

Aus der Poliklinik für Zahnärztliche Prothetik  
(Prof. Dr. med. dent. Ralf Bürgers)  
im Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

# **Antimikrobielle Beschichtung kieferorthopädischer Ligaturenringe mit Silber und Bismut**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades  
für Zahnheilkunde  
der Medizinischen Fakultät der  
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

**Carolin Griesmüller**

aus

Braunschweig

Göttingen 2018

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

Referent/in Prof. Dr. med. dent. R. Bürgers

Ko-Referent/in: Prof. Dr. med. dent. A. Wiegand

Drittreferent/in:

Datum der mündlichen Prüfung: 07.05.2019

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Antimikrobielle Beschichtung kieferorthopädischer Ligaturenringe mit Silber und Bismut" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den .....  
.....  
(Unterschrift)

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>III</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>VI</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>2 Literaturübersicht .....</b>	<b>2</b>
2.1 Orale Biofilme.....	2
2.1.1 Entstehung und Morphologie von Biofilmen .....	2
2.1.2 Physiko-chemische Faktoren der bakteriellen Adhäsion .....	6
2.1.3 Rolle der Mutans-Streptokokken in der Karies-Entstehung.....	8
2.1.4 Folgen der Biofilmbildung in der kieferorthopädischen Therapie .....	9
2.1.5 Präventionsmaßnahmen in der Kieferorthopädie.....	11
2.2 Antimikrobielle Strategien bei dentalen Werkstoffen.....	12
2.2.1 Nanopartikel – Eigenschaften und Grundlagen.....	13
2.2.2 Anorganische Nanopartikel .....	14
2.2.3 Silber.....	14
2.2.4 Bismut .....	16
2.3 Beschichtungsverfahren .....	17
2.4 Werkstoffkundliche Aspekte der kieferorthopädischen Ligaturenringe.....	18
2.5 Methoden zur Visualisierung und Quantifizierung von Bakterien.....	19
2.5.1 Klassische Kultivierungsverfahren .....	20
2.5.2 Mikroskopietechniken .....	21
2.5.3 Fluochrome .....	24
2.5.4 Grundlagen Lumineszenz .....	27
<b>3 Ziel und Fragestellung.....</b>	<b>29</b>
<b>4 Material und Methoden .....</b>	<b>30</b>
4.1 Probekörper.....	30
4.2 Physiko-chemische Eigenschaften der Testoberflächen.....	33
4.2.1 Messung der Rauheit.....	33
4.2.2 Messung der freien Oberflächenenergie .....	33
4.3 Mikroorganismen und Versuchsdurchführung .....	34
4.3.1 Bakterien .....	34
4.3.2 Versuchsvorbereitung.....	34
4.3.3 Bakterieninkubation.....	35
4.3.4 Vorversuch: Fluoreszenzfärbung.....	35
4.3.5 Vorversuchsauswertung Fluoreszenz.....	36
4.3.6 Hauptversuch: Lumineszenz .....	37

---

4.4	Statistische Auswertung.....	38
<b>5</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>39</b>
5.1	Rauheit und freie Oberflächenenergie (SFE).....	39
5.2	Ergebnisse der Vorversuche.....	43
5.2.1	Hoechst 33342-Färbung.....	43
5.2.2	BacLight Bacterial Viability Kit.....	46
5.3	Ergebnisse Hauptversuch: ATP-Lumineszenzen.....	50
5.4	Statistische Auswertung.....	50
5.4.1	Kruskal-Wallis-Test.....	51
5.4.2	Mann-Whitney-U-Test .....	51
5.5	Statistische Auswertung ohne Vorversuch.....	51
5.5.1	Deskriptive Datenanalyse ohne Ausreißer .....	51
5.5.2	Statistische Auswertung ohne Ausreißer .....	52
<b>6</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>53</b>
6.1	Studiendesign .....	53
6.2	Diskussion von Materialien und Methoden.....	55
6.2.1	Mikroorganismen und Biofilmmodell.....	55
6.2.2	Probekörper.....	56
6.2.3	Versuchsauswertung .....	58
6.3	Diskussion der Ergebnisse.....	61
6.3.1	Rauheit und freie Oberflächenenergie .....	61
6.3.2	Deskriptive Datenanalyse.....	62
6.3.3	Statistische Auswertung.....	62
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>67</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>69</b>
8.1	Literatur.....	69
8.2	Internetquellen.....	94

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Phasen der Biofilmentstehung.....	4
<b>Abbildung 2:</b> Schematische Darstellung der Kontaktwinkelmessung eines liegenden Tropfens.....	7
<b>Abbildung 3:</b> Magnetronspattern schematisch dargestellt.....	17
<b>Abbildung 4:</b> Kieferorthopädische Ligaturenringe zur Befestigung des Bogens am Bracket.....	18
<b>Abbildung 5:</b> Blutagar, beimpft mit <i>Staphylococcus aureus</i> .....	20
<b>Abbildung 6:</b> Aufbau des Fluoreszenzmikroskops.....	22
<b>Abbildung 7:</b> Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von <i>S.sanguinis</i> nach 2 Stunden Inkubation auf einem dentalen Zement.....	23
<b>Abbildung 8:</b> Färbung mit dem Fluochrom Hoechst 33342; <i>S. sanguinis</i> auf Titanoberfläche nach 2 Stunden Inkubation.....	26
<b>Abbildung 9:</b> Färbung mit dem Fluochrom Syto 9 bzw. mit dem Fluochrom Propidiumiodid; <i>S. sanguinis</i> auf Titanoberflächen nach 2 Stunden Inkubation.....	26
<b>Abbildung 10:</b> Digitale Überlagerungen der Aufnahmen mit Syto 9 und Propidiumiodid.....	27
<b>Abbildung 11:</b> Polyurethan-Polyester-Elastomer-Sticks; Probekörper, gewonnen aus den Endstücken der Sticks.....	31
<b>Abbildung 12:</b> Testoberflächen.....	31
<b>Abbildung 13:</b> Magnetronspatternanlage des Fraunhofer-Instituts für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik IGB.....	32
<b>Abbildung 14:</b> Dreidimensionale Darstellung des Oberflächenprofils der Silberbeschichtung; Echtfarbenansicht der Silberbeschichtung; Profilkurve des Rauheitsprofils.....	40
<b>Abbildung 15:</b> Dreidimensionale Darstellung des Oberflächenprofils der Bismutbeschichtung; Echtfarbenansicht der Bismutbeschichtung; Profilkurve des Rauheitsprofils.....	41
<b>Abbildung 16:</b> Dreidimensionale Darstellung des Oberflächenprofils des unbeschichteten Gummis; Echtfarbenansicht des Gummis; Profilkurve des Rauheitsprofils.....	42
<b>Abbildung 17:</b> Hoechst 33342-Färbung; unbeschichteter Gummi-Probekörper nach 2,5 Stunden Inkubation mit <i>Streptococcus mutans</i> .....	44
<b>Abbildung 18:</b> Hoechst 33342-Färbung; Bismut-beschichteter Probekörper nach 2,5 Stunden Inkubation mit <i>Streptococcus mutans</i> ; Vergrößerung 20x.....	44
<b>Abbildung 19:</b> Hoechst 33342-Färbung; Bismut-beschichteter Probekörper nach 2,5 Stunden Inkubation mit <i>Streptococcus mutans</i> ; Vergrößerung 40x.....	45
<b>Abbildung 20:</b> Hoechst 33342-Färbung; Silber-beschichteter Probekörper nach 2,5 Stunden Inkubation mit <i>Streptococcus mutans</i> ; Vergrößerung 40x.....	45
<b>Abbildung 21:</b> Hoechst 33342-Färbung; Silber-beschichteter Probekörper (rechte Hälfte) mit unbeschichtetem Breich (Kratzer, linke Hälfte) nach 2,5 Stunden Inkubation mit <i>Streptococcus mutans</i> ; Vergrößerung 40x.....	46
<b>Abbildung 22:</b> Lebend/Tot-Färbung (BaLight Bacterial Viability Kit); Silber-beschichteter Probekörper nach 2,5 Stunden Inkubation mit <i>Streptococcus mutans</i> .....	47
<b>Abbildung 23:</b> Lebend/Tot-Färbung (BaLight Bacterial Viability Kit); Silber-beschichteter Probekörper nach 2,5 Stunden Inkubation mit <i>Streptococcus mutans</i> .....	48
<b>Abbildung 24:</b> Lebend/Tot-Färbung (BaLight Bacterial Viability Kit); Bismut-beschichteter Probekörper nach 2,5 Stunden Inkubation mit <i>Streptococcus mutans</i> .....	48
<b>Abbildung 25:</b> Lebend/Tot-Färbung (BaLight Bacterial Viability Kit); Bismut-beschichteter Probekörper nach 2,5 Stunden Inkubation mit <i>Streptococcus mutans</i> .....	49
<b>Abbildung 26:</b> Lebend/Tot-Färbung (BaLight Bacterial Viability Kit); unbeschichteter Gummi-Probekörper mit starker Eigenfluoreszenz nach 2,5 Stunden Inkubation mit <i>Streptococcus mutans</i> .....	49

---

<b>Abbildung 27:</b> Box-Plot für Lumineszenz [rlu] nach Inkubation mit <i>Streptococcus mutans</i> auf den Gummi-, Silber-, und Bismut-Oberflächen .....	50
<b>Abbildung 28:</b> Box-Plot für Lumineszenz [rlu] nach Inkubation mit <i>Streptococcus mutans</i> auf den Gummi-, Silber-, und Bismut-Probekörpern ohne Vorversuch.....	52

---

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1</b> Mittelwerte des freien Oberflächenenergie SFE mit polarem und dispersem Anteil [mN/m]; gruppiert nach Beschichtung.....	39
---	----

## Abkürzungsverzeichnis

ALT	Alanin-Aminotransferase
AMP	Adenosinmonophosphat
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
aq. dest./Aqua dest.	<i>Aqua destillata</i>
Ar	Argon
AST	Aspartat-Aminotransferase
AT	Adenin/Thymin
ATP	Adenosintriphosphat
B2-Abfall	Umweltgefährdende feste und schlammige Abfälle
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DC-Magnetronspattern	<i>Direct Current Magnetron sputtering</i> ; Gleichstromspattern
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland
ESEM	<i>Environmental Scanning Electron Microscope</i>
F <sub>EMP</sub>	Empirischer F-Wert
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
H <sub>0</sub>	Nullhypothese
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
KBE	Koloniebildende Einheit
Mag	<i>Magnification</i> (Vergrößerung)
Mg	Magnesium
MIC	minimale inhibitorische Konzentration
N	Anzahl der Probekörper

NaCl	Natriumchlorid
OD	Optische Dichte
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PFA	Paraformaldehyd
pH	<i>Potentia Hydrogenii</i>
PI	Propidiumiodid
PK	Probekörper
PP <sub>i</sub>	Pyrophosphate (Diphosphate)
PVD	<i>Physical Vapour Deposition</i> (physikalische Gasphasenabscheidung)
REM, SEM	Rasterelektronenmikroskop
RF	<i>Radio Frequency</i>
rlu	relative Lumineszenz
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
S-IgA	Serum-Immunglobulin A
SFE	Freie Oberflächenenergie; <i>surface free energy</i>
sp.	Spezies
spp.	Plural von sp.: mehrere Arten der Gattung
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TM	Trademark
UV	Ultraviolettes Licht

# 1 Einleitung

Die Mundhygienefähigkeit von Patienten in kieferorthopädischer Behandlung ist oft eingeschränkt, da insbesondere die festsitzenden kieferorthopädischen Apparaturen Retentionsnischen für Speisereste und Bakterien bilden und es infolgedessen zur Ausbildung eines stärkeren oralen Biofilms auf den Zahn- und Bracketoberflächen kommt. Die kieferorthopädischen Ligaturenringe aus hochelastischem Material dienen neben den Drahtligaturen der Befestigung des Bogens im Bracketschlitz. Auch diese Ligaturenringe stellen zusätzliche Nischen für Bakterien dar. Eine suffiziente Mundhygiene ist für den Patienten nur mit erheblichem Aufwand möglich. Schmelzdemineralisationen in Form von White-Spot-Läsionen sowie Entzündungen des Zahnfleisches und Zahnhalteapparates sind mögliche Folgen, die bei unzureichender Mundhygiene auftreten können.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, die Bildung von White-Spot-Läsionen während der kieferorthopädischen Behandlung zu verhindern. In der Kariesprophylaxe sollten Maßnahmen wie die mechanische Biofilmentfernung, Mundhygiene-Instruktionen, professionelle Zahnreinigungen sowie die Applikation von Fluoriden und anderen antimikrobiellen Agenzien kombiniert werden. Bedeutender Nachteil dieser Methoden zur Prävention von Demineralisationen ist die Abhängigkeit von der Mitarbeit der Patienten. Den meist jugendlichen Patienten fehlt häufig das Interesse an der täglichen Pflege der Apparaturen, weshalb in vielen Fällen bei der häuslichen Mundhygiene keine ausreichend effektive und vollständige Entfernung des Biofilms erreicht werden kann.

Zusätzlich zu den individuellen Mundhygienemaßnahmen wären deshalb antimikrobiell wirksame kieferorthopädische Materialien von erheblichem Nutzen. Metalle wie Silber, Bismut und Kupfer sind für ihre antibakterielle Wirksamkeit bekannt und werden in der Medizin und Lebensmittelindustrie vielseitig eingesetzt. Diverse Studien über die Verwendung dieser Metalle in Kombination mit dentalen Werkstoffen lieferten bereits vielversprechende Ergebnisse. In der vorliegenden In-vitro-Studie sollte deshalb die antimikrobielle Wirkung von Silber und Bismut als Oberflächenbeschichtung von Ligaturenringen auf *Streptococcus mutans*, den Leitkeim der Kariespathogenese, untersucht werden.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Orale Biofilme

#### 2.1.1 Entstehung und Morphologie von Biofilmen

Alle Hart- und Weichgewebe der Mundhöhle sind normalerweise von Biofilmen bedeckt. Diese Biofilme sind ubiquitär und neben anderen Virulenzfaktoren verantwortlich für die Entstehung von Karies und parodontalen Entzündungen (Loesche 1986; Whittaker et al. 1996; Hannig und Hannig 2009; Jafer et al. 2016). Biofilme sind ökologische Lebensgemeinschaften von Mikroorganismen, die in einer Matrix aus extrazellulärem polymerem Material eingebettet vorliegen (Wimpenny et al. 2000). Sie entstehen, wenn Mikroorganismen sich an Grenzflächen zwischen zwei verschiedenen Phasen ansiedeln (Hannig und Hannig 2009) und sind vorzugsweise in wässrigen Systemen zu finden (Marsh und Bradshaw 1995; Wingender 1999; Karatan und Watnick 2009). Die extrazelluläre Matrix aus polymeren Molekülen wird von den Bakterien selbst synthetisiert und dient unter anderem der dauerhaften und festen Anheftung auf der Grenzfläche, dem sogenannten Substrat (Wingender 1999; Flemming et al. 2007; Flemming und Wingender 2010).

Auf einer keimfreien Zahnoberfläche, die in der Mundhöhle exponiert wird, verläuft die Biofilmentstehung in verschiedenen Stadien: zunächst erfolgt die Anheftung von Speichelglykoproteinen an die Zahnoberfläche, die *acquired pellicle* (Schmelzoberhäutchen) wird gebildet (Armstrong 1967; Armstrong 1968; Siqueira et al. 2012). Es folgt die reversible unspezifische Bakterienadhäsion mit schwachen, weitreichenden physiko-chemischen Interaktionen zwischen der Zelloberfläche und der Pellicel (Cowan et al. 1987; van Loosdrecht und Zehnder 1990b; Nobbs et al. 2011). Im Anschluss an die reversible Bakterienadhäsion kommt es zu einer stärkeren, Adhesin-Rezeptor-vermittelten spezifischen Anheftung, die im weiteren Verlauf zur Co-Adhäsion (Bindung planktonischer Bakterien an bereits adhärente Bakterien) und Co-Aggregation (Bindung genetisch verschiedener Bakterien in der planktonischen Phase) weiterer Bakterien an bereits gebundene Zellen führt (van Loosdrecht und Zehnder 1990b; Kolenbrander et al. 1993; Kolenbrander et al. 2006).

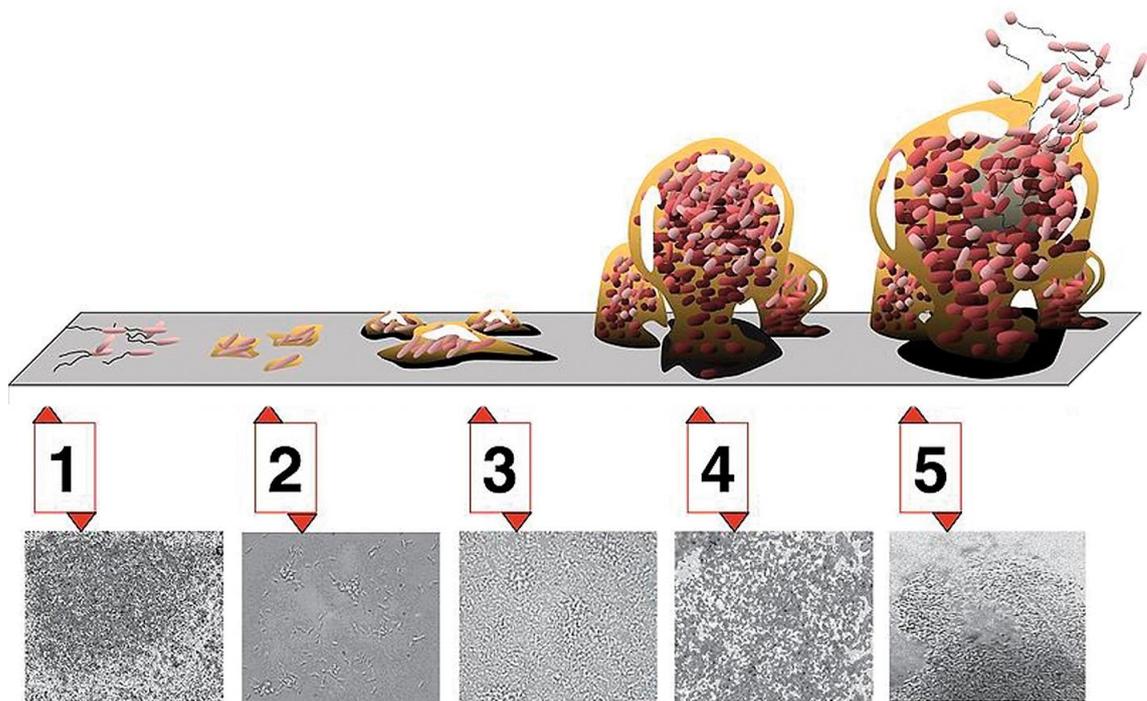
Die sogenannte *acquired pellicle* ist ein ca 0,1-1,3 µm dicker azellulärer Film und besteht aus Speichelglykoproteinen, Muzinen und zellfreien Enzymen (Hannig 1999a; Hannig 1999b; Yao et al. 2001; Hannig et al. 2005a). Die initiale Pellicel-Bildung erfolgt innerhalb von wenigen Minuten (Al-Hashimi und Levine 1989; Hannig 1999b; Lendenmann et al. 2000) und vermittelt die Wechselwirkung zwischen festem Substrat, oralen Flüssigkeiten und Mikroorganismen (Whittaker et al. 1996; Siqueira et al. 2012; Lee et al. 2013). Der schnellen ersten Phase der Pellicel-Bildung schließt sich die Phase der kontinuierlichen Adsorption von Protein-Aggregaten aus dem Speichel an (Hannig 1999b; Lee et al. 2013). Die Pellicel-Bildung

unterliegt einer hohen Selektivität – nur ein Bruchteil der im Speichel vorhandenen Proteine ist in der Pellikel zu finden (Al-Hashimi und Levine 1989; Hannig und Joiner 2006). Stathe-rin, Histatin und prolinreiche Proteine sind Phosphoproteine mit hoher Affinität zu Hydroxylapatit und zählen zu den ersten adsorbierten Proteinen auf der Zahnoberfläche (Hay 1973; Jensen et al. 1992; Lamkin et al. 1996; Yao et al. 2001; Li et al. 2004b). Sie werden auch Pellikel-Vorläufer-Proteine genannt (Hay 1973). Des Weiteren zählen Albumin,  $\alpha$ -Amylase, Carboanhydrase II, S-IgA, IgG, IgM, Laktoferrin, Lysozym sowie Kohlenhydrate, Lipide und Aminosäuren zu den Bestandteilen der Pellikel (Sönju und Glantz 1975; Mayhall und Butler 1976; Slomiany et al. 1986; Al-Hashimi und Levine 1989; Rykke et al. 1990; Yao et al. 2001; Li et al. 2004b; Siqueira et al. 2012).

Die Adsorption der Proteine auf dentalen Oberflächen ist das Resultat verschiedener gleichzeitig auftretender Wechselwirkungen unterschiedlicher Reichweite (Norde 1986; Gibbins et al. 2014). Van-der-Waals- und Coulomb-Kräfte haben mit 50-100 nm die größte Reichweite, hydrophobe Wechselwirkungen mit 10-50 nm eine mittlere und elektrostatische sowie Säure-Base-Wechselwirkungen, ionische Bindungen, kovalente Bindungen und Wasserstoffbrückenbindungen eine geringe Reichweite von unter 5 nm (Verwey 1947; Derjaguin und Landau 1993; van Oss 2003; Hannig und Hannig 2009; Gibbins et al. 2014) Laut van Oss (2003) sind die Säure-Base- oder auch Elektronen-Akzeptor/Donator-Wechselwirkungen die vorherrschenden Kräfte unter den nicht-kovalenten Bindungen.

Die Zusammensetzung der Pellikel unterliegt permanenten Veränderungen, die auf Enzymaktivitäten zurückzuführen sind, welche Proteine abbauen oder modifizieren (Siqueira et al. 2012; Lee et al. 2013). Laut Hannig *et al.* (2009) sind die Transaminasen Aspartat-Aminotransferase (AST) und Alanin-Aminotransferase (ALT) an der intrinsischen Reifung der Pellikel-Proteine maßgeblich beteiligt. Die reife Pellikel ist ambivalent. Auf der einen Seite fungiert sie als Gleitmittel, Erosionsschutz und Puffer für den Zahnschmelz (Slomiany et al. 1986; Hannig et al. 2004; Hannig und Hannig 2014) und wirkt über die Proteine Laktoferrin, Cystatin und Lysozym direkt antibakteriell (Hannig et al. 2005b; Hannig und Joiner 2006; Deimling et al. 2007; Hannig et al. 2009). Auf der anderen Seite weist die *acquired pellicle* einige Eigenschaften auf, die die bakterielle Adhäsion erleichtern (Slomiany et al. 1986; Meurman und Frank 1991; Hannig und Joiner 2006). Einige Komponenten der Pellikel, wie zum Beispiel Amylase, Prolinreiche Proteine, Mucin MG2, Fibrinogen und Lysozym, dienen als spezifische Rezeptoren für die anschließende bakterielle Anheftung (Scannapieco et al. 1989; Scannapieco et al. 1993; Douglas 1994; Rogers et al. 1998).

Die Bakterienadhäsion an der ausgereiften Pellikeloberfläche ist ein phasenweise ablaufender Prozess. Die fünf Stadien der bakteriellen Biofilmbildung sind 1) die initiale Adhäsion, 2) das Wachstum und die Matrixbildung, 3) die Reifung und Strukturierung, 4) die Dispersion/Detachment 5) und das Loslösen in planktonischer Phase (siehe **Abbildung 1**) (Busscher und Weerkamp 1987; van Loosdrecht et al. 1990a; van Loosdrecht und Zehnder 1990b; Scheie 1994; Bos et al. 1999; Teughels et al. 2006; Aguayo und Bozec 2016).



**Abbildung 1:** Phasen der Biofilmentstehung (Monroe 2007)

Der Transport zur Materialoberfläche erfolgt meist passiv über Brown'sche Molekularbewegungen (van Loosdrecht et al. 1990a; Teughels et al. 2006). Das zweite Stadium der Biofilmbildung ist die initiale, reversible Adhäsion der Bakterien (Heller et al. 2016). Innerhalb von 24 Stunden wird die Pellicel von vorwiegend grampositiven, fakultativ anaeroben Kokken und Stäbchen kolonisiert (Listgarten 1994; Rosan und Lamont 2000; Li et al. 2004a). Zu den ersten kolonisierenden Bakterien zählen *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mitis* und *Streptococcus gordonii* (Gibbons und Houte 1975; Socransky et al. 1977; Syed und Loesche 1978; Theilade et al. 1982; Nyvad und Kilian 1990; Diaz et al. 2006). Sie werden als Erstbesiedler bezeichnet (Nyvad und Kilian 1987; Nyvad und Kilian 1990). Die Adhäsion erfolgt über verschiedene molekulare Wechselwirkungen (Cowan et al. 1987; Nobbs et al. 2009; Heller et al. 2016). Es sind hauptsächlich physikalische Kräfte wie hydrophobe Wechselwirkungen, Van-der-Waals-Kräfte, Wasserstoff- und Kalziumbrücken sowie elektrostatische Wechselwirkungen und Säure-Base-Reaktionen beteiligt (Gibbons und Houte 1975; Nyvad und Fejerskov 1987; Whittaker et al. 1996; Dalton und March 1998; Palmer, Jr. et al. 2003; Nobbs et al. 2009). Die initiale, reversible Bakterienadhäsion vollzieht sich vorzugsweise in Bereichen mit Oberflächenunregelmäßigkeiten, wo die Mikroorganismen gegen Scherkräfte geschützt sind (Quirynen et al. 1993; Teughels et al. 2006).

Die irreversible, spezifische Adhäsion erfolgt durch metabolische, chemische und genetische Kommunikation zwischen den Bakterien. Nach der initialen Anlagerung der Pionierbakterien verstärken sich mit der Zeit vor allem die spezifischen Rezeptor-Adhäsion-Bindungen zwischen Bakterien und Pellicel-Oberfläche (Cowan et al. 1987; van Der Mei et al. 2008; Nobbs et al. 2009). Zudem wird dieses Stadium der Biofilm-Bildung hauptsächlich durch die

Co-Aggregation von Bakterien in Suspension und durch Co-Adhäsion zwischen suspendierten und bereits im Biofilm vorkommenden Bakterien bestimmt (Gibbons und Nygaard 1970; Kolenbrander et al. 1993; Kolenbrander und London 1993; Whittaker et al. 1996; Kolenbrander et al. 2006; Kolenbrander et al. 2010). Auch die bakterielle Produktion extrazellulärer Polysaccharide führt sowohl zur verstärkten Adhäsion des Biofilms an den oralen Oberflächen als auch zur vermehrten Anheftung neuer Bakterien (Schilling und Bowen 1992; Fleming et al. 2007; Koo et al. 2010).

Während unter den Pionierbakterien der primären Adhäsion vorwiegend grampositive, fakultativ anaerobe Kokken und Stäbchen zu finden sind, folgt in der sekundären Adhäsion nun die Besiedlung mit grampositiven und -negativen Stäbchen sowie fusiformen Bakterien (Listgarten et al. 1975; Socransky et al. 1977; Marsh et al. 2003; Zijngje et al. 2010). Mit Zunahme der Zellschichten sinken sowohl die Sauerstoffkonzentration als auch der pH-Wert – der orale Biofilm enthält zunehmend anaerobe und säuretolerante Mikroorganismen (Syed und Loesche 1978; Burne 1998; Marsh 2004; Takahashi und Nyvad 2008; Jakubovics und Kolenbrander 2010; Marsh et al. 2011). Neben der Erweiterung der bakteriellen Vielfalt gewinnt auch die räumliche und funktionelle Organisation der Mikroorganismen stetig an Ausprägungsgrad (Kolenbrander 1989; Kolenbrander et al. 2002; Marsh 2004; Zijngje et al. 2010). Um sich den wechselnden Umgebungsbedingungen anpassen zu können bedarf es eines interbakteriellen Informationsaustausches. Diese Kommunikation der Bakterienzellen erfolgt mittels Diffusion von Signalmolekülen und wird auch als *quorum sensing* bezeichnet (Bassler et al. 1997; Miller und Bassler 2001; Marsh 2004; Waters und Bassler 2005; ten Cate 2006; Li und Tian 2012). Die von den Bakterienzellen abgegebenen Signalmoleküle lösen bei Über- oder Unterschreitung eines bestimmten Schwellenwertes genetische Regulationsprozesse aus und führen so zur Expression spezifischer Gene (Kaplan und Greenberg 1985). Die Bakterien sind in der Lage, mithilfe des *quorum sensing* Prozesse zu koordinieren, die nur durch das Zusammenspiel mehrerer Bakterienspezies effizient sind. Hierzu zählen unter anderem die Bildung definierter Biofilmarchitekturen sowie die Ausprägung und Vermehrung der bakteriellen Virulenzfaktoren (Passador et al. 1993; Fuqua et al. 1994; Davies et al. 1998; Novick und Muir 1999; Vuong et al. 2000; Rutherford und Bassler 2012; Parashar et al. 2015). Mit Ausreifung des Biofilms kann auch ein horizontaler Genaustausch zwischen den Bakterien erfolgen und den Mikroorganismen eine Veränderung ihres Phänotyps ermöglichen (Håvarstein et al. 1995; DuPont 1997; Madsen et al. 2012).

Ein weiteres Stadium der Biofilmentwicklung ist das sogenannte Detachment-Phänomen. Hierbei kommt es zur Ablösung einiger Mikroorganismen des Biofilms (Stewart 1993; Stoodley et al. 2001). Ein Teil der Bakterien des Biofilms sind in der Lage, Enzyme zu produzieren, welche die Adhäsine der Bakterienzelloberfläche oder Bestandteile der Biofilm-Matrix hydrolysieren, wodurch die Adhäsion-Rezeptor-Verbindung sowie die schützende Wirkung der Matrix aufgelöst wird und so andere Oberflächen der Mundhöhle neu kolonisiert werden können (planktonische Phase) (Cavedon und London 1993; Lee et al. 1996; Kaplan 2010). Das Detachment-Phänomen spielt bei der Übertragung von Infektionen und Erregern, wie

beispielsweise des kariogenen Keimes *Streptococcus mutans* von der Mutter auf das Kind, eine wichtige Rolle (Lee et al. 1996; Stoodley et al. 2001; Gripp und Schlagenhaut 2002; Kaplan 2010).

### 2.1.2 Physiko-chemische Faktoren der bakteriellen Adhäsion

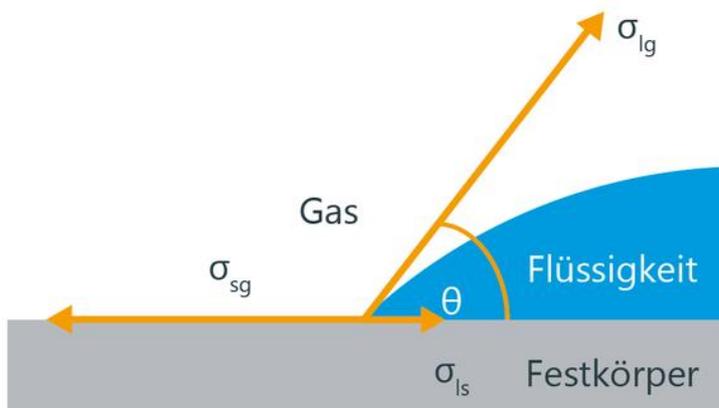
Die irreversible Bakterienadhäsion auf Oberflächen ist eine Voraussetzung für die Biofilmbildung und wird durch verschiedene physikalische und chemische Faktoren beeinflusst (Marsh und Bradshaw 1995). Insbesondere in der initialen Phase der Bakterienadhäsion sind Wechselwirkungen zwischen Mikroorganismen und Substrat von entscheidender Bedeutung. Diese Wechselwirkungen werden neben hydrodynamischen Scherkräften, Temperatur und pH-Wert entscheiden durch Faktoren wie das Zeta-Potenzial, die Oberflächenrauheit, die Hydrophobizität sowie die freie Oberflächenenergie (SFE, *surface free energy*) bestimmt (McEl-downey und Fletcher 1986; Weerkamp et al. 1988; Quirynen et al. 1990; Cowan et al. 1992; Ahn et al. 2009; Rashid 2014).

Das Zeta-Potenzial ist das elektrostatisch wirksame Potenzial an der Grenzfläche von Partikeln in Suspension und ist abhängig von der Ionenkonzentration der Flüssigkeit, der Polarität der adsorbierten Ionen sowie der Ladung der Materialoberfläche. Änderungen des pH-Wertes führen ebenfalls zu Änderungen des Zeta-Potenzials (Kinnari et al. 2009). Laut Weerkamp *et al.* (1988) ist ein erhöhtes Zeta-Potenzial mit einer verminderten Bakterienadhäsion verknüpft. Ein weiterer Parameter, der die bakterielle Adhäsion beeinflusst, ist die Oberflächenrauheit (Ahn et al. 2009; Yeo et al. 2012; Rashid 2014). Die mittlere Rauheit  $R_a$  stellt das arithmetische Mittel des Oberflächenprofils dar und wird in der Einheit  $\mu\text{m}$  angegeben (Quirynen und Bollen 1995; Bollen et al. 1997; Kappert und Eichner 2005; Ahn et al. 2009). In der Literatur konnte eine stärkere bakterielle Adhäsion auf rauen Oberflächen dentaler Werkstoffe im Vergleich zu besser polierten, glatteren Oberflächen festgestellt werden (Einwag et al. 1990; Kawai und Urano 2001; Sainan et al. 2016). Für Titan wird eine mittlere Rauheit  $R_a$  von  $0,2 \mu\text{m}$  als Grenzwert angegeben. Unterhalb dieses Wertes kann durch Politur keine weitere Reduktion der bakteriellen Adhäsion erreicht werden (Bollen et al. 1997). Zur Bestimmung der mittleren Rauheit kommen als Oberflächenmesstechniken die 2D-Profilometrie bzw. Tastschnittmessung sowie die dreidimensionale Oberflächenmessung mithilfe des Weitwinkel-Konfokalmikroskops zum Einsatz (Wennerberg et al. 1996; Mustafa et al. 2001; Kocher et al. 2002; Xia et al. 2012).

Ein weiterer wesentlicher Faktor, der die bakterielle Adhäsion bestimmt, ist die Hydrophobizität als Maß für den Ausprägungsgrad der Hydrophobie von Stoffen (Atkins 2013). Die bakterielle Anlagerung ist zum einen von der Hydrophobie der Materialoberfläche und zum anderen von der Hydrophobie der Protein- oder Bakterienoberfläche abhängig. Hydrophobe Bakterien adhären bevorzugt an ebenfalls hydrophoben Materialien und umgekehrt bevorzugen hydrophile Bakterien eine hydrophile Materialoberfläche (Quirynen et al. 1990;

Quirynen und Bollen 1995; An und Friedman 1998; Morgan und Wilson 2001; Xu und Siedlecki 2014; Song et al. 2015). An hydrophilen Oberflächen kommt es vermehrt zu Wasseranlagerungen, wodurch die Proteinadsorption erschwert ist. Auf hydrophoben Oberflächen kann demnach eine stärkere Ansammlung von Proteinen festgestellt werden (Norde 1986; Vassilakos et al. 1992; Vassilakos et al. 1993; Lindh 2002). Die Hydrophilie wird beispielsweise über Kontaktwinkelmessungen mit verschiedenen Messflüssigkeiten auf der Oberfläche der Testmaterialien bestimmt. Bei der Kontaktwinkelmessung wird der Winkel zwischen Materialoberfläche und einem auf diese Oberfläche auftreffenden Tropfens der Messflüssigkeit ermittelt (siehe **Abbildung 2**) (Freie Oberflächenenergie - KRÜSS GmbH 2017). In den meisten Fällen steht die Hydrophobie in enger Korrelation zur freien Oberflächenenergie, indem es mit steigender Hydrophobizität zu einer Abnahme der freien Oberflächenenergie kommt (van Loosdrecht et al. 1987a; van Loosdrecht et al. 1987b).

Die freie Oberflächenenergie (SFE,  $\sigma$ ) beschreibt die Grenzflächenspannung von zwei Stoffen beliebiger Phase und wird basierend auf SI-Einheiten in  $\text{mJ}/\text{m}^2$  oder in  $\text{mN}/\text{m}$  angegeben. Sie ist vergleichbar mit der Oberflächenspannung bei Flüssigkeiten (Freie Oberflächenenergie - KRÜSS GmbH 2017). Die freie Oberflächenenergie wird anhand der Kontaktwinkelmessung ermittelt (Busscher et al. 1984). Anfang des 19. Jahrhunderts beschrieb Thomas Young mit der Young'schen Gleichung ( $\sigma_s = \sigma_{sl} + \sigma_l \cdot \cos\theta$ ) den Zusammenhang zwischen der freien Oberflächenenergie des Festkörpers ( $\sigma_s$ ), dem Kontaktwinkel ( $\theta$ ), der Oberflächenspannung der Flüssigkeit ( $\sigma_l$ ) sowie der Grenzflächenspannung ( $\sigma_{sl}$ ) zwischen Festkörper und Flüssigkeit. Zur Berechnung der freien Oberflächenenergie anhand der Methode nach Owens, Wendt, Rabel und Kaelble erfolgte zudem die Aufteilung der jeweiligen Oberflächenspannungen in einen dispersen (<sup>d</sup>) und einen polaren (<sup>p</sup>) Anteil ( $\sigma_s = \sigma_s^d + \sigma_s^p$ ) (Freie Oberflächenenergie - KRÜSS GmbH 2017).



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung der Kontaktwinkelmessung eines liegenden Tropfens (Freie Oberflächenenergie - KRÜSS GmbH 2017)

In der Literatur wird berichtet, dass sich Bakterien in höherem Maße auf hochenergetischen Oberflächen ansammeln und dort ebenfalls fester binden. So kommt es auch auf oralen Oberflächen mit hoher freier Oberflächenenergie bevorzugt zu einer Adhäsion oraler Mikroorganismen, da diese meist selbst eine hohe freie Energie besitzen. Eine Reduktion der freien Oberflächenenergie auf oralen Oberflächen könnte demnach zu einer Reduktion der bakteriellen Besiedelung und Biofilmbildung führen (Norde 1986; Weerkamp et al. 1988; Quirynen et al. 1990; Quirynen und Bollen 1995; Arvidsson et al. 2004; Mabboux et al. 2004; Teughels et al. 2006). Einige Studien berichten jedoch, dass die Rauheit über einem  $R_a$  von  $0,2 \mu\text{m}$  einen größeren Einfluss auf die bakterielle Adhäsion zu haben scheint als die freie Oberflächenenergie (Quirynen et al. 1990; Grössner-Schreiber et al. 2001; Teughels et al. 2006; Bürgers et al. 2010).

### 2.1.3 Rolle der Mutans-Streptokokken in der Karies-Entstehung

Neben den Parodontopathien ist Karies die weltweit häufigste bakterielle Infektionskrankheit (Helöe und Haugejorden 1981; Edman et al. 2016). Die Kariesentstehung und -entwicklung wird zum einen durch die Nahrungszusammensetzung und Frequenz der Nahrungsaufnahme und zum anderen durch die Stoffwechselaktivität der oralen Bakterienflora bestimmt (Frostell 1969; Khoo et al. 2005; Bernabé et al. 2016). Die Zusammensetzung der oralen Mikroflora hat eine entscheidende Auswirkung auf die Entstehung und Progression kariöser Läsionen. Neben Laktobazillen wird insbesondere *Streptococcus mutans* als Leitkeim der Kariesentstehung betrachtet (Hamada und Slade 1980; Loesche 1986; Legéřnová und Bujđáková 2015).

Streptokokken sind unbewegliche, grampositive Bakterien. Morphologisch stellen sie sich als kugelige bis eiförmige Zellen dar, die in gewundenen Ketten angeordnet sind (Miller 1890). *Streptococcus mutans* zählt zu den Streptokokken der Mutansgruppe, deren natürliches Biotop der Rachenraum ist. Neben *Streptococcus mutans* sind *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus rattus*, *Streptococcus cricetus*, *Streptococcus downei*, *Streptococcus ferus* und *Streptococcus macacae* weitere Vertreter der Mutansgruppe (Coykendall 1974). Alle Streptokokkenspezies sind fakultativ anaerob (Abbe et al. 1991). *Streptococcus mutans* wurde bereits 1924 als ein Hauptverursacher dentaler Karies identifiziert (Clarke 1924; Hamada und Slade 1980). Seine Virulenz ist auf unterschiedliche Eigenschaften zurückzuführen: die Fähigkeit zur Adhäsion, Säureproduktion und Säuretoleranz (Schilling und Bowen 1992; Dashper und Reynolds 1996; Svensäter et al. 1997; Banas 2004; Krzyściak et al. 2014). Die Adhäsion wird über Oberflächenadhäsine für Glykoproteinstrukturen der *acquired pellicle* und über spätere Vernetzung mit anderen Primärkolonisierern vermittelt (Whittaker et al. 1996). Nach Adhäsion am Schmelzoberhäutchen ist *Streptococcus mutans* in der Lage, mithilfe der Glykosyltransferase aus Saccharose der Nahrung unlösliche extrazelluläre Polysaccharide (Glucane) zu produzieren, die zum einen die Adhäsion an die Pellicel unterstützen und zum anderen dem Bakterium selbst sowie anderen Bakterienarten als Substratspeicher und Lebensraum dienen (Schilling und Bowen 1992; Koo

et al. 2010). Des Weiteren konnte Miller (1890) erstmals den Zusammenhang zwischen der bakteriellen Milchsäureproduktion und Karies-entstehung herstellen. Im Rahmen eines fermentativen Stoffwechsels baut das Bakterium ebenfalls mithilfe der Glykosyltransferase die Oligosaccharide der Nahrung zu Lactat ab – es kommt zu einem deutlichen Abfall des pH-Wertes (Miller 1890; Jensen et al. 1982; Loesche 1986; de Soet et al. 2000; Thaweboon et al. 2007). Die demineralisierende Milchsäure führt dann zum Herauslösen von Kalzium- und Phosphationen aus dem Zahnschmelz (Clarke 1924; West und Joiner 2014). Wenn Frequenz und Rate der Milchsäureproduktion die natürliche Remineralisation übersteigen, kommt es zu einer dauerhaften Demineralisation, die im weiteren Verlauf bei längerfristigem Unterschreiten des kritischen pH-Wertes von 5,5-5,3 zur Kavitation führen kann (Arends und ten Cate 1981; Takahashi und Nyvad 2008). Ein saures Umgebungsmilieu kann sich jedoch nicht nur schädigend auf die Zahnhartsubstanz auswirken, sondern auch auf die Mikroorganismen des oralen Biofilms. Es kann zur Versäuerung des intrazellulären Zytoplasmas mit anschließendem Verlust der glykolytischen Enzymaktivität sowie zur strukturellen Schädigung der Zellmembran, Proteine und bakterieller DNA kommen (Lindahl und Nyberg 1972; Klungland und Yang 2016). Säuretolerante Bakterienspezies sind in der Lage, mithilfe verschiedener Mechanismen ihre bakterielle DNA zu schützen oder im Falle einer Schädigung zu reparieren (Svensäter et al. 1997; Cotter und Hill 2003; Cox 2007). Die Säuretoleranz bestimmter Bakterienspezies, darunter auch *Streptococcus mutans*, stellt daher einen bedeutenden Virulenzfaktor dar, der zur Progression kariöser Läsionen beiträgt (Belli und Marquis 1991). Es konnte gezeigt werden, dass Bakterien im Biofilm eine signifikant höhere Säuretoleranz aufweisen als die gleiche Spezies in planktonischer Form (Welin-Neilands und Svensäter 2007).

#### 2.1.4 Folgen der Biofilmbildung in der kieferorthopädischen Therapie

Auch in der kieferorthopädischen Behandlung mit festsitzenden Apparaturen stellt die Biofilmbildung eine Herausforderung an den Behandler dar. Schmelzdemineralisationen in Form von White-Spot-Läsionen sowie gingivale und parodontale Erkrankungen sind häufige ungewollte Nebeneffekte der festsitzenden Apparaturen und können bereits im Zeitraum von vier Wochen nach Therapiebeginn manifest werden (O'Reilly und Featherstone 1987; Ogaard et al. 1988; Lovrov et al. 2007; Bergstrand und Twetman 2011; Richter et al. 2011). Durch die Eingliederung der Brackets und Bögen werden zusätzliche Retentionsnischen und Prädilektionsstellen geschaffen, die zu einer erhöhten Akkumulation von Bakterien bei gleichzeitig erschwerter Mundhygiene führen (Balenseifen und Madonia 1970; Gwinnett und Ceen 1979; Büyükyilmaz und Øgaard 1995; Atack et al. 1996). Auch die physiologischen Selbstreinigungsmechanismen werden durch die festsitzenden Apparaturen beeinträchtigt (Srivastava et al. 2013). Der Biofilm entsteht vorzugsweise unter Bändern (Forsberg et al. 1991) und am Übergang vom Bracket zum Schmelz (Gwinnett und Ceen 1979). Auch die Art der Ligation hat laut Forsberg *et al.* (1991) einen Einfluss auf die Bakterienakkumulation. So wiesen Patienten mit elastischen Ligaturen deutlich mehr Bakterien im dentalen Biofilm

auf als Patienten mit Stahlligaturen (Forsberg et al. 1991). Nicht nur die bakterielle Akkumulation wird begünstigt, sondern auch die Speichelzusammensetzung wird zugunsten der säureproduzierenden Bakterienspezies verändert (Corbett et al. 1981; Maret et al. 2014). Während der aktiven Behandlungsphasen konnten erhöhte Anzahlen an *Streptococcus mutans* und Lactobazillen im Speichel und im dentalen Biofilm nachgewiesen werden (Mattingly et al. 1983; Rosenbloom und Tinanoff 1991; Jordan und LeBlanc 2002; Andruccioli et al. 2012; Moolya et al. 2014). Neben der Speichelzusammensetzung spielen auch individuelle Faktoren, wie die Kohlenhydratzufuhr, Mundhygiene, Schmelzstruktur sowie Speichelzusammensetzung und -fließrate eine entscheidende Rolle bei der Biofilm-Entstehung (Frostell 1969; Khoo et al. 2005; Selwitz et al. 2007; Srivastava et al. 2013; Bernabé et al. 2016), die im weiteren Verlauf zur kariösen Läsion des Zahnes führen kann (Marsh 2010).

### 2.1.5 Präventionsmaßnahmen in der Kieferorthopädie

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, die Bildung von White-Spot-Läsionen und Gingivitiden während der kieferorthopädischen Behandlung zu reduzieren. Bei der Kariesprophylaxe werden Maßnahmen wie die mechanische Biofilmentfernung, Mundhygiene-Instruktionen, professionelle Zahnreinigungen sowie die Applikation von Fluoriden und anderen antimikrobiellen Agenzien vereint (Harvey und Powell 1981; O'Reilly und Featherstone 1987; Ogaard et al. 1988; Geiger et al. 1992; Srivastava et al. 2013). Die mechanische Biofilmentfernung durch den Patienten erfolgt mit Zahnbürsten, Zahnpasta sowie weiteren Hilfsmitteln wie Zahnseide, Monobüschel- und Interdentalbürsten zur effektiven Reinigung sowohl der Brackets als auch der Interdentalräume und stellt die Grundlage der Kariesprävention dar (Ogaard et al. 1988; Kossack und Jost-Brinkmann 2005). Bei vollständiger und gründlicher Entfernung der Beläge kann die Kariesentstehung verhindert werden (Bellini et al. 1981). Häufig erfolgt jedoch bei der häuslichen Mundhygiene keine ausreichend effektive und vollständige Entfernung des Biofilms, da die durchschnittlich aufgewendete Zeit für die Mundhygiene oftmals weniger als eine Minute beträgt (Saxer et al. 1998). Um dennoch eine erfolgreiche Kariesprävention zu erreichen, sollten die Defizite der häuslichen Mundhygiene durch professionelle Zahnreinigungen ausgeglichen werden (Huber et al. 1987; Holmen et al. 1988).

Eine weitere Säule der Kariesprophylaxe bilden die Fluoridierungsmaßnahmen. Insbesondere der Bereich des Bracketumfeldes, der bei der Befestigung der Brackets einer Demineralisation ausgesetzt wurde, sollte bei der Fluoridierung sehr gründlich behandelt werden (O'Reilly und Featherstone 1987; Baka et al. 2015). Die Applikation von Fluoriden in verschiedenen Formen wie Mundspüllösungen, Zahnpasten, hochdosierten Lacken und als Bestandteil von Adhäsiven beeinträchtigen den Bakterienstoffwechsel der kariesverursachenden Bakterien (ten Cate und van Loveren 1999), erhöhen die Widerstandsfähigkeit von Schmelz und Dentin (ten Cate 1997) und können auf diese Weise maßgeblich zur Prävention von White-Spot-Läsionen beitragen (O'Reilly und Featherstone 1987; Geiger et al. 1988; Geiger et al. 1992; Bergstrand und Twetman 2011).

Bedeutender Nachteil der zuvor genannten Methoden zur Prävention von White-Spot-Läsionen ist die Abhängigkeit von der Compliance der Patienten (Geiger et al. 1988; Geiger et al. 1992; Hadler-Olsen et al. 2012). Zusätzlich zu den individuellen Mundhygienemaßnahmen sind deshalb präventive Maßnahmen, die unabhängig von der Mitarbeit der Patienten stattfinden, erstrebenswert und notwendig. Antiadhäsive und antibakterielle Oberflächenmodifikationen könnten die Bakterienadhäsion deutlich reduzieren und so unerwünschte Nebenwirkungen wie Demineralisationen und Entzündungen der Gingiva verhindern

## 2.2 Antimikrobielle Strategien bei dentalen Werkstoffen

Biofilm-assoziierte infektiöse Erkrankungen machen mehr als 80% der bakteriellen Infektionen aus. Antiseptika wie Chlorhexidin-Präparate oder Delmopinol dienen bereits seit vielen Jahren der Prävention von Infektionen in der Mundhöhle (Heyden 1970; Mandel 1988; Claydon et al. 1996; Arweiler et al. 2003; Baehni und Takeuchi 2003). Loe und Schiott (1970) zeigten während ihrer 21-tägigen Studie, in der die Probanden nicht die Zähne putzten, dass die Verwendung einer 0,2%igen Chlorhexidin-Mundspüllösung die Entstehung und Entwicklung von Plaque und Gingivitis vollständig verhindern konnte. Die Chlorhexidin-Moleküle adsorbieren an der Schmelzoberfläche direkt oder am Schmelzoberhäutchen und verhindern auf diese Weise die Bakterienadhäsion (Rölla und Melsen 1975). In hohen Konzentrationen zeigt Chlorhexidin auch eine direkte bakterizide Wirkung durch Schädigung der bakteriellen Zellmembran (Meurman 1988). Bakterien, die Teil eines ausgereiften oralen Biofilms sind, besitzen jedoch andere virulente Eigenschaften im Vergleich zu ihrer planktonischen Form. Bakterien im Biofilm erwiesen sich als deutlich weniger empfänglich für antimikrobielle Substanzen als planktonische Zellen (Larsen und Fiehn 1996; Wilson et al. 1996). Zaura-Arite *et al.* (2001) zeigten in ihrer Studie, dass die Wirksamkeit antimikrobieller Substanzen auf einen ausgereiften Biofilm nur auf die äußersten Schichten begrenzt ist. Des Weiteren demonstrierten Pratten *et al.* (1998), dass sich Bakterien nach einer Chlorhexidin-Behandlung schnell wieder erholen. Demnach scheint die Wirksamkeit antimikrobieller Agenzien auf einen ausgereiften Biofilm begrenzt zu sein.

Der orale Biofilm bildet nicht nur die Grundlage der oralen Infektionskrankheiten, sondern stellt gleichzeitig ein Bakterienreservoir für chronische Erkrankungen im gesamten Körper bereit (Beck et al. 1996; Li et al. 2000; Al Kawas et al. 2012; Nilson et al. 2016). Die Mikroorganismen im Biofilm reagieren nur schwach auf konventionelle Antibiotika und sind durch die interzelluläre Kommunikation in der Lage, Antibiotikaresistenzen zu entwickeln und über einen horizontalen Gentransfer auf andere Bakterienarten im Biofilm zu übertragen (Klein 1947; Arthur und Courvalin 1993; Davies 1994; Høiby et al. 2010). Antibiotika greifen hauptsächlich an vier bakteriellen Zielpunkten an: Zellwandsynthese, bakterielle Proteinsynthese sowie bakterielle Translation und DNA-Replikation (Thrum 1977; Walsh 2000). Bakterielle Resistenzen können sich jedoch bereits innerhalb einiger Monate gegen alle vier Angriffsmechanismen ausbilden (Davies 1996; Walsh 2000). Die Mechanismen der Resistenzbildung beinhalten Enzyme wie Beta-Laktamase und Aminoglykoside, Modifikationen von Zellkomponenten wie Zellwand und Ribosomen sowie Effluxpumpen, die eine Resistenz gegen viele Antibiotika ermöglichen (Bryan 1988; Jarlier et al. 1988; Shaw et al. 1993; Li et al. 2015). Die Vermeidung der Bakterienadhäsion an Biomaterialien mit daraus resultierender Biofilmbildung ist daher ein wesentlicher Aspekt in der Entwicklung dentaler und

medizinischer Materialien. Die aktuelle Forschung konzentriert sich hierbei auf die Entwicklung anti-adhäsiver und antibakterieller Oberflächen (Gottenbos et al. 2002; Müller et al. 2007; Hannig und Hannig 2009).

Antimikrobielle Nanopartikel als Alternative zu Antibiotika gewinnen in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung. Neben den anorganischen metallhaltigen Nanopartikeln existieren auch diverse organische Nanopartikel, die eine große Bandbreite an anti-mikrobiellen Wirkungsspektren aufweisen. Die Inkorporation von Nanopartikeln darf die chemischen und physikalischen Eigenschaften und somit die klinische Verwendung jedoch nicht beeinträchtigen. Des Weiteren müssen sowohl die antimikrobiellen und anti-adhärenenten Eigenschaften als auch die Sicherheit der Nanopartikel über einen klinisch relevanten Zeitraum sichergestellt werden.

### 2.2.1 Nanopartikel – Eigenschaften und Grundlagen

Nanopartikel sind unlösliche Teilchen mit einer Größe von bis zu 100 nm (Cushing et al. 2004). Im Vergleich zu größeren Partikeln besitzen Nanopartikel ein größeres Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnis, was zum einen den Vorteil einer besseren Interaktion mit mikrobiellen Membranen bedeutet und zum anderen die Abgabe von wirksamen Ionen begünstigt und damit die bakterizide bzw. bakteriostatische Wirkung verstärkt (Morones et al. 2005; Verran et al. 2007). Besonders die Nanopartikel mit einer Partikelgröße von 1-10 nm binden an die Zellmembran und stören so die physiologischen Funktionen wie Permeabilität und Zellatmung (Kawabata et al. 1987; Yong 2015). Die Schädigung der Membran tritt ein, wenn sich die Nanopartikel elektrostatisch mit der Zellwand verbinden und so eine Veränderung des Membranpotenzials, der Membrandepolarisation und den Verlust der Zellintegrität bewirken. Es kommt zu einem Ungleichgewicht der bakteriellen Transportmechanismen, einer Beeinträchtigung der Zellatmung, Unterbrechung der Signalweitergabe bis hin zur Zell-Lyse und dem Zelltod (Lok et al. 2006). Ein weiterer Vorteil der geringen Partikelgröße von Nanopartikeln ist die höhere Mobilität und die damit einhergehende bessere Bioverfügbarkeit. Die Nanopartikel können ins Innere der Bakterienzelle penetrieren und dort an stickstoff-, sauerstoff- oder schwefelhaltige Elektronendonorguppen, die in der Bakterienzelle in Form von Aminen, Hydroxylen, Phosphaten, Imidazolen und Thiolen vorkommen, binden (Feng et al. 2000; Morones et al. 2005; Eckhardt et al. 2013). Einige Studien machen zusätzlich darauf aufmerksam, dass auch die Herstellungsmethode und die Form der Nanopartikel Einfluss auf den antimikrobiellen Effekt haben (Pal et al. 2007; Weir et al. 2008). Zusätzlich zu der direkten Interaktion mit der bakteriellen Membran bilden Nanopartikel reaktive Sauerstoffspezies (ROS). Diese ROS platzen und üben einen starken oxidativen Stress auf alle Makromoleküle der bakteriellen Zelle aus. Es kommt zur Veränderung von Proteinen, Inaktivierung von Enzymen und Schäden der bakteriellen RNA und DNA. In hohen Konzentration führen die ROS zum Zelltod, in niedrigeren Dosen verursachen sie starke DNA-Schäden und Mutationen (Chairuangkitti et al. 2013; Fu et al. 2014; Quinteros et al. 2016). Den

zahlreichen Vorteilen der Nanopartikel sind jedoch auch einige Nachteile und Kritikpunkte gegenüberzustellen. Insbesondere die hohe Bioverfügbarkeit und mögliche toxische Wirkung ist als kritisch anzusehen, da me-tallische Nanopartikel Zell- und Organgrenzen passieren und über das Blut- und Lymph-system im gesamten Organismus verteilt werden können (Oberdörster et al. 2005). Laut Sharma *et al.* (2009) können die Nanopartikel eine toxische Wirkung auf das Nervensystem ausüben. Auch eine mögliche Verteilung in der Umwelt ist als kritisch zu bewerten und kann zu Problemen in Abwasser und Klärschlamm führen (Giao et al. 2017).

### 2.2.2 Anorganische Nanopartikel

Metalle und Metalloxide sind für ihr antibakterielles Potenzial bekannt. Zu den meist verbreiteten anorganischen Nanopartikeln mit antimikrobieller Wirksamkeit zählen Silber, Eisenoxide, Titanoxide, Kupferoxide und Zinkoxide. Die meisten Metalloxid-Nanopartikel wirken über die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies oder über die Abgabe von Metallionen und führen zu einer Auflösung der bakteriellen Zellmembran mit Penetration ins Zell-innere und Zerstörung der intrazellulären Bestandteile. Aufgrund der bioziden und anti-adhärenen Eigenschaften wurden metallhaltige Nanopartikel bereits in Kombination mit unterschiedlichen dentalen Werkstoffen und an diversen oralen Grenzflächen untersucht (Abou Neel et al. 2015). Neben Silber konnte auch die Wirksamkeit von Bismut-Nanopartikeln gegen *Streptococcus mutans* und die Biofilm-Bildung nachgewiesen werden (Hernandez-Delgado et al. 2012).

### 2.2.3 Silber

Silber ist bereits seit vielen Jahren für seine antimikrobielle Wirksamkeit gegen ein breites Spektrum von Mikroorganismen bekannt (Berger et al. 1976; Rai et al. 2009) und wird in der Medizin unter anderem bei der Wunddesinfektion von Verbrennungen und dermatologischen Entzündungen sowie in der Wasser-Desinfektion verwendet (Clement und Jarrett 1994; Elliott 2010). Während der genaue antimikrobielle Wirkmechanismus in der Literatur noch diskutiert wird, scheint sicher zu sein, dass Silber-Nanopartikel mit kleinem Durchmesser eine deutlich effektivere antimikrobielle Wirkung aufweisen als Silberpartikel mit größerem Durchmesser (Morones et al. 2005). Bei den Wirkmechanismen werden die Desintegration der bakteriellen Zellmembran, die Penetration in das Zellinnere sowie die Zerstörung intrazellulärer Bestandteile genannt. Es wird angenommen, dass die antimikrobielle Wirksamkeit der Nanopartikel über Wechselwirkungen mit schwefelhaltigen Proteinen der Zellmembran vermittelt wird. Es resultieren Störungen der Energiegewinnung, Desintegrationen der Membranstruktur sowie der Austritt und Verlust intrazellulärer Bestandteile (Feng et al. 2000; Lok et al. 2006). Sondi und Salopek-Sondi (2004) zeigten in ihrer Studie über die Wir-

kung von Silber auf *Escherichia coli*, dass Silber-Nanopartikel die Permeabilität der Zellmembran erhöhen und die Atmungskette unterbrechen konnten. Andere Studien verweisen auf das Silberion als antimikrobiell wirksames Agens (Feng et al. 2000). Das Silberion bildet mit Schwefelverbindungen der Enzyme oder Proteine ein Mercaptit, eine sehr schwer lösliche Silber-Schwefelverbindung, und blockiert so die Funktion zahlreicher Proteine der Bakterienzelle. Zusätzlich können die Silberionen direkt mit der bakteriellen DNA interagieren und die bakterielle Replikation verhindern. Es kommt also zur Komplexbildung von Membranen, Enzymen, Proteinen und Nukleinsäuren und somit zur Inhibierung des Bakteriums (Feng et al. 2000; Morones et al. 2005; Eckhardt et al. 2013). Auch die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies wird in der Literatur als möglicher antimikrobieller Wirkmechanismus diskutiert (Quinteros et al. 2016). Silber in mikro-kristalliner Form oder in Form von Nanopartikeln wurde vor allem als Mittel gegen antibiotikaresistente Keime untersucht (Pal et al. 2007; Leid et al. 2012; Eckhardt et al. 2013). Es konnte gezeigt werden, dass bereits geringe Konzentrationen von Silberionen die Adhäsion von *Staphylococcus epidermidis* über einen längeren Zeitraum verhindern konnten (Wang et al. 2016). Das breite Wirkspektrum und die diversen Angriffsmechanismen der Nanopartikel erschweren die Resistenzbildung der Bakterien, die nur über viele Mutationen erfolgen könnte (Pal et al. 2007).

In der Literatur werden jedoch auch mögliche Nachteile der Verwendung von Silber-Nanopartikeln diskutiert. So konnten bereits bakterielle Plasmide nachgewiesen werden, die Resistenzen gegen Silber übertragen (Silver 2003). Des Weiteren sollte intensiver geprüft werden, ob Silber-Nanopartikel in der Lage sind, den gesamten Biofilm zu zerstören oder lediglich auf planktonische Zellen wirken (Sheng et al. 2015). Mit dem immer breiteren Einsatzspektrum der Nanopartikel werden auch Bedenken über mögliche Gesundheitsschäden der Menschen sowie Schädigungen der Umwelt geäußert. Aufgrund der geringen Partikelgröße können die Silbermoleküle in die menschlichen Zellen eindringen und dort zu zahlreichen Schäden führen (Greulich et al. 2011; Liz et al. 2015). Die mögliche Zytotoxizität und Genotoxizität werden deshalb bereits intensiv geprüft (Zhang et al. 2014). Ein möglicher grundlegender Mechanismus, der die Zytotoxizität vermittelt, ist die bereits erwähnte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (Chairuankitti et al. 2013). Diese ROS können menschliche und tierische Zellen, darunter auch Immunzellen, schädigen als auch Umweltschäden verursachen (Fu et al. 2014; Liz et al. 2015).

Die antibakterielle Wirkung von Silber wurde bereits auf unterschiedlichen dentalen Materialien untersucht. Bürgers *et al.* (2009) verglichen unbehandelte Komposit-Probekörper mit Probekörpern mit 0,3% und 0,6% Silber-Additiven und konnten auf den unbehandelten Probekörpern eine drei- bis vierfach höhere Bakterienadhäsion feststellen im Vergleich zu den Silber-Probekörpern. Zudem wurden signifikant mehr membrangeschädigte Zellen auf den silberhaltigen Materialien detektiert. Auch Yoshida *et al.* (1999b) zeigten in ihrer Studie, dass Komposit-Materialien in Kombination mit Silber das Bakterienwachstum inhibieren können. Nicht nur in Kombination mit Komposit, sondern auch auf Titan-Implantaten konnte die antimikrobielle Wirkung von Silber demonstriert werden. Wang *et al.* (2016) modifizierten

Titan-Oberflächen mit Silber-Nanopartikeln und zeigten, dass die modifizierten Oberflächen einen Einfluss auf die Expression von Biofilm-assoziierten Genen der Testkeime *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis* ausüben und auf diese Weise die bakterielle Adhäsion und Biofilmbildung hemmen. Des Weiteren wurde demonstriert, dass die Inkorporation von Silber-Nanopartikeln als wirksames Antiinfektivum gegen anheftende und planktonische Bakterien anzusehen ist.

#### 2.2.4 Bismut

Bismut mit seinen antimykotischen und antiproliferativen Eigenschaften findet in der Medizin bereits seit mehr als 200 Jahren Verwendung (Bierer 1990). Ende des 19. Jahrhunderts war Bismut Bestandteil von Wundpulvern und seit den 1920er Jahren wurde Bismut bei der Therapie von Syphilis eingesetzt (Gross 1923; Salvador et al. 2012). Bismutverbindungen, meist in Form von kolloidalem Bismutsubzitrat und Bismutsubsalizylat, werden bei der Behandlung von duodenalen Ulcera, Gastritis und diversen Diarrhö-Formen eingesetzt (DuPont 1987; Konturek et al. 1987a; Konturek et al. 1987b). Einen weiteren Anwendungsbereich stellt die Behandlung von mukosalen und dermalen Infektionen dar (Miller und Delaney 1949).

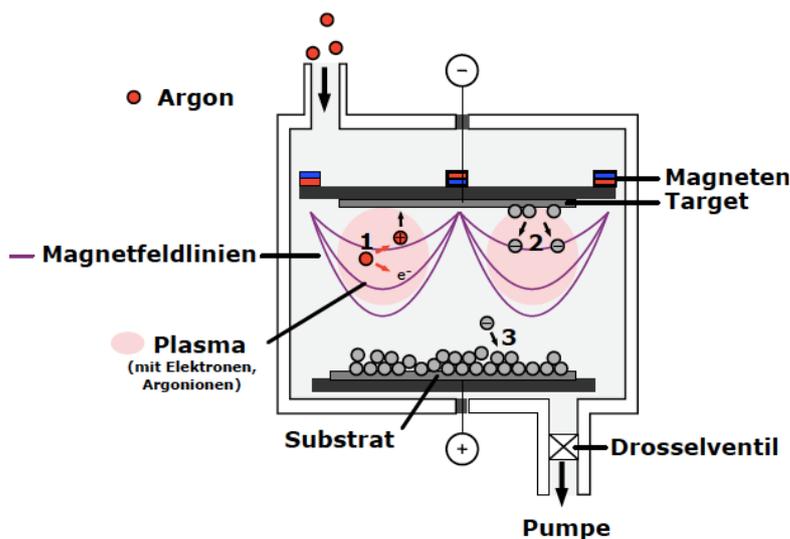
Die antibakterielle Wirkung von Bismut in der Mundhöhle wurde bereits in einigen Studien untersucht. Gosau *et al.* (2015) beschichteten Titan-Implantatoberflächen mit nano-kristallinem Silber, Kupfer und Bismut, um anschließend die Oberflächeneigenschaften, Biokompatibilität und den antimikrobiellen Effekt zu beurteilen. Sowohl die Silber- als auch die Bismutbeschichtung zeigten keine Zytotoxizität und konnten als zufriedenstellend biokompatibel eingestuft werden. Im Vergleich zu Kupfer und Silber zeigte Bismut in dieser Studie sogar einen überlegenen antimikrobiellen Effekt auf *Staphylococcus epidermidis*. Chen *et al.* (2010) verwendeten Bismutsubsalizylat als antibakteriellen Zusatzstoff in einem Calcium-Phosphat-Zement und konnten eine gute antimikrobielle Wirksamkeit gegen *Staphylococcus aureus* feststellen. Hernandez-Delgado *et al.* (2012) prüften in ihrer Studie die antibakterielle Wirkung von Bismut auf *Streptococcus mutans* im Vergleich zu Chlorhexidin und konnten ähnlich gute Werte für beide Agenzien ermitteln. In einer weiteren Studie von Hernandez-Delgado *et al.* (2013) konnte auch die antimykotische Wirksamkeit von Bismut gegen *Candida albicans* sowie die Anti-Biofilm-Aktivität nachgewiesen werden. Bezüglich des biochemischen Wirkmechanismus wird vermutet, dass die positiv geladenen Metallionen eine elektrostatische Verbindung mit der negativ geladenen bakteriellen Zellmembran eingehen und es dadurch zu Schäden und Perforationen der Zellmembran mit anschließender Zerstörung intrazellulärer Bestandteile kommt (Stratton et al. 1999; Hernandez-Delgado et al. 2012; Hernandez-Delgado et al. 2013).

Bismut scheint demnach ein vielversprechender Werkstoff mit guter antibakterieller Wirksamkeit bei gleichzeitig guter Biokompatibilität zu sein. Es sollten jedoch weitere Studien

durchgeführt werden, die sich noch intensiver mit der Toxizität sowie dem genauen Wirkmechanismus beschäftigen.

### 2.3 Beschichtungsverfahren

Für die vorliegende Versuchsreihe wurden die Silber- und Bismutbeschichtungen in Kooperation mit dem Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik IGB mittels Magnetronspütern durchgeführt. Das Magnetronspütern zählt zu der Gruppe der PVD-Verfahren (*Physical Vapour Deposition*/ physikalische Gasphasenabscheidung). Bei der physikalischen Gasphasenabscheidung werden die Atome oder Moleküle des abzuscheidenden Stoffes im Vakuum auf das Substrat übertragen, ohne dabei eine chemische Umwandlung zu erfahren (Hacking et al. 2007). **Abbildung 3** zeigt eine schematische Darstellung des Verfahrens. Das Spütern wird in einer Argon-Atmosphäre durchgeführt. Bei niedrigem Druck wird eine Glimmentladung erzeugt, wobei die Stoffquelle, das sogenannte Target, als Kathode dient. Die im Plasma enthaltenen hochenergetischen Argon-Ionen werden durch das elektrische Feld in Richtung der Stoffquelle beschleunigt. Durch den Aufprall der Ionen werden Atome aus dem Target herausgeschlagen, die sich anschließend auf dem gegenüberliegenden Substrat abscheiden. Das Magnetfeld im Bereich des Targets zwingt die Elektronen in der Nähe des Targets zu einer spiralförmigen Bewegung entlang der Targetoberfläche und kann so die Erzeugung von Ionen stark erhöhen und auf einen Bereich nahe der Targetoberfläche beschränken. Auf diese Weise wird die Effizienz des Prozesses deutlich gesteigert (Jiang et al. 2013).



**Abbildung 3:** Magnetronspütern schematisch dargestellt (Schema einer Spütkammer 2007)

Die Dicke der Beschichtung ist proportional zu der Abscheidungszeit und zu der Entladungstromstärke (Said et al. 2010). Als Vorteile des Magnetronsputterns sind die einfache Steuerung und Reproduzierbarkeit des Abscheidungsprozesses zu nennen. Es erfolgt eine genaue Übertragung der chemischen Zusammensetzung des Targets auf die abgeschiedene Schicht (Hacking et al. 2007; Song et al. 2011; Uhm et al. 2014a).

## 2.4 Werkstoffkundliche Aspekte der kieferorthopädischen Ligaturenringe

Kieferorthopädische Ligaturenringe, die sogenannten Alastics, dienen während der festsitzenden kieferorthopädischen Behandlung der Befestigung der Drahtbögen im Bracketschlitz (siehe **Abbildung 4**) (Forsberg et al. 1991; Guimarães et al. 2013). Um dem Drahtbogen einen Bewegungsspielraum zur Kraftübertragung zu ermöglichen wird dieser nicht fix, sondern mithilfe der Alastics am Bracket befestigt.



**Abbildung 4:** Kieferorthopädische Ligaturenringe zur Befestigung des Bogens am Bracket (Quelle: D. Witt, KFO, UMG)

Bei den Ligaturenringen handelt es sich um Polyurethan-Polyester-Elastomerringe (TOC Orthodontic & Specialist Dental Supplies; Sani-Ties Elastomeric). Polyurethane gelten als vielseitige Kunststoffe, die in vielen verschiedenen Bereichen Verwendung finden, unter anderem als Elastomere (Kappert und Eichner 2005; Hübner 2012). Chemisch betrachtet enthalten alle Polyurethane Urethan-Bindungen, die in einer Polyadditionsreaktion aus Dialkoholen, Polyethern oder Polyestern und Diisocyanaten hergestellt werden (Wong 1976).

Elastomere weisen bei Raumtemperatur ein gummielastisches Verhalten auf. Sie können sich unter einer einwirkenden Kraft stark verformen, ohne zu reißen, und nach Abklingen der Kraft wieder vollständig in den Ausgangszustand zurückkehren. Dieses Phänomen wird auch als „Memory Effekt“ bezeichnet (Kappert und Eichner 2005). Die Molekülketten liegen

bevorzugt in dem entropiereichsten, verknäulten Zustand vor. Sobald Zugkräfte auf die Molekülketten einwirken, werden diese gezwungen, ihren entropiereichen Zustand aufzugeben und sich in Richtung des Zuges anzuordnen. Beim Nachlassen der Zugkräfte kehren die Molekülketten wieder in den entropiereichen Ausgangszustand zurück (Hübner 2012). Die Dehnbarkeit ist durch den schwachen chemischen Verbund der Ketten untereinander möglich. Bei äußerer Krafteinwirkung können die Ketten aneinander vorbeigleiten, ohne dass es zu einer irreversiblen Schädigung des Netzwerkes kommt (Kappert und Eichner 2005; Hübner 2012). Elastomere sind nicht schmelzbar und unlöslich in Lösungsmittel (Kappert und Eichner 2005).

Die synthetischen Polyurethan-Elastomerringe gelten als abrasionsresistenter im Vergleich zu den natürlichen Gummis, verlieren jedoch nach einem gewissen Zeitraum in der Mundhöhle ihre elastischen Eigenschaften und müssen ausgetauscht werden (Wong 1976; Guimarães et al. 2013; Martínez-Colomer et al. 2016). Die elastischen Ligaturenringe stellen zwar im Vergleich zu den Stahlligaturen eine einfache und effiziente Möglichkeit der Ligation dar, werden aber in der Literatur aufgrund der möglichen erhöhten Bakterienakkumulation kontrovers diskutiert (Forsberg et al. 1991; Türkkahraman et al. 2005). Forsberg *et al.* (1991) stellten erhöhte Bakterienanzahlen bei Patienten mit elastischen Ligaturen fest, wohingegen Türkkahraman *et al.* (2005) keinen signifikanten Unterschied der quantitativen Bakterienadhäsion demonstrieren konnten, jedoch auf erhöhte Blutungsindizes aufmerksam machten. Der Verdacht auf einen engen Zusammenhang zwischen erhöhter Plaqueakkumulation an den Ligaturenringen und der Entstehung und Progression von Demineralisationen im Bracketumfeld sowie Gingivitiden ist demnach naheliegend und sollte detailliert untersucht werden.

## 2.5 Methoden zur Visualisierung und Quantifizierung von Bakterien

Es existieren diverse Verfahren, die der Quantifizierung und Visualisierung adhärenter Bakterien des oralen Biofilms dienen. Neben den klassischen Kultivierungsverfahren ermöglichen die Lichtmikroskopie oder die elektronenoptischen Verfahren einen Einblick in den bakteriellen Biofilm. Zudem gewinnen in den letzten Jahren fluoreszenzmikroskopische Methoden in Kombination mit Vitalfärbeverfahren immer mehr an Bedeutung (Hannig et al. 2010).

### 2.5.1 Klassische Kultivierungsverfahren

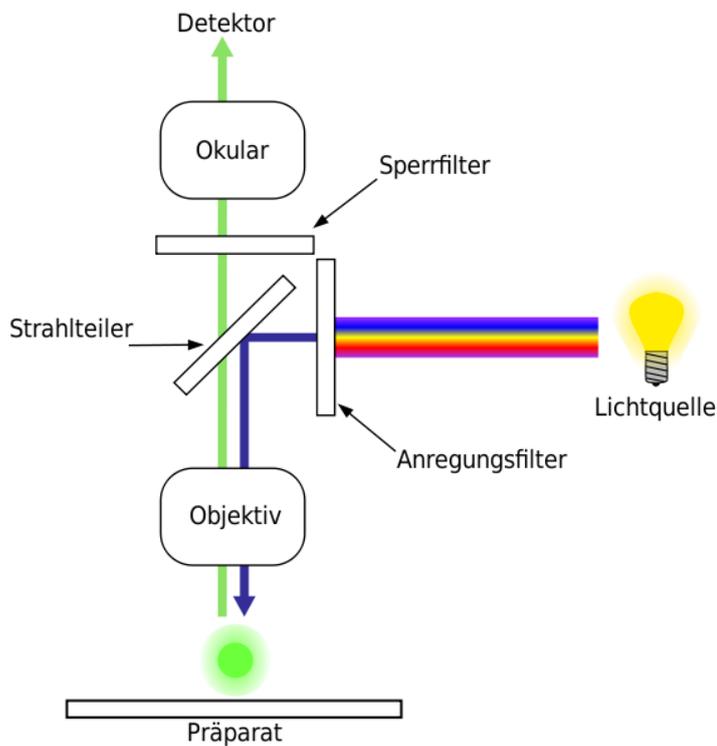
Mikroskopie und Kultivierungsverfahren dienen dem direkten Erregernachweis im Labor (Messelhäuser 2010). Bei den klassischen Kultivierungsverfahren werden die Bakterien zunächst auf künstlichen Nährmedien kultiviert und lassen sich anschließend als koloniebildende Einheit (KBE) auszählen (Gates 1923; Messelhäuser 2010; Beldüz et al. 2017). Die Kulturmedien können flüssig, halbfest oder fest sein und enthalten Kohlenstoff, Stickstoff, Mineralsalze, Metalle, Wasser und Vitamine sowie Puffersubstanzen, die einen Erhalt des pH-Optimums der gesuchten Mikroorganismen gewährleisten und so eine Bakterienvermehrung außerhalb des natürlichen Standortes ermöglichen (siehe **Abbildung 5**) (Messelhäuser 2010). Feste Nährmedien enthalten zudem ein Verfestigungsmittel, beispielsweise Agar-Agar. Zur Identifizierung der Bakterienspezies dienen neben morphologischen Kriterien auch spezifische biochemische und enzymatische Eigenschaften (Neumeister et al. 2009). Die manuellen Identifizierungssysteme verwenden hauptsächlich vier verschiedene Reaktionsarten. Bei pH-Wert-basierten Reaktionen kommt es infolge der Stoffwechselaktivität der Bakterien zu einer Veränderung des pH-Wertes, der mithilfe des Umschlags eines Farbindikators visualisiert wird (Neumeister et al. 2009). Auch die Enzymaktivitäten der Bakterien stellen eine mögliche Grundlage der Bakterienidentifikation dar (Öschläger 2007). Je nach untersuchtem Enzym wird ein entsprechendes farbloses Substrat verwendet, dessen Hydrolyse zur Bildung einer chromogenen Substanz führt (Junillon et al. 2014). Weitere Möglichkeiten sind die Visualisierung des Bakterienwachstums anhand der Trübung des Substrats oder die Reduktion des Farbstoffs Tetrazoliumviolett bei der oxidativen Verstoffwechslung bestimmter Kohlenhydrate im Substrat (Junillon et al. 2014; Bommer und Ward 2016). Mithilfe der klassischen Kulturverfahren werden ausschließlich stoffwechselaktive Bakterien erfasst. Zudem erfordert diese Methode einen sehr hohen Arbeits- und Zeitaufwand (Parahitayawa et al. 2010).



**Abbildung 5:** Blutagar, beimpft mit *Staphylococcus aureus*. (Staphylococcus aureus auf Columbia-Agar 2011)

### 2.5.2 Mikroskopietechniken

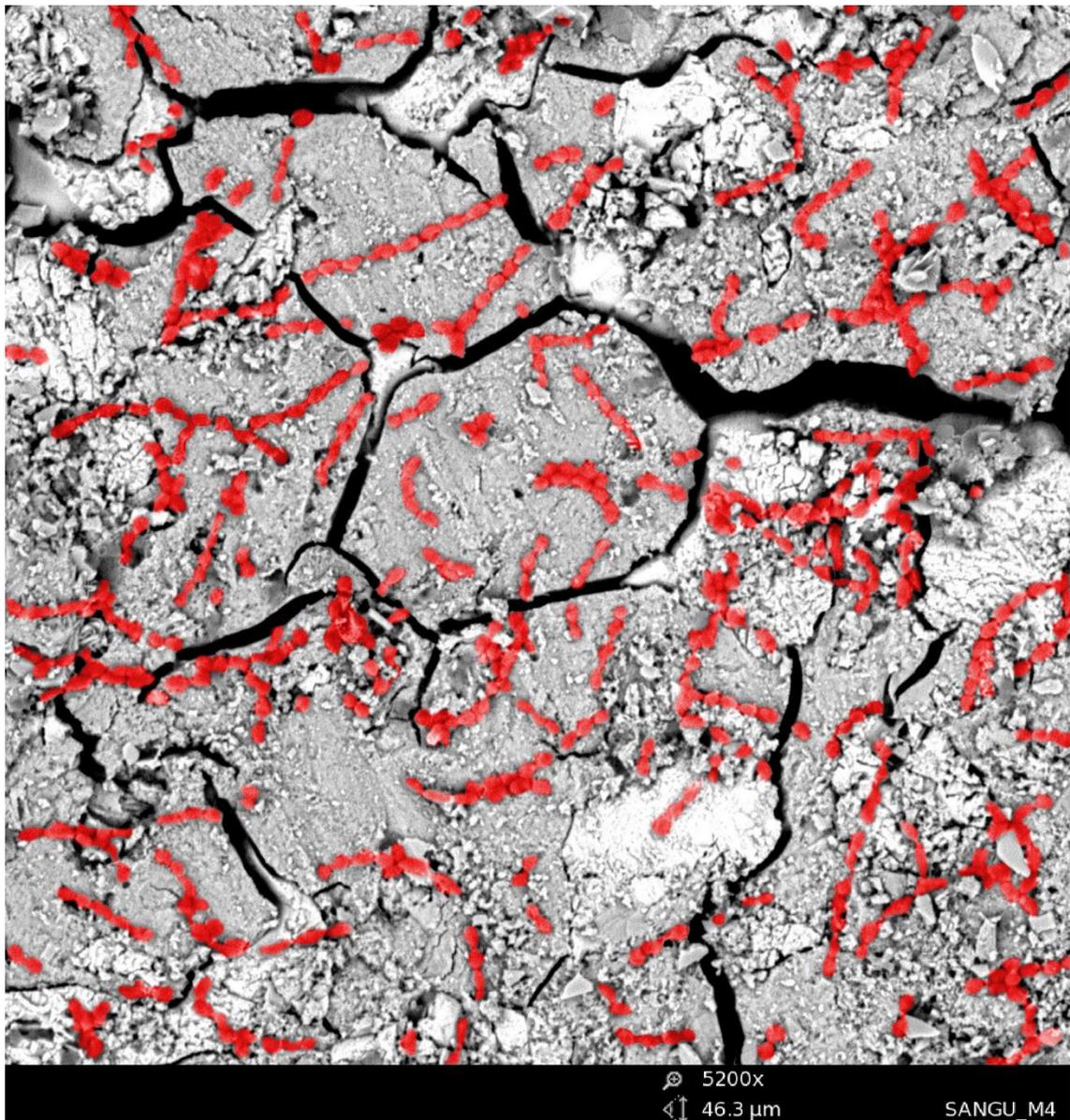
Es existieren diverse Mikroskopietechniken, die der Erfassung bakterieller Biofilme dienen. Mithilfe des klassischen Lichtmikroskops können Strukturen, die mit bloßem Auge nicht mehr sichtbar sind, dargestellt und betrachtet werden. Die Vergrößerungen des Lichtmikroskops werden durch optische Effekte erzeugt. Der Strahlengang beginnt unterhalb des Objektträgers an der Lichtquelle und erzeugt mithilfe des Objektivs zunächst ein optisch vergrößertes Zwischenbild (reelles Zwischenbild), welches anschließend durch das Okular zu einem virtuellen Zwischenbild vergrößert wird (Mißfeldt 2014). Am Mikroskop sind verschiedene Objektive mit unterschiedlichem Vergrößerungsfaktor befestigt, meist vierfach, zehnfach und vierzigfach. Die Präparate können maximal 1500-fach vergrößert werden (Mißfeldt 2014). Ein wichtiger Vorteil des Lichtmikroskops ist, dass die zu untersuchenden Zellen nichtinvasiv untersucht werden können. Es können also auch lebende Zellen untersucht werden. Die Präparate sollten dünn und lichtdurchlässig sein, um ein optimales Ergebnis zu ermöglichen. Da die Auflösung an die Wellenlänge gekoppelt ist, liegt sie bei der Lichtmikroskopie nur bei 0,2 bis 0,3  $\mu\text{m}$ , wohingegen das Elektronenmikroskop Auflösungen bis zu 0,1 nm und Vergrößerungen um das 250.000-fache ermöglicht (Hannig et al. 2010; Lousert et al. 2012). Die Fluoreszenzmikroskopie stellt eine Sonderform der Lichtmikroskopie dar, die sich das Prinzip der Fluoreszenz zunutze macht. Bei der Fluoreszenzmikroskopie werden Fluoreszenzfarbstoffe, sogenannte Fluorochrome, durch UV- und kurzwelliges Licht angeregt und emittieren dann wenig später selbst sichtbares Licht mit längerer Wellenlänge. Fluoreszenzmikroskope erfassen über eine Kombination von Filtern (Anregungsfilter und Emissionsfilter) selektiv nur das emittierte Licht. **Abbildung 6** zeigt den Aufbau eines Fluoreszenzmikroskops. Das weiße Licht einer Xenon- oder Quecksilberdampfampe trifft auf den Anregungsfilter, der die Wellenlänge für die Anregung des Präparats herausfiltert. Das Licht wird im Inneren des Mikroskops von einem dichroitischen (dichromatischen) Spiegel reflektiert. Dichroitische Spiegel besitzen eine kritische Wellenlänge – Wellenlängen, die kleiner als die kritische Wellenlänge sind, werden reflektiert, Wellenlängen, die darüber liegen, werden vom Spiegel durchgelassen. Die kritische Wellenlänge liegt zwischen dem Anregungs- und Emissionsmaximum des Präparats. Da das vom angeregten Präparat emittierte Licht stets energieärmer und lang-welliger ist, wird das Anregungslicht zum Präparat gelenkt und das emittierte Fluoreszenzlicht passiert den Spiegel und gelangt durch das Okular zum Detektor. Einige Stoffe sind autofluoreszent, andere können mit bestimmten Fluoreszenzfarbstoffen angefärbt werden (Parahitayawa et al. 2010). Anwendung findet die Fluoreszenzmikroskopie hauptsächlich in der morphologischen Untersuchung von Zellbestandteilen (Neumeister et al. 2009).



**Abbildung 6:** Aufbau des Fluoreszenzmikroskops (Fluoreszenzmikroskopie 2017)

Zu den elektronenoptischen Verfahren zählt die Rasterelektronenmikroskopie (REM, engl.: Scanning Electron Microscope: SEM), das Environmental Scanning Electron Microscope (ESEM) sowie die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM). Die Verfahren unterscheiden sich in Aufbau und Einsatzgebiet. Elektronenoptische Verfahren ermöglichen neben der reinen Visualisierung auch einen Einblick in die Ultrastruktur der Bakterien und ihrer Umgebung (Hannig et al. 2010).

Mithilfe des Rasterelektronenmikroskops können Oberflächenstrukturen dreidimensional mit unterschiedlichen Bildauflösungen dargestellt werden (siehe **Abbildung 7**). Da der Abbildungsvorgang im Hochvakuum stattfindet und die biologischen Proben nicht leitend sind, muss vor dem Abbildvorgang die Fixierung, Dehydratation und Beschichtung mit einem leitenden Material stattfinden (Samson et al. 1979; Fischer et al. 2012). Die Oberflächen der Proben dürfen dabei jedoch keinesfalls beschädigt werden. Die Raster-elektronenmikroskopie eignet sich zwar für die Untersuchung festsitzender Biofilme oder Proteinschichten, die Evaluation verschiedener Bakterienspezies sowie die Differenzierung von Kokken, Stäbchen und Filamenten ist jedoch nur mithilfe zusätzlicher Antigentests möglich (Klainer und Betsch 1970; Goldberg und Fišerová 2016).



**Abbildung 7:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme (5200x Vergrößerung) von *S. sanguinis* (in rot dargestellt) nach 2 Stunden Inkubation auf einem dentalen Zement Quelle: T. Wassmann, Zahnärztliche Prothetik, UMG)

Das ESEM stellt eine Variante des Rasterelektronenmikroskops dar, bei der die vorbereitenden Maßnahmen wie Dehydratation, Fixation und Beschichtung nicht erforderlich sind, da sich in der Probenkammer kein Hochvakuum, sondern ein Gas zur Signalverstärkung befindet. Der vom ESEM ausgesandte Elektronenstrahl kann jedoch vitale und unfixierte Zellen schädigen und so zu Ungenauigkeiten in der dreidimensionalen Bilddarstellung führen (Bergmans et al. 2005).

Im Vergleich zur Rasterelektronenmikroskopie wird bei der Transmissionmikroskopie das Objekt vom Elektronenstrahl durchstrahlt. Hierfür sind jedoch ausreichend dünne Schnitte

der Objekte nötig. Der wichtigste Vorteil der Transmissionsmikroskopie ist die hohe Auflösung auf bis zu 1 nm (Hannig et al. 2010). Um Artefakte und Schädigungen der Proben zu vermeiden, sind auch bei der Transmissionsmikroskopie aufwändige Vorbereitungen notwendig (Bergmans et al. 2005; Palara et al. 2016). Die Rasterelektronenmikroskopie ermöglicht eine detaillierte Darstellung des dentalen Biofilms. Hannig *et al.* (2008) untersuchten mithilfe der Rasterelektronenmikroskopie die Verteilung verschiedener Isoformen der Glykosyltransferase in den Schichten der dentalen Plaque.

Die Rasterkraftmikroskopie oder auch Atomkraftmikroskopie erreicht eine vergleichbar gute Auflösung wie die Transmissionsmikroskopie und weist zudem den Vorteil auf, dass kein Vakuum für den Abbildvorgang benötigt wird. Mit der Atomkraftmikroskopie können Membranproteine und Zellen direkt in der Pufferlösung dargestellt werden. Zudem lassen sich dynamische Prozesse wie strukturelle Veränderungen, die durch Wachstumsprozesse oder medikamentöse Wechselwirkungen verursacht werden, darstellen (Dufrêne 2008). Mei *et al.* (2011) verwendeten in ihrer Studie die Atomkraftmikroskopie zur Messung der Kraft, mit der Bakterien an unterschiedlich rauen Oberflächen haften.

### 2.5.3 Fluochrome

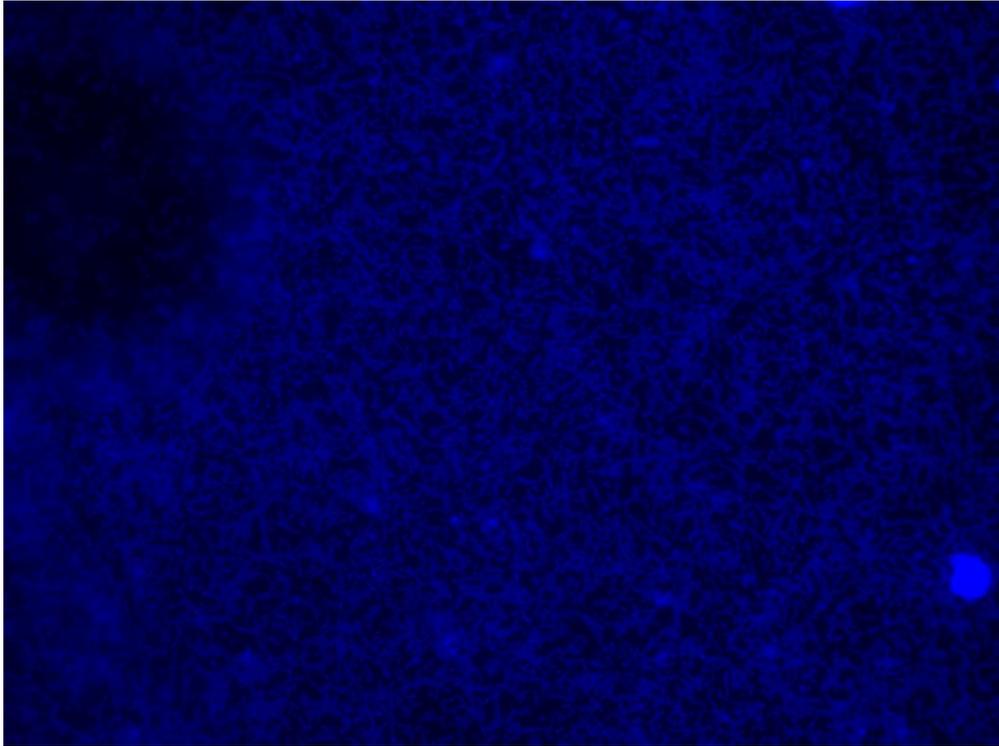
Bakterien lassen sich mit der DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)-Färbung direkt anfärben. DAPI bindet bevorzugt an Adenin/Thymin (AT)-reiche Regionen der doppelsträngigen DNA vitaler und avitaler Zellen und fluoresziert bei Anregung mit ultraviolettem Licht. Die DAPI-Färbung eignet sich vor allem für die Visualisierung und Quantifizierung der anhaftenden Bakterien an Biomaterialien und oralen Oberflächen oder für die reine Anfärbung von DNA, eine Differenzierung verschiedener Bakterienspezies ist jedoch nicht möglich (Grossgebauer et al. 1976; Schnedl et al. 1977; Hannig et al. 2007). Die Hoechst 33342-Färbung wird ebenfalls spezifisch für die fluoreszenzbasierte Färbung der DNA fixierter und lebender Zellen eingesetzt (Chazotte 2011). Das zellgängige Fluochrom Hoechst 33342 wird mit ultraviolettem Licht angeregt und fluoresziert selbst im Wellenlängenbereich von 460 bis 490 nm blau (siehe **Abbildung 8**) (Hoechst® 33342 Protocol for Imaging). Die Bindung des Farbstoffes erfolgt genau wie bei der DAPI-Färbung vorzugsweise an Adenin-Thymin-Regionen (A-T) der zellulären DNA (Chazotte 2011; Zurek-Biesiada et al. 2013).

Bei der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) werden Fluoreszenz-markierte Einzelstrang-Oligonukleotidsonden verwendet, die sich an ribosomale RNA-Sequenzen anlagern (Amann et al. 1995). Durch Einsatz mehrerer Fluoreszenzfarbstoffe können verschiedene RNA-Sequenzen und damit verschiedene Bakterienspezies sichtbar gemacht werden (Lischevski et al. 1996; Xu et al. 2016). Die zu untersuchenden Zellen müssen jedoch eine ausreichend hohe Anzahl intakter Ribosomen aufweisen, weshalb sich die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung nur auf vitalen Zellen anwenden lässt (Amann et al. 1995).

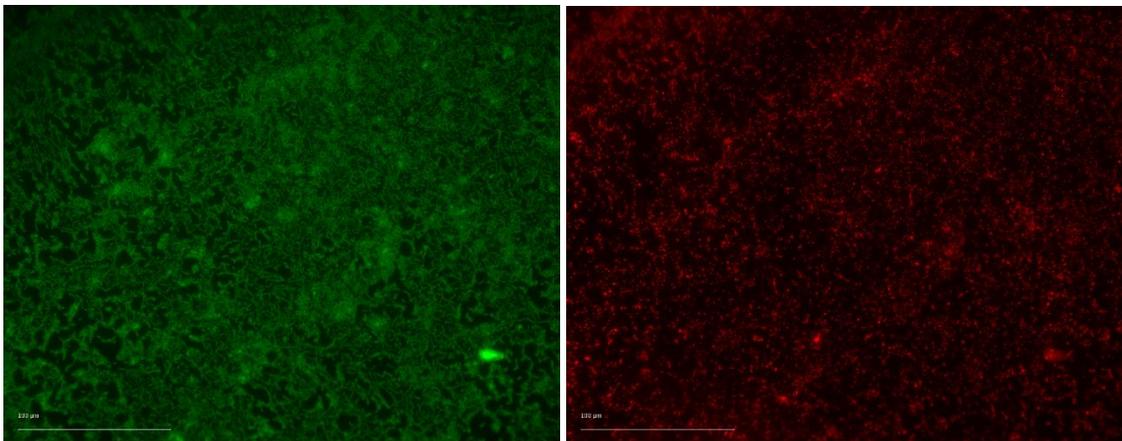
Bei der Untersuchung antimikrobiell wirksamer Substanzen oder Beschichtungen ist insbesondere die Vitalität der Mikroorganismen von Bedeutung. Bestimmte Fluoreszenzfarbstoffe ermöglichen die Differenzierung von vitalen und avitalen Zellen. Bei der Vital-färbung zeigen die Färbeeigenschaften der Fluoreszenzfarbstoffe einen Zusammenhang zum physiologischen Zustand der Bakterien. Bakterien in der Wachstumsphase haben eine hohe Stoffwechselaktivität und fluoreszieren intensiver als ruhende Zellen. Es existieren bereits viele verschiedene Vitalfärbeverfahren. Für die Darstellung oraler Streptokokkenstämme eignet sich besonders die Kombination aus Syto 9 und Propidiumiodid (PI), die im BacLight Viability Kit verwendet wird (siehe **Abbildung 9** und **10**) (Decker 2001). Der Vitalfarbstoff Syto 9 besitzt die Fähigkeit, intakte Zellmembranen passiv zu überwinden und penetriert sowohl die vitalen als auch die avitalen Zellen (siehe **Abbildung 9**). In der Zelle verteilt sich der Farbstoff im Zytosol und bindet an die bakterielle DNA oder RNA und färbt diese an. Propidiumiodid penetriert ausschließlich beschädigte Zellen und weist ebenfalls starke Affinität zur bakteriellen DNA auf (siehe **Abbildung 9**) (Boulos et al. 1999).

Weitere gängige Verfahren zur Darstellung vitaler Zellen sind unter anderem die Fluoro-gene *Fluorescein-Diacetat*, *Carboxyfluorescein-Diacetat* sowie das Farbmolekül *Calcein* (Escarilla 1966; Decker 2001; Iannetti et al. 2016). Neben Syto 9 besitzt auch Syto 17 eine starke Affinität zur DNA bzw. RNA und kann ebenfalls intakte Zellmembranen passieren (Tomonaga et al. 2016).

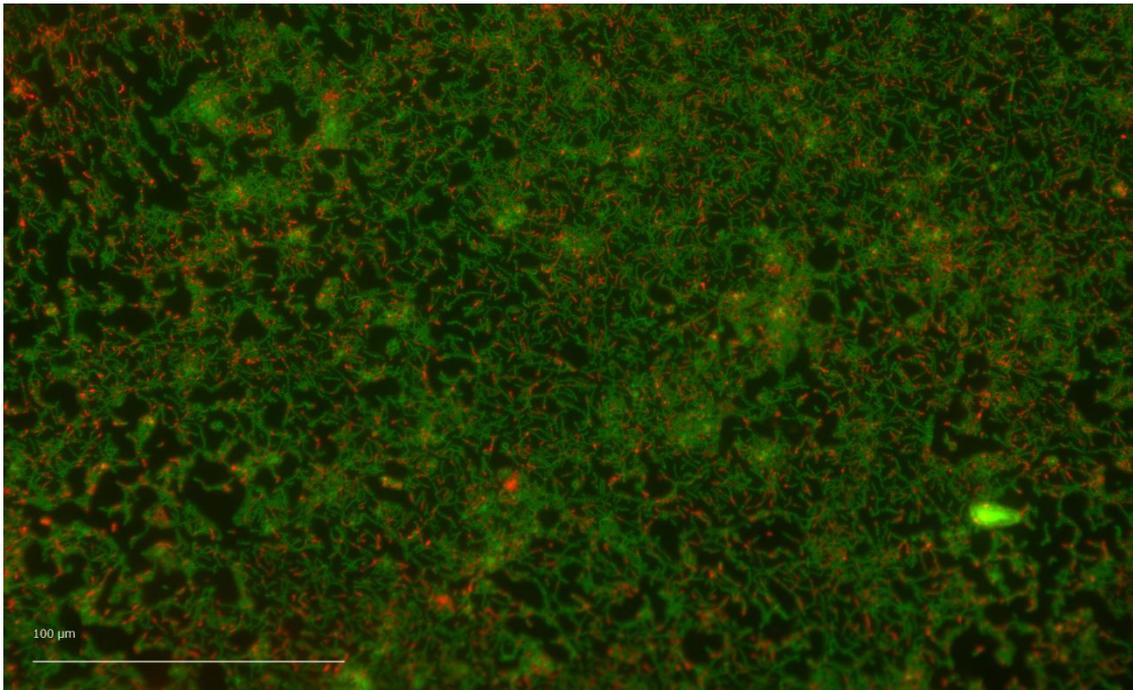
Alternativ zu Propidiumiodid stellt Ethidiumbromid ein gängiges Verfahren zur Anfärbung avitaler Mikroorganismen dar (Lepecq und Paoletti 1967). In der Literatur wird jedoch auf die mögliche mutagene Wirkung und Toxizität des Farbstoffes hingewiesen, weshalb Propidiumiodid gegenüber Ethidiumiodid als überlegen gilt. Propidiumiodid besitzt eine geringere Polarität und damit höhere Affinität zur DNA (Sayas et al. 2015).



**Abbildung 8:** Färbung mit dem Fluochrom Hoechst 33342 (20x Vergrößerung); *S. sanguinis* auf Titanoberfläche nach 2 Stunden Inkubation



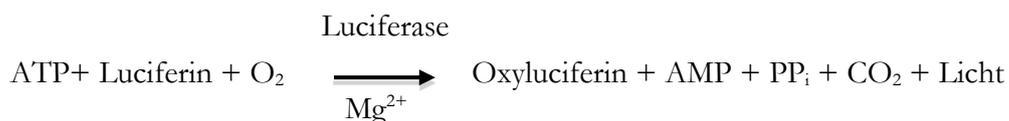
**Abbildung 9:** links: Färbung mit dem Fluochrom Syto 9 (20x Vergrößerung); *S. sanguinis* auf Titanoberflächen nach 2 Stunden Inkubation; sowohl vitale als auch avitale Zellen werden gefärbt (grün); rechts: Färbung mit dem Fluochrom Propidiumiodid (20x Vergrößerung); *S. sanguinis* auf Titanoberflächen nach 2 Stunden Inkubation; ausschließlich avitale Zellen werden gefärbt (rot)



**Abbildung 10:** Digitale Überlagerungen der Aufnahmen mit Syto 9 und Propidiumiodid (20x Vergrößerung); aktive, vitale Zellen werden grün dargestellt; avitale, inaktive Zellen werden rot dargestellt

#### 2.5.4 Grundlagen Lumineszenz

Ein indirektes Verfahren zur Quantifizierung vitaler Mikroorganismen stellt die Messung der relativen Lumineszenzintensitäten dar. Bei der Lumineszenz wird einem physikalischen System eine Energie von außen zugeführt, die nicht dem Wärmehaushalt des Körpers dient, sondern das System in einen angeregten Zustand versetzt. Das angeregte physikalische System emittiert daraufhin Licht. Findet zwischen der Absorption und Emission der Energie kein Aktivierungsprozess statt, spricht man von Fluoreszenz (Stanley 1989; Crouch et al. 1993; Roda und Guardigli 2012). Bei der Biolumineszenz findet die Anregung des Systems durch chemische Reaktionen in lebenden Organismen statt und basiert häufig auf dem Enzym Luziferase (McElroy und Ballentine 1944; McElroy 1947; Burkhardt und Heitmeier 2008). Das Prinzip der Biolumineszenz beruht auf folgender Reaktionsgleichung:



Das Enzym Luciferase katalysiert die Bildung von Licht aus ATP und Luciferin unter der Anwesenheit von Sauerstoff. Die emittierte Lichtintensität ist anschließend linear proporti-

onal zur ATP-Konzentration und somit zur Konzentration metabolisch aktiver Zellen (Stanley 1989; Crouch et al. 1993; Sánchez et al. 2013). Mithilfe dieses ATP-Nachweises lässt sich die funktionelle Integrität lebender Zellen überprüfen, da alle Zellen ATP zum Überleben und zum Erhalt ihrer spezifischen Zell-funktionen benötigen. Jede Form der Zellverletzung geht mit einem Abfall der zyto-plasmatischen ATP-Konzentration einher (Ludwicka et al. 1985; Loimaranta et al. 1998; Garcez et al. 2013).

### 3 Ziel und Fragestellung

Die Biofilmbildung auf Elastomerringen erhöht das Risiko für Karies und Parodontopathien. Deswegen wären kieferorthopädische Ligaturenringe mit antimikrobieller Wirkung von erheblichem klinischen Nutzen für betroffene Patienten. Bisher wurden die metallischen antimikrobiellen Beschichtungen ausschließlich auf metallischen Werkstoffen untersucht. Ziel der vorliegenden Studie war es deshalb, die antimikrobielle Wirkung von Nano-Beschichtungen aus Silber und Bismut auf den kieferorthopädischen Elastomerringen *in vitro* zu untersuchen.

Folgende Fragestellungen sollten geklärt werden:

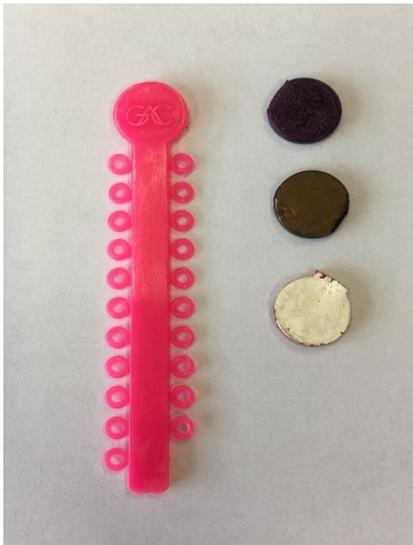
- 1) Zeigen Ligaturenringe mit Beschichtungen aus Silber oder Bismut gegenüber unbeschichteten Referenzringen ein erhöhtes antimikrobielles Potenzial?
- 2) Unterscheiden sich verschiedene Quantifizierungsmethoden im Nachweis der antimikrobiellen Potenziale?

## 4 Material und Methoden

In der vorliegenden In-vitro-Studie wurde der antimikrobielle Effekt von Silber- und Bismutbeschichtungen von kieferorthopädischen Ligaturenringen auf die initiale Besiedlung mit *Streptococcus mutans* untersucht. Hierzu wurden zu Beginn die physiko-chemischen Eigenschaften (Rauheit und freie Oberflächenenergie) der Testoberflächen (Silberbeschichtung, Bismutbeschichtung und unbeschichtetes Polyurethan-Polyester-Elastomer) ermittelt. Im Rahmen einer Vorversuchsreihe wurden zunächst Fluoreszenzfärbungen mit dem Fluorochrom Thermo Scientific Pierce Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific Inc. (NYSE:TMO), Waltham, USA) und dem Live/Dead BacLight Bacterial Viability Kit (Molecular Probes, Eugene, USA) auf beschichteten Probekörpern durchgeführt und am Fluoreszenzmikroskop Keyence BZ-X700 (Keyence Corporation, Osaka, Japan) ausgewertet. Da eine fluoreszenzmikroskopische Quantifizierung und somit der Vergleich der Bakterien-adhäsion auf den verschiedenen Beschichtungen aufgrund der starken Eigenfluoreszenz der Polyurethan-Polyester-Elastomer-Probekörper nicht möglich war, erfolgte in einer weiteren Vorversuchsreihe die Quantifizierung der Bakterien mithilfe des ViaLight™ Plus Cell Proliferation and Cytotoxicity BioAssay Kits (Lonza Group AG, Basel, Schweiz). Die Auswertung erfolgte mittels Plattenreader FLUOstar Omega (BMG Labtech GmbH, Offenburg, Deutschland). Da sich das Lumineszenz-Assay in der Vorversuchsreihe als reproduzierbar und verlässlich erwies, folgten hierauf die Hauptversuche. Die Ergebnisse wurden anschließend statistisch ausgewertet. Alle Versuchsreihen fanden unter semistatischen Bedingungen statt. Es wurde ein Monospezies-Biofilm mit kultivierten *Streptococcus mutans*-Bakterien (DSMZ-Nr. 20523 Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland) verwendet.

### 4.1 Probekörper

Für die Untersuchung wurden die runden Endstücke der Polyurethan-Polyester-Elastomer-Sticks (Sani-Tie®-Elastomerringe, Dentsply Sirona, York, USA) mit einem Durchmesser von 10 mm und einer Höhe von 1,5 mm verwendet, an denen die eigentlichen kieferorthopädischen Ligaturen befestigt waren (siehe **Abbildung 11** und **12**). Die Endstücke und die Ligaturen waren aus einem Guss.



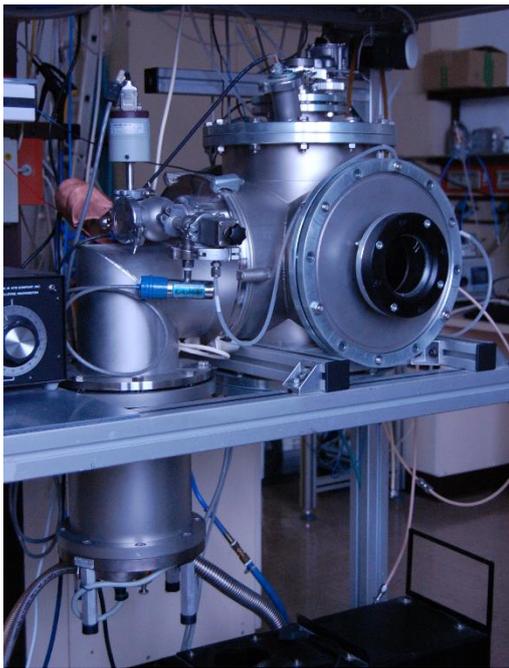
**Abbildung 11:** links: Polyurethan-Polyester-Elastomer-Sticks; rechts: Probekörper, gewonnen aus den Endstücken der Sticks; von oben: unbeschichtet, mit Bismutbeschichtung, mit Silberbeschichtung



**Abbildung 12:** Testoberflächen (von links: Silberbeschichtung, unbeschichtetes Gummi, Bismutbeschichtung)

Die Probekörper wurden mit einer dünnen Schicht Silber bzw. Bismut mittels DC-Magnetronsputtern (*direct current magnetron sputtering*; Gleichstromsputtern) beschichtet. Die Sputteranlage des Fraunhofer-Instituts für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik IGB (siehe **Abbildung 13**) enthält Vorrichtungen für zwei Targets, mit denen wahlweise unterschiedliche Beschichtungen hergestellt werden können. Zudem enthält die Sputteranlage zwei Elektroden, die eine Plasmaaktivierung oder -reinigung vor dem eigentlichen Beschichtungsprozess ermöglichen. Die Stromversorgung für das Sputterverfahren erfolgte durch einen Gleichstromgenerator (PFG 2500 DC, Trumpf Hüttinger GmbH & Co. KG, Freiburg, Deutschland). Im vorliegenden Versuchsaufbau wurde für die Plasmaaktivierung zunächst ein Radiofrequenz-Plasma (13,67 MHz) mit einem AGC-5 Generators (Eni Power Systems, Inc., New York, USA) unter Impedanzanpassung (*viking impedance matching network*, Nye Company, Idaho, USA) erzeugt. Der Beschichtungsprozess lief bei ständigem Gasdurchfluss mit Argon (Ar) ab, der mittels Nadelventil geregelt wurde. Der Basisdruck sowie der Druck während

des Beschichtungsverfahrens wurden durch die Druckmesser *Ionivac Granville-Phillips® ionization vacuum gauge*, *Convectron Granville-Phillips® Pirani vacuum gauge* sowie *Baratron® capacitance manometer* (MKS Instruments, Inc., Massachusetts, USA) stetig kontrolliert. Die Probekörper wurden für den Beschichtungsvorgang auf einem drehbaren Probenhalter platziert, der während des Beschichtungsprozesses drei verschiedene Positionen einnehmen konnte: die linke Position für Target A, die mittlere Position für die Plasmaaktivierung und die rechte Position für Target B. Auf diese Weise konnten alle Schritte des Beschichtungsverfahrens nahtlos durchgeführt werden ohne das Vakuum zu verlassen. Vor dem Beschichtungsprozess wurden alle Probekörper zunächst mit Isopropanol und deionisiertem Wasser im 1:1 Verhältnis mit Ultraschallunterstützung gereinigt und anschließend getrocknet. Der gesamte Beschichtungsprozess fand im Vakuum statt. Nach dem Erreichen des Basisdrucks von  $2 \cdot 10^{-6}$  mbar wurde das Argon in die Sputteranlage geleitet und über den Gasdurchfluss der Prozessdruck von 6  $\mu$ bar eingestellt. Es folgt die Plasmavorbehandlung für 1 Minute bei einer RF-Leistung von 40 W. Der Beschichtungsprozess wurde bei einer Stromstärke von 0,4 A für 5 Minuten durchgeführt.



**Abbildung 13:** Magnetronsputteranlage des Fraunhofer-Instituts für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik IGB; Quelle: Jakob Philipp Barz (Abteilung Grenzflächentechnologie und Materialwissenschaft, Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik IGB)

## 4.2 Physiko-chemische Eigenschaften der Testoberflächen

### 4.2.1 Messung der Rauheit

Die mittlere Rauheit  $R_a$  beschreibt das arithmetische Mittel eines gemessenen Oberflächenprofils. Die Oberflächentopographie der verwendeten Testoberflächen (Silberbeschichtung, Bismutbeschichtung, unbeschichteter Polyurethan-Polyester-Elastomer Probekörper) wurde mithilfe des Weitwinkel-Konfokalmikroskops Zeiss Smartproof 5 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland) an jeweils drei willkürlichen Stellen je Probekörper bestimmt. Die Auswertung erfolgte mittels der Imaging Software ZEN (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland). Für die Messungen wurde das integrierte Zeiss Objectiv C Epiplan-APOCHROMAT (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland) mit 20-facher Vergrößerung verwendet. Die aufgenommenen Daten wurden zur Verarbeitung und Analyse der 3D-Eigenschaften automatisch an die ConfoMap-Software (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland) übertragen. Durch Überlagerung der vom Weitwinkel-Konfokalmikroskop erzeugten Texturinformationen wurde eine wahrheitsgetreue Oberflächenrekonstruktion ( $500 \mu\text{m} * 500 \mu\text{m}$ ) erstellt.

### 4.2.2 Messung der freien Oberflächenenergie

Die Messung der freien Oberflächenenergie (SFE) erfolgte exemplarisch an je einem Probekörper pro Testoberfläche und wurde mithilfe des Krüss Drop Shape Analyzers DSA 25 (Krüss GmbH, Hamburg, Deutschland) durchgeführt. Für die Messungen wurden Wasser und Dijodmethan als Messflüssigkeiten verwendet. Die Probekörper wurden zunächst auf dem feinjustierbaren Hubtisch positioniert und mittig unter der Doppel-Druckdosiereinheit ausgerichtet. Für jede Testoberfläche wurde der Drop Shape Analyzer neu kalibriert, um ein optimales und genaues Ergebnis zu erreichen. Für die Kontaktwinkelmessung wurde zunächst mithilfe des Liquid Needle Systems ein Tropfen ( $2 \mu\text{l}$ ) pro Messflüssigkeit auf die Testoberfläche dosiert (Sessile Drop). Mithilfe der integrierten USB 3.0 Kamera von IDS (IDS Imaging Development Systems GmbH, Obersulm, Deutschland) wurde der gesamte Vorgang aufgezeichnet und in die Bildanalysesoftware AD-VANCE (Krüss GmbH, Hamburg, Deutschland) übertragen. Anhand einer Graustufenanalyse des Bildes wurde zunächst eine automatische Konturerkennung durchgeführt und anschließend ein geometrisches Modell der Tropfenkontur erstellt. Hieraus wurde der Kontaktwinkel als Winkel zwischen der ermittelten Tropfenkontur-Funktion und der Kontaktoberfläche (Basislinie) ermittelt. Innerhalb von 10 s nach Abgabe des Tropfens erfolgten 10 Messungen der Kontaktwinkel. Aus den rechten und linken Kontaktwinkeln zwischen Basislinie und Tropfen wurde mithilfe der ADVANCE Software die SFE in  $\text{mN/m}$  nach der Methode von Owens, Wendt, Rabel und Kaeble automatisch errechnet (Owens und Wendt 1969).

## 4.3 Mikroorganismen und Versuchsdurchführung

### 4.3.1 Bakterien

In allen Versuchsreihen wurde der Bakterienstamm *Streptococcus mutans* (DSMZ-Nr. 20523 Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland) verwendet. 25 µl des Bakterienstamms wurden in 25 ml Trypticase Soy Yeast Extract Medium (DSMZ-Medium Nr. 92, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland) bestehend aus 30 g tryptischer Soja-Nährbouillon (Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, USA) und 3 g Hefe-extrakt (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) gelöst in einem Liter *Aqua dest.* zur weiteren Verwendung als Wochenkultur für 16 Stunden bei 37 °C und 55 U/min kultiviert. Die Wochenkultur wurde anschließend bei 4 °C im Kühlschrank gelagert. Am Tag vor Versuchsbeginn wurde aus der Wochenkultur die für den Versuch benötigte Versuchskultur angezüchtet. Je 10 µl der Wochenkultur wurden pro 10 ml Trypticase Soy Yeast Extract Medium in einem Erlenmeyerkolben (Schott Glas, Mainz, Deutschland) überimpft und über Nacht für 16 Stunden bei 37 °C und 55 U/min auf dem Schüttelinkubator Max Q (Thermo Fisher Scientific Inc. (NYSE: TMO), Waltham, USA) inkubiert.

### 4.3.2 Versuchsvorbereitung

Die Probekörper wurden 24 Stunden vor Versuchsbeginn erst mit 70%igem Ethanol desinfiziert und anschließend mit deionisiertem Wasser gewaschen, auf sterilem Papier unter der Sterilbank getrocknet und im Anschluss in eine durchsichtige 24er Wellplatte (Sarstedt, Newton, USA) mittels des Dubliersilikons Z-Dupe (Henry Schein, Langen, Deutschland) fixiert. Das Dubliersilikon wurde in einer Petrischale auf einer gekühlten Metallplatte nach Herstellerangaben vorbereitet und in die Kammern der 24er Wellplatte überführt. Die Probekörper wurden vorsichtig auf dem Dubliersilikon platziert, nach Aushärtung des Silikons mit je 1 ml sterilem Wasser gewässert und über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank zur Standardisierung der Versuchsbedingungen und Eliminierung möglicher Beeinträchtigungen der Prüfkörper gelagert. Ebenfalls wurde am Tag vor Versuchsbeginn die Versuchskultur angesetzt (siehe 7.2.1). Direkt vor Versuchsbeginn wurden die Probekörper mittels UV-Strahler der Sicherheitswerkbank Heraeus Herasafe KS (Thermo Fisher Scientific Inc. (NYSE:TMO), Waltham, USA) für eine Stunde sterilisiert.

### 4.3.3 Bakterieninkubation

Zu Beginn des Versuchstages wurde die Versuchskultur in 50 ml Zentrifugenröhrchen (Fa. Corning GmbH, Kaiserslautern, Deutschland) überführt und anschließend in der Zentrifuge (Megafuge 8, Thermo Fisher Scientific Inc. (NYSE:TMO), Waltham, USA) für 5 Minuten bei 3200 U/min abzentrifugiert. Zur photometrischen Bestimmung der optischen Dichte (OD) der Bakterienkultur wurden 1,2 ml der nicht-zentrifugierten Suspensionskultur gesondert aufbewahrt. Die Ausgangs-OD bei einer Wellenlänge von 600 nm wurde gegen Tripti-case Soy Yeast Extract Medium als Blindwert gemessen.

Nach dem Zentrifugieren wurde der Flüssigkeitsüberstand vom Bakterienpellet durch vorsichtiges Abschütten getrennt. Die Bakterien wurden anschließend zweimal mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) gewaschen. Hierfür wurden pro Waschschrift je 30 ml PBS auf das abzentrifugierte Bakterienpellet pipettiert, vorsichtig durchmischt und erneut abzentrifugiert. Nach dem zweiten Waschschrift wurden die Bakterien in PBS resuspendiert und in einem sterilen Becherglas mithilfe des Magnetrührers MR Hei-Standard (Heidolph Instruments GmbH&Co, Nümbrecht, Deutschland) homogen durchmischt. Zur Einstellung der planktonischen Bakterienkonzentration wurde mittels des Photometers (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) zunächst der Blindwert mit PBS bestimmt und anschließend die Bakterienkultur mit PBS verdünnt, bis die optische Dichte im Photometer bei einer Wellenlänge von 600 nm gemäß dem Protokoll von Bürgers *et al.* (2009) auf 0,3 eingestellt war. Unmittelbar vor der Bakterieninkubation wurde das *Aqua dest.* vorsichtig von den Probekörpern abgesaugt. Die Probekörper wurden mit je 1 ml Bakteriensuspension für 2,5 Stunden bei 37 °C und mit 55 U/min im Schüttelinkubator Max Q inkubiert. Nach abgeschlossener Inkubation wurde die Bakteriensuspension vorsichtig am Rand aus der Wellplatte abgesaugt, sodass die Probekörper nicht berührt wurden. Die Probekörper wurden im Anschluss an die Bakterieninkubation mit je 1 ml 0,85%iger NaCl-Lösung gewaschen um Medienreste, PBS-Rückstände und nicht anheftende Bakterien zu entfernen.

### 4.3.4 Vorversuch: Fluoreszenzfärbung

Im Rahmen der Vorversuchsreihe wurde an einer reduzierten Anzahl an Probekörpern (zwei Probekörper pro Beschichtung) zunächst das Fluochrom Thermo Scientific Pierce Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific Inc. (NYSE:TMO), Waltham, USA) evaluiert. Gemäß den Herstellerangaben wurde eine Färbelösung aus 5 µl Hoechst 33342 (1 mg/ml) pro Milliliter 0,85%iger NaCl-Lösung angesetzt. Auf jeden Probekörper wurde 1 ml der Färbelösung pipettiert und gemäß der Empfehlung des Herstellers sowie gemäß dem Protokoll von Bürgers *et al.* (2009) für 15 Minuten bei 55 U/min, lichtdicht abgedeckt mit Alufolie, auf dem Schüttelinkubator bei 20 °C inkubiert. Die Färbelösung wurde vorsichtig abgesaugt und die Probekörper zweimal mit 0,85%iger NaCl-Lösung auf dem Schüttelinkubator für 5 Minuten bei 55 U/min und 20 °C gewaschen. Die NaCl-Lösung wurde anschließend vorsichtig in den

Bakterienabfall abgesaugt. Im weiteren Versuchsablauf wurde 2%iges Paraformaldehyd (PFA) aus 2 ml 8% PFA und 6 ml PBS hergestellt. Je Probe-körper wurde 1 ml des 2%igen PFA hinzupipettiert und für 5 Minuten bei 55 U/min und einer Temperatur von 20 °C gewaschen. Anschließend wurde das PFA abgesaugt, und es folgten zwei erneute Waschschrirte mit 0,85%iger NaCl-Lösung. Für die Lagerung bis zur mikroskopischen Auswertung wurden die Probekörper vorsichtig aus dem Dubliersilikon herausgetrennt, mit der besiedelten Seite nach unten auf ein Deckglas (Schott Gläser, Mainz, Deutschland) positioniert und bei 4 °C in einer Inkubationskammer lichtgeschützt gelagert.

Zusätzlich zu der Färbung mit dem Fluochrom Thermo Scientific Pierce Hoechst 33342 wurde in einer zweiten Vorversuchsreihe eine Lebend/Tot-Färbung durchgeführt. Die Versuchsvorbereitung und -durchführung der Lebend/Tot-Versuchsreihe entsprachen der Hoechst 33342-Versuchsreihe. Aufgrund der Lichtempfindlichkeit des Live/Dead BacLight Bacterial Viability Kits wurde im Dunkeln gearbeitet und die Färbelösung vor Lichteinfall geschützt. Gemäß der herstellereitigen Konzentrationsangabe des BacLight Kits wurden für die Färbelösung pro Milliliter Puffer (NaCl) 1,5 µl der Komponente A (Live\_Green; Syto 9) und 1,5 µl der Komponente B (Dead\_Red; Propidiumiodid) verwendet. Pro Probekörper wurde 1 ml der angesetzten Färbelösung zugegeben. Anschließend wurde der Farbstoff gemäß den Herstellerangaben und entsprechend Bürgers *et al.* (2009) und Boulos *et al.* (1999) für 15 Minuten auf dem Schüttelinkubator bei 55 U/min und 20 °C auf den Probekörpern inkubiert. Die Fixierung mittels PFA und die anschließenden Waschschrirte erfolgten analog zu der Versuchsreihe mit dem Fluochrom Thermo Scientific Pierce Hoechst 33342.

#### 4.3.5 Vorversuchsauswertung Fluoreszenz

Die Versuchsauswertung der Fluoreszenz-Vorversuchsreihen erfolgte am Fluoreszenz-mikroskop Keyence BZ-X700 (Keyence Corporation, Osaka, Japan). Für die Färbung mit dem Fluochrom Hoechst 33342 wurde der BZ-X Filter DAPI (Keyence Corporation, Osaka, Japan; Modell OP-87762; Anregungswellenlänge: 360/40; Absorptionswellenlänge: 460/50; Wellenlänge des dichroitischen Spiegels: 400) ausgewählt. Die Aufnahmen wurden für jeden Probekörper mit den stufenlos einstellbaren Objektiven Nikon CFI Plan Apo λ20x (972032) und CFI Plan Apo λ40x (972032) (Nikon Corporation, Tokio, Japan) sowohl in 20-facher als auch in 40-facher Vergrößerung angefertigt. Für die Lebend/Tot-Färbung mit Syto 9 wurde der BZ-X Filter GFP (Keyence Corporation, Osaka, Japan; Modell OP-87763; Anregungswellenlänge: 470/40; Absorptionswellenlänge: 525/50; Wellenlänge des dichroitischen Spiegels: 495) ausgewählt. Für die Färbung mit Propidiumiodid wurde der BZX-Filter TRITC (Keyence Corporation, Osaka, Japan; Modell OP-87764; Anregungswellenlänge: 545/25; Absorptionswellenlänge: 605/70; Wellenlänge des dichroitischen Spiegels: 565) verwendet. Die Kanäle der verschiedenen Färbungen wurden zunächst einzeln betrachtet und

fotografiert. Die Färbungen mit Hoechst 33342 wurden isoliert in 20- und 40-facher Vergrößerung betrachtet und grün dargestellt. Für die Auswertung der Färbungen mit Propidiumiodid und Syto 9 erfolgte die digitale Überlagerung der Aufnahmen, wobei Färbungen mit Syto 9 in grün und Färbungen mit Propidiumiodid in rot dargestellt wurden. Die Belichtungszeit und Schärfe wurden manuell, die Blende automatisch angepasst.

#### 4.3.6 Hauptversuch: Lumineszenz

Vor Beginn der Hauptversuche wurde im Rahmen eines weiteren Vorversuches die Lumineszenz-Versuchsreihe exemplarisch mit reduzierter Anzahl an Probekörpern ( $n=3$ ) durchgeführt. Die Ergebnisse der erfolgreich durchgeführten Vorversuchsreihe wurden in die statistische Auswertung mit einbezogen.

In den Hauptversuchen wurden in jedem Durchlauf pro Beschichtung (Silber, Bismut, unbeschichtet) 6 Probekörper verwendet, von denen je 5 mit Bakterien und je ein Probekörper als Nullkontrolle mit PBS inkubiert wurden. Die Versuchsvorbereitungen und Arbeitsschritte entsprachen den zuvor beschriebenen Fluoreszenz-Vorversuchsreihen. Nach zweieinhalbstündiger Bakterieninkubation (OD 0,3) bei 37 °C mit 55 U/min im Schüttelinkubator mit anschließendem Waschschrift mit PBS wurde auf jeden Probekörper 300 µl Lysisreagent des ViaLight™ Plus Cell Proliferation and Cytotoxicity BioAssay Kits (Lonza Group AG, Basel, Schweiz) pipettiert. Anschließend wurde das Lumineszenz-Assay für 10 Minuten entsprechend der Herstellerangaben inkubiert. Danach wurden aus jeder Kammer je 100 µl in eine weiße 96er Wellplatte (Sarstedt, Newton, USA) überführt und zusätzlich pro Kammer 100 µl Via Light AMR-Plus Assay-Buffer (Lonza Group AG, Basel, Schweiz) hinzugefügt. Nach erneuter Inkubation für 5 Minuten erfolgte die Messung der relativen Lumineszenzintensitäten am Plattenreader FLUOstar Omega (BMG Labtech GmbH, Offenburg, Deutschland) im Modus Luziferase mit einem Gain von 3600 und einer Messzeit von einer Sekunde. Ein hoher Wert sprach für eine hohe Bakterienaktivität, ein niedriger Wert für geringe Bakterienaktivität.

## 4.4 Statistische Auswertung

Die ermittelten Daten wurden in das Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft®Excel®2008 für Mac (Microsoft Corporation, Redmond, USA) übertragen. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte anschließend mithilfe von STATISTICA 12 (StatSoft Inc., Tulsa, USA). Zunächst wurden in einer deskriptiven Datenauswertung die Verteilungsparameter Mittelwert, Standardabweichung, Median sowie oberes Quartil und unteres Quartil der einzelnen Versuchsreihen ermittelt sowie graphisch mithilfe von Box-Plots dargestellt. Das Signifikanzniveau für die vergleichende statistische Auswertung wurde standardmäßig auf 5% festgelegt. Der Datensatz wurde graphisch anhand von Quantil-Quantil-Plots sowie mithilfe des Shapiro-Wilk-Tests auf Normalverteilung überprüft (Rochon et al. 2012). Da die Daten nicht normalverteilt waren, wurde als nicht parametrischer Test der Kruskal-Wallis-Test angewendet (Lantz 2013). Die Nullhypothese des Kruskal-Wallis-Tests nimmt an, dass die Stichproben aus Populationen mit der gleichen Verteilung stammen. Zusätzlich zu dem Kruskal-Wallis-Test erfolgte ein paarweiser Vergleich der einzelnen Gruppen (Silber, Bismut, Gummi) mithilfe des nichtparametrischen Mann-Whitney-U-Tests (Whitney 1997). Das Signifikanzniveau wurde mittels Bonferroni-Korrektur auf 1,6% adjustiert.

Bei der statistischen Auswertung der Daten ohne Einbezug des Vorversuches lag eine Normalverteilung vor, und es wurde die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) für die Gruppenvergleiche verwendet (Kim 2014). Die Nullhypothese der einfaktoriellen Varianzanalyse ist so formuliert, dass sich die Mittelwerte der einzelnen Faktorstufen nicht unterscheiden, es also keine signifikanten Unterschiede der relativen Lumineszenzintensitäten der einzelnen Beschichtungen gibt.

## 5 Ergebnisse

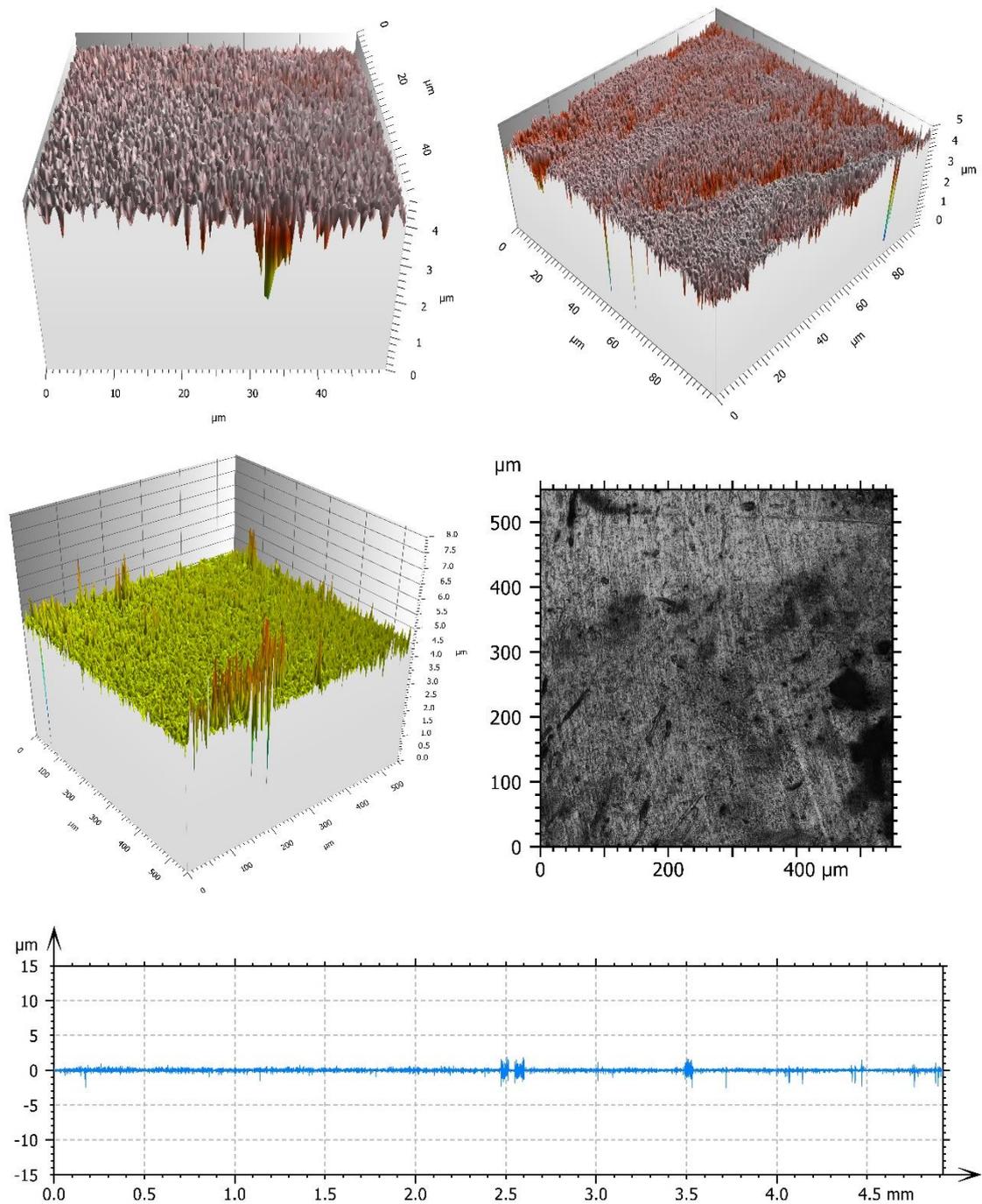
### 5.1 Rauheit und freie Oberflächenenergie (SFE)

Die Berechnung der freien Oberflächenenergie der verschiedenen Testoberflächen anhand der Kontaktwinkelmessung mit Wasser und Dijodmethan ergab für das unbeschichtete Gummi eine SFE von  $62,93 \pm 3,78$  mN/m, für die Silberbeschichtung eine SFE von  $69,69 \pm 1,41$  mN/m und für die Bismutbeschichtung eine SFE von  $73,93 \pm 1,48$  mN/m. Die Mittelwerte sowie der polare und disperse Anteil sind in **Tabelle 1** aufgeführt.

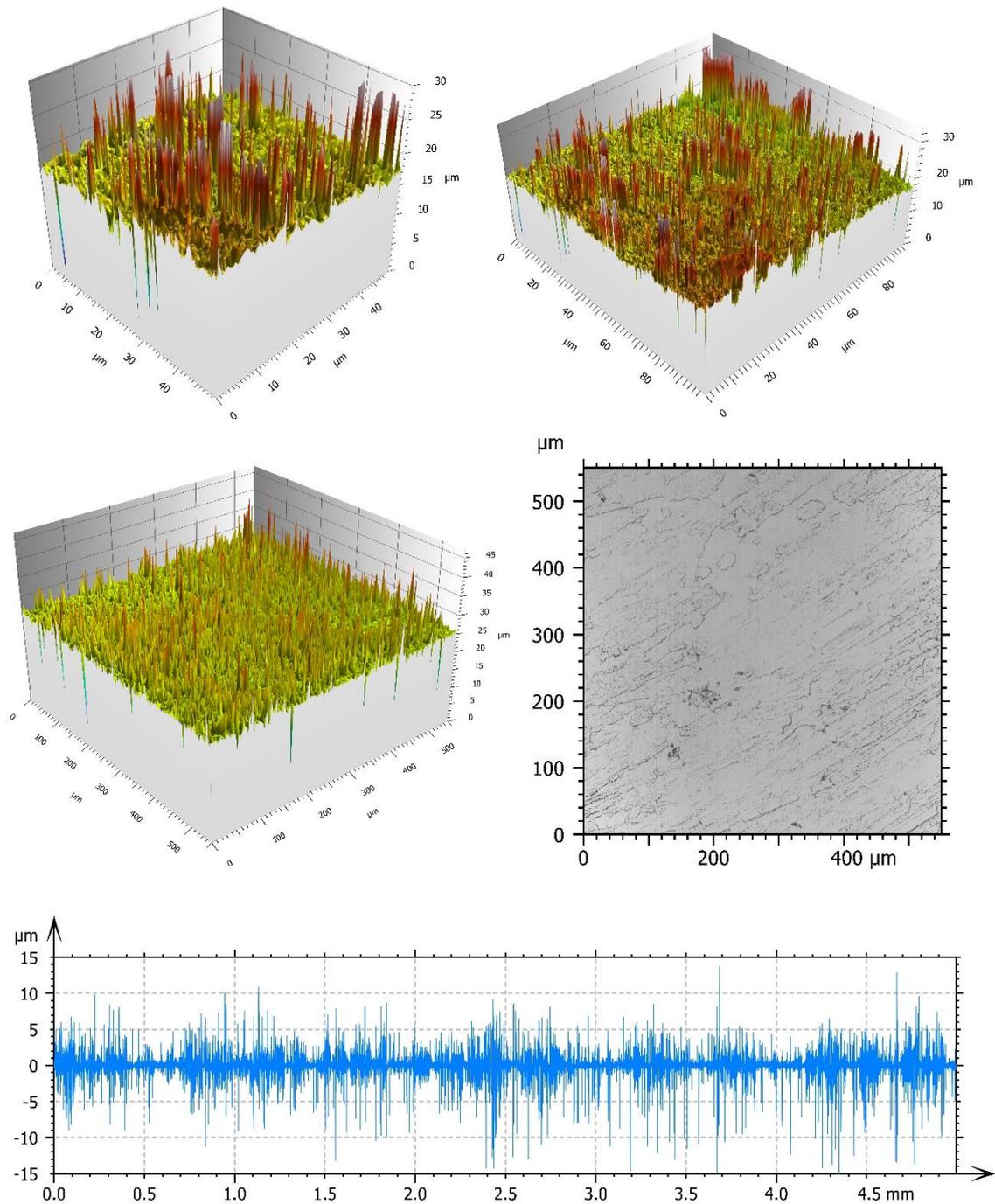
**Tabelle 1:** Mittelwerte des freien Oberflächenenergie SFE mit polarem und dispersem Anteil [mN/m]; gruppiert nach Beschichtung

<u>Beschichtung</u>	<u>SFE</u>	<u>disperser Anteil</u>	<u>polarer Anteil</u>
Gummi	$62,93 \pm 3,78$	$13,15 \pm 1,49$	$49,78 \pm 2,28$
Silber	$69,69 \pm 1,41$	$38,50 \pm 0,85$	$31,19 \pm 0,56$
Bismut	$73,92 \pm 1,48$	$46,04 \pm 0,66$	$27,88 \pm 0,82$

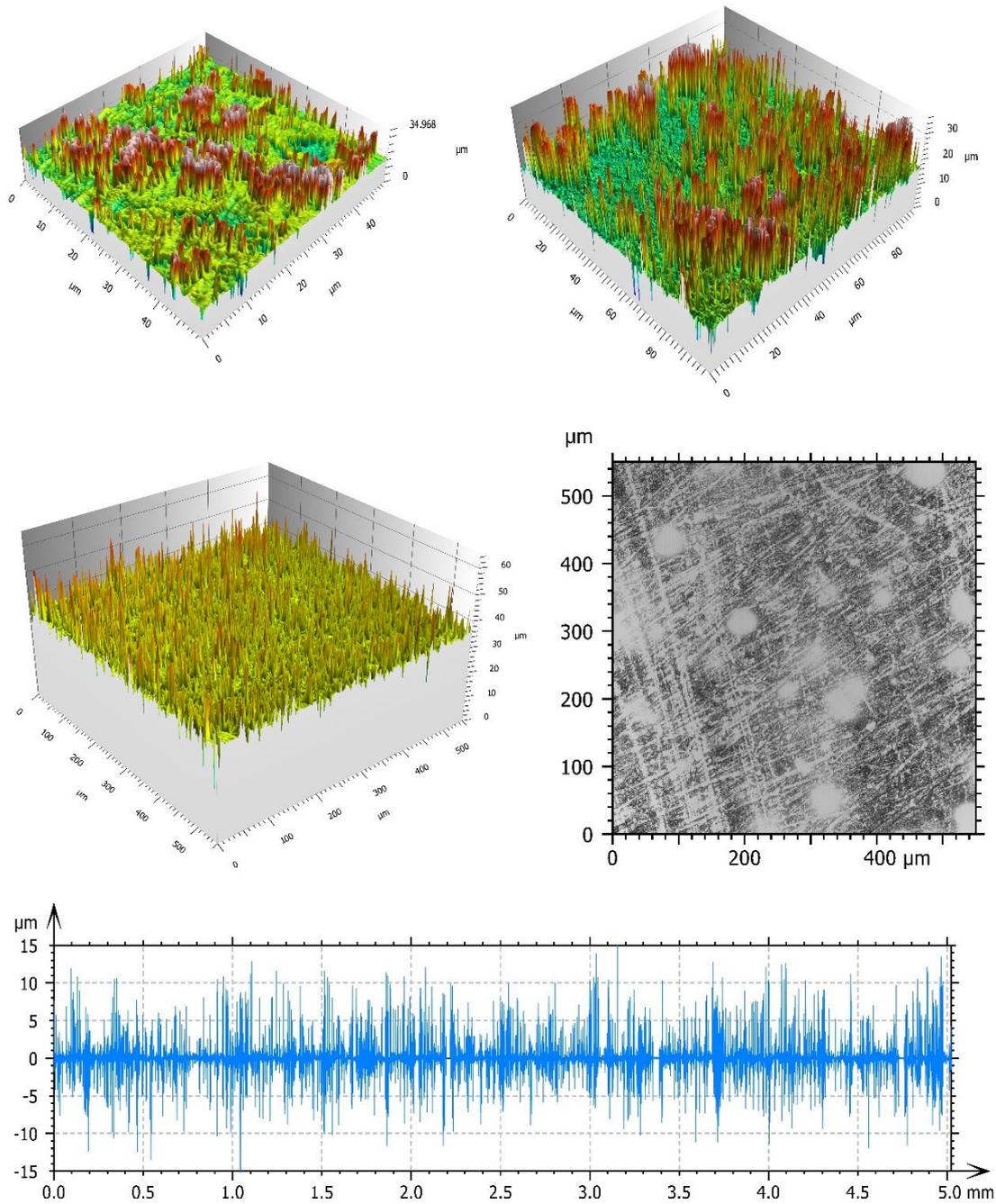
Die **Abbildungen 14-16** zeigen jeweils die dreidimensionale Darstellung des Oberflächenprofils der Testoberflächen, eine Echtfarbenansicht der Oberfläche sowie die Profilkurve des Rauheitsprofils. Für den Vergleich der Oberflächenrauheit wurden die Werte des arithmetischen Mittels der Rauheit  $R_a$  betrachtet. Dabei zeigte die Silberbeschichtung die geringste Oberflächenrauheit mit  $R_a = 0,122 \mu\text{m}$ , gefolgt von der Bismutbeschichtung mit  $R_a = 1,006 \mu\text{m}$ . Die unbeschichteten Probekörper zeigten die höchsten mittleren Rauheitswerte mit  $R_a = 1,182 \mu\text{m}$ . Auch in den dreidimensionalen Darstellungen der Oberflächenprofile wurden die Ergebnisse der Rauheitsmessungen bestätigt (siehe **Abbildungen 14-16**). Die Mikrostruktur wurde in den Aufnahmen detailliert aufgelöst und dargestellt und zeigte bei Gummi und Bismut mehr Unregelmäßigkeiten und größere Ausschläge im Vergleich zur glatteren Silberoberfläche. Auch die Profilkurve des Rauheitsprofils wies bei der Silber-Beschichtung im Vergleich zu unbeschichtetem Gummi und Bismut deutlich geringere Amplituden auf. Zwischen Bismut und Gummi ließ sich kein Unterschied feststellen.



**Abbildung 14:** Dreidimensionale Darstellung des Oberflächenprofils der Silberbeschichtung ( $50\ \mu\text{m} \times 50\ \mu\text{m}$ ;  $100\ \mu\text{m} \times 100\ \mu\text{m}$ ;  $500\ \mu\text{m} \times 500\ \mu\text{m}$ ); Echtfarbenansicht der Silberbeschichtung ( $550\ \mu\text{m} \times 550\ \mu\text{m}$ ); Profilkurve des Rauheitsprofils



**Abbildung 15:** Dreidimensionale Darstellung des Oberflächenprofils der Bismutbeschichtung ( $50 \mu\text{m} \times 50 \mu\text{m}$ ;  $100 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$ ;  $500 \mu\text{m} \times 500 \mu\text{m}$ ); Echtfarbenansicht der Bismutbeschichtung ( $550 \mu\text{m} \times 550 \mu\text{m}$ ); Profilkurve des Rauheitsprofils

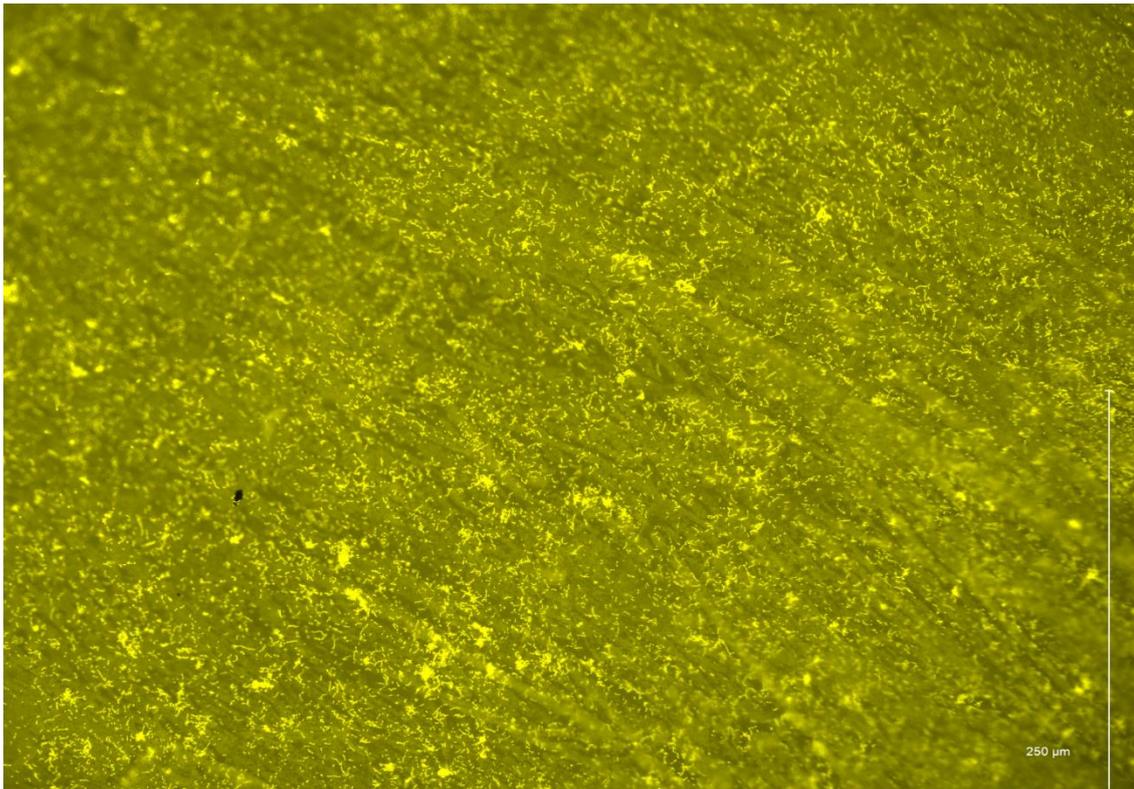


**Abbildung 16:** Dreidimensionale Darstellung des Oberflächenprofils des unbeschichteten Gummis (50 μm \* 50 μm; 100 μm \* 100 μm; 500 μm \* 500 μm); Echtfarbenansicht des Gummis (550 μm \* 550 μm); Profilkurve des Rauheitsprofils

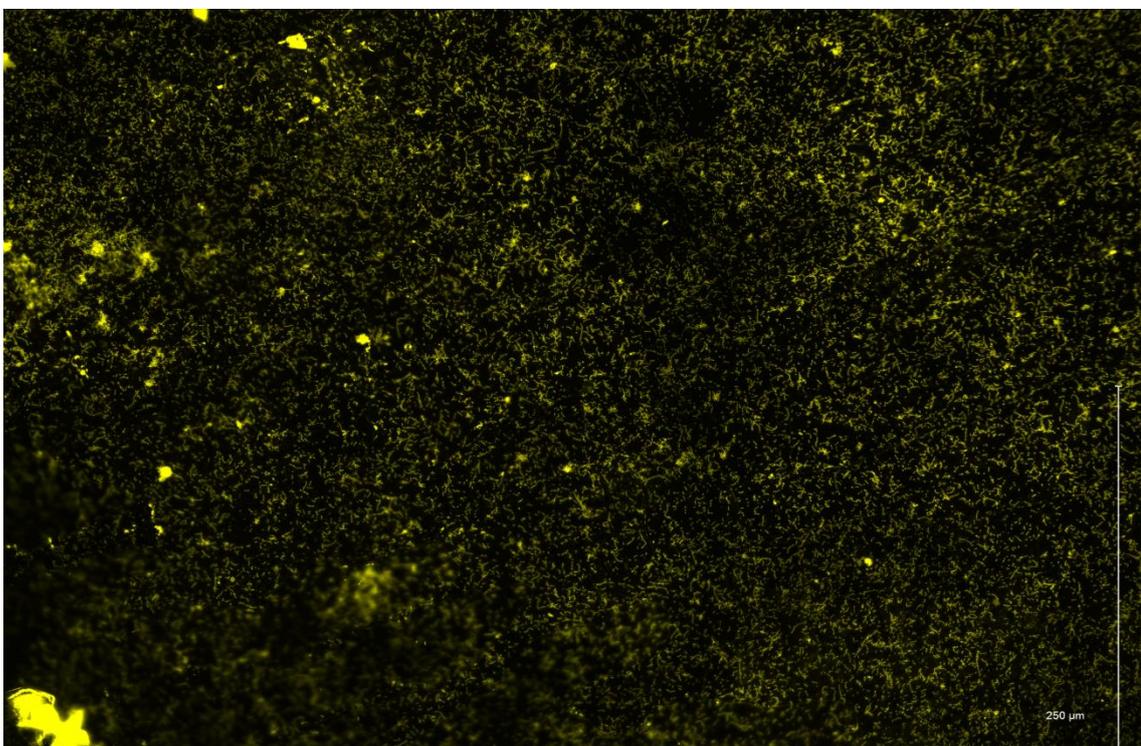
## 5.2 Ergebnisse der Vorversuche

### 5.2.1 Hoechst 33342-Färbung

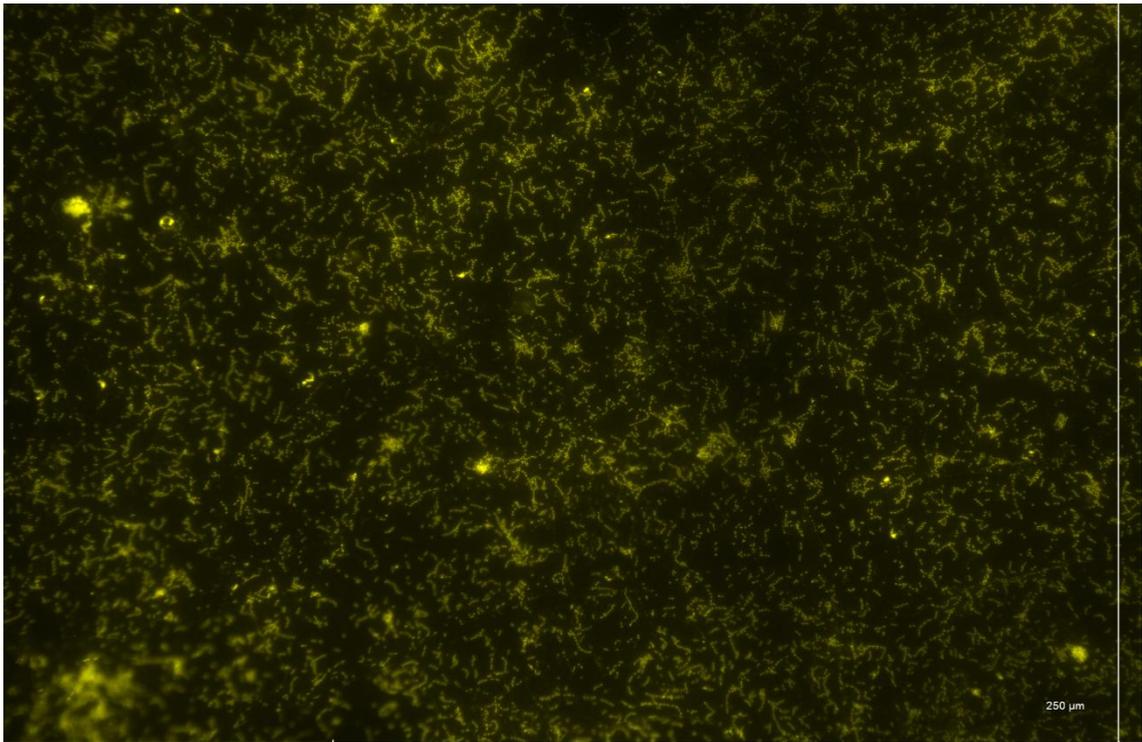
Mittels Fluoreszenzmikroskopie und dem Fluochrom Hoechst 33342 wurde zunächst die Bakterienanlagerung auf den verschiedenen Testoberflächen bewertet. Die **Abbildungen 17-21** zeigen entsprechende repräsentative Aufnahmen der verschiedenen Beschichtungen unter Verwendung des DAPI Filters. Auf allen Probekörpern (und damit allen Beschichtungen) zeigte sich ein heterogener Bakterienbelag. Die kugelförmigen Bakterien lagen einzeln sowie auch in Ketten und Haufen agglomeriert vor. Die Bakterienagglomerate bedeckten die Oberflächen nicht vollständig, sodass zwischen den Bakterien die Oberfläche der Probekörper exponiert war. Rein visuell waren keine Unterschiede in der Bakterienmenge und Art der Besiedlung festzustellen. Der Gummi-Probekörper ohne Beschichtung wies eine hohe Eigenfluoreszenz auf, weshalb der Hintergrund in **Abbildung 17** stark überstrahlte. Die Bakterien waren jedoch eindeutig durch die intensivere und stärkere Fluoreszenz vom Hintergrund zu differenzieren. Die **Abbildungen 18-21** zeigen die beschichteten Probekörper, die keine Eigenfluoreszenz aufwiesen. Die Anordnung in kurzen bis mittellangen Ketten spiegelte das typische Erscheinungsbild von *Streptococcus mutans* wieder und ließ sich eindeutig identifizieren. In **Abbildung 21** war ein Kratzer in der Silberbeschichtung dargestellt. Auf der linken Hälfte des Bildes war der beschädigte Teil, also der „reine“ Gummi-Probekörper zu sehen, die rechte Hälfte zeigte die Bakterien auf der Silberbeschichtung. In diesem Abschnitt schien die Besiedlung auf der zerkratzten/unbeschichteten Seite im Vergleich zum beschichteten Anteil größer zu sein. Jede Abbildung zeigte nur einen kleinen Ausschnitt des Probekörpers (bei 20-facher Vergrößerung: 500  $\mu\text{m}$  \* 750  $\mu\text{m}$ ; bei 40-facher Vergrößerung: 250  $\mu\text{m}$  \* 375  $\mu\text{m}$ ), in dem die Bakterien jedoch deutlich zu erkennen waren.



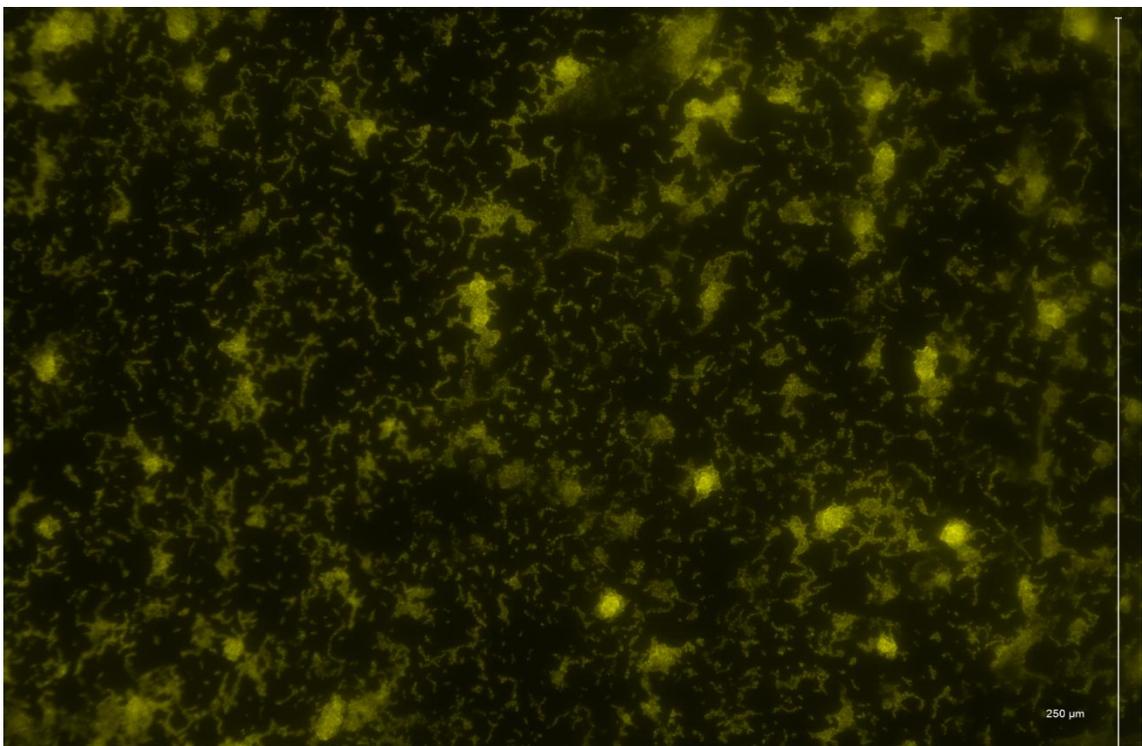
**Abbildung 17:** Hoechst 33342-Färbung; unbeschichteter Gummi-Probekörper nach 2,5 Stunden Inkubation mit *Streptococcus mutans*; Vergrößerung: 20x



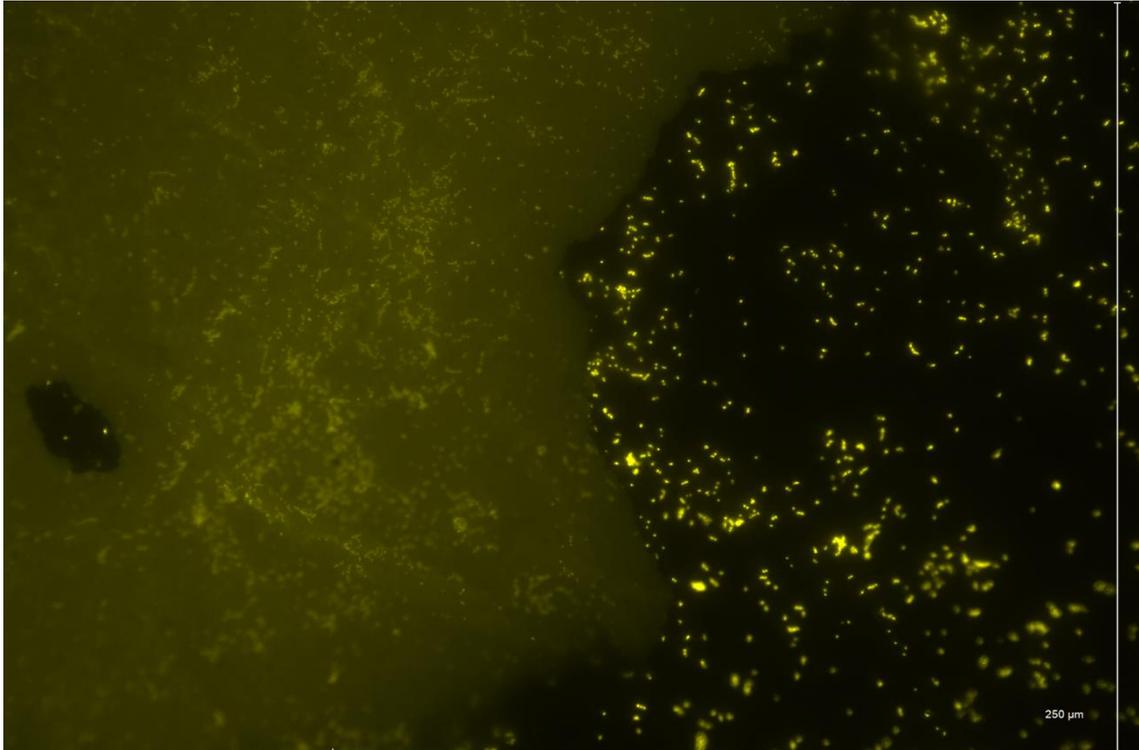
**Abbildung 18:** Hoechst 33342-Färbung; Bismut-beschichteter Probekörper nach 2,5 Stunden Inkubation mit *Streptococcus mutans*; Vergrößerung 20x



**Abbildung 19:** Hoechst 33342-Färbung; Bismut-beschichteter Probekörper nach 2,5 Stunden Inkubation mit *Streptococcus mutans*; Vergrößerung 40x



**Abbildung 20:** Hoechst 33342-Färbung; Silber-beschichteter Probekörper nach 2,5 Stunden Inkubation mit *Streptococcus mutans*; Vergrößerung 40x

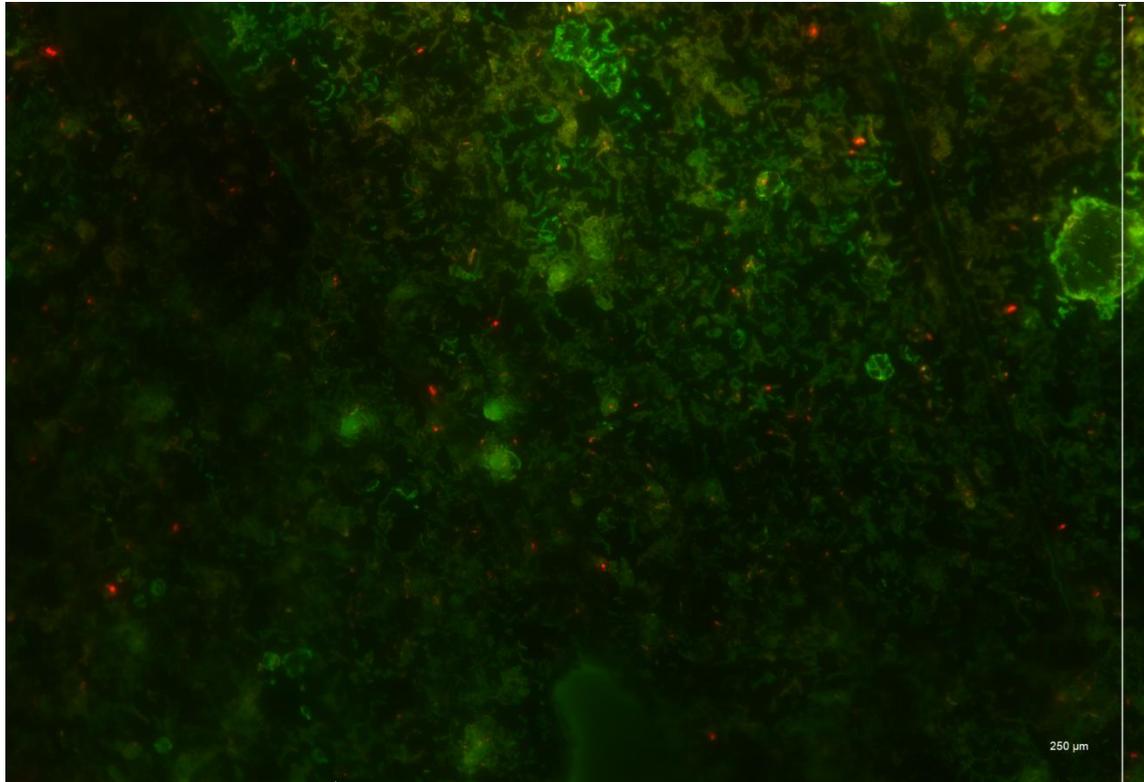


**Abbildung 21:** Hoechst 33342-Färbung; Silber-beschichteter Probekörper (rechte Hälfte) mit unbeschichtetem Bereich (Kratzer, linke Hälfte) nach 2,5 Stunden Inkubation mit *Streptococcus mutans*; Vergrößerung 40x

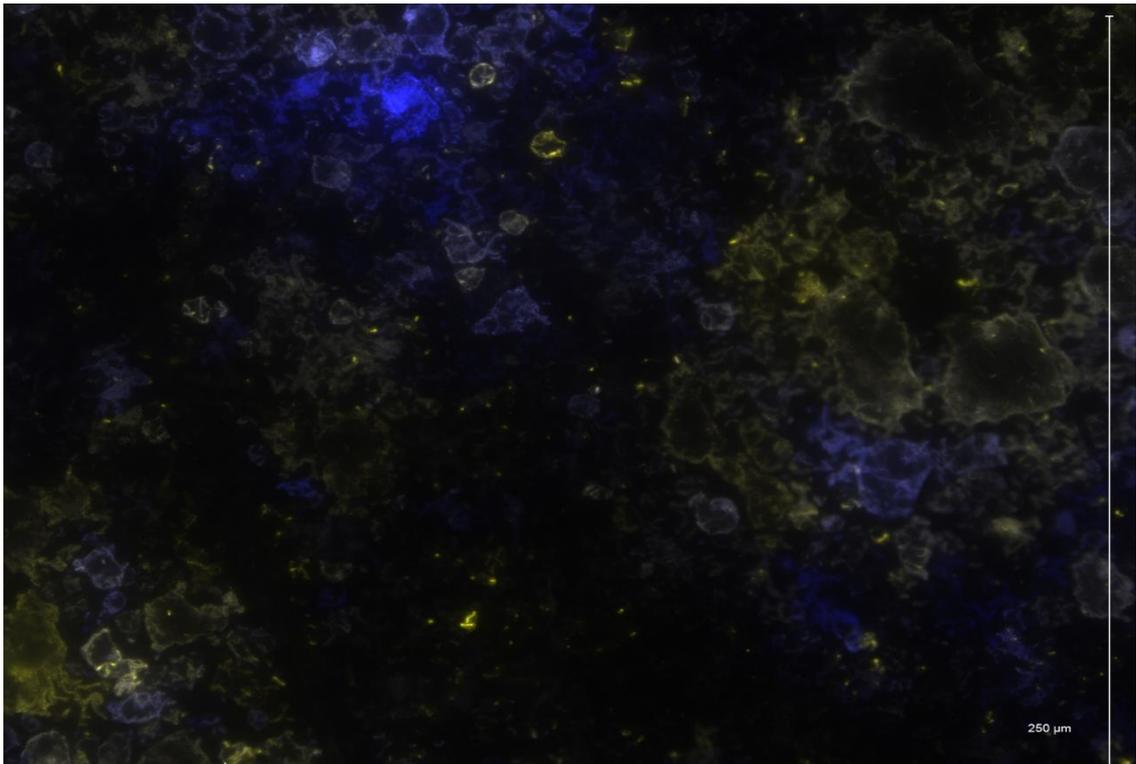
### 5.2.2 BacLight Bacterial Viability Kit

Die **Abbildungen 22-26** zeigen fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der verschiedenen Beschichtungen nach der Lebend/Tot-Färbung mit dem Live/Dead BacLight Bacterial Viability Kit. In den **Abbildung 22-25** zeigte sich ein heterogener Bakterienfilm. Die Bakterien lagen in gewundenen Ketten und Haufen agglomeriert vor. Die Oberfläche zeigte zudem diffuse verschwommene Areale, die durch Lufteinschlüsse bzw. den Phasenübergang von Wasser zu Luft hervorgerufen wurden. Die grün fluoreszierenden Kokken ließen sich eindeutig von den intensiv rot fluoreszierenden Kokken differenzieren. Dem biochemischen Grundprinzip der Färbemethode folgend, wurden grün gefärbte Kokken als vital und rot gefärbte aufgrund ihrer beschädigten Zellwand als avital gewertet. In **Abbildung 23** wurden zur Verbesserung des Kontrastes die vitalen Bakterien blau und die avitalen Zellen in gelb dargestellt. Es zeigten sich ebenfalls diffuse Monolayer der adhärennten Streptokokken. Aufgrund der starken Eigenfluoreszenz der Gummi-Probekörper war in **Abbildung 26** die Unterscheidung zwischen vitalen und avitalen Bakterien nicht eindeutig möglich, da die lebenden Bakterien von dem Hintergrund nicht zweifelsfrei zu differenzieren waren. Eine weitere Problematik stellte die unebene und strukturierte Oberfläche der Beschichtungen dar, die zu Lufteinschlüssen und unklaren Strukturen bei der Bildgebung, wie in **Abbildung 24** besonders ausgeprägt zu sehen, führte. Auf den fluoreszenz-mikroskopischen Aufnahmen nach

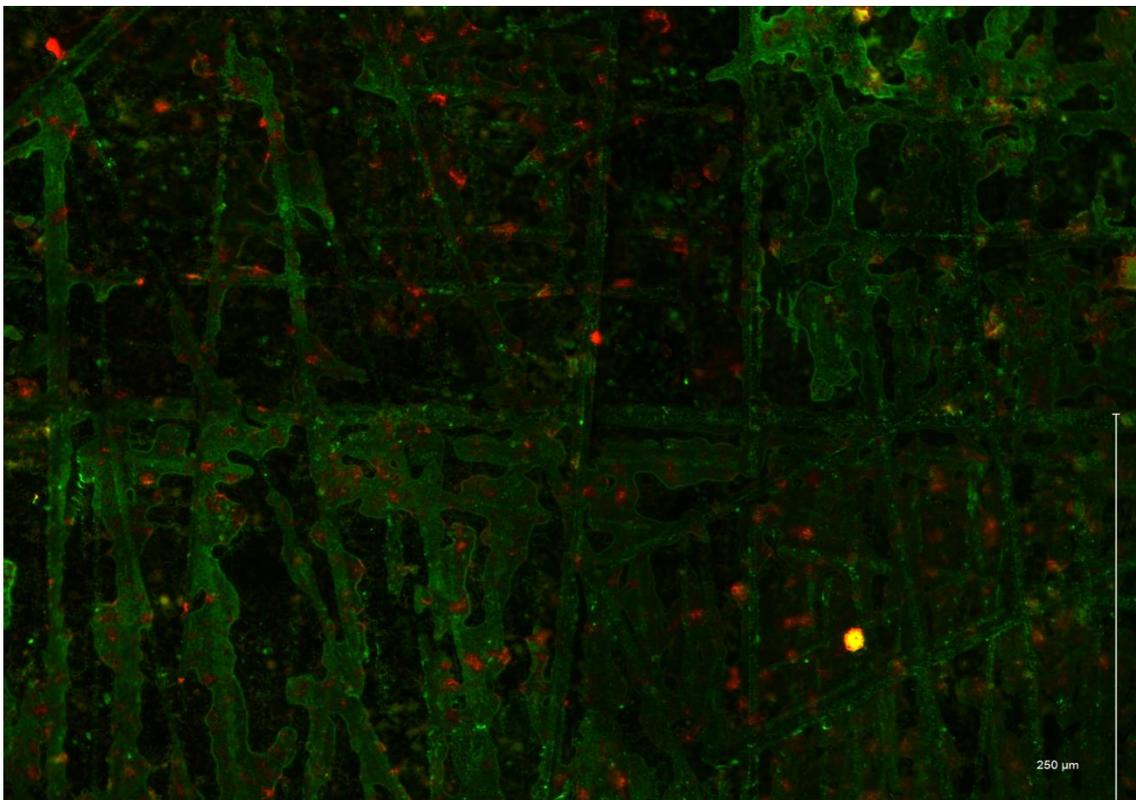
Lebend/Tot-Färbung waren auf den Silber- und Bismut-Testoberflächen deutlich mehr tote Bakterien zu erkennen als auf der reinen Gummi-Testoberfläche. Eine Quantifizierung war jedoch auch aufgrund von Unregelmäßigen in der Oberflächenstruktur nicht möglich.



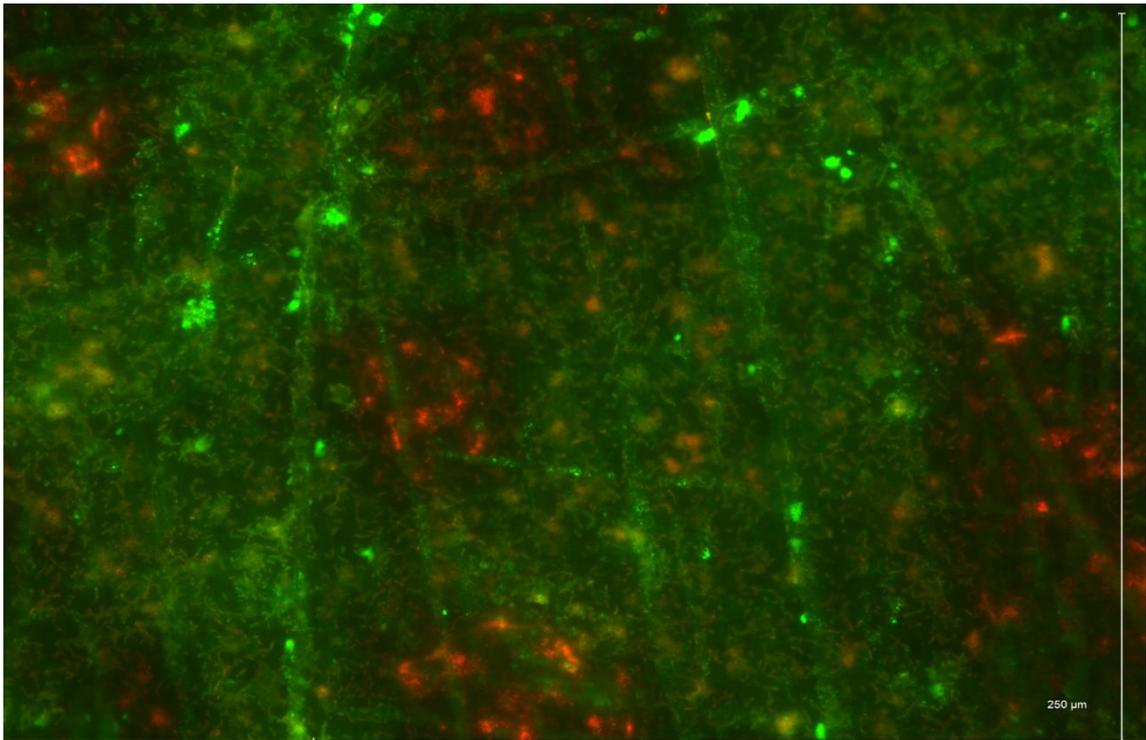
**Abbildung 22:** Lebend/Tot-Färbung (BacLight Bacterial Viability Kit); Silber-beschichteter Probekörper nach 2,5 Stunden Inkubation mit *Streptococcus mutans*; Vergrößerung 40x; grün: vital; rot: avital



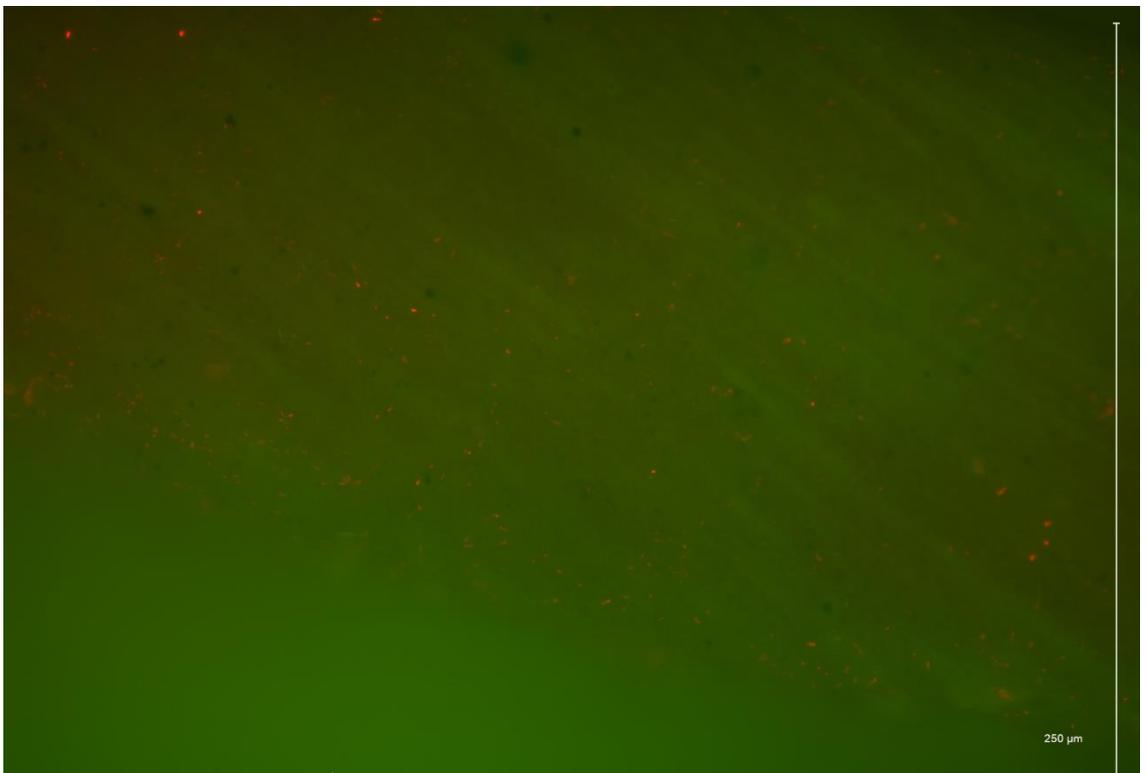
**Abbildung 23:** Lebend/Tot-Färbung (BacLight Bacterial Viability Kit); Silber-beschichteter Probekörper nach 2,5 Stunden Inkubation mit *Streptococcus mutans*; Vergrößerung 40x; blau: vital; gelb: avital



**Abbildung 24:** Lebend/Tot-Färbung (BacLight Bacterial Viability Kit); Bismut-beschichteter Probekörper nach 2,5 Stunden Inkubation mit *Streptococcus mutans*; Vergrößerung 20x; grün: vital; rot: avital



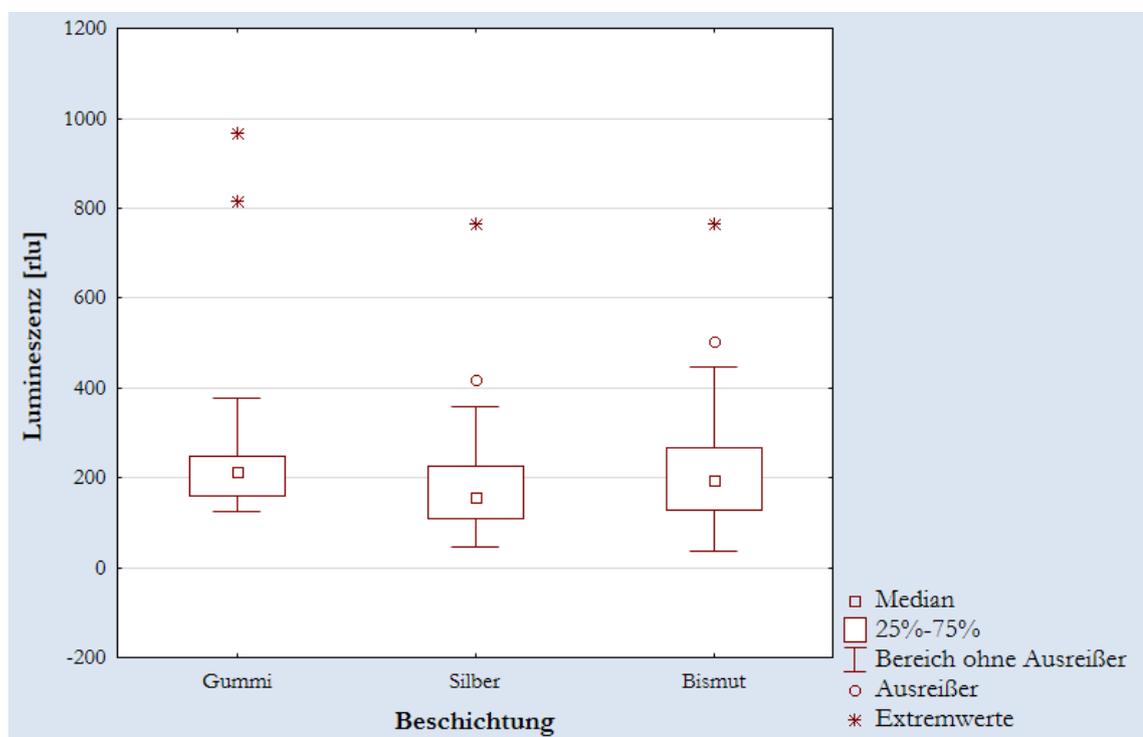
**Abbildung 25:** Lebend/Tot-Färbung (BacLight Bacterial Viability Kit); Bismut-beschichteter Probekörper nach 2,5 Stunden Inkubation mit *Streptococcus mutans*; Vergrößerung 40x; grün: vital; rot: avital



**Abbildung 26:** Lebend/Tot-Färbung (BacLight Bacterial Viability Kit); unbeschichteter Gummi-Probekörper mit starker Eigenfluoreszenz nach 2,5 Stunden Inkubation mit *Streptococcus mutans*; Vergrößerung 40x; grün: vital; rot: avital

### 5.3 Ergebnisse Hauptversuch: ATP-Lumineszenzen

**Abbildung 27** zeigt die relative Lumineszenz (Ordinate) der nach Beschichtung gruppierten Probekörper nach 2,5 Stunden Inkubation mit *Streptococcus mutans*. Die Silberbeschichtung wies im Mittel die geringste relative Lumineszenz auf (193 rlu), die unbeschichteten Gummi-Probekörper zeigten die höchsten mittleren Lumineszenzwerte (240 rlu) und auch den höchsten Medianwert (213 rlu). Es zeigte sich somit eine tendenziell vermehrte Bakterienanlagerung auf den unbeschichteten Probekörpern. Die Messwerte der unbeschichteten Prüfkörper wiesen den geringsten Interquartilsabstand auf, die Bismut-Probekörper den größten.



**Abbildung 27:** Box-Plot für Lumineszenz [rlu] nach Inkubation mit *Streptococcus mutans* auf den Gummi-, Silber-, und Bismut-Oberflächen

### 5.4 Statistische Auswertung

Im vorliegenden Datensatz wurde die Standardnormalverteilung sowohl anhand der Quantil-Quantil-Plots als auch mithilfe des Shapiro-Wilk-Tests abgelehnt. Alle p-Werte des Shapiro-Wilk-Tests waren kleiner als 0,05, und auch die Werte der Teststatistik waren kleiner als der kritische Wert von 0,947, weshalb die Nullhypothese verworfen und die relativen Lumineszenzintensitäten als nicht normalverteilt angesehen wurden (Razali und Wah 2011; Rochon et al. 2012).

### 5.4.1 Kruskal-Wallis-Test

Da der Datensatz als nicht normalverteilt angesehen wurde, erfolgte die statistische Auswertung anhand des Kruskal-Wallis-Tests. Der Wert der Teststatistik  $H$  betrug 5,07 und war somit kleiner als der kritische Wert (5,99). Bei einem  $p$ -Wert von 0,0791 ( $p > 0,05$ ) und  $H < 5,99$  wurde geschlussfolgert, dass kein signifikanter Unterschied zwischen den Beschichtungen in Bezug auf den antibakteriellen Effekt bestand. Da mithilfe des Kruskal-Wallis-Tests alle Gruppen miteinander verglichen wurden, konnte lediglich die Aussage getroffen werden, dass kein signifikanter Unterschied zwischen allen Gruppen bestand. Um die Daten noch differenzierter zu betrachten, wurde anschließend ein Mann-Whitney U-Test angewendet, der jeweils zwei Beschichtungen miteinander vergleicht und auf signifikante Unterschiede überprüft. Das Signifikanzniveau wurde hierfür mittels Bonferroni-Korrektur auf 1,6% adjustiert.

### 5.4.2 Mann-Whitney-U-Test

Die paarweisen Vergleiche zeigten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Im paarweisen Vergleich zeigte die Silberbeschichtung zwar eine niedrigere Bakterienadhäsion im Vergleich zu unbeschichtetem Gummi mit einem  $p$ -Wert von 0,022, es konnte jedoch nicht von einem statistisch signifikanten Unterschied gesprochen werden ( $p > 0,016$ ), sondern lediglich von einer Tendenz. Der Vergleich von Silberbeschichtung und Bismutbeschichtung sowie Bismutbeschichtung und Gummi ohne Beschichtung ergab ebenfalls keine statistisch signifikanten Unterschiede mit  $p$ -Werten von 0,202 und 0,309 ( $p > 0,016$ ).

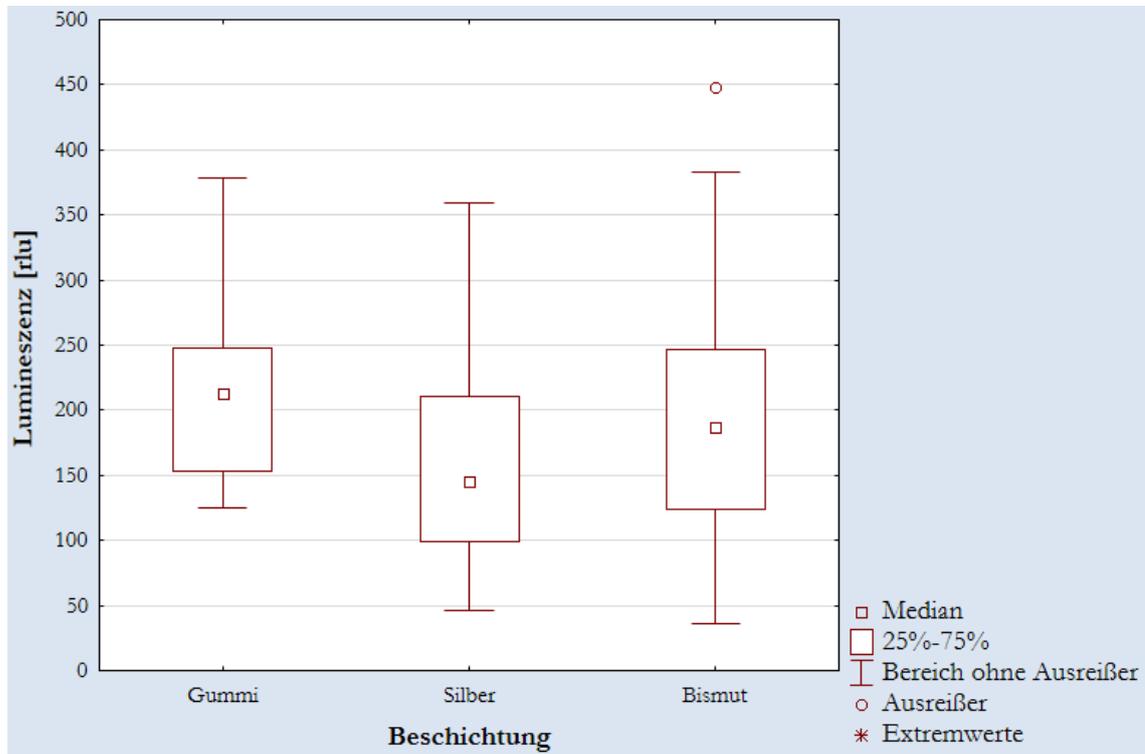
## 5.5 Statistische Auswertung ohne Vorversuch

Bei Betrachtung der deskriptiven Datenanalyse aus **Abbildung 27** fielen die extremen Ausreißer auf. Der erste Versuchsdurchlauf wurde als Vorversuch mit deutlich weniger Probekörpern durchgeführt und zeigte im Vergleich zu den nachfolgenden Läufen höhere relative Lumineszenzintensitäten. Der Datensatz wurde daher erneut ohne Einbeziehung des Vorversuches analysiert und statistisch ausgewertet (siehe **Abbildung 28**).

### 5.5.1 Deskriptive Datenanalyse ohne Ausreißer

Die Silberbeschichtung wies in der deskriptiven Analyse des Datensatzes unter Ausschluss des Vorversuches ebenfalls im Mittel die geringsten relativen Lumineszenzintensitäten auf, die unbeschichteten Gummi-Probekörper die höchsten. Bismut zeigte sowohl das kleinste

Minimum als auch das größte Maximum sowie die größte Spannweite und Standardabweichung. Das unbeschichtete Gummi zeigte die geringste Spannweite und Standardabweichung, wies jedoch einen deutlich größeren Minimum-Wert im Vergleich zu der Silberbeschichtung und Bismutbeschichtung auf.



**Abbildung 28:** Box-Plot für Lumineszenz [rlu] nach Inkubation mit *Streptococcus mutans* auf den Gummi-, Silber-, und Bismut-Probekörpern ohne Vorversuch

### 5.5.2 Statistische Auswertung ohne Ausreißer

Der Datensatz wurde mithilfe des Shapiro-Wilk-Tests auf Normalverteilung überprüft. Bei allen Beschichtungen lagen die p-Werte (Silber: 0,254; Bismut: 0,175; Gummi: 0,088) über 0,05, die Nullhypothese wurde nicht verworfen und die Daten somit als normalverteilt angesehen. Da die Messwerte der einzelnen Beschichtungen in der Auswertung ohne den Vorversuch normalverteilt waren, wurde im weiteren Verlauf der statistischen Auswertung eine einfaktorische Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde standardmäßig auf  $\alpha = 0,05$  (5%) festgelegt. Die Berechnung der Teststatistik  $F(2,101)$  ergab einen empirischen F-Wert ( $F_{EMP}$ ) von 2,8707. Der kritische Wert wurde den Tabellen der F-Verteilung für  $\alpha = 0,05$  entnommen (2 Freiheitsgrade im Zähler ( $v_1$ ) und 101 Freiheitsgrade im Nenner ( $v_2$ ); [ $F(v_1, v_2) = F((k-1), (N-k))$ ]) und lag bei 3,09 ( $x_{kritisch} = 3,09$ ) (Einfaktorische Varianzanalyse). Mit einem p-Wert von 0,06130 ( $p > 0,05$ ) und  $F_{EMP} < x_{kritisch}$  konnte die Nullhypothese nicht abgelehnt werden. Dies führte zu der Schlussfolgerung, dass die Beschichtung keine signifikante Auswirkung auf die relative Lumineszenz hatte.

## 6 Diskussion

Die spezifischen Biofilme der Mundhöhle sind neben anderen Virulenzfaktoren verantwortlich für die Entstehung von Karies und parodontalen Erkrankungen (Loesche 1986; Whittaker et al. 1996; Hannig und Hannig 2009; Jafer et al. 2016). In der festsitzenden kieferorthopädischen Behandlung kommt es aufgrund der erschwerten Mundhygiene häufig zu ungewollten Nebenwirkungen wie Schmelzdemineralisationen in Form von White-Spot-Läsionen sowie Gingivitiden und Parodontopathien (O'Reilly und Featherstone 1987; Ogaard et al. 1988; Lovrov et al. 2007; Bergstrand und Twetman 2011; Richter et al. 2011). Laut Forsberg *et al.* (1991) hat die Art der Ligation einen entscheidenden Einfluss auf die Bakterienakkumulation und somit auf die Entstehung von Schmelzdemineralisationen. Bei Patienten mit elastischen Ligaturen waren deutlich mehr Bakterien im dentalen Biofilm nachweisbar als bei Patienten mit Stahlligaturen. Nicht nur die Akkumulation wird begünstigt, sondern auch die Speichelzusammensetzung wird zugunsten der säureproduzierenden Bakterien, darunter auch *Streptococcus mutans*, verändert (Corbett et al. 1981; Maret et al. 2014). Bisherige kariesprophylaktische Maßnahmen wie die mechanische Biofilmentfernung, Mundhygieneinstruktionen, Fluoridierungsmaßnahmen sowie die Verwendung antimikrobieller Agenzien sind stark von der Compliance der Patienten abhängig (Corbett et al. 1981; Maret et al. 2014). In der Literatur existieren zahlreiche Studien über die bakterielle Adhäsion auf verschiedenen medizinischen Biomaterialien (Zhang et al. 2011; McConoughey et al. 2014; Veerachamy et al. 2014; Song et al. 2015; Yousif et al. 2015). Bei der Entwicklung antimikrobieller Strategien, die unabhängig von der Compliance der Patienten wirksam und erfolgreich sind, rücken antiadhäsive und antibakterielle Oberflächen immer mehr in den Fokus (Gottenbos et al. 2002; Müller et al. 2007; Hannig und Hannig 2009). Aufgrund ihrer langjährig bewährten antibakteriellen Eigenschaften wurden Metalle und Metalloxide in Form von Nano- oder Mikropartikeln bereits in Kombination mit unterschiedlichen dentalen Werkstoffen an verschiedenen oralen Grenzflächen untersucht (Bürgers et al. 2009; Hernandez-Delgadillo et al. 2013; Abou Neel et al. 2015; Bai und Vaz 2015; Mhaske et al. 2015). In dieser In-vitro-Studie wurden die antimikrobiellen Effekte von Silber- und Bismutbeschichtungen auf Polyurethan-Elastomer-Probekörpern gegen *Streptococcus mutans* untersucht.

### 6.1 Studiendesign

In der vorliegenden Versuchsreihe wurden zunächst die physiko-chemischen Analysen der verschiedenen Testoberflächen durchgeführt. Die Rauheitsmessung erfolgte mittels Weitwinkel-Konfokalmikroskopie. Als alternative Verfahren hierzu sind unter anderem die Atomkraftmikroskopie (AFM), die konfokale Laserscanningmikroskopie sowie das Tastschlittenprinzip zu nennen (Duparré et al. 2002). Laut Vorburger *et al.* (2007) unterscheiden

sich die Ergebnisse dieser Methoden bei verschiedenen Fragestellungen und Materialien nur geringfügig. Bei der Weitwinkel-Konfokalmikroskopie handelt es sich um ein etabliertes und bewährtes optisches, berührungsloses Verfahren (Xia et al. 2012). Die Proben müssen für dieses Verfahren nicht vorbereitet werden, weshalb Artefakte, die durch Vorbereitungsmaßnahmen wie Dehydratation entstehen können, eliminiert werden (Radford et al. 1997). Die Untersuchung der freien Oberflächenenergie erfolgte mittels Kontaktwinkelmessung (*sessile drop*) mit den zwei Messflüssigkeiten Wasser und Dijodmethan, welches sich als gängiges Verfahren etabliert hat (Busscher et al. 1984; Rozairo und Croll 2015; Kontaktwinkel - KRÜSS GmbH 2017). Es kann jedoch zu Abweichungen zwischen physikalischer Realität und den ermittelten Ergebnissen kommen (Chibowski und Perea-Carpio 2002). Der Zusammenhang zwischen Oberflächenrauheit und Benetzbarkeit der Testoberflächen ist ein möglicher Einflussfaktor und wird in der Literatur noch diskutiert (Koopal 2012; Svoboda et al. 2015). Ebenso könnte die Lagerung der Probekörper (feucht oder trocken) die Ergebnisse stark beeinflussen, indem trockengelagerte Probekörper die Flüssigkeitstropfen möglicherweise schneller aufnehmen als nass gelagerte Probekörper. Durch strenge Einhaltung der Zeitangaben (Messung innerhalb von 10 s nach Tropfenabgabe) wurde versucht, diesen Effekt zu minimieren.

Im Zuge der Vorversuchsreihen konnte zunächst mithilfe des Fluochroms Hoechst 33342 die Bakterienadhäsion auf den Probekörpern visualisiert werden. Auf allen untersuchten Probekörpern zeigten sich diffuse Monolayer von adhärenen Streptokokken. Die Vitalität der adhärenen Bakterien sollte anschließend mit einer Lebend/Tot-Färbung untersucht werden. Mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie können Bakterien mittels spezieller Fluochrome gefärbt und direkt betrachtet werden. Da eine verlässliche Quantifizierung der Bakterien anhand der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen aufgrund von Unregelmäßigkeiten der Silber- und Bismutbeschichtungen sowie der starken Eigenfluoreszenz der Polyurethan-Polyester-Elastomer-Probekörper jedoch nicht möglich war, wurde für den Vergleich der Beschichtungen die Quantifizierung vitaler Bakterien anhand von relativen ATP-Messungen gewählt. Diese indirekte Quantifizierungsmethode anhand relativer Lumineszenzintensitäten vereint zahlreiche Vorteile. Es handelt sich um ein etabliertes, sicheres, sensitives und reproduzierbares Verfahren, welches sich besonders durch die einfache Handhabung auszeichnet (McElroy und Ballentine 1944; Stanley 1989; Roda und Guardigli 2012; Yang et al. 2015). Das Verfahren ist zusätzlich unabhängig von möglichen Eigenfluoreszenzen der untersuchten Materialien. Es ist jedoch keine direkte Betrachtung bzw. Darstellung der Bakterien möglich. Das Vialight Plus Kit zeigt eine hohe Anfälligkeit für Verunreinigungen wie Staubkörnchen, weshalb es zu Abweichungen zwischen gemessener ATP-Konzentration und tatsächlicher zellulärer ATP-Menge kommen könnte. Die gemessenen relativen Lumineszenzintensitäten wurden anschließend statistisch auf signifikante Unterschiede getestet.

Das angewandte Prozedere stellt eine reproduzierbare Methode dar, die Wirkung antimikrobieller Beschichtungen auf einen gezüchteten Bakterienstamm *in vitro* zu untersuchen (Stanley 1989; Marques und Esteves da Silva 2009; Sánchez et al. 2013). Sowohl die Fluoreszenz-

Vorversuchsreihen als auch die Lumineszenz-Hauptversuchsreihe fanden unter semistatischen Bedingungen statt. Bürgers *et al.* (2010) zeigten, dass sich mithilfe semistatischer In-vitro-Methoden die Bakterienadhäsion realistisch und reproduzierbar darstellen lässt. In ihrer Studie konnte eine Übereinstimmung der untersuchten Parameter bei parallel durchgeführten In-vivo- und In-vitro-Versuchsreihen festgestellt werden. Ziel der Arbeit war es, die grundlegende Wirkung der Oberflächenbeschichtungen auf *Streptococcus mutans* zu untersuchen. Deshalb wurde in dieser Studie ein reproduzierbarer, vereinfachter Versuchsaufbau mit standardisierten Versuchsbedingungen gewählt, der gegebenenfalls in einem weiteren Schritt *in vivo* verifiziert werden könnte.

## 6.2 Diskussion von Materialien und Methoden

### 6.2.1 Mikroorganismen und Biofilmmodell

In allen Versuchsreihen wurde *Streptococcus mutans* als Testkeim verwendet, da er mit einer Konzentration von  $10^5$  Zellen/ml Speichel zu den häufigsten Keimen des orofazialen Systems zählt und als Leitkeim der Karies und der White-Spot-Läsionen angesehen wird (Loesche 1986; Khoo et al. 2005). *Streptococcus mutans* zählt jedoch nicht zu den primär-kolonisierenden Keimen in der Mundhöhle, was eine Abweichung des In-vitro-Studiendesigns von den eigentlichen Bedingungen in der Mundhöhle bedeutet (Gibbons und Houte 1975; Theilade et al. 1982; Nyvad und Kilian 1990; Diaz et al. 2006). In-vitro-Biofilmmodelle mit Multispezies-Biofilmen ermöglichen zwar eine realistischere Simulation der klinischen Bedingungen einschließlich Pellikelbildung und Biofilmentwicklung; für ein grundlegendes Verständnis der Vorgänge ist jedoch ein Monospezies-Biofilm mit wenigen Variablen bei spezifischen Fragestellungen von Vorteil. Die gewonnenen Ergebnisse der In-vitro-Monospezies-Biofilm-Versuchsreihe lassen sich trotz Limitationen auf komplexere In-vivo-Versuchsaufbauten übertragen (Bürgers et al. 2010). Der Inkubationszeitraum von 2,5 Stunden wurde gewählt, da in diesem Versuch die initiale Adhäsion der Mikroorganismen (Bakterien-Monolayer) untersucht werden sollte, die innerhalb weniger Stunden erfolgt. Laut Switalski und Butcher (1994) ist die initiale bakterielle Adhäsion von *Streptococcus mutans* nach 1-3 Stunden abgeschlossen. Die vollständige Plaquebildung und -reifung dauert mehrere Tage und hätte dementsprechend einen deutlich komplexeren Versuchsaufbau zur Folge. Eine längere Inkubationszeit wäre zusätzlich nur mit einem Medienwechsel während des Versuchs möglich, da die Nährsubstrate nach ca. 8 Stunden verbraucht sind und die anfallenden Stoffwechselprodukte eine toxische Wirkung auf die Bakterien ausüben können (Eick et al. 2004).

Die Proben wurden während des Versuchs mithilfe eines Schüttlers bei 37 °C inkubiert, wodurch konstante semistatische Bedingungen simuliert wurden. Für die Herstellung der Versuchskultur wurden pro 10 ml Medium 10 µl der Wochenkultur *Streptococcus mutans* hinzupipettiert und für 16 Stunden bei 55 U/min und 20 °C auf dem Schüttelinkubator bis zum

Versuchsbeginn inkubiert. Bei Betrachtung der typischen Wachstumskurve von *in vitro* in Suspension gezüchteten *Streptococcus mutans* Bakterien kommt es nach einer kurzen Anpassungs- und Beschleunigungsphase zu einem exponentiellen Wachstum der Kultur (Madigan et al. 2000). Während dieser Phase verdoppelt sich die Zellzahl in regelmäßigen Abständen. Mit der Zeit kommt es zum Nährstoffverbrauch und zur Anhäufung von hemmenden Stoffwechselprodukten, die das bakterielle Wachstum in eine stationäre Phase übergehen lassen. Während dieser Phase befinden sich Zelltod und langsamer Zuwachs im Gleichgewicht und die Zellzahl bleibt annähernd gleich (Madigan et al. 2000; Fritsche 2001). Da für eine reproduzierbare Studie eine konstante Zellzahl unabdinglich ist, wurde die Inkubationszeitraum von 16 Stunden ausgewählt, da sich die Bakterien zu diesem Zeitpunkt in der stationären Phase befanden (Madigan et al. 2000; Fritsche 2001).

### 6.2.2 Probekörper

Polyurethan-Polyester-Elastomerringe werden zur Befestigung der Drahtbögen im Bracketschlitz während der festsitzenden kieferorthopädischen Behandlung verwendet. Sie stellen neben den Stahlligaturen und selbstligierenden Brackets eine einfache und effiziente Möglichkeit der Fixierung dar, die sich klinisch bewährt hat. In der Literatur wird jedoch eine erhöhte Plaqueakkumulation auf den elastischen Ligaturenringen diskutiert. Laut Corbett *et al.* (1981) führt die Eingliederung der Bänder und Brackets nicht nur zu einer quantitativen Veränderung des Biofilms. Sie zeigten in ihrer Studie, dass bei Patienten mit festsitzenden kieferorthopädischen Apparaturen auch eine deutlich höhere Konzentration an *Streptococcus mutans* im Biofilm zu finden ist. Schmelzdeminalisationen in Form von White-Spot-Läsionen sowie gingivale und parodontale Erkrankungen treten deshalb häufig als ungewollte Nebeneffekte der festsitzenden Apparaturen in Erscheinung (O'Reilly und Featherstone 1987; Ogaard et al. 1988; Lovrov et al. 2007; Bergstrand und Twetman 2011; Richter et al. 2011). Die Entwicklung antimikrobieller Strategien, die eine bakterielle Kontamination der kieferorthopädischen Ligaturenringe verhindern und so den unerwünschten Nebenwirkungen wie Demineralisationen im Bracketumfeld und Gingivitiden entgegenwirken, scheint demnach sinnvoll zu sein. Beimengungen von antibakteriellen Additiven verändern die elastischen Eigenschaften von Werkstoffen, weshalb im vorliegenden Versuch Beschichtungen verwendet wurden.

Aufgrund ihrer bewährten antimikrobiellen Eigenschaften finden Silber und Bismut bereits seit vielen Jahren Anwendung in der Medizin (Berger et al. 1976; Bierer 1990; Rai et al. 2009). Insbesondere in der Entwicklung anti-adhäsiver und antibakterieller Oberflächen nehmen Silber und Bismut in mikro- oder nanopartikulärer Form einen wichtigen Stellenwert ein (Gottenbos et al. 2002; Müller et al. 2007; Hannig und Hannig 2009). Im Vergleich zu größeren Partikeln weisen Nanopartikel ein größeres Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnis auf, was zum einen eine besseren Interaktion mit mikrobiellen Membranen ermöglicht und zum anderen die Bildung von Ionen begünstigt und damit die bakterizide Wirkung verstärkt

(Morones et al. 2005; Verran et al. 2007). Der genaue Wirkmechanismus der metallhaltigen Nanopartikel wird in der Literatur noch diskutiert. Es wird angenommen, dass die Partikel zu einer Desintegration der bakteriellen Zellmembran mit Penetration in das Zellinnere führen und dort die Zerstörung intrazellulärer Bestandteile hervorrufen. Dieser Wirkmechanismus wird über Wechselwirkungen mit schwefelhaltigen Proteinen der Zellmembran vermittelt (Feng et al. 2000; Morones et al. 2005; Lok et al. 2006; Pal et al. 2007; Eckhardt et al. 2013). Es resultieren hieraus Störungen der Energiegewinnung, Desintegrationen der Membranstruktur sowie der Austritt und Verlust intrazellulärer Bestandteile (Feng et al. 2000; Lok et al. 2006). Auch die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies wird in der Literatur als möglicher antimikrobieller Wirkmechanismus diskutiert (Quinteros et al. 2016).

Die antibakterielle Wirkung von Silber und Bismut in der Mundhöhle wurde bereits in einigen Studien untersucht. Gosau *et al.* (2015) beschichteten in ihrer Studie Titan-Implantatoberflächen mit nanokristallinem Silber, Kupfer und Bismut und beurteilten anschließend die Oberflächeneigenschaften, Biokompatibilität und den antimikrobiellen Effekt. Sowohl die Silber- als auch die Bismutbeschichtung zeigten keine Zytotoxizität und konnten als zufriedenstellend biokompatibel eingestuft werden. Im Vergleich zu Kupfer und Silber zeigte Bismut in der Studie sogar einen überlegenen antimikrobiellen Effekt auf *Staphylococcus epidermidis*. Wang *et al.* (2016) modifizierten ebenfalls Titan-Oberflächen mit Silber-Nanopartikeln und zeigten, dass die modifizierten Oberflächen die Expression von Biofilm assoziierten Genen der Testkeime *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis* beeinflussen und auf diese Weise die bakterielle Adhäsion und Biofilmbildung hemmen. Auch in der Entwicklung kieferorthopädischer Materialien wurden die antibakteriellen Eigenschaften der Metall-Nanopartikel bereits untersucht. Mhaske *et al.* (2015) beschichteten kieferorthopädische Stahl- und Nickel-Titan-Drähte mit Silber-Nanopartikeln und demonstrierten den anti-adhäsiven und bakteriziden Effekt gegen *Lactobacillus acidophilus*. Im klinischen Einsatz könnte so eine Minimierung der dentalen Plaque-Akkumulation mit rückläufiger Karies-Inzidenz während der festsitzenden kieferorthopädischen Behandlung die Folge sein. Auch die Beschichtung von kieferorthopädischen Brackets aus rostfreiem Stahl mit einer Stickstoff-versetzten Titanoxid-Schicht zeigte sowohl anti-adhäsive als auch bakterizide Eigenschaften gegen *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus*, *Actinomyces viscosus* und *Candida albicans* (Cao et al. 2013). Ob die verringerte Bakterienadhäsion und die bakteriziden Eigenschaften der Nanopartikel *in vivo* tatsächlich zu einer verminderten Plaque-Akkumulation führen und ob die Beschichtungen den physiologischen Reinigungsmechanismen der Mundhöhle über einen ausreichend langen Zeitraum standhalten können, wurde noch nicht hinreichend geprüft.

Zwar scheinen Silber und Bismut vielversprechende antimikrobielle Materialien zu sein, es sollten jedoch weitere Studien durchgeführt werden, die sich noch intensiver mit der Toxizität von nanopartikulären Beschichtungen sowie dem genauen Wirkmechanismus beschäftigen. Insbesondere die hohe Bioverfügbarkeit und mögliche toxische Wirkung werden häufig kritisch diskutiert, da metallische Nanopartikel Zell- und Organgrenzen passieren und über das Blut- und Lymphsystem im gesamten Organismus verteilt werden können (Oberdörster

et al. 2005). In der vorliegenden Versuchsreihe wurde die Beschichtung der Polyurethan-Polyester-Elastomer-Probekörper im Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik IGB mittels Magnetronspütern durchgeführt. Es handelt sich um eine feinvakuumbasierte Beschichtungstechnik, die auf dem Prinzip der Kathodenzerstäubung beruht (siehe 2.3) (Popa et al. 2013). Das Magnetronspütern-Beschichtungsverfahren fand bereits in diversen Studien über die Wirkung antimikrobieller Oberflächenmodifikationen auf Medizinprodukten Anwendung, in der Literatur existieren jedoch keine Studien über die Beschichtung von Polyurethan-Polyester-Elastomerringen mittels Magnetronspütern. Das Beschichtungsverfahren zeichnet sich besonders durch die einfache Steuerung und Reproduzierbarkeit des Abscheidungsprozesses aus (Hacking et al. 2007; Song et al. 2011; Song et al. 2012; Jiang et al. 2013; Uhm et al. 2014a; Uhm et al. 2014b). Zudem ist eine genaue Übertragung der chemischen Zusammensetzung des Targets auf die abgeschiedene Beschichtung möglich (Hacking et al. 2007). Da die Dicke der Beschichtung dem Entladungsstrom und der Abscheidungszeit direkt proportional ist, konnten die Oberflächen der Prüfkörper bei einer Stromstärke von 0,4 Ampere und einer Dauer von 5 Minuten gleichmäßig mit Bismut und Silber beschichtet werden. In der vorliegenden Arbeit wurden erstmalig elastische Testoberflächen mittels Magnetronspütern beschichtet. Daher waren zunächst diverse vorbereitende Testläufe mit und ohne Titan-Zwischenschicht notwendig, um den bestmöglichen Haftverbund zu erreichen. Der Beschichtungsprozess war daher mit großem finanziellen und zeitlichen Aufwand verknüpft. Trotz präzisester Vorgehensweise bei der Beschichtungstechnik zeigten die Beschichtungen bei stärkeren Berührungen, die sich im Versuchsablauf nicht vermeiden ließen, bereits Rauheiten und Faltenbildungen auf der Oberfläche. Im klinischen Einsatz werden die elastischen Ligaturenringe bei Insertion und Entfernung stark gedehnt und sind zudem den stetigen physiologischen Reinigungsmechanismen sowie dem Lippen-tonus, der Nahrungsaufnahme und den Mundhygienemaßnahmen ausgesetzt. Aufgrund des instabilen Verbundes von Probekörper und Beschichtung käme es bereits bei geringfügiger Beanspruchung der Ligaturenringe zu einer Ablösung der Beschichtung, die eventuell verschluckt und auf diese Weise in den Organismus gelangen könnte. Bei einer vollständigen Bebanderung und regelmäßigem Wechsel der Ligaturenringe könnte dies fatale gesundheitliche Folgen bei den meist jugendlichen Patienten provozieren. Insbesondere vor dem Hintergrund der bereits häufig diskutierten erhöhten Bioverfügbarkeit und Toxizität von metallischen Nanopartikeln ist ein stabiler Verbund der Metalle mit dem Probekörper unverzichtbar.

### 6.2.3 Versuchsauswertung

Es existieren diverse Methoden zur Auswertung der Bakterienadhäsion auf Biomaterialien. In der vorliegenden In-vitro-Studie erfolgte die Versuchsauswertung mittels Messung relativer Lumineszenzintensitäten am Plattenreader. Die gemessenen relativen Lumineszenzintensitäten korrelierten direkt proportional mit der umgesetzten ATP-Menge und damit mit der

Konzentration metabolisch aktiver Bakterienzellen (Crouch et al. 1993; Marques und Esteves da Silva 2009; Sánchez et al. 2013). Als Vorversuche wurden zwei Fluoreszenz-Versuchsreihen durchgeführt, anhand derer die Bakterienadhäsion auf den Probekörpern am Fluoreszenzmikroskop zweifelsfrei nachgewiesen werden konnte. Die Fluoreszenz-mikroskopie zählt zu den direkten Quantifizierungsverfahren, ermöglicht also eine direkte visuelle Identifikation der Bakterien. Das Fluochrom Hoechst 33342 ist ein zellgängiger Farbstoff, der sowohl lebende als auch geschädigte und abgestorbene Zellen penetriert und dort an Adenin-Thymin-Regionen der zellulären DNA bindet (Chazotte 2011; Zurek-Biesiada et al. 2013). Mithilfe von Hoechst 33342 wurden zunächst alle Bakterien auf den Probekörpern am Fluoreszenzmikroskop visualisiert. Die anschließende Lebend/Tot-Färbung sollte der Unterscheidung vitaler und avitaler Zellen auf den Beschichtungen dienen. Die Lebend/Tot-Färbung beruht auf dem Prinzip, dass sich der zellgängige Lebendfarbstoff Syto 9 sowohl im Zytosol intakter vitaler als auch beschädigter oder zerstörter Zellen anreichert und diese färbt. Propidiumiodid penetriert ausschließlich beschädigte Zellen und akkumuliert dort am Zellkern (Boulos et al. 1999). Es ist jedoch anzumerken, dass mithilfe der Lebend/Tot-Färbung lediglich zwischen Zellen mit intakter und zerstörter Zellmembran differenziert werden kann (Berney et al. 2006; Berney et al. 2007; Filoche et al. 2007). Es existieren Studien, in denen auch Populationen, die mithilfe der Vitalfärbung als tot markiert wurden, auf Agarplatten Kolonien bildeten (Renyé et al. 2004). Gleichzeitig ist nicht sicher, dass Zellen mit intakter Membran auch vital sind (Joux und Lebaron 2000).

Eine weitere Möglichkeit der direkten Quantifizierung des bakteriellen Biofilms stellen elektronenoptische Verfahren dar, die neben der reinen Visualisierung auch einen Einblick in die Ultrastruktur der Bakterien und ihrer Umgebung ermöglichen (Hannig et al. 2010). Während bei der Licht- und Fluoreszenzmikroskopie maximale Auflösungen von 0,2 bis 0,3  $\mu\text{m}$  und Vergrößerungen um das 1500-Fache erreicht werden können, sind mit dem Elektronenmikroskop Auflösungen von bis zu 0,1 nm und Vergrößerungen um das 250.000-Fache möglich (Hannig et al. 2010; Loussert et al. 2012). Ein elektronenoptisches Verfahren, welches häufig bei der Untersuchung von Biofilmen Einsatz findet, ist die Rasterelektronenmikroskopie. Sie eignet sich insbesondere zur Visualisierung oberflächlicher Strukturen, der bakteriellen Morphologie sowie der Verteilung des Biofilms auf dem Prüfkörper (Du et al. 2012; Fischer et al. 2012; Albuquerque et al. 2015). Bei entsprechender Vergrößerung und Vorbehandlung mittels Dehydrierung, Fixierung und Imprägnierung können sogar ungefähre Aussagen über die genaue Zusammensetzung des Biofilms getroffen werden (Goldberg und Fišerová 2016). Im Zuge der Vorbehandlung kann es jedoch auch zu Zerstörungen des ursprünglichen Biofilmgefüges kommen (Fischer et al. 2012). Die Auswertung der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen erfolgt im Anschluss digital mithilfe einer Bildgebungssoftware, wobei für dunklere Biofilm-bedeckte Flächen ein gewisser Grenzwert als Graustufe definiert wird. Hierbei kann es zu Ungenauigkeiten kommen, wenn beispielsweise Plaqueareale, die diesen Grenzwert unterschreiten, fälschlicherweise als nicht-besiedelte Bereiche erfasst werden. Bei der vorliegenden Versuchsreihe wurde sowohl bei der Versuchsdurchführung als

auch bei der Auswertung der Vorversuche am Fluoreszenzmikroskop die fragile Verbindung zwischen Prüfkörper und der Silber- und Bismutbeschichtung als problematisch festgestellt. Auf den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen waren Risse sowie Unebenheiten und Luftpinschlüsse auf der Oberfläche der Prüfkörper zu erkennen. Eine klare Identifikation von Mikroorganismen konnte nur auf ausgewählten Ausschnitten des Probekörpers stattfinden. Ähnliche Problematiken wären auch für eine Quantifizierung mittels Rasterelektronenmikroskopie denkbar. Unebenheiten in der Beschichtung, wie Faltenbildungen, die im Rastermikroskop dunkler erscheinen, könnten fälschlicherweise als Bakterien gedeutet werden. Es wäre zudem denkbar, dass der Kontrast zwischen der metallhaltigen Beschichtung und den Bakterien für eine klare Auswertung nicht stark genug wäre. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der Vorversuchsreihe dienten aufgrund der zuvor genannten Schwachstellen der Demonstration der bakteriellen Besiedelung auf den Prüfkörpern und somit dem Nachweis, dass der Versuchsaufbau funktioniert und eine Bakterienakkumulation auf den Prüfkörpern stattfindet.

Für den Hauptversuch wurde das Verfahren der Biolumineszenz als indirektes Quantifizierungsverfahren gewählt. Die Biolumineszenz ist in der Natur weit verbreitet und bezeichnet die Lichtemission durch enzymkatalysierte Reaktionen in Gegenwart von ATP (McElroy und Ballentine 1944; McElroy 1947; McElroy und Farghaly 1947). Das Verfahren ermöglicht durch die Detektion von zellulärem ATP Rückschlüsse auf die Stoffwechselaktivität der Zellen (Ludwicka et al. 1985; Burkhardt und Heitmeier 2008). Es handelt sich um ein schnelles, sicheres, sensitives und reproduzierbares Verfahren, welches sich besonders durch die einfache Handhabung auszeichnet (McElroy und Ballentine 1944; Ludwicka et al. 1985; Loimaranta et al. 1998; Burkhardt und Heitmeier 2008). Als Nachteil ist jedoch zu nennen, dass bei unserer Versuchsreihe die Leuchtkraft des ViaLight™ Plus Cell Proliferation and Cytotoxicity BioAssay Kits nach initialer Benutzung abnahm. Die Vorversuchsreihe mit reduzierter Anzahl an Probekörpern lieferte deutlich höhere relative Lumin-eszenzwerte als die nachfolgenden Hauptversuchsreihen. Dies ist wahrscheinlich auf die Verwendung unterschiedlicher Chargen im Verlauf der mehrwöchigen Versuchsreihe zurückzuführen, weshalb in zukünftigen Versuchsreihen pro Versuchsreihe stets dasselbe Kit verwendet werden sollte. Die Relationen im Vergleich zu der reinen Bakterienprobe blieben jedoch gleich. Zudem ist das Vialight Kit laut Hersteller sehr anfällig für Hautschuppen oder kleinste Staubkörnchen, was zu einer Verfälschung des Ergebnisses führen könnte (www.lonza.com 2017). Bei der Biolumineszenz handelt es sich um ein indirektes Nachweisverfahren, mit dem eine Aussage über die Stoffwechselaktivität der adhärennten Zellen getroffen werden kann. Eine Visualisierung der Bakterien ist mit diesem Verfahren nicht möglich (Burkhardt und Heitmeier 2008; Garcez et al. 2013).

## 6.3 Diskussion der Ergebnisse

### 6.3.1 Rauheit und freie Oberflächenenergie

Die freie Oberflächenenergie zeigte bei den durchgeführten Messungen für alle Testoberflächen ähnliche Werte und schien in der vorliegenden Studie keinen Einfluss auf die bakterielle Adhäsion auszuüben. Zur Auswertung der Rauheit wurde das arithmetische Mittel der Rauheit  $R_a$  in  $\mu\text{m}$  betrachtet, welches in der Literatur am Häufigsten zur Beschreibung der Rauheit dentaler Werkstoffe angegeben wird (Quirynen und Bollen 1995; Kappert und Eichner 2005). Die Messung der mittleren Oberflächenrauheit mithilfe des Weitwinkel-Konfokalmikroskops ergab für die Silberbeschichtung eine deutlich geringere mittlere Rauheit ( $R_a = 0,122 \mu\text{m}$ ) im Vergleich zu Bismut ( $R_a = 1,066 \mu\text{m}$ ) und unbeschichtetem Poly-urethan-Polyester-Elastomer ( $R_a = 1,182 \mu\text{m}$ ). Zahlreiche Studien demonstrieren den begünstigenden Einfluss rauer Oberflächen auf die Bildung und Reifung eines dentalen Biofilms. So untersuchten Quirynen *et al.* (1990) die Bedeutung der freien Oberflächenenergie und Oberflächenrauheit auf die supragingivale Plaquebildung *in vivo* mithilfe eines Polymerstreifens, der auf einer Hälfte glatt ( $R_a = 0,1 \mu\text{m}$ ) und auf der anderen Hälfte angeraut war ( $R_a = 2,0 \mu\text{m}$ ). Auf der angerauten Seite war die Ausdehnung und Dicke des Biofilms viermal so groß wie auf der polierten, glatten Oberfläche. Auch Einwag *et al.* (1990) zeigten eine verstärkte Bakterienadhäsion von *Streptococcus mutans* an rauen Füllungsmaterialien im Vergleich zu hochglanzpolierten Oberflächen. Unebenheiten der Oberflächenstruktur werden als initiale Besiedlungspunkte beschrieben, da die Bakterien dort vor Scherkräften geschützt sind (Hannig 1999a). In der Literatur konnte zudem gezeigt werden, dass es im Bereich von Oberflächenunregelmäßigkeiten nicht nur zu einer gesteigerten initialen Bakterienadhäsion, sondern auch zu einem schnelleren Übergang von reversibler zu irreversibler Adhäsion kommt (Quirynen *et al.* 1990; Quirynen *et al.* 1993; Quirynen und Bollen 1995; Taylor *et al.* 1998; Hannig 1999a). Bollen *et al.* (1997) ermittelten für Titanoberflächen einen Schwellenwert von  $R_a = 0,2 \mu\text{m}$ . Rauigkeiten unterhalb dieses Wertes konnten keinen Einfluss auf die bakterielle Adhäsion im Fließkammersystem ausüben. Bei Übertragung der Ergebnisse von Bollen *et al.* (1997) auf die vorliegenden Ergebnisse, wäre lediglich die Silber-Oberfläche als glatt einzustufen ( $R_a < 0,2 \mu\text{m}$ ). Die deutlich glattere Oberfläche wäre also eine mögliche Erklärung für die tendenziell geringere Bakterienadhäsion auf den silberbeschichteten Probekörpern. Die Faktoren Oberflächenrauheit und freie Oberflächenenergie interagieren miteinander, wobei der Oberflächenrauheit in einigen Studien ein größerer Einfluss zugeschrieben wird (Quirynen *et al.* 1990; Teughels *et al.* 2006; Bürgers *et al.* 2010). Wassmann *et al.* (2017) zeigten in ihrer Studie, dass die bakterielle Adhäsion an Titan und Zirkonoxid sowohl durch die Oberflächenrauheit als auch durch die Benetzbarkeit der Oberfläche beeinflusst wird. Welcher der beiden Parameter als vorherrschender Einflussfaktor agiert, ist laut Wassmann *et al.* abhängig von der Bakterienspezies. In ihrer Versuchsreihe wurde die bakterielle Adhäsion von *S. epidermidis*

vorrangig durch die Benetzbarkeit der Oberfläche beeinflusst, wohingegen für die Adhäsion von *S. sanguinis* in erster Linie die Oberflächenrauheit entscheidend war.

### 6.3.2 Deskriptive Datenanalyse

Die deskriptive statistische Auswertung wurde sowohl für den Datensatz inklusive als auch exklusive des Vorversuches durchgeführt. Die Gummi-Probekörper zeigten in der Auswertung mit dem Vorversuch den geringsten Interquartilsabstand und in der Datenanalyse ohne Vorversuch auch die geringste Spannweite und Standardabweichung im Vergleich zu Silber und Bismut. Die Probekörper wurden mittels Magnetronspütern gleichmäßig beschichtet. Die Beschichtung war jedoch nicht voll kompatibel mit den gummielastischen Eigenschaften der Polyurethan-Polyester-Elastomer Probekörper (Hübner 2012). Die Probekörper wurden bis zum Versuchsbeginn trocken gelagert. Am Tag vor dem Versuchsablauf wurden die Probekörper mit Alkohol und Wasser gewaschen, steril getrocknet, eingeklebt und über Nacht im Kühlschrank gewässert. Dadurch wurden möglicherweise Spannungen und Mikrorisse innerhalb des Gefüges provoziert, was die Oberflächeneigenschaften des Materials beeinflusst haben könnte. Im Verlauf der Versuchsdurchführung wurden die Probekörper mit der Pinzette vorsichtig am Rand gefasst und umgelagert. Bei der kleinsten Berührung der Probekörper war bereits eine Veränderung der Oberfläche in Form von Falten und Rissbildung mit bloßem Auge zu erkennen. Es kann also im Zuge der Versuchsdurchführung trotz vorsichtiger Vorgehensweise zu kleinen Veränderungen der Oberflächenstruktur der Beschichtung mit Beeinträchtigung der Effektivität und so zu Schwankungen der gemessenen relativen Lumineszenzen (größerer Interquartilsabstand) gekommen sein. Sowohl in der Auswertung mit Vorversuch als auch ohne zeigten die silberbeschichteten Probekörper die geringsten relativen Lumineszenzen, die Gummi-Probekörper die höchsten, was ein mögliches antimikrobielles Potenzial der Silber-beschichtung vermuten lässt. Für den klinischen Einsatz wäre also eine deutliche Modifikation der werkstoffkundlichen Eigenschaften anzustreben. In der vorliegenden Untersuchung ging es jedoch primär um eine initiale mikrobielle Evaluierung als Vorstufe für weitere (klinische) Studien.

### 6.3.3 Statistische Auswertung

Die statistischen Auswertungen mittels Kruskal-Wallis-Test (Datensatz mit Vorversuch) und ANOVA (Datensatz ohne Vorversuch) zeigten keine signifikanten Unterschiede im Vergleich aller Beschichtungen bei einem Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,05$ . Im paarweisen Vergleich des Mann-Whitney-U-Testes zeigte Silber im Vergleich zu Gummi tendenziell niedrigere relative Lumineszenzintensitäten, der Unterschied war jedoch nicht statistisch signifikant. Die Vergleiche zwischen Bismutbeschichtung und Gummi sowie zwischen Silberbeschichtung und Bismutbeschichtung waren ebenfalls nicht signifikant. Die antibakterielle Wirkung von Silber wurde in anderen Studien auf unterschiedlichen dentalen Materialien

untersucht. Bürgers *et al.* (2009) verglichen unbehandelte Komposit-Probekörper mit Probekörpern mit 0,3% und 0,6% Silber-Additiven. Die Auswertung erfolgte am Fluo-reszenzmikroskop zum einen quantitativ mithilfe der Resazurin-Färbung und zum anderen qualitativ anhand der BacLight-Färbung. Mit der Resazurin-Färbung zeigten die Komposit-Probekörper ohne Silber-Zusatz eine drei- bis vierfach höhere Bakterienadhäsion im Vergleich zu den Probekörpern mit Silber-Additiven. Anhand der BacLight-Färbung wurden auf den Silber-Probekörpern signifikant mehr membrangeschädigte Zellen detektiert. Beides deutet auf ein bakterizides und anti-adhärentes Potenzial von Silber hin. Ob diese Eigenschaften auch zur Prävention kariöser Läsionen in der Mundhöhle beitragen können, muss noch *in vivo* geprüft werden. Auch Yoshida *et al.* (1999b) untersuchten die anti-bakterielle Wirksamkeit von Komposit-Materialien in Kombination mit zwei verschiedenen silberhaltigen Materialien auf *Streptococcus mutans*. Beide Materialien konnten das Wachstum von *Streptococcus mutans* über einen Zeitraum von 6 Monaten inhibieren. Wang *et al.* (2016) modifizierten Titan-Oberflächen mit Silber-Nanopartikeln und zeigten, dass die modifizierten Oberflächen einen Einfluss auf die Expression von Biofilm-assoziierten Genen der Testkeime *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis* ausübten und auf diese Weise die bakterielle Adhäsion und Biofilmbildung hemmten. Des Weiteren wurde demonstriert, dass die Inkorporation von Silber-Nanopartikeln als wirksames Antiinfektivum gegen anheftende und planktonische Bakterien anzusehen ist. Auch Gosau *et al.* (2015) beschichteten Titan-Implantatoberflächen mit nanokristallinem Silber, Kupfer und Bismut. Sowohl Silber als auch Bismut zeigten gute antibakterielle Wirksamkeit gegen *Streptococcus epidermidis*.

In der vorliegenden In-vitro-Studie konnte im paarweisen Vergleich von Silber und Gummi zwar kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden, die Silberbeschichtung zeigte jedoch sowohl im Kruskal-Wallis-Test als auch im paarweisen Vergleich tendenziell die geringsten relativen Lumineszenzintensitäten. Dies könnte entweder durch ein mögliches antimikrobielles Potenzial der Silberbeschichtung zu erklären sein oder auch durch die deutlich glattere Oberflächenbeschaffenheit der Silberbeschichtung. Im Vergleich der verwendeten Materialien fällt auf, dass es sich in den anderen Studien um starre Materialien wie Titan-Implantate oder Stahldrähte und Stahl-Brackets handelt. Eine Beschichtung von Materialien mit Eigenelastizität scheint demnach nicht voll kompatibel mit der Silber- und Bismutbeschichtung zu sein, was möglicherweise die Einbußen der anti-mikrobiellen Wirksamkeit erklärt. Ein möglicher Lösungsansatz, der die Problematik der Inkongruenz zwischen elastischem Probekörper und fragiler Beschichtung eliminieren könnte, wäre die Inkorporation des antibakteriellen Materials in den Probekörper oder ein alternatives Beschichtungsverfahren, das einen besseren Verbund zwischen Probekörper und Beschichtung ermöglicht. In der Literatur werden zwei verschiedene Möglichkeiten der antimikrobiellen Modifikation von kieferorthopädischen Ligaturenringen untersucht und diskutiert: die Metafasix-Technologie (Super Slick Elastomers) und die Orthoshield Orthodontic Antimicrobial Technologie (Orthoshield Safe-T-Tie®) (Magno et al. 2008; Leander und Kumar 2011; Caccianiga et al.

2012; Kim et al. 2012; Bai und Vaz 2015; Mattos et al. 2015; Ortho Organizers; OrthoShield™ Safe-T-Tie™ - Ortho Organizers). Das Grundprinzip der Metafasix-Technologie beruht auf einer wasserunlöslichen Hydrogel-Polymer-Beschichtung, welche zum einen die Friktion an der Verbindung von Bracketbogen und -slot herabsetzen soll und zum anderen die Oberfläche der Polyurethan-Elastomere bei Befeuchtung in eine glatte, bakterienabweisende Oberfläche modifiziert. Des Weiteren verspricht der Hersteller eine gute Retention, Reißfestigkeit und überlegene elastische Fähigkeiten der beschichteten Elastomere (Magno et al. 2008; Leander und Kumar 2011; Mattos et al. 2015). Die anti-adhäsiven und antimikrobiellen Eigenschaften der Super-Slick-Elastomere wurden bereits in einigen Studien untersucht. Magno *et al.* (2008) verglichen in ihrer In-vivo-Studie mit 20 Patienten die Kontamination mit *Streptococcus mutans* an beschichteten Super-Slick-Elastomerringen mit konventionellen Ligaturenringen. Nach 15 Tagen *in situ* waren entgegen den Herstellerangaben sogar signifikant mehr *Streptococcus mutans*-Bakterien auf den Super-Slick-Elastomeren nachweisbar als auf den unbeschichteten konventionellen Ligaturenringen, weshalb Magno *et al.* von der Verwendung der Super-Slick-Elastomere während der kieferorthopädischen Behandlung abraten. Auch Mattos *et al.* (2015) konnten in ihrer In-vivo-Studie keinen signifikanten Unterschied der mikro-biellen Kontamination von Super-Slick-Elastomerketten im Vergleich zu konventionellen elastischen Ketten über einen Zeitraum von 21 Tagen feststellen. Die Ergebnisse stimmen also mit den Resultaten der vorliegenden Untersuchung überein.

Die Orthoshield-Orthodontic-Antimicrobial-Technologie nutzt die antimikrobiellen Eigenschaften von Silber, wie Destabilisierung der bakteriellen Zellwand und Unterbrechung des bakteriellen Zellstoffwechsels (Caccianiga et al. 2012; Ortho Organizers; OrthoShield™ Safe-T-Tie™ - Ortho Organizers). Das Silber liegt eingebettet in einer porösen Keramik vor, wodurch eine stetige, kontrollierte Abgabe von Silber an die Oberfläche der Elastomerringe über einen Zeitraum von 30 Tagen sichergestellt werden soll (Caccianiga et al. 2012; Ortho Organizers; OrthoShield™ Safe-T-Tie™ - Ortho Organizers). Caccianiga *et al.* (2012) demonstrierten in einer In-vivo-Studie mit 50 Patienten eine signifikante Abnahme der Bakterienanzahl unter Verwendung der Safe-T-Ties® im Vergleich zu konventionellen Ligaturen. Zudem konnte auch eine deutliche Verbesserung der gingivalen Entzündungsindizes festgestellt werden. Kim *et al.* (2012) konnten in ihrer In-vivo-Studie hingegen keinen signifikanten Unterschied der mikrobiellen Kontamination mit *Streptococcus mutans* auf konventionellen Ligaturen und Safe-T-Ties® feststellen. Mögliche Faktoren, die die antimikrobielle Wirksamkeit beeinträchtigen, könnten laut Kim *et al.* die Menge an abgegebenen Silber-Ionen, die Verweildauer der Elastomere *in situ*, die physiologischen Konditionen der Mundhöhle sowie die physikalischen Eigenschaften der Elastomere sein. Die Menge an abgegebenen Silber-Ionen könnte zwar, wie vom Hersteller angegeben, über einen Zeitraum von 30 Tagen konstant sein, die Konzentration an abgegebenen Ionen ist jedoch möglicherweise zu gering, um ein bakterielles Wachstum zu verhindern. Eine weitere Erklärung für die fehlende antimikrobielle Wirksamkeit könnte eine Abnahme der Konzentration sein, die es den Bakterien ermöglichte, sich während des Versuchszeitraums wieder zu regenerieren. Casemiro *et al.* (2008)

demonstrierten in ihrer Studie, dass der prozentuale Anteil von Silber-Verbindungen in Komposit-Materialien positiv mit der antimikrobiellen Wirksamkeit korreliert. Die Konzentration der Ionen scheint demnach Einfluss auf die antimikrobielle Effektivität zu haben. Hotta *et al.* (1998) untersuchten in einer Langzeitstudie die antimikrobielle Effektivität von Silber-Zink-Verbindungen in Komposit-Materialien und fanden heraus, dass die Abgabe von Silber-Ionen bei dreimonatiger Lagerung in Wasser stagniert. Sie schlussfolgerten, dass der antimikrobielle Effekt auch durch direkten Kontakt mit den Bakterien und nicht nur durch Abgabe von Ionen hervorgerufen wird. Der genaue Wirkmechanismus scheint also noch nicht vollständig nachgewiesen zu sein und muss in weiteren Studien noch intensiv untersucht werden.

Die in der vorliegenden Studie verwendeten Ligaturenringe werden im klinischen Alltag in regelmäßigen Abständen gewechselt und dabei stark gedehnt. Zusätzlich sind die Ligaturenringe den physiologischen Reinigungsmechanismen der Mundhöhle, dem Lippentonus und stetiger mechanischer Beanspruchung bei Nahrungsaufnahme und Mundhygienemaßnahmen ausgesetzt. Es kommt zu Veränderungen der Materialeigenschaften, die einen monatlichen Wechsel der Ligaturenringe erforderlich machen. Dieser „Alterungsprozess“ des Materials sollte bei weitergehenden Entwicklungen unbedingt beachtet werden. Ein konstant stabiler Verbund zwischen antimikrobieller Beschichtung und elastischer Ligatur ist essenziell für einen klinischen Einsatz. Zudem sollte die Konzentration der abgegebenen Ionen vor einem klinischen Einsatz intensiv geprüft werden. Mit jedem neu inserierten Ligaturenring addiert sich die Menge an Ionen, die in den Organismus abgegeben wird, was gesundheitliche Folgen für die meist jugendlichen Patienten haben könnte. Die Entwicklung antimikrobiell wirksamer Ligaturenringe sollte also auf der einen Seite eine ausreichend hohe Konzentration an antimikrobiellen Ionen sicherstellen, die eine Etablierung pathogener Biofilme reduziert und nachhaltig wirksam ist. Auf der anderen Seite sollte die hohe Bioverfügbarkeit der Nanopartikel und insbesondere die Belastung der Patienten durch den Ligaturenwechsel, der mit einer erneuten Abgabe an Ionen in den Organismus verbunden ist, kritisch bedacht werden. Ein weiterer wichtiger Punkt ist das Umgebungsmilieu. Elastomere, die dem umgebenden Milieu der Mundhöhle ausgesetzt sind, werden in kürzester Zeit mit einem Film aus Speichelproteinen benetzt, der die Wirksamkeit beeinträchtigt und so den klinischen Einsatz erschwert (Schierholz *et al.* 1998). Die kontinuierlich sezernierten Silber-Ionen könnten zudem direkt durch andere Speichel-Ionen gebunden und dadurch unwirksam gegen Bakterien werden (Kim *et al.* 2012). Der genaue Wirkmechanismus ist, wie bereits erwähnt, noch nicht vollständig geklärt und in der Literatur wird diskutiert, welche Konzentration an Ionen ausreichend für eine antimikrobielle Wirkung ist. Berger *et al.* (1976) ermittelten, dass die minimale inhibitorische Konzentration (MIC) für Silber-Ionen auf eine Vielzahl von Bakterien-spezies bei 30 µg/l liegt, während Yoshida *et al.* (1999a) und Tanagawa *et al.* (1999) demonstrierten, dass bereits kleinste Mengen an Silber-Ionen zu einem antimikrobiellen Effekt auf *Streptococcus mutans* führen. Die unterschiedlichen Versuchsbedingungen der Studien erschweren jedoch einen direkten Vergleich. Die Konzentration an abgegebenen Silber-Ionen sowie

die Korrelation mit der antimikrobiellen Wirksamkeit sollte noch intensiver überprüft werden. Zudem sollten auch die Oberflächeneigenschaften der Elastomere, wie die freie Oberflächenenergie und Rauigkeit, betrachtet und auf Veränderungen im Verlauf der Studie überprüft werden (Kim et al. 2012).

Es lässt sich somit schlussfolgern, dass Silber möglicherweise eine antimikrobielle Wirkung aufweist. Das gummielastische Material der verwendeten Ligaturenringe scheint jedoch eine besondere Herausforderung an das Beschichtungsverfahren zu stellen. In weiterführenden Studien sollte als Grundvoraussetzung zunächst eine stabile Verbindung von antimikrobiellem Wirkstoff und Probekörper geschaffen werden, bevor weitere wichtige Parameter wie die Wirkstoffkonzentration, Toxizität, Oberflächeneigenschaften sowie die Langzeitwirkung untersucht werden können.

## 7 Zusammenfassung

Die Entstehung pathogener Biofilme an festsitzenden kieferorthopädischen Apparaturen kann zu unerwünschten klinischen Nebenwirkungen wie Demineralisationen im Brack- und Umgebung und Gingivitiden führen. Die erhöhte Bakterienakkumulation auf kieferorthopädischen Elastomerringen erhöht das Risiko für Karies und Parodontopathien. Deswegen wären oberflächenmodifizierte Ligaturenringe mit antimikrobiellem Potenzial von erheblichem klinischen Nutzen. Ziel der vorliegenden In-vitro-Studie war es, die antimikrobielle Wirkung von Nanobeschichtungen aus Silber und Bismut auf kieferorthopädischen Polyurethan-Polyester-Elastomerringen zu untersuchen. In der Versuchsreihe wurde *Streptococcus mutans* als repräsentativer Vertreter der Mutansgruppe ausgewählt, da er zu den häufigsten Keimen des orofazialen Systems zählt und als Leitkeim der Karies und somit auch von White-Spot-Läsionen gilt.

In einer Vorversuchsreihe wurde anhand fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen zunächst die Bakterienadhäsion auf den unbeschichteten und beschichteten Prüfkörpern visualisiert. Eine Quantifizierung der Bakterien war aufgrund von Unregelmäßigkeiten der Beschichtungen und den starken Hintergrundfluoreszenzen jedoch so nicht möglich. Für die Hauptversuchsreihe wurde deshalb das indirekte Quantifizierungsverfahren mittels Biolumineszenz gewählt. Anhand der Hauptversuchsreihe wurden die relativen Lumineszenzintensitäten der unbeschichteten und beschichteten Probekörper ermittelt und anschließend statistisch ausgewertet. Die relativen Lumineszenzintensitäten erlauben einen Rückschluss auf die Anzahl metabolisch aktiver Zellen. Je höher die Werte, desto mehr ATP wurde durch das Assay umgesetzt und desto mehr aktive Zellen befanden sich auf den Probekörpern. Bei der statistischen Auswertung zeigte die Silberbeschichtung sowohl im Kruskal-Wallis-Test als auch im paarweisen Vergleich zu unbeschichtetem Gummi die geringsten relativen Lumineszenzintensitäten und damit die geringste Bakterienaktivität. Dies könnte zum einen Rückschlüsse auf ein mögliches antimikrobielles Potenzial der Silberbeschichtung zulassen, ist zum anderen aber möglicherweise auch mit der deutlich glatteren Oberfläche der Silberbeschichtung und damit einhergehender verminderter Bakterienadhäsion zu erklären. Der Unterschied zwischen Bismutbeschichtung und unbeschichtetem Probekörper sowie zwischen Silberbeschichtung und Bismutbeschichtung war aber insgesamt statistisch nicht signifikant.

Das gummielastische Verhalten der Polyurethan-Polyester-Elastomerringe stellte eine besondere Herausforderung für Beschichtungsverfahren dar. Die Silber- und Bismutbeschichtungen, die mittels Magnetronsputtern aufgetragen wurden, erwiesen sich in der Versuchsreihe als mechanisch relativ instabil. Dadurch lassen sich möglicherweise die Schwankungen der Messwerte erklären. Auch eine Einschränkung des antibakteriellen Wirkmechanismus ist durch die instabile Oberfläche denkbar. Alternative Modifikationen der kieferorthopädischen Ligaturenringe, wie die wasserunlösliche Hydrogel-Polymer-Beschichtung der Me-

tafasix-Technologie oder die Inkorporation des antimikrobiell wirksamen Silbers in eine poröse Keramik der Orthoshield-Orthodontic-Antimicrobial-Technologie werden in der Literatur kontrovers diskutiert und sind noch nicht hinreichend erforscht.

Da es sich bei der Biofilmentstehung mit anschließender Demineralisation im Bracketumfeld um ein multifaktorielles Geschehen mit diversen Einflussfaktoren handelt, muss der antimikrobielle Wirkmechanismus der Probekörper unter unterschiedlichen Umgebungsbedingungen getestet werden. Es sollte zunächst ein stabiler Verbund zwischen Probekörper und antimikrobieller Beschichtung geschaffen werden, der auch einer starken mechanischen Beanspruchung standhält und die mechanischen Eigenschaften der Elastomere nicht negativ beeinflusst. Des Weiteren sollten Parameter wie die Konzentration an antimikrobiellen Zusätzen sowie eine mögliche toxische Wirkung von Nano- oder Mikropartikeln besonders vor dem Hintergrund eines stetigen Ligaturenwechsels im klinischen Alltag in diesem Zusammenhang intensiv geprüft werden.

Die Bakterienadhäsion auf den Probekörpern konnte mithilfe fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen eindeutig nachgewiesen werden und im Anschluss mittels Messung relativer Lumineszenzintensitäten reproduzierbar und schnell quantifiziert werden. Eine antimikrobielle Wirkung von Silber- und Bismutbeschichtungen auf kieferorthopädischen Ligaturenringen konnte in dieser Studie jedoch nicht nachgewiesen werden.

## 8 Literaturverzeichnis

### 8.1 Literatur

Abbe K, Carlsson J, Takahashi-Abbe S, Yamada T (1991): Oxygen and the sugar metabolism in oral streptococci. *Proc Finn Dent Soc Suom Hammaslääkäriseuran Toim* 87, 477–487

Abou Neel EA, Bozec L, Perez RA, Kim HW, Knowles JC (2015): Nanotechnology in dentistry: prevention, diagnosis, and therapy. *Int J Nanomedicine* 10, 6371–6394

Aguayo S, Bozec L (2016): Mechanics of Bacterial Cells and Initial Surface Colonisation. *Adv Exp Med Biol* 915, 245–260

Ahn HB, Ahn SJ, Lee SJ, Kim TW, Nahm DS (2009): Analysis of surface roughness and surface free energy characteristics of various orthodontic materials. *Am J Orthod Dentofac Orthop* 136, 668–674

Al Kawas S, Rahim ZHA, Ferguson DB (2012): Potential uses of human salivary protein and peptide analysis in the diagnosis of disease. *Arch Oral Biol* 57, 1–9

Albuquerque MTP, Valera MC, Moreira CS, Bresciani E, de Melo RM, Bottino MC (2015): Effects of ciprofloxacin-containing scaffolds on enterococcus faecalis biofilms. *J Endod* 41, 710–714

Al-Hashimi I, Levine MJ (1989): Characterization of in vivo salivary-derived enamel pellicle. *Arch Oral Biol* 34, 289–295

Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH (1995): Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* 59, 143–169

An YH, Friedman RJ (1998): Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces. *J Biomed Mater Res* 43, 338–348

Andrucioli MCD, Nelson-Filho P, Matsumoto MAN, Saraiva MCP, Feres M, Figueiredo LC de, Martins LP (2012): Molecular detection of in-vivo microbial contamination of metallic orthodontic brackets by checkerboard DNA-DNA hybridization. *Am J Orthod Dentofac Orthop* 141, 24–29

Arends J, ten Cate JM (1981): Tooth enamel remineralization. *J Cryst Growth* 53, 135–147

Armstrong WG (1967): The composition of organic films formed on human teeth. *Caries Res* 1, 89–103

Armstrong WG (1968): Origin and nature of the acquired pellicle. *Proc R Soc Med* 61, 923–930

Arthur M, Courvalin P (1993): Genetics and mechanisms of glycopeptide resistance in enterococci. *Antimicrob Agents Chemother* 37, 1563–1571

- Arvidsson A, Löfgren CD, Christersson CE, Glantz PO, Wennerberg A (2004): Characterisation of structures in salivary secretion film formation. An experimental study with atomic force microscopy. *Biofouling* 20, 181–188
- Arweiler NB, Sculean A, Auschill TM (2003): Der Wirkstoff Delmopinol – eine Alternative zu Chlorhexidin?. *Schweiz Monatsschr Zahnmed* 113, 136–142
- Atack NE, Sandy JR, Addy M (1996): Periodontal and microbiological changes associated with the placement of orthodontic appliances. A review. *J Periodontol* 67, 78–85
- Atkins PW, de Paula J: *Physikalische Chemie*. (Wiley-VCH-Lehrbuchkollektion 1), 5. Auflage; Wiley-VCH, Weinheim 2013
- Baehni P, Takeuchi Y (2003): Anti-plaque agents in the prevention of biofilm-associated oral diseases. *Oral Dis* 2, 23–29
- Bai MP, Vaz AC (2015): „Comparative evaluation of surface modified elastomeric ligatures for microbial colonization“: An in vivo study. *Indian J Dent Res* 26, 180–185
- Baka ZM, Akin M, Ileri Z, Basciftci FA (2015): Effects of remineralization procedures on shear bond strengths of brackets bonded to demineralized enamel surfaces with self-etch systems. *Angle Orthod* 86, 661–667
- Balenseifen JW, Madonia JV (1970): Study of dental plaque in orthodontic patients. *J Dent Res* 49, 320–324
- Banas JA (2004): Virulence properties of *Streptococcus mutans*. *Front Biosci J Virtual Libr* 2, 1267–1277
- Bassler BL, Greenberg EP, Stevens AM (1997): Cross-species induction of luminescence in the quorum-sensing bacterium *Vibrio harveyi*. *J Bacteriol* 179, 4043–4045
- Beck J, Garcia R, Heiss G, Vokonas PS, Offenbacher S (1996): Periodontal disease and cardiovascular disease. *J Periodontol* 67, 1123–1137
- Beldüz N, Kamburoğlu A, Yılmaz Y, Tosun I, Beldüz M, Kara C (2017): Evaluation of candida albicans biofilm formation on various dental restorative material surfaces. *Niger J Clin Pract* 20, 355–360
- Belli WA, Marquis RE (1991): Adaptation of *Streptococcus mutans* and *Enterococcus hirae* to acid stress in continuous culture. *Appl Environ Microbiol* 57, 1134–1138
- Bellini HT, Arneberg P, von der Fehr FR (1981): Oral hygiene and caries. A review. *Acta Odontol Scand* 39, 257–265
- Berger TJ, Spadaro JA, Bierman R, Chapin SE, Becker RO (1976): Antifungal Properties of Electrically Generated Metallic Ions. *Antimicrob Agents Chemother* 10, 856–860

- Bergmans L, Moisiadis P, Van Meerbeek B, Quirynen M, Lambrechts P (2005): Microscopic observation of bacteria: review highlighting the use of environmental SEM. *Int Endod J* 38, 775–788
- Bergstrand F, Twetman S (2011): A Review on Prevention and Treatment of Post-Orthodontic White Spot Lesions – Evidence-Based Methods and Emerging Technologies. *Open Dent J* 5, 158–162
- Bernabé E, Vehkalahti MM, Sheiham A, Lundqvist A, Suominen AL (2016): The Shape of the Dose-Response Relationship between Sugars and Caries in Adults. *J Dent Res* 95, 167–172
- Berney M, Weilenmann HU, Egli T (2006): Flow-cytometric study of vital cellular functions in *Escherichia coli* during solar disinfection (SODIS). *Microbiol Read Engl* 152, 1719–1729
- Berney M, Hammes F, Bosshard F, Weilenmann HU, Egli T (2007): Assessment and interpretation of bacterial viability by using the LIVE/DEAD BacLight Kit in combination with flow cytometry. *Appl Environ Microbiol* 73, 3283–3290
- Bierer DW (1990): Bismuth subsalicylate: history, chemistry, and safety. *Rev Infect Dis* 12 Suppl 1, 3-8
- Bollen CM, Lambrechts P, 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. *Dent Mater* 13, 258–269
- Bommer M, Ward JM (2016): Micromolar colorimetric detection of 2-hydroxy ketones with the water-soluble tetrazolium WST-1. *Anal Biochem* 493, 8–10
- Bos R, van der Mei HC, Busscher HJ (1999): Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions – its mechanisms and methods for study. *FEMS Microbiol Rev* 23, 179–230
- Boulos L, Prévost M, Barbeau B, Coallier J, Desjardins R (1999): LIVE/DEAD® BacLight™: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *J Microbiol Methods* 37, 77–86
- Bryan LE (1988): General mechanisms of resistance to antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 22 Suppl A, 1–15
- Bürgers R, Eidt A, Frankenberger R, Rosentritt M, Schweikl H, Handel G, Hahnel S (2009): The anti-adherence activity and bactericidal effect of microparticulate silver additives in composite resin materials. *Arch Oral Biol* 54, 595–601
- Bürgers R, Gerlach T, Hahnel S, Schwarz F, Handel G, Gosau M (2010): In vivo and in vitro biofilm formation on two different titanium implant surfaces. *Clin Oral Implants Res* 21, 156–164
- Burkhardt N, Heitmeier S (2008): Verfahren zum Nachweis von Pyrophosphat mit Biolumineszenzdetektion. <https://patents.google.com/patent/DE102006054562A1/de>

- Burne RA (1998): Oral Streptococci... Products of Their Environment. *J Dent Res* 77, 445–452
- Busscher HJ, Weerkamp AH (1987): Specific and non-specific interactions in bacterial adhesion to solid substrata. *FEMS Microbiol Lett* 46, 165–173
- Busscher HJ, Weerkamp AH, van der Mei HC, van Pelt AW, de Jong HP, Arends J (1984): Measurement of the surface free energy of bacterial cell surfaces and its relevance for adhesion. *Appl Environ Microbiol* 48, 980–983
- Büyükyılmaz T, Øgaard B (1995): Caries-Preventive Effects of Fluoride-Releasing Materials. *Adv Dent Res* 9, 377–383
- Caccianiga DG, Ordesi P, Cambini A, Stanizzi A, Denotti G, Fumagalli T (2012): Evaluation about antimicrobial activity of silver in OrthoShield Safe-T- Tie® ligatures used in orthodontic patients. *Eur J Inflamm* 10, 93–96
- Cao B, Wang Y, Li N, Liu B, Zhang Y (2013): Preparation of an orthodontic bracket coated with an nitrogen-doped TiO(2-x)N(y) thin film and examination of its antimicrobial performance. *Dent Mater J* 32, 311–316
- Casemiro LA, Gomes Martins CH, Pires-de-Souza F de CP, Panzeri H (2008): Antimicrobial and mechanical properties of acrylic resins with incorporated silver-zinc zeolite - part I. *Gerodontology* 25, 187–194
- Cavedon K, London J (1993): Adhesin degradation: a possible function for a *Prevotella loescheii* protease? *Oral Microbiol Immunol* 8, 283–287
- Chairuangkitti P, Lawanprasert S, Roytrakul S, Aueviriyavit S, Phummiratch D, Kulthong K, Chanvorachote P, Maniratanachote R (2013): Silver nanoparticles induce toxicity in A549 cells via ROS-dependent and ROS-independent pathways. *Toxicol In Vitro* 27, 330–338
- Chazotte B (2011): Labeling nuclear DNA with hoechst 33342. *Cold Spring Harb Protoc* 2011, pdb.prot5557
- Chen F, Liu C, Mao Y (2010): Bismuth-doped injectable calcium phosphate cement with improved radiopacity and potent antimicrobial activity for root canal filling. *Acta Biomater* 6, 3199–3207
- Chibowski E, Perea-Carpio R (2002): Problems of contact angle and solid surface free energy determination. *Adv Colloid Interface Sci* 98, 245–264
- Clarke J (1924): On the Bacterial Factor in the Ætiology of Dental Caries. *Br J Exp Pathol* 5, 141–147
- Claydon N, Hunter L, Moran J, Wade W, Kelty E, Mover R, Addy M (1996): A 6-month home-use trial of 0.1% and 0.2% delmopinol mouthwashes (I). Effects on plaque, gingivitis, supragingival calculus and tooth staining. *J Clin Periodontol* 23, 220–228

- Clement JL, Jarrett PS (1994): Antibacterial Silver. *Met-Based Drugs* 1, 467–482
- Corbett JA, Brown LR, Keene HJ, Horton IM (1981): Comparison of *Streptococcus mutans* concentrations in non-banded and banded orthodontic patients. *J Dent Res* 60, 1936–1942
- Cotter PD, Hill C (2003): Surviving the Acid Test: Responses of Gram-Positive Bacteria to Low pH. *Microbiol Mol Biol Rev* 67, 429–453
- Cowan MM, Taylor KG, Doyle RJ (1987): Energetics of the initial phase of adhesion of *Streptococcus sanguis* to hydroxylapatite. *J Bacteriol* 169, 2995–3000
- Cowan MM, van der Mei HC, Rouxhet PG, Busscher HJ (1992): Physico-chemical and structural properties of the surfaces of *Peptostreptococcus micros* and *Streptococcus mitis* as compared to those of *mutans streptococci*, *Streptococcus sanguis* and *Streptococcus salivarius*. *J Gen Microbiol* 138, 2707–2714
- Cox MM (2007): Regulation of bacterial RecA protein function. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 42, 41–63
- Coykendall AL (1974): Four types of *Streptococcus mutans* based on their genetic, antigenic and biochemical characteristics. *J Gen Microbiol* 83, 327–338
- Crouch SP, Kozlowski R, Slater KJ, Fletcher J (1993): The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *J Immunol Methods* 160, 81–88
- Cushing BL, Kolesnichenko VL, O'Connor CJ (2004): Recent advances in the liquid-phase syntheses of inorganic nanoparticles. *Chem Rev* 104, 3893–3946
- Dalton HM, March PE (1998): Molecular genetics of bacterial attachment and biofouling. *Curr Opin Biotechnol* 9, 252–255
- Dashper SG, Reynolds EC (1996): Lactic acid excretion by *Streptococcus mutans*. *Microbiology* 142, 33–39
- Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW, Greenberg EP (1998): The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* 280, 295–298
- Davies J (1994): Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science* 264, 375–382
- Davies J (1996): Bacteria on the rampage. *Nature* 383, 219–220
- Decker EM (2001): The ability of direct fluorescence-based, two-colour assays to detect different physiological states of oral streptococci. *Lett Appl Microbiol* 33, 188–192
- Deimling D, Hannig C, Hoth-Hannig W, Schmitz P, Schulte-Mönting J, Hannig M (2007): Non-destructive visualisation of protective proteins in the in situ pellicle. *Clin Oral Investig* 11, 211–216

- de Soet JJ, Nyvad B, Kilian M (2000): Strain-related acid production by oral streptococci. *Caries Res* 34, 486–490
- Derjaguin B, Landau L (1993): Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and of the adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolytes. *Prog Surf Sci* 43, 30–59
- Diaz PI, Chalmers NI, Rickard AH, Kong C, Milburn CL, Palmer RJ, Kolenbrander PE (2006): Molecular characterization of subject-specific oral microflora during initial colonization of enamel. *Appl Environ Microbiol* 72, 2837–2848
- Douglas CW (1994): Bacterial-protein interactions in the oral cavity. *Adv Dent Res* 8, 254–262
- Du X, Huang X, Huang C, Frencken JE, Yang T (2012): Inhibition of early biofilm formation by glass-ionomer incorporated with chlorhexidine in vivo: a pilot study. *Aust Dent J* 57, 58–64
- Dufrêne YF (2008): Towards nanomicrobiology using atomic force microscopy. *Nat Rev Microbiol* 6, 674–680
- Duparré A, Ferre-Borrull J, Gliech S, Notni G, Steinert J, Bennett JM (2002): Surface characterization techniques for determining the root-mean-square roughness and power spectral densities of optical components. *Appl Opt* 41, 154–171
- DuPont GA (1997): Understanding dental plaque; biofilm dynamics. *J Vet Dent* 14, 91–94
- DuPont HL (1987): Bismuth subsalicylate in the treatment and prevention of diarrheal disease. *Drug Intell Clin Pharm* 21, 687–693
- Eckhardt S, Brunetto PS, Gagnon J, Priebe M, Giese B, Fromm KM (2013): Nanobio silver: its interactions with peptides and bacteria, and its uses in medicine. *Chem Rev* 113, 4708–4754
- Edman K, Öhrn K, Nordström B, Holmlund A (2016): Prevalence of dental caries and influencing factors, time trends over a 30-year period in an adult population. Epidemiological studies between 1983 and 2013 in the county of Dalarna, Sweden. *Acta Odontol Scand* 74, 385–392
- Eick S, Glockmann E, Brandl B, Pfister W (2004): Adherence of *Streptococcus mutans* to various restorative materials in a continuous flow system. *J Oral Rehabil* 31, 278–285
- Einwag J, Ulrich A, Gehring F (1990): In-vitro plaque accumulation on different filling materials. *Oralprophylaxe* 12, 22–25, 27
- Elliott C (2010): The effects of silver dressings on chronic and burns wound healing. *Br J Nurs Mark Allen Publ* 19, S32-36
- Escarilla AM (1966): Fluorometric titration of calcium, magnesium and iron using calcein blue as indicator. *Talanta* 13, 363–370

- Feng QL, Wu J, Chen GQ, Cui FZ, Kim TN, Kim JO (2000): A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J Biomed Mater Res* 52, 662–668
- Filoche SK, Coleman MJ, Angker L, Sissons CH (2007): A fluorescence assay to determine the viable biomass of microcosm dental plaque biofilms. *J Microbiol Methods* 69, 489–496
- Fischer ER, Hansen BT, Nair V, Hoyt FH, Dorward DW (2012): Scanning electron microscopy. *Curr Protoc Microbiol* Chapter 2, Unit 2B.2.
- Flemming H-C, Wingender J (2010): The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* 8, 623–633
- Flemming H-C, Neu TR, Wozniak DJ (2007): The EPS Matrix: The “House of Biofilm Cells”. *J Bacteriol* 189, 7945–7947
- Forsberg CM, Brattström V, Malmberg E, Nord CE (1991): Ligature wires and elastomeric rings: two methods of ligation, and their association with microbial colonization of *Streptococcus mutans* and *Lactobacilli*. *Eur J Orthod* 13, 416–420
- Fritsche W: *Mikrobiologie*. 3. Auflage; Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2001
- Frostell G (1969): Dental plaque pH in relation to intake of carbohydrate products. *Acta Odontol Scand* 27, 3–29
- Fu PP, Xia Q, Hwang H-M, Ray PC, Yu H (2014): Mechanisms of nanotoxicity: generation of reactive oxygen species. *J Food Drug Anal* 22, 64–75
- Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP (1994): Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol* 176, 269–275
- Garcez AS, Núñez SC, Azambuja N, Fregnani ER, Rodriguez HMH, Hamblin MR, Suzuki H, Ribeiro MS (2013): Effects of Photodynamic Therapy on Gram-Positive and Gram-Negative Bacterial Biofilms by Bioluminescence Imaging and Scanning Electron Microscopic Analysis. *Photomed Laser Surg* 31, 519–525
- Gates FL (1923): The cultivation of anaerobic treponemata on the surface of blood agar plates. *J Exp Med* 37, 311–317
- Geiger AM, Gorelick L, Gwinnett AJ, Griswold PG (1988): The effect of a fluoride program on white spot formation during orthodontic treatment. *Am J Orthod Dentofac Orthop* 93, 29–37
- Geiger AM, Gorelick L, Gwinnett AJ, Benson BJ (1992): Reducing white spot lesions in orthodontic populations with fluoride rinsing. *Am J Orthod Dentofac Orthop* 101, 403–407
- Giao NT, Limpiyakorn T, Kunapongkiti P, Thuptimdang P, Siripattanakul-Ratpukdi S (2017): Influence of silver nanoparticles and liberated silver ions on nitrifying sludge: ammonia oxidation inhibitory kinetics and mechanism. *Environ Sci Pollut Res Int* 24, 9229–9240
- Gibbins HL, Yakubov GE, Proctor GB, Wilson S, Carpenter GH (2014): What interactions drive the

salivary mucosal pellicle formation? *Colloids Surf B Biointerfaces* 120, 184–192

Gibbons RJ, Nygaard M (1970): Interbacterial aggregation of plaque bacteria. *Arch Oral Biol* 15, 1397-IN39

Gibbons RJ, Houte JV (1975): Bacterial adherence in oral microbial ecology. *Annu Rev Microbiol* 29, 19–44

Goldberg MW, Fišerová J (2016): Immunogold Labeling for Scanning Electron Microscopy. *Methods Mol Biol* 1474, 309–325

Gosau M, Haupt M, Thude S, Strowitzki M, Schminke B, Buegers R (2015): Antimicrobial effect and biocompatibility of novel metallic nanocrystalline implant coatings. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 104, 1571-1579

Gottenbos B, Busscher HJ, van Der Mei HC, Nieuwenhuis P (2002): Pathogenesis and prevention of biomaterial centered infections. *J Mater Sci Mater Med* 13, 717–722

Greulich C, Diendorf J, Simon T, Eggeler G, Epple M, Köller M (2011): Uptake and intracellular distribution of silver nanoparticles in human mesenchymal stem cells. *Acta Biomater* 7, 347–354

Gripp VC, Schlagenhauf U (2002): Prevention of early mutans streptococci transmission in infants by professional tooth cleaning and chlorhexidine varnish treatment of the mother. *Caries Res* 36, 366–372

Gross CJ (1923): The New Bismuth Therapy of Syphilis. *Can Med Assoc J* 13, 265–268

Grossgebauer K, Kegel M, Dann O (1976): Neues fluoreszenzoptisches Verfahren in der medizinisch-diagnostischen Mikrobiologie. *Dtsch Med Wochenschr* 1946 101, 1098–1099

Grössner-Schreiber B, Griepentrog M, Haustein I, Müller WD, Lange KP, Briedigkeit H, Göbel UB (2001): Plaque formation on surface modified dental implants. An in vitro study. *Clin Oral Implants Res* 12, 543–551

Guimarães GS, de Moraes LS, de Souza MMG, Elias CN (2013): Superficial morphology and mechanical properties of in vivo aged orthodontic ligatures. *Dent Press J Orthod* 18, 107–112

Gwinnett AJ, Ceen RF (1979): Plaque distribution on bonded brackets: A scanning microscope study. *Am J Orthod* 75, 667–677

Hacking SA, Zuraw M, Harvey EJ, Tanzer M, Krygier JJ, Bobyn JD (2007): A physical vapor deposition method for controlled evaluation of biological response to biomaterial chemistry and topography. *J Biomed Mater Res A* 82, 179–187

Hadler-Olsen S, Sandvik K, El-Agroudi MA, Øgaard B (2012): The incidence of caries and white spot lesions in orthodontically treated adolescents with a comprehensive caries prophylactic regimen—a prospective study. *Eur J Orthod* 34, 633–639

- Hamada S, Slade HD (1980): Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Rev* 44, 331–384
- Hannig C, Hannig M (2009): The oral cavity—a key system to understand substratum-dependent bioadhesion on solid surfaces in man. *Clin Oral Investig* 13, 123–139
- Hannig C, Hannig M, Attin T (2005a): Enzymes in the acquired enamel pellicle. *Eur J Oral Sci* 113, 2–13
- Hannig C, Hoch J, Becker K, Hannig M, Attin T (2005b): Lysozyme activity in the initially formed in situ pellicle. *Arch Oral Biol* 50, 821–828
- Hannig C, Hannig M, Rehmer O, Braun G, Hellwig E, Al-Ahmad A (2007): Fluorescence microscopic visualization and quantification of initial bacterial colonization on enamel in situ. *Arch Oral Biol* 52, 1048–1056
- Hannig C, Ruggeri A, Al-Khayer B, Schmitz P, Spitzmüller B, Deimling D, Huber K, Hoth-Hannig W, Bowen WH, Hannig M (2008): Electron microscopic detection and activity of glucosyltransferase B, C, and D in the in situ formed pellicle. *Arch Oral Biol* 53, 1003–1010
- Hannig C, Spitzmüller B, Hannig M (2009): Transaminases in the acquired pellicle. *Arch Oral Biol* 54, 445–448
- Hannig C, Follo M, Hellwig E, Al-Ahmad A (2010): Visualization of adherent micro-organisms using different techniques. *J Med Microbiol* 59, 1–7
- Hannig M (1999a): Transmission electron microscopy of early plaque formation on dental materials in vivo. *Eur J Oral Sci* 107, 55–64
- Hannig M (1999b): Ultrastructural investigation of pellicle morphogenesis at two different intraoral sites during a 24-h period. *Clin Oral Investig* 3, 88–95
- Hannig M, Joiner A (2006): The structure, function and properties of the acquired pellicle. *Monogr Oral Sci* 19, 29–64
- Hannig M, Hannig C (2014): The pellicle and erosion. *Monogr Oral Sci* 25, 206–214
- Hannig M, Fiebiger M, Güntzer M, Döbert A, Zimehl R, Nekrashevych Y (2004): Protective effect of the in situ formed short-term salivary pellicle. *Arch Oral Biol* 49, 903–910
- Harvey WJ, Powell KR (1981): Care of dental enamel for the orthodontic patient. *Aust Orthod J* 7, 70–76
- Håvarstein LS, Coomaraswamy G, Morrison DA (1995): An unmodified heptadecapeptide pheromone induces competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 11140–11144

- Hay DI (1973): The interaction of human parotid salivary proteins with hydroxyapatite. *Arch Oral Biol* 18, IN5-IN6
- Heller D, Helmerhorst EJ, Gower AC, Siqueira WL, Paster BJ, Oppenheim FG (2016): Microbial Diversity in the Early In Vivo-Formed Dental Biofilm. *Appl Environ Microbiol* 82, 1881–1888
- Heløe LA, Haugejorden O (1981): “The rise and fall” of dental caries: some global aspects of dental caries epidemiology. *Community Dent Oral Epidemiol* 9, 294–299
- Hernandez-Delgadillo R, Velasco-Arias D, Diaz D, Arevalo-Niño K, Garza-Enriquez M, De la Garza-Ramos MA, Cabral-Romero C (2012): Zerovalent bismuth nanoparticles inhibit *Streptococcus mutans* growth and formation of biofilm. *Int J Nanomedicine* 7, 2109–2113
- Hernandez-Delgadillo R, Velasco-Arias D, Martinez-Sanmiguel JJ, Diaz D, Zumeta-Dube I, Arevalo-Niño K, Cabral-Romero C (2013): Bismuth oxide aqueous colloidal nanoparticles inhibit *Candida albicans* growth and biofilm formation. *Int J Nanomedicine* 8, 1645–1652
- Heyden G (1970): Chlorhexidine. A new aid in preventive dentistry? *Tidn Sver Tandläkarförbund* 62, 20–23
- Højby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O (2010): Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents* 35, 322–332
- Holmen L, Mejare I, Malmgren B, Thylstrup A (1988): The effect of regular professional plaque removal on dental caries in vivo. A polarized light and scanning electron microscope study. *Caries Res* 22, 250–256
- Hotta M, Nakajima H, Yamamoto K, Aono M (1998): Antibacterial temporary filling materials: the effect of adding various ratios of Ag-Zn-Zeolite. *J Oral Rehabil* 25, 485–489
- Huber SJ, Vernino AR, Nanda RS (1987): Professional prophylaxis and its effect on the periodontium of full-banded orthodontic patients. *Am J Orthod Dentofac Orthop* 91, 321–327
- Hübner KH: Anorganische nichtmetallische Werkstoffe. In: Bargel HJ, Schulze G (Hrsg.): *Werkstoffkunde*. 11. Auflage; Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 2012, 357-395
- Iannetti EF, Smeitink JAM, Beyrath J, Willems PHGM, Koopman WJH (2016): Multiplexed high-content analysis of mitochondrial morphofunction using live-cell microscopy. *Nat Protoc* 11, 1693–1710
- Jafer M, Patil S, Hosmani J, Bhandi SH, Chalisserry EP, Anil S (2016): Chemical Plaque Control Strategies in the Prevention of Biofilm-associated Oral Diseases. *J Contemp Dent Pract* 17, 337–343
- Jakubovics NS, Kolenbrander PE (2010): The road to ruin: the formation of disease-associated oral biofilms. *Oral Dis* 16, 729–739

- Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Philippon A (1988): Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis* 10, 867–878
- Jensen JL, Lamkin MS, Oppenheim FG (1992): Adsorption of Human Salivary Proteins to Hydroxyapatite: A Comparison Between Whole Saliva and Glandular Salivary Secretions. *J Dent Res* 71, 1569–1576
- Jensen ME, Polansky PJ, Schachtele CF (1982): Plaque sampling and telemetry for monitoring acid production on human buccal tooth surfaces. *Arch Oral Biol* 27, 21–31
- Jiang H, Liu XF, Zou ZY, Tang RH, Liu W, Yu RH (2013): Effect of high magnetic field on structure and oxygen adsorption of CuO films. *J Nanosci Nanotechnol* 13, 1087–1090
- Jordan C, LeBlanc DJ (2002): Influences of orthodontic appliances on oral populations of mutans streptococci. *Oral Microbiol Immunol* 17, 65–71
- Joux F, Lebaron P (2000): Use of fluorescent probes to assess physiological functions of bacteria at single-cell level. *Microbes Infect* 2, 1523–1535
- Junillon T, Morand L, Flandrois JP (2014): Enhanced tetrazolium violet reduction of *Salmonella* spp. by magnesium addition to the culture media. *Food Microbiol* 42, 132–135
- Kaplan HB, Greenberg EP (1985): Diffusion of autoinducer is involved in regulation of the *Vibrio fischeri* luminescence system. *J Bacteriol* 163, 1210–1214
- Kaplan JB (2010): Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. *J Dent Res* 89, 205–218
- Kappert HF, Eichner K: Zahnärztliche Werkstoffe und ihre Verarbeitung. 1. Grundlagen und Verarbeitung. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2005
- Karatan E, Watnick P (2009): Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiol Mol Biol Rev* 73, 310–347
- Kawabata N, Ueno Y, Torii K, Matsumoto T (1987): Capturing interaction between insoluble pyridinium-type polymer and bacterial cells. *Agric Biol Chem* 51, 1085–1090
- Kawai K, Urano M (2001): Adherence of plaque components to different restorative materials. *Oper Dent* 26, 396–400
- Khoo G, Zhan L, Hoover C, Featherstone JDB (2005): Cariogenic virulence characteristics of mutans streptococci isolated from caries-active and caries-free adults. *J Calif Dent Assoc* 33, 973–980
- Kim H-Y (2014): Analysis of variance (ANOVA) comparing means of more than two groups. *Restor Dent Endod* 39, 74–77

- Kim Y-J, Lee D-Y, Lee J-Y, Lim Y-K (2012): The effect of silver ion-releasing elastomers on mutans streptococci in dental plaque. *Korean J Orthod* 42, 87–93
- Kinnari TJ, Esteban J, Martin-de-Hijas NZ, Sánchez-Muñoz O, Sánchez-Salcedo S, Colilla M, Vallet-Regí M, Gomez-Barrena E (2009): Influence of surface porosity and pH on bacterial adherence to hydroxyapatite and biphasic calcium phosphate bioceramics. *J Med Microbiol* 58, 132–137
- Klainer AS, Betsch CJ (1970): Scanning-Beam Electron Microscopy of Selected Microorganisms. *J Infect Dis* 121, 339–343
- Klein M (1947): A Mechanism for the Development of Resistance to Streptomycin and Penicillin 1. *J Bacteriol* 53, 463–467
- Klungland A, Yang YG (2016): Endogenous DNA Damage and Repair Enzymes: —A short summary of the scientific achievements of Tomas Lindahl, Nobel Laureate in Chemistry 2015. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 14, 122–125
- Kocher T, Langenbeck N, Rosin M, Bernhardt O (2002): Methodology of three-dimensional determination of root surface roughness. *J Periodontal Res* 37, 125–131
- Kolenbrander PE (1989): Surface Recognition among Oral Bacteria: Multigeneric Coaggregations and their Mediators. *Crit Rev Microbiol* 17, 137–159
- Kolenbrander PE, London J (1993): Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. *J Bacteriol* 175, 3247–3252
- Kolenbrander PE, Ganeshkumar N, Cassels FJ, Hughes CV (1993): Coaggregation: specific adherence among human oral plaque bacteria. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 7, 406–413
- Kolenbrander PE, Andersen RN, Blehert DS, Eglund PG, Foster JS, Palmer RJ (2002): Communication among oral bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR* 66, 486–505
- Kolenbrander PE, Palmer RJ, Rickard AH, Jakubovics NS, Chalmers NI, Diaz PI (2006): Bacterial interactions and successions during plaque development. *Periodontol 2000* 42, 47–79
- Kolenbrander PE, Palmer RJ, Periasamy S, Jakubovics NS (2010): Oral multispecies biofilm development and the key role of cell–cell distance. *Nat Rev Microbiol* 8, 471–480
- Konturek SJ, Stachura J, Radecki T, Drozdowicz D, Brzozowski T (1987a): Cytoprotective and ulcer healing properties of prostaglandin E2, colloidal bismuth and sucralfate in rats. *Digestion* 38, 103–113
- Konturek SJ, Bilski J, Kwiecien N, Obtulowicz W, Kopp B, Oleksy J (1987b): De-Nol stimulates gastric and duodenal alkaline secretion through prostaglandin dependent mechanism. *Gut* 28, 1557–1563

- Koo H, Xiao J, Klein MI, Jeon JG (2010): Exopolysaccharides Produced by *Streptococcus mutans* Glucosyltransferases Modulate the Establishment of Microcolonies within Multispecies Biofilms. *J Bacteriol* 192, 3024–3032
- Koopal LK (2012): Wetting of solid surfaces: fundamentals and charge effects. *Adv Colloid Interface Sci* 179–182, 29–42
- Kossack C, Jost-Brinkmann PG (2005): Plaque- und Gingivitisreduktion bei Multibracketpatienten – Zahnbürsten und Interdentalreinigungshilfen im Vergleich. *J Orofac Orthop* 66, 20–38
- Krzyściak W, Jurczak A, Kościelniak D, Bystrowska B, Skalniak A (2014): The virulence of *Streptococcus mutans* and the ability to form biofilms. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 33, 499–515
- Lamkin MS, Arancillo AA, Oppenheim FG (1996): Temporal and compositional characteristics of salivary protein adsorption to hydroxyapatite. *J Dent Res* 75, 803–808
- Lantz B (2013): The impact of sample non-normality on ANOVA and alternative methods. *Br J Math Stat Psychol* 66, 224–244
- Larsen T, Fiehn NE (1996): Resistance of *Streptococcus sanguis* biofilms to antimicrobial agents. *APMIS Acta Pathol Microbiol Immunol Scand* 104, 280–284
- Leander D, Kumar JK (2011): Comparative evaluation of frictional characteristics of coated low friction ligatures - Super Slick Ties™ with conventional uncoated ligatures. *Indian J Dent Res* 22, 90
- Lee SF, Li YH, Bowden GH (1996): Detachment of *Streptococcus mutans* biofilm cells by an endogenous enzymatic activity. *Infect Immun* 64, 1035–1038
- Lee YH, Zimmerman JN, Custodio W, Xiao Y, Basiri T, Hatibovic-Kofman S, Siqueira WL (2013): Proteomic evaluation of acquired enamel pellicle during in vivo formation. *PloS One* 8, e67919
- Legéňová K, Bujdaková H (2015): [The role of *Streptococcus mutans* in the oral biofilm]. *Epidemiol Mikrobiol Imunol Cas Spolecnosti Epidemiol Mikrobiol České Lékařské Spolecnosti JE Purkyne* 64, 179–187
- Leid JG, Ditto AJ, Knapp A, Shah PN, Wright BD, Blust R, Christensen L, Clemons CB, Wilber JP, Young GW, et al. (2012): In vitro antimicrobial studies of silver carbene complexes: activity of free and nanoparticle carbene formulations against clinical isolates of pathogenic bacteria. *J Antimicrob Chemother* 67, 138–148
- Lendenmann U, Grogan J, Oppenheim FG (2000): Saliva and dental pellicle--a review. *Adv Dent Res* 14, 22–28
- Lepecq JB, Paoletti C (1967): A fluorescent complex between ethidium bromide and nucleic acids. *J Mol Biol* 27, 87–106

- Li J, Helmerhorst EJ, Leone CW, Troxler RF, Yaskell T, Haffajee AD, Socransky SS, Oppenheim FG (2004a): Identification of early microbial colonizers in human dental biofilm. *J Appl Microbiol* 97, 1311–1318
- Li J, Helmerhorst EJ, Troxler RF, Oppenheim FG (2004b): Identification of in vivo pellicle constituents by analysis of serum immune responses. *J Dent Res* 83, 60–64
- Li X, Kolltveit KM, Tronstad L, Olsen I (2000): Systemic diseases caused by oral infection. *Clin Microbiol Rev* 13, 547–558
- Li X-Z, Plésiat P, Nikaido H (2015): The Challenge of Efflux-Mediated Antibiotic Resistance in Gram-Negative Bacteria. *Clin Microbiol Rev* 28, 337–418
- Li Y-H, Tian X (2012): Quorum Sensing and Bacterial Social Interactions in Biofilms. *Sensors* 12, 2519–2538
- Lindahl T, Nyberg B (1972): Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid. *Biochemistry (Mosc)* 11, 3610–3618
- Lindh L (2002): On the adsorption behaviour of saliva and purified salivary proteins at solid/liquid interfaces. *Swed Dent J Suppl* 2002, 1–57
- Lischewski A, Amann RI, Harmsen D, Merkert H, Hacker J, Morschhäuser J (1996): Specific detection of *Candida albicans* and *Candida tropicalis* by fluorescent in situ hybridization with an 18S rRNA-targeted oligonucleotide probe. *Microbiol Read Engl* 142 ( Pt 10), 2731–2740
- Listgarten MA (1994): The structure of dental plaque. *Periodontol 2000* 5, 52–65
- Listgarten MA, Mayo HE, Tremblay R (1975): Development of dental plaque on epoxy resin crowns in man. A light and electron microscopic study. *J Periodontol* 46, 10–26
- Liz R, Simard JC, Leonardi LBA, Girard D (2015): Silver nanoparticles rapidly induce atypical human neutrophil cell death by a process involving inflammatory caspases and reactive oxygen species and induce neutrophil extracellular traps release upon cell adhesion. *Int Immunopharmacol* 28, 616–625
- Löe H, Schiott CR (1970): The effect of mouthrinses and topical application of chlorhexidine on the development of dental plaque and gingivitis in man. *J Periodontal Res* 5, 79–83
- Loesche WJ (1986): Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev* 50, 353–380
- Loimaranta V, Tenovuo J, Koivisto L, Karp M (1998): Generation of Bioluminescent *Streptococcus mutans* and Its Usage in Rapid Analysis of the Efficacy of Antimicrobial Compounds. *Antimicrob Agents Chemother* 42, 1906–1910
- Lok CN, Ho CM, Chen R, He QY, Yu WY, Sun H, Tam PKH, Chiu JF, Che CM (2006): Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles. *J Proteome Res* 5, 916–924

- Loussert C, Forestier CL, Humbel BM (2012): Correlative light and electron microscopy in parasite research. *Methods Cell Biol* 111, 59–73
- Lovrov S, Hertrich K, Hirschfelder U (2007): Schmelzdemineralisation während festsitzender kieferorthopädischer Behandlung – Inzidenz und Zusammenhang mit verschiedenen Parametern der Mundhygiene. *J Orofac Orthop* 68, 353–363
- Ludwicka A, Switalski LM, Lundin A, Pulverer G, Wadström T (1985): Bioluminescent assay for measurement of bacterial attachment to polyethylene. *J Microbiol Methods* 4, 169–177
- Mabboux F, Ponsonnet L, Morrier J-J, Jaffrezic N, Barsotti O (2004): Surface free energy and bacterial retention to saliva-coated dental implant materials--an in vitro study. *Colloids Surf B Biointerfaces* 39, 199–205
- Madigan MT, Martinko JM, Parker J: BROCK - Mikrobiologie: Herausgegeben von Werner Goebel. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2000
- Madsen JS, Burmølle M, Hansen LH, Sørensen SJ (2012): The interconnection between biofilm formation and horizontal gene transfer. *FEMS Immunol Med Microbiol* 65, 183–195
- Magno AFF, Enoki C, Ito IY, Matsumoto MAN, Faria G, Nelson-Filho P (2008): In-vivo evaluation of the contamination of Super Slick elastomeric rings by *Streptococcus mutans* in orthodontic patients. *Am J Orthod Dentofac Orthop* 133, S104-109
- Mandel ID (1988): Chemotherapeutic agents for controlling plaque and gingivitis. *J Clin Periodontol* 15, 488–498
- Maret D, Marchal-Sixou C, Vergines JN, Hamel O, Georgelin-Gurgel M, Van Der Sluis L, Sixou M (2014): Effect of fixed orthodontic appliances on salivary microbial parameters at 6 months: a controlled observational study. *J Appl Oral Sci* 22, 38–43
- Marques SM, Esteves da Silva JCG (2009): Firefly bioluminescence: a mechanistic approach of luciferase catalyzed reactions. *IUBMB Life* 61, 6–17
- Marsh P, Martin MV, Callaway AS (Hrsg.): *Orale Mikrobiologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2003
- Marsh PD (2004): Dental plaque as a microbial biofilm. *Caries Res* 38, 204–211
- Marsh PD (2010): Microbiology of dental plaque biofilms and their role in oral health and caries. *Dent Clin North Am* 54, 441–454
- Marsh PD, Bradshaw DJ (1995): Dental plaque as a biofilm. *J Ind Microbiol* 15, 169–175
- Marsh PD, Moter A, Devine DA (2011): Dental plaque biofilms: communities, conflict and control: Plaque biofilms and communities. *Periodontol 2000* 55, 16–35

- Martínez-Colomer S, Gatón-Hernández P, Romano FL, De Rossi A, Fukada SY, Nelson-Filho P, Consolaro A, Silva RAB, Silva LAB (2016): Latex and nonlatex orthodontic elastics: In vitro and in vivo evaluations of tissue compatibility and surface structure. *Angle Orthod* 86, 278–284
- Mattingly JA, Sauer GJ, Yancey JM, Arnold RR (1983): Enhancement of *Streptococcus mutans* colonization by direct bonded orthodontic appliances. *J Dent Res* 62, 1209–1211
- Mattos CT, Baratieri C, Freitas AOA, Alviano DS, Souza M (2015): Microbial Colonization of Conventional and Enhanced Elastomeric Chains in Orthodontic Patients. *Austin J Dent* 2, 1017
- Mayhall CW, Butler WT (1976): The carbohydrate composition of experimental salivary pellicles. *J Oral Pathol* 5, 358–370
- McConoughey SJ, Howlin R, Granger JF, Manring MM, Calhoun JH, Shirtliff M, Kathju S, Stoodley P (2014): Biofilms in periprosthetic orthopedic infections. *Future Microbiol* 9, 987–1007
- McEldowney S, Fletcher M (1986): Variability of the influence of physicochemical factors affecting bacterial adhesion to polystyrene substrata. *Appl Environ Microbiol* 52, 460–465
- McElroy WD (1947): The Energy Source for Bioluminescence in an Isolated System. *Proc Natl Acad Sci U S A* 33, 342–345
- McElroy WD, Ballentine R (1944): The Mechanics of Bioluminescence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 30, 377–382
- McElroy WD, Farghaly AH (1947): Biochemical mutations affecting the growth and light production in luminous bacteria. *Anat Rec* 99, 635
- Mei L, Busscher HJ, van der Mei HC, Ren Y (2011): Influence of surface roughness on streptococcal adhesion forces to composite resins. *Dent Mater* 27, 770–778
- Messelhäuser U: Kultivierungsverfahren für Bakterien. In: Busch U (Hrsg.): *Molekularbiologische Methoden in der Lebensmittelanalytik*. Springer, Berlin Heidelberg 2010, 5-18
- Meurman JH (1988): Ultrastructure, growth, and adherence of *Streptococcus mutans* after treatment with chlorhexidine and fluoride. *Caries Res* 22, 283–287
- Meurman JH, Frank RM (1991): Scanning electron microscopic study of the effect of salivary pellicle on enamel erosion. *Caries Res* 25, 1–6
- Mhaske AR, Shetty PC, Bhat NS, Ramachandra CS, Laxmikanth SM, Nagarhalli K, Tekale PD (2015): Antiadherent and antibacterial properties of stainless steel and NiTi orthodontic wires coated with silver against *Lactobacillus acidophilus*--an in vitro study. *Prog Orthod* 16, 40
- Miller MB, Bassler BL (2001): Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol* 55, 165–199
- Miller T, Delaney J (1949): Oral bismuth therapy in dermatology. *Arch Dermatol Syphilol* 60, 196–205

Miller WD: The micro-organisms of the human mouth: The local and general diseases which are caused by them. Philadelphia, the S. S. White Dental MFG. Co. 1890

Monroe D (2007): Looking for Chinks in the Armor of Bacterial Biofilms. *PLoS Biol* 5, e307

Moolya NN, Shetty A, Gupta N, Gupta A, Jalan V, Sharma R (2014): Orthodontic bracket designs and their impact on microbial profile and periodontal disease: A clinical trial. *J Orthod Sci* 3, 125–131

Morgan TD, Wilson M (2001): The effects of surface roughness and type of denture acrylic on biofilm formation by *Streptococcus oralis* in a constant depth film fermentor. *J Appl Microbiol* 91, 47–53

Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, Holt K, Kouri JB, Ramírez JT, Yacaman MJ (2005): The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology* 16, 2346–2353

Müller R, Gröger G, Hiller KA, Schmalz G, Ruhl S (2007): Fluorescence-Based Bacterial Overlay Method for Simultaneous In Situ Quantification of Surface-Attached Bacteria. *Appl Environ Microbiol* 73, 2653–2660

Mustafa K, Wennerberg A, Wroblewski J, Hultenby K, Lopez BS, Arvidson K (2001): Determining optimal surface roughness of TiO<sub>2</sub> blasted titanium implant material for attachment, proliferation and differentiation of cells derived from human mandibular alveolar bone. *Clin Oral Implants Res* 12, 515–525

Neumeister B, Geiss HK, Braun R, Kimmig P: *Mikrobiologische Diagnostik Bakteriologie - Mykologie - Virologie - Parasitologie*. 2. Auflage; Thieme, Stuttgart 2009

Nilson B, Olaison L, Rasmussen M (2016): Clinical presentation of infective endocarditis caused by different groups of non-beta haemolytic streptococci. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 35, 215–218

Nobbs AH, Lamont RJ, Jenkinson HF (2009): *Streptococcus* adherence and colonization. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR* 73, 407–450

Nobbs AH, Jenkinson HF, Jakubovics NS (2011): Stick to your gums: mechanisms of oral microbial adherence. *J Dent Res* 90, 1271–1278

Norde W (1986): Adsorption of proteins from solution at the solid-liquid interface. *Adv Colloid Interface Sci* 25, 267–340

Novick RP, Muir TW (1999): Virulence gene regulation by peptides in staphylococci and other Gram-positive bacteria. *Curr Opin Microbiol* 2, 40–45

Nyvad B, Kilian M (1987): Microbiology of the early colonization of human enamel and root surfaces in vivo. *Scand J Dent Res* 95, 369–380

Nyvad B, Fejerskov O (1987): Transmission electron microscopy of early microbial colonization of human enamel and root surfaces in vivo. *Scand J Dent Res* 95, 297–307

- Nyvad B, Kilian M (1990): Comparison of the initial streptococcal microflora on dental enamel in caries-active and in caries-inactive individuals. *Caries Res* 24, 267–272
- Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J (2005): Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect* 113, 823–839
- Ogaard B, Rølla G, Arends J (1988): Orthodontic appliances and enamel demineralization. Part 1. Lesion development. *Am J Orthod Dentofac Orthop* 94, 68–73
- Ölschläger V: Molekularbiologische und enzymatische Untersuchungen zum Einfluss von Partikelgröße und Konzentration auf Parameter der fibrolytischen Pansenverdauung. Cuvillier Verlag, Göttingen 2007
- O'Reilly MM, Featherstone JD (1987): Demineralization and remineralization around orthodontic appliances: an in vivo study. *Am J Orthod Dentofac Orthop Off Publ Am Assoc Orthod Its Const Soc Am Board Orthod* 92, 33–40
- Owens DK, Wendt RC (1969): Estimation of the surface free energy of polymers. *J Appl Polym Sci* 13, 1741–1747
- Pal S, Tak YK, Song JM (2007): Does the Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Depend on the Shape of the Nanoparticle? A Study of the Gram-Negative Bacterium *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 73, 1712–1720
- Palara A, Sagona AP, Nezis IP (2016): Preparation of *Drosophila* Follicles for Transmission Electron Microscopy. *Methods Mol Biol Clifton NJ* 1457, 105–110
- Palmer, Jr. RJ, Gordon SM, Cisar JO, Kolenbrander PE (2003): Coaggregation-Mediated Interactions of Streptococci and Actinomyces Detected in Initial Human Dental Plaque. *J Bacteriol* 185, 3400–3409
- Parahitiyawa N, Scully C, Leung W, Yam W, Jin L, Samaranyake L (2010): Exploring the oral bacterial flora: current status and future directions. *Oral Dis* 16, 136–145
- Parashar A, Parashar S, Zingade A, Gupta S, Sanikop S (2015): Interspecies communication in oral biofilm: An ocean of information. *Oral Sci Int* 12, 37–42
- Passador L, Cook JM, Gambello MJ, Rust L, Iglewski BH (1993): Expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes requires cell-to-cell communication. *Science* 260, 1127–1130
- Popa AC, Stan GE, Husanu MA, Pasuk I, Popescu ID, Popescu AC, Mihailescu IN (2013): Multi-layer haemocompatible diamond-like carbon coatings obtained by combined radio frequency plasma enhanced chemical vapor deposition and magnetron sputtering. *J Mater Sci Mater Med* 24, 2695–2707
- Pratten J, Smith AW, Wilson M (1998): Response of single species biofilms and microcosm dental plaques to pulsing with chlorhexidine. *J Antimicrob Chemother* 42, 453–459

- Quinteros MA, Cano Aristizábal V, Dalmasso PR, Paraje MG, Páez PL (2016): Oxidative stress generation of silver nanoparticles in three bacterial genera and its relationship with the antimicrobial activity. *Toxicol In Vitro* 36, 216–223
- Quirynen M, Bollen CM (1995): The influence of surface roughness and surface-free energy on supra- and subgingival plaque formation in man. A review of the literature. *J Clin Periodontol* 22, 1–14
- Quirynen M, Marechal M, Busscher HJ, Weerkamp AH, Darius PL, van Steenberghe D (1990): The influence of surface free energy and surface roughness on early plaque formation. An in vivo study in man. *J Clin Periodontol* 17, 138–144
- Quirynen M, Mei HCVD, Bollen CML, Schotte A, Marechal M, Doornbusch GI, Naert I, Busscher HJ, Steenberghe DV (1993): An in vivo Study of the Influence of the Surface Roughness of Implants on the Microbiology of Supra- and Subgingival Plaque. *J Dent Res* 72, 1304–1309
- Radford DR, Watson TF, Walter JD, Challacombe SJ (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. *J Prosthet Dent* 78, 200–208
- Rai M, Yadav A, Gade A (2009): Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnol Adv* 27, 76–83
- Rashid H (2014): The effect of surface roughness on ceramics used in dentistry: A review of literature. *Eur J Dent* 8, 571–579
- Razali NM, Wah YB (2011): Power comparisons of Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov, Lilliefors and Anderson-Darling tests. *JOSMA* 2, 21–33
- Renye JA, Piggot PJ, Daneo-Moore L, Buttaro BA (2004): Persistence of *Streptococcus mutans* in stationary-phase batch cultures and biofilms. *Appl Environ Microbiol* 70, 6181–6187
- Richter AE, Arruda AO, Peters MC, Sohn W (2011): Incidence of caries lesions among patients treated with comprehensive orthodontics. *Am J Orthod Dentofac Orthop* 139, 657–664
- Rochon J, Gondan M, Kieser M (2012): To test or not to test: Preliminary assessment of normality when comparing two independent samples. *BMC Med Res Methodol* 12, 81
- Roda A, Guardigli M (2012): Analytical chemiluminescence and bioluminescence: latest achievements and new horizons. *Anal Bioanal Chem* 402, 69–76
- Rogers JD, Haase EM, Brown AE, Douglas CW, Gwynn JP, Scannapieco FA (1998): Identification and analysis of a gene (*abpA*) encoding a major amylase-binding protein in *Streptococcus gordonii*. *Microbiol Read Engl* 144 ( Pt 5), 1223–1233
- Rölla G, Melsen B (1975): On the mechanism of the plaque inhibition by chlorhexidine. *J Dent Res* 54, 57-62
- Rosan B, Lamont RJ (2000): Dental plaque formation. *Microbes Infect Inst Pasteur* 2, 1599–1607

- Rosenbloom RG, Tinanoff N (1991): Salivary *Streptococcus mutans* levels in patients before, during, and after orthodontic treatment. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 100, 35–37
- Rozairo DP, Croll AB (2015): Using the sessile drop geometry to measure fluid and elastic block copolymer interfaces. *Langmuir ACS J Surf Colloids* 31, 1303–1311
- Rutherford ST, Bassler BL (2012): Bacterial Quorum Sensing: Its Role in Virulence and Possibilities for Its Control. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2, a012427
- Rykke M, Sönju T, Rölla G (1990): Interindividual and longitudinal studies of amino acid composition of pellicle collected in vivo. *Scand J Dent Res* 98, 129–134
- Said R, Ahmed W, Gracio J (2010): Closed field unbalanced magnetron sputtering ion plating of Ni/Al thin films: influence of the magnetron power. *J Nanosci Nanotechnol* 10, 2558–2563
- Sainan Z, Li J, Lei Z, Liying H, Lu Y, Wei L (2016): [Influence of surface roughness on oral streptococcal adhesion forces to dental filling materials]. *West China J Stomatol* 34, 448–453
- Salvador JAR, Figueiredo SAC, Pinto RMA, Silvestre SM (2012): Bismuth compounds in medicinal chemistry. *Future Med Chem* 4, 1495–1523
- Samson RA, Stalpers JA, Verkerke W (1979): A simplified technique to prepare fungal specimens for scanning electron microscopy. *Cytobios* 24, 7–11
- Sánchez M-C, Llama-Palacios A, Marín M-J, Figuero E, León R, Blanc V, Herrera D, Sanz M (2013): Validation of ATP bioluminescence as a tool to assess antimicrobial effects of mouthrinses in an in vitro subgingival-biofilm model. *Med Oral Patol Oral Cirugia Bucal* 18, 86-92
- Saxer UP, Barbakow J, Yankell SL (1998): New studies on estimated and actual toothbrushing times and dentifrice use. *J Clin Dent* 2, 49–51
- Sayas E, García-López F, Serrano R (2015): Toxicity, mutagenicity and transport in *Saccharomyces cerevisiae* of three popular DNA intercalating fluorescent dyes. *Yeast* 32, 595–606
- Scannapieco FA, Bergey EJ, Reddy MS, Levine MJ (1989): Characterization of salivary alpha-amylase binding to *Streptococcus sanguis*. *Infect Immun* 57, 2853–2863
- Scannapieco FA, Torres G, Levine MJ (1993): Salivary alpha-amylase: role in dental plaque and caries formation. *Crit Rev Oral Biol Med Off Publ Am Assoc Oral Biol* 4, 301–307
- Scheie AA (1994): Mechanisms of dental plaque formation. *Adv Dent Res* 8, 246–253
- Schierholz JM, Lucas LJ, Rump A, Pulverer G (1998): Efficacy of silver-coated medical devices. *J Hosp Infect* 40, 257–262

- Schilling KM, Bowen WH (1992): Glucans synthesized in situ in experimental salivary pellicle function as specific binding sites for *Streptococcus mutans*. *Infect Immun* 60, 284–295
- Schnedl W, Mikelsaar AV, Breitenbach M, Dann O (1977): DIPI and DAPI: fluorescence banding with only negligible fading. *Hum Genet* 36, 167–172
- Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB (2007): Dental caries. *Lancet* 369, 51–59
- Sharma HS, Ali SF, Hussain SM, Schlager JJ, Sharma A (2009): Influence of engineered nanoparticles from metals on the blood-brain barrier permeability, cerebral blood flow, brain edema and neurotoxicity. An experimental study in the rat and mice using biochemical and morphological approaches. *J Nanosci Nanotechnol* 9, 5055–5072
- Shaw KJ, Rather PN, Hare RS, Miller GH (1993): Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol Rev* 57, 138–163
- Sheng Z, Van Nostrand JD, Zhou J, Liu Y (2015): The effects of silver nanoparticles on intact wastewater biofilms. *Front Microbiol* 6, 680
- Silver S (2003): Bacterial silver resistance: molecular biology and uses and misuses of silver compounds. *FEMS Microbiol Rev* 27, 341–353
- Siqueira WL, Custodio W, McDonald EE (2012): New insights into the composition and functions of the acquired enamel pellicle. *J Dent Res* 91, 1110–1118
- Slomiany BL, Murty VL, Zdebska E, Slomiany A, Gwozdziński K, Mandel ID (1986): Tooth surface-pellicle lipids and their role in the protection of dental enamel against lactic-acid diffusion in man. *Arch Oral Biol* 31, 187–191
- Socransky SS, Manganiello AD, Propas D, Oram V, van Houte J (1977): Bacteriological studies of developing supragingival dental plaque. *J Periodontal Res* 12, 90–106
- Sondi I, Salopek-Sondi B (2004): Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *J Colloid Interface Sci* 275, 177–182
- Song DH, Uhm SH, Lee SB, Han JG, Kim KN (2011): Antimicrobial silver-containing titanium oxide nanocomposite coatings by a reactive magnetron sputtering. *Thin Solid Films* 519, 7079–7085
- Song DH, Uhm SH, Kim SE, Kwon JS, Han JG, Kim KN (2012): Synthesis of titanium oxide thin films containing antibacterial silver nanoparticles by a reactive magnetron co-sputtering system for application in biomedical implants. *Mater Res Bull* 47, 2994–2998
- Song F, Koo H, Ren D (2015): Effects of Material Properties on Bacterial Adhesion and Biofilm Formation. *J Dent Res* 94, 1027–1034

- Sönju T, Glantz PO (1975): Chemical composition of salivary integuments formed in vivo on solids with some established surface characteristics. *Arch Oral Biol* 20, 687–691
- Srivastava K, Tikku T, Khanna R, Sachan K (2013): Risk factors and management of white spot lesions in orthodontics. *J Orthod Sci* 2, 43–49
- Stanley PE (1989): A review of bioluminescent ATP techniques in rapid microbiology. *J Biolumin Chemilumin* 4, 375–380
- Stewart PS (1993): A model of biofilm detachment. *Biotechnol Bioeng* 41, 111–117
- Stoodley P, Wilson S, Hall-Stoodley L, Boyle JD, Lappin-Scott HM, Costerton JW (2001): Growth and Detachment of Cell Clusters from Mature Mixed-Species Biofilms. *Appl Environ Microbiol* 67, 5608–5613
- Stratton CW, Warner RR, Coudron PE, Lilly NA (1999): Bismuth-mediated disruption of the glyco-calyx-cell wall of *Helicobacter pylori*: ultrastructural evidence for a mechanism of action for bismuth salts. *J Antimicrob Chemother* 43, 659–666
- Svensäter G, Larsson UB, Greif EC, Cvitkovitch DG, Hamilton IR (1997): Acid tolerance response and survival by oral bacteria. *Oral Microbiol Immunol* 12, 266–273
- Svoboda M, Malijeuský A, Lísal M (2015): Wetting properties of molecularly rough surfaces. *J Chem Phys* 143, 104701
- Switalski LM, Butcher WG (1994): An in vitro model for adhesion of bacteria to human tooth root surfaces. *Arch Oral Biol* 39, 155–161
- Syed SA, Loesche WJ (1978): Bacteriology of human experimental gingivitis: effect of plaque age. *Infect Immun* 21, 821–829
- Takahashi N, Nyvad B (2008): Caries Ecology Revisited: Microbial Dynamics and the Caries Process. *Caries Res* 42, 409–418
- Tanagawa M, Yoshida K, Matsumoto S, Yamada T, Atsuta M (1999): Inhibitory effect of antibacterial resin composite against *Streptococcus mutans*. *Caries Res* 33, 366–371
- Taylor RL, Verran J, Lees GC, Ward AJ (1998): The influence of substratum topography on bacterial adhesion to polymethyl methacrylate. *J Mater Sci Mater Med* 9, 17–22
- ten Cate JM (1997): Review on fluoride, with special emphasis on calcium fluoride mechanisms in caries prevention. *Eur J Oral Sci* 105, 461–465
- ten Cate JM (2006): Biofilms, a new approach to the microbiology of dental plaque. *Odontol Soc Nippon Dent Univ* 24, 1–9
- ten Cate JM, van Loveren C (1999): Fluoride mechanisms. *Dent Clin North Am* 43, 713–742

- Teughels W, van Assche N, Slieden I, Quirynen M (2006): Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. *Clin Oral Implants Res* 17 Suppl 2, 68–81
- Thaweboon S, Suddhasthira T, Thaweboon B, Soo-Ampon S, Dechkunakorn S (2007): Plaque pH response to snack foods in children with different levels of mutans streptococci. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 38, 598–603
- Theilade E, Theilade J, Mikkelsen L (1982): Microbiological studies on early dento-gingival plaque on teeth and Mylar strips in humans. *J Periodontal Res* 17, 12–25
- Thrum H (1977): [Classes of antibiotics and their mechanisms of action]. *Z Für Gesamte Inn Med Ihre Grenzgeb* 32, 209-214
- Tomonaga T, Rai SK, Uga S (2016): Differentiation between Viable and Dead *Cryptosporidium* Oocysts Using Fluorochrome Staining. *Kobe J Med Sci* 61, E138-143
- Türkkahraman H, Sayin MO, Bozkurt FY, Yetkin Z, Kaya S, Onal S (2005): Archwire ligation techniques, microbial colonization, and periodontal status in orthodontically treated patients. *Angle Orthod* 75, 231–236
- Uhm SH, Lee SB, Song DH, Kwon JS, Han JG, Kim KN (2014a): Fabrication of bioactive, antibacterial TiO<sub>2</sub> nanotube surfaces, coated with magnetron sputtered Ag nanostructures for dental applications. *J Nanosci Nanotechnol* 14, 7847–7854
- Uhm SH, Song DH, Kwon JS, Lee SB, Han JG, Kim KN (2014b): Tailoring of antibacterial Ag nanostructures on TiO<sub>2</sub> nanotube layers by magnetron sputtering. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 102, 592–603
- van Der Mei HC, Rustema-Abbing M, de Vries J, Busscher HJ (2008): Bond strengthening in oral bacterial adhesion to salivary conditioning films. *Appl Environ Microbiol* 74, 5511–5515
- van Loosdrecht MC, Lyklema J, Norde W, Schraa G, Zehnder AJ (1987a): The role of bacterial cell wall hydrophobicity in adhesion. *Appl Environ Microbiol* 53, 1893–1897
- van Loosdrecht MC, Lyklema J, Norde W, Schraa G, Zehnder AJ (1987b): Electrophoretic mobility and hydrophobicity as a measured to predict the initial steps of bacterial adhesion. *Appl Environ Microbiol* 53, 1898–1901
- van Loosdrecht MC, Lyklema J, Norde W, Zehnder AJ (1990a): Influence of interfaces on microbial activity. *Microbiol Rev* 54, 75–87
- van Loosdrecht MC, Zehnder AJ (1990b): Energetics of bacterial adhesion. *Experientia* 46, 817–822
- van Oss CJ (2003): Long-range and short-range mechanisms of hydrophobic attraction and hydrophilic repulsion in specific and aspecific interactions. *J Mol Recognit JMR* 16, 177–190

- Vassilakos N, Rundegren J, Arnebrant T, Glantz PO (1992): Adsorption from salivary fractions at solid/liquid and air/liquid interfaces. *Arch Oral Biol* 37, 549–557
- Vassilakos N, Arnebrant T, Glantz PO (1993): An in vitro study of salivary film formation at solid/liquid interfaces. *Scand J Dent Res* 101, 133–137
- Veerachamy S, Yarlagadda T, Manivasagam G, Yarlagadda PK (2014): Bacterial adherence and biofilm formation on medical implants: a review. *Proc Inst Mech Eng [H]* 228, 1083–1099
- Verran J, Sandoval G, Allen NS, Edge M, Stratton J (2007): Variables affecting the antibacterial properties of nano and pigmentary titania particles in suspension. *Dyes Pigments* 73, 298–304
- Verwey EJW (1947): Theory of the Stability of Lyophobic Colloids. *J Phys Colloid Chem* 51, 631–636
- Vorburger TV, Rhee H-G, Renegar TB, Song J-F, Zheng A (2007): Comparison of optical and stylus methods for measurement of surface texture. *Int J Adv Manuf Technol* 33, 110–118
- Vuong C, Saenz HL, Götz F, Otto M (2000): Impact of the agr quorum-sensing system on adherence to polystyrene in *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis* 182, 1688–1693
- Walsh C (2000): Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature* 406, 775–781
- Wang J, Li J, Guo G, Wang Q, Tang J, Zhao Y, Qin H, Wahafu T, Shen H, Liu X, Zhang X (2016): Silver-nanoparticles-modified biomaterial surface resistant to staphylococcus: new insight into the antimicrobial action of silver. *Sci Rep* 6, 32699
- Wassmann T, Kreis S, Behr M, Buegers R (2017): The influence of surface texture and wettability on initial bacterial adhesion on titanium and zirconium oxide dental implants. *Int J Implant Dent* 3, 32
- Waters CM, Bassler BL (2005): QUORUM SENSING: Cell-to-Cell Communication in Bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21, 319–346
- Weerkamp AH, Uyen HM, Busscher HJ (1988): Effect of zeta potential and surface energy on bacterial adhesion to uncoated and saliva-coated human enamel and dentin. *J Dent Res* 67, 1483–1487
- Weir E, Lawlor A, Whelan A, Regan F (2008): The use of nanoparticles in anti-microbial materials and their characterization. *Analyst* 133, 835–845
- Welin-Neilands J, Svensäter G (2007): Acid Tolerance of Biofilm Cells of *Streptococcus mutans*. *Appl Environ Microbiol* 73, 5633–5638
- Wennerberg A, Ohlsson R, Rosén BG, Andersson B (1996): Characterizing three-dimensional topography of engineering and biomaterial surfaces by confocal laser scanning and stylus techniques. *Med Eng Phys* 18, 548–556

- West NX, Joiner A (2014): Enamel mineral loss. *J Dent* 42 Suppl 1, 2-11
- Whitney J (1997): Testing for differences with the nonparametric Mann-Whitney U test. *J Wound Ostomy Cont Nurs* 24, 12
- Whittaker CJ, Klier CM, Kolenbrander PE (1996): Mechanisms of Adhesion by Oral Bacteria. *Annu Rev Microbiol* 50, 513–552
- Wilson M, Patel H, Fletcher J (1996): Susceptibility of biofilms of *Streptococcus sanguis* to chlorhexidine gluconate and cetylpyridinium chloride. *Oral Microbiol Immunol* 11, 188–192
- Wimpenny J, Manz W, Szewzyk U (2000): Heterogeneity in biofilms. *FEMS Microbiol Rev* 24, 661–671
- Wingender J: What are Bacterial Extracellular Polymeric Substances? In: Wingender J, Neu TR, Flemming H-C (Hrsg.): *Microbial Extracellular Polymeric Substances*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 1999, 1-19
- Wong AK (1976): Orthodontic elastic materials. *Angle Orthod* 46, 196–205
- Xia L, Chen P, Wang Y, Zhou L, Luo X (2012): Three-dimensional measuring technique for surface topography using a light-sectioning microscope. *Appl Opt* 51, 1162–1170
- Xu LC, Siedlecki CA (2014): *Staphylococcus epidermidis* adhesion on hydrophobic and hydrophilic textured biomaterial surfaces. *Biomed Mater Bristol Engl* 9, 035003
- Xu SS, Liu Z, Zhang Q, Niu Z, Jan C-C, Cai X (2016): Chromosome Painting by GISH and Multi-color FISH. *Methods Mol Biol Clifton NJ* 1429, 7–21
- Yang Y, Lu Y, Wu QY, Hu HY, Chen YH, Liu WL (2015): Evidence of ATP assay as an appropriate alternative of MTT assay for cytotoxicity of secondary effluents from WWTPs. *Ecotoxicol Environ Saf* 122, 490–496
- Yao Y, Grogan J, Zehnder M, Lendenmann U, Nam B, Wu Z, Costello CE, Oppenheim FG (2001): Compositional analysis of human acquired enamel pellicle by mass spectrometry. *Arch Oral Biol* 46, 293–303
- Yeo IS, Kim HY, Lim KS, Han JS (2012): Implant surface factors and bacterial adhesion: a review of the literature. *Int J Artif Organs* 35, 762–772
- Yong CW (2015): Study of interactions between polymer nanoparticles and cell membranes at atomistic levels. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 370, 20140036
- Yoshida K, Tanagawa M, Matsumoto S, Yamada T, Atsuta M (1999a): Antibacterial activity of resin composites with silver-containing materials. *Eur J Oral Sci* 107, 290–296
- Yoshida K, Tanagawa M, Atsuta M (1999b): Characterization and inhibitory effect of antibacterial dental resin composites incorporating silver-supported materials. *J Biomed Mater Res* 47, 516–522

Yousif A, Jamal MA, Raad I (2015): Biofilm-based central line-associated bloodstream infections. *Adv Exp Med Biol* 830, 157–179

Zaura-Arite E, van Marle J, ten Cate JM (2001): Confocal microscopy study of undisturbed and chlorhexidine-treated dental biofilm. *J Dent Res* 80, 1436–1440

Zhang L, Gowardman J, Rickard CM (2011): Impact of microbial attachment on intravascular catheter-related infections. *Int J Antimicrob Agents* 38, 9–15

Zhang T, Wang L, Chen Q, Chen C (2014): Cytotoxic potential of silver nanoparticles. *Yonsei Med J* 55, 283–291

Zijngé V, van Leeuwen MBM, Degener JE, Abbas F, Thurnheer T, Gmür R, M. Harmsen HJ (2010): Oral Biofilm Architecture on Natural Teeth. *PLoS ONE* 5, e9321

Zurek-Biesiada D, Kędracka-Krok S, Dobrucki JW (2013): UV-activated conversion of Hoechst 33258, DAPI, and Vybrant DyeCycle fluorescent dyes into blue-excited, green-emitting protonated forms. *Cytometry A* 83, 441–451

## 8.2 Internetquellen

Einfaktorielle Varianzanalyse. <http://www.methodenberatung.uzh.ch/de/datenanalyse/unterschiede/zentral/evarianz.html>; Zugriff am 18.05.2017

Fluoreszenzmikroskopie. <https://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Fluoreszenzmikroskopie&oldid=164132385>; Zugriff am 06.04.2017

Freie Oberflächenenergie - KRÜSS GmbH. <https://www.kruss.de/de/service/schulung-theorie/glossar/freie-oberflaechenenergie/>; Zugriff am 08.11.2017

Hoechst® 33342 Protocol for Imaging. <https://www.thermofisher.com/de/de/home/references/protocols/cell-and-tissue-analysis/protocols/hoechst-33342-imaging-protocol.html>; Zugriff am 04.05.2017

Kontaktwinkel - KRÜSS GmbH. <https://www.kruss.de/de/service/schulung-theorie/glossar/kontaktwinkel/>; Zugriff am 19.11.2017

Mißfeldt M. <https://www.lichtmikroskop.net>; Zugriff am 28.03.2017

Ortho Organizers. [http://www.targetortodonzia.it/public/allegati/OrthoShield\\_Tech.pdf](http://www.targetortodonzia.it/public/allegati/OrthoShield_Tech.pdf)

OrthoShield™ Safe-T-Tie™ - Ortho Organizers.

<https://www.yumpu.com/en/document/view/10854906/orthoshieldtm-safe-t-tietm-ortho-organizers>; Zugriff am 11.05.2017

Schema einer Sputterkammer. [https://de.wikipedia.org/wiki/Datei:Schema\\_einer\\_Sputterkammer.svg](https://de.wikipedia.org/wiki/Datei:Schema_einer_Sputterkammer.svg); Zugriff am 14.09.2018

Staphylococcus aureus auf Columbia horse blood agar. [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Staphylococcus\\_aureus\\_agar\\_sangre.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Staphylococcus_aureus_agar_sangre.jpg); Zugriff am 14.09.2018

TOC Orthodontic & Specialist Dental Supplies; Sani-Ties Elastomerics. <http://www.tocdental.com/sani-ties-elastomerics-120/p141>; Zugriff am 06.04.2017

www.lonza.com. [http://bio.lonza.com/uploads/tx\\_mwaxmarketingmaterial/Lonza\\_ManualsProductInstructions\\_Instructions\\_-\\_ViaLight\\_plus\\_kit.pdf](http://bio.lonza.com/uploads/tx_mwaxmarketingmaterial/Lonza_ManualsProductInstructions_Instructions_-_ViaLight_plus_kit.pdf)

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Ralf Bürgers für die Überlassung des Themas, die großzügige Bereitstellung von Arbeitsmitteln der „AG Biofilme und Orales Mikrobiom“ der Poliklinik für Zahnärztliche Prothetik der UMG Göttingen sowie die ausgezeichnete Betreuung und Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit. Ich möchte mich ebenfalls ganz herzlich bei Herrn Professor Nikolaus Gersdorff bedanken, der die Promotion in der Poliklinik für Zahnärztliche Prothetik ermöglichte, mir stets mit methodischen und wissenschaftlichen Tipps zur Seite stand und mich besonders in der Anfangszeit der Arbeit intensiv betreut hat. Herrn Dr. Torsten Wassmann, dem Leiter der „AG Biofilme und Orales Mikrobiom“ gebührt mein besonderer Dank für die erfolgreiche Zusammenarbeit und große Hilfsbereitschaft bei der Beantwortung fachlicher und methodischer Fragen. Mein Dank gilt zudem Frau MTA Andrea Bernhard für die wertvolle Zusammenarbeit während der ersten Versuchsreihe sowie Frau MTA Susanne Kieke für die Einweisung und Einarbeitung in das Labor der „AG Biofilme und Orales Mikrobiom“ sowie die kompetente Betreuung bei der Versuchsdurchführung. Herrn Dr. Jacob Barz und Herrn Dipl.-Ing. Bentsian Elkin vom Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik IGB danke ich für die Beschichtung der Probekörper und Bereitstellung der Informationen über das Beschichtungsverfahren sowie die stets freundliche und erfolgreiche Kooperation. Des Weiteren möchte ich mich bei Frau M.Sc. Xenia Schulz für die Beratung und Hilfestellung bei der statistischen Auswertung bedanken.

## Lebenslauf

Am 20.09.1991 wurde ich, Carolin Griesmüller, als zweites Kind meiner Eltern Andrea Griesmüller, geborene Pilgrim, und Dr. med. dent. Henning Griesmüller in Braunschweig geboren.

Von 1997 bis 2001 besuchte ich die Grundschule Volkmarode, von 2001 bis 2003 die Orientierungsstufe Braunschweig-Volkmarode und von 2003 bis 2010 das Gymnasium Neue Oberschule, an dem ich im Juni 2010 mein Abitur absolvierte.

Im Oktober 2010 nahm ich das Studium der Zahnheilkunde an der Georg-August-Universität Göttingen auf. Die naturwissenschaftliche Vorprüfung legte ich im August 2011 ab, das Physikum im März 2013. Das Studium schloss ich im November 2015 mit dem Staatsexamen erfolgreich ab. Seit Dezember 2015 bin ich als Zahnärztin tätig. Zunächst war ich von Dezember 2015 bis März 2016 als Vorbereitungsassistentin in der Praxis Dr. Henning Griesmüller tätig, anschließend von März 2016 bis Februar 2018 als Assistenz Zahnärztin in der Poliklinik für Zahnärztliche Prothetik der Universitätsmedizin Göttingen angestellt und seit März 2018 arbeite ich als angestellte Zahnärztin in der Praxis Dr. Henning Griesmüller.