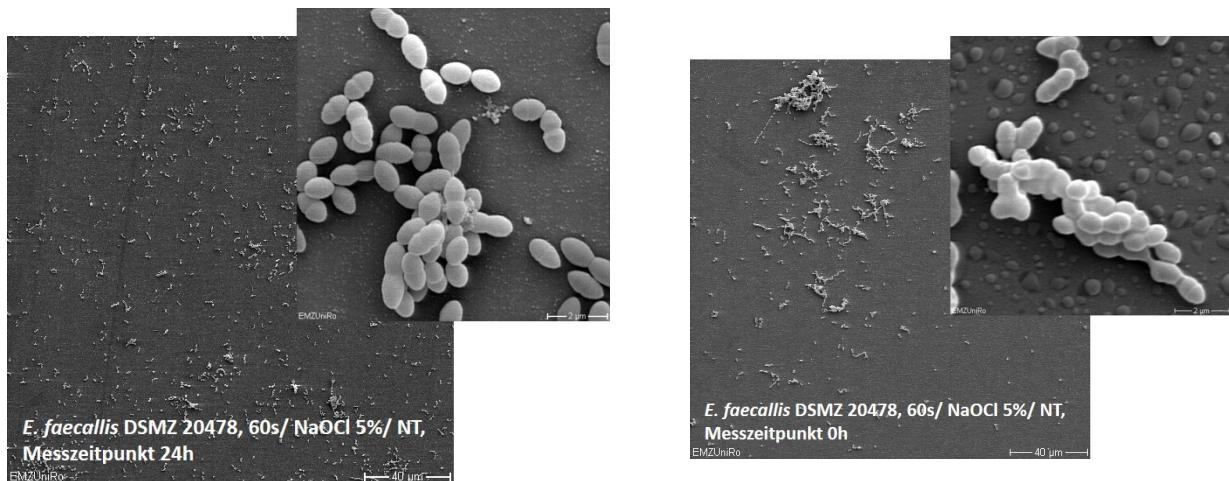


Abbildung 134 a+b: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des Versuchsansatzes mit einer O₃-Exposition über 60 s und nachfolgenden NaOCl- und NaS₂O₃ (NT)-Behandlungen für den *E. faecalis* Stamm DSMZ 20478. Vergrößerung 500x und 10.000x; Aufnahmen exemplarisch für die Messzeitpunkte 0 h und nach 24 h Erholungsphase. Unmittelbar nach der kompletten Behandlung ließen sich nur vereinzelt Zellen nachweisen. Zum Messzeitpunkt nach 24 h Erholungsphase ließ sich ein einschichtiger, gleichmäßiger Zellrasen mit Zellklumpen dokumentieren.

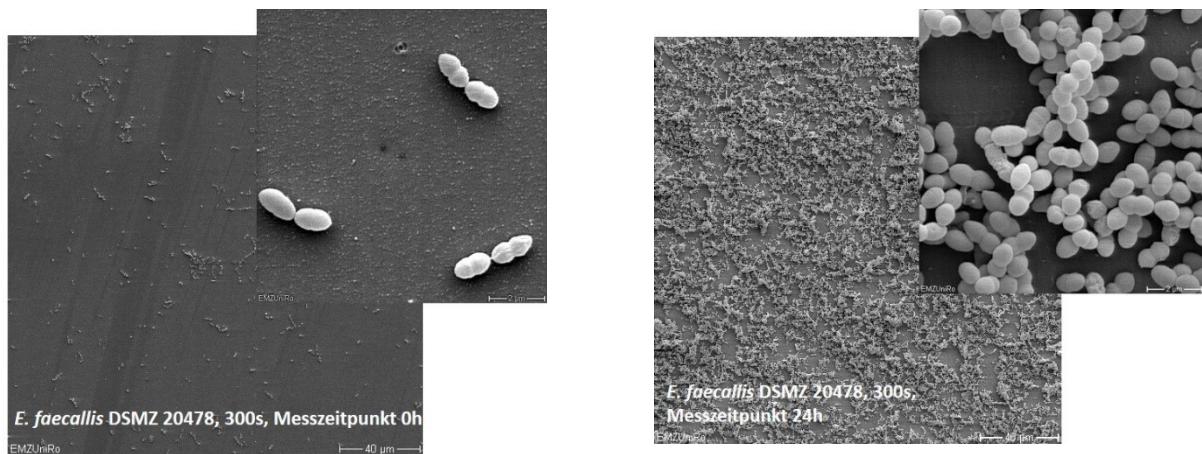


Abbildung 135 a+b: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des Versuchsansatzes mit einer O₃-Exposition über 300 s für den *E. faecalis* Stamm DSMZ 20478. Vergrößerung 500x und 10.000x; Aufnahmen exemplarisch für die Messzeitpunkte 0 h und nach 24 h Erholungsphase. Zum ersten Messzeitpunkt unmittelbar nach der O₃-Applikation ließen sich an der Oberfläche vereinzelt Zellen nachweisen, teilweise zu Zellklumpen aggregiert. Zum zweiten Messzeitpunkt konnte ein eher gleichmäßig verteilter *monolayer* nachgewiesen werden.

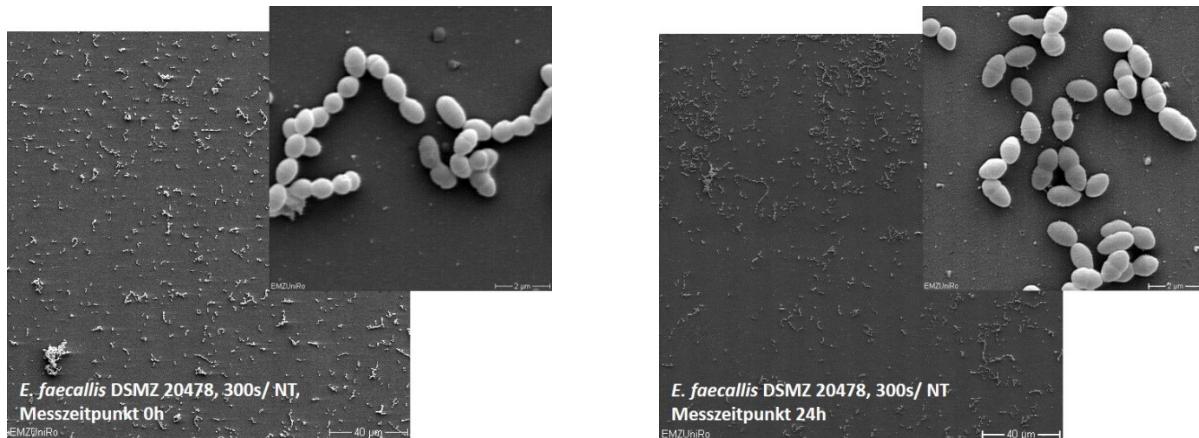


Abbildung 136 a+b: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des Versuchsansatzes mit einer O₃-Exposition über 300 s und nachfolgenden NaS₂O₃ (NT)-Behandlung für den *E. faecalis* Stamm DSMZ 20478. Vergrößerung 500x und 10.000x; Aufnahmen exemplarisch für die Messzeitpunkte 0 h und nach 24 h Erholungsphase. An beiden Messzeitpunkten bildete sich ein gleichmäßiger *monolayer* aus.

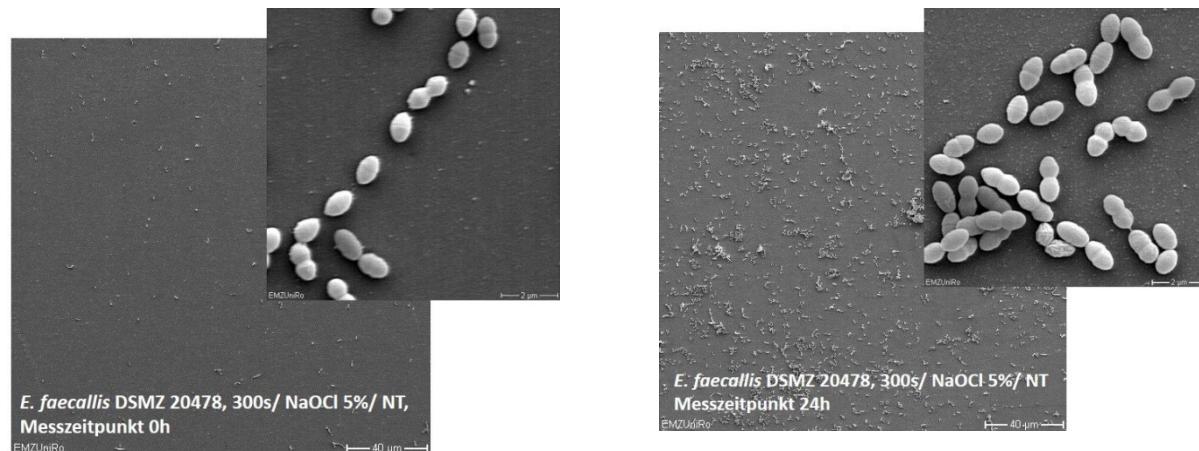


Abbildung 137 a+b: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des Versuchsansatzes mit einer O₃-Exposition über 300 s und nachfolgenden 5 % NaOCl- und NaS₂O₃ (NT)-Behandlungen für den *E. faecalis* Stamm DSMZ 20478. Vergrößerung 500x und 10.000x; Aufnahmen exemplarisch für die Messzeitpunkte 0 h und nach 24 h Erholungsphase. Unmittelbar nach der vollständigen Behandlung ließen sich nur vereinzelt Zellen nachweisen. Zum Messzeitpunkt nach 24 h Erholungsphase ließ sich ein einschichtiger, gleichmäßiger Zellrasen mit Zellklumpen dokumentieren.

**7.6. zu 3.10. Ergebnisse der Rasterelektronenmikroskopie nach *in vitro* Ozon-
Applikation auf *F. nucleatum* ATCC 25586-Kulturen unter anaeroben
Verhältnissen**

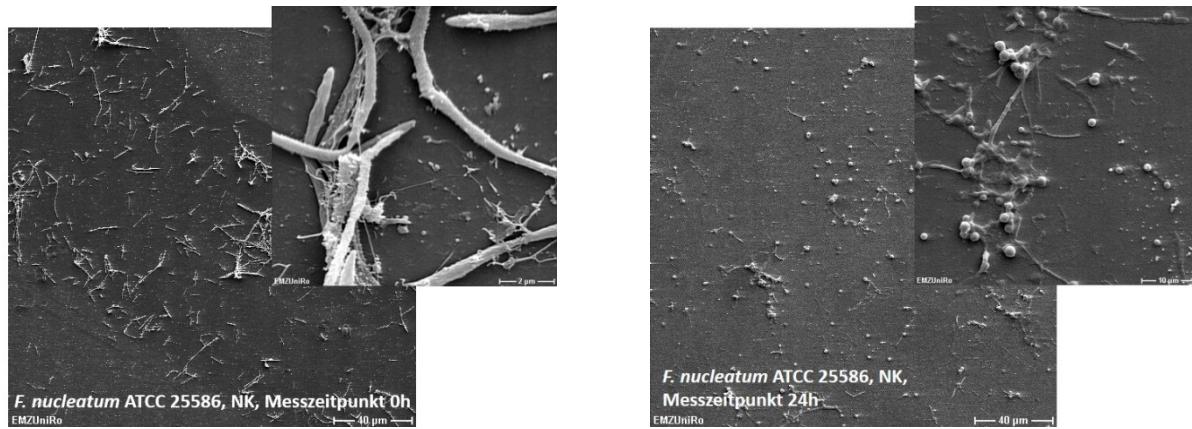


Abbildung 138 a+b: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Negativkontrolle (NK) des Stamms *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586. Vergrößerung 500x und 10.000x; Aufnahmen exemplarisch für die Messzeitpunkte 0 h und nach 24 h Erholungsphase.

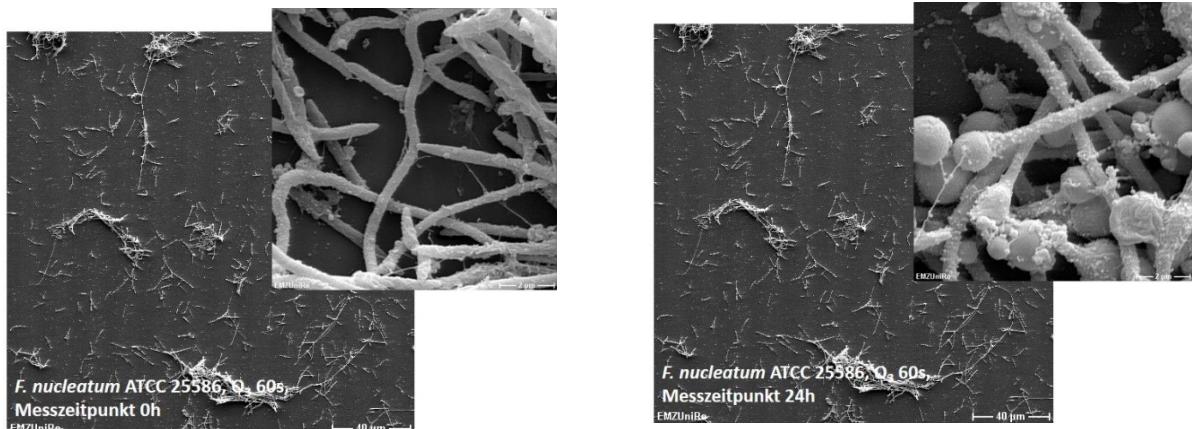


Abbildung 139 a+b: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen nach einer O₃-Behandlung von *Fusobacterium nucleatum* Stamm ATCC 25586 über 60 s. Vergrößerung 500x und 10.000x; Aufnahmen exemplarisch für Tag 1 (0 h) und Tag 2 (24 h).

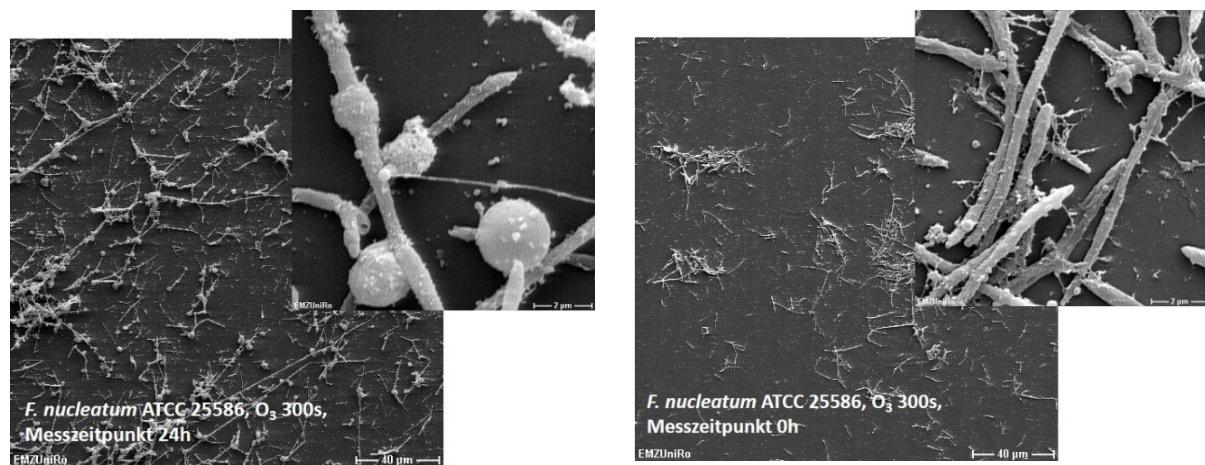


Abbildung 140 a+b: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen nach einer O₃-Behandlung von *Fusobacterium nucleatum* Stamm ATCC 25586 über 300 s. Vergrößerung 500x und 10.000x; Aufnahmen exemplarisch für Tag 1 (0 h) und Tag 2 (24 h).

Tabelle 26: Zusammenstellung von *in vitro* Studien, die mit gasförmigen Ozon durchgeführt wurden.

Autor, Veröffentlichung	Titel	Ziele	Methode	Ergebnis
Noites <i>et al.</i> , 2014 ⁷⁸	Synergistic Antimicrobial Action of Chlorhexidine and Ozone in Endodontic Treatment	Evaluierung der Wirkung von NaOCl, CHX und gasförmigen Ozon allein oder in Kombination gegen <i>E. faecalis</i> und <i>C. albicans</i>	Frisch exkavierte Zähne wurden mit <i>E. faecalis</i> und <i>C. albicans</i> inkokultiert und in randomisierten Gruppen mit NaOCl (1 %, 3 % und 5 %), CHX (0,2 % und 2 %) und gasförmigen Ozon untersucht.	NaOCl, CHX und gasförmiges Ozon waren ineffektiv eine komplette Eliminierung der Testkulturen zu erreichen. Die sequentielle Behandlung mit CHX und anschließend Ozon mit 24 s konnte eine komplett Eliminierung von <i>E. faecalis</i> und <i>C. albicans</i> erreichen.
Astorga, 2013 ⁴	Antibacterial effects of ozone on <i>Streptococcus mutans</i>	Investigation des antibakteriellen Effektes gasförmigen Ozons auf <i>S. mutans</i> <i>in vitro</i>	<i>S. mutans</i> Kulturen (10^6 /ml) wurden auf humanen und bovinen Dentinpräparaten in Wilkins-Chalgren-Kulturmedium inkuliert. Die herangezüchteten Kulturen wurden mit unterschiedlichen Ozoneneratoren (CurOzone X4, OL80A und OL80W) und mit unterschiedlichen Ozonkonzentrationen (2, 20, 200, 2000 und 2100 ppm) behandelt.	CurOzone zeigte keinen antibakteriellen Effekt. OL80W und OL80A zeigten konzentrationsabhängig eine Reduktion der <i>S. mutans</i> Kulturen.
Dukic <i>et al.</i> , 2013 ²⁹	The efficacy of gaseous ozone on some cariogenic bacteria.	Das Ziel der Studie ist die Investigation der antimikrobiellen Effektivität gasförmigen Ozons gegen <i>L. paracasei</i> (ATCC11974) und <i>S. mutans</i> (ATCC33420)	Mit <i>L. paracasei</i> und <i>S. mutans</i> inkulierte Dentinpräparate wurden vor und nach einer Ozonbehandlung untersucht.	Es zeigte sich eine signifikante Reduktion in <i>L. paracasei</i> und <i>S. mutans</i> .

Polydorou et al., 2011⁸⁵	The antibacterial effect of gaseous ozone after 2 months of in vitro evaluation	Ziel der Studie war es, den Effekt gasförmigen Ozons mittels des KaVo HealOzone Ozongenerators 2130C auf <i>S. mutans</i> und <i>L. casei</i> 4 und 8 Wochen nach Ozonbehandlung zu untersuchen.	Frisch exkavierte Zähne wurden gereinigt und mit den Testbakterien inkuliert. Die Zähne wurden mit 60 s Ozon behandelt, versiegelt und nach 4 bzw. 8 Wochen auf ein Wachstum der Bakterien getestet.	Es zeigte sich eine signifikante Reduktion von <i>S. mutans</i> .
Stoll et al., 2008¹⁰⁵	The disinfecting effect of ozonized oxygen in an infected root canal: an in vitro study.	Untersuchung des desinfizierenden Effektes gasförmigen Ozons (HealOzone Ozongenerator 2130C) auf <i>E. faecalis</i> im Vergleich mit konventionellen Desinfektionsmitteln (NaCl-Lösung, 3 % H ₂ O ₂ , 0,2 % CHX, 1,5 % NaOCl und 3 % NaOCl)	Sterilisation der Wurzelkanäle und mit den Testmikroorganismen kontaminiert. Es erfolgte die Ozonapplikation mittels des Ozongenerators und die Applikation von NaOCl als Positivkontrolle.	Gasförmiges Ozon sowie NaOCl erzeugte eine Keimzahlreduktion.
Fagrell et al., 2008³³	Effect of ozone treatment on different cariogenic microorganisms in vitro.	Untersuchung der Effektivität gasförmigen Ozons an 3 Spezies von <i>S. mutans</i> und einer <i>Lactobacillus</i> -Spezies	Es erfolgte die Applikation von 0, 20, 40 und 60 s Ozon. REM wurde genutzt um den Effekt zu visualisieren.	20 s gasförmigen Ozons konnten eine Reduzierung der Keimzahlen erbringen. 60 s konnte eine komplett Keimzahlreduktion nachweisen.
Johansson et al., 2008⁵¹	Antibacterial effect of ozone on cariogenic bacterial species	Evaluierung des antibakteriellen Effektes gasförmigen Ozons an Karies-assoziierten Bakterienspezies wie <i>Acinetobacter naeslundii</i> , <i>S. mutans</i> , <i>L. casei</i>) mit und ohne Saliva und unter Verwendung des KaVo Healzone Ozongenerators 2130C.	Es erfolgte die Ozonapplikation an Bakterienkulturen in einer Pufferlösung bzw. in Saliva mit einer Dauer von 10 s bis 60 s.	Die kariogenen Spezies <i>S. mutans</i> , <i>L. casei</i> , <i>A. naeslundii</i> wurden fast komplett eliminiert. Bei der Anwesenheit von Saliva zeigte sich eine Abnahme des Eliminationseffektes des Ozons.
Castillo et al., 2008¹⁸	In vitro reduction of mutans streptococci by means of ozone gas application	In vitro Untersuchung der Wirkung gasförmigen Ozons an <i>S. mutans</i>	Es erfolgte die Applikation von 10 s, 20 s, 40 s mit 2100 pm (KaVo Heal-Ozone Ozongenerator 2130C)	Eine Ozonapplikation für 10 s und 20 s erzeugte eine signifikante Keimzahlreduktion. Nach > 40 s konnten keine Bakterien mehr nachgewiesen werden.
Müller et al., 2007⁷²	Efficacy of gasiform ozone and photodynamic therapy on a multispecies oral biofilm in vitro	Beurteilung der Effektivität gasförmigen Ozons (KaVo HealOzone Ozongenerator 2130C) und der photodynamischen Therapie (PDT)	Mature 6 Spezies- Biofilme wurden selektiert und aufgeteilt in folgende Gruppen: a) Ozonapplikation für 60 s, b) PDT, c) desinfizierende Lösungen wie 0,2 % und 2 % CHX, 0,5 % und 5 % NaOCl	Ozon und PDT hatten lediglich einen geringen Effekt auf die Viabilität der in einem Biofilm organisierten Mikroorganismen
Baysan et Beighton, 2007⁷	Assessment of the Ozone-mediated killing of bacteria in infected dentine associated with non-cavitated occlusal carious lesions	Untersuchung des antimikrobiellen Effektes gasförmigen Ozons an Mikroorganismen die assoziiert sind mit Primärkaries	Frisch extrahierte Zähne wurden in zwei Gruppen randomisiert. Zähne mit Primärkariesläsion wurden mit 40 s Ozon behandelt.	Die Ozonbehandlung konnte keine signifikante Keimzahlreduktion erzeugen.
Baysan, Whiley et Lynch, 2000⁹	Antimicrobial Effect of a novel Ozone-Generating Device on Micro-	Untersuchung des antimikrobiellen Effektes gasförmigen Ozons auf	Es erfolgte die Applikation von gasförmigen Ozon für 10 s und 20 s der mit den	Eine signifikante Reduktion der Mikroorganismen wurde

Organisms Associated with Primary Root Carious	Biofilme von <i>S. mutans</i> und <i>S. sobrinus</i> in einer in vitro Untersuchung an Glasperlen sowie an Primärkariesläsionen frisch exkaviert Zähne.	Testbakterien inkulierten Glasperlen sowie die Ozonapplikation der frisch exkavierten Zähne mit Primärkariesläsionen.	nach 10 s und nach 20 s Ozonexposition in den Primärkariesläsionen und auf den Glasperlen registriert.
--	---	---	--

Tabelle 27: Zusammenstellung von *in vitro* Studien die mit gasförmigen Ozon sowie in eine wässrige Lösung gebrachtes Ozon durchgeführt wurden.

Autor, Veröffentlichung	Titel	Ziele	Methode	Ergebnis
Kollmuss et al., 2014⁵⁷	Antimicrobial effect of gaseous and aqueous ozone on caries pathogen microorganisms grown in biofilms.	Untersuchung des antimikrobiellen Effektes gasförmigen sowie in Lösung gebrachtes Ozon anhand von Biofilmen oralpathogener Bakterien mit Betrachtung der Konzentration und Zeitabhängigkeit	Biofilme von <i>A. naeslundii</i> , <i>S. mutans</i> , <i>L. paracasei</i> wurde auf Nitro-Cellulose-Membranen für 48 h inkubiert. Die Membranen wurden anschließenden CHX (0,1–20 %), gasförmigem Ozon (1–64 g/m ³) und in Lösung gebrachtes Ozon (1,25–20 µg/ml für 60 s ausgesetzt. Die Expositionszeit wurde mit 30–120 s festgesetzt. Die LKZ/ ml wurde erhoben.	Bei allen verwendeten Testsubstanzen zeigte sich eine signifikante Reduktion der Testbakterienstämme unter Verwendung hoher Konzentrationen. Je höher die Konzentration und Kontaktzeit war, desto effektiver war die Keimzahlreduktion.
Huth et al., 2011⁴⁸	Effectiveness of ozone against periodontal pathogenic microorganisms	Effektivität gasförmigen und in Wasser gelöstem Ozon im Vergleich mit CHX gegen periodontale Mikroorganismen (<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> , <i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Tannerella forsythia</i> und <i>Parvimonas micra</i>)	Planktonische und in Biofilm kultivierte Kulturen von <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> , <i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Tannerella forsythia</i> und <i>Parvimonas micra</i> wurden 1 min gasförmigen Ozons, in Wasser gelöstem Ozon, CHX oder einer Phosphat gepufferten Salzlösung (Kontrolle) ausgesetzt.	Die reduktive Wirkung war abhängig von Bakterienspezies, Art und Dosierung des zu testenden Agens. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied von gasförmigen und in Wasser gelöstem Ozon im Vergleich zu 2 % CHX-Lösung. Alle waren sie jedoch effektiver als eine 0,2 % CHX-Lösung.
Estrela et al., 2007³²	Antimicrobial efficacy of ozonated water, gaseous ozone, sodium hypochlorite and chlorhexidine in infected human root canals	Ermittlung der antibakteriellen Effektivität von in Wasser gelöstem Ozon, gasförmigen Ozon, 2,5 % NaOCl-Lösung, 25 CHX-Lösung in Wurzelkanälen extrahierter humaner Zähne.	30 humane Zähne wurden nach Schema präpariert und mit <i>E. faecalis</i> für 60 Tage inkuliert. Anschließend wurde der Effekt der Testsubstanzen untersucht.	Keiner der ausgewählten Substanzen war in der Lage <i>E. faecalis</i> suffizient zu eliminieren.
Hems et al., 2005⁴⁴	An in vitro evaluation of the ability of ozone to kill a strain of <i>Enterococcus faecalis</i>	Evaluierung des antibakteriellen Potenzials gasförmigen und in Wasser gelöstem Ozons auf Biofilme von <i>E. faecalis</i> von <i>E. faecalis</i>	Gasförmiges Ozon wurden an planktonischen Zellen und an Biofilme von <i>E. faecalis</i> mit Applikationszeiten von 30 s, 60 s, 120 s und 240 s getestet	Es zeigte sich kein Effekt gasförmigen Ozons auf Biofilme von <i>E. faecalis</i> . In Wasser gelöstes Ozon konnte nach 240 s Applikation eine Keimzahlreduktion der planktonischen Zellen produzieren. NaOCl (0,5 %) war effektiver.

Tabelle 28: Ergebnisse von Studien unter Verwendung von in eine wässrige Lösung gebrachtes Ozons.

Autor, Veröffentlichung	Titel	Ziele	Methode	Ergebnis
Sadatullah <i>et al.</i> , 2012 ⁹⁴	The antimicrobial effect of 0.1 ppm ozonated water on 24-hour plaque microorganisms in situ.	Untersuchung des Effektes von mit 0,1 ppm ozonierte Wasser unter Verwendung einer 24 Stunden alten supragingivalen Plaque.	Supragingivaler Plaque wurde von der Zahnoberfläche entfernt und ozonierte Wasser für 30 s appliziert.	Die Applikation von ozonierte Wasser reduzierte die Zellzahl des 24 h-Plaque um 45,3 %.
Arita <i>et al.</i> , 2005 ²	Microbial efficacy of ozonated water against <i>C. albicans</i> adhering acrylic denture plates	Untersuchung der Wirkung ozonierten Wassers auf <i>C. albicans</i>	Mit <i>C. albicans</i> inkuliert Zahnräperate wurden mit ozonierte Wasser behandelt.	<i>C. albicans</i> wurde nach der Behandlung mit ozonierte Wasser nicht mehr nachgewiesen.
Nagayoshi <i>et al.</i> , 2004 ⁷³	Efficacy of ozone on survival and permeability of oral microorganisms	Der Effekt von ozonierten Wasser auf orale Mikroorganismen und dentaler Plaque wurde untersucht.	Biofilme von <i>S. mutans</i> wurden ozonierte Wasser (4 mg/l) ausgesetzt. Der Plaque wurde fluoreszenzmikroskopisch mit LIVE/ DEAD BacLight™ sowie mittels Elektronenmikroskopie untersucht.	Nach Ozonierung für 10 s konnte fast eine 100 %-ige Elimination des Biofilms erreicht werden. In der Fluoreszenzmikroskopie zeigte die Ozonbehandlung eine sofortige Abtötung der Bakterien. Elektronenmikroskopisch wiesen die verbliebenen Zellen Bruchstellen an der Oberfläche auf.
Nagayoshi <i>et al.</i> , 2004 ⁷⁴	Antimicrobial effect of ozonated water on bacteria invading dentinal tubules.	<i>In vitro</i> Untersuchung des antimikrobiellen Effektes von ozoniertem Wasser gegen <i>E. faecalis</i> und <i>S. mutans</i> .	Bovine Dentinpräparate wurden mit <i>E. faecalis</i> und <i>S. mutans</i> inkuliert. Es erfolgte die Applikation von ozoniertem Wasser auf die Biofilme. Als Vergleich wurde eine 2,5 % NaOCl-Lösung angewendet.	Nach der Ozonapplikation konnte eine signifikante Abnahme der Zellzahl registriert werden und hatte die gleiche Aktivität wie die mit 2,5 % NaOCl behandelten Proben.

Tabelle 29: Funktion der extrazellulären polymerischen Substanz bakterieller Biofilme.²⁰

Funktion	Relevanz für den Biofilm	Involvierte EPS Komponenten
Adhäsion	Ermöglicht die initialen Schritte planktonischer Zellen zur Kolonisation abiotischer und biotischer Oberflächen sowie eine längerfristige Oberflächenbindung eines Biofilms	Polysaccharide, Proteine, DNA und amphiphile Moleküle
Aggregation bakterieller Zellen	Ermöglicht die Formierung von Zellbrücken, temporäre Immobilisierung bakterieller Populationen, Entwicklung einer hohen Zelldichte und Zell-zu-Zell-Erkennung.	Polysaccharide, Proteine, DNA und amphiphile Moleküle
Kohäsion des Biofilms	Formierung eines hydrierten polymeren Netzwerkes (Biofilmmatrix), Vermittlung einer mechanischen Stabilität des Biofilms und Aufrechterhaltung des Biofilmarchitektur, Zell-zu-Zell-Kommunikation.	neutrale und geladene Polysaccharide (Amyloide und Lektine) und DNA
Wasserretention	Aufrechterhaltung einer hydrierten Mikroumgebung um die Biofilmorganismen, die maßgeblich zur Dürererstanz in einer wasserdefizitären Umgebung beiträgt	hydrophile Polysaccharide und möglicherweise Proteine
Barrierefunktion	Gewährt eine Resistenz gegenüber nichtspezifischen und spezifischen Abwehrmechanismen eines besiedelten Organismus während einer Infektion, gewährleistet Toleranz gegenüber unterschiedlichen antimikrobiellen Substanzen (z. B. Desinfektionsmittel und Antibiotika)	Polysaccharide, Proteine
Sorption organischer Stoffe	Akkumulation von Nährstoffen aus der Umgebung und Sorption von Xenobiotika (Detoxifikation der Umgebung)	geladene oder hydrophobe Polysaccharide und Proteine
Sorption anorganischer Stoffe	Förderung der Gelbildung durch Polysaccharide, Ionenaustausch, Bildung von Mineralien und Akkumulation von toxischen Metallionen (Detoxifikation der Umgebung)	geladene Polysaccharide und Proteine inklusive anorganische Bestandteile wie Phosphate und Sulfate
Enzymatische Aktivität	Ermöglicht den Abbau exogener Makromoleküle zur Nährstofffrekrutierung und den Abbau der EPS um einzelne Zellen aus dem Biofilmverband zu entlassen	Proteine
Nahrungsquelle	Karbon-, Nitrogen- und Phosphorhaltige Nahrungsquelle	potenziell alle EPS-Anteile
Austausch genetischer Informationen	Ermöglicht horizontalen Gentransfer zwischen den Biofilmzellen	DNS
Elektronendonator- und akzeptor	Redoxaktivitäten in der Biofilmmatrix werden gestützt	Proteine
Export von Zellkomponenten	Export von zellulärem Abfallprodukten	Membranvesikel mit Nukleinsäuren, Enzymen, Lipopolysacchariden und Phospholipiden
Abfluss für Energieüberschuss	Speicherung überschüssiger Energie	Polysaccharide
Enzymbindung	In einer Interaktion mit Polysacchariden resultiert die Akkumulation, Retention und Stabilisierung von Enzymen	Polysaccharide und Enzyme

8. Thesen

In der vorliegenden Dissertation sollte die potentiell antikariöse Wirkung von Ozon, welches mit Hilfe des von KaVo angebotenen Ozongenerators HealOzon 2130C generiert wird, untersucht werden. Seit der Markteinführung 2003 wurden in mehreren Publikationen divergente Ergebnisse publiziert. Folgende Thesen galt es in dieser Dissertationsarbeit zu überprüfen:

- (1) Die propagierte bakterizide Wirkung gasförmigen Ozons, generiert von dem Ozongenerator 2130C der Firma KaVo, bietet eine effektive und vor allem schmerz- und geräuscharme Alternative zur konventionellen Kariestherapie (Drill and fill) an.
- (2) Gasförmiges Ozon ist ein potentes bakterizides Mittel gegen Keime bzw. Pathogene der Mundhöhle. Gasförmiges Ozon auf Biofilme als auch auf planktonische Zellen der fakultativ anaeroben Bakterienstämme *Streptococcus mutans* und *Enterococcus faecalis*, sowie der obligat anaeroben Bakterienstämme *Fusobacterium nucleatum* und *Parvimonas micra* hat eine bakterizide Wirkung.
- (3) Natriumhypochlorit (NaOCl) in einer Konzentration von 5 %, wie es in der konventionellen Stomatologie als Spül- und Desinfektionsmittel verwendet wird, wirkt bakterizid.
- (4) Ozon ist in der bakteriziden Effektivität und in einem standardisierten annährend äquivalent der Wirkung des NaOCl in der verwendeten Dosierung.
- (5) Ozon und Natriumhypochlorit sind in der Kombination überlegen gegenüber der Monotherapie der verwendeten bakterizid wirksamen Substanzen.
- (6) Die verwendeten Spezies können unter den gewählten Wachstumsbedingungen mit BHI und Mucin ein einschichtigen (Monolayer) bzw. mehrschichtigen Biofilm bilden.
- (7) Die bakterizide Wirkung gasförmigen Ozons ist auch unter Simulierung einer oralen Umgebung mit Mucin nachweisbar.

9. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene des Universitätsklinikums Rostock durchgeführt.

An dieser Stelle möchte ich **Prof. Dr. Andreas Podbielski** danken, für die Vergabe des Themas und seine Unterstützung. Insbesondere möchte ich ihm für die Möglichkeit danken, diese Arbeit während meiner Berufstätigkeit fertigstellen zu können.

Mein großer Dank gilt **Frau Dr. Kerstin Köller**, die diese Arbeit mit Enthusiasmus und dem nötigen Quentchen Optimus begleitet hat, wenn ich ihn benötigt habe. Für die vielen Stunden, die sie in das Korrekturlesen und die Kommentare gesteckt, kann ich ihr nicht genug danken. Ich möchte mich für die vielen Dinge bedanken, die ich bei ihr gelernt habe, begonnen bei den Labortechniken bis hin zum Schreiben einer Promotionsarbeit.

Prof. Dr. Bernd Kreikemeyer möchte ich ebenso für die wertvollen Tipps Anregungen und Kritik danken.

Unvergessen bleiben werden die wunderbaren Tage im Labor! **Nikolai Siemens, Sylvio Redanz** und **Dr. Cordula Lembke** waren stets eine großartige Bereicherung und Problemlöser, wenn ich nicht weiter wusste und haben immer für einen Lacher gesorgt. Für ihre ständige Hilfsbereitschaft und ihre ausgeglichene Art möchte ich mich bedanken. Bei **Yvonne Humboldt** und **Jana Normann** möchte ich mich für die Hilfestellung bei jeglichen Laborarbeiten bedanken.

Den Mitarbeitern des EMZ der Universität Rostock, um den inzwischen emeritierten **Prof. Dr. Ludwig Jonas** mit **Wolfgang Labs** und **Gerhard Fulda**, möchte ich für ihre Hilfestellung bei der Präparation und der Mikroskopie der Präparate danken.

Frau Dr. Judith Lindert gebührt an dieser Stelle ein großes Dankeschön für das Korrekturlesen, die wertvollen Anmerkungen und auch, dass sie immer ein offenes Ohr für meine Probleme hatte, wenn sie sich nicht gerade auf ärztlicher Mission in Afrika befand.

Ganz besonders danken, möchte ich meinem Freund **Georg Steiner**. Ohne sein Durchhaltevermögen, die wertvollen Tipps und Anmerkungen wäre ich an so mancher Stelle wahrscheinlich verzweifelt. Für seine Unterstützung und seine Liebe kann ich gar nicht genug dankbar sein.

Meinen Eltern **Dr. Roland Born** und **Eva-Maria Born** danke ich für die Liebe, das Interesse an meiner Arbeit und die moralische Unterstützung.

10. Selbstständigkeitserklärung

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und ohne fremde Hilfe verfasst habe, keine außer den von mir angegebenen Hilfsmitteln und Quellen dazu verwendet habe und die den benutzten Werken inhaltlich und wörtlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Constanze Born

Lübeck, den 10.06.2016