

AUS DER POLIKLINIK
FÜR ZAHNÄRZTLICHE PROTHETIK
DIREKTOR: PROF. DR. G. HANDEL
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Methoden zur Quantifizierung von bakterieller Adhäsion
auf zahnärztlichen Materialien

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Sabine Kadlez

2019

AUS DER POLIKLINIK
FÜR ZAHNÄRZTLICHE PROTHETIK
DIREKTOR: PROF. DR. G. HANDEL
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Methoden zur Quantifizierung von bakterieller Adhäsion
auf zahnärztlichen Materialien

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Sabine Kadlez

2019

Dekan: Prof. Dr. Dirk Hellwig
1. Berichterstatter: Prof. Dr. Sebastian Hahnel
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Peter Proff
Tag der mündlichen Prüfung: 15. Juni 2020

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	3
2	LITERATURÜBERSICHT	4
2.1	DEFINITION UND EIGENSCHAFTEN DES PELLIKELS.....	4
2.2	DEFINITION UND EIGENSCHAFTEN DER DENTALEN PLAQUE.....	10
2.3	ORALE PLAQUEBILDUNG.....	12
2.4	MATERIALSPEZIFISCHE FAKTOREN DER BAKTERIELLEN ADHÄSION	19
2.4.1	<i>Oberflächenrauheit</i>	<i>19</i>
2.4.2	<i>Freie Oberflächenenergie (Surface Free Energy, SFE) und Hydrophobizität.....</i>	<i>23</i>
2.4.3	<i>Zeta-Potential (ζ-Potential).....</i>	<i>25</i>
2.5	BAKTERIELLE ADHÄSION AUF ZAHNÄRZTLICHEN RESTAURATIONSMATERIALIEN	26
2.6	UNTERSUCHUNGSMETHODEN.....	30
2.6.1	<i>Agarplatten.....</i>	<i>30</i>
2.6.2	<i>Fluoreszenznachweise</i>	<i>32</i>
2.6.3	<i>Rasterelektronenmikroskopie (REM)</i>	<i>39</i>
2.6.4	<i>Sessile-Drop-Methode (Hydrophobie)</i>	<i>41</i>
2.6.5	<i>Ermittlung der Oberflächenrauheit.....</i>	<i>43</i>
2.7	ZAHNÄRZTLICHE FÜLLUNGSMATERIALIEN	44
2.7.1	<i>Komposite.....</i>	<i>45</i>
2.7.2	<i>Glasionomerezemente</i>	<i>46</i>
2.7.3	<i>Kompomere</i>	<i>46</i>
2.8	STREPTOCOCCUS MUTANS.....	47
3	ZIEL DER UNTERSUCHUNG UND FRAGESTELLUNG.....	50
4	MATERIAL UND METHODE	51
4.1	VERSUCHSVORBEREITUNG	51
4.1.1	<i>Herstellung des Flüssigmediums.....</i>	<i>51</i>
4.1.2	<i>Herstellung der Agarplatten.....</i>	<i>51</i>
4.1.3	<i>Herstellung der Bakterienkultur.....</i>	<i>52</i>
4.1.4	<i>Mikroorganismen</i>	<i>52</i>
4.1.5	<i>Chemikalien und Lösungen</i>	<i>53</i>
4.1.6	<i>Geräte und technisches Material.....</i>	<i>53</i>
4.1.7	<i>Software.....</i>	<i>55</i>
4.2	PROBEKÖRPERHERSTELLUNG.....	55
4.3	RAUHEITSMESSUNG	58
4.4	HYDROPHOBIZITÄTSMESSUNG	58
4.5	BAKTERIELLE ADHÄSION.....	59
4.5.1	<i>Agarplatten.....</i>	<i>59</i>

4.5.2	<i>Fluorometrie</i>	61
4.5.3	<i>Rasterelektronenmikroskopie (REM)</i>	64
4.6	STATISTIK	66
5	ERGEBNISSE	67
5.1	RAUHEIT (ARITHMETISCHE MITTENRAUWERTE R_A)	67
5.2	HYDROPHOBIZITÄTEN (KONTAKTWINKEL)	69
5.3	BAKTERIENADHÄSIONSVERSUCHE	70
5.3.1	<i>Fluorometrie</i>	70
5.3.2	<i>Rasterelektronenmikroskopie</i>	73
5.3.3	<i>Agarplatten</i>	80
6	DISKUSSION	82
6.1	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	82
6.2	EIGNUNG DER METHODEN HINSICHTLICH DER MATERIALIEN	82
6.2.1	<i>Glas</i>	83
6.2.2	<i>Sinfony</i>	84
6.2.3	<i>Ketac Molar</i>	87
6.2.4	<i>GC Fuji II LC</i>	90
6.2.5	<i>Tetric EvoCeram</i>	91
6.2.6	<i>Filtek Supreme XT</i>	92
6.2.7	<i>Dyract eXtra</i>	92
6.3	DURCHFÜHRBARKEIT UND AUSSAGEKRAFT DER METHODEN	93
6.3.1	<i>Fluoreszenz</i>	93
6.3.2	<i>Rasterelektronenmikroskopie</i>	96
6.3.3	<i>Agarplatten</i>	99
7	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	102
8	LITERATURVERZEICHNIS	104

1 Einleitung

Karies ist eine der am weitesten verbreiteten Infektionserkrankungen weltweit. Sie entsteht, wenn Zahnoberflächen über einen längeren Zeitraum hinweg zuckerhaltiger Ernährung und kariogenen Bakterien ausgesetzt sind. Je nach Ausdehnung der Karies ist eine direkte Füllungstherapie oder die Anfertigung von indirektem Zahnersatz sinnvoll. Die Langzeitprognose von zahnärztlichen Füllungen und feststehendem Zahnersatz wird durch das Auftreten von Sekundärkaries limitiert. Daher sollten solche dentalen Materialien entwickelt werden, die eine möglichst geringe bakterielle Adhäsion auf ihrer Oberfläche aufweisen. Dazu sind mikrobiologische Untersuchungsmethoden notwendig, die reproduzierbare und sichere Ergebnisse generieren, die wiederum zu aussagekräftigen klinischen Schlussfolgerungen führen. Es sollen Rückschlüsse hinsichtlich des Adhäsionspotentials von Bakterien auf spezifischen Füllungsmaterialien gezogen werden, damit deren biologische Eigenschaften gegebenenfalls modifiziert werden können. Dies setzt ein detailliertes Verständnis der Adhäsionsprozesse und der Biofilmbildung voraus. Grundsätzlich stehen optische, chemische und physikalische Methoden zum direkten oder indirekten Nachweis von Biofilmen zur Verfügung. Sie unterscheiden sich hinsichtlich des logistischen, zeitlichen und finanziellen Aufwands. Auch scheint nicht jedes Verfahren für jedes Material gleich gut geeignet zu sein. Drei grundlegende klassische Versuchsaufbauten sollen im Folgenden auf ihre Vor- und Nachteile, ihre Effektivität und ihre klinische Durchführbarkeit untersucht werden.

2 Literaturübersicht

2.1 Definition und Eigenschaften des Pellikels

Die Schicht angelagerter azellulärer Partikel auf der Zahnoberfläche bezeichnet man als Zahnoberhäutchen, als *acquired enamel pellicle*, oder kurz als Pellikel (Hannig 2014, Siqueira 2012). Dieser komplexe, aber unorganisierte Film besteht aus Proteinen, Enzymen, Immunglobulinen und Lipiden des Speichels und der Sulkusflüssigkeit (Marsh 2016, Müller 2012, Hannig 2009, Vacca-Smith 2000, Hannig 1999). Das Pellikel vermittelt Wechselwirkungen zwischen den Zahnhartsubstanzen, oralen Flüssigkeiten und Mikroorganismen (Hannig 2009). In der Mundhöhle bildet es die Basis für die bakterielle Besiedlung aller Zahnhartsubstanzen, da die Eigenladung seiner Bestandteile eine elektrostatische Anziehung an Kalzium- und Phosphatgruppen des Hydroxylapatits der entsprechenden Substrate ermöglicht (Hannig 2009, Moreno 1984, Bennick 1979). Allerdings ist das Pellikel nicht zwingend für eine bakterielle Besiedlung notwendig, denn Bakterien adhärieren *in vitro* auch ohne Pellikel an die Zahnoberfläche (Hahnel 2010a, Hahnel 2009b, Montanaro 2004). Es ist zudem bekannt, dass bestimmte Speichelproteine auch einen hemmenden Einfluss auf die bakterielle Besiedlung besitzen (Hahnel 2014, Hannig 2009, Montanaro 2004). Die Adsorption von Proteinen an den Zahnschmelz erfolgt zum einen durch allgemein wirksame elektrostatische Wechselwirkungen und zum anderen durch entgegengesetzte Ladungen von Proteinbestandteilen des Pellikels und der Zahnoberflächen (Hannig 2006, Moreno 1982, Hay 1973). Die Pellikelbildung ist der erste Schritt der Plaquebildung *in vivo*. Schon wenige Sekunden nach der gründlichen mechanischen Reinigung der Zähne bildet sich auf der Zahnoberfläche das Pellikel aus (Marsh 2016, Hannig 2014, Vacca-Smith 2000, Hannig 1999). Dabei werden Speichelbestandteile auf die Zahnoberfläche adsorbiert (Marsh 2016, Hannig 2014, Hannig 2006,

Vacca-Smith 2000). In der wässrigen Elektrolytlösung des Speichels besitzen die Calciumionen des Zahnschmelzes eine höhere Tendenz in Lösung zu gehen als die Phosphationen. Daraus resultierend verleihen die zurückgebliebenen Phosphationen der Zahnoberfläche eine negative Ladung. Die positive Eigenladung spezifischer Speichelbestandteile ermöglicht eine elektrostatische Bindung an die entgegengesetzt geladene Zahnhartsubstanz (Hannig 2006). Beispielsweise lagern sich positiv geladene Calciumionen an und bilden eine Zwischenschicht. Die daraus resultierende Doppelschicht wird auch als Stern-Layer (siehe Abbildung 1) bezeichnet (Hannig 2009, Hannig 2006, Wilson 2001).

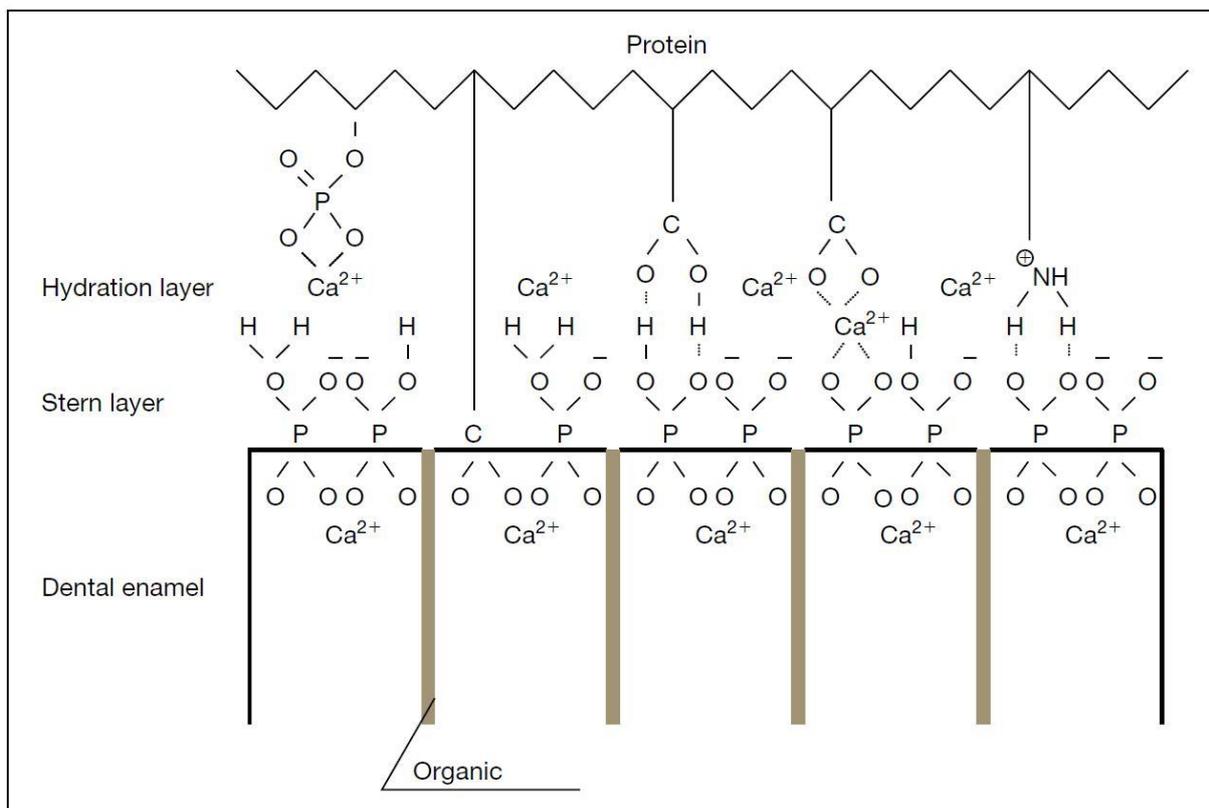


Abbildung 1. Die schematische Darstellung der Pellikelbildung zeigt die Adsorption von Speichelproteinen an den Zahnschmelz über elektrostatische Wechselwirkungen (Hannig 2006).

Zunächst lagern sich selektiv nur besonders affine Proteine aus dem Molekülgemisch des Speichels an, man spricht von den *pellicle precursor*

proteins (Siqueira 2012, Hannig 2009). So binden zunächst Phosphoproteine, die aufgrund ihrer Ladung eine hohe Affinität zum Zahnschmelz haben (Hannig 2006, Lindh 2002). Zu diesen spezifischen Proteinbestandteilen gehören dabei auch Statherin, Histatin und prolinreiche Proteine (PRPs) (Siqueira 2012, Hannig 2006, Hay 1973). Die Adhäsion der Proteine auf den Zahnschmelz führt zu einer Konformationsänderung selbiger und es werden vorher verborgene, prolinreiche Segmente (Kryptitope) zugänglich, die wiederum den Bakterien als Rezeptoren dienen (Marsh 2016, Hannig 2009, Elangovan 2007, Teughels 2006, Gray 2004). Dabei wenden sich hydrophile Ketten nach außen, was wiederum zu der Bildung eines hydrophoben Milieus (zur Substratoberfläche hin gerichtet) führt. Folglich wird Wasser aus dem Inneren verdrängt und eine Anhaftung begünstigt (Hannig 2009, Teughels 2006, Norde 1995). Bereits während der ersten drei Minuten können ebenfalls Muzine, Amylase, Cystatine, Lysozym, Carboanhydrasen, Laktoferrin und bakterielle Glycosyltransferasen nachgewiesen werden (Hannig 2007a). Auch treten in diesem Stadium schon vereinzelt Bakterien in den gebildeten Komplexen auf, da sie in der Mundhöhle ubiquitär sind. Aufgrund der fehlenden Struktur kann man allerdings noch nicht von einem Biofilm sprechen (Hannig 2007c). Die angelagerte Proteinschicht erreicht dabei eine Stärke von 10 bis 20 nm (Siqueira 2012, Hannig 2006, Teughels 2006, Vacca-Smith 2000, Hannig 1999). Die bereits von adhärennten Proteinen bedeckten Zahnschmelzareale werden in einer zweiten, langsamer ablaufenden Phase von weniger bindungsaffinen Proteinen bedeckt (Hannig 2006). Diese frei im Speichel verfügbaren Proteine binden an die bereits am Zahnschmelz adhärennten Proteine und bilden so eine Schicht, die innerhalb von 60 Minuten eine Stärke von 100 bis 1000 nm erreichen kann (García-Godoy 2008, Amaechi 1999, Hannig 1999, Hannig 1997). Da im Speichel Proteincluster vorliegen, die sich als Ganzes anlagern, wächst diese Schicht sehr schnell an (Siqueira 2012, Hannig 2009,

Hannig 2006). Auf transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen lassen sich die beiden Schichten gut differenzieren (siehe Abbildung 2): Eine basale, dem Schmelz direkt aufliegende, elektronendichte Schicht wird von einer äußeren globulären Schicht geringerer Elektronendichte überdeckt (Hannig 2007a).

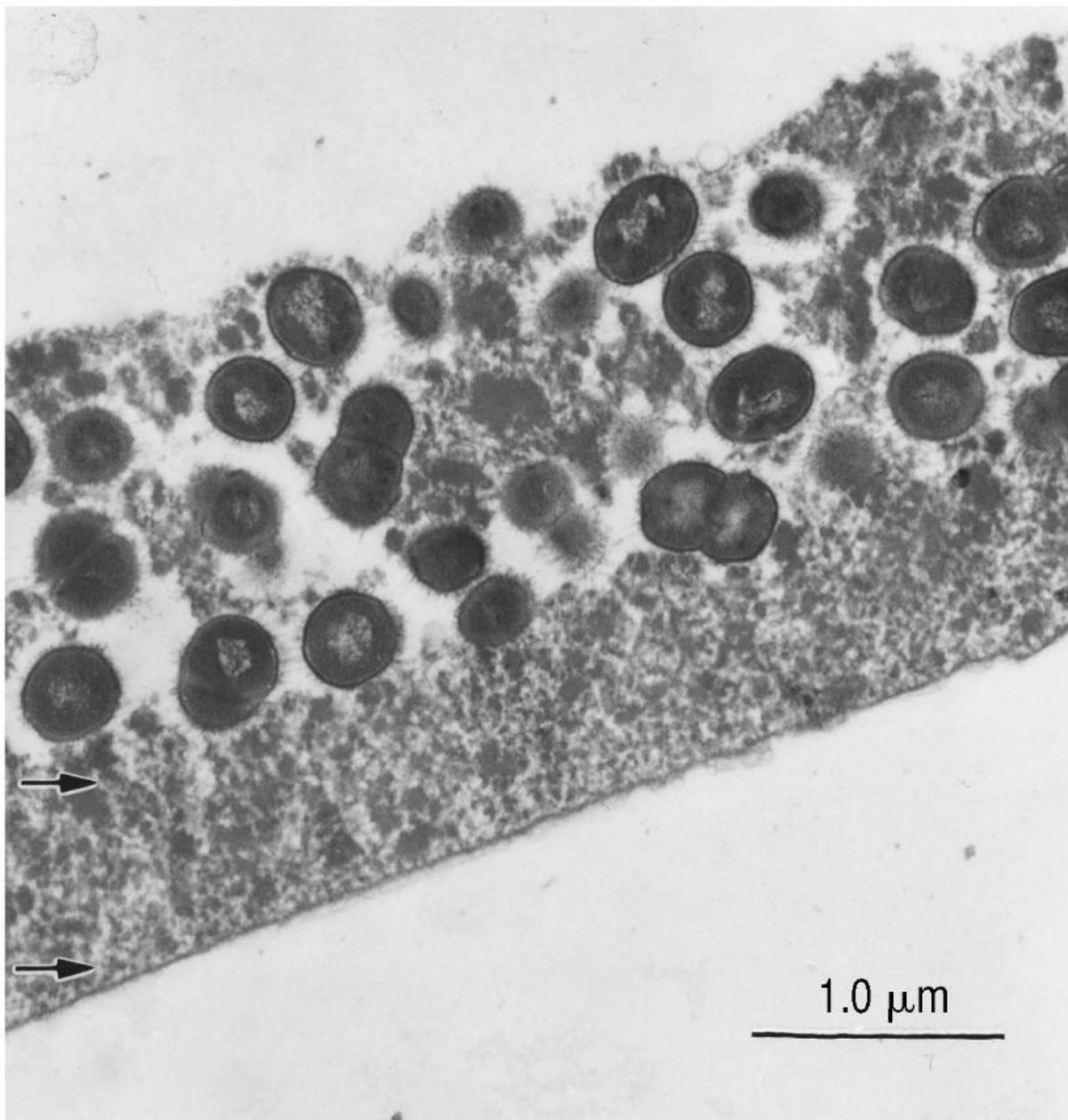


Abbildung 2. Aufnahme des Pellikels mit einem Transmissionselektronenmikroskop. Deutlich erkennbar ist eine basale elektronendichte Schicht mit einer bedeckenden globulären Schicht (Hannig 2007a).

Das Pellikel dient der Befeuchtung der Zahnoberfläche und wirkt durch seine Pufferwirkung der Demineralisierung entgegen (Hannig 2014, Siqueira 2012, Hannig 2009, García-Godoy 2008). Außerdem stellt es einen mechanischen Schutz vor Abrasion beim Kauakt dar (Hellwig 2009, Hannig 2007a, Hannig 2004). Es erleichtert zudem durch seine Schmierwirkung das Gleiten der Lippen über die Zahnoberfläche und damit die Artikulation. (Hannig 2007a, Hahn Berg 2003).

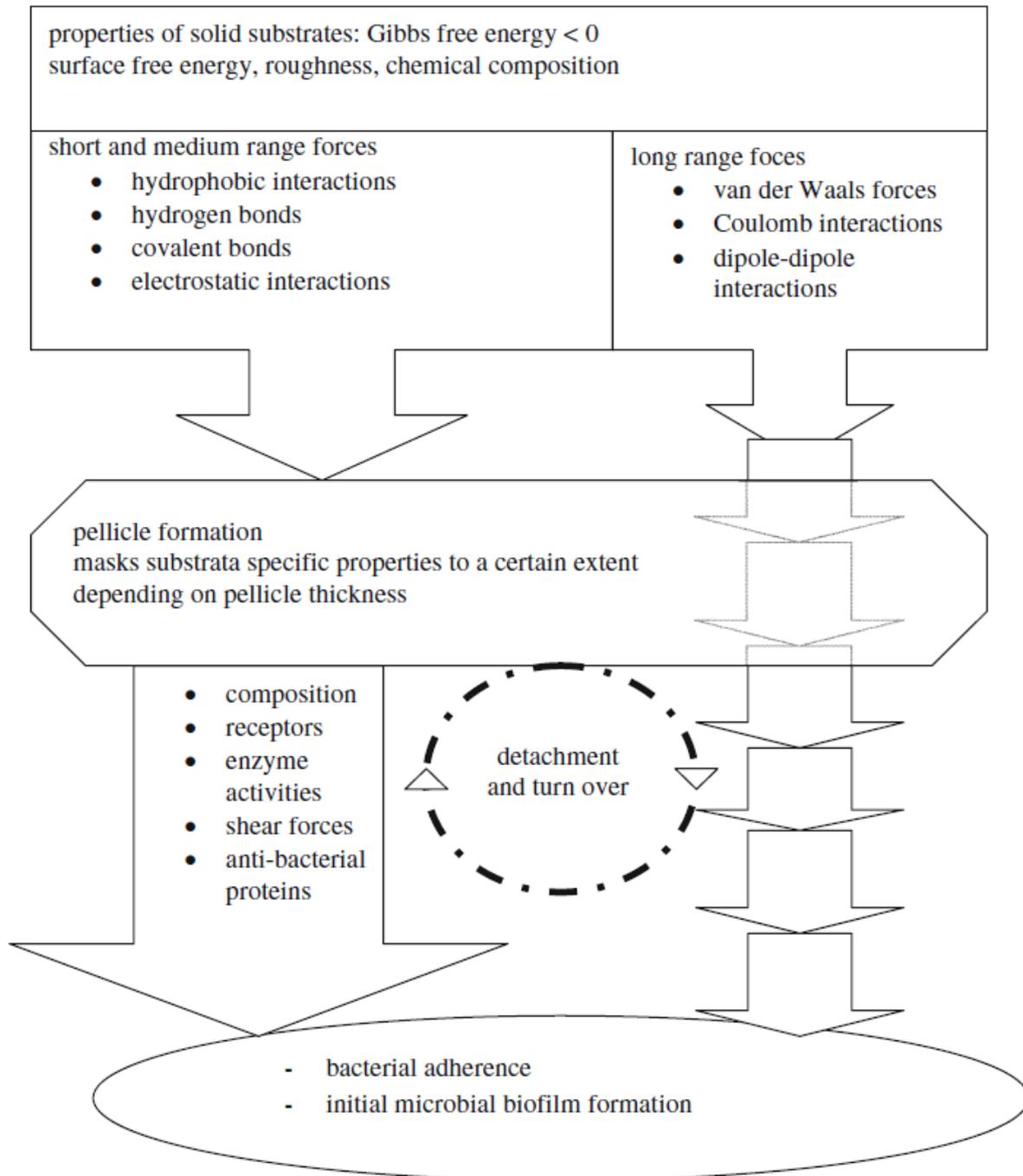


Abbildung 3. Interaktionen von Proteinen, Flüssigkeiten und Bakterien in der Mundhöhle. Substrat-spezifische Oberflächeneigenschaften werden bis zu einem gewissen Grad vom Pellicel maskiert, aber die Biofilmbildung wird durch long-range-Kräfte durch die Pellicelschicht hindurch beeinflusst (Hannig 2009).

Laut verschiedenen in-vivo-Studien reduziert das Pellicel die material-spezifische Oberflächenrauheit und die *surface free energy* (SFE), was wieder-

rum das Potential zur Adhäsion von Mikroorganismen reduziert (Rüttermann 2014, Ionescu 2012, Hahnel 2009, Hannig 2009, Teughels 2006, Quirynen 1995, Pratt-Terpstra 1989a). Allerdings kann das Pellikel die zwischen 50 nm und 100 nm wirksamen, materialspezifischen long-range-Kräfte (Van-der-Waals-Kräfte, Coulomb-Wechselwirkungen, Dipol-Dipol-Wechselwirkungen, siehe Abbildung 3) nicht unterdrücken, die für die bakterielle Adhäsion bedeutend sind (Huang 2011, Hannig 2009, Teughels 2006). Darüber hinaus bietet es Verankerungsmöglichkeiten für Mikroorganismen, die ohne Pellikel nicht so intensiv an der Zahnhartsubstanz adhäreren könnten (Palmer 2014, Busscher 2010, Hannig 2006). Auch SCHWEIKL *et al.* stellten fest, dass Speichelproteine zwar in der Lage sind, die Eigenschaften der Oberfläche zu maskieren, aber auch zusätzliche funktionelle Gruppen für die Anlagerung von Bakterien bereitstellen (Schweikl 2013). Weil long-range-Kräfte durch das Pellikel hindurch wirken, sind Materialien mit geringer Oberflächenenergie erstrebenswert, da sie die Bildung von Biofilm erschweren (Hannig 2009). Einige Autoren erwähnen, dass *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) als Bakterium mit hoher SFE bevorzugt an Materialien mit ebenfalls hoher SFE bindet (Mabboux 2004, Steinberg 2004, Ahn 2003). Daher sind die molekulare Zusammensetzung und die physiochemischen Eigenschaften des Pellikels von essentieller Bedeutung, weil sie über die vorhandenen Liganden das Muster der mikrobiellen Besiedlung beeinflussen (Marsh 2016).

2.2 Definition und Eigenschaften der dentalen Plaque

Biofilme im Allgemeinen sind oberflächengebundene, dreidimensionale, strukturierte, mikrobielle Gemeinschaften irreversibel adhärierter Zellen (Bakterien und/oder Pilze), die in einer selbst synthetisierten, extrazellulären Matrix aus Polysacchariden, DNA und anderen Komponenten eingebettet sind

(Wilking 2013, Xiao 2010, Hannig 2007c). Die Ausbildung eines Biofilms wird als Voraussetzung für das Überleben von individuellen Mikroorganismen in der Mundhöhle angesehen (Wright 2013, Jakubovics 2010). Den oralen Biofilm bezeichnet man auch als Plaque. Diese ist ein strukturierter, zäher, verfilzter Zahnbelag aus Speichelbestandteilen, bakteriellen Stoffwechselprodukten, Nahrungsresten und Bakterienzellen (Hellwig 2009, Klimek 1999). Plaque hat eine offene Architektur mit Kanälen und Hohlräumen, die der Struktur anderer Biofilme ähnlich ist (Marsh 2004). Die Adhäsion von Mikroorganismen und deren Organisation an das azelluläre Pellicel führt zur Ausbildung der dentalen Plaque (Cheaib 2015, Hannig 2006). Dieser Prozess beginnt schon wenige Minuten nach der Zahnreinigung (Cheaib 2015). Die Anlagerung an unbewegliche Oberflächen, wie beispielsweise Zähne, Füllungsmaterialien oder Prothesen, ist für planktonische Bakterien eine Möglichkeit, sich in der Mundhöhle langfristig zu etablieren, da sie sonst durch Muskelbewegungen und Speichelfluss einfach abgewischt und schließlich verschluckt würden (Palmer 2014, Kolenbrander 2010, Teughels 2006, Bradshaw 2001). Die Möglichkeit untereinander (Koadhäsion) und an Oberflächen zu adhären, ist für orale Bakterien deshalb eine essentielle Strategie zum Überleben in der Mundhöhle (Palmer 2014). Die Anlagerung von Bakterien an Oberflächen und die Bildung von Mikrokolonien in einer extrazellulären Matrix werden als kritischer Schritt für die Entstehung eines pathogenen Biofilms erachtet (Johnson 2008, Lawrence 2007). Dabei adhären sie zunächst besonders an Prädilektionsstellen wie Fissuren oder Füllungsrandern (Mei 2011, Müller 2007, Tanner 2003, Carlén 2001, Morgan 2001, Hannig 1999, Quirynen 1995). Auch die Reifung der Plaque schreitet an Prädilektionsstellen schneller voran, was auf einen schnelleren Übergang von der reversiblen zur irreversiblen Phase der Anlagerung schließen lässt (Teughels 2006, Quirynen 1995). Mikrobielle Anlagerungen in diesen Nischen sind für die mechanische Reinigung im Zuge

der Mundhygiene schlecht zugänglich und damit vor in der Mundhöhle auftretenden Scherkräften geschützt (Bürgers 2010, Teughels 2006). WHITEHEAD *et al.* stellten fest, dass Oberflächendefekte, die der Größe von Bakterien entsprechen, besonders stark besiedelt werden (Whitehead 2006). Die Selbstreinigungskräfte der Mundhöhle (Muskelbewegung, Speichelfluss) reichen nicht aus, um die Plaque vollständig zu entfernen (Hellwig 2009, Leid 2005). Der Biofilm ist nicht nur hinsichtlich der Substratbeschaffung für die einzelnen Bakterien von Vorteil, sondern stellt auch einen mechanischen Schutz vor Abscherkräften dar. Zudem ist ein organisierter komplexer Biofilm weitgehend resistent gegenüber lokal und systemisch applizierten Antibiotika (Krzyściak 2014, Palmer 2014, Bjarnsholt 2013) und schützt die Mikroorganismen gegen die Immunabwehr des Wirts (Marsh 2016, Leid 2005). Auch Umwelteinflüsse wie Schwankungen des pH-Werts, Sauerstoffangebot, Zugang zu Nährstoffen des Bolus und die antimikrobiellen Eigenschaften des Speichels werden durch die Organisation im Biofilm abgeschwächt (Marsh 2016, Jenkinson 2011, Xiao 2010). Die ausgereifte Plaque der humanen Mundhöhle enthält etwa 10^9 Bakterien pro g (Dewhirst 2010) und mehr als 700 verschiedene Arten (www.homd.org, Kolenbrander 2010). Die Besiedlung der Mundhöhle durch Mikroorganismen ist ein natürlicher Vorgang und bringt für den Wirt auch Vorteile mit sich, da viele Mikroorganismen schädliche Nahrungsbestandteile neutralisieren oder durch Nahrungskonkurrenz ein Etablieren schädlicher Mikroorganismen hemmen (Marsh 2016).

2.3 Orale Plaquebildung

Bereits nach etwa 4 h beginnen sich auf dem Pellikel erste Bakterien anzulagern. Zu diesen sogenannten Erstbesiedlern zählen vor allem gram-negative Kokken wie *Streptococcus sanguis* (*S. sanguis*), *Streptococcus mitis* (*S. mitis*),

Streptococcus oralis (*S. oralis*) und Aktinomycceten wie *Actinomyces viscosus*, *Granulicatella adiacens*, *Abiotrophia defectiva*, *Gemella spp.* und *Rothia* (Wang 2015, Jenkinson 2011, Diaz 2006, Li 2004, Whittaker 1996, Nyvad 1990). Erstbesiedler wie *Actinomyces spp.*, *S. oralis*, *S. mitis* oder *Streptococcus gordonii* (*S. gordonii*) schaffen ideale Adhäsionsbedingungen für Sekundärbesiedler wie beispielsweise *Fusobacterium nucleatum*, *Veillonella spp.* sowie *S. mutans* (Cheaib 2015). Erstbesiedler gehören zu der physiologischen Mundflora und sind meist wenig pathogen (Aas 2005). Allerdings können Streptokokken die pathogenen Eigenschaften (beispielsweise Antibiotikaresistenzen und Säureresistenz) anderer Bakterien durch horizontalen Gentransfer und *cell signaling* erhöhen (Marsh 2016, Cornejo 2013, Whitmore 2011, Kolenbrander 2010). Die Bakterien werden überwiegend passiv zu den Substraten transportiert. Dies geschieht durch konvektiven Massentransport im Speichel, durch die Brownsche Molekularbewegung oder durch Sedimentation (Palmer 2007, Teughels 2006). Durch die Brownsche Molekularbewegung wird ein Bakterium bis zu 40 µm/h fortbewegt (Martienssen 2001, Bos 1999, An 1998, Quirynen 1995). Befindet sich ein Bakterium nahe genug an der Oberfläche, so beginnt die initiale Anlagerung (Palmer 2007). In dieser Phase treten nur schwache Bindungskräfte auf, d.h. Van-der-Waals-Kräfte, elektrostatische Kräfte und hydrophobe Wechselwirkungen. Die Anlagerung ist reversibel, daher kann das Bakterium leicht - etwa durch Abspülen - entfernt werden (Wright 2013, Palmer 2007). Auch beim Übergang von der reversiblen zur irreversiblen Phase sind die verschiedenen short-range-Kräfte, wie kovalente Bindung, Wasserstoffbrückenbindung und hydrophobe Wechselwirkungen (siehe Abbildung 4), beteiligt (Palmer 2007). Erst durch die Rezeptorbindungen treten höhere Bindungskräfte auf, wodurch die Bindung irreversibel wird (Wright 2013).

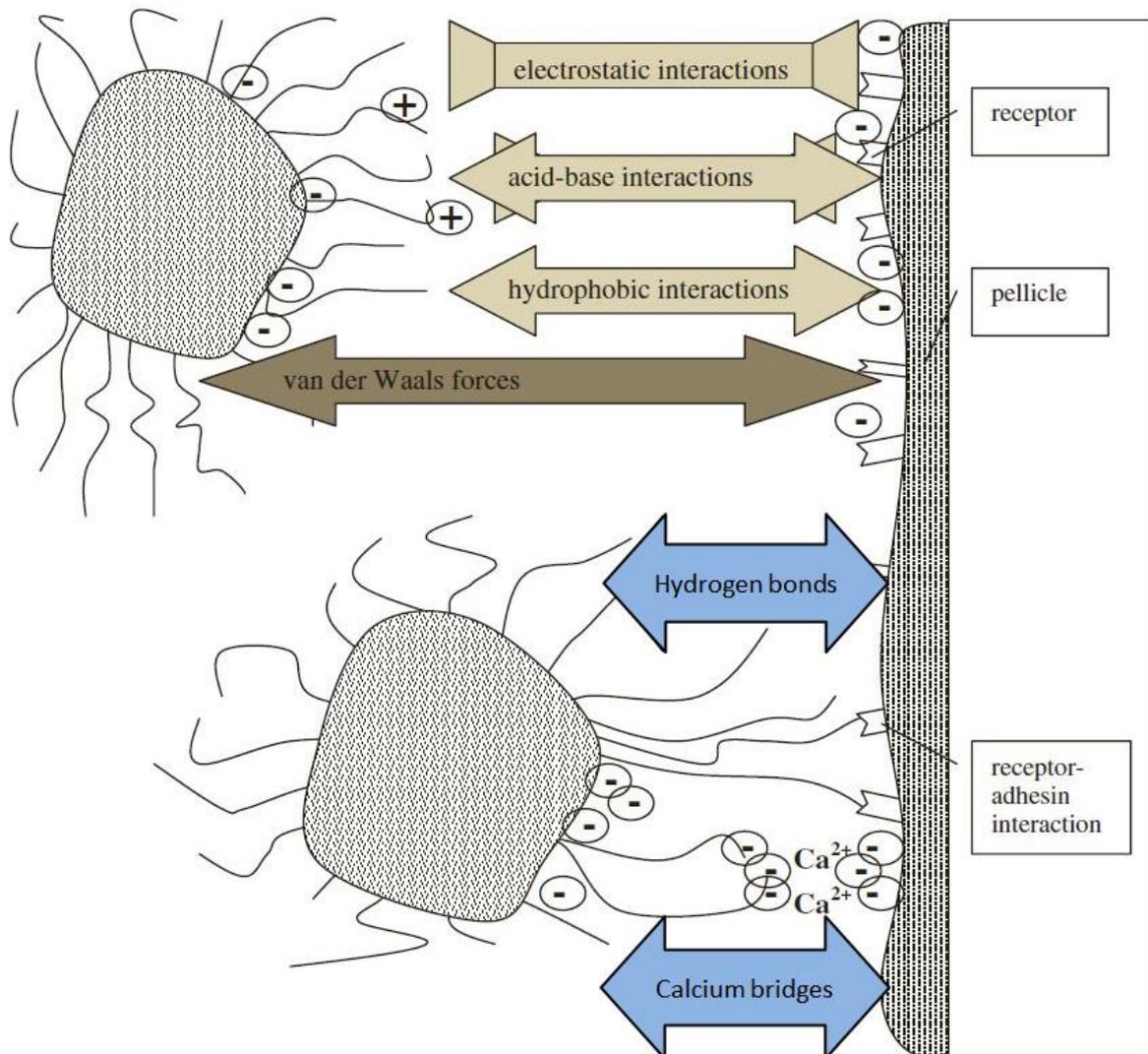


Abbildung 4. Schematische Darstellung der bei der bakteriellen Adhäsion auf einer pellicelbeschichteten Oberfläche wirkenden Kräfte (Hannig 2009, modifiziert).

Die nach den Autoren Boris Derjagin, Lew Landau, Evert Verweij und Theodoor Overbeek benannte DLVO-Theorie wurde von mehreren Autorengruppen herangezogen, um diese komplexen Vorgänge zu erklären (Palmer 2007, Teughels 2006, Vogler 1999). Sie beschreibt die anziehenden und abstoßenden Kräfte, die bei einem Adhäsionsvorgang auftreten. Im Prinzip wird mittels der DLVO-Theorie die Wechselwirkung eines kolleidalen Partikels bei der Annäherung an eine Oberfläche als Änderung der freien Enthalpie (Gibbs'sche Energie) in Abhängigkeit vom Abstand der beiden Oberflächen

zueinander beschrieben (Martienssen 2001). Die Adhäsion von Partikeln wird danach durch die Summe der Lifshitz-van-der-Waals-Kräfte, der elektrostatischen Wechselwirkungen – die je nach Oberflächenladung anziehend oder abstoßend sein können – sowie durch Säure-Base-Interaktionen und ionische Wechselwirkungen gesteuert (Busscher 2010, Hannig 2009, Palmer 2007). Diese Kräfte können zu einer distanzabhängigen Interaktionsenergie (siehe Abbildung 4) kombiniert werden (Busscher 2010). Ist diese Interaktionsenergie negativ, so ist eine Adhäsion begünstigt (Busscher 2010, Teughels 2006). Bakterien müssen für eine Anlagerung die Gibbs'sche Energiebarriere überwinden, wozu in manchen Fällen bereits der konvektive Massentransport durch den Speichel ausreichend sein kann (Palmer 2007). Durch die Produktion von extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) und/oder spezifischen Liganden sind Bakterien in der Lage, sich aktiv und irreversibel an der Oberfläche anzulagern. Dieser Vorgang ist innerhalb von Sekunden bis zu wenigen Minuten abgeschlossen (Mei 2011). Am Ende dieses Prozesses ist eine Entfernung der Bakterien nur noch durch stärkere physikalische oder chemische Kräfte wie Abkratzen, Abreiben oder durch chemische Reiniger möglich, da hohe Bindungskräfte auftreten (Marsh 2016, Palmer 2007, Hannig 2009). Die molekularen Rezeptoren der Bakterien werden Adhäsine, die der Oberflächen Liganden genannt. Adhäsine befinden sich oft an exponierten Orten wie auf Fimbrien oder Pili, die meist unpolare, hydrophobe Aminosäureseitenketten aufweisen (Marsh 2016, Hannig 2009, Palmer 2007, Bos 1999, Hultgren 1993). Ein Rezeptortyp, also ein bestimmtes Adhäsins, ist jeweils komplementär zum Ligand (Schlüssel-Schloss-Prinzip). Diese Art der Adhäsion existiert sowohl für die Bindung des Bakteriums zur Oberfläche als auch für die Bindung zwischen Bakterien untereinander, der so genannten Koadhäsion (Nobbs 2009). Einige Bakterienstämme bilden besonders potente Adhäsine. Sie adhärieren sehr früh an saure, prolinreiche Speichelproteine des Pellikels und werden deshalb

Primärbesiedler genannt (Jenkinson 2011, Nyvad 1990). So können Erstbesiedler mit höheren Kräften spezifisch an den Zahn binden, während Sekundärbesiedler eher auf Vernetzung mit anderen Bakterien ausgerichtet sind (Wang 2015). WANG *et al.* stellten auch fest, dass die Adhäsionskräfte an Kunststoffe von Primärbesiedlern (*S. oralis*, *S. sanguinis* und *S. mitis*) signifikant höher waren als die von Sekundärbesiedlern (*S. mutans* und *S. sobrinus*) (Wang 2015). Teilweise müssen die Liganden erst durch enzymatische Aktivität modifiziert werden, bevor ein Bakterium binden kann. In diesem Fall spricht man von Kryptitopen (Marsh 2016, Palmer 2014, Elangovan 2007, Gibbons 1989). In dieser irreversiblen Phase treten ionische Bindungen, Säure-Base-Bindungen und kovalente Bindungen auf (Palmer 2007). Nachdem sich die Primärbesiedler auf der Zahnoberfläche etabliert haben, beginnen sie sich miteinander zu vernetzen. Man spricht bei diesem Vorgang von Koadhäsion (Marsh 2004, Bos 1999). Streptokokken exprimieren vielfältige Adhäsine, die eine starke Vernetzung zwischen Wirt und anderen Bakterien ermöglichen (Okahashi 2010, Nobbs 2009, Marsh 2004). Beispielsweise bildet der in dieser Arbeit verwendete *S. mutans* das AgI/II-Antikörper-Protein aus, welches die Adhäsion an das Pellikel und auch die Koaggregation mit anderen Organismen ermöglicht (Brady 2010, Valm 2010, Nobbs 2009). An dieser zunehmend komplexer werdenden Struktur beteiligen sich auch andere Bakterienarten, die die Struktur der Erstbesiedler stabilisieren (Valm 2010, Nobbs 2009). Dabei kommt es zu einer intergenerischen Koaggregation zwischen den unterschiedlichen Bakterienstämmen, die in einem fast symbiontischen Verhältnis leben. Laut KOLENBRANDER *et al.* hatten alle der ungefähr 1000 untersuchten Bakterienstämme in der Mundhöhle mindestens einen Koaggregationspartner (Kolenbrander 2010). So sezerniert *Porphyromonas gingivalis* Isobuttersäure und eine bestimmte Protease, die das Wachstum von *Treponema denticola*

stimuliert. Im Gegenzug sezerniert *T. denticola* Bernsteinsäure, die das Wachstum von *P. gingivalis* fördert (Cogoni 2012, Grenier 1992). *Fusobakterium nucleatum* setzt die Sauerstoffkonzentration seiner Umgebung herab und ermöglicht so sauerstoffsensitiven Organismen wie z.B. *P. gingivalis* oder rein anaeroben Spezies das Überleben in der Mundhöhle (Diaz 2002, Kolenbrander 1995). Dieser Mikroorganismus ist auch in der Lage, durch Ammoniumfreisetzung den pH-Wert zu regulieren und schafft somit ein erträgliches Milieu für säureempfindliche Bakterien (Takahashi 2003). Die Interaktion zwischen den Primär- und Sekundärbesiedlern führt zu einem zunehmend pathogenen Charakter des Biofilms (Whitmore 2011, Kuboniwa 2010). Zudem bieten diese Bakterien Rezeptoren für weitere, pathogenere Mikroorganismen wie z.B. *Fusobakterium nucleatum*, *Treponema denticola* und *Tannerella forsythia* (He 2012, Periasamy 2010). An Oberflächen adhärente Bakterien innerhalb eines Biofilms sind von einer extrazellulären Matrix umgeben (Asahi 2015, Xiao 2012, Costerton 1999). Diese Matrix wird von den Bakterien selbst sezerniert, umschließt sie, erleichtert die Erstellung einer multizellulären Struktur, die fest mit der Zahnoberfläche verbunden ist, und bietet sowohl mechanischen Schutz als auch Schutz gegen antimikrobielle Einflüsse (Xiao 2012, Kreth 2008). Die Zusammensetzung der Matrix kann je nach beteiligten Bakterien unterschiedlich sein, ist von Umwelteinflüssen abhängig und kann sich über die Zeit verändern (Xiao 2012). Als Bestandteile dieser Matrix wurden von Bakterien gebildete extrazelluläre polymere Substanzen (EPS), Proteine, Lipide, Nukleinsäuren, Lipoteichonsäure und Lipopolysaccharide festgestellt (Xiao 2012). Bei fortlaufender Bildung der langkettigen EPS-Moleküle verbinden sich inselartige Bakterienkolonien zu einer dreidimensionalen komplexen Struktur innerhalb des intakten Biofilms (Xiao 2012, Bowen 2011). Der Schutz durch die EPS-reiche Matrix ermöglicht es *S. mutans* durch die Metabolisierung von Zuckern klebrige Polymere

(Glucane) zu produzieren, welche die Neutralisierung von Säuren hemmen und so die Bildung von geschützten inselartigen Kolonien säureresistenter Bakterien auf der Zahnoberfläche begünstigen. Die Abschottung vor basischem und mineralhaltigem Speichel erklärt, warum keine Neutralisation der Säuren durch diesen stattfindet, was zu einer Demineralisierung des Zahnschmelzes führt (Xiao 2012). Die Bildung der EPS ist stark von den Kohlenhydraten abhängig, die zur Metabolisierung zur Verfügung stehen (Xiao 2012, Xiao 2010). XIAO *et al.* verglichen in einer Studie die Bildung von EPS bei unterschiedlichem Substratangebot, nämlich Glukose, Glukose mit Stärke, Saccharose und Saccharose mit Stärke. Dabei stellten sie fest, dass bei einem Angebot von Saccharose und Stärke deutlich mehr EPS-Masse gebildet wurde als vergleichsweise bei Saccharose als alleiniges Substrat (Xiao 2010). Bei Glukose wurde kein EPS gebildet, unabhängig von der Verfügbarkeit von Stärke (Xiao 2010).

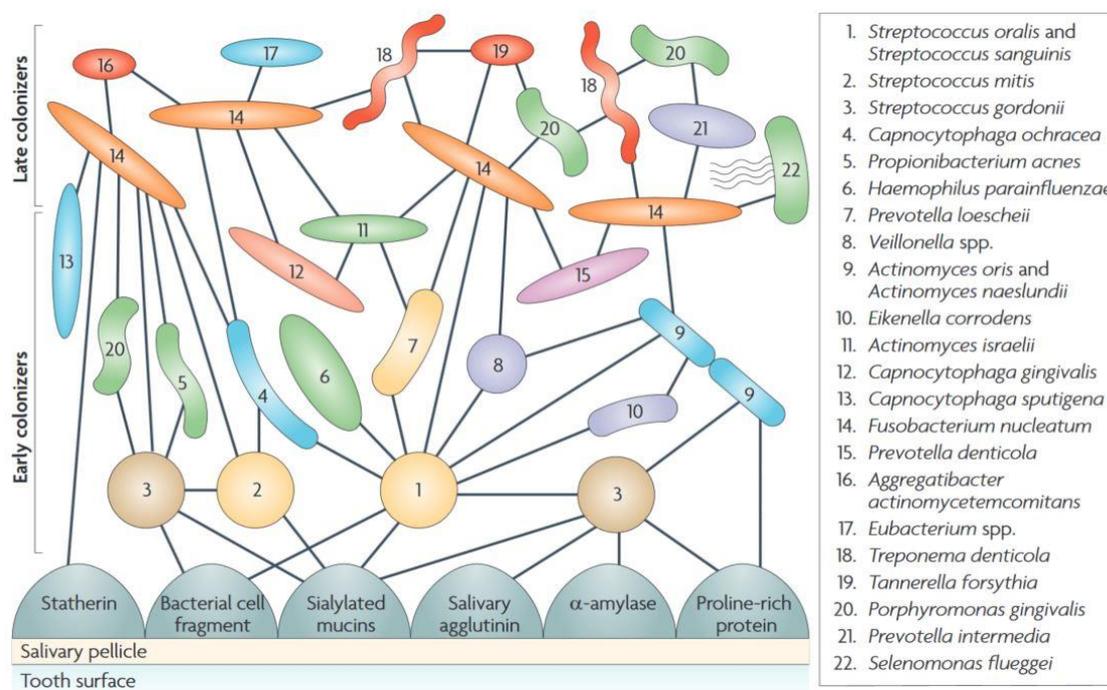


Abbildung 5. Beispiel einer ausgereiften Plaque (Kolenbrander 2010).

Die hohe Proliferationsrate der Bakterien ist bei einer Generationsdauer von 0,7 h bis 2,4 h Hauptursache für die rasante Zunahme der Bakterienanzahl in den ersten 24 h (Müller 2007). Mit zunehmendem Alter und Diversität der Plaque (siehe Abbildung 5) nimmt der verhältnismäßige Anteil von Streptokokken zugunsten fakultativ oder obligat anaerober Aktinomyzeten ab (Hannig 2006). Auch siedeln in tieferen Plaqueschichten vor allem Spirochäten und gram-negative Bakterien, in den oberen Bereichen eher gram-positive Kokken (Marsh 2004). Nach etwa einer Woche ungestörten Wachstums können in der supragingivalen Plaque Spirochäten sowie bewegliche Stäbchen nachgewiesen werden (Müller 2012).

2.4 Materialspezifische Faktoren der bakteriellen Adhäsion

Adhäsion wird nicht nur von den an der Biofilmbildung beteiligten Mikroorganismen und den Eigenschaften des Pellikels gesteuert, sondern auch von den Materialeigenschaften der Oberfläche beeinflusst. In der Literatur werden vor allem die in den folgenden Abschnitten beschriebenen Parameter behandelt:

2.4.1 Oberflächenrauheit

Die Rauheit einer Oberfläche in der Mundhöhle hat signifikanten Einfluss auf Quantität und Qualität der mikrobiellen Besiedlung (Hahnel 2010a, Hannig 2009, Teughels 2006, An 1998). Um den Zusammenhang zwischen der Besiedlung durch Mikroorganismen und der Beschaffenheit einer Oberfläche untersuchen zu können, ist es notwendig, die Messung und Größe der Rauheit einheitlich und nachvollziehbar zu definieren. Als Standardkenngröße für die Rauheit einer Oberfläche wird der arithmetische Mittenrauwert R_a in den meisten entsprechenden Studien verwendet (Giannini 2014, Rüttermann 2014,

Mei 2011, An 1998). Der Parameter entsteht aus einer zweidimensionalen Messung und wird in Mikrometer ($1 \mu\text{m} = 10^{-6} \text{ m}$) angegeben. Für das auf einer definierten Strecke abgetastete Profil ergeben sich unterschiedliche Messwerte für die Distanz zur Oberfläche an den einzelnen Messpunkten. Für dieses Profil wird eine Mittellinie (*mean line*) konstruiert (Volk 2013, Watanabe 2005). Da die Mittellinie den aus den einzelnen Profilerhebungen gebildeten Graphen schneidet, ergeben sich Flächen aus Graph und Mittellinie, die oberhalb und unterhalb der Mittellinie liegen. Die Mittellinie wird dabei so gewählt, dass die Summe aus den Flächeninhalten oberhalb und unterhalb der Mittellinie gleich ist. Da die Mittellinie aus Gründen der Übersicht auf die X-Achse bezogen wird, ergibt sich so eine Summe der Flächen oberhalb und unterhalb der Mittellinie von 0 (siehe Abbildung 6).

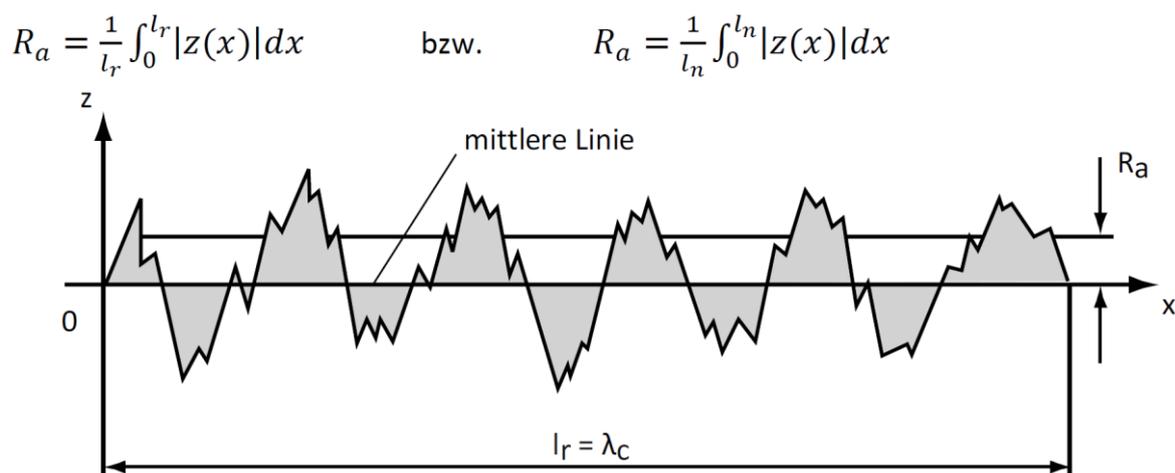


Abbildung 6. Ermittlung der Gesamtrauheit R_a , definiert als das arithmetische Mittel aller absoluten Distanzen des Rauheitsprofils von der Mittellinie innerhalb der Messdistanz (Volk 2013).

R_a beschreibt die Gesamtrauheit einer definierten Oberfläche und ist das arithmetische Mittel aller absoluten Distanzen des Rauheitsprofils von der Mittellinie innerhalb der Messdistanz (Watanabe 2005, Whitehead 1995). Für die Beschreibung der Rauheit können auch noch diverse andere Werte bestimmt werden. Der quadratische Mittenrauwert R_q ist der quadratische Mittelwert der

Profilabweichung. R_q ist damit ähnlich definiert wie R_a , reagiert aber empfindlicher auf einzelne Spitzen und Täler (Volk 2013). Die gemittelte Rautiefe R_z ist die Summe aus der Höhe der größten Profilspitze und der Tiefe des größten Profiltals innerhalb einer Einzelmessstrecke. Üblicherweise ergibt sich R_z aus Mittelung der Ergebnisse von fünf Einzelmessstrecken. Insgesamt reagiert R_z empfindlicher auf die Veränderung von Oberflächenstrukturen als R_a (Volk 2013, Whitehead 1995). R_{pm} ist die Höhe der größten Profilspitze des Rauheitsprofils innerhalb der Messstrecke. Ähnlich wie für den Parameter R_z wird die Messstrecke in fünf gleich lange Abschnitte eingeteilt, gemessen wird aber jeweils der Höhenunterschied der Profilspitzen innerhalb dieser Abschnitte zur Mittellinie. Das arithmetische Mittel dieser fünf Werte ergibt den Parameter R_{pm} (Whitehead 1995). Dieser Parameter wird auch als mittlere Glättungstiefe R_p bezeichnet (Volk 2013). Alle genannten Rauheitswerte sind für spezifische Fragestellungen unterschiedlich gut geeignet, der R_a -Wert ist allerdings in Studien zur bakteriellen Adhäsion als Kennwert etabliert. In-vivo-Untersuchungen haben gezeigt, dass die initiale mikrobielle Besiedlung der Zahnhartsubstanzen an Unregelmäßigkeiten auf der Oberfläche, wie zum Beispiel in Schmelzgrübchen, Perikymatien oder Mikrorissen im Schmelz, beginnt und sich von dort aus ausbreitet (Hannig 2009, Teughels 2006, Hannig 1999). Die Oberflächenrauheit scheint im Vergleich zu anderen physiochemischen Oberflächenparametern den stärksten Einfluss auf die Protein- und Bakterienadhäsion zu haben (Hannig 2009, Quirynen 1995, Siegrist 1991). Für *S. mutans* konnte ein positiver Zusammenhang zwischen der Rauheit der Oberflächen und der Besiedlungsdichte bereits mehrfach nachgewiesen werden (Fahmy 2012, Mei 2011, Aykent 2010). AYKENT *et al.* stellten in einer in-vitro-Studie einen signifikanten Zusammenhang von Oberflächenrauheit verschiedener Komposite und Keramiken, die mit verschiedenen Verfahren poliert wurden, und der Adhäsion von *S. mutans* fest.

Die untersuchten Materialien unterschieden sich hinsichtlich der Adhäsionstendenz. Je glatter die Oberfläche, desto geringer war die Anhaftung der Bakterien (Aykent 2010). Außerdem zeigte sich, dass die chemische Zusammensetzung (Füllkörpergröße, Matrixmonomer) der Materialien die Besiedelung beeinflusst (Aykent 2010). IONESCU untersuchte konkret den Einfluss von Matrix und Füllern auf die Biofilmbildung. Dabei wurden Kompomere mit unterschiedlicher Füllkörpergröße und Matrixzusammensetzung angefertigt und auf ihre Adhäsionstendenz hin untersucht. Es wurden zwei Versuchsreihen durchgeführt. In der ersten Versuchsreihe wurde nur *S. mutans* inkubiert (Mono-Spezies-Ansatz). In der zweiten Versuchsreihe wurde über menschlichen Speichel inkubiert, wodurch ein Multi-Spezies-Biofilm entstand. Im Mono-Spezies-Ansatz wurde festgestellt, dass der Einfluss der Füllkörper auf die Adhäsion wesentlich größer war als der Einfluss der Matrixzusammensetzung. Im Multi-Spezies-Ansatz konnte dagegen ein signifikanter Einfluss der Matrixzusammensetzung festgestellt werden, der wesentlich größer war als der Einfluss der Füllkörper. IONESCU merkt an, dass der Mono-Spezies-Ansatz ein zu vereinfachtes Modell für den komplexen Vorgang der Biofilmbildung darstellt, und somit der Multi-Spezies-Ansatz die Vorgänge *in vivo* präziser abbildet. Er schlussfolgert, dass in zukünftigen Studien die Matrixzusammensetzung genauer untersucht werden sollte, da durch deren Veränderung die Entstehung des Biofilms entscheidend beeinflusst werden kann (Ionescu 2015). NEDELJKOVIC untersucht den Einfluss von Single- und Multi-Spezies-Biofilmen auf die Oberflächenrauheit und -topografie. Dabei zeigte sich, dass *S. mutans* in der Lage ist, durch Esterasen Bis-GMA aus der Monomermatrix von Kunststoffen zu lösen. Damit wird die Topografie verändert und die Rauheit signifikant erhöht. Bei einem Multi-Spezies-Biofilm konnte diese Veränderung jedoch nicht beobachtet werden. Die Autorin führt dies darauf zurück, dass der Einfluss von *S. mutans* durch die anderen Bakterien abgeschwächt wird

(Nedeljkovic 2017). Auch HAHNEL stellte einen Einfluss der Matrixzusammensetzung in der frühen Phase der Biofilmbildung fest (Hahnel 2008a). Der in der Literatur allgemein akzeptierte Grenzwert für den Einfluss der Rauheit auf die Adhäsion von Bakterien liegt bei $0,2\ \mu\text{m}$ (Ionescu 2017, Cazzinga 2015). Unterhalb dieses Schwellenwertes besteht kein Einfluss mehr auf die Biofilmbildung (Ionescu 2015, Mei 2011, Bürgers 2009a, Bollen 1997). RIMONDINI merkt an, dass Oberflächen für zahnärztliche Materialien so glatt wie möglich sein sollten und schlägt vor eine Rauheit von weniger als $0,088\ \mu\text{m}$ anzustreben. In ihrer Untersuchung von Titanprobekörpern konnte sie an korrekt bis auf diesen Wert polierten Stellen in SEM-Aufnahmen keine bakterielle Adhäsion feststellen. Allerdings zeigte sich bei der statistischen Auswertung eines zusätzlich durchgeführten MTT-Assay kein signifikanter Unterschied zu Probekörpern, die bis auf $0,2\ \mu\text{m}$ poliert worden waren (Rimondini 1997). Neuere Studien deuten jedoch darauf hin, dass die Oberflächentopographie eine bedeutende Rolle bei der Adhäsion spielt (siehe Kapitel 2.5). IONESCU vermutete, dass bei gleichen gemessenen Werten von Rauheit und SFE die unterschiedliche Biofilmbildung durch die unterschiedliche Topographie der Probekörper erklärt werden kann (Ionescu 2015).

2.4.2 Freie Oberflächenenergie (Surface Free Energy, SFE) und Hydrophobizität

Damit ein Bakterium nahe genug an die zu besiedelnde Oberfläche gelangen kann, muss der Flüssigkeitsfilm zwischen ihm und dem Pellicel verdrängt werden (Mei 2011, Teughels 2006). Einflussfaktoren sind hierbei die hydrophoben Oberflächenbestandteile von Bakterien, der Pelliceloberfläche und des Substrats (Mei 2011). So besteht ein direkter Zusammenhang zwischen dem Grad der Hydrophobizität einer Oberfläche und dem Ausmaß der bakteriellen

Anlagerung an diese (Mei 2011, Marsh 1999). In der initialen Phase der bakteriellen Adhäsion spielt die freie Oberflächenenergie eine bedeutende Rolle (Ionescu 2015). Sie ist das Maß für diejenige Energie, die zum Aufbrechen der chemischen Bindungen notwendig ist, wenn eine neue Oberfläche eines Festkörpers oder einer Flüssigkeit erzeugt wird (Meschede 2015). Das heißt, um eine neue Bindung zwischen zwei Molekülen zu knüpfen, muss erst Energie aufgebracht werden um die bisher bestehenden intermolekularen Bindungen zu brechen (Hannig 2009). Dies geschieht umso leichter, je reaktiver die Atomgruppen auf den Oberflächen sind, d.h. je höher die Oberflächenenergie der beiden Moleküle ist, da stets ein Zustand geringer Energie angestrebt wird (Hannig 2009, Teughels 2006). Im Umkehrschluss kann die Oberflächenenergie auch als Maß für die Reaktivität der oberflächennahen Moleküle angesehen werden, da ausschließlich diese für die Wechselwirkungen zwischen zwei Oberflächen relevant sind. Eine Oberfläche mit zahlreichen Carbonyl- sowie Carboxylgruppen ist aufgrund deren hoher Polarität und Hydrophilie äußerst reaktionsfreudig und hat daher auch eine hohe Oberflächenenergie. Besitzt ein Material hingegen viele schwach geladene Molekülreste wie zum Beispiel langkettige Kohlenwasserstoffe, weist es aufgrund seiner geringen Hydrophilie auch eine geringe Oberflächenenergie auf (Atkins 2013, Hannig 2009). RÖLLA *et al.* brachten in einer Studie Silikonöl auf Zahnschmelz auf und senkten so die SFE, woraufhin eine deutlich geringere Plaqueakkumulation beobachtet wurde (Röllä 1991). Es wurde festgestellt, dass Bakterien und Proteine mit geringer Oberflächenenergie bevorzugt an niedrigenergetische Materialien, Bakterien und Proteine mit hoher Oberflächenenergie vor allem an geladenen Oberflächen haften (Hahnel 2009b, Hannig 2009, Quiryne 1995). Für die bakterielle Besiedlung der Mundhöhle bedeutet das: Je hydrophiler eine Oberfläche – beispielsweise Zahnschmelz oder auch Kunststoffe – desto mehr Plaque lagert sich an (Teughels 2006, Quiryne 1995). HANNIG *et al.* forderten

daher für orale Restaurationsmaterialien eine möglichst geringe SFE, um die Anlagerung von Bakterien zu minimieren (Hannig 2009). BAIER *et al.* stellten in einer Studie fest, dass sich bei einer SFE zwischen 22 und 24 mN/m bereits angelagerte Biomasse wieder abschält und nur das initiale Pellicel zurück bleibt, da die Moleküle bei diesen Kräften am wenigsten denaturieren und dadurch weniger gut haften (Baier 2006). Auch HANNIG *et al.* stellten dieses Phänomen an *low-energy*-Nanocompositen und polierten Keramikoberflächen fest (Hannig 2007b). Mathematisch wird die totale freie Energie einer Oberfläche (γ_s^{TOT}) als Summe der Lifshitz-van-der-Waals-Kräfte (γ_s^{LW}) und der Lewissäure-Basen-Wechselwirkungen (γ_s^{AB}) verstanden, es gilt also: $(\gamma_s^{\text{TOT}}) = (\gamma_s^{\text{LW}}) + (\gamma_s^{\text{AB}})$ (Akovali 1998, Akbay 1995).

2.4.3 Zeta-Potential (ζ -Potential)

In einer Suspension bildet sich an der Phasengrenze zwischen elektrisch geladenen Partikeloberflächen (beispielsweise einem Bakterium) und der flüssigen Phase (z.B. Speichel) eine elektrochemische Doppelschicht. Diese besteht aus einer starren Schicht gegensätzlich geladener Ionen oder orientierter Dipole und einer diffusen Schicht mit weniger gerichteten Dipolen oder Ionen mit nach außen hin stets sinkender Konzentration, die bei zunehmender Entfernung zum Festkörper schließlich die Konzentration der reinen Flüssigkeit erreicht (Hannig 2009, Hannig 2006). Die beiden Schichten werden zusammen als Stern-Layer bezeichnet (Hannig 2009). Die Potentialdifferenz zwischen Partikeloberfläche und der reinen Flüssigkeit wird ζ -Potential genannt (Wilson 2001, Saito 1997). Es ist das nach außen wirksame Potential der Partikel und wird auch als elektrochemisches Potential bezeichnet. Es wird von der Anzahl der geladenen Gruppen auf der Zellwand sowie von pH-Wert und der Ionenkonzentration des Mediums beeinflusst (Scheie 1994). Zur

mathematischen Ermittlung des ζ -Potentials eignet sich die Smoluchowski-Näherung (Wilson 2001): $\zeta = \eta\mu / \epsilon\epsilon_0$ (η steht für die Viskosität des Mediums, ϵ_0 ist die Dielektrizitätskonstante des Vakuums, ϵ steht für die Dielektrizitätskonstante des Mediums und μ für die elektrophoretische Mobilität (Wilson 2001)). Das ζ -Potential spielt eine wichtige Rolle bei der bakteriellen Adhäsion (Atkins 2013, Olsson 1976). SCHEIE *et al.* und WEERKAMP *et al.* stellten fest, dass eine geringe negative Ladung der Oberfläche die Anlagerung von Bakterien begünstigt (Scheie 1994, Weerkamp 1988).

2.5 Bakterielle Adhäsion auf zahnärztlichen Restaurationsmaterialien

Seit vielen Jahren beschäftigen sich Laboruntersuchungen und klinische Studien mit bakteriellen Adsorptionstendenzen auf zahnärztlichen Materialien. Die Forschungsschwerpunkte liegen dabei auf physikalischen Faktoren (z.B. SFE, R_a , ζ -Potential), Vorgängen bei der Biofilmbildung, dem Einfluss von Speichel und der Möglichkeit der Einflussnahme auf die Adhäsion durch verschiedene Agenzien (Marsh 2016, Ionescu 2015, Krzysciak 2014, Schweikl 2013, Ionescu 2012, Mei 2011, Aykent 2010, Bürgers 2010, Hahnel 2010a, Hahnel 2010b, Hannig 2009, Montanaro 2004, Carlén 2001, Kawai 2001, Grivet 2000). HAHNEL *et al.* untersuchten den Einfluss unterschiedlicher Faktoren (Lagerung in verschiedenen Flüssigkeiten, Temperatur, Beschichtung mit Speichel) auf die Adhäsion von *S. mutans* an Probenkörper aus unterschiedlichen Füllungsmaterialien sowie Interaktionen zwischen diesen Faktoren. Hydrophobizität und Rauheit R_a wurden dabei analog zu der vorliegenden Arbeit mit der *Sessile-Drop*-Methode und Perthometer bestimmt. Die Arbeitsgruppe kam zu dem Schluss, dass mit zunehmender Alterung die Hydrophobizität zunimmt und die SFE sinkt (Hahnel 2010a). Auch die Vorgängerstudie belegte nach sechs Monaten künstlicher Alterung eine

deutliche Senkung der SFE, was einherging mit stärker hydrophoben Oberflächeneigenschaften (Bürgers 2009a). Im Gegensatz zur Dauer der Lagerung hatte thermische zyklische Belastung keinen signifikanten Einfluss auf die Hydrophobizität (Hahnel 2010a). TEUGHELIS *et al.* beobachteten, dass Oberflächen mit einer hohen SFE eher zur Anlagerung von Bakterien neigten (Teughels 2006). Diese Aussage wurde von IONESCU *et al.* bestätigt (Ionescu 2012). Auf solchen Studienergebnissen basieren diverse antimikrobielle Strategien, die SFE von Kunststoffen zu senken, um so die Anlagerungen von Mikroorganismen zu reduzieren. Es ist beispielsweise möglich, die SFE durch beigesetzte Additiva zu beeinflussen. RÜTTERMANN *et al.* mischten Kunststoffen Hohlperlen bei, die während einer Kausimulation Oberflächenspannung herabsetzende Stoffe freisetzen. Es wurde festgestellt, dass die SFE nach der Kausimulation signifikant niedriger war (Rüttermann 2014). SCHWEIKL *et al.* untersuchten unter anderem die Füllungsmaterialien Ketac Molar, Tetric EvoCeram und Filtek Silorane. Sie kamen zu dem Schluss, dass an hydrophoben Oberflächen die Adhäsion und das Attachment stärker ausgeprägt waren (Schweikl 2013). Die Rauheit der Oberflächen spielt eine größere Rolle in Bezug auf die Adhäsion von Bakterien als die SFE (Hahnel 2010b, Teughels 2006, Quirynen 2002, Quirynen 1995). Viele Studien befassten sich mit dem Einfluss der Oberflächenrauheit auf die Adhäsion (Mei 2011, Bürgers 2009a, Bürgers 2009c, Hannig 2009, Whitehead 2006). Eine verbreitete und akzeptierte Erklärung für die positive Korrelation der beiden Parameter ist, dass die Vertiefungen in einer rauen Oberfläche bevorzugte Stellen für eine Besiedlung durch Bakterien bieten (Müller 2007). MEI *et al.* verglichen zwei häufig verwendete restaurative Kunststoffe, die zu drei unterschiedlichen Graden der Rauheit poliert wurden, in Hinsicht auf die bei der Adhäsion mit *S. mutans* und *S. sanguinis* auftretenden Kräfte (Mei 2011). Sie kamen zu dem Schluss, dass ein signifikanter,

positiv-linearer Zusammenhang zwischen den gemessenen Adhäsionskräften und der Rauheit der Kunststoffe bestand (Mei 2011). Je länger die Bakterien mit der Oberfläche in Kontakt standen, desto stärker wurden die Adhäsionskräfte. Dieses Phänomen wird als *bond strengthening* bezeichnet. Es war sowohl bei mit Speichel beschichteten als auch bei nicht mit Speichel beschichteten Oberflächen zu beobachten (Mei 2011). Laut MEI *et al.* waren die bei rauer Oberfläche auftretenden höheren Adhäsionskräfte dadurch zu erklären, dass die Anzahl der möglichen Bindungsstellen mit zunehmender Rauheit der Oberfläche anstieg (siehe Abbildung 7) (Mei 2011).

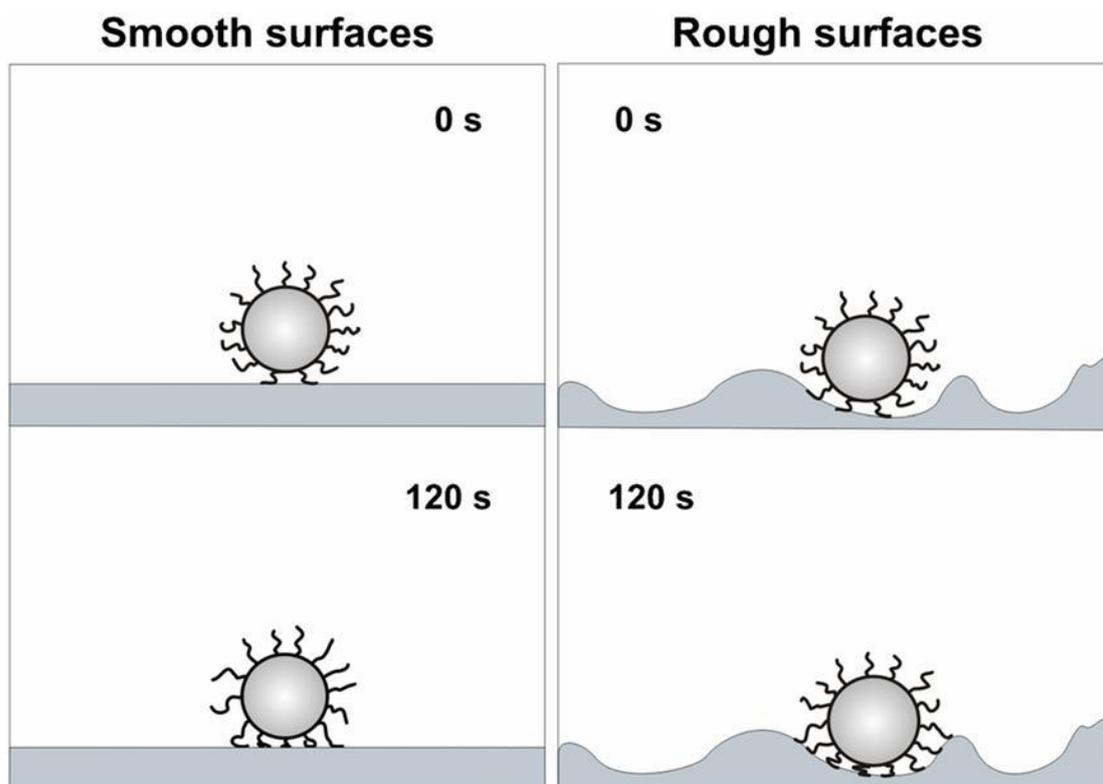


Abbildung 7. Adhäsionskräfte von Streptokokken an Kompositoberflächen steigen mit zunehmender Oberflächenrauheit und Kontaktzeit auf Grund größerer Kontaktflächen und größerer Anzahl der Bindungsstellen (Mei 2011).

Auch laut WHITEHEAD *et al.* erhöhten Oberflächendefekte mit ähnlicher Größe wie die adhärierenden Bakterien die Kontaktfläche, was zu stärkeren Adhäsionskräften führte. Ebenso spielte die Form des Bakteriums relativ zur Topographie der Oberfläche eine Rolle (Whitehead 2006). Diese Feststellung wurde von WANG *et al.* bestätigt (Wang 2015). Auch IONESCU erklärt Unterschiede in der Adhäsion durch den Zusammenhang von Oberflächentopographie und Bakteriengröße. Die Zellen von *S. mutans* haben einen mittleren Durchmesser von 0,8 bis 0,9 μm . Bei den Probekörpern mit einer maximalen Profiltiefe von 0,7 μm wurde eine erhöhte Adhäsion festgestellt (Ionescu 2017). Neuere Studien beschäftigten sich damit, diese Effekte auszunutzen, indem die Oberfläche zahnärztlicher Füllungsmaterialien absichtlich mit Mikrostrukturen versehen wurde, deren Größe unterhalb der der Mikroorganismen lagen (Frenzel 2016). TEUGHELIS *et al.* merkten an, dass ein Aufrauen der Oberfläche die für die Adhäsion zur Verfügung stehende Oberfläche um den Faktor 2 bis 3 vergrößerte (Teughels 2006). Viele Studien befassten sich mit dem Einfluss des Speichels auf die Pellikelbildung und damit auf die Adhäsion von Bakterien (Marsh 2016, Cheaib 2015, Hahnel 2012, Hannig 2009, Hannig 2006). HANNIG *et al.* bemerkten, dass das Pellikel bis zu einem gewissen Grade – abhängig von seiner Dicke – den Einfluss der Oberflächeneigenschaften auf die Adhäsion von Bakterien maskiert (Hannig 2009). SCHWEIKL *et al.* kamen zu dem Schluss, dass die bestehenden Oberflächeneigenschaften der Materialien durch die Anlagerung von Speichelproteinen nicht nur maskiert wurden, sondern dass durch die Speichelproteine die Eigenschaften der Oberfläche durch neue funktionelle Gruppen erweitert wurden (Schweikl 2013). MONTANARO *et al.* merkten an, dass auch ohne das Vorhandensein von Speichelproteinen in einem flüssigen Milieu eine Anlagerung an Füllungsmaterialien stattfand, abhängig von deren Materialeigenschaften (Montanaro 2004). Allgemein wird versucht die Materialeigen-

schaften dahingehend zu beeinflussen, dass eine Anlagerung von vorneherein erschwert wird. Beispielsweise ist es möglich, Materialien herzustellen, die Inhaltsstoffe abgeben, die die Adhäsion von Bakterien reduzieren können. Die Abgabe von Fluorid oder anderen antibakteriellen Zusätzen hatte in verschiedenen Studien Einfluss auf die Menge und das Wachstum von Bakterien auf Füllungsmaterialien (Hahnel 2017, Fúcio 2016, Hahnel 2014, Hannig 2009, Ebi 2001, Friedl 1997). CURY *et al.* stellten allerdings fest, dass Fluorid als Additiv die Bildung eines Biofilms nicht signifikant reduzierte, dafür allerdings die Ausbreitung von Kariesläsionen über Remineralisationsvorgänge erfolgreich behinderte (Cury 2016). BUSSCHER *et al.* beobachteten, dass Fluorid entweder kein dominanter Einflussfaktor bei der Bildung des Biofilms war oder aber die Fluoridkonzentration zu gering war, um effektiv zu sein (Busscher 2010). FÚCIO stellt die Hypothese auf, dass die Fluoridfreisetzung aus GIZ nach einer gewissen Zeit eine Schwelle unterschreitet, unterhalb derer der wachstumsinhibierende Effekt nicht mehr zum Tragen kommt (Fúcio 2016). HAHNEL stellt fest, dass der Biofilm zwar die Freisetzung von Fluorid reduziert, allerdings setzen GIZ in saurem Milieu nach einem anfänglichen Hoch kontinuierlicher Fluoridionen frei (Hahnel 2017).

2.6 Untersuchungsmethoden

2.6.1 Agarplatten

Unter Agarplatten versteht man mit Agar-Medium gefüllte Petrischalen. Sie dienen zur Kultivierung von Bakterien, die auf dem Substrat sichtbare Kolonien bilden (Petri 1887). Je nach Zusammensetzung des Nährmediums kann das Wachstum bestimmter Bakterien selektiv gefördert oder behindert werden. In diesem Fall spricht man von einem selektiven Nährmedium (Madigan 2009, Gold 1973). Dieser Effekt kann genutzt werden, um das Wachstum bestimmter

Mikroorganismen gezielt zu betrachten, ohne die Spezies vorher isolieren zu müssen. Bei der Zucht auf Agarplatten handelt es sich um eine so genannte Batch-Kultur, das heißt die Menge des Substrates wird während des Wachstums nicht modifiziert (Dingermann 2013). Die lebenden Bakterien werden dabei von der kolonisierten Oberfläche gelöst. Es wird eine Verdünnungsreihe in 10er Potenzen hergestellt, ausplattiert und auf Agarplatten inkubiert (An 1997). Anschließend erfolgt die Auszählung der gebildeten Kolonien. Es ist dabei allerdings nicht auszuschließen, dass vereinzelt Bakterien auf der Oberfläche des Probekörpers verbleiben, nicht ausplattiert werden und so zu einem falsch negativen Ergebnis führen (Van den Driessche 2014, Müller 2007). Es muss auch berücksichtigt werden, dass übertragene Bakterien sich nicht vermehren und sichtbare Kolonien bilden, wenn sie unter Stress stehen oder kein ausreichendes Nahrungsangebot vorfinden (Freitas 2013, Shen 2010). Für den quantitativen Nachweis von auf Oberflächen anhaftenden Bakterien steht eine große Anzahl unterschiedlicher Methoden zur Verfügung. So ist es auch möglich, das von Bakterien kolonisierte Material direkt in den Agar zu drücken (Replikatechnik), um die anschließend auf den Agarplatten kultivierten Kolonien visuell auszuzählen. Es werden auch hier nur Bakterien berücksichtigt, die tatsächlich auf das Agar-Medium übertragen werden konnten (Fijan 2005). Das manuelle Auszählen der Kolonien ist abhängig vom Untersucher und damit fehleranfällig (Brugger 2012). Oft werden nur sehr hohe Verdünnungen auf Agarplatten ausplattiert und gezählt, da die Gesamtzahl der zu quantifizierenden Kolonien somit geringer ist beziehungsweise lediglich ein Teil der Agarplatte ausgezählt, um den Zeitaufwand der Auswertung zu begrenzen (Brugger 2012). Diese Faktoren führen somit zu höheren Fehlerquoten in Bezug auf das Gesamtergebnis, können allerdings durch die Verwendung eines automatischen Zählgerätes, welches mittels einer hochauflösenden Digitalkamera und eines Bilderkennungsalgorithmus die Auszählung der Kolonien übernimmt, weit-

gehend ausgeschlossen werden (Brugger 2012). Der Nachweis mit Agarplatten ist sehr zeitaufwändig und ist deshalb nicht für eine große Anzahl von Untersuchungen geeignet (Van den Driessche 2014).

2.6.2 Fluoreszenznachweise

Für den Nachweis von Bakterien stehen mehrere Fluoreszenzverfahren zur Verfügung. Das Prinzip besteht aus der spezifischen Anfärbung von Zellbestandteilen oder -produkten. Dies ermöglicht die Quantifizierung über optische, automatisierte Verfahren. Eines der ältesten noch eingesetzten Verfahren ist die Färbung mit Trypanblau. Das Verfahren beruht auf der Undurchlässigkeit einer intakten Zellmembran für dieses Makromolekül. Es kann nur in tote Zellen eindringen und färbt diese blau (Louis 2011). Voraussetzung für die Methode ist das Vorliegen einer Zellsuspension mit vereinzelt Zellen. Diese werden unter einem Mikroskop unter Verwendung eines Hämozytometers ausgezählt. Damit ist es einfach, einen Rückschluss auf die Gesamtzahl der Zellen und den Anteil der lebenden Zellen in der Kultur zu ziehen (Louis 2011). Der Farbstoff Propidiumiodid kann ebenfalls nur durch zerstörte Bakterienmembranen eindringen. Auch hier werden folglich ausschließlich tote Bakterien angefärbt (Tawakoli 2013, Stoddart 2011a, Woolston 2011). Es existieren auch Stoffe, die Bestandteile auf der Bakterienmembran färben, was allerdings keine Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen erlaubt. Mit dem Farbstoff Concanavalin A lassen sich beispielsweise Zuckerreste auf der Bakterienmembran unter dem Fluoreszenzmikroskop rot darstellen, was bei der Erforschung von extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) von Bedeutung ist (Asahi 2015, Freires 2015, Decker 2014). Auch durch das grün fluoreszierende SYTO 9 können lebende und tote Bakterien angefärbt werden. Dieser Farbstoff dringt

durch intakte und zerstörte Zellmembranen in das Zellinnere, wo er an DNA und RNA bindet (Freires 2015, Decker 2014, Tawakoli 2013, Xiao 2010). Zur Unterscheidung von lebenden und toten Bakterien werden Farbstoffe kombiniert. Für das sogenannte *Life-Dead-Staining*-Verfahren gibt es mehrere kommerzielle Kits mit für das jeweilige Vorhaben ausgewählten Substanzen. So kombiniert die Firma Thermo Fisher Scientific im Kit BacLight™ Syto 9 mit Propidiumiodid (www.thermofisher.com). Diese Kombination verwendeten DECKER *et al.* für die Untersuchung zum Wachstum von *S. mutans* unter unterschiedlichen Wachstumsbedingungen hinsichtlich des Nahrungsangebots an Zuckern (Decker 2014). Unter dem Fluoreszenzmikroskop erschienen intakte Zellen grün, Zellen mit zerstörter Membran rot (Freires 2015). TAWAKOLI *et al.* beschrieben dieses Verfahren als zuverlässige Technik für die Unterscheidung von lebenden und toten adhärierten Zellen, das weniger toxisch war als die gängige Färbemethode mit Ethidiumbromid (Tawakoli 2013). Auch WLODKOWIC *et al.* beschrieben Verfahren zum *Life-Dead-Staining* von Zellen, in denen membrangängige SYTO-Farbstoffe mit nicht membrangängigen Markern wie beispielsweise Propidiumiodid (PI) oder 7-Actinomycin D (7-AAD) kombiniert wurden (Wlodkowic 2011). Eine weitere Möglichkeit ist der indirekte Nachweis von Bakterien, indem nicht die Bakterien selbst, sondern von ihnen induzierte Milieuveränderungen sichtbar gemacht werden. Bei dem Kit CytoX-Violet wird die Indikatorlösung durch zelluläre Dehydrogenasen hinsichtlich ihres Fluoreszenzverhaltens verändert. Dabei ist das Ausmaß der Fluoreszenzveränderung proportional zur Bakterienmenge (Winkler 2014). Im Gegensatz zur Färbung mit Alamar Blue ist es bei diesem Verfahren nicht notwendig, die Eigenfluoreszenz der untersuchten Materialien zu bestimmen, was sowohl eine Zeitersparnis bedeutet, als auch einen potentiell fehleranfälligen Arbeitsschritt eliminiert (Ehrenfeld 2013, Wislsperger 2012). EHRENFELD verglich in einer Studie CytoX-Violet mit dem etablierten

Fluoreszenznachweis mittels Resazurin. Dabei stellte sie für den Großteil der Versuchsreihen für die Methode CytoX-Violet eine höhere Präzision fest (Ehrenfeld 2013). Des Weiteren lässt sich auch das in lebenden Zellen vorhandene ATP (Adenosintriphosphat) mittels des ViaLight MDA-Assays messen. Das enthaltene Enzym Luciferase erzeugt durch ATP und Luciferin Licht, dessen Intensität sich direkt proportional zur vorhandenen Menge ATP verhält. Durch diese Biolumineszenz können Rückschlüsse auf die tatsächliche Anzahl der Zellen gemacht werden (Hahnel 2010b). RISS *et al.* beschrieben dieses Verfahren als eines der sensitivsten, zuverlässigsten und am einfachsten durchzuführenden, um den Zellmetabolismus zu beobachten (Riss 2011). Dieser Test lässt sich als Kontrolle mit anderen Nachweismethoden kombinieren, um den aktiven Zustand der Zellen während des Testvorganges sicherzustellen. Da ATP nur durch lebende Zellen generiert werden kann, bedeutet ein schneller Abfall der Lichtintensität den Tod der beobachteten Zellen. Somit kann auf einfache Weise ein falsch negatives Ergebnis der Testreihen detektiert werden. Durch diese Methode ließen sich bereits ATP-Konzentrationen im Nanogramm-bereich nachweisen (Riss 2011). Der in dieser Arbeit verwendete Fluoreszenznachweis mit Alamar Blue/Resazurin dient ebenfalls der indirekten Quantifizierung (Ehrenfeld 2013). Ursprünglich wurde er in den 1920er Jahren eingeführt, um die Keimbelastung von Milch zu kontrollieren. Erst später wurde er in Biotechnologielabors eingesetzt, um allgemein die Zellvitalität und -proliferation zu untersuchen (Rampersad 2012, Czekanska 2011). Der oxidierte und in diesem Zustand wenig fluoreszierende, bläuliche Farbstoff Resazurin (Absorptionsmaximum bei 605 nm) wird durch Bakterien zu dem stark fluoreszierenden roten Farbstoff Resorufin reduziert (siehe Abbildung 8). Die reduzierte Form zeigt eine gut messbare Absorption bei 573 nm (www.thermofischer.com, Bonnier 2015, Czekanska 2011).

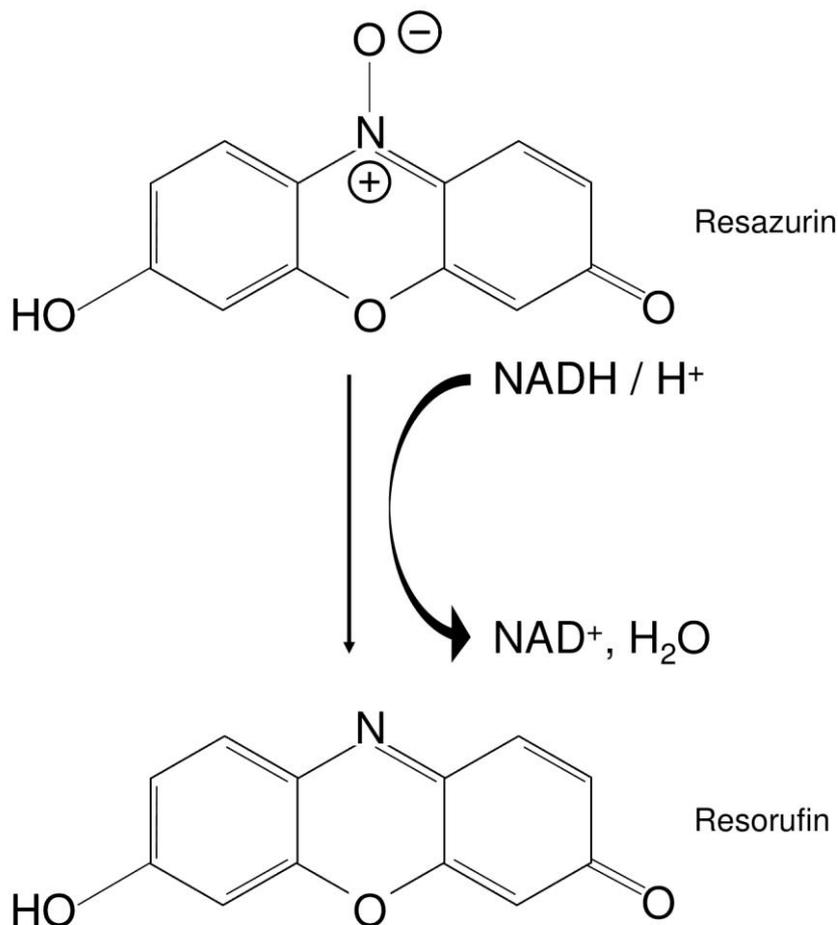


Abbildung 8. Reduktion von Resazurin zu Resorufin in lebenden Zellen.

Der genaue biochemische Vorgang der Reduktion sowie der genaue Ort in der Zelle, an dem diese Reaktion stattfindet, sind dabei noch nicht endgültig geklärt. Wahrscheinlich handelt es sich aber um eine Abfolge von Reaktionen, katalysiert durch Redox-Enzyme in Mitochondrien, Cytosol und Mikrosomen, da der Farbstoff von NADPH, FADPH, FMNH, NADH sowie Cytochromen reduziert werden kann (Bonnier 2015, Wu 2010). Eine andere Erklärung wäre eine im Medium stattfindende chemische Reaktion (Maeda 2001, O'Brien 2000, Voytik-Harbin 1998). Es wurde jedoch ein direkter Zusammenhang zwischen der Menge des umgesetzten Farbstoffes und der Anzahl der adhärenen Bakterien nachgewiesen (Van den Driessche 2014, Wu 2010, Rosentritt 2008,

O'Brien 2000, Voytik-Harbin 1998, Nakayama 1997). Die Resazurin-Reduktionsmethode ist daher ein wissenschaftlich anerkanntes Verfahren zur Quantifizierung stoffwechselmetabolisch aktiver Bakterien, Pilze, Hefen, Hepatozyten und Lymphozyten, das seit mehr als 50 Jahren in der Forschung Verwendung findet (Bonnier 2015, Rampersad 2012, Sandberg 2009, Bürgers 2007, Slaughter 1999, Collins 1997, De Fries 1995, Ansar 1994). Diese Methode ist einfach durchzuführen, präzise, sicher, nicht toxisch und kosteneffektiv (Czekanska 2011). Allerdings stellten HAHNEL *et al.* bei einer Inkubationszeit von 24 h ein zu niedriges Ergebnis für die Adhäsion von *S. mutans* und *S. sobrinus* fest. Sie, wie auch andere Autoren, erklärten dieses falsch negative Ergebnis durch die Bildung des nicht fluoreszierenden Stoffes Dihydroresorufin aus Resorufin bei langen Inkubationszeiten (Hahnel 2012, Peeters 2008). Es kann bei einer Inkubation mit Speichel eine Reaktion zwischen Resazurin und Pellikel nicht ausgeschlossen werden, was ein falsch positives Ergebnis zur Folge hätte (Ehrenfeld 2013). Da Resazurin eine sehr lange Halbwertszeit besitzt, konnten laut O'BRIEN *et al.* auch bereits abgestorbene Zellen fluorometrisch erfasst werden (O'Brien 2000). Eine weitere Möglichkeit zur Zellzahlbestimmung ist ein Reduktionsassay mit Tetrazolium-Salzen. Bei Reduktionsassays werden nicht die Zellen selbst angefärbt, sondern ihr Metabolismus sichtbar gemacht, woraus Rückschlüsse auf die Anzahl vitaler Zellen gezogen werden können. Die Vorteile von Metabolismusfärbungen mit Tetrazolium-Salzen liegen in ihrer Zuverlässigkeit und der Möglichkeit, eine große Anzahl von Proben automatisiert auszuwerten. Die Zellen können in der Kultur untersucht und müssen nicht gewaschen oder fixiert werden. Es ist ein kostengünstiges Verfahren, das für fast alle Zelltypen einsetzbar ist (Rampersad 2012, Kupcsik 2011). MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) ist ein vor allem für Toxizitätstests in der Pharmaindustrie verwendetes Tetrazolium-Salz. Die schwachgelbe, wasser-

lösliche Substanz wird zu einem blauen, wasserunlöslichen Formazan reduziert. Diese Reaktion findet hauptsächlich im Zytoplasma statt und ist abhängig von der NADH- und NADPH-Konzentration (Kupcsik 2011). Allerdings ist eine Apoptose der Zellen für die Auswertung notwendig, was weitere Versuche mit den selben Zellen ausschließt (Rampersad 2012). Modernere Formazane sind: MTS (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium), XTT (2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-((phenylamino)carbonyl)-2H-tetrazoliumhydroxid), WST-1 (2-(4-Iodphenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium) und WST-8 (2-(2-Methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium). Diese Farbstoffe sind weniger toxisch, sensitiver und wasserlöslich. Das Produkt gelangt folglich ins Medium und die Versuche können deshalb auch ohne Apoptose durchgeführt werden. Dadurch sind weniger Arbeitsschritte erforderlich. Allerdings sind diese Salze störanfälliger, da sie von mehreren Faktoren – wie beispielsweise der Glucose- und Sauerstoffkonzentration – im Medium beeinflusst werden, was bei MTT nicht der Fall ist (Kupcsik 2011). Zusätzlich muss beachtet werden, dass MTT von allen stoffwechselaktiven Zellen jedes Zelltyps reduziert wird, die anderen Salze nicht (Kupcsik 2011). HAHNEL *et al.* berichteten, wie auch durch XIAO *et al.* bestätigt, dass die Untersuchung von *S. mutans* und *S. sobrinus* durch MTT bei längeren Inkubationszeiten Ergebnisse mit weniger Streuung lieferte als mit Resazurin, allerdings schien Resazurin bei Inkubationszeiten von 4 h und geringer Bakteriendichte die genaueren Ergebnisse zu liefern (Hahnel 2012, Xiao 2010). Eine weitere gängige Nachweismethode stellen die Immunoassays dar. Zugrunde liegend ist bei diesen Verfahren eine Antigen-Antikörper-Bindung, die sowohl hoch spezifisch als auch sehr bindungsstark ist (Kim 2013). Bereits KOIVUNEN *et al.* beschrieben diese Methoden als einfach durchzuführende, schnelle, wenig fehleranfällige, sensitive und einfach zu automatisierende Routineanalyse in Kliniklaboren (Koivunen 2006). Ein gängiges Immunoassay ist das so genannte Sandwich-ELISA (*Enzyme Linked*

Immunosorbent Assay) (siehe Abbildung 9). Ein Antikörper wird auf ein festes Trägermaterial, beispielsweise eine Microtiterplatte, aufgebracht. Danach wird mit dem gesuchten Antigen in einem Flüssigmedium inkubiert, welches von den stationären Antikörpern auf der Platte eingefangen wird. Dann wird wiederum mit einem markierten Antikörper inkubiert. Dieser bindet spezifisch an das Antigen. Der zweite Antikörper ist durch ein Enzym markiert, dessen Stoffwechselaktivität gemessen werden kann oder das eine andere messbare Reaktion auslöst.

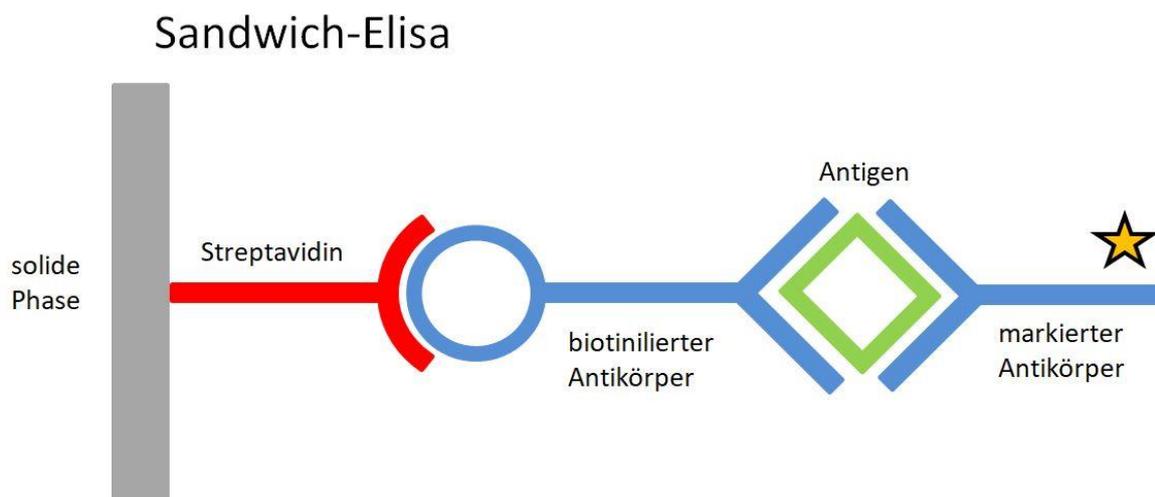


Abbildung 9. Schematische Darstellung eines Sandwich-ELISA (nach Koivunen 2006).

Eine andere Möglichkeit besteht darin, den ersten oder zweiten Antikörper mit einer fluoreszierenden Substanz, so genannten Fluorochromen, zu markieren (siehe Abbildung 10). Diese Methode ist für Versuchsreihen in großem Maßstab geeignet (Koivunen 2006).

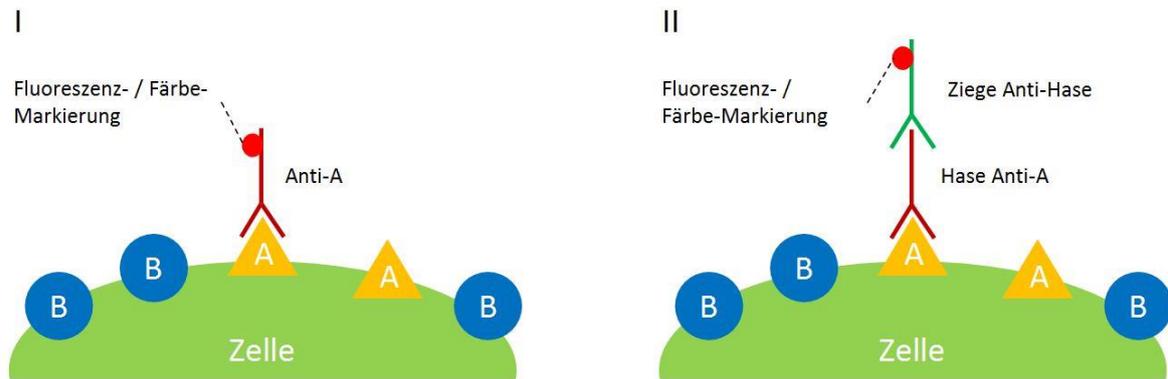


Abbildung 10. Schematische Darstellung eines direkten Fluoreszenz-Antikörper-Tests (nach Koivunen 2006).

2.6.3 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Das Rasterelektronenmikroskop (REM, engl. *Scanning Electron Microscopy, SEM*) ist ein mit einer Elektronenquelle ausgestattetes Mikroskop, das unter Ausnutzung der sehr kleinen Wellenlänge beschleunigter Elektronen ein besonders hohes Auflösungsvermögen von ca. 10 nm besitzt. Das Objekt wird durch einen feinen Elektronenstrahl zeilenweise abgetastet (Kühnel 2015). Die Rasterelektronenmikroskopie ist eine etablierte Methode, um Proben biologischen Materials abzubilden. Sie ermöglicht die Erstellung hoch auflösender Bilder kleiner Probenbereiche in einer Größenordnung von mehreren Mikrometern (Asahi 2015, Eberle 2015). Die Vorbereitung von biologischem Material für die Untersuchung im REM ist aufwändig, da die Proben fixiert, dehydriert und entweder luftgetrocknet oder der Kritisch-Punkt-Trocknung unterzogen werden müssen, da das REM unter Vakuum arbeitet (Asahi 2015, Little 1991). Nichtleitende Proben, wie beispielsweise ein Biofilm, müssen zusätzlich mit einem leitenden Film aus Metall überzogen werden, bevor sie betrachtet werden können (Asahi 2015, Little 1991). Diese Untersuchungsmethode gibt Aufschluss über die Zusammensetzung sowie räumliche Verteilung der Spezies, kann jedoch kein präzises Bild des intakten Biofilms wiedergeben, da die Struktur der

extrazellulären Substanz durch die aufwändige Vorbereitung verfälscht wird (Weber 2014, El Abed 2012). WEBER *et al.* sowie ALHEDE *et al.* beobachteten, dass durch die Dehydration der Proben und das Hochvakuum die extrazelluläre Substanz des Biofilms weitestgehend zerstört wurde und Risse an der Oberfläche entstanden (Weber 2014, Alhede 2012). Für die originalgetreue Abbildung des Biofilms werden in der Literatur unterschiedliche Verfahren diskutiert (Asahi 2015, Weber 2014, Alhede 2012, Griffin 2007). Neben der in dieser Arbeit angewandten Methode der konventionellen Rasterelektronenmikroskopie gibt es Verfahren, die durch höhere Drücke in der Untersuchungskammer des REMs und durch Verzicht auf die Dehydrierung eine Zerstörung der Extrazellulärsubstanz umgehen (Weber 2014, Griffin 2007). GRIFFIN *et al.* schlugen für die Einteilung dieser Verfahren die Bezeichnungen *Variable Pressure Scanning Electron Microscopy* (VPSEM) und *Environmental Scanning Electron Microscopy* (ESEM) vor. VPSEM bezeichnet dabei allgemein alle Verfahren, die mit variablem, niedrigem Druck in der Kammer arbeiten. ESEM sind davon diejenigen Verfahren, bei denen der Druck hoch genug ist, um nicht dehydrierte Proben untersuchen zu können (Griffin 2007). Als Gas in der Untersuchungskammer wird oft Wasserdampf verwendet (Griffin 2007). ALHEDE *et al.* merkten an, dass ein großer Vorteil der ESEM-Verfahren das Fehlen jeglicher Vorbehandlung der Proben war, jedoch wurde das Erstellen von hoch auflösenden Bildern durch die herabgesetzte Leitfähigkeit der nassen Proben erschwert (Alhede 2012). ASAH I *et al.* benutzten ein konventionelles REM-Verfahren, allerdings verzichteten sie auf die Fixierung und Dehydrierung und das Besputtern, sondern verwendeten stattdessen eine Beschichtung mit ionischen Liquiden. Es konnten scharfe und aussagekräftige Bilder des Biofilms erstellt werden (Asahi 2015). Eine weitere Möglichkeit stellt das Verfahren mit einer Rutheniumrot-Fixierung dar (SEM-RR). Während der Fixierung der Probe wurde Rutheniumrot hinzugefügt, um die Zuckermoleküle in der extrazellulären

Matrix zu stabilisieren (Weber 2014). WEBER *et al.* verglichen in einer Studie Bilder von *S. mutans*-Biofilmen, die mit einem konventionellen SEM, SEM-RR und VPSEM generiert wurden (siehe Abbildung 11). Dabei war deutlich die noch intakte extrazelluläre Matrix bei der VPSEM-Aufnahme zu erkennen (Weber 2014).

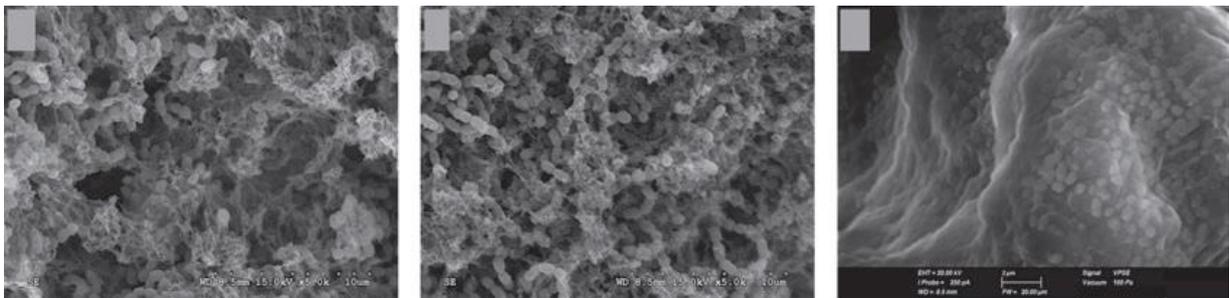


Abbildung 11. *S. mutans*-Biofilme, aufgenommen mit SEM (a), SEM-RR (b) und VPSEM (c). Aufgenommen mit einer Arbeitsdistanz von 8,5 mm und einer Feldbreite von ca. 20 µm (Weber 2014).

2.6.4 Sessile-Drop-Methode (Hydrophobie)

Die Hydrophobie einer Oberfläche hat Einfluss auf die bakterielle Adhäsion (Hahnel 2010a, Teughels 2006). Die *Sessile-Drop*-Methode (liegender Tropfen) ist eine Möglichkeit, die Hydrophobizität, – und damit indirekt die SFE – eines Feststoffes zu ermitteln (Hannig 2009). Die SFE ist dabei das Äquivalent zur Oberflächenspannung der Flüssigkeit und kann über den Kontaktwinkel zur Oberfläche bestimmt werden (Hannig 2009). Dabei wird ein Tropfen unter genormten Bedingungen auf den zu untersuchenden Feststoff aufgebracht. Anschließend werden die Kontaktwinkel zwischen Festkörper und Tropfen gemessen (Rupp 2002) (siehe Abbildung 12). Der Kontaktwinkel reflektiert die Interaktion der Flüssigkeit mit der Festkörperoberfläche abhängig von Ladung, Hydrophobizität und Benetzbarkeit der beteiligten Komponenten (Hannig 2009).

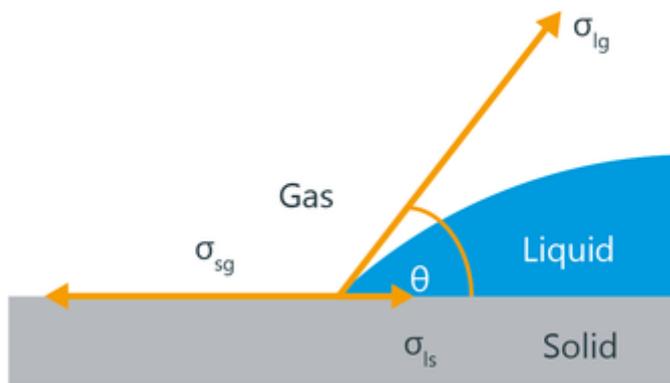


Abbildung 12. Kontaktwinkel (www.kruss.de).

Dieser Methode liegt das Phänomen des Abperlens zu Grunde. Je hydrophober ein Material ist, umso weniger ist es durch Flüssigkeiten benetzbar, der Tropfen bildet eine Perle (siehe Abbildung 13). Für die Untersuchungsmethode bedeutet das: Je größer der Kontaktwinkel, desto höher die Hydrophobizität des Feststoffes (Hannig 2009).

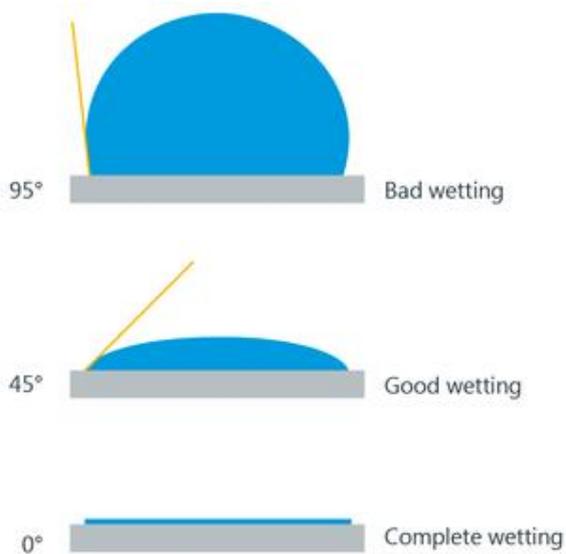


Abbildung 13. Oberflächenenergie und Kontaktwinkel (www.kruss.de).

Aus physikalischer Sicht wird indirekt die Oberflächenenergie des Festkörpers gemessen, dazu muss die Oberflächenspannung der Flüssigkeit bekannt sein. Die Youngsche Gleichung $\cos \theta = \frac{\sigma_s - \sigma_{LS}}{\sigma_L}$ beschreibt die Beziehung zwischen dem Kontaktwinkel θ , der Oberflächenspannung der Flüssigkeit σ_L , der Oberflächenenergie des Festkörpers σ_s , sowie der Grenzflächenspannung zwischen Festkörper und Flüssigkeit σ_{LS} (Tschernin 2003). Ab einem Kontaktwinkel von über 65° bei Wasser bestand laut RÜTTERMANN *et al.* eine hohe Hydrophobizität (Rüttermann 2014). VOGLER *et al.* definierte eine Oberfläche als hydrophil, wenn der Kontaktwinkel mit Wasser zwischen 0° und 63° lag, und als hydrophob bei einem Kontaktwinkel zwischen 63° und 120° (Vogler 1998). Es wurde in anderen Studien festgestellt, dass bei einem Kontaktwinkel kleiner als $62,4^\circ$ keine hydrophoben Kräfte auftreten (Wu 2005, Vogler 1999). Eine differenziertere Methode ist das Verfahren von Owens, Wendt, Rabel und Kaelble (OWRK). Zur Bestimmung der freien Oberflächenenergie des Festkörpers wurden dabei mindestens zwei Flüssigkeiten mit bekannten dispersiven und polaren Anteilen der Oberflächenspannung benötigt, wobei mindestens eine der Flüssigkeiten einen polaren Anteil > 0 aufweisen musste (Owens 1969). Mit der Methode konnten die polaren und dispersiven Anteile der Oberflächenspannung bestimmt werden. Es war mit dieser Methode also möglich, die gesamte SFE und deren Einzelkomponenten zu bestimmen (Sardin 2004). Dies ist nützlich, wenn der Einfluss dieser Einzelkomponenten auf die Adhäsion von Bakterien bestimmt werden soll (Rüttermann 2014).

2.6.5 Ermittlung der Oberflächenrauheit

Die Rauheit einer Oberfläche kann durch ein Tastschlittensystem (Perthometer) ermittelt werden (siehe Abbildung 14). Dieses Gerät besteht aus einer Spitze,

meist aus Diamant, die nahezu reibungsfrei in einem Tastsystem eingebaut ist. Wird das Tastsystem mit Hilfe eines Vorschubgerätes über eine Oberfläche geführt, so werden Unebenheiten auf dieser durch die Tastspitze erkannt und als elektrische Impulse umgewandelt einem Auswertrechner zugeführt (Tschernin 2003). Für die durchgeführten Versuche wurde eine Messung des Parameters R_a durchgeführt. R_a entspricht dem arithmetischen Mittel des Rauheitsprofils (Teughels 2006). Zur Untersuchung unterschiedlicher Eigenschaften der abgetasteten Oberfläche können mit diesem Gerät unterschiedliche Parameter erfasst werden (siehe Kapitel 2.4.1).



Abbildung 14. Perthometer S6P (www.uniklinikum-regensburg.de).

2.7 Zahnärztliche Füllungsmaterialien

Das zunehmende ästhetische Empfinden und die negativen Schlagzeilen bezüglich des Amalgams, insbesondere die Diskussion um eine mögliche Quecksilberbelastung, führten zu einer erhöhten Nachfrage nach zahnfarbenen Füllungsmaterialien (Jones 2008). Hierfür stehen vor allem Komposite, Glasionomere (GIZ) und eine Mischform aus beiden, die Kompomere, zur Verfügung.

2.7.1 Komposite

Die in der Zahnmedizin verwendeten Komposite setzen sich aus einer organischen Monomermatrix, meist Bisphenol-A-Glycidylmethacrylat (Bis-GMA), zusammen, die zur Verbesserung der Materialeigenschaften Füllkörper unterschiedlicher Größe, meist aus Glas, Quarz, sowie Siliziumdioxid, enthält (Cramer 2011, Ferracane 2011). Die Klassifikation der Komposite basiert auf der Größe dieser Füllkörper. Man unterscheidet Makrofüllerkomposite (durchschnittliche Füllkörpergröße 10–50 μm), Mikrofüllerkomposite (40–50 nm) und die weit verbreiteten Hybridkomposite. Innerhalb dieser Gruppe unterscheidet man wiederum Grobpartikel-Hybridkomposite (1–10 μm und 40 nm), Feinpartikel-Hybridkomposite (0,6–1 μm und 40 nm) und Nano-Hybridkomposite (5–100 nm und 0,6–1 μm) (Rosentritt 2018). Mikrofüller bewirken gute Polierbarkeit und eine hohe Verschleißfestigkeit. Makrofüller erhöhen die physikalische Festigkeit und senken die Polymerisationsschrumpfung. Allerdings führt ein hoher Makrofülleranteil auch zu einer Zunahme der Oberflächenrauheit (Eichner 2008). Zusätze wie Barium-, Strontium-, Zink- und Ytterbium-Atome machen das Komposit röntgenopak. Füllstoffe sind durch eine Verbundschicht fest in der Matrix verankert (Ferracane 2011). Das Kopplungsagens 3-Methacryloxypropyltrimethoxysilan (MPS) stellt eine chemische Verbindung zwischen der hydrophilen Siliziumoxidoberfläche und der hydrophoben, organischen Matrix her. Neben diesen Hauptbestandteilen sind Metalloxide zur Farbgebung sowie lichtempfindliche Katalysatoren, die den Polymerisationsstart einleiten, beigemischt (Ferracane 2011). Die dadurch initiierte Reaktion ist eine Polymerisationskettenbildung, in der die Monomere miteinander vernetzen (Eichner 2008, Schmalz 2008).

2.7.2 Glasionomerzemente

Glasionomerzemente (GIZ) werden aus einem Pulver aus fein gemahlenem Aluminiumsilikatglas und einem in Wasser gelösten Polycarboxylat-Kopolymer gebildet (Sakaguchi 2012, Eichner 2008). Oft sind die beiden Komponenten in einem Kapselsystem erhältlich (www.3mdeutschland.de). Werden die Bestandteile vermengt, läuft eine Säure-Base-Reaktion ab. Kationen aus dem Glas verknüpfen die Polyacrylsäure-Moleküle und es bildet sich eine kreuzvernetzte Gelmatrix, die nach ca. 24 h ausgehärtet ist (www.3mdeutschland.de). Zusätzlich entsteht durch Chelatbildung zwischen den Polyacrylsäure-Molekülen und den Kalziumionen der Zahnoberfläche eine chemisch adhäsive Bindung, die jedoch wesentlich schwächer ist als bei Bondingsystemen, die für die Adhäsivtechnik bei Kompositen verwendet werden (Sakaguchi 2012). Die Retention von GIZ ist primär mikromechanisch. Der große Vorteil gegenüber den Kompositen besteht in der hohen Fluoridabgabe, die das Risiko von Sekundärkaries minimiert (Hannig 2009). Nachteilig sind die geringe Härte und die Wasserlöslichkeit, daher sind GIZ eher zu den temporären Füllungsmaterialien bzw. zu den Unterfüllungsmaterialien zu zählen (www.3mdeutschland.de, Sakaguchi 2012, Eichner 2008).

2.7.3 Kompomere

Das Wort „Kompomer“ ist eine Zusammensetzung der Wörter „Komposit“ und „Ionomer“ und spiegelt auch die Verschmelzung der Materialeigenschaften wider. Es handelt sich um polyalkensäuremodifizierte Komposite mit Glasionomerzement-Komponenten. Kompomere besitzen bessere mechanische Werte als GIZ und setzen wie diese ebenfalls eine gewisse Menge an Fluorid frei. Allerdings erreichen sie nicht die guten mechanischen Werte der Komposite und werden deshalb in mechanisch weniger beanspruchten Regionen

(z.B. Zahnhalsfüllungen) eingesetzt (www.dentsply.eu, Eichner 2008, Schmalz 2008). Kompomere werde von mehreren Dentalfirmen angeboten. Neben dem in dieser Arbeit verwendeten Kompomer Dyract eXtra der Firma Dentsply (www.dentsply.eu) sind noch mehrere Kompomere auf dem Markt, z.B. Compoglass F der Firma Ivoclar Vivadent (www.ivoclarvivadent.com) oder die Eigenmarke der Firma Henry Schein HS-Kompomer (www.henryschein-dental.de).

2.8 Streptococcus mutans

Der für diese Arbeit verwendete Keim *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) ist ein grampositives und fakultativ anaerobes Bakterium (Dörries 2014, Raghavendra 2014). Häufig tritt er in kurzen Ketten oder auch paarweise auf (Sanderink 2004). Obwohl er nicht zur Normalflora der Mundhöhle zählt, ist er ein repräsentativer Besiedler der Mundhöhle, da er wie andere Infektionskeime durch Speichel von Mensch zu Mensch übertragen wird (Hellwig 2009, Marsh 2006, Sanderink 2004, Heidemann 1999). Er erhielt seinen Namen aufgrund der Eigenschaft, seine Morphologie von der Kokkenform bei alkalischem pH in eine leichte Stäbchenform bei saurem Milieu zu ändern (Sanderink 2004). *S. mutans* ist kein typischer Primärbesiedler, er bindet in Adhäsionsversuchen daher besser an nicht mit Speichel beschichtete Probekörper (Ionescu 2015). Dieses Bakterium erweist sich als äußerst säurestabil, da es in saurem Milieu seinen Stoffwechsel verändert. So kann es bis zu einem pH-Wert von unter 5,5 in Suspension existieren (Marsh 2006, Welin 2003). Dieser pH-Wert wurde in Kariesläsionen gefunden (Welin 2003). Wird der pH-Wert graduell gesenkt, überlebt der Erreger in einer Plaquematrix auch bei Werten bis pH 3,0, da die Bakterien sich nach und nach an die sauren Milieubedingungen adaptieren (Welin-Neilands 2007). CORNEJO *et al.*

vermuteten, dass diese Eigenschaft durch lateralen Gentransfer von *S. gallolyticus* auf *S. mutans* übertragen wurde, wobei ein Gen für die Synthese des Enzyms putative Reduktase weitergegeben wurde (Cornejo 2013). Folgende Anpassungen werden unter *acid tolerance response* (ATR) zusammengefasst und bestehen nach WELIN-NEILANDS *et al.* im Wesentlichen aus drei Vorgängen. Es erfolgt eine Steigerung der Aktivität der *proton-translocating ATPase*. Dieses Enzym reguliert den intrazellulären pH-Wert, indem es Protonen aktiv durch die Zellwand hinaus schleust. Eine gesteigerte Synthese von *stress-responsive proteins* schützt den Keim vor Denaturierung. Ein Anstieg der glycolytischen Aktivitäten bewirkt eine schnellere Vernetzung und Biofilmbildung, was den Erreger vor schädlichen Einflüssen abschirmt (Welin-Neilands 2007). *S. mutans* besitzt spezifische Enzyme, so genannte Glycosyltransferasen (Gtfs), die ausschließlich Saccharose verstoffwechseln (Xiao 2010). Glycosyltransferase B bildet beispielsweise aus extrazellulären Polysacchariden das extrem unlösliche 1,3- α -Glucan, das die Vernetzung von Bakterien ermöglicht und so die Plaquematrix stabilisiert (Krzyściak 2014, Bowen 2011, Xiao 2010, Nobbs 2009). Glycosyltransferase C bildet das lösliche α -1,6-Glucan, welches die Adhäsion an den Zahnschmelz erleichtert (Xiao 2012, Bowen 2011, Xiao 2010). Die von Glycosyltransferase D gebildeten Glucane aktivieren das Enzym Glukosyltransferase B und dienen, eingelagert in der Plaquematrix, als Energiespeicher für Bakterien (Krzyściak 2014). Außerdem induzieren die Glucane bei ihrer Bindung an Bakterien ebenfalls eine Glycosyltransferasen-Bildung bei diesen, wodurch der Vernetzungsprozess weiter beschleunigt wird. Freie Glucane bilden eine stabile Matrix, in die sich Mikroorganismen einlagern (Bowen 2011). Die Bildung von Glucanen durch die drei Glycosyltransferasen macht eine Adhäsion und Clusterbildung erst möglich (Krzyściak 2014, Koo 2010, Xiao 2010). Die Aktivität der Enzyme unterscheidet sich je nachdem ob sie gerade membranständig oder gelöst

vorliegen, wobei membranständige Enzyme eine höhere Umsatzrate aufweisen (Bowen 2011). Unter anaeroben Bedingungen, wie sie in tieferen Plaque-schichten herrschen, baut *S. mutans* im Zuge des fakultativ fermentativen Energiestoffwechsels Saccharide zu Lactat und Pyruvat ab. Diese Säuren bewirken ein Absinken des pH-Wertes und dadurch eine Demineralisation der Schmelzschicht (Bowen 2011, Welin-Neilands 2007, Reitemeier 2006). *S. mutans* ist außerdem in der Lage, spezielle Proteasen zu synthetisieren sowie im Speichel enthaltene IgA-Antikörper zu deaktivieren und somit die Immunreaktion des Wirts zu schwächen (Sanderink 2004). Durch diese Vielzahl an Eigenschaften ist *S. mutans* maßgeblich für die Entstehung von Karies verantwortlich (Krzyściak 2014, Raghavendra 2014, Nobbs 2009, Selwitz 2007, Sanderink 2004, Gaines 2003, Nyvad 1990). MARSH *et al.* bezeichneten *S. mutans* aufgrund epidemiologischer Studien als Haupterreger bei der Entstehung von Schmelzkaries, Wurzelkaries bei der älteren Bevölkerung und *nursing bottle caries* bei Kleinkindern (Marsh 2003). PALMER *et al.* hoben hervor, dass die Zugabe von einfach zu verstoffwechselnden Zuckern einen Anstieg der Streptokokkenpopulation und ein Absinken des pH-Wertes bewirkt. Säurebildende und säuretolerante Organismen wie *S. mutans* profitieren von diesen Bedingungen so stark, dass andere, weniger säuretolerante und nicht säurebildende Organismen nicht mehr konkurrieren können (Palmer 2014).

3 Ziel der Untersuchung und Fragestellung

In der vorgestellten Untersuchung sollten drei grundlegende Methoden zur Quantifizierung der Adhäsion von Bakterien auf zahnärztlichen Füllungs-materialien miteinander verglichen werden. Die Aussagekraft, Reproduzierbarkeit und Reliabilität dieser mikrobiologischen Untersuchungsmethoden sollte gegenübergestellt werden. Hierzu wurden verschiedene handelsübliche, zahnärztliche, direkte Füllungsmaterialien als Träger und *S. mutans* als Testkeim verwendet.

4 Material und Methode

4.1 Versuchsvorbereitung

4.1.1 Herstellung des Flüssigmediums

Für die Herstellung von 1 l Nährmedium wurden 30 g Trypticase Soy Broth (Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, USA) und 3 g Hefeextrakt (Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, USA) in 900 ml destilliertem Wasser gelöst. Durch tropfenweise Beigabe von Salzsäure (HCl 37%, Merck, Darmstadt, Deutschland) wurde mit dem pH-Meter (Multi-Calimatic, Knick, Berlin, Deutschland) ein pH-Wert von 7,0 eingestellt. Anschließend wurde das Volumen des Flüssigmediums durch Zugabe von destilliertem Wasser (*aq. dest.*) auf exakt 1000 ml ergänzt.

4.1.2 Herstellung der Agarplatten

Die Herstellung der Agarplatten erfolgte analog der Herstellung des Flüssigmediums. Trypticase Soy Broth und Hefeextrakt wurden in 1 l *aq. dest.* gelöst und mit dem pH-Meter auf einen pH-Wert von 7,0 eingestellt. Anschließend wurden 15 g Agar (Bakto Agar, Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, USA) zugeführt und für 20 min bei 121 °C und 1 bar im Autoklaven (Sanoclav, Wolf, Bad Überkingen, Deutschland) sterilisiert. Darauf wurde das Agarmedium bei 70 °C unter der Sicherheitswerkbank (Herasafe HSP12, Heraeus, Hanau, Deutschland) in die Petrischalen (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) gegossen. Um gleiche Wachstumsbedingungen zu gewährleisten, wurde darauf geachtet, dass in allen Petrischalen eine einheitliche Schichtdicke des Mediums von 5 mm eingehalten wurde. Nachdem der Agar erstarrt war, wurden die Platten bis zu ihrer Verwendung im Kühlschrank bei 6 °C aufbewahrt.

4.1.3 Herstellung der Bakterienkultur

Für die Versuche wurde *S. mutans* (DSMZ-Nr.: 20523; Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland) verwendet. 30 g Soja-Nährbouillion (Trypticase Soy Yeast Extract Medium, Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, USA) und 3 g Hefeextrakt (Yeast Extract, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) wurden in 1 l *aq. dest.* gelöst. In dieser Nährlösung wurde *S. mutans* kultiviert. Die sterilisierte Nährlösung wurde am Vortag des Versuchs mit 50 µl aus der Bakterienvorkultur beimpft und in zwei Tubes (PS-Tubes 50 ml, Greiner, Frickenhausen, Deutschland) für 15 h im Schüttelinkubator (Forma Orbital Shaker, Thermo Elektron Corp., Marietta, USA) bei 37 °C bebrütet. Die beiden Tubes wurden bei 2300 U/min und 18 °C für 5 min in der Zentrifuge (Rotixa/P, Hettich, Tuttlingen, Deutschland) zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und das verbleibende Bakterienpellet mit 30 ml PBS-Puffer (Phosphate Buffered Saline, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) gewaschen. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Nach der ersten Zentrifugation wurden die Bakterienpellets in einem Tube vereinigt. Das zentrifugierte Bakterienpellet wurde anschließend in 50 ml PBS-Puffer gelöst und die Suspension unter Photometerkontrolle (Genesys 10nV Scanning, Thermo Spectronic, Rochester NY, USA) auf eine optische Dichte von 0,3 eingestellt. Zusätzlich wurde der pH-Wert durch tropfenweise Zugabe von NaOH (2%, Apotheke des Klinikums der Universität Regensburg, Regensburg, Deutschland) auf 5,0 eingestellt.

4.1.4 Mikroorganismen

In sämtlichen Adhäsionsversuchen wurde als Testkeim *Streptococcus mutans* (NCTC 20523; DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland) eingesetzt.

4.1.5 Chemikalien und Lösungen

Agar (Bakto Agar, Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, USA)

Ethanol (Ethanol absolut, Merck, Darmstadt, Deutschland)

Natriumchlorid (NaCl, 0,9%, Merck, Darmstadt, Deutschland)

Phosphatgepufferte Salzlösung / PBS-Puffer in 200 ml *aq. dest.* (Phosphate Buffered Saline Tablette, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

3 mM Resazurin-Lösung (Resazurin Natriumsalz mit Zertifikat, Indikator pH 3,8-6,5, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

TS-Medium 92 (30 g Trypticase soy broth, 3 g yeast extract, Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, USA)

Salzsäure (HCl 37%, Merck, Darmstadt, Deutschland)

Natriumhypochlorid (NaOH 2%, Apotheke des Klinikums der Universität Regensburg, Regensburg, Deutschland)

4.1.6 Geräte und technisches Material

Autoklav: Sanoclav (Wolf, Bad Überkingen, Deutschland)

Dubliersilikon: Deguform (DeguDent, Hanau, Deutschland)

Durchlicht-Mikroskop (Carl Zeiss West GmbH, Oberkochen, Deutschland)

Eppendorf-Pipetten (Netheler & Hinz GmbH, München, Deutschland)

Eppendorf-Pipetten-Spitzen (100/1000 µl) (Greiner Labortechnik, München, Deutschland)

Magnetrührgerät: IKAMAG Rec-G (Ika-Labortechnik, Staufen im Breisgau, Deutschland)

Mikroplatten-Reader: Fluorstar Optima (BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland).

Panasil contact plus (Kettenbach Dental, Eschenburg, Deutschland)

Petrischalen (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)

pH-Meter: Multi-Calimatic (Knick, Berlin, Deutschland)

Photometer: Genesys 10nV Scanning (Thermo Spectronic, Rochester NY, USA)

Pipette des Goniometers (Microlab RP, Hamilton, USA)

Poliergerät: Buehler-Metaserv (Buehler GmbH, Düsseldorf, Deutschland)

Polymerisationsgeräte: Unilux AC (Heraeus, Hanau, Deutschland) und ESPE Visio Beta (3M ESPE Deutschland GmbH, Seefeld, Deutschland)

Probenträger Alu-Stubs (Provac GmbH, Oestrich Winkel, Deutschland)

Tubes: PS-Tubes 15 ml/50 ml (Greiner, Frickenhausen, Deutschland)

P1 Goniometer (Erma Inc., Tokyo, Japan)

Rasterelektronenmikroskop: Cambridge Stereoscan 240 (LEO Elektronenmikroskopie GmbH, Oberkochen, Deutschland)

Schleifpapierscheiben (Bühler GmbH, Düsseldorf, Deutschland)

Schüttelinkubator: G-25 Shaker Incubator (New Brunswick Scientific Co. Inc, Edison, New Jersey, USA)

Sicherheitswerkbank: HeraSafe HSP12 (Heraeus, Hanau, Deutschland)

Silikonkleber UHU Silikon (UHU GmbH & Co. KG, Bühl, Deutschland)

Sputtergerät für Goldbedampfung: Balzerunion SCD 040 (Balzer Union Limited, Balzers, Liechtenstein)

Testschlittensystem: Perthometer S6P (Feinprüf Perten GmbH, Göttingen, Deutschland)

Ultraschallgerät: Sonifier W-450D (Branson Ultrasonics Corp., Danbury, USA)

Wellplatten: 12 bzw. 48 Well Cell Culture Cluster (Corning Inc., Corning NY, USA)

Zentrifuge: Rotixa/P (Hettich, Tuttlingen, Deutschland)

4.1.7 Software

Für die Erfassung der Fluoreszenzwerte wurde Fluostar Optima Version 1.30.0 (BMG LabTech, Offenburg, Deutschland) verwendet. Für die statistische Auswertung und graphische Darstellung der Versuchsergebnisse kam die Software SPSS für Windows Version 12.0 (SPSS Inc., Chicago, USA) zum Einsatz. Die Auswertung der REM-Bilder erfolgte mit der Software Optimas 6.2 (Optimas Corp., Bothell, USA).

4.2 Probekörperherstellung

Für die Versuche wurden aus unterschiedlichen Füllungsmaterialien (siehe Tabelle 1) Probekörper hergestellt. Für die Herstellung der Komposit-Probekörper (Tetric EvoCeram, Filtek Supreme XT, Sinfony) wurden Metallschablonen (siehe Abbildung 15) mit einem Lochdurchmesser von 10 mm und einer Höhe von 2,0 mm verwendet, die auf einen Anmischblock gelegt wurden.



Abbildung 15. Herstellungs-Schablone für die Komposit- und Kompomerprobekörper.

Materialart	Markenname Lot-Nummer Farbe	Hersteller
Komposit	Filtek Supreme XT Lot 6BG A1	3M ESPE (3M ESPE Deutschland GmbH, Seefeld, Deutschland)
	Sinfony Lot 234822 A1	3M ESPE (3M ESPE Deutschland GmbH, Seefeld, Deutschland)
	Tetric EvoCeram Lot H32690 A1	Ivoclar Vivadent (Ivoclar Vivadent GmbH, Schaan, Liechtenstein)
Kompomer	Dyract eXtra Lot 0607001558 A1	Dentsply (Dentsply DeTrey GmbH, Konstanz, Deutschland)
Glasionomer- Zement	GC Fuji II LC Capsule Lot 0604191 uni	GC Corporation (GC Germany GmbH, Bad Homburg, Deutschland)
	Ketac Molar Aplicap Lot 219532 uni	3M ESPE (3M ESPE Deutschland GmbH, Seefeld, Deutschland)
Glas	Glasplättchen 10mm uni	Marienfeld (Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda Königshofen, Deutschland)

Tabelle 1. Übersicht über die untersuchten Materialien.

Darauf wurde der jeweilige Kunststoff mit einem Planstopfer blasenfrei eingebracht. Anschließend wurde jedes Material wie vom Hersteller angegeben polymerisiert. Sinfony wurde zuerst mit dem Lichtpolymerisationsgerät Unilux AC (1 min) und anschließend ein weiteres Mal mit dem Lichtpolymerisationsgerät Espe Visio Beta (15 min) gehärtet. Tetric EvoCeram und Filtek Supreme XT wurden jeweils 20 Sekunden ebenfalls mit dem Lichtpolymerisationsgerät Unilux AC Licht polymerisiert. Das Kompomer (Dyract eXtra) wurden ebenfalls, wie oben beschrieben, in die Metallschablonen eingebracht und anschließend wie in der Verarbeitungsanweisung des Herstellers angegeben für zehn Sekunden polymerisiert. Für die Herstellung der Glasionomerzement-

Probekörper (Ketac Molar Aplicap, GC Fuji II LC Capsule) wurden Schablonen aus Dubliersilikon (siehe Abbildung 16) mit 10 mm Durchmesser und 2 mm Höhe (Deguform, DeguDent, Hanau, Deutschland) benutzt.



Abbildung 16 Herstellungsschablone für die Zementprobekörper.

Anschließend wurden alle Probekörper mit einem Poliergerät (Buehler-Metaserv, Buehler GmbH, Düsseldorf, Deutschland) und Schleifpapier aufsteigender Körnung von 600, 800 und 1000 (Bühler GmbH, Düsseldorf, Deutschland) unter ständiger Wasserzufuhr poliert. Bei diesem Vorgang wurde auch die bei der Polymerisation entstehende Sauerstoffinhibitionsschicht entfernt. Für jedes Material wurden somit 50 blasenfreie, standardisierte, gleichartig polierte Probekörper von 10 mm Durchmesser und 2 mm Höhe hergestellt. Probekörper, die nicht den Standardanforderungen entsprachen, wurden verworfen. Bis zu Ihrer Verwendung wurden die Probekörper getrennt nach Material in *aq. dest.* gelagert.

4.3 Rauheitsmessung

Zur Objektivierung der mittleren Oberflächenrauheit R_a wurden pro Material 10 Probekörper in dem Testschlittensystem (Perthometer S6P, Feinprüf Perthen GmbH, Göttingen, Deutschland) vermessen. Bei jedem Probekörper wurde die Messung drei Mal durchgeführt. Inklusive Vor- und Nachlauf wurde eine Distanz von 1,7 mm abgefahren, wobei die eigentliche Messstrecke 250 μm betrug. Alle Probekörper sollten R_a -Werte unter 0,08 μm aufweisen, um einen Einfluss der Oberflächenrauheit auf die bakterielle Adhäsion auszuschließen (siehe Kapitel 2.4.1). Bei den Zementproben war dieses Ziel aus materialtechnischen Gründen nicht erreichbar, weil die Hochglanzpolitur zu keinen niedrigeren Rauheitswerten führte. Hier wurden Werte bis 2,0 μm (GC Fuji II LC Capsule) bzw. bis 1,3 μm (Ketac Molar Aplicap) toleriert.

4.4 Hydrophobizitätsmessung

Die Hydrophobizität wurde mittels eines Goniometers bestimmt. Es wurden je Material 10 beliebige Probekörper ausgewählt und auf den Objektisch des Goniometers (P1 Goniometer, Erma Inc., Tokyo, Japan) gelegt. Auf jeden Probekörper wurden mit einer Pipette (Microlab RP, Hamilton, USA) zwei Tropfen aus 2 μl entionisiertem Wasser aufgebracht. Anschließend wurde jeweils der rechte und linke Kontaktwinkel mit Hilfe eines individuell adjustierbaren Fadenkreuzes nach genau 30 Sekunden gemessen.

4.5 Bakterielle Adhäsion

4.5.1 Agarplatten

Für diesen Versuch wurden pro Material sieben Probekörper verwendet. Diese wurden zunächst mit *aq. dest.* abgespült, mit Panasil (Panasil contact plus, Kettenbach Dental, Eschenburg, Deutschland) in 12er-Wellplatten (12 Well Cell Culture Cluster, Corning Inc., Corning NY, USA) eingeklebt und 24 h in 2 ml *aq. dest.* gelagert. Am Versuchstag wurde zuerst unter dem Durchlichtmikroskop das Bakterienwachstum in den beiden am Vortag angesetzten und über Nacht inkubierten Kulturen untersucht. Waren aktive Bakterien in den beiden Tubes nachweisbar, konnte der Versuch durchgeführt werden. Zunächst wurde das destillierte Wasser aus den Wellplatten abgesaugt und die Probekörper in den Platten mit je 1 ml Ethanol (Ethanol 70%, Merck, Darmstadt, Deutschland) versetzt, um eine bereits bestehende Kontamination mit Bakterien auszuschließen. Nach 30 Sekunden wurden die Probekörper wiederum zweimal mit *aq. dest.* gewaschen. Nun konnte je Probekörper 1 ml Bakterienlösung in die Vertiefungen eingebracht werden. Um der Verdunstung vorzubeugen, wurden die Wellplatten in eine feuchte Kammer gelegt. Die so präparierten Platten wurden für 2,5 h bei 37 °C auf dem Schüttelinkubator inkubiert. Damit die Agarplatten beim Ausstreichen nicht zu nass waren, wurden sie in der Sterilbank während der Inkubationszeit getrocknet. Nach der Inkubationszeit wurde die Bakterienlösung abgesaugt. Danach wurde jeder Probekörper zweimal mit 1 ml PBS gewaschen, um die nicht am Probekörper adhärenen Bakterien zu entfernen. Anschließend wurden die Probekörper aus den Wellplatten herausgelöst und in ein kleineres Tube (15 ml) mit je 2 ml isotoner Kochsalzlösung (NaCl, Merck, Darmstadt, Deutschland) überführt. Die adhärenen Bakterien wurden mittels Ultraschall (Sonifier W-450D, Branson Ultrasonics Corp., Danbury, USA) vom Probekörper gelöst (2 x 10 Sekunden).

Anschließend wurde der Ultraschallstab mit je 1 ml NaCl abgespült und die Lösung im jeweiligen Tube wieder aufgefangen, damit keine Bakterien verlorengehen konnten. Zwischen den Beschallungen der einzelnen Probekörper wurde der Stab zuerst in ein PS-Tube mit 70 % Ethanol, dann in zwei PS-Tubes mit destilliertem Wasser getaucht. Dieses Vorgehen verhinderte zum einen das Verschleppen von Bakterien in das nächste Tube, zum anderen das Abtöten der Bakterien im nächsten zu bearbeitenden Tube. Die vollständige Ablösung wurde am Rasterelektronenmikroskop (REM; Cambridge Stereoscan 240, LEO Elektronenmikroskopie GmbH, Oberkochen, Deutschland) überprüft (siehe Abbildung 17).

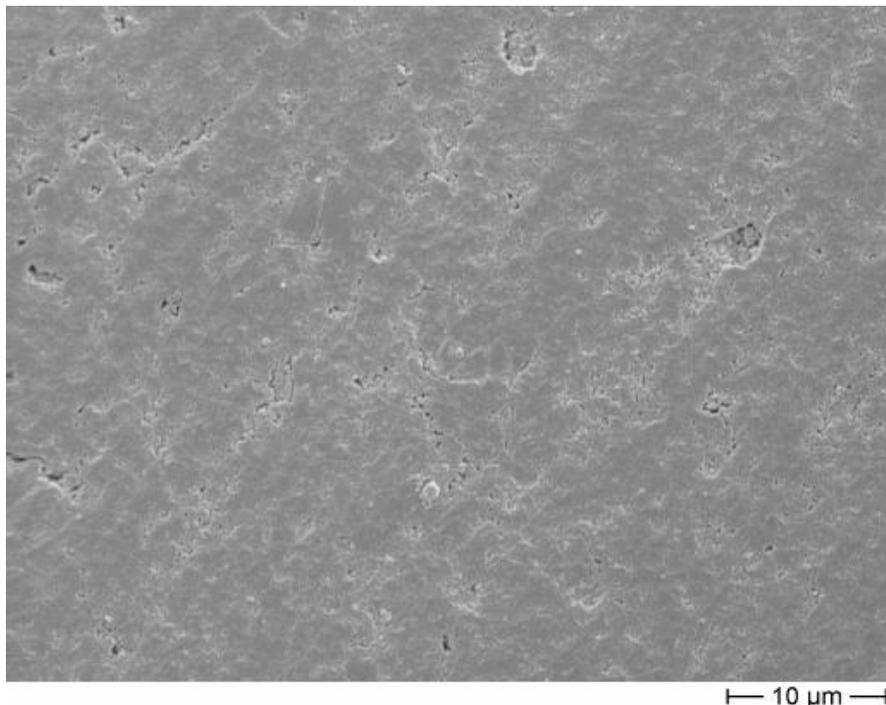


Abbildung 17. Bakterienfreie Oberfläche eines Probekörpers nach Ablösen der adhärennten Bakterien.

Nun konnte für jeden Probekörper eine Verdünnungsreihe hergestellt werden, wonach jeweils 0,5 ml des Inhalts in ein weiteres Tube mit 2 ml NaCl pipettiert wurden. So wurden pro Probekörper die Verdünnungen 1:100, 1:1000 und 1:10000 hergestellt. Von diesen Verdünnungen wurden jeweils 50 µl auf eine Agarplatte (Herstellung siehe Kapitel 4.1.2) pipettiert und mit einem

Drigalskispatel ausplattiert. Insgesamt wurden 147 Platten beimpft. Der Drigalskispatel wurde, um Sterilität zu gewährleisten, bevor er mit der Agarplatte in Berührung kam, in Ethanol getaucht und abgeflammt. Zusätzlich wurde er anschließend in gekühltes, steriles und destilliertes Wasser getaucht, damit ausgeschlossen werden konnte, dass Bakterien durch die Wärme des Spatels inaktiviert werden. Alle beimpften Agarplatten wurden in den Inkubator gestellt und fünf Tage bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die visuelle Auszählung der Kolonien. Von einigen der beimpften Agarplatten wurden zu Dokumentationszwecken Fotografien angefertigt (siehe Kapitel 5.3.3).

4.5.2 Fluorometrie

Pro Material wurden 15 Probekörper untersucht und bis auf das Material Glas zunächst für eine Woche in Wellplatten unter Lichtabschluss und in *aq. dest.* gelagert. Andere Studien zeigen, dass die Freisetzung von Restmonomeren innerhalb von 24 Stunden fast vollständig abgeschlossen ist (Ionescu 2015, Ferracane 1990). Die Freisetzung von für Bakterien giftigen Restmonomeren während des eigentlichen Versuchs wurde dadurch also nahezu ausgeschlossen. Zwei Tage vor dem Versuch wurde aus der Bakterien-Wochenkultur eine Versuchskultur angeimpft. Am Vortag wurden die Probekörper aus den Wellplatten genommen und auf Küchenpapier luftgetrocknet. Danach wurden die Probekörper in 24er-Wellplatten mit Panasil contact plus (Kettenbach Dental, Eschenburg, Deutschland) eingeklebt (siehe Abbildung 18). Die Probekörper wurden 1,5 h zur Desinfektion mit dem UV-Strahler der Sicherheitswerkbank (Herasafe HSP12, Heraeus, Hanau, Deutschland) bestrahlt und nach 30 min mit 1 ml sterilem PBS-Puffer versetzt, damit die Messung der Eigenfluoreszenz erfolgen konnte.

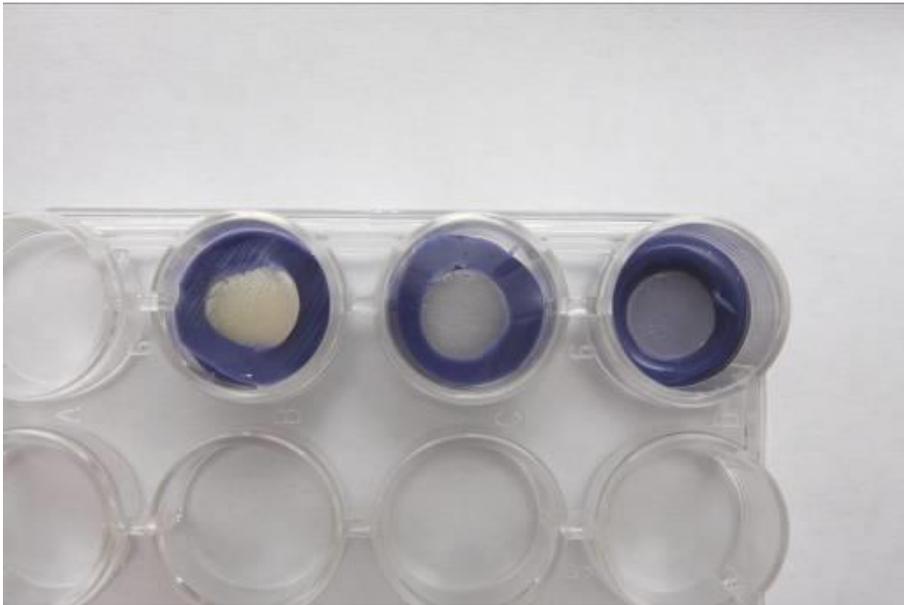


Abbildung 18. Einbetten der Probekörper in Silikonmasse in der Wellplatte.

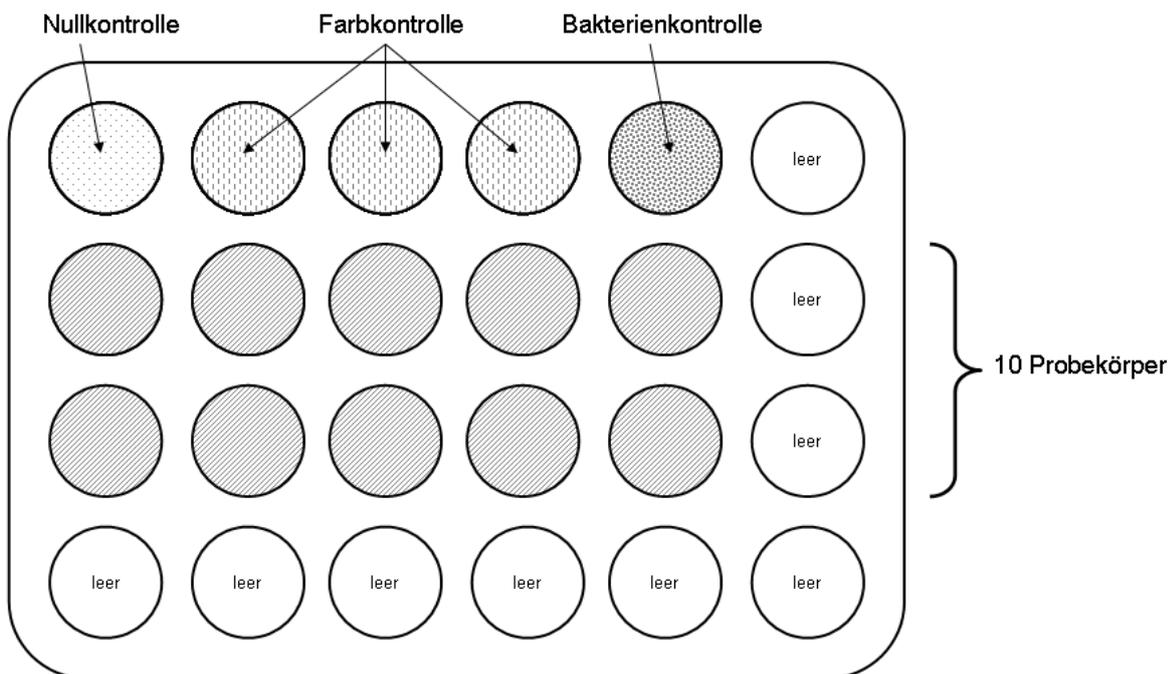


Abbildung 19. Anordnung der Probekörper in der Wellplatte.

Bei der Messung wurden die Probekörper immer nach dem gleichen Schema in den Wellplatten angeordnet (siehe Abbildung 19). Es wurden je Material fünf Kontrollen markiert. Diese bestanden aus einer Nullkontrolle mit ausschließlich

1 ml PBS-Puffer, drei Farbkontrollen mit 1 ml PBS Puffer und 15 µl Resazurin, sowie einer Bakterienkontrolle, die nur 1 ml der Bakterienkultur enthielt. Die Nullkontrolle dient dabei der Ermittlung der Eigenfluoreszenz des Probekörpers. Die Farbkontrollen geben die Eigenfluoreszenz des Farbstoffs wieder, die Bakterienkontrolle die Eigenfluoreszenz der Bakterien. Diese Kontrollen dienen der Feststellung der Eigenfluoreszenz des sich im Well befindenden Probekörpers, des PBS-Puffers, des Farbstoffs und der Bakterien. Bei den Kontrollen findet keine Umsetzung von Resazurin zu Resorufin statt, daher gibt es in diesen Wells auch keine Veränderung der Fluoreszenz. Die Kontrollen dienen der Ermittlung der im Well vorhandenen Hintergrundstrahlung. Sie muss von den Messwerten des eigentlichen Versuchs abgezogen werden, um eine Fluoreszenzveränderung ermitteln zu können, welche mit der Stoffwechselaktivität der Bakterien korreliert. Somit werden die Messergebnisse der einzelnen Materialien untereinander vergleichbar. Zur Ermittlung der tatsächlichen Stoffwechselaktivität der Bakterien wurden jeweils zehn Probekörper pro Material mit 1 ml Bakterienkultur und 15 µl Resazurin in den Wellplatten versetzt. Nur in diesen Wells fand während des Versuchs eine Veränderung der Fluoreszenz statt. Von den hier gemessenen Werten wurden die Messwerte der Nullkontrolle, der Bakterienkontrolle, und der Mittelwert der Messergebnisse der Farbkontrollen abgezogen. Das Ergebnis gab die tatsächliche Stoffwechselaktivität der Bakterien auf den Probekörpern wieder. Alle Wellplatten wurden anschließend in einer dunklen, feuchten Kammer auf dem Schüttelinkubator (G-25 Shaker Incubator New Brunswick Scientific Co. Inc, Edison, New Jersey, USA) bei einer Geschwindigkeit (54) für 2,5 h bei 37 °C inkubiert. Nach diesem Zeitraum wurden die Wells vollständig, vorsichtig und nur am Rand mit der aufrecht gehaltenen Pipettenspitze abgesaugt. Danach wurde zweimal mit PBS-Puffer gewaschen. Dabei war darauf zu achten, dass der Puffer am Rand der Wellplatte langsam hinab lief bzw. wie oben beschrieben wieder abgesaugt

wurde, um zu verhindern, dass adhärenente Bakterien wieder aufgewirbelt werden. Es sollten lediglich die nicht adhärirten Bakterien und der überschüssige Farbstoff entfernt werden. Die Fluoreszenzmessung erfolgte mit jeweils 1 ml PBS im Mikropplatten-Reader (Fluorstar-Optima, BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland).

4.5.3 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Außer den Kontrollen wurden alle Probekörper auf Träger aufgeklebt (Alu-Stubs, Provac GmbH, Oestrich Winkel, Deutschland und UHU Silikon, UHU GmbH & Co. KG, Bühl, Deutschland) und mit Goldstaub (Balzerunion SCD 040, Balzer Union Limited, Balzers, Liechtenstein) besputtert (siehe Abbildung 20).



Abbildung 20. Besputterter Probekörper vor der REM-Untersuchung.

Erst dann konnten die auf diese Weise vorbehandelten Proben in das Rasterelektronenmikroskop eingeschleust und unter genormten Bedingungen (WD 23 mm, AV 10 kW, 100fache Vergrößerung) vermessen werden. Um zu gewährleisten, dass die Oberfläche der Proben gleichmäßig erfasst wird, wurde diese in neun Areale (siehe Abbildung 21) eingeteilt. Es wurde von der Mitte des jeweiligen Areals eine Aufnahme mit einer Größe von 42 x 55 µm gemacht. Dies entspricht einer Fläche von 2184 µm². Insgesamt wurden auf diese Weise neun Aufnahmen je Probekörper angefertigt.

REM - Schema

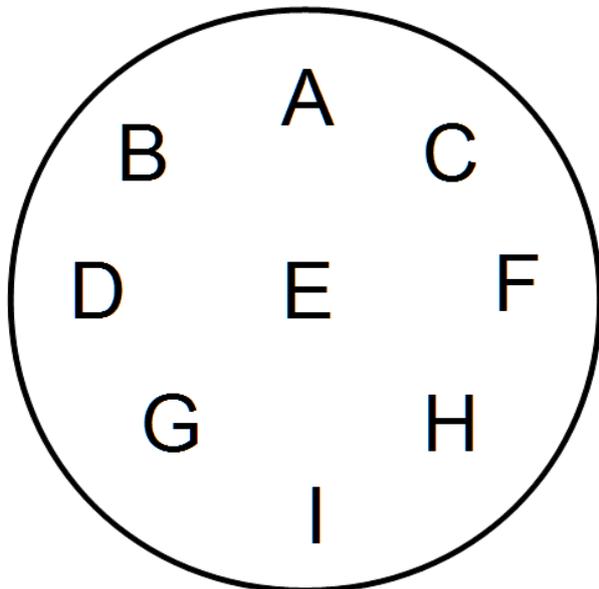


Abbildung 21. Unterteilung des Probekörpers für die REM-Bilder.

Die so entstandenen rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden mit dem Bildanalyseprogramm Optimas 6.2 (Optimas Corp., Bothell, USA) ausgewertet. Es wurde die gesamte im REM entstandene Aufnahme im Modus „32 bit Grey“ analysiert. *S. mutans* erscheint auf den Aufnahmen heller als die Oberfläche der Probekörper. Es wurde mit Hilfe eines Reglers im Programm ein Schwellenwert für den Grauwert der Schwarz-Weiß-Aufnahme festgelegt, der eine möglichst genaue Unterscheidung von Probekörperoberfläche und den

anhaftenden Bakterien ermöglichte. So wurde die Aufnahme aus dem REM in zwei Flächenanteile klassifiziert, nämlich die besiedelte und die nicht besiedelte Oberfläche. Das Messergebnis war ein Prozentwert, der das Verhältnis von besiedelter zu unbesiedelter Oberfläche angab.

4.6 Statistik

Für die statistische Auswertung und graphische Darstellung der Versuche wurden die Programme SPSS für Windows (Version 12.0, SPSS Inc., Chicago, USA) und das Tabellenkalkulationsprogramm Excel (Version 2003, Microsoft Cooperation, Redmond, USA) verwendet. Die statistische Analyse zur Bestimmung von Unterschieden bezüglich Rauheit und Kontaktwinkel zwischen den Materialien erfolgte mit dem Mann-Whitney U-Test auf dem Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$. Für die Auswertung der REM-Aufnahmen wurde der Tukey Test mit einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ zum Vergleich einer großen Anzahl an Materialpaaren angewandt. Zur graphischen Darstellung der zentralen Tendenzen wurden die Medianwerte sowie die 25%- und 75%- Perzentile ermittelt.

5 Ergebnisse

5.1 Rauheit (arithmetische Mittenrauwerte R_a)

Die Ergebnisse der Perthometermessung sind in Tabelle 2 und in Abbildung 22 zusammengefasst, der Signifikanznachweis in Tabelle 3. GC Fuji II LC zeigte die höchsten Rauheitswerte (Medianwert $0,97 \mu\text{m}$) mit statistisch signifikanten Unterschieden zu allen anderen Testmaterialien ($p < 0,001$ für alle Vergleiche; $n = 6$). Es folgte Ketac Molar ($0,47 \mu\text{m}$), welches wiederum signifikant rauer war als Tetric EvoCeram ($0,04 \mu\text{m}$), Filtek Supreme XT ($0,04 \mu\text{m}$), Dyract eXtra ($0,04 \mu\text{m}$), das Referenzmaterial Glas ($0,04 \mu\text{m}$) und das Referenzmaterial Sinfony ($0,04 \mu\text{m}$) ($p < 0,001$ für alle Vergleiche; $n = 5$). Zwischen den fünf Materialien mit den niedrigen R_a -Werten lagen keine statistisch signifikanten Unterschiede vor ($p > 0,05$ für alle Vergleiche; $n = 10$).

	Material	Perzentile		
		25	50	75
1	Tetric EvoCeram	0,04000	0,04000	0,08500
2	Filtek Supreme XT	0,04000	0,04000	0,05075
3	Ketac Molar	0,43150	0,46650	0,55700
4	GC Fuji II LC	0,78150	0,97200	1,15575
5	Dyract eXtra	0,04000	0,04000	0,04000
6	Glas	0,04000	0,04000	0,04000
7	Sinfony	0,04000	0,04000	0,04000

Tabelle 2. Arithmetische Mittelrauheiten [μm], Medianwerte, 25%- und 75%-Perzentile.

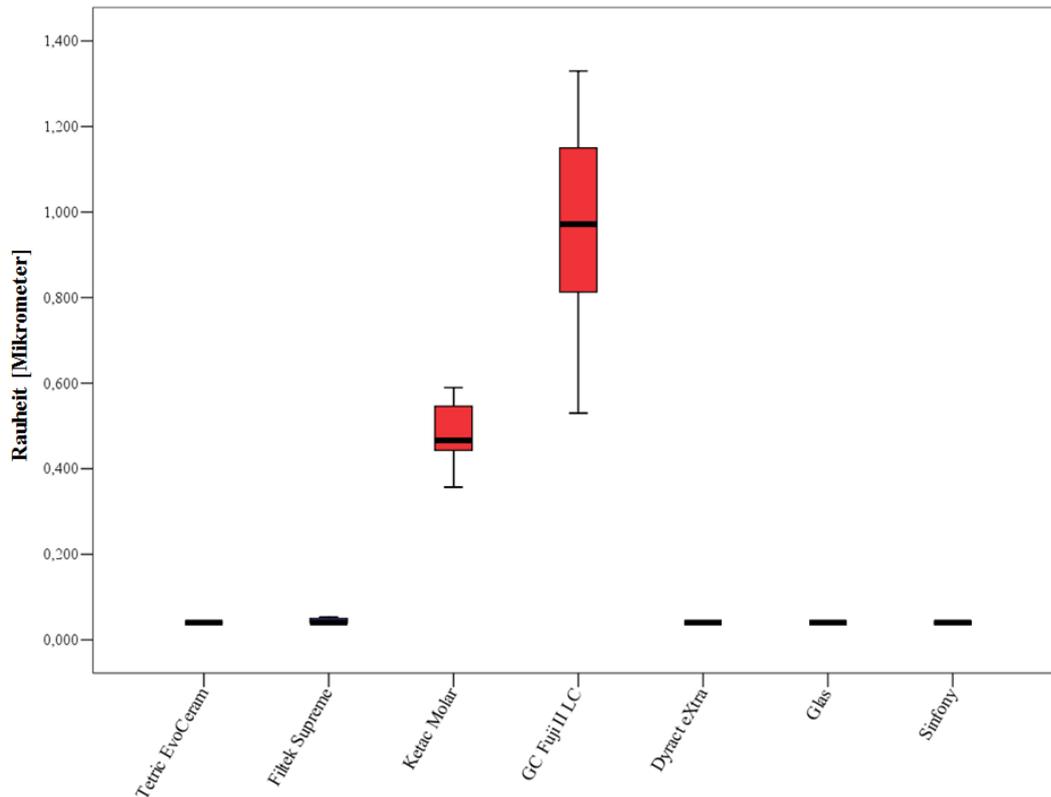


Abbildung 22. Grafische Darstellung der Ergebnisse der Rauheitsmessung: Medianwerte, 25%- und 75%-Perzentile.

Material \ Material		Material					
		2	3	4	5	6	7
1	Tetric EvoCeram	0,912	<0,001*	<0,001*	0,684	0,315	0,684
2	Filtek Supreme XT		<0,001*	<0,001*	0,529	0,165	0,981
3	Ketac Molar			<0,001*	<0,001*	<0,001*	<0,001*
4	GC Fuji II LC				<0,001*	<0,001*	<0,001*
5	Dyract eXtra					0,481	0,971
6	Glas						0,481
7	Sinfony						

Tabelle 3. P-Werte für die Perthometermessung: Mann-Whitney U-Test: $\alpha = 0,05$; mit * markierte Werte kennzeichnen signifikante Unterschiede.

5.2 Hydrophobizitäten (Kontaktwinkel)

Die Ergebnisse der Goniometermessung sind in Tabelle 4 und Abbildung 23 dargestellt. Gemessen wurde jeweils der Kontaktwinkel Θ . Sinfony wies den größten Kontaktwinkel (Medianwert 75°) und damit die geringste Benetzbarkeit auf.

	Material	Perzentile		
		25	50	75
1	Tetric EvoCeram	56,3	58,0	61,8
2	Filtek Supreme XT	46,5	50,0	54,8
3	Ketac Molar	16,3	18,0	23,8
4	GC Fuji II LC	13,0	15,0	17,0
5	Dyract eXtra	53,0	54,5	58,5
6	Glas	51,0	54,0	57,0
7	Sinfony	69,3	75,0	80,0

Tabelle 4. Perzentile der gemessenen arithmetischen Mittelwerte der Kontaktwinkel [°]: Medianwerte, 25%- und 75%- Perzentile.

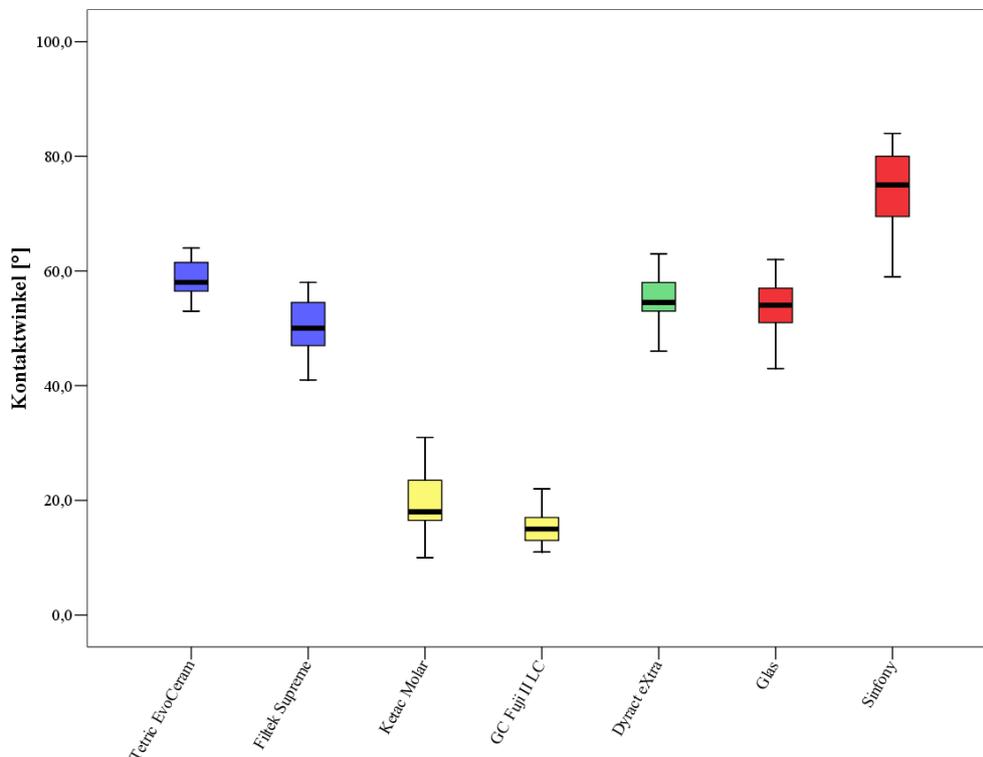


Abbildung 23. Grafische Darstellung der gemessenen Kontaktwinkel: Medianwerte, 25%- und 75%-Perzentile.

Der Unterschied zu den anderen Materialien war signifikant ($p < 0,001$ für alle Vergleiche; $n = 6$) (siehe Tabelle 5).

	Material	1	2	3	4	5	6
1	Tetric EvoCeram						
2	Filtek Supreme XT	<0,001*					
3	Ketac Molar	<0,001*	<0,001*				
4	GC Fuji II LC	<0,001*	<0,001*	0,006*			
5	Dyract eXtra	0,014*	0,003*	<0,001*	<0,001*		
6	Glas	<0,001*	0,063	<0,001*	<0,001*	0,314	
7	Sinfony	<0,001*	<0,001*	<0,001*	<0,001*	<0,001*	<0,001*

Tabelle 5. P-Werte der Kontaktwinkelmessung: Mann-Whitney U-Test: $\alpha = 0,05$; mit * markierte Werte kennzeichnen signifikante Unterschiede.

Die beiden GIZ wiesen mit einem Kontaktwinkelmedian von 15° (GC Fuji II LC) bzw. 18° (Ketac Molar) die größte Benetzbarkeit und somit die geringste Hydrophobizität auf. Der Unterschied war auch hier signifikant ($p < 0,001$; $n = 2$). Bei Tetric EvoCeram wurde eine höhere Hydrophobizität beobachtet (58°), der Kontaktwinkel war zu allen Materialien signifikant unterschiedlich ($p < 0,001$ für alle Vergleiche; $n = 6$). Filtek Supreme XT (50°) und Dyract eXtra ($54,5^\circ$) wiesen untereinander sowie zum Referenzmaterial Glas (54°) keinen signifikanten Unterschied auf, jedoch zu den anderen Materialien ($p < 0,001$; $n = 4$).

5.3 Bakterienadhäsionsversuche

5.3.1 Fluorometrie

Die Ergebnisse der Fluoreszenzmessung wurden in Tabelle 6 und Abbildung 24 dargestellt, der Signifikanznachweis (Tukey Test, $\alpha = 0,05$) in Tabelle 7. Ein höherer Fluoreszenzwert bedeutet bei diesem Versuch eine höhere Anzahl von Bakterien auf dem Probekörper. Die bei Tetric EvoCeram gemessenen

Fluoreszenzwerte waren signifikant unterschiedlich zu den Werten bei Filtek Supreme XT, Sinfony, Dyract eXtra, GC Fuji II LC und Ketac Molar ($p < 0,05$; $n = 5$), nicht jedoch zum Testmaterial Glas ($p > 0,05$; $n = 1$). Bei den Messwerten von Filtek Supreme XT konnte ein signifikanter Unterschied zu denen von Tetric EvoCeram, Ketac Molar, GC Fuji II LC und Glas festgestellt werden ($p < 0,05$; $n = 4$). Zwischen den Messergebnissen bei Sinfony und Dyract eXtra bestand kein signifikanter Unterschied ($p > 0,05$; $n = 2$). Der niedrigste Fluoreszenzwert bezogen auf den im Versuch bestimmten Median konnte bei Ketac Molar mit 0,0 bestimmt werden, mit signifikantem Unterschied zu den Werten bei den anderen Materialien ($p < 0,05$; $n = 6$). Die Ergebnisse bei GC Fuji II LC wiesen ausschließlich zu Dyract eXtra keinen signifikanten Unterschied auf ($p > 0,05$; $n = 1$), zu allen anderen Materialien bestand ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$; $n = 5$). Für das Kompomer Dyract eXtra konnten zu Tetric EvoCeram, Ketac Molar und Glas signifikant unterschiedliche Werte bestimmt werden ($p < 0,05$; $n = 3$), nicht jedoch zu den Ergebnissen bei den anderen Materialien ($p > 0,05$; $n = 3$). Die geringste Streuung der Fluoreszenzwerte konnte beim Referenzmaterial Glas bestimmt werden, gefolgt von Tetric EvoCeram (siehe Abbildung 24). Sie wiesen zu den Werten bei Tetric EvoCeram keinen signifikanten Unterschied auf ($p > 0,05$; $n = 1$). Zu den Ergebnissen bei den anderen Materialien bestand ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$; $n = 5$). Die Fluoreszenzwerte bei Sinfony waren zu denen bei Tetric EvoCeram, Ketac Molar, GC Fuji II LC und Glas signifikant unterschiedlich ($p < 0,05$; $n = 4$), nicht jedoch zu denen bei Filtek Supreme XT und Dyract eXtra ($p > 0,05$; $n = 2$).

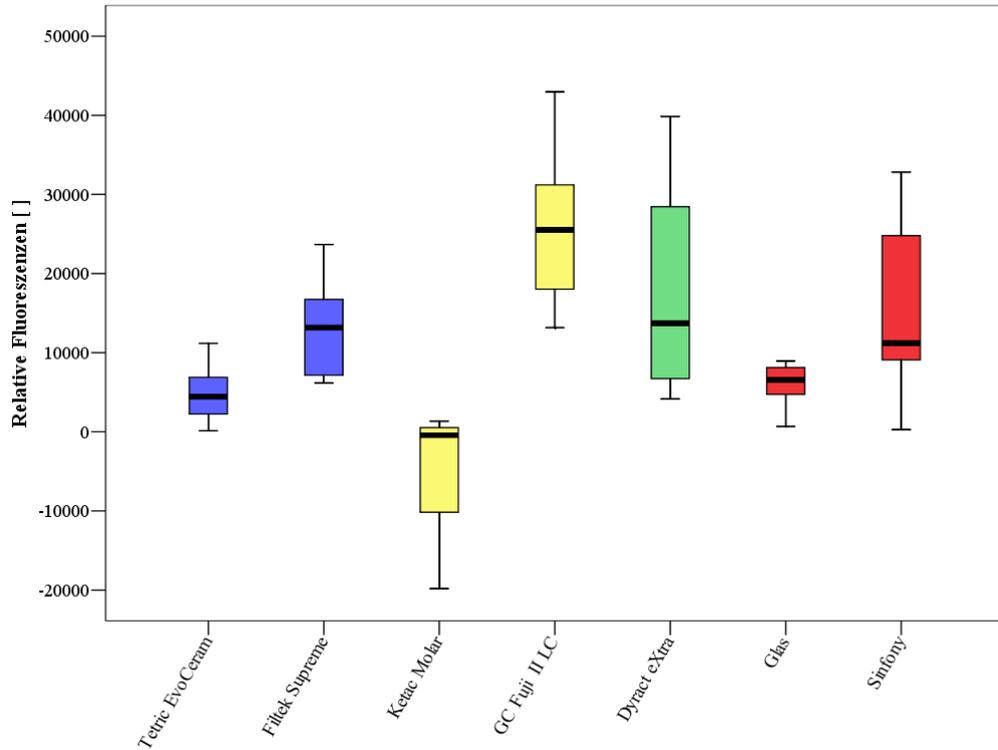


Abbildung 24. Grafische Darstellung der Fluoreszenzmessung: Medianwerte, 25%- und 75%-Perzentile.

	Material	Perzentile		
		25	50	75
1	Tetric EvoCeram	1831	4461	7958
2	Filtek Supreme	7017	13164	18470
3	Ketac Molar	0	0	709
4	GC Fuji II LC	17013	25536	33356
5	Dyract eXtra	6457	13694	29857
6	Glas	4312	6553	8335
7	Sinfony	8803	11184	25652

Tabelle 6. Perzentile der gemessenen Fluoreszenzwerte: Medianwerte, 25%- und 75%- Perzentile.

Material		1	2	3	4	5	6	7
1	Filtek Supreme	/	0,971	0,011*	0,853	0,000*	0,019*	0,009*
2	Sinfony		/	0,019*	0,739	0,000*	0,019*	0,019*
3	Tetric EvoCeram			/	0,023*	0,035*	0,002*	0,143
4	Dyract eXtra				/	0,000*	0,218	0,035*
5	Ketac Molar					/	0,000*	0,000*
6	GC Fuji II LC						/	0,000*
7	Glas							/

Tabelle 7. Signifikanzniveaus Fluorometrie: Tukey Test; $\alpha = 0,05$; mit * markierte Werte kennzeichnen signifikante Unterschiede.

5.3.2 Rasterelektronenmikroskopie

Bei diesem Versuch stellte das Messergebnis einen Prozentwert, der das Verhältnis von besiedelter zu unbesiedelter Oberfläche angab, dar (siehe Kapitel 4.5.3). In Tabelle 8 wurde jeweils der Mittelwert über alle Messwerte eines Materials angegeben. Die Signifikanzniveaus der Ergebnisse wurden in Tabelle 9 zusammengefasst.

	Material	N	Mittelwert	Standardabweichung
1	Tetric EvoCeram	75	16,9	10,0
2	Filtek Supreme XT	72	16,6	4,8
3	Ketac Molar	27	21,8	4,8
5	Dyract eXtra	90	10,8	5,9
6	Glas	90	22,4	15,0
7	Sinfony	90	11,1	6,5

Tabelle 8. Mittelwerte der Besiedlungsdichte mit Standardabweichung.

Material		Material					
		1	2	3	4	5	6
1	Tetric EvoCeram	/	1,000	0,160	0,000*	0,002*	0,001*
2	Filtek Supreme		/	0,126	0,001*	0,001*	0,002*
3	Ketac Molar			/	0,000*	0,999	0,000*
4	Dyract eXtra				/	0,000*	1,000
5	Glas					/	0,000*
6	Sinfony						/

Tabelle 9. Signifikanzniveaus der Ergebnisse des REM-Versuchs: Tukey Test; $\alpha = 0,05$; mit * markierte Werte kennzeichnen signifikante Unterschiede.

5.3.2.1 Glas

Das Material mit einem der höchsten gemessenen Mittelwerte der Besiedlungsdichte war Glas (22,4), bei einer relativ hohen Standardabweichung von 15,0. Bei Betrachtung der Abbildungen waren große Kolonien und weniger dicht besiedelte Areale zu erkennen. Außerdem zeigten sich Bläschen, die sich durch Erhitzung im REM unter der Goldschicht bildeten (siehe Abbildung 25 und Abbildung 26).

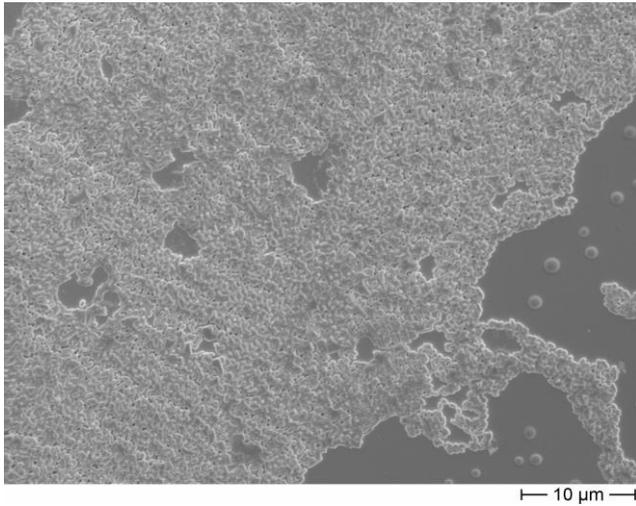


Abbildung 25. Koloniales Wachstum von *S. mutans* auf einem Glas-Probekörper.

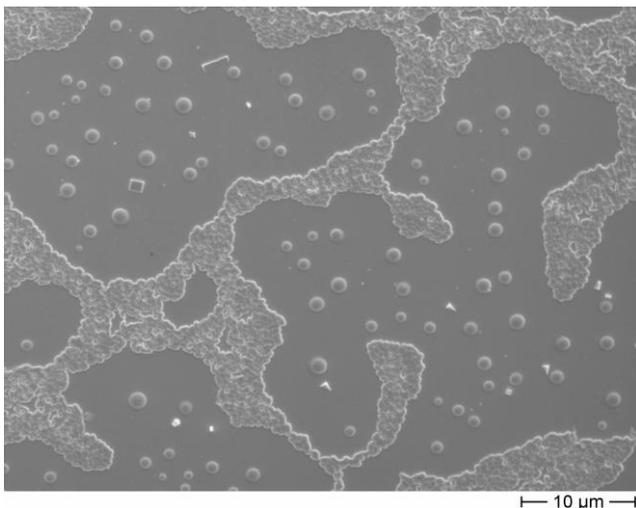


Abbildung 26. Hitzebläschen in der Goldbeschichtung und verzweigtes Wachstumsmuster auf einem Glas-Probekörper.

5.3.2.2 Ketac Molar

Auf Grund der Gasentwicklung bei Ketac Molar konnten nur bei drei Probekörpern Aufnahmen in ausreichender Bildqualität erstellt werden. Dies muss bei der Betrachtung der statistischen Ergebnisse berücksichtigt werden. Das Material wies nach Auswertung der Fotografien mit 21,8 einen ähnlich hohen Mittelwert der Besiedlungsdichte wie Glas auf. Die Standardabweichung lag dabei mit 4,8 deutlich niedriger. Auf den Bildern war die raue Oberfläche deutlich zu erkennen. Die Abbildungen erwiesen sich als homogen, somit war eine relativ geringe Standardabweichung festzustellen, da immer ein ähnlicher Schwellenwert festgelegt werden konnte (siehe Abbildung 27 und Abbildung 28).

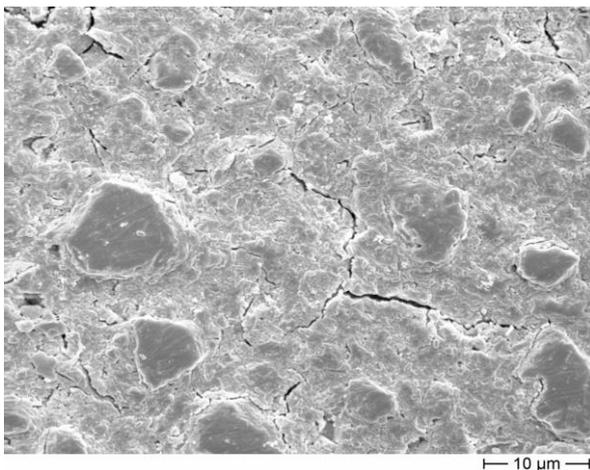


Abbildung 27. Raue Oberfläche von Ketac Molar.

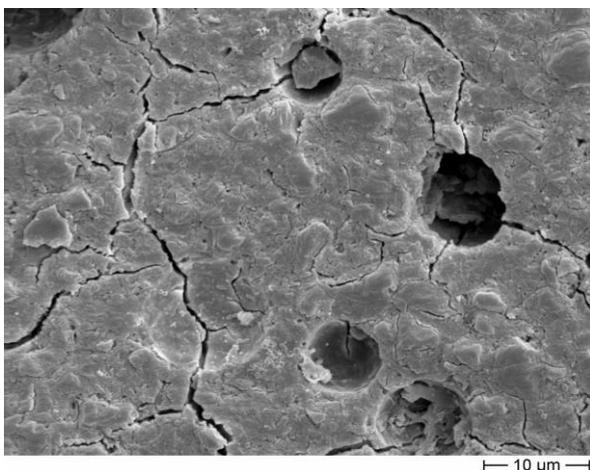


Abbildung 28. Durch Politur von Füllkörpern entstandene Kavitäten.

5.3.2.3 GC Fuji II LC

Dieser GIZ konnte wegen der Gasentwicklung im REM nicht untersucht werden, da sich kein Vakuum herstellen ließ.

5.3.2.4 Dyract eXtra

Obwohl bei der Perthometermessung kein signifikanter Unterschied zu Glas festgestellt werden konnte, war auf den REM-Aufnahmen eine deutlich strukturiertere Morphologie der Oberfläche zu erkennen. Die Bakterien wuchsen nicht wie auf Glas in verzweigten Strukturen, sondern verteilten sich gleichmäßig über die Probekörper. Der Mittelwert der Besiedlungsdichte wurde mit 10,8 bestimmt (siehe Abbildung 29).

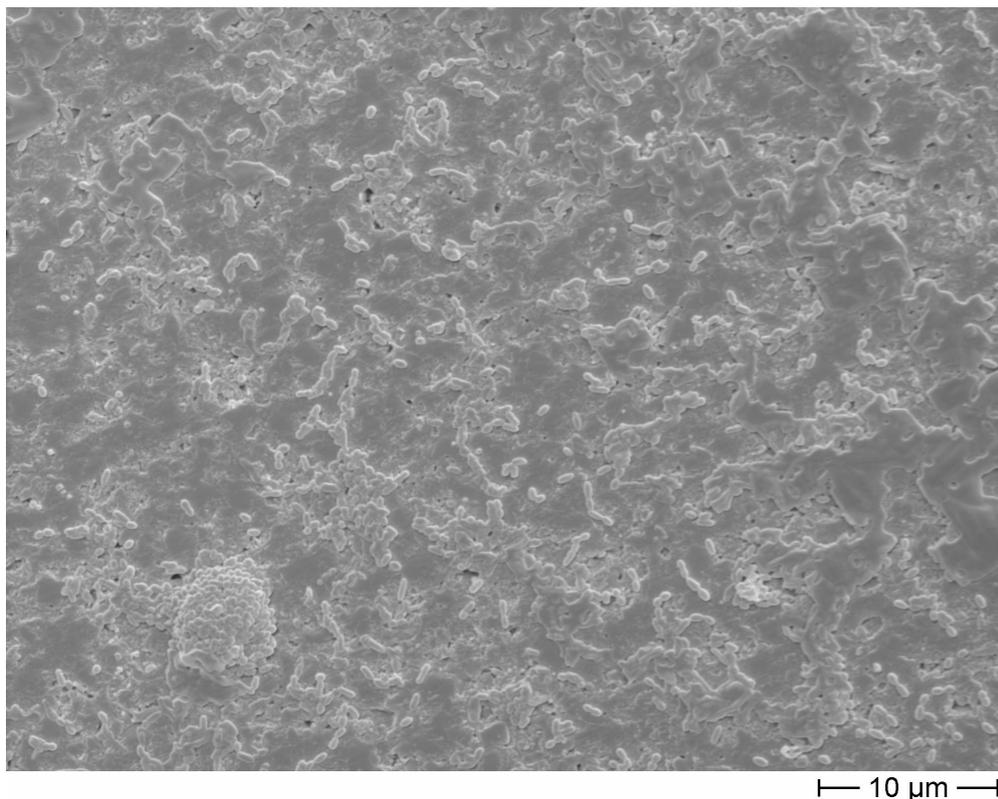


Abbildung 29. Bakterienwachstum auf Dyract eXtra.

5.3.2.5 Sinfony

Für das Material Sinfony ergab die Messung einen Mittelwert der Besiedlungsdichte von 11,1. Deutlich sichtbar war die im Vergleich zu Glas rauere Oberfläche, obwohl die Perthometermessung keine Signifikanz zeigte. Allerdings waren keine Kavitäten wie bei Ketac Molar nachweisbar. Auch auf Sinfony konnte wie auf Glas eine verzweigte Wachstumsstruktur festgestellt werden (siehe Abbildung 30).

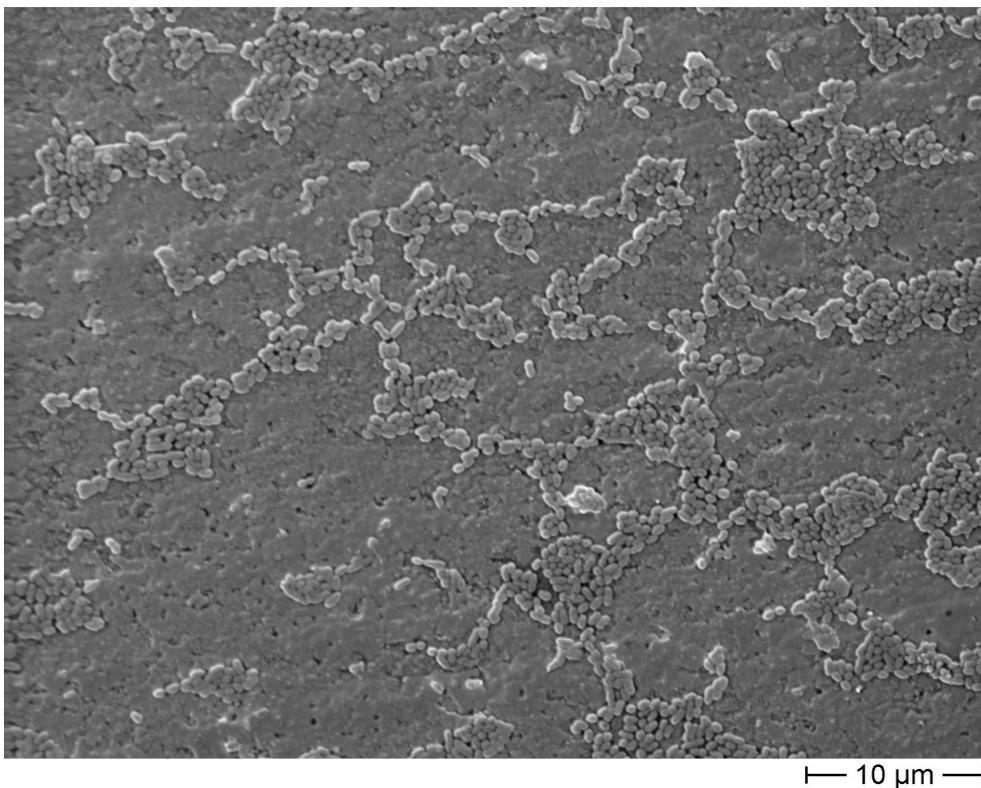


Abbildung 30. Verzweigtes Wachstumsmuster auf Sinfony.

5.3.2.6 Tetric EvoCeram

Tetric EvoCeram wies eine durchgehend glatte Oberfläche auf. Wie bei Glas waren auch hier Areale mit Kolonien, verzweigtem Wachstumsmuster und unbesiedelte Flächen erkennbar (siehe Abbildung 31 und Abbildung 32). Dennoch war der gemessene Mittelwert von 16,7 signifikant niedriger als bei den Glas-Probekörpern (siehe Tabelle 9).

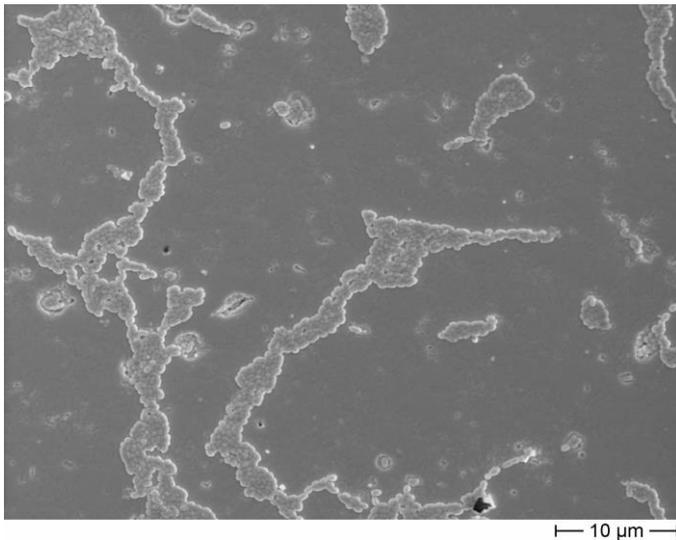


Abbildung 31. Verzweigtes Wachstumsverhalten auf Tetric EvoCeram.

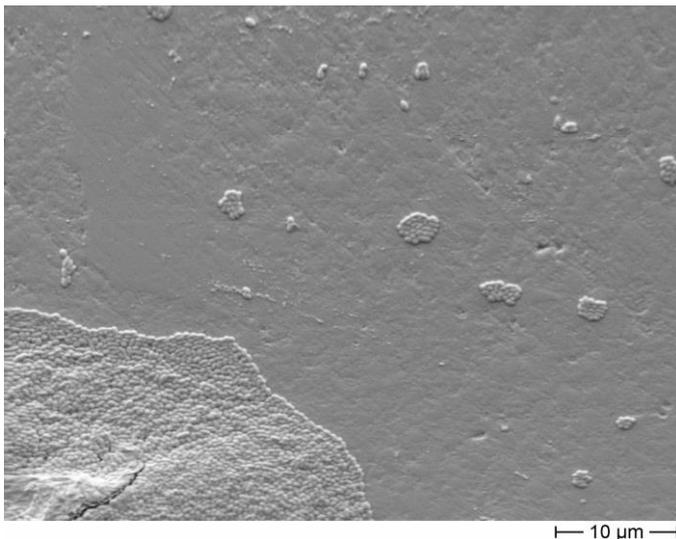


Abbildung 32. Koloniales Wachstum und wenig besiedelte Areale.

5.3.2.7 Filtek Supreme XT

Auch Filtek Supreme XT zeigte glatte Oberflächen. Bei der Messung wurde ein Mittelwert der Besiedlungsdichte von 16,6 festgestellt. Auf den REM-Bildern waren keine großen Kolonien wie auf Glas oder Sinfony erkennbar. *S. mutans* wuchs eher in kleinen Kolonien oder war mit vereinzelt Zellen gleichmäßig verteilt. Verzweigtes Wachstum konnte ebenfalls ansatzweise beobachtet werden (siehe Abbildung 33 und Abbildung 34).

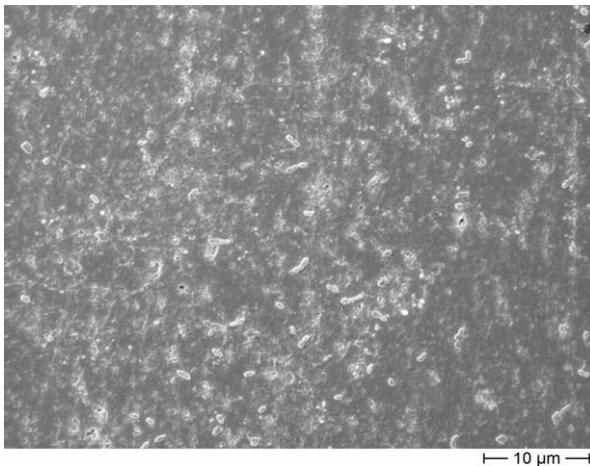


Abbildung 33. Verteilung einzelner Zellen auf Filtek Supreme XT.

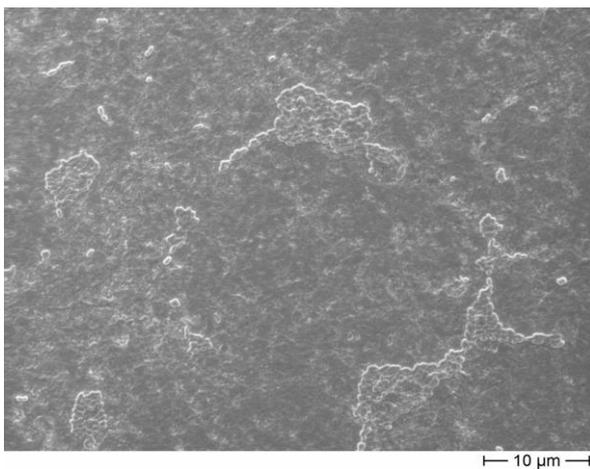


Abbildung 34. Verzweigtes Wachstumsmuster auf Filtek Supreme XT.

5.3.3 Agarplatten

Bei diesem Versuch war die Anzahl der auswertbaren Daten im Vergleich zu den anderen Versuchen gering, weshalb auf eine statistische Untersuchung der Unterschiede zwischen den einzelnen Materialien verzichtet wurde. Stattdessen werden die reinen Mittelwerte dargestellt. Das Wachstum auf den Agarplatten entsprach den zu erwartenden Ergebnissen auf Grund der Verdünnungsreihe (siehe Abbildung 35).



Abbildung 35. Beispiel für koloniales Wachstum auf Agarplatten: dargestellt sind von links nach rechts die Ergebnisse der Verdünnungsreihe 1:100, 1:1000, 1:10000. *S. mutans* wurde auf Dyract eXtra inkubiert.

Bei allen Verdünnungen zeigten Glas, Ketac Molar und Sinfony die höchste Besiedlung (siehe Abbildung 36). Glas zeigte mit Abstand die meisten Kolonien (Mittelwerte für die jeweilige Verdünnung: 505,71 Kolonien bei Verdünnung 1:100; 97,71 bei 1:1000 und 8,71 bei 1:10000). Bei Glas war auch der Zusammenhang zwischen der Verdünnung und der auf dem Probekörper vorhandenen Bakterienanzahl am deutlichsten ausgeprägt. Die logarithmische Skala zeigte eine mit der Verdünnung der Bakterienlösung deutlich abnehmende Besiedlung (siehe Abbildung 36). Bei den Verdünnungen mit geringer Konzentration wurde bei den Materialien mit hoher Bakteriendichte (Glas, Ketac Molar und Sinfony) ein direkter Zusammenhang zwischen der Verdünnung und dem Mittelwert der gezählten Kulturen festgestellt. Bei einer Verdünnung um den

Faktor 10 nahm der Mittelwert hier bei allen drei Materialien um den gleichen Faktor ab. Bei den Materialien Dyract eXtra, Tetric EvoCeram, Filtek Supreme XT und GC Fuji II LC war die Bakteriendichte bei diesem Versuch durchgehend geringer als bei den übrigen Materialien. Unterschiede in der Bakterienkonzentration zeigten sich so nur bei der geringsten Verdünnung 1:100. Dyract eXtra zeigte hier die höchste Anzahl an sichtbaren Kolonien. Bei höheren Verdünnungen war die Bakterienkonzentration so gering, dass keine sinnvolle Interpretation der Unterschiede hinsichtlich der Koloniedichte möglich war.

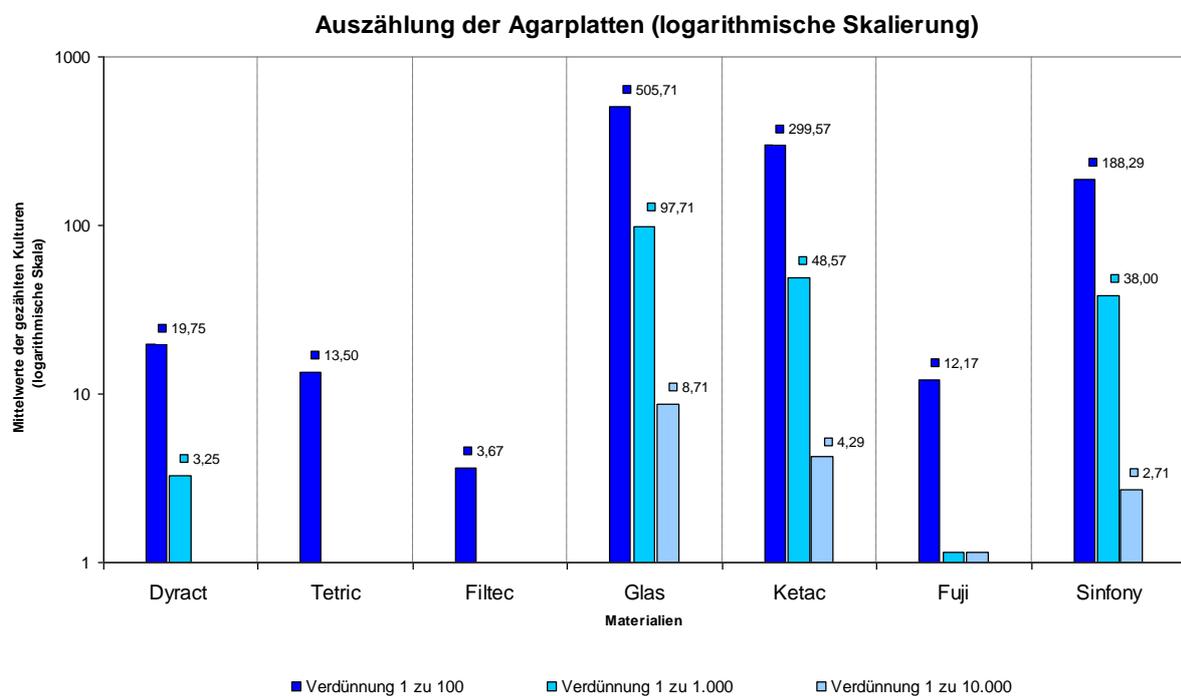


Abbildung 36. Auszählung der Kulturen auf den Agarplatten. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert der ausgezählten Kolonien; für alle Materialien galt $n = 7$.

6 Diskussion

6.1 Zielsetzung der Arbeit

Der Fokus dieser Arbeit lag auf dem Vergleich der Untersuchungsmethoden für bakterielle Adhäsion (bildgebende Verfahren, Kultivierung auf Agarplatten und Fluoreszenznachweise). Es konnten deutliche Unterschiede hinsichtlich der Durchführbarkeit, des zeitlichen und logistischen Aufwandes und der Eignung für unterschiedliche Materialien festgestellt werden. *S. mutans* ist kein typischer Primärbesiedler, er bindet in Adhäsionsversuchen daher besser an nicht mit Speichel beschichtete Probekörper (Ionescu 2015). Deshalb, und weil der Fokus dieser Arbeit auf der Beurteilung und dem Vergleich der Untersuchungsmethoden lag, wurde auf die Simulation des Pellikels verzichtet. Die Ergebnisse dieser Arbeit erlauben deshalb keine Rückschlüsse auf die Besiedlungsstruktur *in situ*, da das Pellikel die Struktur des Biofilms maßgeblich beeinflusst (Marsh 2016). Mehrere Studien beschäftigen sich außerdem zunehmend mit der Bedeutung der Oberflächentopographie als zusätzlichen Faktor bei der Adhäsion (Ionescu 2015, Wang 2015, Whitehead 2006). Es gibt sogar Ansätze, wie Materialien mit Mikrostrukturen versehen werden können, um die Adhäsion gezielt zu verhindern (Frenzel 2016). Deshalb wurden in den REM-Aufnahmen deutlich sichtbare Eigenschaften der Oberflächentopographie in die Diskussion der REM-Aufnahmen mit einbezogen.

6.2 Eignung der Methoden hinsichtlich der Materialien

Jedes Material wurde hinsichtlich der Adhäsion mit jeder der drei Methoden untersucht. Aus dem Vergleich der Ergebnisse lassen sich Rückschlüsse auf die Eignung der Methode für das spezifische Material ziehen. Darüber hinaus konnten Beobachtungen gemacht werden, inwieweit materialspezifische Eigen-

schaften die Aussagekraft der jeweiligen Methode beeinflussen. Dabei wird vorausgesetzt, dass die Adhäsionsvorgänge auf den einzelnen Materialien immer gleich verlaufen und Unterschiede in den Ergebnissen innerhalb eines Materials auf die Untersuchungsmethode zurückzuführen sind.

6.2.1 Glas

Das Referenzmaterial Glas wies im Vergleich zu den anderen untersuchten Materialien einen der niedrigsten Werte für Rauheit auf (mediane Rauheit 0,04) und zeigte einen hohen Kontaktwinkelmedian (54°). Durch den Fluoreszenztest ließ sich nur ein geringes Bakterienwachstum feststellen, was auf Grund der Materialeigenschaften plausibel ist. Auffällig ist im Agarplattenversuch ein im Vergleich zu den anderen Materialien ausgeprägtes Wachstum auf den Glasprobekörpern. Dies lässt sich durch die sehr glatte Oberfläche erklären, die eine mechanisch stabile Adhäsion von Zellen an der Probekörperoberfläche erschwerte. Es ist anzunehmen, dass durch den Ultraschall ein höherer Prozentsatz der angelagerten Bakterien gelöst werden konnte als bei raueren Materialien. Dies lässt folglich vermuten, dass bei anderen Materialien einzelne Bakterienzellen nach Anwendung des Ultraschalls auf den Probekörpern haften blieben (Van den Driessche 2014, Müller 2007). Bei der Auswertung der REM-Bilder in Optimas trat eine hohe Streuung auf. Betrachtete man die Probekörper im REM direkt, waren deutliche Unterschiede in der Besiedlungsstruktur zu erkennen. Je nach Auswahl des Bildausschnitts traf man entweder einen Bereich mit hoher Zellzahl oder einen Bereich mit wenig Besiedlung. Dies erklärt sich durch die Neigung von *S. mutans*, auf diesem Material in großen Kolonien zu wachsen. Hier liegt die Vermutung nahe, dass sich der Testkeim leichter an andere Bakterien anlagern kann, als an das glatte Material Glas. Außerdem war es in diesem Verfahren nicht möglich, zwischen Bakterien und hitzebedingten

Verformungen der Goldbeschichtung (siehe Abbildung 37) sicher zu unterscheiden. Man erhielt also ein falsch positives Ergebnis im REM-Versuch. Auf Grund dieser Beobachtungen liefert die Fluorometrie die plausibelsten Ergebnisse für die Besiedlung mit *S. mutans*.

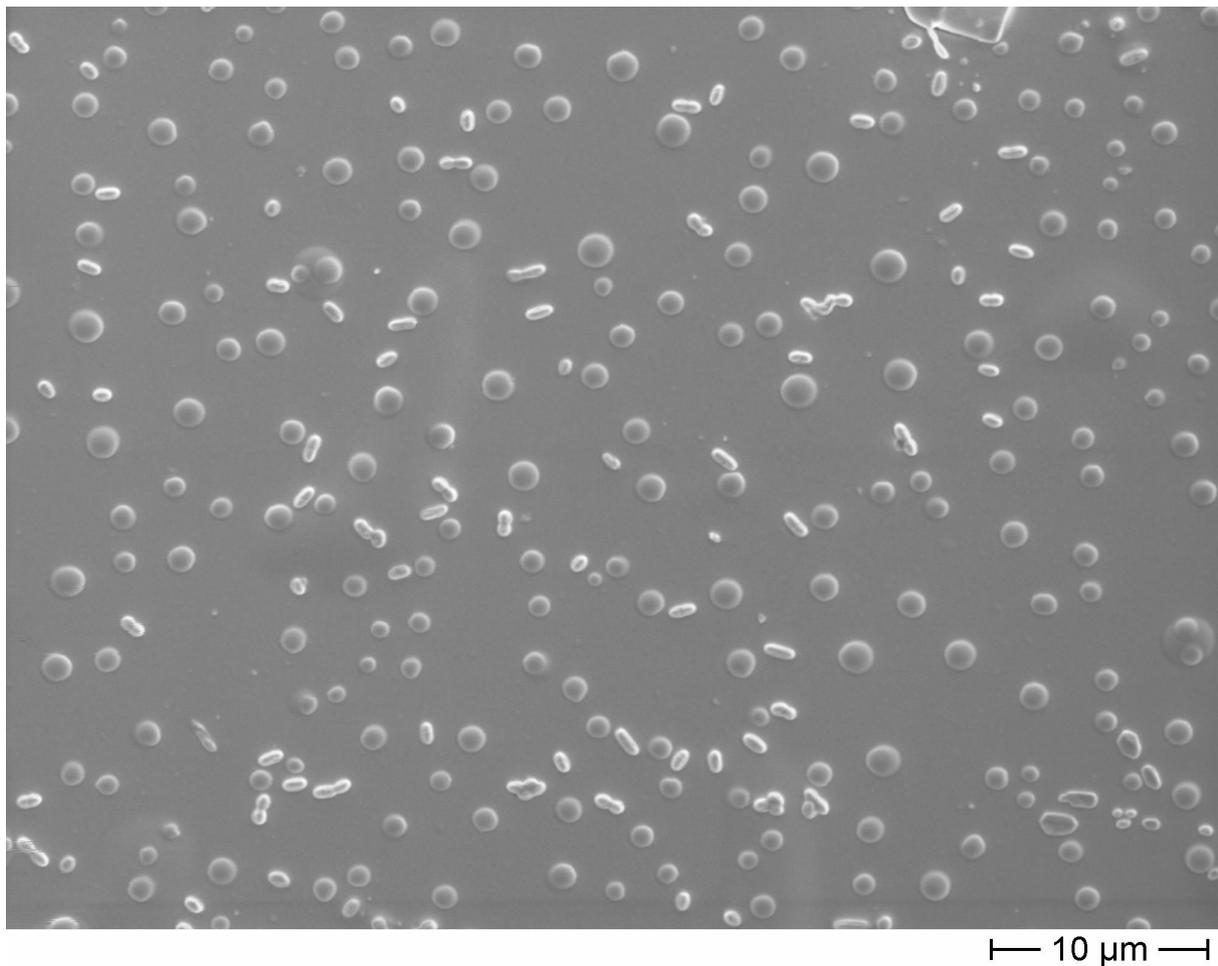


Abbildung 37. Hitzebedingte Verformung der Goldbeschichtung eines Glasprobekörpers.

6.2.2 Sinfony

Auch für Sinfony wurde durch die Perthometermessung eine sehr glatte Oberfläche ähnlich der von Glas bestimmt (mediane Rauheit 0,04). Dies ist bemerkenswert, da Sinfony, anders als Glas, Füllkörper enthält. Die Oberflächentopographie unterscheidet sich also deutlich von der der Glasoberfläche

(siehe Abbildung 37 und Abbildung 38). Sinfony war das Material mit dem größten gemessenen Kontaktwinkelmedian (75°).



— 10 μm —

Abbildung 38. Oberfläche eines Sinfony-Probekörpers. Einzelne Bakterien sind auf der Oberfläche deutlich erkennbar.

Beim Agarplattenversuch wurde bei diesem Material beobachtet, dass ein deutlich geringeres Koloniewachstum als beim Vergleichsmaterial Glas auftrat, obwohl beide eine ähnliche Rauheit aufwiesen. Im Fluoreszenzversuch, bei dem die Stoffwechselaktivität aller auf den Probekörpern anhaftenden Bakterien gemessen wurde, zeigten Sinfony und Glas einen signifikanten Unterschied mit einer erhöhten Adhäsion von Bakterien auf Sinfony. Auf den REM-Aufnahmen zeigt Sinfony eine ausgeprägtere Topographie als Glas, eine erhöhte Anlagerung

ist also plausibel. Im REM-Versuch zeigte sich ein signifikanter Unterschied zu allen Materialien bis auf Dyract eXtra. Sinfony hat eine sehr homogene Materialstruktur ohne Poren oder große Füllkörper. Alle gewachsenen Kolonien waren im REM-Versuch auswertbar und auch gut von der Oberfläche zu unterscheiden. Daher war ein durch die Oberflächenstruktur verursachtes, falsch positives Ergebnis, wie bei raueren Materialien, unwahrscheinlich. Allerdings erfolgte in diesem Versuch keine dreidimensionale Analyse der Wachstumsstruktur, weshalb nicht ausgeschlossen werden konnte, dass die Bakterien hier Haufen gebildet haben, also in mehreren übereinanderliegenden Schichten adhärten. Auf den REM-Aufnahmen sind deutlich Haufen, sowie Areale mit vereinzelt Wachstum erkennbar (siehe Abbildung 39). Durch die Haufenbildung lässt sich der Unterschied zwischen den Ergebnissen des Fluoreszenzversuchs und des REM-Versuchs erklären. Es adhären in den Haufen deutlich mehr Bakterien pro Oberflächenabschnitt, als auf den zweidimensionalen REM-Aufnahmen erkennbar ist. Man erhält daher ein falsch negatives Ergebnis.

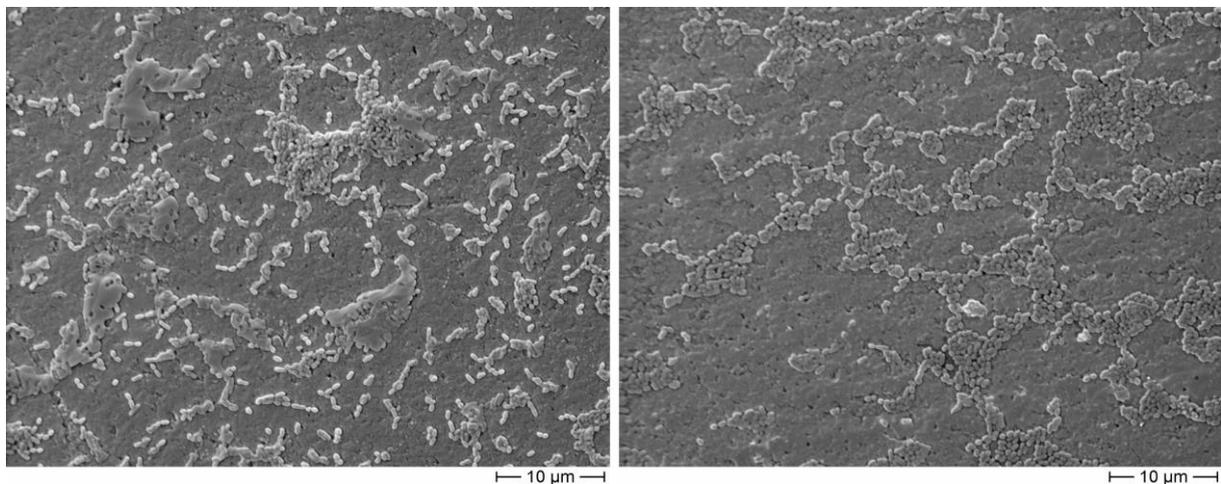


Abbildung 39. Die Probekörperoberfläche ist weniger deutlich erkennbar. Die Bakterien haben Haufen gebildet, die obersten Zellen heben sich von der Matrix ab.

Eine Folgeuntersuchung, ob beispielsweise eine hohe SFE der Materialoberfläche ein Wachstum der Bakterien in mehreren übereinanderliegenden Schichten begünstigt, wäre sinnvoll. Hierzu sind jedoch modernere bildgebende

Verfahren einzusetzen. In zahlreichen Studien wurde gezeigt, dass Bakterien mit hoher Oberflächenenergie an Materialien mit ebenfalls hoher Oberflächenenergie adhäreren (Teughels 2006, Quirynen 1995). Da *S. mutans* selbst über eine hohe Oberflächenenergie verfügt (Pratt-Terpstra 1989b, Weerkamp 1988, Weerkamp 1985), bindet das Bakterium vorzugsweise an Materialien mit ebenfalls hoher freier Oberflächenenergie (Mabboux 2004, Steinberg 2004, Ahn 2003). Es ist daher möglich, dass im Agarplattenversuch auf Grund der starken Bindung nicht alle am Material Sinfony adhärierenden Bakterien durch den Ultraschall abgeschüttelt werden konnten, da diese eine stärkere Bindung durch die SFE aufwiesen. Um diese Fehlerquelle auszuschließen, wäre eine generelle Kontrolle aller Probekörper nach dem Ausplattieren auf noch anhaftende Bakterien im REM sinnvoll gewesen. Aus den genannten Gründen liefert der Fluoreszenzversuch präzisere Daten über die tatsächliche Adhäsion als die anderen betrachteten Verfahren.

6.2.3 Ketac Molar

Der GIZ lag mit einer medianen Rauheit von 0,47 deutlich über den Werten von Tetric EvoCeram und Filtek Supreme XT. Der gemessene Kontaktwinkelmedian betrug 18°. Im Fluoreszenzversuch war auffällig, dass für die auf Ketac Molar adhärerten Bakterien die geringste Stoffwechselaktivität bei allen untersuchten Materialien gemessen wurde. Das heißt, der Unterschied zwischen den Werten der fünf Kontrollen und denen der zehn Probekörper, war sehr gering. Es war unklar, warum auf diesem Material nur sehr niedrige und teils negative Messergebnisse für die Fluoreszenz ermittelt werden konnten, zumal bei den anderen Methoden (REM-Bilder und Agarplatten) ein relativ hohes Bakterienwachstum nachgewiesen werden konnte. Es könnte sich dabei um ein statistisches Phänomen aufgrund der geringen Anzahl an Messungen gehandelt

haben, es wären aber auch andere Ursachen denkbar. Möglicherweise war der Keim hier nur bedingt stoffwechselaktiv, wie auch HAHNEL *et al.* für *S. mutans* auf Glasionomerzement beim Resazurin-Nachweis feststellten (Hahnel 2012). Dies könnte an der anfänglichen Freisetzung von Fluoridionen liegen (Hahnel 2017, Cury 2016, Fúcio 2016, Hahnel 2014, Hahnel 2012), jedoch hätte sich das niedrige Ergebnis dann auch bei den anderen Untersuchungsmethoden widerspiegeln müssen. Für Ketac Molar wurde in anderen Versuchen eine hohe Besiedlung durch *S. mutans* festgestellt (siehe Kapitel 5.3.3). Nimmt man dies als plausibel an, so könnte diese hohe Anzahl an Bakterien im Fluoreszenzversuch dazu geführt haben, dass das angebotene Resazurin schnell zu Resorufin umgesetzt wurde, welches daher früher als bei anderen Materialien zu dem nicht fluoreszierenden Dihydroresorufin zerfiel. Da dieses Endprodukt nicht fluoresziert, führte dies möglicherweise zu einem Messwert, der unterhalb dem der Kontrollen lag. Das Gesamtergebnis war somit nach Abzug der Farbkontrolle negativ. Es ist wegen dieses Effektes notwendig, die Inkubationszeit auf den Metabolismus des untersuchten Bakteriums anzupassen (Sandberg 2009). Der Farbumschlag von Resazurin ist außerdem abhängig vom pH-Wert des Mediums (www.alfa.com). Eine ungewollte Schwankung des pH-Wertes des Mediums könnte daher die Frequenz der Fluoreszenz des Farbstoffes verändert haben, so dass eine korrekte Erfassung durch das Messgerät nicht möglich war. Zu beachten war auch, dass bei einem pH-Wert außerhalb des Optimums die Bakterien nicht die gewünschte Viabilität zeigten (Matsui 2010, Dashper 1992). Um eine Veränderung des pH-Wertes als Ursache auszuschließen, wäre eine Messung des pH-Wertes zu Beginn und nach der Messung sinnvoll. Die Eigenfluoreszenz der Bakterien ist geringer als die Eigenfluoreszenz des Materials. Ist der Probekörper von einem dichten Biofilm überdeckt, wird die Eigenfluoreszenz des Probekörpers abgeschirmt. Dieser Effekt kommt besonders bei einer hohen Eigenfluoreszenz des Materials zum

Tragen und führt nach Abzug des Kontrollwertes beim Gesamtergebnis zu einem negativen Ergebnis. Da durch den REM-Versuch und den Agarplattenversuch für Ketac Molar ein hohes Bakterienaufkommen nachgewiesen wurde, erscheint diese Erklärung plausibel. Demnach ist das beschriebene Verfahren für Materialien mit hoher Eigenfluoreszenz und hoher Bakteriendichte fehleranfällig. Daher sollte mit einem anderen Verfahren das Messergebnis kontrolliert werden. Um eine höhere Datenmenge zu generieren sollten deutlich mehr als zehn Probekörper untersucht werden, was bei diesem Verfahren einen überschaubaren Mehraufwand darstellen würde. Es wäre auch sinnvoll, die Anzahl der Kontroll-Wellen zu erhöhen und für die statistische Auswertung den jeweiligen Mittelwert dieser Kontrollen zu verwenden. Damit kann ein unerwünschter Einfluss der Hintergrundstrahlung minimiert werden, da diese dann präziser erfasst werden kann. Um auszuschließen, dass die relative Fluoreszenz durch das Auftreten von Dihydroresorufin abnimmt, wäre es sinnvoll, innerhalb eines Zeitraumes mehrere Messungen durchzuführen. Beim REM-Versuch wurden hohe Adhäsionswerte gemessen. Auch BUSSCHER *et al.* beobachteten eine Kolonisierung des GIZ trotz Fluorid (Busscher 2010). Bei der Auswertung des REM-Versuchs mit Optimas war eine sinnvolle Festlegung des Schwellenwertes erschwert, da sich die Bakterien von der zerklüfteten Oberfläche nur schwer abhoben. Im REM konnten nur 27 von insgesamt 90 Bildern erstellt werden, da Ketac Molar unter den Bedingungen des REM zum Ausgasen neigte und so kein ausreichendes Vakuum erreicht werden konnte. Durch die notwendige Trocknung während der Präparation traten materialbedingt Artefakte wie beispielsweise Risse auf (Weber 2014, Alhede 2012, El Abed 2012). Auch erschwerten bei den erstellten Aufnahmen Verzerrungen durch das austretende Gas die Auswertung. Daher erwies sich dieses Material für die Auswertung über REM-Aufnahmen als weniger geeignet. Modernere bildgebende Verfahren (VPSEM und ESEM) sollten hier bessere

Ergebnisse generieren, da auf Grund des variablen Drucks und der feuchten Kammer weniger Artefakte auftreten. Bei der Auswertung mittels Auszählung auf Agarplatten stellt das in Ketac Molar enthaltene Fluorid einen nicht kontrollierbaren Störfaktor dar (Fúcio 2016, Hahnel 2012, Shashibhushan 2008). Keines der in dieser Arbeit untersuchten Verfahren lieferte ein zufriedenstellendes Ergebnis und kann für dieses Material ohne Einschränkungen empfohlen werden. Modernen bildgebenden Verfahren wie VPSEM und ESEM sollte hier, wenn möglich, der Vorzug gegeben werden.

6.2.4 GC Fuji II LC

Im Vergleich mit den anderen Materialien war GC Fuji II LC das Material mit der größten medianen Rauheit ($0,97\ \mu\text{m}$) und dem kleinsten gemessenen Kontaktwinkelmedian von 15° . Für GC Fuji II LC wurde im Fluoreszenztest der signifikant höchste Wert von allen untersuchten Materialien festgestellt. Dies steht im Widerspruch zu dem geringen Bakterienwachstum, das bei der Auszählung der Agarplatten ermittelt wurde. MEI *et al.* und WHITEHEAD *et al.* stellten fest, dass ein hoher Rauheitswert zu einer größeren Kontaktfläche und einer höheren Anzahl an Bindungsstellen jedes einzelnen Bakteriums führt (Mei 2011, Whitehead 2006). Damit könnte das geringe Bakterienwachstum auf den Agarplatten erklärt werden, da aufgrund der starken Adhäsion eventuell nicht alle Bakterien von den Probekörpern gelöst werden konnten. Es sollte hier ebenfalls die Freisetzung von wachstumshemmenden Fluoridionen berücksichtigt werden (siehe Abbildung 42), die bei diesem Versuch auf Grund der längeren Exposition als bei anderen Verfahren einen stärkeren Einfluss erreichten (Cury 2016, Hahnel 2014). Es ist zu vermuten, dass durch die Behandlung mit Ultraschall auch Fluoridionen gelöst wurden, die dann mit den Bakterien auf die Agarplatten gelangten. Das Material konnte nicht

im REM untersucht werden, da durch die starke Ausgasung kein Vakuum generiert werden konnte. Auf Grund der Materialeigenschaften ergeben sich Einschränkungen für die anderen Versuche. Daher erweist sich die Fluorometrie als das für dieses Material am ehesten geeignete Verfahren.

6.2.5 Tetric EvoCeram

Tetric EvoCeram wies eine glatte Oberfläche (mediane Rauheit 0,04) und mit 58° einen im Vergleich mit den anderen Materialien mittleren Kontaktwinkelmedian auf. SCHWEIKL *et al.* werteten ein ähnliches Messergebnis als leicht hydrophob (Schweikl 2013). In derselben Studie kamen SCHWEIKL *et al.* zu dem Ergebnis, dass zunehmende Hydrophobizität zu einer Zunahme der Adhäsion führt. Hydrophobe Materialien wie Kunststoffe zeigen eine höhere Tendenz zur Anlagerung von Proteinen und Bakterien (Schweikl 2013, An 1998). Dennoch konnte in der vorliegenden Studie sowohl im Fluoreszenzversuch als auch beim Agarplattenversuch eine niedrige Anlagerungstendenz festgestellt werden. Einzig im REM-Versuch ließen sich die guten Eigenschaften nicht bestätigen. Berücksichtigt werden muss hier jedoch, dass dieses Material ebenso wie Glas bei *S. mutans* ein Wachstum in verzweigten Strukturen und großen Zellhaufen begünstigt, also je nach Bildausschnitt ein Areal mit wenig oder mit viel Wachstum für die Auszählung herangezogen wurde. Dies verursacht bei der Auswertung einen großen Standardfehler. In zukünftigen Untersuchungen sollte daher eine größere Anzahl von Messwerten erzeugt werden, um den Standardfehler zu verringern. Die Fluorometrie liefert auch hier ein glaubwürdiges Ergebnis, und ist auf Grund des geringeren Aufwandes auch der Auswertung mit Agarplatten vorzuziehen.

6.2.6 Filtek Supreme XT

Bei der Perthometermessung wurde für Filtek Supreme XT ebenfalls eine glatte Oberfläche (mediane Rauheit 0,04) festgestellt. Außerdem wurde ein für diese Versuchsreihe durchschnittlicher Kontaktwinkelmedian von 50° gemessen. Beim Agarplattenversuch wurde für dieses Material die geringste Adhäsion aller Materialien ermittelt. Beim Fluoreszenzversuch lag der Medianwert für die Besiedlung jedoch im Mittelfeld aller Materialien. Diese Diskrepanz ließ sich damit erklären, dass beim Agarplattenversuch nicht alle Bakterien von den Probekörpern gelöst und ausplattiert wurden, und auch einige gelöste Fluoridionen das Wachstum auf den Agarplatten einschränkten (siehe Kapitel 6.3.3). Beim REM-Versuch zeigte Filtek Supreme XT eine mittlere Besiedlungsdichte. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zu Tetric EvoCeram, sehr wohl aber zu Sinfony, Dyract eXtra und Glas. Hier muss allerdings erwähnt werden, dass auf Grund der Materialeigenschaften die einzelnen Bakterien nur schwer vom Untergrund zu unterscheiden waren (siehe Kapitel 5.3.2.7). Es ist also möglich, dass bei der Auswertung mit Optimas kein aussagekräftiges Ergebnis erzielt werden konnte. Aus oben genannten Gründen stellt die Fluorometrie ein geeignetes Verfahren dar, um die Adhäsion auf Filtek Supreme XT zu bestimmen.

6.2.7 Dyract eXtra

Dyract eXtra war in Bezug auf mediane Rauheit (0,04) und Kontaktwinkelmedian (54,5°) am ehesten mit Glas vergleichbar. Im Fluoreszenztest wurde auf Dyract eXtra ein signifikant höheres Wachstum als auf Glas festgestellt, was auf Grund der Materialeigenschaften ein glaubhaftes Ergebnis darstellt. Das geringere Wachstum auf den Agarplatten ist vermutlich durch die Freisetzung der bakterientoxischen Fluoridionen zu erklären, die einen inhibierenden

Wachstumsfaktor darstellten (siehe Kapitel 6.3.3, www.dentsply.eu). Der REM-Versuch ergab für das Wachstum von *S. mutans* auf Dyract eXtra einen zu allen Materialien bis auf Sinfony signifikant unterschiedlichen Messwert. Auf den Aufnahmen zeigt Dyract eXtra eine ausgeprägte Topographie, was die Unterscheidung der Bakterien von der Materialoberfläche erschwerte. Auch für dieses Material erwies sich die Fluorometrie als praktikables Verfahren zur Bestimmung der Adhäsion.

6.3 Durchführbarkeit und Aussagekraft der Methoden

Insgesamt wurden deutliche Unterschiede bezüglich der Messergebnisse und des zeitlichen und logistischen Aufwandes für die einzelnen Versuche festgestellt. Insbesondere waren einige Methoden schon auf Grund der Anzahl der im gleichen Zeitraum zu erhaltenden Messwerte anderen vorzuziehen, auch wenn eine Verifizierung der Ergebnisse durch die Verwendung unterschiedlicher Methoden durchaus sinnvoll erschien.

6.3.1 Fluoreszenz

Die Fluorometrie mit AlamarBlue / Resazurin erwies sich in verschiedenen Publikationen als einfaches und reproduzierbares Verfahren zur quantitativen Bestimmung von vitalen Bakterien *in vitro* (Rampersad 2012, Bürgers 2009c, Pettit 2009, Peeters 2008, Rosentritt 2008). Es bestand ein direkter Zusammenhang zwischen der Anzahl der vorhandenen Bakterien und der produzierten Menge von Resorufin (O'Brien 2000, Voytik-Harbin 1998, Nakayama 1997, De Fries 1995). Die Messfehleranfälligkeit erwies sich als gering. Es wurden nur stoffwechselaktive Zellen erfasst, da nur Zellen mit funktionstüchtigem Stoffwechsel in der Lage sind, Resazurin zu Resorufin zu reduzieren (Hahnel 2008b, O'Brien 2000, Voytik-Harbin 1998,

Nakayama 1997). In einer Studie postulierten HAHNEL *et al.*, dass unter bestimmten Voraussetzungen (u.a. nicht optimaler pH-Wert, Pellikelzusammensetzung) Adhäsion und Metabolismus der Bakterien als separate Faktoren betrachtet werden müssen, da Bakterien zwar adhäriert, aber dennoch stoffwechsellinaktiv sein können (Hahnel 2012). Da die Versuchsbedingungen wie zum Beispiel der pH-Wert oder die Temperatur das Bakterienwachstum beeinflussen, müssen diese im Optimum liegen, um einen möglichst hohen Anteil von aktiven Zellen zu erhalten (Rampersad 2012). Außerdem muss bedacht werden, dass auch nicht adhärierte Zellen mit in das Well gelangen könnten und dann das Ergebnis falsch positiv beeinflussen. Ein Nachteil ist die Photosensitivität von Alamar-Blue. Inkubation und Fluoreszenzmessung müssen daher im Dunkeln stattfinden. Auch muss darauf geachtet werden, dass Kulturmedium und andere Testkomponenten nicht mit Resazurin reagieren und so das Ergebnis falsch positiv beeinflussen. Dieses Problem lässt sich aber durch entsprechende Kontrollgruppen gut in den Griff bekommen (Rampersad 2012). Eine weitere Fehlerquelle könnte eine falsch gewählte Inkubationszeit darstellen, da diese individuell für jede Spezies ist (Sandberg 2009). Das Ende der Inkubationszeit ist abhängig von der Zelldichte zu Beginn des Versuchs und lässt sich aufgrund der langjährigen Erfahrungen mit diesem System leicht feststellen (Rampersad 2012). Eine zu lange Inkubationszeit führt zur Bildung des farblosen Produktes Dihydroresorufin, das bei einer Fluoreszenzuntersuchung zu einem falsch negativen Ergebnis führt (Hahnel 2012, Rampersad 2012, Czekanska 2011, Peeters 2008, O'Brien 2000). Bereits abgestorbene Zellen, die zuvor Resazurin zu Resorufin reduziert haben, können auf Grund der langen Halbwertszeit des Resazurins immer noch fluoreszieren (O'Brien 2000). Die Zelldichte sollte nicht zu gering sein, um aussagekräftige Werte zu generieren (Sandberg 2009). Auf Grund des Aufbaus war es möglich, eine große Anzahl von Messwerten mit verhältnismäßig geringem Aufwand zu

erhalten. Durch die Messung im Photometer war es außerdem ausgeschlossen, dass das Urteil des Durchführenden die Messergebnisse beeinflusste, wie dies etwa bei der Auszählung der Bilder im REM-Versuch der Fall gewesen sein könnte. Möglicherweise könnten erhebliche Unterschiede in der Eigenfluoreszenz von spezifischen Werkstoffen – trotz Berücksichtigung bei der Messung – zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen. HANNIG stellt fest, dass dentale Materialien eine hohe Eigenfluoreszenz aufweisen, weshalb die Nachweismethoden an die jeweiligen Materialien angepasst werden sollten (Hannig 2010). PEETERS vergleicht verschiedene Fluoreszenztests miteinander, und kommt zu dem Ergebnis, dass sowohl das Resazurinassay als auch das FDA-Assay gute Nachweismethoden zur Quantifizierung von Bakterien darstellen. Sie betont dabei, dass das FDA-Assay (*fluorescein diacetate assay*) auf die Minimierung der Eigenfluoreszenz hin optimiert wurde. Die Verwendung eines MOPS-Puffers führt dabei zu einer deutlichen Reduzierung der Hintergrundfluoreszenz im Gegensatz zur Verwendung des PBS-Puffers (Peeters 2008). Das Resazurinassay erwies sich in dieser Arbeit als unkompliziertes Verfahren, bei dem eine große Anzahl an Messungen mit kleinem logistischem Aufwand möglich ist. Wenn das Ziel der Untersuchung der Nachweis stoffwechselaktiver Zellen ist, so stellt dieser Versuch das Mittel der Wahl dar. Allerdings sollte bedacht werden, dass mit diesem Verfahren keinerlei Aussage über Aufbau und Struktur eines Biofilms getroffen werden kann. Zu diesem Zweck sind bildgebende Verfahren notwendig. Allerdings muss bei einem hohen Bakterienaufkommen berücksichtigt werden, dass ein ausgeprägter Biofilm die Eigenfluoreszenz des Probekörpers abschirmt. Dieser Effekt kann bei Materialien mit hoher Eigenfluoreszenz zu falsch negativen Ergebnissen führen. Die Notwendigkeit, die Eigenfluoreszenzen von Material, Bakterien und Farbstoff zu berücksichtigen, kann zu falschen Messergebnissen (siehe Kapitel 6.2.3) führen und stellt somit eine Limitation des Verfahrens dar.

6.3.2 Rasterelektronenmikroskopie

Die Anzahl der auf den Probekörpern vorhandenen Bakterien wurde bei diesem Versuch über eine Bildanalyse der Aufnahmen aus dem REM bestimmt. Dabei legte der Auswertende über einen Regler einen Grenzwert für die Bildanalyse fest, um zu bestimmen, welche Bildanteile Bakterien darstellen und welche nicht. Das Ergebnis beschrieb den Flächenanteil der Bakterien an der analysierten Bildfläche. Trotz der Verwendung einer Software für die Bildauswertung handelte es sich hier wegen der manuellen Festlegung des Grenzwertes um ein zumindest teilweise untersucherabhängiges Verfahren. Durch die manuelle Festlegung des Parameters für die Bildauswertung war ein Einfluss des Auswertenden auf die Messergebnisse nicht ausgeschlossen. Bei der Anfertigung der Fotos im REM war dem Untersuchenden zudem die Auswahl des abgebildeten Areals innerhalb des jeweiligen Sektors überlassen, die Auswahl erfolgte also nicht rein zufällig. Die Untersucher wählten Ausschnitte, die sie als repräsentativ für die Oberfläche einschätzten. Bei zukünftigen Untersuchungen sollte eine rein zufällige, automatische Auswahl des Areals verwendet werden. Es wurde nur ein relativ kleines Areal des Probekörpers untersucht, dessen Besiedlungsdichte nicht unbedingt repräsentativ für den Probekörper sein musste (Ehrenfeld 2013). Aus diesen drei Gründen ist eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse nicht gewährleistet. Ähnlich wie beim manuellen Auszählen von Agarplatten war das Ergebnis von der Beurteilung durch den Durchführenden abhängig und somit fehleranfällig (Brugger 2012). Das Ergebnis des Versuchs war außerdem abhängig von der Bildqualität, welche wiederum abhängig von den verwendeten Materialien war. Oberflächen von verschiedener Beschaffenheit wurden unterschiedlich abgebildet und somit waren die Unterschiede zwischen Bakterien und der darunter liegenden, unbesiedelten Materialoberfläche unterschiedlich stark ausgeprägt. Bei dem für diese Arbeit durchgeführten Versuch waren beispielsweise Füllkörper teilweise schwer von

Bakterien unterscheidbar. Substratrückstände konnten ebenfalls nur schlecht von Bakterien differenziert werden (siehe Abbildung 40).

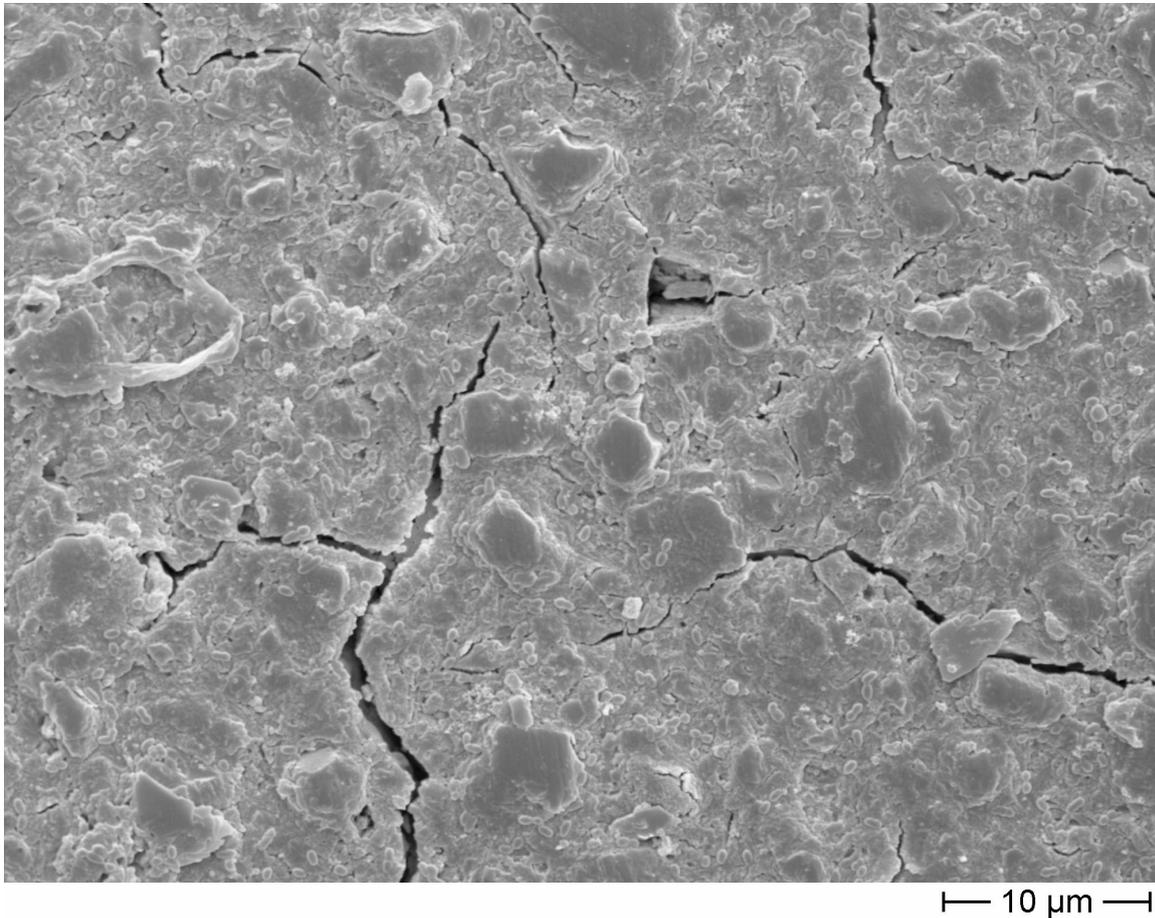


Abbildung 40. Schwer unterscheidbare Bakterien und Füllkörper auf einem Ketac Molar Probekörper.

Bei unterschiedlichen Materialien war durch die ungleichen Oberflächenstrukturen und -eigenschaften eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse nicht immer gewährleistet. Beispielsweise musste bei dem GIZ GC Fuji II LC auf eine Auswertung verzichtet werden, da auf Grund von Ausgasungen im REM keine aussagekräftigen Fotos dieses Materials gemacht werden konnten. Der Füllkörpergehalt war bei dem GIZ Ketac Molar außerdem wesentlich höher als bei den anderen Materialien, was eine Unterscheidung von Füllkörpern und Bakterien erschwerte. Der Versuchsaufbau ist somit nur bedingt für die

Auswertung bakterieller Adhäsion auf unterschiedlichen Materialien geeignet, könnte jedoch bei gleichem Material aber unterschiedlicher Vorbehandlung (beispielsweise Inkubation mit und ohne Speichel) sinnvolle Ergebnisse liefern. Positiv hervorzuheben ist ein im Vergleich zum Agarplattenversuch geringerer Aufwand in zeitlicher und logistischer Hinsicht. Allerdings sind bei diesem Versuch aufwändigere Arbeitsschritte und Geräte (Besputtern, REM) notwendig als bei der Fluorometrie, wodurch der zeitliche und materielle Aufwand vergrößert wird. Wie auch von EL ABED *et al.* beschrieben kam es durch die aufwändige Präparation der Probekörper zur Bildung von Artefakten (siehe Abbildung 41), durch welche die Auswertung ebenfalls erschwert wurde (Weber 2014, Alhede 2012, El Abed 2012).

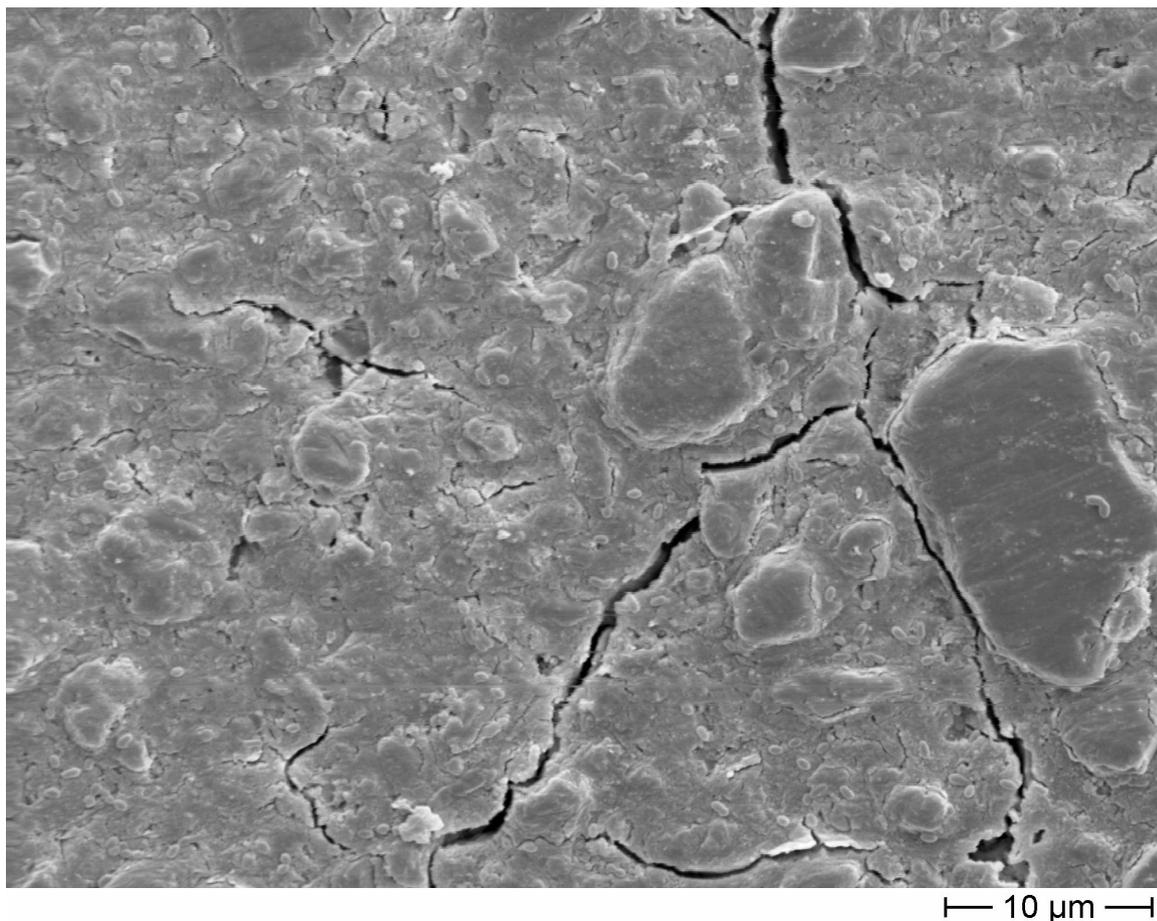


Abbildung 41. Deutlich erkennbare Risse auf dem Probekörper als Folge der Vorbehandlung.

Hervorzuheben sind die bei neueren Verfahren der Rasterelektronenmikroskopie möglichen Darstellungen des intakten Biofilms und die Möglichkeit, diesen dreidimensional darzustellen (siehe Kapitel 2.6.3). Die Art und Weise der Anlagerung konnte bei diesem Verfahren also direkt beobachtet werden, was wertvolle Hinweise liefern kann, wieso das Material für bestimmte Bakterien gute bzw. schlechte Voraussetzungen für eine Besiedlung bietet.

6.3.3 Agarplatten

Bei diesem Versuch wurde durch Zählen der sichtbaren Bakterienkolonien auf Agarplatten die ursprüngliche Bakteriendichte auf den Probekörpern ermittelt. Es wurde davon ausgegangen, dass nach der Vereinzelnung der Bakterien in der Verdünnungsreihe jedes in der ausplattierten Lösung vorhandene Bakterium eine zählbare Kolonie bildet (Cypionka 2010). Die Ergebnisse aller Materialien entsprachen der Bakteriendichte in der Verdünnungsreihe, daher konnte nach MANKOVSKAIA *et al.* davon ausgegangen werden, dass der Versuch fehlerfrei durchgeführt wurde (Mankovskaia 2013). Einzig bei der Verdünnung 1:100 wäre hier eine wesentlich höhere Anzahl an Kulturen zu erwarten gewesen. Auf Grund der sehr hohen absoluten Anzahl der Kolonien war aber davon auszugehen, dass das beschränkte Nährstoffangebot einen limitierenden Wachstumsfaktor darstellte (Fuchs 2007). *S. mutans* trat hier also in so großer Zahl auf, dass die Kulturen ihr Wachstum gegenseitig behinderten oder das Nahrungsangebot für ein weiteres exponentielles Wachstum zu eingeschränkt war. Die Bakterien gingen also von der logarithmischen Phase des Wachstums in die stationäre Phase über (Dingermann 2013, Fuchs 2007). Bei der Auswertung der Agarplatten konnte festgestellt werden, dass der Versuchsablauf sowohl sehr zeitaufwändig war als auch zahlreiche mögliche Fehlerquellen eine Auswertung erschwerten. So können Bakterien während des Ablösevorgangs vom

Probekörper durch zu starken Einsatz des Ultraschalls vernichtet werden (Müller 2007). Bei einem zu geringen Einsatz des Ultraschalls besteht andererseits die Gefahr, dass nicht alle Bakterien vom Probematerial gelöst werden und damit nicht ausplattiert werden können (Van den Driessche 2014, Müller 2007). Auch in diesem Fall kommt es zu einem falsch negativen Ergebnis. Dies kann ausgeschlossen werden, indem die Probekörper nach der Ultraschallbehandlung im REM auf verbliebene Bakterien kontrolliert werden. Im Falle der GIZ wird vermutet, dass auch in Lösung gegangene Fluoridionen mit ausplattiert wurden, die das Koloniewachstum negativ beeinflussten. Dieser Effekt (siehe Abbildung 42) konnte auch in einer anderen Studie beobachtet werden (Shashibhushan 2008). Andere Studien belegen, dass die Freisetzung von Fluoridionen generell das Wachstum von *S. mutans* behindert (Fúcio 2016, Hahnel 2012).

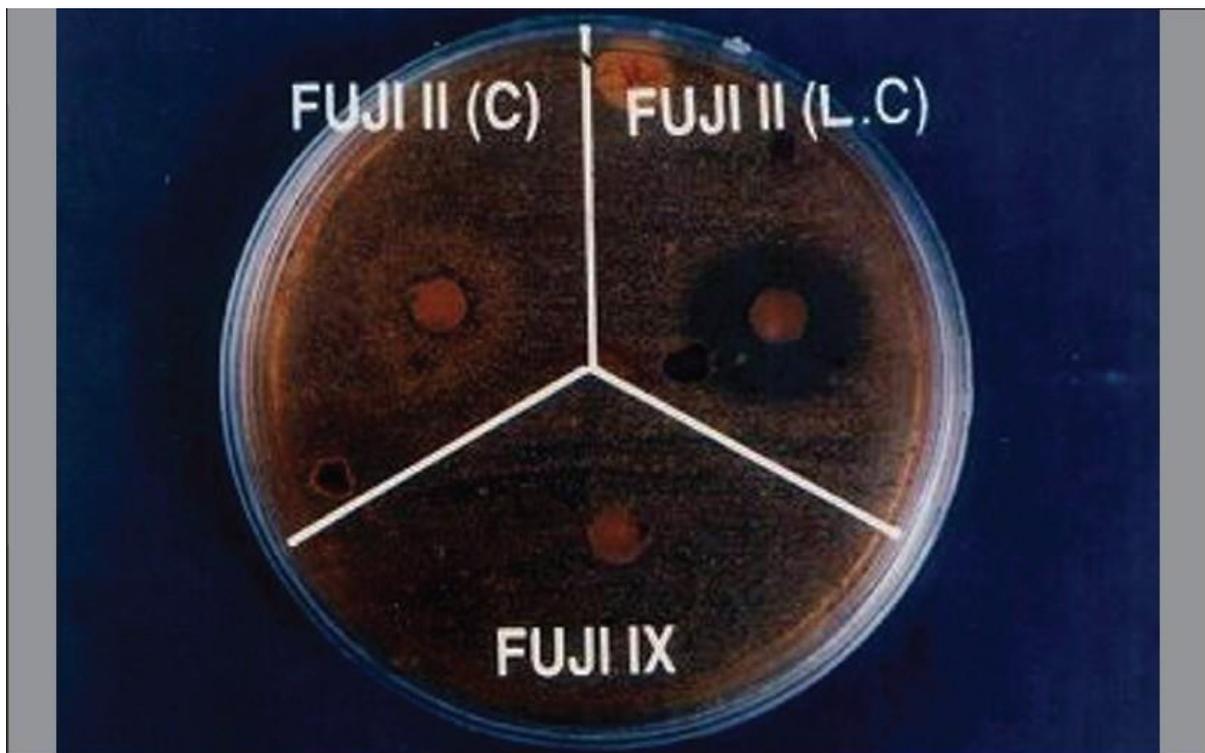


Abbildung 42. Fluoridfreisetzung bei Fuji II LC als Inhibitor für das Wachstum für *S. mutans* auf einer Agarplatte (Shashibhushan 2008).

Zusätzlich können beim Ausplattieren Verunreinigungen durch Fremdkulturen auftreten, die das Wachstum von *S. mutans* auf den Agarplatten behindern. Bei diesem Versuchsaufbau wird eine sehr große Menge an Agarplatten benötigt. Diese müssen fachgerecht gelagert und inkubiert werden, was einen hohen logistischen Aufwand bedeutet und zwingend ein Labor mit ausreichenden Kapazitäten erfordert. Die Methode ist daher für die Auswertung zahlreicher Proben weniger gut geeignet (Müller 2007). Bei einer sehr großen Anzahl von Bakterienkolonien auf der Agarplatte sollte unbedingt ein Plattenzähler verwendet werden, da sonst die Fehlerquote beim manuellen Auszählen ansteigt (Brugger 2012). Abschließend kann gesagt werden, dass auf Grund des hohen zeitlichen und logistischen Aufwands und der hohen Fehleranfälligkeit die Ausplattierung auf Agar für einen quantitativen Nachweis der Besiedlungsdichte weniger gut geeignet ist. Das Verfahren kann allerdings sehr gut für einen qualitativen Nachweis verwendet werden. Die benötigten Materialien befinden sich außerdem in jedem biologischen Labor.

7 Zusammenfassung und Ausblick

Alle in dieser Arbeit angewandten Methoden zur Quantifizierung von Bakterien hatten sowohl Vorteile als auch Nachteile, was auch vom untersuchten Material abhing. So zeigte sich beispielsweise, dass die Untersuchung der Oberfläche eines Probekörpers aus Glasionomerzement im Rasterelektronenmikroskop nur bedingt möglich war, da auf Grund der Materialeigenschaften das für die Untersuchung notwendige Vakuum nicht zufriedenstellend erzeugt werden konnte. Bei der Auswertung der REM-Bilder mittels Bildverarbeitung (Optimas) konnten bei einigen Materialien die Bakterien nicht eindeutig von Unregelmäßigkeiten der Oberfläche unterschieden werden. Die manuelle Auswahl des Bildausschnitts erschwerte bei dieser Methode außerdem die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Andererseits ermöglichte dieses bildgebende Verfahren die direkte Darstellung der Bakterien auf der Oberfläche, woraus über die reine Quantifizierung hinaus weitere Erkenntnisse über die Besiedlungsstrukturen und die Materialoberfläche gewonnen werden konnten. Der Agarplattenversuch erwies sich als Verfahren, das hohen zeitlichen, räumlichen und logistischen Aufwand erforderte. Für die Auszählung einer großen Anzahl von Kolonien empfiehlt sich eine maschinelle Auswertung. Hierfür stehen einfache und kostengünstige Lösungen zur Verfügung. Es handelt sich hierbei außerdem um einen eindeutigen qualitativen Nachweis, da die Mikroorganismen bei der Auswertung direkt identifizierbar sind. Die Fluorometrie mit Resazurin erwies sich als das unkomplizierteste der drei Verfahren. Diese Methode ist einfach durchzuführen, präzise, sicher, nicht toxisch und kosteneffektiv. Sie erfordert einen zeitlich, räumlich und logistisch überschaubaren Aufwand. Allerdings ist bei Materialien mit hoher Eigenfluoreszenz bei hoher Bakteriendichte Vorsicht geboten, da diese Kombination Effekte hervorruft, die im Verfahren mathematisch nicht berücksichtigt werden. Dies führt zu falsch negativen

Ergebnissen. Auch wurden die untersuchten Mikroorganismen hier lediglich indirekt beobachtet. Es wurden ausschließlich stoffwechselaktive Bakterien erfasst. Bei den Ergebnissen war somit zu berücksichtigen, dass lebende, aber nicht stoffwechselaktive Zellen nicht erkannt wurden. Folglich sollte die Auswahl der Methode vom Ziel der Untersuchung abhängig gemacht werden. Liegt der Fokus auf der Darstellung des Biofilms selbst, so bieten sich bildgebende Verfahren wie Rasterelektronenmikroskopie (SEM), *scanning electron microscopy mit ruthenium red* (SEM-RR), *Environmental scanning electron microscopy* (ESEM) und *variable pressure scanning electron microscopy* (VPSEM) an. Soll untersucht werden, in welchem Ausmaß lebende Bakterien auf der untersuchten Oberfläche siedeln, so sollten Färbemethoden angewandt werden. In der Kombination mit modernen bildgebenden Verfahren ist hier sogar eine dreidimensionale Darstellung des Biofilms möglich. Die Kultivierung und Auszählung auf Agarplatten ist eine bewährte Methode zur eindeutigen Identifizierung lebender Bakterien. Zudem sind bei der Wahl des Verfahrens selbstverständlich der jeweils notwendige personelle und sachliche Aufwand abzuwägen. Zuverlässige Nachweisverfahren werden auch in Zukunft von zentraler Bedeutung für die erfolgreiche Durchführung von Studien über den oralen Biofilm sein. Das Verständnis über Aufbau und Genese des Biofilms ist Voraussetzung für zukünftige Untersuchungen, die sich mit der Entwicklung neuer Materialien und der Beeinflussung der Eigenschaften der Mundflora befassen. Ziel dieser Studien ist die Entwicklung von Füllungsmaterialien, Ernährungsmethoden, Mundspülungen und Zahnpasten, um die Mundflora positiv zu beeinflussen. Die Entstehung von Krankheiten wie Karies und Parodontitis soll so bereits von vorneherein verhindert werden.

8 Literaturverzeichnis

Aas, J.A., Paster, B.J., Stokes, L.N., Olsen, I., and Dewhirst, F.E. (2005). Defining the Normal Bacterial Flora of the Oral Cavity. *J. Clin. Microbiol.* *43*, 5721–5732.

Ahn, S.-J., Kho, H.-S., Kim, K.-K., and Nahm, D.-S. (2003). Adhesion of oral streptococci to experimental bracket pellicles from glandular saliva. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics* *124*, 198–205.

Akbay, A.R., and Bayramli, E. (1995). The Effect of Surface Activation in Polymer Matrix-Carbon Fiber Interactions. *The Journal of Adhesion* *50*, 155–164.

Akovali, G., Torun, T.T., Bayamli, E., and Erinc, H.K. (1998). Mechanical-Properties and Surface Energies of Low-Density Polyethylene Poly(vinyl Chloride) Blends. *Polymer* *39*, 1363–1368.

Alhede, M., Qvortrup, K., Liebrechts, R., Høiby, N., Givskov, M., and Bjarnsholt, T. (2012). Combination of microscopic techniques reveals a comprehensive visual impression of biofilm structure and composition. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* *65*, 335–342.

Amaechi, B.T., Higham, S.M., Edgar, W.M., and Milosevic, A. (1999). Thickness of Acquired Salivary Pellicle as a Determinant of the Sites of Dental Erosion. *J DENT RES* *78*, 1821–1828.

An, Y.H., and Friedman, R.J. (1997). Laboratory methods for studies of bacterial adhesion. *Journal of Microbiological Methods* *30*, 141–152.

An, Y.H., and Friedman, R.J. (1998). Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research* *43*, 338–348.

Ansar Ahmed, S., Gogal Jr, R.M., and Walsh, J.E. (1994). A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [³H] thymidine incorporation assay. *Journal of Immunological Methods* *170*, 211–224.

Asahi, Y., Miura, J., Tsuda, T., Kuwabata, S., Tsunashima, K., Noiri, Y., Sakata, T., Ebisu, S., and Hayashi, M. (2015). Simple observation of *Streptococcus mutans* biofilm by scanning electron microscopy using ionic liquids. *AMB Express* 5.

Atkins, P.W., and Paula, J. de (2013). *Atkins: Physikalische Chemie* (Weinheim u.a.: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA).

Aykent, F., Yondem, I., Ozyesil, A.G., Gunal, S.K., Avunduk, M.C., and Ozkan, S. (2010). Effect of different finishing techniques for restorative materials on surface roughness and bacterial adhesion. *The Journal of Prosthetic Dentistry* 103, 221–227.

Baier, R.E. (2006). Surface behaviour of biomaterials: The theta surface for biocompatibility. *J Mater Sci: Mater Med* 17, 1057–1062.

Bennick, A., Cannon, M., and Madapallimattam, G. (1979). The nature of the hydroxyapatite-binding site in salivary acidic proline-rich proteins. *Biochem. J* 183, 115–126.

Bjarnsholt, T., Ciofu, O., Molin, S., Givskov, M., and Høiby, N. (2013). Applying insights from biofilm biology to drug development — can a new approach be developed? *Nature Reviews Drug Discovery* 12, 791–808.

Bollen, C.M.L., Lambrechts, P., and Quirynen, M. (1997). Comparison of surface roughness of oral hard materials to the threshold surface roughness for bacterial plaque retention: A review of the literature. *Dental Materials* 13, 258–269.

Bonnier, F., Keating, M.E., Wróbel, T.P., Majzner, K., Baranska, M., Garcia-Munoz, A., Blanco, A., and Byrne, H.J. (2015). Cell viability assessment using the Alamar blue assay: A comparison of 2D and 3D cell culture models. *Toxicology in Vitro* 29, 124–131.

Bos, R., Mei, H.C. van der, and Busscher, H.J. (1999). Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions – its mechanisms and methods for study. *FEMS Microbiology Reviews* 23, 179–230.

- Bowen, W.H., and Koo, H. (2011). Biology of *Streptococcus mutans*-Derived Glucosyltransferases: Role in Extracellular Matrix Formation of Cariogenic Biofilms. *Caries Research* 45, 69–86.
- Bradshaw, D.J., and Lynch, R.J.M. (2013). Diet and the microbial aetiology of dental caries: new paradigms. *International Dental Journal* 63, 64–72.
- Bradshaw, D.J., Walker, J.T., Burger, B., Gangnus, B., and Marsh, P.D. (2001). In vitro modeling of biofouling of dental composite materials. *Meth. Enzymol.* 337, 416–425.
- Brady, L.J., Maddocks, S.E., Larson, M.R., Forsgren, N., Persson, K., Deivanayagam, C.C., and Jenkinson, H.F. (2010). The changing faces of *Streptococcus* antigen I/II polypeptide family adhesins: *Streptococcus* antigen I/II family proteins. *Molecular Microbiology* 77, 276–286.
- Brugger, S.D., Baumberger, C., Jost, M., Jenni, W., Brugger, U., and Mühlemann, K. (2012). Automated Counting of Bacterial Colony Forming Units on Agar Plates. *PLoS ONE* 7, e33695.
- Bürgers, R., Rosentritt, M., and Handel, G. (2007). Bacterial adhesion of *Streptococcus mutans* to provisional fixed prosthodontic material. *The Journal of Prosthetic Dentistry* 98, 461–469.
- Bürgers, R., Cariaga, T., Müller, R., Rosentritt, M., Reischl, U., Handel, G., and Hahnel, S. (2009a). Effects of aging on surface properties and adhesion of *Streptococcus mutans* on various fissure sealants. *Clinical Oral Investigations* 13, 419–426.
- Bürgers, R., Eidt, A., Frankenberger, R., Rosentritt, M., Schweikl, H., Handel, G., and Hahnel, S. (2009b). The anti-adherence activity and bactericidal effect of microparticulate silver additives in composite resin materials. *Archives of Oral Biology* 54, 595–601.
- Bürgers, R., Schneider-Brachert, W., Hahnel, S., Rosentritt, M., and Handel, G. (2009c). Streptococcal adhesion to novel low-shrink silorane-based restorative. *Dental Materials* 25, 269–275.

- Bürgers, R., Gerlach, T., Hahnel, S., Schwarz, F., Handel, G., and Gosau, M. (2010). In vivo and in vitro biofilm formation on two different titanium implant surfaces. *Clinical Oral Implants Research* 21, 156–164.
- Busscher, H.J., Rinastiti, M., Siswomihardjo, W., and van der Mei, H.C. (2010). Biofilm Formation on Dental Restorative and Implant Materials. *Journal of Dental Research* 89, 657–665.
- Carlén, A., Nikdel, K., Wennerberg, A., Holmberg, K., and Olsson, J. (2001). Surface characteristics and in vitro biofilm formation on glass ionomer and composite resin. *Biomaterials* 22, 481–487.
- Cazzaniga, G., Ottobelli, M., Ionescu, A., Garcia-Godoy, F., and Brambilla, E. (2015). Surface properties of resin-based composite materials and biofilm formation: A review of the current literature. *American Journal of Dentistry* 28, 11.
- Cheab, Z., Rakmathulina, E., Lussi, A., and Eick, S. (2015). Impact of Acquired Pellicle Modification on Adhesion of Early Colonizers. *Caries Research* 49, 626–632.
- Cogoni, V., Morgan-Smith, A., Fenno, J.C., Jenkinson, H.F., and Dymock, D. (2012). *Treponema denticola* chymotrypsin-like proteinase (CTLP) integrates spirochaetes within oral microbial communities. *Microbiology (Reading, Engl.)* 158, 759–770.
- Collins, L., and Franzblau, S.G. (1997). Microplate alamar blue assay versus BACTEC 460 system for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41, 1004–1009.
- Cornejo, O.E., Lefebure, T., Pavinski Bitar, P.D., Lang, P., Richards, V.P., Eilertson, K., Do, T., Beighton, D., Zeng, L., Ahn, S.-J., *et al.* (2013). Evolutionary and Population Genomics of the Cavity Causing Bacteria *Streptococcus mutans*. *Molecular Biology and Evolution* 30, 881–893.
- Costerton, J.W., Stewart, P.S., and Greenberg, E.P. (1999). Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science* 284, 1318–1322.

Cramer, N.B., Stansbury, J.W., and Bowman, C.N. (2011). Recent Advances and Developments in Composite Dental Restorative Materials. *J DENT RES* 90, 402–416.

Cury, J.A., de Oliveira, B.H., dos Santos, A.P.P., and Tenuta, L.M.A. (2016). Are fluoride releasing dental materials clinically effective on caries control? *Dental Materials*.

Cypionka, H. (2010). *Grundlagen der Mikrobiologie* (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg).

Czekanska, E.M. (2011). Assessment of cell proliferation with resazurin-based fluorescent dye. *Methods Mol. Biol.* 740, 27–32.

Dashper, S.G., and Reynolds, E.C. (1992). pH regulation by *Streptococcus mutans*. *J. Dent. Res.* 71, 1159–1165.

De Fries, R., and Mitsushashi, M. (1995). Quantification of mitogen induced human lymphocyte proliferation: Comparison of alamarbluetm assay to 3h-thymidine incorporation assay. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 9, 89–95.

Decker, E.-M., Klein, C., Schwindt, D., and von Ohle, C. (2014). Metabolic activity of *Streptococcus mutans* biofilms and gene expression during exposure to xylitol and sucrose. *International Journal of Oral Science* 6, 195–204.

Dewhirst, F.E., Chen, T., Izard, J., Paster, B.J., Tanner, A.C.R., Yu, W.-H., Lakshmanan, A., and Wade, W.G. (2010). The Human Oral Microbiome. *Journal of Bacteriology* 192, 5002–5017.

Diaz, P.I., Zilm, P.S., and Rogers, A.H. (2002). *Fusobacterium nucleatum* supports the growth of *Porphyromonas gingivalis* in oxygenated and carbon-dioxide-depleted environments. *Microbiology* 148, 467–472.

Diaz, P.I., Chalmers, N.I., Rickard, A.H., Kong, C., Milburn, C.L., Palmer, R.J., and Kolenbrander, P.E. (2006). Molecular Characterization of Subject-Specific Oral Microflora during Initial Colonization of Enamel. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 2837–2848.

van Dijk, J., Herkströter, F., Busscher, H., Weerkamp, A., Jansen, H., and Arends, J. (1987). Surface-free energy and bacterial adhesion. *Journal of Clinical Periodontology* 14, 300–304.

van Dijk, L.J., Goldsweer, R., and Busscher, H.J. (1988). Interfacial free energy as a driving force for pellicle formation in the oral cavity: An in vivo study in beagle dogs. *Biofouling* 1, 19–25.

Dingermann, T., Hänsel, R., and Zündorf, I. (2013). *Pharmazeutische Biologie: Molekulare Grundlagen und klinische Anwendung* (Springer-Verlag).

Dörries, R., Hof, H., Schlüter, D., Geginat, G., and Wendt, C. (2014). *Medizinische Mikrobiologie* (Thieme).

Eberle, A.L., Mikula, S., Schalek, R., Lichtman, J., Tate, M.L.K., and Zeidler, D. (2015). High-resolution, high-throughput imaging with a multibeam scanning electron microscope: High-Throughput Imaging with a multibeam SEM. *Journal of Microscopy* 259, 114–120.

Ebi, N., Imazato, S., Noiri, Y., and Ebisu, S. (2001). Inhibitory effects of resin composite containing bactericide-immobilized filler on plaque accumulation. *Dental Materials* 17, 485–491.

Ehrenfeld, M.L. (2013). Untersuchungen zur Adhäsion von oralen Streptokokken an zahnärztliche Werkstoffe in Abhängigkeit von der Auswertmethodik in vitro.

Eichner, K., and Kappert, H.F. (2008). *Zahnärztliche Werkstoffe und ihre Verarbeitung, Bd. 2: Werkstoffe unter klinischen Aspekten* (Stuttgart: Thieme).

El Abed, S., Ibsouda, S.K., Latrache, H., and Hamadi, F. (2012). Scanning Electron Microscopy (SEM) and Environmental SEM: Suitable Tools for Study of Adhesion Stage and Biofilm Formation.

Elangovan, S., Margolis, H.C., Oppenheim, F.G., and Beniash, E. (2007). Conformational Changes in Salivary Proline-Rich Protein 1 upon Adsorption to Calcium Phosphate Crystals. *Langmuir* 23, 11200–11205.

Fahmy, A.M., Hamed, A.F., and Gobashy, M.O.I. (2012). Effect of different finishing techniques on the surface roughness and bacterial adhesion of cast Nickel-chromium alloy. *Journal of American Science* 8.

Ferracane, J.L., and Condon, J.R. (1990). Rate of elution of leachable components from composite. *Dent Mater* 6, 282–287.

Ferracane, J.L. (2011). Resin composite—State of the art. *Dental Materials* 27, 29–38.

Fijan, S., Šostar-Turk, S., and Cencič, A. (2005). Implementing hygiene monitoring systems in hospital laundries in order to reduce microbial contamination of hospital textiles. *Journal of Hospital Infection* 61, 30–38.

Freires, I.A., Bueno-Silva, B., Galvão, L.C. de C., Duarte, M.C.T., Sartoratto, A., Figueira, G.M., Alencar, S.M. de, and Rosalen, P.L. (2015). The Effect of Essential Oils and Bioactive Fractions on *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* Biofilms: A Confocal Analysis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2015, 1–9.

Freitas, A.I., Vasconcelos, C., Vilanova, M., and Cerca, N. (2014). Optimization of an automatic counting system for the quantification of *Staphylococcus epidermidis* cells in biofilms: Cell clusters in older *S. epidermidis* biofilms. *Journal of Basic Microbiology* 54, 750–757.

Frenzel, N., Maenz, S., Sanz Beltrán, V., Völpel, A., Heyder, M., Sigusch, B.W., Lüdecke, C., and Jandt, K.D. (2016). Template assisted surface microstructuring of flowable dental composites and its effect on microbial adhesion properties. *Dental Materials*.

Friedl, K.H., Schmalz, G., Hiller, K.A., and Shams, M. (1997). Resin-modified glass ionomer cements: fluoride release and influence on *Streptococcus mutans* growth. *Eur. J. Oral Sci.* 105, 81–85.

Fúcio, S.B.P., Paula, A.B. de, Sardi, J.C.O., Duque, C., Correr-Sobrinho, L., and Puppim-Rontani, R.M. (2016). *Streptococcus Mutans* Biofilm Influences on the Antimicrobial Properties of Glass Ionomer Cements. *Brazilian Dental Journal* 27, 681–687.

- Fuchs, G. (2007). *Allgemeine Mikrobiologie* (Georg Thieme Verlag).
- Gaines, S., James, T.C., Folan, M., Baird, A.W., and O'Farrelly, C. (2003). A novel spectrofluorometric microassay for *Streptococcus mutans* adherence to hydroxylapatite. *Journal of Microbiological Methods* 54, 315–323.
- García-Godoy, F., and Hicks, M.J. (2008). Maintaining the integrity of the enamel surface: The role of dental biofilm, saliva and preventive agents in enamel demineralization and remineralization. *The Journal of the American Dental Association* 139, *Supplement 2*, 25S–34S.
- Giannini, M., Di Francescantonio, M., Pacheco, R., Boaro, L.C., and Braga, R. (2014). Characterization of Water Sorption, Solubility, and Roughness of Silorane- and Methacrylate-based Composite Resins. *Operative Dentistry* 39, 264–272.
- Gibbons, R.J. (1989). Bacterial adhesion to oral tissues: a model for infectious diseases. *Journal of Dental Research* 68, 750–760.
- Gold, O.G., Jordan, H.V., and van Houte, J. (1973). A selective medium for *Streptococcus mutans*. *Archives of Oral Biology* 18, 1357–1364.
- Gray, J.J. (2004). The interaction of proteins with solid surfaces. *Current Opinion in Structural Biology* 14, 110–115.
- Grenier, D. (1992). Nutritional interactions between two suspected periodontopathogens, *Treponema denticola* and *Porphyromonas gingivalis*. *Infect. Immun.* 60, 5298–5301.
- Griffin, B.J. (2007). Variable pressure and environmental scanning electron microscopy: imaging of biological samples. *Methods Mol. Biol.* 369, 467–495.
- Grivet, M., Morrier, J.J., Benay, G., and Barsotti, O. (2000). Effect of hydrophobicity on in vitro streptococcal adhesion to dental alloys. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 11, 637–642.
- Grössner-Schreiber, B., Teichmann, J., Hannig, M., Dörfer, C., Wenderoth, D.F., and Ott, S.J. (2009). Modified implant surfaces show different biofilm compositions under in vivo conditions. *Clin Oral Implants Res* 20, 817–826.

Hahn Berg, I.C., Rutland, M.W., and Arnebrant, T. (2003). Lubricating Properties of the Initial Salivary Pellicle — an AFM Study. *Biofouling* 19, 365–369.

Hahnel, S., Rosentritt, M., Bürgers, R., and Handel, G. (2008a). Surface properties and in vitro *Streptococcus mutans* adhesion to dental resin polymers. *J Mater Sci: Mater Med* 19, 2619–2627.

Hahnel, S., Rosentritt, M., Bürgers, R., and Handel, G. (2008b). Adhesion of *Streptococcus mutans* NCTC 10449 to artificial teeth: An in vitro study. *The Journal of Prosthetic Dentistry* 100, 309–315.

Hahnel, S., Rosentritt, M., Handel, G., and Bürgers, R. (2009a). In vitro evaluation of artificial ageing on surface properties and early *Candida albicans* adhesion to prosthetic resins. *J Mater Sci: Mater Med* 20, 249–255.

Hahnel, S., Rosentritt, M., Handel, G., and Bürgers, R. (2009b). Surface characterization of dental ceramics and initial streptococcal adhesion in vitro. *Dental Materials* 25, 969–975.

Hahnel, S., Ettl, T., Gosau, M., Rosentritt, M., Handel, G., and Bürgers, R. (2010a). Influence of saliva substitute films on the initial adhesion of *Candida albicans* to dental substrata prior to and after artificial ageing. *Archives of Oral Biology* 55, 391–396.

Hahnel, S., Henrich, A., Rosentritt, M., Handel, G., and Bürgers, R. (2010b). Influence of artificial ageing on surface properties and *Streptococcus mutans* adhesion to dental composite materials. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 21, 823–833.

Hahnel, S., Mühlbauer, G., Hoffmann, J., Ionescu, A., Bürgers, R., Rosentritt, M., Handel, G., and Häberlein, I. (2012). *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* biofilm formation and metabolic activity on dental materials. *Acta Odontologica Scandinavica* 70, 114–121.

Hahnel, S., Wastl, D.S., Schneider-Feyrer, S., Giessibl, F.J., Brambilla, E., Cazzaniga, G., and Ionescu, A. (2014). *Streptococcus mutans* biofilm formation and release of fluoride from experimental resin-based composites depending on surface treatment and S-PRG filler particle fraction. *J Adhes Dent* 16, 313–23.

- Hahnel, S., Ionescu, A.C., Cazzaniga, G., Ottobelli, M., and Brambilla, E. (2017). Biofilm formation and release of fluoride from dental restorative materials in relation to their surface properties. *Journal of Dentistry* 60, 14–24.
- Hannig, M. (1997). Transmission electron microscopic study of in vivo pellicle formation on dental restorative materials. *European Journal of Oral Sciences* 105, 422–433.
- Hannig, M. (1999). Transmission electron microscopy of early plaque formation on dental materials in vivo. *European Journal of Oral Sciences* 107, 55–64.
- Hannig, C., and Hannig, M. (2009). The oral cavity—a key system to understand substratum-dependent bioadhesion on solid surfaces in man. *Clinical Oral Investigations* 13, 123–139.
- Hannig, C., Follo, M., Hellwig, E., and Al-Ahmad, A. (2010). Visualization of adherent micro-organisms using different techniques. *J Med Microbiol* 59, 1–7.
- Hannig, M., and Hannig, C. (2014). The pellicle and erosion. *Monographs in Oral Science* 25, 206.
- Hannig, M., and Joiner, A. (2006). The structure, function and properties of the acquired pellicle. *Monographs in Oral Science* 19, 29.
- Hannig, M., and Hannig, C. (2007a). Der initiale orale Biofilm—pathogen oder protektiv? *Oralprophylaxe* 29, 73–82.
- Hannig, M., Kriener, L., Hoth-Hannig, W., Becker-Willinger, C., and Schmidt, H. (2007b). Influence of nanocomposite surface coating on biofilm formation in situ. *J Nanosci Nanotechnol* 7, 4642–4648.
- Hannig, C., Hannig, M., Rehmer, O., Braun, G., Hellwig, E., and Al-Ahmad, A. (2007c). Fluorescence microscopic visualization and quantification of initial bacterial colonization on enamel in situ. *Archives of Oral Biology* 52, 1048–1056.
- Hannig, M., Fiebiger, M., Güntzer, M., Döbert, A., Zimehl, R., and Nekrashevych, Y. (2004). Protective effect of the in situ formed short-term salivary pellicle. *Archives of Oral Biology* 49, 903–910.

Hay, D.I. (1973). The interaction of human parotid salivary proteins with hydroxyapatite. *Archives of Oral Biology* 18, 1529.

He, X., Hu, W., Kaplan, C.W., Guo, L., Shi, W., and Lux, R. (2012). Adherence to *Streptococci* facilitates *Fusobacterium nucleatum* integration into an oral microbial community. *Microb Ecol* 63, 532–542.

Heidemann, D. (1999). *Kariologie und Füllungstherapie* (Elsevier, Urban&FischerVerlag).

Hellwig, E., Klimek, J., and Attin, T. (2009). *Einführung in die Zahnerhaltung* (Deutscher Ärzteverlag).

Huang, R., Li, M., and Gregory, R.L. (2011). Bacterial interactions in dental biofilm. *Virulence* 2, 435–444.

Hultgren, S.J., Abraham, S., Caparon, M., Falk, P., St Geme, J.W., and Normark, S. (1993). Pilus and nonpilus bacterial adhesins: assembly and function in cell recognition. *Cell* 73, 887–901.

Ionescu, A., Wutscher, E., Brambilla, E., Schneider-Feyrer, S., Giessibl, F.J., and Hahnel, S. (2012). Influence of surface properties of resin-based composites on in vitro *Streptococcus mutans* biofilm development. *European Journal of Oral Sciences* 120, 458–465.

Ionescu, A., Brambilla, E., Wastl, D.S., Giessibl, F.J., Cazzaniga, G., Schneider-Feyrer, S., and Hahnel, S. (2015). Influence of matrix and filler fraction on biofilm formation on the surface of experimental resin-based composites. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 26.

Ionescu, A.C., Hahnel, S., Cazzaniga, G., Ottobelli, M., Braga, R.R., Rodrigues, M.C., and Brambilla, E. (2017). *Streptococcus mutans* adherence and biofilm formation on experimental composites containing dicalcium phosphate dihydrate nanoparticles. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 28.

Jakubovics, N., and Kolenbrander, P. (2010). The road to ruin: the formation of disease-associated oral biofilms. *Oral Diseases* 16, 729–739.

Jenkinson, H.F. (2011). Beyond the oral microbiome. *Environmental Microbiology* 13, 3077–3087.

Johnson, L.R. (2008). Microcolony and biofilm formation as a survival strategy for bacteria. *Journal of Theoretical Biology* 251, 24–34.

Jones, D.W. (2008). Has Dental Amalgam Been Torpedoed and Sunk? *Journal of Dental Research* 87, 101–102.

Kassebaum, N.J., Bernabé, E., Dahiya, M., Bhandari, B., Murray, C.J.L., and Marcenes, W. (2015). Global Burden of Untreated Caries A Systematic Review and Metaregression. *J DENT RES* 22034515573272.

Kawai, K., and Takaoka, T. (2001). Inhibition of bacterial and glucan adherence to various light-cured fluoride-releasing restorative materials. *Journal of Dentistry* 29, 119–122.

Kim, M.-A., Jeon, H.-S., Shin, S.-Y., Baik, B.-J., Yang, Y.-M., Lee, K.-Y., and Kim, J.-G. (2013). Rapid Detection of *S. Mutans* Surface Antigen I/II Using a Sensitive Monoclonal Anti-Ag I/II Antibody by ELISA. *Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy* 32, 336–340.

Klimek, J., and Hellwig, E. (1999). Kariesätiologie und-diagnose. In *Kariologie Und Füllungstherapie. Praxis Der Zahnheilkunde*, p. 6.

Koivunen, M.E., and Krogsrud, R.L. (2006). Principles of Immunochemical Techniques Used in Clinical Laboratories. *Laboratory Medicine* 37, 490–497.

Kolenbrander, P.E., Parrish, K.D., Andersen, R.N., and Greenberg, E.P. (1995). Intergeneric coaggregation of oral *Treponema* spp. with *Fusobacterium* spp. and intrageneric coaggregation among *Fusobacterium* spp. *Infection and Immunity* 63, 4584–4588.

Kolenbrander, P.E., Palmer, R.J., Periasamy, S., and Jakubovics, N.S. (2010). Oral multispecies biofilm development and the key role of cell–cell distance. *Nat Rev Micro* 8, 471–480.

Koo, H., Xiao, J., Klein, M.I., and Jeon, J.G. (2010). Exopolysaccharides Produced by *Streptococcus mutans* Glucosyltransferases Modulate the Establishment of Microcolonies within Multispecies Biofilms. *J. Bacteriol.* 192, 3024–3032.

- Kreth, J., Zhang, Y., and Herzberg, M.C. (2008). Streptococcal Antagonism in Oral Biofilms: *Streptococcus sanguinis* and *Streptococcus gordonii* Interference with *Streptococcus mutans*. *J. Bacteriol.* *190*, 4632–4640.
- Krzyściak, W., Jurczak, A., Kościelniak, D., Bystrowska, B., and Skalniak, A. (2014). The virulence of *Streptococcus mutans* and the ability to form biofilms. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* *33*, 499–515.
- Kuboniwa, M., and Lamont, R.J. (2010). Subgingival biofilm formation. *Periodontology 2000* *52*, 38–52.
- Kühnel, W., and others (2015). PSCHYREMBEL–Klinisches Wörterbuch, 266., aktualisierte Auflage. Hardcover XXIX, 2348 Seiten, 49. Walter de Gruyter GmbH, Berlin-Boston 2014. (Elsevier).
- Kupcsik, L. (2011). Estimation of cell number based on metabolic activity: the MTT reduction assay. *Methods Mol. Biol.* *740*, 13–19.
- Kutsch, V., and Young, D. (2011). New directions in the etiology of dental caries disease. *J Calif Dent Assoc* *39*, 716–721.
- Lawrence, J.R., Swerhone, G.D.W., Kuhlicke, U., and Neu, T.R. (2007). In situ evidence for microdomains in the polymer matrix of bacterial microcolonies. *Canadian Journal of Microbiology* *53*, 450–459.
- Leid, J.G., Willson, C.J., Shirtliff, M.E., Hassett, D.J., Parsek, M.R., and Jeffers, A.K. (2005). The Exopolysaccharide Alginate Protects *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Bacteria from IFN- γ -Mediated Macrophage Killing. *J Immunol* *175*, 7512–7518.
- Li, J., Helmerhorst, E.J., Troxler, R.F., and Oppenheim, F.G. (2004). Identification of in vivo Pellicle Constituents by Analysis of Serum Immune Responses. *Journal of Dental Research* *83*, 60–64.
- Lindh, L., Glantz, P.-O., Strömberg, N., and Arnebrant, T. (2002). On the Adsorption of Human Acidic Proline-rich Proteins (PRP-1 and PRP-3) and Statherin at Solid/liquid Interfaces. *Biofouling* *18*, 87–94.

Little, B., Wagner, P., Ray, R., Pope, R., and Scheetz, R. (1991). Biofilms: an ESEM evaluation of artifacts introduced during SEM preparation. *Journal of Industrial Microbiology* 8, 213–221.

Louis, K.S., and Siegel, A.C. (2011). Cell Viability Analysis Using Trypan Blue: Manual and Automated Methods. In *Mammalian Cell Viability*, M.J. Stoddart, ed. (Totowa, NJ: Humana Press), 7–12.

Matsui, R., and Cvitkovitch, D. (2010). Acid tolerance mechanisms utilized by *Streptococcus mutans*. *Future Microbiol* 5, 403–417.

Mabboux, F., Ponsonnet, L., Morrier, J.-J., Jaffrezic, N., and Barsotti, O. (2004). Surface free energy and bacterial retention to saliva-coated dental implant materials—an in vitro study. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 39, 199–205.

Madigan, M.T. (2009). *Brock Biology of Microorganisms* (Pearson/Benjamin Cummings).

Maeda, H., Matsu-Ura, S., Yamauchi, Y., and OHMORI, H. (2001). Resazurin as an electron acceptor in glucose oxidase-catalyzed oxidation of glucose. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 49, 622–625.

Mai, T., Rakhmatullina, E., Bleek, K., Boye, S., Yuan, J., Völkel, A., Gräwert, M., Cheaib, Z., Eick, S., Günter, C., *et al.* (2014). Poly(ethylene oxide)-*b*-poly(3-sulfopropyl methacrylate) Block Copolymers for Calcium Phosphate Mineralization and Biofilm Inhibition. *Biomacromolecules* 15, 3901–3914.

Mankovskaia, A., Lévesque, C.M., and Prakki, A. (2013). Catechin-incorporated dental copolymers inhibit growth of *Streptococcus mutans*. *Journal of Applied Oral Science* 21, 203–207.

Marsh, P.D. (1999). Microbiologic aspects of dental plaque and dental caries. *Dent Clin North Am* 43, 599–614, v–vi.

Marsh, P.D. (2004). Dental plaque as a microbial biofilm. *Caries Res.* 38, 204–211.

Marsh, P.D. (2006). Dental plaque as a biofilm and a microbial community – implications for health and disease. *BMC Oral Health* 6, S14.

- Marsh, P., and Martin, M.V. (2003). *Orale Mikrobiologie* (Georg Thieme Verlag).
- Marsh, P.D., Do, T., Beighton, D., and Devine, D.A. (2016). Influence of saliva on the oral microbiota. *Periodontology 2000* 70, 80–92.
- Martienssen, M. (2001). *Leistungen immobilisierter Mikroorganismen bei der Eliminierung von Umweltschadstoffen* (Universitäts-und Landesbibliothek).
- Mei, L., Busscher, H.J., van der Mei, H.C., and Ren, Y. (2011). Influence of surface roughness on streptococcal adhesion forces to composite resins. *Dental Materials* 27, 770–778.
- Meschede, D. (2015). *Gerthsen Physik* (Berlin u.a.: Springer Spektrum).
- Montanaro, L., Campoccia, D., Rizzi, S., Donati, M.E., Breschi, L., Prati, C., and Arciola, C.R. (2004). Evaluation of bacterial adhesion of *Streptococcus mutans* on dental restorative materials. *Biomaterials* 25, 4457–4463.
- Moreno, E.C., Kresak, M., and Hay, D.I. (1982). Adsorption thermodynamics of acidic proline-rich human salivary proteins onto calcium apatites. *J. Biol. Chem.* 257, 2981–2989.
- Moreno, E.C., Kresak, M., and Hay, D.I. (1984). Adsorption of molecules of biological interest onto hydroxyapatite. *Calcif Tissue Int* 36, 48–59.
- Morgan, T. d., and Wilson, M. (2001). The effects of surface roughness and type of denture acrylic on biofilm formation by *Streptococcus oralis* in a constant depth film fermentor. *Journal of Applied Microbiology* 91, 47–53.
- Müller, H.-P. (2012). *Checklisten der Zahnmedizin Parodontologie* (Georg Thieme Verlag).
- Müller, R., Groger, G., Hiller, K.-A., Schmalz, G., and Ruhl, S. (2007). Fluorescence-Based Bacterial Overlay Method for Simultaneous In Situ Quantification of Surface-Attached Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 2653–2660.

- Nakayama, G.R., and Caton, M.C. (1997). Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro. *Journal of Immunological Methods* 204, 205–208.
- Nobbs, A.H., Lamont, R.J., and Jenkinson, H.F. (2009). Streptococcus Adherence and Colonization. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 73, 407–450.
- Nedeljkovic, I., De Munck, J., Ungureanu, A.-A., Slomka, V., Bartic, C., Vananroye, A., Clasen, C., Teughels, W., Van Meerbeek, B., and Van Landuyt, K.L. (2017). Biofilm-induced changes to the composite surface. *J Dent* 63, 36–43.
- Norde, W. (1995). Adsorption of proteins at solid-liquid interfaces. *Cells and Materials* 5, 97–112.
- Nyvad, B., and Kilian, M. (1990). Comparison of the Initial Streptococcal Microflora on Dental Enamel in Caries-Active and in Caries-Inactive Individuals. *Caries Research* 24, 267–272.
- O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T., and Pognan, F. (2000). Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry* 267, 5421–5426.
- Okahashi, N., Nakata, M., Sakurai, A., Terao, Y., Hoshino, T., Yamaguchi, M., Isoda, R., Sumitomo, T., Nakano, K., Kawabata, S., *et al.* (2010). Pili of oral *Streptococcus sanguinis* bind to fibronectin and contribute to cell adhesion. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 391, 1192–1196.
- Olsson, J., Glantz, P.O., and Krasse, B. (1976). Surface potential and adherence of oral streptococci to solid surfaces. *Scand J Dent Res* 84, 240–242.
- Owens, D.K., and Wendt, R.C. (1969). Estimation of the surface free energy of polymers. *J. Appl. Polym. Sci.* 13, 1741–1747.
- Palmer, J., Flint, S., and Brooks, J. (2007). Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 34, 577–588.
- Palmer Jr, R.J. (2014). Composition and development of oral bacterial communities. *Periodontology* 2000 64, 20–39.

Peeters, E., Nelis, H.J., and Coenye, T. (2008). Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *Journal of Microbiological Methods* 72, 157–165.

Periasamy, S., and Kolenbrander, P.E. (2010). Central Role of the Early Colonizer *Veillonella* sp. in Establishing Multispecies Biofilm Communities with Initial, Middle, and Late Colonizers of Enamel. *J. Bacteriol.* 192, 2965–2972.

Petri, R.J. (1887). Eine kleine Modification des Kochschen Plattenverfahrens. *Centralbl Bacteriol Parasitenkunde* 1, 279–280.

Pettit, R.K., Weber, C.A., and Pettit, G.R. (2009). Application of a high throughput Alamar blue biofilm susceptibility assay to *Staphylococcus aureus* biofilms. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 8, 28.

Pratt-Terpstra, I.H., Weerkamp, A.H., and Busscher, H.J. (1989a). The Effects of Pellicle Formation on Streptococcal Adhesion to Human Enamel and Artificial Substrata with Various Surface Free-energies. *J DENT RES* 68, 463–467.

Pratt-Terpstra, I.H., Weerkamp, A.H., and Busscher, H.J. (1989b). Microbial factors in a thermodynamic approach of oral streptococcal adhesion to solid substrata. *Journal of Colloid and Interface Science* 129, 568–574.

Quirynen, M., and Bollen, C.M.L. (1995). The influence of surface roughness and surface-free energy on supra- and subgingival plaque formation in man. *Journal of Clinical Periodontology* 22, 1–14.

Quirynen, M., De Soete, M., and Van Steenberghe, D. (2002). Infectious risks for oral implants: a review of the literature. *Clinical Oral Implants Research* 13, 1–19.

Raghavendra, S., Kazi, M., Vyavahare, N., and Gaikwad, S. (2014). Effect of finishing and polishing procedures on biofilm adhesion to composite surfaces: An ex vivo study. *Journal of Dental and Allied Sciences* 3, 70.

Rampersad, S.N. (2012). Multiple Applications of Alamar Blue as an Indicator of Metabolic Function and Cellular Health in Cell Viability Bioassays. *Sensors* 12, 12347–12360.

Reitemeier, B. (2006). Einführung in die Zahnmedizin (Georg Thieme Verlag).

Rimondini, L., Faré, S., Brambilla, E., Felloni, A., Consonni, C., Brossa, F., and Carrassi, A. (1997). The Effect of Surface Roughness on Early In Vivo Plaque Colonization on Titanium. *Journal of Periodontology* 68, 556–562.

Riss, T.L., Moravec, R.A., and Niles, A.L. (2011). Cytotoxicity testing: measuring viable cells, dead cells, and detecting mechanism of cell death. *Methods Mol. Biol.* 740, 103–114.

Rölla, G., and Rykke, M. (1994). Evidence for presence of micelle-like protein globules in human saliva. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 3, 177–182.

Rosentritt, M., Hahnel, S., Gröger, G., Mühlfriedel, B., Bürgers, R., and Handel, G. (2008). Adhesion of *Streptococcus mutans* to various dental materials in a laminar flow chamber system. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 86B, 36–44.

Rosentritt, M., Ilie, N., Lohbauer, U. (2018). *Werkstoffkunde in der Zahnmedizin* (Stuttgart New York: Thieme).

Rupp, F., Axmann, D., Ziegler, C., and Geis-Gerstorfer, J. (2002). Adsorption/desorption phenomena on pure and Teflon® AF-coated titania surfaces studied by dynamic contact angle analysis. *J. Biomed. Mater. Res.* 62, 567–578.

Rüttermann, S., Beikler, T., and Janda, R. (2014). Contact angle and surface free energy of experimental resin-based dental restorative materials after chewing simulation. *Dental Materials* 30, 702–707.

Saito, T., Takatsuka, T., Kato, T., Ishihara, K., and Okuda, K. (1997). Adherence of oral streptococci to an immobilized antimicrobial agent. *Archives of Oral Biology* 42, 539–545.

Sakaguchi, R.L., and Powers, J.M. (2012). *Craig's Restorative Dental Materials* (Elsevier Health Sciences).

Sandberg, M.E., Schellmann, D., Brunhofer, G., Erker, T., Busygin, I., Leino, R., Vuorela, P.M., and Fallarero, A. (2009). Pros and cons of using resazurin staining for quantification of viable *Staphylococcus aureus* biofilms in a screening assay. *Journal of Microbiological Methods* 78, 104–106.

Sanderink, R.B.A. (2004). *Curriculum orale Mikrobiologie und Immunologie* (Quintessenz-Verlag).

Sardin, S., Morrier, J.-J., Benay, G., and Barsotti, O. (2004). In vitro streptococcal adherence on prosthetic and implant materials. Interactions with physicochemical surface properties. *Journal of Oral Rehabilitation* 31, 140–148.

Sbordone, L., and Bortolaia, C. (2003). Oral microbial biofilms and plaque-related diseases: microbial communities and their role in the shift from oral health to disease. *Clin Oral Invest* 7, 181–188.

Scheie, A.A. (1994). Mechanisms of Dental Plaque Formation. *ADR* 8, 246–253.

Schmalz, G., and Bindsvlev, D.A. (2008). *Biocompatibility of Dental Materials* (Springer Science & Business Media).

Schweikl, H., Hiller, K.-A., Carl, U., Schweiger, R., Eidt, A., Ruhl, S., Müller, R., and Schmalz, G. (2013). Salivary protein adsorption and *Streptococcus gordonii* adhesion to dental material surfaces. *Dental Materials* 29, 1080–1089.

Selwitz, R.H., Ismail, A.I., and Pitts, N.B. (2007). Dental caries. *The Lancet* 369, 51–59.

Shashibhushan, K.K., Basappa, N., and Subba Reddy, V.V. (2008). Comparison of antibacterial activity of three fluorides- and zinc-releasing commercial glass ionomer cements on strains of mutans streptococci: an in vitro study. *J Indian Soc Pedod Prev Dent* 26 *Suppl* 2, S56-61.

Shen, Y., Stojicic, S., and Haapasalo, M. (2010). Bacterial Viability in Starved and Revitalized Biofilms: Comparison of Viability Staining and Direct Culture. *Journal of Endodontics* 36, 1820–1823.

Siegrist, B.E., Brex, M.C., Gusberty, F.A., Joss, A., and Lang, N.P. (1991). In vivo early human dental plaque formation on different supporting substances. A

scanning electron microscopic and bacteriological study. *Clinical Oral Implants Research* 2, 38–46.

Siqueira, W.L., Custodio, W., and McDonald, E.E. (2012). New Insights into the Composition and Functions of the Acquired Enamel Pellicle. *Journal of Dental Research* 91, 1110–1118.

Slaughter, M., Bugelski, P., and O'Brien, P. (1999). Evaluation of Alamar Blue Reduction for the In Vitro Assay of Hepatocyte Toxicity. *Toxicology in Vitro* 13, 567–569.

Steinberg, D., and Eyal, S. (2004). Initial biofilm formation of *Streptococcus sobrinus* on various orthodontics appliances. *Journal of Oral Rehabilitation* 31, 1041–1045.

Stoddart, M.J. (2011a). Cell viability assays: introduction. *Methods Mol. Biol.* 740, 1–6.

Stoddart, M.J. (2011b). WST-8 analysis of cell viability during osteogenesis of human mesenchymal stem cells. *Methods Mol. Biol.* 740, 21–25.

Takahashi, N. (2003). Acid-neutralizing activity during amino acid fermentation by *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Fusobacterium nucleatum*. *Oral Microbiology and Immunology* 18, 109–113.

Tanner, J., Carlén, A., Söderling, E., and Vallittu, P.K. (2003). Adsorption of parotid saliva proteins and adhesion of *Streptococcus mutans* ATCC 21752 to dental fiber-reinforced composites. *J. Biomed. Mater. Res.* 66B, 391–398.

Tawakoli, P.N., Al-Ahmad, A., Hoth-Hannig, W., Hannig, M., and Hannig, C. (2013). Comparison of different live/dead stainings for detection and quantification of adherent microorganisms in the initial oral biofilm. *Clinical Oral Investigations* 17, 841–850.

Teughels, W., Van Assche, N., Sliepen, I., and Quirynen, M. (2006). Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. *Clinical Oral Implants Research* 17, 68–81.

Tschernin, M. (2003). Oberflächeneigenschaften von Zahnrestaurationsmaterialien. *Imu*.

- Vacca Smith, A.M., and Bowen, W.H. (2000). In situ studies of pellicle formation on hydroxyapatite discs. *Archives of Oral Biology* 45, 277–291.
- Valm, A.M., Welch, J.L.M., Rieken, C.W., Hasegawa, Y., Sogin, M.L., Oldenbourg, R., Dewhirst, F.E., and Borisy, G.G. (2011). Systems-level analysis of microbial community organization through combinatorial labeling and spectral imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 4152–4157.
- Van den Driessche, F., Rigole, P., Brackman, G., and Coenye, T. (2014). Optimization of resazurin-based viability staining for quantification of microbial biofilms. *Journal of Microbiological Methods* 98, 31–34.
- Vogler, E.A. (1998). Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces. *Advances in Colloid and Interface Science* 74, 69–117.
- Vogler, E.A. (1999). Water and the acute biological response to surfaces. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 10, 1015–1045.
- Volk, R. (2013). *Rauheitsmessung: Theorie und Praxis* (Beuth Verlag).
- Voytik-Harbin, S.L., Brightman, A.O., Waisner, B., Lamar, C.H., and Badylak, S.F. (1998). Application and evaluation of the alamarBlue assay for cell growth and survival of fibroblasts. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 34, 239–246.
- Wang, C., Zhao, Y., Zheng, S., Xue, J., Zhou, J., Tang, Y., Jiang, L., and Li, W. (2015). Effect of enamel morphology on nanoscale adhesion forces of streptococcal bacteria: An AFM study: Effect of morphology on bacterial adhesion. *Scanning* 37, 313–321.
- Watanabe, T., Miyazaki, M., Takamizawa, T., Kurokawa, H., Rikuta, A., and Ando, S. (2005). Influence of polishing duration on surface roughness of resin composites. *Journal of Oral Science* 47, 21–25.
- Weber, K., Delben, J., Bromage, T.G., and Duarte, S. (2014). Comparison of SEM and VPSEM imaging techniques with respect to *Streptococcus mutans* biofilm topography. *FEMS Microbiol. Lett.* 350, 175–179.

- Weerkamp, A.H., Van der Mei, H.C., and Busscher, H.J. (1985). The Surface Free Energy of Oral Streptococci after being Coated with Saliva and its Relation to Adhesion in the Mouth. *Journal of Dental Research* *64*, 1204–1210.
- Weerkamp, A.H., Uyen, H.M., and Busscher, H.J. (1988). Effect of Zeta Potential and Surface Energy on Bacterial Adhesion to Uncoated and Saliva-coated Human Enamel and Dentin. *Journal of Dental Research* *67*, 1483–1487.
- Welin, J., Wilkins, J., Beighton, D., Wrzesinski, K., Fey, S., Mose-Larsen, P., Hamilton, I., and Svensäter, G. (2003). Effect of acid shock on protein expression by biofilm cells of *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiology Letters* *227*, 287–293.
- Welin-Neilands, J., and Svensater, G. (2007). Acid Tolerance of Biofilm Cells of *Streptococcus mutans*. *Applied and Environmental Microbiology* *73*, 5633–5638.
- Whitehead, S.A., and Shearer, A.C. (1995). Comparison of methods for measuring surface roughness of ceramic. *Journal of Oral Rehabilitation* *22*, 421–427.
- Whitehead, K.A., Rogers, D., Colligon, J., Wright, C., and Verran, J. (2006). Use of the atomic force microscope to determine the effect of substratum surface topography on the ease of bacterial removal. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* *51*, 44–53.
- Whitmore, S.E., and Lamont, R.J. (2011). The pathogenic persona of community-associated oral streptococci. *Molecular Microbiology* *81*, 305–314.
- Whittaker, C.J., Klier, C.M., and Kolenbrander, P.E. (1996). Mechanisms of adhesion by oral bacteria. *Annual Review of Microbiology* *50*, 513–552.
- Wilking, J.N., Zaboradaev, V., De Volder, M., Losick, R., Brenner, M.P., and Weitz, D.A. (2013). Liquid transport facilitated by channels in *Bacillus subtilis* biofilms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *110*, 848–852.
- Wilson, W.W., Wade, M.M., Holman, S.C., and Champlin, F.R. (2001). Status of methods for assessing bacterial cell surface charge properties based on zeta potential measurements. *Journal of Microbiological Methods* *43*, 153–164.

- Winkler, C., Schäfer, L., Felthaus, O., Allerdings, J., Hahnel, S., Behr, M., and Bürgers, R. (2014). The bacterial adhesion on and the cytotoxicity of various dental cements used for implant-supported fixed restorations. *Acta Odontologica Scandinavica* 72, 241–250.
- Wislsperger, B.V. (2012). Untersuchungen zur initialen Biofilmbildung von koaggregierenden oralen Keimen an zahnärztlichen Werkstoffen in vitro.
- Wlodkovic, D., Telford, W., Skommer, J., and Darzynkiewicz, Z. (2011). Apoptosis and Beyond: Cytometry in Studies of Programmed Cell Death. In *Methods in Cell Biology*, (Elsevier), pp. 55–98.
- Woolston, C., and Martin, S. (2011). Analysis of tumor and endothelial cell viability and survival using sulforhodamine B and clonogenic assays. *Methods Mol. Biol.* 740, 45–56.
- Wright, C.J., Burns, L.H., Jack, A.A., Back, C.R., Dutton, L.C., Nobbs, A.H., Lamont, R.J., and Jenkinson, H.F. (2013). Microbial interactions in building of communities. *Molecular Oral Microbiology* 28, 83–101.
- Wu, G. (2010). *Assay development: fundamentals and practices* (Hoboken, N.J: Wiley).
- Wu, Y., Simonovsky, F.I., Ratner, B.D., and Horbett, T.A. (2005). The role of adsorbed fibrinogen in platelet adhesion to polyurethane surfaces: A comparison of surface hydrophobicity, protein adsorption, monoclonal antibody binding, and platelet adhesion. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 74A, 722–738.
- Xiao, J., and Koo, H. (2010). Structural organization and dynamics of exopolysaccharide matrix and microcolonies formation by *Streptococcus mutans* in biofilms. *Journal of Applied Microbiology* 108, 2103–2113.
- Xiao, J., Klein, M.I., Falsetta, M.L., Lu, B., Delahunty, C.M., Yates, J.R., Heydorn, A., and Koo, H. (2012). The Exopolysaccharide Matrix Modulates the Interaction between 3D Architecture and Virulence of a Mixed-Species Oral Biofilm. *PLoS Pathogens* 8, e1002623.

Internetquellen

www.homd.org Human Oral Microbiome Database [Internet].
[zitiert 4. August 2019].

www.alfa.com Resazurin sodium salt - 7-Hydroxy-3H-phenoxazin-3-one-10-oxide sodium salt - Alfa Aesar [Internet]. [zitiert 4. August 2019].
Verfügbar unter:
<https://www.alfa.com/de/catalog/B21187/>

www.thermofisher.com AlamarBlue - Rapid and Accurate Cell Health Indicator [Internet]. [zitiert 4. August 2019]. Verfügbar unter:
<https://www.thermofisher.com/de/de/home/brands/molecular-probes/key-molecular-probes-products/alarblue-rapid-and-accurate-cell-health-indicator.html>

www.thermofisher.com LIVE/DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability Kit, for microscopy [Internet]. [zitiert 4. August 2019]. Verfügbar unter:
<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/L7007>

www.kruss.de Surface tension measurement - KRÜSS GmbH [Internet]. [zitiert 4. August 2019]. Verfügbar unter:
<https://www.kruss-scientific.com/services/education-theory/glossary/contact-angle/>

www.dentsply.eu Dentsply DeTrey - Gebrauchsanweisungen [Internet]. [zitiert 4. August 2019]. Verfügbar unter:
<http://www.dentsply.eu/docs/ifudocs.aspx?id=31746&domid=1042&sp=D&m1=31071&m2=31129&m3=31233&m4=31746&lgi=>

www.3mdeutschland.de Ketac™ Molar Glasionomer-Füllungsmaterial - 3M ESPE Dentalprodukte - 3M Deutschland [Internet]. [zitiert 4. August 2019].
Verfügbar unter:
http://solutions.3mdeutschland.de/wps/portal/3M/de_DE/3M_ESPE/Dental-Manufacturers/Products/Dental-Restorative-Materials/Glass-Ionomer/Ketac-Molar/#tab5

www.uniklinikum-regensburg.de Universitätsklinikum Regensburg - Werkstoffprüfung [Internet]. [zitiert 4. August 2019]. Verfügbar unter:

http://www.uniklinikum-regensburg.de/kliniken-institute/zahnaerztliche-prothetik/Forschung/Ger__teausstattung/Werkstoffpr__fung/index.php

www.ivoclarvivadent.com Compoglass F [Internet].

[zitiert 4. August 2019].

Verfügbar unter:

<http://www.ivoclarvivadent.ch/de-ch/produktkategorien/fllen/compoglass-f>

www.henryschein-dental.de HS-Compomer [Internet].

[zitiert 4. August 2019].

Verfügbar unter:

[https://www.henryschein-dental.de/global/Shopping/](https://www.henryschein-dental.de/global/Shopping/ProductDetailsFullPage.aspx?productid=9008261&CatalogName=WEBDENT)

[ProductDetailsFullPage.aspx?productid=9008261&CatalogName=WEBDENT](https://www.henryschein-dental.de/global/Shopping/ProductDetailsFullPage.aspx?productid=9008261&CatalogName=WEBDENT)
&FullPageMode=true

Danksagungen

Für die freundliche Überlassung des Themas sowie die Bereitstellung der Arbeitsmittel und des Labors der Poliklinik für Zahnärztliche Prothetik der Universität Regensburg möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. G. Handel herzlich bedanken.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Ralf Bürgers für die wissenschaftliche Betreuung und Korrektur der Arbeit, sowie für zahlreiche Hinweise und Ratschläge.

Prof. Dr. Sebastian Hahnel danke ich herzlich für die Übernahme der Betreuung. Frau MTA Gerlinde Held war eine unersetzliche und immer freundliche Hilfe bei der Durchführung der Versuche. Ihr gilt ein besonderes Dankeschön für die labortechnische Unterstützung.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich besonders für Ihre Unterstützung und Geduld.