

Aus der Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Präventive Zahnheilkunde,

Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar

(Direktor: Prof. Dr. M. Hannig)

**Einfluss von Leistungsparametern eines kalten,
atmosphärischen Plasmajets auf die Destruktion von
in-vitro-Biofilmen**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnheilkunde

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2012

vorgelegt von

Daniela Anna Wind

geb. am 10.12.1984 in Saarbrücken

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung	1
1.1 Deutsche Zusammenfassung.....	1
1.2 Abstract	4
2 Einleitung	6
2.1 Grundlagen physikalischer Plasmen	6
2.2 Anwendung physikalischer Plasmen in Medizin und Zahnmedizin	7
2.3 Biofilmmodelle in der Zahnmedizin.....	12
2.4 Ziele der Arbeit / Fragestellung	14
3 Material und Methode	15
3.1 Herstellung von Prüfkörpern als Biofilmträger	15
3.2 In-vitro-Biofilmkultivierung über 2, 7 und 14 Tage	15
3.3 Plasmajet, Bearbeitungsparameter	18
3.3.1 Aufbau der Plasmaquelle.....	18
3.3.2 Parameter für die Behandlung der Biofilme mit Plasma	19
3.3.3 Wasserbestrahlung.....	19
3.4 Auswertungsmethoden	20
3.4.1 Rasterelektronenmikroskopie (REM)	20
3.4.2 Fluoreszenzmikroskopie / „live/dead staining“	22
3.4.3 Mikrobiologie	23
3.4.4 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)	25
3.5 Prüfkörperzuordnung zu Bearbeitungsparametern und Auswertungsmethoden	26
4 Ergebnisse	27
4.1 Vorversuche.....	27
4.2 Charakterisierung der Biofilme nach in-vitro-Kultivierung über 2, 7 und 14 Tage sowie Kontrollprobenauswertung	30
4.3 Plasmabearbeitung von Biofilmen mit unterschiedlichen Leistungsparametern	45
4.4 Mehrschrittbehandlung von Biofilmen mit Plasmajet und Wasserbestrahlung	56
5 Diskussion	69
6 Schlussfolgerung	76
7 Literaturverzeichnis	77
8 Publikationen / Dank	89

1 Zusammenfassung

1.1 Deutsche Zusammenfassung

Kalte, atmosphärische Plasmen sind ionisierte lokale Gasströmungen. Diese werden unter Normaldruck bei biologisch akzeptablen Temperaturen mittels Mikrowelle, Hochfrequenz oder gepulster DC-Hochspannung unter Verwendung von Edelgasen erzeugt. Die Edelgase Helium, Neon oder Argon stellen die nichtreaktiven, auch als Inertgase bezeichneten, Trägergase dar. Durch Beimischung chemisch aktiver Gase, wie Sauerstoff und Stickstoff werden reaktive Spezies erzeugt, die in der Lage sind, mit biologischem Material zu reagieren.

Die Zielstellung der Arbeit war die Untersuchung von Leistungsparametern eines kalten, atmosphärischen und reaktiven, Helium-Plasmajets auf die Desinfektion und Desintegration natürlicher Biofilme. Es sollten vergleichbare Behandlungszeiten von wenigen Sekunden angewendet werden, wie sie in der zahnmedizinischen Praxis für die Kavitätendesinfektion verwendet werden.

Auf polierten, bovinen Schmelzprüfkörpern wurden unter Verwendung 37,5 %iger Phosphorsäure mikroretentive Regionen mit einer Ausdehnung von 2,5 x 4 mm und einer Tiefe von 60 µm erzeugt. Danach wurde durch 2-stündige intraorale Exposition die Biofilmbildung *in-situ* initiiert und durch weitere Inkubation in einer Durchflussskammer für 2 Tage, 7 Tage oder für 14 Tage Biofilme *in-vitro* akkumuliert. Als Nährmedium wurde LB Medium, das 20 % Glukose enthielt, mit einer Fließrate von 20 ml/h verwendet, um die Ausbildung einer aziduren, kariogenen Flora zu begünstigen. Nach Biofilmakkumulation wurden die Prüfkörper mit kaltem, atmosphärischem Plasma bestrahlt. Die Plasmaquelle wurde zur Erzeugung des Plasmajets mit gepulster Mikrowelle angeregt. Die Oberflächentemperatur des Plasmajets am Strahlauftreffpunkt betrug 32 °C bis 40 °C. Die Arbeitsdistanz wurde auf 2,5 mm, die mittlere Pulsdauer auf 3 µs und die mittlere Leistungsabgabe des Mikrowellengenerators auf 1,5 W bis 3 W festgelegt. Der Gasfluss durch die Plasmaquelle betrug 3,5 Liter Helium pro Minute bei linearen Geschwindigkeiten der Plasmaquelle über der Probe von 11 mm/s und einem Linienvorschub von 0,1 mm, resultierend in Behandlungszeiten von 0,9 s/mm². Unbehandelte Biofilme sowie Biofilme, die gegenüber den ungezündeten Prozessgasen oder Chlorhexidin exponiert wurden, dienten als Positiv- und Negativkontrollen.

Die Biofilme wurden mikrobiologisch, vital-fluoreszenzoptisch und rasterelektronenmikroskopisch analysiert. Um auch Veränderungen in der Tiefe der Biofilme morphologisch begutachten zu können, wurden repräsentative Proben zusätzlich transmissionselektronenmikroskopisch untersucht. Die Adhärenz der, mit kaltem Plasma, behandelten Biofilme gegenüber mechanischen Einwirkungen wurde durch Nachbehandlung mit einem Wasserstrahl mit einem Gesamtvolumen von 10 ml aus einer 500 ml Laborflasche aus 10 mm Entfernung für 5 s im Vergleich mit unbehandelten Biofilmen überprüft.

Nach 2-tägiger *in-vitro*-Biofilmbildung waren auf den mikroretentiven Schmelzoberflächen Kokken und Stäbchen als Monolayer sowie vereinzelte Bakterienkolonien erkennbar. Nach 7-tägiger Inkubation war ein mehrlagiger Biofilm nachweisbar. Nach 14 Tagen waren die mikroretentiven Schmelzregionen vollständig mit Biofilm aufgefüllt. Die Bestrahlung der Biofilme mit kaltem, atmosphärischem Plasma führte leistungsabhängig zu differierenden Ergebnissen. Während für 2 Tage kultivierte Biofilme durch alleinige Plasmabestrahlung vollständig desinfiziert und weitgehend zerstört wurden, konnten 7 und 14 Tage alte Biofilme zwar morphologisch reduziert, jedoch nicht vollständig von den Schmelzoberflächen entfernt werden. Vorhandene Biofilmreste erwiesen sich bei Bestrahlung mit einer mittleren Leistung des Mikrowellengenerators von 3 W und einer linearen Bewegung des Plasmajets über die Probe von 11 mm/s, entsprechend 40 °C des Plasmajets am Strahlauftreffpunkt im mikrobiologischen Kontaktpräparat als desinfiziert. Biofilme, die mit geringeren mittleren Leistungen oder schnelleren, linearen Bewegungen des Plasmajets bestrahlt wurden, zeigten geringe Restvitalität. Die Biofilme unterlagen nach Bestrahlung im rasterelektronenmikroskopischen Befund deutlichem Strukturverlust und Ablösungserscheinungen. Während unbehandelte Biofilme nicht durch den Wasserstrahl entfernt werden konnten, erwiesen sich die mit kaltem, atmosphärischem Plasma bestrahlten Biofilme als nicht mehr resistent.

Im Rahmen der vorgestellten Studie konnten Parameter herausgearbeitet werden, mit denen reife Biofilme auf mikroretentiven Schmelzoberflächen mit kaltem, atmosphärischem Plasma bei Temperaturen von 40 °C desinfiziert und desintegriert werden können. Durch einfache mechanische Maßnahmen, wie die Anwendung eines Wasserstrahls war nachfolgend eine vollständige Beseitigung dieser Biofilme möglich. Die hier vorgelegten Ergebnisse stellen eine Basis für die Entwicklung von

Plasmajet gestützten Verfahren für die Oberflächendesinfektion intraoraler Strukturen und dentaler Hartgewebe bei biologisch akzeptablen Temperaturen dar.

1.2 Abstract

Cold atmospheric plasma-jets are ionized local gas flows generated under normal pressure and biologically acceptable temperatures using microwave, high frequency or pulsed DC-high voltage and noble gases. The noble gases Helium, Neon and Argon are non-reactive processing gases also called inert gases. Reactive oxygen species are produced by the use of active gases, such as Oxygen and Nitrogen, which are able to interact with biological material.

The investigation`s aim was to test the suitability of an experimental, non-thermal atmospheric Helium-plasma-jet for the local treatment of *ex-vivo* biofilms. The plasma torch was excited by pulsed microwaves. Treatment temperatures and times applied were comparable to application times for dental treatment procedures.

Polished enamel slices of bovine incisors were etched with 37.5% phosphoric acid to increase the surface energy and then intraorally exposed for two hours to initiate *in-situ* biofilm formation. Thereafter, *in-vitro* biofilm accumulation was performed by incubating the specimens for 2, 7 or 14 days in a flow chamber. In order to foster the formation of an aciduric, cariogenic flora, LB Medium with 20 % of glucose was used as nutrition solution at a flow rate of 20 ml/h. After biofilm formation the slices were irradiated with a non-thermal atmospheric plasma-jet. The surface temperature of the enamel at the contact point ranged from 32°C to 40°C. The operating distance of 2.5 mm, the pulse length of 3 µm and the mean power of the microwave generator of 1.5 W to 3 W were established. The gas flow through the plasma torch was 3.5 l Helium per minute with a linear movement of the torch over the specimens of 11 mm/s with a step width of 0.1 mm, resulting in treatment times of 0.9 s/mm². Untreated biofilms as well as biofilms irradiated with unexcited processing gases and chlorhexidin-treated biofilms served as positive and negative controls.

Specimens were examined by scanning electron microscopy, fluorescence microscopy and microbiologically. To analyze the morphological differences in the depth of the biofilm a representative number of specimens was additionally examined by transmission-electron-microscopy. To investigate the resistance of treated biofilms under mechanical load some specimens were additionally treated with water spray (500 ml plastic flask, distance 10 mm, 5s, 10 ml). The use of the plasma-jet led to power-dependent effects on the biofilms. Early biofilms (2 days) could be disinfected

and destroyed by plasma application, while established biofilms (7 days, 14 days) could not be erased from the surface. Remnants of biofilm could be disinfected by radiation with a mean power of the microwave generator of 3 W and a linear movement of the torch with a speed of 11 mm/s, which is correlated to a surface temperature of 40 °C at contact point. Biofilms which were irradiated with mean power and an accelerated linear movement of the torch showed only a reduced vitality. After radiation the biofilms were loosened and showed a loss of structural integrity. Biofilms treated with a non-thermal atmospheric plasma-jet could not withstand subsequent treatment with an air-driven water spray.

In the presented study it was possible to find parameters of a non-atmospheric plasma torch, which are able to disinfect and disintegrate established biofilms at a temperature of 40 °C. With the help of a simple mechanical treatment, like the air-driven water spray, it was possible to completely remove the biofilm. The presented results form a basis for developing treatment protocols assisted by non-thermal atmospheric plasma-jet to disinfect intraoral surfaces and dental tissue.

2 Einleitung

2.1 Grundlagen physikalischer Plasmen

Physikalische Plasmen haben in jüngster Zeit auf vielen Gebieten der Material- und Oberflächentechnologie, der Optik und der Medizin Bedeutung erlangt. Als Plasma wird ein energiereicher Aggregatzustand bezeichnet, der technisch vorwiegend als Gasentladung erzeugt wird. Physikalische Plasmen bestehen zu einem großen Teil aus freien Ladungsträgern. Der Plasmastrahl, bezeichnet als Plasmajet, ist eine ionisierte lokale Gasströmung, die mittels Mikrowelle, Hochfrequenz oder gepulster DC-Hochspannung in einer sogenannten Plasmaquelle unter Verwendung nichtreaktiver Trägergase wie Helium, Argon oder Neon erzeugt werden kann. Durch Beimischung chemisch aktiver Gase wie Sauerstoff, Stickstoff oder Wasserdampf werden reaktive Spezies erzeugt (z. B. NO-, O- und OH-Radikale), die in der Lage sind, mit oder in biologischem Material zu reagieren (Kieft, 2005a; Kieft *et al.*, 2005b, Liebmann *et al.*, 2011). Des Weiteren werden in den Plasmaentladungen UV-Strahlen, Ionen und Elektronen emittiert, die ebenfalls mit biologischem Material wechselwirken (Vleugels *et al.*, 2005). In Abhängigkeit von den, im Plasmajet, vorkommenden Elementen kommt es zu einer charakteristischen Färbung des Plasmastrahls (Tabelle 1).

Man unterscheidet natürlich vorkommende von künstlich produzierten Plasmen. Eine weitere Unterscheidung physikalischer Plasmen kann nach den Umweltbedingungen, unter denen das Plasma erzeugt wird, in Niederdruckplasmen (unter Vakuum auftretend), atmosphärische Plasmen und Hochdruckplasmen (Druck $\geq 10^5$ MPa) erfolgen. Zu den natürlichen Plasmen gehören Sonne und Fixsterne. Auch die äußere Schicht der Erdatmosphäre, die Ionosphäre ist ein ionisiertes Gas. Natürliche Plasmaentladungen sind zum Beispiel Blitze und das Polarlicht. Bei den technologisch genutzten Plasmen spielt die Temperatur eine wesentliche Rolle. Es existieren Hochtemperaturplasmen mit Temperaturen von 100 °C bis zu mehreren 1000 °C und Niedertemperaturplasmen mit einer konstanten Temperatur unter 100 °C. Hochtemperaturplasmen in industriellen Anwendungen ermöglichen z.B. das Auftragen von Substanzen durch Abscheidung, das Plasmaschweißen, die Oberflächenkorrektur optischer Oberflächen, Ätzvorgänge und Präzisionsschneidarbeiten.

Tabelle 1: Zusammensetzung und elementspezifische Farben physikalischer Plasmen. ROS: Reaktive Sauerstoff Spezies (reactive oxygen species; O, OH, H₂O₂, O₃); RNS: Reaktive Stickstoff Spezies (reactive nitrogen species; NO, NO₂) Die Farbintensität ist abhängig von der Dichte der vorkommenden Spezies (modifiziert nach Heinlin, 2010).

geladene Teilchen	
UVA	ROS
UVB	Wärme
UVC	RNS
elektrisches Feld	
	
Trägergas	Farbe des Plasmastrahls
Sauerstoff (O ₂)	gelb
Helium (He)	blau- purpurrot
Neon (Ne)	rot-orange
Xenon (Xe)	hell weiß/ hellgrau
Krypton (Kr)	bläulich weiß/ bläulich grau
Stickstoff (N ₂)	weißliches u. gräuliches pink
Kohlendioxid (CO ₂)	hell/ weiß/ blau-weißlich
Argon (Ar)	violett/lavendel
Luft (N ₂ /O ₂ / H ₂ O)	pink/ purpurn

2.2 Anwendungen physikalischer Plasmen in Medizin und Zahnmedizin

In der Medizintechnik werden heiße Plasmen zur Oberflächenmodifizierung enossaler Implantate zum Ziel der Verbesserung der Osseointegration (Ring *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2009) eingesetzt. Auch medizinische Behandlungsmethoden basierend auf heißen Plasmaentladungen sind als chirurgische Anwendungen bereits etabliert. Eine wichtige Technik ist die Argon-Plasma-Koagulation (Fridman *et al.*, 2006; Manner, 2008; Zenker, 2008). Sie ist ein Verfahren, bei dem Hochfrequenzenergie kontaktfrei durch ionisiertes Argon-Luft-Gemisch (Argon-

Plasma) auf das Gewebe übergeleitet wird. Das Argon-Luft-Gemisch wird beim Austritt aus einer, durch den Arbeitskanal eines Endoskops (Malick, 2006; Raiser *et al.*, 2006; Sumiyama *et al.*, 2006), eingeführten Sonde durch Hochfrequenzspannung ionisiert und dient als Übertragungsmedium für die Plasmaenergie. Der Arbeitsabstand zum Gewebe beträgt 2 bis 10 mm. Dies führt zu einer punktuellen oder flächigen Koagulation des Gewebes mit einer limitierten Tiefenausdehnung von maximal 3 mm. Indikationen sind die Stillung diffuser Blutungen jeglicher Art (Reshetov *et al.*, 2000; Zenker, 2008) und die Verödung von Angiodysplasien, die Tonsillektomie (Bergler *et al.*; 2001), aber auch der minimalinvasive Gewebeabtrag bei schwierigen Operationen (Priglinger *et al.*, 2005) als auch bei benignen und malignen Tumoren (Malick, 2006; Zucker *et al.* 2009). Bei der kosmetischen Hautverjüngung, als Photorejuvenation bezeichnet (Foster *et al.* 2008; Kilmer *et al.* 2007), werden Hautpigmentationen durch kontrollierte Hitzeeinwirkung geschädigt und die Kollagenproduktion der Haut angeregt. Die hier verwendeten Plasmen weisen eine mittlere Leistung von mehr als 100 W und Temperaturen am Kontaktpunkt zum Gewebe von über 100 °C auf, was auch unerwünschte Effekte wie Verbrennungen hervorrufen kann (Reddy *et al.*, 2008). Der Grad der Gewebeveränderung ist vor allem von der Temperatur des Plasmajets am Auftreffpunkt auf das Gewebe abhängig. So haben Temperaturen von weniger als 40 °C keine Auswirkungen, zwischen 40 °C und 50 °C in Abhängigkeit von der Einwirkzeit treten Veränderungen an Zellmembranen und intermolekularen Strukturen auf, mit fortschreitender Einwirkzeit werden Ödembildung, Nekrose und Devitalisation beobachtet. Bei Temperaturen des Plasmajets am Auftreffpunkt von 60 °C bis 100 °C kommt es zur Proteindenaturierung, der Koagulation extrazellulären Kollagens, der Devitalisation und der Verdunstung von Zellflüssigkeit. Temperaturen über 100 °C führen zur Karbonisierung des bestrahlten Gewebes (Tabelle 2, nach Zenker, 2008). Die hohen Temperaturen am Kontaktpunkt des Plasmastrahls machen diese Art von Plasma unbrauchbar für die Anwendung in engen Körperhöhlen und auf thermo-sensiblen Oberflächen, wie z. B. auf Dentin.

Tabelle 2: Übersicht über die Auswirkungen atmosphärischer Plasmen auf Gewebe. Der Grad der Gewebeveränderung ist vor allem von der Temperatur des Plasmajets abhängig (modifiziert nach Zenker, 2008).

Temperatur	Auswirkungen
< 40 °C	Keine
40 °C – 50 °C	Hyperthermie: Veränderungen von Zellmembranen und intermolekularen Strukturen, Ödembildung, Nekrose und Devitalisation in Abhängigkeit von der Einwirkzeit
60 °C – 80 °C	Proteindenaturierung (Koagulation), Zerstörung von Zellmembranen, Koagulation extrazellulären Kollagens, Devitalisation
100 °C	Verdunstung von Zellflüssigkeit
> 100 °C	Karbonisierung

In der jüngsten Vergangenheit ist es gelungen, lokale Plasmen unter Normaldruck bei Temperaturen von unter 30 °C zu erzeugen. Dabei wird die Temperatur des Plasmas durch gepulste Zündung des Plasmajets für einige Mikrosekunden, kombiniert mit einer Kühlung der Oberfläche mittels des Gasstromes des Trägergases während der Zwischenphase, gesenkt. Die Anwendung von Plasmen mit Temperaturen zwischen 40 °C und 100 °C ist für viele Anwendungsgebiete sinnvoll. Niedertemperaturplasmen werden zur Modifikation von Textilfasern oder auch zur Verbesserung der Haftung von Farbüberzügen auf Kunststoffteilen und zur Sterilisation von Kunststoffen eingesetzt (Deilmann *et al.*, 2008; Morent *et al.*, 2007). Auf dem Gebiet der Medizintechnik werden kalte Plasmen verbreitet zur Desinfektion und Sterilisation von Instrumenten und Verbrauchsmaterialien genutzt, da sie die zu desinfizierenden oder zu sterilisierenden Oberflächen nicht beschädigen oder zerstören. Vorteil dieser Methode ist des Weiteren, dass Plasmen in inhomogene Oberflächen, Risse und Fissuren von wenigen Mikrometern Ausdehnung eindringen können (Hauser *et al.*, 2011; Masaoka, 2007; Mueller *et al.*, 2009). Um die Biokompatibilität von Implantatmaterialien zu verbessern, wurden Plasma-vermittelte

Beschichtungen metallischer Oberflächen mit Kollagen I entwickelt (Hauser *et al.*, 2010). Auch die Biokompatibilität von hitzeempfindlichen Materialien, wie z. B. Silikon, kann durch Plasmabehandlung verbessert werden (Hauser *et al.*, 2009,2011).

Die mikrobielle Wirksamkeit kalter Plasmen konnte in zahlreichen Studien nachgewiesen werden (Becker *et al.*, 2005; Hammann *et al.*, 2010; Laroussi, 2002a,b; Laroussi and Lu, 2005; Moisan *et al.*, 2001; Ostroukhova *et al.*, 1995; Rupf *et al.*, 2010a, c; Vleugels *et al.* 2005).

Mit fortschreitender Entwicklung der atmosphärischen Plasmen entwickelt sich die Plasmamedizin als eine fächerübergreifende Disziplin. Vor allem auf dem Gebiet der Dermatologie und hier insbesondere zur Desinfektion infizierter Hautareale wird die Effektivität von Plasmen geprüft (Lademann *et al.*, 2009; 2011a; b). In jüngster Zeit wurden erste klinische Studien zur Verwendung eines Niedertemperatur-Argon-Plasmas in der Dermatologie publiziert (Daeschlein *et al.*, 2009; Heinlin *et al.*, 2010; Isbary *et al.*, 2010; Isbary *et al.*, 2011; Mertens *et al.*, 2009 a, b). Dabei wurden chronisch infizierte und ulzerierte Wunden mit kaltem, atmosphärischem Plasma behandelt. Es konnte gezeigt werden, dass dieses kontaktfreie und non-invasive Behandlungsverfahren Vorteile gegenüber der herkömmlichen Therapie hat. Durch die Eigenschaft von Plasmen, selbst in kleinste Poren und Fissuren eindringen zu können, war es möglich infizierte Hautareale zu desinfizieren (Isbary *et al.*, 2010). Auch multi-resistente Bakterien, wie der Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* und Markerkeime wie *Bacillus subtilis* sowie Biofilme werden effektiv in ihrer Anzahl reduziert (Ermolaeva *et al.* 2011; Heinlin *et al.*, 2010, Winter *et al.*, 2011). Darüber hinaus konnte bis heute bei Bakterien keine Resistenzbildung gegenüber Plasmabehandlungen nachwiesen werden. Für die behandelten Patienten hatte die Plasmatherapie den Vorteil, dass die Behandlung schmerzfrei ablief. Ebenso konnte die Wundheilung beschleunigt werden (Fetykow *et al.*, 2009). Die verbesserte Wundheilung wird durch die Bildung von NO-Radikalen im Gewebe, gefolgt von beschleunigter Angiogenese und Neovaskularisation der Kollagen-Elastin Matrix erklärt (Liebmann *et al.*, 2011; Ring *et al.*, 2010).

Durch eine erhebliche Miniaturisierung der Plasmaquellen (Coulombe *et al.*, 2006, Rupf *et al.*, 2010a,b,c) eröffnen sich auch Anwendungsmöglichkeiten kalter Plasmen in der Zahnmedizin (Abbildung 1). So konnte nachgewiesen werden, dass durch Plasmabestrahlung Oberflächeneigenschaften verändert werden (Rupf *et al.*,

2010b,2011a, b; Yoshinari *et al.*, 2009). Im Einzelnen wurden die Erhöhung der Benetzbarkeit, verminderte Kohlenstoffanteile und die Dotierung mit Sauerstoffspezies gemessen (Böhm *et al.*, 2009). Im Rahmen von *in-vitro* Studien zur Beeinflussung der Interaktionszone zwischen Zahn und Kompositfüllung wurde eine stärker ausgeprägte Hybridisierung von Dentin und Adhäsivsystem beobachtet (Ritts *et al.*, 2010; Rupf *et al.*, 2011a, b).



Abbildung 1: Am Leibniz Institut für Oberflächenmodifizierung in Leipzig entwickelte miniaturisierte Plasmaquelle. Der Plasmajet (Plasmastrahl) besitzt eine Temperatur von weniger als 40 °C.

In der Zahnmedizin besitzen kalte, atmosphärische Plasmen und Plasmajets ein multimodales Anwendungspotenzial. So sind neben der Desinfektion von kariösem Dentin, parodontalen Biofilmen (Joaquin *et al.* 2009; Puac *et al.*, 2009) und dem Endodont (Lu *et al.*, 2009) sowie von (Titan-)Oberflächen (Hübner *et al.*,2010; Koban *et al.*, 2011; Rupf *et al.*, 2011c) vor allem die erhöhte Oberflächenenergie für die Erzielung eines verbesserten Haftverbundes zwischen Zahn und Füllungsmaterial oder auch zwischen verschiedenen Restaurationsmaterialien von Interesse (Rupf *et al.*, 2011a, b). Neben der bisher vor allem untersuchten abtragenden, Oberflächen ätzenden Arbeitsweise bieten Plasmajets jedoch auch die Möglichkeit, Stoffe auf Oberflächen abzuscheiden, um mikroporöse Oberflächen zu versiegeln. Auch kosmetische Zahnaufhellungen durch kaltes, atmosphärisches Plasma wurden *in-vitro* geprüft (Lee *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2009).

Auf dem Gebiet der Zahnmedizin sind bisher wenige Publikationen erschienen, die eine Anwendung kalten, atmosphärischen Plasmas untersuchten. So wurden die Entfernung von Plaque und kariösem Dentin suggeriert (Bin *et al.*, 2006; Sladek *et al.*, 2004; Stoffels *et al.* 2002; Walraven *et al.*, 2002). Es wurden bisher nur wenige Studien mit systematischen Untersuchungen an Biofilmen vorgenommen. Ausnahmen sind die *in-vitro*-Desinfektion von *Streptococcus mutans* (Sladek *et al.*, 2007), *Staphylococcus aureus* (Joshi *et al.*, 2010) und *Staphylococcus epidermis* (Kamgang *et al.*, 2007). Herkömmliche Verfahren, wie die Applikation desinfizierender Agenzien, z. B. von Chlorhexidindigluconat oder die Ozonanwendung, zeigen eine unvollkommene Penetration von Biofilmen oder von kariös verändertem Dentin (Baysan und Beighton, 2007; Hope und Wilson, 2004). Eine Zerstörung der Biofilmmatrix ist mit diesen Verfahren nur unvollständig möglich. Kaltes, atmosphärisches Plasma bietet die Möglichkeit, kontaktfrei zum Operationsgebiet Biofilme vollständig zu desinfizieren (Goree *et al.*, 2006; Koban *et al.*, 2011; Rupf *et al.*, 2010a, b).

2.3 Biofilmmodelle in der Zahnmedizin

In der zahnmedizinischen Forschung sind zahlreiche Biofilmmodelle etabliert (Wimpenny, 1997). Zwei Modelle sind dabei klinisch von besonderer Bedeutung (Marsh, 1995). Zum einen das *in-vivo* Biofilmmodell, das allerdings auf Grund ethischer Grundsätze nicht immer zur Anwendung kommen kann, da es in vielen Fällen zu gesundheitlichen Schäden der Testpersonen führen würde (*Primum non nocere*). Zum anderen das *in-vitro* Biofilmmodell, das bezogen auf den menschlichen Organismus jedoch nicht immer volle Gültigkeit aufweist.

In-vivo Biofilmmodelle sind teilweise sehr aufwendig in ihrer Handhabung, da bei der Entnahme der Proben der Biofilm zerstört werden kann. Mit Hilfe sogenannter *in-situ* Modelle ist es möglich, Biofilme in der Mundhöhle auf Prüfkörpern zu etablieren und unverletzt zu entnehmen (Robinson *et al.*, 1997; Sandig *et al.*, 1988). Dabei wurden auch Trägerplatten aus bovinem Schmelz hergestellt und entweder an Teilprothesen befestigt oder aber an individuell angefertigten Kunststoffschienen (Arweiler *et al.*, 2008).

In-vitro Biofilmmodelle unterteilen sich in replikative und investigative Modelle (Gilbert, 1995). Replikative Modelle sind Versuchsaufbauten, die die oralen

Verhältnisse möglichst genau wiedergeben. Sie werden auch als künstliche Mundhöhle bezeichnet. Investigative Modelle konzentrieren sich nur auf einen oder auf einige wenige Aspekte des oralen Biofilms, die für die Forschung wichtig sind. Dabei werden Proben entweder in bakterielle Suspension eingelegt (Clarkson *et al.*, 1984) oder kontinuierlich mit einer bakteriellen Lösung betropft (Levine, Coulter, 1976).

Bei der Untersuchung von Plasmabestrahlung auf orale Biofilme stellt sich insbesondere die Frage nach der morphologischen Veränderung der Biofilme. Mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie (REM) lassen sich Oberflächen in hoher Auflösung vergrößern und darstellen. Dabei ist zu beachten, dass die feuchten Biofilmproben zuvor entwässert werden müssen (Reimer, 1983). Außerdem muss eine leitende Metallschicht aufgetragen werden, um statische Aufladungsphänomene zu verhindern (Plattner, Hentschel, 1997).

Durch die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) ist es möglich die morphologischen Veränderungen in der Tiefe des Biofilms zu bewerten. Zudem besitzt das Transmissionselektronenmikroskop eine hohe Auflösung im Nanometerbereich und kann somit zur Darstellung von Nanostrukturen dienen. Die Transmissionselektronenmikroskopie hat sich bei der Untersuchung zur Bildung oraler Biofilme als ergiebig erwiesen (Deimling *et al.*, 2004; Hannig M., 1997)

Zur Beurteilung der Fähigkeit von Methoden, Biofilme zu desinfizieren, ist der Vitalitätszustand der Mikroorganismen, die den Biofilm bilden von besonderem Interesse. Mit Hilfe der Vital-Fluoreszenzmikroskopie ist es möglich lebende von toten Mikroorganismen zu unterscheiden und somit die Wirkung eines Desinfektionsverfahrens einzuschätzen. Diese Methode des Anfärbens von Mikroorganismen in der Zahnmedizin ist erstmals 1983 beschrieben worden (Netuschil *et al.*, 1983) und ist heute eine anerkannte Methode zur Vitalitätsuntersuchung oraler Biofilme (Auschill *et al.*, 2001; Netuschil *et al.*, 1996)

Die RODAC-Kontakttechnik (Replicate Organism Direct Agar Contact) wurde gewählt, da sie ein seit langer Zeit bewährtes Mittel zur mikrobiologischen Untersuchung kontaminierter Oberflächen darstellt (Klein, 1969; Niskaken, 1977). Zunächst zur Überprüfung in Lebensmittelbetrieben entwickelt und durch das Deutsche Institut für Normung standardisiert (DIN 10113-3), hat dieses Verfahren

heute weite Verbreitung erlangt (Baumgart, 1996; Schulze, 2000). Es ist leicht durchzuführen und dennoch aussagekräftig.

2.4 Ziele der Arbeit / Fragestellung

Im Rahmen eines durch das BMBF (FKZ: FKZ 01 EZ 0730 und 01 EZ 0731) geförderten Kooperationsprojektes mit dem Leibniz-Institut für Oberflächenmodifizierung in Leipzig sollte die Machbarkeit der Anwendung eines kalten, atmosphärischen Plasmajets in der Zahnmedizin geprüft werden. Die Zielstellungen dieses Projektes beinhalteten neben der Bearbeitung von Zahnhartsubstanzen mit kaltem, atmosphärischem Plasma auch die Destruktion und Modifikation oraler Biofilme.

Für die vorgestellte Studie wurden folgende Arbeitshypothesen aufgestellt:

1. Die Destruktion früher und etablierter Biofilme auf Zahnhartsubstanz ist durch Anwendung kalten, atmosphärischen Plasmas bei biologisch akzeptablen Temperaturen und kurzzeitiger Anwendung möglich.
2. Durch Plasmabestrahlung wird die Biofilmmatrix desintegriert und kann durch nichtinvasive Verfahren entfernt werden.

Die Zielstellung der vorgelegten Arbeit war es, Parameter für einen experimentellen, kalten, atmosphärischen Helium-Plasmajet zu erarbeiten, die für die Zerstörung und Beseitigung von Biofilmen auf bovinen Schmelzprobekörpern, bei biologisch akzeptablen Temperaturen, geeignet sind. Die Untersuchungen sollten hauptsächlich morphologische Veränderungen der Biofilme durch Plasmabestrahlung, mittels rasterelektronenmikroskopischer Darstellung, belegen. Die fluoreszenz-mikroskopischen und die mikrobiologischen Untersuchungen sollten die erhaltenen Ergebnisse bestätigen.

3 Material und Methode

3.1 Herstellung von Prüfkörpern als Biofilmträger

Für die Herstellung von Schmelzprüfkörpern wurden bovine Inzisiven der 2. Dentition aus dem Schlachthof Zweibrücken bezogen. Die Rinder wurden auf „Bovine spongiforme Enzephalopathie“ (BSE) getestet und erwiesen sich als frei von dieser Erkrankung. Zunächst wurden, mit einer diamantierten Kreissäge (Conrad Apparatebau, Clausthal-Zellerfeld, Deutschland), die Zahnwurzeln abgetrennt. Die Zahnkronen wurden zur Politur und Egalisierung der Schmelzoberfläche durch einen Polierautomaten (Metkon Gripo 2V, Metkon Instruments, Bursa, Türkei) mit Siliziumkarbid-Schleifpapier (SiC, Buehler, Düsseldorf, Deutschland; Struers, Willich, Deutschland) aufsteigender Körnung (Grit P 120, 600, 800, 1200, 2500, 4000) bearbeitet. Die Zahnkronen wurden anschließend durch die diamantierte Kreissäge in 5 mm x 5 mm x 2 mm große Prüfkörper zerteilt. Nach der Politur wurde die Prüfkörperoberfläche mit säurebeständigem Nagellack versiegelt, wobei ein zentrales 2,5 mm x 4 mm großes Fenster unbedeckt blieb (Meyer-Lueckel und Paris, 2008). Um eine Retentionsverstärkung der Biofilme durch Mikroretention auf den Schmelzprüfkörpern zu erreichen, wurde die freie Schmelzoberfläche für 3 x 30 min mit 37,5% Phosphorsäure (KerrHawe, Bioggio, Schweiz) geätzt. Etwa $60 \pm 20 \mu\text{m}$ der Schmelzoberfläche wurden so partiell erodiert. Nach dieser Oberflächenbearbeitung wurde der Nagellack vorsichtig entfernt und die Prüfkörper bis zu ihrer weiteren Verwendung in destilliertem Wasser gelagert. Abweichend vom beschriebenen Vorgehen wurden Prüfkörper für die transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung mit einer Größe von 2 mm x 2 mm x 1 mm hergestellt.

3.2 *In-vitro*-Biofilmkultivierung über 2, 7 und 14 Tage

Zur Initiation der Biofilmbildung wurden die Prüfkörper mit einem additionsvernetzenden Silikon (President fast light, Coltene/Whaledent, Altstätten, Schweiz) auf individuell angefertigten Kunststoffschienen im Oberkiefer von 3 Probanden bukkal und palatinal befestigt (Abbildung 2). Die Schmelzprüfkörper wurden für 2 Stunden im oralen Milieu exponiert. Danach wurden die Prüfkörper, mit Silikon, auf Objektträgern fixiert und in eine Durchflussskammer eingebracht (Abbildung 3). Die intraorale Biofilmetablierung und die nachfolgende Bestrahlung

der Biofilme mit kaltem, atmosphärischem Plasma wurde durch die Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes (Votum No. 39/09) genehmigt.



Abbildung 2: Individuell angefertigte Kunststoffschiene mit bukkal fixierten Prüfkörpern.

Für die *in-vitro*-Akkumulation und -Maturation der Biofilme wurden Objektträgerfärbeküvetten nach Hellendahl (VWR, Wien, Österreich) genutzt, in die an der unteren seitlichen Wand eine Öffnung für einen Abflussschlauch gefräst wurde. Um das Nährmedium kontinuierlich in die Durchflussskammer einleiten zu können, wurden über einen Tropfenregulierer (D-Flo Infusionsgerät mit Infusionsregler, P.J. Dahlhausen, Köln, Deutschland) 20 ml/h Nährmedium zugeführt. Die Nährflüssigkeit bestand aus LB-Medium (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) und enthielt 20 % Glukose, um die Ausbildung glukosetoleranter kariogener Biofilme zu ermöglichen. Der Abfluss des Mediums wurde durch die Verwendung einer Peristaltikpumpe (Reglo Analog, Ismatec, Wertheim-Mondfeld, Deutschland) realisiert. Die Objektträger wurden seitlich mit zusätzlichen Kerben versehen, um einen gerichteten Flüssigkeitsstrom durch die Kammer zu gewährleisten. Die Umwälzung des Nährmediums wurde mit Hilfe eines Magnetrührers durchgeführt. Die Durchflussskammer wurde bei einer konstanten Temperatur von 37 °C in einem Inkubator platziert (in Anlehnung an Schiffner, 1999).

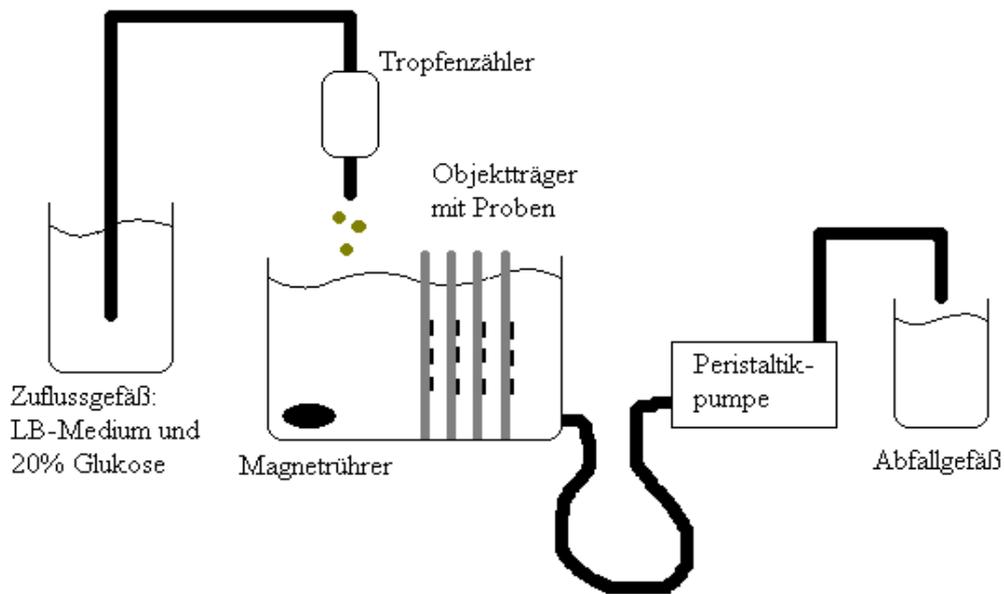


Abbildung 3: Schematischer Aufbau der verwendeten Durchflusskammer zur *in-vitro* Biofilmetablerung. Aus dem Zuflussgefäß wurde über einen Infusionsregler frisches Medium in die Durchflusskammer eingeleitet. Durch den Magnetrührer wurde eine Strömung aufrechterhalten, die eine Biofilmbildung auf dem Nährmedium verhindert und Strömungsstress an den Proben verursacht. Mit Hilfe der Peristaltikpumpe wurde ein kontinuierlicher Abfluss gewährleistet (modifiziert nach Schiffner, 1999).

Die Schmelzprüfkörper wurden für 2 Tage, 7 Tage und 14 Tage zur Etablierung von Biofilmen in der Durchflusskammer inkubiert. Nach 14-tägiger Inkubation füllten die Biofilme die durch Ätzung entstandenen Schmelzdefekte auf. Alle Prüfkörper wurden unmittelbar nach Abschluss der Biofilmbildung der Behandlung mit dem Plasmajet unterzogen.

In Zusammenarbeit mit dem Institut für Mikrobiologie und Hygiene des Universitätsklinikums des Saarlandes wurde geprüft, welche Bakterienspezies die Biofilme nach 2, 7 und 14 Tagen dominierten. Jeweils 2 Prüfkörper wurden mit der biofilmtragenden Oberfläche mit BHI-Agar-Platten (brain heart infusion, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) in Kontakt gebracht und über die Agar-Oberfläche S-förmig ausgestrichen. Nach 48-stündiger Inkubation bei 37 °C wurden morphologisch differierende Bakterienkolonien aufgenommen und auf neue BHI-Agarplatten übertragen. Nach weiterer 48-stündiger Inkubation wurden die Bakterienkolonien mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie (MALDI Biotyper,

Ultraflex MALDI-TOF Massenspektrometer, Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Deutschland) klassifiziert.

3.3 Plasmajet, Bearbeitungsparameter

3.3.1 Aufbau der Plasmaquelle

Der in dieser Untersuchung verwendete kalte, atmosphärische Plasmajet wurde in einer neuentwickelten, miniaturisierten Plasmaquelle generiert (Abbildung 4). Die Plasmaquelle bestand aus einem Elektrodenkoaxialsystem und wurde über gepulste Mikrowellenenergie angeregt. Der Innenleiter repräsentierte die innere Elektrode und bestand aus einem 0,3 mm dicken Stahlröhrchen, aus dem die Prozessgase zugeleitet wurden. Die zweite Elektrode wurde von dem Stahlkörper der Quelle gebildet und hatte einen Durchmesser von 3,4 mm. Zur Anregung der Quelle wurde ein gepulster Mikrowellengenerator (2,45 GHz) verwendet. Der Generator ermöglichte eine Pulsleistung von 100-300 W, eine Pulsweite von 1-10 μ s und eine mittlere Leistung von 1-9 W. Über einen Massenflussregler konnte eine definierte Flussrate der Prozessgase eingestellt werden. Die Plasmaquelle wurde auf einem computergesteuerten 3-Achsen Tischsystem montiert, um reproduzierbare Zeit-, Distanz- und Scanparameter einzustellen.

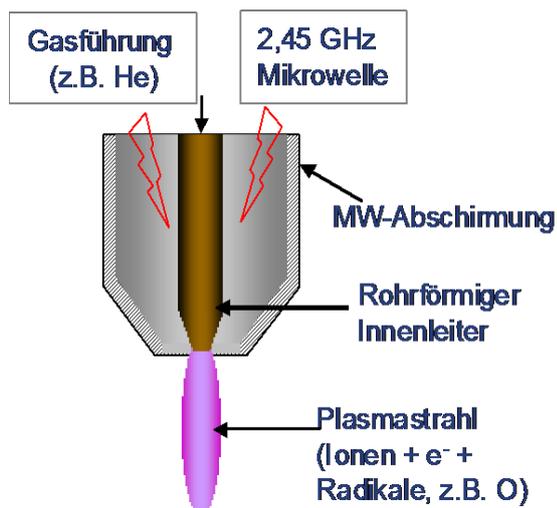


Abbildung 4: Schematische Darstellung einer Plasmaquelle und des Plasmajets. Das durch die Plasmaquelle hindurch strömende Gas wird mittels gepulster Mikrowelle (2,45 GHz) angeregt. Der Plasmajet besteht aus Ionen, Elektronen, Neutralteilchen und im Plasma erzeugten Radikalen, weiterhin wird Licht emittiert.

3.3.2 Parameter für die Behandlung der Biofilme mit Plasma

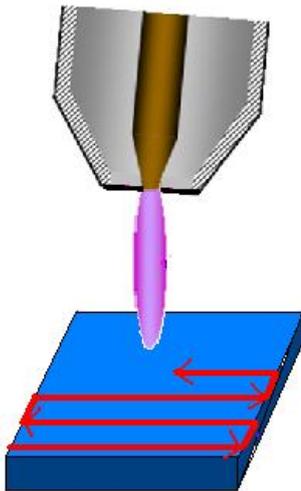
Für die gestellte Zielsetzung wurden die Biofilme im konstanten Abstand Plasmquelle - Biofilmoberfläche von 2,5 mm bestrahlt. Die Mikrowellen-Pulsdauer betrug 3 μ s bei einer Pulsleistung von 300 W und einem Helium-Gasfluss von 3,5 Standard-Litern pro Minute. Es wurden mittlere elektrische Eingangsleistungen von 1,5 W, 2 W und 3 W, innerhalb der Vorversuche auch 5 W, justiert.

Die Temperaturmessung erfolgte mittels Infrarot-Kamera-Thermographie am Strahlauftrittspunkt. Die Bewegungsgeschwindigkeit des Plasmajets über den Biofilmen betrug 11 mm/s, innerhalb der Vorversuche auch 16 mm/s oder 30 mm/s. Die Plasmaquelle wurde mäanderförmig mit einem Zeilenvorschub von 0,1 mm geführt (Abbildung 5). In Vorversuchen wurden verschiedene Bestrahlungsparameter getestet, von denen letztendlich 3 Parameter (1,5 W, 2 W, 3 W jeweils 11 mm/s) verwendet wurden (Tabelle 5). Für die rasterelektronenmikroskopische Auswertung wurde die Hälfte eines jeden Prüfkörpers bestrahlt; die unbestrahlte Hälfte diente als interne Kontrolle. Weitere Kontrollproben wurden ohne Plasmazündung, ausschließlich mit den Prozessgasen, bestrahlt. Zusätzlich wurden unbestrahlte Biofilmprouben für 2 min in Chlorhexidindigluconatlösung (0,2 %) inkubiert. Für mikrobiologische und fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen wurden jeweils die kompletten Prüfkörper bestrahlt.

3.3.3 Wasserbestrahlung

Vorangegangene Untersuchungen zur Desinfektion von Biofilmen mit kaltem, atmosphärischem Plasma ließen den Schluss zu, dass die Wirkung des Plasmas auf die Oberfläche biologischer Strukturen begrenzt ist. Biofilme einer Stärke von mehreren Mikrometern könnten oberflächlich desinfiziert in der Tiefe jedoch noch vital sein. Bei initialen Untersuchungen wurde zudem festgestellt, dass sich die Biofilme von den Prüfkörpern bei Einlagerung in Pufferlösungen ablösen. Um der Frage der Desintegration der Biofilmadhäsion auf mikroretentivem Schmelz nachzugehen, wurden Biofilme nach Plasmabehandlung zusätzlich mit einem Wasserstrahl (500 ml Laborflasche, 5 s, 10 mm Abstand, 10 ml) gespült. Repräsentativ wurden, für diese Untersuchung, 3 Parameter ausgewählt. Sie repräsentierten die geringste Leistungsstufe (Gruppe A), eine mittlere Leistungsstufe

(Gruppe B) sowie die Leistungsstufe mit der höchsten Bestrahlungsintensität (Gruppe C). Die gesamte Prüfkörperoberfläche wurde bestrahlt. Ausschließlich mit Prozessgasen, mit Chlorhexidindigluconat (0,2 %; 2 min.) behandelte sowie unbehandelte Biofilme wurden als Kontrollen mitgeführt und ebenfalls mit dem Wasserstrahl bearbeitet.



a)



b)

Abbildung 5: a) Schematische Darstellung des mäanderförmigen Bewegungsablaufs des Plasmajets, b) Probenbearbeitung durch den Plasmajet.

3.4 Auswertungsmethoden

3.4.1 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Für die rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen wurde jeweils die Hälfte der Prüfkörperoberfläche bestrahlt. Die Prüfkörper wurden danach für 2 Stunden in Glutaraldehyd (2,5 % in PBS) fixiert. Zur vollständigen Entfernung des Glutaraldehyds wurden die Schmelzprüfkörper 5-mal für 10 Minuten mit PBS (Phosphat buffered saline; PAA Laboratories, Pasching, Österreich) gespült. Im Anschluss folgte die Entwässerung der Proben in einer aufsteigenden Ethanolreihe (50 – 90 % je 10 min; 96 % 2 x 10 min). Die Proben wurden danach mit 1,1,1,3,3,3-Hexamethyldisilazan (HMDS, Acros Organics, USA) getrocknet (Bray *et al.* 1993; Perdigao *et al.* 1995). Das HMDS wurde bei Raumtemperatur in einer

Sicherheitswerkbank verdampft. Mittels doppelseitiger Klebefolien wurden die Proben auf REM-Probentellern (Plano, Wetzlar, Deutschland) fixiert und mit einer 2-3 nm dicken Platin-Schicht besputtert (Sputter Coater SC 7640 mit planetarischer Probenbühne, Quorum Technologies, Newhaven, GB; Pumpe: Pfeiffer Vacuum Duo 5, Asslar, Deutschland).

Für die rasterelektronenmikroskopische Beurteilung der Biofilme wurde ein Quanta 200 Rasterelektronenmikroskop (Fei Company, Eindhoven, Niederlande) benutzt. Jede Probe wurde in 4 Vergrößerungsstufen (800-, 1600-, 3000- und 5000fach) dargestellt um die Bedeckung der Prüfkörperoberfläche mit Biofilm und die Oberflächenmorphologie der Biofilme im Detail darzustellen. Repräsentativ wurden höhere und geringere Vergrößerungsstufen (50 - 15000) zur bildlichen Darstellung genutzt. Bestrahlte und unbestrahlte Hälfte des Prüfkörpers wurden jeweils miteinander verglichen.

Zur morphologischen Auswertung der Biofilme wurde die 5000fache Vergrößerung genutzt. Es wurde in Vorversuchen, anhand vorliegender unbehandelte und mit unterschiedlichen Plasmaleistungsstufen bearbeiteter Biofilme, ein 7stufiges Bewertungssystem entwickelt (Tabelle 3).

Zur Auswertung der Daten wurden für jeden Parameter und jede Biofilmstärke die Mediane mit Minimal-und Maximalwert (Range) erhoben. Zur statistischen Absicherung wurde der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test verwendet.

Tabelle 3: Scoring zur Bewertung der REM-Bilder.

Score	Beschreibung
6	Etablierter Biofilm oder Bakterien, die die Prüfkörperoberfläche zu mehr als 50% bedecken
5	Intakter Biofilm oder Bakterienschicht. Weniger als 50% der Prüfkörperoberfläche sind bedeckt
4	Vereinzelte Bakterien und kleine Kolonien
3	Keine intakten Mikroorganismen bzw. zerstörter Biofilm. Bedeckung der Oberfläche mit Resten des Biofilms
2	Reduzierte Bedeckung der Prüfkörperoberfläche mit Biofilmresten (<25%)
1	Einzelne zerstörte Bakterien und Reste der Biofilmmatrix
0	Biofilmfrei Prüfkörperoberfläche. Keine Mikroorganismen erkennbar

3.4.2 Fluoreszenzmikroskopie / „live/dead staining“

Für die Vitalfluoreszenzmikroskopie wurden Prüfkörper mit den Plasmajet-Behandlungsparametern A (1,5 W, 11 mm/s), B (2 W, 11 mm/s) und C (3 W, 11 mm/s) vollständig bestrahlt. Die Parameter D und E wurden nicht in diese Untersuchungen einbezogen. Zur Darstellung der Mikroorganismen wurde ein kommerziell verfügbares Test-System genutzt (BacLight Bacterial Viability Kit L7012, Molecular Probes, Carlsbad, USA). Je 1 µl der Komponenten des Kits, SYTO 9 Farbstoff (3,34 mM) und Propidiumiodid (20 mM), wurden im Verhältnis 1 : 1 gemischt und zu 1 ml physiologischer Kochsalzlösung hinzugefügt. Die Färbeflüssigkeit wurde für 15 Minuten in einem abgedunkelten 1,5 ml-Reaktionsgefäß inkubiert. Danach wurden die Prüfkörper in Mikrotiterplatten mit dem Fluoreszenzfarbstoffgemisch bedeckt. Es wurden jeweils nur so viele Proben einbezogen, wie in einer Zeit von 15 Minuten bearbeitet werden konnten, da die Färbeflüssigkeit eine toxische Wirkung auf die Bakterien hat. Die SYTO 9 Farblösung färbt alle Bakterien grün, unabhängig vom Zustand ihrer Zellwand. Propidiumiodid penetriert Bakterien, deren Zellwand zerstört ist und verursacht dadurch eine Reduktion der SYTO 9-Fluoreszenz. Bakterien mit intakter Zellwand können somit grün, zerstörte Bakterien rot fluoreszierend dargestellt werden. SYTO 9 besitzt ein Emissionsmaximum von 500 nm bei einer Anregungswellenlänge von 480 nm. Propidiumiodid wird bei 490 nm angeregt und emittiert Licht der Wellenlänge von 635 nm. Die Proben wurden mit beidseitigem Klebeband auf einem Objektträger befestigt, um zu verhindern, dass sie sich während des Mikroskopierens verschieben. Danach wurde Mounting-Medium auf die Oberfläche gegeben und diese mit einem Deckglas abgedeckt. Die Proben wurden unter einem Auflicht-Fluoreszenzmikroskop (Axioskop sowie Axio Imager A1, Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) beurteilt. Als Lichtquelle kam eine Quecksilber-Kurzbogen-Reflektor-Lampe (Kompaktlichtquelle HXP 120, Leistungselektronik JENA, Jena, Deutschland) zum Einsatz. Die Biofilme wurden durch eine am Mikroskop installierte Digitalkamera (Axio Cam MRc5, Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) bildlich dargestellt. Zur Erstellung von Mischbildern (Overlays) wurde eine mit der Kamera kompatible Bildbearbeitungssoftware (Axio Vision 29A, Carl Zeiss, D-Oberkochen) benutzt. Die Aufnahmen wurden bei 400facher Vergrößerung ausgewertet. Von der Oberfläche des Prüfkörpers wurden repräsentative Biofilmareale bewertet. Prüfkörper, auf denen

keine Bakterien und somit auch keine Fluoreszenz detektiert werden konnten, wurden nicht in die Berechnungen aufgenommen. Die Auswertung erfolgte nach einem dreistufigen Bewertungssystem (Tabelle 4). Zur Auswertung der Daten wurden für jeden Parameter und jede Biofilmstärke die Mediane mit Minimal- und Maximalwert (Range) erhoben.

Tabelle 4: Score zur Auswertung der einzelnen Quadranten der live/dead-Mischbilder. Waren Quadranten vorhanden, die keine Bakterien / Fluoreszenz aufwiesen, so wurden diese als nicht auswertbar (n.a.) gekennzeichnet und nicht in die Berechnungen aufgenommen.

Score	Beschreibung
1	Hauptsächlich rote Fluoreszenz. Das Verhältnis zwischen roter und grüner Fluoreszenz beträgt 60:40 oder höher.
2	Das Verhältnis zwischen roter und grüner Fluoreszenz beträgt 50:50.
3	Hauptsächlich grüne Fluoreszenz. Das Verhältnis zwischen roter und grüner Fluoreszenz beträgt 40:60 oder weniger.

3.4.3 Mikrobiologie

Mit Hilfe der Rodac-Technik (Replicate Organism Detection and Counting) wurden mikrobiologische Kontakt-Agar-Präparate hergestellt. Dazu wurden die Prüfkörper mit der vollständig bestrahlten, biofilmtragenden Oberfläche mit den BHI-Agar-Platten (brain heart infusion, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) in Kontakt gebracht und für 5 s leicht angedrückt. Die Rodac-Platten wurden für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert und danach auf mikrobielles Wachstum geprüft. Biofilmproben, deren Kontaktareale auf dem Agar kein mikrobielles Wachstum aufwiesen wurden als desinfiziert bewertet (Score: 1). Bei Kontaktproben mit mikrobiellem Wachstum

wurde zwischen dem Vorhandensein einzelner Kolonien (Score: 2) und eines dichten Bakterienrasens (Score: 3) differenziert (Abbildung 6). Zur Auswertung der Daten wurden für jeden Parameter und jede Biofilmstärke die Mediane mit Minimal- und Maximalwert (Range) erhoben.

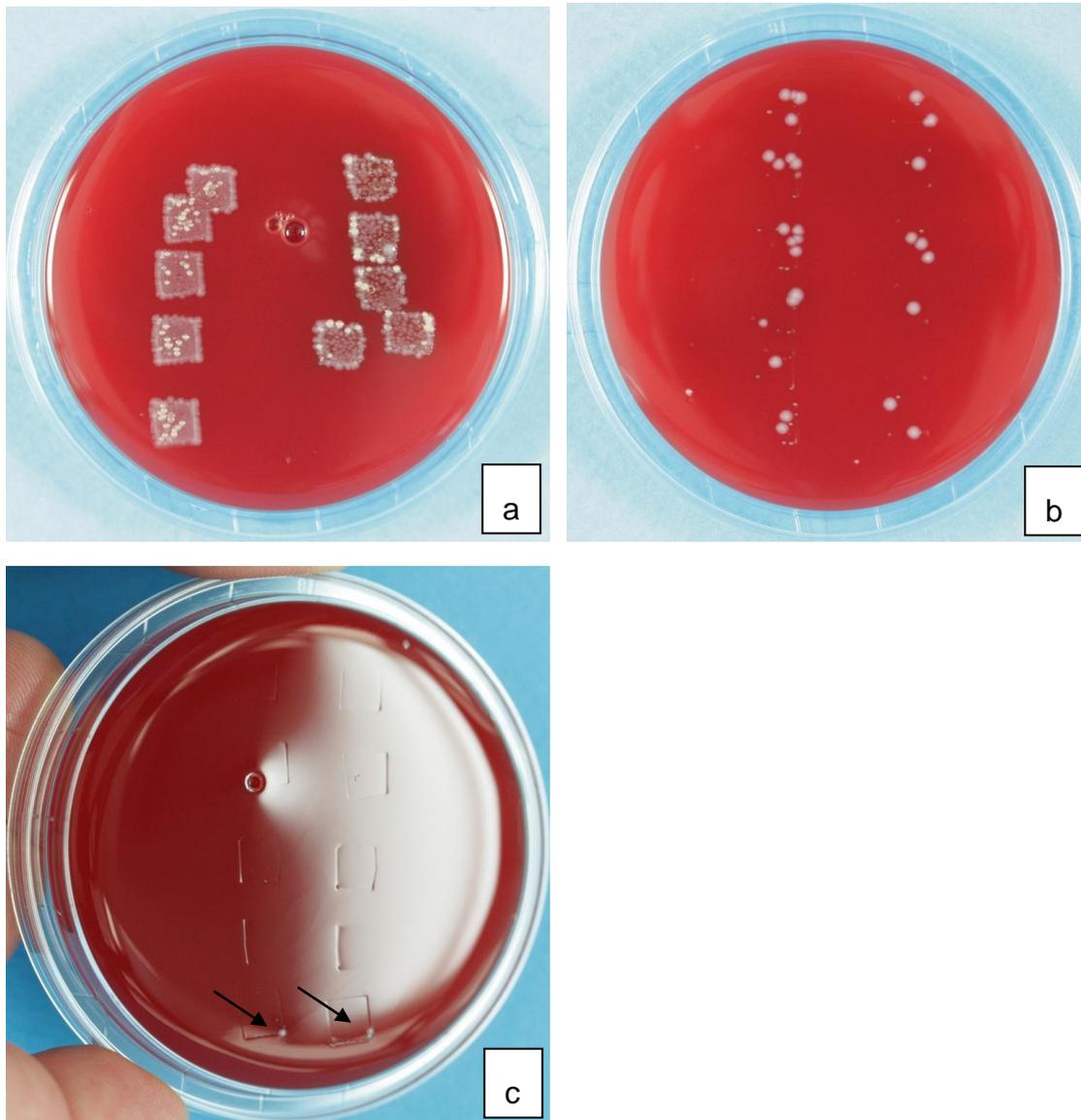


Abbildung 6: Übersichtsaufnahmen von RODAC-Platten mit Kontaktarealen erzeugt durch Prüfkörperabdrücke, a) dichter Bakterienrasen: Score 3, b) einzelne mikrobielle Kolonien: Score 2, c) Kontaktareale ohne mikrobielles Wachstum: Score 1 (Pfeile: Score 2).

3.4.4 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Die Prüfkörper wurden vollständig bestrahlt und danach in 3%igem Glutaraldehyd (in PBS 0,1 M; pH 7,4) fixiert. Nach der Fixierung wurden die Proben mehrfach in PBS gespült. Danach wurden die Proben 2 Stunden in Osmiumtetroxid (2 %; Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) nachfixiert und wiederum mehrfach in PBS gespült. Nach zehnminütigem Spülen in destilliertem Wasser, konnten die Proben in einer aufsteigenden Ethanolreihe (50 % - 96 %) entwässert werden. Die abschließende Entwässerung geschah in Propylenoxid (Serva Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland). Für die transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung mussten die Prüfkörper aus der Propylenlösung über ein Araldit-Propylen-Gemisch in das Einbettmedium überführt werden. Das Araldit-Einbettmedium wurde aus 13 Teilen Araldit Cy 212 (Serva Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland) und 12 Teilen Dodecenylnbernsteinsäure-Anhydride (DDAS) (Serva Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland) hergestellt. Die Prüfkörper wurden schrittweise und über 3 Tage hinweg in das Medium überführt. Danach wurden sie in die Einbettformen gegeben und so ausgerichtet, dass die Schnittseite zur Formspitze positioniert war. Zur Polymerisation des Mediums wurde der Beschleuniger Dy-064 (2,4,6-Tri(dimethyl-aminomethyl)phenol; Serva Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland) verwendet. Das Epoxidharz wurde für 2 Tage bei 65 °C im Brutschrank auspolymerisiert.

Nach der Polymerisation des Epoxidharzes wurden die Prüfkörper von retrograd, also von der Dentinfläche her, angeschliffen und in EDTA (4 %; pH 7,2) entkalkt. Es folgte die Nacheinbettung der Präparate in Araldit. Nach der Polymerisation wurden die Proben aus den Einbettformen entnommen, angeschliffen, poliert und mit einer Rasierklinge zugespitzt. Von den Probekörpern wurden mit Hilfe eines Ultramikrotoms (Ultracut, Reichert-Jung heute Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) unter Verwendung eines Diamantmessers (Typ: ultra, Winkel: 45°, Speed: 1mm/s; Diatome, Bienne, Switzerland) 60-80 nm dicke Ultradünnschnitte hergestellt und auf, mit Pioloformfolie beschichtete, Kupfernetze aufgebracht.

Die Untersuchung der einzelnen Schnitte wurde mit einem Transmissionselektronenmikroskop (Tecnai, Fei Company, Eindhoven, Niederlande) durchgeführt. Die Proben wurden deskriptiv ausgewertet.

3.5 Prüfkörperzuordnung zu Bearbeitungsparametern und Auswertungsmethoden

Tabelle 5: Verwendete Bestrahlungsparameter sowie Probenanzahl für die rasterelektronenmikroskopischen (REM, n = 120), fluoreszenzmikroskopischen (FM, n = 108), transmissionselektronenmikroskopischen (TEM, n = 3) und mikrobiologischen (n = 108) Untersuchungen. Proben der Gruppen A – F wurden mit dem Plasmajet bestrahlt, die Proben der Gruppe „Gas“ wurden den Prozessgasen ohne Plasmazündung ausgesetzt. Gruppen „CHX“ und „Kon“ repräsentieren Kontrollgruppen mit Chlorhexidinbehandlung (0,2 %, 120 s) oder ohne Behandlung. Neben den unbehandelten Biofilmen gab es für die REM-Auswertung zusätzlich noch die internen Kontrollen durch die Bestrahlung der Hälfte der Prüfkörperoberfläche. Die in Klammern gesetzten Zahlenwerte geben die Teilmengen der biofilmtragenden Prüfkörper an, die nach Plasmabestrahlung zusätzlich einer Luft-/Wasser-Behandlung unterzogen wurden. Parameter D – F wurden ausschließlich im Rahmen der Vorversuche verwendet.

Gruppe	A	B	C	D	E	F	Gas	CHX	Kon
mittlere Leistung [W]	1,5	2	3	3	3	5	-	CHX	-
Geschwindigkeit [mm/s]	11	11	11	16	30	11	11	-	-
Rasterelektronenmikroskopie									
2d	7 (2)	7 (2)	9 (2)	2 (-)	2 (-)	2 (-)	3 (1)	4 (1)	4 (1)
7d	7 (2)	7 (2)	9 (2)	2 (-)	2 (-)	2 (-)	3 (1)	4 (1)	4 (1)
14d	7 (2)	7 (2)	9 (2)	2 (-)	2 (-)	2 (-)	3 (1)	4 (1)	4 (1)
Fluoreszenzmikroskopie									
2d	6 (3)	6 (3)	6 (3)	-	-	-	6 (3)	6 (3)	6 (3)
7d	6 (3)	6 (3)	6 (3)	-	-	-	6 (3)	6 (3)	6 (3)
14d	6 (3)	6 (3)	6 (3)	-	-	-	6 (3)	6 (3)	6 (3)
Transmissionselektronenmikroskopie									
2d	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7d	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14d	-	-	1	-	-	-	-	1	1
Mikrobiologie									
2d	6 (3)	6 (3)	6 (3)	-	-	-	6 (3)	6 (3)	6 (3)
7d	6 (3)	6 (3)	6 (3)	-	-	-	6 (3)	6 (3)	6 (3)
14d	6 (3)	6 (3)	6 (3)	-	-	-	6 (3)	6 (3)	6 (3)

Insgesamt wurden 339 Prüfkörper in der Untersuchung verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Vorversuche

Schmelzätzung

Zur Retentionsverbesserung für die Biofilme sollte, durch Anwendung 37 %iger Phosphorsäure, eine Region mit mikroretentiver Oberfläche auf den Schmelzprüfkörpern hergestellt werden. Dabei wurden Ätztiefen von 40-80 μm angestrebt. Es wurde säurefester Nagellack auf die Oberfläche aufgetragen, wobei ein 2,5 x 4 mm großes Fenster unbedeckt blieb. Nach Ende des Ätzvorganges wurde der Nagellack schonend entfernt (Abbildung 7).

Die Einwirkzeit der Phosphorsäure wurde kontinuierlich gesteigert und in der Folge das Phosphorsäuregel mehrfach aufgetragen. Konventionelle Ätzzeiten von 30 s bis 1 min erreichten Rautiefen von wenigen Mikrometern. Die Einwirkzeit des Ätzgels von 30 min resultierte in höheren, jedoch nicht gleichmäßig reproduzierbaren Ätzmustern (Abbildung 7c).

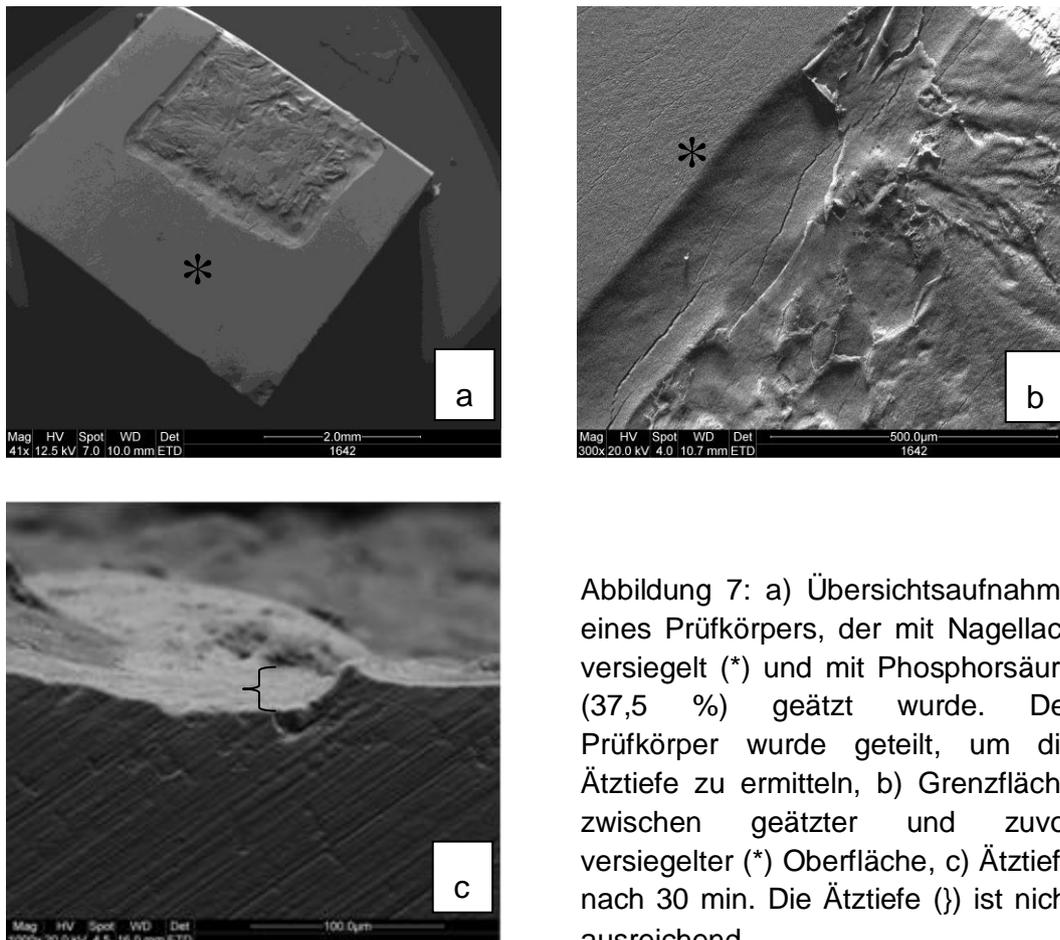


Abbildung 7: a) Übersichtsaufnahme eines Prüfkörpers, der mit Nagellack versiegelt (*) und mit Phosphorsäure (37,5 %) geätzt wurde. Der Prüfkörper wurde geteilt, um die Ätztiefe zu ermitteln, b) Grenzfläche zwischen geätzter und zuvor versiegelter (*) Oberfläche, c) Ätztiefe nach 30 min. Die Ätztiefe (j) ist nicht ausreichend.

Nach wiederholtem Aufbringen des Ätzelgels und einer Einwirkzeit von 3 x 30 min konnten gleichmäßige Relieftiefen zwischen 40 und 80 µm erreicht werden (Abbildung 8).

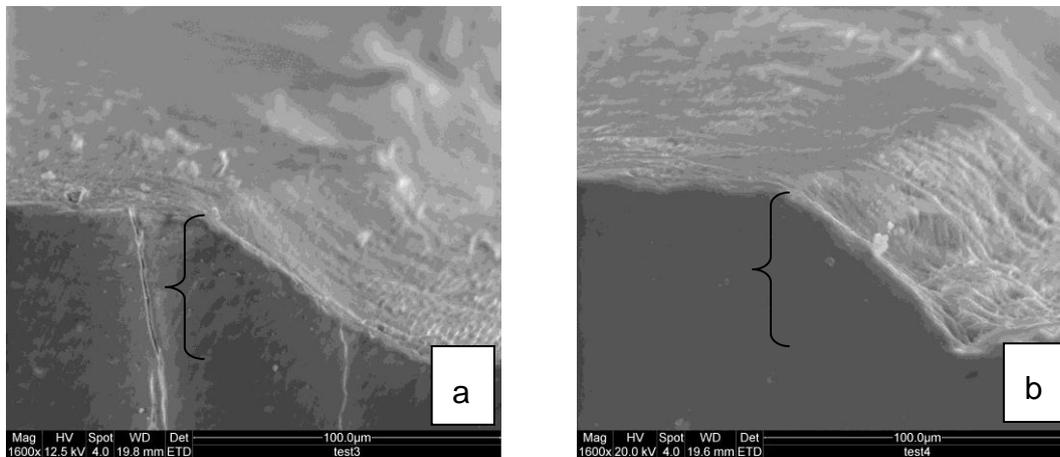


Abbildung 8: a) Prüfkörper nach 3x 30 min Ätzeit. Das entstandene Relief ist 40-80 µm tief. b) weiterer Prüfkörper nach 3x 30 min Ätzeit. Bestätigung des Ergebnisses in Bild a.

Biofilmetablierung

In einem weiteren Vorversuch wurde geprüft, ob unter Verwendung einer Durchflusskammer reproduzierbar Biofilme erzeugt werden können. Ein Verzicht auf die Durchströmung der Durchflusskammer mit Nährmedium resultierte in Biofilmen, die sich Scherkräften gegenüber, als nicht resistent erwiesen. Der Einsatz von 20 % Glukose im Nährmedium ermöglichte die gleichmäßige Ausbildung von Biofilmen zu den jeweiligen Inkubationszeiten. Einzelne Bakterien sowie Bakterienkolonien konnte nach 2 Tagen, ein etablierter mehrlagiger Biofilm nach 7 Tagen und eine vollständige Auffüllung der Ätzmuster nach 14 Tagen beobachtet werden. Beispielhaft sind Biofilme nach 2 Tagen nach 7 Tagen und nach 14 Tagen dargestellt (Abbildung 9). Aus Biofilmen nach 2tägiger Inkubation wurden mit der MALDI-TOF Analyse die Arten *Actinomyces viscosus*, *Enterococcus faecalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus parasanguinis* und *Streptococcus salivarius* identifiziert. Nach 7 Tagen waren die Arten *Actinomyces viscosus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus pneumoniae* und *Streptococcus salivarius* präsent und aus 14tägigen Biofilmen wurden die Arten *Actinomyces viscosus*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis* und *Streptococcus salivarius* identifiziert.

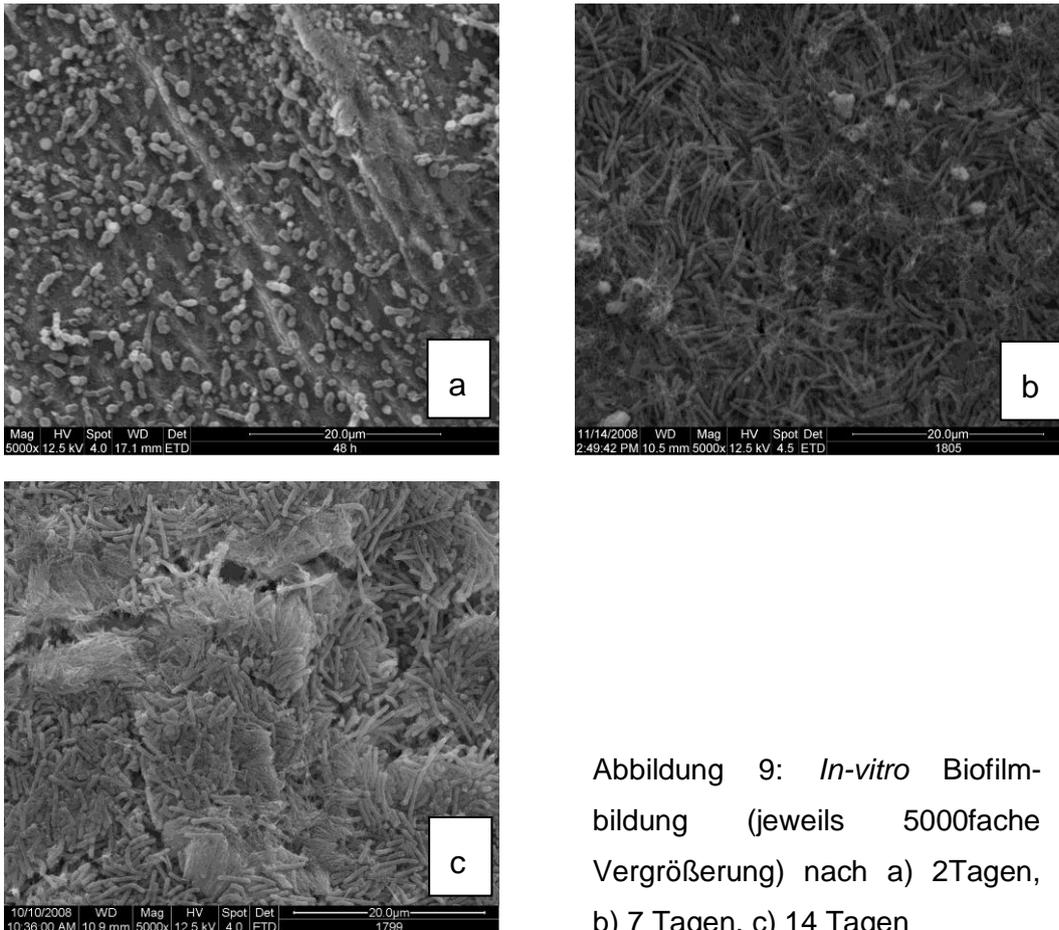


Abbildung 9: *In-vitro* Biofilmbildung (jeweils 5000fache Vergrößerung) nach a) 2 Tagen, b) 7 Tagen, c) 14 Tagen

Parametereinstellungen

In weiteren Vorversuchen wurde die Oberflächentemperatur von Biofilmproben am Auftreffpunkt des Plasmajets in statischer Position mittels Infrarot-Kamera-Thermographie bestimmt. Die Zielstellung dieser Versuche bestand in der Ermittlung von Parametersätzen, die eine Oberflächentemperatur zwischen 32 °C und 40 °C garantierten. An der Plasmaquelle konnten die Parameter Gasfluss, Bearbeitungsgeschwindigkeit, mittlere Leistung und Abstand der Plasmaquelle zur Probe variiert werden. Es konnten mittlere elektrische Eingangsleistungen der Plasmaquelle zwischen 1,5 W und 6 W gewählt werden. Im Rahmen dieses Leistungsbereiches ermöglichte die Menge von 3,5 Litern Helium pro Minute den stabilen Betrieb der Plasmaquelle. Geringere Gas-Durchflussmengen führten bereits bei geringen Leistungen zu Temperaturen von mehr als 40 °C bei unbewegter Plasmaquelle. Gleichzeitig reduzierte sich die Stabilität des Plasmajets. Der Plasmajet hatte eine Länge von 4 mm und der Abstand der Plasmaquelle von der Oberfläche wurde auf 2,5 mm festgelegt. Eine mittlere Leistung von 1,5 W resultierte

bei stehender Quelle in einer mittleren Temperatur von 32 °C, bei 2 W wurden 38 °C und bei 3 W mittlerer Leistung 40 °C erreicht. Die Verwendung der mittleren elektrischen Eingangsleistung von 5 W führte zu Temperaturen auf den Prüfkörperoberflächen von 48 °C. Dieser Parameter wurde aufgrund der hohen Temperatur nicht weiter verwendet. (Abbildung 10). Für die Bearbeitungsgeschwindigkeit wurde eine lineare Zeilenbewegungen über der Probe von 11 mm/s festgelegt. Bei einem Vorschub der Plasmaquelle von 0,1 mm je Zeile entspricht dies einer Bestrahlungszeit von 0,91 s/mm². Orientierend wurden für die mittlere elektrische Eingangsleistung von 3 W höhere Liniengeschwindigkeiten von 16 mm/s und 30 mm/s, entsprechend Bestrahlungszeiten von 0,63 s/mm² bzw. 0,33 s/mm² geprüft. Da bei diesen hohen Geschwindigkeiten jedoch Stabilitätsprobleme für den 3-Achs-Tisch auftraten, wurden hier nur wenige Prüfkörper bestrahlt und diese Parameter ebenfalls nur während der Vorversuche verwendet (Tabelle 5).

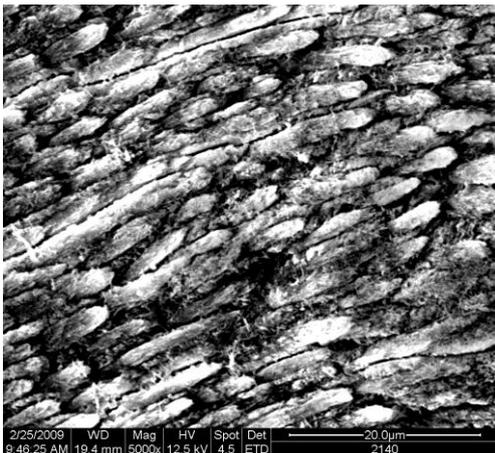


Abbildung 10: 14tägiger Biofilm nach Einwirkung von Plasmastrahlung mit 5 W elektrischer Eingangsleistung. Der Biofilm ist zwar stark alteriert und größtenteils eliminiert, allerdings lagen die Temperaturen während der Bestrahlung bei 48 °C.

4.2 Charakterisierung von Biofilmen nach *in-vitro*-Kultivierung über 2, 7 und 14 Tage sowie Kontrollprobenauswertung

Biofilme nach 2tägiger Kultivierung

Rasterelektronenmikroskopie

Auf den Schmelzprüfkörpern imponierten nach einem Zeitraum von 2 Tagen der *in-vitro*-Biofilmbildung vereinzelte Mikroorganismen und kleine Kolonien. Dabei prägten vor allem Stäbchenbakterien das Bild. Die polierte Schmelzoberfläche und das Ätzmuster waren gut zu erkennen. Es konnte festgestellt werden, dass sich

besonders auf den stärker strukturierten Oberflächenabschnitten größere Bakterienmengen ansammeln konnten.

Die Proben, die mit den Prozessgasen ohne Plasmazündung behandelt wurden, wiesen keine Unterschiede im Vergleich zu unbehandelten Kontrollproben in der rasterelektronenmikroskopischen Auswertung auf. Hier ließen sich sowohl kleine Bakterienkolonien als auch vereinzelte Bakterien nachweisen. Morphologisch zeigten auch die mit Chlorhexidin behandelten Biofilme keine Unterschiede im Vergleich zu unbehandelten Oberflächen (Abbildung 11).

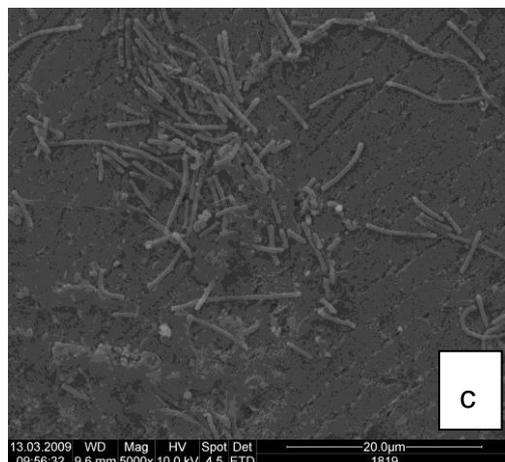
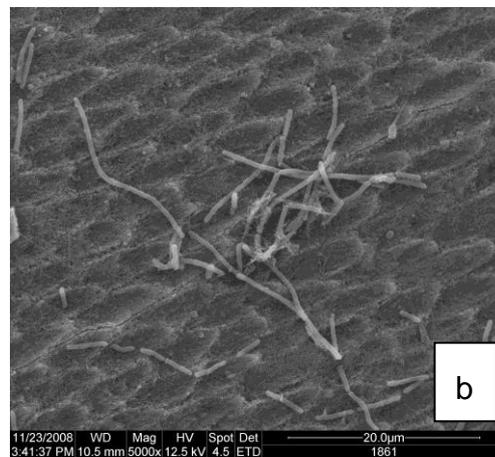
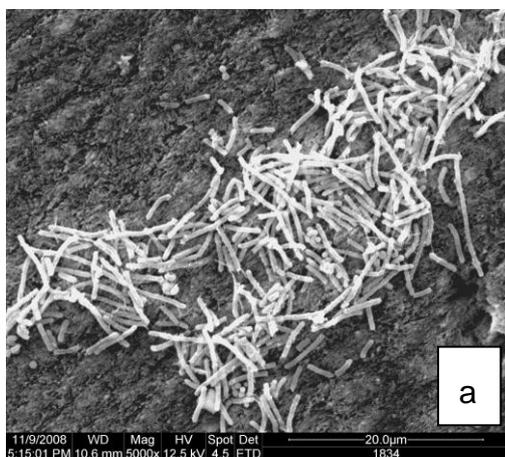


Abbildung 11: Biofilmproben (jeweils 5000fache Vergrößerung) nach 2tägiger Kultivierung. a) mit Prozessgas ohne Plasmazündung behandelte Oberfläche (Gruppe Gas), b) mit Chlorhexidin behandelte Oberfläche (Gruppe CHX), c) Unbehandelte Oberfläche (Gruppe Kon).

Fluoreszenzmikroskopie

Auf den Prüfkörpern mit unbehandelten Biofilmen konnten, nach 2tägiger Inkubation, einzelne Bakterien und Bakterienkolonien detektiert werden. Hier wurde ein hohes Vorkommen von Score 2 gefunden. Eine gute antibakterielle Wirkung zeigte Chlorhexidin, da hier eine geringe Vitalität detektiert werden konnte.

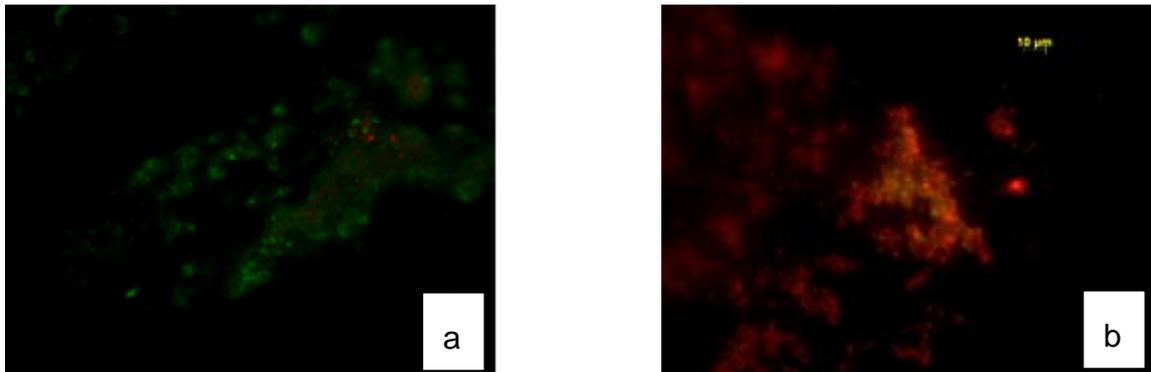


Abbildung 12: 2tägiger Biofilm auf Schmelzprüfkörper a) unbehandelter Biofilm (Gruppe Kon), b) mit Chlorhexidin behandelte Biofilm (Gruppe CHX).

Mikrobiologie

Auf den Kontaktpräparaten 2tägiger Biofilme kam es zum Wachstum dichter Bakterienrasen. Chlorhexidin desinfizierte die Biofilme auf allen 3 Präparaten nach 2 minütiger Inkubation.

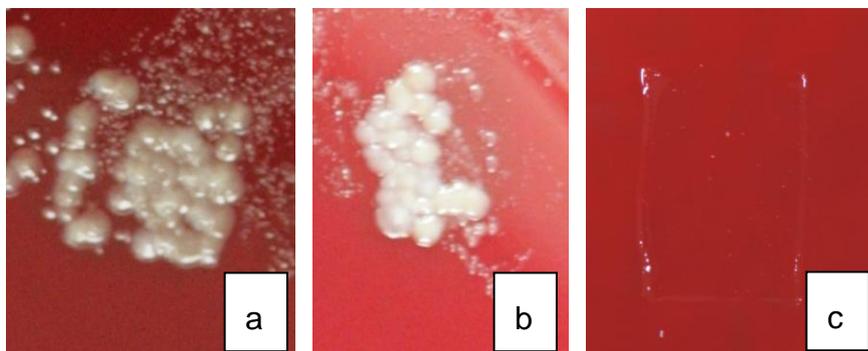


Abbildung 13: Kontaktpräparate eines a) unbehandelten 2tägigen Biofilms, Score 3, b) mit den Prozessgasen ohne Plasmazündung behandelten Biofilms, Score 3 und c) mit Chlorhexidin behandelte Biofilm, Score 1.

Tabelle 6: Ergebnisse der rasterelektronenmikroskopischen (REM), fluoreszenzmikroskopischen (FM) und mikrobiologischen (RODAC) Untersuchungen für Biofilme nach 2tägiger Kultivierung. Die Biofilme wurden mit den Prozessgasen ohne Plasmazündung (Gas, 0,9 s/mm²) oder Chlorhexidin (CHX, 0,2 %, 2 min) behandelt oder ohne weitere Behandlung analysiert (Kon). Angegeben sind jeweils der Median der Scores sowie deren Wertebereich [Minimal-/Maximalwert]. Für die rasterelektronenmikroskopische Auswertung wurde ein 7-stufiges Scoring angewendet (s. Tab. 3). Für die fluoreszenzmikroskopische (s. Tab. 4) und mikrobiologische (s. Abb. 6) Auswertung wurde jeweils ein 3-stufiges Scoring entwickelt.

	Gas	CHX	Kon
REM	3,5 [3/4]	4 [4/4]	4 [3/4]
FM	2,5 [1/3]	1 [1/1]	2,5 [1/3]
RODAC	3 [3/3]	1 [1/1]	3 [3/3]

Biofilme nach 7tägiger Kultivierung

Rasterelektronenmikroskopie

Nach 7tägiger Kultivierung waren etablierte Biofilme entstanden, die eine mehrlagige bakterielle Bedeckung der Prüfkörper aufwiesen. Die vorwiegend auftretenden Stäbchenbakterien konnten die Schmelzkavitäten jedoch nicht vollständig maskieren. Die Prüfkörperoberflächen waren teilweise noch zu erkennen.

Innerhalb der Kontrollgruppen konnte für die Behandlung mit Chlorhexidin und die Bestrahlung der Biofilme mit dem Trägergas eine geringfügige Reduktion der Biofilmausprägung beobachtet werden.

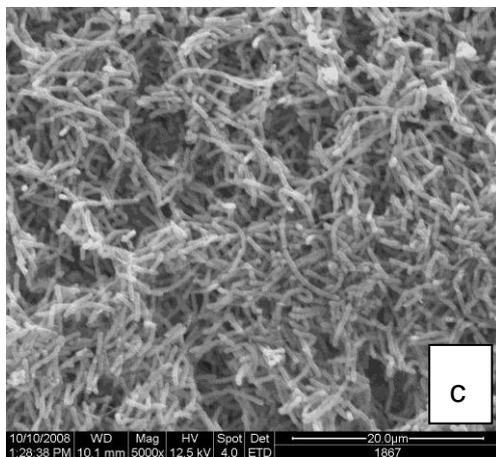
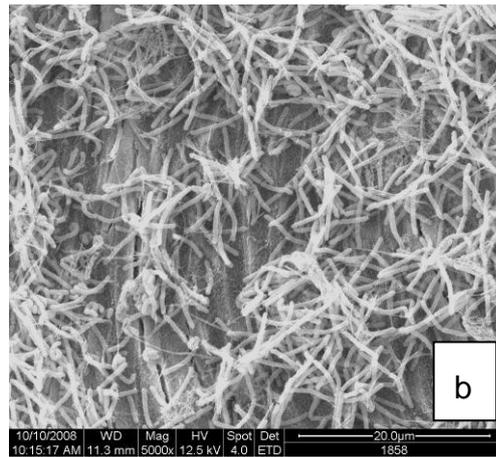
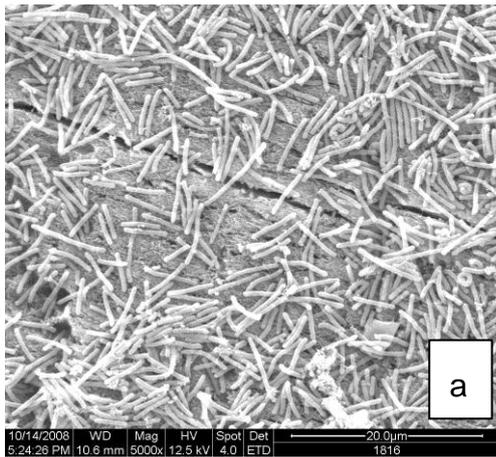


Abbildung 14: Biofilmproben (jeweils 5000fache Vergrößerung) nach 7tägiger Kultivierung. a) mit Prozessgas ohne Plasmazündung behandelte Oberfläche (Gruppe Gas), b) mit Chlorhexidin behandelte Oberfläche (Gruppe CHX), c) Unbehandelte Oberfläche (Gruppe Kon).



Abbildung 15: 15000fache Vergrößerung einer 7tägigen Kontrollprobe. Zu erkennen ist ein etablierter mehrlagiger Biofilm aus Stäbchenbakterien.

Fluoreszenzmikroskopie

Auf den 7tägigen, unbehandelten Prüfkörpern, als auch auf den mit dem Prozessgas behandelten Oberflächen, waren vorwiegend lebende Bakterien zu finden. Die Wirkung von CHX war hier ebenso effektiv, wie die Wirkung auf 2- und 14-Tages-Biofilme.

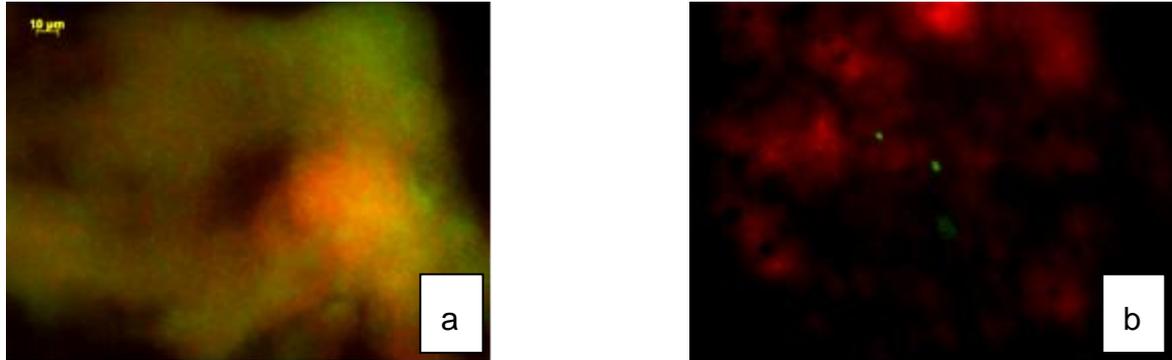


Abbildung 16: 7tägiger Biofilm auf Schmelzprüfkörper a) unbehandelter Biofilm (Gruppe Kon), b) mit Chlorhexidin behandelter Biofilm (Gruppe CHX).

Mikrobiologie

Auf den 7tägigen, unbehandelten Kontaktpräparaten ließ sich ein dichtes bakterielles Wachstum erkennen. Es ließen sich keine Unterschiede im Vergleich zu den mit Trägergas bestrahlten Kontrollen erkennen. Auf den mit Chlorhexidin behandelten Oberflächen kam es zu einer Reduktion des mikrobiellen Wachstums.

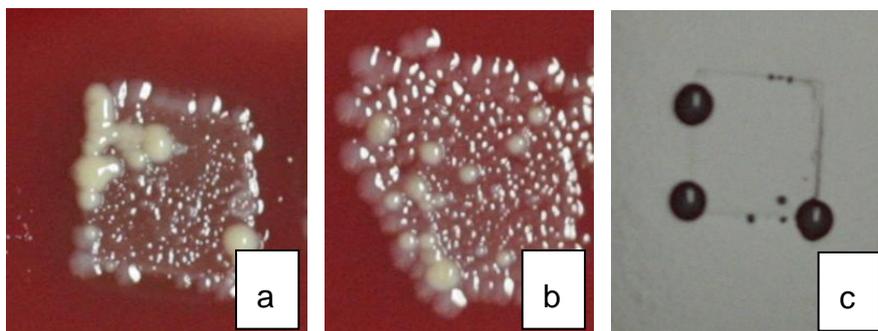


Abbildung 17: Kontaktpräparate von Biofilmen nach 7-tägiger Kultivierung a) unbehandelter Biofilm, Score 3, b) Behandlung mit Prozessgasen ohne Plasmazündung, Score 3, c) Behandlung mit Chlorhexidin, Score 2.

Tabelle 7: Ergebnisse der rasterelektronenmikroskopischen (REM), fluoreszenzmikroskopischen (FM) und mikrobiologischen (RODAC) Untersuchungen für Biofilme nach 7tägiger Kultivierung. Die Biofilme wurden mit den Prozessgasen ohne Plasmazündung (Gas, 0,9 s/mm²) oder Chlorhexidin (CHX, 0,2 %, 2 min) behandelt oder ohne weitere Behandlung analysiert (Kon). Angegeben sind jeweils der Median der Scores sowie deren Wertebereich [Minimal-/Maximalwert]. Für die rasterelektronenmikroskopische Auswertung wurde ein 7-stufiges Scoring angewendet (s. Tab. 3). Für die fluoreszenzmikroskopische (s. Tab. 4) und mikrobiologische (s. Abb. 6) Auswertung wurde jeweils ein 3-stufiges Scoring entwickelt.

	Gas	CHX	Kon
REM	5 [5/5]	6 [5/6]	6 [5/6]
FM	3 [3/3]	1 [1/2]	3 [2/3]
RODAC	3 [3/3]	1 [1/2]	3 [3/3]

Biofilme nach 14tägiger Kultivierung

Rasterelektronenmikroskopie

Biofilme, die über 14 Tage kultiviert wurden, füllten die erodierten Bereiche der Schmelzoberfläche auf den Prüfkörpern vollständig auf. Auch hier bestanden die Biofilme vorwiegend aus Stäbchenbakterien.

In den Kontrollgruppen war zu erkennen, dass es durch Chlorhexidin-Einwirkung zu einer geringen Reduktion des mehrlagigen Biofilms gekommen war.

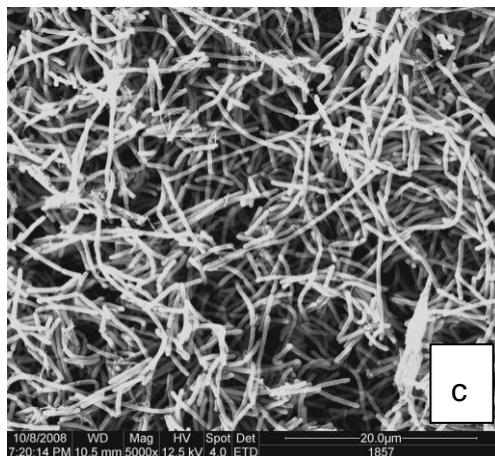
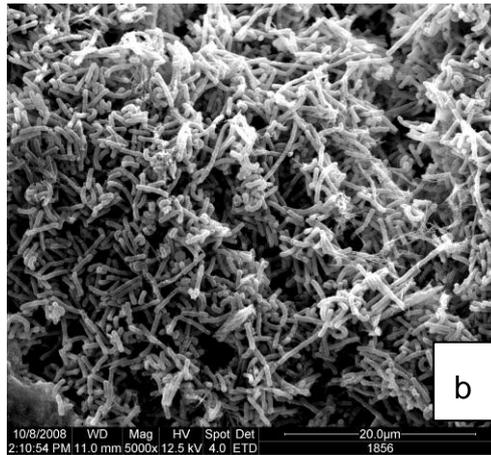
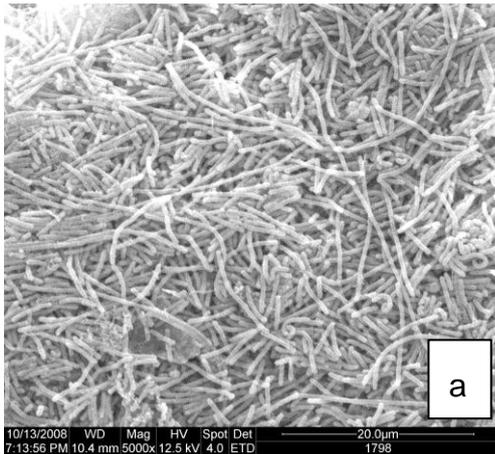


Abbildung 18: Biofilmproben (jeweils 5000fache Vergrößerung) nach 14tägiger Kultivierung. a) mit Prozessgas ohne Plasmazündung behandelte Oberfläche (Gruppe Gas), b) mit Chlorhexidin behandelte Oberfläche (Gruppe CHX), c) Unbehandelte Oberfläche (Gruppe Kon).

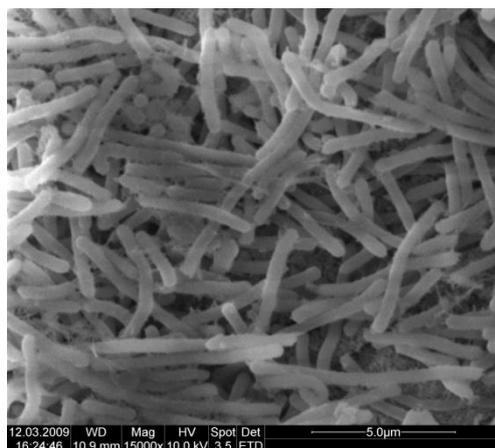


Abbildung 19: 15000fache Vergrößerung eines unbehandelten 14tägigen Biofilms. Die mehrlagige Biofilmstruktur ist deutlich zu erkennen.

Fluoreszenzmikroskopie

Auf den 14tägigen, unbehandelten als auch auf den mit Gas bestrahlten Prüfkörpern waren überwiegend vitale Mikroorganismen zu finden. Die Wirkung von Chlorhexidin auf diesen mehrlagigen Biofilm zeigte für alle Präparate Score 1.

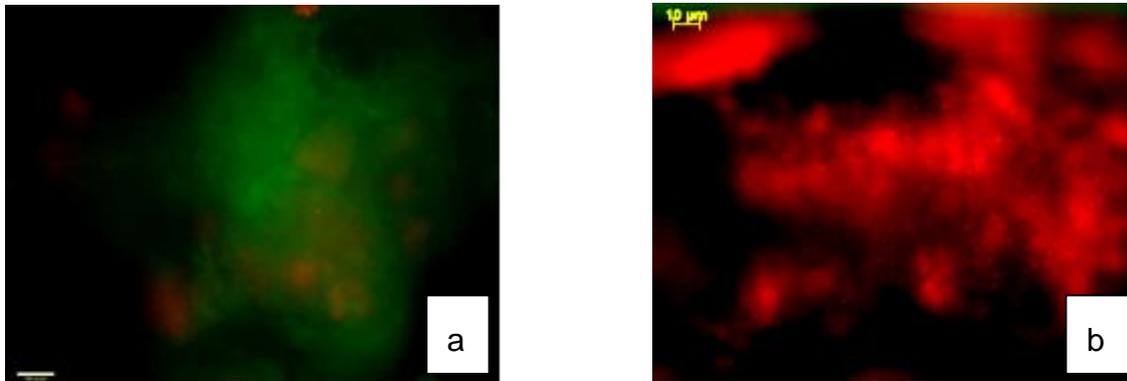


Abbildung 20: 14tägiger Biofilm auf Schmelzprüfkörper a) unbehandelter Biofilm (Gruppe Kon), b) mit Chlorhexidin behandelter Biofilm (Gruppe CHX).

Mikrobiologie

Auf den Kontaktpräparaten unbehandelter, 14tägiger Biofilme war ein dicht gewachsener Bakterienrasen zu erkennen. Die Chlohexidinbehandlung reduzierte die mikrobielle Aktivität des Biofilms, vollständige Desinfektion wurde jedoch nicht festgestellt.

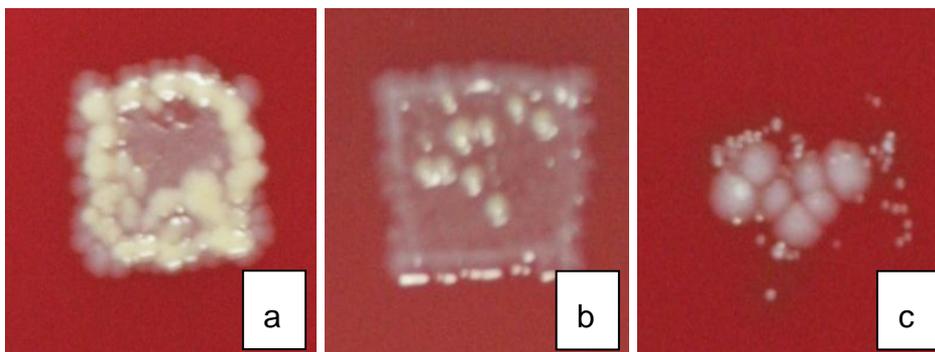


Abbildung 21: Kontaktpräparate von Biofilmen nach 14tägiger Inkubation. a) unbehandelter Biofilm, Score 3, b) Behandlung mit den Prozessgasen ohne Plasmazündung, Score 3, c) Behandlung mit Chlorhexidin, Score 2.

Tabelle 8: Ergebnisse der rasterelektronenmikroskopischen (REM), fluoreszenzmikroskopischen (FM) und mikrobiologischen (RODAC) Untersuchungen für Biofilme nach 14tägiger Kultivierung. Die Biofilme wurden mit den Prozessgasen ohne Plasmazündung (Gas, 0,9 s/mm²) oder Chlorhexidin (CHX, 0,2 %, 2 min) behandelt oder ohne weitere Behandlung analysiert (Kon). Angegeben sind jeweils der Median der Scores sowie deren Wertebereich [Minimal-/Maximalwert]. Für die rasterelektronenmikroskopische Auswertung wurde ein 7-stufiges Scoring angewendet (s. Tab. 3). Für die fluoreszenzmikroskopische (s. Tab. 4) und mikrobiologische (s. Abb. 6) Auswertung wurde jeweils ein 3-stufiges Scoring entwickelt.

	Gas	CHX	Kon
REM	6 [6/6]	5 [5/6]	6 [5/6]
FM	2,5 [1/3]	1 [1/1]	3 [3/3]
RODAC	3 [3/3]	2 [2/2]	3 [3/3]

Transmissionselektronenmikroskopie

In der unbehandelten, 14tägigen Probe ist zu erkennen, dass sich ein Biofilm entwickeln konnte und die Bakterien durch extrazelluläre Matrixstrukturen miteinander vernetzt waren.

Durch Vergrößerung der Übersichtsaufnahme, sind die einzelnen Bakterien genauer zu sehen. Man erkennt, dass im Biofilm sowohl Stäbchen als auch Kokken zu finden sind.

Bei stärkerer Vergrößerung der einzelnen Bakterien in der Nähe der Oberfläche des Biofilms ist des Weiteren zu sehen, dass die Bakterien völlig intakt sind. Zu erkennen ist die Membran, die die Bakterien umgibt und das Zytoplasma im Inneren der Einzeller.

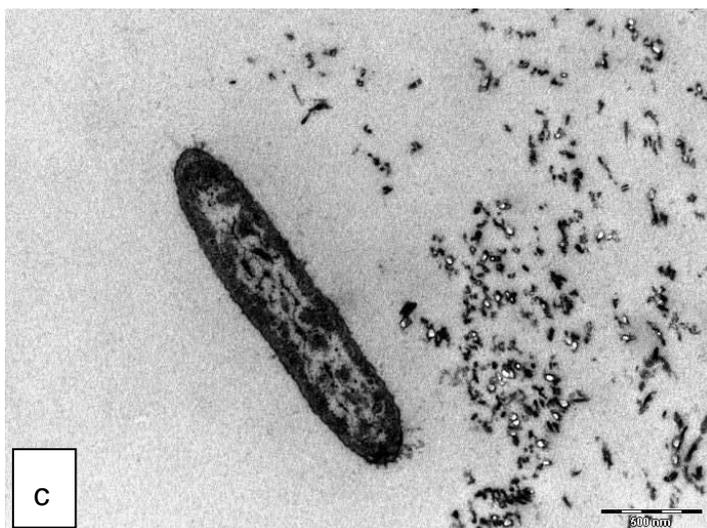
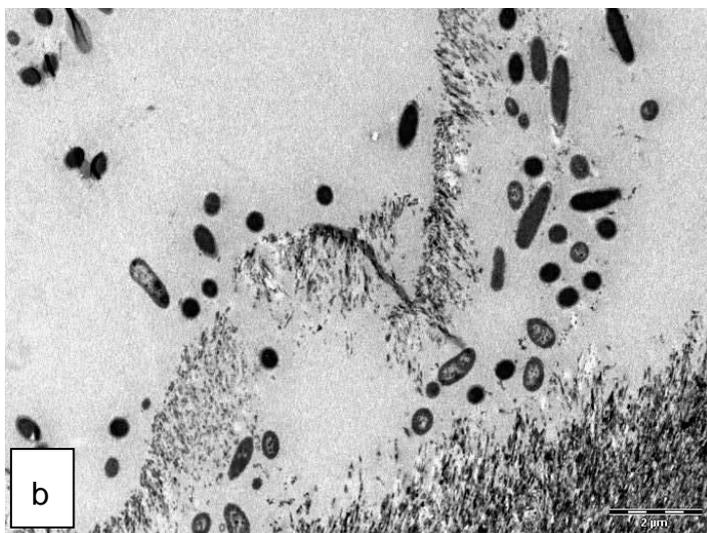
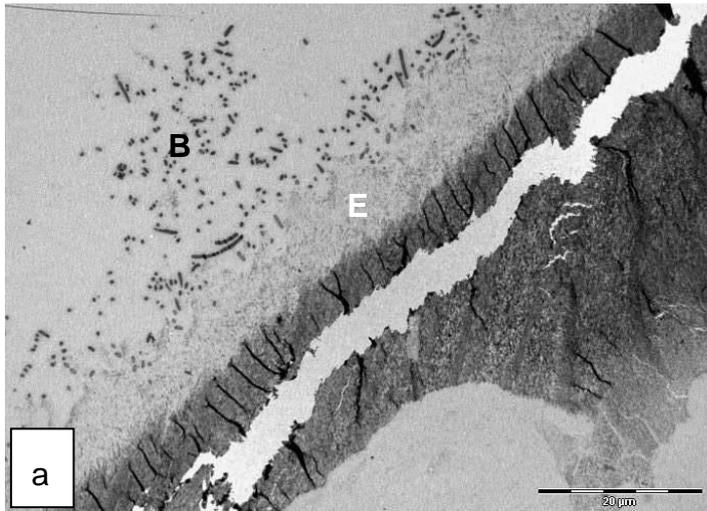


Abbildung 22: TEM Abbildungen: a) unbehandelter Biofilm 1200fache Vergrößerung. Der Biofilm erreicht Dicken bis zu 20µm (B= Biofilm; E= Schmelz) b) Unbehandelte Probe 6800fache Vergrößerung. Die Membran und das Zytoskelett sind zu erkennen c) Unbehandelte Probe 30000fache Vergrößerung. Intaktes stäbchenförmiges Bakterium.

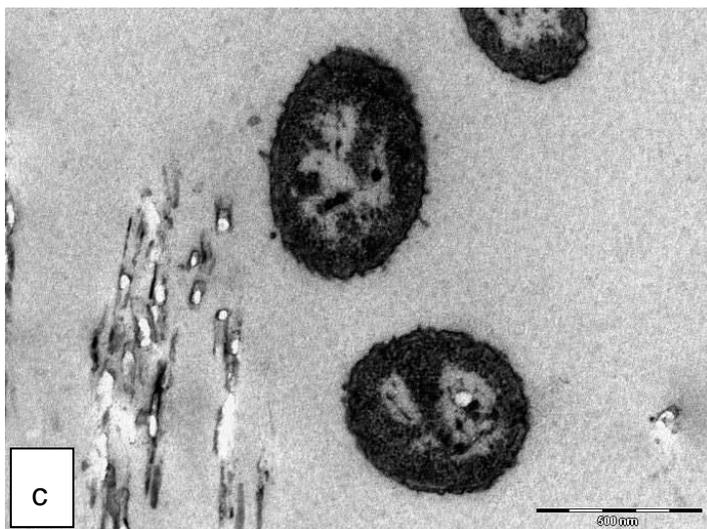
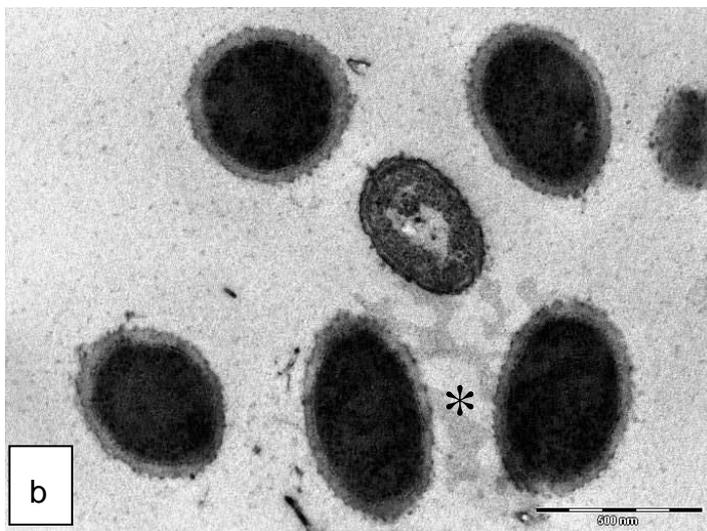
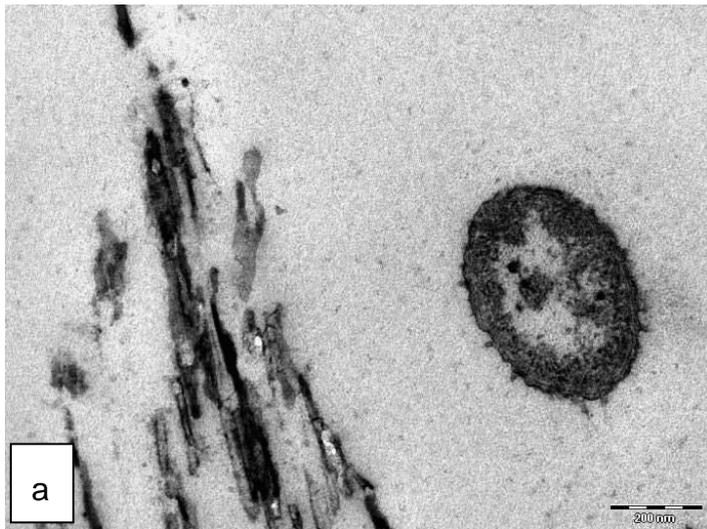


Abbildung 23: a) Unbehandelter Biofilm 68000fache Vergrößerung. Zu erkennen ist ein Bakterium b) Unbehandelte Probe 49000fache Vergrößerung. Intakte Bakterien mit Extrazellulärer Polysaccharidschicht (*) c) Unbehandelte Probe 49000fache Vergrößerung mit intakten Bakterien.

In der mit Chlorhexidin behandelten Biofilmprobe, ist in der Übersichtsaufnahme das durch die 37%ige Phosphorsäure entstandene Ätzmuster zu erkennen.

Des Weiteren ist an dieser Stelle zu erkennen, dass sich der Biofilm auf der konditionierten Oberfläche ausgeprägter entwickeln konnte als auf der polierten Oberfläche.

Durch höhere Vergrößerung erkennt man auch hier die einzelnen Bakterien und kann die Biofilmstruktur erkennen.

Die starke Vergrößerung einzelner Bakterien zeigt, dass diese intakt waren und durch die 2-minütige Chlorhexidinapplikation keine sichtbaren Alterationen aufweisen. Auch auf dieser Biofilmprobe sind sowohl Stäbchen als auch Kokken zu detektieren.

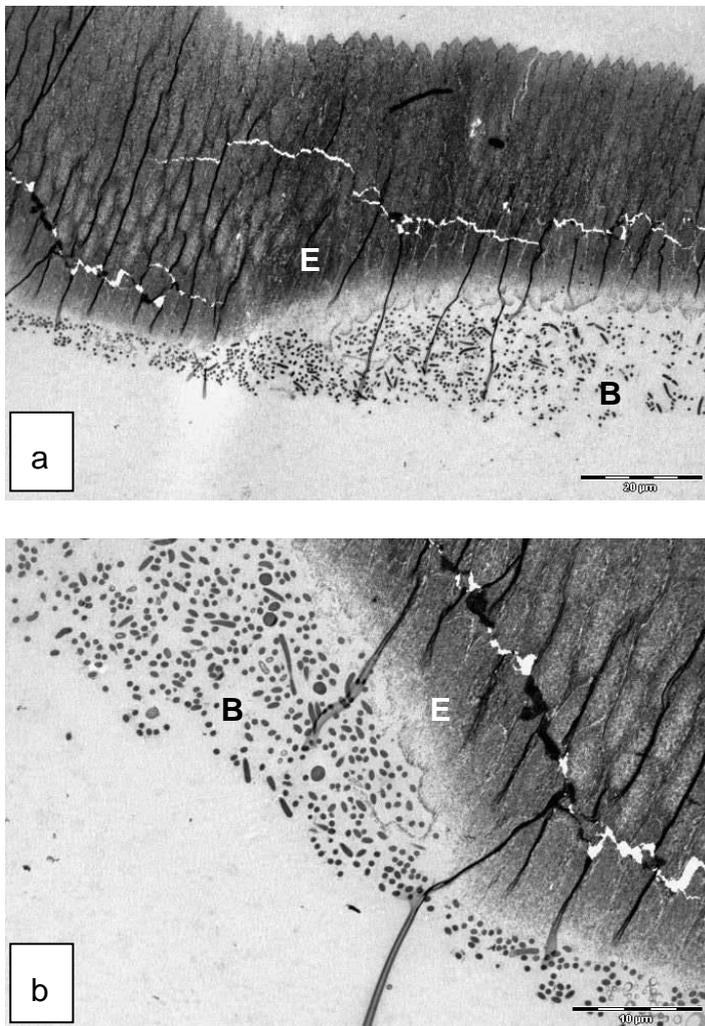


Abbildung 24: a) Mit Chlorhexidin behandelter Biofilm bei 890facher Vergrößerung. Das 15-20 µm tiefe Ätzmuster ist gut zu erkennen. Der Biofilm kann hier besser anhaften und dickere Schichtstärken erreichen (E= Schmelz; B= Biofilm) b) Chlorhexidin behandelte Oberfläche in 1900facher Vergrößerung. Deutlich zu erkennen, ist die Grenze zur polierten Seite.

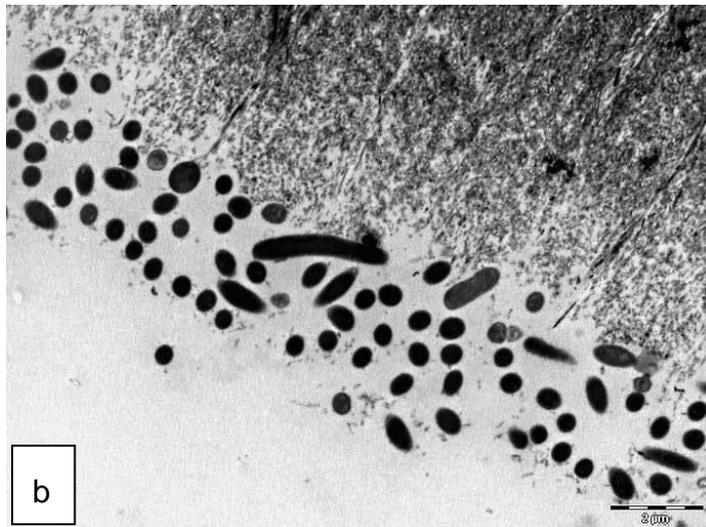
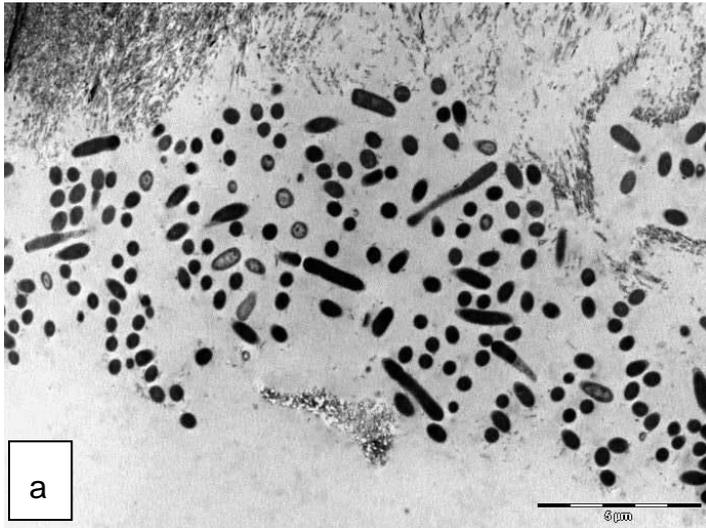


Abbildung 25: a) Chlorhexidin behandelte Biofilmprobe 4800fache Vergrößerung, geätzte Seite mit dickerer Biofilmschicht ($\sim 10\mu\text{m}$), b) Mit Chlorhexidin behandelter Biofilm 6800fache Vergrößerung, ungeätzte Seite mit geringerem Biofilmwachstum ($\sim 7\mu\text{m}$).

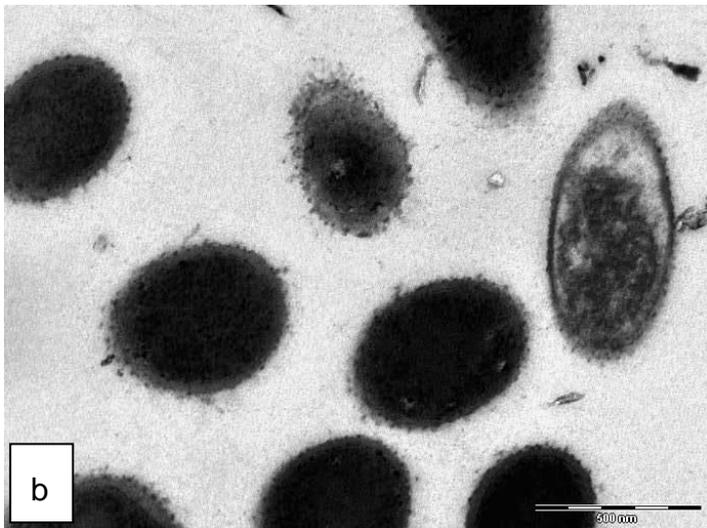
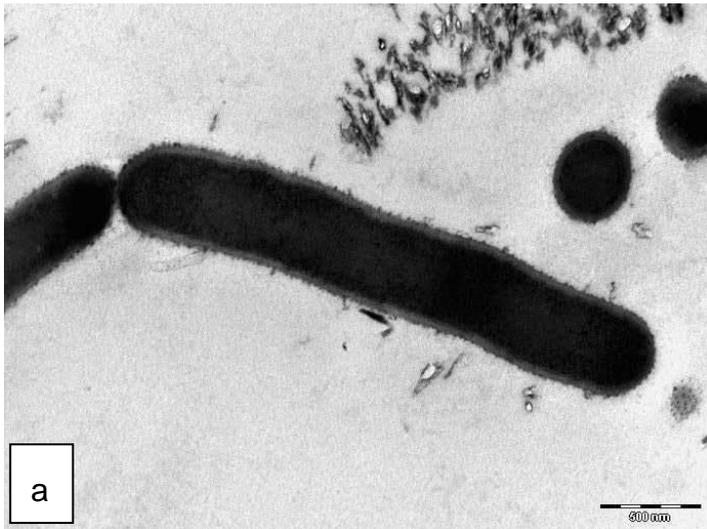


Abbildung 26: a) Chlorhexidin behandelter Biofilm in 30000fache Vergrößerung. Unbeschadetes Stäbchen-Bakterium, b) Chlorhexidin behandelte Probe 49000fache Vergrößerung. Intakte Kokken.

4.3 Plasmabearbeitung von Biofilmen mit unterschiedlichen Leistungsparametern

Plasmabehandlung von 2tägigen Biofilmproben

Rasterelektronenmikroskopie

Durch die Plasmabestrahlung wurden die Mikroorganismen bei allen Leistungsstufen und Scangeschwindigkeiten vollständig entfernt. Nur vereinzelt waren zerstörte Bakterien zu erkennen.

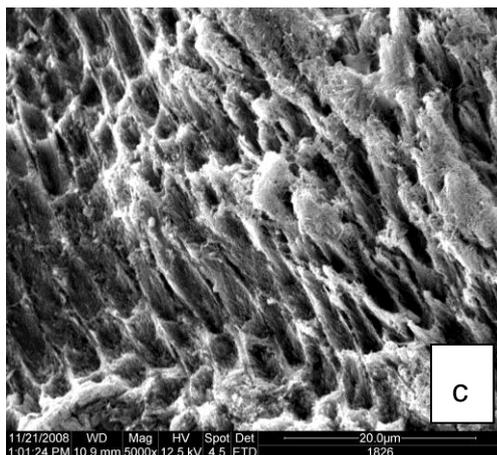
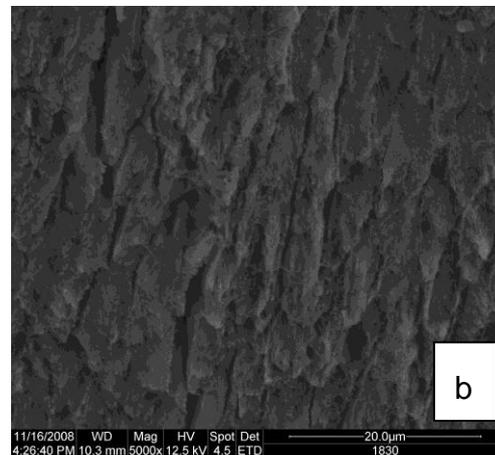
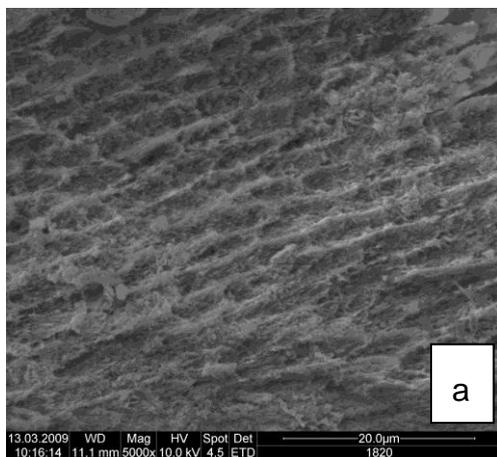


Abbildung 27: Biofilmproben (jeweils 5000fache Vergrößerung) nach 2tägiger Kultivierung, mit Plasmajet bestrahlt. Elektrische Eingangsleistung des Plasmajets von: a) 1,5 W (Parameter A), b) 2 W (Parameter B), und c) 3 W (Parameter C). In den raster-elektronenmikroskopischen Aufnahmen waren keine oder vereinzelt, zerstörte Mikroorganismen zu erkennen.

Fluoreszenzmikroskopie

In der Gruppe der 2-Tages-Biofilmproben zeigten sich nur geringfügige Unterschiede. Der leistungsstärkste Parameter C hatte in den fluoreszenzmikroskopischen Präparaten keine stärker desinfizierende Wirkung auf die Biofilme, als die leistungsschwächeren Parameter.

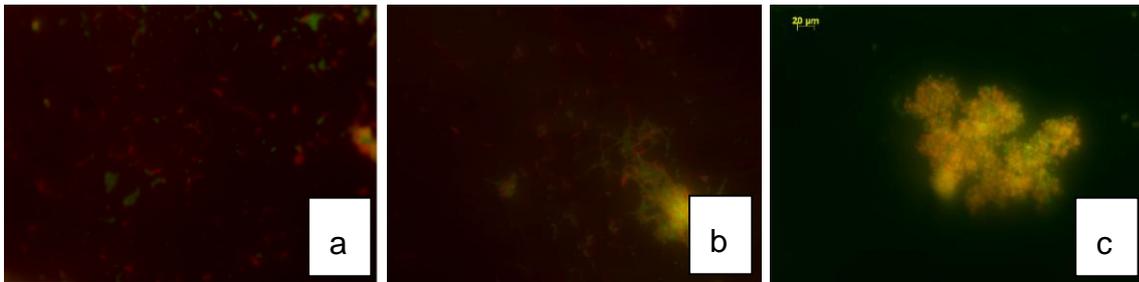


Abbildung 28: 2tägiger Biofilm auf Schmelzprüfkörper mit Plasmajet bestrahlt. Elektrische Eingangsleistung des Plasmajets von: a) Parameter A, 1,5 W, 11 mm/s, b) Parameter B, 2 W, 11 mm/s, c) Parameter C, 3 W, 11 mm/s).

Mikrobiologie

Auf den Kontaktpräparaten von Biofilmen, die mit den Parametern B und C bestrahlt worden waren, war kein bakterielles Wachstum zu erkennen. Allein auf den Kontaktpräparaten der Gruppe A waren Bakterienkolonien zu detektieren (Score 2).

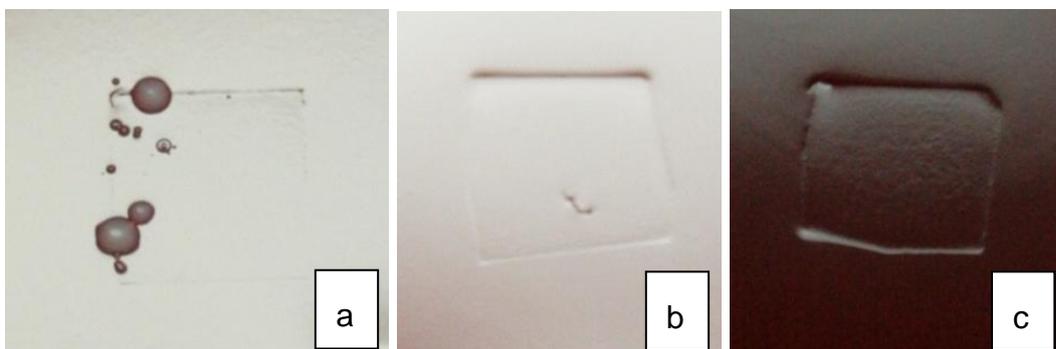


Abbildung 29: Kontaktpräparate von Biofilmen nach 2tägiger Inkubation. a) Parameter A, 1,5 W, 11 mm/s, Score 2, b) Parameter B, 2 W, 11 mm/s, Score 1, c) Parameter C, 3 W, 11 mm/s, Score 1.

Tabelle 9: Ergebnisse der rasterelektronenmikroskopischen (REM), fluoreszenzmikroskopischen (FM) und mikrobiologischen (RODAC) Untersuchungen für Biofilme nach 2tägiger Kultivierung. Die Biofilme wurden mit Plasmajet folgender Parameter bearbeitet: Parameter A: Eingangsleistung 1,5 W, 0,9 s/mm²; Parameter B: Eingangsleistung 2 W, 0,9 s/mm², Parameter C: Eingangsleistung 3 W, 0,9 s/mm². Angegeben sind jeweils der Median der Scores sowie deren Wertebereich [Minimal-/Maximalwert]. Der Zahlenwert nach dem Pfeil (>) gibt für die rasterelektronenmikroskopische Auswertung den Median der unbehandelten Kontrollseite an. Für die rasterelektronenmikroskopische Auswertung wurde ein 7-stufiges Scoring angewendet (s. Tab. 3). Für die fluoreszenzmikroskopische (s. Tab. 4) und mikrobiologische (s. Abb. 6) Auswertung wurde jeweils ein 3-stufiges Scoring entwickelt.

	A	B	C
REM	0 [0/1] > 4 *	0[0/1] > 4 *	0 [0/1] > 4 *
FM	1,5 [1/2]	1,5 [1/2]	3 [2/3]
RODAC	2 [2/2]	1 [1/1]	1 [1/1]

* REM, Vergleich der Scores der Prüfkörperhälften mit unbehandelten vs. Plasmajet behandelten Biofilmen, statistisch signifikanter Unterschied, Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, $p < 0,05$.

Plasmabehandlung von 7tägigen Biofilmproben

Rasterelektronenmikroskopie

Durch Bestrahlung mit dem Plasmajet kam es zu einer deutlichen Veränderung der Biofilmstruktur. Morphologisch intakte Bakterien waren nur noch auf wenigen rasterelektronenmikroskopisch ausgewerteten Präparaten zu erkennen. Teilweise wurde der Biofilm so weit entfernt, dass die Schmelzprismenstruktur der Prüfkörper sichtbar wurde. Das mit allen verwendeten Bestrahlungsparametern vorherrschende Ergebnis war, dass Biofilmreste zu erkennen waren. Die Mikroorganismen erschienen durch die Plasmawirkung aus der Biofilmmatrix herausgelöst und hinterließen Impressionen in der verschmolzen erscheinenden Oberfläche. Ein Einfluss der Scangeschwindigkeit und der Bestrahlungsleistung konnte nicht erkannt werden.

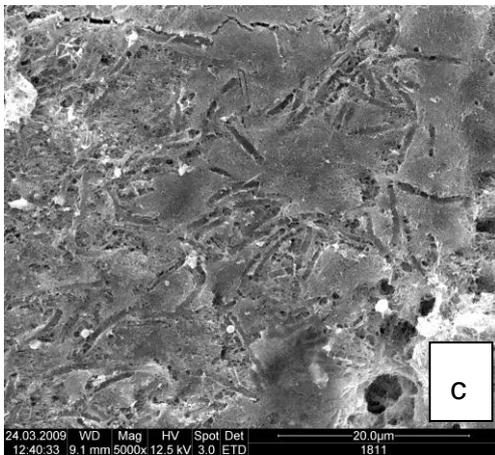
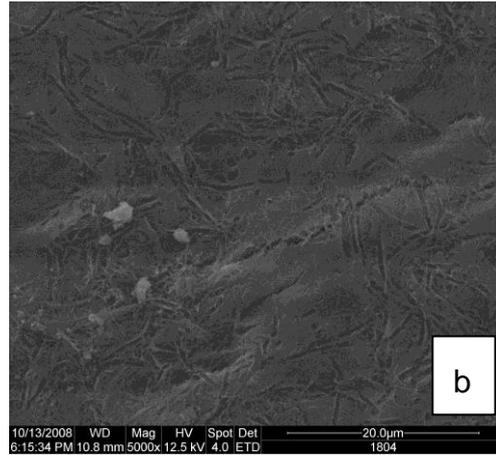
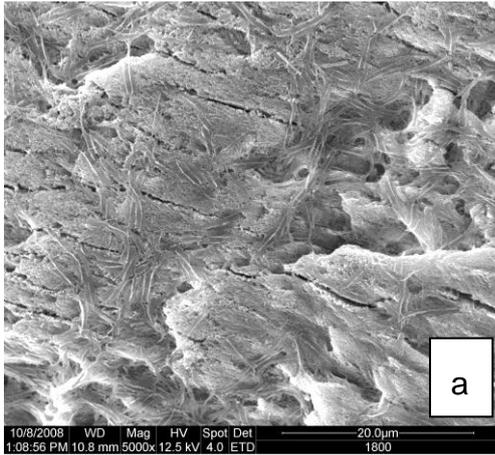
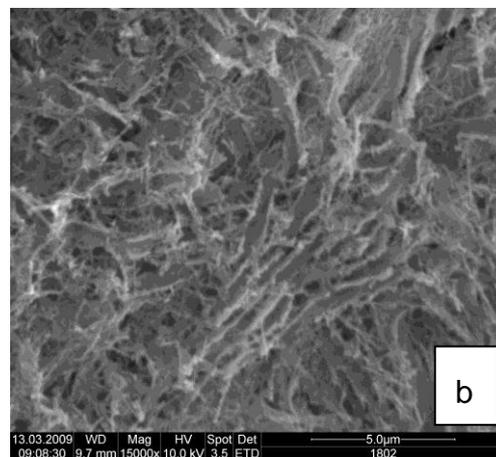
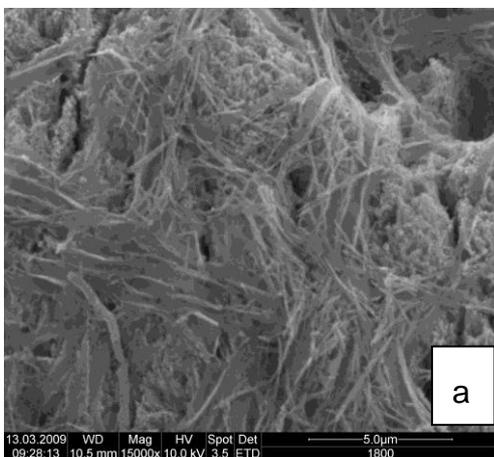


Abbildung 30: Biofilmproben (jeweils 5000fache Vergrößerung) nach 7tägiger Kultivierung, mit Plasmajet bestrahlt. Elektrische Eingangsleistung des Plasmajets von: a) 1,5 W (Parameter A), b) 2 W (Parameter B), und c) 3 W (Parameter C). In den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen war eine Biofilmreduktion zu erkennen.

Durch die rasterelektronenmikroskopischen Abbildungen höherer Vergrößerung wurde bestätigt, dass die Biofilmmatrix nur teilweise von der Oberfläche entfernt werden konnte. Daher sind die Impressionen, der aus der Matrix herausgelöster Mikroorganismen zu erkennen. Auf einem Teil der Präparate war die Prüfkörperoberfläche sichtbar.



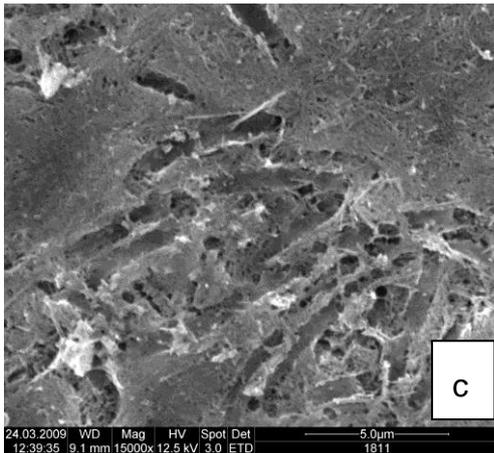


Abbildung 31: Biofilmproben (jeweils 1500fache Vergrößerung) nach 7tägiger Kultivierung, mit Plasmajet bestrahlt. Elektrische Eingangsleistung des Plasmajets von: a) 1,5 W (Parameter A), b) 1,5 W (Parameter A), und c) 3 W (Parameter C).

Fluoreszenzmikroskopie

Auf Prüfkörpern, die für 7 Tage inkubiert worden waren, konnte auch in fluorezenzmikroskopischer Darstellung eine Reduktion der Oberflächenbedeckung mit Biofilm festgestellt werden. Die verbliebenen Biofilminseln waren kleiner, verglichen mit unbehandelten Proben und Biofilmen, die mit Chlorhexidin behandelt worden waren (Abbildung 16). Obwohl rote Fluoreszenz dominierte, waren verbliebene Reste grüner Fluoreszenz zu verzeichnen.

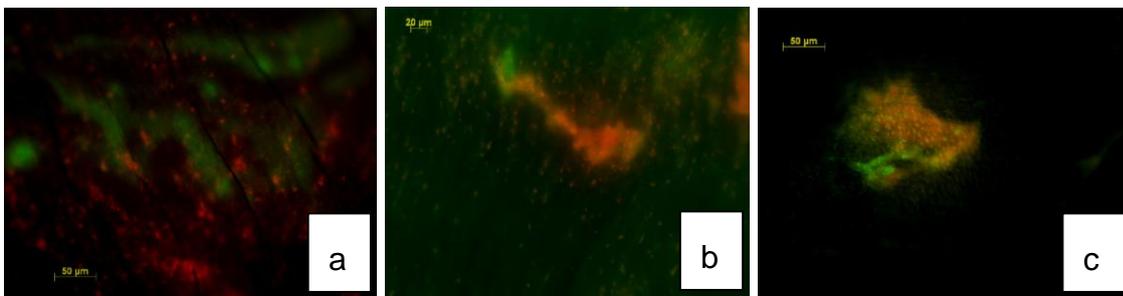


Abbildung 32: 7tägiger Biofilm auf Schmelzprüfkörper mit Plasmajet bestrahlt. Elektrische Eingangsleistung des Plasmajets von: a) Parameter A, 1,5 W, 11 mm/s, b) Parameter B, 2 W, 11 mm/s, c) Parameter C, 3 W, 11 mm/s).

Mikrobiologie

Auch für 7tägige Biofilme konnte auf den Kontaktpräparaten nach Plasmabestrahlung nur geringe Restvitalität festgestellt werden. Für Parameter C zeigte keines der Präparate mikrobielles Wachstum, für die Parameter A und B waren auf jeweils 2 Präparaten wenige Bakterienkolonien erkennbar.

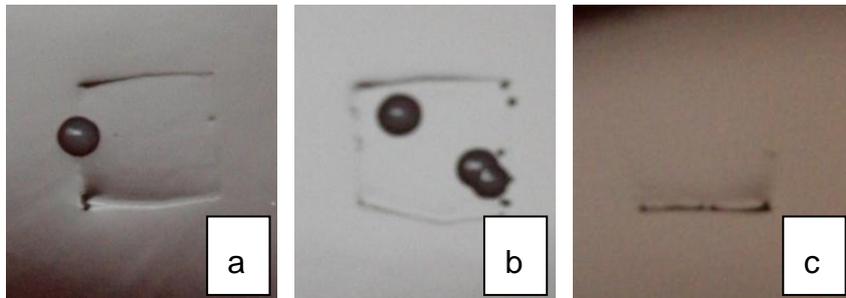


Abbildung 33: Kontaktpräparate von Biofilmen nach 7tägiger Kultivierung. a) Parameter A, 1,5 W, 11 mm/s, Score 2, b) Parameter B, 2 W, 11 mm/s, Score 2, c) Parameter C, 3 W, 11 mm/s), Score 1.

Tabelle 10: Ergebnisse der rasterelektronenmikroskopischen (REM), fluoreszenzmikroskopischen (FM) und mikrobiologischen (RODAC) Untersuchungen für Biofilme nach 7tägiger Kultivierung. Die Biofilme wurden mit Plasmajet folgender Parameter bearbeitet: Parameter A: Eingangsleistung 1,5 W, 0,9 s/mm²; Parameter B: Eingangsleistung 2 W, 0,9 s/mm², Parameter C: Eingangsleistung 3 W, 0,9 s/mm². Angegeben sind jeweils der Median der Scores sowie deren Wertebereich [Minimal-/Maximalwert]. Der Zahlenwert nach dem Pfeil (>) gibt für die rasterelektronenmikroskopische Auswertung den Median der unbehandelten Kontrollseite an. Für die rasterelektronenmikroskopische Auswertung wurde ein 7-stufiges Scoring angewendet (s. Tab. 3). Für die fluoreszenzmikroskopische (s. Tab. 4) und mikrobiologische (s. Abb. 6) Auswertung wurde jeweils ein 3-stufiges Scoring entwickelt.

	A	B	C
REM	1 [1/2] > 5 *	2 [1/3] > 5 *	1 [1/2] > 6 *
FM	1 [1/3]	1 [1/3]	1 [1/3]
RODAC	2 [1/2]	2 [1/2]	1 [1/1]

* REM, Vergleich der Scores der Prüfkörperhälften mit unbehandelten vs. Plasmajet behandelten Biofilmen, statistisch signifikanter Unterschied, Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, $p < 0,05$.

Plasmabehandlung von 14tägigen Biofilmproben

Rasterelektronenmikroskopie

Nach Plasmabestrahlung war eine deutliche Veränderung der Biofilmstruktur im Vergleich zu den unbestrahlten Prüfkörpern zu detektieren. Die bestrahlten Biofilme erschienen verschmolzen und in ihrem Oberflächenrelief egalisiert. Es ließen sich in Einzelfällen noch Bakterienreste erkennen. Oftmals waren nur noch Impressionen der Mikroorganismen in der Biofilmmatrix zu sehen. Die vollständige Beseitigung der Biofilme war nicht nachweisbar.

Im Vergleich zu unbestrahlten Proben bildeten sich in der Biofilmmatrix Risse und Poren, teilweise desintegrierte der Biofilm und löste sich von der Unterlage.

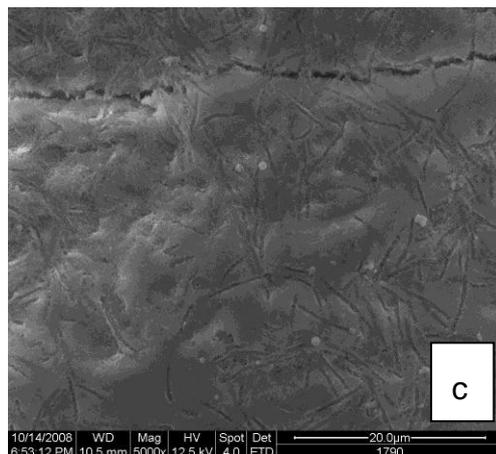
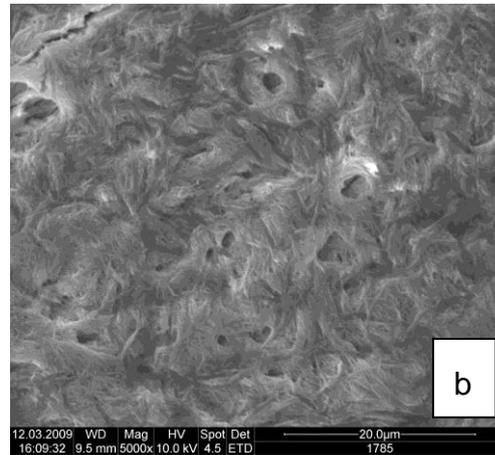
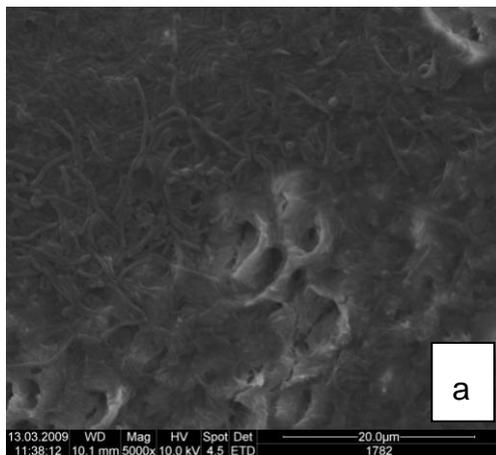


Abbildung 34: Biofilmproben (jeweils 5000fache Vergrößerung) nach 14tägiger Kultivierung, mit Plasmajet bestrahlt. Elektrische Eingangsleistung des Plasmajet von: a) 1,5 W (Parameter A), b) 2 W (Parameter B), und c) 3 W (Parameter C). In den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen war eine Biofilmreduktion zu erkennen.

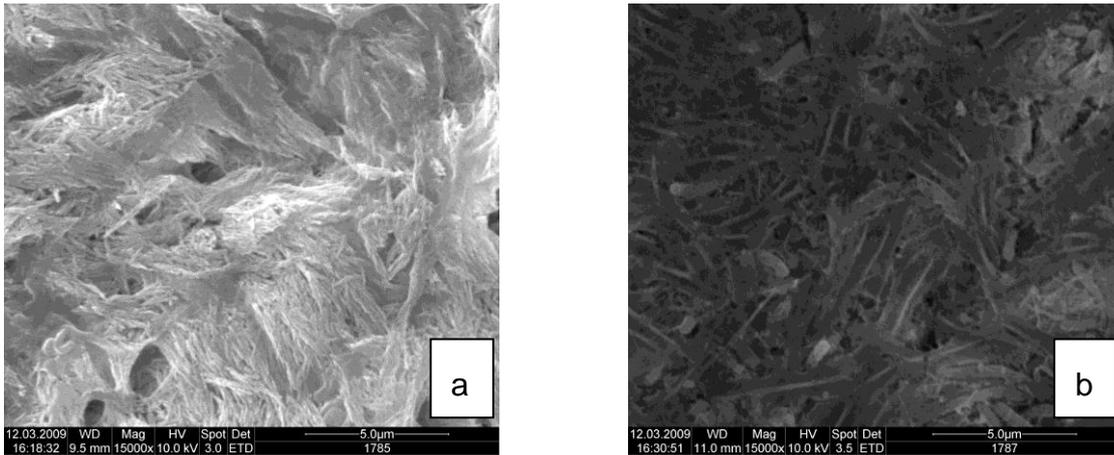


Abbildung 35: Biofilmproben (jeweils 15000fache Vergrößerung) nach 14tägiger Kultivierung, mit Plasmajets bestrahlt. Elektrische Eingangsleistung des Plasmajets von: a) 1,5 W (Parameter A), b) 2 W (Parameter B). Der Biofilm ist reduziert und die Impressionen zerstörter Bakterien sind zu erkennen.

Fluoreszenzmikroskopie

Die fluoreszenzmikroskopischen Abbildungen von Biofilmen, die über 14 Tage kultiviert wurden, zeigten eine deutliche Reduktion der Oberflächenbedeckung und überwiegend rote Fluoreszenz.

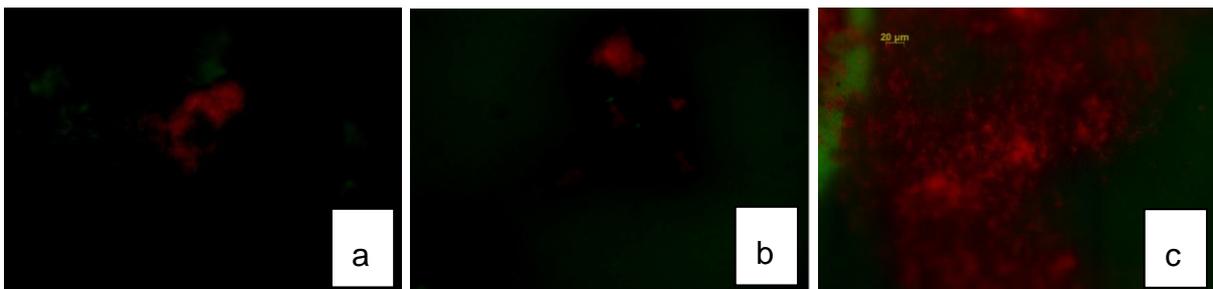


Abbildung 36: 14tägiger Biofilm auf Schmelzprüfkörper mit Plasmajet bestrahlt. Elektrische Eingangsleistung des Plasmajets von: a) Parameter A, 1,5 W, 11 mm/s, b) Parameter B, 2 W, 11 mm/s, c) Parameter C, 3 W, 11 mm/s).

Mikrobiologie

Die RODAC-Kontaktpräparate zeigten, dass die verschiedenen Parameter, auch auf 14tägige Biofilme, eine das mikrobielle Wachstum reduzierende Wirkung hatten. Es waren auf allen Präparaten noch Kolonien detektierbar. Nach Behandlung mit Parameter C zeigte eines der Präparate kein Wachstum mehr.

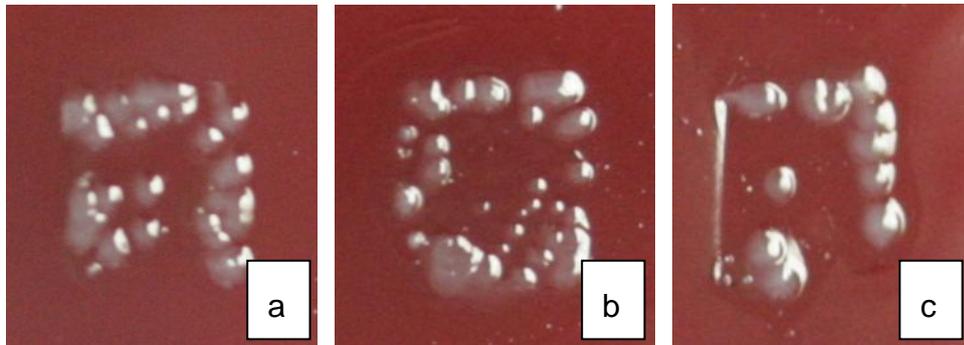


Abbildung 37: Kontaktpräparate von Biofilmen nach 14tägiger Kultivierung. a) Parameter A, 1,5 W, 11 mm/s, Score 2, b) Parameter B, 2 W, 11 mm/s, Score 2, c) Parameter C, 3 W, 11 mm/s, Score 2.

Tabelle 11: Ergebnisse der rasterelektronenmikroskopischen (REM), fluoreszenzmikroskopischen (FM) und mikrobiologischen (RODAC) Untersuchungen für Biofilme nach 14tägiger Kultivierung. Die Biofilme wurden mit Plasmajet folgender Parameter bearbeitet: Parameter A: Eingangsleistung 1,5 W, 0,9 s/mm²; Parameter B: Eingangsleistung 2 W, 0,9 s/mm², Parameter C: Eingangsleistung 3 W, 0,9 s/mm². Angegeben sind jeweils der Median der Scores sowie deren Wertebereich [Minimal-/Maximalwert]. Der Zahlenwert nach dem Pfeil (>) gibt für die rasterelektronenmikroskopische Auswertung den Median der unbehandelten Kontrollseite an. Für die rasterelektronenmikroskopische Auswertung wurde ein 7-stufiges Scoring angewendet (s. Tab. 3). Für die fluoreszenzmikroskopische (s. Tab. 4) und mikrobiologische (s. Abb. 6) Auswertung wurde jeweils ein 3-stufiges Scoring entwickelt.

	A	B	C
REM	2 [1/3] > 6	1 [1/2] > 6 *	1 [1/2] > 6 *
FM	1 [1/3]	1 [1/2]	1 [1/3]
RODAC	2 [2/2]	2 [2/2]	2 [1/2]

* REM, Vergleich der Scores der Prüfkörperhälften mit unbehandelten vs. Plasmajet behandelten Biofilmen, statistisch signifikanter Unterschied, Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, $p < 0,05$.

Transmissionselektronenmikroskopie

Auf der mit Parameter C behandelten Probe war es schwer eine noch mit Biofilm bedeckte Schmelzoberfläche zu lokalisieren. Der Ausschnitt in Abbildung 38 zeigt eine der wenigen Stellen, an denen überhaupt Biofilm nachweisbar war. Der Biofilm an dieser Stelle ist wesentlich dichter und komprimierter als auf den Kontrolloberflächen. Am oberflächlichen Rand der Probe erkennt man, bei stärkerer Vergrößerung, Reste von Bakterienzellwänden. Darüber hinaus ist ein teilweise zerstörtes Zytoskelett der oberflächlichen Bakterien zu sehen. Bei genauerer Betrachtung ist festzustellen, dass Bakterien, die weiter im Inneren des Biofilms zu finden sind, unbeschadet geblieben sind. Auch hier finden sich Stäbchen und Kokken gleichermaßen.

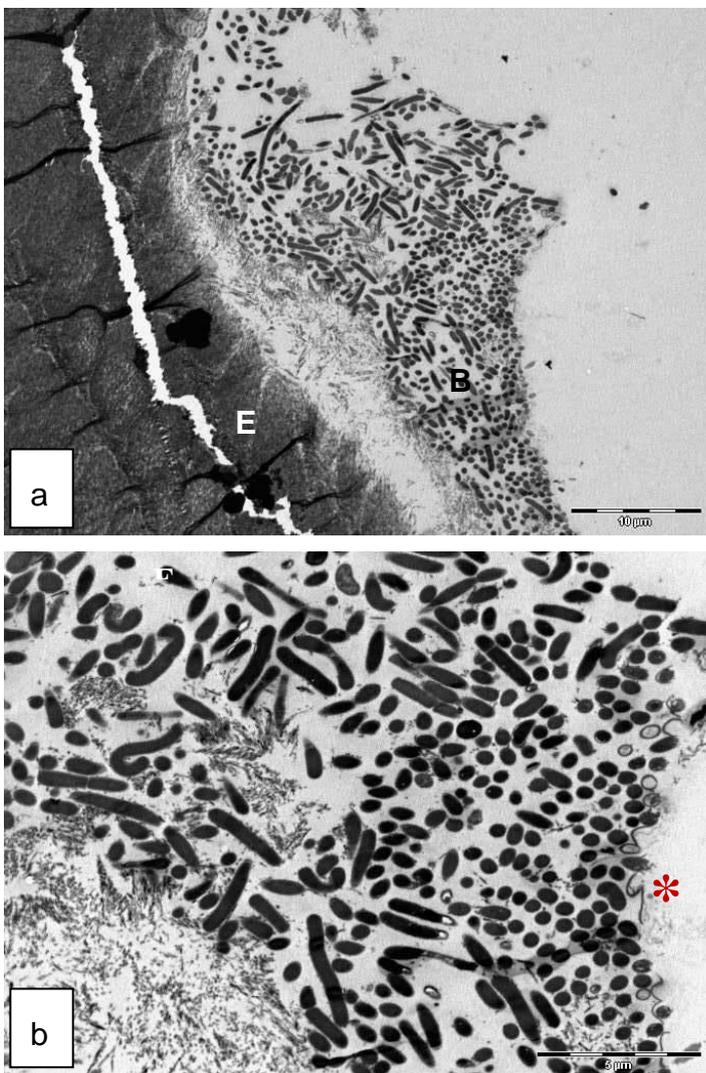


Abbildung 38: a) Bestrahlte Probe 1900fache Vergrößerung. Reste des Biofilms konnten auf der Probe gefunden werden (E= Schmelz; B= Biofilm) b) Bestrahlte Probe 4800fache Vergrößerung. Ein sehr dichter Biofilm mit oberflächlich zerstörten Bakterien (*) ist sichtbar. Im Inneren des Biofilms erkennt man noch intakte Bakterien.

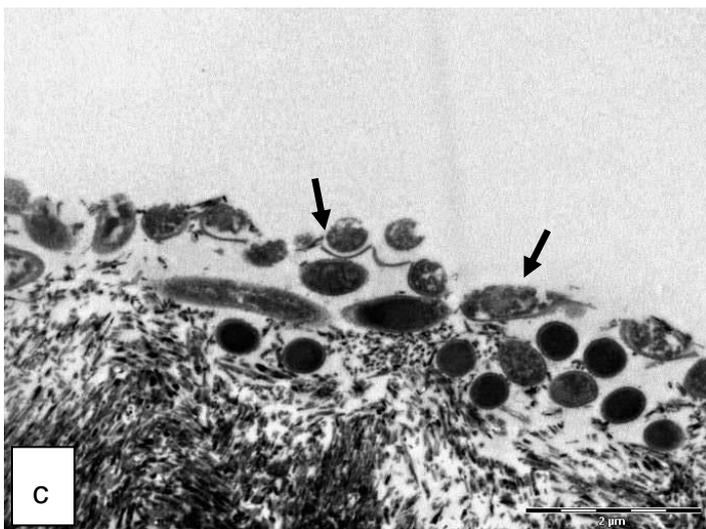
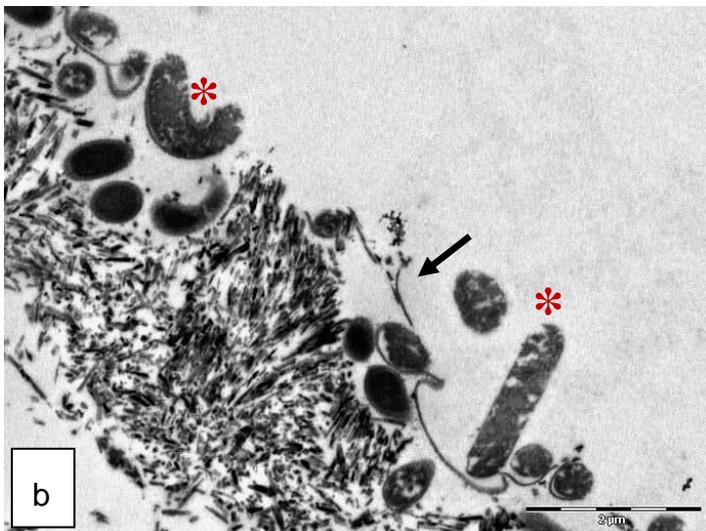
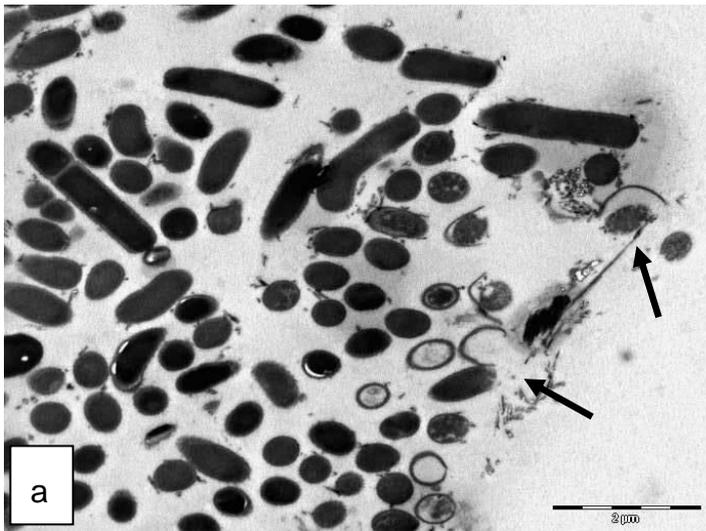


Abbildung 39: a) Bestrahlte Probe 11000fache Vergrößerung. Zerstörte Bakterien an der Oberfläche des Biofilms (→) b) Bestrahlte Probe 13000fache Vergrößerung. Zerstörte Zellwände(→) und ein zum Teil zerstörtes Zytoskelett (*) c) Bestrahlte Probe 13000fache Vergrößerung. Auch hier sind zerstörte Bakterien zu erkennen

4.4 Mehrschrittbearbeitung von Biofilmen mit Plasmajet und Wasserbestrahlung

Mehrschrittbehandlung von 2tägigen Biofilmproben

Rasterelektronenmikroskopie

Die Kontrollproben, die 2 Tage kultiviert wurden, wiesen einzelne Mikroorganismen und kleine Kolonien auf. Mittels Wasserstrahl ließen sich diese Biofilme nicht vollständig von den Prüfkörperoberflächen entfernen. Plasmabestrahlung mit nachfolgender Wasserstrahlanwendung führte zur Beseitigung der Mikroorganismen auf den Prüfkörperoberflächen.

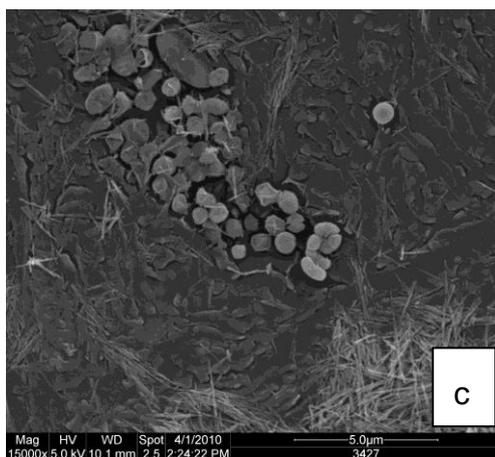
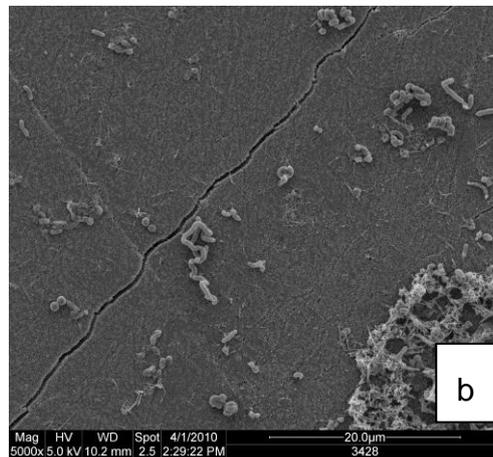
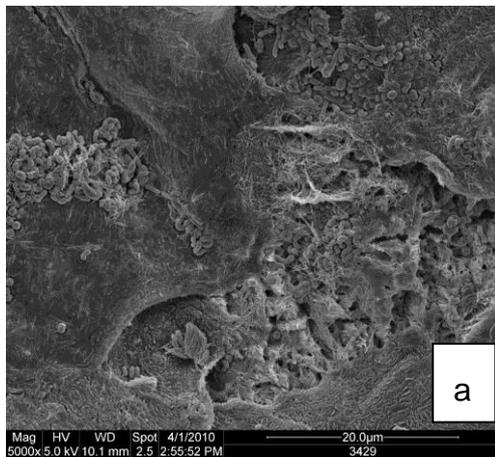


Abbildung 40: Biofilmproben (jeweils 5000fache Vergrößerung) nach 2tägiger Kultivierung a) nach Wasserbestrahlung (Gruppe Kon), b) nach Wasserbestrahlung und Chlorhexidinbehandlung (Gruppe CHX), c) nach Wasserbestrahlung und Bestrahlung mit Prozessgasen (Gruppe Gas; 15000fache Vergrößerung).

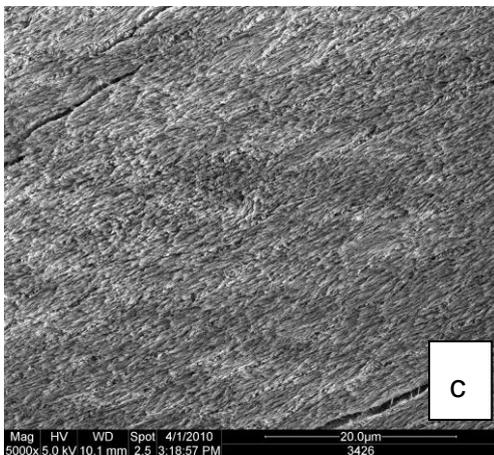
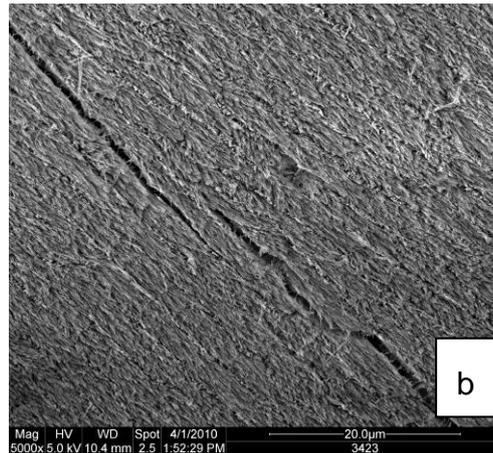
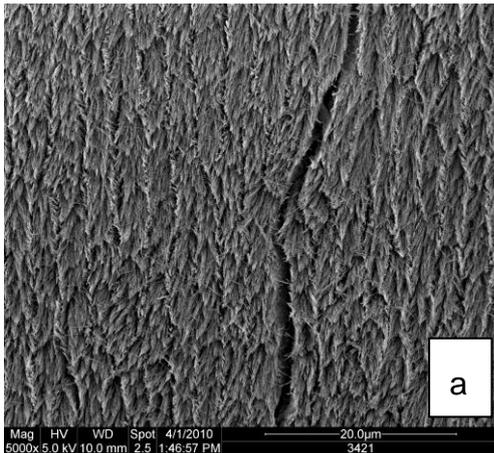


Abbildung 41: Biofilmproben (jeweils 5000fache Vergrößerung) nach 2tägiger Kultivierung, mit Plasmajet bestrahlt und nachfolgend mit Wasserstrahl behandelt. Elektrische Eingangsleistung des Plasmajets von: a) 1,5 W (Parameter A), b) 2 W (Parameter B), und c) 3 W (Parameter C). In den raster-elektronenmikroskopischen Aufnahmen waren keine Mikroorganismen zu erkennen.

Fluoreszenzmikroskopie

Auf den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen konnten lediglich vereinzelte Biofilmreste detektiert werden. Der größte Anteil der Prüfkörperoberflächen zeigte keine Fluoreszenz. Auf Prüfkörpern mit Restfluoreszenz, konnte vorwiegend rote Fluoreszenz nachgewiesen werden, während auf den Kontrollprüfkörpern noch einzelne lebende Bakterien und kleinere Kolonien zu detektieren waren. Auf Prüfkörpern die mit Parameter C behandelt wurden, ließen sich keine Bakterien nachweisen.

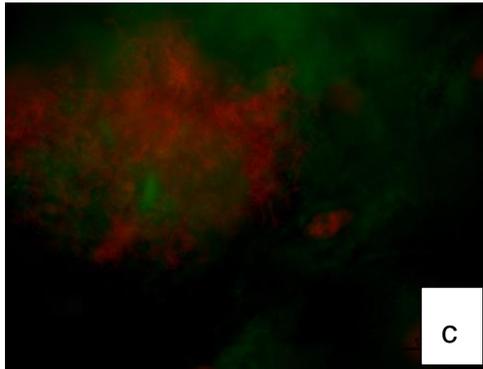
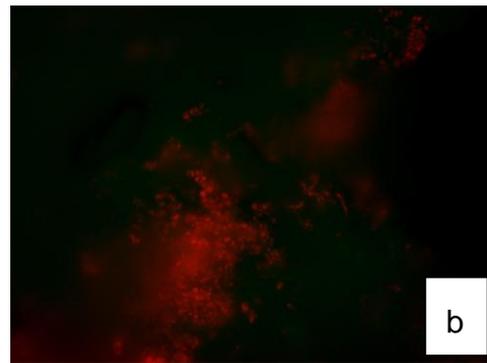
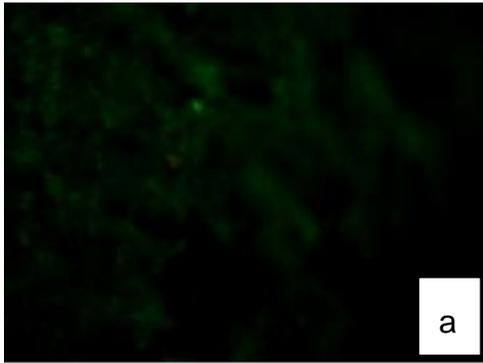


Abbildung 42: 2tägiger Biofilm auf Schmelzprüfkörper a) nach Wasserbestrahlung (Gruppe Kon), b) Nach Wasserbestrahlung und Chlorhexidinbehandlung (Gruppe CHX), c) Nach Wasserbestrahlung und Bestrahlung mit Prozessgasen (Gruppe Gas).

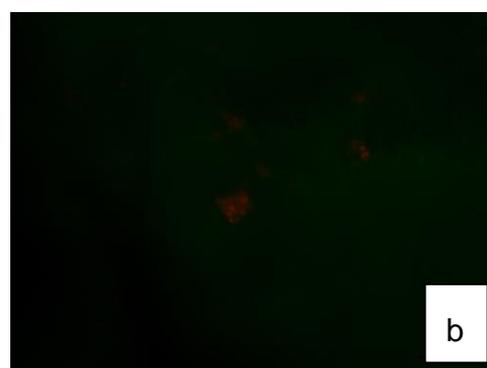
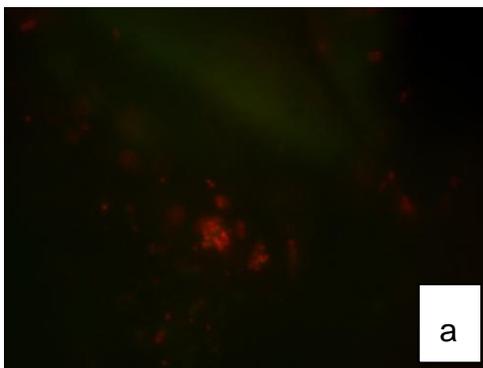


Abbildung 43: Biofilmproben nach 2tägiger Kultivierung, mit Plasmajet bestrahlt und nachfolgend mit Wasserstrahl behandelt. a) Parameter A (1,5 W, 11 mm/s) und Wasserstrahl, b) Parameter B (2 W, 11 mm/s) und Wasserstrahl, c) Parameter C (3 W, 11 mm/s) und Wasserstrahl.

Mikrobiologie

Auf den mit dem Wasserstrahl behandelten Kontaktpräparaten war zu erkennen, dass nicht alle Bakterien von der Prüfkörperoberfläche entfernt werden konnten. Nach Plasmabestrahlung und Wasserstrahleinsatz war die Kolonisierung der Kontaktareale deutlich reduziert. Die Reduktion war leistungsabhängig.

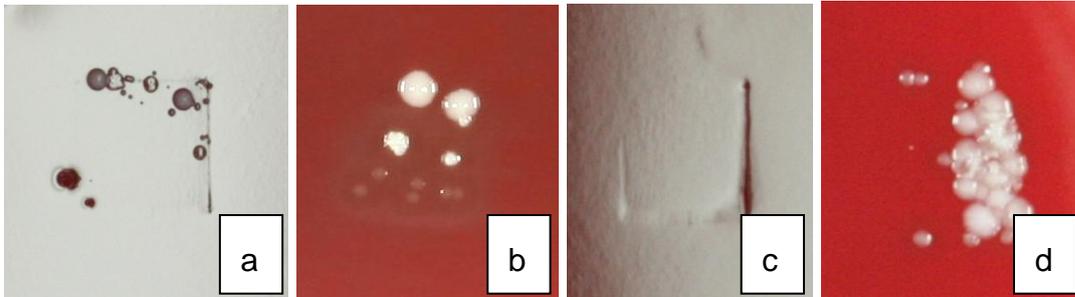


Abbildung 44: Kontaktpräparate von Biofilmen nach 2tägiger Kultivierung. a) Bestrahlung mit Parameter A, 1,5 W, 11 mm/s und Wasser, Score 2, b) Bestrahlung mit Parameter B, 2 W, 11 mm/s und Wasser, Score 2, c) Bestrahlung mit Parameter C, 3 W, 11 mm/s) und Wasser, Score 1, d) Biofilm ausschließlich mit Wasserstrahl behandelt, Score 2.

Tabelle 12: Ergebnisse der rasterelektronenmikroskopischen (REM), fluoreszenzmikroskopischen (FM) und mikrobiologischen (RODAC) Untersuchungen für Biofilme nach 2tägiger Kultivierung und jeweils nachfolgender Wasserstrahlbehandlung (+ W). Die Biofilme wurden mit Plasmajet folgender Parameter bearbeitet: Parameter A: Eingangsleistung 1,5 W, 0,9 s/mm²; Parameter B: Eingangsleistung 2 W, 0,9 s/mm², Parameter C: Eingangsleistung 3 W, 0,9 s/mm². Die mitgeführten Kontrollpräparate wurden mit den Prozessgasen ohne Plasmazündung (Gas + W, 0,9 s/mm²) oder Chlorhexidin (CHX + W, 0,2 %, 2 min) behandelt oder ohne weitere Behandlung, jedoch mit nachfolgender Wasserbestrahlung, analysiert (Kon + W). Angegeben sind jeweils der Median der Scores sowie deren Wertebereich [Minimal-/Maximalwert]. Für die rasterelektronenmikroskopische Auswertung wurde ein 7-stufiges Scoring angewendet (s. Tab. 3). Für die fluoreszenzmikroskopische (s. Tab. 4) und mikrobiologische (s. Abb. 6) Auswertung wurde jeweils ein 3-stufiges Scoring entwickelt. Nach Anwendung von Parameter C+W konnte auf den Prüfkörpern keine Fluoreszenz ermittelt werden. Die entsprechenden Tabellenfelder sind als nicht auswertbar (n.a.) gekennzeichnet.

	A + W	B + W	C + W	Gas + W	CHX + W	Kon + W
REM	0 [0/0]	0 [0/0]	0 [0/0]	4	4	5
FM	1 [1/2]	1 [1/1]	n.a.	2 [1/3]	1 [1/1]	3 [2/3]
RODAC	2 [2/2]	1 [1/2]	1 [1/1]	2 [2/2]	1 [1/1]	2 [2/3]

Mehrschrittbehandlung von 7tägigen Biofilmproben

Rasterelektronenmikroskopie

Nach Plasmaanwendung und Wasserbestrahlung ließen sich im rasterelektronenmikroskopischen Präparat keine Biofilmreste mehr erkennen. Demgegenüber verblieben auf den Kontrollpräparaten unbehandelter Biofilme sowie auf Präparaten, deren Biofilme zuvor mit den Prozessgasen oder Chlorhexidin behandelt wurden, deutlich erkennbare Biofilmreste.

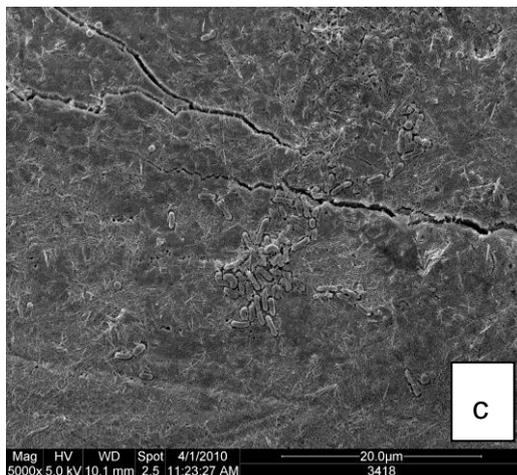
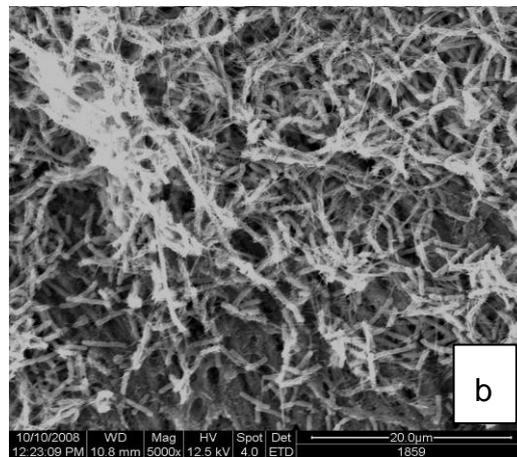
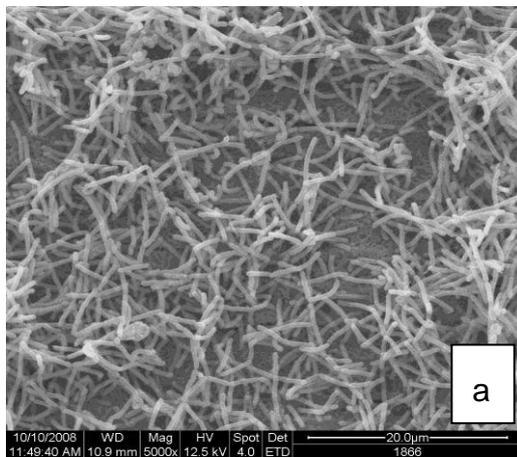


Abbildung 45: Biofilmproben (jeweils 5000fache Vergrößerung) nach 7tägiger Kultivierung a) nach Wasserbestrahlung (Gruppe Kon), b) nach Wasserbestrahlung und Chlorhexidinbehandlung (Gruppe CHX) c) nach Wasserbestrahlung und Bestrahlung mit Prozessgasen (Gruppe Gas).

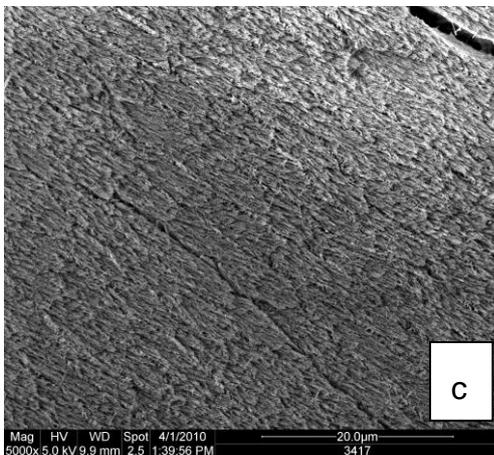
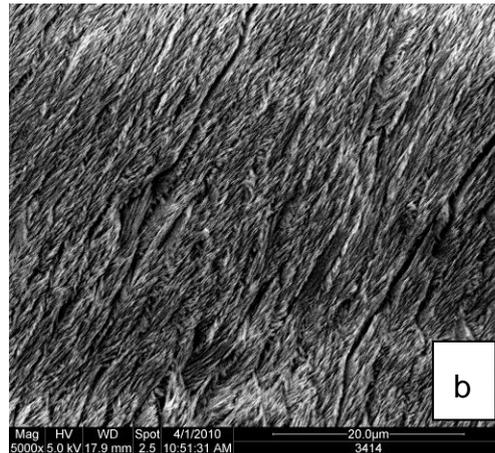
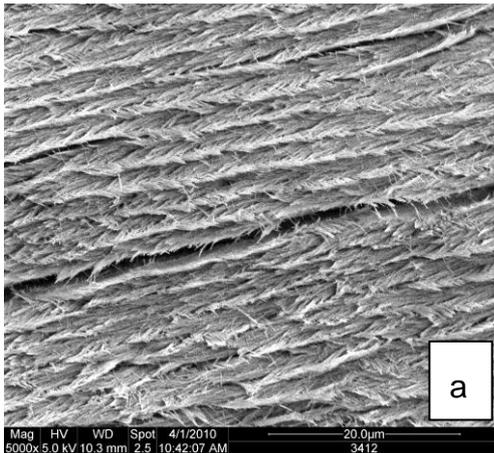


Abbildung 46: Biofilmproben (jeweils 5000fache Vergrößerung) nach 7tägiger Kultivierung, mit Plasmajet bestrahlt und nachfolgend mit Wasserstrahl behandelt. Elektrische Eingangsleistung des Plasmajets von: a) 1,5 W (Parameter A), b) 2 W (Parameter B), und c) 3 W (Parameter C). In den raster-elektronenmikroskopischen Aufnahmen waren keine Mikroorganismen zu erkennen.

Fluoreszenzmikroskopie

Die fluoreszenzmikroskopischen Bilder zeigen, dass einzelne Bakterien und Kolonien auf den wasserbestrahlten Prüfkörperoberflächen unbehandelter Biofilme, sowie mit Chlorhexidin behandelter Biofilme zurück geblieben waren. Allerdings ist hier keine oder geringe Vitalität zu erkennen. Auf Prüfkörpern die mit Plasmajet der Parameter A und B und nachfolgend mit Wasser bestrahlt wurden, ließen sich vereinzelt rot fluoreszierende Biofilmreste erkennen. Auf Präparaten die mit Parameter C behandelt wurden, ließen sich keine Bakterien mehr nachweisen.

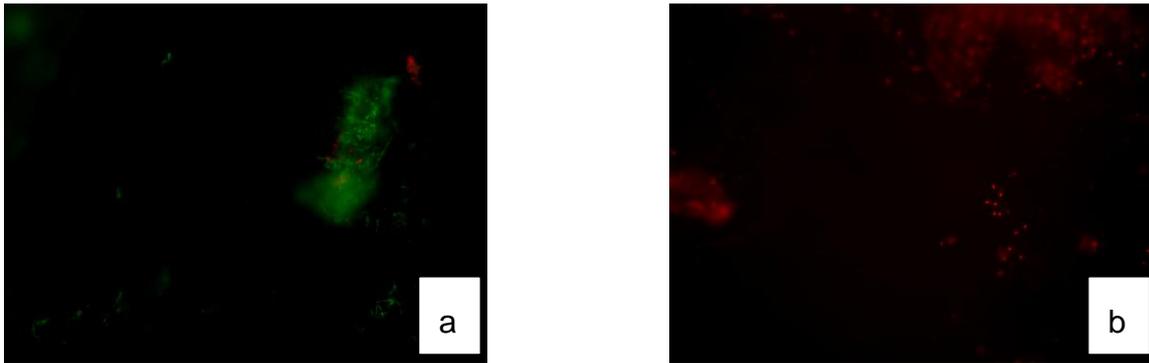


Abbildung 47: 7-tägiger Biofilm auf Schmelzprüfkörper a) nach Wasserbestrahlung (Gruppe Kon), b) nach Wasserbestrahlung und Chlorhexidinbehandlung (Gruppe CHX).

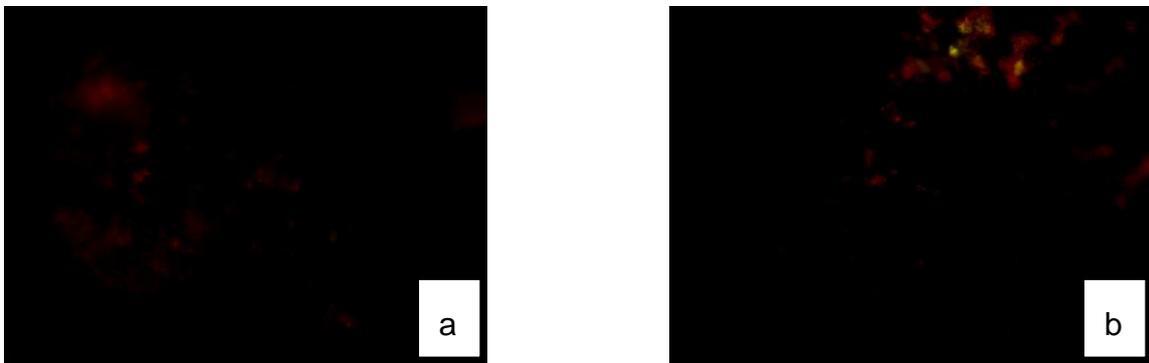


Abbildung 48: Biofilmprouben nach 7-tägiger Kultivierung, mit Plasmajet bestrahlt und nachfolgend mit Wasserstrahl behandelt. a) Parameter A (1,5 W, 11 mm/s) und Wasserstrahl, b) Parameter B (2 W, 11 mm/s) und Wasserstrahl.

Mikrobiologie

Auch auf den 7-tägigen, nur mit Wasser bestrahlten Biofilmen waren auf den Kontaktflächen der RODAC-Platten dichte, bakterielle Kolonisation zu finden. Nach Plasmabestrahlung mit Parameter C gefolgt von Wasserstrahlbehandlung war, bis auf eine Ausnahme, kein mikrobielles Wachstum mehr zu detektieren. Nach Behandlung mit Parameter A und B waren noch einzelne Bakterienkolonien nachweisbar.

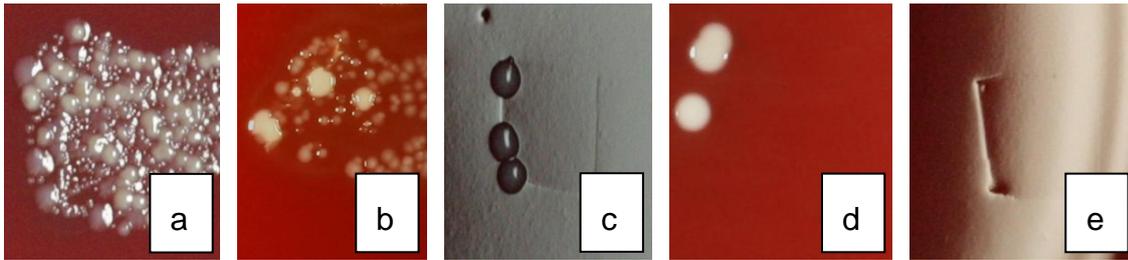


Abbildung 49: Kontaktpräparate von Biofilmen nach 7tägiger Kultivierung. a) Behandlung mit Wasserstrahl, Score 3, b) Behandlung mit Chlorhexidin und Wasserstrahl, Score 3, c) Plasmapehandlung mit Parameter A, 1,5 W, 11 mm/s und Wasser, Score 2, d) Plasma-behandlung mit Parameter B, 2 W, 11 mm/s und Wasser, Score 2, e) Plasmabehandlung mit Parameter C, 3 W, 11 mm/s und Wasser, Score 1.

Tabelle 13: Ergebnisse der rasterelektronenmikroskopischen (REM), fluoreszenzmikroskopischen (FM) und mikrobiologischen (RODAC) Untersuchungen für Biofilme nach 7tägiger Kultivierung und jeweils nachfolgender Wasserstrahlbehandlung (+ W). Die Biofilme wurden mit Plasmajet folgender Parameter bearbeitet: Parameter A: Eingangsleistung 1,5 W, 0,9 s/mm²; Parameter B: Eingangsleistung 2 W, 0,9 s/mm², Parameter C: Eingangsleistung 3 W, 0,9 s/mm². Die mitgeführten Kontrollpräparate wurden mit den Prozessgasen ohne Plasmazündung (Gas + W, 0,9 s/mm²) oder Chlorhexidin (CHX + W, 0,2 %, 2 min) behandelt oder ohne weitere Behandlung, jedoch mit nachfolgender Wasserbestrahlung, analysiert (Kon + W). Angegeben sind jeweils der Median der Scores sowie deren Wertebereich [Minimal-/Maximalwert]. Für die rasterelektronenmikroskopische Auswertung wurde ein 7-stufiges Scoring angewendet (s. Tab. 3). Für die fluoreszenzmikroskopische (s. Tab. 4) und mikrobiologische (s. Abb. 6) Auswertung wurde jeweils ein 3-stufiges Scoring entwickelt. Nach Anwendung von Parameter C+W konnte auf den Prüfkörpern keine Fluoreszenz ermittelt werden. Die entsprechenden Tabellenfelder sind als nicht auswertbar (n.a.) gekennzeichnet.

	A + W	B + W	C + W	Gas +W	CHX + W	Kon + W
REM	0 [0/0]	0 [0/0]	0 [0/0]	4	6	6
FM	1 [1/2]	1 [1/2]	n.a.	3 [2/3]	1 [1/2]	3 [2/3]
RODAC	2 [2/2]	2 [1/2]	1 [1/2]	3 [3/3]	2 [1/3]	3 [3/3]

Mehrschrittbehandlung von 14tägigen Biofilmpollen

Rasterelektronenmikroskopie

Nach kompletter Plasmabestrahlung und Wassereinsatz zeigte sich in den rasterelektronenmikroskopischen Bildern, dass sich auch der etablierte 14tägige Biofilm leicht von der Oberfläche löste. Durch Bestrahlung mit 1,5 W und anschließender Wasserbehandlung konnten allerdings nicht alle Biofilmreste von der Prüfkörperoberfläche entfernt werden (Gruppe A). Nach Plasmabestrahlung der Biofilme mit mittleren Eingangsleistungen von 2 W und 3 W waren keine Biofilmreste mehr erkennbar (Gruppe B und C).

Auf Präparaten der unbehandelten Biofilm-Kontrollgruppe war zu erkennen, dass der Biofilm noch adhäsiv an der Oberfläche angehaftet war. Es war bei diesen Proben nicht möglich den Biofilm durch den Wasserstrahl vollständig zu entfernen. Eine Reduktion der Biofilme durch zusätzliche Chlorhexidinbehandlung oder Bestrahlung mit den Prozessgasen ohne Plasmazündung konnte nicht nachgewiesen werden.

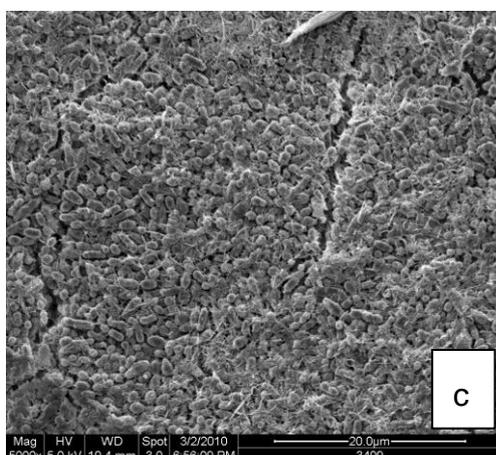
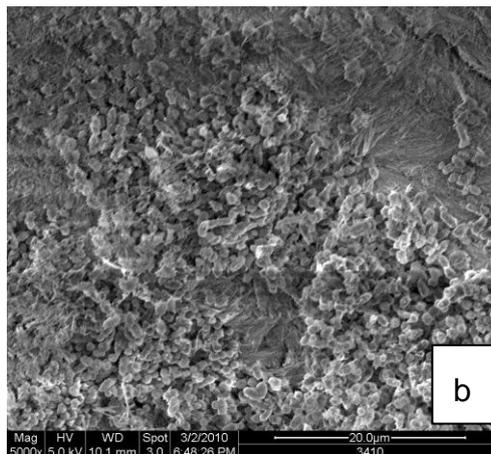
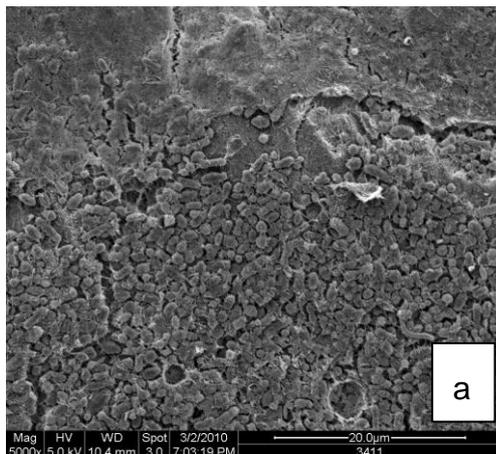


Abbildung 50: Biofilmpollen (jeweils 5000fache Vergrößerung) nach 14tägiger Kultivierung a) nach Wasserbestrahlung (Gruppe Kon). Sowohl die Biofilmmatrix als auch die einzelnen Bakterien sind gut zu erkennen, b) nach Wasserbestrahlung und Chlorhexidinbehandlung (Gruppe CHX). Hier kam es nicht zu einer Biofilmreduktion c) nach Wasserbestrahlung und Bestrahlung mit Prozessgasen (Gruppe Gas).

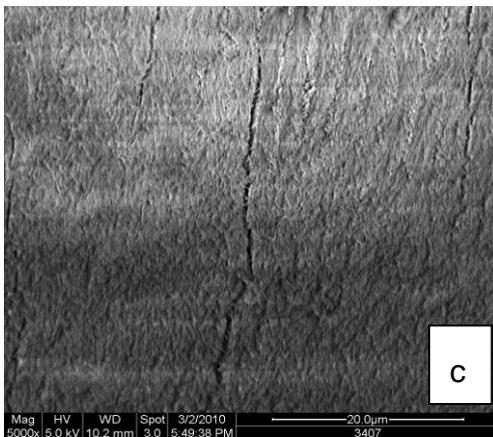
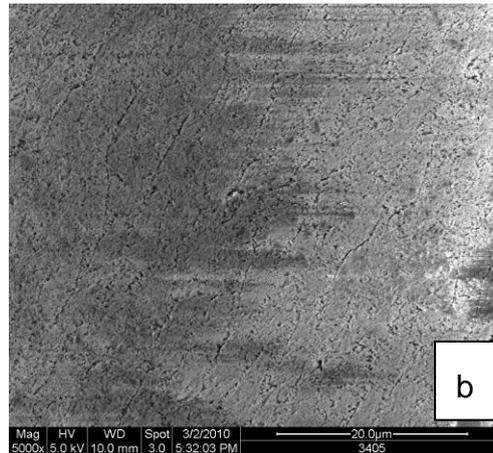
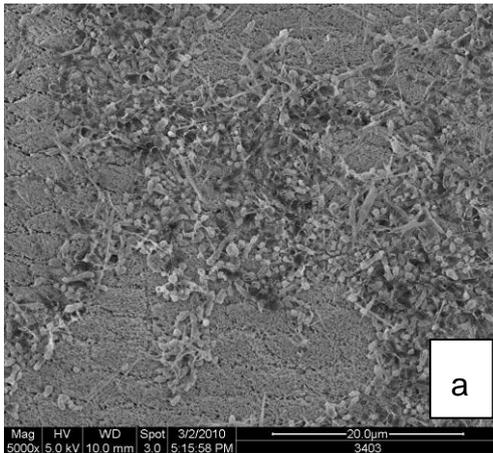


Abbildung 51: Biofilmproben (jeweils 5000fache Vergrößerung) nach 14tägiger Kultivierung, mit Plasmajet bestrahlt und nachfolgend mit Wasserstrahl behandelt. Elektrische Eingangsleistung des Plasmajets von: a) 1,5 W (Parameter A), b) 2 W (Parameter B), und c) 3 W (Parameter C). In den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen von Parameter A kam es zu einer Biofilmreduktion. In den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen von Parameter B und C waren keine Mikroorganismen zu erkennen.

Fluoreszenzmikroskopie

Die Ergebnisse der rasterelektronenmikroskopischen Auswertung ließen sich durch die Fluoreszenzmikroskopie bestätigen. Die Biofilme der Kontrollgruppen waren nach Wasserbestrahlung weiterhin vital. Chlorhexidin reduzierte die Grünfluoreszenz, eine Entfernung der Biofilme war jedoch nicht möglich. Auf Prüfkörpern die mit Parameter B und C behandelt wurden, ließen sich keine Bakterien nachweisen, während nach Plasmabestrahlung mit Parameter A alle erkennbaren Mikroorganismen rote Fluoreszenz aufwiesen.

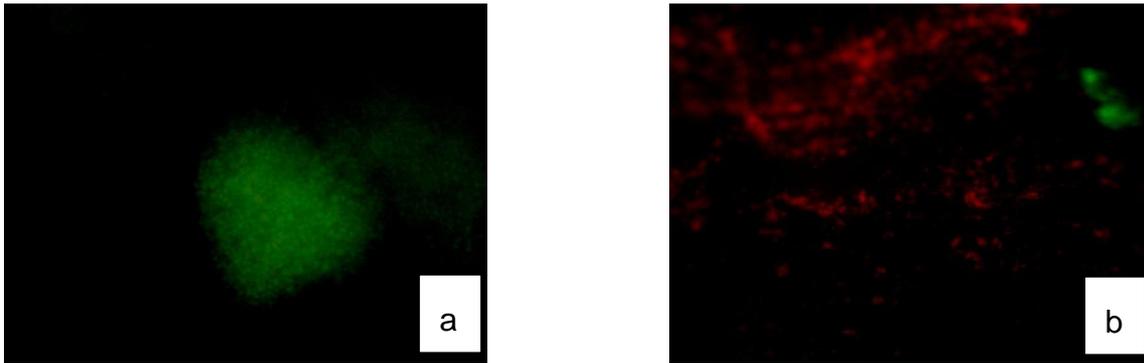


Abbildung 52: 14tägiger Biofilm auf Schmelzprüfkörper a) nach Wasserbestrahlung (Gruppe Kon), b) nach Wasserbestrahlung und Chlorhexidinbehandlung (Gruppe CHX).

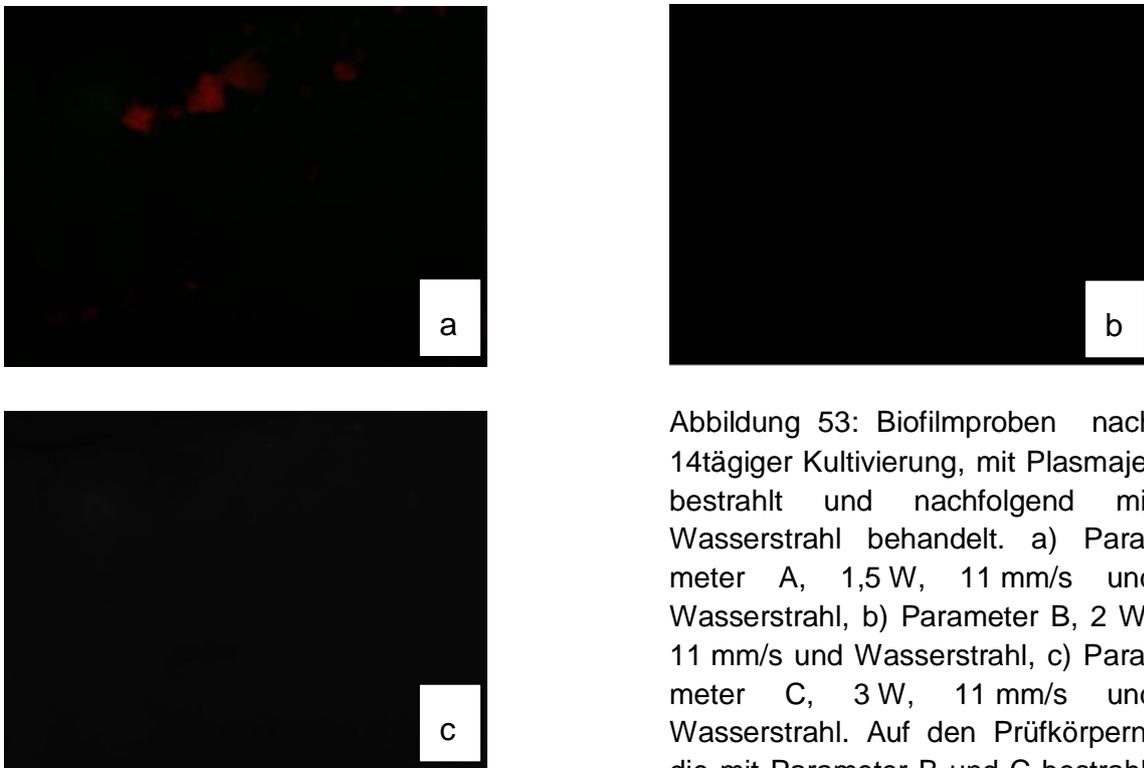


Abbildung 53: Biofilmproben nach 14tägiger Kultivierung, mit Plasmajet bestrahlt und nachfolgend mit Wasserstrahl behandelt. a) Parameter A, 1,5 W, 11 mm/s und Wasserstrahl, b) Parameter B, 2 W, 11 mm/s und Wasserstrahl, c) Parameter C, 3 W, 11 mm/s und Wasserstrahl. Auf den Prüfkörpern, die mit Parameter B und C bestrahlt worden sind, konnte keine Fluoreszenz ermittelt werden.

Mikrobiologie

Biofilme nach 14tägiger Kultivierung und nach Wasserstrahlbehandlung zeigten auf den Kontaktpräparaten dichtes mikrobielles Wachstum. Die Anwendung der Prozessgase ohne Plasmazündung reduzierte das Wachstum nicht. Auch mit Chlorhexidin behandelte Biofilme zeigten ein Wachstum. Nach Plasmabestrahlung und Behandlung mit dem Wasserstrahl war bei Parameter A und Parameter B eine deutliche Reduktion des bakteriellen Wachstums zu erkennen, allerdings waren weiterhin einzelne Bakterienkolonien gewachsen.

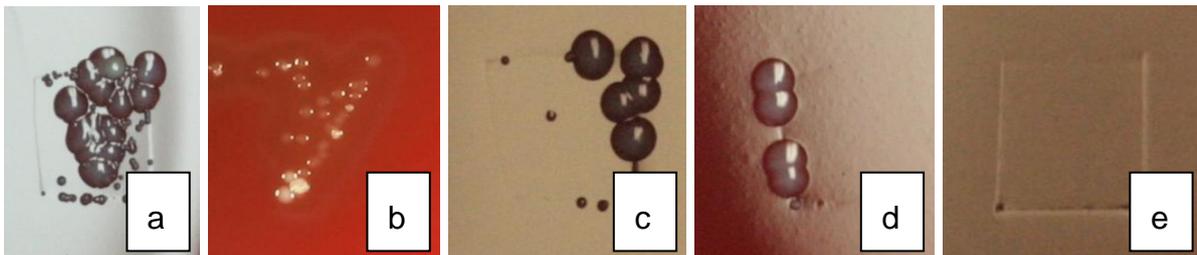


Abbildung 54: Biofilme nach 14tägiger Kultivierung. a) Behandlung mit Wasserstrahl, Score 3, b) Behandlung mit Chlorhexidin und Wasserstrahl, Score 2 c) Plasmabehandlung mit Parameter A, 1,5 W, 11 mm/s und Wasser, Score 2 d) Plasmabehandlung mit Parameter B, 2 W, 11 mm/s und Wasser, Score 2 e) Plasmabehandlung mit Parameter C, 3 W, 11 mm/s und Wasser, Score 1.

Ergebnisse

Tabelle 14: Ergebnisse der rasterelektronenmikroskopischen (REM), fluoreszenzmikroskopischen (FM) und mikrobiologischen (RODAC) Untersuchungen für Biofilme nach 14tägiger Kultivierung und jeweils nachfolgender Wasserstrahlbehandlung (+ W). Die Biofilme wurden mit Plasmajet folgender Parameter bearbeitet: Parameter A: Eingangsleistung 1,5 W, 0,9 s/mm²; Parameter B: Eingangsleistung 2 W, 0,9 s/mm², Parameter C: Eingangsleistung 3 W, 0,9 s/mm². Die mitgeführten Kontrollpräparate wurden mit den Prozessgasen ohne Plasmazündung (Gas + W, 0,9 s/mm²) oder Chlorhexidin (CHX + W, 0,2 %, 2 min) behandelt oder ohne weitere Behandlung, jedoch mit nachfolgender Wasserbestrahlung, analysiert (Kon + W). Angegeben sind jeweils der Median der Scores sowie deren Wertebereich [Minimal-/Maximalwert]. Für die rasterelektronenmikroskopische Auswertung wurde ein 7-stufiges Scoring angewendet (s. Tab. 3). Für die fluoreszenzmikroskopische (s. Tab. 4) und mikrobiologische (s. Abb. 6) Auswertung wurde jeweils ein 3-stufiges Scoring entwickelt. Nach Anwendung der Parameter B+W und C+W konnte auf den Prüfkörpern keine Fluoreszenz ermittelt werden. Die entsprechenden Tabellenfelder sind als nicht auswertbar (n.a.) gekennzeichnet.

	A + W	B + W	C + W	Gas + W	CHX + W	Kon + W
REM	0,5 [0/1]	0 [0/0]	0 [0/0]	6	6	6
FM	1 [1/1]	n. a.	n. a.	2 [2/3]	1 [1/2]	3 [3/3]
RODAC	2 [2/2]	2 [2/2]	1 [1/2]	3[2/3]	2[2/2]	3[3/3]

5 Diskussion

Biofilmetablierung / Biofilmmodell

Die vorgelegte Arbeit hatte das Ziel, *in-vitro* den Einfluss einer Bestrahlung früher und etablierter Biofilme mit kaltem, atmosphärischem Plasma zu prüfen. Um dies testen zu können, war es zunächst nötig einen mehrdimensionalen oralen Biofilm reproduzierbar herzustellen. Dabei war es nicht die primäre Zielstellung, die oralen Bedingungen der Mundhöhle zu imitieren, sondern das Biofilmwachstum oraler Mikroorganismen schnell und reproduzierbar voran zu treiben um stabile Biofilme verfügbar zu machen (Bradshaw und Marsh, 1999; Sissons, 1997). Für die Untersuchungen wurde ein replikatives Modell (Gilbert, 1995) gewählt, dass eine artifizielle, säureinduzierte Retentionsverstärkung der Schmelzoberfläche aufwies. So wurde versucht, sich der Situation einer Biofilmretentionsnische anzunähern. Da die Vorversuche zeigten, dass durch konventionelles Ätzen von 30 Sekunden, keine ausreichende Ätztiefe zu erzielen war, mussten die Ätzzeiten um ein Vielfaches verlängert werden. Um eine reproduzierbare Biofilmbildung mit oralen Mikroorganismen zu erreichen und unterschiedliche Biofilmstärken untersuchen zu können, ohne die möglichen Probanden angesichts der hohen Anzahl benötigter Biofilme zu überfordern, erschien es sinnvoll, die Prüfkörper *in-situ* mit oralen Mikroorganismen zu infizieren und für den weiten Versuchsaufbau die Biofilme *in-vitro* in einer Durchflussskammer zu kultivieren. Es wurde eine Objektträgerschale gewählt um sicherzustellen, dass die Konstruktion sterilisierbar und leicht zu handhaben ist (in Anlehnung an Schiffner, 1999). Weiterhin musste es möglich sein, die Schmelzproben zu befestigen und eine Flüssigkeitsumwälzung zu gewährleisten um Strömungsstress (shear stress) auf den heranwachsenden Biofilm auszuüben (Cook *et al.*, 1998; Peyton und Characklis, 1993). Um zu vermeiden, dass das Biofilmwachstum stagniert oder sich Pilzsporen in der Nährlösung bilden und heranwachsen können, musste des weiteren die Möglichkeit eines Zu- und Abflusses der Nährlösung gegeben sein. So war es möglich ständig neues Nährmedium zuzuführen und die verbrauchte Nährlösung schnell abzutransportieren. Damit war es möglich, ohne größeren personellen Aufwand, schnell und effizient große Mengen an Prüfkörpern mit etablierten Biofilmen herzustellen.

Untersuchungsmethoden

Die mit kaltem, atmosphärischem Plasma bestrahlten Biofilme wurden rasterelektronenmikroskopisch im Vergleich zu unbestrahlten Biofilmen untersucht. Das Rasterelektronenmikroskop ist, aufgrund seiner großen Schärfentiefe, das Mittel der Wahl bei der Untersuchung mikrostrukturierter Oberflächen. Um gleichzeitig auch die Möglichkeit zu haben, die Morphologie der einzelnen Bakterienzellen bewerten zu können, wurden einzelne Biofilmproben auch einer transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchung unterzogen. Damit war es möglich nachzuweisen, ob die Matrix und das Zytoskelett der Bakterien intakt oder zerstört waren. Desweiteren wurde die Methodik der Fluoreszenzmikroskopie (live/dead-Färbung) verwendet, um die verbleibende Vitalität behandelter Biofilme einschätzen zu können und die Effektivität einer Abtötung durch die Plasmabehandlung nachweisen zu können. Die Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie sind dabei allerdings nur zusätzliche, richtungsweisende Informationen, da sich das Handling dieser Proben schwierig gestaltet. Mehrlagige Biofilme sind, aufgrund der geringen Schärfentiefe der Aufnahmen, schwer zu untersuchen. Durch die mikroretentive Gestaltung der Schmelzoberflächen war es zusätzlich nicht möglich, die Biofilme in eine für die fluoreszenzmikroskopische Analyse ideale Ebene zu bringen. Alternativ wäre hier eine Analyse im konfokalen Laser Scanning Mikroskop (CLSM) möglich gewesen. Dementgegen standen die große Anzahl an Prüfkörpern und die Beeinflussung des Biofilms durch den Laser während der mehrminütigen Bildakquise. Zusätzlich konnte aber durch die Fluoreszenzmikroskopie festgestellt werden, ob sich auf den Prüfkörperoberflächen überhaupt Mikroorganismen befanden, da diese fluoreszieren. Im Rasterelektronenmikroskop gestaltete sich dieser Nachweis teilweise schwierig, da eine vollständige Untersuchung der Prüfkörperoberflächen bei hinreichend hohen Vergrößerungsstufen zeitlich nicht praktikabel war. Durch die zusätzliche Anfertigung von RODAC-Kontaktpräparaten war es zudem möglich, die gewonnenen Ergebnisse weiter zu untermauern.

Diskussion der Ergebnisse

Im Rahmen der Studie konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe der Biofilmbestrahlung mit einem kalten, atmosphärischen Plasmajet bei biologisch akzeptablen Temperaturen von 32 bis 40 °C und kurzen Applikationszeiten von wenigen Sekunden die Zerstörung früher Biofilme und die Modifikation reifer Biofilme möglich ist. Die Zerstörung der Biofilme erwies sich als leistungsabhängig. Biofilme die mit einer mittleren elektrischen Eingangsleistung des Plasmajets von 1,5 W bearbeitet wurden, waren geringer desintegriert als die Biofilme, die mit höheren Leistungsstufen bestrahlt wurden. Es muss hierbei berücksichtigt werden, dass sehr kurze Plasma-Applikationszeiten gewählt wurden, um Bedingungen eines praktischen Einsatzes mit vertretbarem Zeitaufwand zu simulieren. Eine Verstärkung der desintegrierenden Wirkung auf Biofilme wäre zu erwarten, wenn Applikationszeiten verlängert oder der Leistungseintrag erhöht würden. In explorativen Voruntersuchungen wurden Plasmajets höherer Leistung auch über längere Zeiträume angewendet. Leistungen von 5 W hinterließen auch reife Biofilme stark alteriert. Als Temperatur am Auftreffpunkt des Plasmajets wurden allerdings bis zu 48 °C gemessen. Allerdings waren, in der vorliegenden Arbeit, diese Leistungsstufen nicht Gegenstand der Untersuchung, da in Kontakt mit Zahnhartsubstanzen vor allem die Auswirkungen des Jets auf Biofilme bei geringeren Temperaturen von Interesse waren.

Nach Durchführung mehrerer Untersuchungsreihen wurde klar, dass die Biofilme zwar meist alteriert und desintegriert erschienen, allerdings durch Plasmabehandlung nicht vollständig entfernt werden konnten. Um untersuchen zu können, ob sich der Biofilm eventuell komplett eliminieren lässt, wurde eine weitere Versuchsreihe erstellt. Dabei wurde nach der Bestrahlung mittels Plasmajet die Oberfläche zusätzlich mit einem Wasserstrahl, abgegeben aus einer Laborflasche, gespült. Die Ergebnisse waren überraschend. Es kam zu einer deutlichen Reduktion der persistierenden Biofilme. Dieser Befund lässt darauf schließen, dass die Adhäsion der Biofilme an die mikroretentive Schmelzoberfläche stark vermindert war. Durch diese zusätzlichen Untersuchungsreihen war es auch möglich, die Limits der Plasmawirkung bei biologisch akzeptabler Temperatur und kurzer Applikationszeit in der Tiefe der Biofilme zu verifizieren. Im Einklang mit den Ergebnissen der

transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen wurde deutlich, dass die Plasmaenergie zwar für eine oberflächliche Desinfektion von Biofilmen geeignet erscheint, in Biofilmregionen einer Tiefe von mehreren 10 µm jedoch die Mikroorganismen nicht vollständig abtötet. In gleichzeitig durchgeführten Versuchsreihen zur Desintegration von Biofilmen auf Titanoberflächen (Rupf *et al.*, 2011c) wurden durch eine zweite Plasmabestrahlung Biofilmreste vollständig desinfiziert und entfernt. Die Effektivität der Biofilmdesinfektion durch atmosphärisches Plasma mit den gewählten Parametern erreichte die des Chlorhexidins. Chlorhexidin wurde allerdings in einer Konzentration von 0,2 % über einen Zeitraum von 2 min angewendet. In der klinischen Praxis stehen höhere Wirkstoffkonzentrationen zur Verfügung, so dass hier eine Verkürzung der Applikationszeit möglich ist. Mit einem Chlorhexidingel oder einer Chlorhexidinlösung ist allerdings eine punktförmige Kavitätendesinfektion, wie sie mit einem Plasmajet durchgeführt werden kann, unmöglich. Bei einer Chlorhexidin-Anwendung, zum Beispiel im Rahmen einer Parodontitistherapie (full-mouth-disinfection), kommt es auch zur Abtötung von Mikroorganismen, die nicht parodontopathogen sind. Desweiteren würde durch Beschränkung der Plasmaanwendung auf ein wenige Quadratmillimeter großes Areal, der Vorteil der kurzen Applikationszeit noch stärker zum Tragen kommen, da hierbei die Reizintensität auf biologisches Material auf ein Minimum reduziert werden kann.

In der Laborumgebung, in der die Untersuchungen durchgeführt wurden, war keine zahnärztliche Behandlungseinheit verfügbar. Die Verwendung einer Plastik-Laborflasche diente der Simulation der zahnmedizinischen Option, Luft/Wasser-Spray aus einer Multifunktionsspritze einzusetzen. Der Luftdruck für diese, in die zahnärztliche Einheit, integrierten Systeme beträgt 2 bar. Über 5 s werden so etwa 5 ml Wasser bei höherem Druck, als er mit der Laborflasche zu erzeugen war, auf die Biofilme abgegeben. Allein durch die Verfügbarkeit erhöhten Bearbeitungsdruckes ist eine Steigerung der Behandlungseffektivität zu erwarten. Auf mikrostrukturierten Titanoberflächen konnte dies für im Mittel 90 µm starke Biofilme demonstriert werden (Rupf *et al.*, 2011c).

Die im Rahmen dieser Studie angewendeten Parameter hinterließen keine, in der rasterelektronenmikroskopischen Darstellung, sichtbare Alteration der geätzten Schmelzoberflächen. Die Wirkung des Plasmajets auf die frühen und etablierten *in-*

vitro-Biofilme kann auf die Wirkung reaktiver Sauerstoffradikale sowie energiereicher Teilchen wie Elektronen und Ionen und energiereicher Photonen im UVB und UVC Bereich zurückgeführt werden (Laroussi *et al.*, 2004; Vleugels *et al.*, 2005; Winter *et al.*, 2011). Den höchsten Anteil an der desinfizierenden und desintegrierenden Wirkung des in dieser Untersuchung verwendeten Plasmajets kann Plasma-induzierten reaktiven Spezies wie atomarem Sauerstoff und OH Radikalen zugeschrieben werden. Zusätzlich wird ein Membran- und Zellwand-destruktiver elektrostatischer Prozess vermutet (Kim und Kim, 2006; Laroussi *et al.*, 2002b). Thermische Einflüsse scheinen, aufgrund der geringen Temperaturen und der kurzen Applikationszeiten, keinen entscheidenden Einfluss auf die Biofilmdestruktion auszuüben (Zenker, 2008). Ebenso ist ein austrocknender Einfluss der Gasströmung, aufgrund der hier präsentierten Daten, unter den gewählten Parametern von untergeordneter Bedeutung. Dies konnte durch die Kontrollen ohne Plasmazündung als auch durch die eigenen fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen bestätigt werden.

Die Ergebnisse der transmissionselektronischen Untersuchungen unterstützen die These, dass die Plasmabestrahlung an der Oberfläche der Biofilme zur Destruktion führen kann. In tieferen Biofilmregionen sind jedoch intakte Bakterienzellen detektierbar. Auch die Ergebnisse der fluoreszenzmikroskopischen und der mikrobiologischen Untersuchung stützen diese These.

Für die Bearbeitungsgeschwindigkeit wurde, nach Vorversuchen, eine lineare Zeilenbewegung über der Probe von 11 mm/s festgelegt. Bei einem Vorschub der Plasmaquelle von 0,1 mm je Zeile entspricht dies einer Bestrahlungszeit von 0,91 s/mm². Bei typischen Kavitätengrößen von wenigen Quadratmillimetern wurden diese Parametersätze als praxisrelevant erachtet und ermöglichten die Biofilmbearbeitung bei minimaler thermischer Belastung des Prüfkörpers.

Wie in den Vorversuchen gezeigt, sind höhere Bestrahlungsdosen durchaus geeignet, etablierte Biofilme zu zerstören. Die Biofilme sind nach Bestrahlung auch deutlich weniger adhärent, wie in einer jüngst erschienenen Untersuchung gezeigt wurde (Rupf *et al.*, 2010a). Gleichwohl sind diese Parameter, die eine höhere Oberflächentemperatur verursachen zurzeit noch zu hinterfragen, da Schmelz, Dentin und vor allem die Pulpa durch die Bestrahlung Schäden erleiden können.

Perspektiven

Für die Biofilmdestruktion in der Mundhöhle stehen eine Reihe chemischer, physikalischer und mechanischer Verfahren zur Verfügung. Ein Problem stellt dabei die Kavitätendesinfektion da. Dabei muss zwar adhärenter Biofilm zerstört und entfernt werden, es sollte aber nicht zum Abtrag gesunder Zahnhartsubstanz kommen. Aufgrund der gezeigten, schonenden Destruktion oraler Biofilme ist die Anwendung des Plasmajets zur Desinfektion präparierter Kavitäten, zur selektiven Demarkierung kariöser Zahnhartsubstanz und zur Fissurenreinigung sowie zur Oberflächenversiegelung durch Abscheidung mineralischer Substanzen naheliegend.

In Pilotuntersuchungen wurde ebenfalls eine Erhöhung der Benetzbarkeit von Schmelz und Dentin nach Applikation des Plasmajets nachgewiesen (Rupf *et al.*, 2011a, b). Dies ging mit einer verstärkten Penetration von Adhäsiven in Schmelz und Dentin in bestrahlten Kavitäten einher. Eine adjunktive Anwendung des Plasmajets auf dem Gebiet der restaurativen Zahnmedizin erscheint auch hier möglich.

Besondere Schwierigkeiten treten in der Zahnmedizin vor allem dann auf, wenn Oberflächen dekontaminiert werden sollen, jedoch nicht geschädigt werden dürfen. Eine solche Problematik ist die Therapie der Periimplantitis, bei der die Entfernung der mikrobiellen Plaque und der Endotoxine von der Implantatoberfläche eine wichtige Voraussetzung für die Ausheilung der Entzündung und die anschließende knöcherne Regeneration darstellt. Zur mechanischen Belagentfernung werden Kunststoffscaler, Polierkelche und Ultraschallgeräte mit Kunststoffaufsätzen, für die Entfernung von Bakterien und Toxinen Pulver-Wasserstrahlgeräte und sogar Laser empfohlen (Ramaglia *et al.*, 2006; Schwarz *et al.*, 2005,2009). Die Vorbeugung einer erneuten Plaqueakkumulation geschieht häufig durch das Abtragen rauer Oberflächenstrukturen der Implantate mit möglichen Nachteilen für eine knöcherne Reintegration. Im Rahmen der Periimplantitistherapie ist somit der Einsatz eines kalten, atmosphärischen Plasmajets ebenfalls denkbar. Es erscheint möglich, auf der Implantatoberfläche aufliegende Biofilme zu desintegrieren und ihre Reste mit Detergenzien schonend zu entfernen. Desweiteren gibt es Ergebnisse eines Pilotversuchs, bei dem mit einem kalten Plasmajet ein intraoral etablierter, mehrtägiger Biofilm auf Titan stark reduziert wurde (Rupf *et al.*, 2011c). Eine zusätzliche Option eröffnet sich durch die Möglichkeit, mit Hilfe des Plasmajets am

Patienten eine Modifikation von Implantatoberflächen zur Verbesserung des Benetzungsverhaltens vorzunehmen (Lopez-Heredia *et al.*, 2008; Yoshinari *et al.*, 2009). Mittels UV-Bestrahlung konnte eine verbesserte Osseointegration von Implantaten im Tierversuch durch dieses Bearbeitungsprinzip nachgewiesen werden (Ueno *et al.*, 2010). Dieses Verfahren ist bisher jedoch aufgrund langer Bearbeitungszeiten der Titanimplantate nur industriell verfügbar (Aita *et al.*, 2009). Durch den Plasmajet sind die gewünschten Veränderungen auf den Titanoberflächen innerhalb weniger Minuten zu erreichen (Lopez-Heredia *et al.*, 2008). Damit wäre ein solches Verfahren auf die klinische Situation übertragbar.

6 Schlussfolgerung

Die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse zeigen vielversprechende Möglichkeiten auf, die bisher in der Medizin eingesetzten heißen Plasmajets um die Optionen kalter Plasmajets in der Zahnmedizin zu ergänzen, wenn eine berührungslose Oberflächenbearbeitung bei Körpertemperatur notwendig ist. Es sollte auch weiterhin daran gearbeitet werden, die Parameter so zu optimieren, so dass eine restlose Biofilmzerstörung garantiert werden kann. Die verwendete Methode bietet therapeutisches Anwendungspotenzial insbesondere für die Kavitätendesinfektion.

7 Literaturverzeichnis

1. Aita H, Hori N, Takeuchi M, Suzuki T, Yamada M, Anpo M, Ogawa T. (2009) The effect of ultraviolet functionalization of titanium on integration with bone. *Biomaterials*. 30: 1015–1025.
2. Arweiler NB, Lenz R, Sculean A, Al-Ahmed A, Hellwig E, Auschill TH. (2008) Effect of food preservatives on in situ biofilm formation. *Clin Oral Investig*. 12: 203-208.
3. Auschill TM, Arweiler NB, Netuschil L, Brex M, Reich E, Sculean A. (2001) Spatial distribution of vital and dead microorganisms in dental biofilms. *Arch Oral Biol*. 46: 471-476.
4. Baumgart J. (1996) Möglichkeiten und Grenzen moderner Schnellverfahren zur Prozesskontrolle von Reinigungs- und Desinfektionsverfahren. *Zentralblatt für Hygiene und Umweltschutz*. 366-375. Fischer Verlag.
5. Baysan A, Beighton D. (2007) Assessment of the ozone-mediated killing of bacteria in infected dentine associated with non-cavitated occlusal carious lesions. *Caries Res*. 41: 337-341.
6. Becker K, Koutsospyros A, Yin SM, Christodoulatos C, Abramzon N, Joaquin JC, Brelles M. (2005) Environmental and biological applications of microplasmas. *Plasma Phys Control Fusion*. 12: 513–523.
7. Bergler W, Huber K, Hammerschmitt N, Hormann K. (2001) Tonsillectomy with argon plasma coagulation (APC): evaluation of pain and hemorrhage. *Laryngoscope*. 111: 1423-1429.
8. Bin L, Goree J, Drake D, Stoffels E. (2006) Killing of *S. mutans* bacteria using a plasma needle at atmospheric pressure. *IEEE Trans Plasma Sci*. 34: 1317–1324.
9. Böhm G, Janietz M, Eichentopf I-M, Meister J, Arnold T, Lehmann A, Rueppell A, Schindler A, Rupf S. (2009) Oberflächen(form)modulation und -funktionalisierung mit Hilfe miniaturisierter Atmosphärendruck-Plasmajets. 5. „Thüringer Grenz- und Oberflächentage“ & 7. „Thüringer Biomaterial-Kolloquium“, 15.-17. September 2009, Friedrichroda, Posterpräsentation.

10. Bradshaw DJ, Marsh PD. (1999) Use of continuous flow techniques in modelling dental plaque biofilms. *Method Enzymol.* 310: 279-296.
11. Bray DF, Bagu J, Koepler P. (1993) Comparison of hexamethyldisilazane (HMDS), Peldrill and critical-point drying methods for scanning electron microscopy of biological specimens. *Microsc Res Tech.* 26: 489-495.
12. Clarkson BH, Wefel JS, Miller I. (1984) A model for producing caries-like lesions in enamel and dentin using oral bacteria in vitro. *J Dent Res.* 63: 1186-1189.
13. Cook GS, Costerton JW and Lamont RJ. (1998) Biofilm formation by *Porphyromonas gingivalis* and *Streptococcus gordonii*. *J Periodontal Res.* 33: 323-327.
14. Coulombe S, Léveillé V, Yonson S, Leask RL. (2006) Miniature atmospheric pressure glow discharge torch (APGD-t) for local biomedical applications. *Pure Appl Chem.* 78: 1147–1156.
15. Daeschlein G, Darm K, Majunke S, Kindel E, Weltmann KD, Juenger M. (2009) In vivo monitoring of atmospheric pressure plasma jet (APPJ) skin therapy by confocal laserscan microscopy (CLSM). San Antonio, Texas, USA.
16. Deilmann M, Halfmann H, Bibinov N, Wunderlich J, Awakowicz P. (2008) Low-pressure microwave plasma sterilization of polyethylene terephthalate bottles. *J Food Prot.* 71: 2119-2123.
17. Deimling D, Breschi L, Hoth-Hannig W, Ruggeri A, Hannig C, Nekrashevych Y, Prati C, Hannig M. (2004) Electron microscopic detection of salivary α -amylase in the pellicle formed in situ. *Eur J Oral Sci.* 112: 503-509.
18. Ermolaeva SA, Varfolomeev AF, Chernukha MY, Yurov DS, Vasiliev MM, Kaminskaya AA, Moisenovich MM, Romanova JM, Murashev AN, Selezneva II, Shimizu T, Sysolyatina EV, Shaginyan IA, Petrov OF, Mayevsky EI, Fortov VE, Morfill GE, Naroditsky BS, Gintsburg AL. (2011) Bactericidal effects of non-thermal argon plasma in vitro, in biofilms and in the animal model of infected wounds. *J Med Microbiol.* 60(Pt 1): 75-83.

19. Fetykov AI, Avdeeva EA, Fulton J, Ferrel J, Grotsev VA, Galov AA. (2009) The effectiveness of cold plasma treatment of diabetic feet syndrome, complicated by purulonecrotic process. Second International Conference on Plasma. San Antonio, Texas, USA.
20. Foster KW, Moy RL, Fincher EF. (2008) Advances in plasma skin regeneration. *J Cosmet Dermatol.* 7: 169-179.
21. Fridman G, Peddinghaus M, Ayan H, Fridman A, Balasubramanian M, Gutsol A, Brooks A and Fridman G. (2006) Blood coagulation and living tissue sterilization by floating-electrode dielectric barrier discharge in air. *Plasma Chem. Plasma Process.* 26: 425-442.
22. Gilbert P. (1995) The value of in-vitro models to the study of biofilms. In: Wimpenny J, Handley P, Gilbert P, Lappin-Scott H (eds), *Life and death of biofilm.* BioLine: 13-16, Cardiff .
23. Goree J, Liu B, Drake D, Stoffels E. (2006) Killing of *S. mutans* bacteria using a plasma needle at atmospheric pressure. *IEEE Trans Plasma Sci.* 34: 1317-1324.
24. Hammann A, Huebner NO, Bender C, Ekkernkamp A, Hartmann B, Hinz P, Kindel E, Koban I, Koch S, Kohlmann T, Lademann J, Matthes R, Müller G, Titze R, Weltmann KD, Kramer A. (2010) Antiseptic efficacy and tolerance of tissue-tolerable plasma compared with two wound antiseptics on artificially bacterially contaminated eyes from commercially slaughtered pigs. *Skin Pharmacol Physiol.* 23: 328-332.
25. Hannig M. (1997) Transmission electron microscopic study of in vivo pellicle formation on dental restorative materials. *Eur J Oral Sci.* 105: 422-433.
26. Hauser J, Zietlow J, Köller M, Esenwein SA, Halfmann H, Awakowicz P, Steinau HU. (2009) Enhanced cell adhesion to silicone implant material through plasma surface modification. *J Mater Sci Mater Med.* 20: 2541-2548.
27. Hauser J, Koeller M, Bensch S, Halfmann H, Awakowicz P, Steinau HU, Esenwein S. (2010) Plasma mediated collagen-I-coating of metal implant materials to improve biocompatibility. *J Biomed Mater Res A.* 94: 19-26.

28. Hauser J, Esenwein SA, Awakowicz P, Steinau HU, Köller M, Halfmann H. (2011) Sterilization of heat-sensitive silicone implant material by low-pressure gas plasma. *Biomed Instrum Technol.* 45: 75-79.
29. Heinlin J, Isbary G, Stolz W, Morfill G, Landthaler M, Shimizu T, Steffens B, Nosenko T, Zimmermann JL, Karrer S. (2010) Plasma applications in medicine with a special focus on dermatology. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 25: 1-11.
30. Hope CK, Wilson M. (2004) Analysis of the effects of chlorhexidine on oral biofilm vitality and structure based on viability profiling and an indicator of membrane integrity. *Antimicrob Agents Chemother.* 48: 1461-1468.
31. Hübner NO, Matthes R, Koban I, Rändler C, Müller G, et al. (2010) Efficacy of chlorhexidine, polihexanide and tissue-tolerable plasma against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms grown on polystyrene and silicone materials. *Skin Pharmacol Physiol.* 23: 28-34.
32. Isbary G, Morfill G, Schmidt HU et al. (2010) A first prospective randomized controlled trial to decrease bacterial load using cold atmospheric argon plasma on chronic wounds in patients. *Br J Dermatology.* 163: 78-82.
33. Isbary G, Morfill G, Zimmermann J, Shimizu T, Stolz W. (2011) Cold atmospheric plasma: a successful treatment of lesions in Hailey-Hailey disease. *Arch Dermatol.* 147: 388-390.
34. Joaquin JC, Kwan C, Abramzon N, Vandervoort K, Brelless-Mariño G. (2009) Is gas-discharge plasma a new solution to the old problem of biofilm inactivation? *Microbiology.* 155: 724-732.
35. Joshi SG, Paff M, Friedman G, Fridman A, et al. (2010) Control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in planktonic form and biofilm: A biocidal efficacy study of nonthermal dielectric-barrier discharge plasma. *Am J Infect Control.* 38: 293-301.

36. Kammgang JO, Briandet R, Herry JM, Brisset JL, Naitali M. (2007) Destruction of planktonic, adherent and biofilm cells of *Staphylococcus epidermis* using a gliding discharge in humid air. J Appl Microbiol. 103: 621-628.
37. Kieft IE. (2005, a) Plasma needle: exploring biomedical applications of non-thermal plasmas. PhD Thesis, Eindhoven University of Technology, Eindhoven, NL.
38. Kieft IE, van Berkel JJBN, Kieft ER, Stoffels E. (2005, b) Radicals of plasma needle detected with fluorescent probe. Plasma Process Polym. 22: 295–308.
39. Kilmer S, Semchyshyn N, Shah G, Fitzpatrick R. (2007) A pilot study on the use of a plasma skin regeneration device in full facial rejuvenation procedures. Laser Med Sci. 22: 101-109.
40. Kim SM, Kim JI. (2006) Decomposition of biological macromolecules by plasma generated with helium and oxygen. J Microbiol. 44: 466-471.
41. Klein HJ, Werner HP. (1969) Eine einfache Methode zur Anfertigung von Abklatschmethoden für den Nachweis von Keimträgern bei der Bekämpfung des Hospitalismus. Zbl. für Biologie. 211: 395-399.
42. Koban I, Holtfreter B, Hübner N-O, Matthes R, Sietmann R, Kindel E, Weltmann K-D, Welk A, Kramer A, Kocher T. (2011) Antimicrobial efficacy of non-thermal plasma in comparison to chlorhexidine against dental biofilms on titanium discs in vitro-proof of principle experiment. J Clin Periodontol. 38: 956-965.
43. Lademann J, Richter H, Alborova A, Humme D, Patzelt A, Kramer A, Weltmann KD, Hartmann B, Ottomann C, Fluhr JW, Hinz P, Hübner G, Lademann O. (2009) Risk assessment of the application of a plasma jet in dermatology. J Biomed Opt. 14: 054025.
44. Lademann O, Richter H, Meinke MC, Patzelt A, Kramer A, Hinz P, Weltmann KD, Hartmann B, Koch S. (2011, a) Drug delivery through the skin barrier enhanced by treatment with tissue-tolerable plasma. Exp Dermatol. 20: 488-490.

45. Lademann O, Kramer A, Richter H, Patzelt A, Meinke MC, Czaika V, Weltmann KD, Hartmann B, Koch S. (2011, b) Skin disinfection by plasma-tissue interaction: comparison of the effectivity of tissue-tolerable plasma and a standard antiseptic. *Skin Pharmacol Physiol.* 24: 284-288.
46. Laroussi M. (2002, a) Non-thermal decontamination of biological media by atmospheric pressure plasmas: review, analysis and prospects. *IEEE Trans Plasma Sci.* 30: 1409–1415.
47. Laroussi M, Richardson JP, Dobbs FC. (2002, b) Effects of non-equilibrium atmospheric pressure plasmas on the heterotrophic pathways of bacteria and on their cell morphology. *Appl Phys Lett.* 81: 772–774.
48. Laroussi M, Leipold F. (2004) Evaluation of the roles of reactive species, heat, and UV radiation in the inactivation of bacterial cells by air plasmas at atmospheric pressure. *Int J Mass Spectrom.* 233: 81–86.
49. Laroussi M., Lu X. (2005) Room-temperature atmospheric pressure plasma plume for biomedical applications. *Appl Phys Lett.* 87: 113902.
50. Lee HW, Kim GJ, Kim JM, Park JK, Lee JK, Kim GC. (2009) Tooth bleaching with nonthermal atmospheric pressure plasma. *J Endod.* 35: 587-591.
51. Levine RS, Coulter WA. (1976) A preliminary report on human enamel demineralization in an artificial mouth. *Arch Oral Biol.* 21: 137-139.
52. Liebmann J, Scherer J, Bibinov N, Rajasekaran P, Kovacs R, Gesche R, Awakowicz P, Kolb-Bachofen V. (2011) Biological effects of nitric oxide generated by an atmospheric pressure gas-plasma on human skin cells. *Nitric Oxide.* 24: 8-16.
53. Lopez-Heredia MA, Legeay G, Gaillard C, Layrolle P. (2008) Radio frequency plasma treatment on titanium for enhancement of bioactivity. *Acta Biomater.* 4:1953-1962.

54. Lu X, Cao Y, Yang P et al. (2009) A plasma jet device for root canal sterilization. Second International Conference on Plasma Medicine. San Antonio, Texas, USA.
55. Malick KJ. (2006) Clinical applications of argon plasma coagulation in endoscopy. *Gastroenterol Nurs.* 29: 386-391.
56. Manner H. (2008) Argon plasma coagulation therapy. *Curr Opin Gastroenterol.* 24: 612-616.
57. Marsh PD. (1995) The role of microbiology in models of dental caries. *Adv Dent Res.* 9: 244-269.
58. Masaoka S. (2007) Plasma sterilization of polyethylene terephthalate bottles by pulsed corona discharge at atmospheric pressure. *Biocontrol Sci.* 12: 59-63.
59. Mertens N, Helmka A, Vioel W. (2009, a) Dielectric barrier discharge plasma – an upcoming approach in skin treatment. 2nd International Workshop on Plasma-Tissue Interaction. Greifswald, Germany.
60. Mertens N, Helmke A, Goppold A et al. (2009, b) Low temperature plasma treatment of human tissue. Second International Conference on Plasma Medicine. San Antonio, Texas, USA.
61. Meyer-Lueckel H, Paris S, (2008) Progression of artificial enamel caries lesions after infiltration with experimental light curing resins, *Caries Res.* 42: 117-124
62. Moisan M, Barbeau J, Moreau S, Pelletier J, Tabrizian M, Yahia, LH. (2001) Low-temperature sterilization using gas plasmas: a review of the experiments and an analysis of the inactivation mechanisms. *Intl J Pharm.* 226: 1–21.
63. Morent R, De Geyter N, Verschuren J, De Clerck K, Kiekens P, Leys C. (2007) Non-thermal plasma treatment of textiles. *Surface and Coatings Technology.* 202: 3427-3449.

64. Mueller M, Burger-Kentischer A, Trick I, Oehr C. (2009) Sterilization of thermo labile materials by low pressure plasma discharge. Second International Conference on Plasma Medicine. San Antonio, Texas, USA.
65. Netuschill L. (1983) Vitalfärbung von Plaque-Mikroorganismen mit Fluoresceindiacetat und Ethidumbromid. Dtsch Zahnärztebl. Z 38: 914-917.
66. Netuschill L, Von Ohle C, Brex M. (1996) Die Vitalfluoreszenztechnik in der Plaqueforschung. Parodontol. 7: 293-305.
67. Niskaken A, Pohja MS. (1977) Comparative studies on the sampling and investigation of surfaces by the contact plate and the swab methods. J App Bact. 42: 53-63.
68. Ostroukhova AA, Markov BP, Iushchuk ND, Kudriavtseva NV, Pizatulina SS. (1995) [The microorganism count on impression materials following disinfection by dynamic plasma treatment] Stomatologija (Mosk). 74: 52-55.
69. Perdigao J, Lambrechts P, Van Meerbeek B, Vanherle G, Lopes AL. (1995) Field emission SEM comparison of four postfixation drying techniques for human dentin, J Biomed Mater Res. 29: 1111-1120.
70. Peyton BM and Characklis WG, (1993) A statistical analysis of the effect of substrate utilization and shear stress on the kinetics of biofilm detachment. Biotechnology and Bioengineering. 41: 728-735.
71. Plattner H, Hentschel J.(1997) Zelluläre Strukturen- Sichtbarmachung mit Hilfe mikroskopischer Techniken; Thieme; Stuttgart-New York.
72. Priglinger SG, Haritoglou C, Palanker DV, Alge CS, Gandorfer A, Kampik A. (2005) Pulsed electron avalanche knife (PEAK-fc) for dissection of retinal tissue. Arch.Ophthalmol. 123: 1412-1418.
73. Puac N, Lazovic S, Hadzi-Mihajlovic M et al. (2009) Plasma needle treatment of bacteria originating from periodontal pocket. Second International Conference on Plasma Medicine. San Antonio, Texas, USA.

74. Raiser J, Zenker M. (2006) Argon plasma coagulation for open surgical and endoscopic applications: state of the art. *J Phys D: Applied Physics*. 39: 3520- 3523.
75. Ramaglia L, di Lauro AE, Morgese F, Squillace A. (2006) Profilometric and standard error of the mean analysis of rough implant surfaces treated with different instrumentations, *Implant Dent*. 15: 77-82.
76. Reddy C, Majid A, Michaud G, Feller-Kopman D, Eberhardt R, Herth F, Ernst A. (2008) Gas embolism following bronchoscopic argon plasma coagulation: a case series. *Chest*. 134: 1066-1069.
77. Reimer L. (1983) *Scanning Electron Microscopy*; Springer Verlag.
78. Reshetov IV, Kabisov RK, Shekhter AB, Pekshev AV, Maneilova MV. (2000) The use of a "Plason" air-plasma apparatus for coagulation and NO-therapy in plastic reconstructive surgery for oncologic patients. *Ann. Plastic, Reconstr. Aesthetic Surg*. 4: 24-38.
79. Ring A, Langer S, Schaffran A, Stricker I, Awakowicz P, Steinau HU, Hauser J. (2010) Enhanced neovascularization of dermis substitutes via low-pressure plasma-mediated surface activation. *Burns*. 36 : 1222-1227.
80. Ring A, Tilkorn DJ, Goertz O, Langer S, Schaffran A, Awakowicz P, Hauser J. (2011) Surface modification by glow discharge gasplasma treatment improves vascularization of allogenic bone implants. *J Orthop Res*. 29: 1237-1244.
81. Ritts AC, Li H, Yu Q, Xu C, Yao X, Hong L, Wang Y. (2010) Dentin surface treatment using a non-thermal argon plasma brush for interfacial bonding improvement in composite restoration. *Eur J Oral Sci*. 118: 510-516.
82. Robinson C, Kirkham J, Percival R, Shore R, Bonass W, Brookes S, Kusa L. (1997) A method for the quantitative site-specific study of the biochemistry within dental plaque biofilms formed in vivo. *Caries Res*. 31: 194-200.

83. Rupf S, Lehmann A, Hannig M, Schäfer B, Schubert A, Feldmann U, Schindler A. (2010, a) Killing of adherant oral microbes by non-thermal atmospheric plasma jet. *J Med Microbiol.* 59: 206-212.
84. Rupf S, Idlibi N, Lehmann A, Rueppell A, Hannig M, Schindler A. (2010, b) Biofilm removal from titanium surfaces by non-thermal atmospheric plasma-jet. IADR/AADR 88th General Session Barcelona, Spain, *J Dent Res.* 89, Spec Iss B.
85. Rupf S, Lehmann A, al Muhammad M, Schäfer B, Hannig M, Schindler A. (2010, c) Morphological changes on human dentin caused by irradiation with a cold atmospheric plasma jet. 57th Annual ORCA Congress, *Caries Res.* 44: 235.
86. Rupf S, al-Muhammad M, Lehmann A, Rueppell A, Hannig M. (2011, a) Zum Einfluss kalten atmosphärischen Plasmas auf die Zahn-Komposit Interaktionszone. 43. Jahrestagung der AfG, Mainz, Januar, Vortrag.
87. Rupf S, al Muhammd M, Hannig M, Lehmann A, Rueppell A, Schindler A. (2011, b) In-vitro influence of non-thermal atmospheric plasma treatment on the tooth-composite-interface. IADR/AADR/CADR 89th General Session San Diego, Calif., *J Dent Res* 90, Spec Iss A.
88. Rupf S, Idlibi AN, Marrawi FA, Hannig M, Schubert A, von Mueller L, Spitzer W, Holtmann H, Lehmann A, Rueppell A, Schindler A. (2011, c) Removing biofilms from microstructured titanium ex vivo: a novel approach using atmospheric plasma technology. *PLoS One.* 6(10):e25893.
89. Sandig H, Pfister W, Liesegang K. (1988) Untersuchung zur mikrobiellen Zusammensetzung der Plaque in Abhängigkeit von abnehmbaren Teilprothesen. *Zahn- Mund- und Kieferheilkd.* 76: 717-720.
90. Schiffner U, (1999) Der Einfluss von Speichelproteinen auf die Demineralisation von Zahnschmelz. Hanser Fachbuch ISBN-10: 3446186042.
91. Schulze G. (2000) Untersuchungen zur Repräsentanz der RODAC-Abklatschtechnik, Vet-med. Diss, FU Berlin.

92. Schwarz F, Bieling K, Sculean A, Hertel M, Becker J, (2005) Therapie der Parodontitis und Periimplantitis mit dem Er:YAG-Laser, Deutsche Zahnärztl Z. 60:135-147.
93. Schwarz F, Ferrari D, Popovski K, Hartig B, Becker J. (2009) Influence of different air-abrasive powders on cell viability at biologically contaminated titanium dental implants surfaces. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 88: 83-91.
94. Sissons CH. Artificial dental plaque biofilm models. (1997) Adv Dent Res. 11: 110-126.
95. Sladek REJ, Stoffels E, Walraven R, Tielbeek PJA, Koolhoven RA. (2004) Plasma treatment of dental cavities: a feasibility study. IEEE Trans Plasma Sci. 32: 1540–1543.
96. Sladek RE, Filoche SK, Sissons CH, Stoffels E. (2007) Treatment of Streptococcus mutans biofilms with a nonthermal atmospheric plasma. Lett Appl Microbiol. 45: 318-323.
97. Stoffels E, Flikweert AJ, Stoffels WW, Kroesen GMW. (2002) Plasma needle: a non-destructive atmospheric plasma source for fine surface treatment of (bio)materials. Plasma Sources Sci Technol. 11: 383-388.
98. Sumiyama K, Kaise M, Kato M et al. (2006) New generation argon plasma coagulation in flexible endoscopy: ex vivo study and clinical experience. J Gastroenterol Hepatol. 21: 1122-1128.
99. Sun P, Wang R, Tong G, Zhang J, Fang J. (2009) Teeth whitening with dental gel assisted by an atmospheric pressure non-thermal plasma. Second International Conference on Plasma Medicine. San Antonio, Texas, USA.
100. Ueno T, Yamada M, Hori N, Suzuki T, Ogawa T. (2010) Effect of ultraviolet photoactivation of titanium on osseointegration in a rat model, Int J Oral Maxillofac Implants. 25: 287-294.

101. Vleugels M, Shama G, Deng XT, Greenacre E, Brocklehurst T, Kong MG. (2005) Atmospheric plasma inactivation of biofilm-forming bacteria for food safety control. *IEEE Trans Plasma Sci.* 33: 824–828.
102. Walraven R, Kieft IE, Stoffels E, Sladek REJ, Tielbeek PJA. (2002) Investigation of possibilities for plasma treatment of dental caries, P29, 5th Euregional Welt-PP, Workshop on the Exploration of Low Temperature Plasma Physics, November 28th and 29th , 2002, Rolduc, Kerkrade, The Netherlands.
103. Wimpenny JW. (1997) The validity of models. *Adv Dent Res.* 11: 150-159.
104. Winter T, Winter J, Polak M, Kusch K, Mäder U, Sietmann R, Ehlbeck J, van Hijum S, Weltmann KD, Hecker M, Kusch H. (2011) Characterization of the global impact of low temperature gas plasma on vegetative microorganisms. *Proteomics.* 11:3518-3530.
105. Yoshinari M, Wei J, Matsuzaka K, Inoue T. (2009) Effect of cold plasma-surface modification on surface wettability and initial cell attachment. *World Acad Sci Eng Technol.* 58:171-175.
106. Zenker M. (2008) Argon plasma coagulation. *GMS Krankenhaushyg Interdiszip.* 3(1).
107. Zhu S, Huang N, Xua L, Zhang Y, Liu H, Lei Y, Sun H, Yaoa Y. (2009) Biocompatibility of Fe–O films synthesized by plasma immersion ion implantation and deposition. *Surface and Coatings Technology.* 203: 1523–1529.
108. Zucker S, DiSanto TM, DesSoye B, Bagati A, Zirnheld J, Etemadi K. (2009) Utilization of plasma needle to selectively target melanoma cells. *Second International Conference on Plasma Medicine.* San Antonio, Texas, USA.

8 Publikationen / Danksagung

Ergebnisse der Studie wurden auf der 56. Jahrestagung der Europäischen Gesellschaft für Kariesforschung (ORCA) vom 1. – 4. Juli 2009 in Budapest präsentiert. Die Zusammenfassung ist in der Zeitschrift „Caries Research“ Nr. 43 im Jahre 2009 erschienen.

Abstract 58, Caries Res 2009;43:199

Treatment of ex vivo Biofilms by Non-Thermal Atmospheric Plasma Jet

D. Wind, S. Rupf, B. Schäfer, M. Hannig, A. Lehmann, T. Hofmann, A. Schindler

The aim of the investigation was to test the suitability of a nonthermal atmospheric plasma jet for the destruction of ex-vivo biofilms. 112 slices of bovine incisor enamel (5 x 5 x 2 mm) were exposed intraorally for 2 h to initiate biofilm formation. 4 groups of 28 specimens each were further incubated in a flow chamber (LB-medium, 20% sucrose, 20 ml/h) for 6 h, 2, 7 or 14 days. Half of the specimen surfaces were irradiated with the plasma-jet for 4 or 11 s, processing parameters: He process gas flow 3.5 slm, pulsed microwave excitation (2.45 GHz), 5 µs pulse width, 1.5, 2 and 3 W mean power, 2.5 mm distance, 32–38 ° C surface temperature of enamel at plasma-jet contact point. Positive controls were treated with chlorhexidine and negative controls with gas streams without plasma ignition. The vitality of the biofilms after plasma-jet treatment was assessed by comparison of treated and untreated areas using live/dead staining. Biofilm morphology was visualized by scanning electron microscopy (SEM) to assess the integrity of biofilm matrix and the appearance of bacteria. Early biofilms (6 h, 2 days) were completely destroyed by the plasma jet. Remnants of biofilm matrix and bacterial residues were visible by SEM. No vitality was detected by live/dead staining. Destruction of established biofilms (7, 14 days) was power-correlated. At mean power of 3 W, the biofilm matrix was strongly reduced, but not completely removed. The biofilm structure was loosened and remnants of biofilm appeared to come off the enamel surface. The vitality of the biofilm was lower than 10% compared to untreated control samples. In summary non-thermal atmospheric Plasmajet can effectively destroy biofilms on enamel surfaces at biologically acceptable temperatures.

Supported by the Federal Ministry of Education and Research, Germany (BMBF; FKZ 01 EZ 0730 and 01EZ 0731).

Danksagung

Herrn Privatdozent Dr. med. dent. Stefan Rupf danke ich für die Überlassung des interessanten Themas. Ich danke ihm für die sehr freundliche und konstruktive Unterstützung sowie dessen immer vorhandene Hilfsbereitschaft, tatkräftigen Beistand und die vielen anregenden Diskussionen, die diese Arbeit ermöglicht haben.

Desweiteren danke ich allen Mitarbeitern der Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Präventive Zahnheilkunde der Universitätsklinik des Saarlandes, insbesondere Herrn Professor Dr. med. dent. Matthias Hannig.

Besonders danken möchte ich Herrn Oberarzt Dr. med. dent. Fuad Al Marrawi für die stets freundliche Unterstützung am Rasterelektronenmikroskop sowie Frau W. Hoth-Hannig und Frau Dr. Umanskaya für die kompetente Betreuung im Forschungslabor der Zahnerhaltung.

Ebenso danke ich Muhammad al Muhammad und Ahmad Nour Idlibi für die Unterstützung bei der Datenakquise am Fluoreszenzmikroskop.

Ganz herzliche bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. Barbara Schäfer, die mir immer engagiert mit Rat und Tat zur Seite stand.

Ein besonderer Dank gilt PD Dr. Axel Schindler und Dipl.-Ing. Antje Lehmann vom Leibniz-Institut für Oberflächenmodifizierung e.V. in Leipzig sowie André Rueppell für die tatkräftige Unterstützung bei der Arbeit mit der Plasmaquelle.

Dank geht auch an Dr. Andreas Schubert vom Fraunhofer-Institut für Zelltherapie und Immunologie in Leipzig für die Nutzung der Einrichtung.

Weiterer Dank geht an PD Dr. med. Lutz von Müller und Martina Birke vom Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universitätsklinik des Saarlandes für die Überlassung der Ergebnisse der MALDI-TOF Analyse und für die Bereitstellung der RODAC-Platten.

Danken möchte ich auch PD Dr. F. Nothdurft, der mir freundlicherweise gestattet hat während meiner Kurszeiten an meiner Dissertation zu arbeiten.

Mein Studium und meine Promotion wären ohne die langjährige bedingungslose Unterstützung und Förderung durch meine lieben Eltern nicht möglich gewesen. Ihnen habe ich das Erreichte zu verdanken und somit widme ich ihnen diese vorliegende Arbeit.