

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR ZAHNÄRZTLICHE PROTHETIK

PROF. DR. GERHARD HANDEL

DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN

DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

UNTERSUCHUNGEN ZUR BIOFILMBILDUNG AUF
PROTHESENBASIS MATERIALIEN MIT ANTEILEN VON
NANOPARTIKULÄREM ZINKOXID, CALCIUMOXID UND TITANDIOXID

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Zahnmedizin

der

Fakultät der Medizin

der Universität Regensburg

vorgelegt von

Melissa Anna Anwander

2018

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR ZAHNÄRZTLICHE PROTHETIK

PROF. DR. GERHARD HANDEL

DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN

DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

UNTERSUCHUNGEN ZUR BIOFILMBILDUNG AUF
PROTHESEBASIS MATERIALIEN MIT ANTEILEN VON
NANOPARTIKULÄREM ZINKOXID, CALCIUMOXID UND TITANDIOXID

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Zahnmedizin

der

Fakultät der Medizin

der Universität Regensburg

vorgelegt von

Melissa Anna Anwander

2018

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1.Berichterstatter: Prof. Dr. Sebastian Hahnel

2.Berichterstatter: Prof. Dr. Kerstin Galler

Tag der mündlichen Prüfung: 28.06.2018

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
2	Literaturübersicht.....	4
2.1	Physiologische Grundlagen	4
2.1.1	Natürlicher Speichel	4
2.1.1.1	Bildung.....	4
2.1.1.2	Zusammensetzung.....	4
2.1.1.3	Funktion.....	6
2.1.2	Biofilm.....	7
2.1.2.1	Erworbenes Pellicel	7
2.1.2.2	Plaque.....	9
2.1.2.3	Proliferation von Mikroorganismen auf zahnärztlichen Werkstoffen	12
2.2	Künstlicher Speichel	13
2.3	Verwendete Mikroorganismen	14
2.3.1	<i>Candida albicans</i>	14
2.3.2	<i>Actinomyces naeslundii</i> T14V	18
2.3.3	<i>Streptococcus gordonii</i> DL1	19
2.4	Verwendete Werkstoffe	21
2.4.1	Prothesenbasismaterial <i>Palapress® vario</i>	21
2.4.2	Prothesenbasismaterial <i>Palapress® vario</i> mit Zusätzen.....	22
2.4.2.1	Zinkoxid (ZnO).....	23
2.4.2.2	Calciumoxid (CaO)	23
2.4.2.3	Titandioxid (TiO ₂).....	24
2.4.3	Kobaltchrom-Legierung <i>Wirobond® LFC</i>	25
2.4.4	Verblendkomposit <i>Sinfony™</i>	26
3	Material und Methode	28
3.1	Aufgabenstellung.....	28
3.2	Prüfkörper	28
3.2.1	Herstellung	28
3.2.1.1	<i>Palapress® vario</i> mit Zusätzen (0,1%, 0,2%, 0,4%, 0,8%)	28
3.2.1.2	<i>Palapress® vario</i>	29
3.2.1.3	<i>Wirobond® LFC</i>	30
3.2.1.4	<i>Sinfony™</i>	30

3.2.2	Nachbearbeitung.....	31
3.2.3	Bestimmung der Oberflächenrauigkeit.....	31
3.2.4	Bestimmung der freien Oberflächenenergie.....	31
3.2.5	Waschen, Einkleben und Wasserlagerung.....	32
3.2.6	Wiederverwendung.....	32
3.3	Herstellung der Lösungen und Medien.....	33
3.3.1	<i>Phosphatgepufferte Salzlösung (=PBS, phosphate buffered saline)</i>	33
3.3.2	Speichelgemisch aus natürlichem und künstlichem Speichel.....	33
3.3.2.1	Natürlicher Speichel.....	33
3.3.2.2	Künstlicher Speichel.....	33
3.3.3	<i>Schädlermedium</i>	34
3.3.4	Ertragsreagens und Lysis-Reagens für farbmetrische MTT-Assays.....	34
3.3.5	<i>FUN® 1 Cell-Stain</i>	35
3.3.6	Kultivierung der Mikroorganismen.....	35
3.4	Versuche.....	36
3.4.1	Überblick.....	36
3.4.2	Aufbau und Ablauf.....	37
3.5	Fluoreszenzmikroskopie.....	39
3.6	Rasterelektronenmikroskopie.....	39
3.7	Datenverarbeitung und statistische Auswertung.....	40
3.7.1	Graphische Darstellung: Fehlerbalken.....	40
3.7.2	Statistische Auswertung.....	40
4	Ergebnisse.....	42
4.1	Eigenschaften der <i>Palapress® vario</i> –Prüfkörper mit Zusätzen von Zinkoxid-, Calciumoxid- und Titandioxidnanopartikeln.....	42
4.1.1	Oberflächenrauigkeit.....	42
4.1.1.1	Metalloxid-Konzentration 0,1%.....	42
4.1.1.2	Metalloxid-Konzentration 0,2%.....	43
4.1.1.3	Metalloxid-Konzentration 0,4%.....	44
4.1.1.4	Metalloxid-Konzentration 0,8%.....	45
4.1.2	Kontaktwinkelmessung und Bestimmung der Oberflächenenergie.....	46
4.1.2.1	Metalloxid-Konzentration 0,1%.....	46
4.1.2.2	Metalloxid-Konzentration 0,2%.....	48
4.1.2.3	Metalloxid-Konzentration 0,4%.....	50
4.1.2.4	Metalloxid-Konzentration 0,8%.....	52

4.2	Biofilmbildung auf Prothesenbasismaterial mit Zusatz von ZnO, CaO und TiO ₂	54
4.2.1	Analyse der relativen Zellzahl (mittels MTT-Assays).....	54
4.2.1.1	Untersuchungen der Monospezieskultur aus <i>Candida albicans</i>	54
4.2.1.1.1	Metalloxid-Konzentration 0,1%.....	54
4.2.1.1.2	Metalloxid-Konzentration 0,2%.....	55
4.2.1.1.3	Metalloxid-Konzentration 0,4%.....	56
4.2.1.1.4	Metalloxid-Konzentration 0,8%.....	57
4.2.1.2	Untersuchungen der Multispezieskultur aus <i>Candida albicans</i> , <i>Actinomyces naeslundii T14V</i> und <i>Streptococcus gordonii DL1</i>	58
4.2.1.2.1	Metalloxid-Konzentration 0,1%.....	58
4.2.1.2.2	Metalloxid-Konzentration 0,2%.....	60
4.2.1.2.3	Metalloxid-Konzentration 0,4%.....	61
4.2.1.2.4	Metalloxid-Konzentration 0,8%.....	62
4.2.2	Fluoreszenzmikroskopische Analyse.....	62
4.2.2.1	Untersuchungen der Monospezieskultur aus <i>Candida albicans</i>	63
4.2.2.1.1	Metalloxid-Konzentration 0,1%.....	63
4.2.2.1.2	Metalloxid-Konzentration 0,2%.....	64
4.2.2.1.3	Metalloxid-Konzentration 0,4%.....	65
4.2.2.1.4	Metalloxid-Konzentration 0,8%.....	66
4.2.2.2	Untersuchungen der Multispezieskultur aus <i>Candida albicans</i> , <i>Actinomyces naeslundii T14V</i> und <i>Streptococcus gordonii DL1</i>	67
4.2.2.2.1	Metalloxid-Konzentration 0,1%.....	67
4.2.2.2.2	Metalloxid-Konzentration 0,2%.....	68
4.2.2.2.3	Metalloxid-Konzentration 0,4%.....	69
4.2.2.2.4	Metalloxid-Konzentration 0,8%.....	70
4.2.2.3	Fluoreszenzmikroskopische Bilder.....	71
4.2.3	Rasterelektronenmikroskopische Analyse.....	72
4.2.3.1	Morphologische Darstellung des Monospeziesbiofilms aus <i>Candida albicans</i>	72
4.2.3.2	Morphologische Darstellung des Multispeziesbiofilms aus <i>Candida albicans</i> , <i>Actinomyces naeslundii T14V</i> und <i>Streptococcus gordonii DL1</i>	74
5	Diskussion.....	76
5.1	Diskussion der Methoden.....	76
5.1.1	Verwendeter natürlicher und künstlicher Speichel.....	76
5.1.2	Verwendetes Nährmedium - <i>Schädlermedium</i>	77
5.1.3	Verwendete Mikroorganismen.....	78
5.1.4	Verwendete Werkstoffe.....	80

5.1.5	Herstellung, Bearbeitung und Wiederverwendung der Prüfkörper.....	80
5.1.6	Bestimmung der Oberflächenrauigkeit und der freien Oberflächenenergie.....	81
5.1.7	Experimentelle Pellikelbildung	82
5.1.8	Experimentelle Biofilmbildung	84
5.1.9	Verwendete Auswertungsmethoden	85
5.2	Diskussion der Ergebnisse	87
6	Zusammenfassung.....	96
7	Resümee	97
8	Literaturverzeichnis.....	98
9	Danksagung	118

1 Einleitung

In Deutschland tragen viele, überwiegend ältere Patienten herausnehmbaren Zahnersatz. Laut der aktuellen, fünften deutschen Mundgesundheitsstudie (DMS V [Jordan et al. 2016a]) ist die Anzahl fehlender Zähne in allen Altersstufen rückläufig; dies ist auf bessere Prophylaxe, (zahn-) gesundheitliche Aufklärung, bessere Mundhygiene und dadurch bedingten längeren Erhalt eigener Zähne zurückzuführen. Im Jahr 1997 (DMS III) war noch jeder vierte jüngere Senior (65- bis 74-Jährige) zahnlos (24,8 Prozent), heute nur noch jeder Achte (12,4 Prozent) (siehe Abb. 1). Darüber hinaus besitzen jüngere Senioren heutzutage mindestens fünf eigene Zähne mehr als noch im Jahr 1997 (DMS III: 10,4 vs. DMS V: 16,9 Zähne) [Jordan et al. 2016a].

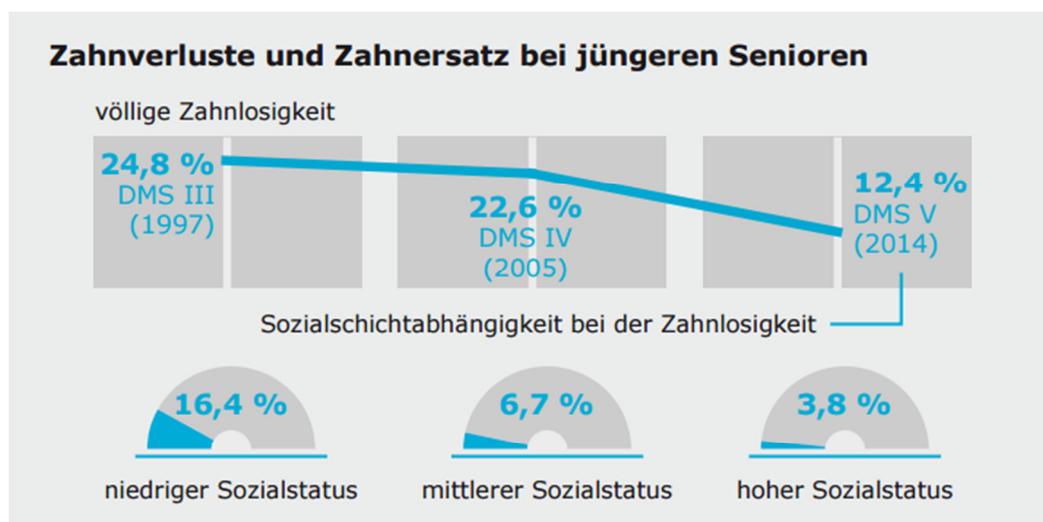


Abb. 1: Halbierung der Zahnlosigkeit bei jüngeren Senioren (65- bis 74-Jährige); Sozialschichtabhängigkeit bei Zahnverlusten [Jordan et al. 2016b].

Die fünfte deutsche Mundgesundheitsstudie betrachtete darüber hinaus einen weiteren wichtigen Aspekt der deutschen Zahn- und Mundgesundheit: ältere Senioren (75- bis 100-Jährige) mit Pflegebedarf wurden mit Altersgenossen ohne Pflegebedarf verglichen. Abb. 2 zeigt deutlich auf, dass pflegebedürftige, ältere Senioren einen niedrigeren Kariessanierungsgrad (69,2 Prozent vs. 83,0 Prozent) und weniger eigene Zähne haben (22,4 vs. 17,8 fehlende Zähne), zudem liegt häufiger eine völlige Zahnlosigkeit vor (53,7 Prozent vs. 32,8 Prozent). Drei wichtige Kriterien nehmen bei pflegebedürftigen, älteren Senioren stark ab: Therapiefähigkeit, Mundhygienefähigkeit und Eigenverantwortung [Jordan et al. 2016a]. Das alles sind Gründe dafür, dass, trotz der allgemeinen Tendenz zu feststehendem Zahnersatz, ältere, pflegebedürftige Senioren nach wie vor häufig über herausnehmbaren Zahnersatz verfügen [Heidemann 2008; Jordan et al. 2016a].

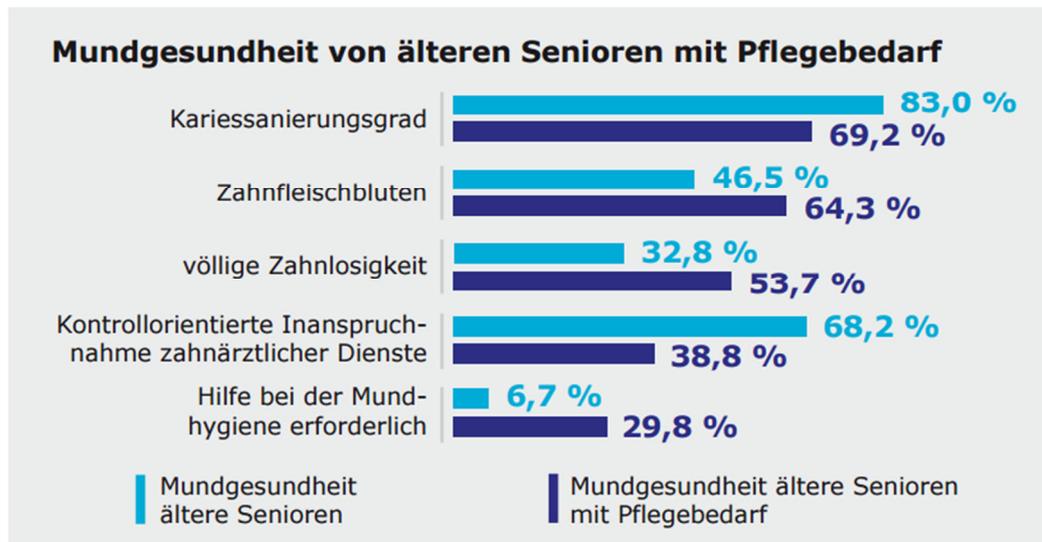


Abb. 2: Ältere Senioren mit Pflegebedarf (75- bis 100-Jährige) weisen eine schlechtere Mundgesundheit auf und benötigen mehr Hilfe bei der Mundhygiene [Jordan et al. 2016b].

Einerseits gilt die gute Hygienefähigkeit als einer der Hauptvorteile von herausnehmbaren Zahnersatz – dies spielt vor allem bei älteren, manuell gehandicapten und pflegebedürftigen Patienten eine wichtige Rolle [Heidemann 2008] – andererseits muss beachtet werden, dass herausnehmbarer Zahnersatz eine Adhäsionsgrundlage für Mikroorganismen schafft. So haben Nair et al. kürzlich gezeigt, dass zwischen der Tragedauer von herausnehmbaren Zahnersatz und der mikrobiellen Kontamination des Zahnersatzes ein linearer Zusammenhang besteht – je länger die Tragedauer, desto höher die Zahl adhärierter Mikroorganismen. Streptokokken und *Staphylococcus aureus* waren nach einem Monat Tragedauer signifikant ($P < .05$) nachweisbar, *Candida albicans*, Diptheroide, *Escherichia coli* und Mikrokokken waren nach sechs Monaten Tragedauer zusätzlich deutlich vorhanden [Nair et al. 2016]. Bianchi et al. haben in Ihrer Untersuchung festgestellt, dass Patienten mit herausnehmbarem Zahnersatz viel häufiger orale Candida-Vorkommen aufweisen als Patienten ohne herausnehmbaren Zahnersatz und dass fast alle Patienten, die an einer Candidiasis erkrankt sind, Prothesenträger waren (83,3 Prozent) [Bianchi et al. 2016].

Zahlreiche weitere Krankheiten, die, aufgrund des größeren Keimreservoirs, vermehrt bei Prothesenträgern auftreten können, werden seit langer Zeit untersucht: Prothesenstomatopathien [Walter and Frank 1985; Corrado 1990; Martori et al. 2014], Cheilitis angularis [Corrado 1990; Martori et al. 2014], Candidiasis [Baran and Nalcaci 2009; Bianchi et al. 2016], Candida-Pneumonien [Hietala et al. 1982], Pneumonien, die durch schlechte Mundhygiene bei Patienten mit herausnehmbarem Zahnersatz ausgelöst werden können [Iinuma et al. 2015], gastrointestinale Infektionen und Aspirationspneumonien, die als disseminierte Infektionen durch oralen *Candida albicans* auftreten können [Nikawa et al. 2005; Coulthwaite and Verran 2007].

Um diesen Krankheiten vorzubeugen, werden Möglichkeiten gesucht, die Keimzahl auf herausnehmbarem Zahnersatz zu reduzieren.

Metalloxide wie Zinkoxid, Calciumoxid und Titandioxid wurden untersucht und ihnen werden antimikrobielle Eigenschaften zugeschrieben – es konnten antifungale Effekte [Sawai and Yoshikawa 2004] und die Hemmung mikrobieller Adhäsion auf Kunststoffen nachgewiesen werden [Arai et al. 2009]. Vor allem Metalloxide in Nanopartikelform zeigen antimikrobielle Aktivität – Zinkoxid-

Nanopartikel zeigten starke Wirkung gegen gram-positive und gram-negative Bakterien [Azam et al. 2012; Dizaj et al. 2014].

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die Biofilmbildung auf Prothesenbasismaterialien, die mit nanopartikulären Zusätzen von Zinkoxid, Calciumoxid und Titandioxid modifiziert wurden, zu untersuchen. Der Studie lag die Hypothese zugrunde, dass eine Modifikation der Prothesenbasismaterialien mit Zinkoxid, Calciumoxid und Titandioxid eine Verminderung der Biofilmbildung bewirkt.

2 Literaturübersicht

2.1 Physiologische Grundlagen

2.1.1 Natürlicher Speichel

2.1.1.1 Bildung

Der Speichel wird in der Mundhöhle zu einem kleinen Teil von den akzessorischen Speicheldrüsen gebildet - diese liegen vor allem in Lippen, Zunge, Wangenschleimhaut und Gaumen [Holsinger and Bui 2007] - und zu einem deutlich größeren Teil von den drei paarig gelegenen, großen Speicheldrüsen: Glandula parotis, Glandula submandibularis und Glandula sublingualis [Ekstrand and Zero 2012]. Die Ohrspeicheldrüse (Glandula parotis) ist die größte dieser drei Speicheldrüsen und wiegt im Mittel zwischen 15 – 30 g. Sie ist eine rein seröse Drüse und sezerniert über den Stenon-Gang einen wässrigen, Amylase-haltigen Speichel in die Mundhöhle [Holsinger and Bui 2007; Ekstrand and Zero 2012]. Der seröse Speichel der Glandula parotis enthält zusätzlich zum Wasser, Elektrolyte und Glykoproteine [Vaupel 2010]. Bei den Unterzungen- und Unterkieferdrüsen (Glandula sublingualis und Glandula submandibularis) handelt es sich um gemischte Drüsen, sog. sero-muköse Drüsen, die zusätzlich Muzine (saccharidreiche Glykoproteine) produzieren [Vaupel 2010]. Hierbei handelt es sich bei der Glandula submandibularis um eine vorwiegend seröse, bei der Glandula sublingualis um eine vorwiegend muköse Drüse [Holsinger and Bui 2007].

Innerhalb eines Tages werden 0,6-1,5 l Speichel sezerniert [Vaupel 2010]; die unstimulierte Bildungsrate liegt bei 0,25 ml Speichel pro Minute, die durch Stimulation auf 0,7 ml pro Minute ansteigt [Ekstrand and Zero 2012]. Die reflektorische Erhöhung der Sekretion wird ausgelöst durch Nahrungsaufnahme, Geruch und Anblick von Speisen, aber auch durch Übelkeit [Vaupel 2010]. Der durchschnittliche pH-Wert des Speichels liegt zwischen 6,75 und 7,25, variiert aber abhängig von der Speichelfließrate und der Pufferkapazität. Die Menge aus Ruhespeichel und stimuliertem Speichel bezeichnet man als Gesamtspeichel [Marsh and Martin 2003].

Die Speichelbildung ist zweiteilig: so handelt es sich bei dem in den Drüsenzazini gebildeten Primärspeichel zunächst um einen blutisotonen Speichel, der sich nach Durchtritt durch die Drüsenausführungsgänge durch Resorptions- und Sezernierungsvorgänge von Na⁺, K⁺, Cl⁻-Ionen und Wasser zu einem hypotonen Speichel wandelt [Hick 2013].

2.1.1.2 Zusammensetzung

Der Gesamtspeichel besteht zu 99,5 % aus Wasser, die übrigen 0,5 % stellen anorganische (0,17 %) und organische (0,33 %) Bestandteile dar [Jungermann and Möhler 1980], die in ihrer Menge und Zusammensetzung abhängig von den äußeren Einflüssen und individuellen Begebenheiten stark variieren [Mandel 1987a]. Die Zusammensetzung des Speichels hängt zum einen davon ab, aus

welcher Speicheldrüse der Speichel stammt, und zum anderen, ob es sich um stimulierten oder unstimulierten Speichel handelt [Edgar et al. 2004; Klimek 2007b].

Die bedeutendsten anorganischen Bestandteile sind Elektrolyte wie Kalium, Natrium, Kalzium, Chlorid, Bikarbonat, Phosphat sowie Thiocyanat und Fluorid [Edgar et al. 2004; Klimek 2007b].

	unstimuliert	stimuliert
Natrium (mmol/l)	2-26	13-80
Kalium (mmol/l)	13-40	13-38
Kalzium (mmol/l)	0,5-2,8	0,2-4,7
Chlorid (mmol/l)	8-40	10-56
Bikarbonat (mmol/l)	0,1-8	4-40
Phosphat (mmol/l)	2-22	1,5-25
Thiocyanat (mmol/l)	0,4-5	0,4-3
Fluorid (μ mol/l)	0,2-2,8	0,8-6-3

Tab. 1: Wichtige anorganische Bestandteile des Gesamtspeichels [Whelton 2004].

Die organischen Bestandteile setzen sich zusammen aus niedermolekularen Bestandteilen wie Harnstoff, Harnsäure, Lipiden, Milchsäure, Zitronensäure und Glucose, und hochmolekularen wie Glykoproteine (Muzine), Enzyme (Amylase, Peroxidase, Lysozym), Immunglobuline (IgA) und antibakteriell wirksame Proteinen [Hinsberg and Schmid 1953; Buddecke 1981; Scheibe 2006].

Gesamtprotein (Proteine und Glykoproteine)	ca. 2 g/l
α -Amylase	ca. 0,4 g/l
Muzine	ca. 0,4 g/l
Lysozym	ca. 0,2 g/l
Prolin-reiche Proteine	ca. 0,2-0,8 g/l
Harnstoff	3-5 mmol/l

Tab. 2: Wichtige organische Bestandteile des Gesamtspeichels [Tenovuo 2004].

Die häufigsten organischen Bestandteile sind Glykoproteine und Proteine (ca. 2 g/l Gesamtspeichel), die zu 90 % von den Speicheldrüsen gebildet werden; 10 % der Proteine sind Stoffwechselprodukte von Bakterien und stammen aus dem Blutserum oder den Zellen der Mundschleimhaut. Zu diesen Proteinen zählen u.a. das Enzym α -Amylase, antibakterielle Proteine wie Lysozym, Lactoferrin und Peroxidase sowie Immunglobulin A [Buddecke 1981]. Das wichtigste Glykoprotein im Speichel ist Muzin, das in zwei verschiedenen Formen auftritt: hochmolekulares Muzin-Glykoprotein 1 (MUC5B,

früher MG1 [Thornton et al. 1999]) und Glykoproteine des Muzintyps 2 mit niedrigem Molekulargewicht (MUC7, früher MG2 [Bobek et al. 1993]) [Tenovuo 2004; Scheibe 2006; Klimek 2007b]. Weitere wichtige Komponenten sind prolinreiche Proteine (PRPs) und Statherin, die als Inhibitoren wirken, indem sie der Ausfällung von Kalziumphosphaten entgegenwirken, sowie Agglutinin, histidinreiche Proteine (Histatine), Defensine und Cystatine [Klimek 2007b]. Auch freie Aminosäuren kommen im Speichel vor; Glutaminsäure, Glycin, Serin, Asparginsäure, Alanin und Leucin wurden beispielsweise in höheren Konzentrationen nachgewiesen [Al-Hashimi and Levine 1989].

2.1.1.3 Funktion

Die Funktionen des Speichels sind so vielfältig wie seine Zusammensetzung.

Speichel und seine Funktionen

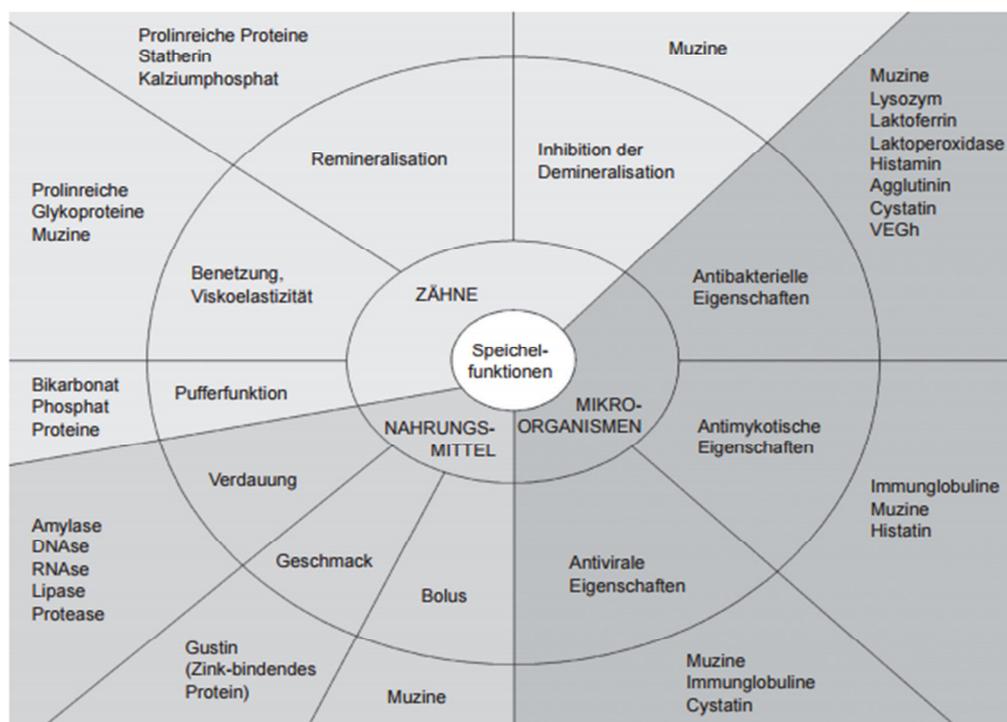


Abb. 3: Funktionen des Speichels, abhängig von den Speichelbestandteilen [van Nieuw Amerongen et al. 2004].

Die sechs Hauptaufgaben des humanen Speichels sind [Tenovuo et al. 1981; Tabak et al. 1982; Mandel 1987b; Douglas 1994; Rudney 1995; Humphrey and Williamson 2001; Marsh and Martin 2003; van Nieuw Amerongen et al. 2004; Klimek 2007a; Ekstrand and Zero 2012; Hellwig et al. 2013]:

(1) Spül-/Reinigungsfunktion: Verantwortlich für das Spülen und Reinigen der Mundhöhle ist der Speichel als Gesamtflüssigkeit mit seinem Hauptbestandteil Wasser.

(2) Pufferung von Säuren: Diese Aufgabe übernehmen Bikarbonat- und Phosphatpuffer, indem sie organische Säuren neutralisieren und Speichel zu einer kalzium- und phosphatreichen Remineralisationslösung machen.

(3) (Re-)Mineralisation und Inhibition der Demineralisation von Zahnhartsubstanzen: Unterstützend für die Remineralisation wirken anorganische Bestandteile wie Fluorid, Kalzium und Phosphat sowie das Protein Statherin.

(4) Lubrikation der gesamten Mundhöhle: Die Muzine dienen der Benetzung der Gewebe, schützen vor Austrocknung und führen gemeinsam mit Wasser zur Formung eines Speisebolus, wodurch Kauen, Schlucken und Sprechen erleichtert wird.

(5) antimikrobielle Aktivität gegen Bakterien, Viren und Pilze: Die antimikrobielle Speichelaktivität ist auf viele verschiedene Bestandteile zurückzuführen. Lysozyme zerstören Bakterienwände, Laktoferrin hemmt das Wachstum verschiedener Mikroorganismen, aus Thiocyanat (SCN^-) wird in Anwesenheit von Lactoperoxidase und Wasserstoffperoxid Hypothiocyanat (OSCN^-). Hypothiocyanat besitzt eine antibakterielle Wirksamkeit. Histatine wirken antibakteriell und antimykotisch, Cystatine und Immunglobuline haben antivirale Eigenschaften.

(6) Andauung der Nahrung und Geschmackswahrnehmung: Für die im Mund beginnende Andauung der Nahrung sind Amylasen, Proteasen, Lipasen, DNAsen und RNAsen bedeutend, wobei als wichtigstes Enzym die α -Amylase gilt. α -Amylase startet den Abbau von Glykogen und Stärke in der Mundhöhle; Stärke wird in Maltose, Maltotriose und Dextrine zerkleinert. Die Verdünnung und Auflösung von Nahrungsbestandteilen ist sehr wichtig, da erst durch sie ein Kontakt mit den Geschmacksknospen und somit eine gute Geschmackswahrnehmung ermöglicht wird.

2.1.2 Biofilm

2.1.2.1 Erworbenes Pellikel

Namensgebend für die Struktur des „erworbenen Pellikels“ war die Nomenklatur von Dawes, die bis heute beibehalten wurde [Dawes et al. 1963]. Das „erworbene Pellikel“ ist ein dünner (0,1 μm bis mehrere Mikrometer), organischer, azellulärer und bakterienfreier Film, der die Gewebe der Mundhöhle bedeckt [Dawes et al. 1963; Gibbons and van Houte 1973]. Neben den Zähnen werden auch Weichgewebe [Bradway et al. 1989] und prothetische Materialien wie Kunststoff [Yoo et al. 2003] von dem erworbenen Pellikel proliferiert.

Das erworbene Pellikel entsteht innerhalb weniger Sekunden nach Reinigung der Zahnoberfläche durch selektive Bindung von Speichelproteinen und -glykoproteinen an Zahnschmelz [Sönju and Rölla 1973; Hannig and Hannig 2007; Ekstrand and Zero 2012]. An der Schmelzoberfläche ist eine Schicht positiv geladener Calciumionen vorhanden, da diese schneller in Lösung gehen als die darunter gelegenen Phosphationen [Hannig and Hannig 2007]. Im Speichel liegen Proteine vor, die eine hohe Affinität zu dieser Phosphationenschicht haben – sie werden als Pellikel-Präkursoren („pellicle precursor proteins“) bezeichnet; dazu zählen Statherin, Histatin und prolineiche Proteine [Lamkin et al. 1996; Lendenmann et al. 2000; Hannig and Hannig 2007]. Es kommt zu einer Adsorption der

Präkursoren [Mayhall 1970; Bennick et al. 1979; Moreno et al. 1982; Hannig and Hannig 2007]. Die für die Proteinadsorption relevanten Kräfte können aufgrund ihrer Streckenwirkung unterschieden werden: Van-der-Waals- und Coulomb-Kräfte sind die Hauptvertreter der Langstrecken-Kräfte (50-100 nm), hydrophobe Wechselwirkungen erstrecken sich über mittlere Distanzen (10-50 nm) und elektrostatische, ionische sowie Säure-Base-Wechselwirkungen und kovalente Bindungen werden als Kurzstrecken-Kräfte klassifiziert (< 5 nm) [Hannig and Hannig 2009].

Sobald eine saubere Oberfläche mit Speichel in Kontakt kommt, beginnt die Bildung des erworbenen Pellikels; diese schreitet in den folgenden 30 – 90 Minuten zügig voran, bis nach zwei Stunden ein von einigen Autoren beschriebenes „2-Stunden-Plateau“ erreicht wird [Sönju and Rölla 1973; Al-Hashimi and Levine 1989; Marsh and Martin 2003; Hannig and Hannig 2009]. Hierbei wird davon ausgegangen, dass nach zwei Stunden das Hauptwachstum des Pellikels abgeschlossen ist, Umbauvorgänge finden aber nach wie vor statt.

Andere Studien berichten von einem stetigen Wachstum und einer Verdichtung der Pellikelstruktur über mehrere Stunden [Lie 1977; Lamkin et al. 1996].

Es ist aufgrund verschiedener Ursachen problematisch, eine exakte Zusammensetzung des Pellikels zu nennen, da sich zum Beispiel ein ‚neues‘ Pellikel, geformt in den ersten beiden Stunden nach der Zahnreinigung, deutlich von einem ‚gereiften‘ Pellikel, das sich auf Zähnen gebildet hat, die längere Zeit keine professionelle Reinigung erfahren haben, unterscheidet [Sönju and Rölla 1973; Lendenmann et al. 2000]. Die Zusammensetzung ist abhängig von der Pellikel-Entnahmestelle in der Mundhöhle und kann bei jedem Individuum unterschiedlich sein [Mayhall 1970].

Kohlenhydrate wurden in einem ‚gereiften‘ und ‚neuen‘ Pellikel in unterschiedlicher prozentualer Verteilung gefunden. In einem ‚gereiften‘ Pellikel wurden Glucose, Mannose, Galaktose, Fucose, Galaktosamin und Glucosamin nachgewiesen [Mayhall and Butler 1976; Lendenmann et al. 2000]. Sönju hat Glucose, Glucosamin, Galaktose und Mannose auch in ‚neuem‘ Pellikel entdeckt [Sönju 1975]. Zu den meist vorhandenen Aminosäuren zählen Glycin, Alanin, Serin, Prolin, Glutaminsäure und Asparaginsäure [Armstrong 1968; Mayhall 1970; Sönju and Rölla 1973; Al-Hashimi and Levine 1989; Lendenmann et al. 2000], wobei sich die mengenmäßige Verteilung im Vergleich zum Gesamtspeichel signifikant unterscheidet [Lendenmann et al. 2000]. Viele wichtige Proteine sind im Pellikel enthalten. Neben den Speichelhauptproteinen - sekretorisches Immunglobulin A (sIgA), prolinreiche Proteine, Cystatine, hochmolekulares Muzin (MG1), Laktoferrin, Lysozym und Amylase - finden sich im Pellikel weitere Proteine des Speichels wie Carboanhydrase, Albumin, IgM und IgG [Lendenmann et al. 2000]. Auch niedermolekulares Muzin (MG2), Glykoproteine, Statherin, Histatine, Fibronectin und Fibrinogen sind im Pellikel vorhanden [Hannig and Hannig 2007]. Mit 22 bis 23 % des Trockengewichts stellen Lipide einen Hauptteil des Pellikels dar; sie treten in Form von freien Fettsäuren, Triglyceriden, Cholesterol, Cholesterolestern, Phospholipiden und Glycolipiden auf [Slomiany et al. 1986; Hannig and Hannig 2007]. Zusätzlich wurde das von Bakterien ausgeschiedene Enzym Glycosyltransferase im Pellikel identifiziert [Lendenmann et al. 2000; Marsh and Martin 2003].

Die Hauptfunktion des erworbenen Pellikels ist der Schutz und Erhalt gesunder Zahnhartsubstanz, weshalb es auch häufig als natürlicher Schutzfilm bezeichnet wird [Hannig and Hannig 2007]. Das erworbene Pellikel bietet dem Schmelz Abrasionsschutz bei Kauvorgängen und parafunktionellen Vorgängen [Lendenmann et al. 2000] sowie Schutz gegen erosive Vorgänge [Amaechi et al. 1999; Hannig and Balz 2001]. Des Weiteren spielt das erworbene Pellikel aufgrund seiner semipermeablen

Eigenschaften eine wichtige Rolle bei De- und Remineralisationsvorgängen der Zahnhartsubstanzen [Zahradnik et al. 1976; Zahradnik et al. 1978; Hellwig et al. 2013]. Neben diesen positiven Eigenschaften wird dem erworbenen Pellicel eine Rolle bei der Adhäsion von Bakterien und der damit verbundenen Plaquebildung zugeschrieben, da sich selektiv Mikroorganismen aus dem Speichel anlagern können [Gibbons and van Houte 1973; Marsh and Martin 2003; Hannig and Hannig 2007; Hellwig et al. 2013].

2.1.2.2 Plaque

Die Entwicklung der Zahnplaque erfolgt in mehreren Phasen. So finden zunächst initiale Adhäsionsvorgänge statt, die an das erworbene Pellicel erfolgen; im Anschluss folgen sekundäre Adhäsionsvorgänge, die sich überwiegend durch interbakterielle Wechselwirkungen sowie Interaktionen von Bakterien mit Stoffwechselprodukten auszeichnen [Gibbons and van Houte 1973; Rosan and Lamont 2000]. In dieser Phase ist die Plaque nicht mehr durch Selbstreinigungskräfte der Mundhöhle entfernbar und wird als strukturierter, zäher, verfilzter Biofilm aus Speichelbestandteilen, bakteriellen Stoffwechselprodukten, Nahrungsresten und Bakterienzellen definiert [Klimek and Hellwig 1999].

Während der initialen Phase kommt es zu unspezifischen, physiko-chemischen Wechselwirkungen wie Van-der-Waals-Kräften und elektrostatischen Abstoßungskräften. Sie sind über größere Reichweiten wirksam und binden die Bakterien reversibel an die Zahnoberfläche. Irreversible Anbindungen der Bakterien an die Zahnoberfläche entstehen durch spezifische, stereo-chemische Wechselwirkungen zwischen Adhäsinen auf der Bakterienoberfläche und Rezeptoren im erworbenen Pellicel; diese wirken über kürzere Distanzen [Klimek and Hellwig 1999; Marsh and Martin 2003; Hannig and Hannig 2007; Hellwig et al. 2013]. Bekannte Adhäsine sind Amylase-bindende Proteine, eine Antigen-I/II-Familie, weitere verschiedene Antigenkomplexe, Glykosyltransferase, Lektine, kohlenhydratbindende Proteine, verschiedene Lipoproteine, Lipoteichonsäure sowie Lysozym [Rosan and Lamont 2000; Marsh and Martin 2003; Hannig and Hannig 2007].

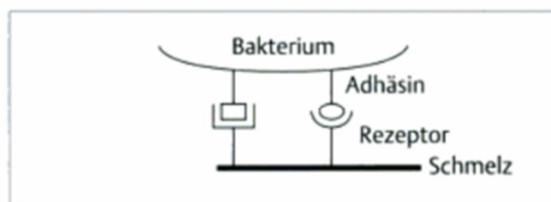


Abb. 4: Schematische Darstellung der Wechselwirkung zwischen Adhäsinen auf der Bakterienoberfläche und Rezeptoren im erworbenen Pellicel [Marsh and Martin 2003].

Die Erstbesiedler der Zahnoberfläche, auch Pionierkeime genannt, sind überwiegend orale Streptokokken, insbesondere *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus oralis* und *Streptococcus mitis biovar 1*; sie sind Hauptbestandteil der frühen Plaqueflora [Kolenbrander and London 1993; Klimek and Hellwig 1999]. In der initialen Adhäsionsphase finden sich außerdem Actinomyceten und Haemophili. Diese Pionierkeime adhäreren an sog. Prädilektionsstellen, die sich den oralen Selbstreinigungskräften weitestgehend entziehen, wie beispielsweise an Oberflächenrauigkeiten,

Zahnhälsen, Approximalräumen oder Fissuren. Dort vermehren sie sich und formieren Mikrokolonien; diese werden durch die weiterhin gebildeten extrazellulären Schleime und Polysaccharide sowie die adsorbierten Speichelproteine und -glykoproteine in eine Matrix eingebettet [Marsh and Martin 2003]. In den ersten vier Stunden nach der Zahnreinigung finden sich nur wenige Kokken an der Zahnoberfläche [Klimek and Hellwig 1999], nach circa vier Stunden binden dann die Erstbesiedler an prolinreiche Proteine, Amylase, Sialinsäure oder andere Pellikelbestandteile und werden somit selbst zu Anheftungsstellen für sekundäre Mikroorganismen [Whittaker et al. 1996].

Die sekundäre Phase wird geprägt von Koadhäsions- und Koaggregationsprozessen der Mikroorganismen untereinander. Hierbei wird meist durch Lektine ein gegenseitiges Erkennen zweier Bakterienzellen vermittelt, die genetisch unterschiedlichen Typen von Partnerzellen angehören [Rosan and Lamont 2000; Marsh and Martin 2003]. Des Weiteren bilden bereits adhärierte Mikroorganismen extrazelluläre Polymere, die zu einer weiteren Bakterienanlagerung führen. Dies stellt einen zweiten bedeutsamen Mechanismus der sekundären Adhäsionsphase dar. Eines der wichtigsten so gebildeten Polysaccharide ist wasserunlösliches Glucan; es wird speziell von *Streptococcus mutans*-Stämmen gebildet und dient als Bindeglied für Glykosyltransferase und andere Glucan-bindende Proteine, die sich auf der Oberfläche unterschiedlicher Bakterien befinden [Rosan and Lamont 2000]. Das Enzym Glykosyltransferase wiederum wird von vielen Bakterien ausgeschieden und ist seinerseits an Kolonisations- und Koaggregationsprozessen beteiligt [Marsh and Martin 2003]. Innerhalb eines Tages bildet sich auf den Oberflächen ein dichter Bakterienrasen [Klimek and Hellwig 1999].

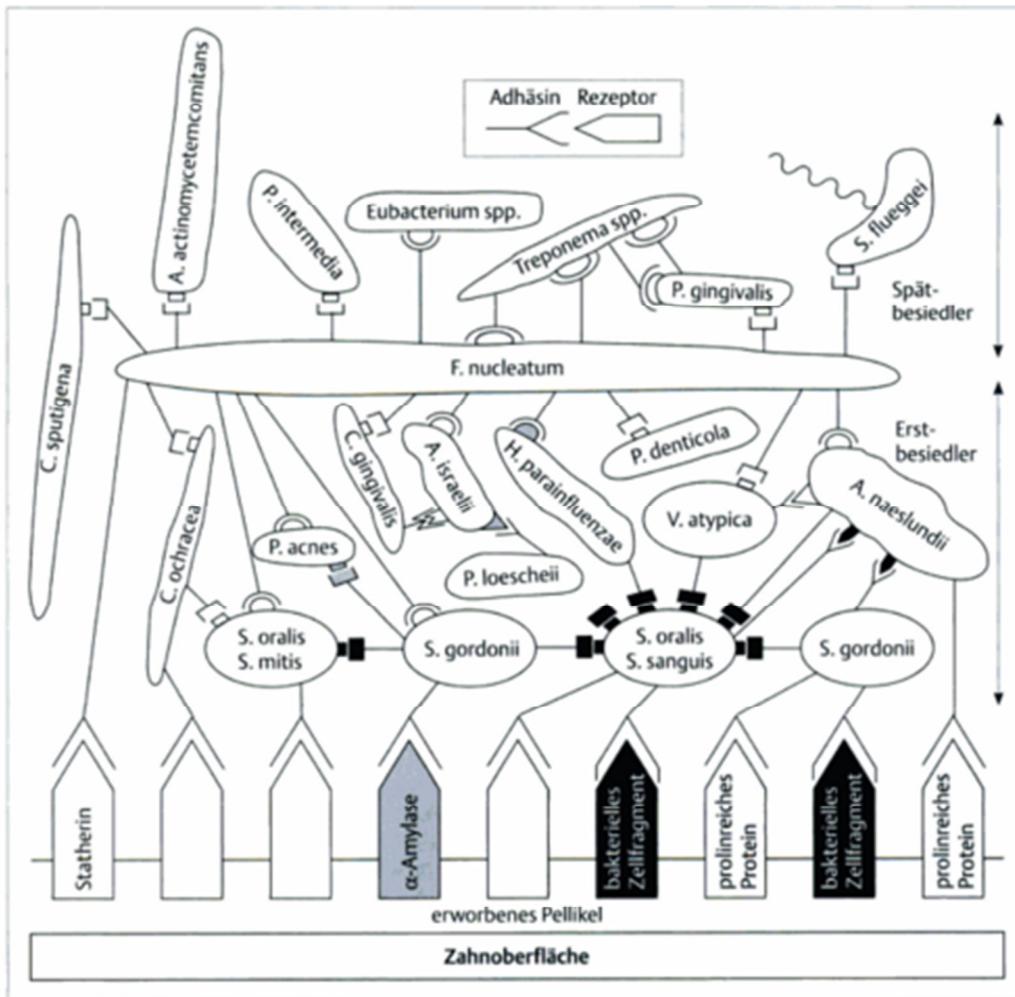


Abb. 5: Schematische Darstellung der Koaggregationsmuster in menschlicher Zahnplaque [Kolenbrander and London 1993], modifiziert nach [Marsh and Martin 2003].

Mit zunehmendem Alter der Plaque verändert sich ihre Bakterienzusammensetzung. Die Anzahl der aeroben Streptokokken sinkt, dafür steigt die Zahl der fakultativ anaeroben Actinomyceten. Durch den Verbrauch des in der Plaque vorhandenen Sauerstoffs durch aerobe und fakultativ aerobe Bakterienarten kommt es zur Proliferation von obligat anaeroben Mikroorganismen. Die Zahl der aeroben Bakterien wie Neisserien und Nocardien sinkt, die Zahl anaerober Bakterien wie Fusobakterien, Veillonellen, Filamenten und Stäbchen steigt [Ritz 1967; Klimek and Hellwig 1999; Marsh and Martin 2003]. Innerhalb einer Woche hat sich eine ausgereifte Plaque gebildet; die vorbereitenden Pionierbakterien sind in der ausgereiften Plaque kaum mehr vorhanden. 60-70 Vol % der etablierten Plaque sind Bakterien, die in eine amorphe Plaquematrix eingebettet sind; die Zusammensetzung der Plaque kann je nach Entnahmestelle im Mund stark variieren [Klimek and Hellwig 1999].

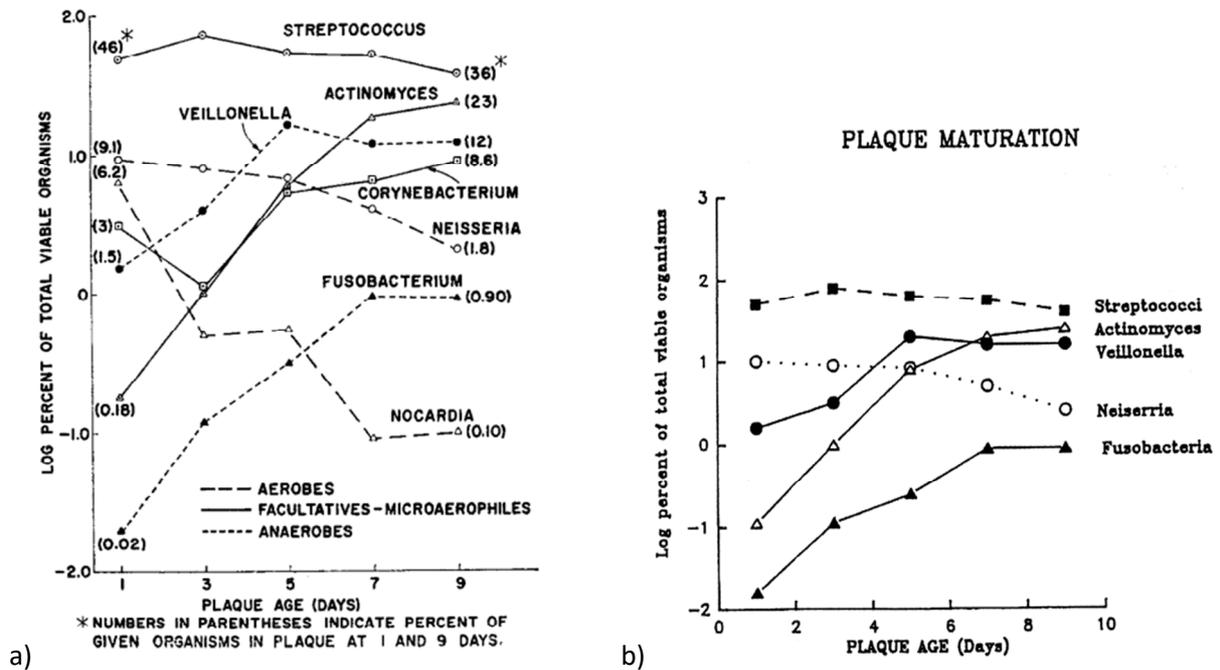


Abb. 6: Verteilung der versch. Bakterienarten in der Plaque bei zehntätigem Plaque-Wachstum, Abb. 6a [Ritz 1967], Abb. 6b modifiziert durch [Rosan and Lamont 2000].

2.1.2.3 Proliferation von Mikroorganismen auf zahnärztlichen Werkstoffen

Die Adhäsion von Mikroorganismen und die dadurch beginnende Biofilmbildung sind abhängig von der Adhäsionsgrundlage. In der zahnärztlichen Therapie werden viele unterschiedliche Werkstoffe verwendet, die den Mikroorganismen verschiedenste Adhäsionsgrundlagen bieten.

Entscheidend sind sowohl die grundsätzliche Art und Zusammensetzung der Werkstoffe als auch deren physikalische und chemische Eigenschaften.

So haben beispielsweise Methacrylat-Komposite eine signifikant höhere Bakterienadhäsion als Bisacrylat-Komposite und Polymethyl-Methacrylat-Komposite [Bürgers et al. 2007]. An Silikonen und silikonbasierten Prothesenmaterialien wurde eine höhere Mikroorganismen-Adhäsion festgestellt als an zahnärztlichen Kunststoffen [Radford et al. 1999; Nevzatoglu et al. 2007], wohingegen an Kompomeren relativ geringe Adhäsionswerte gemessen wurden [Bürgers et al. 2009]. Die Adhäsion von *Streptococcus mutans* an Polymeren ist je nach Zusammensetzung der Monomere sehr unterschiedlich [Hahnel et al. 2008a].

Eine der wichtigsten beeinflussenden Werkstoffeigenschaften ist die Oberflächenrauigkeit. Je rauher die Materialoberfläche ist, desto leichter haften Mikroorganismen an; das liegt daran, dass zum einen eine größere Oberfläche entsteht, zum anderen eine geschützte, schwerer zu reinigende Fläche für Plaqueentwicklung geschaffen wird [Quiryne et al. 1990; Verran and Maryan 1997; Radford et al. 1998; Radford et al. 1999; Bürgers et al. 2009]. Nevzatoglu et al. haben in einer *in vitro*-Studie gezeigt, dass durch die Oberflächenbearbeitung von Kunststoffen und silikonbasierten

Materialien mit Glas, dentalem Gips und Wolframkarbid-Fräsen signifikante Rauigkeitsunterschiede und dadurch bedingte Adhäsionsunterschiede erzeugt wurden [Nevzatoglu et al. 2007].

Weitere beeinflussende Werkstoffeigenschaften sind die Hydrophobizität und die freie Oberflächenenergie von Werkstoffen. Je näher die freie Oberflächenenergie eines Materials und eines Mikroorganismus zusammenliegen, desto höher ist die Adhäsion [Radford et al. 1999]; hydrophobe Mikroorganismen adhäreren besser an Kunststoffen, da diese auch hydrophob sind [Moura et al. 2006]. Dieser Zusammenhang zwischen Hydrophobizität der Materialien und der Mikroorganismen wird immer wieder deutlich – Mikroorganismen haften am besten an Werkstoffen, die eine ähnliche Hydrophobie aufweisen wie sie selbst [Miyake et al. 1986; Bürgers et al. 2009]. Minagi et al. haben herausgefunden, dass aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen ein direkter Bezug zwischen freier Oberflächenenergie der Mikroorganismen und der Materialien besteht – je ähnlicher sie sich sind, desto größer ist die Adhäsion [Minagi et al. 1985; Radford et al. 1999]. Koch et al. haben eine signifikant höhere Proliferation von *Candida albicans* auf Prothesenbasismaterial beobachtet, das den höchsten polaren Beitrag zur freien Oberflächenenergie lieferte [Koch et al. 2013]. Die freie Oberflächenenergie wird indirekt über den Kontaktwinkel berechnet und gibt Auskunft über die Benetzbarkeit eines Materials. Allerdings gibt es auch zahlreiche Studien zur *Candida albicans*- und *Streptococcus mutans*-Adhäsion, die keinen Einfluss der freien Oberflächenenergie auf die Adhäsion festgestellt haben [Moura et al. 2006; Hahnel et al. 2008a; Hahnel et al. 2009].

Des Weiteren ist die Alterung der Materialien entscheiden. Hahnel et al. haben bewiesen, dass eine künstliche Alterung der Materialien zu einer signifikanten Steigerung der *Candida albicans*-Adhäsion führt, obwohl die Oberflächenrauigkeit und die freie Oberflächenenergie nur gering beeinflusst werden [Yip et al. 2004; Hahnel et al. 2009].

Entscheidend ist darüber hinaus die Möglichkeit der Reinigung. Harte Polyacrylate sind wesentlich besser zu reinigen als weichbleibende Unterfütterungsmaterialien und somit weniger anfällig für Biofilmbildung [Radford et al. 1999].

2.2 Künstlicher Speichel

Zahlreiche wissenschaftliche Untersuchungen und Testreihen im Bereich der experimentiellen Zahnheilkunde benötigen für *in vitro*-Studien eine möglichst exakte Nachbildung der Mundhöhle und des stomatognathen Systems. Ein unverzichtbarer Versuchsbestandteil dabei ist Speichel. Da natürlicher Speichel nicht immer in den benötigten Mengen zur Verfügung steht, greift man auf künstlich hergestellten Speichel zurück. Allerdings gestaltet es sich schwierig, einen geeigneten künstlichen Ersatz herzustellen, weil humaner Speichel in seiner Zusammensetzung, seinen Eigenschaften und Funktionen nicht exakt reproduzierbar ist. Deshalb werden künstliche Speichel für *in vitro*-Untersuchungen nicht als vollwertiger Ersatz für natürlichen Speichel gestaltet; ihre Zusammensetzung und Eigenschaften sollten abhängig vom gewünschten Verwendungszweck gewählt werden. Deshalb werden verschiedene Speicheleratzmittel für verschiedene Arten von Untersuchungen hergestellt [Hahnel 2007].

Ein Beispiel hierfür hat Kirstein erarbeitet; er differenziert künstliche Speichel für Korrosionsuntersuchungen an Amalgamlegierungen, an edelmetallfreien Legierungen und an Kontaktflächen zwischen Gold und Amalgam. Außerdem gibt er künstliche Speichel für rheologische Untersuchungen und Adhäsionsuntersuchungen an [Kirstein 1986]. Andere Autoren haben künstliche Speichel zur Untersuchung von Bakterien und der Kultivierung von dentaler Plaque genannt [Shellis 1978; Wyss 1992]. Demnach weist künstlicher Speichel für Adhäsionsuntersuchungen von Bakterien eine andere Zusammensetzung auf als künstlicher Speichel für die Korrosionsprüfung von Werkstoffen [Hahnel 2007].

Mittlerweile gibt es eine Vielzahl verschiedener Anleitungen zur Herstellung künstlichen Speichels, einige der Bekanntesten werden immer wieder in angegebener oder modifizierter Form verwendet [Muhler and Swenson 1947; Fusayama et al. 1963; Shellis 1978; Talu et al. 2016].

Gegenwärtig sind modifizierte Salzlösungen als Speichelersatz präsent [El Medawar et al. 2002; Kwokal et al. 2003; Lennon et al. 2006], zum Teil mit zusätzlichem Proteinzusatz - meist Mucin oder Albumin [Eick et al. 2004]. Für die Erforschung oraler Bakterien oder dentaler Biofilme werden spezielle künstliche Speichel mit Aminosäuremischungen, Wachstumsfaktoren, Vitaminen und Fettsäuren hergestellt, die den Mikroorganismen möglichst natürliche Wachstumsbedingungen bieten [Shellis 1978; Wyss 1992; Wong and Sissons 2001].

Ein Problem bei der Bewertung der überlieferten Speichel-Rezepturen ist, dass die Zusammensetzung meistens nicht auf fundiertem Wissen basiert, sondern vielmehr auf Individualität und Zufall [Leung and Darvell 1997]. Immer wieder wird die Notwendigkeit eines in chemischer Hinsicht exakt definierten künstlichen Speichels für wissenschaftliche Untersuchungen gefordert [Leung and Darvell 1997; Wong and Sissons 2001]. Der Vorteil daran ist, dass durch gezielte Veränderung der Speichelzusammensetzung Rückschlüsse auf den Gesamtversuch gezogen werden und standardisierte, reproduzierbare Versuchsbedingungen geschaffen werden können [Shellis 1978]. Neben dem Problem fehlender Studien zur exakten Zusammensetzung fehlen auch Untersuchungen bezüglich des Einflusses von künstlichem Speichel auf die bakterielle Adhäsion. Wenige Autoren haben sich bisher diesem Problem gewidmet [Shellis 1978; Wijeyeweera 1987; Wong and Sissons 2001].

Hahnel hat den von Wong beschriebenen Speichelersatz modifiziert und für Untersuchungen zur Bildung von Biofilmen mit *Streptococcus mutans* verwendet [Hahnel 2007].

2.3 Verwendete Mikroorganismen

2.3.1 *Candida albicans*

Candida albicans ist ein polymorpher Pilz. Pilze sind heterotrophe Eukaryonten, was bedeutet, dass das Genom in einem Zellkern liegt und sie kein Chlorophyll besitzen - sie leben von organischen Substanzen, die sie durch die Zellwand aufnehmen. Bisher werden fünf Klassen nach morphologischen Merkmalen unterschieden: Myxomyceten, Phycomyceten, Ascomyceten, Basidiomyceten und Deuteromyceten. Für uns relevant sind vor allem humanpathogene Pilze, die

überwiegend aus der Klasse der Deuteromyceten stammen. Medizinisch relevante *Deuteromyceten* werden nach dem DHS-System in drei Gruppen gegliedert: Dermatophyten (Fadenpilze), Hefen (Sprosspilze) und Schimmelpilze. Dermatophyten besiedeln Strukturen mit Keratin wie Haut, Haare und Nägel, Hefen befallen überwiegend Hautfalten und Schleimhäute, Schimmelpilze hingegen sind ausschließlich bei schweren Immunabwehrstörungen pathogen [Moll et al. 2005]. Pilze sind meist fakultativ pathogen; das bedeutet, dass sie nur bei geschwächter Immunabwehr und nicht intakter Hautbarriere eine Erkrankung auslösen; Pilze sind opportunistische Erreger [King et al. 1980; Moll et al. 2005; Groß 2009].

Candida albicans ist eine von über 200 *Candida*-Arten, von denen *C. albicans* mit Abstand am häufigsten auftritt. *C. albicans* gehört allgemein zur Gattung der *Candida*, die der Gruppe der Hefen zugeordnet wird [Groß 2009]. *Candida albicans* tritt in drei morphologischen Phänotypen auf: (1) als rundzellige Hefe oder Sprosspilz, (2) als fädiges Pseudomyzel oder (3) als fadenförmiges echtes Myzel. Evolutionsbiologisch ist die Hefezelle eine Anpassung an flüssiges Milieu, da runde Einzelzellen durch Mikroströmungen in diesem leicht fortbewegt werden. Pseudomyzel und echtes Myzel sind angepasste Formen an feste und halbfeste Substrate, die das Milieu aktiv durchwuchern können [Müller and Melchinger 2006]. *C. albicans* vermehrt sich einerseits, indem eine kleine vegetative Tochterzelle aus der Mutterzelle herauswächst (Sprossung/Knospung), und andererseits, indem die Hyphenform regelmäßig fragmentiert und so neue Myzelien und Sporen bildet (siehe Abb. 7) [Molero et al. 1998; Bastidas and Heitman 2009; Groß 2009]. Die Zellengröße beträgt 5-8 µm, ein besonderes Erkennungsmerkmal der *Candida albicans*-Art ist die Bildung von Chlamydosporen; einzig *Candida dubliniensis* ist auch dazu imstande [Groß 2009].

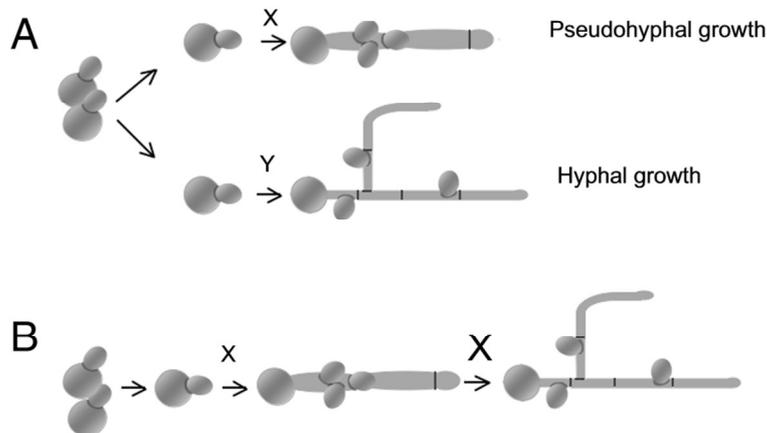


Abb. 7: Schematische Darstellung des Übergangs von Hefezellen zu Pseudohyphen und Hyphen [Bastidas and Heitman 2009].

Candida albicans haftet in deutlich größerem Maß an oralen und vaginalen Schleimhautepithelzellen als andere *Candida*-Arten (siehe Abb. 7); hierbei kann die Adhäsion je nach Testperson stark variieren. Diese erste Adhäsion an Wirtszellen ist der initiale Schritt der Pathogenese mukokutaner Candidiasis [Kimura and Pearsall 1978; King et al. 1980]. Sie ist nur möglich, da *C. albicans* verschiedene Adhäsine exprimiert, die an extrazelluläre Matrixproteine von Mukosa- und Endothelzellen binden. Es folgt die Bildung von Biofilmen, welche durch Aussenden und Empfangen von Signalmolekülen zwischen den beteiligten Mikroorganismen gesteuert wird („Quorum-Sensing“); ein Quorum-Sensing-Molekül der *Candida*-Arten ist das Oxylin Farnesol. Die umhüllenden Biofilme

schützen die Hefezellen vor Angriffen aus der Umgebung [Schulze and Sonnenborn 2009]. Des Weiteren sezerniert *C. albicans* unterschiedliche Aspartat-Proteinasen, die wichtig sind für die Invasion in Gewebe und Organe. Außerdem inaktivieren sie einige Abwehrmechanismen des Wirtes, zum Beispiel Immunglobuline, Protease-Inhibitoren des Blutserums und Komplementfaktoren [Hube 2004; Thewes et al. 2007; Schulze and Sonnenborn 2009]. Das „phenotypic switching“ einiger Candida-Stämme (= schnelle Änderung der Zelloberflächenstruktur) erschwert zudem die Erkennung durch Immunabwehrzellen, weil beispielsweise beim Gestaltwechsel von der rundlichen Hefezelle zur länglichen Hyphe keine β -Glucanmoleküle in die äußere Wandschicht eingebaut werden, wodurch die auf das β -Glucan spezialisierten Mustererkennungsrezeptoren („toll-like-Rezeptoren“) der angeborenen Immunabwehr die Pilze nicht mehr erkennen und abwehren können [Netea et al. 2008; Bastidas and Heitman 2009; Schulze and Sonnenborn 2009].

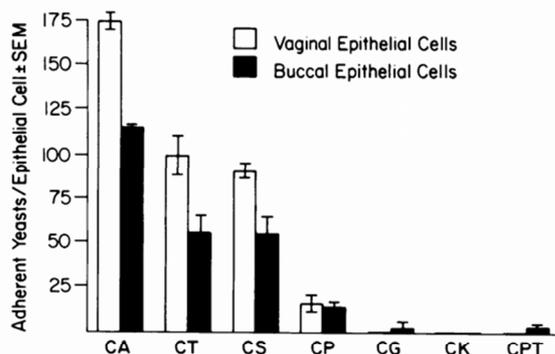


FIG. 5. Quantitative adherence of the various *Candida* species to vaginal and buccal epithelial cells. CA, *C. albicans*; CT, *C. tropicalis*; CS, *C. stellatoidea*; CP, *C. parapsilosis*; CG, *C. guilliermondii*, CK, *C. krusei*; CPT, *C. pseudotropicalis*; SEM, standard error of the mean.

Abb. 8: Anhaftung der verschiedenen *Candida*-Arten nach Untersuchungen von King et al. [King et al. 1980].

Candida albicans ist häufig Teil der oralen Bakterienflora gesunder Patienten [Amato and Pecora 1983]; Candidiasis kommt beim Gesunden sehr selten vor. Man kann sie unterteilen in eine oberflächliche Form - zu ihr zählen oraler und vaginaler Soor sowie chronische mukokutane Candidiasis und Prothesenstomathopathien [Douglas 1985] - und eine tiefgreifende Form, die sich in einer *Candida*-Myokarditis oder akuter, disseminierter *Candida*-Sepsis zeigt [Molero et al. 1998]. Verschiedene Faktoren verstärken das Risiko einer Candidiasis:

(1) Säuglinge sind durch die vaginale Flora der Mutter gefährdet; enthält sie *Candida albicans* kann es während der Geburt im Geburtskanal zur Kontamination des Säuglings mit *Candida albicans* kommen [Shardt and Roy 1957]. Diese ‚vertical transmission‘ ist der Hauptgrund für neonatale *Candida*-Kolonisation [Filippidi et al. 2014]. Risikofaktoren für eine vaginale *Candida*-Kolonisation der Mutter sind Tabakkonsum, Geschlechtsverkehr während der Schwangerschaft, systemische oder vaginale Antibiotikaaufnahme und Diabetes mellitus [Filippidi et al. 2014]. Des Weiteren kann die Brust der Mutter beim Stillen eine persistierende Quelle für *Candida albicans* sein [Johnstone and Marcinak 1990] und für Säuglinge, vor allem für Frühgeborene, kann die Krankenhausumgebung wegen des schwachen Immunsystems die Bildung einer Candidiasis begünstigen [Russell and Lay 1973; Tinoco-Araujo et al. 2013; Filippidi et al. 2014].

(2) Je älter der Mensch wird, desto eingeschränkter wird im Allgemeinen seine Agilität und Mobilität; dies führt zu einer Abnahme der Mundhygienefähigkeit und verstärktem Vorhandensein oraler Mikroorganismen und oraler Läsionen [Baran and Nalcaci 2009; Martori et al. 2014; Jordan et al. 2016a]. Hinzukommt, dass ältere Menschen oft an Erkrankungen leiden, die eine Candidiasis begünstigen – beispielsweise haben Patienten mit Diabetes mellitus ein 4,4mal höheres Risiko an einer Candidiasis zu erkranken als gesunde Altersgenossen [Bianchi et al. 2016]. Ein weiterer prädisponierender Faktor ist das Tragen eines herausnehmbaren Zahnersatzes; Patienten, die einen herausnehmbaren Zahnersatz tragen, haben ein deutlich höheres Risiko an einer Candidiasis zu erkranken [Baran and Nalcaci 2009; Bianchi et al. 2016].

(3) Immunsupprimierte erkranken häufiger an einer Infektion durch *Candida albicans*; vor allem bei unterbrochener Schleimhautbarriere kann es zu einer invasiven Form der Candidiasis kommen [Schellun 1987; Nikawa et al. 2005].

(4) Patienten mit Sjögren-Syndrom und krankheitsbedingter Xerostomie haben bedingt durch die Mundtrockenheit stark erhöhte *Candida albicans*-Werte im Speichel und leiden häufig an Candidiasis [MacFarlane and Mason 1974].

(5) Die orale Candida-Besiedlung bei Patienten mit oralen Leukoplakien und Karzinomen der Mundschleimhaut ist signifikant höher als bei gesunden Kontrollgruppen [Hornstein et al. 1979].

(6) Bei Patienten, die sich einer Bestrahlungstherapie im Kopf-Halsbereich unterziehen müssen, werden deutlich erhöhte *Candida albicans*-Zahlen festgestellt; bedingt durch die eingeschränkte Funktion der Speicheldrüsen, einhergehend mit Mundtrockenheit [Rossie et al. 1987].

(7) Träger von Zahnprothesen haben deutlich erhöhte *Candida albicans*-Werte und häufig dadurch ausgelöste Prothesenstomatopathien [Vandenbussche and Swinne 1984; Abu-Elteen and Abu-Alteen 1998].

Zahlreiche Untersuchungen befassen sich mit dem Problem der vermehrten *C. albicans*-Adhärenz auf Zahnprothesen. Beim gesunden Patienten ohne Prothese wurde vor allem der Zungenrücken als primäres, orales *Candida albicans*-Reservoir vorgeschlagen [Alkumru and Beydemir 1992], wohingegen beim gesunden Patienten mit Prothese die *Candida albicans*-Anlagerung überwiegend auf den Prothesen stattgefunden hat [Abu-Elteen and Abu-Alteen 1998]. Laut Vandenbussche et al. wurde *Candida albicans* bei 82 % der Prothesenträger mit klinisch gesunder Mundhöhle nachgewiesen [Vandenbussche and Swinne 1984]. Abu-Elteen et al. haben die orale Candida-Kolonisation von Patienten ohne und mit Zahnprothesen verglichen und einen deutlichen Unterschied festgestellt: während lediglich 36,8 % der 190 Patienten ohne Prothese *Candida albicans*-Träger waren, wurden 78,3 % der 230 Prothesenträger als *Candida albicans*-Träger identifiziert. So wurde festgestellt, dass *Candida albicans* eine sehr hohe Affinität zur Adhäsion an Zahnprothesen hat [Abu-Elteen and Abu-Alteen 1998]. Nochmals gesteigert wurde diese Adhäsion an Zahnprothesen durch Diabetes oder Zigarettenkonsum [Abu-Elteen and Abu-Alteen 1998].

Außerdem können die Materialeigenschaften maßgeblich die Adhäsion von Mikroorganismen und die Biofilmbildung beeinflussen (siehe Kap. 2.1.2.3).

Neben den beeinflussenden Materialeigenschaften gibt es noch weitere Umgebungseinflüsse, die entscheidend sind für die Adhäsion von *Candida albicans* an Zahnersatzmaterialien. Knight und

Fletcher haben schon früh gezeigt, dass Glucose im Speichel das Wachstum von *Candida albicans* stark ansteigen lässt [Knight and Fletcher 1971]. Samaranayake et al. haben bestätigt, dass kohlenhydratreiche Nahrung entscheidenden Einfluss nehmen kann – bei der Inkubation von *Candida albicans* mit Saccharose wurde eine vierfach gesteigerte Adhäsion festgestellt, mit Glucose eine zweifach gesteigerte Adhäsion [Samaranayake et al. 1980]. Lediglich Laktose und Xylitol haben keinen Einfluss gezeigt [Samaranayake et al. 1980].

Das Vorhandensein von Speichel auf herausnehmbaren Zahnersatz ist überaus wichtig, da die Spülfunktion des Speichels die *Candida albicans*-Anhaftung signifikant verringert [Samaranayake et al. 1980; Radford et al. 1998; Moura et al. 2006]. Gegensätzlich wirkt sich das Vorhandensein von menschlichem Serum auf zahnärztlichem Kunststoff aus, dieses steigert die Adhäsion von Mikroorganismen an den Kunststoff [Samaranayake et al. 1980].

2.3.2 *Actinomyces naeslundii* T14V

Das Bakterium *Actinomyces naeslundii* zählt zur Gattung *Actinomyces*, die der Familie der Actinomycetaceae angehört. Namensgebend war Carl Naeslund, der das Bakterium 1925 erstmals in der humanen Mundhöhle isoliert hat [Coleman et al. 1969; Schaal et al. 2006].

A. naeslundii kann in drei Genospezies unterteilt werden: *Actinomyces naeslundii* *genospecies* 1 (laut neuer, genauerer Gensequenz-Klassifizierung auch *Actinomyces naeslundii sensu stricto* genannt), *Actinomyces naeslundii* *genospecies* 2 (neuere Bezeichnung *Actinomyces oris*) und *Actinomyces naeslundii* *genospecies* WVA 963 (neuere Bezeichnung *Actinomyces johnsonii*). Das in diesen Untersuchungen verwendete Bakterium *A. naeslundii* T14V gehört zur Spezies *A. naeslundii* *genospecies* 2 [Henssge et al. 2009].

A. naeslundii sind unbewegliche, grampositive, fakultativ anaerobe Stäbchenbakterien, die keine Sporen bilden können [Ellen 1976; Schaal et al. 2006] und als Erstbesiedler der Mundhöhle zur physiologischen Mundflora zählen [Coleman et al. 1969; Clark et al. 1981; Kolenbrander et al. 1990; Li et al. 2004; Sanderink 2004]. Durch unzureichende Mundhygiene, immunschwächende Erkrankungen, äußere Einflüsse und prothetischen Zahnersatz steigt das Risiko einer Erkrankung des oralen Systems durch *A. naeslundii* - meist im Zusammenspiel mit anderen Mikroorganismen. So wurde in vielen Studien erwiesen, dass *A. naeslundii* bei folgenden Erkrankungen mitverantwortlich ist:

- (1) Entstehung von Karies, vor allem Wurzelkaries [Shakespeare et al. 1985; Bowden et al. 1999; Chen et al. 2001];
- (2) Gingivitis und Parodontitis [Clark et al. 1981];
- (3) endodontische Infektionen [Xia and Baumgartner 2003];
- (4) Aktinomykose [Coleman et al. 1969].

A. naeslundii bindet an die Speichelbestandteile des erworbenen Pellicels und bildet durch Koaggregation sowohl untereinander als auch mit anderen Mikroorganismen - vor allem mit den

dominierenden, erstbesiedelnden Streptokokken - einen Biofilm auf allen pellicelbedeckten Flächen der Mundhöhle [Kolenbrander et al. 1990; Palmer et al. 2003; Sanderink 2004].

Das Bakterium verfügt über zwei Fimbrienarten:

(1) Typ-1-Fimbrien vermitteln die Adhäsion an Zahnoberflächen, für diese Bindung dienen prolinreiche Proteine (PRPs) und Statherin des Speichels als Rezeptoren [Clark et al. 1986; Gibbons et al. 1988; Chen et al. 2007].

(2) Typ-2-Fimbrien vermitteln eine lactose-sensitive Koaggregation mit *Streptococcus sanguinis* und anderen Stämmen und begünstigen die Biofilmbildung und Adhäsion durch Erkennen von Glykoprotein-Rezeptoren auf Epithelzellen und Bakterienrezeptoren [Cisar et al. 1984; Clark et al. 1986; Chen et al. 2007]. Außerdem vermitteln sie die bakterielle Anhaftung an polymorphkernige Leukozyten, die begleitet wird von deren Aktivierung und somit zur Phagozytose der Bakterien führt [Sandberg et al. 1986].

Ein auffallendes Merkmal ist, dass *A. naeslundii* für den Kohlenhydratabbau nicht auf Adenosintriphosphat (ATP) zurückgreift, sondern Guanosintriphosphat (GTP) und Polyphosphate nutzen kann. Das Bakterium kann die glykolytische Säurebildung mildern und nutzt Laktat als Kohlenstoffquelle, wodurch dieses in schwache Säuren umgewandelt wird. Das Enzym Urease hydrolysiert Harnstoff und produziert Ammonium, um die pH-Wert-Homöostase zu modulieren [Takahashi et al. 1995; Takahashi and Yamada 1999; Liu et al. 2006]. Der optimale pH-Wert für die ureolytische Aktivität des *A. naeslundii* liegt bei 6,5 (siehe Abb.9) [Liu et al. 2006].

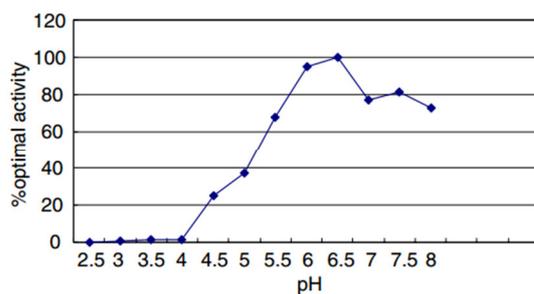


Abb. 9: Urease-Aktivität intakter *A. naeslundii*-Zellen in Bezug auf den pH-Wert [Liu et al. 2006].

2.3.3 *Streptococcus gordonii* DL1

Das Bakterium *Streptococcus gordonii* zählt zur Gattung *Streptococcus*, die der Familie der *Streptococcaceae* angehört. In den vorliegenden Untersuchungen wurde *Streptococcus gordonii* DL1 verwendet, ein Mitglied der *Streptococcus sanguinis*-/*S. mitis*-Gruppe [Sanderink 2004].

S. gordonii ist ein grampositives, fakultativ anaerobes Kokkenbakterium, das als Pionierkeim in der menschlichen Mundhöhle die Biofilmbildung auf Zahnoberflächen initiiert und zur Gruppe der *Viridans-Streptokokken* zählt [Nyvad and Kilian 1990; Loo et al. 2000; Kilic et al. 2004]. *S. gordonii* besitzt verschiedene Oberflächen-Polypeptid-Proteine, wie zum Beispiel SspA und SspB, die eine Adhäsion an humane und bakterielle Rezeptoren vermitteln [Demuth et al. 1996; Eglund et al. 2001].

Als Rezeptoren zur Anheftung an Zahnoberflächen dienen Speichelbestandteile wie Amylase und Fibronektin [Hannig and Hannig 2007]; das Amylase-bindende Protein A (AbpA) des Bakteriums *S. gordonii* fungiert als Adhäsion an Amylase-bedecktes Hydroxyapatit, trägt zum Stärkeabbau und der Biofilmbildung bei [Rogers et al. 2001]. Hamada et al. beurteilen die Interaktionsbereitschaft von *S. gordonii* mit Speichelkomponenten im Vergleich zu anderen Pionierkeimen als eine der stärksten [Hamada et al. 2004].

Des Weiteren spielt *S. gordonii* für die Koaggregation oraler Mikroorganismen untereinander eine bedeutende Rolle [Kolenbrander et al. 1990]. Die Abbildungen 10 und 11 zeigen die zentrale Rolle von *S. gordonii* [Kolenbrander et al. 2010]:

(1) *S. gordonii* interagiert mit *Actinomyces naeslundii* über Oberflächenproteine SspA und SspB [Demuth et al. 1996; Eglund et al. 2001];

(2) *S. gordonii* stellt ein Befestigungssubstrat für das potenziell pathogene *Porphyromonas gingivalis* dar [Stinson et al. 1992; Cook et al. 1998; Kuboniwa et al. 2006];

(3) Glykosyltransferase begünstigt die Bindung von *Candida albicans* an *S. gordonii* [Ricker et al. 2014];

(4) Zahlreiche weitere Mikroorganismen binden an *S. gordonii*, vor allem andere *Viridans-Streptokokken* (siehe Abb. 10), und werden Teil einer entstehenden Plaque [Kolenbrander et al. 1990; Loo et al. 2000].

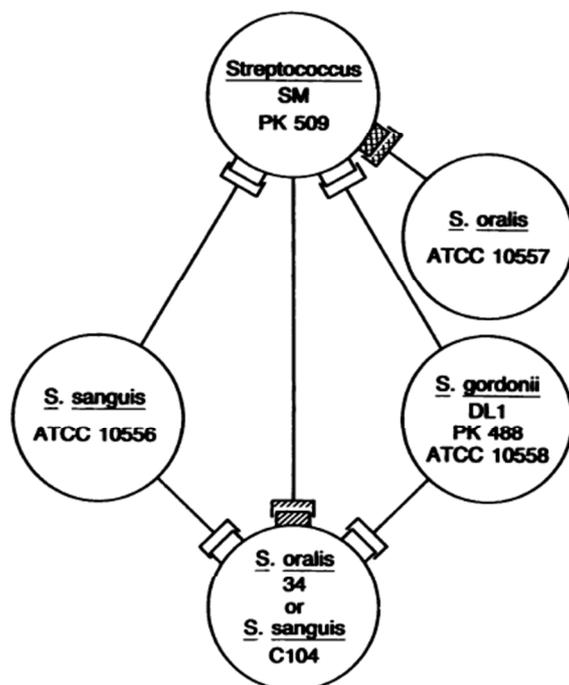


Abb. 10: Schematische Darstellung der zwischengenerischen Koaggregation humaner, oraler *Viridans-Streptokokken* [Kolenbrander et al. 1990].

S. gordonii ist Teil der physiologischen Mundflora und somit nicht grundlegend an Zahn- oder Zahnfleischerkrankungen beteiligt [Kilic et al. 2004]. Beim Gesunden hat *S. gordonii* keine direkte

pathologische Wirkung; bei immungeschwächten Menschen kann *S. gordonii* als Teil der *Viridans-Streptokokken* zu schweren Erkrankungen führen, sobald es in den Blutkreislauf gelangt: Bakteriämien [Gaudreau et al. 1981; Gonzalez-Barca et al. 1996], bakterielle Endokarditis und Schäden an den Herzklappen [van der Meer et al. 1992; Kilic et al. 2004] sind mögliche Konsequenzen.

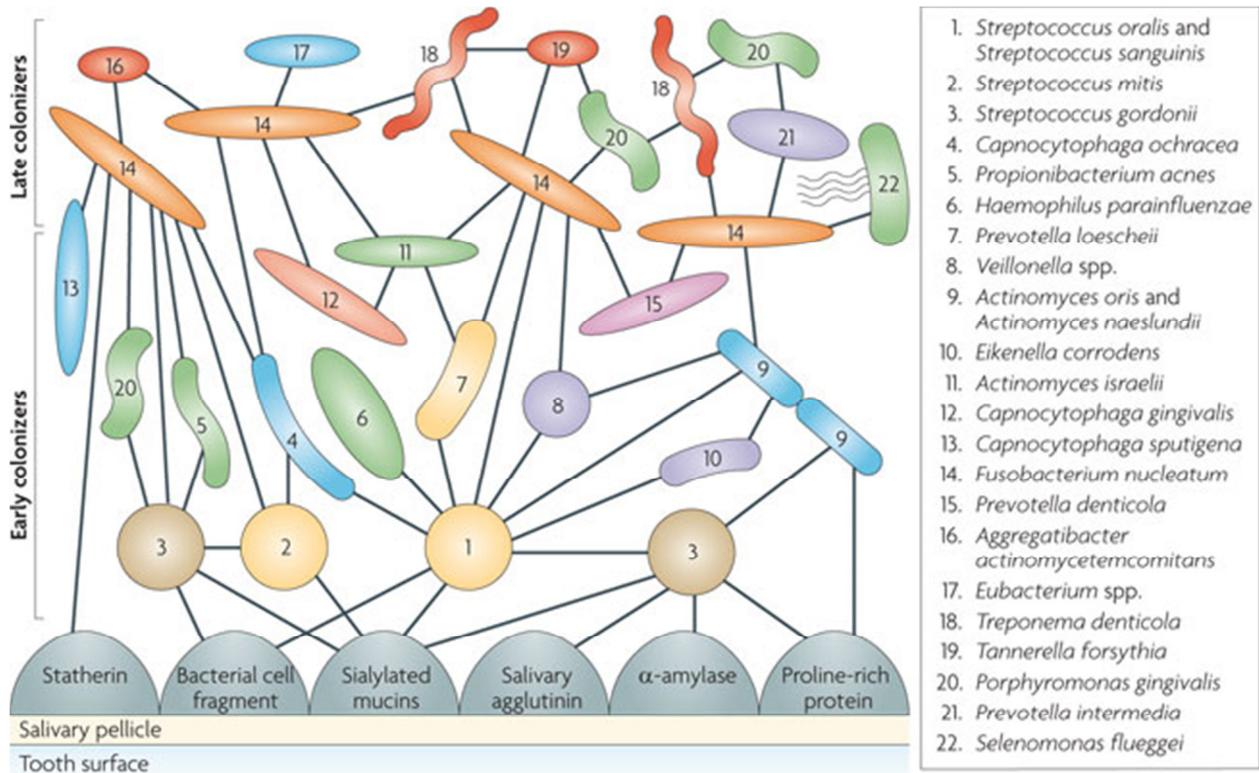


Abb. 11: Orale bakterielle Kolonisation; *S. gordonii* als initialer Pionierkeim neben *S. oralis*, *S. sanguinis* und *S. mitis* [Kolenbrander et al. 2010].

2.4 Verwendete Werkstoffe

2.4.1 Prothesenbasismaterial *Palapress® vario*

In dieser Arbeit wurde der Prothesenkunststoff *Palapress® vario* der Firma Heraeus Kulzer (Wehrheim, Deutschland) als Referenzmaterial verwendet. Bei diesem Werkstoff handelt es sich um ein Prothesenbasismaterial, das in der Zahnmedizin vor allem zur Herstellung von herausnehmbarem prothetischem Zahnersatz verwendet wird.

Der geschichtliche Ursprung dieses Prothesenkunststoffes liegt im Jahr 1936, als durch einen Zahntechniker der Firma Kulzer - Gottfried Roth - das „Paladon-Verfahren“ erfunden wurde. Er hat in Untersuchungen festgestellt, dass Polymethylmethacrylat (PMMA) in seinen Monomeren löslich ist [Heraeus Kulzer Stand 2015], woraufhin Polymerpulver (PMMA) mit Monomerflüssigkeit

(Methylmethacrylat, MMA) zu einem Kunststoffteil vermengt und durch Pressen und Heißpolymerisieren harter Kunststoff hergestellt wurde [Welker et al. 2005].

Diese zwei Grundbestandteile liegen auch dem hier verwendeten *Palapress® vario*-Prothesenkunststoff zugrunde. Das Pulver wird auf der Basis von Methacrylat-Copolymerisaten hergestellt [Heraeus Kulzer 2016b]. Die Flüssigkeitshauptkomponente ist Methylmethacrylat (> 90%), zusätzlich sind 1,4-Butandiolmethacrylat (5-10%) und Trioctylmethylammoniumchlorid (< 1%) enthalten [Heraeus Kulzer 2016a]. *Palapress® vario* ist ein autopolymerisierender Prothesenkunststoff [Heraeus Kulzer 2012].

2.4.2 Prothesenbasismaterial *Palapress® vario* mit Zusätzen

Die Entstehung von antibiotisch-resistenten Pathogenen ist zu einem ernstzunehmenden Gesundheitsproblem geworden, weshalb zahlreiche Studien über Möglichkeiten berichten, die aktuellen antimikrobiellen Therapien zu verbessern. Über 70% der Bakterien, die bakterielle Infektionen verursachen, sind gegen eines oder mehrere der Antibiotika, die standardmäßig gegen sie eingesetzt werden, resistent. In zahlreichen Untersuchungen wurde festgestellt, dass Metalle und Metalloxid-Nanopartikel wie Zinkoxid (ZnO), Calciumoxid (CaO), Titandioxid (TiO₂) etc. antimikrobielle Aktivität besitzen (vgl. Abb. 12) [Dizaj et al. 2014].

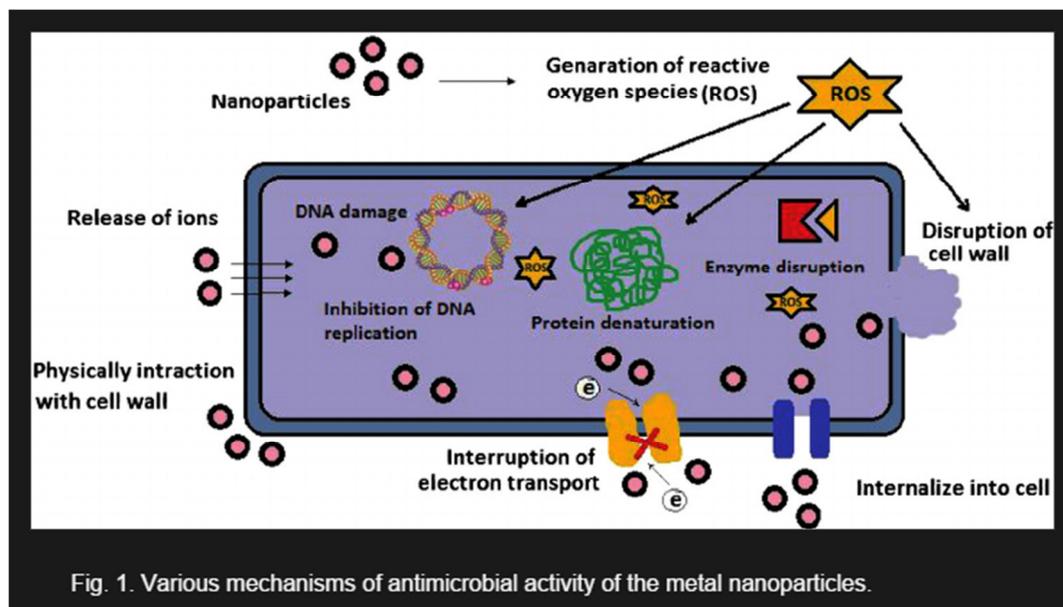


Abb. 12: Mögliche Wirkmechanismen der nanopartikulären Metalle [Dizaj et al. 2014].

2.4.2.1 Zinkoxid (ZnO)

Zinkoxid in Form von Zinkoxid-Nanopartikeln zeigt bakterizide Wirkung gegen grampositive und gramnegative Bakterien [Azam et al. 2012]. Studien haben ergeben, dass die Wirkung mit der Größe der Nanopartikel zusammenhängt; man kam zu dem Ergebnis, dass die bakterizide Wirkung mit sinkender Größe der ZnO-Nanopartikel steigt [Padmavathy and Vijayaraghavan 2008; Emami-Karvani and Chehrazi 2011]. Zudem haben Emami-Karvani et al. berichtet, dass eine gesteigerte Partikelkonzentration die antibakterielle Wirkung erhöht [Emami-Karvani and Chehrazi 2011]. Neben Partikelgröße und Konzentration spielt auch der mögliche Oberflächenbereich eine entscheidende Rolle. Je größer die Oberfläche der Nanopartikel ist, desto größer ist deren bakterizide Wirkung [Buzea et al. 2007].

Azam et al. haben berichtet, dass Zinkoxid (ZnO) im Vergleich zu Kupfer(II)-oxid (CuO) und Eisen(III)-oxid (Fe₂O₃) die größte bakterizide Wirkung hat [Azam et al. 2012]. ZnO reduziert insbesondere die Lebensfähigkeit von Bakterien, wobei der genaue Mechanismus seiner antimikrobiellen Wirkung noch nicht vollkommen geklärt ist [Dizaj et al. 2014]. Eine vorgeschlagene Wirkoption ist die Bildung von Wasserstoffperoxid (H₂O₂) [Rao et al. 2013]. Eine weitere Möglichkeit der antibakteriellen Wirkung ist die Akkumulation der ZnO-Nanopartikel auf der Bakterienoberfläche aufgrund elektrostatischer Kräfte [Zhang et al. 2008]. Außerdem können ROS-Bildung (ROS=reactive oxygen-species) auf der Partikeloberfläche, Zink-Ionen-Freisetzung, Membrandysfunktion und Nanopartikel-Verinnerlichung als mögliche Gründe für die Zerstörung der Bakterienzellen in Betracht gezogen werden [Rao et al. 2013]. Die Studie von Xie et al. suggeriert, dass die ZnO-Nanopartikel zu morphologischen Veränderungen, messbaren Membranleakages und einem (bis zu 52-fachen) Anstieg des oxidativen Stress in *Campylobacter jejuni* geführt haben [Xie et al. 2011].

2.4.2.2 Calciumoxid (CaO)

Calciumoxid (CaO) kann durch Wärmebehandlung aus Calciumcarbonat (CaCO₃) gewonnen werden; Nanopartikel des Calciumoxids (CaO) zeigen bakterizide Wirkung gegen verschiedene Bakterien [Jeong et al. 2007].

CaO wirkt gegen grampositive und gramnegative Bakterien [Sawai et al. 1995], wobei der Effekt auf grampositive Bakterien besser ist [Yamamoto et al. 2010]. Der Wirkmechanismus der CaO-Nanopartikel beruht zum einen auf der Bildung von Hyperoxiden auf der Partikeloberfläche, zum anderen auf dem pH-Wert-Anstieg ausgelöst durch Hydratation des CaO [Sawai et al. 1996; Yamamoto et al. 2010].

Die antimykotische Wirkung des CaO wurde durch indirekte konduktimetrische Untersuchung [Owens et al. 1989] und quantitative Analyse nach Takahashi's kinetischem Modell zur Wachstumshemmung [Takahashi 1990] erforscht [Sawai and Yoshikawa 2004]. Dabei wurde herausgefunden, dass CaO-Nanopartikel den Abfall der elektrischen Leitfähigkeit in NaOH-Lösungen verzögern, was bedeutet, dass das Pilz-Wachstum gehemmt wird. Sehr entscheidend ist dabei die Konzentration des CaO; idealerweise liegt sie zwischen 0,4 – 1,0 mg/ml, keinesfalls >1,6 mg/ml [Sawai and Yoshikawa 2004].

2.4.2.3 Titandioxid (TiO₂)

Titandioxid (TiO₂) existiert in drei verschiedenen Modifikationen, die sich in ihrer Kristallstruktur und somit auch in den physikalischen Eigenschaften unterscheiden: Rutil, Anatas und Brookit. Nur zwei der drei Formen sind technisch relevant - Rutil, welches die thermodynamisch stabilste Form darstellt, und Anatas, die Modifikation mit der größten photokatalytischen Aktivität [Winkler 2013].

Es wird vermutet, dass die Erzeugung von oxidativem Stress durch Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen ein besonders wichtiger Wirkmechanismus der TiO₂-Nanopartikel (in Anatas-Form) ist. Reaktive Sauerstoffverbindungen verursachen ortsspezifische DNA-Schäden [Roy et al. 2010]. Roy et al. haben außerdem berichtet, dass TiO₂-Nanopartikel die antibiotische Wirkung vieler Antibiotika verbessern und dass Bakterien weniger resistent gegen Antibiotika sind, wenn diese TiO₂-Nanopartikel enthalten.

Die antimikrobiellen Eigenschaften des TiO₂ hängen von seiner Kristallstruktur, Form und Größe ab. TiO₂-Nanopartikel verbessern die antimykotische Wirkung gegen Biofilme von *Candida albicans* und hemmen das Wachstum von Pilzbiofilmen insbesondere auf der Oberfläche medizinischer Gerätschaften [Haghighi et al. 2013].

Die photokatalytischen Eigenschaften der TiO₂-Nanopartikel helfen, Bakterien unschädlich zu machen; tatsächlich produzieren TiO₂-Nanopartikel unter UV-Licht reaktive Sauerstoffverbindungen. Die photokatalytische Aktivität wird zusätzlich von Lipidperoxidation begleitet, die zu verbesserter Membranfluidität und Unterbrechung der Zellintegrität führt [Carré et al. 2014]. Jedoch ist die Verwendung von TiO₂-Nanopartikeln unter UV-Licht sehr eingeschränkt, da UV-Licht zu genetischen Veränderungen und Defekten in menschlichen Zellen und Gewebe führt [Allahverdiyev et al. 2011]. Um dieses Problem zu umgehen, kann man Metallionen zu den TiO₂-Nanopartikeln geben, wodurch sich der Absorptionsbereich ins sichtbare Licht verlagert und die antibakteriellen und photokatalytischen Eigenschaften sogar weiter verbessert werden [Zaleska 2008; Allahverdiyev et al. 2011].

Table 1
Commonly used nanometals as antimicrobial agent, their mechanisms of action and characteristics.

Type of the nanoparticles	Proposed mechanism of antimicrobial action	Main characteristics as antimicrobial agent	The main factors that influence antimicrobial activity	Reference
Ag nanoparticles	Ion release; induction of pits and gaps in the bacterial membrane; interact with disulfide or sulfhydryl groups of enzymes that lead to disruption of metabolic processes. DNA loses its replication ability and the cell cycle halts at the G ₂ /M phase owing to the DNA damage (in the case of Ag ₂ O).	High antimicrobial activity against both bacteria and drug-resistant bacteria, antifungal activity on spore-producing fungal plant pathogens, high stability, nontoxicity.	Particle size and shape of particles.	[8,15,22,25,26]
ZnO nanoparticles	ROS generation on the surface of the particles; zinc ion release, membrane dysfunction; and nanoparticles internalization into cell.	Photocatalytic activity; high stability; bactericidal effects on both Gram-positive and Gram-negative bacteria; antibacterial activity against spores which are resistant to high temperature and high pressure.	Particle size and concentration.	[10,34–36,44,50]
TiO ₂ nanoparticles	Oxidative stress via the generation of ROS; lipid peroxidation that cause to enhance membrane fluidity and disrupt the cell integrity.	Suitable photocatalytic properties; high stability; effective antifungal for fluconazole resistant strains.	Crystal structure, shape and size.	[1,44,51–53]
Au nanoparticles	Attachment of these nanoparticles to membrane which change the membrane potential and then cause the decrease the ATP level; and inhibition of tRNA binding to the ribosome	Nontoxicity, not inducing any ROS-related process; high ability to functionalization, polyvalent effects; ease of detection; photothermal activity.	Roughness and particle size.	[54,55,57,58]
Si nanoparticles	Influencing the cell functions such as cell differentiation, adhesion and spreading.	Non-toxicity; stability.	Particle size and shape.	[52,61,63,65]
CuO nanoparticles	Crossing of nanoparticles from the bacteria cell membrane and then damaging the vital enzymes of bacteria.	Effective against Gram-positive and Gram-negative bacteria; high stability; antifungal activity.	Particle size and concentration.	[36,75,76]
MgO and CaO nanoparticles	Damaging the cell membrane and then causing the leakage of intracellular contents and death of the bacterial cells.	Effective against both Gram-positive and Gram-negative bacteria; high stability; low cost; availability.	Particle size, pH and concentration.	[65–69]

Tab. 3: Nanometalle als antimikrobielle Wirkstoffe, ihre Wirkmechanismen und Eigenschaften [Dizaj et al. 2014].

2.4.3 Kobaltchrom-Legierung *Wirobond® LFC*

Neben Prothesenkunststoffen gibt es in der Zahnmedizin eine weitere Werkstoffgruppe, die maßgeblich zur Herstellung von herausnehmbarem Zahnersatz verwendet wird – Nichtedelmetall-(NEM)-Legierungen. Dass NEM-Legierungen heutzutage häufiger verwendet werden als Edelmetall-(EM)-Legierungen, liegt zum einen an den ökonomischen Aspekten, zum anderen an dem höheren Elastizitätsmodul und der höheren Wärmefestigkeit von NEM-Legierungen gegenüber EM-Legierungen [Geis-Gerstorfer et al. 2005]. Man unterscheidet anhand ihrer Zusammensetzung zwischen Cobalt-, Nickel-, Eisen- und Titan-Legierungen sowie Stahldrähten und anhand ihres Wärmeverhaltens zwischen aufbrennfähigen und nicht-aufbrennfähigen Legierungen. Aufbrennfähige Legierungen werden vor allem zur Herstellung von festsitzendem Zahnersatz wie Kronen und Brücken verwendet, wohingegen nicht-aufbrennfähige Legierungen für herausnehmbare Teilprothetik verwendet werden [Geis-Gerstorfer et al. 2005].

Die in dieser Arbeit verwendete Kobaltchrom-Legierung *Wirobond® LFC* ist eine Kobalt-Basislegierung und geht, wie die meisten Kobalt-Basislegierungen, in ihren Grundbausteinen auf *Vitallium* zurück, welche 1932 von Erdle und Prange eingeführt wurde [Geis-Gerstorfer et al. 2005]. Die Kobalt-Basislegierungen sind meist zweiphasige Legierungen, bestehend aus einem hexagonalen Mischkristall ϵ , der für die guten mechanischen Eigenschaften verantwortlich ist, und einer tetragonalen Phase σ , welche die Härte und Sprödigkeit der Legierung festlegt [Geis-Gerstorfer et al. 2005].

Wirobond® LFC enthält 33,9m% Kobalt, 28,5m% Chrom, 30,0m% Eisen, 5,0m% Molybdän und circa 1m% Mangan, Silizium, Kohlenstoff und Stickstoff [BEGO Bremer Goldschlägerei 2013]. Chrom und Molybdän erhöhen die Korrosionsbeständigkeit, Molybdän wirkt zudem gefügestabilisierend. Mangan verbessert die Fließeigenschaften und verhindert eine Oxidation. Silizium und Kohlenstoff optimieren Fließfähigkeit und Härte und steigern den Schmelzpunkt. Eisen stabilisiert die mechanischen Eigenschaften [Geis-Gerstorfer et al. 2005].

2.4.4 Verblendkomposit *Sinfony™*

Der dritte häufig für herausnehmbaren Zahnersatz verwendete Werkstoff ist Komposit, der insbesondere für Verblendungen verwendet wird. In dieser Arbeit diente das Verblendkomposit *Sinfony™* der Firma 3M ESPE als Referenzmaterial.

Bei Kompositen handelt es sich im Allgemeinen um komplex zusammengesetzte Werkstoffe, die aus einer Vielzahl unterschiedlicher Komponenten bestehen, welche man in drei Hauptbestandteile - organische Matrix, disperse Phase und Verbundphase - einteilt [Hellwig et al. 2007].

Die organische Matrix beinhaltet Monomere, Comonomere, Initiatoren, Stabilisatoren, Farbstoffe, Pigmente und weitere Additiva wie z.B. Lichtschutzmittel und Weichmacher [Janda et al. 2005; Hellwig et al. 2007]. Die am häufigsten verwendeten Monomere sind Bis-GMA (Bisphenol-A-Glycidyl-Methacrylat) und UDMA (Urethandimethacrylat) sowie die niedermolekularen Comonomere TEDMA (Triethylen-Glycol-Dimethacrylat) und EDMA (Ethylen-Glycol-Dimethacrylat) [Hellwig et al. 2007]. Die Initiatoren sind entscheidend für die Farbstabilität und bestimmen den Polymerisationsmechanismus der Komposite; Autopolymerisate enthalten als Initiator beispielsweise Benzoylperoxid, Photopolymerisate enthalten z.B. Kampferchinon [Janda et al. 2005; Hellwig et al. 2007]. Stabilisatoren werden auch als Inhibitoren bezeichnet, weil sie eine vorzeitige Polymerisation verhindern und somit die Lagerfähigkeit der Komposite erhöhen, wohingegen Farbstoffe und Pigmente die unterschiedlichen Färbungen bestimmen [Hellwig et al. 2007].

Die disperse Phase setzt sich aus anorganischen und organischen Füllstoffen zusammen und hat einen großen Einfluss auf folgende Materialeigenschaften: Abrasionsstabilität, chemische Beständigkeit, Festigkeit, Konsistenz, Polierbarkeit, Polymerisationsschrumpfung, thermische Ausdehnung, Wasseraufnahme usw. [Janda et al. 2005]. Bei den organischen Füllstoffen handelt es sich meist um Perl- oder Splitterpolymerisate, wohingegen es sich bei den anorganischen Füllstoffen um Quarz, Glas (Bsp.: Barium- oder Strontiumaluminiumborosilikatglas), Keramik (Bsp.: Lithium-Aluminium-Silikat), feinstteiliges Siliziumdioxid oder Yttrium-/Ytterbiumfluorid handelt [Janda et al. 2005; Hellwig et al. 2007]. Die Größe der Füllkörper der dispersen Phase diente der ursprünglichen Einteilung der Komposite nach Lutz in Makrofüllerkomposite (alle Füllstoffe: $\varnothing > 1\mu\text{m}$), Mikrofüllerkomposite (alle Füllstoffe: $\varnothing = 10\text{-}40\text{nm}$) und Hybridkomposite (Makro- und Mikrofüllstoffe) [Lutz et al. 1983].

Heutzutage lassen sich drei Einteilungsmöglichkeiten unterscheiden, die nur im Zusammenspiel eine exakte Bewertung der einzelnen Kompositmaterialien gewährleisten [Ernst 2010]:

1. nach der Konsistenz
2. nach den enthaltenen Füllern
3. nach der Basischemie (Matrix).

Laut Ernst ist die Einteilung nach der Konsistenz die praktikabelste für den Anwender; hierbei unterscheidet er vier verschiedene Kompositarten bzgl. ihrer Konsistenz: „normale“ (= geschmeidige), stopfbare und hochfeste Materialien sowie Flowables [Ernst 2010].

Der dritte Kompositbestandteil ist die Verbundphase. Sie ist nötig, um die Füllstoffe in die organische Matrix einzubauen. In der Regel wird als Silanisierungsmittel 3-Methacryloyloxypropyltrimethoxysilan verwendet; dadurch kommt es zur Hydrophobierung der Füllstoffe und anschließend zur Polymerisation der Monomere mit dem Methacrylsäurerest des Silans [Janda et al. 2005; Hellwig et al. 2007].

3 Material und Methode

3.1 Aufgabenstellung

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, die Biofilmbildung auf der Oberfläche von unterschiedlichen experimentellen Prothesenbasismaterialien mit verschiedenen Anteilen von nanopartikulärem Zinkoxid (ZnO), Calciumoxid (CaO) und Titandioxid (TiO₂) *in vitro* zu untersuchen.

Es wurden zwei Suspensionen verschiedener Mikroorganismen verwendet, um unter Laborbedingungen Mono- und Multispeziesbiofilme zu erzeugen. Dabei wurde auf eine Suspension von *Candida albicans* und auf eine aus standardisierten Teilen bestehende Suspension von *Candida albicans*, *Actinomyces naeslundii* T14V und *Streptococcus gordonii* DL1 zurückgegriffen.

Die Prüfkörper wurden zunächst bezüglich ihrer physikalischen Eigenschaften untersucht. Es folgte die Bildung der Biofilme mit anschließender Bestimmung der relativen Zellzahl sowie fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen, bei denen die Mikroorganismen durch vorheriges Anfärben mit einem fluoreszierenden Farbstoff quantifiziert wurden. Die Untersuchung der Biofilme am Rasterelektronenmikroskop diente dem qualitativen Vergleich der Biofilmbildung auf den unterschiedlichen Prüfkörpern.

3.2 Prüfkörper

3.2.1 Herstellung

Alle verwendeten Prüfkörper hatten einen definierten, runden Durchmesser von 7 mm und eine Dicke von 1,5 mm. Um diese genormten Größen zu schaffen, wurden Silikonformen aus einem additionsvernetzenden Dubliersilikon (*Turbosil*, Klasse 4 Dental GmbH, Augsburg, Deutschland) hergestellt.

3.2.1.1 *Palapress*® vario mit Zusätzen (0,1%, 0,2%, 0,4%, 0,8%)

Für die vorliegenden Untersuchungen wurde ein konventionelles Prothesenbasismaterial, *Palapress*® vario (Heraeus Kulzer GmbH, Hanau, Deutschland), durch Beimengen verschiedener Konzentrationen von Zinkoxid (544906, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), Calciumoxid (634182, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) und Titandioxid (718467, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) modifiziert. Die Prüfkörper wurden mit Zusätzen von jeweils 0,1%, 0,2%, 0,4% und 0,8% (Gewichts%) der jeweiligen Metalloxide hergestellt.

Metalloxid	Partikelgröße
Zinkoxid	< 100 nm
Calciumoxid	< 160 nm
Titandioxid	Ø 21 nm

Tab. 4: Partikelgrößen der verwendeten Metalloxid-Nanopartikel.

Es wurden jeweils 100 Prüfkörper pro Gewichtskonzentration und Metalloxid hergestellt.

Die passende Metalloxidmenge wurde anhand einer definierten Prothesenbasismaterialmenge von 7,14 g, zusammengesetzt aus 5 g *Palapress® vario*-Pulver und 3 ml der dazugehörigen Flüssigkeit, errechnet. So ergaben sich folgende Zusatzmengen:

Gewichtsprozent [%]	Menge des Metalloxides [mg]
0,1	7,14
0,2	14,28
0,4	28,56
0,8	57,12

Tab. 5: Metalloxid-Zusatzangaben.

Die errechnete Metalloxidmenge wurde mithilfe einer analytischen Präzisionswaage exakt abgewogen (*SI-114*, Denver Instrument, New York, USA), mit dem *Palapress® vario*-Pulver in einem sterilen Zentrifugenröhrchen (Corning Incorporated, Corning, USA) zusammengeführt und für 30 Minuten in einem Überkopfschüttler (*Reax 2*, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland) durchmengt. Anschließend wurde das Pulver-Metalloxid-Gemisch in einem Kunststoffanrührbecher (*Resimix®*, Scheu Dental, Iserlohn, Deutschland) mit einem Mörser (HCT Germany, Rosenthal Technik-CeramTec GmbH, Plochingen, Deutschland) zu einem einheitlichen, feinen Pulver verarbeitet und 3 ml der *Palapress® vario*-Flüssigkeit mit einer *Eppendorf-Pipette* (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) zugegeben. Daraufhin folgte das blasenfreie Anrühren des modifizierten Kunststoffes mithilfe eines Metallspatels für maximal 15 Sekunden. Der flüssige Kunststoff wurde in Einwegspritzen (*BD Plastipak™* mit *Luer-Lok™*-Ansatz, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA) umgefüllt, um ein möglichst präzises und blasenfreies Einbringen in die Vertiefungen der Silikonformen zu gewährleisten. Anschließend folgte die Polymerisation bei einer Wassertemperatur von 55°C und einem Druck von 2 bar für 15 Minuten im Drucktopf (*Futuramat*, Schütz-Dental GmbH, Rosbach, Deutschland).

3.2.1.2 *Palapress® vario*

Die *Palapress® vario*-Prüfkörper ohne Zusätze dienen als Referenzmaterial.

Analog dem oben genannten Procedere (Kap. 3.2.1.1) wurden 5 g des *Palapress® vario*-Pulvers mit 3 ml der *Palapress® vario*-Flüssigkeit im Kunststoffanrührbecher verrührt und zur besseren Dosierung in Einwegspritzen gefüllt. Nachfolgend wurden die Vertiefungen der Silikonschlitten blasenfrei befüllt und der Kunststoff für 15 Minuten im Drucktopf bei einer Wassertemperatur von 55°C und einem Druck von 2 bar polymerisiert.

3.2.1.3 Wirobond® LFC

Zur Herstellung der Prüfkörper aus der CoCr-Legierung *Wirobond® LFC* (BEGO Bremer Goldschlägerei Wilh. Herbst GmbH & Co. KG, Bremen, Deutschland) wurde das *Lost-Wax-Verfahren* angewendet. Vorab mussten deshalb Prüfkörper der richtigen Form und Größe aus rückstandsfrei ausbrennendem Material hergestellt werden; dabei wurde der selbsthärtende Modellierkunststoff *Pattern Resin™ LS* (GC America, Alsip, USA) verwendet.

Das *Pattern Resin™ LS*-Pulver und die *Pattern Resin™*-Flüssigkeit wurden zu einer zähflüssigen Masse verrührt und mithilfe von Einwegspritzen in die Silikonschlitten eingebracht. Nach dem Ablauf der Polymerisationszeit von 15 Minuten wurden die erhärteten Prüfkörper entnommen und, um bereits vor dem Guss eine exakte und plane Form zu erreichen, überstehende Fahnen und Unebenheiten mit einer feinkörnigen Hartmetallfräse (Henry Schein, Langen, Deutschland) entfernt.

Danach wurden die Kunststoff-Prüfkörper mit *S-U-Wachsdraht* (Schuler Dental GmbH & Co. KG, Ulm, Deutschland) angestiftet und in die mit Vaseline und Vlies (*S-U-Bio-Vlies*, Schuler Dental GmbH & Co. KG, Ulm, Deutschland) ausgelegte Muffel eingebracht und eingebettet (*GC Stellavest*, GC Europe N.V., Leuven, Belgien). Die Einbettmasse wurde im Vakuumrührgerät (*Multivac® compact*, DeguDent GmbH, Hanau-Wolfgang, Deutschland) angerührt und auf dem Rüttler in die Muffel eingebracht. Nach einer Abbindezeit von 20 Minuten wurde die Muffel im Vorwärmofen *P6/B* (MIHM-VOGT GmbH & Co. KG, Stutensee-Blankenloch, Deutschland) aufgesetzt. Durch das 60-minütige Schnellaufheizverfahren, bei dem eine Vorwärmtemperatur von 900-1000°C erreicht wurde, kam es zum vollständigen Ausbrennen der modellierten Kunststoffformen. Im anschließenden *Vakuum-Druckguss-Verfahren* mit Induktions-Schmelzeinrichtung (*Nautilus® T*, BEGO Bremer Goldschlägerei Wilh. Herbst GmbH & Co. KG, Bremen, Deutschland) wurde die Hohlform durch die einschießende Legierung gefüllt. Nach dem vollständigen Abkühlen wurde das Gussobjekt ausgebettet und mithilfe des Punktstrahlgerätes (*P-G 400*, Harnisch+Rieth GmbH & Co. KG, Winterbach, Deutschland) gesäubert. Folglich wurden die Prüfkörper mit einer Trennscheibe (Henry Schein, Langen, Deutschland) abgetrennt und die entstandenen Asymmetrien am Rand der Prüfkörper mit rotierenden Handinstrumenten (Henry Schein, Langen, Deutschland) entfernt. Des Weiteren wurden die Prüfkörper mit einem Schleif- und Poliergerät (*Buehler Metaserv Motopol 8*, ITW Test & Measurement GmbH, Düsseldorf, Deutschland) mit Schleifpapier der Körnung *P240* (*Buehler-MET® II*, ITW Test & Measurement GmbH, Düsseldorf, Deutschland) vorgeschliffen, um Rillen und Unebenheiten zu entfernen.

3.2.1.4 Sinfony™

Die Herstellung und Formgebung der Prüfkörper aus *Sinfony™* (3M Deutschland GmbH, Standort Seefeld, 3M ESPE; Seefeld, Deutschland) erfolgte ebenfalls mithilfe der Silikonformen. Das Feinstpartikel-Komposit ist ein lighthärtendes Verblendkomposit und wurde direkt aus der handelsüblichen Mischkartusche in die Vertiefungen der Silikonschlitten eingebracht. Es folgte die Polymerisation im Lichtpolymerisationsgerät (*Visio™ Beta vario*, 3M Deutschland GmbH, Standort Seefeld, 3M ESPE; Seefeld, Deutschland) für eine Minute unter Licht und für weitere 14 Minuten unter Licht und Vakuum.

3.2.2 Nachbearbeitung

Die Nachbearbeitung aller Prüfkörper war ein essentieller Bestandteil der Untersuchungen, um eine möglichst ähnliche Oberflächenbeschaffenheit der verschiedenen Materialien zu erzeugen. Die Ränder der Prüfkörper wurden mit kleinen feinkörnigen Handfräsen entgratet, um Fahren und Überhänge zu beseitigen. Darüber hinaus wurden alle Prüfkörper mit Schleifpapier unterschiedlicher Körnung (*P1000 und P4000 Buehler-MET® II und Microcut®*, ITW Test & Measurement GmbH, Düsseldorf, Deutschland) behandelt, um eine optimale Politur zu gewährleisten. Hierfür wurde das oben genannte Schleif- und Poliergerät (Kap. 3.2.1.3) verwendet.

3.2.3 Bestimmung der Oberflächenrauigkeit

Bei den vorliegenden Untersuchungen wurde die Oberflächenrauigkeit R_a bestimmt, die den Mittenrauwert gemessen in μm angibt. Es wurde eine Überprüfung der Oberflächen an jeweils drei willkürlich ausgewählten Stellen eines Prüfkörpers, einmal zentral und zweimal marginal, mit einem Tastschnittgerät (*Perthometer S6P*, Mahr GmbH, Göttingen, Deutschland) durchgeführt. Jeweils fünf Probekörper eines Materials wurden stichprobenartig untersucht. Dabei wurden Oberflächenrauigkeiten bis $0,1 \mu\text{m}$ toleriert, wohingegen Prüfkörper mit höheren Werten verworfen oder ggf. nachbehandelt wurden.

3.2.4 Bestimmung der freien Oberflächenenergie

Die freie Oberflächenenergie γ hat als Energie pro Fläche die Einheit (mJ/m^2) und beschreibt die komplette Energie einer Festkörper-Oberfläche als Äquivalent zur Oberflächenspannung einer Flüssigkeit. Die gesamte freie Oberflächenenergie setzt sich aus einem polaren und einem dispersen Anteil zusammen. Zu den polaren Wechselwirkungen zählen Wasserstoffbrückenbindungen und Säure-Base-Kräfte, zu den dispersen die van-der-Waals-Wechselwirkungen. Wichtig für die Bestimmung der freien Oberflächenenergie ist die Bestimmung des Kontaktwinkels, der an der Grenzfläche zwischen Flüssigkeit und Festkörper entsteht. Der Kontaktwinkel θ wird zwischen der Flüssigkeitsoberfläche und der Kontaktfläche des Festkörpers gemessen und ist ein Maß für die Benetzbarkeit, Hydrophilie und Polarität der flüssigen und festen Komponenten. Entscheidend für die Größe des Kontaktwinkels ist das Verhältnis der Adhäsionskräfte der Flüssigkeit, die den Tropfen breitflächig verteilen, zu den Kohäsionskräften der Flüssigkeit, die den Tropfen in Kugelform halten [Hannig and Hannig 2009; DataPhysics Instruments GmbH 2015; Krüss GmbH 2015].

In der vorliegenden Untersuchung wurde zur Bestimmung des Kontaktwinkels ein Kontaktwinkelmessgerät (*OCA 15 plus*, DataPhysics Instruments GmbH, Filderstadt, Deutschland) am Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie der Universität Regensburg genutzt. Bei den drei verwendeten Flüssigkeiten handelte es sich um destilliertes Wasser, Ethylenglycol (Merck, Darmstadt, Deutschland) und Methylenjodid (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Die spezifische Oberflächenspannung sowie der disperse und polare Anteil der freien Oberflächenenergie der

Flüssigkeiten waren bekannt. Mithilfe einer elektronisch kalibrierten Pipette (*Microlab p*, Hamilton Bonaduz, Bonaduz, Schweiz) wurden je 0,2 µl an jeweils zwei Stellen von je fünf willkürlich gewählten Prüfkörpern pro Material und Flüssigkeit pipettiert. Der Tropfen wurde langsam auf dem Prüfkörper abgesetzt und nach dem Auftreffen sofort fotografiert. Anschließend wurde der fixierte Tropfen elektronisch vermessen, indem jeweils die zwei äußersten und der höchste Punkt der Tropfenkontur markiert und miteinander verbunden wurden. Der Kontaktwinkel θ wurde zwischen einer an die Tropfenkontur angelegten Tangente und der Kontaktfläche des Festkörpers bestimmt. Abschließend folgte für jedes Material eine Berechnung der Mittelwerte pro Flüssigkeit sowie die Bestimmung der gesamten freien Oberflächenenergie, inklusive der dispersen und polaren Anteile. Für diese Berechnungen wurde das Verfahren nach Owens und Wendt angewandt [Owens and Wendt 1969].

3.2.5 Waschen, Einkleben und Wasserlagerung

Die Prüfkörper wurden zur Reinigung und Desinfektion gewaschen; zunächst für fünf Minuten in 70-%igem Ethanol, anschließend für eine Minute in destilliertem Wasser, um Ethanolreste zu entfernen.

Daraufhin wurden die Prüfkörper mit Dubliersilikon (*Z-Dupe*, Henry Schein, Langen, Deutschland) in zuvor beschriftete, konfektionierte Wellplatten (*48 Well Cell Culture Cluster*, Corning Incorporated, Corning, USA) eingeklebt. Auf der Oberseite vorhandene Silikonreste wurden sorgsam entfernt, um ein unerwünschtes Anlagern von Mikroorganismen auf dem Silikon zu vermeiden.

Nach dem Trocknen des Silikons wurde je 1 ml destilliertes Wasser auf jeden eingeklebten Prüfkörper pipettiert, um durch siebentägige Wasserlagerung die residualen Monomere weitgehend zu eliminieren.

3.2.6 Wiederverwendung

Prüfkörper aus *Wirobond® LFC* und *Sinfony™* wurden erneut verwendet, weil ihre Neuanfertigung sehr zeit- und kostenaufwändig wäre. Ausschließlich Prüfkörper, die zur quantitativen Untersuchung der Biofilme verwendet wurden, wurden erneut aufbereitet. Dazu wurden die Probekörper zuerst für 10 Minuten in 70%-igem Ethanol gewaschen und anschließend in destilliertem Wasser. Es folgte eine erneute Politur und die Bestimmung der Oberflächenrauigkeit mittels Profilometrie.

3.3 Herstellung der Lösungen und Medien

3.3.1 Phosphatgepufferte Salzlösung (=PBS, phosphate buffered saline)

Die *phosphatgepufferte Salzlösung* (=PBS, *phosphate buffered saline*) ist eine Pufferlösung mit einem pH-Wert von 7,4. PBS ist eine unschädliche, isotonische Lösung, die verschiedene Salze enthält, wodurch sie den osmotischen Druck des humanen Organismus erhält. Zu einem Liter destilliertem Wasser wurden 8,0 g Natriumchlorid (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland), 0,2 g Kaliumchlorid (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland), 1,42 g di-Natriumhydrogenphosphat (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) und 0,2 g Kaliumdihydrogenphosphat (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) zugeführt [2006].

3.3.2 Speichelgemisch aus natürlichem und künstlichem Speichel

3.3.2.1 Natürlicher Speichel

Der natürliche Speichel wurde mittels Expektoration von Freiwilligen nach Aufklärung und Stimulation des Speichelflusses durch Kauen auf Paraffinpellets (Ivoclar Vivadent AG, Schaan, Liechtenstein) gesammelt und bis zur Verwendung bei -50°C tiefgefroren. Die Probanden waren weiblich, zwischen 23 und 56 Jahre alt, Nichtraucherinnen und wiesen keine aktiven kariösen oder parodontalen Erkrankungen auf. Sie wurden angehalten, den Humanspeichel stets nüchtern und zur gleichen Tageszeit zu sammeln.

Vor Verwendung wurde der humane Speichel gepoolt und in sterilen Einmalfiltrationsgeräten mit Porengrößen von 0,45 µm und 0,22 µm (*Corning® Bottle Top Vacuum Filter*, Corning Incorporated, Corning, USA) filtriert, um Keimfreiheit zu erzielen.

3.3.2.2 Künstlicher Speichel

Aufgrund des großen benötigten Speichelvolumens wurde ein Speichelgemisch hergestellt, das zu gleichen Teilen aus natürlichem und künstlichem Speichel bestand.

Bei dem hier verwendeten künstlichen Speichel diente PBS als Lösungsmittel. Es wurden 850 mg Mucin (*Mucin from porcine stomach*, Type III, Sigma-Aldrich, St.Louis, USA), 10 mg Lysozym (*Lysozyme from hen egg white*, Fluka Biochemika, Buchs, Schweiz), 1 g α -Amylase (*α -Amylase from hog pancreas*, Fluka Biochemika, Buchs, Schweiz) und 40 mg Albumin (*Albumin Bovine*, Sigma-Aldrich, St.Louis, USA) zu einem Liter PBS beigemischt und durch Rühren mithilfe eines Magnetrührers gelöst [Hahnel 2007]. Anschließend wurde der künstliche Speichel analog zum Vorgehen beim humanen Speichel in Einmalfiltrationsgeräten der Porengrößen 0,45 µm und 0,22 µm filtriert und bei -50°C bis zur Verwendung tiefgefroren.

3.3.3 Schädlermedium

Das *Schädlermedium* ist ein universelles Medium und dient der Kultivierung von aeroben und vor allem anaeroben Mikroorganismen. Es setzt sich aus vielen für die Anaerobier wichtigen Nährstoffen zusammen. Darunter finden sich, bezogen auf einen Liter destilliertes Wasser, 8,1 g Kaseinpepton (Fluka Analytical, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), 2,5 g Fleischpepton (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland), 1,0 g Sojapepton (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland), 5,0 g Hefeextrakt (Fluka Analytical, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), 5,82 g Glukose (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), 1,7 g Natriumchlorid (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland), 3,0 g TRIS (-hydroxymethyl-aminomethan) (USB Corporation, Cleveland, USA), 0,82 g di-Kaliumhydrogenphosphat (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland), 0,01 g Hämin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) und 0,4 g L-Zystein (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) [Schaedler et al. 1965].

Für die vorliegenden Untersuchungen wurde das *Schädlermedium* zum Kultivieren der Bakterien und Pilze auf den Prüfkörpern verwendet. Alle Komponenten wurden nacheinander in einen großen *Erlenmeyerkolben* (DURAN Group GmbH, Wertheim, Deutschland) eingewogen, mit einem Liter destilliertem Wasser vermischt und mittels Magnetrührstäbchen darin gelöst.

3.3.4 Ertragsreagens und Lysis-Reagens für farbmessende MTT-Assays

Das MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid)-basierte, kolorimetrische Verfahren dient der indirekten Quantifikation der viablen Biomasse. Bei dem Farbstoff MTT, enthalten in dem Ertragsreagens, handelt es sich um ein gelbliches Tetrazoliumsalz, das von lebenden, stoffwechselaktiven Zellen zu violett-blauem Formazan reduziert wird. Die so entstehende Menge an Formazan ist direkt proportional zur Anzahl lebender Zellen. Formazan muss aus den Zellen isoliert und in Lösung gebracht werden, um ein Messen der Absorption ($\lambda = 570 \text{ nm}$) zu ermöglichen. Dafür ist das Lysis-Reagens nötig, welches ein Auflösen der Zellmembranen bewirkt [Mosmann 1983; Berridge and Tan 1993; Berridge et al. 1996].

Für die Absorptionsbestimmung mittels eines farbmessenden MTT-Assays wurden in der vorliegenden Arbeit für jeden Versuch je 40 ml Ertragsreagens und Lysis-Reagens hergestellt.

Das Ertragsreagens setzte sich zusammen aus 4 ml MTT-Lösung, 4 ml PMS (=Phenazinmethosulfat)-Lösung und 32 ml *PBS* (Kap. 3.3.2). Die MTT- und PMS-Lösungen wurden in größeren Mengen hergestellt und portionsweise zu jeweils 1 ml eingefroren. Für die Herstellung der MTT-Lösung wurden 50 mg Thiazolylblau-Tetrazoliumbromid in 10 ml steriler *PBS* gelöst. Für die Herstellung der PMS-Lösung wurden 3 mg Phenazinmethosulfat in 10 ml steriler *PBS* gelöst [Ionescu et al. 2012].

Für die Herstellung des Lysis-Reagens wurden 10 Vol% Dodecylschwefelsäure (SDS) und 50 Vol% Dimethylformamid (DMF) in destilliertem Wasser gelöst; umgerechnet auf 40 ml Lysis-Reagens wurden 4 g SDS und 20 ml Dimethylformamid in circa 16 ml destilliertem Wasser gelöst [Ionescu et al. 2012].

3.3.5 FUN® 1 Cell-Stain

Der Farbstoff *FUN® 1 Cell Stain* (Molecular Probes, Life Technologies GmbH, Carlsbad, USA) ist ein Zwei-Farben-Fluoreszenz-Farbstoff zur fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der Lebensfähigkeit von Hefen und Pilzen. Der Farbstoff dringt durch Diffusion passiv in die Hefe- und Pilzzellen ein und färbt das Zytoplasma mit einer nebulösen, grünen Fluoreszenz. Wird der FUN 1-Farbstoff von lebenden Zellen verstoffwechselt, entsteht eine deutliche, rote Fluoreszenz, während die zytoplasmatische, grüne Fluoreszenz abnimmt. Folglich werden lebende Zellen durch den Farbstoff rot fluoresziert, während tote Zellen in einem hellen Gelb-Grün ohne erkennbare, rote Struktur fluoresziert werden [Life Technologies GmbH- Marke: Molecular Probes 2011].

3.3.6 Kultivierung der Mikroorganismen

Für die vorliegenden Untersuchungen wurden drei verschiedene Mikroorganismen verwendet: *Candida albicans ATCC 10231* (bezogen von der DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig) sowie *Actinomyces naeslundii T14V* und *Streptococcus gordonii DL1*; letztere wurden von Paul Kolenbrander (NIH, Bethesda, Maryland, USA) zur Verfügung gestellt.

Das Anzüchten der Versuchskulturen erfolgte mit Vorkulturen, die wöchentlich neu im *Schädlermedium* überimpft wurden. Das Animpfen der Bakterien- und Pilzkulturen erfolgte unter sterilen Bedingungen, indem je 300 µl der Vorkultur mit 300 ml des *Schädlermediums* versetzt und inkubiert wurden (37°C, 60 U/Min; *Orbital Shaker*, Thermo Forma, Marietta, USA).

Die Inkubationszeiten für die einzelnen Bakterien wurden so gewählt, dass sich die Mikroorganismen bei Inkubationsende in der frühen exponentiellen Wachstumsphase befanden. *Candida albicans ATCC 10321* wurde für 18 Stunden inkubiert, *Actinomyces naeslundii T14V* für 22 Stunden und *Streptococcus gordonii DL1* für 11 Stunden [Susewind S. 2014].

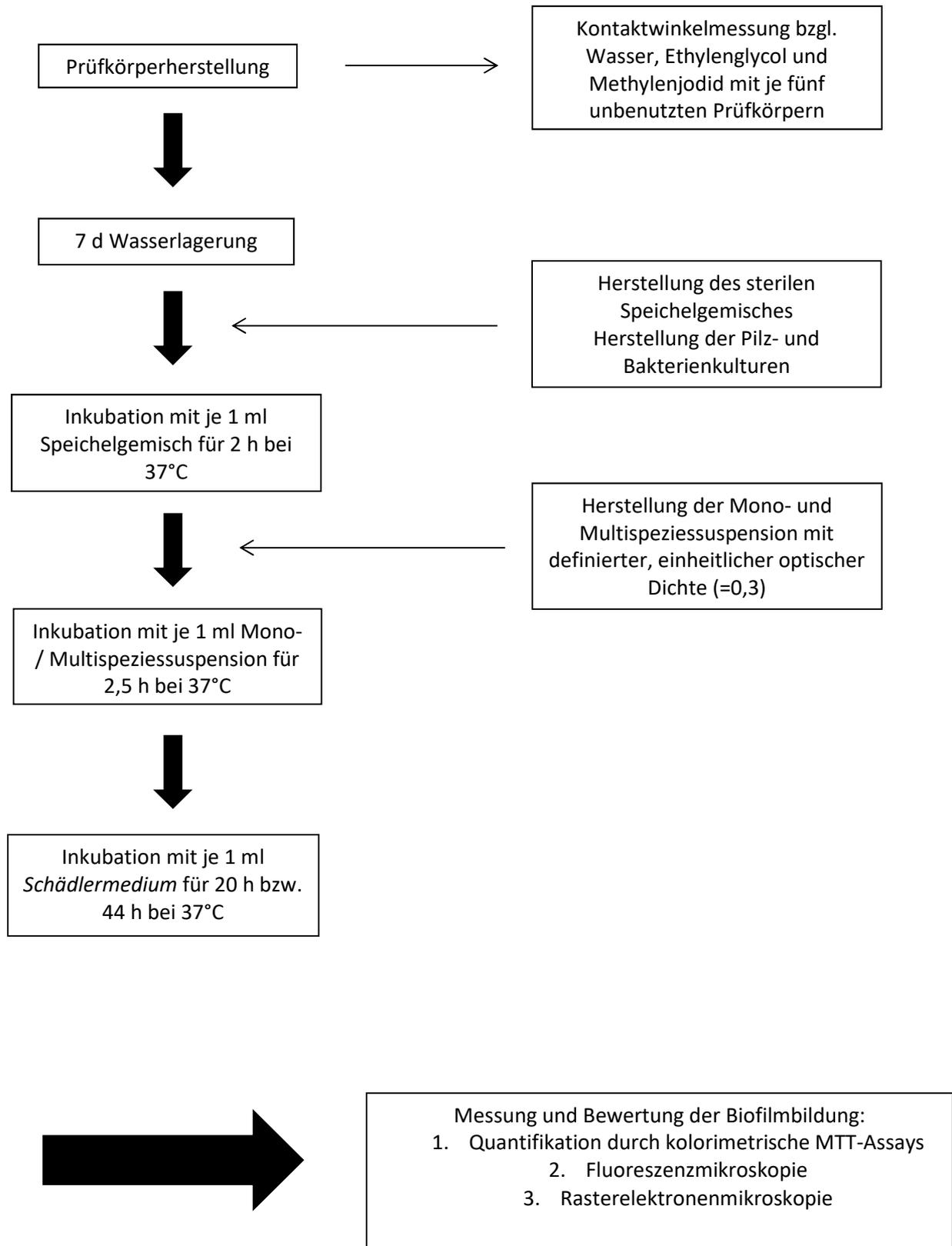
Nach der Inkubation wurden die kultivierten Suspensionen in sterile Zentrifugenröhrchen aufgeteilt und es folgte das Abzentrifugieren der Zellpellets (2300 U/min, 18°C, 5 Minuten; *ROTINA 420R*, Hettich GmbH Co. KG, Tuttlingen, Deutschland). Die Überstände wurden behutsam abgekippt, die entstandenen Zellpellets in einem Zentrifugenröhrchen vereint und zwei weitere Male mit *PBS* gewaschen und zentrifugiert und abschließend resuspendiert.

Um genormte Bakterienlösungen zu erhalten, wurden alle drei Suspensionen auf eine optische Dichte von 0,3 kalibriert. Dies geschah durch Verdünnung der Suspensionen mit *PBS* und mithilfe eines Photometers (*Genesys™ 10S*, Thermo Spectronic, Rochester, USA), das die optische Dichte gegen den Nullwert bestimmt; in den vorliegenden Untersuchungen wurde *PBS* als Nullwert verwendet.

Es wurde eine Monospezieskultur von *Candida albicans ATCC 10321* sowie eine Multispezieskultur von *Candida albicans ATCC 10321*, *Actinomyces naeslundii T14V* und *Streptococcus gordonii DL1* hergestellt. Für diese Multispezieskultur wurden die drei Kulturen nach dem Einstellen der entsprechenden optischen Dichte zu gleichen Volumina von je 150 ml gemischt.

3.4 Versuche

3.4.1 Überblick



3.4.2 Aufbau und Ablauf

Die experimentellen Versuche wurden in vier Einzelversuche aufgeteilt. Pro Einzelversuch wurden sechs verschiedene Materialien mit zwei verschiedenen Mikroorganismensuspensionen für jeweils 20 und 44 Stunden inkubiert, um eine Biofilmbildung zu simulieren. Es wurde ein Mono-/ Multispeziesbiofilmodell angewandt. Bei den verwendeten Bakterienkulturen handelte es sich einerseits um eine reine *Candida albicans*-Kultur, andererseits um eine Multispezieskultur von *Candida albicans*, *Actinomyces naeslundii* T14V und *Streptococcus gordonii* DL1 (siehe Kap. 3.3.6). Im ersten Versuch wurden die *Palapress*[®] vario-Prüfkörper mit 0,1%igem Zusatz von Zinkoxid, Calciumoxid oder Titandioxid sowie die drei Referenzmaterialien - *Palapress*[®] vario, *Sinfony*[™], *Wirobond*[®] LFC - verwendet. Im zweiten Versuch fanden die Prüfkörper mit 0,2%igen Zusätzen Anwendung, im dritten Versuch die Prüfkörper mit 0,4%igen Zusätzen und im vierten Versuch die Prüfkörper mit 0,8%igen Zusätzen; die drei Referenzmaterialien wurden z.T. wiederverwendet (siehe Kap. 3.2.5) und in jedem Einzelversuch erneut untersucht. Die Versuche wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

P	P	P	P	P	P	P	P
P	P	FK	FK	FK	BK	NK	
P	P	P	P	P	P	P	P
P	P	FK	FK	FK	BK	NK	
P	P	P	P	P	P	P	P
P	P	FK	FK	FK	BK	NK	

P	P	P	P	P	P	P	P
P	P	FK	FK	FK	BK	NK	
P	P	P	P	P	P	P	P
P	P	FK	FK	FK	BK	NK	
P	P	P	P	P	P	P	P
P	P	FK	FK	FK	BK	NK	

FM	FM	FM	FM	FM	RM	RM	
FM	FM	FM	FM	FM	RM	RM	
FM	FM	FM	FM	FM	RM	RM	
FM	FM	FM	FM	FM	RM	RM	
FM	FM	FM	FM	FM	RM	RM	
FM	FM	FM	FM	FM	RM	RM	

Materialien:
<i>Palapress</i> [®] vario mit Zinkoxid
<i>Palapress</i> [®] vario mit Calciumoxid
<i>Palapress</i> [®] vario mit Titandioxid
<i>Sinfony</i> [™]
<i>Wirobond</i> [®] LFC
<i>Palapress</i> [®] vario

Legende:
P – Probe
FK – Farbkontrolle
BK – Bakterienkontrolle
NK – Nullkontrolle
FM – Fluoreszenzmikroskop
RM – Rasterelektronenmikroskop

Abb. 13: Anordnung der Prüfkörper in den Wellplatten: Darstellung eines Einzelversuchs pro Bakterienkultur, je Inkubationszeit.

Die Prüfkörper wurden in die Wellplatten eingeklebt und für 7 Tage in destilliertem Wasser bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Die Abbildung zeigt drei Wellplatten pro beobachtetem Zeitraum und Mono-/Multispezieskultur.

Nach einwöchiger Wasserlagerung wurden die Wellplatten unter der sterilen Sicherheitswerkbank geöffnet und das destillierte Wasser abgesaugt (*Laboport® N86*, KNF Instruments GmbH, Freiburg, Deutschland). Anschließend wurde auf jeden Prüfkörper 1 ml des zuvor hergestellten Speichelgemischs pipettiert. Jeweils drei Wellplatten wurden in einer schwarzen, lichtundurchlässigen und mit feuchten Tüchern ausgelegten Box gelagert und für 2 Stunden bei 37°C im *Orbital Shaker* (60 U/Min.) inkubiert, um die Bildung eines erworbenen Pellikels zu simulieren.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Speichelgemisch vorsichtig abgesaugt und es folgte die Bewirtung mit der Mono- bzw. Multispezieskultur. Hierfür wurde auf die Proben (P), Bakterienkontrollen (BK) und die Prüfkörper für Fluoreszenzmikroskopie (FM) sowie Rasterelektronenmikroskopie (RM) je 1 ml der jeweiligen Kultur pipettiert. Die Farb- und Nullkontrollen (FK, NK) wurden lediglich mit je 1 ml *PBS* versehen. Die bewirteten Wellplatten wurden abermals in den lichtundurchlässigen Boxen gelagert und für 2,5 Stunden bei 37°C und 60 U/Min. inkubiert.

Daraufhin wurden die Bakterienkulturen und *PBS* achtsam abgesaugt. Auf jeden Prüfkörper, der mit einer Bakterienkultur bewirtet war, wurde 1 ml des *Schädlermediums* pipettiert; Farb- und Nullkontrollen wurden mit 1 ml *PBS* versehen. Die Wellplatten wurden mit einer Acetatfolie dicht verschlossen, um ein Verdunsten zu vermeiden, und in lichtundurchlässigen Boxen gelagert. Die Wellplatten wurden nun entsprechend der vorher festgelegten Zeiten für 20 oder 44 Stunden bei 37°C und 60 U/Min. inkubiert.

Bei den Wellplatten, die 44 Stunden inkubiert wurden, wurde nach 20 Stunden ein Mediumwechsel vorgenommen, indem das vorhandene *Schädlermedium* sowie *PBS* abgesaugt und frisches Medium und *PBS* aufpipettiert wurden. Die Platten wurden mit Acetatfolien abgedeckt und in den Boxen für weitere 24 Stunden inkubiert.

Nach Ablauf der endgültigen Inkubationszeit folgte das Umsetzen der Prüfkörper. Dafür wurden die Wellplatten aus den Boxen entnommen, die Acetatfolien entfernt und *Schädlermedium* und *PBS* nacheinander abgesaugt. Alle Prüfkörper mit Ausnahme der für die Fluoreszenzmikroskopie (FM) vorgesehenen wurden zweimal vorsichtig mit *PBS* gewaschen, um freie und an den Platten haftende Mikroorganismen zu eliminieren.

Ab diesem Zeitpunkt wurden die Prüfkörper, je nach Art der Auswertung, differenziert weiterbehandelt (Kap. 3.5 und 3.6).

Die Prüfkörper, bei denen die Biofilmbildung durch kolorimetrische MTT-Verfahren quantifiziert wurde, wurden in neue, identisch beschriftete Wellplatten umgesetzt, indem sie vorsichtig mit einer sterilen Pinzette entnommen wurden, um den anlagernden Biofilm nicht zu beschädigen. Eventuell vorhandene Silikonreste mussten von den Prüfkörpern entfernt werden, um Verfälschungen zu minimieren. Anschließend wurden auf die Proben (P) und Farbkontrollen (FK) je 250 µl Ertragsreagens, auf Bakterien- und Nullkontrollen (BK, NK) je 250 µl *PBS* pipettiert. Die Wellplatten wurden nochmals mit Acetatfolie verschlossen, in lichtundurchlässigen Boxen gelagert und für fünf Stunden bei 37°C und 60 U/Min. inkubiert. Nach diesen fünf Stunden wurden Ertragsreagens und *PBS*

abgesaugt und auf Bakterien- und Nullkontrollen (BK, NK) nochmals je 250 µl *PBS* pipettiert. Die Proben (P) und Farbkontrollen (FK) wurden mit je 250 µl Lysis-Reagens versehen und es folgte eine kurze Inkubation von fünf Minuten. Abschließend wurden je 200 µl Lysis-Reagens in zuvor beschriftete, sterile Wellplatten (*Nunc™ 96-Well Platten*, Thermo Fisher Scientific Incorporated, Waltham, USA) umpipettiert, um die Absorption zu messen. Bei diesem Schritt wurde nach jedem Well eine neue Pipettenspitze verwendet, um den entstandenen Farbstoff Formazan für jeden Prüfkörper einzeln erfassen zu können. Für die Absorptionsbestimmung bei 570 nm wurde ein filterbasierter Multifunktions-Mikroplatten-Reader [*FLUOstar OPTIMA* (BMG LABTECH GmbH, Ortenburg, Deutschland)] verwendet.

3.5 Fluoreszenzmikroskopie

Von jedem Material wurden fünf willkürlich ausgewählte Prüfkörper für die Auswertung mittels Fluoreszenzmikroskop verwendet. Nach dem einmaligen Waschen mit *PBS* wurden die Prüfkörper mit einer sterilen Pinzette aus den Wellplatten entnommen, das Silikon entfernt und vorsichtig in zuvor einzeln beschriftete *Eppendorf Self-Lock-Tubes* (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) umgesetzt. Um den entstandenen Biofilm von den Prüfkörpern zu lösen und in Lösung zu überführen, wurde in jedes Tube 1 ml einer 0,9%igen Kochsalzlösung pipettiert. Es folgte das Vortexen der Tubes im Reagenzglasschüttler (*Reax top*, Heidoph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland) für jeweils fünf Sekunden und die anschließende Biofilm-Lockerung im Ultraschallbad (*Sonorex super RK 510 H*, Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland). Daraufhin wurden die Prüfkörper aus den Tubes entnommen und die entstandene Biofilm-NaCl-Lösung für 10 Minuten bei einer Temperatur von 4°C und einer Geschwindigkeit von 4500 rcf zentrifugiert (*Eppendorf Centrifuge 5417 R*, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland). Der Überstand wurde abpipettiert und verworfen. Zu jedem Zellpellet wurden jeweils 30 µl *Fun®1-Farbstoff* zugegeben, die Tubes verschlossen und eingefroren. Vor der Auswertung am Fluoreszenzmikroskop wurden die jeweiligen Proben im abgedunkelten Raum aufgetaut und mit einer Pipette gut durchmischt. Anschließend wurden je 10 µl einer Probe auf einen Objektträger (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) pipettiert und mit einem Deckglas (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) möglichst blasenfrei fixiert.

Zur Anwendung kam dann das Fluoreszenzmikroskop *AxioScope.A1* von Zeiss (Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland). Die auf dem Objektträger befindlichen Proben wurden bei 40-facher Vergrößerung durch Kanal 2 (AF 568, $\lambda=530$ nm) betrachtet und an drei willkürlich ausgewählten Stellen mit gut sichtbaren Mikroorganismen wurden mit der *AxioCam MRM* (Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland) drei Bilder pro Probe aufgenommen, abgespeichert und später der quantitativen Auswertung zugeführt.

3.6 Rasterelektronenmikroskopie

Die Auswertung mittels Rasterelektronenmikroskopie diente der Darstellung der Objektoberfläche und der Morphologie der Mikroorganismen. Von jedem Material wurden zwei Prüfkörper pro Mono- bzw. Multispezieskultur und Inkubationszeit für die Untersuchung am Rasterelektronenmikroskop

verwendet. Die Prüfkörper wurden zweimal mit *PBS* gewaschen und anschließend mit doppelseitigen Klebepads (Baltic Präparation, Niesgrau, Deutschland) auf die Aluminiumprobenteller (Baltic Präparation, Niesgrau, Deutschland) aufgeklebt. Um Aufladungseffekte zu vermeiden, wurden sie mit einer sehr dünnen Platinschicht versehen. Dazu wurden die Prüfkörper im Sputtergerät (*SCD 005 Sputter Coater*, Bal Tec, Pfäffikon, Schweiz) platziert und unter Vakuum für jeweils 40 Sekunden mit Platinstaub besputtert. Anschließend wurden die rasterelektronenmikroskopischen Bilder mit dem Rasterelektronenmikroskop (*Phenom™*, Phenom-World BV, Eindhoven, Niederlande) aufgenommen, um eine qualitative Übersicht der Mikroorganismenmorphologie zu erlangen. Es wurde jeweils eine Übersichtsaufnahme bei 1000-facher Vergrößerung und eine Tiefenaufnahme bei 3000-facher Vergrößerung angefertigt.

3.7 Datenverarbeitung und statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung und graphische Darstellung wurde das Statistikprogramm *IBM SPSS Statistics* (Version 23, International Business Machines Corporation, Armonk, USA) und das Tabellenkalkulationsprogramm *Excel* (Version von 2010, Microsoft Corporation, Redmond, USA) verwendet.

3.7.1 Graphische Darstellung: Fehlerbalken

Die graphische Darstellung der Versuchsergebnisse erfolgte mittels gruppierter Fehlerbalken. Fehlerbalken sind eine graphische Repräsentation der Variabilität von Daten. Sie zeigen, wie genau eine Messung ist und in welchem Bereich sich der tatsächliche Wert befinden könnte. Die hier verwendeten Fehlerbalken geben den Fehler als Standardabweichung an. Die Standardabweichung ist ein Maß für die Varianz der Daten; sie zeigt auf, wie weit die Datenpunkte voneinander entfernt liegen. Eine geringe Standardabweichung bedeutet demnach, dass die gemessenen Daten relativ nah beieinander liegen, wohingegen eine hohe Standardabweichung für weit verstreute Daten spricht. Somit ist die Standardabweichung ein Maß für die Aussagekraft des Mittelwerts; je größer sie ist, desto ungenauer der Mittelwert. Hier wurde für die Standardabweichung ein Multiplikator von eins verwendet.

3.7.2 Statistische Auswertung

Die in den Versuchen gewonnenen Daten wurden mittels univarianter ein- oder zweifaktorieller Varianzanalyse (ANOVA = analysis of variance) statistisch ausgewertet. Im *SPSS*-Statistikprogramm wurde die Varianzhomogenität mittels Levene-Test überprüft. Der wichtigste Analysewert in der ANOVA-Ergebnistabelle ist der p-Wert; dieser gibt die Signifikanz bzw. den signifikanten Unterschied an. Das Signifikanzniveau α wurde auf 0,05 festgelegt. Wenn ein signifikanter Unterschied ($\alpha \leq 0,05$)

festgestellt wurde, wurden Paarvergleiche (Post-hoc-Test) durchgeführt. Dabei wurden mittels Tukey-HSD-Test Mehrfachvergleiche bei angenommener Varianzgleichheit durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Eigenschaften der *Palapress® vario*-Prüfkörper mit Zusätzen von Zinkoxid-, Calciumoxid- und Titandioxidnanopartikeln

4.1.1 Oberflächenrauigkeit

Um eine gute Vergleichsgrundlage bezüglich der Mikroorganismenanlagerung zu schaffen, wurde auf ähnliche Oberflächenrauigkeitswerte der verschiedenen Materialien geachtet. Es wurden ausschließlich Prüfkörper verwendet, deren Oberflächenrauigkeit den Wert $0,1 \mu\text{m}$ nicht überschritten hat. Für die statistische Analyse mittels *SPSS* wurde eine univariante, einfaktorische Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt; hierbei diente als Variable die Oberflächenrauigkeit, als Faktor das jeweilige Material.

4.1.1.1 Metalloxid-Konzentration 0,1%

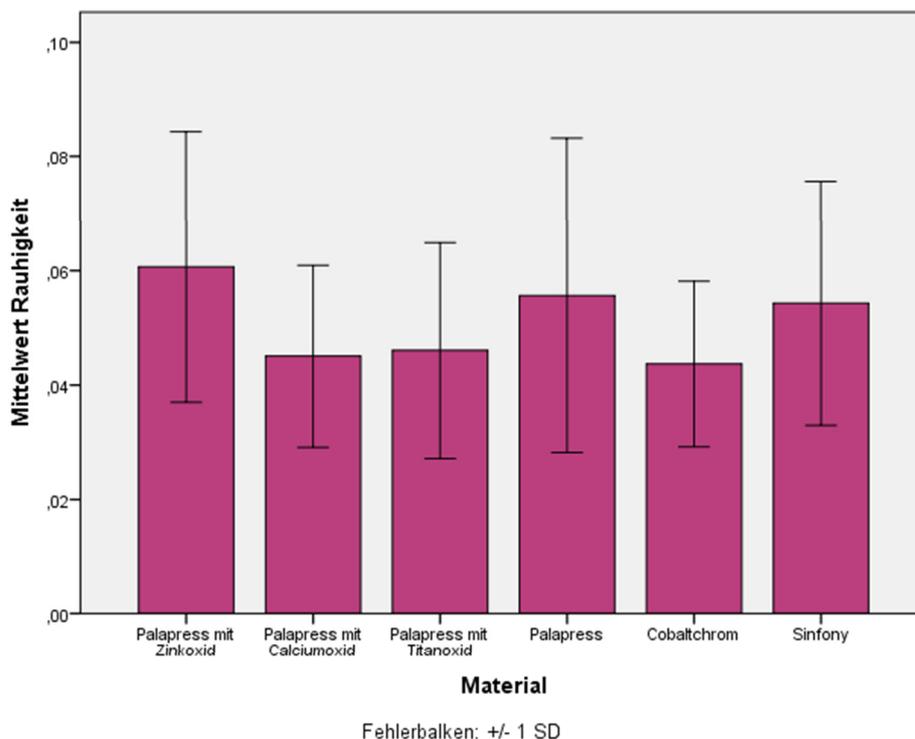


Abb. 14: Oberflächenrauigkeiten der Prüfkörper mit 0,1%-igem Zusatz und der Referenzmaterialien.

	0,1%ZnO	0,1% CaO	0,1% TiO ₂	Palapress	CoCr	Sinfony
0,1% ZnO	---	0,045	0,073	0,938	0,022	0,845
0,1% CaO		---	1,000	0,353	1,000	0,507
0,1% TiO ₂			---	0,467	0,998	0,630
Palapress				---	0,226	1,000
CoCr					---	0,353
Sinfony						---

Tab. 6: Statistische Auswertung (Post-hoc-Test, Tukey-HSD; $\alpha \leq 0,05$).

Die einfaktorielle Varianzanalyse zeigte das Vorliegen von signifikanten Unterschieden an ($P=0,006$).

Die anschließende Post-hoc-Analyse zeigte eine signifikant höhere Oberflächenrauigkeit für das Material *Palapress® vario* mit dem Zusatz von 0,1% Zinkoxid als für das Material *Palapress® vario* mit Zusatz von 0,1% Calciumoxid ($P=0,045$) und für das Material Cobaltchrom ($P=0,022$).

4.1.1.2 Metalloxid-Konzentration 0,2%

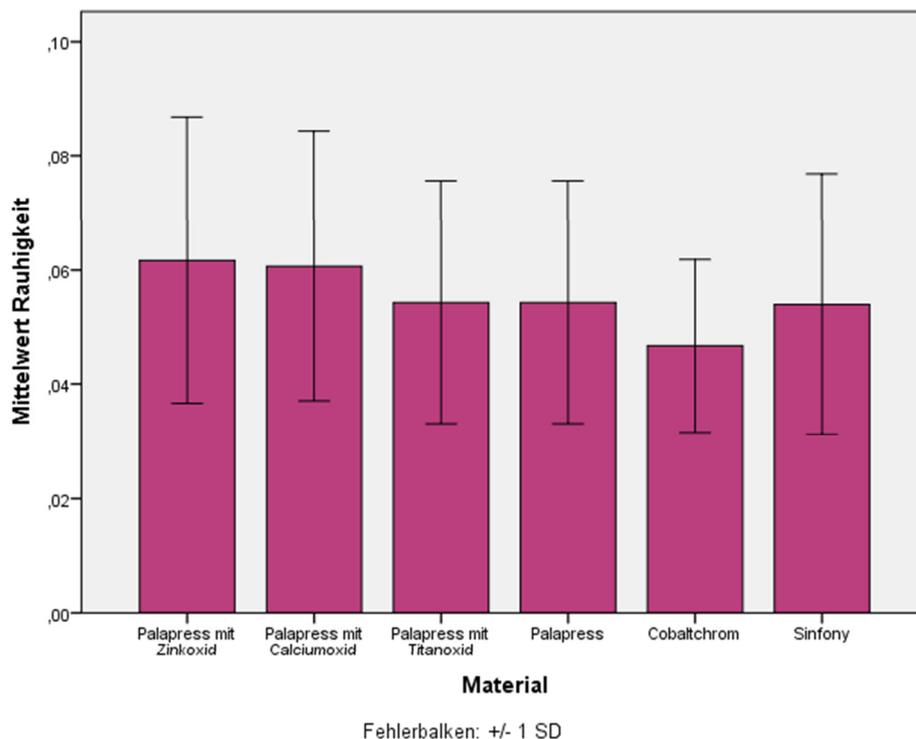


Abb. 15: Oberflächenrauigkeiten der Prüfkörper mit 0,2%-igem Zusatz und der Referenzmaterialien.

Die einfaktorielle Varianzanalyse zeigte keine signifikanten Unterschiede an ($P=0,103$). Es folgte keine Post-hoc-Analyse.

4.1.1.3 Metalloxid-Konzentration 0,4%

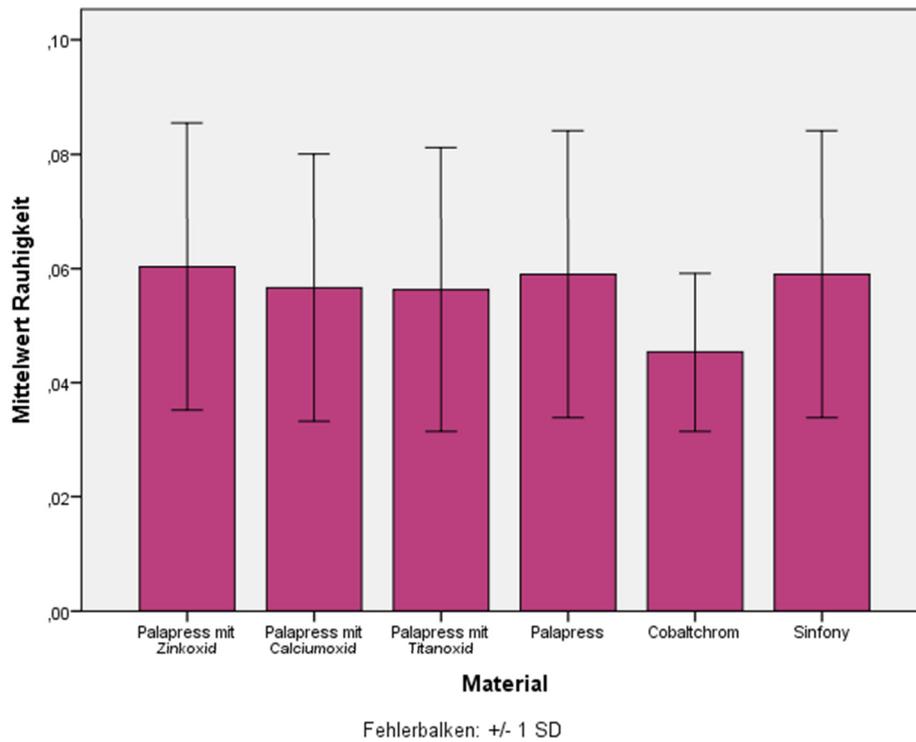


Abb. 16: Oberflächenrauigkeiten der Prüfkörper mit 0,4%-igem Zusatz und der Referenzmaterialien.

Die einfaktorielle Varianzanalyse zeigte keine signifikanten Unterschiede an ($P=.143$). Es folgte keine Post-hoc-Analyse.

4.1.1.4 Metalloxid-Konzentration 0,8%

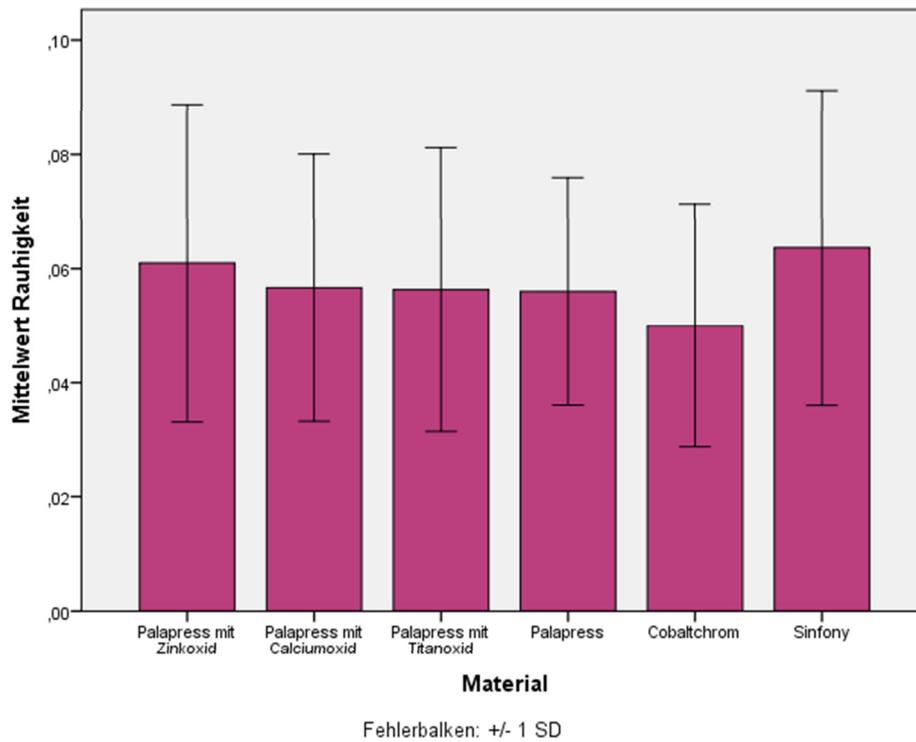


Abb. 17: Oberflächenrauigkeiten der Prüfkörper mit 0,8%-igem Zusatz und der Referenzmaterialien.

Die einfaktorielle Varianzanalyse zeigte keine signifikanten Unterschiede an ($P=0,352$). Es folgte keine Post-hoc-Analyse.

4.1.2 Kontaktwinkelmessung und Bestimmung der Oberflächenenergie

4.1.2.1 Metalloxid-Konzentration 0,1%

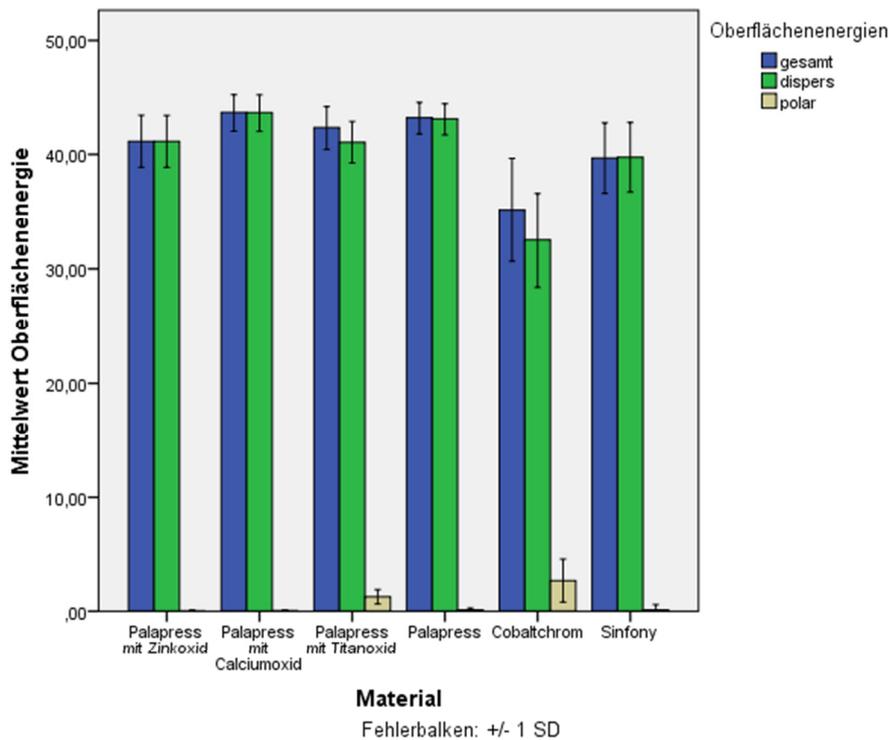


Abb. 18: Gesamte, disperse und polare Oberflächenenergie [mJ/m²] der *Palapress vario*[®]-Prüfkörper mit 0,1%-igem Metalloxid-Zusatz im Vergleich zu den Oberflächenenergien der Referenzmaterialien.

Die einfaktorielle Varianzanalyse zeigte einen signifikanten Einfluss des Materials auf die **gesamte** Oberflächenenergie (P=.021). Die anschließende Post-hoc-Analyse zeigte für den Werkstoff Cobaltchrom eine signifikant geringere **gesamte** Oberflächenenergie als für die Werkstoffe *Palapress vario*[®] mit Calciumoxid (P=.021) und das Referenzmaterial *Palapress vario*[®] (P=.030).

	0,1% ZnO	0,1% CaO	0,1% TiO ₂	Palapress	CoCr	Sinfony
0,1% ZnO	---	0,851	0,993	0,929	0,139	0,982
0,1% CaO		---	0,988	1,000	0,021	0,490
0,1% TiO ₂			---	0,998	0,058	0,824
Palapress				---	0,030	0,612
CoCr					---	0,365
Sinfony						---

Tab. 7: Varianzanalyse der **gesamten** Oberflächenenergie der Prüfkörper mit 0,1% Metalloxid-Zusatz und der Referenzmaterialien (Post-hoc-Test, Tukey-HSD; $\alpha \leq 0,05$).

Die einfaktorielle Varianzanalyse zeigte einen signifikanten Einfluss des Materials auf die **disperse** Oberflächenenergie (P=.002). Die anschließende Post-hoc-Analyse zeigte für den Werkstoff Cobaltchrom eine signifikant geringere **disperse** Oberflächenenergie als für die Werkstoffe *Palapress*

vario[®] mit Zinkoxid (P=.013), mit Calciumoxid (P=.002), mit Titandioxid (P=.014), *Palapress vario*[®] (P=.003) und Sinfony (P=.040).

	0,1% ZnO	0,1% CaO	0,1% TiO ₂	Palapress	CoCr	Sinfony
0,1% ZnO	---	0,825	1,000	0,926	0,013	0,983
0,1% CaO		---	0,809	1,000	0,002	0,461
0,1% TiO ₂			---	0,915	0,014	0,986
Palapress				---	0,003	0,607
CoCr					---	0,040
Sinfony						---

Tab. 8: Varianzanalyse der **dispersen** Oberflächenenergie der Prüfkörper mit 0,1% Metalloxid-Zusatz und der Referenzmaterialien (Post-hoc-Test, Tukey-HSD; $\alpha \leq 0,05$).

Die einfaktorielle Varianzanalyse zeigte einen signifikanten Einfluss des Materials auf die **polare** Oberflächenenergie (P=.010). Die anschließende Post-hoc-Analyse zeigte für den Werkstoff Cobaltchrom eine signifikant höhere **polare** Oberflächenenergie als für die Werkstoffe *Palapress vario*[®] mit Zinkoxid (P=.020), mit Calciumoxid (P=.020), *Palapress vario*[®] (P=.025) und Sinfony (P=.026).

	0,1% ZnO	0,1% CaO	0,1% TiO ₂	Palapress	CoCr	Sinfony
0,1% ZnO	---	1,000	0,477	1,000	0,020	1,000
0,1% CaO		---	0,485	1,000	0,020	1,000
0,1% TiO ₂			---	0,550	0,365	0,567
Palapress				---	0,025	1,000
CoCr					---	0,026
Sinfony						---

Tab. 9: Varianzanalyse der **polaren** Oberflächenenergie der Prüfkörper mit 0,1% Metalloxid-Zusatz und der Referenzmaterialien (Post-hoc-Test, Tukey-HSD; $\alpha \leq 0,05$).

4.1.2.2 Metalloxid-Konzentration 0,2%

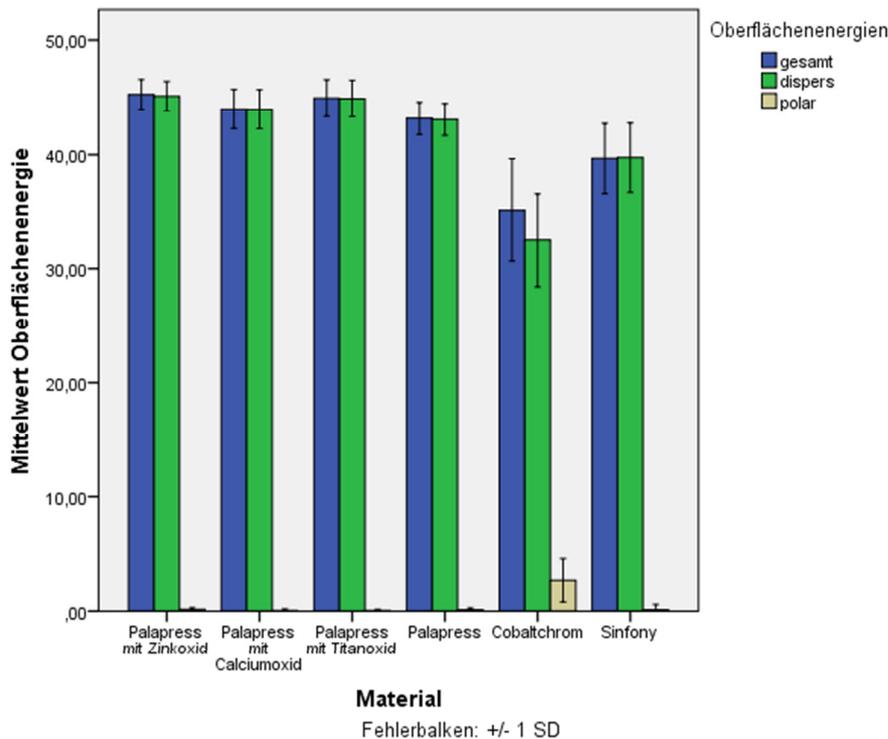


Abb. 19: Gesamte, disperse und polare Oberflächenenergie [mJ/m²] der *Palapress vario*[®]-Prüfkörper mit 0,2%-igem Metalloxid-Zusatz im Vergleich zu den Oberflächenenergien der Referenzmaterialien.

Die einfaktorielle Varianzanalyse zeigte einen signifikanten Einfluss des Materials auf die **gesamte** Oberflächenenergie (P=.003). Die anschließende Post-hoc-Analyse zeigte für den Werkstoff Cobaltchrom eine signifikant geringere **gesamte** Oberflächenenergie als für die Werkstoffe *Palapress vario*[®] mit Zinkoxid (P=.004), mit Calciumoxid (P=.011), mit Titandioxid (P=.005) und das Referenzmaterial *Palapress vario*[®] (P=.021).

	0,2% ZnO	0,2% CaO	0,2% TiO ₂	Palapress	CoCr	Sinfony
0,2% ZnO	---	0,988	1,000	0,906	0,004	0,146
0,2% CaO		---	0,997	0,998	0,011	0,353
0,2% TiO ₂			---	0,950	0,005	0,185
Palapress				---	0,021	0,562
CoCr					---	0,315
Sinfony						---

Tab. 10: Varianzanalyse der **gesamten** Oberflächenenergie der Prüfkörper mit 0,2% Metalloxid-Zusatz und der Referenzmaterialien (Post-hoc-Test, Tukey-HSD; $\alpha \leq 0,05$).

Die einfaktorielle Varianzanalyse zeigte einen signifikanten Einfluss des Materials auf die **disperse** Oberflächenenergie (P<.001). Die anschließende Post-hoc-Analyse zeigte für den Werkstoff Cobaltchrom eine signifikant geringere **disperse** Oberflächenenergie als für die Werkstoffe *Palapress vario*[®] mit Zinkoxid (P<.001), mit Calciumoxid (P=.001), mit Titandioxid (P<.001), *Palapress vario*[®] (P=.002) und Sinfony (P=.029).

	0,2% ZnO	0,2% CaO	0,2% TiO ₂	Palapress	CoCr	Sinfony
0,2% ZnO	---	0,990	1,000	0,897	0,000	0,138
0,2% CaO		---	0,996	0,997	0,001	0,325
0,2% TiO ₂			---	0,931	0,000	0,163
Palapress				---	0,002	0,556
CoCr					---	0,029
Sinfony						---

Tab. 11: Varianzanalyse der **dispersen** Oberflächenenergie der Prüfkörper mit 0,2% Metalloxid-Zusatz und der Referenzmaterialien (Post-hoc-Test, Tukey-HSD; $\alpha \leq 0,05$).

Die einfaktorielle Varianzanalyse zeigte einen signifikanten Einfluss des Materials auf die **polare** Oberflächenenergie ($P=0,009$). Die anschließende Post-hoc-Analyse zeigte für den Werkstoff Cobaltchrom eine signifikant höhere **polare** Oberflächenenergie als für die Werkstoffe *Palapress vario*[®] mit Zinkoxid ($P=0,021$), mit Calciumoxid ($P=0,016$), mit Titandioxid ($P=0,016$), *Palapress vario*[®] ($P=0,019$) und Sinfony ($P=0,020$).

	0,2% ZnO	0,2% CaO	0,2% TiO ₂	Palapress	CoCr	Sinfony
0,2% ZnO	---	1,000	1,000	1,000	0,021	1,000
0,2% CaO		---	1,000	1,000	0,016	1,000
0,2% TiO ₂			---	1,000	0,016	1,000
Palapress				---	0,019	1,000
CoCr					---	0,020
Sinfony						---

Tab. 12: Varianzanalyse der **polaren** Oberflächenenergie der Prüfkörper mit 0,2% Metalloxid-Zusatz und der Referenzmaterialien (Post-hoc-Test, Tukey-HSD; $\alpha \leq 0,05$).

4.1.2.3 Metalloxid-Konzentration 0,4%

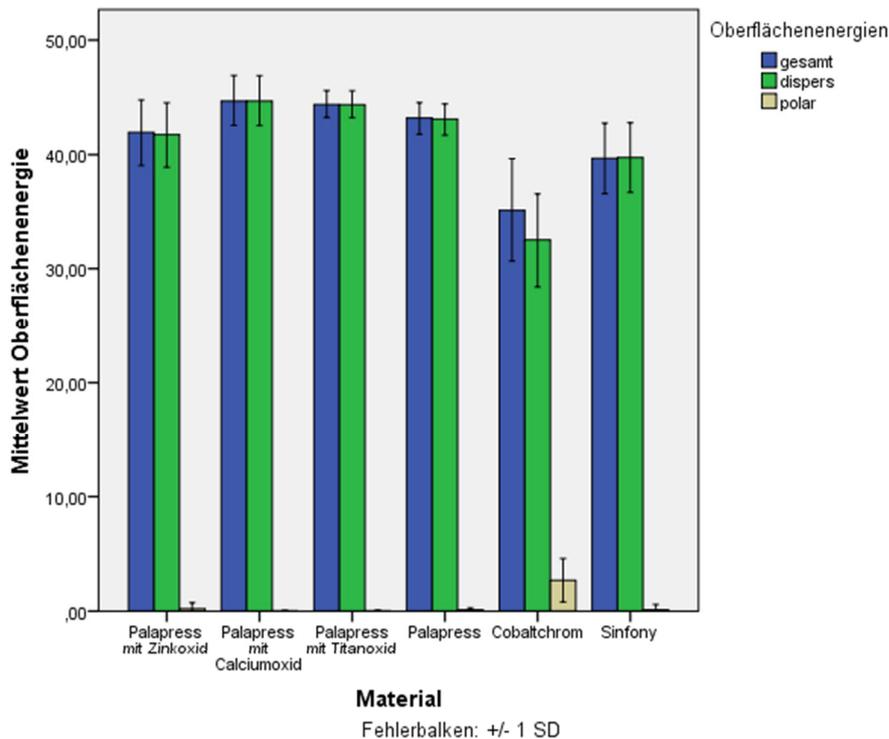


Abb. 20: Gesamte, disperse und polare Oberflächenenergie [mJ/m²] der *Palapress vario*[®]-Prüfkörper mit 0,4%-igem Metalloxid-Zusatz im Vergleich zu den Oberflächenenergien der Referenzmaterialien.

Die einfaktorielle Varianzanalyse zeigte einen signifikanten Einfluss des Materials auf die **gesamte** Oberflächenenergie (P=.010). Die anschließende Post-hoc-Analyse zeigte für den Werkstoff Cobaltchrom eine signifikant geringere **gesamte** Oberflächenenergie als für die Werkstoffe *Palapress vario*[®] mit Calciumoxid (P=.012), mit Titandioxid (P=.014) und das Referenzmaterial *Palapress vario*[®] (P=.037).

	0,4% ZnO	0,4% CaO	0,4% TiO ₂	Palapress	CoCr	Sinfony
0,4% ZnO	---	0,813	0,872	0,993	0,092	0,909
0,4% CaO		---	1,000	0,980	0,012	0,291
0,4% TiO ₂			---	0,992	0,014	0,347
Palapress				---	0,037	0,644
CoCr					---	0,399
Sinfony						---

Tab. 13: Varianzanalyse der **gesamten** Oberflächenenergie der Prüfkörper mit 0,4% Metalloxid-Zusatz und der Referenzmaterialien (Post-hoc-Test, Tukey-HSD; $\alpha \leq 0,05$).

Die einfaktorielle Varianzanalyse zeigte einen signifikanten Einfluss des Materials auf die **disperse** Oberflächenenergie (P=.001). Die anschließende Post-hoc-Analyse zeigte für den Werkstoff Cobaltchrom eine signifikant geringere **disperse** Oberflächenenergie als für die Werkstoffe *Palapress vario*[®] mit Zinkoxid (P=.011), mit Calciumoxid (P=.001), mit Titandioxid (P=.001) und *Palapress vario*[®] (P=.004).

	0,4% ZnO	0,4% CaO	0,4% TiO ₂	Palapress	CoCr	Sinfony
0,4% ZnO	---	0,737	0,811	0,987	0,011	0,933
0,4% CaO		---	1,000	0,970	0,001	0,264
0,4% TiO ₂			---	0,988	0,001	0,321
Palapress				---	0,004	0,644
CoCr					---	0,051
Sinfony						---

Tab. 14: Varianzanalyse der **dispersen** Oberflächenenergie der Prüfkörper mit 0,4% Metalloxid-Zusatz und der Referenzmaterialien (Post-hoc-Test, Tukey-HSD; $\alpha \leq 0,05$).

Die einfaktorielle Varianzanalyse zeigte einen signifikanten Einfluss des Materials auf die **polare** Oberflächenenergie ($P=0,11$). Die anschließende Post-hoc-Analyse zeigte für den Werkstoff Cobaltchrom eine signifikant höhere **polare** Oberflächenenergie als für die Werkstoffe *Palapress vario*[®] mit Zinkoxid ($P=0,29$), mit Calciumoxid ($P=0,18$), mit Titandioxid ($P=0,18$), *Palapress vario*[®] ($P=0,23$) und Sinfony ($P=0,24$).

	0,4% ZnO	0,4% CaO	0,4% TiO ₂	Palapress	CoCr	Sinfony
0,4% ZnO	---	1,000	1,000	1,000	0,029	1,000
0,4% CaO		---	1,000	1,000	0,018	1,000
0,4% TiO ₂			---	1,000	0,018	1,000
Palapress				---	0,023	1,000
CoCr					---	0,024
Sinfony						---

Tab. 15: Varianzanalyse der **polaren** Oberflächenenergie der Prüfkörper mit 0,4% Metalloxid-Zusatz und der Referenzmaterialien (Post-hoc-Test, Tukey-HSD; $\alpha \leq 0,05$).

4.1.2.4 Metalloxid-Konzentration 0,8%

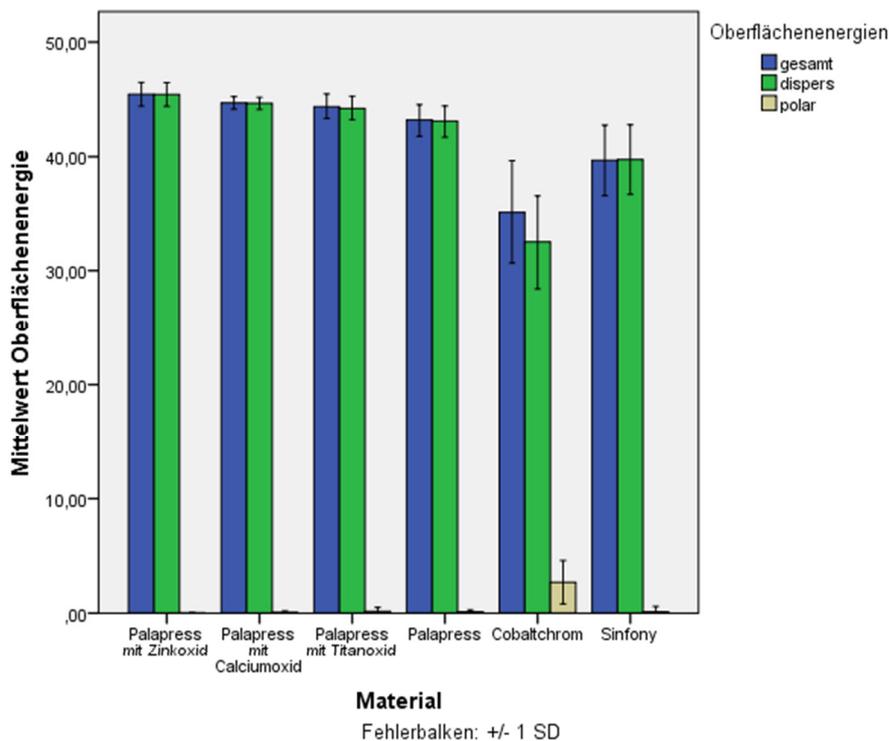


Abb. 21: Gesamte, disperse und polare Oberflächenenergie [mJ/m²] der *Palapress vario*[®]-Prüfkörper mit 0,8%-igem Metalloxid-Zusatz im Vergleich zu den Oberflächenenergien der Referenzmaterialien.

Die einfaktorielle Varianzanalyse zeigte einen signifikanten Einfluss des Materials auf die **gesamte** Oberflächenenergie (P=.001). Die anschließende Post-hoc-Analyse zeigte für den Werkstoff Cobaltchrom eine signifikant geringere **gesamte** Oberflächenenergie als für die Werkstoffe *Palapress vario*[®] mit Zinkoxid (P=.002), mit Calciumoxid (P=.004), mit Titandioxid (P=.005) und das Referenzmaterial *Palapress vario*[®] (P=.014).

	0,8% ZnO	0,8% CaO	0,8% TiO ₂	Palapress	CoCr	Sinfony
0,8% ZnO	---	0,999	0,993	0,836	0,002	0,093
0,8% CaO		---	1,000	0,961	0,004	0,169
0,8% TiO ₂			---	0,986	0,005	0,218
Palapress				---	0,014	0,500
CoCr					---	0,259
Sinfony						---

Tab. 16: Varianzanalyse der **gesamten** Oberflächenenergie der Prüfkörper mit 0,8% Metalloxid-Zusatz und der Referenzmaterialien (Post-hoc-Test, Tukey-HSD; $\alpha \leq 0,05$).

Die einfaktorielle Varianzanalyse zeigte einen signifikanten Einfluss des Materials auf die **disperse** Oberflächenenergie (P<.001). Die anschließende Post-hoc-Analyse zeigte für den Werkstoff Cobaltchrom eine signifikant geringere **disperse** Oberflächenenergie als für die Werkstoffe *Palapress vario*[®] mit Zinkoxid (P<.001), mit Calciumoxid (P<.001), mit Titandioxid (P<.001), *Palapress vario*[®] (P=.001) und Sinfony (P=.018).

	0,8% ZnO	0,8% CaO	0,8% TiO ₂	Palapress	CoCr	Sinfony
0,8% ZnO	---	0,998	0,983	0,778	0,000	0,073
0,8% CaO		---	1,000	0,944	0,000	0,144
0,8% TiO ₂			---	0,985	0,000	0,208
Palapress				---	0,001	0,486
CoCr					---	0,018
Sinfony						---

Tab. 17: Varianzanalyse der **dispersen** Oberflächenenergie der Prüfkörper mit 0,8% Metalloxid-Zusatz und der Referenzmaterialien (Post-hoc-Test, Tukey-HSD; $\alpha \leq 0,05$).

Die einfaktorielle Varianzanalyse zeigte einen signifikanten Einfluss des Materials auf die **polare** Oberflächenenergie ($P=0,10$). Die anschließende Post-hoc-Analyse zeigte für den Werkstoff Cobaltchrom eine signifikant höhere **polare** Oberflächenenergie als für die Werkstoffe *Palapress vario*[®] mit Zinkoxid ($P=0,16$), mit Calciumoxid ($P=0,18$), mit Titandioxid ($P=0,23$), *Palapress vario*[®] ($P=0,20$) und Sinfony ($P=0,21$).

	0,8% ZnO	0,8% CaO	0,8% TiO ₂	Palapress	CoCr	Sinfony
0,8% ZnO	---	1,000	1,000	1,000	0,016	1,000
0,8% CaO		---	1,000	1,000	0,018	1,000
0,8% TiO ₂			---	1,000	0,023	1,000
Palapress				---	0,020	1,000
CoCr					---	0,021
Sinfony						---

Tab. 18: Varianzanalyse der **polaren** Oberflächenenergie der Prüfkörper mit 0,8% Metalloxid-Zusatz und der Referenzmaterialien (Post-hoc-Test, Tukey-HSD; $\alpha \leq 0,05$).

4.2 Biofilmbildung auf Prothesenbasismaterial mit Zusatz von ZnO, CaO und TiO₂

4.2.1 Analyse der relativen Zellzahl (mittels MTT-Assays)

Für die Analyse der relativen Zellzahl wurde die gemessene optische Dichte als Maß für die Biofilmbildung verwendet. Es wurde eine univariante, zweifaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) angewandt; hierbei diente als Variable die optische Dichte, als Faktoren das jeweilige Material und die Inkubationszeit.

4.2.1.1 Untersuchungen der Monospezieskultur aus *Candida albicans*

4.2.1.1.1 Metalloid-Konzentration 0,1%

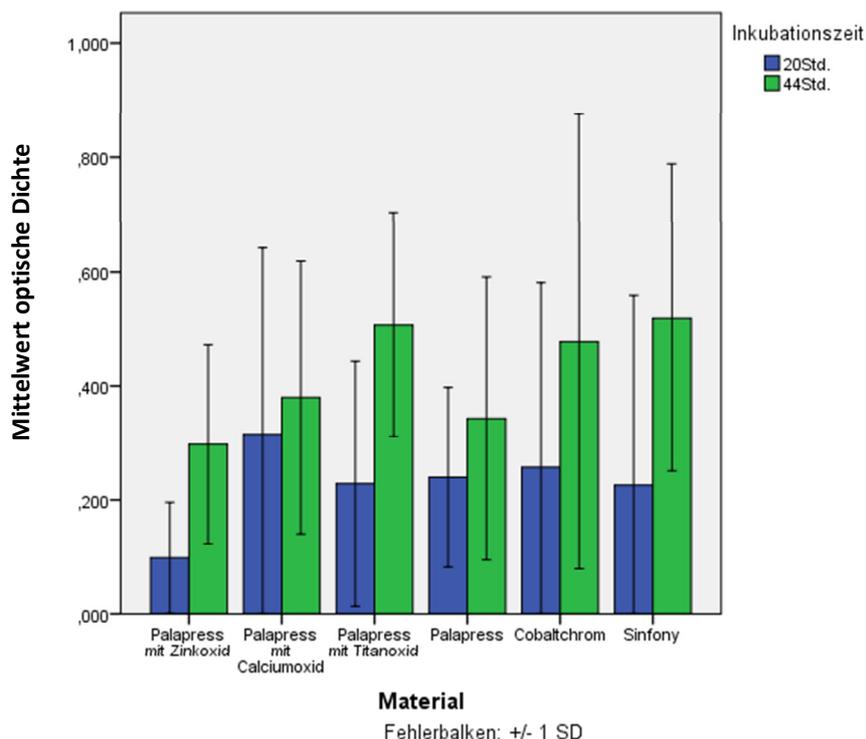


Abb. 22: *Candida albicans*-Biofilmbildung auf den Prüfkörpern mit 0,1%-igem Zusatz und den Referenzmaterialien.

Die zweifaktorielle Varianzanalyse zeigte das Vorliegen von signifikanten Unterschieden bezüglich der optischen Dichte an, die die relative Zellzahl viabler Mikroorganismen widerspiegelt ($P=0,010$); dabei zeigte sich ein signifikanter Einfluss der Inkubationszeit ($P<0,001$), wohingegen sich kein signifikanter

Einfluss des Materials zeigte ($P=.236$). Es wurden keine Interaktionseffekte zwischen Inkubationszeit und Material festgestellt ($P=.679$).

In diesem speziellen Fall wurde anschließend kein Post-hoc-Test durchgeführt, da die Inkubationszeit der signifikante Faktor ist und in der graphischen Darstellung eindeutig festgestellt wurde, dass bei der 44 Stunden-Inkubation eine höhere relative Zellzahl vorliegt als bei 20 Stunden-Inkubation.

4.2.1.1.2 Metalloxid-Konzentration 0,2%

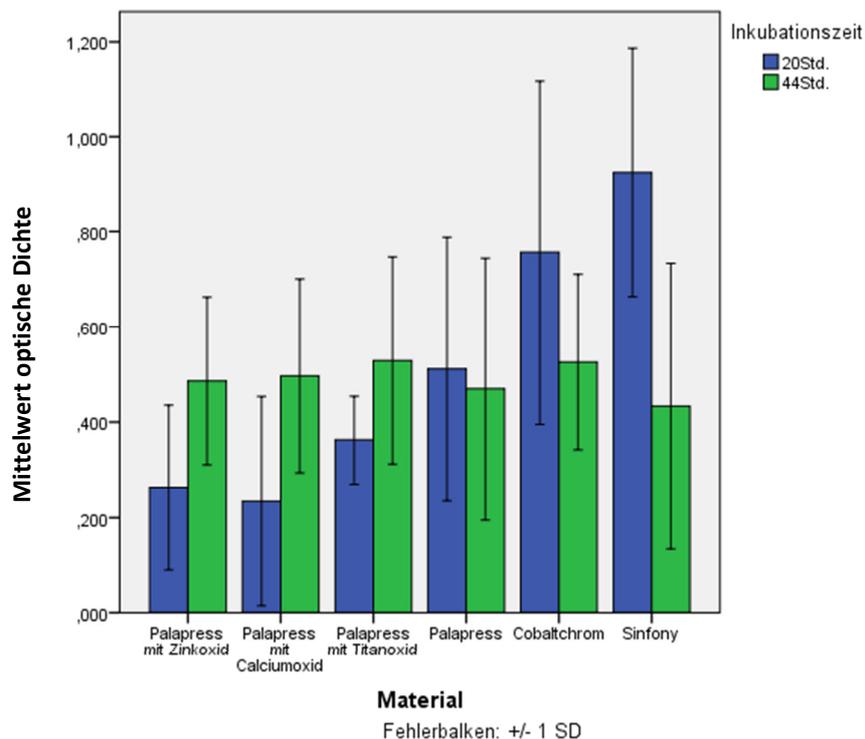


Abb. 23: *Candida albicans*-Biofilmbildung auf den Prüfkörpern mit 0,2%-igem Zusatz und den Referenzmaterialien.

	0,2% ZnO	0,2% CaO	0,2% TiO ₂	Palapress	CoCr	Sinfony
0,2% ZnO	---	1,000	0,935	0,637	0,008	0,001
0,2% CaO		---	0,897	0,560	0,005	0,001
0,2% TiO ₂			---	0,991	0,106	0,028
Palapress				---	0,352	0,132
CoCr					---	0,996
Sinfony						---

Tab. 19: Statistische Auswertung (Post-hoc-Test, Tukey-HSD; $\alpha \leq 0,05$).

Die zweifaktorielle Varianzanalyse zeigte das Vorliegen von signifikanten Unterschieden bezüglich der optischen Dichte an, die die relative Zellzahl viable Mikroorganismen widerspiegelt ($P<.001$); dabei zeigte sich ein signifikanter Einfluss des Materials ($P<.001$), wohingegen sich kein signifikanter

Einfluss der Inkubationszeit zeigte (P=.671). Es wurde außerdem Interaktionseffekte zwischen Material und Inkubationszeit festgestellt (P<.001).

Die anschließende Post-hoc-Analyse zeigte eine signifikant höhere relative Zellzahl auf dem Werkstoff Cobaltchrom als auf den Werkstoffen *Palapress® vario* mit Zinkoxid (P=.008) und mit Calciumoxid (P=.005). Desweiteren zeigte die Post-hoc-Analyse eine höhere relative Zellzahl auf dem Werkstoff Sinfony als auf den Werkstoffen *Palapress® vario* mit Zinkoxid (P=.001), mit Calciumoxid (P=.001) und mit Titandioxid (P=.028).

4.2.1.1.3 Metalloxid-Konzentration 0,4%

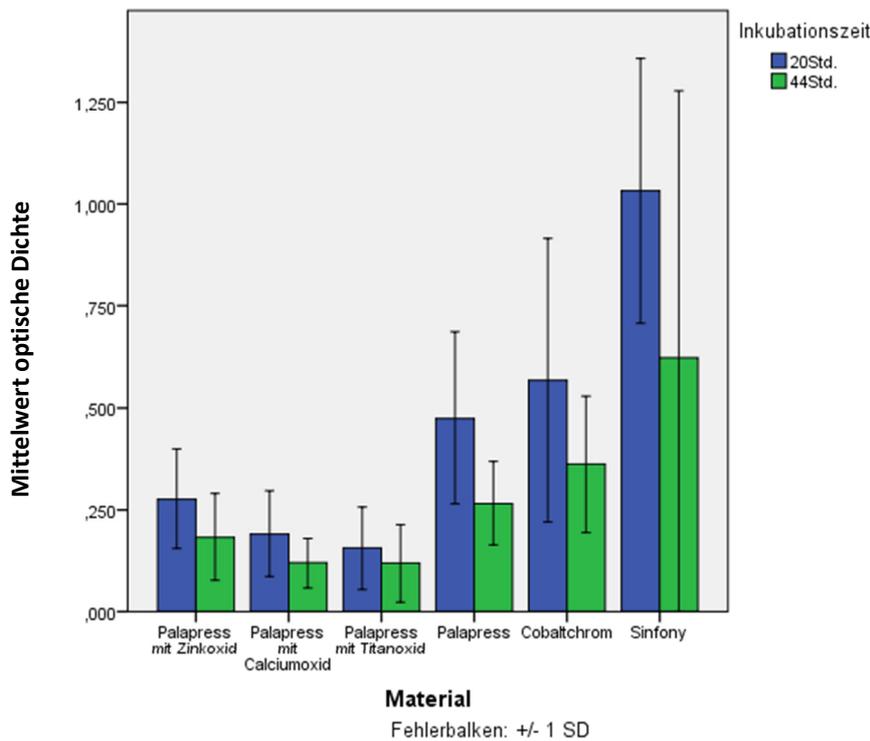


Abb. 24: *Candida albicans*-Biofilmbildung auf den Prüfkörpern mit 0,4%-igem Zusatz und den Referenzmaterialien.

	0,4% ZnO	0,4% CaO	0,4% TiO ₂	Palapress	CoCr	Sinfony
0,4% ZnO	---	0,942	0,865	0,522	0,053	0,000
0,4% CaO		---	1,000	0,98	0,003	0,000
0,4% TiO ₂			---	0,056	0,002	0,000
Palapress				---	0,856	0,000
CoCr					---	0,000
Sinfony						---

Tab. 20: Statistische Auswertung (Post-hoc-Test, Tukey-HSD; $\alpha \leq 0,05$).

Die zweifaktorielle Varianzanalyse zeigte das Vorliegen von signifikanten Unterschieden bezüglich der optischen Dichte an, die die relative Zellzahl viabler Mikroorganismen widerspiegelt (P<.001); dabei

zeigte sich sowohl ein signifikanter Einfluss der Inkubationszeit ($P < .001$) als auch ein signifikanter Einfluss des Materials ($P < .001$). Es wurden aber keine Interaktionseffekte zwischen Inkubationszeit und Material festgestellt ($P = .226$).

Die anschließende Post-hoc-Analyse zeigte eine signifikant höhere relative Zellzahl auf dem Werkstoff Sinfony als auf den Werkstoffen *Palapress® vario* mit Zinkoxid ($P < .001$), mit Calciumoxid ($P < .001$), mit Titandioxid ($P < .001$), *Palapress® vario* ($P < .001$) und Cobaltchrom ($P < .001$). Darüberhinaus zeigte die Post-hoc-Analyse eine signifikant höhere relative Zellzahl auf dem Werkstoff Cobaltchrom als auf den Werkstoffen *Palapress® vario* mit Calciumoxid ($P = .003$) und mit Titandioxid ($P = .002$).

4.2.1.1.4 Metalloxid-Konzentration 0,8%

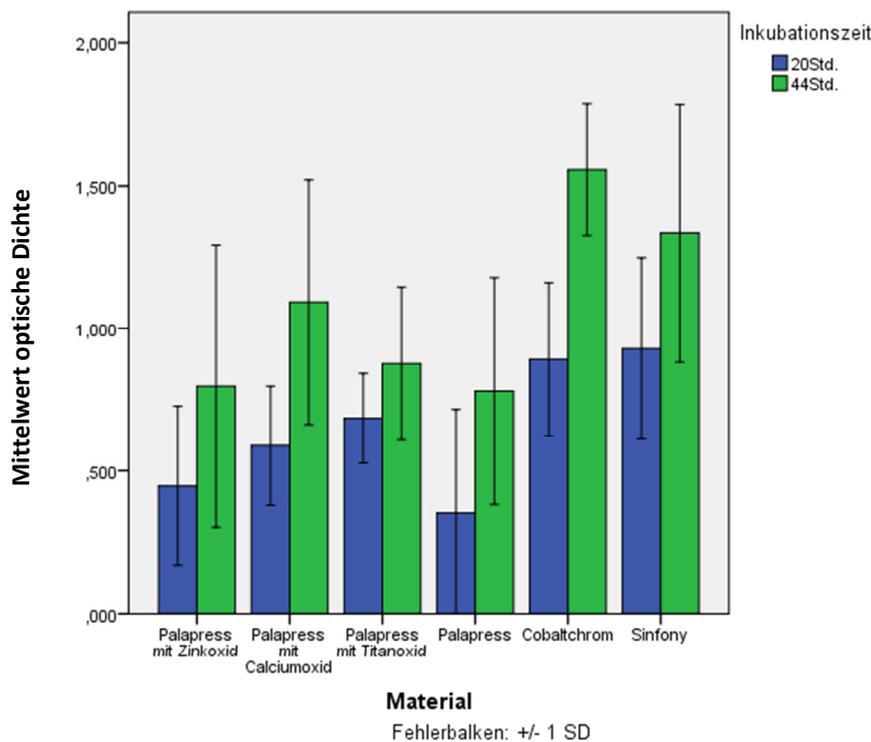


Abb. 25: *Candida albicans*-Biofilmbildung auf den Prüfkörpern mit 0,8%-igem Zusatz und den Referenzmaterialien.

	0,8% ZnO	0,8% CaO	0,8% TiO ₂	Palapress	CoCr	Sinfony
0,8% ZnO	---	0,325	0,675	0,995	0,000	0,000
0,8% CaO		---	0,993	0,115	0,006	0,078
0,8% TiO ₂			---	0,346	0,001	0,017
Palapress				---	0,000	0,000
CoCr					---	0,945
Sinfony						---

Tab. 21: Statistische Auswertung (Post-hoc-Test, Tukey-HSD; $\alpha \leq 0,05$).

Die zweifaktorielle Varianzanalyse zeigte das Vorliegen von signifikanten Unterschieden bezüglich der optischen Dichte an, die die relative Zellzahl viabler Mikroorganismen widerspiegelt ($P < .001$); dabei zeigte sich sowohl ein signifikanter Einfluss der Inkubationszeit ($P < .001$) als auch ein signifikanter Einfluss des Materials ($P < .001$). Es wurden aber keine Interaktionseffekte zwischen Inkubationszeit und Material festgestellt ($P = .369$).

Die anschließende Post-hoc-Analyse zeigte eine signifikant höhere relative Zellzahl auf dem Werkstoff Cobaltchrom als auf den Werkstoffen *Palapress® vario* mit Zinkoxid ($P < .001$), mit Calciumoxid ($P = .006$), mit Titandioxid ($P = .001$) und *Palapress® vario* ($P < .001$). Außerdem zeigte sich eine signifikant höhere relative Zellzahl auf dem Werkstoff Sinfony als auf den Werkstoffen *Palapress® vario* mit Zinkoxid ($P < .001$), mit Titandioxid ($P = .017$) und *Palapress® vario* ($P < .001$).

4.2.1.2 Untersuchungen der Multispezieskultur aus *Candida albicans*, *Actinomyces naeslundii* T14V und *Streptococcus gordonii* DL1

4.2.1.2.1 Metalloxyd-Konzentration 0,1%

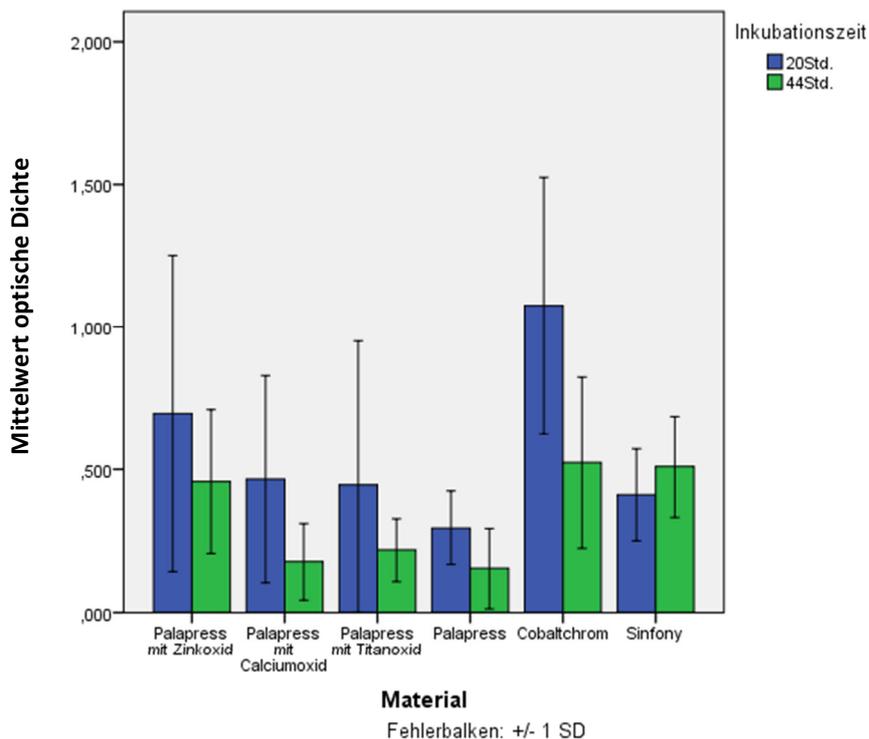


Abb. 26: Multispezies-Biofilmbildung auf den Prüfkörpern mit 0,1%-igem Zusatz und den Referenzmaterialien.

	0,1% ZnO	0,1% CaO	0,1% TiO ₂	Palapress	CoCr	Sinfony
0,1% ZnO	---	0,111	0,141	0,007	0,224	0,848
0,1% CaO		---	1,000	0,924	0,000	0,723
0,1% TiO ₂			---	0,887	0,000	0,784
Palapress				---	0,000	0,171
CoCr					---	0,011
Sinfony						---

Tab. 22: Statistische Auswertung (Post-hoc-Test, Tukey-HSD; $\alpha \leq 0,05$).

Die zweifaktorielle Varianzanalyse zeigte das Vorliegen von signifikanten Unterschieden bezüglich der optischen Dichte an, die die relative Zellzahl viabler Mikroorganismen widerspiegelt ($P < 0,001$); dabei zeigte sich sowohl ein signifikanter Einfluss der Inkubationszeit ($P < 0,001$) als auch ein signifikanter Einfluss des Materials ($P < 0,001$). Es wurden aber keine Interaktionseffekte zwischen Inkubationszeit und Material festgestellt ($P = 0,052$).

Die anschließende Post-hoc-Analyse zeigte eine signifikant höhere relative Zellzahl auf dem Werkstoff Cobaltchrom als auf den Werkstoffen *Palapress*[®] *vario* mit Calciumoxid ($P < 0,001$), mit Titandioxid ($P < 0,001$), *Palapress*[®] *vario* ($P < 0,001$) und Sinfony ($P = 0,011$). Darüberhinaus zeigte sich eine signifikant höhere relative Zellzahl auf dem Werkstoff *Palapress*[®] *vario* mit Zinkoxid als auf dem Werkstoff *Palapress*[®] *vario* ($P = 0,007$).

4.2.1.2.2 Metalloxid-Konzentration 0,2%

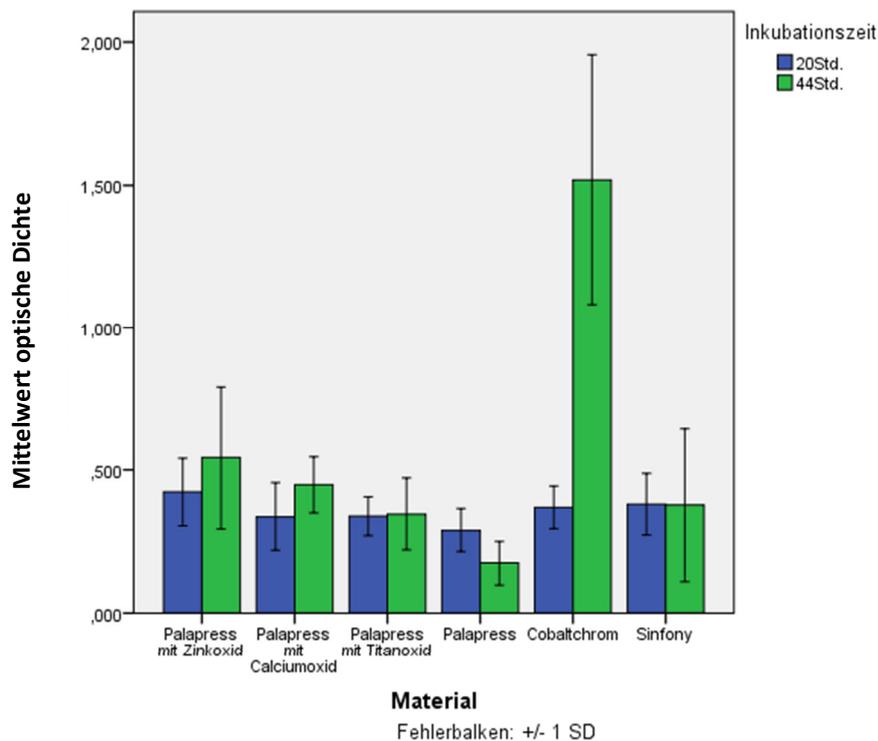


Abb. 27: Multispezies-Biofilmbildung auf den Prüfkörpern mit 0,2%-igem Zusatz und den Referenzmaterialien.

	0,2% ZnO	0,2% CaO	0,2% TiO ₂	Palapress	CoCr	Sinfony
0,2% ZnO	---	0,632	0,163	0,001	0,000	0,486
0,2% CaO		---	0,956	0,075	0,000	1,000
0,2% TiO ₂			---	0,416	0,000	0,989
Palapress				---	0,000	0,128
CoCr					---	0,000
Sinfony						---

Tab. 23: Statistische Auswertung (Post-hoc-Test, Tukey-HSD; $\alpha \leq 0,05$).

Die zweifaktorielle Varianzanalyse zeigte das Vorliegen von signifikanten Unterschieden bezüglich der optischen Dichte an, die die relative Zellzahl viabler Mikroorganismen widerspiegelt ($P < .001$); dabei zeigte sich sowohl ein signifikanter Einfluss der Inkubationszeit ($P < .001$) als auch ein signifikanter Einfluss des Materials ($P < .001$). Außerdem wurden signifikante Interaktionseffekte zwischen Inkubationszeit und Material festgestellt ($P < .001$).

Die anschließende Post-hoc-Analyse zeigte eine signifikant höhere relative Zellzahl auf dem Werkstoff Cobaltchrom als auf den Werkstoffen *Palapress*[®] vario mit Zinkoxid ($P < .001$), mit Calciumoxid ($P < .001$), mit Titandioxid ($P < .001$), *Palapress*[®] vario ($P < .001$) und Sinfony ($P < .001$). Weiterhin zeigte sich eine signifikant höhere relative Zellzahl auf dem Werkstoff *Palapress*[®] vario mit Zinkoxid als auf dem Werkstoff *Palapress*[®] vario ($P = .001$).

4.2.1.2.3 Metalloxid-Konzentration 0,4%

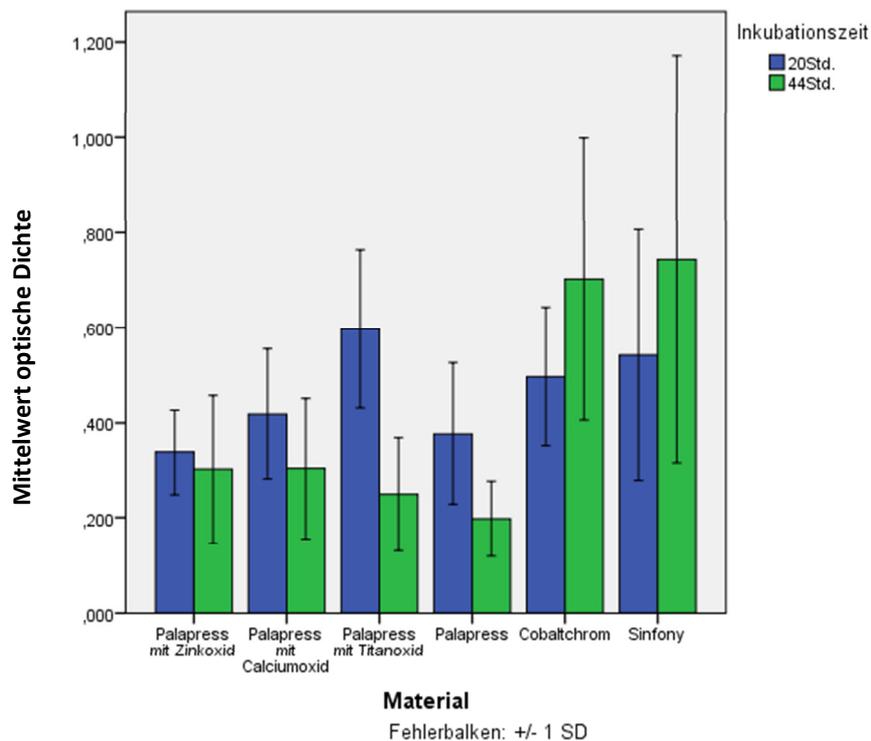


Abb. 28: Multispezies-Biofilmbildung auf den Prüfkörpern mit 0,4%-igem Zusatz und den Referenzmaterialien.

	0,4% ZnO	0,4% CaO	0,4% TiO ₂	Palapress	CoCr	Sinfony
0,4% ZnO	---	0,988	0,601	0,996	0,001	0,000
0,4% CaO		---	0,928	0,868	0,005	0,000
0,4% TiO ₂			---	0,298	0,081	0,013
Palapress				---	0,000	0,000
CoCr					---	0,985
Sinfony						---

Tab. 24: Statistische Auswertung (Post-hoc-Test, Tukey-HSD; $\alpha \leq 0,05$).

Die zweifaktorielle Varianzanalyse zeigte das Vorliegen von signifikanten Unterschieden bezüglich der optischen Dichte an, die die relative Zellzahl viabler Mikroorganismen widerspiegelt ($P < 0,001$); dabei zeigte sich ein signifikanter Einfluss des Materials ($P < 0,001$), wohingegen sich kein signifikanter Einfluss der Inkubationszeit zeigte ($P = 0,228$). Es wurden signifikante Interaktionseffekte zwischen der Inkubationszeit und dem Material festgestellt ($P < 0,001$).

Die anschließende Post-hoc-Analyse zeigte eine signifikant höhere relative Zellzahl auf dem Werkstoff Cobaltchrom als auf den Werkstoffen *Palapress*[®] vario mit Zinkoxid ($P = 0,001$), mit Calciumoxid ($P = 0,005$) und *Palapress*[®] vario ($P < 0,001$). Zusätzlich zeigte sie eine signifikant höhere relative Zellzahl auf dem Werkstoff Sinfony als auf den Werkstoffen *Palapress*[®] vario mit Zinkoxid ($P < 0,001$), mit Calciumoxid ($P < 0,001$), mit Titandioxid ($P = 0,013$) und *Palapress*[®] vario ($P < 0,001$).

4.2.1.2.4 Metalloid-Konzentration 0,8%

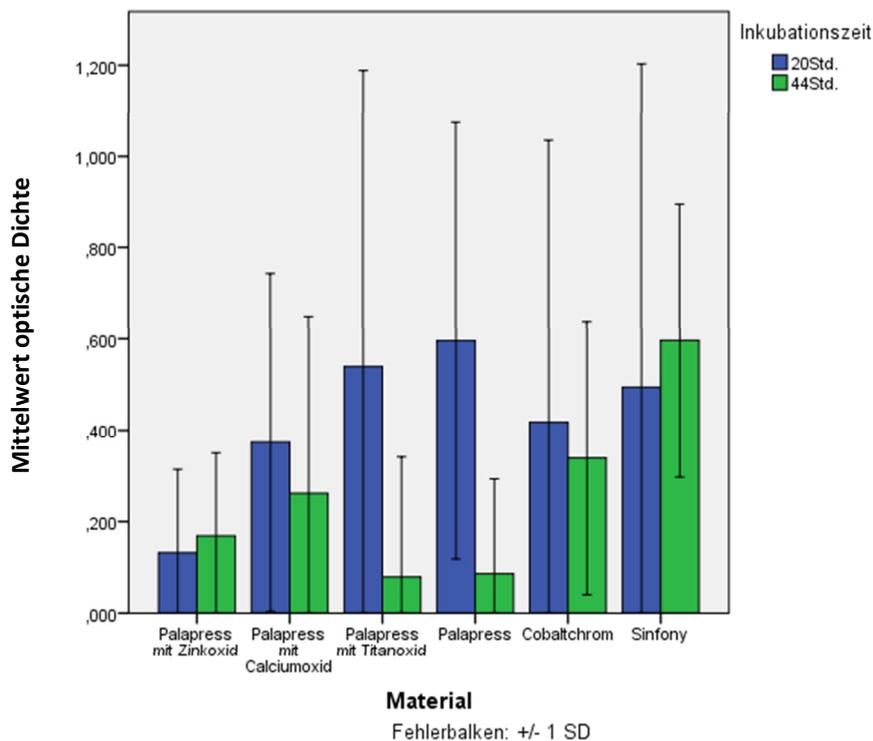


Abb. 29: Multispezies-Biofilmbildung auf den Prüfkörpern mit 0,8%-igem Zusatz und den Referenzmaterialien.

Die zweifaktorielle Varianzanalyse zeigte das Vorliegen von signifikanten Unterschieden bezüglich der optischen Dichte an, die die relative Zellzahl viable Mikroorganismen widerspiegelt ($P=0.028$); dabei zeigte sich ein signifikanter Einfluss der Inkubationszeit ($P=0.031$), wohingegen sich kein signifikanter Einfluss des Materials zeigte ($P=0.121$). Es wurden keine Interaktionseffekte zwischen Inkubationszeit und Material festgestellt ($P=0.115$).

In diesem speziellen Fall wurde anschließend kein Post-hoc-Test durchgeführt, da die Inkubationszeit der signifikante Faktor ist und in der graphischen Darstellung eindeutig festgestellt wurde, dass bei der 20 Stunden-Inkubation eine höhere relative Zellzahl vorliegt als bei der 44 Stunden-Inkubation (ähnlich Kap. 4.2.1.1.1).

4.2.2 Fluoreszenzmikroskopische Analyse

Für die fluoreszenzmikroskopische Analyse wurde die gemessene grüne Fluoreszenz der Lebendzellen in Flächenprozent als Maß für die Biofilmbildung verwendet. Es wurde eine univariante, zweifaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) angewandt; hierbei diente der Mittelwert der Flächenprozentwerte als Variable, als Faktoren das jeweilige Material und die Inkubationszeit.

4.2.2.1 Untersuchungen der Monospezieskultur aus *Candida albicans*

4.2.2.1.1 Metalloid-Konzentration 0,1%

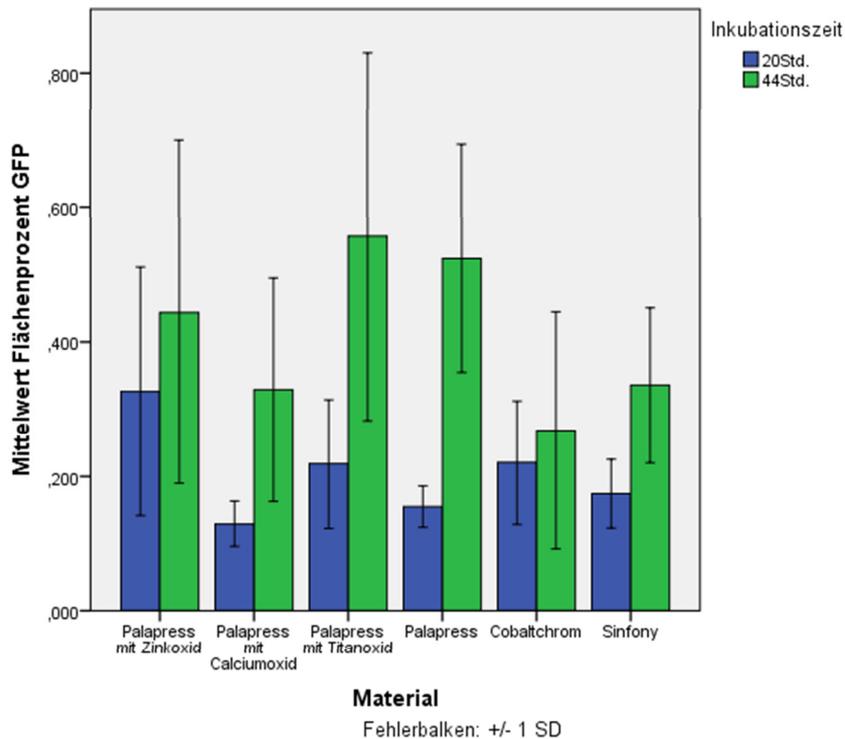


Abb. 30: *Candida albicans*-Biofilmbildung auf den Prüfkörpern mit 0,1%-igem Zusatz und den Referenzmaterialien, angegeben als fluoreszenzmikroskopischer Flächenprozent-Mittelwert (GFP-Darstellung der lebenden Zellen).

	0,1% ZnO	0,1% CaO	0,1% TiO ₂	Palapress	CoCr	Sinfony
0,1% ZnO	---	0,002	1,000	0,867	0,009	0,020
0,1% CaO		---	0,002	0,077	0,999	0,988
0,1% TiO ₂			---	0,845	0,007	0,017
Palapress				---	0,185	0,305
CoCr					---	1,000
Sinfony						---

Tab. 25: Statistische Auswertung (Post-hoc-Test, Tukey-HSD; $\alpha \leq 0,05$).

Die zweifaktorielle Varianzanalyse zeigte das Vorliegen von signifikanten Unterschieden bezüglich der Biofilmbildung auf den verschiedenen Prothesenmaterialien an ($P < .001$); dabei zeigte sich sowohl ein signifikanter Einfluss des Materials ($P < .001$) als auch ein signifikanter Einfluss der Inkubationszeit ($P < .001$). Des Weiteren wurden signifikante Interaktionseffekte zwischen der Inkubationszeit und dem Material festgestellt ($P < .001$).

Die anschließende Post-hoc-Analyse zeigte eine signifikant höhere Flächenprozentzahl für Biofilme auf dem Werkstoff *Palapress® vario* mit Zinkoxid als für Biofilme auf den Werkstoffen *Palapress® vario* mit Calciumoxid (P=.002), Cobaltchrom (P=.009) und Sinfony (P=.020). Zusätzlich zeigte sie eine signifikant höhere Flächenprozentzahl für Biofilme auf dem Werkstoff *Palapress® vario* mit Titandioxid als für Biofilme auf den Werkstoffen *Palapress® vario* mit Calciumoxid (P=.002), Cobaltchrom (P=.007) und Sinfony (P=.017).

4.2.2.1.2 Metalloxid-Konzentration 0,2%

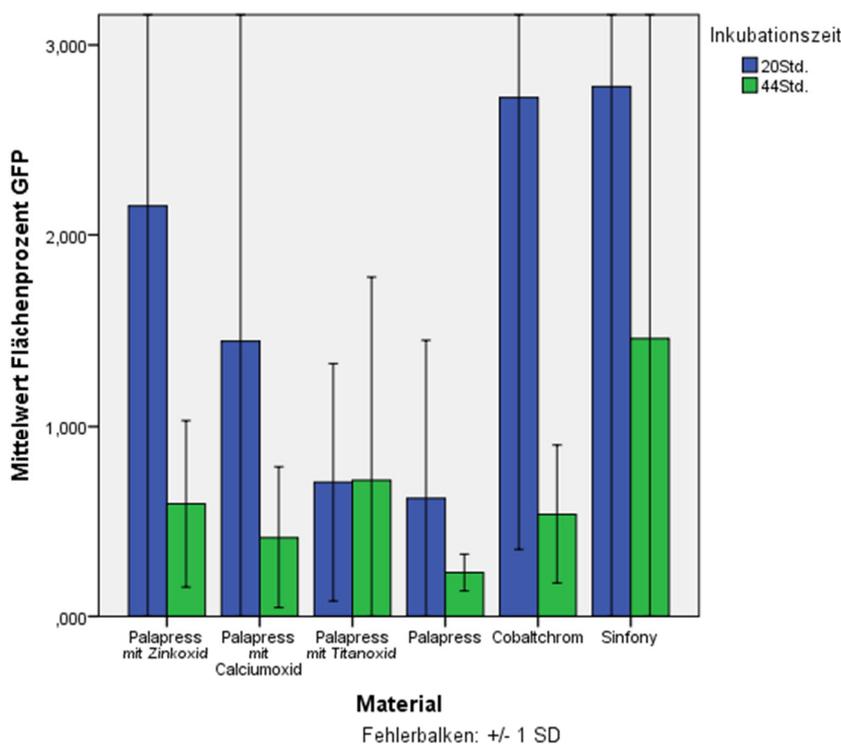


Abb. 31: *Candida albicans*-Biofilmbildung auf den Prüfkörpern mit 0,2%-igem Zusatz und den Referenzmaterialien, angegeben als fluoreszenzmikroskopischer Flächenprozent-Mittelwert.

	0,2% ZnO	0,2% CaO	0,2% TiO ₂	Palapress	CoCr	Sinfony
0,2% ZnO	---	0,904	0,628	0,232	0,991	0,500
0,2% CaO		---	0,995	0,844	0,572	0,064
0,2% TiO ₂			---	0,985	0,263	0,014
Palapress				---	0,058	0,001
CoCr					---	0,860
Sinfony						---

Tab. 26: Statistische Auswertung (Post-hoc-Test, Tukey-HSD; $\alpha \leq 0,05$).

Die zweifaktorielle Varianzanalyse zeigte das Vorliegen von signifikanten Unterschieden bezüglich der Biofilmbildung auf den verschiedenen Prothesenmaterialien an (P<.001); dabei zeigte sich ein

signifikanter Einfluss des Materials ($P=0.001$) und der Inkubationszeit ($P<0.001$). Es wurden keine Interaktionseffekte zwischen Inkubationszeit und Material festgestellt ($P=0.126$).

Die anschließende Post-hoc-Analyse zeigte eine signifikant höhere Flächenprozentzahl für Biofilme auf dem Werkstoff Sinfony als für Biofilme auf den Werkstoffen *Palapress® vario* mit Titandioxid ($P=0.014$) und *Palapress® vario* ($P=0.001$).

4.2.2.1.3 Metalloxid-Konzentration 0,4%

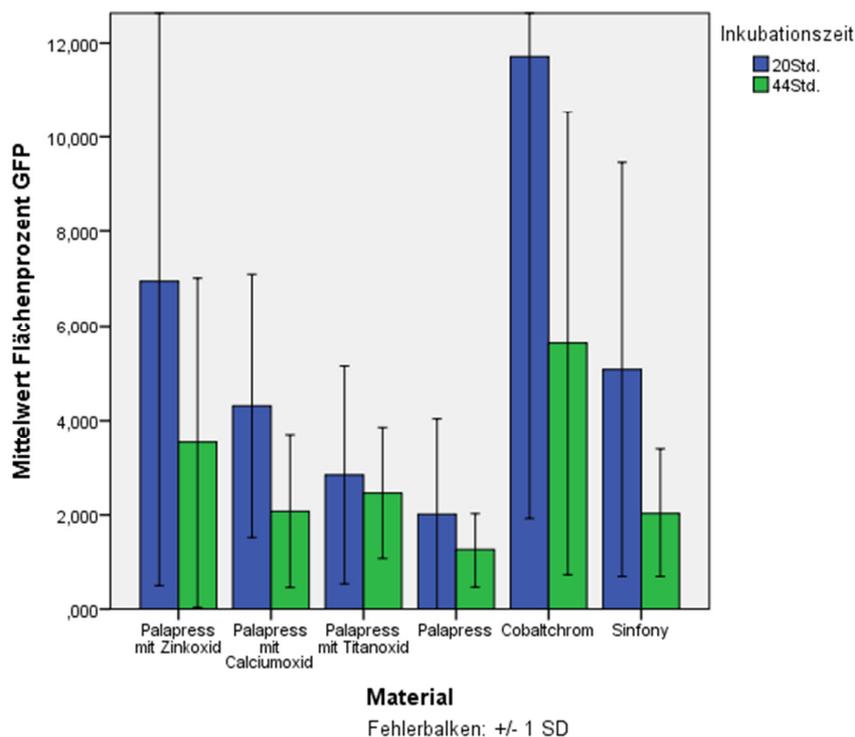


Abb. 32: *Candida albicans*-Biofilmbildung auf den Prüfkörpern mit 0,4%-igem Zusatz und den Referenzmaterialien, angegeben als fluoreszenzmikroskopischer Flächenprozent-Mittelwert.

	0,4% ZnO	0,4% CaO	0,4% TiO ₂	Palapress	CoCr	Sinfony
0,4% ZnO	---	0,432	0,178	0,016	0,025	0,644
0,4% CaO		---	0,996	0,712	0,000	1,000
0,4% TiO ₂			---	0,940	0,000	0,963
Palapress				---	0,000	0,501
CoCr					---	0,000
Sinfony						---

Tab. 27: Statistische Auswertung (Post-hoc-Test, Tukey-HSD; $\alpha \leq 0,05$).

Die zweifaktorielle Varianzanalyse zeigte das Vorliegen von signifikanten Unterschieden bezüglich der Biofilmbildung auf den verschiedenen Prothesenmaterialien an ($P<0.001$); dabei zeigte sich ein

signifikanter Einfluss des Materials ($P < .001$) sowie der Inkubationszeit ($P < .001$). Es wurden keine Interaktionseffekte zwischen Inkubationszeit und Material festgestellt ($P = .120$).

Die anschließende Post-hoc-Analyse zeigte eine signifikant höhere Flächenprozentzahl für Biofilme auf dem Werkstoff Cobaltchrom als für Biofilme auf den Werkstoffen *Palapress® vario* mit Zinkoxid ($P = .025$), mit Calciumoxid ($P < .001$), mit Titandioxid ($P < .001$), *Palapress® vario* ($P < .001$) und Sinfony ($P < .001$). Zusätzlich zeigte sich eine signifikant höhere Flächenprozentzahl für Biofilme auf dem Werkstoff *Palapress® vario* mit Zinkoxid als für Biofilme auf dem Werkstoff *Palapress® vario* ($P = .016$).

4.2.2.1.4 Metalloid-Konzentration 0,8%

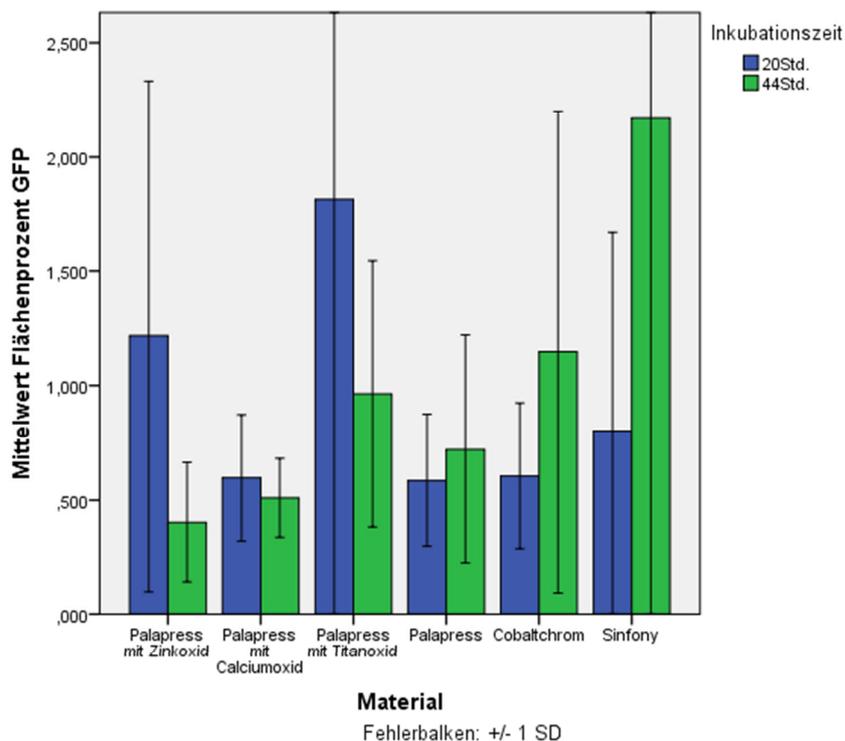


Abb. 33: *Candida albicans*-Biofilmbildung auf den Prüfkörpern mit 0,8%-igem Zusatz und den Referenzmaterialien, angegeben als fluoreszenzmikroskopischer Flächenprozent-Mittelwert.

Die zweifaktorielle Varianzanalyse zeigte keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Biofilmbildung auf den verschiedenen Prothesenmaterialien an ($P = .439$); weder das Material ($P = .410$) noch die Inkubationszeit ($P = .877$) zeigten signifikanten Einfluss oder wiesen Interaktionseffekte auf ($P = .310$). Es folgte keine Post-hoc-Analyse.

4.2.2.2 Untersuchungen der Multispezieskultur aus *Candida albicans*, *Actinomyces naeslundii* T14V und *Streptococcus gordonii* DL1

4.2.2.2.1 Metalloxid-Konzentration 0,1%

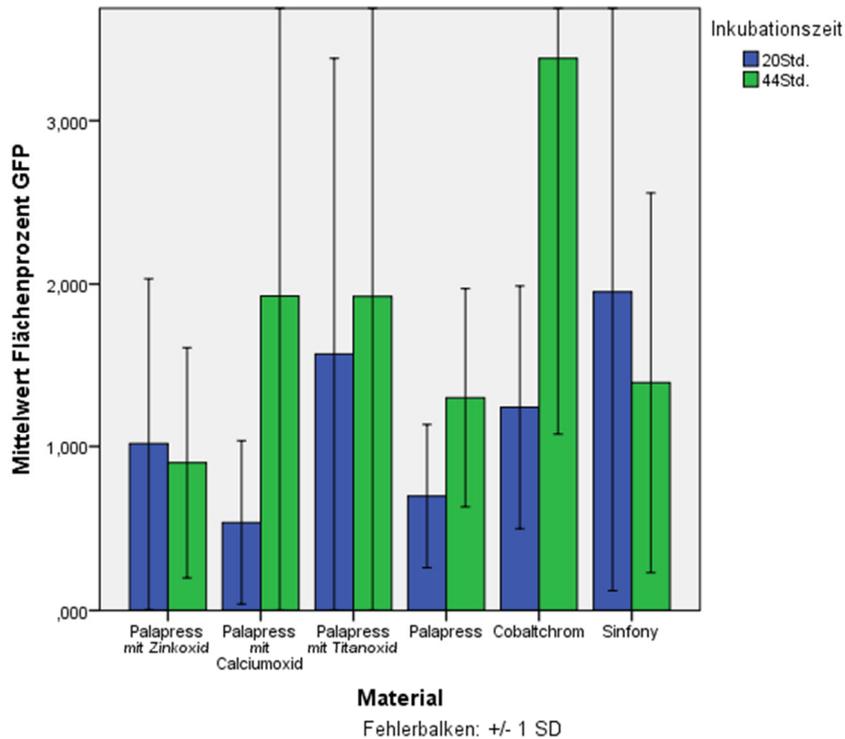


Abb. 34: Multispezies-Biofilmbildung auf den Prüfkörpern mit 0,1%-igem Zusatz und den Referenzmaterialien, angegeben als fluoreszenzmikroskopischer Flächenprozent-Mittelwert.

	0,1% ZnO	0,1% CaO	0,1% TiO ₂	Palapress	CoCr	Sinfony
0,1% ZnO	---	0,985	0,386	1,000	0,014	0,499
0,1% CaO		---	0,804	0,993	0,090	0,887
0,1% TiO ₂			---	0,447	0,733	1,000
Palapress				---	0,019	0,565
CoCr					---	0,618
Sinfony						---

Tab. 28: Statistische Auswertung (Post-hoc-Test, Tukey-HSD; $\alpha \leq 0,05$).

Die zweifaktorielle Varianzanalyse zeigte das Vorliegen von signifikanten Unterschieden bezüglich der Biofilmbildung auf den verschiedenen Prothesenmaterialien an ($P < .001$); dabei zeigte sich sowohl ein signifikanter Einfluss des Materials ($P = .007$) als auch ein signifikanter Einfluss der Inkubationszeit ($P = .008$). Es wurden signifikante Interaktionseffekte zwischen Inkubationszeit und Material festgestellt ($P = .014$).

Die anschließende Post-hoc-Analyse zeigte eine signifikant höhere Flächenprozentzahl für Biofilme auf dem Werkstoff Cobaltchrom als für Biofilme auf den Werkstoffen *Palapress® vario* mit Zinkoxid (P=.014) und *Palapress® vario* (P=.019).

4.2.2.2.2 Metalloid-Konzentration 0,2%

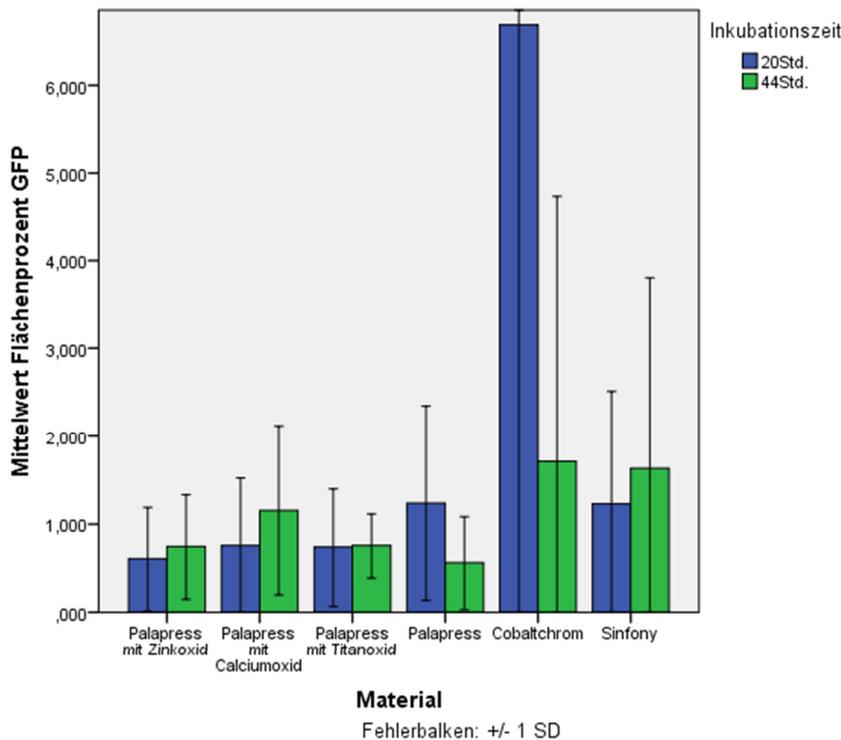


Abb. 35: Multispezies-Biofilmbildung auf den Prüfkörpern mit 0,2%-igem Zusatz und den Referenzmaterialien, angegeben als fluoreszenzmikroskopischer Flächenprozent-Mittelwert.

	0,2% ZnO	0,2% CaO	0,2% TiO ₂	Palapress	CoCr	Sinfony
0,2% ZnO	---	1,000	1,000	1,000	0,003	0,965
0,2% CaO		---	1,000	1,000	0,009	0,996
0,2% TiO ₂			---	1,000	0,004	0,977
Palapress				---	0,007	0,993
CoCr					---	0,042
Sinfony						---

Tab. 29: Statistische Auswertung (Post-hoc-Test, Tukey-HSD; $\alpha \leq 0,05$).

Die zweifaktorielle Varianzanalyse zeigte das Vorliegen von signifikanten Unterschieden bezüglich der Biofilmbildung auf den verschiedenen Prothesenmaterialien an (P=.001); dabei zeigte das Material signifikanten Einfluss (P=.001), wohingegen die Inkubationszeit keinen signifikanten Einfluss zeigte (P=.152). Es wurden signifikante Interaktionseffekte zwischen Inkubationszeit und Material festgestellt (P=.034).

Die anschließende Post-hoc-Analyse zeigte eine signifikant höhere Flächenprozentzahl für Biofilme auf dem Werkstoff Cobaltchrom als für Biofilme auf den Werkstoffen *Palapress® vario* mit Zinkoxid (P=.003), mit Calciumoxid (P=.009), mit Titandioxid (P=.004), *Palapress® vario* (P=.007) und Sinfony (P=.042).

4.2.2.2.3 Metalloxyd-Konzentration 0,4%

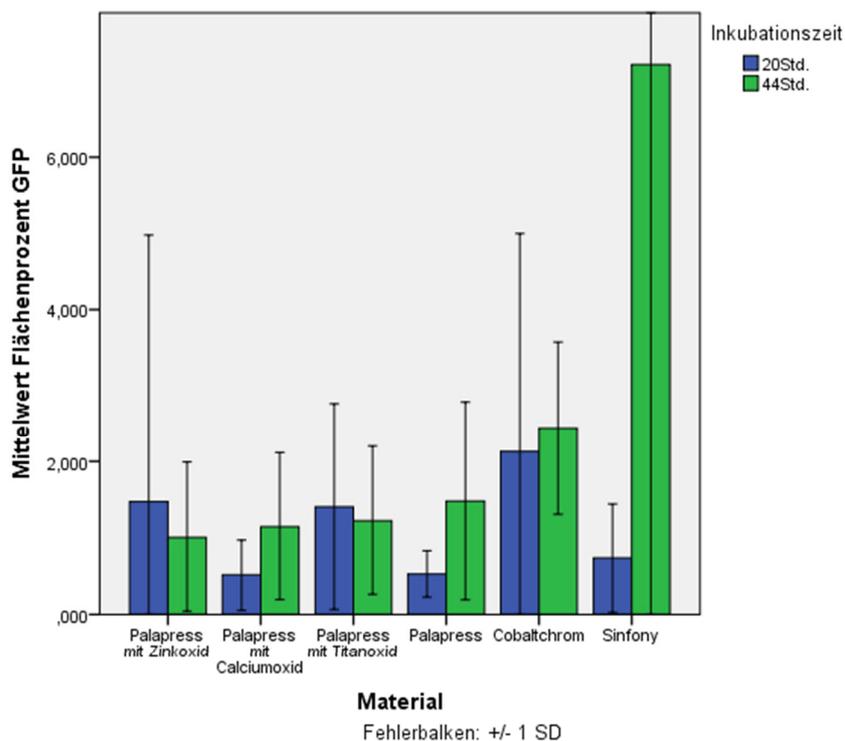


Abb. 36: Multispezies-Biofilmbildung auf den Prüfkörpern mit 0,4%-igem Zusatz und den Referenzmaterialien, angegeben als fluoreszenzmikroskopischer Flächenprozent-Mittelwert.

Die zweifaktorielle Varianzanalyse zeigte das Vorliegen von signifikanten Unterschieden bezüglich der Biofilmbildung auf den verschiedenen Prothesenmaterialien an (P=.008); dabei zeigte weder das Material (P=.070) noch die Inkubationszeit signifikanten Einfluss (P=.057). Es wurden lediglich signifikante Interaktionseffekte zwischen Material und Inkubationszeit festgestellt (P=.034). Es folgte keine Post-hoc-Analyse.

4.2.2.2.4 Metalloid-Konzentration 0,8%

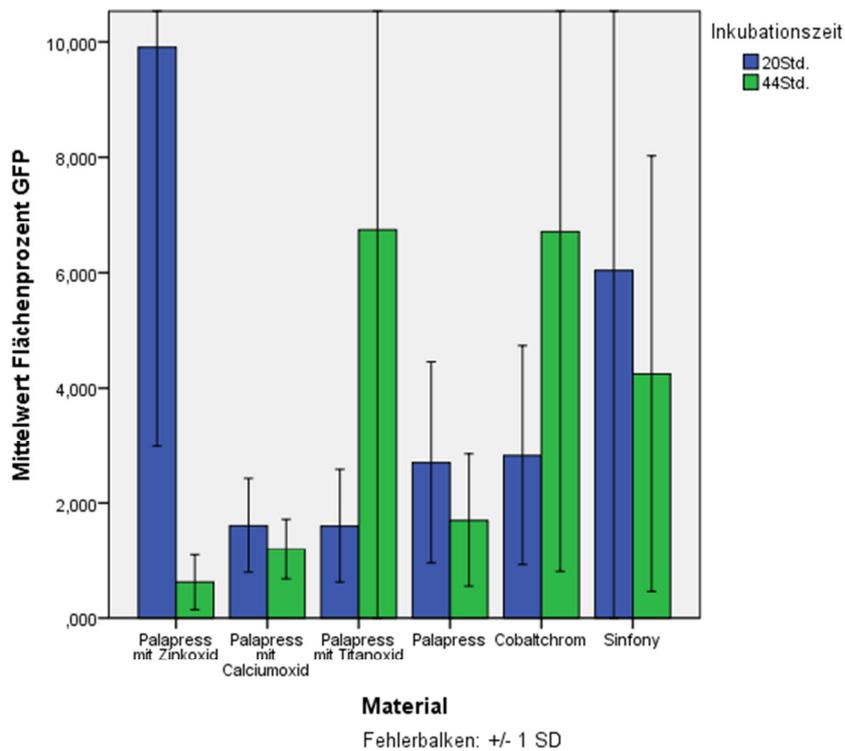


Abb. 37: Multispezies-Biofilmbildung auf den Prüfkörpern mit 0,8%-igem Zusatz und den Referenzmaterialien, angegeben als fluoreszenzmikroskopischer Flächenprozent-Mittelwert.

	0,8% ZnO	0,8% CaO	0,8% TiO ₂	Palapress	CoCr	Sinfony
0,8% ZnO	---	0,020	0,944	0,120	0,998	1,000
0,8% CaO		---	0,204	0,986	0,065	0,027
0,8% TiO ₂			---	0,580	0,996	0,966
Palapress				---	0,280	0,150
CoCr					---	1,000
Sinfony						---

Tab. 30: Statistische Auswertung (Post-hoc-Test, Tukey-HSD; $\alpha \leq 0,05$).

Die zweifaktorielle Varianzanalyse zeigte das Vorliegen von signifikanten Unterschieden bezüglich der Biofilmbildung auf den verschiedenen Prothesenmaterialien an ($P < .001$); dabei zeigte sich ein signifikanter Einfluss des Materials ($P = .004$), wohingegen sich kein signifikanter Einfluss der Inkubationszeit zeigte ($P = .406$). Es wurden signifikante Interaktionseffekte zwischen Inkubationszeit und Material festgestellt ($P < .001$).

Die anschließende Post-hoc-Analyse zeigte eine signifikant höhere Flächenprozentzahl für Biofilme auf den Werkstoffen *Palapress*[®] vario mit Zinkoxid ($P = .020$) und Sinfony ($P = .027$) als für Biofilme auf dem Werkstoff *Palapress*[®] vario mit Calciumoxid.

4.2.2.3 Fluoreszenzmikroskopische Bilder

Die Bilder der fluoreszenzmikroskopischen Analyse wurden nicht nur zur quantitativen Auswertung genutzt, sondern auch zur qualitativen Beurteilung der Morphologie, Größe und Anordnung der Mikroorganismen. Im Folgenden sind beispielhaft mehrere Fluoreszenzmikroskopaufnahmen abgebildet. Diese zeigen die charakteristische Zellordnung aus *Candida albicans*-Sporen und -Hyphen.

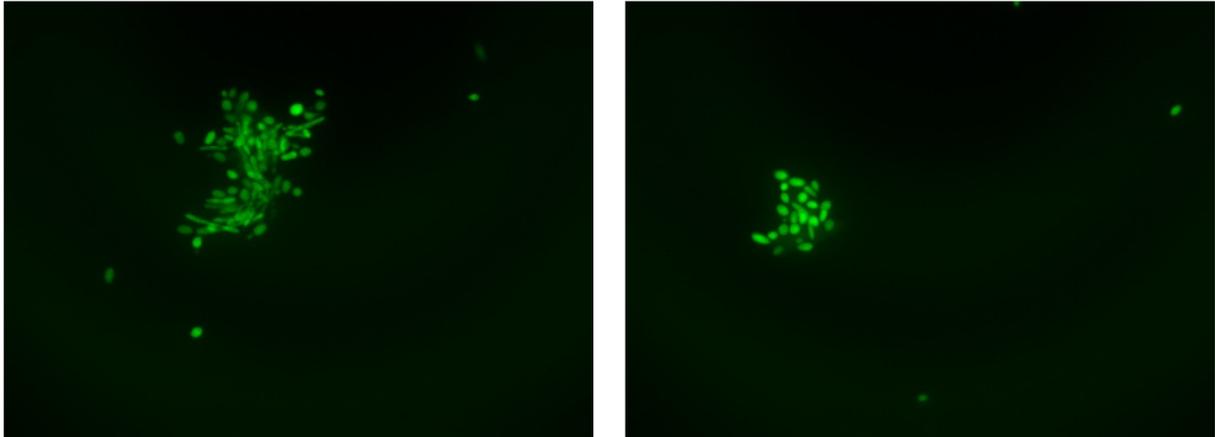


Abb. 38.: links – Monospezies-Biofilmbildung nach 20 Stunden Inkubation auf Sinfony-Prüfkörpern; rechts – Monospezies-Biofilmbildung nach 44 Stunden auf Cobaltchrom-Prüfkörpern. Aufgrund der selektiven Färbung des *FUN[®]1 Cell Stain*-Farbstoffs handelt es sich bei den dargestellten Mikroorganismen stets um *Candida albicans*.

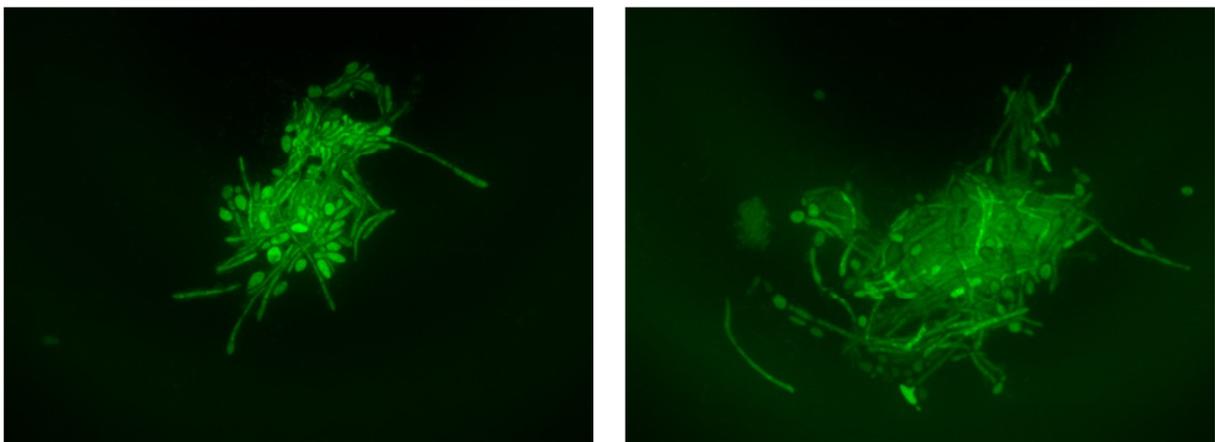


Abb. 39: links – Multispezies-Biofilmbildung nach 20 Stunden Inkubation auf Cobaltchrom-Prüfkörpern; rechts – Multispezies-Biofilmbildung nach 44 Stunden Inkubation auf Cobaltchrom-Prüfkörpern. Aufgrund der selektiven Färbung des *FUN[®]1 Cell Stain*-Farbstoffs handelt es sich bei den dargestellten Mikroorganismen stets um *Candida albicans*.

4.2.3 Rasterelektronenmikroskopische Analyse

Anhand der rasterelektronenmikroskopischen Bilder wurde die Morphologie, Größe und Anordnung der verschiedenen Mikroorganismen dargestellt. Die Aufnahmen haben lediglich qualitative Aussagekraft und lassen keinen Rückschluss auf die genaue Quantität einzelner Mikroorganismen zu. Im Folgenden wurden zur Veranschaulichung exemplarisch rasterelektronenmikroskopische Bilder ausgewählt.

4.2.3.1 Morphologische Darstellung des Monospeziesbiofilms aus *Candida albicans*

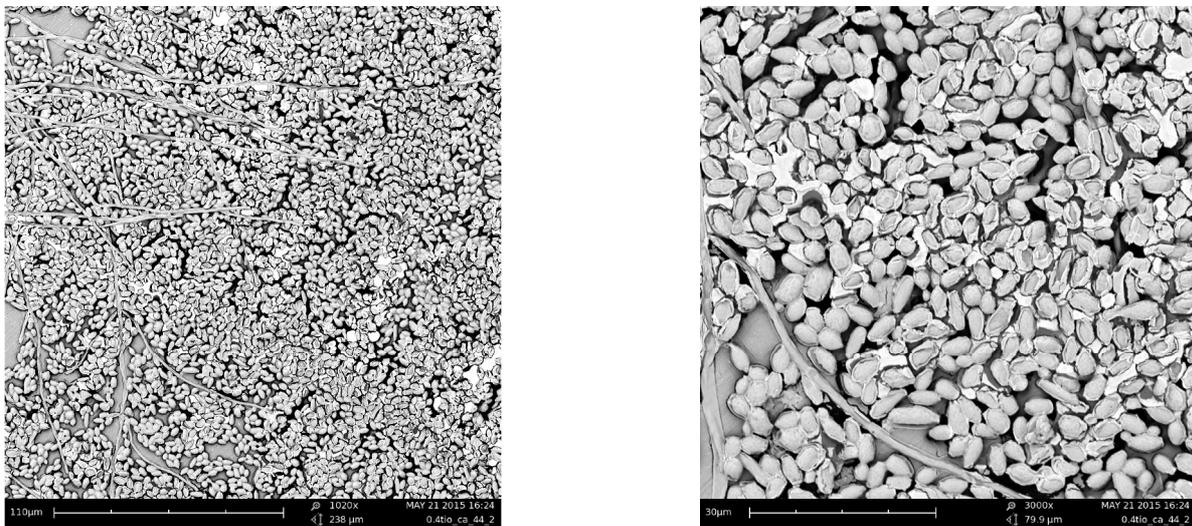


Abb. 40: *C. albicans*-Biofilm auf *Palapress*[®] *vario*-Prüfkörpern mit 0,4%-igem Zusatz von Titandioxid, nach 44 Stunden Inkubationszeit; links 1000-fache Vergrößerung, rechts 3000-fache Vergrößerung.

Alle rasterelektronenmikroskopischen Bilder wurden in 1000- und 3000-facher Vergrößerung aufgenommen. Die obigen Bilder veranschaulichen, dass bei 1000-facher Vergrößerung ein dichter *Candida albicans*-Rasen sichtbar ist, während die 3000-fache Vergrößerung überwiegend der genaueren Darstellung einzelner Zellformen dient: kleine, oval-rundliche Sporen und dünne, längliche Hyphen.

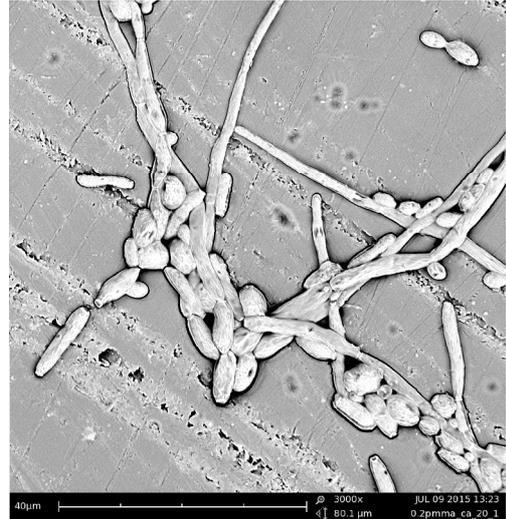
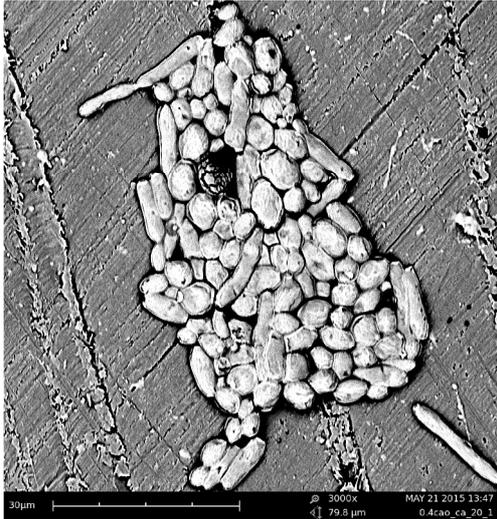


Abb. 41: links - *C. albicans*-Biofilm auf *Palapress*[®] *vario*-Prüfkörpern mit 0,4%-igem Zusatz von Calciumoxid; rechts - *C. albicans*-Biofilm auf *Palapress*[®] *vario*-Prüfkörpern ohne Zusatz; beide Aufnahmen in 3000-facher Vergrößerung nach 20 Stunden Inkubationszeit.

Das Wachstum von *C. albicans* ist nicht immer so stark, dass ein lückenloser Biofilmrasen entsteht. Im linken Bild sieht man eine exemplarische, kugelförmige Sporenanhäufung; im rechten Bild lagern sich die Sporen entlang der Hyphen an.

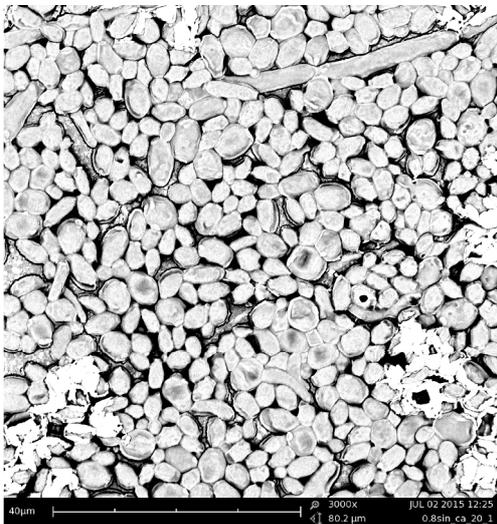


Abb. 42: *C. albicans*-Biofilm auf Sinfony-Prüfkörpern in 3000-facher Vergrößerung; links 20 Stunden Inkubationszeit, rechts 44 Stunden Inkubationszeit.

Diese zwei Aufnahmen zeigen die Abhängigkeit der Zellenform von der Inkubationszeit. Während nach 20 Stunden Inkubationszeit kaum Hyphen vorhanden sind und Sporen deutlich überwiegen, zeigen sich im rechten Bild nach 44 Stunden Inkubationszeit mehrere hyphenförmige Zellen.

4.2.3.2 Morphologische Darstellung des Multispeziesbiofilms aus *Candida albicans*, *Actinomyces naeslundii* T14V und *Streptococcus gordonii* DL1

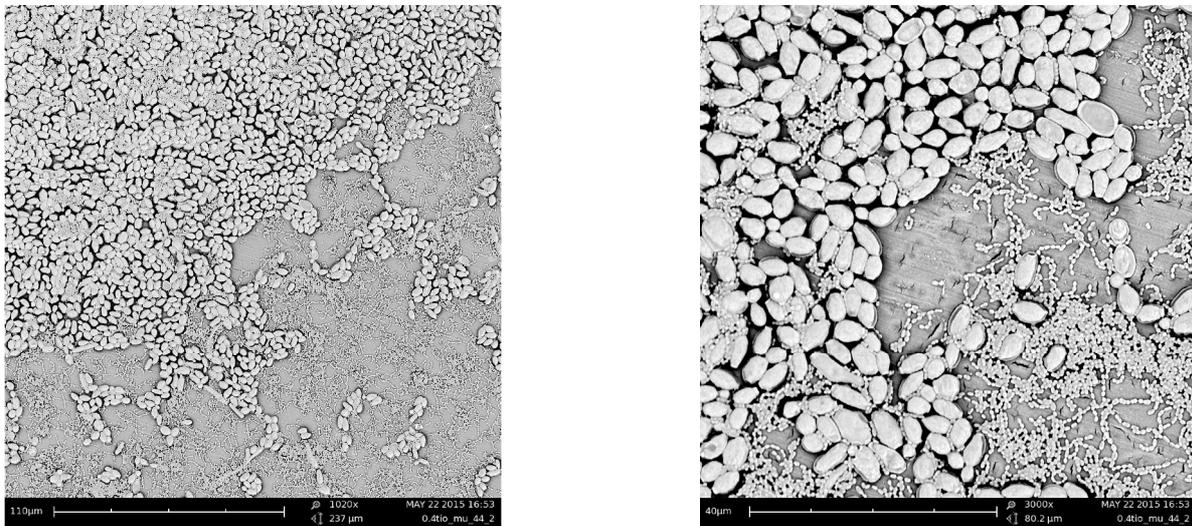


Abb. 43: Multispezies-Biofilm auf *Palapress*[®] vario-Prüfkörpern mit 0,4%-igem Zusatz von Titandioxid, nach 44 Stunden Inkubationszeit; links 1000-fache Vergrößerung, rechts 3000-fache Vergrößerung.

Auch hier erlangt man durch die 1000-fache Vergrößerung einen besseren Eindruck der gesamten Biofilmanordnung, während bei 3000-facher Vergrößerung die Formen und Größenverhältnisse der Mikroorganismen deutlich werden. Die Pilzzellen sind deutlich größer als die Bakterienzellen.

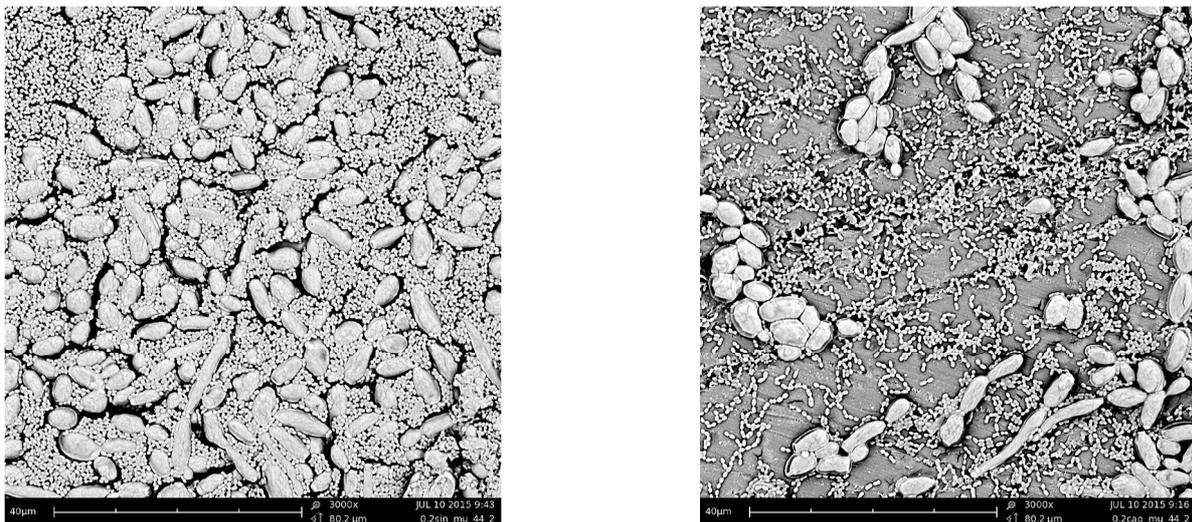


Abb. 44: links - Multispezies-Biofilm auf Sinfony-Prüfkörpern; rechts – Multispezies-Biofilm auf *Palapress*[®] vario-Prüfkörper mit 0,2%-igem Zusatz von Calciumoxid; beide Aufnahmen in 3000-facher Vergrößerung nach 44 Stunden Inkubationszeit.

Diese rasterelektronenmikroskopischen Bilder verdeutlichen die typischen morphologischen Formen der Mikroorganismen: *C. albicans* ist in Sporen- und Hyphenform sichtbar, *Streptococcus gordonii* DL1 zeigt sich in kugelrunder Kettenform und *Actinomyces naeslundii* T14V tritt stäbchenförmig auf.

Außerdem ist die Biofilmdichte der beiden Aufnahmen unterschiedlich; dies ist allerdings kein quantitatives Kriterium, da die Prüfkörperstelle der Aufnahme zufällig ausgewählt wurde.

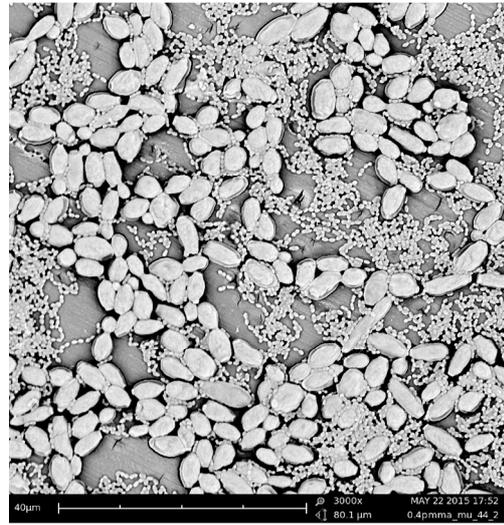


Abb. 45: Multispezies-Biofilm auf *Palapress® vario*-Prüfkörpern in 3000-facher Vergrößerung; links 20 Stunden Inkubationszeit, rechts 44 Stunden Inkubationszeit.

Diese Aufnahmen verdeutlichen, dass nach 20 Stunden Inkubationszeit deutlich mehr Bakterien- als Pilzzellen vorhanden sind und dass sich dieses Verhältnis nach weiteren 24 Stunden Inkubation umkehrt.

5 Diskussion

5.1 Diskussion der Methoden

5.1.1 Verwendeter natürlicher und künstlicher Speichel

Für die vorliegenden *in vitro* Untersuchungen wurden wegen des Umfangs der Versuche sehr große Speichelmengen benötigt. Aus diesem Grund wurde ein Speichelgemisch hergestellt, das zu gleichen Teilen aus natürlichem und künstlichem Speichel bestand und folglich eine Limitation der realitätsnahen Darstellung bewirkt.

Der mittels Expektoration gewonnene natürliche Speichel enthält zahlreiche Mikroorganismen und muss, um ungewünschte Einflüsse auf die Versuchsergebnisse weitestgehend auszuschließen, sterilisiert werden. Für die Sterilisation von Speichel gibt es zwei Hauptmöglichkeiten: Zentrifugation und Filtration. In vielen Studien wird der natürliche Speichel zentrifugiert und der klare Überstand abpipettiert, um die Mikroorganismen zu eliminieren; die Rotationszeit liegt häufig zwischen 5 Minuten und 30 Minuten, bei einer *Schleuderziffer* von 1000 g bis 30000 g (*Schleuderziffer* = Vielfaches der mittleren Erdbeschleunigung g) [Armstrong 1971; McGhee et al. 1975; Ligtenberg et al. 1992; Carlen et al. 2001; Lamkin et al. 2001; Kawashima et al. 2003; Ahn et al. 2005; Chambers et al. 2008; Jiang et al. 2009; Cvikl et al. 2015]. Für die in der Literatur weniger häufig beschriebene Filtration werden verschiedene Arten von Filtern verwendet, um den Speichel von zellulären Bestandteilen zu reinigen [Slowey et al. 1968; Liu et al. 1999; Hahnel 2007; Jiang et al. 2009; Li et al. 2012; Cvikl et al. 2015]. Für die vorliegenden Untersuchungen wurde die Filtrationsmethode mit sterilen Filtern der Porengröße 0,45 µm und 0,22 µm angewandt.

Ein Vorteil der hier angewandten Filtrationsmethode ist das Erlangen einer absoluten Keimfreiheit; diese konnte bei zentrifugierten Speichelproben nicht nachgewiesen werden, da sich nach Ausstrich auf Blutagar und Inkubation Bakterienwachstum zeigte [Medlhammer 2003], welches möglicherweise zur mikrobiellen Verunreinigung des Speichels führen kann. Ein Nachteil der Filtration ist verglichen mit der Zentrifugation die längere Dauer [Williams and Kraus 1963].

Neben diesen zwei Hauptmethoden gibt es noch weitere Möglichkeiten, Speichel zu sterilisieren. Chemische Substanzen wie Chlorhexidin, Ethylenoxid und Wasserstoffperoxid, sowie Gamma- und ultraviolette Strahlung wurden in Studien zur Sterilisation von Speichel genutzt [Williams and Kraus 1963; Sreebny et al. 1995].

Die Sterilisationsverfahren sind einerseits nötig, um einen möglichst keimfreien Speichel zu erhalten; andererseits schränken sie die *in vitro* Bakterienadhäsion durch Denaturierung ein und durch die Säuberungsvorgänge gehen Speichelproteine verloren, die für die Bindung von Mikroorganismen besonders bedeutend sind. Bei der Filtration gehen beispielsweise bis zu 50 % des gesamten Proteingehalts der Speichelproben verloren, wohingegen bei der Zentrifugation vor allem signifikante Verluste der hochmolekularen Glykoproteine auftreten [Williams and Kraus 1963; Sweet et al. 1990; Sreebny et al. 1995; Langenfelder 2005].

Zusätzlich zum natürlichen Speichel wurde für diese Arbeit künstlicher Speichel benötigt, um die erforderliche Menge an Speichel zu erhalten. Es liegen unzählige Vorschläge zur Herstellung von künstlichem Speichel vor; darunter sind einige, die häufig verwendet oder modifiziert werden, weil sie in Untersuchungen zu guten Ergebnissen beigetragen haben [Muhler and Swenson 1947; Fusayama et al. 1963; Shellis 1978; Wong and Sissons 2001].

Generell ist es wichtig, einen künstlichen Speichel zu verwenden, der den Ansprüchen der durchgeführten Untersuchungen angepasst ist, da sich künstliche Speichelerersatzmittel, je nach Zielsetzung, in ihrer Zusammensetzung unterscheiden. Demnach weist künstlicher Speichel für Adhäsionsuntersuchungen von Mikroorganismen eine andere Zusammensetzung auf als künstlicher Speichel für Korrosionsprüfungen von Werkstoffen [Kirstein 1986; Wyss 1992; Hahnel 2007; Talu et al. 2016].

Die Zielsetzung dieser Arbeit war die Untersuchung von Adhäsionsvorgängen auf zahnärztlichen Materialien, weshalb ein von Hahnel modifizierter Speichelerersatz verwendet wurde, der speziell für Untersuchungen mikrobieller Anlagerung entwickelt worden ist [Hahnel 2007]. Anschließend wurde der künstliche Speichel analog zum natürlichen Speichel in sterilen Filtern der Porengröße 0,45 µm und 0,22 µm sterilisiert, um für beide Speichelarten gleiche Ausgangsbedingungen zu schaffen.

Da die Enzymaktivität sowohl des natürlichen als auch des künstlichen Speichels bei Temperaturen von 25 und 37°C über einen längeren Zeitraum fast komplett verloren geht [Williams and Kraus 1963], wurden die Speichelproben bei -50°C tiefgefroren und erst vor Gebrauch wieder aufgetaut, um die Speichelproteine möglichst intakt zu halten [Veerman et al. 2008].

5.1.2 Verwendetes Nährmedium - *Schädlermedium*

Um für die Mikroorganismen während der Inkubation eine wachstumsfördernde Umgebung zu schaffen, ist ein Nährmedium nötig. Für die vorliegenden Untersuchungen wurde ein flüssiges Nährmedium verwendet, das, anders als halb feste und feste Nährmedien, direkt auf die Prüfkörper pipettiert wird [Krüger and Seidler 2007]. Es gibt eine Vielzahl von industriell hergestellten Nährmedien oder exakte Anleitungen, um sie selbst herzustellen. Entscheidend für die Zusammensetzung des Mediums sind die physiologischen Ansprüche der Mikroorganismen, die kultiviert, detektiert oder gezählt werden sollen und die Zielsetzung der Untersuchung [Krüger and Seidler 2007; Carl Roth GmbH 2015].

So dient das *MacConkey-Medium*, das häufig auch als festes Nährmedium sog. *MacConkey-Agar* verwendet wird, vor allem der Kultivierung und Detektion gramnegativer Bakterien, wie Salmonellen, Shigellen und coliformer Bakterien [Sanz et al. 1993; Aguilera et al. 2005], während das *Todd-Hewitt-Medium* vor allem die Kultivierung β -hämolytischer Streptokokken unterstützt [Finch and Phillips 1977; Engel and van Silfhout 1981; Huelves et al. 2008].

Das *Schädlermedium* wiederum ist ein Kulturmedium zur Anreicherung und Kultivierung aerober und v. a. anaerober Mikroorganismen, das in zahlreichen Untersuchungen Anwendung gefunden hat [Shungu et al. 1985; Busscher et al. 1995; Decker et al. 2014]. Da es sich bei den hier verwendeten Mikroorganismen – *Candida albicans*, *Streptococcus gordonii* DL1 und *Actinomyces naeslundii* T14V –

um fakultative Anaerobier handelt, war das *Schädlermedium* Mittel der ersten Wahl [Ellen 1976; Loo et al. 2000; Biswas and Chaffin 2005].

Das für die vorliegenden Untersuchungen verwendete *Schädlermedium* wurde nach Schaedler et al. selbst hergestellt [Schaedler et al. 1965].

5.1.3 Verwendete Mikroorganismen

In der menschlichen Mundhöhle beträgt die Gesamtkeimzahl im Speichel circa 10^8 Keime pro ml [Groß 2009]. Darunter finden sich in der residenten Mikroflora *Viridans-Streptokokken*, Staphylokokken, Corynebakterien, Neisserien, Aktinomyzeten, Fusobakterien, Hefepilze, Veillonellen, Laktobazillen, uvm. [Slots 1977; Babaahmady et al. 1997; Groß 2009]. Für die vorliegenden Untersuchungen wurden repräsentative Mikroorganismen verwendet, welche folgende Kriterien erfüllten: häufiges Vorkommen in der physiologischen Mundflora, Beitrag zur initialen Biofilm- und Plaquebildung und hohe Adhäsionsbereitschaft zu Zähnen, Schleimhaut und Zahnersatzmaterialien.

Candida albicans ist häufiger Bestandteil der oralen Flora gesunder Patienten [Amato and Pecora 1983; Ramanathan et al. 1985; Odds 1988]. Von allen im Mund vorkommenden Pilzarten ist *C. albicans* der mit Abstand am häufigsten anzutreffende [Rams and Slots 1991; Dorko et al. 2001]. *C. albicans* ist ein fakultativ pathogener Organismus, ein sogenannter opportunistischer Erreger, der nur bei geschwächter Immunabwehr oder nicht intakter Hautbarriere eine Erkrankung auslöst [King et al. 1980; Moll et al. 2005; Groß 2009]. Beim gesunden Menschen zählt der Pilz zur physiologischen oralen Mikroorganismengemeinschaft, wohingegen er beim immungeschwächten Menschen zum pathogenen Mikroorganismus werden und dadurch orale Erkrankungen verursachen kann - z. B. orale Soor, mukokutane oder pseudomembranöse Candidiasis, Prothesenstomatopathien, Mundwinkelcheilitis, bis hin zu Candida-Myokarditis oder akuter, disseminierter Candida-Sepsis [Douglas 1985; Cannon et al. 1995; Molero et al. 1998].

Die Zellen des Hefepilzes *C. albicans* binden an andere Mikroorganismen und Speichelproteine; einige Autoren beschreiben, dass die an Zahnoberflächen adsorbierten Speichelkomponenten zu Liganden für *C. albicans* und andere Mikroorganismen werden [Calderone and Braun 1991; Edgerton et al. 1993]. Da fast alle Strukturen der menschlichen Mundhöhle mit Speichel überzogen sind, adhärirt *C. albicans* über die Proteine des Speichels an Zähnen, Wange, Zunge, jeglichen Schleimhäuten der Mundhöhle sowie auch an Prothesenmaterialien, Polymeroberflächen und Implantaten [Arendorf and Walker 1980; Klotz et al. 1985; Cannon et al. 1995; Dorko et al. 2001; Bürgers et al. 2010b; Susewind S. 2014]. *C. albicans* kann durch Abstrich von Zähnen, Wangen und zahnärztlichen Prothesen oder Speichelproben gewonnen werden und ist häufig Bestandteil der dentalen Plaque [Arendorf and Walker 1980; Dorko et al. 2001].

Viele Untersuchungen haben gezeigt, dass *C. albicans* eine sehr hohe Affinität zur Adhäsion an zahnärztlichen Prothesenwerkstoffen hat [Budtz-Jorgensen 1978; Vandenbussche and Swinne 1984; Abu-Elteen and Abu-Alteen 1998]; dies begünstigt in großem Maße das Entstehen von Prothesenstomatopathien [Arendorf and Walker 1987; Nanetti et al. 1993]. Somit gelten zahnärztliche Prothesen als prädisponierender Faktor für die Anlagerung von *C. albicans* und dadurch entstehende Krankheiten [Budtz-Jorgensen 1978; Dorko et al. 2001; Gleiznys et al. 2015]; aus diesem

Grund ist es wichtig herauszufinden, welche Maßnahmen die Adhäsion von Mikroorganismen an zahnärztlichen Prothesen inhibieren können und deshalb wurde für diese Untersuchung *Candida albicans* sowohl als Monokultur als auch als Teil der Multikultur verwendet.

Actinomyces naeslundii T14V zählt als Erstbesiedler zur physiologischen Mundflora des Menschen und weist starke Beteiligung an der Entwicklung dentaler Plaque auf [Coleman et al. 1969; Clark et al. 1981; Kolenbrander et al. 1990]. *A. naeslundii* besiedelt bei fast allen Menschen die Zähne und die Mundhöhle [Clark et al. 1981], auch unbezahnte Babys sind betroffen, und das Bakterium ist überwiegend auf dem Zungenrücken und im Speichel vorhanden; *A. naeslundii* weist eine Dominanz unter den fakultativ anaeroben Aktinomyzeten auf [Ellen 1976]. Aktinomyzeten und Streptokokken besiedeln innerhalb kürzester Zeit frisch gereinigte Zahnoberflächen, binden durch intragenerische Wechselwirkungen aneinander sowie durch intergenerische Koaggregation untereinander und haben dadurch großen Anteil an der Entwicklung dentaler Plaque [Kolenbrander et al. 1990].

A. naeslundii kann, meist im Zusammenhang mit anderen Mikroorganismen, zur Entstehung von oralen Krankheiten beitragen. Kariöse Läsionen, Gingivitis sowie Parodontitis, endodontische Infektionen und Aktinomykosen sind einige der u.a. durch *A. naeslundii* ausgelösten möglichen Krankheiten [Coleman et al. 1969; Clark et al. 1981; Bowden et al. 1999; Chen et al. 2001; Xia and Baumgartner 2003]. *A. naeslundii* besiedelt speichel- und pellicelbedeckte Flächen, d.h. auch Zahnersatzmaterialien werden kolonisiert; bei Trägern zahnärztlicher Prothesen führt dies zu einer vermehrten Anhäufung von Bakterien und dadurch zur Steigerung des Erkrankungsrisikos [Sumi et al. 2003]. Vor allem bei älteren Patienten ist die Zahnersatz-Plaque in Kombination mit schlechter Zahnersatz- und Mundhygiene häufig mit Stomatopathien verbunden, sie dient als Reservoir für potenziell infektiöse Pathogene und kann zu Mundgeruch, Karies und Parodontitis beitragen [Coulthwaite and Verran 2007]. Aus diesem Grund wurde *A. naeslundii* als häufig auftretender Erstbesiedler von Zähnen, Zahnersatzmaterialien und der Mundhöhle in der vorliegenden Untersuchung als Teil der Multikultur verwendet.

Streptococcus gordonii DL1 gehört zur Gruppe der *Viridans-Streptokokken*, die als Pionierkeime die Biofilmbildung in der menschlichen Mundhöhle initiieren [Nyvad and Kilian 1990; Loo et al. 2000; Martin et al. 2017]. Zur Adhäsion an Zahnoberflächen und zahnärztlichen Materialien dienen u. a. Speichelbestandteile als Rezeptoren; die Interaktionsbereitschaft von *S. gordonii* mit diesen wird als eine der stärksten im Vergleich zu anderen Erstbesiedlern beschrieben [Hamada et al. 2004; Hannig and Hannig 2007]. Darüber hinaus besitzt das Bakterium verschiedene Oberflächen-Polypeptid-Proteine, die eine Adhäsion an humane und bakterielle Rezeptoren vermitteln [Demuth et al. 1996; Eglund et al. 2001]. Nicht nur die eigene Adhäsion, sondern die durch *S. gordonii* vermittelte Koaggregation vieler oraler Mikroorganismen, ist von großer Bedeutung [Kolenbrander et al. 1990]. *S. gordonii* interagiert mit *Actinomyces naeslundii* über Oberflächenproteine und zahlreiche weitere Keime binden an *S. gordonii*, vor allem andere *Viridans-Streptokokken* [Kolenbrander et al. 1990; Demuth et al. 1996; Loo et al. 2000; Eglund et al. 2001]. Außerdem ermöglicht *S. gordonii* durch die Erstbesiedlung die anschließende Adhäsion parodontaler Pathogene wie z. B. *Porphyromonas gingivalis* [Stinson et al. 1992; Kuboniwa et al. 2006; Martin et al. 2017].

Aufgrund der zentralen Rolle in der Mikroorganismenadhäsion ist *Streptococcus gordonii* ein exemplarisch wertvoller Keim zur Initiierung von dem stomatognathen System möglichst ähnlichen Versuchsbedingungen.

5.1.4 Verwendete Werkstoffe

In der vorliegenden Untersuchung wurde die Adhäsion von Mikroorganismen an zahnärztliche Prothesenmaterialien untersucht. Deshalb ist es wichtig, dass authentische Werkstoffe verwendet wurden, die auch *in vivo* häufig zur Herstellung von herausnehmbarem Zahnersatz Anwendung finden. *Palapress® vario* ist ein Prothesenkunststoff der Firma Heraeus Kulzer und wird in der Zahnmedizin als Prothesenbasismaterial für die Herstellung von Totalprothesen, zur Komplettierung von Modellgussprothesen, Randgestaltung, Reparaturen und indirekten Unterfütterungen verwendet [Heraeus Kulzer, 2012]. Die Kobaltchrom-Legierung *Wirobond® LFC* der Firma BEGO ist eine Nichtedelmetall-Legierung mit großem Indikationsbereich. Sie ist für die Herstellung von Modellguss-Gerüsten, Kronen, Brücken sowie Metallkeramik geeignet [BEGO Bremer Goldschlägerei, 2013]. Das Verblendkomposit *Sinfony™* der Firma 3M ESPE kann zur Teil- / Vollverblendung von Kronen, Brücken, Teleskop- und Konuskronen, galvanisierten Doppelkronen, Geschiebeaußenteilen, Implantat-Suprakonstruktionen und Adhäsivbrücken sowie für Prothesenindividualisierungen, intraorale Reparaturen und Herstellung von Veneers, Inlays, Onlays und Voll-Composite-Einzelkronen verwendet werden [3M ESPE, 2014].

Aufgrund des häufigeren Auftretens oraler Erkrankungen bei Patienten mit herausnehmbarem Zahnersatz im Vergleich zu Patienten ohne herausnehmbaren Zahnersatz wurden Zinkoxid-, Calciumoxid- und Titandioxid-Nanopartikel zur Pulverkomponente des Prothesenkunststoffes *Palapress® vario* hinzugefügt, weil in zahlreichen Untersuchungen eine antimikrobielle Aktivität dieser Metalloxid-Nanopartikel festgestellt wurde [Dizaj et al. 2014].

5.1.5 Herstellung, Bearbeitung und Wiederverwendung der Prüfkörper

Die Herstellung der Prüfkörper erfolgte nach jeweiliger Herstellerangabe. Für die *Palapress® vario*-Prüfkörper mit Zusatz wurde die jeweilige Metalloxidmenge dem *Palapress® vario*-Pulver beigemischt, anschließend folgte die Weiterverarbeitung nach Herstellerangaben.

Um eine möglichst ähnliche Form und Oberflächenrauigkeit der Prüfkörper zu erlangen, wurden die Ränder mit herkömmlichen Handfräsen entgratet und die Oberfläche mit Schleifpapier verschiedener Körnungen und unter konstanter Wasserkühlung bearbeitet; diese Methode wurde bereits in einigen Untersuchungen angewandt [Hahnel et al. 2009; Koch et al. 2013; Susewind et al. 2015].

Aufgrund der großen Versuchsanordnung war es aus Zeit- und Kostengründen nötig, die Prüfkörper aus *Wirobond® LFC* und *Sinfony™* wiederzuverwenden. Um eine Verfälschung der Untersuchungsergebnisse zu vermeiden, wurden die Prüfkörper nach jeder Verwendung in 70%-igem Ethanol und Wasser gewaschen und anschließend mit Schleifpapier poliert, um die adhärennten Biofilme gänzlich zu entfernen.

5.1.6 Bestimmung der Oberflächenrauigkeit und der freien Oberflächenenergie

Raue Oberflächen begünstigen die Bildung und Reifung von Plaque; Substrate mit hohen Oberflächenenergien sammeln mehr Plaque an, binden sie fester und können spezifische Bakterien binden [Quiryren and Bollen 1995]. Deshalb ist es wichtig, dass die Oberflächenrauigkeit und die freie Oberflächenenergie dentaler Werkstoffe möglichst gering sind. Obwohl beide Komponenten miteinander in Wechselwirkung treten, überschreitet der Einfluss der Oberflächenrauigkeit den der freien Oberflächenenergie [Quiryren and Bollen 1995].

Da die Oberflächenrauigkeit (R_a) maßgeblich für die Anlagerung von Zellen und Mikroorganismen verantwortlich ist, wurde in der Vergangenheit nach Schwellenwerten gesucht, die dentale Werkstoffe idealerweise erreichen sollen, um möglichst wenig Adhäsion zuzulassen [Busscher 1985; Quiryren and Bollen 1995; Bollen et al. 1996; Lampin et al. 1997]. So wurde von Bollen et al. ein Schwellenwert von $R_a = 0,2 \mu\text{m}$ festgelegt. Bei Rauigkeitswerten unter $0,2 \mu\text{m}$ wurden keine weiteren positiven Auswirkungen auf die Adhäsion von Mikroorganismen festgestellt [Bollen et al. 1996; Bollen et al. 1997]. Im Vergleich dazu hat Busscher in seinen Untersuchungen einen niedrigeren Wert als Schwellenwert festgelegt; laut seinen Studien sind Rauigkeitswerte unter $0,1 \mu\text{m}$ nötig, um Auswirkungen auf die Kontaktwinkelmessung und mikrobielle Adhäsion ausschließen zu können [Busscher 1985].

Für die vorliegende Untersuchung wurden deshalb Oberflächenrauigkeitswerte unter $0,1 \mu\text{m}$ akzeptiert und Prüfkörper, die diesen Wert überschritten haben, nachbearbeitet oder verworfen. Die Bestimmung der Oberflächenrauigkeit erfolgte mittels Perthometer (= profilometrisches Tastschnittgerät) an jeweils drei willkürlich ausgewählten Stellen eines Prüfkörpers, einmal zentral und zweimal marginal.

Ein profilometrisches Tastschnittgerät wurde auch in vielen anderen Untersuchungen angewandt [Valcke and Duggan 1981; Willershausen et al. 1999; Sofou et al. 2001; Bürgers et al. 2010a]. Weitere Methoden zur Bestimmung der Oberflächenrauigkeit sind die Verwendung eines Rastertunnelmikroskops [Baro et al. 1986] oder eines Konfokalmikroskops [Radford et al. 1997; Sidhu et al. 1997; Lee et al. 2009] sowie die häufig angewandte Bestimmung der Oberflächenrauigkeit mittels Rasterelektronenmikroskopie [Sendall and Staniforth 1986; Ariyaratnam et al. 1997; Radford et al. 1997; Sofou et al. 2001; Camboni and Donnet 2016]. Bei Untersuchungen, in denen die Bestimmung der Rauigkeit das Hauptziel darstellt, haben Radford et al. empfohlen, zwei verschiedene Rauigkeitsmessverfahren anzuwenden, um Artefakte auszuschließen; die Untersuchungsgruppe um Radford hat z. B. ein Rasterelektronen- und ein Konfokalmikroskop verwendet [Radford et al. 1997], Sofou et al. sowie Ariyaratnam et al. haben ein Rasterelektronenmikroskop und ein Perthometer verwendet [Ariyaratnam et al. 1997; Sofou et al. 2001].

In der vorliegenden Untersuchung wurde die Rauigkeit bestimmt, um möglichst gleiche Voraussetzungen für die Adhäsionsversuche zu schaffen. Die Rauigkeitsbestimmung war also nicht das primäre Ziel der Studie, weshalb auf die relativ schnelle, sichere und einfache Methode der Perthometermessung zurückgegriffen wurde.

Die Bestimmung der freien Oberflächenenergie erfolgt meist indirekt mit Hilfe des Kontaktwinkels durch die Messung der Benetzbarkeit, da gemäß der Gleichung von Young ein Zusammenhang zwischen der freien Oberflächenenergie eines Festkörpers, der Oberflächenspannung einer Flüssigkeit, der spezifischen Grenzflächenspannung zwischen Festkörper und Flüssigkeit und dem Kontaktwinkel besteht [Young 1805; Anderson 1986; Menges et al. 2014; Krüss GmbH Stand - 2017a]. Zwei weitere Methoden zur Messung der Benetzbarkeit sind die *Amott*-Methode und die *U. S. Bureau of Mines*-Methode (USBM), die die durchschnittliche Benetzbarkeit eines Grundkörpers messen, wohingegen der Kontaktwinkel die Benetzbarkeit spezifischer Oberflächen misst [Anderson 1986].

Für die Bestimmung des Kontaktwinkels sind viele verschiedene Messmethoden bekannt. In der vorliegenden Untersuchung wurde die Tropfenkonturanalyse verwendet, die schon in zahlreichen anderen Studien Anwendung gefunden hat [Jong et al. 1982; Hahnel et al. 2008a; Osorio et al. 2012]. Diese ist eine Bildanalysemethode und kann sowohl für die Kontaktwinkelmessung von Festkörpern (Methode des liegenden Tropfens = sessile drop method) als auch für Flüssigkeiten (Methode des hängenden Tropfens = pendant drop method) verwendet werden [Kopczynska and Ehrenstein 2013; Krüss GmbH Stand - 2017b]. In dieser Arbeit wurde die Benetzbarkeit mit drei verschiedenen Flüssigkeiten untersucht – mit destilliertem Wasser, Ethylenglycol und Methylenjodid. Auf jeweils fünf willkürlich gewählten Prüfkörpern pro Material wurden an je zwei Stellen die verschiedenen Flüssigkeiten aufpipettiert, die Tropfen fotografiert und die Kontaktwinkel bestimmt. Anschließend folgte die Berechnung der Mittelwerte sowie die Bestimmung der gesamten freien Oberflächenenergie, inklusive der dispersen und polaren Anteile, nach dem Verfahren von Owens und Wendt [Owens and Wendt 1969; Hahnel et al. 2008a].

5.1.7 Experimentelle Pellikelbildung

In dieser Arbeit wurde eine *in vitro*-Pellikelbildung induziert, indem die Prüfkörper für jeweils zwei Stunden bei 37°C in je 1 ml der sterilen 1:1-Speichelmischung aus natürlichem und künstlichem Speichel inkubiert wurden, um für die später folgende mikrobielle Anlagerung eine möglichst realitätsnahe Ausgangssituation zu schaffen.

Das erworbene Pellikel ist die erste natürliche Beschichtung aller Teile der Mundhöhle, die innerhalb der ersten Minuten nach der Reinigung auftritt [Bennick et al. 1983; Marsh and Bradshaw 1995; Skjorland et al. 1995; Carlen et al. 1998; Hannig 1999b]. Das bedeutet, dass für Untersuchungen, die sich mit der möglichst realitätsgetreuen Darstellung der menschlichen Mundhöhle befassen, meist eine experimentelle Pellikelbildung nötig ist. Es gibt dennoch viele *in vitro* Untersuchungen, die auf die Bildung eines experimentellen Pellikels verzichten [Dummer and Harrison 1982; Satou et al. 1991; Blunden et al. 1994; Suljak et al. 1995; Kawai et al. 2000; Rimondini et al. 2002; Montanaro et al. 2004]. Dadurch binden die Mikroorganismen direkt an die Oberflächen der jeweiligen Prüfkörper und es können potenziell toxische oder wachstumshemmende Einflüsse des Materials auf Mikroorganismen festgestellt werden, ohne Minderungen oder Beeinflussungen durch das erworbene Pellikel [Hahnel 2007]. Suljak et al. und Satou et al. haben vergleichende Untersuchungen mit und ohne experimentell erzeugtes Pellikel durchgeführt [Satou et al. 1991; Suljak et al. 1995]. Dabei haben Satou et al. festgestellt, dass die Zahl adhärenter Zellen auf Materialplatten mit

vorheriger Pellikelbildung deutlich niedriger war als auf Materialplatten ohne Pellikelbildung [Satou et al. 1991]. Suljak et al. kamen ebenfalls zu dem Schluss, dass Materialien mit proteinreichem Speichelfilm, verglichen mit Materialien ohne diesen, eine verminderte Bindung lebender Zellen aufweisen [Suljak et al. 1995]. Vor allem *Streptococcus salivarius* zeigte bei vorhandenem Pellikel deutlich weniger Retention an den Werkstoffen [Suljak et al. 1995].

Die experimentelle Pellikelbildung kann *in vivo* oder *in vitro* erfolgen. Für *in vivo*-Untersuchungen werden die Prüfkörper direkt in den Mundhöhlen verschiedener Probanden platziert, indem sie entweder an herausnehmbaren Kunststoffschienen, -Stäbchen oder Gaumenapparaturen befestigt [Orstavik et al. 1974; Bennick et al. 1983; Hannig 1997, 1999b; Hannig 1999a; Auschill et al. 2002] oder mit Zementen und Adhäsivstoffen direkt an den Zähnen fixiert werden [Lie 1977; Rykke and Rolla 1990; Amaechi et al. 1999]. Die Prüfkörper unterliegen so allen im stomatognathen System vorkommenden Unregelmäßigkeiten, wie zum Beispiel der ungleichmäßigen Zusammensetzung, Verteilung und Dicke des Pellikels [Hannig 1997; Amaechi et al. 1999; Hannig 1999a]. Amaechi et al. haben herausgefunden, dass das Pellikel an den unteren, posterioren Lingualflächen am dicksten ist mit circa 1,06 μm , wohingegen an den Palatinalflächen der oberen Schneidezähne die niedrigsten Werte gemessen wurden (circa 0,3 μm) [Amaechi et al. 1999]. Darüber hinaus kann es zu Verfälschungen der anschließenden, mikrobiellen Adhäsionsvorgänge kommen, da bereits nach zwei Stunden eine Adhäsion von Mikroorganismen an *in vivo*-Pellikeln festgestellt wurde [Li et al. 2004]. Des Weiteren können Schwankungen auftreten z.B. durch die individuellen oralen Begebenheiten der Probanden, durch vorher angewandte Zahnpasten oder Mundspülungen und durch unbewusst vorkommende Scher- und Selbstreinigungskräfte wie Zungen- und Wangenbewegungen [Hannig 1997; Amaechi et al. 1999; Marsh and Martin 2003]. Alle diese Gründe führen zu einer mangelnden Standardisier- und Reproduzierbarkeit. Bedingt durch den großen Aufwand der *in vivo*-Untersuchungen, kann außerdem nur eine relativ geringe Prüfkörperanzahl untersucht werden, weshalb in der vorliegenden Untersuchung eine *in vitro*-Pellikelbildung angewandt wurde.

Bezüglich der Inkubationszeit und -temperatur gibt es viele Ansätze. *In vivo*-Untersuchungen dienen als Grundlage für die Bestimmung der Dauer und es wurde festgestellt, dass sich auf Schmelzscheiben bereits eine Minute nach Speichelexposition eine dünne Pellikelschicht gebildet hat [Bennick et al. 1983; Hannig 1999b]. Nach eineinhalb bis zwei Stunden hat sich ein Gleichgewicht zwischen Adsorptions- und Desorptionsvorgängen der Speichelproteine eingestellt, was oft als „Plateau“ beschrieben wird, da das Pellikel dann seine maximale Dicke erreicht hat und die Zusammensetzung sich nicht mehr signifikant ändert [Sönju and Rölla 1973; Sönju 1975; Bennick et al. 1983; Kuboki et al. 1987]. Auf dieser Grundlage haben verschiedene Forschungsteams mehrere Inkubationszeiten *in vitro* angewandt: Vacca Smith und Bowen haben verschiedene Inkubationszeiten unter 20 Minuten verwendet [Vacca Smith and Bowen 2000], manche Forschungsteams testeten eine Inkubationszeit von 45 Minuten [Pruitt et al. 1969; Steinberg et al. 1993; Steinberg and Eyal 2002], andere führten die Inkubation in Speichellösungen für 60 Minuten durch [Satou et al. 1991; Suljak et al. 1995; Carlen et al. 1998; Steinberg et al. 1999; Carlen et al. 2001] und Cowan et al. haben die Prüfkörper für 90 Minuten inkubiert [Cowan et al. 1986]. Aufgrund des viel erforschten plateauartigen Gleichgewichts und der bewährten Inkubationsdauer von zwei Stunden [Orstavik et al. 1974; Stiefel 1976] wurden an unserer Forschungseinrichtung viele Versuche mit einer Inkubationszeit von zwei Stunden durchgeführt [Hahnel 2007; Hahnel et al. 2008b; Hahnel et al. 2010; Hahnel et al. 2012; Susewind et al. 2015], weshalb man sich in der vorliegenden Arbeit auch für eine zweistündige Inkubation entschieden hat. Bezüglich der Inkubationstemperatur

versucht man meistens ähnliche Verhältnisse wie in der menschlichen Mundhöhle zu schaffen, weshalb eine Temperatur von 37°C gewählt wird [Orstavik et al. 1974; Stiefel 1976; Satou et al. 1991; Steinberg et al. 1993; Steinberg and Eyal 2002; Hahnel 2007]. Carlen et al. und Yoo et al. führten ihre Versuche bei Raumtemperatur durch [Carlen et al. 1998; Carlen et al. 2001; Yoo et al. 2003] und vereinzelt werden die Temperaturbedingungen nicht genauer angegeben [Eick et al. 2004]. Um auch hier möglichst realitätsnah zu arbeiten, wurde in der vorliegenden Arbeit eine Inkubationstemperatur von 37°C gewählt.

5.1.8 Experimentelle Biofilmbildung

In dieser Arbeit wurde eine *in vitro*-Biofilmbildung induziert. Nach zweistündiger Inkubation zur experimentellen Pellikelbildung wurde das Speichelgemisch vorsichtig abgesaugt und die Prüfkörper für jeweils zweieinhalb Stunden bei 37°C in je 1 ml der Mono- oder Multispezieskultur inkubiert.

Die Inkubationsdauer der Prüfkörper *in vitro* ist von der Zielsetzung der jeweiligen Untersuchung abhängig. Wenn die initiale Adhäsion von Mikroorganismen untersucht werden soll, ist eine relativ kurze Inkubationszeit ausreichend, wohingegen eine Inkubation über Tage oder Wochen nötig ist, wenn die sekundäre Reifung des Biofilms untersucht werden soll. Lange Inkubationszeiten haben zum Beispiel Willershausen et al. (20-35 Tage) [Willershausen et al. 1999] und Kommerein et al. (48 Stunden) [Kommerein et al. 2017] sowie Hahnel et al. (24 Stunden, im Vgl. zur kurzzeitigen Inkubation) [Hahnel et al. 2012] verwendet. Bezüglich der initialen Adhäsion wurde *in vivo* etwa vier Stunden nach Exposition der Oberflächen eine signifikante Anlagerung oraler Kokken festgestellt, das bedeutet circa zwei Stunden nach Pellikelbildung [Lie 1975; Klimek and Hellwig 1999; Montanaro et al. 2004]. Folglich wurden die Prüfkörper in *in vitro*-Untersuchungen häufig nach der experimentellen Pellikelbildung für weitere zwei bis vier Stunden mit den jeweiligen Bakterienlösungen inkubiert. Satou et al. haben eine Inkubationszeit von zwei Stunden angewandt [Satou et al. 1988], Montanaro et al. und Lee et al. bis zu sechs Stunden [Montanaro et al. 2004; Lee et al. 2009]. Wang et al. haben Inkubationszeiten von vier, sechs, zwölf und vierundzwanzig Stunden genutzt [Wang et al. 1994]. Andere Autoren haben auch kürzere Inkubationszeiten angewandt – zum Beispiel eine Stunde [Ellen and Gibbons 1974; Orstavik et al. 1974; Carlen et al. 1996]. An unserer Forschungseinrichtung wurden viele Versuche erfolgreich mit einer Inkubationsdauer von zweieinhalb Stunden durchgeführt [Hahnel et al. 2008a; Hahnel et al. 2009; Susewind et al. 2015], weshalb auch für die vorliegende Arbeit eine Inkubationszeit mit den mikrobiellen Kulturen von zweieinhalb Stunden gewählt wurde, um die initiale Adhäsion der Mikroorganismen zu simulieren. Anschließend folgte eine längerfristige Inkubation in *Schädlermedium* für 20 und 44 Stunden, um die sekundäre Biofilmentwicklung beobachten zu können. Bei den Prüfkörpern, die 44 Stunden inkubiert wurden, wurde nach 20 Stunden ein Mediumwechsel vorgenommen, um mögliche mikrobielle Stoffwechselprodukte zu eliminieren, die zu veränderten Bedingungen führen können.

Ein weiterer entscheidender Faktor neben der Inkubationsdauer ist die Anzahl und Art der verwendeten Mikroorganismen. Wenn in einer Untersuchung mehrere Mikroorganismen verwendet werden, ist es wichtig, dass sie sich ungefähr in der gleichen Wachstumsphase befinden. In der vorliegenden Untersuchung hat man für die Kultivierung der Mikroorganismen den Zeitpunkt der frühen exponentiellen Wachstumsphase gewählt - dafür wurde *Streptococcus gordonii* für 11

Stunden, *Candida albicans* für 18 Stunden und *Actinomyces naeslundii* für 22 Stunden inkubiert [Susewind S. 2014]. Es folgte das dreimalige Waschen, Zentrifugieren und Resuspendieren der Mono-Speziessuspensionen und das Einstellen der optischen Dichte mittels Photometer, um eine relativ ähnliche Bakteriendichte gewährleisten zu können. Um genormte Bakterienlösungen zu erhalten, wurden alle drei Suspensionen auf eine einheitliche optische Dichte von 0,3 kalibriert; dieses Vorgehen wurde auch in etlichen anderen Studien angewandt [Satou et al. 1991; Carlen et al. 1996; Grivet et al. 2000].

Die Inkubation wurde dann bei einer Temperatur von 37°C durchgeführt, um die *in vitro*-Versuchsbedingungen den Gegebenheiten der menschlichen Mundhöhle anzupassen. Zahlreiche Forschungsteams führten Ihre Untersuchungen ebenfalls bei 37°C durch [Satou et al. 1991; Wang et al. 1994; Hahnel 2007; Bürgers et al. 2008; Hahnel et al. 2008a]. Orstavik et al. haben die Versuche bei Raumtemperatur durchgeführt [Orstavik et al. 1974], Ellen und Gibbons bei 35°C [Ellen and Gibbons 1974].

Darüber hinaus ist zu klären, ob die Untersuchungen statisch, semistatisch oder dynamisch durchgeführt werden sollen. *In vivo* unterliegen alle Prozesse der Pelikel- und Biofilmbildung einer natürlichen Dynamik, die auf die umliegenden muskulären Strukturen und durch diese ausgelöste Scher- und Selbstreinigungskräfte sowie kontinuierliche Speichelsekretion zurückzuführen ist. *In vitro* ist es schwierig, dieses komplexe System zu simulieren, um möglichst realistische Versuchsbedingungen zu schaffen. Eine dynamische Inkubation ahmt die natürlichen Bedingungen des oralen Systems besser nach, ist aber meistens deutlich aufwändiger und sensibler. Statische Verfahren beinhalten die Inkubation der Prüfkörper über bestimmte Zeiträume bei definierter Temperatur ohne jegliche Bewegung von außen [Wang et al. 1994]. Schüttelinkubatoren und magnetische Rührfische erzeugen konstante Bewegungen der inkubierten Prüfkörper ohne automatischen Austausch der Suspensionen und werden als semistatisch bezeichnet [Ellen and Gibbons 1974; Satou et al. 1991; Hahnel 2007]. Fließkammersysteme zählen zu den dynamischen Inkubationsverfahren; Katsikogianni und Missirlis unterscheiden in Parallel-, Radial- und Rotating-Disc-Fließkammern [Katsikogianni and Missirlis 2004]. Hierbei handelt es sich um kompliziertere Verfahren, die Scherkräfte und fortlaufenden Speichelfluss simulieren können. Diese beiden Faktoren beeinflussen die Adhäsion von Mikroorganismen signifikant und können in den Fließkammersystemen beliebig variiert werden. Zahlreiche Studien haben diese Methode angewandt [van der Mei, H C et al. 1993; Landa et al. 1997; Millsap et al. 1999; Eick et al. 2004; van der Mei, H C et al. 2004]. Ein weiterer Vorteil der Fließkammersysteme bietet sich für lange Inkubationszeiten durch den stetigen Suspensionsaustausch; dadurch werden bakterielle Stoffwechselprodukte, die zu veränderten Bedingungen führen können, regelmäßig abtransportiert [Eick et al. 2004]. Da in der vorliegenden Untersuchung ein semistatischer Schüttelinkubator mit 60 U/min verwendet wurde, war nach 20 Stunden ein Mediumwechsel nötig, um Stoffwechselprodukte zu eliminieren und ein neues Substratangebot zu schaffen.

5.1.9 Verwendete Auswertungsmethoden

Es sind viele verschiedene Methoden zur Quantifizierung der auf den Prüfkörpern adhärennten Mikroorganismen bekannt.

Einige Methoden beruhen auf dem Sichtbarmachen der Mikroorganismen; dies ermöglichen vor allem die direkten, mikroskopischen Methoden. In einem Lichtmikroskop können die einzelnen Mikroorganismen visuell erfasst und gegebenenfalls ausgezählt werden [z.B. bei Orstavik et al. 1974; Junqueira et al. 2005]. Recht häufig wird außerdem ein Fluoreszenzmikroskop zur Quantifizierung von Zellen genutzt [Satou et al. 1988; Satou et al. 1991; O'Brien et al. 2000; Maza et al. 2002; Hahnel 2007; Hahnel et al. 2008b]; das fluoreszenzmikroskopische Verfahren basiert auf der Fähigkeit metabolisch aktiver Zellen, einen nicht fluoreszierenden Farbstoff in einen fluoreszierenden Farbstoff umzuwandeln. Das durch den fluoreszierenden Farbstoff entstehende Signal kann dann rein visuell durch den Farbumschlag, spektrometrisch oder durch die Fluoreszenz des Farbstoffs bestimmt werden [Hahnel 2007]. Letzteres führt zur höchsten Genauigkeit, da ein enger Zusammenhang zwischen der gemessenen Fluoreszenzintensität und der tatsächlichen Zellzahl besteht [Goegan et al. 1995; O'Brien et al. 2000]. Des Weiteren kann ein Rasterelektronenmikroskop zur manuellen oder computerunterstützten Auszählung und Visualisierung der adhärennten Mikroorganismen genutzt werden [Ewers et al. 1977; Meurman et al. 1983; Friedman et al. 1992; Tanner et al. 2000; Tanner et al. 2003; Junqueira et al. 2005]. Ein noch informativeres Verfahren stellt die konfokale Laser-Raster-Mikroskopie dar. Hierbei können lebende von toten Zellen differenziert und deren dreidimensionale Anordnung innerhalb des Biofilms dargestellt werden [z.B. bei González-Cabezas et al. 1995; Zaura-Arite et al. 2001; Ausschill et al. 2002]. Nachteile sind die hohen finanziellen Aufwendungen und die sehr zeitaufwändige Bildgebung.

Es gibt andere Vorgehensweisen, bei denen die adhärennten Mikroorganismen durch Ultraschall von den Prüfkörpern abgelöst werden. Anschließend kann die entstehende Suspension zum Beispiel angefärbt werden [Medlhammer 2003]. Hier korreliert die Farbintensität der Suspension mit der Anzahl der enthaltenen Mikroorganismen, wobei diese Methode laut Medlhammer relativ geringe Sensibilität aufweist [Medlhammer 2003]. Eine andere Option ist die durch Ultraschall abgelösten Bakterien auf Agarplatten aufzutragen und nach anschließender Inkubation die Mikroorganismen zu quantifizieren [Svanberg et al. 1990].

Eine einfache Methode zur rein quantitativen Auswertung dentaler Plaque ist die Gewichtsbestimmung. Dabei wird die anhaftende Plaque von der Probe abgetragen und ihr Nassgewicht direkt im Anschluss gemessen [Sissons et al. 1995]. Für dieses Vorgehen ist allerdings eine Mindestmenge an Mikroorganismen bzw. Plaque nötig, weshalb sich diese Methode nicht zur Bestimmung initialer Adhäsion eignet. Außerdem kann keinerlei Rückschluss auf die unterschiedlichen Komponenten der Plaque gezogen werden.

Ein komplexeres Verfahren ist die Szintillationsmethode [z.B. bei Love 1996; Shahal et al. 1998; Carlen et al. 2001; Steinberg and Eyal 2002; Ahn et al. 2005]. Hierbei werden die Mikroorganismen durch Inkubation in speziellen Nährlösungen radioaktiv markiert und folglich mithilfe eines Szintillationszählers ausgewertet. Ein Nachteil ist der große technische und finanzielle Aufwand.

In der vorliegenden Arbeit wurden MTT-Assays zur Ermittlung der relativen Zellzahl verwendet. Das MTT-basierte, kolorimetrische Verfahren dient der indirekten Quantifikation der viablen Biomasse. Bei dem Farbstoff MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) handelt es sich um ein gelbliches Tetrazoliumsalz, das von lebenden, stoffwechselaktiven Zellen zu violett-blauem Formazan reduziert wird. Die Menge an Formazan ist direkt proportional zur Anzahl lebender Zellen; das Formazan muss allerdings aus den Zellen isoliert und in Lösung gebracht werden, um die Absorption messen zu können. Hierfür ist ein Lysis-Reagens nötig, welches ein Auflösen der

Zellmembranen bewirkt [Mosmann 1983; Berridge and Tan 1993; Berridge et al. 1996]. Anschließend wurde die berechnete Fluoreszenz als Maß für die Biofilmbildung verwendet, mittels einer univariaten, zweifaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) statistisch ausgewertet und mittels gruppierter Fehlerbalken graphisch dargestellt. Außerdem wurden Mikroorganismen mithilfe des fluoreszierenden Farbstoffs *FUN® 1 Cell-Stain* angefärbt, unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht und in Bildern festgehalten. Danach wurde die auf den Bildern gemessene grüne Fluoreszenz der Lebendzellen in Flächenprozent als Maß für die Biofilmbildung verwendet, mittels einer univariaten, zweifaktoriellen Varianzanalyse statistisch ausgewertet und mittels gruppierter Fehlerbalken graphisch dargestellt. Zusätzlich erfolgte eine qualitative Auswertung mittels Rasterelektronenmikroskop zur Darstellung von Objektoberfläche und Morphologie der Mikroorganismen.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

Aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden *in vitro*-Studie muss die Untersuchungshypothese zurückgewiesen werden. Es wurde durch die Modifikation des Prothesenbasismaterials mit Zinkoxid-, Calciumoxid- und Titandioxid-Nanopartikeln kein Einfluss auf die untersuchten Parameter gefunden. Des Weiteren hat die Dotierung mit Nanopartikeln an den modifizierten Prothesenbasismaterialien keine Änderungen bezüglich der Oberflächenrauigkeit und der freien Oberflächenenergie im Vergleich zum unmodifizierten Prothesenbasiskunststoff bewirkt.

Oberflächenrauigkeit

Entscheidende Oberflächenparameter bei der Beurteilung mikrobieller Adhäsion auf Festkörpern in der menschlichen Mundhöhle sind die Oberflächenrauigkeit und die freie Oberflächenenergie, wobei der Oberflächenrauigkeit häufig eine größere Bedeutung zugewiesen wird [Teughels et al. 2006]; in neueren Studien wird auch die dreidimensionale Topographie der Oberfläche betrachtet, um Zusammenhänge zwischen mikrobieller Adhäsion und Topographie festzustellen [Ionescu et al. 2012; Hahnel et al. 2014]. Die Oberflächenrauigkeit spielt eine wichtige Rolle bezüglich der Adhäsion von Mikroorganismen und der Biofilmbildung auf zahnärztlichen Materialien – i. A. wird an rauen Oberflächen regelmäßig mehr Plaquebildung beobachtet [Quirynen and Bollen 1995; Kawai et al. 2000; Eick et al. 2004]. Das liegt zum einen an der zwei- bis dreifach vergrößerten Oberfläche beim Vorliegen von Unebenheiten oder Rauigkeiten, zum anderen am Schutz, den diese Vertiefungen den Mikroorganismen gegenüber äußeren Einflüssen bieten [Quirynen and Bollen 1995]. Um die Einflüsse der Oberflächenrauigkeit (R_a) auf die Biofilmbildung möglichst gering zu halten, wurde nach einem Schwellenwert gesucht, unterhalb dessen kein signifikanter Einfluss der Oberflächenrauigkeit mehr erkennbar war [Quirynen and Bollen 1995; Bollen et al. 1996; Rimondini et al. 1997]. Generell muss allerdings beachtet werden, dass die Untersuchungen teilweise im Sulkus erfolgt sind, wo keine Scherkräfte vorliegen. Die Ergebnisse von Bollen et al. zeigten, dass eine Verringerung der Oberflächenrauigkeit unter $R_a = 0,2 \mu\text{m}$ weder supra- noch subgingival Auswirkungen auf die quantitative und qualitative mikrobiologische Adhäsion und Kolonisierung hat; $0,2 \mu\text{m}$ wurde in diesen Studien als R_a -Schwellenwert festgelegt [Bollen et al. 1996; Bollen et al. 1997]. Bollen et al. haben hierzu 1996 zwei verschiedene Abutmentmaterialien in einer Langzeituntersuchung getestet – Titan-Abutments ($R_a = 0,2 \mu\text{m}$) und hochpolierte Keramik-Abutments

($R_a = 0,06 \mu\text{m}$). Nach zwölf Monaten zeigte sich zwischen beiden Materialien kein signifikanter Unterschied bezüglich der mikrobiellen Adhäsion und mikrobiellen Zusammensetzung, weshalb Bollen et al. zu dem Schluss gekommen sind, dass die Oberflächenrauigkeit $\leq 0,2 \mu\text{m}$ sein sollte und eine Reduzierung der Rauigkeit unter $0,2 \mu\text{m}$ keine weiteren positiven Auswirkungen auf die mikrobielle Adhäsion hat [Bollen et al. 1996]. Dieses Ergebnis wurde in einer weiteren Studie von Bollen et al. 1997 bestätigt; darin wurden viele verschiedene Untersuchungen bzgl. der Oberflächenrauigkeiten von Zähnen, Abutments, Füllungswerkstoffen uvm. ausgewertet und verglichen [Bollen et al. 1997]. Dieser Schwellenwert von $R_a \leq 0,2 \mu\text{m}$ wurde in unzähligen, folgenden Untersuchungen als Richtwert verwendet [Bürgers et al. 2009; Ionescu et al. 2012; Hahnel et al. 2014]. In den Untersuchungen von Rimondini et al. zeigte sich bei Titanoberflächen eine ideale Oberflächenrauigkeit von $R_a \leq 0,088 \mu\text{m}$, um die Akkumulation und Reifung von Plaque zu hemmen [Rimondini et al. 1997].

In der vorliegenden Untersuchung wurden die Oberflächen der Prüfkörper so vorbehandelt, dass die Oberflächenrauigkeit (R_a) bei allen Materialien kleiner als $0,1 \mu\text{m}$ war, um signifikante Einflüsse der Oberflächenrauigkeit auf die Biofilmbildung von vornherein auszuschließen. Dazu war eine sorgfältige, einheitliche Herstellung und Bearbeitung aller Prüfkörper nötig. Die drei Referenzmaterialien *Palapress® vario*, *Wirobond® LFC* und *Sinfony™* zeigten eine gute Polierbarkeit und somit Werte, die deutlich kleiner waren als $0,1 \mu\text{m}$. Unabhängig von der Höhe der prozentualen Nanopartikel-Zusätze wurden bei den Prüfkörpern aus *Palapress® vario* mit Zinkoxid, Calciumoxid und Titandioxid ebenfalls Rauigkeitswerte unter $0,1 \mu\text{m}$ gemessen. Es zeigten sich somit keine über dem Schwellenwert liegenden Rauigkeitswerte und außerdem keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen modifizierten Prothesenbasiskunststoffen und der unmodifizierten Kontrollgruppe. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Zugabe der Metalloxid-Nanopartikel keinen Einfluss auf die Oberflächenrauigkeit des Prothesenbasismaterials hat und dass die Oberflächenrauigkeit in der vorliegenden Arbeit keinen Einfluss auf die Mono- und Multispeziesbiofilmbildung hat.

Ein weiterer Aspekt der Oberflächenbeschaffenheit von Festkörpern ist die dreidimensionale Oberflächentopographie (3D-Topographie). Zur Bestimmung der Oberflächentopographie kann ein Atomkraftmikroskop (AFM) verwendet werden, um eine hochauflösende, visuelle Analyse der Oberfläche zu erhalten. Ionescu et al. und Hahnel et al. haben in Ihren Untersuchungen die Oberflächentopographie von harzbasierten Kompositen untersucht und folgenden Zusammenhang festgestellt: je mehr Füllstoffanteile in den Prüfkörpern vorhanden waren, desto mehr Füllstoffaggregate zeigten sich an der Prüfkörperoberfläche und dies führte zu einer möglichen Reduzierung der Biofilmbildung [Ionescu et al. 2012; Hahnel et al. 2014]. Ein Nachteil zeigt sich in der Interpretation der AFM-Mikrobilder großer Oberflächen, da nur sehr kleine Felder analysiert werden können ($1 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$ [Ionescu et al. 2012], $2 \mu\text{m} \times 2 \mu\text{m}$ [Hahnel et al. 2014]). In der vorliegenden Untersuchung wurde die Oberflächentopographie nicht untersucht.

Freie Oberflächenenergie

Der Einfluss der freien Oberflächenenergie verschiedener zahnärztlicher Materialien auf die Anlagerung von Mikroorganismen wurde schon vielfach untersucht und beschrieben – mit teilweise konträren Ergebnissen. Van Dijk et al. sind in Ihren Untersuchungen zu dem Schluss gekommen, dass im Allgemeinen mehr Mikroorganismen auf Materialien mit hoher freier Oberflächenenergie adhäreren als auf Materialien mit niedriger freier Oberflächenenergie [van Dijk et al. 1987]. Absolut

et al. hingegen sprechen von einem komplexen Zusammenspiel von Material, Bakterium und Medium [Absolom et al. 1983]. Sie haben die einzelnen Zusammenhänge zwischen Material – Bakterium, Material – Medium und Bakterium – Medium untersucht und festgestellt, dass Bakterien mit hoher freier Oberflächenenergie besser an hochenergetischen Festkörpern haften sowie Bakterien mit niedriger freier Oberflächenenergie besser an niederenergetischen Festkörpern adhären [Absolom et al. 1983]. Dieses Statement wurde in den Untersuchungen von Quirynen et al. teilweise bestätigt und darin erläutert, dass die Mikroorganismen der menschlichen Zahnplaque überwiegend hohe freie Oberflächenenergien besitzen, weshalb sie besser an Materialien adhären, die ebenfalls eine hohe freie Oberflächenenergie aufweisen [Quirynen et al. 1994; Quirynen and Bollen 1995]. Auch Teughels et al. und Ionescu et al. haben in aktuelleren Studien herausgefunden, dass sich auf Oberflächen mit niedriger freier Oberflächenenergie weniger Biofilm bildet als auf Oberflächen mit hoher freier Oberflächenenergie [Teughels et al. 2006; Ionescu et al. 2012]. Des Weiteren zeigte sich ein direkter Zusammenhang zwischen der freien Oberflächenenergie und der Intensität der bakteriellen Anlagerung, weniger zwischen der freien Oberflächenenergie und der Anzahl adhärerter Bakterien [van Pelt et al. 1985; Quirynen et al. 1994].

In wissenschaftlichen Untersuchungen muss bei der Beurteilung der freien Oberflächenenergie generell beachtet werden, dass die Verhältnisse bei *in vivo*-/ und *in vitro*-Untersuchungen komplett unterschiedlich sind. Außerdem ist es entscheidend, ob in den Untersuchungen eine Pellikelbildung induziert wird. Es liegen zahlreiche Untersuchungen vor, die sich mit dem Einfluss des erworbenen Pellikels auf die freie Oberflächenenergie befassen: Einige Studien haben gezeigt, dass das orale Milieu die freie Oberflächenenergie von Festkörpern verändert; durch die Adsorption von Speichelproteinen wurden Unterschiede zwischen den freien Oberflächenenergien verschiedener Materialien verringert [Pratt-Terpstra et al. 1987; van Dijk et al. 1987; Quirynen et al. 1989; Hannig and Hannig 2009]. Bereits 1984 sind De Jong et al. in Ihren Untersuchungen zu diesem Ergebnis gekommen [Jong et al. 1984]. Baier hat in seinen frühen Untersuchungen beschrieben, dass zahnärztliche Materialien bei Speichelkontakt mit adsorbierenden Proteinen bedeckt werden und dadurch unterschiedliche Oberflächeneigenschaften aufweisen [Baier 1975], allerdings zeigten die Untersuchungen von Jendresen und Glantz, dass diese Effekte meistens vernachlässigbar sind [Jendresen and Glantz 1981]. Eine andere Studie betrachtete den Zusammenhang zwischen der Zusammensetzung des frühen erworbenen Pellikels und der Beschaffenheit des untersuchten Festkörpers; es zeigte sich, dass die Zusammensetzung von der Beschaffenheit abhängig ist und dass die Pellikelzusammensetzung deshalb bei unterschiedlichen Restaurationsmaterialien variieren kann [Sönju and Glantz 1975]. Sipahi et al. betonen, dass von der experimentell bestimmten freien Oberflächenenergie keine Rückschlüsse auf die molekularen Interaktionen zwischen Pellikel und Substrat gezogen werden können [Sipahi et al. 2001]. Außerdem wurde von Sipahi et al. nachgewiesen, dass die verwendeten Substrate, die zu Beginn saure und basische Eigenschaften aufgewiesen haben, nach der Beschichtung mit Speichel überwiegend basische Eigenschaften zeigten und es wurde bestätigt, dass durch Pellikelbildung keine identischen Oberflächeneigenschaften geschaffen werden, dass sich jedoch durch organische Beschichtung ein gewisser Homogenisierungseffekt einstellt [Sipahi et al. 2001]. Und nicht nur durch Beschichtung mit einem erworbenen Pellikel, sondern auch durch Beschichtung mit bovinem Serumalbumin (BSA) wurde in einer Untersuchung die freie Oberflächenenergie von Glas von 109 mJ/m² auf 82 mJ/m² reduziert, während die freie Oberflächenenergie von Celluloseacetat von 58 mJ/m² auf 80 mJ/m² erhöht wurde – folglich waren die freien Oberflächenenergien beider Materialien nach BSA-Beschichtung sehr ähnlich [Pratt-Terpstra et al. 1987]. Des Weiteren haben Pratt-Terpstra et al. in ihren

Untersuchungen gezeigt, dass die Beschichtung mit einem erworbenen Pellicel maßgeblichen Einfluss auf die bakterielle Adhäsion hat. Nach der Bildung eines Proteinfilms auf den getesteten Materialien (Teflon, Glas, Celluloseacetat und Zahnschmelz) zeigte sich ein starker Abfall der bakteriellen Adhäsion auf allen vier Materialien (siehe Abb. 44); diese reduzierte Adhäsion wurde sowohl bei einem frühen Fünf-Minuten-Pellicel als auch bei einem gereiften Zwei-Stunden-Pellicel beobachtet [Pratt-Terpstra et al. 1989]. Die Beschichtung mit bovinem Serumalbumin hat ebenfalls zur Reduktion bakterieller Adhäsion geführt [Gibbons and Etherden 1985; Pratt-Terpstra et al. 1987, 1989]. Allerdings wurde von Pratt-Terpstra et al. und anderen Autoren berichtet, dass der Einfluss der eigentlichen Oberflächeneigenschaften, trotz Beschichtung mit Pellicel oder Rinderserum, nicht vollständig beseitigt wird („shine-through-effect“) [Abbott et al. 1983; Pratt-Terpstra et al. 1987, 1989; Müller et al. 2007].

In der vorliegenden Untersuchung zeigten sich durch die Dotierung der *Palapress® vario*-Prüfkörper mit Metalloxid-Nanopartikeln keine signifikanten Änderungen der freien Oberflächenenergie im Vergleich zu den unmodifizierten *Palapress® vario*-Prüfkörpern. Die Mengen der verwendeten Metalloxid-Nanopartikel waren vermutlich zu gering, um zu Unterschieden zu führen; desweiteren hat die Beschichtung mit Pellicel möglicherweise auch in den vorliegenden Untersuchungen zur Angleichung der freien Oberflächenenergien geführt. Das lässt den Schluss zu, dass eventuelle signifikante Unterschiede in der Biofilmbildung nicht mit der freien Oberflächenenergie der verschiedenen Festkörper zusammenhängen.

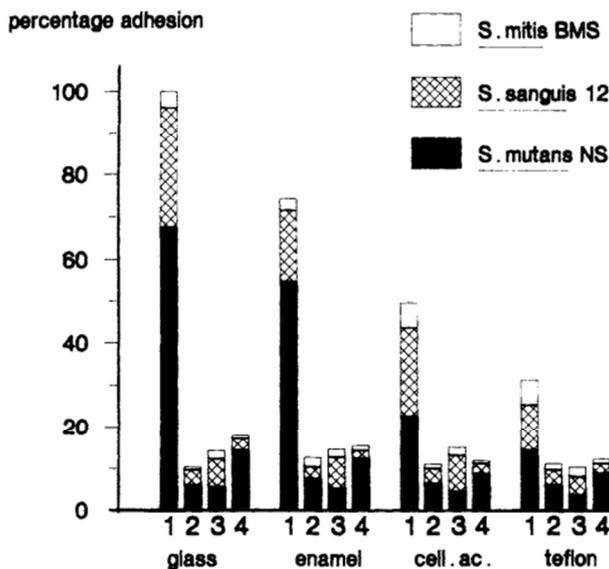


Abb. 46: Darstellung der prozentuale Adhäsion von *S. mitis*, *S. sanguis* und *S. mutans* an Glas, Zahnschmelz, Zelluloseacetat und Teflon (Summe aller adhärenenten Bakterien auf sauberen Glas-Prüfkörpern entspricht 100%-Wert): (1) unbeschichtetes Substrat; (2) nach zweistündiger Speichlexposition; (3) nach fünfminütiger Speichlexposition; (4) nach fünfminütiger BSA-Exposition (BSA = bovinem Serumalbumin) [Pratt-Terpstra et al. 1989].

Biofilmbildung

In der vorliegenden Arbeit wurden die mikrobiellen Adhäsionsversuche als *in vitro*-Untersuchungen durchgeführt. Um die Biofilmbildung dennoch möglichst realitätsnah zu simulieren, wurde sowohl die Bildung eines *erworbenen Pellicels* als auch die Anlagerung von Mikroorganismen unter sterilen

Bedingungen nachgeahmt, um äußere, unerwünschte Einflüsse möglichst ausschließen zu können. Trotz exakter Durchführung der Laborarbeiten ist man sich bewusst, dass eine *in vitro*-induzierte Biofilmbildung immer gewisse Unterschiede zur *in vivo*-induzierten Biofilmbildung aufweisen wird, da die individuellen Schwankungen des oralen Mundmilieus, Muskelbewegungen sowie Speichelmenge und -zusammensetzung nicht exakt simuliert werden können. Aus diesem Grund sollten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit klinischen Studien bestätigt werden.

In den einzelnen Versuchen zeigten sich starke Schwankungen bei den Werten der Referenzmaterialien; dies ist trotz exakter Laborarbeit durch Pipettier- und Messfehler möglich. Außerdem kann ein teilweises Ablösen adhärenter Zellen beim Spülen der Prüfkörper mit Pufferlösung nicht ausgeschlossen werden. Der Spülvorgang wurde so vorsichtig wie möglich durchgeführt, aber dennoch kann man nicht verhindern, dass sich einzelne viable Zellen vom entstandenen Biofilm ablösen und mit der Spüllösung vorzeitig abgesaugt werden.

Mithilfe der MTT-Assays wurde die relative Zellzahl – anhand der optischen Dichte – als Maß für die Biofilmbildung bestimmt. Bei den Untersuchungen des Monospeziesbiofilms aus *Candida albicans* wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den modifizierten Prothesenkunststoff-Prüfkörpern und den unmodifizierten Referenz-Prüfkörpern festgestellt. Bei den Untersuchungen des Multispeziesbiofilms aus *Candida albicans*, *Actinomyces naeslundii* und *Streptococcus gordonii* wurden teilweise signifikante Unterschiede zwischen den mit Zinkoxid modifizierten *Palapress*[®] *vario*-Prüfkörpern und den unmodifizierten *Palapress*[®] *vario*-Prüfkörpern festgestellt. Aufgrund der möglichen oben genannten Messungenauigkeiten lassen diese wenigen signifikanten Unterschiede, allerdings keinen allgemein gültigen Schluss zu. Für die beiden Referenzmaterialien *Wirobond*[®] *LFC* und *Sinfony*[™] wurden bei beiden Biofilmodellen häufig höhere Werte gemessen als für die modifizierten und unmodifizierten *Palapress*[®] *vario*-Prüfkörper, was zu signifikanten Unterschieden geführt hat; diese Ergebnisse sind für die Überprüfung der Untersuchungs-Hypothese nicht relevant.

Neben den verschiedenen Prüfkörper-Materialien haben die unterschiedlichen Inkubationszeiten von 20 und 44 Stunden teilweise zu signifikanten Unterschieden bzgl. der Biofilmbildung geführt. Sowohl bei den Untersuchungen des Mono- als auch des Multispeziesbiofilms wurden signifikante Unterschiede in der Biofilmbildung festgestellt. Aber auch hier konnte vermutlich aufgrund von Messungenauigkeiten kein einheitliches Ergebnis erlangt werden. Die Ergebnisse der MTT-Assays weisen die Hypothese, dass durch Modifikation des Prothesenbasismaterials mit Metalloxid-Nanopartikeln die Biofilmbildung verändert werden kann, zurück.

Die fluoreszenzmikroskopischen Bilder wurden anhand der von Mikroorganismen besiedelten Flächen ausgewertet; so konnte ein Rückschluss auf die adhären, lebensfähigen Zellen gezogen werden und eine Messung der Flächenprozent diene als Maß für die Biofilmbildung. Die fluoreszenzmikroskopische Analyse kann dabei nur bedingt als quantitative Messmethode angesehen werden, da die drei Stellen, die pro Prüfkörper mit dem Fluoreszenzmikroskop aufgenommen wurden, rein zufällig ausgewählt waren und nicht dem gesamten adhären Zellerasen entsprechen, der sich auf der Gesamtfläche des Prüfkörpers angelagert hat. Dies spiegelt sich in den Ergebnisse wider, da, wie bei der MTT-Auswertung, die Werte der Referenzmaterialien in den verschiedenen Versuchen sehr stark variieren.

Bei den Auswertungen des Monospeziesbiofilms wurden teilweise signifikante Unterschiede zwischen modifizierten *Palapress*[®] *vario*-Prüfkörpern und den reinen *Palapress*[®] *vario*-Prüfkörpern

festgestellt. An den beiden Referenzmaterialien *Wirobond*[®] LFC und *Sinfony*[™] wurde eine sehr hohe mikrobielle Adhäsion gemessen, was zu signifikanten, aber für die Untersuchungshypothese irrelevanten Unterschieden geführt hat. Bei den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen des Multispeziesbiofilms wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den *Palapress*[®] vario-Prüfkörpern mit Metalloxid-Nanopartikel-Zusätzen und den reinen *Palapress*[®] vario-Prüfkörpern gefunden. Auf den Referenzmaterial-Prüfkörpern, vor allem auf den *Wirobond*[®] LFC-Prüfkörpern, wurde signifikant mehr Biofilmbildung detektiert als auf den restlichen Prüfkörpern.

In der fluoreszenzmikroskopischen Auswertung wurden aufgrund der Inkubationszeiten von 20 und 44 Stunden ebenfalls signifikante Unterschiede bzgl. der Biofilmbildung festgestellt. Bei den Untersuchungen des Monospeziesbiofilms wurden teilweise signifikante Unterschiede festgestellt; allerdings kann aufgrund der variierenden Ergebnisse kein eindeutiges Fazit daraus gezogen werden. Bei den Untersuchungen des Multispeziesbiofilms wurde in einem Versuch nach 44 Stunden mehr mikrobielle Adhäsion festgestellt, dies hat zu signifikanten, aber wegen der Unregelmäßigkeit der Ergebnisse vernachlässigbaren Unterschieden geführt. Die fluoreszenzmikroskopische Analyse bestätigt somit die MTT-Analyse und die Zurückweisung der Untersuchungs-Hypothese.

Anhand der rasterelektronenmikroskopischen Bilder konnten bei beiden Biofilmmodellen keine qualitativen Unterschiede bezüglich der Biofilmbildung auf modifizierten *Palapress*[®] vario-Prüfkörpern und den unmodifizierten *Palapress*[®] vario-Prüfkörpern beobachtet werden. Auf den Prüfkörpern mit Monospeziesbiofilm zeigte sich *Candida albicans* in seinen typischen Formen – sowohl kleine, oval-rundliche Sporen, die sich bei konstantem Wachstum häufig zu einem dichten Zellrasen zusammenlagern, als auch längliche, dünne Hyphen, die vermehrt nach längerer Inkubationszeit auftreten [Molero et al. 1998; Groß 2009]. Der Multispeziesbiofilm hebt sich deutlich vom Monospeziesbiofilm ab, da zusätzlich zu den Sporen- und Hyphenformen des *C. albicans* die kleinen kugelrunden Zellen des *Streptococcus gordonii* sichtbar sind, die sich häufig in Kettenform zusammenlagern; *Actinomyces naeslundii* tritt in Stäbchenform auf. Teilweise verdeutlichen die rasterelektronenmikroskopischen Bilder sehr gut das Auftreten der Mikroorganismen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit (siehe Abb. 43) – nach 20 Stunden Inkubationszeit überwiegen die Bakterienzellen, während nach 44 Stunden die Pilzzellen den Zellrasen dominieren. Über die Quantität des Biofilmes kann anhand der rasterelektronenmikroskopischen Bilder keine Aussage getroffen werden, da lediglich kleine Ausschnitte der Prüfkörper aufgenommen wurden. Des Weiteren kann keine Aussage über die Dicke des jeweiligen Biofilmes getroffen werden, da hierzu die Untersuchung mittels Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM) notwendig ist, die in der vorliegenden Arbeit nicht angewandt wurde.

Insgesamt zeigte das Beimengen von Zinkoxid-, Calciumoxid- und Titandioxid-Nanopartikeln zu einem konventionellen Prothesenbasiskunststoff in den vorliegenden Untersuchungen für beide Biofilmmodelle keinen signifikanten Einfluss auf die relative, viable Zellzahl. In anderen Studien wurden allerdings antimikrobielle Effekte von Metalloxid-Nanopartikeln nachgewiesen. Arai et al. haben beispielsweise gezeigt, dass das Beschichten von Kunststoffprothesen mit Titandioxid die Adhäsion von *Candida albicans* hemmt [Arai et al. 2009]. Sawai et al. haben nachgewiesen, dass MgO-, CaO- und ZnO-Nanopartikel antifungale Effekte besitzen [Sawai and Yoshikawa 2004] und Azam et al. zeigten vor allem die bakterizide Wirkung von ZnO-Nanopartikeln [Azam et al. 2012]. Es stellt sich also die Frage, warum in der vorliegenden Arbeit keine antimikrobiellen Effekte festgestellt werden konnten.

Ein möglicher Grund dafür könnte in der geringen Konzentration der verwendeten Nanopartikel liegen, denn die Intensität der antimikrobiellen Aktivität der Metalloxid-Nanopartikel ist abhängig von der Partikelkonzentration [Sawai 2003; Raghupathi et al. 2011]. Emami-Karvani et al. haben berichtet, dass eine gesteigerte Partikelkonzentration die antibakterielle Wirkung erhöht [Emami-Karvani and Chehrizi 2011]. Um eine Beeinträchtigung der mechanischen Eigenschaften des Prothesenbasiskunststoffes zu vermeiden, wurden in der vorliegenden Arbeit als höchste Konzentration 0,8 Gewichts-Prozent der einzelnen Nanopartikel verwendet. Möglicherweise waren die verwendeten Konzentrationen zu niedrig, um einen relevanten Effekt auf die Biofilmbildung auszuüben. In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurden verschiedene Konzentrationen von ZnO-Nanopartikeln zu einem Polymethylmethacrylat gemischt. Mit steigender ZnO-Konzentration (2,5 m% bis 7,5 m%) zeigte sich ein stetig wachsender antifungaler Effekt gegen die Biofilmbildung von *Candida albicans* [Cierech et al. 2016]. Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit wurde in den Untersuchungen von Cierech et al. auf die Simulation eines *erworbenen Pellikels* verzichtet – das lässt die Vermutung zu, dass die in der vorliegenden Untersuchung induzierte Pellikelschicht möglicherweise den antimikrobiellen Effekt von Metalloxid-Nanopartikeln hemmt. Da ein auf Festkörpern gebildetes Pellikel erwiesenermaßen Auswirkungen auf die freie Oberflächenenergie der Festkörper sowie auf Adhäsion und Proliferation von Mikroorganismen hat [Pratt-Terpstra et al. 1987; Quirynen et al. 1989; Teughels et al. 2006], ist es vorstellbar, dass auch die Effekte der Metalloxid-Nanopartikel durch ein anhaftendes Pellikel verändert werden können. Dieser mögliche Zusammenhang zwischen Pellikel und antimikrobieller Wirkung von Metalloxid-Nanopartikeln muss in weiteren Studien genauer betrachtet werden.

Auch Lipovsky et al. haben sich mit der Wirkung von Zinkoxid-Nanopartikeln auf die Lebensfähigkeit von *Candida albicans* beschäftigt und beobachtet, dass der antifungale Effekt stark von der Konzentration der ZnO-Nanopartikel abhängig ist. Bei einer ZnO-Konzentration von 0,1 ml/mg wurde eine Wachstumshemmung der *C. albicans*-Zellen von über 95% gemessen. Abb. 45 verdeutlicht die Abhängigkeit der antifungalen Wirksamkeit von der Nanopartikelkonzentration. Dieser starke Effekt lässt sich vermutlich darauf zurückführen, dass die ZnO-Nanopartikel direkt zur Pilzsuspension gemischt wurden und die verwendeten ZnO-Konzentrationen deutlich höher waren als in der vorliegenden Arbeit. Außerdem wurde in dieser Untersuchung festgestellt, dass die Anregung der ZnO-Nanopartikel durch sichtbares Licht den Hefezelltod deutlich erhöht [Lipovsky et al. 2011].

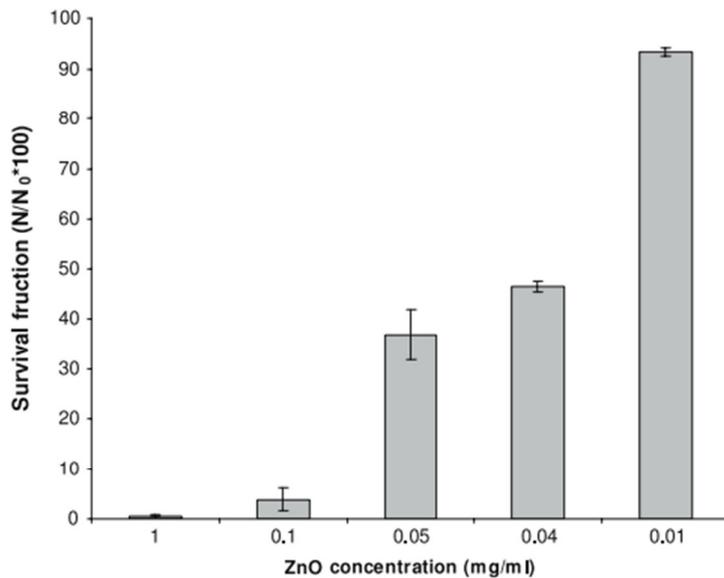


Abb. 47: Bestimmung der minimalen fungiziden Konzentration für Nanopartikel [Lipovsky et al. 2011].

Ein weiterer möglicher Grund ist die Größe der verwendeten Nanopartikel. Studien haben gezeigt, dass die antimikrobielle Aktivität der Nanopartikel von ihrer Partikelgröße abhängig ist; so steigt die bakterizide Wirkung mit sinkender Größe der Nanopartikel [Padmavathy and Vijayaraghavan 2008; Emami-Karvani and Chehrizi 2011; Dizaj et al. 2014]. Möglicherweise waren die in der vorliegenden Untersuchung verwendeten Partikel zu groß, um einen antimikrobiellen Effekt aufzuweisen. Gegen diese Überlegung spricht aber die Untersuchung von Raghupathi et al., die den Schwellenwert für ZnO-Nanopartikel auf 100 nm festgelegt hat, da bei größeren ZnO-Nanopartikeln kein bakteriostatischer Effekt gegenüber dem *methicillin-resistenten Staphylococcus aureus*-Bakterium festgestellt wurde [Raghupathi et al. 2011]. Die hier verwendeten ZnO- und TiO₂-Nanopartikel waren kleiner als 100 nm; deshalb ist es zweifelhaft, ob diese Überlegungen als stichhaltige Erklärung für die hier beobachteten Ergebnisse dienen können.

Neben Konzentration und Größe der Metalloxidnanopartikel spielt eventuell auch die Morphologie der Nanopartikel eine wichtige Rolle. In einer Untersuchung wurden zwei verschiedene Formen von nanopartikulärem Zinkoxid verglichen (stäbchenförmiges und plättchenförmiges); es zeigte sich, dass die stäbchenförmigen ZnO-Nanopartikel eine höhere Hemmung der getesteten Bakterien (*Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*) aufgewiesen haben als die plättchenförmigen [Mohd Bakhori et al. 2017]. Um diese Vermutung zu bestätigen müssen noch weitere Studien durchgeführt werden. Das Forschungsteam um Buzea hat in ihrer Untersuchung die Oberfläche der Nanopartikel genauer untersucht und Folgendes festgestellt: je größer die Oberfläche der Nanopartikel ist, desto stärker ist die bakterizide Wirkung [Buzea et al. 2007]. Auch diesbezüglich müssen noch genauere Untersuchungen folgen.

Weitere mögliche Gründe für die Hemmung der antimikrobiellen Aktivität der beigemengten Nanopartikel sind eventuelle Klumpen- oder Entmischungseffekte, da nicht ausgeschlossen werden kann, dass sich die Nanopartikel im Prothesenbasiskunststoff zusammengelagert oder vom Kunststoff entmischt haben, anstatt sich gleichmäßig darin zu verteilen. Außerdem ist es, durch die

ergänzende Zugabe der Nanopartikel bei der Kunststoffherstellung, möglich, dass Prüfkörper entstanden sind, bei denen die Nanopartikel in der Kunststoffmatrix eingebettet und dadurch nicht direkt an der Prüfkörperoberfläche verfügbar sind; dies könnte eine Erklärung für den geringen antimikrobiellen Effekt in der vorliegenden Arbeit sein. Memarzadeh et al. haben die Verwendung von nanopartikulärem Zinkoxid als Beschichtungsmaterial für zahnärztliche Implantate untersucht. Hierbei wurde das nanopartikuläre Zinkoxid mittels elektrohydrodynamischer Zerstäubung auf die zu untersuchenden Substrate aufgebracht und es konnten antimikrobielle sowie biokompatible Effekte nachgewiesen werden [Memarzadeh et al. 2015]. Eine andere *in vivo*-Untersuchung befasst sich mit der Bakterienanlagerung auf Brackets, die vorher mit Kupferoxid-Nanopartikeln, Zinkoxid-Nanopartikeln oder einem Gemisch der beiden beschichtet wurden. Es zeigten sich bei allen drei Arten starke antimikrobielle Effekte, obwohl die Nanopartikel nur äußerlich auf die Brackets aufgetragen wurden [Ramazanzadeh et al. 2015]; möglicherweise ist das Beschichten der Grund dafür, dass die antimikrobiellen Effekte der außen anliegenden Nanopartikel stärker sind als die Effekte der eingearbeiteten Nanopartikel in der vorliegenden Arbeit.

6 Zusammenfassung

Viele Menschen in Deutschland sind Träger eines herausnehmbaren Zahnersatzes. Nach Einbringen der zahnärztlichen Prothesen in die Mundhöhle bildet sich darauf innerhalb kürzester Zeit eine dünne Schicht aus Speichelproteinen – das *erworbene Pellikel*. Dieses Pellikel dient den oralen Mikroorganismen als erste Adhäsionsgrundlage. In den folgenden Stunden bildet sich ein ‚gereiftes Pellikel‘, das bei unzureichender Reinigung der Zähne in eine Plaque übergeht. Initiale Adhäsionsvorgänge lassen die Plaque reifen und führen über sekundäre Adhäsionsvorgänge zu einem strukturierten, zähen, verfilzten Biofilm aus Speichelbestandteilen, bakteriellen Stoffwechselprodukten, Nahrungsresten und Bakterienzellen [Klimek and Hellwig 1999]. Der stetig wachsende Biofilm kann bei unzureichender Mundhygienefähigkeit und eingeschränkten manuellen Fähigkeiten innerhalb kurzer Zeit zu einem hohen Keimreservoir werden. Daraus resultieren häufig Erkrankungen, wie z.B. Prothesenstomatopathien, Cheilitis angularis, Candidiasis oder Candida-Pneumonien. Um die Adhäsion von Mikroorganismen auf zahnärztlichen Werkstoffen möglichst gering zu halten, befassen sich viele Untersuchungen mit den Möglichkeiten der Modifikation und Bearbeitung zahnärztlicher Prothesenwerkstoffe. Dabei wurden in einigen Untersuchungen antifungale und bakteriostatische Effekte von Metalloxid-Nanopartikeln festgestellt.

Die vorliegende *in vitro*-Untersuchung diente dazu, den Effekt des Beimengens von Zinkoxid-, Calciumoxid- und Titandioxid-Nanopartikeln zu harzbasiertem Prothesenbasiskunststoff auf die Biofilmbildung zu überprüfen. Standardisierte Prüfkörper aus einem handelsüblichen, kalt-härtenden Prothesenbasiskunststoff wurden mit 0,1, 0,2, 0,4 und 0,8 Gewichtsprozent von handelsüblichen Nanopulvern aus ZnO, CaO und TiO₂ versetzt. Die Oberflächenrauigkeit wurde mittels Perthometer, die freie Oberflächenenergie mittels Kontaktwinkelmessung bestimmt; die Biofilmbildung wurde zum einen durch einen Monospeziesbiofilm aus *Candida albicans*, zum anderen durch einen Multispeziesbiofilm aus *Candida albicans*, *Actinomyces naeslundii* und *Streptococcus gordonii* simuliert. Eine vorherige Inkubation mit Speichel induzierte die Bildung eines *erworbenen Pellikels* auf den Prüfkörpern. Die relative viable Zellzahl wurde nach 20 Stunden und 44 Stunden Inkubationszeit bestimmt. Fluoreszenzmikroskopische und rasterelektronenmikroskopische Bilder dienten zusätzlich der quantitativen und qualitativen Auswertung. Zwischen den verschiedenen Materialien wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede bezüglich der Oberflächenrauigkeit, der freien Oberflächenenergie und der relativen viablen Zellzahl festgestellt. Die Ergebnisse zeigen, dass das Beimengen von handelsüblichen Nanopulvern aus ZnO, CaO und TiO₂ zu Prothesenbasiskunststoff-Materialien die Biofilmbildung auf den Materialoberflächen nicht hemmt. Weitere Studien sollten den Einfluss variierender Nanopartikelgrößen und eine Erhöhung der Nanopartikel-Zugabe thematisieren.

7 Resümee

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss von Metalloxid-Nanopartikeln (hier verwendet wurden Zinkoxid, Calciumoxid und Titandioxid) auf die Biofilmbildung auf zahnärztlichen Prothesenwerkstoffen zu untersuchen. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Biofilmbildung, die auf die nanopartikulären Zusätze zurückzuführen sind. Aus diesem Grund sind weitere Studien zur möglichen Beeinflussung und Reduktion der Biofilmbildung auf zahnärztlichen Materialien durch Metalloxid-Nanopartikel nötig. Die Nanopartikelgröße sollte versuchsweise verringert und die Konzentration der Nanopartikel erhöht werden. Außerdem sind andere Methoden bzgl. der Vermengung oder Inkorporation der Nanopartikel mit den Materialien nötig sowie die Untersuchung weiterer Nanopartikelarten wie z.B. Magnesiumoxid, Silberoxid oder Siliziumdioxid.

Neben dem Zusatz von Metalloxid-Nanopartikeln werden auch andere Zusatzstoffe getestet, die zur aktiven Wirkstofffreisetzung und dadurch geringerer Biofilmbildung führen können. Beispielweise werden stark säurelösliche, fluoridhaltige Glaspulver zugesetzt, die sich im Laufe der Zeit unter Fluoridabgabe zersetzen und die mikrobielle Adhäsion verringern sollen. Auch vorreagierte Glasionomer-Füllpartikel werden beigemischt, um einen positiven Effekt zwischen Fluoridfreisetzung und Biofilmbildung zu erlangen. Die Zugabe von bakteriziden Stoffen wie Chlorhexidin oder Triclosan kann ebenfalls als mögliche Option in Betracht gezogen werden.

Weiterhin sind die Oberflächeneigenschaften der Restaurationsmaterialien zu beachten. Bisher ist bekannt, dass eine geringe Rauigkeit und eine niedrige freie Oberflächenenergie dazu beitragen, dass möglichst wenige Mikroorganismen adhären. Es wird allerdings immer deutlicher, dass noch andere Oberflächeneigenschaften Einwirkungen auf die Adhäsion von Mikroorganismen haben. Dazu könnten die spezifischen chemischen Eigenschaften wie Zusammensetzung und Struktur sowie Oberflächenladung eines Materials zählen; dies wurde bisher wenig untersucht. Deshalb wäre es sinnvoll, bei künftigen Studien die untersuchten Materialien hinsichtlich weiterer Oberflächeneigenschaften zu charakterisieren und zu optimieren, um die Biofilmbildung initial einzuschränken. Es gibt Ansätze, die Struktur von Polymethylmethacrylaten grundsätzlich zu verbessern, indem sie mit Glasfasern (unidirektional oder gewebt) verstärkt werden, um die mechanischen und chemischen Eigenschaften zu verbessern.

Überdies sollte dem menschlichen Speichel große Aufmerksamkeit gewidmet werden, da die Anwesenheit von Speichel stets zu einer verringerten mikrobiellen Adhäsion führt. Demnach ist es wichtig, die Speichelzusammensetzung und -menge bei Prothesenträgern gegebenenfalls durch Suspensionen, Kautabletten oder andere Mittel so zu optimieren, dass die Biofilmbildung minimiert wird.

Insofern steht zu hoffen, dass die vielen Möglichkeiten der Beeinflussung der Biofilmbildung weiterführend untersucht werden.

8 Literaturverzeichnis

References

- 3M ESPE. 2014. *Sinfony. Lichthärtendes Komposit zur Herstellung von Kronen, Brücke, Inlays und Onlays*. Gebrauchsinformation. http://multimedia.3m.com/mws/media/3825260/sinfonytm-indirect-lab-composite.pdf?fn=sinfony_ifu_we.pdf.
- ABBOTT, A., RUTTER, P.R., AND BERKELEY, R.C. 1983. The influence of ionic strength, pH and a protein layer on the interaction between *Streptococcus mutans* and glass surfaces. *Journal of general microbiology* 129, 2, 439–445.
- ABSOLOM, D.R., LAMBERTI, F.V., POLICOVA, Z., ZINGG, W., VAN OSS, C.J., AND NEUMANN, A.W. 1983. Surface thermodynamics of bacterial adhesion. *Applied and Environmental Microbiology* 46, 1, 90–97.
- ABU-ELTEEN, K.H., AND ABU-ALTEEN, R.M. 1998. The prevalence of *Candida albicans* populations in the mouths of complete denture wearers. *The new microbiologica* 21, 1, 41–48.
- AGUILERA, M.O., STAGNITTA, P.V., MICALIZZI, B., AND DE GUZMAN, ANA MARIA STEFANINI. 2005. Prevalence and characterization of *Clostridium perfringens* from spices in Argentina. *Anaerobe* 11, 6, 327–334.
- AHN, S.-J., LIM, B.-S., YANG, H.-C., AND CHANG, Y.-I. 2005. Quantitative analysis of the adhesion of cariogenic streptococci to orthodontic metal brackets. *The Angle orthodontist* 75, 4, 666–671.
- AL-HASHIMI, I., AND LEVINE, M.J. 1989. Characterization Of In Vivo Salivary-Derived Enamel Pellicle. *Archives of Oral Biology* 34, 4, 289–295.
- ALKUMRU, H.N., AND BEYDEMIR, K. 1992. The prevalence of *Candida albicans* in complete denture and removable partial denture wearers: a comparative study. *Journal of Marmara University Dental Faculty* 1, 3, 218–222.
- ALLAHVERDIYEV, A.M., ABAMOR, E.S., BAGIROVA, M., AND RAFAILOVICH, M. 2011. Antimicrobial effects of TiO(2) and Ag(2)O nanoparticles against drug-resistant bacteria and leishmania parasites. *Future Microbiol.* 6, 8, 933–940.
- 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. *Journal of Dental Research* 78, 12, 1821–1828.
- AMATO, R., AND PECORA, A. 1983. Presenza di *Candida albicans* nella cavita' orale di soggetti sani. *Bollettino della Società italiana di biologia sperimentale* 59, 4, 529–531.
- ANDERSON, W. 1986. Wettability Literature Survey- Part 2. Wettability Measurement. *Journal of Petroleum Technology* 38, 11, 1246–1262.
- ARAI, T., UEDA, T., SUGIYAMA, T., AND SAKURAI, K. 2009. Inhibiting microbial adhesion to denture base acrylic resin by titanium dioxide coating. *Journal of oral rehabilitation* 36, 12, 902–908.
- ARENDORF, T.M., AND WALKER, D.M. 1980. The prevalence and intra-oral distribution of *Candida albicans* in man. *Archives of Oral Biology* 25, 1, 1–10.
- ARENDORF, T.M., AND WALKER, D.M. 1987. Denture stomatitis. A review. *J Oral Rehabil* 14, 3, 217–227.
- ARIYARATNAM, M.T., WILSON, M.A., MACKIE, I.C., AND BLINKHORN, A.S. 1997. A comparison of surface roughness and composite/enamel bond strength of human enamel following the application of the Nd:YAG laser and etching with phosphoric acid. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials* 13, 1, 51–55.
- ARMSTRONG, W.G. 1968. Origin and nature of the acquired pellicle. *Proceedings of the Royal Society of Medicine* 61, 9, 923–930.
- ARMSTRONG, W.G. 1971. Characterisation studies on the specific human salivary proteins adsorbed in vitro by hydroxyapatite. *Caries research* 5, 3, 215–227.

- AUSCHILL, T.M., ARWEILER, N.B., BRECX, M., REICH, E., SCULEAN, A., AND NETUSCHIL, L. 2002. The effect of dental restorative materials on dental biofilm. *European journal of oral sciences* 110, 1, 48–53.
- AZAM, A., AHMED, S.A., OVES, M., KHAN, M.S., HABIB, S.S., AND MEMIC, A. 2012. Antimicrobial activity of metal oxide nanoparticles against Gram-positive and Gram-negative bacteria: a comparative study. *Int. J. Nanomedicine*, 7, 6003–6009.
- BABAAHMADY, K.G., MARSH, P.D., CHALLACOMBE, S.J., AND NEWMAN, H.N. 1997. Variations in the predominant cultivable microflora of dental plaque at defined subsites on approximal tooth surfaces in children. *Archives of Oral Biology* 42, 2, 101–111.
- BAIER, R.E. 1975. *Applied Chemistry at Protein Interfaces* 145. AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, WASHINGTON, D. C.
- BARAN, I., AND NALCACI, R. 2009. Self-reported denture hygiene habits and oral tissue conditions of complete denture wearers. *Archives of gerontology and geriatrics* 49, 2, 237–241.
- BARO, A.M., GARCIA, N., MIRANDA, R., VAZQUEZ, L., APARICIO, C., OLIVE, J., AND LAUSMAA, J. 1986. Characterization of surface roughness in titanium dental implants measured with scanning tunnelling microscopy at atmospheric pressure. *Biomaterials* 7, 6, 463–466.
- BASTIDAS, R.J., AND HEITMAN, J. 2009. Trimorphic stepping stones pave the way to fungal virulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 2, 351–352.
- BEGO BREMER GOLDSCHLÄGEREI. 2013. *Wirobond® LFC Gebrauchsanweisung. Kobalt-Chrom-Aufbrennlegierung*.
- BENNICK, A., CANNON, M., AND MADAPALLIMATTAM, G. 1979. The nature of the hydroxyapatite-binding site in salivary acidic proline-rich proteins. *The Biochemical journal* 183, 1, 115–126.
- BENNICK, A., CHAU, G., GOODLIN, R., ABRAMS, S., TUSTIAN, D., AND MADAPALLIMATTAM, G. 1983. The role of human salivary acidic proline-rich proteins in the formation of acquired dental pellicle in vivo and their fate after adsorption to the human enamel surface. *Archives of Oral Biology* 28, 1, 19–27.
- BERRIDGE, M.V., AND TAN, A.S. 1993. Characterization of the Cellular Reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular Localization, Substrate Dependence, and Involvement of Mitochondrial Electron Transport in MTT Reduction. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 303, 2, 474–482.
- BERRIDGE, M.V., TAN, A.S., MCCOY, K.D., AND WANG, R. 1996. The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays That Use Tetrazolium Salts. *Biochemica*, Band 4, 14–19.
- BIANCHI, C., BIANCHI, H.A., TADANO, T., PAULA, C.R., HOFFMANN-SANTOS, H.D., LEITE JR, D.P., AND HAHN, R.C. 2016. FACTORS RELATED TO ORAL CANDIDIASIS IN ELDERLY USERS AND NON-USERS OF REMOVABLE DENTAL PROSTHESES. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* 58, 17.
- BISWAS, S.K., AND CHAFFIN, W.L. 2005. Anaerobic growth of *Candida albicans* does not support biofilm formation under similar conditions used for aerobic biofilm. *Current microbiology* 51, 2, 100–104.
- BLUNDEN, R.E., OLIVER, R.G., AND O'KANE, C.O. 1994. Microbial growth on the surfaces of various orthodontic bonding cements. *British journal of orthodontics* 21, 2, 125–132.
- BOBEK, L.A., TSAI, H., BIESBROCK, A.R., AND LEVINE, M.J. 1993. Molecular cloning, sequence, and specificity of expression of the gene encoding the low molecular weight human salivary mucin (MUC7). *The Journal of biological chemistry* 268, 27, 20563–20569.
- BOLLEN, C.M., 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 : official publication of the Academy of Dental Materials* 13, 4, 258–269.

- BOLLEN, C.M., PAPAIOANNO, W., VAN ELDERE, J., SCHEPERS, E., QUIRYNEN, M., AND VAN STEENBERGHE, D. 1996. The influence of abutment surface roughness on plaque accumulation and peri-implant mucositis. *Clinical oral implants research* 7, 3, 201–211.
- BOWDEN, G.H., NOLETTE, N., RYDING, H., AND CLEGHORN, B.M. 1999. The diversity and distribution of the predominant ribotypes of *Actinomyces naeslundii* genospecies 1 and 2 in samples from enamel and from healthy and carious root surfaces of teeth. *Journal of Dental Research* 78, 12, 1800–1809.
- BRADWAY, S.D., BERGEY, E.J., JONES, P.C., AND LEVINE, M.J. 1989. Oral mucosal pellicle. Adsorption and transpeptidation of salivary components to buccal epithelial cells. *Biochemical Journal* 261, 887–896.
- BUDDECKE, E. 1981. *Biochemische Grundlagen der Zahnmedizin*. De Gruyter, Berlin/ New York.
- BUDTZ-JORGENSEN, E. 1978. Clinical aspects of *Candida* infection in denture wearers. *Journal of the American Dental Association (1939)* 96, 3, 474–479.
- BÜRGERS, R., GERLACH, T., HAHNEL, S., SCHWARZ, F., HANDEL, G., AND GOSAU, M. 2010a. In vivo and in vitro biofilm formation on two different titanium implant surfaces. *Clinical oral implants research* 21, 2, 156–164.
- BÜRGERS, R., HAHNEL, S., REICHERT, T.E., ROSENTRITT, M., BEHR, M., GERLACH, T., HANDEL, G., AND GOSAU, M. 2010b. Adhesion of *Candida albicans* to various dental implant surfaces and the influence of salivary pellicle proteins. *Acta biomaterialia* 6, 6, 2307–2313.
- BÜRGERS, R., ROSENTRITT, M., AND HANDEL, G. 2007. Bacterial adhesion of *Streptococcus mutans* to provisional fixed prosthodontic material. *The Journal of Prosthetic Dentistry* 98, 6, 461–469.
- BÜRGERS, R., ROSENTRITT, M., SCHNEIDER-BRACHERT, W., BEHR, M., HANDEL, G., AND HAHNEL, S. 2008. Efficacy of denture disinfection methods in controlling *Candida albicans* colonization in vitro. *Acta odontologica Scandinavica* 66, 3, 174–180.
- BÜRGERS, R., SCHNEIDER-BRACHERT, W., ROSENTRITT, M., HANDEL, G., AND HAHNEL, S. 2009. *Candida albicans* adhesion to composite resin materials. *Clinical oral investigations* 13, 3, 293–299.
- BUSSCHER, H.J. 1985. *Surface Free Energies And The Adhesion Of Oral Bacteria*. Dissertation, Rijksuniversiteit te Groningen.
- BUSSCHER, H.J., BOS, R., AND VAN DER MEI, H.C. 1995. Initial microbial adhesion is a determinant for the strength of biofilm adhesion. *FEMS microbiology letters* 128, 3, 229–234.
- BUZEA, C., PACHECO BLANDINO, I.I., AND ROBBIE, K. 2007. Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. *Biointerphases* 2, 7, MR17-MR172.
- CALDERONE, R.A., AND BRAUN, P.C. 1991. Adherence and receptor relationships of *Candida albicans*. *Microbiological Reviews* 55, 1, 1–20.
- CAMBONI, S., AND DONNET, M. 2016. Tooth Surface Comparison after Air Polishing and Rubber Cup: A Scanning Electron Microscopy Study. *The Journal of clinical dentistry* 27, 1, 13–18.
- CANNON, R.D., NAND, A.K., AND JENKINSON, H.F. 1995. Adherence of *Candida albicans* to human salivary components adsorbed to hydroxylapatite. *Microbiology (Reading, England)* 141 (Pt 1), 213–219.
- CARL ROTH GMBH. 2015. *Nährmedien. Mikrobiologische und molekularbiologische Nährmedien, Medienzusätze und Grundstoffe*.
https://www.carlroth.com/medias/sys_master/pdf_AT/pdf_AT/h13/h48/9333367439390.pdf.
- CARLEN, A., BORJESSON, A.C., NIKDEL, K., AND OLSSON, J. 1998. Composition of pellicles formed in vivo on tooth surfaces in different parts of the dentition, and in vitro on hydroxyapatite. *Caries research* 32, 6, 447–455.
- CARLEN, 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, 5, 481–487.

- CARLEN, A., OLSSON, J., AND RAMBERG, P. 1996. Saliva mediated adherence, aggregation and prevalence in dental plaque of *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis* and *Actinomyces* spp, in young and elderly humans. *Archives of Oral Biology* 41, 12, 1133–1140.
- CARRÉ, G., HAMON, E., ENNAHAR, S., ESTNER, M., LETT, M.-C., HORVATOVICH, P., GIES, J.-P., KELLER, V., KELLER, N., AND ANDRE, P. 2014. TiO₂ Photocatalysis Damages Lipids and Proteins in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 80, 8, 2573–2581.
- CHAMBERS, M.S., TOMSETT, K.L., ARTOPOULOU, I.I., GARDEN, A.S., EL-NAGGAR, A.K., MARTIN, J.W., AND KEENE, H.J. 2008. Salivary flow rates measured during radiation therapy in head and neck cancer patients: a pilot study assessing salivary sediment formation. *The Journal of Prosthetic Dentistry* 100, 2, 142–146.
- CHEN, L., MA, L., PARK, N.H., AND SHI, W. 2001. Cariogenic actinomyces identified with a beta-glucosidase-dependent green color reaction to *Gardenia jasminoides* extract. *Journal of clinical microbiology* 39, 8, 3009–3012.
- CHEN, P., CISAR, J.O., HESS, S., HO, J.T.C., AND LEUNG, K.P. 2007. Amended description of the genes for synthesis of *Actinomyces naeslundii* T14V type 1 fimbriae and associated adhesin. *Infection and Immunity* 75, 8, 4181–4185.
- CIERECH, M., KOLENDA, A., GRUDNIAK, A.M., WOJNAROWICZ, J., WOŹNIAK, B., GOŁAŚ, M., SWOBODA-KOPEĆ, E., ŁOJKOWSKI, W., AND MIERZWIŃSKA-NASTALSKA, E. 2016. Significance of polymethylmethacrylate (PMMA) modification by zinc oxide nanoparticles for fungal biofilm formation. *International journal of pharmaceutics* 510, 1, 323–335.
- CISAR, J.O., DAVID, V.A., CURL, S.H., AND VATTER, A.E. 1984. Exclusive presence of lactose-sensitive fimbriae on a typical strain (WVU45) of *Actinomyces naeslundii*. *Infection and Immunity* 46, 2, 453–458.
- CLARK, W.B., WEBB, E.L., WHEELER, T.T., FISCHLSCHWEIGER, W., BIRDELL, D.C., AND MANSHEIM, B.J. 1981. Role of surface fimbriae (fibrils) in the adsorption of *Actinomyces* species to saliva-treated hydroxyapatite surfaces. *Infection and Immunity* 33, 3, 908–917.
- CLARK, W.B., WHEELER, T.T., LANE, M.D., AND CISAR, J.O. 1986. *Actinomyces* adsorption mediated by type-1 fimbriae. *Journal of Dental Research* 65, 9, 1166–1168.
- COLEMAN, R.M., GEORG, L.K., AND ROZZELL, A.R. 1969. *Actinomyces naeslundii* as an agent of human actinomycosis. *Applied microbiology* 18, 3, 420–426.
- COOK, G.S., COSTERTON, J.W., AND LAMONT, R.J. 1998. Biofilm formation by *Porphyromonas gingivalis* and *Streptococcus gordonii*. *Journal of periodontal research* 33, 6, 323–327.
- CORRADO, O.J. 1990. Dentures. *BMJ (Clinical research ed.)* 301, 6763, 1265–1268.
- COULTHWAIT, L., AND VERRAN, J. 2007. Potential pathogenic aspects of denture plaque. *British journal of biomedical science* 64, 4, 180–189.
- COWAN, M.M., TAYLOR, K.G., AND DOYLE, R.J. 1986. Kinetic analysis of *Streptococcus sanguis* adhesion to artificial pellicle. *Journal of Dental Research* 65, 10, 1278–1283.
- CVIKL, B., LUSSI, A., MORITZ, A., SCULEAN, A., AND GRUBER, R. 2015. Sterile-filtered saliva is a strong inducer of IL-6 and IL-8 in oral fibroblasts. *Clinical oral investigations* 19, 2, 385–399.
- DATA PHYSICS INSTRUMENTS GMBH. 2015. *Beschreibung der analytischen Methode zur Charakterisierung der Oberflächenenergie und Polarität von flüssigen und festen Haftklebstoffen*, Filderstadt, Deutschland.
- DAWES, C., JENKINS, G.N., AND TONGE, C.H. 1963. The Nomenclature of the Integuments of the Enamel Surface of Teeth. *British Dental Journal* 16, 65–68.

- DECKER, E.-M., KLEIN, C., SCHWINDT, D., AND OHLE, C. von. 2014. Metabolic activity of *Streptococcus mutans* biofilms and gene expression during exposure to xylitol and sucrose. *International journal of oral science* 6, 4, 195–204.
- DEMUTH, DUAN, Y., BROOKS, W., HOLMES, A.R., MCNAB, R., AND JENKINSON, H.F. 1996. Tandem genes encode cell-surface polypeptides SspA and SspB which mediate adhesion of the oral bacterium *Streptococcus gordonii* to human and bacterial receptors. *Molecular microbiology* 20, 2, 403–413.
- DIZAJ, S.M., LOTFIPOUR, F., BARZEGAR-JALALI, M., ZARRINTAN, M.H., AND ADIBKIA, K. 2014. Antimicrobial activity of the metals and metal oxide nanoparticles. *Materials Science and Engineering C* 2014, Volume 44, 278–284.
- DORKO, E., JENCA, A., PILIPCINEC, E., DANKO, J., SVICKY, E., AND TKACIKOVA, L. 2001. Candida-associated denture stomatitis. *Folia microbiologica* 46, 5, 443–446.
- DOUGLAS, C.W. 1994. Bacterial-protein interactions in the oral cavity. *Advances in dental research* 8, 2, 254–262.
- DOUGLAS, L.J. 1985. Surface composition and adhesion of *Candida albicans*. *Biochemical Society transactions* 13, 6, 982–984.
- DUMMER, P.M.H., AND HARRISON, K.A. 1982. In vitro plaque formation on commonly used dental materials. *J Oral Rehabil* 9, 5, 413–417.
- EDGAR, W.M., DAWES, C., AND O'MULLANE, D.M., Eds. 2004. *Saliva and oral health*. British Dental Association, London.
- EDGERTON, M., SCANNAPIECO, F.A., REDDY, M.S., AND LEVINE, M.J. 1993. Human submandibular-sublingual saliva promotes adhesion of *Candida albicans* to polymethylmethacrylate. *Infection and Immunity* 61, 6, 2644–2652.
- EGLAND, P.G., DU LD, AND KOLENBRANDER, P.E. 2001. Identification of independent *Streptococcus gordonii* SspA and SspB functions in coaggregation with *Actinomyces naeslundii*. *Infection and Immunity* 69, 12, 7512–7516.
- EICK, S., GLOCKMANN, E., BRANDL, B., AND PFISTER, W. 2004. Adherence of *Streptococcus mutans* to various restorative materials in a continuous flow system. *J Oral Rehabil* 31, 3, 278–285.
- EKSTRAND, K.R., AND ZERO, D.T. 2012. Kapitel 1: Ökologie der Mundhöhle. In *Karies: Wissenschaft und klinische Praxis*, H. MEYER-LÜCKEL, S. PARIS AND K. EKSTRAND, Eds. Thieme, Stuttgart, 3–21.
- EL MEDAWAR, L., ROCHER, P., HORNEZ, J.-C., TRAINSEL, M., BREME, J., AND HILDEBRAND, H. 2002. Electrochemical and cytocompatibility assessment of NiTiNOL memory shape alloy for orthodontic use. *Biomolecular Engineering* 19, 2-6, 153–160.
- ELLEN, R.P. 1976. Establishment and distribution of *Actinomyces viscosus* and *Actinomyces naeslundii* in the human oral cavity. *Infection and Immunity* 14, 5, 1119–1124.
- ELLEN, R.P., AND GIBBONS, R.J. 1974. Parameters affecting the adherence and tissue tropisms of *Streptococcus pyogenes*. *Infection and Immunity* 9, 1, 85–91.
- EMAMI-KARVANI, Z., AND CHEHRAZI, P. 2011. Antibacterial activity of ZnO nanoparticle on gram-positive and gram-negative bacteria. *African Journal of Microbiology Research* 5, 1368–1373.
- ENGEL, H.W., AND VAN SILFHOUT, A. 1981. Simplified coagglutination test for serological grouping of beta-hemolytic streptococci. *Journal of clinical microbiology* 14, 3, 252–255.
- ERNST, C.-P. 2010. Update Komposite Teil 1 – Eine Einteilung der Kompositmaterialien. *ZMK - Zahnheilkunde Management Kultur* 26, 4, 198–206.
- EWERS, G.J., TAYLOR, R.L., AND SCHOENFELD, C.M. 1977. Scanning electron microscopy of human dental pellicle and initial plaque formation in vivo. *Australian dental journal* 22, 6, 462–467.

- FILIPPIDI, A., GALANAKIS, E., MARAKI, S., GALANI, I., DROGARI-APIRANTHITOU, M., KALMANTI, M., MANTADAKIS, E., AND SAMONIS, G. 2014. The effect of maternal flora on *Candida* colonisation in the neonate. *Mycoses* 57, 1, 43–48.
- FINCH, R.G., AND PHILLIPS, I. 1977. Serological grouping of streptococci by a slide coagglutination method. *Journal of clinical pathology* 30, 2, 168–170.
- FRIEDMAN, M.T., BARBER, P.M., MORDAN, N.J., AND NEWMAN, H.N. 1992. The "plaque-free zone" in health and disease: a scanning electron microscope study. *Journal of periodontology* 63, 11, 890–896.
- FUSAYAMA, T., KATAYORI, T., AND NOMOTO, S. 1963. Corrosion of Gold and Amalgam Placed in Contact with Each other. *Journal of Dental Research* 42, 5, 1183–1197.
- GAUDREAU, C., DELAGE, G., ROUSSEAU, D., AND CANTOR, E.D. 1981. Bacteremia caused by viridans streptococci in 71 children. *Canadian Medical Association journal* 125, 11, 1246–1249.
- GEIS-GERSTORFER, J., EICHNER, K., AND KAPPERT, H.F., Eds. 2005. *Zahnärztliche Werkstoffe und ihre Verarbeitung. Band 1: Grundlagen und Verarbeitung*. Kapitel 5: Nichtedelmetalllegierungen, S. 119–172 Band 1. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- GIBBONS, R.J., AND ETHERDEN, I. 1985. Albumin as a blocking agent in studies of streptococcal adsorption to experimental salivary pellicles. *Infection and Immunity* 50, 2, 592–594.
- GIBBONS, R.J., HAY, D.I., CISAR, J.O., AND CLARK, W.B. 1988. Adsorbed salivary proline-rich protein 1 and statherin: receptors for type 1 fimbriae of *Actinomyces viscosus* T14V-J1 on apatitic surfaces. *Infection and Immunity* 56, 11, 2990–2993.
- GIBBONS, R.J., AND VAN HOUTE, J. 1973. On the Formation of Dental Plaques. *Journal of Periodontology* 44, 347–360.
- GLEIZNYS, A., ZDANAVICIENE, E., AND ZILINSKAS, J. 2015. *Candida albicans* importance to denture wearers. A literature review. *Stomatologija* 17, 2, 54–66.
- GOEGAN, P., JOHNSON, G., AND VINCENT, R. 1995. Effects of serum protein and colloid on the alamarBlue assay in cell cultures. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 9, 3, 257–266.
- GONZALEZ-BARCA, E., FERNANDEZ-SEVILLA, A., CARRATALA, J., GRANENA, A., AND GUDIOL, F. 1996. Prospective study of 288 episodes of bacteremia in neutropenic cancer patients in a single institution. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology* 15, 4, 291–296.
- GONZÁLEZ-CABEZAS, C., LI, Y., NOBLITT, T.W., GREGORY, R.L., KAFRAWY, A.H., AND STOOKEY, G.K. 1995. Detection of mutans streptococci in secondary carious lesions using immunofluorescent techniques and confocal laser scanning microscopy. *Caries research* 29, 3, 198–203.
- 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, 10, 637–642.
- GROB, U. 2009. *Kurzlehrbuch Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie [MEDI-LEARN-Gütesiegel]*. Thieme, Stuttgart.
- HAGHIGHI, F., ROUDBAR MAHAMMADI, S., MOHAMMADI, P., HOSSEINKHANI, S., AND SHIDPOUR, R. 2013. Antifungal Activity of TiO₂ nanoparticles and EDTA on *Candida albicans* Biofilms. *Infection Epidemiology & Medicine* 1, 1, 33–38.
- HAHNEL, S. 2007. *Die Eignung von Proteinmischungen als Speichellersatz für die bakterielle in vitro Adhäsion*. Dissertation, Universität Regensburg.
- HAHNEL, S., ETTL, T., GOSAU, M., ROSENTRIT, M., HANDEL, G., AND BURGERS, R. 2010. 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, 5, 391–396.

- HAHNEL, S., ROSENTRITT, M., BURGERS, R., AND HANDEL, G. 2008a. Surface properties and in vitro *Streptococcus mutans* adhesion to dental resin polymers. *Journal of materials science. Materials in medicine* 19, 7, 2619–2627.
- HAHNEL, S., ROSENTRITT, M., BURGERS, R., HANDEL, G., AND LANG, R. 2012. *Candida albicans* biofilm formation on soft denture liners and efficacy of cleaning protocols. *Gerodontology* 29, 2, e383-91.
- HAHNEL, S., ROSENTRITT, M., HANDEL, G., AND BURGERS, R. 2008b. Influence of saliva substitute films on initial *Streptococcus mutans* adhesion to enamel and dental substrata. *Journal of Dentistry* 36, 12, 977–983.
- HAHNEL, S., ROSENTRITT, M., HANDEL, G., AND BÜRGERS, R. 2009. In vitro evaluation of artificial ageing on surface properties and early *Candida albicans* adhesion to prosthetic resins. *Journal of materials science. Materials in medicine* 20, 1, 249–255.
- 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. *The journal of adhesive dentistry* 16, 4, 313–321.
- HAMADA, T., KAWASHIMA, M., WATANABE, H., TAGAMI, J., AND SENPUKU, H. 2004. Molecular interactions of surface protein peptides of *Streptococcus gordonii* with human salivary components. *Infection and Immunity* 72, 8, 4819–4826.
- 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, 2, 123–139.
- HANNIG, M. 1997. Transmission electron microscopic study of in vivo pellicle formation on dental restorative materials. *European journal of oral sciences* 105, 5 Pt 1, 422–433.
- HANNIG, M. 1999a. Transmission electron microscopy of early plaque formation on dental materials in vivo. *Eur J Oral Sci* 107, 1, 55–64.
- HANNIG, M. 1999b. Ultrastructural investigation of pellicle morphogenesis at two different intraoral sites during a 24-h period. *Clinical oral investigations* 3, 2, 88–95.
- HANNIG, M., AND BALZ, M. 2001. Protective properties of salivary pellicles from two different intraoral sites on enamel erosion. *Caries research* 35, 2, 142–148.
- HANNIG, M., AND HANNIG, H. 2007. Der initiale orale Biofilm - pathogen oder protektiv? *Oralprophylaxe & Kinderzahnheilkunde* 29, 73–82.
- HEIDEMANN, D. 2008. *Deutscher Zahnärzte Kalender 2009. Das Jahrbuch der Zahnmedizin*. Deutscher Ärzte-Verlag, Köln.
- HELLWIG, E., KLIMEK, J., AND ATTIN, T. 2007. *Einführung in die Zahnerhaltung*. Urban & Fischer, Elsevier GmbH, München.
- HELLWIG, E., KLIMEK, J., AND ATTIN, T. 2013. *Einführung in die Zahnerhaltung. Prüfungswissen Kariologie, Endodontologie und Parodontologie ; mit 63 Tabellen*. Dt. Zahnärzte-Verl., Köln.
- HENSSGE, U., DO, T., RADFORD, D.R., GILBERT, S.C., CLARK, D., AND BEIGHTON, D. 2009. Emended description of *Actinomyces naeslundii* and descriptions of *Actinomyces oris* sp. nov. and *Actinomyces johnsonii* sp. nov., previously identified as *Actinomyces naeslundii* genospecies 1, 2 and WVA 963. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 59, Pt 3, 509–516.
- HERAEUS KULZER. 2012. *Gebrauchsanweisung Palapress® vario*. http://heraeus-kulzer.de/media/webmedia_local/downloads_new/pala_7/palapress_vario/GBA_Palapress_vario_INT.pdf.
- HERAEUS KULZER. Stand 2015. *Geschichte Heraeus Kulzer Technik*. http://kulzer-technik.de/de_kt/kt/ueber_division_technik/geschichte/division_technik_historie.aspx.

- HERAEUS KULZER. 2016a. *Sicherheitsdatenblattgemäß 1907/2006/EG, Artikel 31. Palapress® vario-Flüssigkeit*. [http://msds.heraeus-dental.de/msds/MSDS2_-_Palapress_vario_Fl%C3%BCssigkeit_\(D\)_2.pdf](http://msds.heraeus-dental.de/msds/MSDS2_-_Palapress_vario_Fl%C3%BCssigkeit_(D)_2.pdf). Accessed 19 January 2016.
- HERAEUS KULZER. 2016b. *Sicherheitsdatenblattgemäß 1907/2006/EG, Artikel 31. Palapress® vario-Pulver*. [http://msds.heraeus-dental.de/msds/MSDS484_-_Palapress_vario_Pulver_\(D\)_2.pdf](http://msds.heraeus-dental.de/msds/MSDS484_-_Palapress_vario_Pulver_(D)_2.pdf). Accessed 19 January 2016.
- HICK, C. 2013. Kapitel 7: Ernährung, Verdauungstrakt, Leber. In *Physiologie*, C. HICK AND A. HICK, Eds. Urban & Fischer, Elsevier GmbH, München, 173–199.
- HIETALA, S.O., JONSSON, M., AND BURMAN, L.A. 1982. Candida albicans pneumonia. *Acta radiologica: diagnosis* 23, 5, 507–511.
- HINSBERG, K., AND SCHMID, G. 1953. Kapitel 5: Speichel. In *Untersuchung der Organe, Körperflüssigkeiten und Ausscheidungen*, F. BRUNS, Ed. Springer, Berlin Heidelberg, 357–361.
- HOLSINGER, F.C., AND BUI, D.T. 2007. Anatomy, Function and Evaluation of the Salivary Glands. In *Salivary Gland Disorders*, E. N. MYERS AND R. L. FERRIS, Eds. Springer, Berlin Heidelberg, 2–14.
- HORNSTEIN, O.P., GRÄSSEL, R., SCHIRNER, E., AND SCHELL, H. 1979. Orale Candida-Besiedlung bei Leukoplakien und Karzinomen der Mundhöhle. *Deutsche medizinische Wochenschrift (1946)* 104, 29, 1033–1036.
- HUBE, B. 2004. From commensal to pathogen: stage- and tissue-specific gene expression of Candida albicans. *Current opinion in microbiology* 7, 4, 336–341.
- HUELVES, L., DEL PRADO, G., GRACIA, M., RODRIGUEZ-CERRATO, V., AND PONTE, C. 2008. In vitro and in vivo activity of miltefosine against penicillin-sensitive and -resistant Streptococcus pneumoniae strains. *Journal of chemotherapy (Florence, Italy)* 20, 4, 441–444.
- HUMPHREY, S.P., AND WILLIAMSON, R.T. 2001. A review of saliva. Normal composition, flow, and function. *The Journal of Prosthetic Dentistry* 85, 2, 162–169.
- IINUMA, T., ARAI, Y., ABE, Y., TAKAYAMA, M., FUKUMOTO, M., FUKUI, Y., IWASE, T., TAKEBAYASHI, T., HIROSE, N., GIONHAKU, N., AND KOMIYAMA, K. 2015. Denture wearing during sleep doubles the risk of pneumonia in the very elderly. *Journal of Dental Research* 94, 3 Suppl, 28S–36.
- 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, 5, 458–465.
- JANDA, R., EICHNER, K., AND KAPPERT, H.F., Eds. 2005. *Zahnärztliche Werkstoffe und ihre Verarbeitung. Band 1: Grundlagen und Verarbeitung*. Kapitel 6: Chemie und Physik zahnärztlicher Kunststoffe, S.173-210 Band 1. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- JENDRESEN, M.D., AND GLANTZ, P.-O. 1981. Clinical Adhesiveness of Selected Dental Materials. *Acta odontologica Scandinavica* 39, 1, 39–45.
- JEONG, M.S., PARK, J.S., SONG, S.H., AND JANG, S.B. 2007. Characterization of antibacterial nanoparticles from the scallop, Pinctada yessoensis. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71, 9, 2242–2247.
- JIANG, J., PARK, N.J., HU, S., AND WONG, D.T. 2009. A universal pre-analytic solution for concurrent stabilization of salivary proteins, RNA and DNA at ambient temperature. *Archives of Oral Biology* 54, 3, 268–273.
- JOHNSTONE, H.A., AND MARCINAK, J.F. 1990. Candidiasis in the breastfeeding mother and infant. *Journal of obstetric, gynecologic, and neonatal nursing : JOGNN* 19, 2, 171–173.
- JONG, H.P. de, BOER, P. de, BUSSCHER, H.J., VAN PELT, A.W., AND ARENDS, J. 1984. Surface free energy changes of human enamel during pellicle formation. An in vivo study. *Caries research* 18, 5, 408–415.

- JONG, H.P. de, VAN PELT, A.W., AND ARENDS, J. 1982. Contact angle measurements on human enamel - an in vitro study of influence of pellicle and storage period. *Journal of Dental Research* 61, 1, 11–13.
- JORDAN, A.R., MICHEELIS, W., AND CHOLMAKOW-BODECHTEL, C., Eds. 2016a. *Fünfte Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS V)*. Materialienreihe / Institut der Deutschen Zahnärzte 35. Deutscher Zahnärzte Verlag DÄV, Köln.
- JORDAN, A.R., MICHEELIS, W., CHOLMAKOW-BODECHTEL, C., FÜBL-GRÜNIG, E., GEYER, S., HERTRAMPF, K., HOFFMANN, T., HOLTFRETER, B., KOCHER, T., NITSCHKE, I., NOFFZ, S., SCHARF, L., SCHIFFNER, U., SCHÜTZHOLD, S., STARK, H., AND ZIMMER, S. 2016b. *Fünfte Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS V) – Kurzfassung*. Institut der Deutschen Zahnärzte im Auftrag von Bundeszahnärztekammer und Kassenzahnärztlicher Bundesvereinigung, Berlin/Köln.
- JUNGERMANN, K., AND MÖHLER, H., Eds. 1980. *Biochemie. Ein Lehrbuch für Studierende der Medizin, Biologie und Pharmazie*. Springer, Berlin Heidelberg New York.
- JUNQUEIRA, J.C., COLOMBO, C.E.D., MARTINS, J.D.S., KOGA ITO, C.Y., CARVALHO, Y.R., AND JORGE, A.O.C. 2005. Experimental candidosis and recovery of *Candida albicans* from the oral cavity of ovariectomized rats. *Microbiology and immunology* 49, 3, 199–207.
- KATSIKOIANNI, M., AND MISSIRLIS, Y.F. 2004. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions. *European cells & materials* 8, 37–57.
- KAWAI, K., URANO, M., AND EBISU, S. 2000. Effect of surface roughness of porcelain on adhesion of bacteria and their synthesizing glucans. *The Journal of Prosthetic Dentistry* 83, 6, 664–667.
- KAWASHIMA, M., HANADA, N., HAMADA, T., TAGAMI, J., AND SENPUKU, H. 2003. Real-time interaction of oral streptococci with human salivary components. *Oral microbiology and immunology* 18, 4, 220–225.
- KILIC, A.O., TAO, L., ZHANG, Y., LEI, Y., KHAMMANIVONG, A., AND HERZBERG, M.C. 2004. Involvement of *Streptococcus gordonii* beta-glucoside metabolism systems in adhesion, biofilm formation, and in vivo gene expression. *Journal of bacteriology* 186, 13, 4246–4253.
- KIMURA, L.H., AND PEARSALL, N.N. 1978. Adherence of *Candida albicans* to human buccal epithelial cells. *Infection and Immunity* 21, 1, 64–68.
- KING, R.D., LEE, J.C., AND MORRIS, A.L. 1980. Adherence of *Candida albicans* and other *Candida* species to mucosal epithelial cells. *Infection and Immunity* 27, 2, 667–674.
- KIRSTEIN, M. 1986. *Zusammensetzung künstlicher Speichel und Ihre Anwendung in der Zahnheilkunde*, Eberhard-Karls-Universität.
- KLIMEK, J. 2007a. *Speichel & Mundgesundheit*, Gießen.
- KLIMEK, J. 2007b. *Speichel & Mundgesundheit. Ein Skript für Studenten zur Examensvorbereitung*. http://www.zahnerhaltung.ukw.de/fileadmin/uk/zahnerhaltung/Dokumente/StuDent_Skript.pdf. Accessed deu.
- KLIMEK, J., AND HELLWIG, E. 1999. Kariesätiologie und -diagnose. In *Kariologie und Füllungstherapie. Praxis der Zahnheilkunde 2*, D. HEIDEMANN, Ed. Urban & Schwarzenberg, München-Wien-Baltimore, 1–45.
- KLOTZ, S.A., DRUTZ, D.J., AND ZAJIC, J.E. 1985. Factors governing adherence of *Candida* species to plastic surfaces. *Infection and Immunity* 50, 1, 97–101.
- KNIGHT, L., AND FLETCHER, J. 1971. Growth of *Candida albicans* in saliva: stimulation by glucose associated with antibiotics, corticosteroids, and diabetes mellitus. *The Journal of infectious diseases* 123, 4, 371–377.
- KOCH, C., BÜRGERS, R., AND HAHNEL, S. 2013. *Candida albicans* adherence and proliferation on the surface of denture base materials. *Gerodontology* 30, 4, 309–313.

- KOLENBRANDER, P.E., ANDERSEN, R.N., AND MOORE, L.V. 1990. Intrageneric coaggregation among strains of human oral bacteria: potential role in primary colonization of the tooth surface. *Applied and Environmental Microbiology* 56, 12, 3890–3894.
- KOLENBRANDER, P.E., AND LONDON, J. 1993. Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. *Journal of bacteriology* 175, 11, 3247–3252.
- KOLENBRANDER, P.E., PALMER, R.J., JR, PERIASAMY, S., AND JAKUBOVICS, N.S. 2010. Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. *Nature reviews. Microbiology* 8, 7, 471–480.
- KOMMEREIN, N., STUMPP, S.N., MUSKEN, M., EHLERT, N., WINKEL, A., HAUSSLER, S., BEHRENS, P., BUETTNER, F.F.R., AND STIESCH, M. 2017. An oral multispecies biofilm model for high content screening applications. *PloS one* 12, 3, e0173973.
- KOPCZYNSKA, A., AND EHRENSTEIN, G.W. 2013. *Sonderdrucke. Oberflächenspannung von Kunststoffen, Messmethoden am LKT*. <https://www.lkt.uni-erlangen.de/publikationen/online-aufsaeetze/oberflaechenspannung.pdf>. Accessed 18 July 2013.
- KRÜGER, M., AND SEIDLER, T. 2007. Kapitel 4 - Allgemeine Bakteriologie. 4.10 Bakterielle Diagnostik. 4.10.2 Kulturverfahren zur Anzüchtung von Bakterien. In *Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. 127 Tabellen*, M. ROLLE, A. MAYR AND M. BÜTTNER, Eds. Enke, Stuttgart, 344–392.
- KRÜSS GMBH. 2015. *Kontaktwinkel*. <http://www.kruss.de/de/service/schulung-theorie/glossar/kontaktwinkel/>.
- KRÜSS GMBH. Stand - 2017a. *Freie Oberflächenenergie*. <https://www.kruss.de/de/service/schulung-theorie/glossar/freie-oberflaechenenergie/>.
- KRÜSS GMBH. Stand - 2017b. *Tropfenkonturanalyse*. <https://www.kruss.de/de/service/schulung-theorie/glossar/tropfenkonturanalyse/>.
- KUBOKI, Y., TERAOKA, K., AND OKADA, S. 1987. X-ray photoelectron spectroscopic studies of the adsorption of salivary constituents on enamel. *Journal of Dental Research* 66, 5, 1016–1019.
- KUBONIWA, M., TRIBBLE, G.D., JAMES, C.E., KILIC, A.O., TAO, L., HERZBERG, M.C., SHIZUKUISHI, S., AND LAMONT, R.J. 2006. *Streptococcus gordonii* utilizes several distinct gene functions to recruit *Porphyromonas gingivalis* into a mixed community. *Molecular microbiology* 60, 1, 121–139.
- KWOKAL, A., METIKOS-HUKOVIĆ, M., RADIĆ, N., POLJAK-GUBERINA, R., AND CATOVIĆ, A. 2003. Amorphous alloys resistant to corrosion in artificial saliva solution. *Journal of materials science. Materials in medicine* 14, 7, 605–610.
- LAMKIN, M.S., ARANCILLO, A.A., AND OPPENHEIM, F.G. 1996. Temporal and compositional characteristics of salivary protein adsorption to hydroxyapatite. *Journal of Dental Research* 75, 2, 803–808.
- LAMKIN, M.S., MIGLIARI, D., YAO, Y., TROXLER, R.F., AND OPPENHEIM, F.G. 2001. New in vitro model for the acquired enamel pellicle: pellicles formed from whole saliva show inter-subject consistency in protein composition and proteolytic fragmentation patterns. *Journal of Dental Research* 80, 1, 385–388.
- LAMPIN, M., WAROCQUIER-CLEROUT, LEGRIS, C., DEGRANGE, M., AND SIGOT-LUIZARD, M.F. 1997. Correlation between substratum roughness and wettability, cell adhesion, and cell migration. *Journal of biomedical materials research* 36, 1, 99–108.
- LANDA, A.S., VAN DER MEI, H C, AND BUSSCHER, H.J. 1997. Detachment of linking film bacteria from enamel surfaces by oral rinses and penetration of sodium lauryl sulphate through an artificial oral biofilm. *Advances in dental research* 11, 4, 528–538.
- LANGENFELDER, S. 2005. *Einfluss der Filtration auf Sterilität und Proteinzusammensetzung des Speichels*, Universität Regensburg.
- LEE, S.-P., LEE, S.-J., LIM, B.-S., AND AHN, S.-J. 2009. Surface characteristics of orthodontic materials and their effects on adhesion of mutans streptococci. *The Angle orthodontist* 79, 2, 353–360.

- LENDENMANN, U., GROGAN, J., AND OPPENHEIM, F.G. 2000. Saliva and Dental Pellicle-A Review. *Advances in dental research* 14, 1, 22–28.
- LENNON, A.M., PFEFFER, M., BUCHALLA, W., BECKER, K., LENNON, S., AND ATTIN, T. 2006. Effect of a casein/calcium phosphate-containing tooth cream and fluoride on enamel erosion in vitro. *Caries research* 40, 2, 154–157.
- LEUNG, V.-H., AND DARVELL, B.W. 1997. Artificial salivas for in vitro studies of dental materials. *Journal of Dentistry* 25, 6, 475–484.
- LI, J., HELMERHORST, E.J., LEONE, C.W., TROXLER, R.F., YASKELL, T., HAFFAJEE, A.D., SOCRANSKY, S.S., AND OPPENHEIM, F.G. 2004. Identification of early microbial colonizers in human dental biofilm. *Journal of Applied Microbiology* 97, 6, 1311–1318.
- LI, R., LI, Y., CHEN, J., ZHOU, Z., MORRISON, B.M., JR, AND PANAGAKOS, F.S. 2012. Efficacy of a desensitizing toothpaste containing arginine and calcium carbonate on dentin surface pore structure and dentin morphology. *American journal of dentistry* 25, 4, 210–214.
- LIE, T. 1975. Pellicle formation on hydroxyapatite splints attached to the human dentition: morphologic confirmation of the concept of adsorption. *Archives of Oral Biology* 20, 11, 739–742.
- LIE, T. 1977. Scanning and transmission electron microscope study of pellicle morphogenesis. *Scandinavian journal of dental research* 85, 4, 217–231.
- LIFE TECHNOLOGIES GMBH- MARKE: MOLECULAR PROBES. 2011. *Probes for Yeast Viability*. <https://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/F7030>.
- LIGTENBERG, A.J., WALGREEN-WETERINGS, E., VEERMAN, E.C., SOET, J.J. de, GRAAFF, J. de, and AMERONGEN, A.V. 1992. Influence of saliva on aggregation and adherence of *Streptococcus gordonii* HG 222. *Infection and Immunity* 60, 9, 3878–3884.
- LIPOVSKY, A., NITZAN, Y., GEDANKEN, A., AND LUBART, R. 2011. Antifungal activity of ZnO nanoparticles--the role of ROS mediated cell injury. *Nanotechnology* 22, 10, 105101.
- LIU, B., RAYMENT, S., OPPENHEIM, F.G., AND TROXLER, R.F. 1999. Isolation of human salivary mucin MG2 by a novel method and characterization of its interactions with oral bacteria. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 364, 2, 286–293.
- LIU, Y., HU, T., ZHANG, J., AND ZHOU, X. 2006. Characterization of the *Actinomyces naeslundii* ureolysis and its role in bacterial aciduricity and capacity to modulate pH homeostasis. *Microbiological research* 161, 4, 304–310.
- LOO, C.Y., CORLISS, D.A., AND GANESHKUMAR, N. 2000. *Streptococcus gordonii* biofilm formation: identification of genes that code for biofilm phenotypes. *Journal of bacteriology* 182, 5, 1374–1382.
- LOVE, R.M. 1996. Adherence of *Streptococcus gordonii* to smeared and nonsmeared dentine. *International endodontic journal* 29, 2, 108–112.
- LUTZ, F., PHILLIPS, R.W., ROULET, J.F., AND IMFELD, T.H. 1983. Komposits- Klassifikation und Wertung S. 914-929. *Schweizer Monatsschrift für Zahnmedizin*, 93.
- MACFARLANE, T.W., AND MASON, D.K. 1974. Changes in the oral flora in Sjögren's syndrome. *Journal of clinical pathology* 27, 5, 416–419.
- MANDEL, I.D. 1987a. Relation of Saliva and Plaque to Caries. *Journal of Dental Research* 53, 246–266.
- MANDEL, I.D. 1987b. The functions of saliva. *Journal of Dental Research* 66 Spec No, 623–627.
- MARSH, P., AND MARTIN, M.V. 2003. *Orale Mikrobiologie*. Thieme, Stuttgart, New York.
- MARSH, P.D., AND BRADSHAW, D.J. 1995. Dental plaque as a biofilm. *Journal of industrial microbiology* 15, 3, 169–175.

- MARTIN, B., TAMANAI-SHACOORI, Z., BRONSARD, J., GINGUENE, F., MEURIC, V., MAHE, F., AND BONNAURE-MALLET, M. 2017. A new mathematical model of bacterial interactions in two-species oral biofilms. *PloS one* 12, 3, e0173153.
- MARTORI, E., AYUSO-MONTERO, R., MARTINEZ-GOMIS, J., VINAS, M., AND PERAIRE, M. 2014. Risk factors for denture-related oral mucosal lesions in a geriatric population. *The Journal of Prosthetic Dentistry* 111, 4, 273–279.
- MAYHALL, C.W. 1970. Concerning the composition and source of the acquired enamel pellicle of human teeth. *Archives of Oral Biology* 15, 12, 1327–1341.
- MAYHALL, C.W., AND BUTLER, W.T. 1976. The carbohydrate composition of experimental salivary pellicles. *Journal of oral pathology* 5, 6, 358–370.
- MAZA, J.L., ELGUEZABAL, N., PRADO, C., ELLACURÍA, J., SOLER, I., AND PONTÓN, J. 2002. Candida albicans adherence to resin-composite restorative dental material: influence of whole human saliva. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics* 94, 5, 589–592.
- MCGHEE, J.R., MICHALEK, S.M., AND GHANTA, V.K. 1975. Rat immunoglobulins in serum and secretions: purification of rat IgM, IgA and IgG and their quantitation in serum, colostrum, milk and saliva. *Immunochemistry* 12, 10, 817–823.
- MEDLHAMMER, M. 2003. *Adhäsion von Streptococcus mutans an zahnärztlichen Materialien in vitro*, Universität Regensburg.
- MEMARZADEH, K., SHARILI, A.S., HUANG, J., RAWLINSON, S.C.F., AND ALLAKER, R.P. 2015. Nanoparticulate zinc oxide as a coating material for orthopedic and dental implants. *Journal of biomedical materials research. Part A* 103, 3, 981–989.
- MENGES, G., HABERSTROH, E., MICHAELI, W., AND SCHMACHTENBERG, E. 2014. *Menges Werkstoffkunde Kunststoffe*. Carl Hanser Fachbuchverlag, s.l.
- MEURMAN, J.H., TUOMPO, H., AND LOUNATMAA, K. 1983. Ultrastructural visualization of the adherence of Streptococcus mutans and Streptococcus salivarius to hydroxyapatite. *Scandinavian journal of dental research* 91, 6, 448–452.
- MILLSAP, K.W., BOS, R., VAN DER MEI, H C, AND BUSSCHER, H.J. 1999. Adhesion and surface-aggregation of Candida albicans from saliva on acrylic surfaces with adhering bacteria as studied in a parallel plate flow chamber. *Antonie van Leeuwenhoek* 75, 4, 351–359.
- MINAGI, S., MIYAKE, Y., INAGAKI, K., TSURU, H., AND SUGINAKA, H. 1985. Hydrophobic interaction in Candida albicans and Candida tropicalis adherence to various denture base resin materials. *Infection and Immunity* 47, 1, 11–14.
- MIYAKE, Y., FUJITA, Y., MINAGI, S., AND SUGINAKA, H. 1986. Surface hydrophobicity and adherence of Candida to acrylic surfaces. *Microbios* 46, 186, 7–14.
- MOHD BAKHORI, S.K., MAHMUD, S., LING, C.A., SIRELKHATIM, A.H., HASAN, H., MOHAMAD, D., MASUDI, S.M., SEENI, A., AND ABD RAHMAN, R. 2017. In-vitro efficacy of different morphology zinc oxide nanopowders on Streptococcus sobrinus and Streptococcus mutans. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications* 78, 868–877.
- MOLERO, G., DÍEZ-OREJAS, R., NAVARRO-GARCÍA, F., MONTEOLIVA, L., PLA, J., GIL, C., SÁNCHEZ-PÉREZ, M., AND NOMBELA, C. 1998. Candida albicans: genetics, dimorphism and pathogenicity. *International microbiology : the official journal of the Spanish Society for Microbiology* 1, 2, 95–106.
- MOLL, I., AUGUSTIN, M., AND JUNG, E.G., Eds. 2005. *Dermatologie ; 119 Tabellen*. Duale Reihe. Thieme, Stuttgart.
- 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, 18, 4457–4463.

- MORENO, E.C., KRESAK, M., AND HAY, D.I. 1982. Adsorption thermodynamics of acidic proline-rich human salivary proteins onto calcium apatites. *The Journal of biological chemistry* 257, 6, 2981–2989.
- MOSMANN, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65, 1-2, 55–63.
- MOURA, J.S., DA SILVA, W.J., PEREIRA, T., DEL BEL CURY, ALTAIR A, AND RODRIGUES GARCIA, RENATA CUNHA MATHEUS. 2006. Influence of acrylic resin polymerization methods and saliva on the adherence of four *Candida* species. *The Journal of Prosthetic Dentistry* 96, 3, 205–211.
- MUHLER, J.C., AND SWENSON, H.M. 1947. Preparation of synthetic saliva from direct analysis of human saliva. *Journal of Dental Research* 26, 6, 474.
- MÜLLER, J., AND MELCHINGER, W. 2006. Ultrastruktur-Merkmale zur Definition der Begriffe 'Hefezelle', 'Pseudomyzel' und 'echtes Myzel' bei *Candida albicans*. *Mycoses* 49 Suppl 2, 24–30.
- MÜLLER, R., GRÖGER, 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, 8, 2653–2660.
- NAIR, V.V., KARIBASAPPA, G.N., DODAMANI, A., AND PRASHANTH, V.K. 2016. Microbial contamination of removable dental prosthesis at different interval of usage: An in vitro study. *Journal of Indian Prosthodontic Society* 16, 4, 346–351.
- NANETTI, A., STANCARI, F., FERRI, M., AND MAZZONI, A. 1993. Relationship between *Candida albicans* and denture stomatitis: a clinical and microbiological study. *The new microbiologica* 16, 3, 287–291.
- NETEA, M.G., BROWN, G.D., KULLBERG, B.J., AND GOW, N.A.R. 2008. An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. *Nature reviews. Microbiology* 6, 1, 67–78.
- NEVZATOGLU, E.U., OZCAN, M., KULAK-OZKAN, Y., AND KADIR, T. 2007. Adherence of *Candida albicans* to denture base acrylics and silicone-based resilient liner materials with different surface finishes. *Clinical oral investigations* 11, 3, 231–236.
- NIKAWA, H., MIKIHARA, S., EGUSA, H., FUKUSHIMA, H., KAWABATA, R., HAMADA, T., AND YATANI, H. 2005. *Candida* adherence and biofilm formation on oral surfaces. *Nihon Ishinkin Gakkai zasshi = Japanese journal of medical mycology* 46, 4, 233–242.
- 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, 4, 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, 17, 5421–5426.
- ODDS, F.C. 1988. *Candida and candidosis*. Tindall, London.
- ORSTAVIK, D., KRAUS, F.W., AND HENSHAW, L.C. 1974. In vitro attachment of streptococci to the tooth surface. *Infection and Immunity* 9, 5, 794–800.
- OSORIO, E., AGUILERA, F.S., OSORIO, R., GARCIA-GODOY, F., CABRERIZO-VILCHEZ, M.A., AND TOLEDANO, M. 2012. Determining efficacy of monitoring devices on ceramic bond to resin composite. *Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal* 17, 5, e833-40.
- OWENS, D.K., AND WENDT, R.C. 1969. Estimation of the surface free energy of polymers. *J. Appl. Polym. Sci.* 13, 8, 1741–1747.
- OWENS, J.D., THOMAS, D.S., THOMPSON, P.S., AND TIMMERMAN, J.W. 1989. Indirect conductimetry: a novel approach to the conductimetric enumeration of microbial populations. *Letters in Applied Microbiology* 9, 245–249.

- PADMAVATHY, N., AND VIJAYARAGHAVAN, R. 2008. Enhanced bioactivity of ZnO nanoparticles - an antimicrobial study. *Sci. Technol. Adv. Mater*, 9, 1–7.
- PALMER, R.J., GORDON, S.M., CISAR, J.O., AND KOLENBRANDER, P.E. 2003. Coaggregation-mediated interactions of streptococci and actinomyces detected in initial human dental plaque. *Journal of bacteriology* 185, 11, 3400–3409.
2006. Phosphate-buffered saline (PBS). *Cold Spring Harbor Protocols 2006*, 1, pdb.rec8247-pdb.rec8247.
- PRATT-TERPSTRA, I.H., WEERKAMP, A.H., AND BUSSCHER, H.J. 1987. Adhesion of oral streptococci from a flowing suspension to uncoated and albumin-coated surfaces. *Journal of general microbiology* 133, 11, 3199–3206.
- PRATT-TERPSTRA, I.H., WEERKAMP, A.H., AND BUSSCHER, H.J. 1989. The effects of pellicle formation on streptococcal adhesion to human enamel and artificial substrata with various surface free-energies. *Journal of Dental Research* 68, 3, 463–467.
- PRUITT, K.M., CALDWELL, R.C., JAMIESON, A.D., AND TAYLOR, R.E. 1969. The interaction of salivary proteins with tooth surface. *Journal of Dental Research* 48, 5, 818–823.
- QUIRYNEN, M., AND BOLLEN, C.M. 1995. The influence of surface roughness and surface-free energy on supra- and subgingival plaque formation in man. A review of the literature. *Journal of clinical periodontology* 22, 1, 1–14.
- QUIRYNEN, M., MARECHAL, M., BUSSCHER, H.J., WEERKAMP, A.H., ARENDS, J., DARIUS, P.L., AND VAN STEENBERGHE, D. 1989. The influence of surface free-energy on planimetric plaque growth in man. *Journal of Dental Research* 68, 5, 796–799.
- QUIRYNEN, M., MARECHAL, M., BUSSCHER, H.J., WEERKAMP, A.H., DARIUS, P.L., AND VAN STEENBERGHE, D. 1990. The influence of surface free energy and surface roughness on early plaque formation. An in vivo study in man. *Journal of clinical periodontology* 17, 3, 138–144.
- QUIRYNEN, M., VAN DER MEI, H C, BOLLEN, C.M., VAN DEN BOSSCHE, L H, DOORNBUSCH, G.I., VAN STEENBERGHE, D., AND BUSSCHER, H.J. 1994. The influence of surface-free energy on supra- and subgingival plaque microbiology. An in vivo study on implants. *Journal of periodontology* 65, 2, 162–167.
- RADFORD, D.R., CHALLACOMBE, S.J., AND WALTER, J.D. 1999. Denture plaque and adherence of *Candida albicans* to denture-base materials in vivo and in vitro. *Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists* 10, 1, 99–116.
- RADFORD, D.R., SWEET, S.P., CHALLACOMBE, S.J., AND WALTER, J.D. 1998. Adherence of *Candida albicans* to denture-base materials with different surface finishes. *Journal of Dentistry* 26, 7, 577–583.
- RADFORD, D.R., WATSON, T.F., WALTER, J.D., AND CHALLACOMBE, S.J. 1997. The effects of surface machining on heat cured acrylic resin and two soft denture base materials: a scanning electron microscope and confocal microscope evaluation. *The Journal of Prosthetic Dentistry* 78, 2, 200–208.
- RAGHUPATHI, K.R., KODALI, R.T., AND MANNA, A.C. 2011. Size-dependent bacterial growth inhibition and mechanism of antibacterial activity of zinc oxide nanoparticles. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* 27, 7, 4020–4028.
- RAMANATHAN, K., HAN, N.K., AND CHELVANAYAGAM, P.I. 1985. Oral candidiasis--its pleomorphic clinical manifestations, diagnosis and treatment. *Dental journal of Malaysia* 8, 1, 39–45.
- RAMAZANZADEH, B., JAHANBIN, A., YAGHOUBI, M., SHAHTAHMASSBI, N., GHAZVINI, K., SHAKERI, M., AND SHAFABEE, H. 2015. Comparison of Antibacterial Effects of ZnO and CuO Nanoparticles Coated Brackets against *Streptococcus Mutans*. *Journal of dentistry (Shiraz, Iran)* 16, 3, 200–205.
- RAMS, T.E., AND SLOTS, J. 1991. *Candida* biotypes in human adult periodontitis. *Oral microbiology and immunology* 6, 3, 191–192.

- RAO, M.C., RAVINDRANADH, K., AND ROSE MARY, T. 2013. Development of ZnO Nanoparticles for Clinical Applications. *Journal of Chemical, Biological and Physical Science*, 4, 469–473.
- RICKER, A., VICKERMAN, M., AND DONGARI-BAGTZOGLU, A. 2014. Streptococcus gordonii glucosyltransferase promotes biofilm interactions with Candida albicans. *Journal of oral microbiology* 6.
- RIMONDINI, L., CERRONI, L., CARRASSI, A., AND TORRICELLI, P. 2002. Bacterial colonization of zirconia ceramic surfaces: an in vitro and in vivo study. *The International journal of oral & maxillofacial implants* 17, 6, 793–798.
- RIMONDINI, L., FARÈ, 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, 6, 556–562.
- RITZ, H.L. 1967. Microbial population shifts in developing human dental plaque. *Archives of Oral Biology* 12, 12, 1561–1568.
- ROGERS, J.D., PALMER, R.J., JR, KOLENBRANDER, P.E., AND SCANNAPIECO, F.A. 2001. Role of Streptococcus gordonii amylase-binding protein A in adhesion to hydroxyapatite, starch metabolism, and biofilm formation. *Infection and Immunity* 69, 11, 7046–7056.
- ROSAN, B., AND LAMONT, R.J. 2000. Dental plaque formation. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 2, 13, 1599–1607.
- ROSSIE, K.M., TAYLOR, J., BECK, F.M., HODGSON, S.E., AND BLOZIS, G.G. 1987. Influence of radiation therapy on oral Candida albicans colonization: a quantitative assessment. *Oral surgery, oral medicine, and oral pathology* 64, 6, 698–701.
- ROY, A.S., PARVEEN, A., KOPPALKAR, A.R., AND PRASAD, M. V. N. A. 2010. Effect of Nano-Titanium Dioxide with Different Antibiotics against Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology* 1, 37–41.
- RUDNEY, J.D. 1995. Does variability in salivary protein concentrations influence oral microbial ecology and oral health? *Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists* 6, 4, 343–367.
- RUSSELL, C., AND LAY, K.M. 1973. Natural history of Candida species and yeasts in the oral cavities of infants. *Archives of Oral Biology* 18, 8, 957–962.
- RYKKE, M., AND ROLLA, G. 1990. Desorption of acquired enamel pellicle in vivo by pyrophosphate. *Scandinavian journal of dental research* 98, 3, 211–214.
- SAMARANAYAKE, L.P., MCCOURTIE, J., AND MACFARLANE, T.W. 1980. Factors affecting the in-vitro adherence of Candida albicans to acrylic surfaces. *Archives of Oral Biology* 25, 8-9, 611–615.
- SANDBERG, A.L., MUDRICK, L.L., CISAR, J.O., BRENNAN, M.J., MERGENHAGEN, S.E., AND VATTER, A.E. 1986. Type 2 fimbrial lectin-mediated phagocytosis of oral Actinomyces spp. by polymorphonuclear leukocytes. *Infection and Immunity* 54, 2, 472–476.
- SANDERINK, R.B.A. 2004. *Curriculum orale Mikrobiologie und Immunologie. [Grundlagen der oralen Mikrobiologie und Immunologie ; Mikroorganismen in der Mundhöhle ; die gesunde und die kranke Mundhöhle ; angewandte Mikrobiologie und Immunologie ; mit CD-ROM]*. Quintessenz, Berlin.
- SANZ, M.E., PARMA, A.E., AND ECHEVARRIA, H. 1993. Deteccion de antigenos de adhesion en Escherichia coli enterotoxigenica. Estudio de la expresion en diferentes medios de cultivo. *Revista Argentina de microbiologia* 25, 1, 1–6.
- SATOU, J., FUKUNAGA, A., MORIKAWA, A., MATSUMAE, I., SATOU, N., AND SHINTANI, H. 1991. Streptococcal adherence to uncoated and saliva-coated restoratives. *Journal of oral rehabilitation* 18, 5, 421–429.

- SATOU, J., FUKUNAGA, A., SATOU, N., SHINTANI, H., AND OKUDA, K. 1988. Streptococcal adherence on various restorative materials. *Journal of Dental Research* 67, 3, 588–591.
- SAWAI, J. 2003. Quantitative evaluation of antibacterial activities of metallic oxide powders (ZnO, MgO and CaO) by conductimetric assay. *Journal of microbiological methods* 54, 2, 177–182.
- SAWAI, J., IGARASHI, H., HASHIMOTO, A., KOKUGAN, T., AND SHIMIZU, M. 1995. Evaluation of growth inhibitory effect of ceramics powder slurry on bacteria by conductance method. *Journal of Chemical Engineering of Japan* 28, 3, 288–293.
- SAWAI, J., KAWADA, E., KANOU, F., IGARASHI, H., HASHIMOTO, A., KOKUGAN, T., AND SHIMIZU, M. 1996. Detection of active oxygen generated from ceramic powders having antibacterial activity. *Journal of Chemical Engineering of Japan* 29, 4, 627–633.
- SAWAI, J., AND YOSHIKAWA, T. 2004. Quantitative evaluation of antifungal activity of metallic oxide powders (MgO, CaO and ZnO) by an indirect conductimetric assay. *Journal of Applied Microbiology*, 96, 803–809.
- SCHAAL, K.P., YASSIN, A.F., AND STACKEBRANDT, E. 2006. The Family Actinomycetaceae: The Genera Actinomyces, Actinobaculum, Arcanobacterium, Varibaculum, and Mobiluncus. In *The Prokaryotes*, M. DWORKIN, S. FALKOW, E. ROSENBERG, K.-H. SCHLEIFER AND E. STACKEBRANDT, Eds. Springer New York, New York, NY, 430–537.
- SCHAEDLER, R.W., DUBOS, R., AND COSTELLO, R. 1965. The development of the bacterial flora in the gastrointestinal tract of mice. *J Exp Med*, 122(1), 59–66.
- SCHEIBE, R. 2006. Biotop Mundhöhle. Speichel. In *Einführung in die Zahnmedizin*, B. REITEMEIER, N. SCHWENZER AND M. EHRENFELD, Eds. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 124–130.
- SHELLUN, P.M. 1987. Invasive candida albicans infections of the oral cavity in immunocompromised patients. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 45, 2, 198.
- SCHULZE, J., AND SONNENBORN, U. 2009. Yeasts in the gut: from commensals to infectious agents. *Deutsches Ärzteblatt international* 106, 51-52, 837–842.
- SENDALL, F.E., AND STANFORTH, J.N. 1986. A study of powder adhesion to metal surfaces during compression of effervescent pharmaceutical tablets. *The Journal of pharmacy and pharmacology* 38, 7, 489–493.
- SHAHAL, Y., STEINBERG, D., HIRSCHFELD, Z., BRONSHTEYN, M., AND KOPOLOVIC, K. 1998. In vitro bacterial adherence onto pellicle-coated aesthetic restorative materials. *Journal of oral rehabilitation* 25, 1, 52–58.
- SHAKESPEARE, A.P., DRUCKER, D.B., AND GREEN, R.M. 1985. The comparative cariogenicity and plaque-forming ability in vivo of four species of the bacterium Actinomyces in gnotobiotic rats. *Archives of Oral Biology* 30, 11-12, 855–858.
- SHARDT, A., AND ROY, T.E. 1957. Notes on neonatal thrush and its epidemiology. *Canadian Medical Association journal* 76, 12, 1029–1032.
- SHELLIS, R.P. 1978. A synthetic saliva for cultural studies of dental plaque. *Archives of Oral Biology* 23, 6, 485–489.
- SHUNGU, D.L., WEINBERG, E., AND CERAMI, A.T. 1985. Evaluation of three broth disk methods for testing the susceptibility of anaerobic bacteria to imipenem. *Journal of clinical microbiology* 21, 6, 875–879.
- SIDHU, S.K., SHERRIFF, M., AND WATSON, T.F. 1997. In vivo changes in roughness of resin-modified glass ionomer materials. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials* 13, 3, 208–213.
- SIPAHI, C., ANIL, N., AND BAYRAMLI, E. 2001. The effect of acquired salivary pellicle on the surface free energy and wettability of different denture base materials. *Journal of Dentistry* 29, 3, 197–204.

- SISSONS, C.H., WONG, L., AND CUTRESS, T.W. 1995. Patterns and rates of growth of microcosm dental plaque biofilms. *Oral microbiology and immunology* 10, 3, 160–167.
- SKJORLAND, K.K., RYKKE, M., AND SONJU, T. 1995. Rate of pellicle formation in vivo. *Acta odontologica Scandinavica* 53, 6, 358–362.
- SLOMIANY, B.L., MURTY, V.L., ZDEBSKA, E., SLOMIANY, A., GWOZDZINSKI, K., AND MANDEL, I.D. 1986. Tooth surface-pellicle lipids and their role in the protection of dental enamel against lactic-acid diffusion in man. *Archives of Oral Biology* 31, 3, 187–191.
- SLOTS, J. 1977. Microflora in the healthy gingival sulcus in man. *Scandinavian journal of dental research* 85, 4, 247–254.
- SLOWEY, R.R., EIDELMAN, S., AND KLEBANOFF, S.J. 1968. Antibacterial activity of the purified peroxidase from human parotid saliva. *Journal of bacteriology* 96, 3, 575–579.
- SOFUO, A., EMMANOUIL, J., PEUTZFELDT, A., AND OWALL, B. 2001. The effect of different polishing techniques on the surface roughness of acrylic resin materials. *The European journal of prosthodontics and restorative dentistry* 9, 3-4, 117–122.
- SÖNJU, T. 1975. Investigations of some salivary glycoproteins and their possible role in pellicle formation. *Den Norske tannlaegeforenings tidende* 85, 10, 393–403.
- SÖNJU, T., AND GLANTZ, P.-O. 1975. Chemical composition of salivary integuments formed in vivo on solids with some established surface characteristics. *Archives of Oral Biology* 20, 10, 687–691.
- SÖNJU, T., AND RÖLLA, G. 1973. Chemical analysis of the acquired pellicle formed in two hours on cleaned human teeth in vivo. Rate of formation and amino acid analysis. *Caries research* 7, 1, 30–38.
- SREEBNY, L.M., ZHU, W.X., SCHWARTZ, S.S., AND MEEK, A.G. 1995. The preparation of an autologous saliva for use with patients undergoing therapeutic radiation for head and neck cancer. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* 53, 2, 131–139.
- STEINBERG, D., AND EYAL, S. 2002. Early formation of *Streptococcus sobrinus* biofilm on various dental restorative materials. *Journal of Dentistry* 30, 1, 47–51.
- STEINBERG, D., KOPEC, L.K., AND BOWEN, W.H. 1993. Adhesion of actinomyces isolates to experimental pellicles. *Journal of Dental Research* 72, 6, 1015–1020.
- STEINBERG, D., MOR, C., DOGAN, H., ZACKS, B., AND ROTSTEIN, I. 1999. Effect of salivary biofilm on the adherence of oral bacteria to bleached and non-bleached restorative material. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials* 15, 1, 14–20.
- STIEFEL, D.J. 1976. Characteristics of an in vitro dental pellicle. *Journal of Dental Research* 55, 1, 66–73.
- STINSON, M.W., HARASZTHY, G.G., ZHANG, X.L., AND LEVINE, M.J. 1992. Inhibition of *Porphyromonas gingivalis* adhesion to *Streptococcus gordonii* by human submandibular-sublingual saliva. *Infection and Immunity* 60, 7, 2598–2604.
- SULJAK, J.P., REID, G., WOOD, S.M., MCCONNELL, R.J., VAN DER MEI, H C, AND BUSSCHER, H.J. 1995. Bacterial adhesion to dental amalgam and three resin composites. *Journal of Dentistry* 23, 3, 171–176.
- SUMI, Y., KAGAMI, H., OHTSUKA, Y., KAKINOKI, Y., HARUGUCHI, Y., AND MIYAMOTO, H. 2003. High correlation between the bacterial species in denture plaque and pharyngeal microflora. *Gerodontology* 20, 2, 84–87.
- SUSEWIND, S., LANG, R., AND HAHNEL, S. 2015. Biofilm formation and *Candida albicans* morphology on the surface of denture base materials. *Mycoses* 58, 12, 719–727.
- SUSEWIND S. 2014. *Untersuchungen zur Morphologie von Candida albicans auf Prothesenbasismaterial*. Dissertation, Universität Regensburg.

- SVANBERG, M., MJÖR, I.A., AND ORSTAVIK, D. 1990. Mutans streptococci in plaque from margins of amalgam, composite, and glass-ionomer restorations. *Journal of Dental Research* 69, 3, 861–864.
- SWEET, S.P., MACFARLANE, T.W., AND SAMARANAYAKE, L.P. 1990. An in vitro method to study the adherence of bacteria to saliva-treated tooth enamel sections. *Oral microbiology and immunology* 5, 1, 24–28.
- TABAK, L.A., LEVINE, M.J., MANDEL, I.D., AND ELLISON, S.A. 1982. Role of salivary mucins in the protection of the oral cavity. *Journal of oral pathology* 11, 1, 1–17.
- TAKAHASHI, K. 1990. Application of calorimetric methods to cellular processes: with special references to quantitative evaluation of drug action on living cells. *Thermochimica Acta* 163, 71–80.
- TAKAHASHI, N., KALFAS, S., AND YAMADA, T. 1995. Phosphorylating enzymes involved in glucose fermentation of *Actinomyces naeslundii*. *Journal of bacteriology* 177, 20, 5806–5811.
- TAKAHASHI, N., AND YAMADA, T. 1999. Glucose and lactate metabolism by *Actinomyces naeslundii*. *Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists* 10, 4, 487–503.
- TALU, S., BRAMOWICZ, M., KULEZA, S., LAINOVIC, T., VILOTIC, M., AND BLAZIC, L. 2016. Influence of the artificial saliva storage on 3-D surface texture characteristics of contemporary dental nanocomposites. *Journal of microscopy* 264, 2, 198–206.
- 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. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials* 66, 1, 391–398.
- TANNER, J., VALLITTU, P.K., AND SÖDERLING, E. 2000. Adherence of *Streptococcus mutans* to an E-glass fiber-reinforced composite and conventional restorative materials used in prosthetic dentistry. *J. Biomed. Mater. Res.* 49, 2, 250–256.
- TENOVOO, J. 2004. Protective functions of saliva. In *Saliva and oral health*, W. M. EDGAR, C. DAWES AND D. M. O'MULLANE, Eds. British Dental Association, London.
- TENOVOO, J., MANSSON-RAHEMTULLA, B., PRUITT, K.M., AND ARNOLD, R. 1981. Inhibition of dental plaque acid production by the salivary lactoperoxidase antimicrobial system. *Infection and Immunity* 34, 1, 208–214.
- 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 Suppl 2, 68–81.
- THEWES, S., KRETSCHMAR, M., PARK, H., SCHALLER, M., FILLER, S.G., AND HUBE, B. 2007. In vivo and ex vivo comparative transcriptional profiling of invasive and non-invasive *Candida albicans* isolates identifies genes associated with tissue invasion. *Molecular microbiology* 63, 6, 1606–1628.
- THORNTON, D.J., KHAN, N., MEHROTRA, R., HOWARD, M., VEERMAN, E., PACKER, N.H., AND SHEEHAN, J.K. 1999. Salivary mucin MG1 is comprised almost entirely of different glycosylated forms of the MUC5B gene product. *Glycobiology* 9, 3, 293–302.
- TINOCO-ARAUJO, J.E., ARAUJO, D.F.G., BARBOSA, P.G., SANTOS, PAULO SERGIO DA SILVA, AND MEDEIROS, ANA MYRIAM COSTA DE. 2013. Invasive candidiasis and oral manifestations in premature newborns. *Einstein (Sao Paulo, Brazil)* 11, 1, 71–75.
- VACCA SMITH, A.M., AND BOWEN, W.H. 2000. In situ studies of pellicle formation on hydroxyapatite discs. *Archives of Oral Biology* 45, 4, 277–291.
- VALCKE, C.F., AND DUGGAN, T.O. 1981. The porosity and roughness of four direct filling resins. *Journal of oral rehabilitation* 8, 6, 507–515.

- VAN DER MEER, J.T., THOMPSON, J., VALKENBURG, H.A., AND MICHEL, M.F. 1992. Epidemiology of bacterial endocarditis in The Netherlands. I. Patient characteristics. *Archives of internal medicine* 152, 9, 1863–1868.
- VAN DER MEI, H C, COX, S.D., GEERTSEMA-DOORNBUSCH, G.I., DOYLE, R.J., AND BUSSCHER, H.J. 1993. A critical appraisal of positive cooperativity in oral streptococcal adhesion: Scatchard analyses of adhesion data versus analyses of the spatial arrangement of adhering bacteria. *Journal of general microbiology* 139, 5, 937–948.
- VAN DER MEI, H C, RUSTEMA-ABBING, M., BRUINSMA, G.M., JAGER, M. de, GOTTENBOS, B., AND BUSSCHER, H.J. 2004. Influence of weight on removal of co-adhering bacteria from salivary pellicles by different modes of brushing. *Caries research* 38, 2, 85–90.
- VAN DIJK, J., HERKSTRÖTER, F., BUSSCHER, H., WEERKAMP, A., JANSEN, H., AND ARENDS, J. 1987. Surface-free energy and bacterial adhesion. An in vivo study in beagle dogs. *Journal of clinical periodontology* 14, 5, 300–304.
- VAN NIEUW AMERONGEN, A., BOLSCHER, J., AND VEERMAN, E. 2004. Salivary Proteins. Protective and Diagnostic Value in Cariology? *Oncology* 38, 3, 247–253.
- VAN PELT, A.W., WEERKAMP, A.H., UYEN, MARIETTE H. W. J., BUSSCHER HENDRIK J., JONG, H.P. de, and ARENDS, J. 1985. Adhesion of Streptococcus sanguis CH3 to polymers with different surface free energies. *Applied and Environmental Microbiology* 1985, 49, 1270–1275.
- VANDEBUSSCHE, M., AND SWINNE, D. 1984. Yeasts oral carriage in denture wearers. *Mykosen* 27, 9, 431–435.
- VAUPEL, P. 2010. Funktionen des Magen-Darm-Trakts. In *Physiologie des Menschen: mit Pathophysiologie*, R. F. SCHMIDT, F. LANG AND M. HECKMANN, Eds. Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 792–833.
- VEERMAN, E.C.I., VISSINK, A., WONG, D.T., AND VAN NIEUW AMERONGEN, A. 2008. Part I - Background and Foundation. Chapter 6 - Processing and Storage of saliva samples. In *Salivary diagnostics*, D. WONG, Ed. Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, 69–76.
- VERRAN, J., AND MARYAN, C.J. 1997. Retention of Candida albicans on acrylic resin and silicone of different surface topography. *The Journal of Prosthetic Dentistry* 77, 5, 535–539.
- WALTER, B., AND FRANK, R.M. 1985. Ultrastructural relationship of denture surfaces, plaque and oral mucosa in denture stomatitis. *Journal de biologie buccale* 13, 2, 145–166.
- WANG, H.L., YUAN, K., BURGETT, F., SHYR, Y., AND SYED, S. 1994. Adherence of oral microorganisms to guided tissue membranes: an in vitro study. *Journal of periodontology* 65, 3, 211–218.
- WELKER, D., EICHNER, K., AND KAPPERT, H.F., Eds. 2005. *Zahnärztliche Werkstoffe und ihre Verarbeitung. Band 1: Grundlagen und Verarbeitung*. Kapitel 7: Prothesenkunststoffe, S.211-250 Band 1. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- WHELTON, H. 2004. Introduction: the anatomy and physiology of the salivary glands. In *Saliva and oral health*, W. M. EDGAR, C. DAWES AND D. M. O'MULLANE, Eds. British Dental Association, London.
- WHITTAKER, C.J., KLIER, C.M., AND KOLENBRANDER, P.E. 1996. Mechanisms of adhesion by oral bacteria. *Annual review of microbiology* 50, 513–552.
- WIJEWEERA, R.L. 1987. *Studies On The Prominent And Base Forming Bacteria In Supragingival Plaque And Their Relation To The Production Of Cariogenic And Non-Cariogenic Stephan PH Curves In Vitro*. Dissertation, State University of New York at Stony Brook.
- WILLERSHAUSEN, B., CALLAWAY, A., ERNST, C.P., AND STENDER, E. 1999. The influence of oral bacteria on the surfaces of resin-based dental restorative materials--an in vitro study. *International dental journal* 49, 4, 231–239.

- WILLIAMS, C.J., AND KRAUS, F.W. 1963. Sterilization and storage of saliva. *Journal of Dental Research* 42, 1416–1428.
- WINKLER, J. 2013. *Titandioxid. Die Technologie des Beschichtens*. Hrsg. von Ulrich Zorll. Vincentz, Hannover.
- WONG, L., AND SISSONS, C.H. 2001. A comparison of human dental plaque microcosm biofilms grown in an undefined medium and a chemically defined artificial saliva. *Archives of Oral Biology* 46, 6, 477–486.
- WYSS, C. 1992. Growth of *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *T. pectinovorum*, *T. socranskii*, and *T. vincentii* in a chemically defined medium. *Journal of clinical microbiology* 30, 9, 2225–2229.
- XIA, T., AND BAUMGARTNER, J.C. 2003. Occurrence of Actinomyces in infections of endodontic origin. *Journal of endodontics* 29, 9, 549–552.
- XIE, Y., HE, Y., IRWIN, P.L., JIN, T., AND SHI, X. 2011. Antibacterial Activity and Mechanism of Action of Zinc Oxide Nanoparticles against *Campylobacter jejuni*. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 7, 2325–2331.
- YAMAMOTO, O., OHIRA, T., ALVAREZ, K., AND FUKUDA, M. 2010. Antibacterial characteristics of CaCO₃-MgO composites. *Mater Sci. Eng. B* 173, 208–212.
- YIP, H.-K., TO, W.M., AND SMALES, R.J. 2004. Effects of artificial saliva and APF gel on the surface roughness of newer glass ionomer cements. *Operative dentistry* 29, 6, 661–668.
- YOO, J.-H., KHO, H.-S., KIM, Y.-K., LEE, S.-W., AND CHUNG, S.-C. 2003. Experimental salivary pellicles formed on the surface of self-curing resin. *Journal of oral rehabilitation* 30, 3, 251–259.
- YOUNG, T. 1805. An Essay on the Cohesion of Fluids. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 95, 0, 65–87.
- ZAHRADNIK, R.T., MORENO, E.C., AND BURKE, E.J. 1976. Effect of salivary pellicle on enamel subsurface demineralization in vitro. *Journal of Dental Research* 55, 4, 664–670.
- ZAHRADNIK, R.T., PROPAS, D., AND MORENO, E.C. 1978. Effect of salivary pellicle formation time on in vitro attachment and demineralization by *Streptococcus mutans*. *Journal of Dental Research* 57, 11-12, 1036–1042.
- ZALESKA, A. 2008. Doped-TiO₂: A Review. *Recent Patents on Engineering* 2, 157–164.
- ZAURA-ARITE, E., VAN MARLE, J., AND CATE, J.M. ten. 2001. Confocal microscopy study of undisturbed and chlorhexidine-treated dental biofilm. *Journal of Dental Research* 80, 5, 1436–1440.
- ZHANG, L., DING, Y., POVEY, M., AND YORK, D. 2008. ZnO nanofluids - A potential antibacterial agent. *Progress in National Science* 18, 939–944.

9 Danksagung

Zu allererst gilt mein herzlicher Dank Herrn Prof. Dr. Gerhard Handel für die freundliche Überlassung des Themas und die Bereitstellung aller Arbeitsmittel sowie des biologischen und technischen Labors der Poliklinik für Zahnärztliche Prothetik der Universität Regensburg.

Für die Betreuung meiner Dissertationsarbeit möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Sebastian Hahnel herzlichst bedanken. Er hat mich stets mit wertvollen Ratschlägen und Ideen unterstützt und hatte bei der Erstellung und Korrektur des Manuskripts hilfreiche Tipps – dafür ein außerordentliches Dankeschön!

Frau Dipl.-Ing. Sibylle Schneider-Feyrer danke ich für die freundliche und umfassende Einweisung in die Bedienung des Rasterelektronenmikroskops.

Frau TA Angelika Berié danke ich für die freundliche und umfassende Einweisung in die Bedienung des Kontaktwinkelmessgerätes im Labor des Instituts für Pharmazeutische Technologie der Universität Regensburg.

Besonders danken möchte ich Frau MTA Gerlinde Held, die mich in die mikrobiologischen Laborarbeiten eingeführt hat und mir bei den großen Versuchen mit Rat und Tat zur Seite stand. Darüber hinaus danke ich ihr für die freundliche und umfassende Einweisung in die Bedienung des Perthometers und des Fluoreszenzmikroskops sowie für die immer freundschaftliche und hilfsbereite Zusammenarbeit.

Auch allen anderen Mitarbeitern der Poliklinik für Zahnärztliche Prothetik, die mich bei der Durchführung dieser Dissertationsarbeit unterstützt haben, gebührt mein aufrichtiger Dank. Besonders Herrn ZTM Martin Stemmer danke ich für die Unterstützung beim Gießen der NEM-Legierungs-Prüfkörper.

Außerdem bedanke ich mich von ganzem Herzen bei meinen Eltern, meinen Großeltern, meiner Schwester mit Familie und meinem Verlobten Sebastian, die mich alle stets motiviert haben und auf deren Unterstützung und Rückhalt ich mich jederzeit verlassen kann. Danke für alles!