

Aus der Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und präventive Zahnheilkunde
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Prof. Dr. M. Hannig

***In-vitro*-Applikation sphärischer Goldnanopartikel auf ein *in-situ*-Modell eines oralen Biofilms**

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnheilkunde
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES**

2017

vorgelegt von:
Maria Schäfer
geb. am 07.12.1989 in Ottweiler

Tag der Promotion:

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. M. D. Menger

Prof. Dr. M. Hannig

Meinen Eltern
Jörn & Sigrid Schäfer

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
1.1	Deutsche Zusammenfassung	1
1.2	Abstract	2
2	Einleitung	3
2.1	Literaturübersicht	3
2.1.1	Die Bedeutung bakterieller Biofilme	3
2.1.2	Die erworbene Pellikel	4
2.1.3	Der bakterielle Biofilm	5
2.1.4	Synthetische Nanopartikel in der Zahnheilkunde	7
2.1.5	Diffusion von Nanopartikeln in einen Biofilm	10
2.2	Ziel der Arbeit / Fragestellung	11
3	Material und Methode	12
3.1	Materialien	12
3.1.1	Goldnanopartikel	12
3.1.2	Rinderschmelzprüfkörper	13
3.1.3	Biofilm	15
3.2	Vorversuche	17
3.2.1	Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Nanopartikel	17
3.2.2	TEM-Analyse der Nanopartikel	17
3.2.3	Fluoreszenzmikroskopische Analyse eines 24-h-Biofilms	18
3.2.4	Fluoreszenz- und rasterelektronenmikroskopische Analyse der Nanopartikel auf einem 24-h-Biofilm	19
3.2.5	Blockface-Testschliffe	20
3.2.6	Blockface-Ätzung	22
3.3	Hauptversuche	23
3.3.1	Versuchsaufbau	23
3.3.2	REM-Analyse der Biofilmoberfläche	24
3.3.3	Statistische Auswertung der Biofilmoberfläche	25
3.3.4	REM-Analyse der Biofilmquerschnittsfläche	25
3.3.5	REM-Analyse der Biofilmunterseite	26
3.3.6	TEM-Analyse der Biofilmquerschnittsfläche	27

4 Ergebnisse	28
4.1 Vorversuche	28
4.1.1 Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Nanopartikel	28
4.1.2 TEM-Analyse der Nanopartikel	28
4.1.3 Fluoreszenzmikroskopische Analyse eines 24-h-Biofilms	30
4.1.4 Fluoreszenz- und rasterelektronenmikroskopische Analyse der Nanopartikel auf einem 24-h-Biofilm	30
4.1.5 Blockface-Testschliffe	32
4.1.6 Blockface-Ätzung	32
4.2 Hauptversuche	33
4.2.1 REM-Analyse der Biofilmoberfläche	33
4.2.2 Statistische Auswertung der Biofilmoberfläche	42
4.2.3 REM-Analyse der Biofilmquerschnittsfläche	44
4.2.4 REM-Analyse der Biofilmunterseite	45
4.2.5 TEM-Analyse der Biofilmquerschnittsfläche	48
5 Diskussion	51
5.1 Material und Methode	51
5.1.1 Auswahl der Nanopartikel	51
5.1.2 Verwendung von Rinderschmelzprüfkörpern	53
5.1.3 <i>In-situ</i> -Biofilmbildung	53
5.1.4 Fixierung der Biofilmproben	55
5.1.5 <i>In-vitro</i> -Applikation der Nanopartikel	56
5.2 Ergebnisse	58
5.2.1 REM-Analyse der Biofilmoberfläche	58
5.2.2 Statistische Auswertung der Biofilmoberfläche	59
5.2.3 REM-Analyse der Biofilmquerschnittsfläche	60
5.2.4 REM-Analyse der Biofilmunterseite	63
5.2.5 TEM-Analyse der Biofilmquerschnittsfläche	65
5.3 Vergleich der eigenen Ergebnisse mit denen aus der Literatur	66
5.4 Schlussfolgerung	68
6 Literaturverzeichnis	69
7 Danksagung	79
Anhang	80

1 Zusammenfassung

1.1 Deutsche Zusammenfassung

Oberflächen-assoziierte mikrobielle Lebensgemeinschaften, sogenannte bakterielle Biofilme, sind in fast allen natürlichen und künstlichen Systemen unserer Umwelt zu finden. Die Bildung und Persistenz pathogener oraler Biofilme als Ursache weit verbreiteter dentaler Infektionskrankungen wie Karies und Parodontitis stellen für die Entwicklung effektiver antibakterieller Therapien eine große Herausforderung dar. Die Anwendung von Nanopartikeln im modernen Biofilmmangement zur Hemmung der Proliferation bakterieller Biofilme durch Applikation antimikrobieller Wirkstoffe setzt ein Vordringen der Nanopartikel in tiefere Schichten des komplexen, schwammartigen Biofilmnetzwerkes voraus. In der vorliegenden Studie sollte untersucht werden, ob und in welchem Umfang Nanopartikel in der Lage sind, das dreidimensionale Netzwerk eines oralen bakteriellen Biofilms zu penetrieren. Weiterhin sollte ermittelt werden, welchen Einfluss Einwirkzeiten und Spülfrequenzen auf den Verbleib von Nanopartikeln auf bzw. im bakteriellen Biofilm besitzen. Dazu erfolgte eine *in-vitro*-Applikation 20 nm großer, sphärischer Goldnanopartikel auf den fixierten, *in situ* gebildeten 24-h-Biofilm zweier Probanden. Nach einer Einwirkzeit von 10 bzw. 30 min wurden die Proben einmal bzw. 20 Mal in dH₂O gespült, sowie 24 h in dH₂O gelagert. Anschließend wurden sowohl die Oberfläche, als auch die Querschnittsfläche im Blockface-Präparat sowie die Unterseite des Biofilms raster-elektronenmikroskopisch und nach Herstellung von Ultradünnschnitten ebenfalls transmissi-onselektronenmikroskopisch analysiert. Die Auszählung der auf der Oberfläche verbliebenen Nanopartikel erfolgte mit der kommerziellen Software MATLAB. Die Experimente ergaben, dass die Nanopartikel den Biofilm nicht penetrieren konnten. Längere Einwirkzeiten hatten in Regionen dünnerer Pellikelschichten einen größeren Effekt auf den Verbleib von Nanopartikeln auf der Prüfkörperoberfläche als auf bakteriellen Aggregaten. Unabhängig von der Biofilmqualität konnten keine Auswaschphänomene festgestellt werden. Die Lagerung in dH₂O führte zu einer Umverteilung der Nanopartikel von dünneren Pellikelschichten zu bakteriellen Aggregaten. Im Hinblick auf eine klinische Anwendung synthetischer Nanopartikel bedarf es weiterer Untersuchungen bzgl. größenspezifischer Effekte, Oberflächenmodifikationen und Wechselwirkungen mit Speichelproteinen. Nanopartikel bergen als Wirkstoff oder Wirkstoffträger im Bereich der modernen Zahnheilkunde ein großes Anwendungspotential, jedoch müssen dabei toxikologische Aspekte berücksichtigt werden.

1.2 Abstract

Surface-associated microbial communities, called biofilms, occur in almost all natural and artificial systems of our environment. Formation and persistence of pathogenic oral biofilms as a cause of widespread dental infectious diseases such as caries and periodontitis represent a big challenge for the development of effective antibacterial therapies. Usage of nanoparticles as a part of modern biofilm management with the aim of inhibiting proliferation of oral biofilms by application of antimicrobial agents presupposes penetration of nanoparticles to deeper layers of the complex, spongy biofilm network. The aim of this study was to investigate, if and to which extent nanoparticles are able to penetrate the three-dimensional network of an oral bacterial biofilm. Furthermore it should be calculated how much the exposure time and rinsing frequency influence the persistence of nanoparticles on or inside of the biofilm. Therefore, 20 nm large, spherical gold nanoparticles were applied *in vitro* to an *in situ* formed, fixed 24 h biofilm of two volunteers. After an exposure time of 10 and 30 min the specimens were rinsed once and 20 times in dH₂O, and also stored in dH₂O for 24 h. Afterwards the surface, as well as the profile and the bottom side of the biofilms, were analyzed by SEM and additionally, after preparation of ultrathin sections, also by TEM. Nanoparticles which remained on the surface were enumerated with the commercial software MATLAB. Results showed that the nanoparticles were not able to penetrate the biofilm. Extended exposure times had a bigger impact on the persistence of nanoparticles on the biofilm surface in areas of a thin pellicle layer than in regions of bacterial aggregates. Irrespectively of the biofilm quality no rinse related effect could be ascertained. Storage in dH₂O lead to a redistribution of nanoparticles from thin pellicle layers to bacterial aggregates. With regard to clinical application of engineered nanoparticles further research concerning size effects, surface modification and interaction with salivary proteins is necessary. In due consideration of toxicological aspects nanoparticles own a huge potential as agents or carriers in modern dentistry.

2 Einleitung

2.1 Literaturübersicht

2.1.1 Die Bedeutung bakterieller Biofilme

Bakterielle Biofilme sind Lebensgemeinschaften einzelner oder verschiedener Bakterienkolonien, welche in einem komplexen, dreidimensionalen Netzwerk, der extrazellulären Matrix, eingebettet sind. Sie entstehen in der Umwelt, sowohl in natürlichen als auch in künstlichen Systemen, fast überall, wo eine Oberfläche mit einer nicht sterilen wässrigen Flüssigkeit in Kontakt tritt [Sutherland, 2001]. Beispiele für derartige Grenzflächen im menschlichen Organismus sind u. a. künstliche Herzklappen, Blasenkatheter, Implantate und Zahnoberflächen. Mehr als 65% aller humanen Infektionskrankheiten sind biofilmassoziiert, darunter Otitis media, zystische Fibrose, sowie Karies und Parodontitis [Seneviratne et al., 2011]. Für die orale Pathologie sind Kenntnisse über die Entstehung und Struktur des oralen bakteriellen Biofilms essentiell für die Therapie weit verbreiteter biofilmassoziiertes, oraler Infektionserkrankungen. Trotz umfangreicher Aufklärung und prophylaktischer Maßnahmen belegen zahlreiche Studien, dass Karies und Parodontitis zu den Volkskrankheiten mit der höchsten Prävalenz zählen.

Die Karies ist eine destruktive Infektionserkrankung der Zahnhartsubstanz, die unbehandelt zu einer progredienten Entzündung und folglich zum Absterben vitalen Pulpengewebes führen kann. Die dadurch entstehende Infektion kann sich über das *foramen apicale* in umliegende Gewebe und darüber hinaus ausbreiten. Ursache sind in erster Linie azidogene Plaquebakterien wie *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* und *Lactobacillus* spp. [Marsh, 2010]. In den Jahren 2011 bis 2012 litten ca. 91% der erwachsenen US-Amerikaner zwischen 20 und 64 Jahren an Karies [Dye et al., 2015b]. Bei den 2- bis 8-Jährigen waren ca. 37% der Kinder von kariösen Läsionen an den Zähnen der 1. Dentition betroffen [Dye et al., 2015a]. Laut einer schwedischen Studie liegt die Prävalenz für eine unbehandelte Karies bei den 20- bis 85-Jährigen bei 33% [Edman et al., 2016]. Auch wenn im Rahmen der Fünften Deutschen Mundgesundheitsstudie (DMS V) ein positiver Trend im Hinblick auf einen nachhaltigen Rückgang der Karieserfahrung in allen Altersgruppen zu verzeichnen war, verdichtet sich die Krankheitslast im höheren Alter. So waren im Jahr 2014 81% der 12-Jährigen kariesfrei, wohingegen nahezu alle Studienteilnehmer der höheren Altersgruppen von Karies betroffen waren. Die durchschnittliche Karieserfahrung, gemessen am DMFT-Index, betrug bei Kindern (12-Jährige) 0,5 Zähne, bei jüngeren Erwachsenen (35- bis 44-Jährige) 11,2 Zähne, bei jüngeren Senioren (65- bis 74-Jährige) 17,7 Zähne sowie bei älteren Senioren (75- bis 100-Jährige) 21,6 Zähne [Jordan et al., 2016].

Im Vergleich zur Karies stellt die Parodontitis weniger ein medizinisches Problem der modernen Neuzeiter Ernährung dar: Pathologische Knochenresorptionen finden sich bereits bei 640.000 bis 735.000 Jahre alten Knochenfunden in Deutschland und 169.000 bis 191.000 Jahre alten Ausgrabungen in Frankreich [Dentino et al., 2013]. Die Parodontitis ist eine entzündliche Infektionserkrankung des Zahnhalteapparats. Als Hauptverursacher gelten pathogene orale Mikroorganismen im subgingivalen bakteriellen Biofilm, darunter *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* und *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* [Ximénez-Fyvie et al., 2000]. Die Erkrankung führt zu einem progredienten Attachmentverlust durch die Destruktion des parodontalen Ligaments sowie zu fortschreitendem Alveolarknochenabbau. Die betroffenen Zähne können aufgrund parodontaler Abszesse oder ausgeprägten Lockerungsgraden verloren gehen. Parodontologische Erkrankungen existieren weltweit unter allen bisher erforschten Bevölkerungsgruppen. So leidet nach einer Untersuchung der Weltgesundheitsorganisation die Mehrheit der Menschen an Gingivitis, 10-15% der Erwachsenen besitzen Taschentiefen > 6 mm [Petersen et al., 2005]. Trotz eines kontinuierlichen Rückgangs parodontaler Erkrankungen, gemessen an der CDC/AAP-Fallklassifikation, ist ein Großteil der Erwachsenen laut der DMS V von einer moderaten oder schweren Parodontitis betroffen. Parodontale Erkrankungen lagen bei 52% der jüngeren Erwachsenen, sowie bei 65% der jüngeren Senioren und 90% der älteren Senioren vor [Jordan et al., 2016].

Ähnlich wie natürliche Zähne können auch dentale Implantate durch bakterielle Infektionserkrankungen verloren gehen. Die Periimplantitis kann sowohl Hart- als auch Weichgewebe betreffen, die das Implantat im Kieferknochen stabilisieren. Auch hier führt die Infektion mit zumeist anaeroben gram-negativen Bakterienspezies zu einer Entzündung der Gingiva und zu progredientem Knochenabbau, die zur Lockerung und schließlich zum Implantatverlust führen können [Becker et al., 2014].

2.1.2 Die erworbene Pellikel

Tritt Speichel mit einer intraoral exponierten Zahnoberfläche in Kontakt, kommt es innerhalb weniger Sekunden zur Adsorption von Speichelproteinen auf der Schmelzoberfläche. Aufgrund der Bindung funktioneller Gruppen der Speichelproteine an Calcium- und Phosphationen der Schmelzoberfläche durch elektrostatische Wechselwirkungen, Van-der-Waals-Kräfte und hydrophobe Wechselwirkungen entsteht bereits nach 1 min eine homogen strukturierte, feingranuläre, elektronendichte, 10-20 nm dicke Schicht, die initiale Pellikel. Die Bildung dieses erworbenen Schmelzoberhäutchens ist nach wenigen Minuten abgeschlossen [Hannig und Joiner, 2006]. Aktuelle Studien zeigen eine weitaus komplexere Zusammensetzung der initialen

Pellikel als bisher angenommen. So konnten im Proteom einer 3-min-Pellikel auf Dentin 351 verschiedene Speichelproteine identifiziert werden, darunter Alpha-Amylase 1, Basic salivary PRP 2, Cystatin-B, Cystatin-S, Cystatin-SA, Cystatin-SN, Lysozyme C, Mucin 7, Protein S100-AB sowie Serumalbumin [Papadopoulos et al., n.d.]. Neben Proteinstrukturen enthält die Pellikel verschiedene Kohlenhydrate, darunter Glucose, Galaktose, Mannose, Fructose, Glucosamine und Galactosamine [Mayhall und Butler, 1976] sowie verschiedene Lipide, die etwa $\frac{1}{4}$ des Trockengewichtes ausmachen [Reich et al., 2012].

Durch die Adsorption größerer Proteinaggregate in der zweiten Phase der initialen Pellikelbildung kommt es neben eines raschen Pellikelwachstums [Hannig und Joiner, 2006] zur Ausbildung einer unebenen, knotigen Oberflächenstruktur [Busscher et al., 1989]. Das Erscheinungsbild dieser, der basalen Schicht locker aufgelagerten, heterogenen Schicht, welche nach 30 min 200-300 nm erreicht [Hannig, 1999], ist geprägt von globulären Proteinaggregaten mit einem Durchmesser von 100-200 nm [Young et al., 1997] und 150-200 nm großen Mizellenartigen Strukturen, welche u. a. im Parotisspeichel vorhanden sind [Ryke et al., 1995]. Innerhalb von 60 min erreicht die Pellikel einer bukkal exponierten Schmelzoberfläche eine Dicke von 200-500 nm, nach 2 h 200-700 nm mit zunehmend locker geschichteten granulären und globulären Strukturen. Nach 6 h erreicht die Pellikel eine Dicke von 500-1000 nm [Hannig, 1999]. Die 24-h-Pellikel der Bukkalflächen ist nach 24 h 1000-1300 nm dick [Hannig, 1999] und stellt sich strukturell als schwammartiges Netzwerk sphärischer Partikel dar [Hannig und Joiner, 2006].

Die erworbene Pellikel moduliert Re- und Demineralisationsprozesse [Hannig und Joiner, 2006] und fungiert sowohl als Diffusionsbarriere als auch als semipermeable Membran [Hannig, 2002]. Die Pellikelschicht verhindert einen direkten Kontakt zwischen der Schmelzoberfläche und freien Säuren. Somit besitzt sie antierosive und protektive Eigenschaften [Vukosavljevic et al., 2014, Carvalho et al., 2016]. *In-vitro*-Ätzungen mit Zitronensäure hatten im Experiment nur geringen Einfluss auf die qualitative Proteom-Zusammensetzung einer 24-h-Pellikel [Papadopoulos et al., n.d.]. Weiterhin fungiert die Pellikel zusammen mit der Speichelflüssigkeit als Gleitmittel beim Sprechen, sowie bei Kau- und Schluckprozessen, wodurch die Bildung eines Speisebolus erleichtert wird [Dawes et al., 2015].

2.1.3 Der bakterielle Biofilm

Von der erworbenen Pellikel unterscheidet sich eindeutig der bakterielle Biofilm [Hannig und Joiner, 2006]. Mehr als 500 verschiedene bakterielle Spezies besiedeln die Hart- und Weichgewebe der menschlichen Mundhöhle. Die qualitative Zusammensetzung des bakteriellen Biofilms ist variabel und beeinflusst maßgeblich dessen Pathogenität. Sowohl im supra- als auch

im subgingivalen Biofilm finden sich unterschiedliche bakterielle Komplexe [Haffajee et al., 2008]. Supragingivaler Biofilm besitzt im Gegensatz zu subgingivalem Biofilm eine heterogenere Struktur ohne erkennbare Organisation von Bakterienkolonien [Zijnge et al., 2010].

Die Bildung des bakteriellen Biofilms beginnt mit unspezifischen Bindungen bakterieller „early colonizer“ an Proteinstrukturen der Pellikelschicht. Innerhalb von 4 h finden sich im frühen bakteriellen Biofilm 60-90% *Streptococcus* spp., außerdem *Actinomyces* spp., *Capnocytophaga* spp., *Haemophilus* spp. sowie *Veillonella* spp. Die Koaggregation der „late colonizer“, wie *Fusobacterium nucleatum*, *Treponema* spp., *Tannerella forsythia* und *Porphyromonas gingivalis* über spezifische interbakterielle Rezeptoren fördert das Biofilmwachstum [Foster und Kolenbrander, 2004].

Die von den Bakterien produzierte extrazelluläre Matrix besteht aus Wasser, Exopolysacchariden, Lipiden, Nukleinsäuren, Lipoteichonsäuren und Lipopolysacchariden [Xiao et al., 2012]. Diese Komponenten verteilen sich inhomogen zwischen den Bakterienzellen und stabilisieren das dreidimensionale, komplexe Netzwerk des bakteriellen Biofilms durch elektrostatische und ionische Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen und Van-der-Waals-Kräfte [Fleming, 2011]. Die Architektur der oralen Biofilmmatrix unterliegt abhängig von der Glycosyltransferase-Aktivität größeren Veränderungen in kürzerer Zeit als in anderen natürlichen Biofilmen [Sutherland, 2001]. Mithilfe der Glycosyltransferase synthetisiert *Streptococcus mutans* aus Saccharose langkettige Glucane, die das Netzwerk des bakteriellen Biofilms ausbilden und als extrazelluläre Energiespeicher dienen. Gleichzeitig können sich sessile Zellen durch die Produktion von Enzymen, welche spezifische Adhäsine hydrolysieren, aktiv von der Oberfläche lösen. Das Ergebnis ist ein dynamisches, funktionell organisiertes Netzwerk verschiedener Bakterienkulturen [Marsh, 2003]. Zwischen bakteriellen Aggregaten finden sich flüssigkeitsgefüllte Poren und Kanäle, die z. T. den gesamten Biofilm bis zur Schmelzoberfläche penetrieren [Wood et al., 2000].

Die Bildung der Biofilmmatrix und die gleichzeitige Bindung weiterer Bakterien bestimmen das Wachstum des bakteriellen Biofilms. Wie ausgeprägt die Biofilmbildung ist, hängt u. a. von der Lokalisation der exponierten Schmelzoberfläche in der Mundhöhle ab [Hannig, 1999]. Weitere beeinflussende Faktoren sind das Substratangebot sowie die Anzahl und Art der Plaque bildenden Bakterien. So zeigten Xiao *et al.*, dass eine Biofilmbildung in 0,1% Saccharose oder 1% Glucose im Vergleich zu 1% Saccharose sehr gering ist. Eine stark reduzierte Matrixbildung in Mischkolonien wurde außerdem in Abwesenheit von *Streptococcus mutans* nachgewiesen [Xiao et al., 2012]. Weitere beeinflussende Parameter sind die Speichelsekretionsrate, das Fluoridangebot, die Morphologie der Zähne, die Zahnstellung sowie die Motivation und

Mundhygiene des Wirtes. Grundlegende Elemente des konventionellen Biofilmmangements sind somit die mechanische Reinigung, Fissurenversiegelungen und eine zahngesunde Ernährung [Laurisch, 2008].

Trotz seiner schwammartigen Struktur stellt der bakterielle Biofilm, ähnlich wie die erworbene Pellikel, eine Diffusionsbarriere dar [Xiao et al., 2012]. Im Hinblick auf den Einsatz synthetischer Nanomaterialien im modernen Biofilmmangement spielt das Diffusionsvermögen antibakterieller Agenzien eine entscheidende Rolle. So treten z. B. punktförmige Regionen niedriger pHs im dreidimensionalen Biofilmmnetzwerk vor allem nahe der Schmelzoberfläche auf, wo sie kariöse Läsionen verursachen können [Xiao et al., 2012]. Bei der Applikation von Nanopartikeln als Wirkstoff oder als Wirkstoffträger ist es von großem Interesse, ob eine Penetration der Partikel durch das komplexe Biofilmmnetzwerk bis zur Schmelzoberfläche möglich ist.

2.1.4 Synthetische Nanopartikel in der Zahnheilkunde

Synthetische Nanopartikel < 100 nm unterschiedlicher chemischer Zusammensetzung besitzen aufgrund ihrer einzigartigen optischen, mechanischen, thermischen, elektronischen, magnetischen, antibakteriellen oder fotoaktiven Eigenschaften vielseitige Anwendungsbereiche [Wang et al., 2016]. Sie finden Verwendung in der Nahrungsmittelindustrie sowie in der Herstellung von Körperpflegeprodukten und Reinigungsmitteln. Zu den medizinischen Anwendungsbereichen von Nanopartikeln gehören u. a. antibakterielle Oberflächenbeschichtungen von Instrumenten und Implantaten, antimikrobielle Wundverbände sowie die radiologische Bildgebung [Besinis et al., 2015]. Fluoreszierende Calcium-Phosphat-Nanopartikel mit einem Durchmesser von 16 nm, dotiert mit nahinfrarot emittierendem Indocyaningrün, können beispielsweise zur diagnostischen Bildgebung von Brustkrebs angewendet werden [Altinoğlu et al., 2008]. Weiterhin können 30 nm große Nanopartikel aus Hydroxylapatit, $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$, mit hexagonaler Kristallstruktur, dotiert mit Gd^{3+} und Eu^{3+} , als biokompatibles Kontrastagens zur Infrarot Bildgebung (NIR) zusammen mit MRT und Röntgen zur Anwendung kommen [Doat et al., 2003]. Die vier Hauptanwendungsbereiche für synthetische Nanopartikel in der Zahnmedizin sind die Verwendung als Füller in dentalen Kompositen, Oberflächenbeschichtungen dentaler Implantate, antimikrobielle Agenzien und als Bestandteile von Mundpflegeprodukten [Besinis et al., 2012].

Abhängig von ihrer Größe, Beschaffenheit und Konzentration können Nanopartikel zur Verbesserung der mechanischen, radioopaken und transluzenten Eigenschaften dentaler Komposite

beitragen. Sie erhöhen die Langzeitstabilität direkter Restaurationen, reduzieren die Polymerisationsschrumpfung und helfen bei der Anpassung des Elastizitätsmoduls an die Zahnhartsubstanz [Chen, 2010]. Als Füller in konventionellen Kompositen kommen u. a. Kieselerde, Quarz und radioopake Siliciumpartikel, die auf Oxiden von Barium, Strontium, Zink, Aluminium und Zirkonium basieren, zur Anwendung [Hervás-García et al., 2006]. Ihre durchschnittliche Größe in Nanokompositen liegt bei ca. 40 nm [Besinis et al., 2015].

Weit verbreitet ist die Anwendung metallischer Nanopartikel als antibakterielle Wirkstoffe [Al-laker, 2010]. Nanopartikel aus Silber, Titandioxid, Zink sowie Zinkoxid gehören zu den beliebtesten antimikrobiellen Agenzien unter den Metallen. Ihre Wirksamkeit ist abhängig von der chemischen Beschaffenheit, der Partikelgröße und -form [Besinis et al., 2015]. So besteht eine inverse Relation zwischen Partikelgröße und antimikrobieller Aktivität, wobei Nanopartikel einer Größe zwischen 1-10 nm die größte antibakterielle Wirkung besitzen [Morones et al., 2005]. Silbernanopartikel weisen im Vergleich zu anderen metallischen Nanopartikeln die besten antibakteriellen Eigenschaften gegen kariogene Bakterienstämme auf [Besinis et al., 2014]. Des Weiteren belegen zahlreiche Studien die effektiv inhibierende Wirkung von Silbernanopartikeln auf die Biofilmbildung verschiedener Bakterienstämme [Markowska et al., 2013]. Eshed *et al.* konnten eine Reduktion der Biofilmbildung auf Schmelzoberflächen durch Beschichtung mit ZnO (85%) und CuO (70%) nachweisen [Eshed et al., 2012].

Neben antibakteriellen Eigenschaften spielen auch antiadhäsive Attribute eine wichtige Rolle im modernen Biofilmmangement. Mit dem Grundgedanken einer „*easy-to-clean-surface*“ führte eine biokompatible Oberflächenbeschichtung mit organisch/anorganischen Nanokompositen mit niedriger freier Oberflächenenergie zu stark reduzierter Biofilmbildung auf Schmelz- und Titanprüfkörpern. Weiterhin lösten sich adsorbierte Speichelproteine und Bakterien unter physiologischen Scherkräften leichter von der Prüfkörperoberfläche [Hannig et al., 2007]. Nanocluster aus Casein-Phosphopeptid stabilisiertem amorphem Calciumphosphat (CPP-ACP) können die Adhäsion kariogener Bakterien reduzieren, indem sie kompetitiv mit doppelt so hoher Affinität als Calcium an Bindungsstellen von *Streptococcus mutans* und Pellikelstrukturen adhären. Außerdem dient CPP-ACP als Calcium- und Phosphatreservoir und fördert somit die Remineralisation demineralisierter Zahnhartsubstanz [Rose, 2000].

Hydroxylapatit-Nanopartikel besitzen als Bestandteile von Zahnpasten oder Mundspüllösungen remineralisierende Eigenschaften auf Schmelz und Dentin [Hannig et al., 2013, Tschoppe et al., 2011] und können somit zur Therapie initialkariöser Läsionen verwendet werden [Huang et al., 2011]. Biomimetische Hydroxylapatit-Nanopartikel mit ähnlicher Größe wie natürliches Dentin- (20 nm) oder Schmelz-Hydroxylapatit (100 nm) können Defekte in der Zahnhartsub-

stanz reparieren [Roveri und Iafisco, 2010]. Durch die Infiltration und Obstruktion demineralisierter Dentinkanäle, beispielsweise mit Siliciumdioxid oder Hydroxylapatit [Besinis et al., 2012, Gopinath et al., 2015], können Nanopartikel außerdem zur Reduktion von Dentinhypersensibilität beitragen [Li et al., 2014]. In der dentalen Implantologie führen biokompatible Oberflächenbeschichtungen von Titanimplantaten mit Hydroxylapatit [Meirelles et al., 2008], bioaktiven Gläsern [Mistry et al., 2011] und anderen Calcium-Phosphat-Verbindungen [Choi et al., 2013] zur Verbesserung der Osseointegration.

Im Rahmen des biomimetischen Biofilmmangements stehen insbesondere biokompatible Hydroxylapatit-Nanopartikel im Fokus [Chen et al., 2005, Wang et al., 2008, Lebugle et al., 2006]. So reduzieren beispielsweise Hydroxylapatit haltige Mundspüllösungen die initiale Kolonisation von Bakterien auf einer Schmelzoberfläche und besitzen antimikrobielle Effekte für *Streptococcus mutans* [Hannig et al., 2013]. Die Interaktion von Hydroxylapatit-Nanopartikeln mit Bakterien des oralen Biofilms ist sowohl abhängig von der Partikel- bzw. Clustergröße [Hannig und Hannig, 2010b], als auch von der Ca^{2+} -Konzentration eines ggf. anwesenden wässrigen Mediums [Venegas et al., 2006]. Funktionalisierte Calcium-Phosphat-Nanopartikel fungierten weiterhin als biokompatible Träger in der photodynamischen Therapie gegen Tumorzellen und bakterielle Biofilme [Schwiertz et al., 2009].

Detaillierte Kenntnisse über die Ultrastruktur von Zahnschmelz stellen die Voraussetzung für die Synthese moderner Nanomaterialien aus Hydroxylapatit dar. Die Mikrostruktur von Zahnschmelz ist von der Organisation und Anordnung der Hydroxylapatit-Kristalle geprägt und lässt sich in sieben Hierarchieebenen untergliedern. Hexagonale Hydroxylapatit-Kristalle (Level 1) bilden Nanofibrillen von 30-40 nm Durchmesser (Level 2), welche sich längs ausgerichtet zu Fibrillen (Level 3) und dickeren Fasern von 80-130 nm Durchmesser (Level 4) zusammenlagern. Durch den Zusammenschluss dieser Fasern entstehen Prismen (Level 5), die sich zu Prismenbündeln (Level 6) zusammenlagern, welche sich in unterschiedlicher Anordnung in der gesamten Schmelzschicht (Level 7) befinden. Prismen und Interprismen ergeben das typische Schlüssellochmuster im Querschnitt mit einem Durchmesser von 6-8 μm pro Einheit [Cui und Ge, 2007]. Aus der ultrastrukturellen Schmelzanalyse lässt sich folgern, dass durch Herauslösen einzelner Fibrillen aus der Prismenstruktur durch Abrasion, Attrition oder Erosion Hydroxylapatit-Partikel <100 nm in der Mundhöhle vorkommen. Diese können mit Bestandteilen des Biofilms interagieren und möglicherweise eine physiologische Nanopartikelquelle als Vorbild für biomimetische, synthetische Nanomaterialien für Biofilmmangement und Remineralisation darstellen [Hannig und Hannig, 2010a].

2.1.5 Diffusion von Nanopartikeln in einen Biofilm

Die Frage nach dem Diffusionsverhalten von Nanopartikeln in einem Biofilm ist hinsichtlich aktueller und zukünftiger Forschungen im Bereich des modernen Biofilmmanagements von besonderem Interesse, um herauszufinden, ob Nanopartikel als Wirkstoff selbst oder als Träger von Wirkstoffen tiefere Schichten des bakteriellen Biofilms oder die Zahnoberfläche erreichen und somit therapeutisch erfolgreich eingesetzt werden können [Stewart, 2003].

Eine Untersuchung von Massentransporten von Makromolekülen in einem *in-vitro*-Modell eines oralen Biofilms beschreibt die Abhängigkeit des Diffusionsvermögens von der Molekülmasse [Thurnheer et al., 2003]. Da die Größe von Makromolekülen üblicherweise über ihr Molekulargewicht in kDa definiert wird, erfolgte zur Veranschaulichung auf der Nanoskala eine Umrechnung nach Erickson von der Molekülmasse eines globulären Proteins in dessen Volumen in nm³, woraus der Durchmesser in nm errechnet werden konnte [Erickson, 2009].

$$V(\text{nm}^3) = 1.212 \times 10^{-3}(\text{nm}^3/\text{Da}) \times M(\text{Da})$$

Dabei ist zu beachten, dass es sich aufgrund der komplexen Tertiär- bzw. Quartärstruktur von Makromolekülen lediglich um eine grobe Größeneinschätzung handelt. So untersuchten Thurnheer et al. in einem *in-vitro*-Biofilmmodell [Thurnheer et al., 2003] das Penetrationsverhalten verschiedener Makromoleküle mithilfe konfokaler Laserscanmikroskopie und kamen zu dem Ergebnis, dass lediglich Moleküle von 3 kDa (1,9 nm) nach 65,5 h Einwirkzeit in der Lage waren, den gesamten Biofilm zu penetrieren. Moleküle einer Größe von 40-70 kDa (4,5-5,5 nm) penetrierten ausschließlich die obere Hälfte des Biofilms. Eine sehr geringe Penetration wurde für Moleküle einer Größe von 100-240 kDa (6,1-8,2 nm) festgestellt. Makromoleküle einer Größe von 900 kDa (12,8 nm) sowie 20 nm große Nanokügelchen penetrierten das Biofilmmodell überhaupt nicht. Dabei bestand für Moleküle von 10-240 kDa (2,8-8,2 nm) eine antiproportionale Beziehung zwischen Diffusionsvermögen und Molekulargewicht. Ab 10 kDa (2,8 nm) abwärts wurde ein dramatischer Anstieg des Diffusionsvermögens verzeichnet.

In einer weiteren Studie [Peulen und Wilkinson, 2011] erreichten Nanopartikel <5 nm im Biofilmmodell ca. 70% der Diffusion im Vergleich zur Diffusion in Wasser. Größere Nanopartikel (57, 92, 135 nm) penetrierten den Biofilm auch in lockeren Bakterien-schichten mit einer Porengröße von ca. 50 nm nur wenig. In dichteren, tieferen Biofilmschichten mit einer Porengröße von ca. 10 nm konnte auch für kleinere Dextrane von 40-70 kDa (3,6 und 4,9 nm) nur eine geringe Diffusion verzeichnet werden.

Aufgrund zahlreicher Wechselwirkungen von Nanopartikeln mit Strukturen eines Biofilms kann ihre Diffusion nicht mit dem Fick'schen Diffusionsgesetz beschrieben werden. Beispielsweise vermindern hydrophobe Zellwände die Diffusion freier Nanopartikel innerhalb einer Biofilmmatrix [Habimana et al., 2011]. In einem Modellversuch mit Agarosegel [Fatin-Rouge et al., 2004] konnte eine kritische Partikelgröße im Verhältnis zur Porengröße von 0,4 ermittelt werden. Bei einem Faktor $<0,4$ wurde eine anomale Diffusion beobachtet, bei einem Faktor $>0,4$ eine behinderte Diffusion in Poren mit größerem Durchmesser als die Partikel bzw. eine gestoppte Diffusion in Poren mit ähnlichem Durchmesser wie die Partikel.

Die meisten Studien, die sich mit Diffusionsprozessen in bakteriellen Biofilmen beschäftigen, beschränken sich auf theoretische [Stewart, 2003] oder künstliche Biofilmmodelle [Fatin-Rouge et al., 2004] bzw. *in-vitro*-Biofilme [Thurnheer et al., 2003, Miller et al., 2013, Takenaka et al., 2009]. Im Hinblick auf eine therapeutische Anwendung synthetischer Nanopartikel bedarf es jedoch insbesondere Forschungen an klinisch relevanten Biofilmmodellen, wie oralen *in-situ*-Biofilmen [Besinis et al., 2015, Allaker und Memarzadeh, 2014]. Ferner unterscheidet sich die Diffusion komplex aufgebauter Makromoleküle aufgrund vermehrter Wechselwirkungen möglicherweise von der Diffusion widerstandsgeringerer Nanopartikel.

2.2 Ziel der Arbeit / Fragestellung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob und in welchem Umfang Nanopartikel in der Lage sind, das dreidimensionale, schwammartige Netzwerk eines oralen bakteriellen Biofilms zu penetrieren. Weiterhin sollte ermittelt werden, welchen Einfluss Einwirkzeiten und häufige Spülungen auf den Verbleib von Nanopartikeln auf bzw. im bakteriellen Biofilm besitzen.

3 Material und Methode

3.1 Materialien

3.1.1 Goldnanopartikel

Bei den in den folgenden Versuchen verwendeten Nanopartikeln handelt es sich um *in-vitro*-fluoreszierende, kugelförmige Goldnanopartikel (In vitro Fluorescent Spherical Gold NPs 10 nm, Nanopartz™ Inc., Loveland/Colorado, USA). Die dotierten Nanopartikel besitzen eine funktionalisierte Hülle (Abb. 1). Diese besteht im Inneren aus einer SiO₂-Polymerschicht. Die Fluorophore vom Typ Dy600 Texas Red 594/618 sind kovalent an die Polymerschicht gebunden. Sie erzeugen eine äquivalente Fluoreszenz von 100 Fluorophoren pro Goldnanopartikel. Die äußere Polymerschicht besitzt terminale Methylgruppen, die den Nanopartikeln eine nicht reaktive Oberfläche verleihen. Die Dicke der funktionalisierten Hülle ist geringer als die Variabilität der Größe der Nanopartikel und somit nicht messbar.

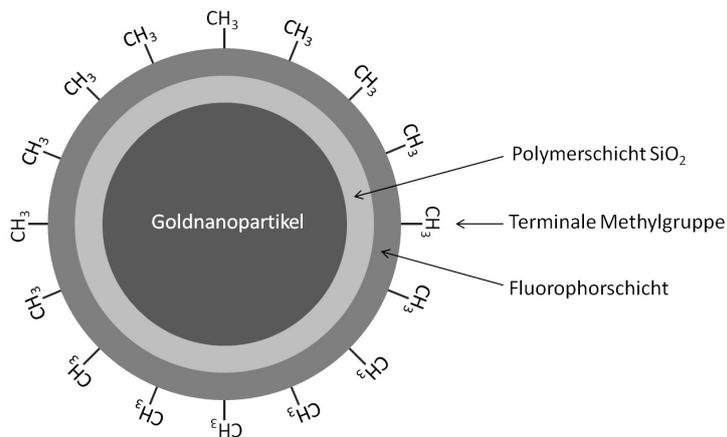


Abb. 1: Schemazeichnung eines Goldnanopartikels

Die Nanopartikel liegen als Kolloid in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) mit einem pH von 7 vor. Die Pufferlösung enthält 3,5 mg Nanopartikel pro ml. Vor jeder Entnahme von Teilmengen wurde durch ein 5-minütiges Ultraschallbad (Sonorex RK 100 H, Bandelin, Berlin, Deutschland) und anschließendes 2-minütiges Rütteln mithilfe eines Vibrationsschüttlers (Vortex-Genie 2, Scientific Industries, Inc., New York, USA) eine gleichmäßige Verteilung der Nanopartikel in der kolloidalen Suspension sichergestellt. Verdünnungen des Kolloids mit dH₂O (Aqua B. Braun, Ecotainer, 1000 ml, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland)

wurden in 1 ml Reaktionsgefäßen (Eppendorf Save-Lock Tubes 1 ml, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) jeweils frisch angesetzt.

3.1.2 Rinderschmelzprüfkörper

Die Rinderzähne zur Prüfkörperherstellung wurden aus Schlachtresten vom Schlachthof Emil Färber GmbH & Co. KG Zweibrücken bezogen. Zur Herstellung der bovinen Schmelzprüfkörper wurden die Labialflächen unterer Frontzähne der 2. Dentition verwendet. Diese bieten ausreichend große Glattflächen, die für die Produktion planer und somit polierbarer Prüfkörper benötigt werden. Die Rinderzähne wurden genau wie die Prüfkörper selbst und alle ihre Zwischenstufen bei 4 °C in 0,1% wässriger Thymollösung (Thymol 0,1% Lösung, Apotheke im Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar, Deutschland) gelagert. Das Zerteilen der Rinderzähne erfolgte unter Wasserkühlung mittels einer diamantierten Trennscheibe (Schleiftrennmaschine WOCO 50p, Conrad GmbH, Clausthal, Deutschland). Das Abtrennen der Wurzel geschah ca. 2 mm koronal der Schmelz-Zement-Grenze, um dünn auslaufende Schmelzränder zu entfernen.

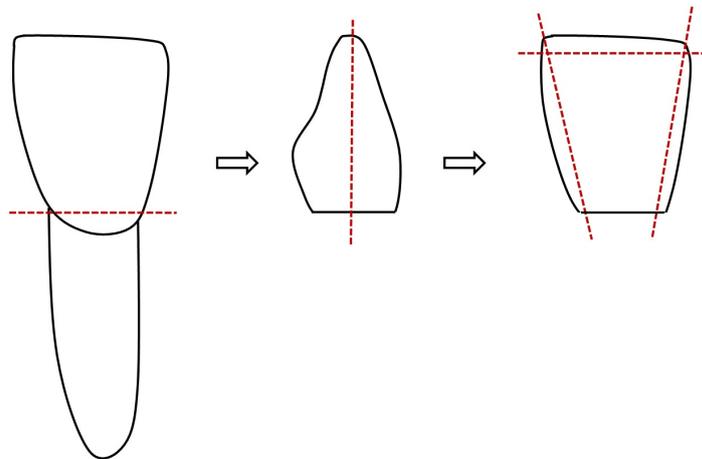


Abb. 2: Schemazeichnung zum Zerteilen der Rinderzähne

Nach dem Teilen der Krone in der Frontalebene wurden die Inzisalkante sowie die mesialen und distalen Approximalflächen abgetrennt (Abb. 2). Die Labialfläche wurde anschließend von inzisal in der Sagittalebene halbiert, wobei der zervikale Teil der Labialfläche in den meisten Fällen nicht durchtrennt wurde. Abschließend erfolgte das Abtrennen der Prüfkörperrohlinge in der Transversalebene, von inzisal beginnend. Die Anzahl der Rohlinge pro Zahn variierte je nach Zahngröße (Abb. 3).

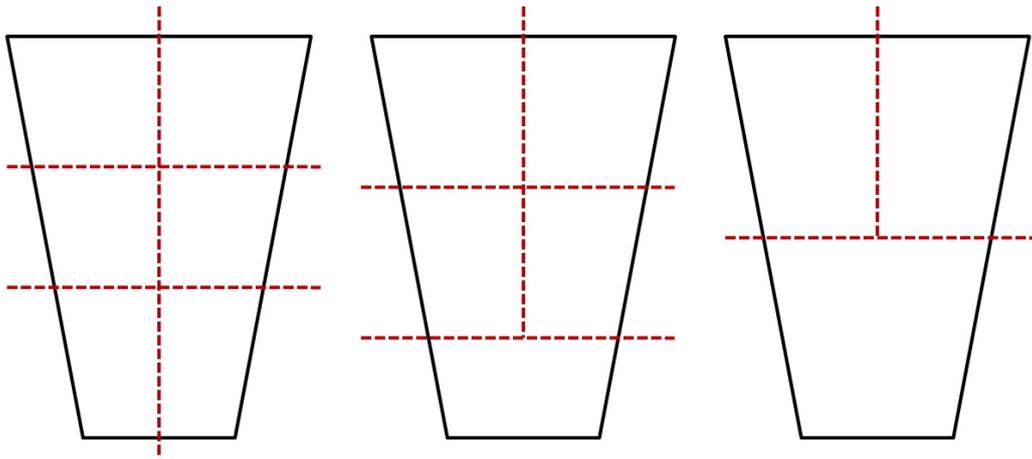


Abb. 3: Schemazeichnung zum Zerteilen der Labialflächen in Prüfkörperrohlinge

Mithilfe eines Schleif- und Poliergeräts (MetaServ™250 Twin, Buehler, Illinois, USA) wurden die Rohlinge zunächst mit einem 240er Grit Siliciumcarbid-Schleifpapier (SiC Grinding Paper 250 mm, Buehler, Illinois, USA) bei 600 U/min in ihre endgültige Form gebracht. Die obere Schmelzschicht wurde zunächst plan angeschliffen (Abb. 4).

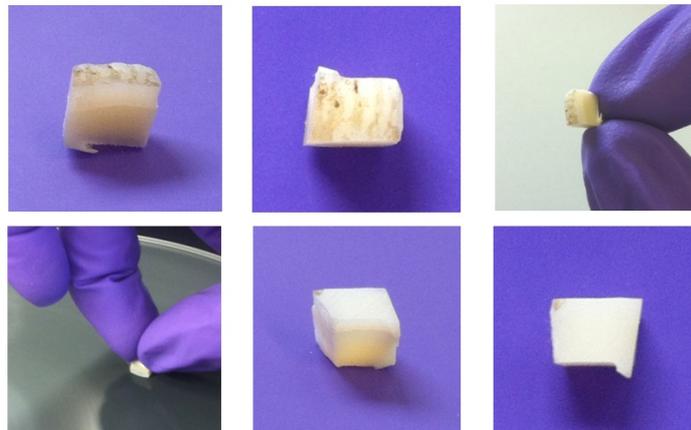


Abb. 4: Schleifen einer planen Schmelzoberfläche

Anschließend wurden die Seitenkanten im rechten Winkel und die Dentinbasis parallel zur Schmelzoberfläche angepasst. Die Dentinunterseite wurde zur Orientierung mit einem Kreuz markiert (Abb. 5). Die fertigen Prüfkörper besaßen eine rechteckige Form mit einer variablen Seitenlänge von ca. 3-6 mm und einer Schichtstärke von 1-1,5 mm. Die abschließende Politur der Schmelzoberfläche erfolgte schrittweise ebenfalls mit Siliciumcarbid-Schleifpapieren der Körnungen 600, 800, 1200, 2500 und 4000 Grit, bis eine plane und glänzende Oberfläche frei von Schleifspuren vorlag.

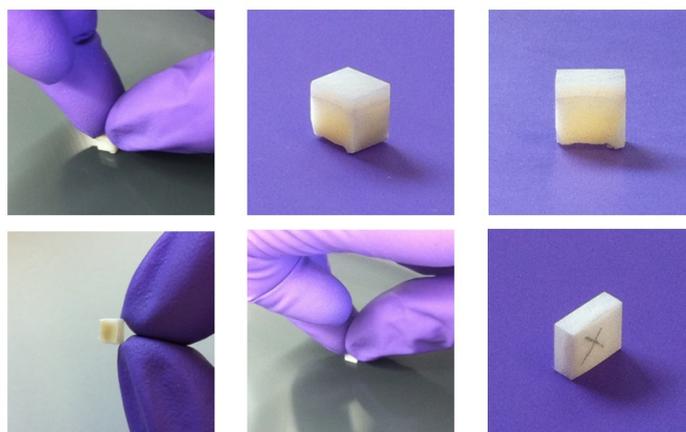


Abb. 5: Fertigstellung des Prüfkörpers

Die Prüfkörper wurden vor ihrer Verwendung einem Reinigungsprotokoll unterzogen. Um eventuell vorhandene Reste der Thymollösung von der Oberfläche zu entfernen, wurde zunächst die Hochglanzpolitur mit 4000 Grit wiederholt. Die Spülungen erfolgten in 70 ml Wiegeschalen (72x72 mm, Polyvinylchlorid PVC, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland) auf einem Wippschüttler (Rocky 1000, Labortechnik Fröbel GmbH, Lindau, Deutschland) bei niedriger Geschwindigkeitsstufe. Es folgte die Reinigung der Prüfkörper für 3 min in 3% NaOCl (Natriumhypochlorit-Lösung 3% DAC, Aug. Hedinger GmbH & Co KG, Stuttgart, Deutschland) und danach eine 4-malige Spülung für jeweils 5 min in dH₂O. Das Spülvolumen betrug jeweils 30 ml. Eine weitere Spülung mit eisgekühltem dH₂O erfolgte im Ultraschallbad für ebenfalls 5 min. Nach einer 15-minütigen Spülung mit 70% Isopropylalkohol (2-Propanol 70%, Otto Fischar GmbH & Co KG, Saarbrücken, Deutschland) in der Wiegeschale wurden die Prüfkörper erneut 5 x 5 min in dH₂O gereinigt.

3.1.3 Biofilm

Für die nachfolgenden Versuche wurden die 24-h-Biofilme von zwei Probanden mit unterschiedlicher Biofilmquantität und -qualität herangezogen. Das Studienprotokoll wurde von der Ethik-Kommission der Ärztekammer des Saarlandes, Ethik-Votum 238/03, Amendment 2012, geprüft und bewilligt. Sowohl Proband 1 (weiblich, 26 Jahre) als auch Proband 2 (männlich, 41 Jahre) waren zum Zeitpunkt der Biofilmbildung kariesfrei. Voraussetzung für die Studienteilnahme war das Fehlen von Allgemeinerkrankungen, Medikamenteneinnahmen oder speziellen Ernährungsgewohnheiten, welche die Qualität oder Quantität der Biofilmbildung hätten beeinflussen können. Zur Bildung eines bakteriellen Biofilms wurden die Prüfkörper auf

individuellen Trageschienen befestigt (Abb. 6). Diese wurden nach Abformungen von Ober- und Unterkiefer mit Alginat (Blueprint X-creme, Dentsply DeTrey, Konstanz, Deutschland) auf Superhartgipsmodellen (Fujirock EP beige, GC Germany GmbH, Bad Homburg, Deutschland) tiefgezogen (Duran 1,0x125 mm, Scheu-Dental, Iserlohn, Deutschland). Die fertig zugeschnittenen Tiefziehschienen umfassten die Zähne 17-13 und 23-27 sowie Teile des Alveolarfortsatzes und waren bukkal mit Perforationen zur Retention des Befestigungssilikons (President light body, Coltne/Whaledent GmbH und Co. KG, Langenau, Deutschland) versehen. Nach vorangegangenem Spülprotokoll wurden die gereinigten Prüfkörper mithilfe des Befestigungssilikons auf der Trageschiene montiert und anschließend zur Rehydrierung 24 h in sterilem dH₂O gelagert (Schraubröhre 50 ml, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland).



Abb. 6: Vorbereitete Trageschiene regio 24-26

Das Eingliedern der Schienen erfolgte mindestens eine Stunde nach dem letzten Zähneputzen. Die Tragedauer belief sich auf 24 h. Der Konsum von Alkohol und Nikotin sowie Mundhygienemaßnahmen waren während der gesamten Tragedauer untersagt. In den Expositionszeiten bestand Nahrungskarenz. Während der Mahlzeiten wurden die Schienen kurzzeitig in einem Hygrophor (Schraubröhre 50 ml, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) zwischengelagert. Nach dem Ausgliedern wurden die Prüfkörper auf der Schiene mit sterilem dH₂O und moderatem Wasserdruck 30 sec gespült, um desquamierte Zellen der oralen Mukosa und Nahrungsdebris von der Biofilmoberfläche zu entfernen. Das Abmontieren der Prüfkörper erfolgte mit einer Pinzette unter besonderer Rücksichtnahme auf eine unversehrte Biofilmoberfläche. Bis zur weiteren Verwendung lagerten die Prüfkörper maximal 4 h in einer sterilen Feuchtkammer.

3.2 Vorversuche

3.2.1 Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Nanopartikel

Unter Ausnutzung der fluoreszierenden Eigenschaften erfolgte die erste Qualitätskontrolle der Nanopartikel unter einem Aufrichtfluoreszenzmikroskop (Axioskop, Axio Imager A1, Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland). Ziel war es, eine gleichmäßige Verteilung der Goldnanopartikel im Kolloid zu erreichen. Die Objektträgergläser (Slides, VWR, Radnor/Pennsylvania, USA) wurden mit Ethanol (Ethanol $\geq 99,5\%$, Ph.Eur., reinst, Ethylalkohol, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) gereinigt. Anschließend wurden jeweils $10\ \mu\text{l}$ des unverdünnten Kolloids sowie der Verdünnungen 1:5, 1:10, 1:50 und 1:100 mithilfe einer Kolbenhubpipette (Transferpette, Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland) appliziert. Die Proben wurden luftgetrocknet und bei 200- bzw. 400-facher Vergrößerung mikroskopiert.

3.2.2 TEM-Analyse der Nanopartikel

Zur qualitativen Beurteilung einzelner Goldnanopartikel erfolgte eine detaillierte transmissionselektronenmikroskopische Analyse. Ziel war eine gleichmäßige Verteilung einzelner Nanopartikel im Kolloid mit geringer Tendenz zur Agglomeration. Untersucht wurden die Verdünnungen 1:10, 1:50 und 1:100. Als Träger dienten Schlitzblenden aus Kupfer (G2500C, Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland), deren Fenster mit Pioloform einer Dicke von 60-70 nm beschichtet wurden. Für die Herstellung einer 1,5% Pioloformlösung wurden 3 g Pioloform (Pioloform FN65 Pulver 10 g, Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland) in 250 ml Chloroform (Trichloromethane, Merck, Darmstadt, Deutschland) gelöst. Je $0,5\ \mu\text{l}$ einer Verdünnung der kolloidalen Nanopartikel-Suspension wurden mithilfe einer Kolbenhubpipette direkt auf eine Hälfte der Pioloformfolie der Schlitzblende aufpipettiert (Abb. 7). Nach wenigen Sekunden wurde der Überschuss am Kupferrand aufgesaugt (Light-Duty Tissue Wipers, VWR, Radnor/Pennsylvania, USA), ohne die Pioloformfolie zu berühren. Anschließend wurden die Schlitzblenden in einer Aufbewahrungskassette (B801003080, Plano, Wetzlar, Deutschland) 24 h unter dem Abzug luftgetrocknet.

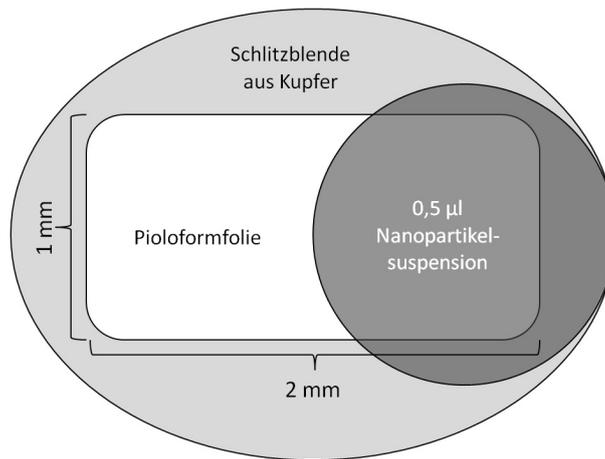


Abb. 7: Schemazeichnung Applikation der Goldnanopartikel auf den Probenträger

In einer weiteren Versuchsreihe wurde der Effekt von zusätzlichen Ultraschallzeiten auf die Auflösung von Agglomeraten untersucht. Dazu wurden die Verdünnungen 1:10 und 1:50 unmittelbar vor dem Aufbringen auf das Kupferlochgrid Ultraschallzeiten von 10 und 30 min ausgesetzt.

Das Mikroskopieren der Proben am Transmissionselektronenmikroskop (TEM Tecnai 12, Fei Company, Eindhoven, Niederlande) erfolgte bei bis zu 98.000-facher Vergrößerung.

3.2.3 Fluoreszenzmikroskopische Analyse eines 24-h-Biofilms

Zur Methodikoptimierung wurden für die Vorversuche 24-h-Biofilme von Proband 1 verwendet. Zur qualitativen und quantitativen Beurteilung des bakteriellen Biofilms erfolgte eine Analyse mithilfe der Vitalfluoreszenzmikroskopie anhand des Life/Dead-Staining-Verfahrens (LIVE/DEAD BacLigh™ Bacterial Viability Kit L7012, Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham/Massachusetts, USA). Zum Ansetzen der Färbelösung wurden die Farbstoff-Aliquots, je 1 µl SYTO 9 und Propidiumiodid, in 1000 µl 0,9% NaCl (Kochsalzlösung 0,9%, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) verdünnt. Anschließend wurden die Biofilmproben in einer 96-Well-Zellkulturplatte (Cellstar, Greiner Bio-One International GmbH, Frickenhausen, Deutschland) mit ca. 100 µl der angesetzten Färbelösung bedeckt. Die Inkubation erfolgte im Dunkeln bei Raumtemperatur für 10 min. Nach Abspülen der Färbelösung wurden die Prüfkörper mithilfe doppelseitiger Klebefolien (Leit-Tabs 12 mm, Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland) auf Objektträgergläsern montiert.

Die Untersuchung der Proben erfolgte bei 100-facher Vergrößerung mithilfe eines Auflichtfluoreszenzmikroskops. Als Kompaktlichtquelle diente eine Quecksilber-Kurzbogen-Reflektorlampe (Kompaktlichtquelle HXP 120, Leistungselektronik JENA, Jena, Deutschland). Das Fo-

tografieren der Proben erfolgte mithilfe einer am Mikroskop installierten Digitalkamera (Axio Cam MRc5, Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland). Zur Überlagerung unterschiedlicher Fluoreszenzen wurde eine mit der Kamera kompatible Bildbearbeitungssoftware (Axio Vision 29A, Carl Zeiss, D-Oberkochen) verwendet.

3.2.4 Fluoreszenz- und rasterelektronenmikroskopische Analyse der Nanopartikel auf einem 24-h-Biofilm

Ziel des folgenden Vorversuches war die Detektion der Goldnanopartikel auf einem bakteriellen Biofilm. Je 2 μ l einer 1:10 Verdünnung der Goldnanopartikel wurden auf einen 24-h-Biofilm sowie auf gereinigte Schmelzprüfkörper aufpipettiert. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur in einer 24-Well-Zellkulturplatte mit Deckel als Verdunstschutz. Die Einwirkzeit betrug 15 bzw. 30 min. Zur Entfernung von Überschüssen erfolgten jeweils drei Spülungen à 5 min mit 5 ml dH₂O in der Wiegeschale. Als Negativkontrolle und zur Beurteilung der Autofluoreszenz dienten 24-h-Biofilme ohne applizierte Goldnanopartikel. Anschließend wurden die Prüfkörper 24 h unter dem Abzug luftgetrocknet.

Ziel der fluoreszenzmikroskopischen Analyse war die Klärung der Fragestellung, ob die Goldnanopartikel unter Ausnutzung ihrer fluoreszierenden Eigenschaften auf dem bakteriellen Biofilm dargestellt werden können. Alle Prüfkörper wurden bei 400-facher Vergrößerung mikroskopiert.

Ziel der rasterelektronenmikroskopischen Analyse war es, einzelne Goldnanopartikel bildlich darzustellen und mithilfe einer EDX-Analyse zu identifizieren. Dazu wurden die Prüfkörper nach vorangegangener fluoreszenzmikroskopischer Analyse mithilfe doppelseitiger Klebefolien auf Probentellern (0,5" Aluminium Specimen Tubs, Agar Scientific, Stansted, UK) befestigt. Anschließend wurden die Proben mit Kohlenstoff (Kohlegarn, E428A, Plano, Wetzlar, Deutschland) beschichtet (Sputter Coater SCD 030, Oerlikon Balzers Coating AG, Balzers, Liechtenstein). Die Proben wurden bei 5.000-50.000-facher Vergrößerung unter einem Rasterelektronenmikroskop (XL 30 ESEM FEG, Fei Company, Eindhoven, Niederlande) im SE- und BSE-Detektor-Modus mikroskopiert.

3.2.5 Blockface-Testschliffe

Da außer des Verhaltens von Nanopartikeln auf der Oberfläche eines bakteriellen Biofilms ebenso das Penetrationsverhalten untersucht werden sollte, wurde eine Methode zur Betrachtung der Querschnittsfläche des Biofilms benötigt. Blockface-Präparate, für deren Herstellung die Prüfkörper in ein Epoxidharz eingebettet und anschließend von der Seite angeschliffen werden, eignen sich für eine REM-Analyse. Ziel des folgenden Vorversuches war es, eine saubere Grenze auf der Schliifffläche zwischen Schmelzoberfläche und Einbettmedium zu erhalten.

Für die Testschliffe wurden gereinigte und 24 h luftgetrocknete Schmelzprüfkörper ohne Biofilm verwendet. Als Einbettmedium diente Araldit, ein Epoxidharz, welches aus flüssigen Einzelkomponenten angesetzt wird. Zur Herstellung von 100 ml Araldit-Gemisch für die Einbettung wurden 26 g Araldit CY212 (Araldite Resin CY212, Agar Scientific, Stansted, UK) und 24 g DDAS (Dodecyl Succinic Anhydride, Agar Scientific, Stansted, UK) 30 min bei Raumtemperatur mithilfe eines Überkopfrührers (RW16 basic, IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen Deutschland) gemischt. Anschließend wurden 1,5 g des Beschleunigers (2,4,6-Tris[dimethylaminomethyl]phenol, Agar Scientific, Stansted, UK) hinzugefügt und für weitere 15 min vermischt. Das Gemisch sollte einige Stunden ruhen, um mögliche Luftblasen aufsteigen zu lassen.

Eine kleine Menge des Araldit-Gemischs wurde jeweils in die Kammer einer Silikoneinbettform (Pelco 106, Plano, Wetzlar, Deutschland) gegeben, sodass deren Boden vollständig mit der Einbettmasse bedeckt war. Der Prüfkörper wurde mit der Dentinseite nach unten in die Einbettform gesetzt, welche anschließend randvoll mit Araldit aufgefüllt wurde. Zur korrekten Zuordnung wurden die Proben mit REM-Nummern versehen, welche diagonal im Einbettmedium versenkt wurden. Die Probenblöcke wurden 48 h bei 65 °C im Brutschrank (Inkubator Classic.Line B28, Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland) auspolymerisiert.

Unter Verwendung eines Schleif- und Poliergeräts wurden die eingebetteten Prüfkörper im 90°-Winkel zur Schmelzoberfläche mit einem 240er Grit Siliciumcarbid-Schleifpapier bei 600 U/min bis zu Beginn des mittleren Prüfkörperdrittels angeschliffen (Abb. 8). Anschließend erfolgte die Politur der Querschnittsfläche schrittweise ebenfalls mit Siliciumcarbid-Schleifpapieren. Drei Proben wurden mit den Körnungen 800, 1200, 2500 und 4000 Grit bearbeitet.

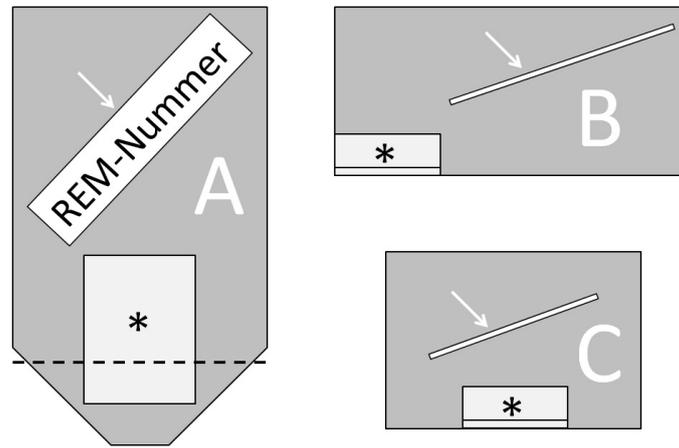


Abb. 8: Schemazeichnung Blockface-Präparat in Aufsicht (A) mit Prüfkörper (*) und Probennummer (Pfeil), Seitenansicht (B) nach Anschliff (gestrichelte Linie) und Schliifffläche (C)

Jeder Prüfkörper unterlag einer anderen Schliiffrichtung, nämlich im 90° -Winkel vom Araldit zum Schmelz, parallel zur Schmelz-Araldit-Grenze oder im 90° -Winkel vom Schmelz zum Araldit (Abb. 9). Die anderen drei Proben wurden lediglich mit 2500 und 4000 Grit poliert und ebenfalls mit drei unterschiedlichen Schliiffrichtungen bearbeitet.

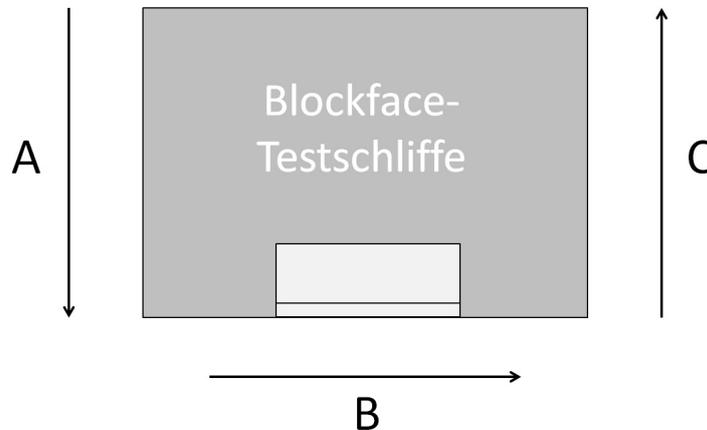


Abb. 9: Schliiffrichtungen: Araldit zu Schmelz (A), horizontal (B), Schmelz zu Araldit (C)

Anschließend wurden die Blockface-Präparate mit der angeschliffenen und polierten Fläche nach oben mithilfe doppelseitiger Klebefolien und metallischem Klebeband (Aluminisiertes Band, G265, Plano, Wetzlar, Deutschland) auf Probentellern befestigt. Dabei sollte die Querschnittsfläche parallel zum Probenteller verlaufen. Die Proben wurden mit Kohlenstoff beschichtet und bei bis zu 50.000-facher Vergrößerung rasterelektronenmikroskopisch im SE-Modus untersucht.

3.2.6 Blockface-Ätzung

Ziel des folgenden Vorversuches war die qualitative Optimierung der Schmelz-Araldit Grenze sowie die Detektion der Goldnanopartikel im Blockface-Präparat. Für die partielle Demineralisation wurden zwei Prüfkörper mit einem 24-h-Biofilm und applizierten Goldnanopartikeln verwendet, deren Oberfläche bereits in einem vorangegangenen Versuch rasterelektronenmikroskopisch untersucht worden war. Die Prüfkörper wurden mithilfe einer Pinzette vom REM-Probenteller abgenommen und anschließend in Araldit eingebettet. Das Anschleifen erfolgte parallel zur Schmelz-Araldit-Grenze mit Tendenz Araldit zu Schmelz unter Verwendung von Schleifpapieren der Körnungen 800-4000.

Für die Herstellung einer 1 M HCl-Lösung wurden 83 ml 37% HCl (Salzsäure 37% reinst, Zentrales Chemielager der Universität des Saarlandes, Saarbrücken, Deutschland) mit 1000 ml dH₂O vermischt. Eine Probe wurde 5 min in 1 M HCl gelagert und anschließend unter Druck mit dH₂O abgespült. Der Ätzvorgang wurde für 5 und 10 min wiederholt, solange bis eine negative Schmelzstufe deutlich sichtbar war (Abb. 10). Auf die Schlifffläche der zweiten Probe wurde 37,5% Phosphorsäure (37,5% Phosphoric Acid, Kerr Italia Srl., Scafati, Italien) appliziert. Auch hier erfolgten Zwischenkontrollen, bis nach 4 x 5 min Einwirkzeit eine negative Schmelzstufe sichtbar war.



Abb. 10: Prüfkörper mit Biofilm (Pfeil): Nach dem Ätzvorgang ist eine negative Schmelzstufe (A) sichtbar.

Die Querschnittsfläche der beiden Proben wurde erneut hochglanzpoliert. Anschließend wurden die Aralditblöcke auf die Probenteller montiert, mit Kohlenstoff gesputtert und rasterelektronenmikroskopisch untersucht.

3.3 Hauptversuche

3.3.1 Versuchsaufbau

Die in den Vorversuchen erfolgten Qualitätskontrollen der Materialien sowie die Methodik-Optimierung zur Detektion und bildgebenden Darstellung der Nanopartikel auf und im bakteriellen Biofilm stellten die Voraussetzungen für die nachfolgenden Hauptversuche dar. Ziel der Untersuchungen war die Klärung der Fragestellung, ob und in welchem Umfang Nanopartikel in der Lage sind, einen oralen bakteriellen Biofilm zu penetrieren. Weiterhin sollte ermittelt werden, welchen Einfluss Einwirkzeiten und häufige Spülungen auf den Verbleib von Nanopartikeln auf bzw. im bakteriellen Biofilm besitzen.

Für die Versuche wurden 24-h-Biofilme von zwei Probanden mit unterschiedlicher Biofilmquantität und -qualität herangezogen. Beide Probanden trugen Tiefziehschienen mit jeweils sechs Prüfkörpern regio 16-14 sowie 24-26. Die Biofilmproben wurden vor Applikation der Nanopartikel fixiert. Für die Herstellung einer 2% Glutaraldehyd-Fixierlösung wurden 4 ml 50% Glutaraldehyd (Glutaraldehyde Solution 50% in H₂O, Merck, Darmstadt, Deutschland) mit 0,1 M Cacodylatpuffer auf 100 ml aufgefüllt. Die Biofilmproben wurden 1 h in einer 48-Well-Zellkulturplatte mit Verdunstschutz unter dem Abzug bei Raumtemperatur in je 1 ml 2% Glutaraldehyd-Fixierlösung inkubiert. Für das Ansetzen eines 0,2 M Cacodylatpuffers wurden 21,4 g Natriumcacodylat (Cacodylatsäure Natriumsalz Trihydrat, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) in 250 ml dH₂O gelöst. Mit 0,1 M HCl wurde die Lösung auf pH 7,4-7,6 eingestellt und danach mit dH₂O auf 500 ml aufgefüllt. Vor Verwendung wurde der Cacodylatpuffer 1:1 mit dH₂O verdünnt. Die Proben wurden mit 0,1 M Cacodylatpuffer 5 x 10 min gespült, wobei beim 3. und 5. Spülvorgang jeweils ein Umsetzen in neue Zellkulturplatten erfolgte.

In einem weiteren Fixiervorgang wurden die Proben osmiert. Für die Herstellung einer Stock-Fixierlösung wurde 1 g kristallines Osmiumtetroxid (Osmium Tetroxide, Electron Microscopy Sciences, Hatfield, USA) in 25 ml dH₂O gelöst. Die Ampulle wurde gründlich entfettet und abgespült. Das Osmiumtetroxid wurde mitsamt der aufgebrochenen Ampulle in die Lösung geworfen. Die fertige Lösung wurde in einer mit Folie (Parafilm, Merck, Darmstadt, Deutschland) luftdicht verschlossenen Säureflasche im Exikator in einem gesonderten Kühlschrank bei 4 °C gelagert. Als Arbeitslösung wurde 2% Osmiumsäure verwendet, indem die Stock-Fixierlösung 1:1 mit 0,2% Cacodylatpuffer verdünnt wurde. Die Biofilmproben wurden 1 h in einer 48-Well-Zellkulturplatte mit Verdunstschutz unter dem Abzug bei Raumtemperatur in je 0,5 ml 2% Osmiumsäure inkubiert. Die Proben wurden mit 0,1 M Cacodylat-Puffer 5 x 10 min

gespült, wobei beim 3. und 5. Spülvorgang jeweils ein Umsetzen in neue Zellkulturplatten erfolgte. Neben den jeweils zwölf fixierten Biofilmproben beider Probanden wurden zur Kontrolle zusätzlich zwölf biofilmfreie Schmelzprüfkörper vorbereitet.

Die Applikation der Goldnanopartikel erfolgte in einer 96-Well-Zellkulturplatte (Abb. 11). Pro Prüfkörper wurden 50 μ l einer 1:10 Verdünnung aufpipettiert, sodass die gesamte Oberfläche der Probe vollständig bedeckt wurde. Die Einwirkzeit betrug 10 bzw. 30 min.

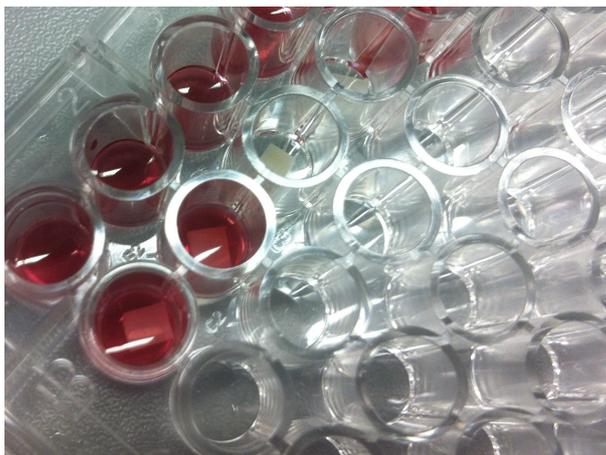


Abb. 11: Applikation der Goldnanopartikel (rote Suspension) auf Biofilmproben

Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur mit Deckel als Verdunstschutz. Pro Prüfkörper wurde ein Spülvolumen von 1 l dH₂O in einem Messbecherglas bereitgestellt. Die Prüfkörper wurden nach Ende der Einwirkzeit zur Entfernung überschüssiger Flüssigkeit kurz auf Papierwischtüchern abgelegt und anschließend mithilfe einer Pinzette vertikal in die Spüllösung eingetaucht. Pro Proband und Einwirkzeit wurden zwei Prüfkörper jeweils einmal eingetaucht, zwei jeweils 20 Mal, und zwei Prüfkörper wurden nach einmaliger Spülung 24 h in 10 ml dH₂O bei Raumtemperatur mit Verdunstschutz gelagert. Alle Prüfkörper wurden 24 h unter dem Abzug luftgetrocknet.

3.3.2 REM-Analyse der Biofilmoberfläche

Die Prüfkörper wurden mithilfe doppelseitiger Klebefolien auf Probentellern befestigt und anschließend mit Kohlenstoff beschichtet. Die REM-Analyse erfolgte bei 1.000-50.000-facher Vergrößerung im gemischten Detektormodus mit 30% SE und 70% BSE.

3.3.3 Statistische Auswertung der Biofilmoberfläche

Die quantitative Auswertung der Biofilmoberfläche erfolgte mit der kommerziellen Software MATLAB 8.6 (R2015b) des Unternehmens The MathWorks, Inc. (Massachusetts, USA). Ausgezählt wurden ausschließlich freie Goldnanopartikel anhand von REM-Aufnahmen bei 10.000-facher Vergrößerung. Die Größe der ausgezählten Fläche betrug $100 \mu\text{m}^2$.

3.3.4 REM-Analyse der Biofilmquerschnittsfläche

Zur Analyse der Querschnittsfläche wurden die Prüfkörper von den Probentellern entnommen und in Araldit eingebettet (Abb. 12).



Abb. 12: Prüfkörper und Probennummern vor Einbettung in Araldit

Der Anschliff der Blockface-Präparate erfolgte im 90° -Winkel zur Schmelzoberfläche und parallel zur Schmelz-Araldit-Grenze mit Schliff tendenz Araldit zu Schmelz. Nach einer Hochglanzpolitur der Schliffflächen wurden die Blöcke 1 h in 1 M HCl angeätzt, sodass im Schmelzbereich eine deutliche negative Stufe sichtbar wurde. Die Schlifffläche wurde mit dH_2O unter Druck für 10 sec gespült. Nach einer abschließenden Hochglanzpolitur mit 4000 Grit wurden die Blockface-Präparate 5 min im eisgekühlten Ultraschallbad in dH_2O gereinigt. Die Proben wurden mit der Schlifffläche nach oben mithilfe doppelseitiger Klebefolien und aluminisiertem Klebeband auf Probentellern befestigt und mit Kohlenstoff beschichtet (Abb. 13). Die Analyse im REM erfolgte mit 30% SE und 70% BSE bei 1.000-50.000-facher Vergrößerung.



Abb. 13: Gesputtertes Blockface-Präparat mit sichtbarer negativer Schmelzstufe (Pfeil)

3.3.5 REM-Analyse der Biofilmunterseite

Zur Analyse der Biofilmunterseite wurden die Blockface-Präparate von den Probestellern gelöst und 1 h in 1 M HCl gelagert. Unter einem Lichtmikroskop wurden mithilfe einer feinen Pinzette Dentin- und Aralditreste von der Prüfkörperunterseite entfernt. Es waren noch zwei Ätzwgänge à 30 min notwendig, um alle sichtbaren Schmelzreste von der Biofilmunterseite zu entfernen. Die obere Seite des Aralditblocks wurde parallel zur Biofilmschicht geschliffen. Abschließend erfolgte eine Reinigung der Proben im eisgekühlten Ultraschallbad in dH₂O für 5 min. Die Araldit-Blöcke wurden mit der Biofilmunterseite nach oben mithilfe doppelseitiger Klebefolien auf Probestellern befestigt (Abb. 14) und mit Kohlenstoff beschichtet. Die Analyse im REM erfolgte mit 30% SE und 70% BSE bei 1.000-100.000-facher Vergrößerung.

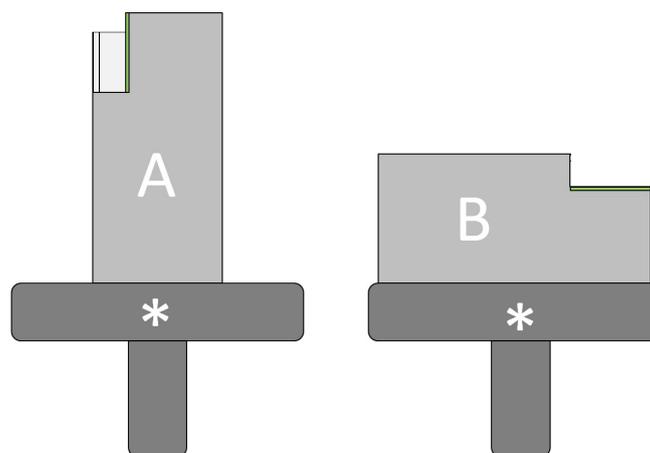


Abb. 14: Positionierung des Aralditblocks auf dem Probesteller (*) zur Analyse der Biofilmquerschnittsfläche (A) und der Biofilmunterseite (B)

3.3.6 TEM-Analyse der Biofilmquerschnittsfläche

Zur Herstellung von Ultradünnschnitten für die TEM-Analyse erfolgte eine Gegenbettung der weggeätzten Schmelzareale mit Araldit. Nach Aushärtung der Proben wurden mithilfe eines Ultramikrotoms (Leica EM UC7, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) und einem Diamantmesser (Diamond Knives Ultra 45°, DiATOME, Hatfield, USA) Ultradünnschnitte angefertigt. Diese wurden im Wasserbad auf Kupfer-Schlitzblenden übertragen, welche mit Pioloformfolie beschichtet waren. Die Schnittkontrastierung erfolgte mit Uranylacetat und Bleicitrat. Für die Herstellung einer 2% Uranylacetat-Lösung wurden 2 g Uranylacetat (Uranyl Acetate Dihydrate, Merck, Darmstadt, Deutschland) in 100 ml dH₂O gelöst. Je Schlitzblende wurden 60 µl Uranylacetat und 4 x 60 µl dH₂O auf eine saubere Parafilmunterlage pipettiert. Die Schlitzblende wurde mit der Oberseite nach unten auf den Tropfen Uranylacetat gelegt und unter einer Schutzabdeckung 10 min inkubiert. Anschließend wurden die Proben vier Mal mit dH₂O auf die gleiche Weise gewaschen. Für die Herstellung einer Bleicitrat-Lösung nach Reynold wurden 1,33 g Bleinitrat und 1,76 g Zitronensäure mit 30 ml dH₂O vermischt. Anschließend wurde 1 M NaOH (Suprapurum, Zentrales Chemielager der Universität des Saarlandes, Saarbrücken, Deutschland) zugegeben, bis die Lösung einen pH-Wert von 11,95 erreicht hatte. Die Lösung wurde mit dH₂O auf 50 ml aufgefüllt. Die Inkubationszeit mit Bleicitrat betrug 5 min. Zum Schluss wurden die Proben erneut vier Mal mit dH₂O gewaschen. Die Flüssigkeitsüberschüsse wurden am Kupferrand aufgesaugt. Anschließend wurden die Proben luftgetrocknet. Die Ultradünnschnitte wurden bei 9.900-105.000-facher Vergrößerung transmissionselektronenmikroskopisch analysiert.

4 Ergebnisse

4.1 Vorversuche

4.1.1 Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Nanopartikel

Durch die funktionalisierte Hülle konnten Goldnanopartikel mit dem Fluoreszenzmikroskop detektiert werden, jedoch ausschließlich größere Agglomerate (Abb. 15). Mit steigender Verdünnung traten weniger und kleinere Agglomerate auf. Einzelne Goldnanopartikel konnten aufgrund der zu geringen Vergrößerung nicht detektiert werden. Zur Darstellung einzelner Nanopartikel mussten für die weiteren Versuche elektronenmikroskopische Verfahren unter Nichtberücksichtigung der fluoreszierenden Eigenschaften zur Anwendung kommen.

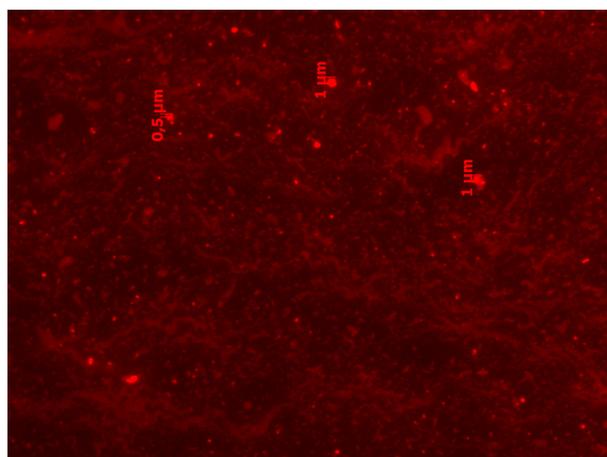


Abb. 15: Fluoreszenzmikroskopische Analyse einer 1:10-Verdünnung

4.1.2 TEM-Analyse der Nanopartikel

Die Goldnanopartikel stellten sich aufgrund ihrer Dichte schwarz und kontrastreich dar. Ihre Form war sphärisch und die Durchmesser waren gleichmäßig. Es lagen sowohl freie (Abb. 16) als auch an sphärische Träger gebundene Nanopartikel (Abb. 17) in unterschiedlicher Verteilung vor. Die Größe der Goldnanopartikel lag bei ca. 20 nm, die Größe der Trägerpartikel bei ca. 150 nm.

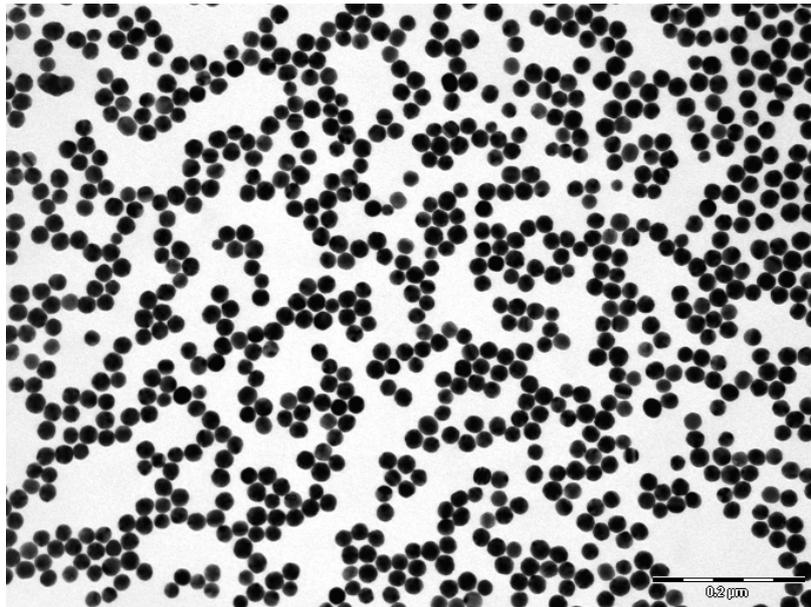


Abb. 16: Freie Goldnanopartikel

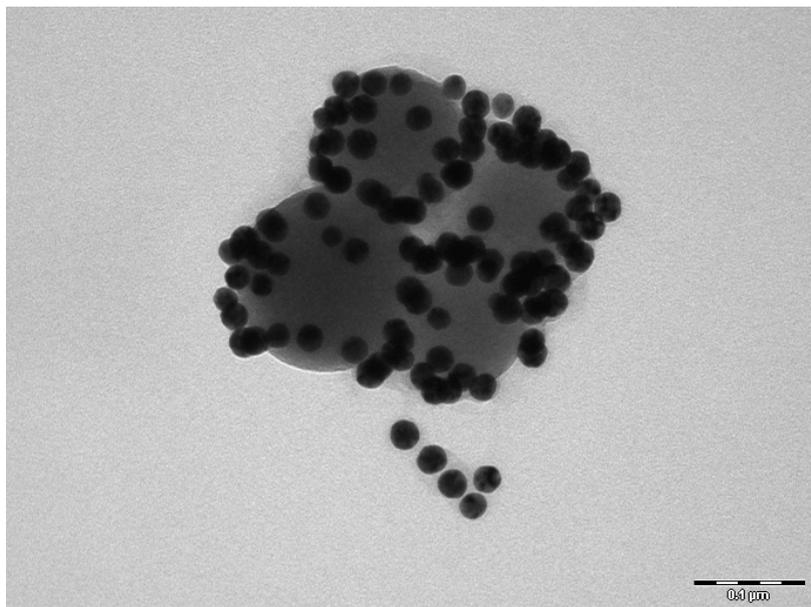


Abb. 17: Gebundene Goldnanopartikel auf sphärischen Trägerpartikeln

Die Verdünnungen 1:10 und 1:50 ohne zusätzliche Ultraschallbehandlung wiesen die größte Dichte an freien Goldnanopartikeln auf. Zusätzliche Ultraschallzeiten führten nicht zu einem Ablösen der gebundenen Goldnanopartikel von Trägerpartikeln und somit zur Auflösung von Konglomeraten.

4.1.3 Fluoreszenzmikroskopische Analyse eines 24-h-Biofilms

In der fluoreszenzmikroskopische Analyse der Biofilme von Proband 1 fanden sich nur wenige bakterielle Zellverbände auf der Prüfkörperoberfläche (Abb. 18).

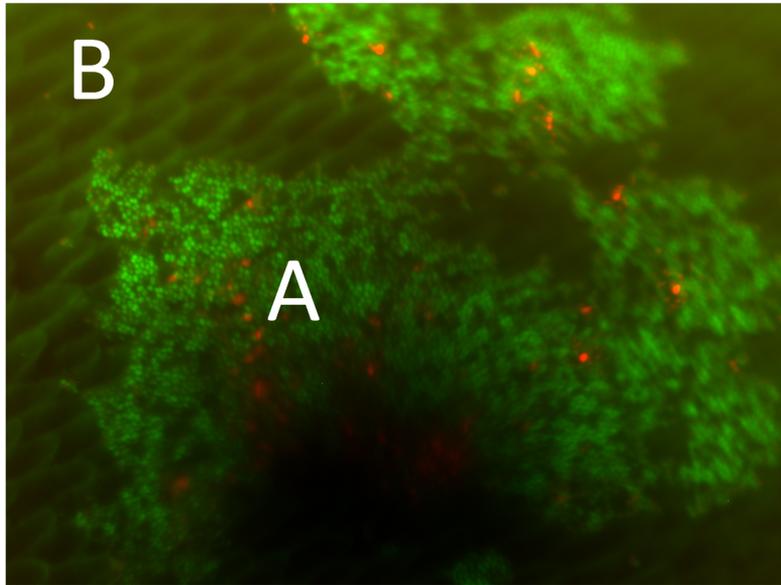


Abb. 18: Bakterieller Zellverband (A) auf der Schmelzoberfläche (B)

4.1.4 Fluoreszenz- und rasterelektronenmikroskopische Analyse der Nanopartikel auf einem 24-h-Biofilm

Im Gegensatz zur fluoreszenzmikroskopischen Analyse der Nanopartikel auf einem Objektträgerglas waren auf den Prüfkörpern keine Agglomerate der Nanopartikel zu erkennen. Es konnte kein Unterschied in der Fluoreszenz von Prüfkörpern mit und ohne Applikation von Nanopartikeln festgestellt werden.

Die rasterelektronenmikroskopische Analyse im SE-Detektormodus zeigte das typische Bild einer heterogenen Biofilmoberfläche. Auf der Biofilmoberfläche der Proben mit applizierten Goldnanopartikeln fanden sich wie in den TEM-Analysen Agglomerate der globulären Trägerpartikel mit einem Durchmesser von ca. 150 nm. In der EDX-Analyse konnte ein hoher Goldgehalt dieser Agglomerate festgestellt werden (Abb. 19). Erst durch Einsatz des BSE-Detektormodus konnten einzelne Goldnanopartikel auf der Oberfläche der Träger erfolgreich dargestellt und mithilfe einer EDX-Analyse identifiziert werden (Abb. 20). Die Trägerpartikel konnten anhand ihres hohen Siliciumgehaltes in der EDX-Analyse als SiO_2 identifiziert werden.

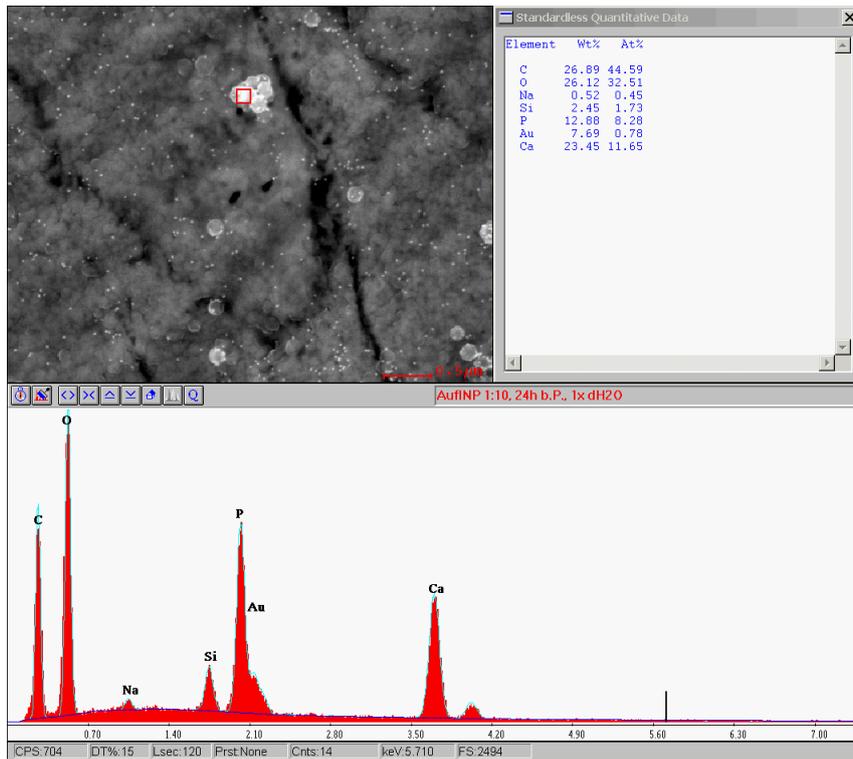


Abb. 19: EDX-Analyse: Nachweis von Gold im Bereich der Cluster

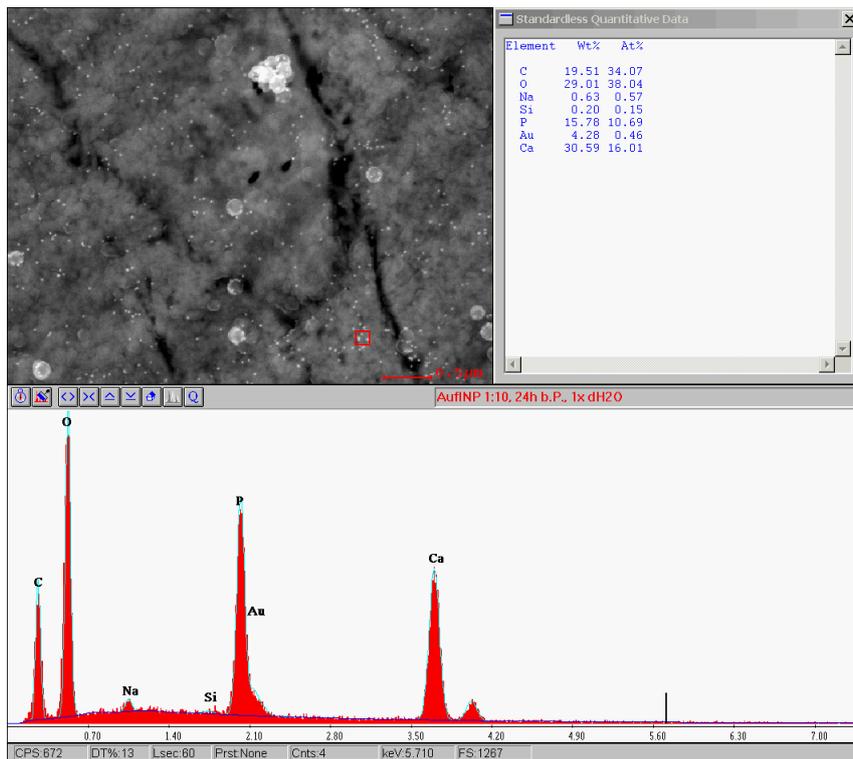


Abb. 20: EDX-Analyse: Nachweis von Gold im Bereich freier Nanopartikel

4.1.5 Blockface-Testschliffe

Die REM-Analyse der Schliifflächen der Blockfacepräparate ergab folgende Grenzflächenbeschaffenheiten: Das Schleifen vom Schmelz zum Araldit führte zu einer deutlichen Spaltbildung im Bereich der Schmelz-Araldit-Grenze mit Ausrissen von Schmelzpartikeln (Abb. 21 a). Der horizontale Schliff parallel zur Schmelz-Araldit-Grenze ergab eine glatte Schmelz-Araldit-Grenze ohne Spaltbildung oder Versprengungen von Partikeln (Abb. 21 b). Durch das Schleifen vom Araldit zum Schmelz entstand eine glatte Schmelz-Araldit-Grenze ohne Spaltbildung mit wenigen Aralditausrissen (Abb. 21 c). Ein Unterschied zwischen den Proben, welche mit den Körnungen 800-4000 und jenen, die lediglich mit 2500-4000 Grit bearbeitet wurden, konnte nicht beobachtet werden.

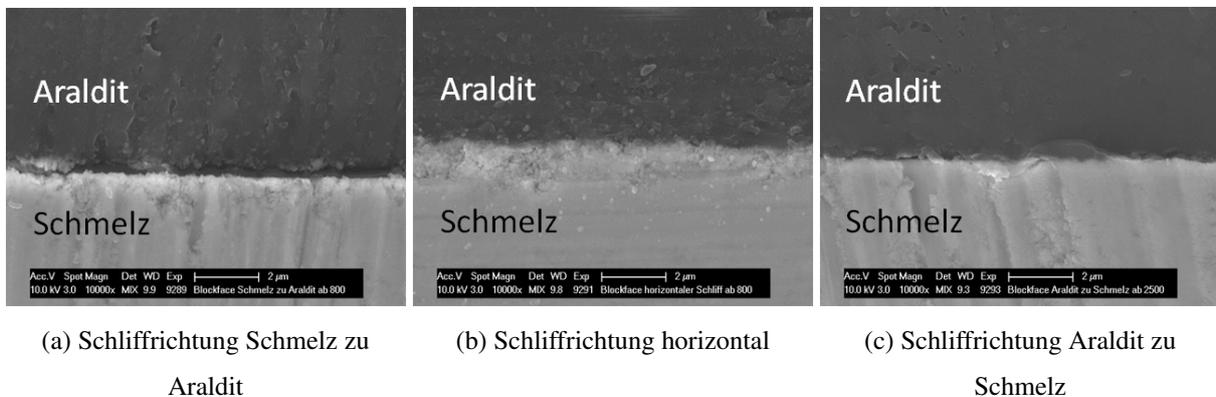
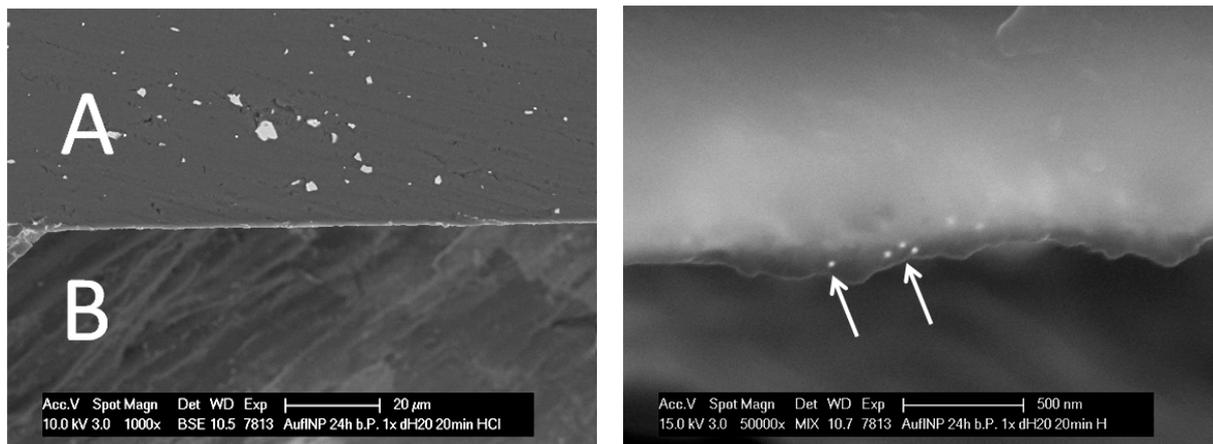


Abb. 21: Blockface-Testschliffe

4.1.6 Blockface-Ätzung

Sowohl die mit HCl als auch die mit Phosphorsäure geätzten Proben wiesen in der REM-Analyse saubere Grenzflächen auf (Abb. 22 a). Im oberen Bildbereich (A) ist die angeschliffene und polierte Fläche des Aralditblocks zu sehen. Die negative Schmelzstufe (B) ist im unteren Bildbereich sichtbar und liegt außerhalb der Fokusebene. Nahe der Aralditkante konnten Goldnanopartikel (Pfeile) mithilfe des BSE-Modus detektiert (Abb. 22 b) und anhand einer EDX-Analyse identifiziert werden.



(a) Übersichtsaufnahme mit Aralditfläche (A) und negativer Schmelzstufe (B)

(b) Detailaufnahme der Aralditkante mit Goldnanopartikeln (Pfeile)

Abb. 22: Geätztes Blockface-Präparat

4.2 Hauptversuche

4.2.1 REM-Analyse der Biofilmoberfläche

Auf der Schmelzoberfläche beider Probanden konnten unterschiedliche Biofilmqualitäten definiert werden. Bei Proband 1 war ein Großteil der Schmelzoberfläche von einer dünnen Pellikelschicht bedeckt, sodass die Schmelzstruktur noch zu erkennen war. Außerdem fanden sich Areale mit dickeren Pellikelschichten, deren komplexere, globuläre Struktur die Schmelzoberfläche maskierte. Einige Proben wiesen bakterielle Aggregate auf, die sich inselartig auf dickeren Pellikelschichten befanden (Abb. 23). Bei Proband 2 fanden sich vorwiegend dickere, komplexe Pellikelschichten mit zahlreichen, teils großflächigen, bakteriellen Aggregaten (Abb. 24).

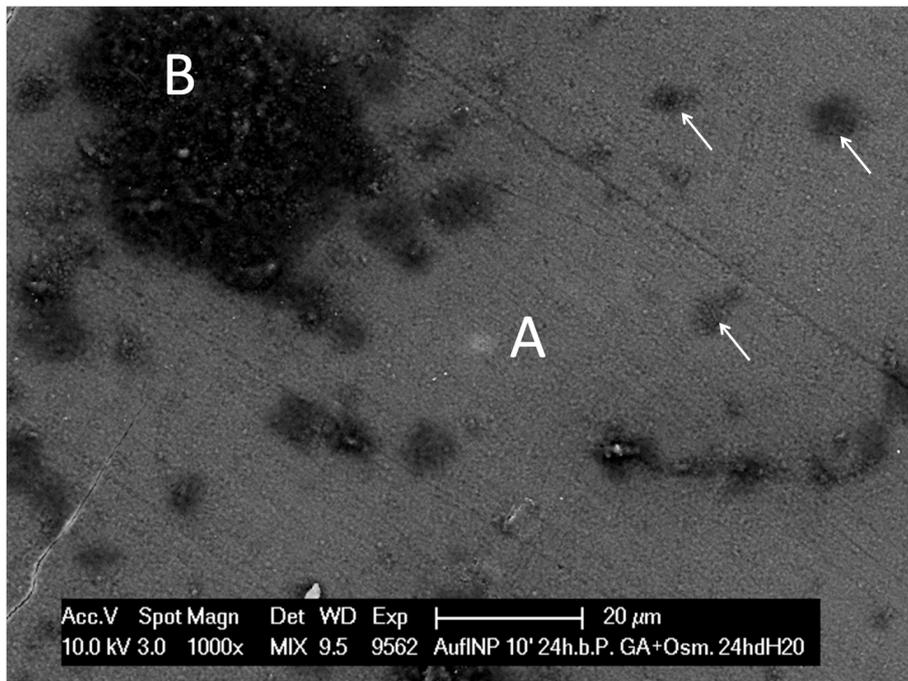


Abb. 23: Übersichtsaufnahme 24-h-Biofilm Proband 1: Typisches Bild einer dünnen Pellikelschicht (A) mit inselartigen dickeren Pellikelschichten (Pfeile) und bakteriellen Aggregaten (B)

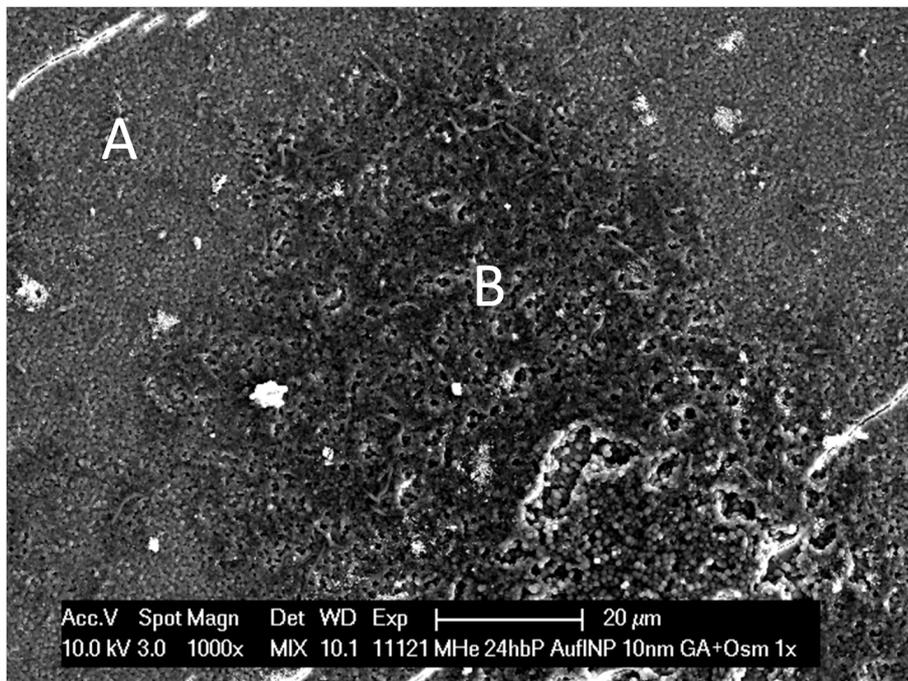


Abb. 24: Übersichtsaufnahme 24-h-Biofilm Proband 2: Typisches Bild einer dicken Pellikelschicht (A) mit großflächigen bakteriellen Aggregaten (B)

Die Goldnanopartikel hoben sich hell und kontrastreich vom Untergrund ab. In Übersichtsaufnahmen bei 1000-facher Vergrößerung waren größere Konglomerate von an SiO_2 -Träger gebundenen Nanopartikeln zu erkennen. Die meisten Konglomerate fanden sich bei den Proben mit 30 min Einwirkzeit und einmaliger Spülung. Ab 10.000-facher Vergrößerung konnten freie

Nanopartikel auf der Oberfläche des Biofilms dargestellt werden. Ihre räumliche Verteilung war sowohl auf Pellikelstrukturen (Abb. 27) als auch auf bakteriellen Aggregaten (Abb. 28) gleichmäßig. Auf den Prüfkörpern mit 30 min Einwirkzeit (Abb. 26) waren deutlich mehr Nanopartikel zu sehen, als auf den Prüfkörpern mit 10 min Einwirkzeit (Abb. 25), insbesondere in Arealen mit dünneren Pellikelschichten. Ein Auswaschphänomen durch häufige Spülungen konnte nicht beobachtet werden (Abb. 29, Abb. 30). Im Vergleich zu einmalig gespülten Prüfkörpern (Abb. 26), fanden sich auf Prüfkörpern, welche nach einmaliger Spülung 24 h in dH₂O gelagert worden waren, auf dünneren Pellikelschichten deutlich weniger Nanopartikel (Abb. 31). In Bereichen dickerer Pellikelschichten und bakterieller Zellaggregate schienen sich die Nanopartikel nach 24 h angehäuft zu haben (Abb. 32, Abb. 33). Ein Eindringen oder eine bevorzugte Ansammlung von Nanopartikeln in Poren des Biofilmmnetzwerkes konnte nicht beobachtet werden (Abb. 34). Auf den Kontrollproben ohne Biofilm konnten freie Goldnanopartikel auf der Schmelzoberfläche gefunden werden (Abb. 35). Ihre räumliche Verteilung war ungleichmäßig. Eine bevorzugte Ansammlung von Nanopartikeln konnte in Abhängigkeit von der Politur- und Oberflächenqualität auf raueren Schmelzarealen beobachtet werden (Abb. 36).

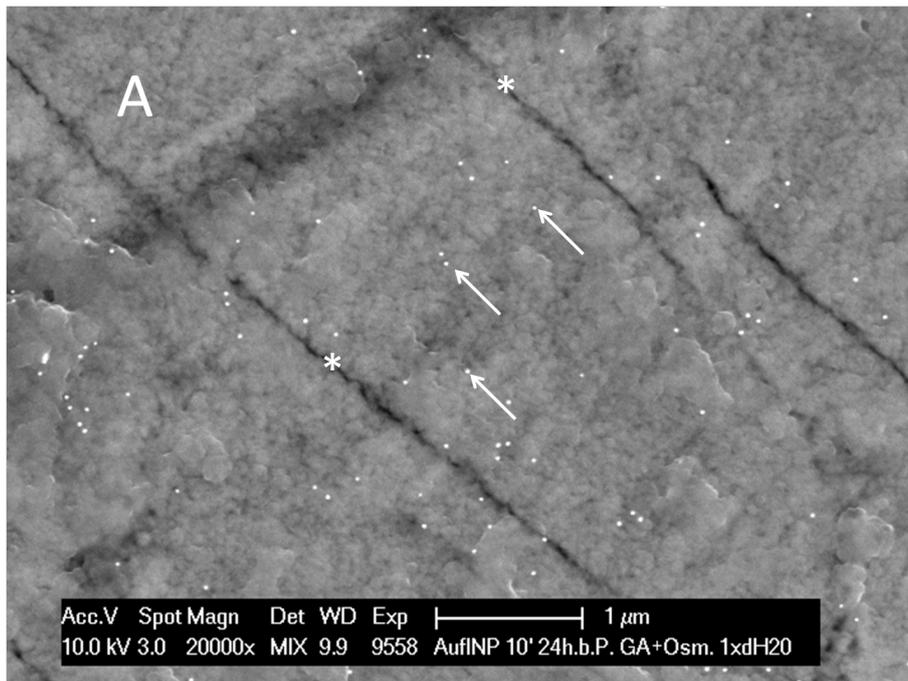


Abb. 25: Gleichmäßig verteilte Goldnanopartikel (Pfeile) auf einer dünnen Pellikelschicht (A) nach 10 min Einwirkzeit und einmaliger Spülung. Die Prismenstruktur des Schmelzes ist erkennbar (*).

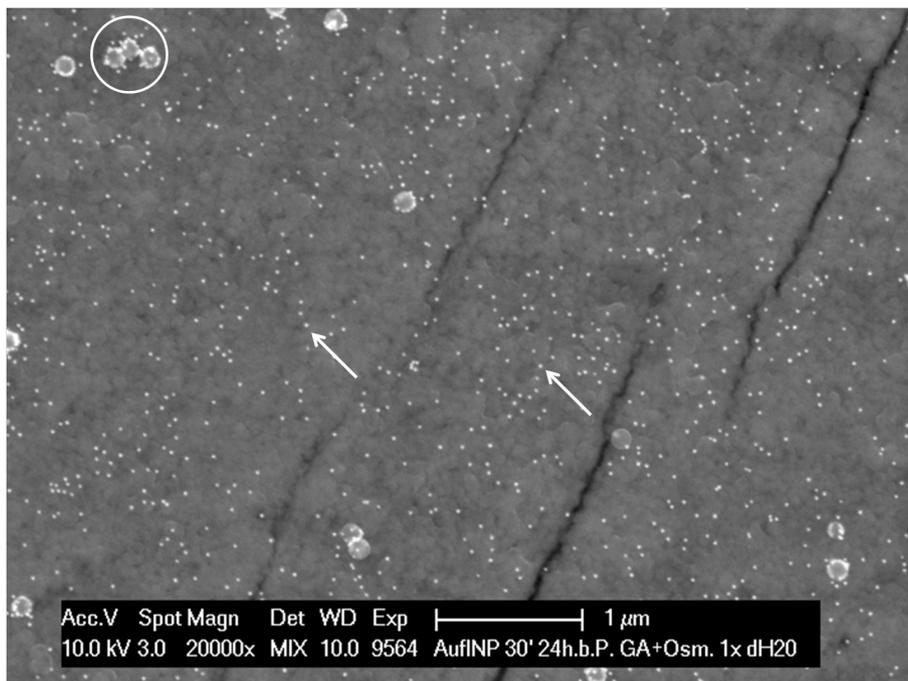


Abb. 26: Nach 30 min Einwirkzeit befinden sich deutlich mehr Nanopartikel (Pfeile) mit Tendenz zur Clusterbildung (Kreis) auf der Pellikeloberfläche.

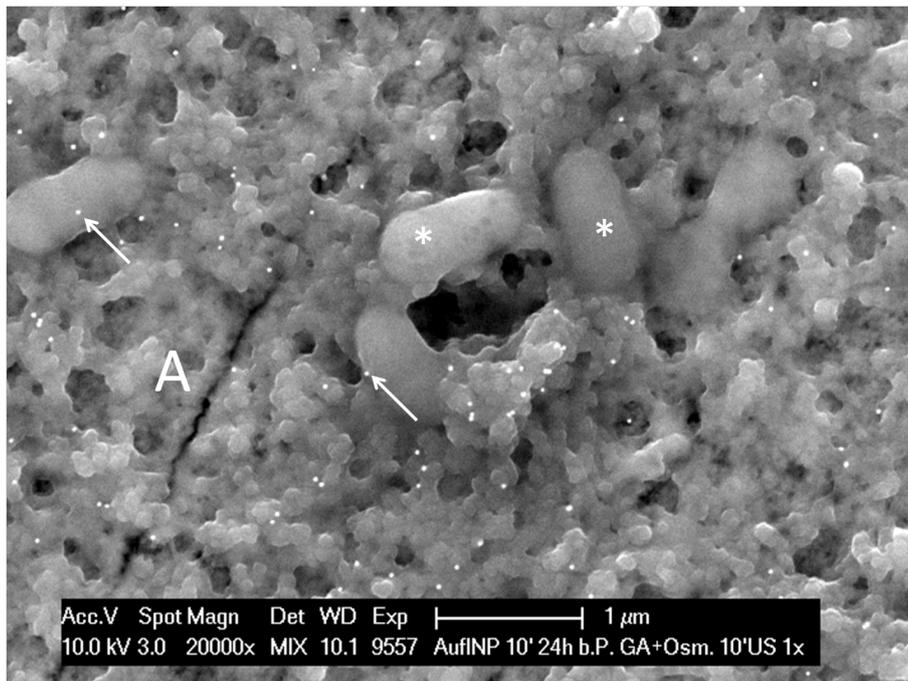


Abb. 27: Nanopartikel (Pfeile) auf dicker Pellicelschicht mit heterogener, globulärer Oberflächenstruktur (A) und einzelnen Bakterienzellen (*)

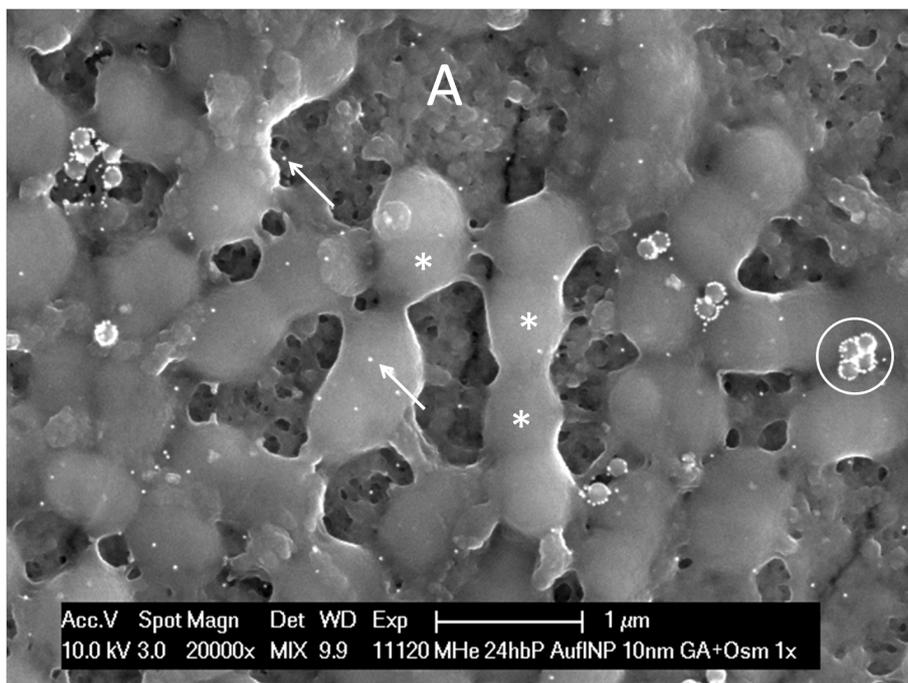


Abb. 28: „Early colonizer“ (*) besiedeln die Pellicelschicht (A). Nach 10 min Einwirkzeit und einmaliger Spülung sind freie Goldnanopartikel (Pfeile) und gebundene Goldnanopartikel (Kreis) zu erkennen.

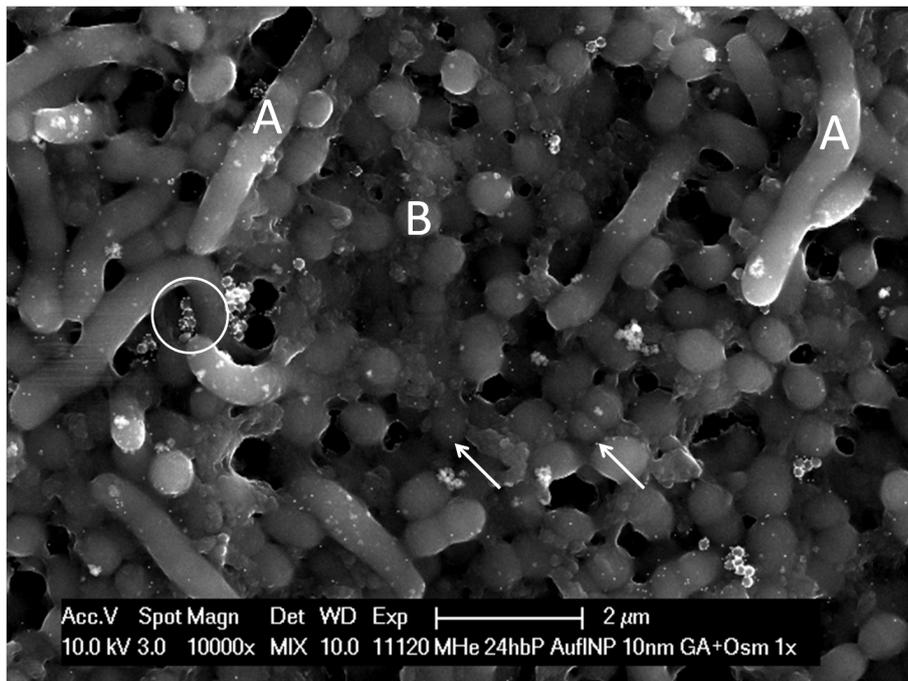


Abb. 29: Komplexes, dreidimensionales Netzwerk aus Stäbchen (A) und Kokken (B) mit Goldnanopartikeln (Pfeile) nach 10 min Einwirkzeit und einmaliger Spülung

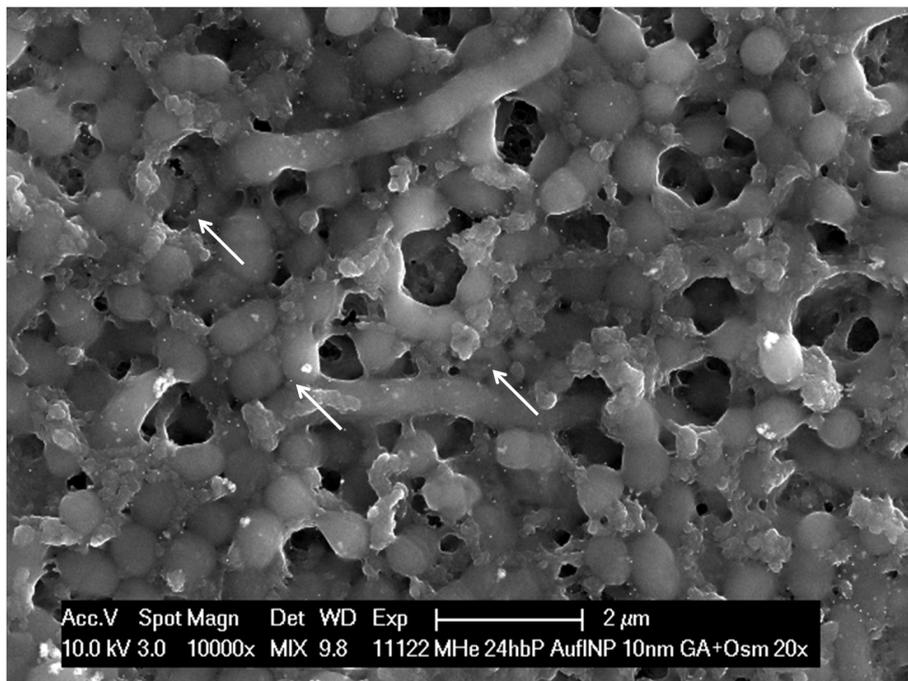


Abb. 30: Nach 20-facher Spülung befinden sich immer noch zahlreiche Goldnanopartikel auf der Biofilmoberfläche.

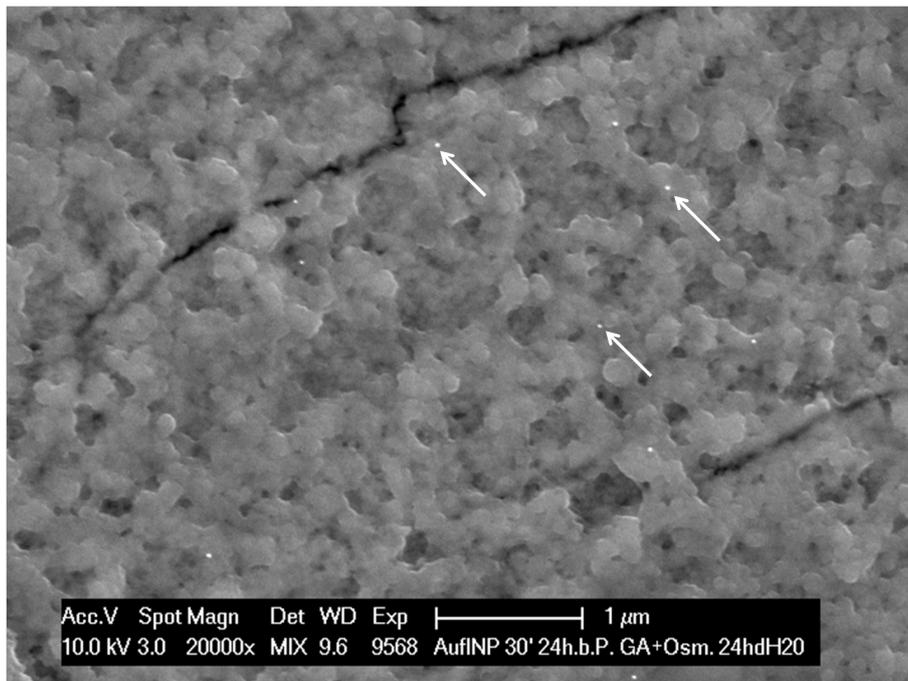


Abb. 31: Nach 24 h finden sich auch bei den Proben mit 30 min Einwirkzeit deutlich weniger Nanopartikel (Pfeile) auf dünneren Pellikelschichten.

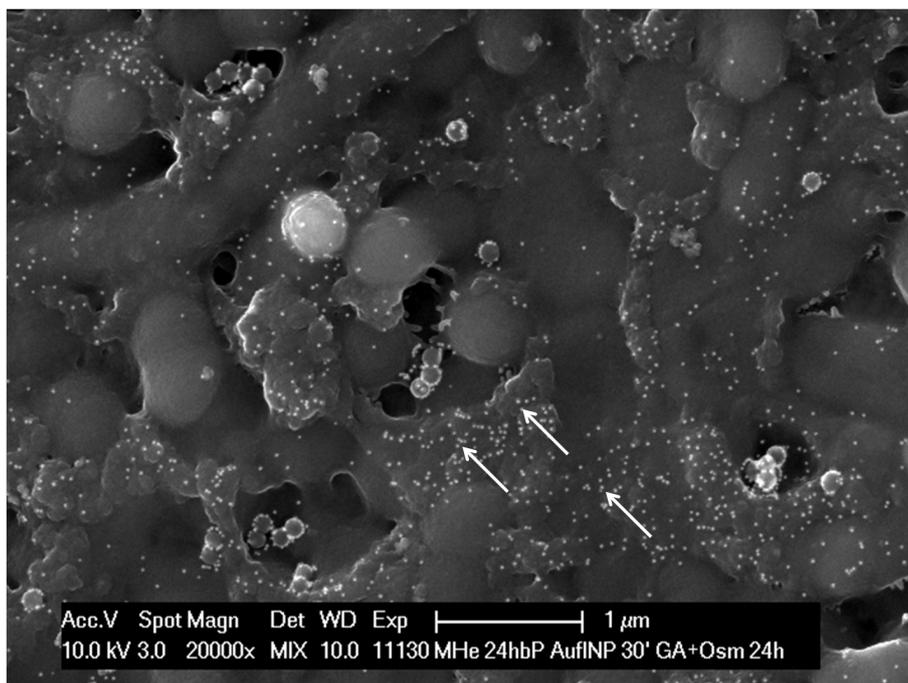


Abb. 32: In Regionen bakterieller Aggregate lässt sich nach 24 h eine Anhäufung von Nanopartikeln (Pfeile) feststellen.

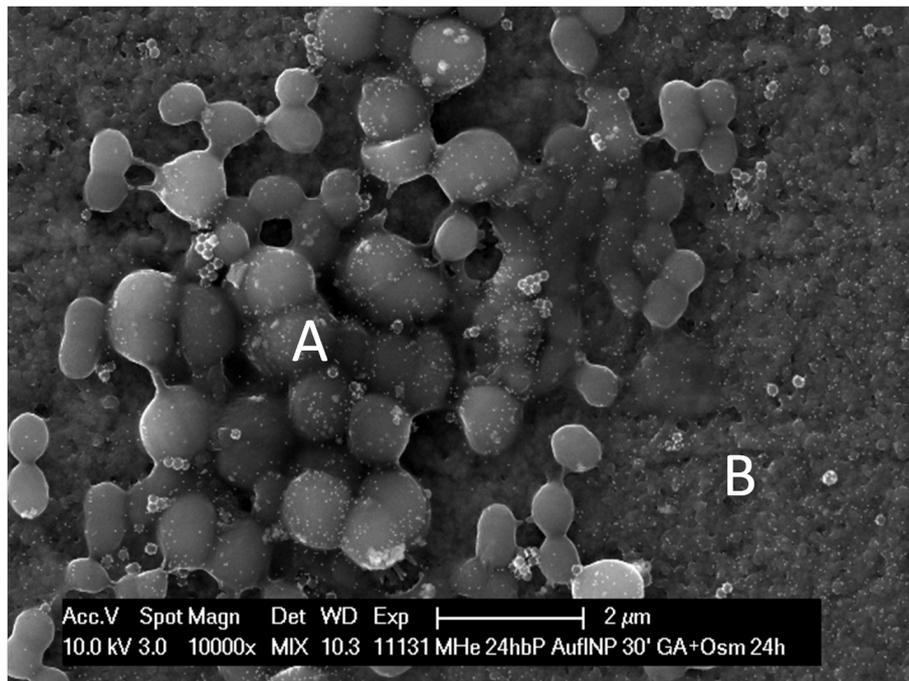


Abb. 33: Genau wie auf bakteriellen Aggregaten (A) häufen sich die Nanopartikel nach 24 h auf dickeren Pellikelschichten (B).

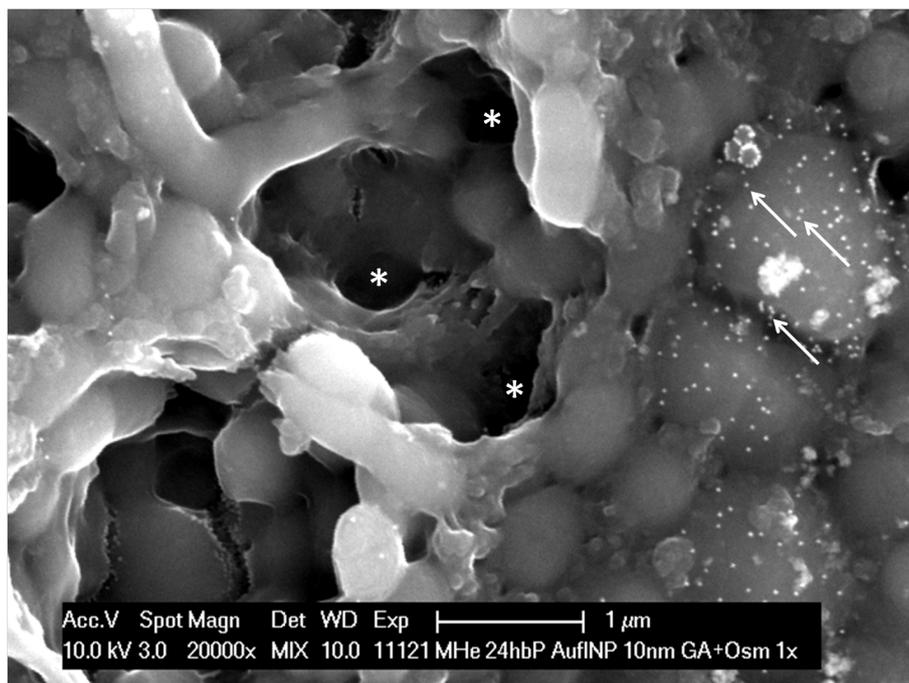


Abb. 34: Es besteht keine Diffusionstendenz in Poren und Kanäle (*) des Biofilmnetzwerks. Stattdessen ist eine Anhäufung von Nanopartikeln (Pfeile) an einzelnen Bakterienzellen zu erkennen.

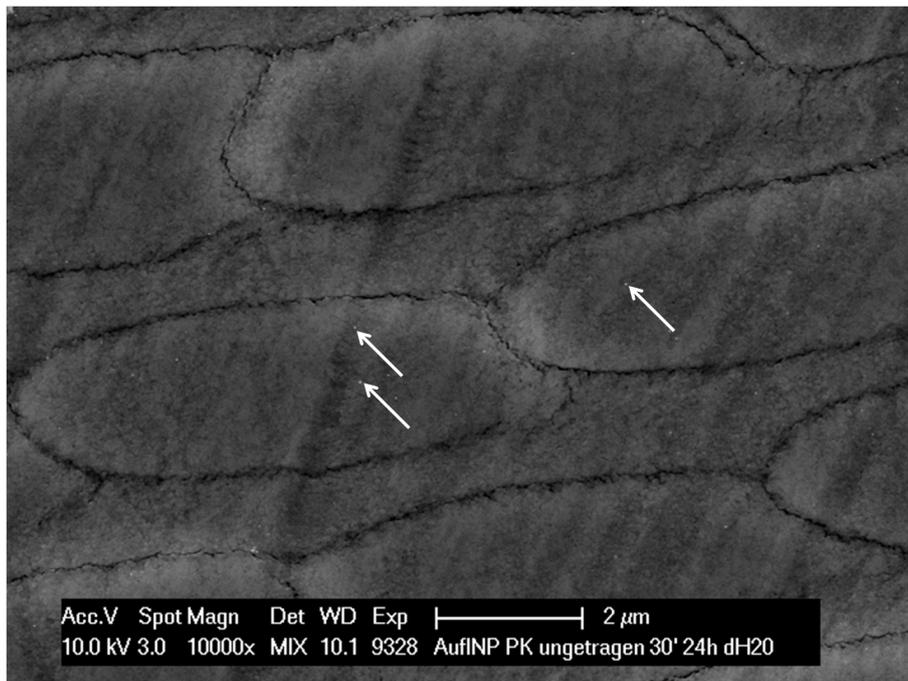


Abb. 35: Auf den Kontrollproben ohne Biofilm finden sich deutlich weniger Nanopartikel (Pfeile) als auf den Prüfkörpern mit 24-h-Biofilm.

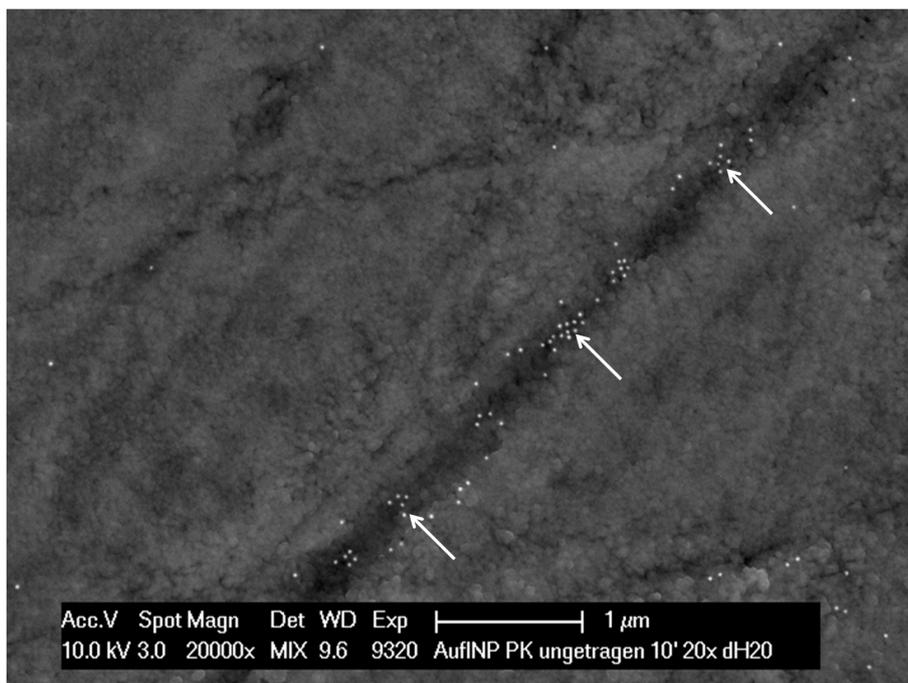
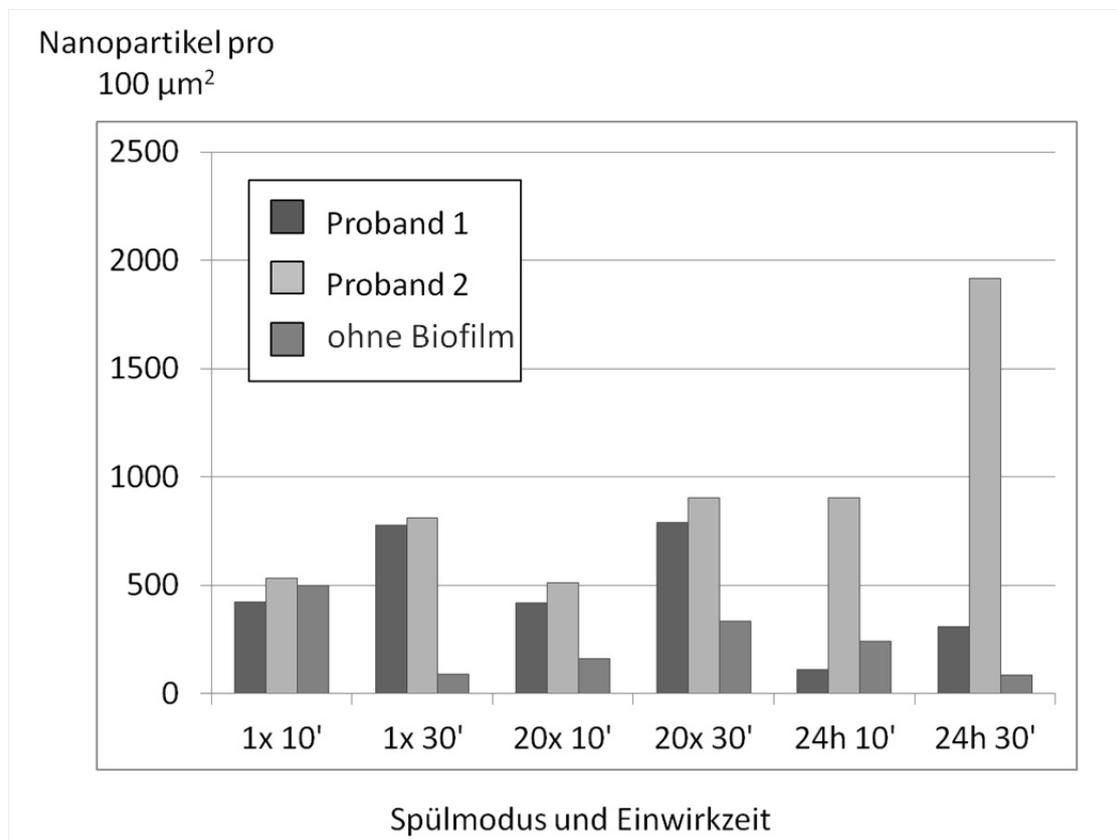


Abb. 36: Anhäufung von Nanopartikeln in einer Schleifspur (Pfeile) auf einem Schmelzprüfkörper ohne Biofilm.

4.2.2 Statistische Auswertung der Biofilmoberfläche

Bei beiden Probanden beeinflussten längere Einwirkzeiten den Verbleib von Nanopartikeln auf der Oberfläche des 24-h-Biofilms positiv. Ein Auswaschphänomen durch häufige Spülungen konnte nicht beobachtet werden. Nach 24-stündiger Lagerung in dH₂O konnten auf den Proben von Proband 2 deutlich mehr Nanopartikel gezählt werden, als bei Proband 1. Auf den Negativproben ohne Biofilm fanden sich im Vergleich zu den 24-h-Biofilmen insgesamt weniger Nanopartikel ohne erkennbaren Bezug zu Einwirkzeiten, Spülungen und Lagerungen in dH₂O (Abb. 37).



1x	einmalige Spülung der Proben mit H ₂ O
20x	20-malige Spülung der Proben mit H ₂ O
24h	24-stündige Lagerung der Proben in H ₂ O
10'	10 min Einwirkzeit der Nanopartikel
30'	30 min Einwirkzeit der Nanopartikel

Abb. 37: Statistische Auswertung: Vergleich Biofilm Proband 1, Biofilm Proband 2 und biofilmfreie Schmelzproben im Hinblick auf die Anlagerung von Goldnanopartikeln

Eine probandenübergreifende Auswertung zeigt die Verteilung von Nanopartikeln auf unterschiedlichen Biofilmqualitäten (Abb. 38). So beeinflusste eine längere Einwirkzeit insbesondere den Verbleib von Nanopartikeln auf dünneren Pellikelschichten. Ein positiver Einfluss längerer Einwirkzeiten auf dickeren Pellikelschichten sowie auf bakteriellen Aggregaten konnte nicht festgestellt werden. Ein Auswaschphänomen durch häufige Spülungen konnte nachwievor nicht beobachtet werden. Nach 24-stündiger Lagerung in dH₂O fand eine Umverteilung von Nanopartikeln von dünneren Pellikelschichten zu dickeren Pellikelschichten und bakteriellen Zellaggregaten statt.

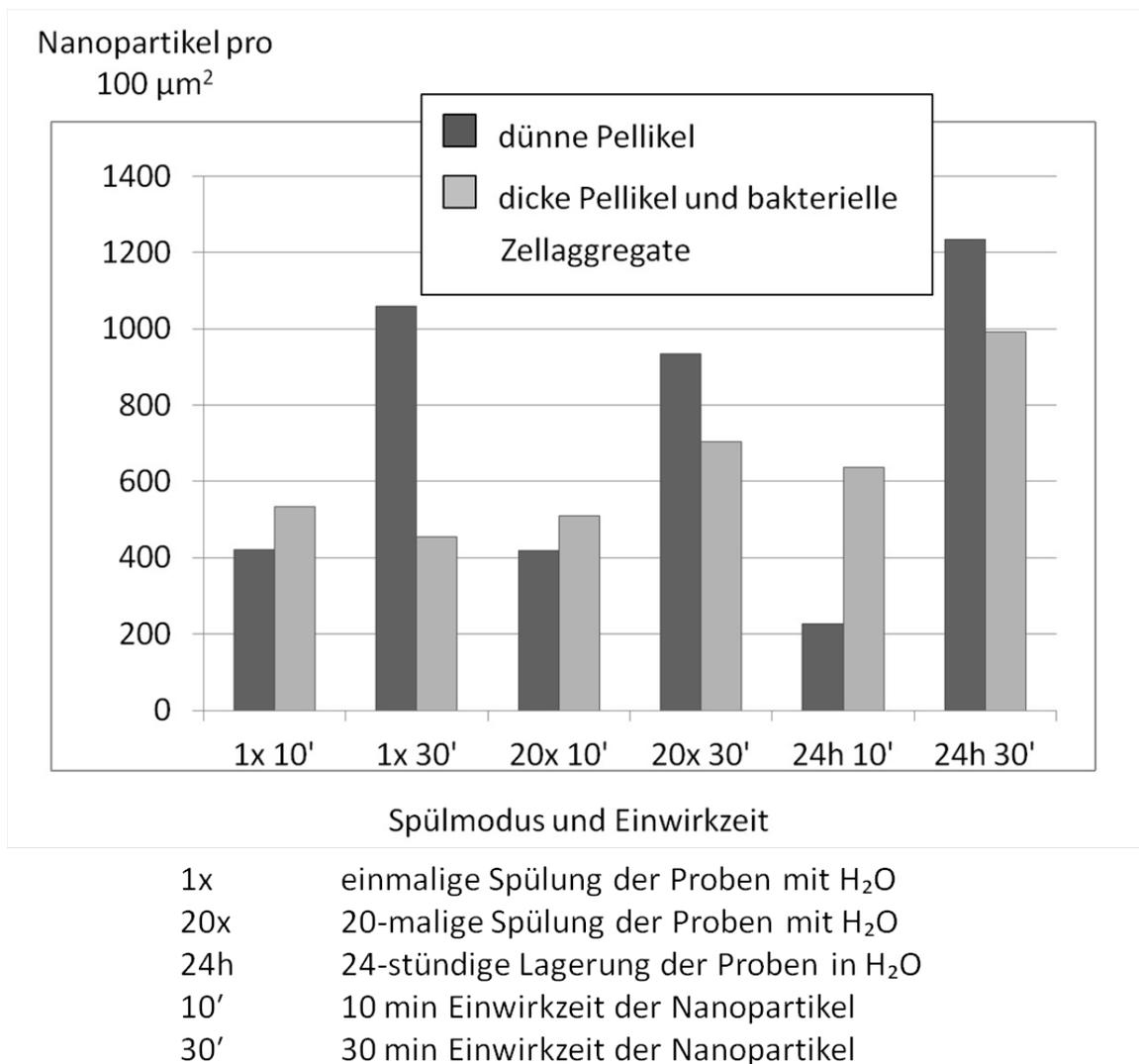


Abb. 38: Statistische Auswertung: Vergleich verschiedener Biofilmqualitäten

4.2.3 REM-Analyse der Biofilmquerschnittsfläche

Alle Blockface-Präparate wiesen saubere Grenzflächen auf. Im Bereich der Aralditkante konnten Goldnanopartikel mit einem gemischten SE-BSE-Signal detektiert (Abb. 39) und mithilfe einer EDX-Analyse identifiziert werden. Biofilmstrukturen waren im Blockface-Präparat nicht sichtbar. Nanopartikel, welche unmittelbar auf der Schliifffläche freigelegt wurden, stellten sich wie bei der REM-Analyse der Pellikeloberfläche umriss-scharf dar. Weiterhin sind verschwommene Goldnanopartikel zu erkennen, welche sich in tieferen Bildebenen befinden. Der Abstand der Nanopartikel zur Aralditkante und somit zur früher vorhandenen Schmelzoberfläche variierte. Es konnten keine Nanopartikel gefunden werden, die unmittelbar auf der Aralditkante lagen.

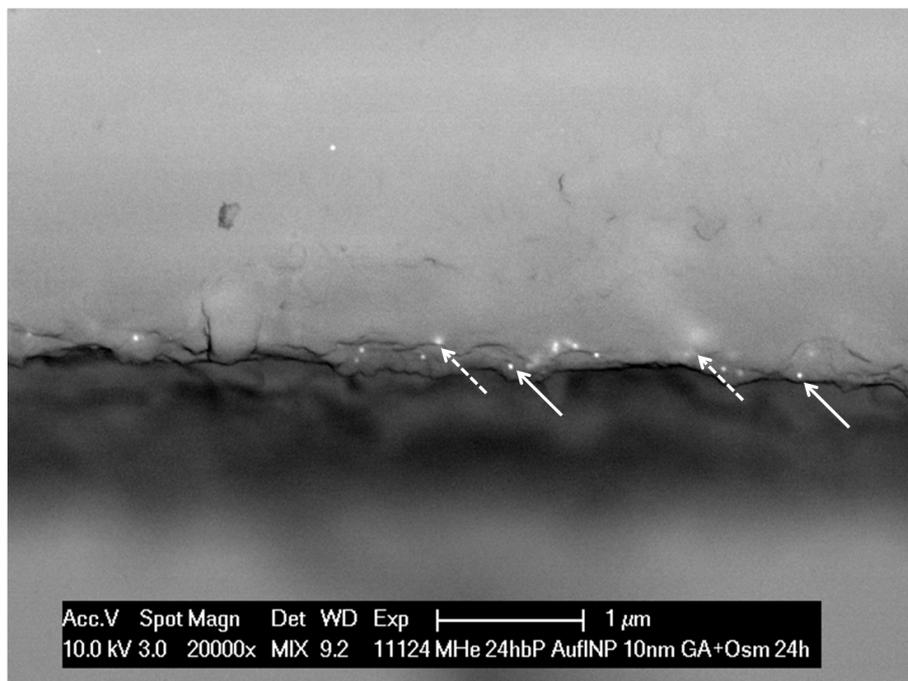


Abb. 39: Blockface-Präparat: Obere Bildhälfte Aralditfläche, untere Bildhälfte angeätzter Schmelz außerhalb der Fokusebene. Einige Nanopartikel wurden durch das Schleifen freigelegt (Pfeile durchgängig), andere liegen in tieferen Bildebenen (Pfeile gestrichelt).

4.2.4 REM-Analyse der Biofilmunterseite

Die Struktur der Biofilmunterseite stellte sich als Negativ der Schmelzoberfläche dar (Abb. 41). Sowohl die Prismenstruktur des polierten Schmelzes als auch Schmelzrisse fanden sich als Abdruck in der Unterseite der Biofilmschicht wieder. Anhand von Vergleichen mit der Biofilmoberfläche konnten auf der Biofilmunterseite äquivalente Biofilmqualitäten unterschieden werden. Im Bereich der dünnen Pellikel konnten räumlich gleichmäßig verteilte Nanopartikel im gemischten SE-BSE-Modus detektiert werden (Abb. 40). Im Bereich dickerer Pellikelschichten, beispielsweise im interprismatischen Bereich (Abb. 41), sowie unter bakteriellen Inseln (Abb. 42, Abb. 43, Abb. 44) konnten keine Nanopartikel detektiert werden.

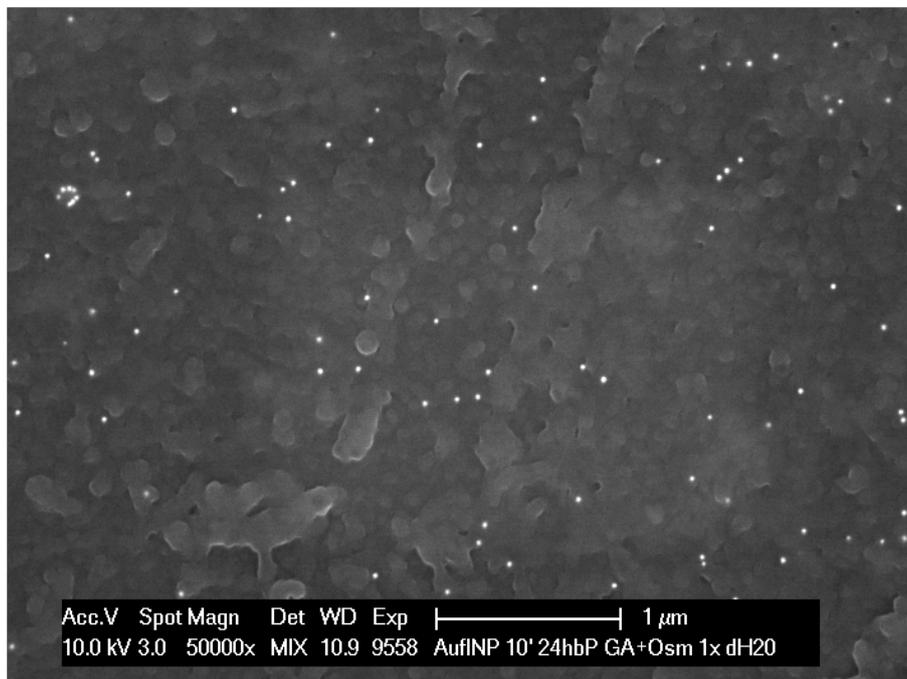


Abb. 40: Blick auf die Unterseite einer dünnen Pellikel: Es sind vergleichbar viele Goldnanopartikel sichtbar, wie in der Aufsicht.

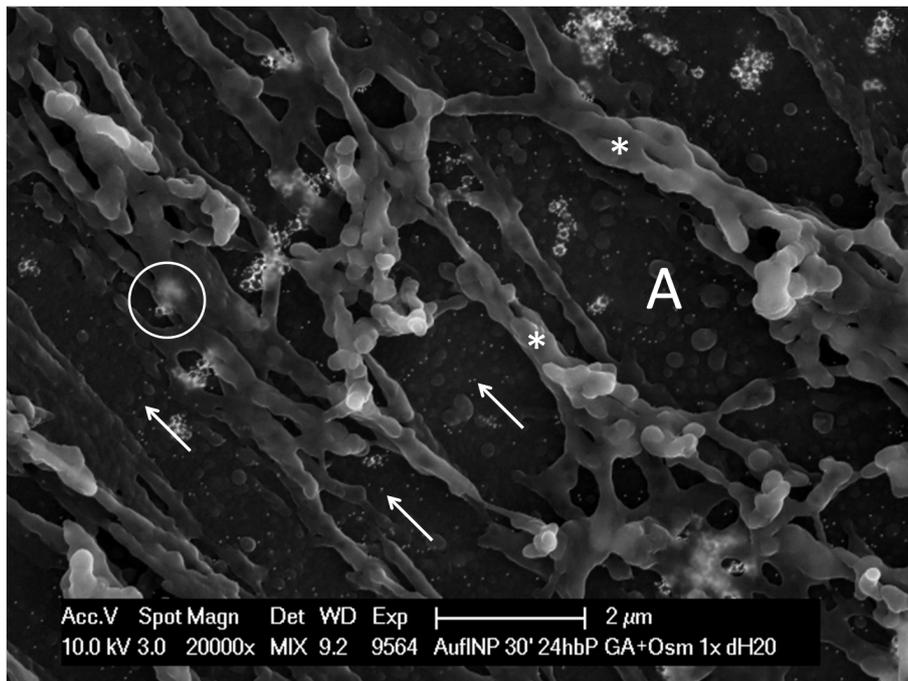


Abb. 41: Abdrücke Interprismatischer Schmelzdefekte (*) in der Pellicelunterseite. Sie verdecken (Kreis), im Gegensatz zu dünneren Pellicelschichten (A), die Sicht auf Nanopartikel (Pfeile).

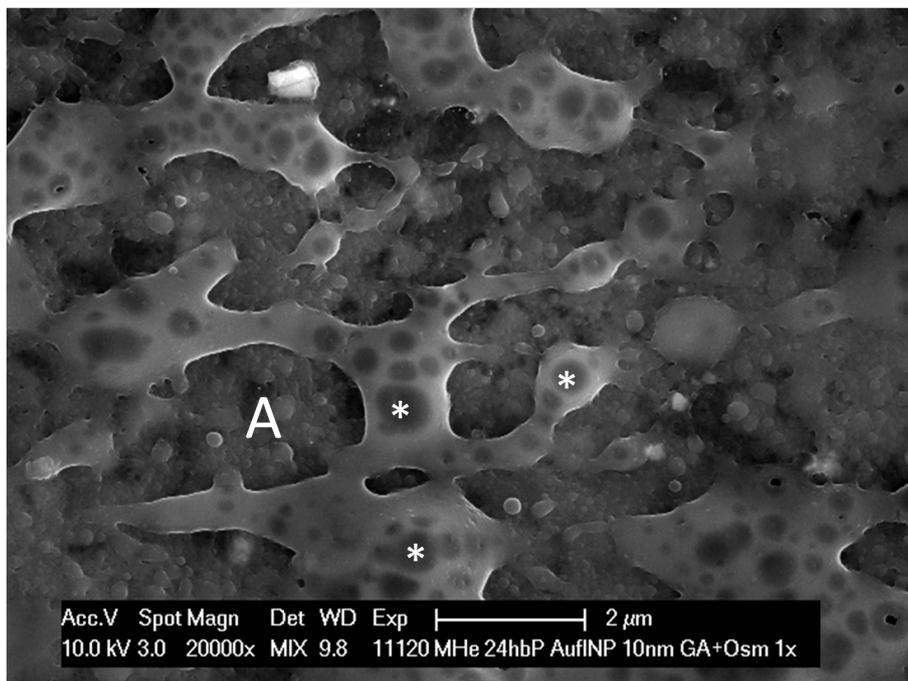


Abb. 42: Blick auf die Unterseite einer dicken Pellicel (A) mit einzelnen Bakterienzellen (*). Es sind im Vergleich zur Aufsicht kaum Nanopartikel zu erkennen.

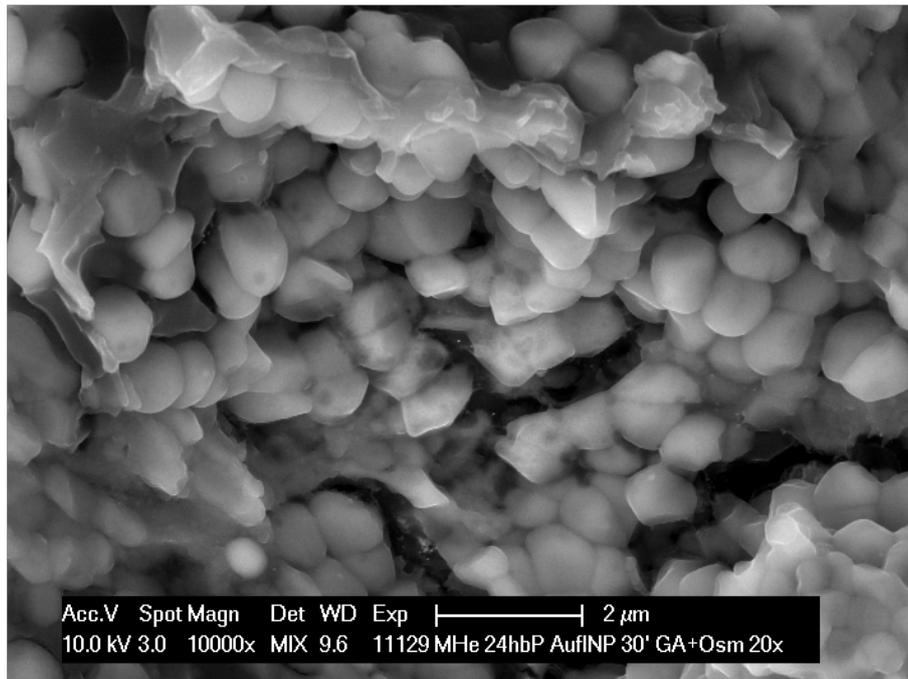


Abb. 43: Auf der Unterseite der bakteriellen Aggregate sind keine Nanopartikel zu sehen.

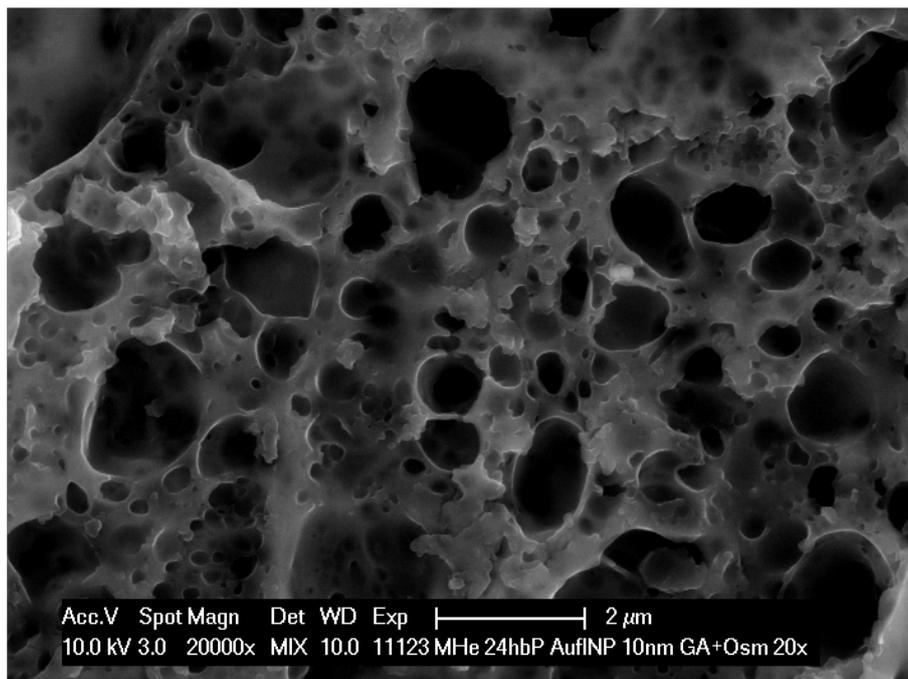


Abb. 44: Die Ansicht der Biofilmunterseite ermöglicht einen Blick auf ein komplexes, verflochtenes Netzwerk mit zahlreichen Poren und Kanälen. Innerhalb dieser Poren und Kanäle sind keine Nanopartikel sichtbar.

4.2.5 TEM-Analyse der Biofilmquerschnittsfläche

Die TEM-Analyse der Ultradünnschnitte zeigte sowohl dünne Pellikelschichten (Abb. 47, Abb. 48) als auch mehrschichtige bakterielle Aggregate (Abb. 45, Abb. 46), welche z.T. gespalten oder durch Schmelzreste maskiert waren. In Bereichen einer intakten Biofilmschicht konnten sowohl einzelne als auch gebundene Nanopartikel detektiert werden, welche der Oberfläche aufgelagert waren. Es konnten keine Nanopartikel gefunden werden, die in tiefere Biofilmschichten vorgedrungen waren.

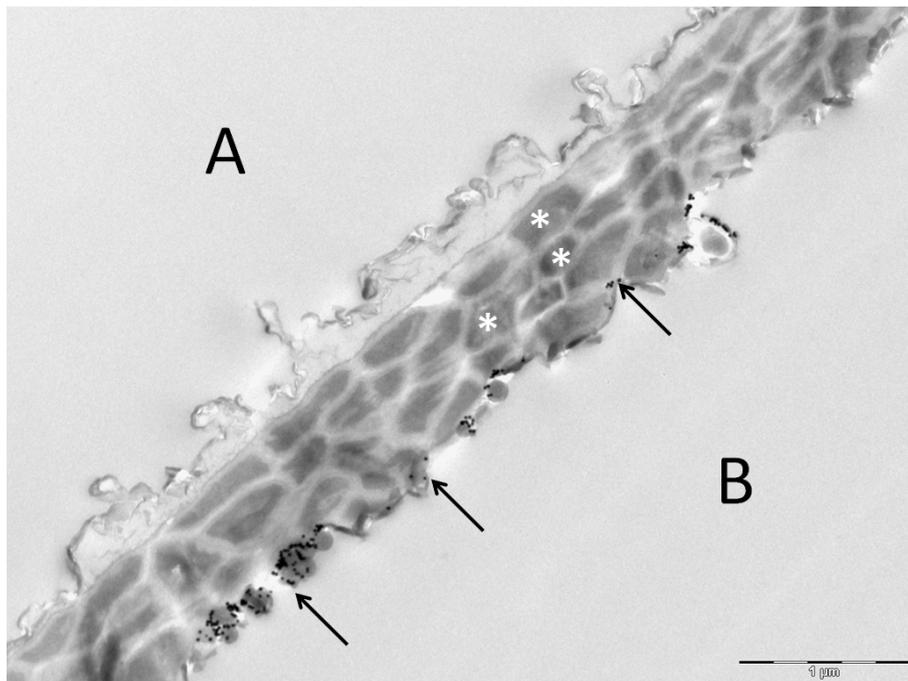


Abb. 45: Schmelzseite A, Biofilmseite B: Der Ultradünnschnitt zeigt mehrschichtige, bakterielle Zellaggregate (*) mit aufgelagerten Nanopartikeln (Pfeile) bei 18.500-facher Vergrößerung.

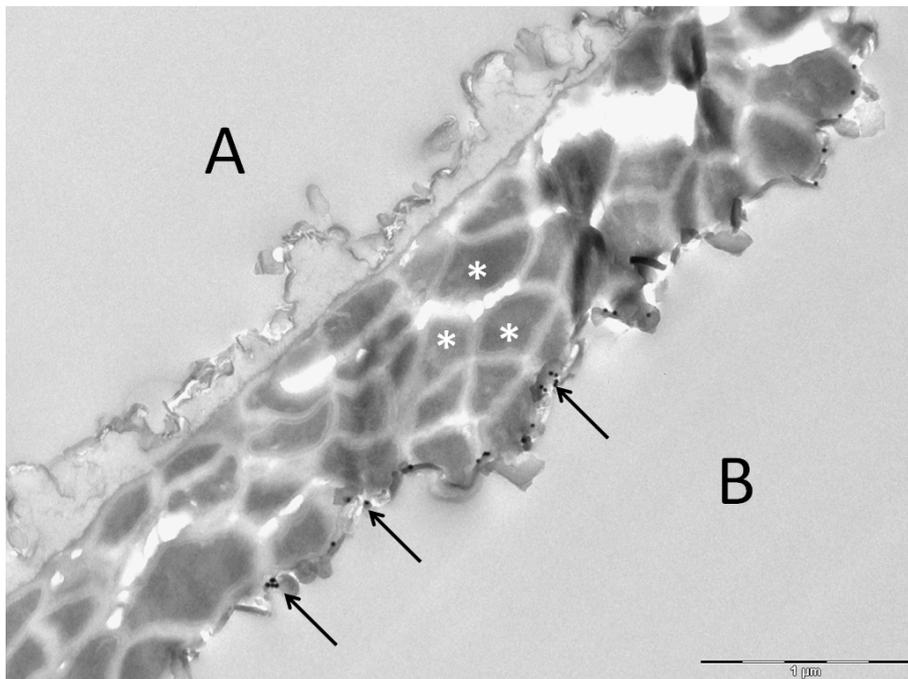


Abb. 46: Schmelzseite A, Biofilmseite B: Der Ultradünnschnitt zeigt mehrschichtige, bakterielle Zellaggregate (*) mit aufgelagerten Nanopartikeln (Pfeile) bei 23.000-facher Vergrößerung.

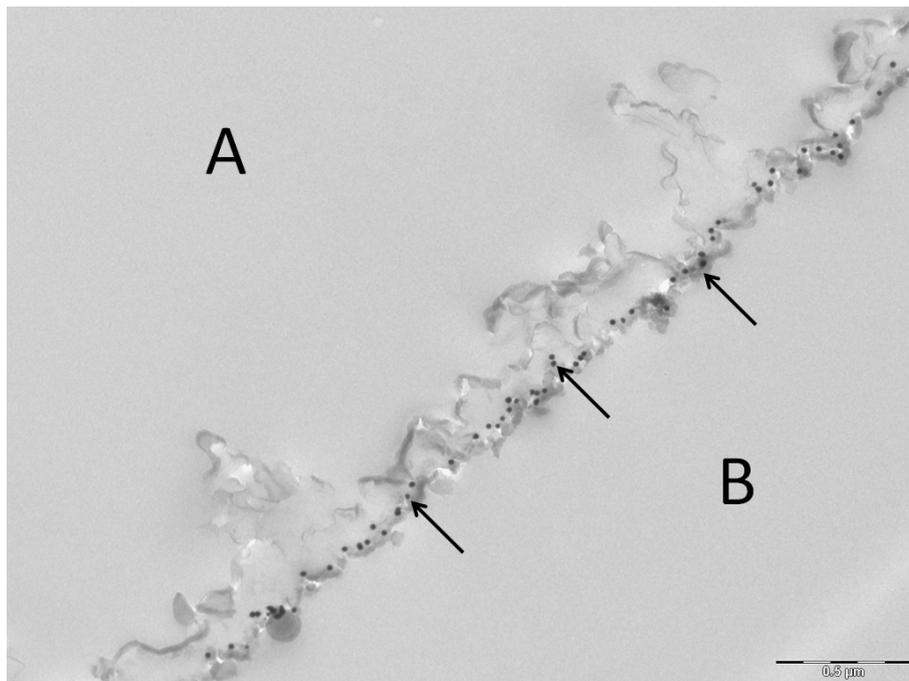


Abb. 47: Schmelzseite A, Biofilmseite B: Der Ultradünnschnitt zeigt einzelne Nanopartikel (Pfeile) im Bereich einer dünnen Pellikelschicht bei 30.000-facher Vergrößerung.

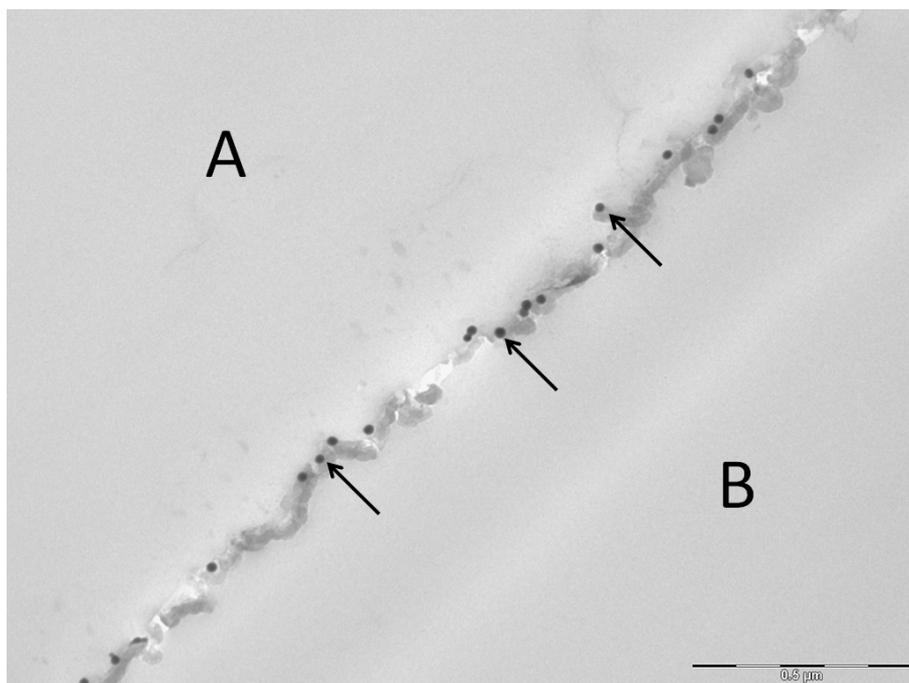


Abb. 48: Schmelzseite A, Biofilmseite B: Der Ultradünnschnitt zeigt einzelne Nanopartikel (Pfeile) im Bereich einer dünnen Pellikelschicht bei 49.000-facher Vergrößerung.

5 Diskussion

5.1 Material und Methode

5.1.1 Auswahl der Nanopartikel

Bei der Auswahl der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Nanopartikel wurden folgende Eigenschaften vorausgesetzt: Die Nanopartikel sollten eine Größe von ≤ 20 nm besitzen und bildgebend detektierbar sein. Das bedeutet, dass sich die Nanopartikel durch ihre chemische Zusammensetzung oder ihre Dichte eindeutig vom Prüfkörper und von einzelnen Bestandteilen des Biofilms unterscheiden müssen, um mithilfe einer EDX-Analyse oder durch eine kontrastreiche Bildgebung dargestellt werden zu können. Des Weiteren sollten die Nanopartikel kommerziell erwerblich sein und eine gleichmäßige Beschaffenheit in Größe und Verteilung aufweisen. Die kolloidale Suspension sollte überwiegend freie, einzelne Nanopartikel mit geringer Tendenz zur Bildung von Agglomeraten enthalten. Die Oberfläche der Nanopartikel sollte möglichst neutral und reaktionsträge sein, um Wechselwirkungen mit Bestandteilen des Biofilms zu verringern und somit die Diffusion zu erleichtern.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Goldnanopartikel erfüllten alle genannten Voraussetzungen und eigneten sich somit im Modellversuch zur generellen Beantwortung der Fragestellung, ob Nanopartikel, unabhängig von ihrer chemischen Zusammensetzung, den bakteriellen Biofilm penetrieren können. Des Weiteren sind Goldnanopartikel aufgrund ihrer geringtoxischen Eigenschaften für Medikamenten- und Gentransport sowie für die medizinische Bildgebung geeignet [Yamada et al., 2015]. Sie gelten außerdem als attraktive Kandidaten für dentale Materialien, da sie beispielsweise effektiv MMP-8 und MMP-9 (Matrixmetalloproteinasen) ohne zytotoxische Effekte oder Entzündungsreaktionen hemmen [Hashimoto et al., 2015]. Die qualitativen REM- und TEM Analysen der Vorversuchsreihen zeigten eine gleichmäßige Beschaffenheit von Größe und Form als wichtige Voraussetzung für die quantitative Analyse. Das Vorhandensein zahlreicher gebundener Goldnanopartikel, welche sich auf 150 nm großen SiO₂-Partikeln befinden, ist laut Hersteller als produktionsbedingte Variation zu betrachten, beeinflusst jedoch die Verfügbarkeit einzelner Nanopartikel durch die Bildung von Konglomeraten negativ. Weiterhin ergaben Messungen, dass die einzelnen Nanopartikel nicht wie vom Hersteller angegeben 10 nm, sondern 20 nm im Durchmesser maßen. Die Optimierung der Produktionsprozesse bei der Herstellung synthetischer Nanopartikel stellt demnach eine wichtige Voraussetzung für weitere Forschungen im Bereich der Nanotechnologie dar.

Da in der vorliegenden Versuchsreihe nur mit einem Typ Nanopartikel gearbeitet wurde, kann bzgl. der Diffusion von Nanopartikeln in einen Biofilm keine Aussage über größenspezifische Effekte getroffen werden, welche nicht nur im Hinblick auf das Diffusionsverhalten von Nanopartikeln von Bedeutung sind. Selbst kleinste Größenunterschiede von Goldnanopartikeln, z. B. 1,2 nm im Vergleich zu 1,4 nm, konnten in Studien unterschiedliche Zellreaktionen bewirken [Pan et al., 2007]. Ähnlich unterschiedliche Zellantworten konnten mit Hydroxylapatit-Nanopartikeln unterschiedlicher Größe und Kristallinität festgestellt werden. Hydroxylapatit-Nanopartikel mit einer Größe von ca. 23 x 47 nm und 85% Kristallinität förderten die Zellproliferation, verhinderten Apoptose und induzierten geringere Entzündungsreaktionen durch Makrophagen. Hydroxylapatit-Nanopartikel mit einer Größe von ca. 16 x 40 nm und 65% Kristallinität konnten von den untersuchten Zellen aufgenommen werden und griffen in die Morphologie des Zytoskeletts ein [Liu et al., 2012]. Die Zytotoxizität von Nanopartikeln ist ein weiterer wichtiger Faktor im Hinblick auf eine klinische Anwendung synthetischer Nanopartikel, der abhängig von Größe und Konzentration der applizierten Partikel ist. Eine erhöhte Toxizität konnte bei steigender Konzentration > 10 ppm und Verringerung der Größe beobachtet werden [Yen et al., 2009]. In Untersuchungen mit Goldnanopartikeln wirkten 1-2 nm große Partikel hoch toxisch auf die untersuchten Zellen, wohingegen Nanopartikel > 15 nm keine Toxizität aufwiesen [Pan et al., 2007].

Neben größenspezifischen Effekten beeinflussen unterschiedliche chemische Zusammensetzungen und Oberflächenbeschichtungen die charakteristischen Eigenschaften synthetischer Nanopartikel. So bestimmt die Oberflächenladung von Partikeln wesentlich ihre Interaktion mit Zellen sowie ihre Zytotoxizität gegen Bakterien und Zellen humaner Gewebe. Im Experiment mit Goldnanopartikeln einer Größe von ca. 2,5 nm, bzw. einer Größe von ca. 10-11 nm inklusive positiven und neutralen Liganden, zeigte sich eine konzentrations- und ladungsabhängige Inhibition der bakteriellen Zellproliferation von *Streptococcus mutans*. Bei einer Konzentration von 10 bzw. 100 nM zeigten keine der Nanopartikel bakterizide Effekte, wohingegen bei einer Konzentration von 1 μ M alle Goldnanopartikel mit positiv geladenen Liganden die Lebensfähigkeit der untersuchten Zellen herabsetzten und die Integrität des Biofilms verletzten. Die antimikrobielle Wirkung von Goldnanopartikeln mit neutralen Liganden war entweder reduziert oder nicht vorhanden. Des Weiteren induzierten die verwendeten Goldnanopartikel keine Resistenzbildung, was im Hinblick auf eine klinische Applikation zur antibakteriellen Therapie von großem Interesse ist [Giri et al., 2015]. Hinsichtlich einer therapeutischen Anwendung an-

timikrobieller Nanopartikel müssen jedoch auch unerwünschte Nebenwirkungen berücksichtigt werden. So können kationische Nanopartikel Fluoride binden und sich trotz ihrer antibakteriellen Eigenschaften möglicherweise negativ auf Remineralisationsprozesse auswirken [Besinis et al., 2015].

5.1.2 Verwendung von Rinderschmelzprüfkörpern

Bovine Schmelzprüfkörper finden standardmäßig Anwendung in zahlreichen aktuellen *in-vitro*- und *in-situ*-Studien zum Thema Erosion [Yönel et al., 2016, do Socorro Coelho Alves et al., 2016], Remineralisation [Cardoso et al., 2016, Wierichs et al., 2016, Nehme et al., 2016], Biofilmbildung [Hertel et al., 2016] und Biofilmmangement [Grychtol et al., 2014]. Vorteile der Verwendung von Rinderschmelzprüfkörpern als Ersatzmaterial für humanen Zahnschmelz sind insbesondere die Größe der Glattflächen und die Verfügbarkeit. Rinderzähne stehen als nahezu kostenfreie Schlachtabfälle in großen Mengen zur Verfügung und eignen sich hervorragend zur Produktion homogener, ausreichend großer, planer und somit polierbarer Prüfkörper. Des Weiteren unterscheidet sich boviner Schmelz im Hinblick auf seine Mikrostruktur, chemische Zusammensetzung, physikalischen Eigenschaften und die Adhäsion von Bakterien nicht signifikant von humanen Schmelzproben [Yassen et al., 2011]. Als Nebenprodukt der Fleischproduktion unterliegen die Rinder stetig gesetzlich vorgeschriebenen Schlachtier- und Fleischuntersuchungen durch das Veterinäramt, sodass die Prüfkörper, u. a. im Hinblick auf Prionenerkrankungen wie der Bovinen Spongiformen Enzephalopathie als sicheres Produkt bewertet werden können.

5.1.3 *In-situ*-Biofilmbildung

Zur Untersuchung der Fragestellung, ob Nanopartikel einen bakteriellen Biofilm penetrieren können, sollten neben Pellikelstrukturen auch Areale mit mehrschichtigen bakteriellen Zellaggregaten auf der Schmelzoberfläche zu finden sein. In der fluoreszenzmikroskopischen Analyse des 24-h-Biofilms von Proband 1 fanden sich nur vereinzelt bakterielle Zellverbände, sodass der bakterielle Biofilm nur bedingt zur Bearbeitung der Fragestellung geeignet war. Um weitere Pellikel- und Biofilmqualitäten beurteilen zu können, wurde für die Hauptversuche ein weiterer Proband mit stärkerer Biofilmbildung herangezogen. Das Prinzip des Life/Dead-Stainings beruht auf den unterschiedlichen fluoreszierenden Eigenschaften von lebenden und toten Bakterien. Propidiumiodid kann Zellwände von zerstörten Bakterien penetrieren und die Wirkung

des Fluorophor SYTO 9 reduzieren. Somit erscheinen abgestorbene Bakterien rot, lebende Bakterien grün. Die Beurteilung der Vitalität von Bakterienzellen spielte in der vorliegenden Studie aufgrund der Verwendung von fixierten Biofilmen keine Rolle. Das Verfahren des Life/Dead-Stainings ermöglichte jedoch eine einfache Beurteilung der Biofilmquantität ohne zeitaufwendige Fixiervorgänge. Die fluoreszenzmikroskopische Pellikelkontrolle beschränkte sich auf Proband 1. Proband 2 wurde anhand von REM-Aufnahmen vergangener Studien aufgrund seiner ausgeprägten Biofilmbildung für die vorliegenden Versuche als geeignet eingestuft.

Zur Untersuchung bakterieller Biofilme stehen sowohl die *in-vitro*- [Pratten et al., 2016] als auch die *in-situ*-Biofilmbildung [Prada-López et al., 2015] zur Verfügung. Die *in-vitro*-Produktion stellt eine sichere Methode zur Bildung gut reproduzierbarer Biofilme dar. Sowohl die qualitative Zusammensetzung als auch das bakterielle Wachstum können je nach Versuchsanforderung angepasst werden [Thurnheer und Belibasakis, 2016]. Weiterhin kann eine *in-vitro*-Biofilmproduktion Probanden unabhängig und demnach zeitsparender und ggf. in größeren Mengen erfolgen. Sie eignet sich insbesondere zur Evaluation antibakterieller Agenzien hinsichtlich ihres Wirkungsspektrums und ihrer Wirkungsweise [Chen et al., 2016]. Da jedoch in der vorliegenden Arbeit das komplexe dreidimensionale Netzwerk eines natürlichen oralen Biofilms im Fokus der Untersuchungen stand, erfolgte die Biofilmgewinnung *in situ*. Eine Nachahmung physiologischer Bioadhäsionsprozesse ist unter *in-vitro*-Bedingungen in Abwesenheit von Speichel und einer natürlichen bakteriellen Mundflora nicht möglich.

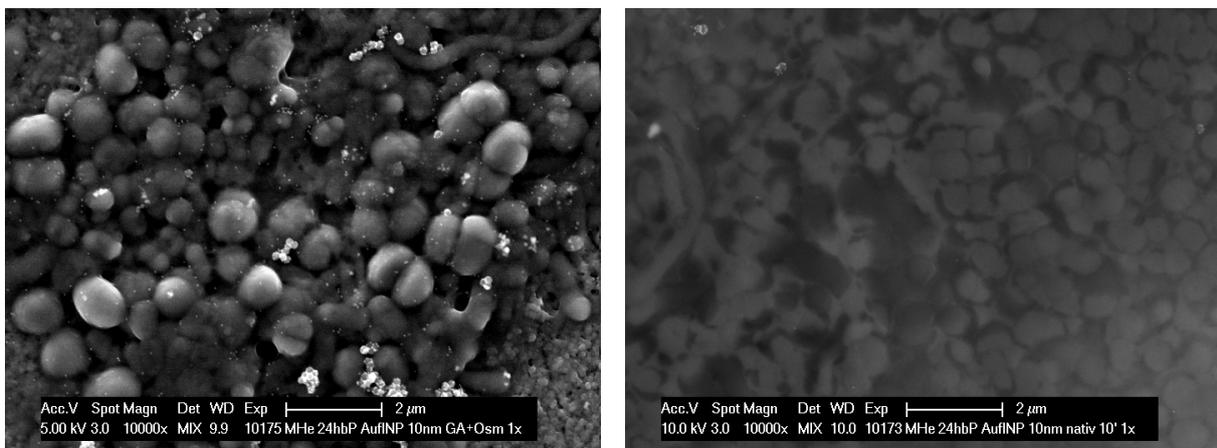
Bei der *in-situ*-Gewinnung von Biofilmen sind individuelle qualitative und quantitative Unterschiede zu beachten. Dabei variieren nicht nur die Biofilme unterschiedlicher Probanden. So kann die Biofilmbildung trotz festgelegter Rahmenbedingungen innerhalb einer Trageperiode auf unterschiedlich in der Mundhöhle lokalisierten Prüfkörpern abweichen. Ebenso kann bei gleich positionierten Prüfkörpern in zwei verschiedenen Trageperioden ein völlig unterschiedliches Biofilmmuster beim selben Probanden entstehen. Selbst auf der Oberfläche eines Prüfkörpers finden sich unterschiedliche Biofilmqualitäten mit unregelmäßiger Verteilung. Diese nicht vorhersagbaren Differenzen wirken sich einerseits negativ auf die Reproduzierbarkeit von Versuchsreihen aus und erschweren die statistische Auswertung. Andererseits ermöglichen sie die Betrachtung zahlreicher Biofilmkonfigurationen innerhalb einer kleinen Versuchsreihe. So war es in der vorliegenden Studie möglich, mit nur zwei Probanden das gesamte strukturelle Spektrum eines 24-h-Biofilms, von kaum maskierter prismenstrukturierter Schmelzoberfläche, bis hin zu mehrschichtigen bakteriellen Aggregaten darzustellen. Somit stand für die Untersuchung der Diffusion von Nanopartikeln in einen Biofilm ein möglichst breitgefächertes strukturelles Spektrum oraler Biofilme zur Verfügung.

5.1.4 Fixierung der Biofilmproben

Ziel der Fixierung war es, das dreidimensionale Netzwerk des Biofilms sowohl während der Applikation der Nanopartikel als auch nach Lufttrocknung für die elektronenmikroskopische Analyse unter Vakuum und dem gebündelten Elektronenstrahl zu stabilisieren (Abb. 49). Da die klassische Fixierung mit Glutaraldehyd und Osmiumtetroxid zahlreiche Spülvorgänge beinhaltet und neben der Diffusion ebenso die Auswirkung häufiger Spülungen untersucht werden sollte, erfolgte der Fixiervorgang vor Applikation der Nanopartikel.

Das beim ersten Fixiervorgang verwendete Glutaraldehyd ($C_5H_8O_2$) gehört zu den bifunktionalen Aldehyden und fixiert organische Strukturen durch Stabilisierung von Proteinen. Es besitzt endständige und mittelständige Aldehydgruppen, die sich mit Aminogruppen von Proteinen zu stabilen Iminen verbinden. Da Glutaraldehyd in wässrigen Lösungen durch Aldolkondensation polymerisiert, sollte die Lösung nach Zugabe des Neutralpuffers innerhalb von 8 h verwendet werden. Ältere Lösungen enthalten langkettige Polymere, die schwerer in das zu fixierende Gewebe eindringen.

Das zur Nachfixierung verwendete Osmiumtetroxid gehört zur Gruppe der Platinmetalle und liegt bei Raumtemperatur als kristalliner, gelber Feststoff vor. Sowohl die Dämpfe aus dem Feststoff als auch aus wässrigen Lösungen sind stark schleimhautirritierend. Die in den Sicherheitsdatenblättern angegebenen Schutzmaßnahmen beim Umgang mit der Substanz sind unbedingt einzuhalten. Osmiumtetroxid fixiert wirkungsvoll die regelmäßig angeordneten Lipidmoleküle in biologischen Membranen und verleiht ihnen elektronendichte Eigenschaften. Es wird vor allem zum Nachfixieren von Präparaten für die Elektronenmikroskopie benutzt [Lang, 2012].



(a) Fixierter Biofilm

(b) Nativer Biofilm

Abb. 49: Vergleich Qualität der REM-Analysen von Nanopartikeln auf fixiertem (a) und nicht fixiertem (b) Biofilm

5.1.5 *In-vitro*-Applikation der Nanopartikel

Abhängig von der Ausgangskonzentration einer Nanopartikel-Suspension kann eine individuell auf die Versuchsanforderungen angepasste Verdünnung notwendig sein. In der vorliegenden Arbeit sollte die Bildung von Agglomeraten vermieden werden, um die Verteilung einzelner Nanopartikel auf und im bakteriellen Biofilm beurteilen zu können. Fluoreszenzmikroskopische Analysen im Vorversuch zeigten eine Reduktion der Clusterbildung mit steigender Verdünnung der kolloidalen Suspension. Trotzdem sollte in der rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung der Biofilmoberfläche eine möglichst hohe Frequenz von Nanopartikeln pro Fläche resultieren, um die Trefferquote in der Querschnittsanalyse zu erhöhen. Insbesondere die TEM-Analyse unterschiedlicher Verdünnungen in der Vorversuchsreihe führte zu dem Ergebnis, dass sich eine 1:10 Verdünnung mit einer Konzentration von 0,35 mg Nanopartikel pro ml für die Hauptversuchsreihe am besten eignet.

Die Applikation der Nanopartikel erfolgte *in vitro*, um mögliche Wechselwirkungen mit Speichelbestandteilen auszuschließen und eine gleichmäßige Konzentration der Nanopartikel-Suspension über die gesamte Einwirkzeit aufrecht zu erhalten. Aufgrund zu erwartender Interaktionen der Nanopartikel mit Speichelproteinen, die zur Förderung der Aggregatbildung auf Oberflächen der Mundhöhle beitragen, kann angenommen werden, dass eine mögliche Diffusion von Nanopartikeln in einen Biofilm in Abwesenheit von Speichel erleichtert ist [Nel et al., 2009]. Wie groß der Einfluss von Speichelproteinen auf die Verteilung und Wirkung von Nanopartikeln tatsächlich ist, hängt u. a. vom pH, der Elektrolytzusammensetzung sowie den viskösen Eigenschaften der Speichelflüssigkeit ab [Besinis et al., 2015]. Im Rahmen der *in-vitro*-Applikation entfiel außerdem die Spülwirkung des Speichels, sodass Auswaschphänomene mit kontrollierten Spülungen untersucht werden konnten. Es ist jedoch darauf hinzuweisen, dass die *in-vitro*-Applikation der Nanopartikel nicht mit einer *in-situ*-Applikation, beispielsweise durch die Anwendung von Mundspüllösungen, zu vergleichen ist. Im Falle einer *in-situ*-Applikation wären insbesondere toxikologische Aspekte zu berücksichtigen gewesen.

Um Flüssigkeitsbewegungen durch Kapillarwirkungen auszuschließen, sollte die gereinigte und fixierte Biofilmoberfläche nicht austrocknen. Die Applikation der Nanopartikel erfolgte deswegen, kurz nach dem Abtropfen von Restflüssigkeit, auf die seidenmatte Oberfläche des Prüfkörpers. Die vollständige Bedeckung der Prüfkörper mit 50 μ l der Nanopartikel-Suspension in einer Zellkulturplatte hatte den Vorteil, dass sich die Nanopartikel gleichmäßig auf dem Prüfkörper verteilten bzw. absenkten. In Vorversuchen konnte bei der wesentlich sparsameren Applikation von 2 μ l auf die Prüfkörperoberfläche eine Anhäufung von Nanopartikeln im Randbereich des Tropfens festgestellt werden. Gleiches ließ sich bei der TEM-Analyse der Nanopartikel fest-

stellen. Dies führte zu einer ungleichmäßigen Verteilung und unerwünschten Clusterbildung im Randbereich.

Zur Untersuchung möglicher Auswaschphänomene wurde die Prüfkörperoberfläche vertikal in die Spüllösung getaucht, um ein Abfließen der Nanopartikel zu ermöglichen. Bei Mehrfachspülungen eines Prüfkörpers war kein Spülwasserwechsel erforderlich. Unter der Annahme, dass von 50 μl der applizierten 1:10 Verdünnung der Ausgangssuspension, mit einer Konzentration von $3,74 \times 10^{14}$ Nanopartikel pro ml, 10 μl auf dem Prüfkörper verblieben, welche vollständig in 1 l Spüllösung übergangen, wäre die Nanopartikel-Konzentration des benutzten Spülwassers im Vergleich zur Ausgangskonzentration um den Faktor 10^6 verdünnt. Da jedoch vor dem Spülvorgang Überschüsse der Suspension durch kurzes Abtropfen auf Filterpapier entfernt und die Nanopartikel nicht vollständig vom Prüfkörper herunter gespült wurden, kann die Menge der Nanopartikel, welche tatsächlich in die Spüllösung übergehen, vernachlässigt werden. Eine Auffrischung des Spülwassers bei Mehrfachspülungen ist bei ausreichend großem Spülvolumen somit nicht erforderlich.

5.2 Ergebnisse

5.2.1 REM-Analyse der Biofilmoberfläche

Die Rasterelektronenmikroskopie stellt ein Standardverfahren in der Untersuchung bakterieller Biofilme dar [Rupf et al., 2012, Ferreira Ribeiro et al., 2016], welches auf der Abrasterung der Biofilmoberfläche mittels eines feingebündelten Elektronenstrahls basiert. Die REM-Analyse ermöglicht eine detailgenaue Darstellung der komplexen Oberflächenstrukturen einer Pellicel oder eines bakteriellen Biofilms, sowie bedingt Einsicht in Poren oder tunnelartige Hohlräume dieses dreidimensionalen Netzwerkes. Dabei kann im Vergleich zur Transmissionselektronenmikroskopie eine deutlich größere Fläche untersucht werden, da mit der REM-Analyse massive, nicht elektronendurchlässige Proben untersucht werden können, die keine Ultradünnschnitte erfordern. Die in der konventionellen Rasterelektronenmikroskopie verwendeten Detektoren registrieren Sekundärelektronen (SE), Rückstreuielektronen (Back Scattered Electrons – BSE), sowie charakteristische Röntgenstrahlung (Energy dispersive X-ray spectroscopy – EDX).

Sekundärelektronen entstehen durch inelastische Streuung, bei der ein Elektron nicht nur vom Coulombfeld des Atomkerns der Probe abgelenkt wird, sondern auch einen Teil seiner kinetischen Energie auf Atome der Probe überträgt. Dadurch können schwach gebundene Elektronen in der Außenschale die Probe verlassen und als Sekundärteilchen detektiert werden. Die Menge

der Sekundärelektronen ist abhängig vom Neigungswinkel der Probe. Der dadurch entstehende Topographiekontrast erzeugt die Bildtiefe. Sekundärelektronen besitzen eine relativ geringe Energie und liefern die beste Auflösung. Da sie jedoch die Probe nur aus einer sehr geringen Tiefe verlassen können, beschränkt sich die SE-Analyse auf die Oberfläche der Probe. Eine Beurteilung oder Messung der Schichtstärke eines Biofilms und damit verbunden einer vertikalen Penetrationstiefe von Nanopartikeln ist mit einer REM-Analyse der Biofilmoberfläche nicht möglich.

Zur Detektion der Goldnanopartikel war ein zusätzliches BSE-Signal notwendig. Die Wahrscheinlichkeit einer elastischen Streuung und somit Rückstreuung von Elektronen erhöht sich mit steigender Kernladungszahl, sodass die Goldnanopartikel aufgrund ihrer hohen Dichte im Vergleich zu Biofilmstrukturen heller erscheinen. Die hochenergetischen BSE können im Gegensatz zu SE die Probe aus tieferen Schichten verlassen. Um eine hochauflösende Darstellung der komplexen Oberflächenstruktur des Biofilms und eine gleichzeitige Detektion der Goldnanopartikel zu ermöglichen, war eine Mischung von SE- und BSE-Detektoren notwendig. Mit dem gemischten Signal konnten die Goldnanopartikel mittels Materialkontrast in räumlicher Relation zu Strukturen des Biofilms bildlich dargestellt werden.

Zur eindeutigen Identifizierung der Nanopartikel erfolgte eine Charakterisierung der Elemente durch die EDX-Analyse. Dabei wird ein ausgewählter Bereich der Probe mit hochenergetischen Elektronen beschossen, was zu einem Herauslösen von Elektronen aus einer inneren Schale führt. Die Ionsierung der Materie führt zu einem instabilen Zustand. Die Lücke in der inneren Schale wird durch ein höher energetisches Elektron aus einem höheren Atomorbital aufgefüllt. Dabei wird charakteristische Röntgenstrahlung emittiert und detektiert, was eine qualitative und quantitative Analyse des untersuchten Probenareals ermöglicht. Voraussetzung für die Detektion der Goldnanopartikel mittel EDX-Analyse war die Oberflächenbeschichtung der Probe mit Kohlenstoff statt mit Gold. Die EDX-Analyse erfolgte im Bereich freier Nanopartikel, sowie im Bereich von Konglomeraten und zur Negativkontrolle in Bereichen ohne Nanopartikel. Aufgrund des hohen Zeitaufwandes erfolgte die EDX-Analyse in Vorversuchen einmalig zum Nachweis der Goldnanopartikel, welche durch ihr charakteristisches Erscheinungsbild im weiteren Verlauf der Untersuchungen rein optisch detektiert werden konnten.

Pro Prüfkörper wurden i. d. R. vier unterschiedliche, repräsentative Areale in jeweils vier Vergrößerungen rasterelektronenmikroskopisch untersucht. Einzelne Nanopartikel konnten in der Übersichtsaufnahme bei 1000-facher Vergrößerung nicht dargestellt werden. Sie diente zur Einordnung der Detailaufnahmen in das untersuchte Gesamtareal und zur Orientierung auf der Prüfkörperoberfläche. In den Übersichtsaufnahmen waren z. T. die Schmelzstruktur, verschie-

dene Biofilmqualitäten sowie größere Konglomerate von Nanopartikeln in unterschiedlicher Verteilung zu erkennen. Da einzelne Nanopartikel im Fokus der Untersuchungen standen, wurden die Clusterareale bei höheren Vergrößerungen gemieden. Für die statistische Auswertung erfolgten sowohl Aufnahmen bei 10.000- als auch bei 20.000-facher Vergrößerung. Detailaufnahmen bei 50.000-facher Vergrößerung dienten zur Darstellung einzelner Nanopartikel in räumlicher Beziehung zu globulären und bakteriellen Strukturen des Biofilms.

5.2.2 Statistische Auswertung der Biofilmoberfläche

Das Auszählen der Nanopartikel auf der Biofilmoberfläche erfolgte mit der kommerziellen Software MATLAB. Die matrixbasierte MATLAB Sprache ermöglicht eine Vielzahl von Analysen, sowie Visualisierung und Auswertung wissenschaftlicher Daten. Zum Auszählen der Nanopartikel wurden drei grundsätzliche Kriterien im Programmbefehl definiert. Die Goldnanopartikel wurden über ihren Bildkontrast und ihre charakteristische Größe vom Programm erfasst. Da ausschließlich einzelne Nanopartikel gezählt werden sollten, wurde zum Ausschluss von Clustern ein Mindestabstand zwischen zwei Partikeln festgelegt. Zur Kontrolle der Zählgenauigkeit erfolgte stichprobenartig mithilfe eines Fadenkreuzes ein direkter Vergleich zwischen gezählten und tatsächlich vorhandenen Goldnanopartikeln. Die Parameter im Programmbefehl wurden solange angepasst, bis eine 100% Übereinstimmung der Zählungen bei den Stichproben erreicht wurde. Nach Auswertung sämtlicher Bilddateien erfolgten erneut für jede einzelne Ausnahme stichprobenartige Kontrollen (Abb. 50), um ein korrektes Auszählen der Partikel auch bei unterschiedlichen Kontrast- und Helligkeitsstufen zu gewährleisten. Bei keiner der Kontrollen konnte eine Differenz zwischen manuell und maschinell ausgezählten Partikeln festgestellt werden. Es kann davon ausgegangen werden, dass die MATLAB-Analyse 100% der zu zählenden Nanopartikel korrekt erfasst hat, weswegen eine Standardabweichung nicht angegeben wurde.

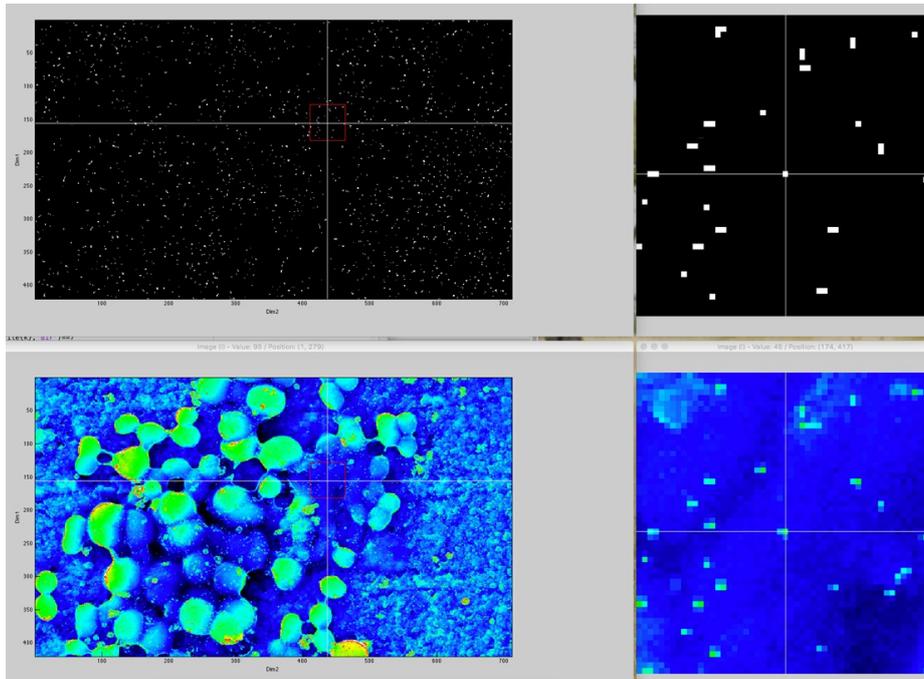


Abb. 50: MatLab: Kontrolle der Zählgenauigkeit, oben gezählte Nanopartikel, unten tatsächlich vorhandene Nanopartikel

5.2.3 REM-Analyse der Biofilmquerschnittsfläche

Die Testschliffe der Blockface-Präparate zeigten einen klaren Zusammenhang zwischen der Schliffrichtung und der Qualität der Grenzfläche zwischen Prüfkörperoberfläche und Einbettmedium. Ein Schliff vom Schmelz zum Araldit ist für die Bildung einer sauberen Grenzfläche aufgrund der Spaltbildung als ungünstig zu bewerten. Weiterhin können versprengte Schmelzpartikel die Grenzfläche maskieren. Sowohl der horizontale Schliff parallel zur Schmelz-Araldit-Grenze, als auch der Schliff vom Araldit zum Schmelz schufen spaltfreie Grenzflächen. Um ein Stauchen der Grenzfläche sowie mögliche Aralditversprengungen in die Schmelzregion zu vermeiden, verläuft die zu bevorzugende Schliffrichtung parallel zur Schmelz-Araldit-Grenze mit Tendenz Araldit zu Schmelz.

In den Blockface-Aufnahmen (Abb. 39) ist in der oberen Bildhälfte das Araldit zu sehen, in der unteren Bildhälfte die negative Schmelzstufe. Unter der Annahme, dass das Araldit alle Biofilmstrukturen bis zur Schmelzoberfläche infiltriert hat, ist die äußerste Kante der Aralditfläche als Schmelzoberfläche, darüber liegende Bereiche als Biofilmareale zu bewerten. Die Nanopartikel fanden sich wie zu erwarten ausschließlich in den Biofilmarealen mit unterschiedlichen Abständen zur Schmelzoberfläche. Da der Biofilm selbst im Blockface-Präparat nicht sichtbar war, konnte keine Aussage darüber getroffen werden, ob Nanopartikel, die sich näher an der Schmelzoberfläche befanden, in tiefere Biofilmschichten vorgedrungen

waren, oder ob der Biofilm in diesem Areal schlichtweg dünner war. Des Weiteren konnte der Probenhalter während der REM-Analyse nicht gekippt werden, sodass ein rechtwinkliges Auftreffen des Elektronenstrahls auf die Querschnittsfläche nicht einstellbar war (Abb. 51). Aufgrund feiner Abweichungen beim Schleifen oder beim Aufbringen des Präparates auf den Probenhalter ergaben sich drei unterschiedliche Bildtypen (Abb. 52). Trifft der Elektronenstrahl die Aralditkante tendenziell auf der Unterseite, sind sowohl die Querschnittsfläche als auch Anteile der Biofilmunterseite zu erkennen. Bei höheren Vergrößerungen sind teilweise Schmelzreste zu sehen, welche beim Ätzvorgang nicht vollständig entfernt wurden. Ist dieser Effekt stark ausgeprägt, kann keine eindeutige Aralditkante und somit Schmelzoberfläche definiert werden. Trifft der Elektronenstrahl die Aralditkante im rechten Winkel, resultieren eine klare Aralditkante sowie ein ausgewogener Bildkontrast. Wenn der Elektronenstrahl die Aralditkante tendenziell auf der Oberseite trifft, stellt sich die Aralditkante zwar eindeutig, jedoch aufgrund ihrer dünnen Stärke im Randbereich heller als die darüber liegenden Aralditareale dar. Die Unterseite des eingebetteten Biofilms ist nicht zu sehen. Die weggeätzten Schmelzareale im unteren Bildbereich liegen weit außerhalb der Fokusebene.

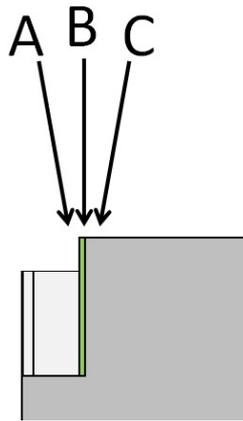


Abb. 51: Der Elektronenstrahl (Pfeil) trifft das Blockface-Präparat tendenziell auf der Unterseite (A), rechtwinklig (B) oder tendenziell von der Oberseite (C)

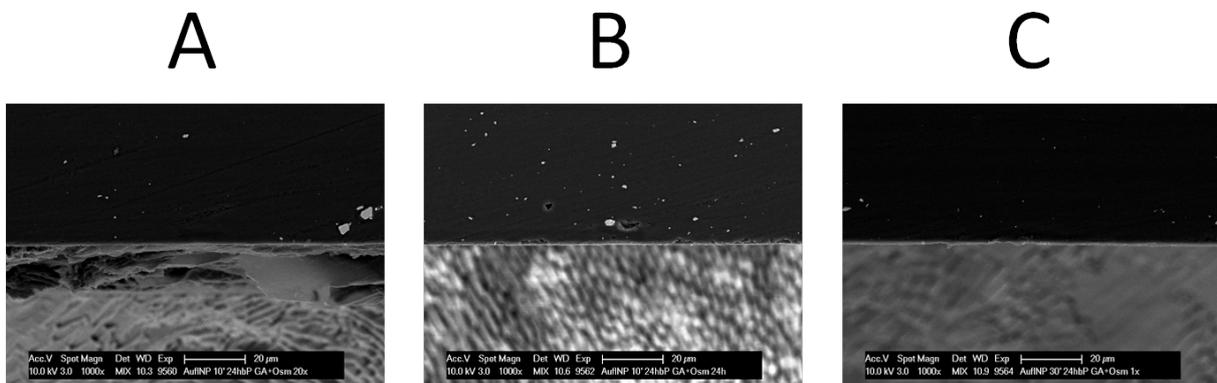


Abb. 52: Der Elektronenstrahl trifft das Blockface-Präparat tendenziell auf der Unterseite (A), rechtwinklig (B) oder tendenziell von der Oberseite (C)

In Bereichen mehrschichtiger bakterieller Zellaggregate ist zur erkennen, dass das Araldit den Biofilm nicht gänzlich infiltriert hat, was auf die fehlende Entwässerung während des Fixiervorgangs zurückzuführen ist. Beim Anschliff bakterieller Inseln entstanden keine klaren Schliffkanten, sondern Ausbrüche des Araldits, die ähnlich wie ein Bruchpräparat Einblicke auf die fixierte Querschnittsfläche der Bakterienkolonien ermöglichten (Abb. 53). In tieferen Schichten dieser Zellaggregate fanden sich keine freien Nanopartikel. Auf der Oberfläche der bakteriellen Inseln sind Nanopartikel-Cluster zu erkennen, welche ebenfalls nicht in tiefere Schichten vorgedrungen waren. Die Blockface-Analyse ermöglichte keine Einschätzung der Eindringtiefe von Nanopartikeln in den Biofilm. Das Penetrationsverhalten war jedoch dahingehend bewertbar, als dass keine Nanopartikel unmittelbar auf der Aralditkante zu finden waren und somit nicht bis zur Schmelzoberfläche durchgedrungen sein konnten.

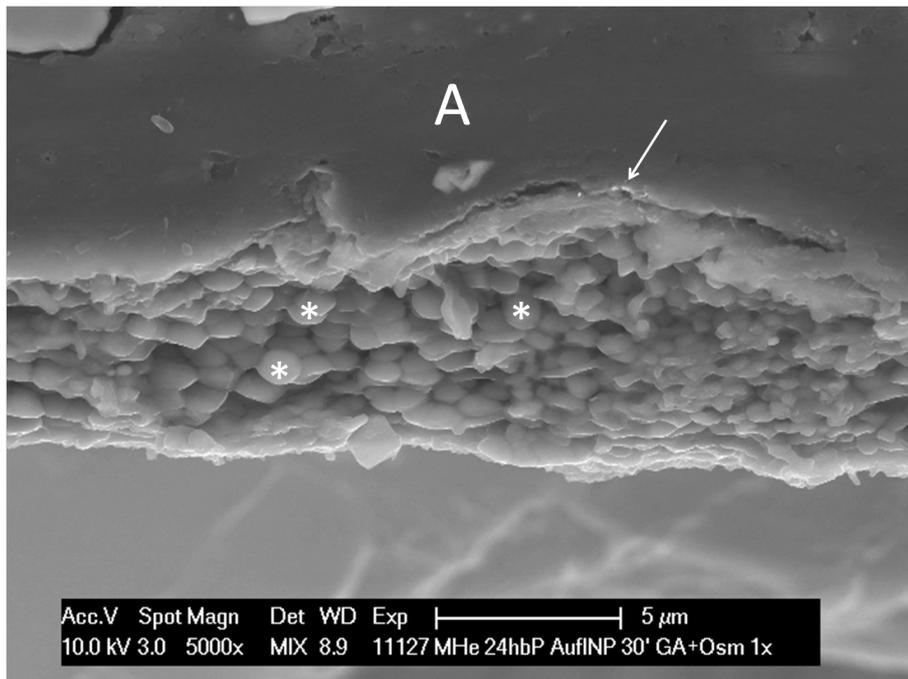


Abb. 53: Bakterielle Aggregate (*) im Blockface-Präparat: Das Araldit (A) hat den Biofilm nicht vollständig infiltriert. Es sind einzelne oberflächliche Goldnanopartikel (Pfeil) zu erkennen. In der Tiefe der Bakterienzellschicht finden sich keine Nanopartikel.

5.2.4 REM-Analyse der Biofilmunterseite

Die rasterelektronenmikroskopische Analyse der Biofilmunterseite diente zur Kontrolle, ob Nanopartikel den Biofilm bis zur Schmelzoberfläche penetrieren konnten. Zur Beurteilung der REM-Bilder der Biofilmunterseite (Abb. 56) erfolgte ein direkter Vergleich mit den REM-Aufnahmen der Biofilmoberfläche (Abb. 54) desselben Präparates. Dabei muss berücksichtigt werden, dass Rückstreuelektronen, welche das BSE-Signal zur Detektion von Goldnanopartikeln liefern, aus tieferen Schichten stammen können. Handelt es sich demnach um eine dünne Pellikelschicht, die von der Unterseite betrachtet wird, so sind auch Nanopartikel sichtbar, welche sich auf der Pellikeloberfläche befinden. Die Pellikel wird praktisch „durchleuchtet“ (Abb. 55). Somit ist eine Beurteilung der Eindringtiefe ähnlich wie im Blockface-Präparat nicht möglich, da sichtbare Nanopartikel sich entweder auf einer dünnen Pellikelschicht befinden oder in tiefere Biofilmschichten nahe der Schmelzoberfläche eingedrungen sein könnten. Das Penetrationsverhalten ist jedoch dahingehend bewertbar, als dass Areale dickerer Pellikelschichten im Bereich regelmäßiger Schmelzvertiefungen mit prismenartiger Anordnung sowie im Bereich bakterieller Zellaggregate definiert werden können. In diesen dickeren Biofilmarealen konnten keine Nanopartikel gefunden werden.

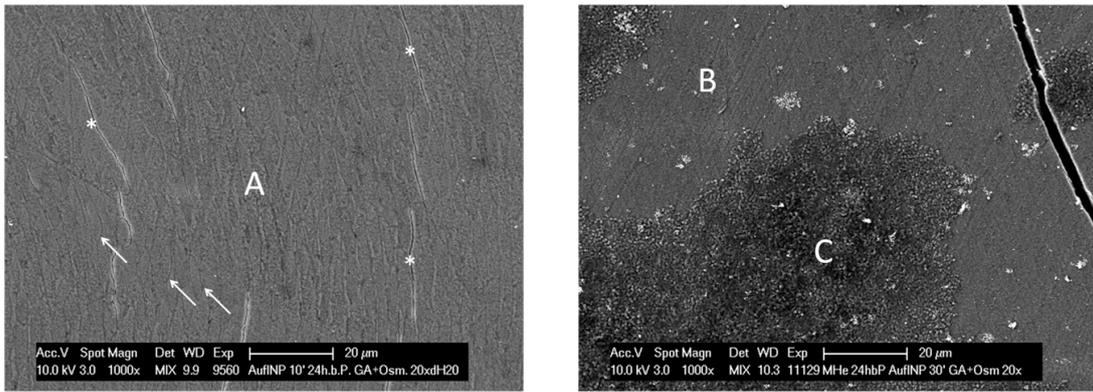


Abb. 54: Links Oberfläche einer dünnen Pellikel (A) auf Prüfkörper mit Prismenstruktur (Pfeile) und Schmelzrissen (*), sowie rechts einer dicken Pellikel (B) und bakterieller Aggregate (C)

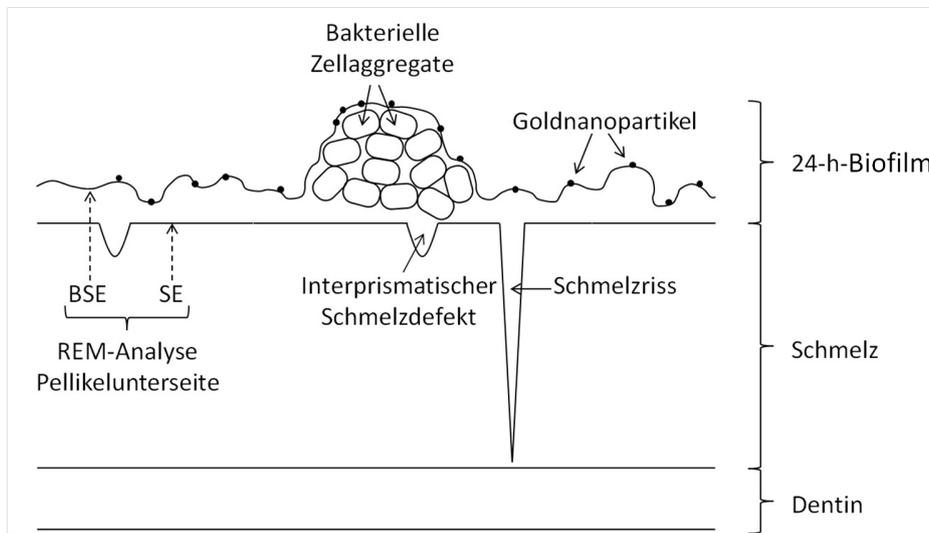


Abb. 55: Schemazeichnung Biofilmquerschnittsfläche

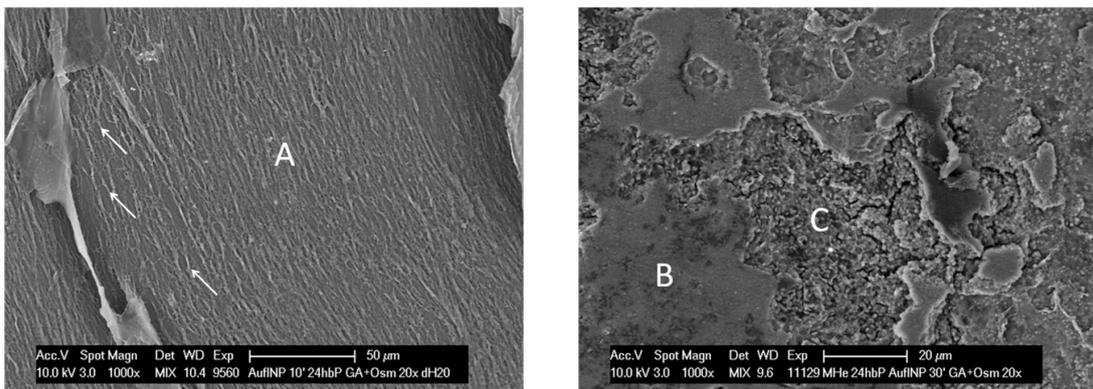


Abb. 56: Links Unterseite einer dünnen Pellikel (A) mit Abdrücken interprismatischer Schmelzdefekte (Pfeile) und infiltrierten Schmelzrissen, sowie rechts einer dicken Pellikel (B) und bakterieller Aggregate (C)

Weiterhin zeigte sich in einem direkten Vergleich zwischen reinen SE- und gemischten SE-BSE-Signalen in hochauflösenden Detailaufnahmen desselben Areals, dass sichtbare Nanopartikel, die scheinbar zur Schmelzoberfläche durchgedrungen sein könnten, in der Untersicht tatsächlich durch Biofilmstrukturen maskiert waren. Die daraus hervorgehende Schlussfolgerung, dass keine Nanopartikel den Biofilm bis zur Schmelzoberfläche durchdringen konnten, stimmt mit der Blockface-Analyse der Querschnittsflächen überein und wurde in weiteren Versuchen mithilfe einer Ultradünnschnittanalyse bestätigt.

5.2.5 TEM-Analyse der Biofilmquerschnittsfläche

Die Ultradünnschnittanalyse mithilfe der Transmissionselektronenmikroskopie liefert detaillierte Einblicke in die Ultrastruktur eines oralen Biofilms [Hannig, 1999]. Die Herstellung klassischer TEM-Ultradünnschnitte beinhaltet nach der Fixierung der Proben mit Glutaraldehyd und Osmiumtetroxid einen Entwässerungsvorgang mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe. Dabei werden die Proben in 50-, 70-, 90-, und 100% Ethanol gelagert. Zur Zwischenlagerung eignet sich Propylenoxid als Intermedium, da Epoxidharze in Propylenoxid besonders gut löslich sind. Die Einbettung und somit Infiltration des Biofilms mit Araldit erfolgt durch die längere Lagerung in einem Propylenoxid-Araldit-Gemisch sowie in klassischer Araldit-Mischung. Araldit eignet sich aufgrund seiner Zusammensetzung aus zwei flüssigen Komponenten besonders gut zur Infiltration bakterieller Biofilme. Da die Proben der vorliegenden Versuchsreihen in erster Linie für die REM-Analyse vorgesehen waren, ist keine Entwässerung erfolgt. Weiterhin wurde bewusst auf die aufsteigende und absteigende Alkoholreihe vor Einbettung verzichtet, da die klassische Araldit-Einbettung zahlreiche Lagerungen in unterschiedlichen Flüssigkeiten einschließt. Somit hätte keine Beurteilung des Einflusses häufiger Spülungen erfolgen können. Aufgrund der fehlenden Entwässerung durchdrang das Araldit dickere Bakterien-schichten nicht komplett, was z. T. im Blockface-Präparat als auch in den REM-Aufnahmen der Pellikelunterseite zu erkennen ist. Pellikelstrukturen, dünne Zellverbände und Schmelzrisse wurden hingegen komplett penetriert. Im TEM-Präparat führte die fehlende Entwässerung zu einer Spaltbildung im Bereich des Biofilms, was die Qualität der Ultradünnschnitte negativ beeinflusste, da zur Beurteilung der Eindringtiefe nur intakte Biofilmbereiche herangezogen werden konnten. Ein weiterer Nachteil der Ultradünnschnittanalyse besteht in der geringen Schichtstärke des untersuchten Areals. Die Trefferquote einzelner Nanopartikel war trotz gleichmäßiger Verteilung der Nanopartikel auf der Pellikeloberfläche aufgrund ihrer kleinen Größe gering, sodass

bevorzugt Konglomerate angeschnitten wurden. Dennoch konnten Areale mit intakter Biofilmschicht und einzelnen Nanopartikeln gefunden werden, welche die in den vorangegangenen REM-Analysen erhobene These einer gescheiterten Diffusion der Nanopartikel in tiefere Biofilmschichten bestätigte.

5.3 Vergleich der eigenen Ergebnisse mit denen aus der Literatur

Abhängig von Größe und Beschaffenheit der Nanopartikel eignen sich raster- und transmissionselektronenmikroskopische Verfahren zur Darstellung der räumlichen Beziehung zwischen einzelnen auf einen Biofilm applizierten Nanopartikeln und der komplexen Oberflächenstruktur des Biofilmnetzwerkes [Reynolds et al., 2003]. Sie eignen sich jedoch nur bedingt zur Beurteilung einer möglichen Diffusion von Partikeln oder Molekülen in einen Biofilm. Die konfokale Laserscannmikroskopie (CLSM) stellt für die Untersuchung von Biofilmstrukturen und der Darstellung einer Diffusionsfront in einem Biofilmmodell ein weit verbreitetes Verfahren dar [Schlafer und Meyer, 2016, Dashper et al., 2013]. Voraussetzung ist die Dotierung von Bestandteilen des Biofilms bzw. der applizierten Partikel oder Moleküle mit einem Fluoreszenzfarbstoff. Ein bakterieller Biofilm kann z. B. durch das Anfärben der Bakterien mit Syto13, der extrazellulären Matrix mit Calcofluor und den interstitiellen Räumen mit 10k-Dex in seiner gesamten Komplexität bildlich dargestellt werden [Thurnheer et al., 2003]. Bakterielle Biofilme lassen sich weiterhin über den Nachweis von Nukleinsäuren durch FISH (Fluorescent *in situ* Hybridization) darstellen [Kniggendorf et al., 2016]. Ebenso existieren zahlreiche Synthemöglichkeiten für fluoreszierende Nanopartikel [Sokolova und Epple, 2011]. Mithilfe einer dreidimensionalen Rekonstruktion des untersuchten Biofilms aus Daten der CLSM kann eine genauere Beurteilung der räumlichen Verteilung von Nanopartikeln auf oder in einem Biofilm erfolgen [Miller et al., 2013, Peulen und Wilkinson, 2011]. Weiterhin kann mithilfe der CLSM die Diffusion antimikrobieller Agenzien in einen Biofilm untersucht werden. So konnte anhand dotierter Bakterienzellen u. a. die Wirkung von Triclosan und CHX durch Verlust der Fluoreszenz nach Zerstörung der bakteriellen Zellmembran gemessen werden [Corbin et al., 2011]. Im Gegensatz zu raster- oder transmissionselektronenmikroskopischen Verfahren ermöglichen fluoreszenzmikroskopische Analysen die Untersuchung des Diffusionsverhaltens von Nanopartikeln unabhängig von ihrer Größe oder chemischen Zusammensetzung und ohne Manipulation des Biofilms durch Fixierungen. Im Hinblick auf die Erforschung des Diffusionsvermögens sehr

kleiner Nanopartikel < 5 nm sowie der Darstellung von Nanopartikeln mit ähnlicher chemischer Zusammensetzung wie Biofilm- oder Prüfkörperbestandteile, beispielsweise Hydroxylapatit-Nanopartikel, die aktuell im Fokus zahlreicher Untersuchungen stehen, stellt die konfokale Laserscannmikroskopie das geeignetere Verfahren dar.

Die Charakterisierung des oralen Biofilms als Diffusionsbarriere findet sich in zahlreichen Studien wieder, die sich mit der Penetration von Partikeln oder Molekülen verschiedenster Größen in einen Biofilm oder in ein Biofilmmodell befassen. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie bestätigen die Hypothese von Besinis *et al.*, dass selbst kleine Nanopartikel ≤ 20 nm den Biofilm durch sterische Hinderung oder durch Bindung an Glycoproteine von Bakterien wahrscheinlich nur schwierig penetrieren und nicht in direktem Kontakt zur Schmelzoberfläche stehen [Besinis *et al.*, 2015]. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der vorliegenden Studie, die keine Effekte häufiger Spülungen oder längerer Lagerung in dH₂O vermerken konnte, wiesen Thurnheer *et al.* nach 60 min extensiver Spülung keine markierten Moleküle im Biofilmmnetzwerk mehr nach [Thurnheer *et al.*, 2003].

Gründe für ein verringertes Diffusionsvermögen von Nanopartikeln oder kleineren Molekülen in einem Biofilm im Vergleich zur Diffusion in Wasser sind vermutlich eine erhöhte Viskosität innerhalb der Biofilmmasse, unspezifische Van-der-Waals-Kräfte zwischen Partikeln und Diffusionsmedium, selektive Bindung an Bakterien oder an die extrazelluläre Matrix, sowie am wahrscheinlichsten die gewundene und verschlungene Mikrostruktur des Biofilms [Thurnheer *et al.*, 2003, Peulen und Wilkinson, 2011, Takenaka *et al.*, 2009, Corbin *et al.*, 2011].

5.4 Schlussfolgerung

Die Vorstellung, dass ein oraler bakterieller Biofilm aufgrund seiner schwammartigen, komplexen 3D-Struktur in der Lage ist, Nanopartikel als Agenzien oder Träger von Wirkstoffen über Poren und Kanäle im komplexen Biofilmmnetzwerk aufzunehmen, muss angesichts der vorliegenden sowie zahlreicher weiterer Studien, die sich mit dem Penetrationsverhalten von Partikeln oder Molekülen in einen Biofilm beschäftigen, dem Modell einer dicht vernetzten Diffusionsbarriere weichen. So ist die Schutzfunktion der erworbenen Pellicel eng verknüpft mit der Undurchlässigkeit eines pathogenen Biofilms selbst für kleine Nanopartikel ≤ 20 nm. Diese Erkenntnis ist nicht nur entscheidend für weitere Forschungen im Bereich des modernen Biofilmmanagements, sondern auch für die Applikation von Mundhygieneprodukten, deren Wirkstoffe z. B. im Sinne einer Remineralisation, die Schmelzoberfläche erreichen sollen. Weitere Untersuchungen sind v. a. im Bereich größen- und formspezifischer Effekte mit einem Fokus auf Nanopartikel < 5 nm notwendig. Außerdem lassen sich mithilfe verschiedener Oberflächenbeschichtungen u. a. fluoreszierende Eigenschaften oder die Oberflächenladung als wichtige Kofaktoren für die Untersuchung von Diffusionsphänomenen modifizieren [Nel et al., 2009]. Weiterhin bedarf es im Hinblick auf eine klinische Anwendung von Nanopartikeln in der antibakteriellen Therapie weiterer Studien bzgl. des Einflusses von Speichelproteinen und Spüleffekten. Auch bei geringem Diffusionsvermögen spielen die Bindung von Nanopartikeln an einen bakteriellen Biofilm sowie ihr Verbleib auf dessen Oberfläche eine entscheidende Rolle für die Wirksamkeit antibakterieller Agenzien [Horev et al., 2015]. Ferner setzt eine biomedizinische Anwendung von Nanomaterialien detaillierte Kenntnisse über ihre Biokompatibilität voraus. Interaktionen zwischen Nanopartikeln und biologischen Systemen, wie Zellen, mit denen sie in Kontakt treten, müssen bekannt sein, sodass eine klinische Applikation von Nanopartikeln erst nach gründlicher Risiko-Nutzen-Abwägung erfolgen darf [Handy et al., 2012].

6 Literaturverzeichnis

- [Allaker, 2010] Allaker RP (2010). The use of nanoparticles to control oral biofilm formation. *Journal of Dental Research*, 89(11), 1175–1186.
- [Allaker und Memarzadeh, 2014] Allaker RP and Memarzadeh K (2014). Nanoparticles and the control of oral infections. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 43(2), 95–104.
- [Altinoğlu et al., 2008] Altinoğlu E, Russin TJ, Kaiser JM, Barth BM, Eklund P, Kester M and Adair JH (2008). Near-infrared emitting fluorophore-doped calcium phosphate nanoparticles for in vivo imaging of human breast cancer. *ACS Nano*, 2(10), 2075–2084.
- [Becker et al., 2014] Becker ST, Beck-Broichsitter B., Graetz C, Dörfer CE, Wiltfang J and Häslér R (2014). Peri-implantitis versus periodontitis: Functional differences indicated by transcriptome profiling. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, 16(3), 401–411.
- [Besinis et al., 2014] Besinis A, De Peralta TD and Handy RD (2014). The antibacterial effects of silver, titanium dioxide and silica dioxide nanoparticles compared to the dental disinfectant chlorhexidine on streptococcus mutans using a suite of bioassays. *Nanotoxicology*, 8(1), 1–16.
- [Besinis et al., 2015] Besinis A, De Peralta T, Tredwin CJ and Handy RD (2015). Review of nanomaterials in dentistry: Interactions with the oral microenvironment, clinical applications, hazards, and benefits. *ACS Nano*, 9(3), 2255–2289.
- [Besinis et al., 2012] Besinis A, van Noort R and Martin N (2012). Infiltration of demineralized dentin with silica and hydroxyapatite nanoparticles. *Dental Materials*, 28(9), 1012–1023.
- [Busscher et al., 1989] Busscher HJ, Uyen HMW, Stokroos I and Jongebloed WL (1989). A transmission electron microscopy study of the adsorption patterns of early developing artificial pellicles on human enamel. *Archives of Oral Biology*, 34(10), 803–810.
- [Cardoso et al., 2016] Cardoso CAB, Cassiano LPS, Costa EN, Souza-e Silva CM, Magalhães AC, Grizzo LT, Caldana ML, Bastos RJM and Buzalaf MAR (2016). Effect of xylitol varnishes on remineralization of artificial enamel caries lesions in situ. *Journal of Dentistry*, 50, 74–78.
- [Carvalho et al., 2016] Carvalho TS, Baumann T and Lussi A (2016). In vitro salivary pellicles from adults and children have different protective effects against erosion. *Clinical Oral Investigations*, (pp. 1–7).

- [Chen et al., 2016] Chen CJ, Chen CC and Ding SJ (2016). Effectiveness of hypochlorous acid to reduce the biofilms on titanium alloy surfaces in vitro. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(7), 1161.
- [Chen et al., 2005] Chen H, Clarkson BH, Sun K and Mansfield JF (2005). Self-assembly of synthetic hydroxyapatite nanorods into an enamel prism-like structure. *Journal of Colloid and Interface Science*, 288(1), 97–103.
- [Chen, 2010] Chen MH (2010). Update on dental nanocomposites. *Journal of Dental Research*, 89(6), 549–560.
- [Choi et al., 2013] Choi AH, Ben-Nissan B, Matinlinna JP and Conway RC (2013). Current perspectives: Calcium phosphate nanocoatings and nanocomposite coatings in dentistry. *Journal of Dental Research*, 92(10), 853–859.
- [Corbin et al., 2011] Corbin A, Pitts B, Parker A and Stewart PS (2011). Antimicrobial penetration and efficacy in an in vitro oral biofilm model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(7), 3338–3344.
- [Cui und Ge, 2007] Cui FZ and Ge J (2007). New observations of the hierarchical structure of human enamel, from nanoscale to microscale. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 1(3), 185–191.
- [Dashper et al., 2013] Dashper SG, Liu SW, Walsh KA, Adams GG, Stanton DP, Ward BR, Shen P, O'Brien-Simpson NM and Reynolds EC (2013). Streptococcus mutans biofilm disruption by κ -casein glycopeptide. *Journal of Dentistry*, 41(6), 521–527.
- [Dawes et al., 2015] Dawes C, Pedersen AML, Villa A, Ekström J, Proctor GB, Vissink A, Aframian D, McGowan R, Aliko A, Narayana N, Sia YW, Joshi RK, Jensen SB, Kerr AR and Wolff A (2015). The functions of human saliva: A review sponsored by the world workshop on oral medicine {VI}. *Archives of Oral Biology*, 60(6), 863–874.
- [Dentino et al., 2013] Dentino A, Lee S, Mailhot J and Hefti AF (2013). Principles of periodontology. *Periodontology 2000*, 61(1), 16–53.
- [do Socorro Coelho Alves et al., 2016] do Socorro Coelho Alves M, Fonseca Mantilla T, Cosser Bridi E, Tarkany Basting R, Mantovani Gomes França F, Lucisano Botelho Amaral F and Pedroso Turssi C (2016). Rinsing with antacid suspension reduces hydrochloric acid-induced erosion. *Archives of Oral Biology*, 61, 66–70.

- [Doat et al., 2003] Doat A, Fanjul M, Pellé F, Hollande E and Lebugle A (2003). Europium-doped bioapatite: a new photostable biological probe, internalizable by human cells. *Biomaterials*, 24(19), 3365–3371.
- [Dye et al., 2015a] Dye BA, Thornton-Evans G, Li X and Iafolla TJ (2015a). Dental caries and sealant prevalence in children and adolescents in the United States, 2011-2012. *NCHS Data Brief*, (191).
- [Dye et al., 2015b] Dye BA, Thornton-Evans G, Li X and Iafolla TJ (2015b). Dental caries and tooth loss in adults in the United States, 2011-2012. *NCHS Data Brief*, (197).
- [Edman et al., 2016] Edman K, Öhrn K, Nordström B and 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 Odontologica Scandinavica*, 74(5), 385–392.
- [Erickson, 2009] Erickson HP (2009). Size and shape of protein molecules at the nanometer level determined by sedimentation, gel filtration, and electron microscopy. *Biological Procedures Online*, 11(1).
- [Eshed et al., 2012] Eshed M, Lellouche J, Matalon S, Gedanken A and Banin E (2012). Sonochemical coatings of ZnO and CuO nanoparticles inhibit streptococcus mutans biofilm formation on teeth model. *Langmuir*, 28(33), 12288–12295.
- [Fatin-Rouge et al., 2004] Fatin-Rouge N, Starchev K and Buffle J (2004). Size effects on diffusion processes within agarose gels. *Biophysical Journal*, 86(5), 2710–2719.
- [Ferreira Ribeiro et al., 2016] Ferreira Ribeiro C, Cogo-Müller K, Cesar Franco G, Silva-Concílio LG, Sampaio Campos M, de Mello Rode S and Claro Neves AC (2016). Initial oral biofilm formation on titanium implants with different surface treatments: An in vivo study. *Archives of Oral Biology*, 69, 33–39.
- [Flemming, 2011] Flemming HC (2011). The perfect slime. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 86(2), 251–259.
- [Foster und Kolenbrander, 2004] Foster JS and Kolenbrander PE (2004). Development of a multispecies oral bacterial community in a saliva-conditioned flow cell. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(7), 4340–4348.

- [Giri et al., 2015] Giri K, Rivas Yepes L, Duncan B, Kolumam Parameswaran P, Yan B, Jiang Y, Bilska M, Moyano DF, Thompson MA, Rotello VM and Prakash YS (2015). Targeting bacterial biofilms via surface engineering of gold nanoparticles. *RSC Adv.*, 5, 105551–105559.
- [Gopinath et al., 2015] Gopinath NM, John J, Nagappan N, Prabhu S and Kumar ES (2015). Evaluation of dentifrice containing nano-hydroxyapatite for dentinal hypersensitivity: A randomized controlled trial. *Journal of International Oral Health*, 7(8), 118–122.
- [Grychtol et al., 2014] Grychtol S, Basche S, Hannig M and Hannig C (2014). Effect of CPP/ACP on initial bioadhesion to enamel and dentin in situ. *The Scientific World Journal*, 2014.
- [Habimana et al., 2011] Habimana O, Steenkeste K, Fontaine-Aupart MP, Bellon-Fontaine MN, Kulakauskas S and Briandet R (2011). Diffusion of nanoparticles in biofilms is altered by bacterial cell wall hydrophobicity. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(1), 367–368.
- [Haffajee et al., 2008] Haffajee AD, Socransky SS, Patel MR and Song X (2008). Microbial complexes in supragingival plaque. *Oral Microbiology and Immunology*, 23(3), 196–205.
- [Handy et al., 2012] Handy RD, van den Brink N and Chappell M et al. (2012). Practical considerations for conducting ecotoxicity test methods with manufactured nanomaterials: what have we learnt so far? *Ecotoxicology (London, England)*, 21, 933–972.
- [Hannig et al., 2013] Hannig C, Basche S, Burghardt T, Al-Ahmad A and Hannig M (2013). Influence of a mouthwash containing hydroxyapatite microclusters on bacterial adherence in situ. *Clinical Oral Investigations*, 17(3), 805–814.
- [Hannig und Hannig, 2010a] Hannig C and Hannig M (2010a). Natural enamel wear - a physiological source of hydroxylapatite nanoparticles for biofilm management and tooth repair? *Medical Hypotheses*, 74(4), 670–672.
- [Hannig, 1999] Hannig M (1999). Ultrastructural investigation of pellicle morphogenesis at two different intraoral sites during a 24-h period. *Clin Oral Invest*, (3), 88–95.
- [Hannig, 2002] Hannig M (2002). The protective nature of the salivary pellicle. *International Dental Journal*, 52(S5), 417–423.
- [Hannig und Hannig, 2010b] Hannig M and Hannig C (2010b). Nanomaterials in preventive dentistry. *Nature Nanotechnology*, 5, 565–569.

- [Hannig und Joiner, 2006] Hannig M and Joiner A (2006). The structure, function and properties of the acquired pellicle. *Druckworth RM (ed): The Teeth and Their Environment*, 19, 69–64.
- [Hannig et al., 2007] Hannig M, Kriener L, Hoth-Hannig W, Becker-Willinger C and Schmidt H (2007). Influence of nanocomposite surface coating in biofilm formation in situ. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 7(11), 1–7.
- [Hashimoto et al., 2015] Hashimoto M, Sasaki JI, Yamaguchi S, Kawai K, Kawakami H, Iwasaki Y and Imazato S (2015). Gold nanoparticles inhibit matrix metalloproteases without cytotoxicity. *Journal of Dental Research*, 94(8), 1085–1091.
- [Hertel et al., 2016] Hertel S, Graffy L, Pöschke S, Basche S, Al-Ahmad A, Hoth-Hannig W, Hannig M and Hannig C (2016). Effect of inula viscosa on the pellicle - protective properties and initial bioadhesion in-situ. *Archives of Oral Biology*, 71, 87–96.
- [Hervás-García et al., 2006] Hervás-García A, Martínez-Lozano MA, Cabanes-Vila J, Barjau-Escribano A and Fos-Galve P (2006). Composite resins. A review of the materials and clinical indications. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.*, 11, 215–220.
- [Horev et al., 2015] Horev B, Klein MI, Hwang G, Li Y, Kim D, Koo H and Benoit DSW (2015). pH-activated nanoparticles for controlled topical delivery of farnesol to disrupt oral biofilm virulence. *ACS Nano*, 9(3), 2390–2404.
- [Huang et al., 2011] Huang S, Gao S, Cheng L and Yu H (2011). Remineralization potential of nano-hydroxyapatite on initial enamel lesions: An in vitro study. *Caries Res*, 45, 460–468.
- [Jordan et al., 2016] Jordan AR, Micheelis W, Cholmakow-Bodechtel C, Füßl-Grünig E, Geyer S, Hertrampf K, Hoffmann T, Holtfreter B, Kocher T, Nitschke I, Noffz S, Scharf L, Schiffner U, Schützhold S, Stark H and Zimmer S (2016). Fünfte Deutsche Mundgesundheitsstudie. *Deutscher Zahnärzte Verlag DÄV*.
- [Kniggendorf et al., 2016] Kniggendorf AK, Nogueira R, Kelb C, Schadzek P, Meinhardt-Wollweber M, Ngezahayo A and Roth B (2016). Confocal raman microscopy and fluorescent in situ hybridization - a complementary approach for biofilm analysis. *Chemosphere*, 161, 112–118.
- [Lang, 2012] Lang G (2012). *Histotechnik: Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik*. Springer-Verlag.
- [Laurisch, 2008] Laurisch L (2008). Kariesprävention durch Biofilmmangement. *DFZ* 7-8.

- [Lebugle et al., 2006] Lebugle A, Pelle F, Charvillat C, Rousselot I and Chane-Ching JY (2006). Colloidal and monocrystalline Ln^{3+} doped apatite calcium phosphate as biocompatible fluorescent probes. *Chem. Commun.*, (pp. 606–608).
- [Li et al., 2014] Li X, Wang J, Joiner A and Chang J (2014). The remineralisation of enamel: a review of the literature. *Journal of Dentistry*, 42, Supplement 1, 12–20.
- [Liu et al., 2012] Liu XC, Zhao MZ, Lu JX, Ma J, Wei J and Wei SC (2012). Cell responses to two kinds of nanohydroxyapatite with different sizes and crystallinities. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 1239–1250.
- [Markowska et al., 2013] Markowska K, Grudniak AM and Wolska KI (2013). Silver nanoparticles as an alternative strategy against bacterial biofilms. *Acta Biochim Pol.*, 60(4), 523–530.
- [Marsh, 2003] Marsh PD (2003). Plaque as a biofilm: pharmacological principles of drug delivery and action in the sub- and supragingival environment. *Oral Diseases*, 9, 16–22.
- [Marsh, 2010] Marsh PD (2010). Microbiology of dental plaque biofilms and their role in oral health and caries. *Dental Clinics of North America*, 54(3), 441–454.
- [Mayhall und Butler, 1976] Mayhall CW and Butler WT (1976). The carbohydrate composition of experimental salivary pellicles. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 5(6), 358–370.
- [Meirelles et al., 2008] Meirelles L, Arvidsson A, Andersson M, Kjellin P, Albrektsson T and Wennerberg A (2008). Nano hydroxyapatite structures influence early bone formation. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 87A(2), 299–307.
- [Miller et al., 2013] Miller JK, Neubig R and Clemons CB (2013). Nanoparticle deposition onto biofilms. *Annals of biomedical engineering*, 41(1), 53–67.
- [Mistry et al., 2011] Mistry S, Kundu D, Datta S and Basu D (2011). Comparison of bioactive glass coated and hydroxyapatite coated titanium dental implants in the human jaw bone. *Australian Dental Journal*, 56(1), 68–75.
- [Morones et al., 2005] Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, Holt K, Kouri JB, Ramírez JT and Yacaman MJ (2005). The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 16(10), 2346.
- [Nehme et al., 2016] Nehme M, Jeffery P, Mason S, Lippert F, Zero DT and Hara AT (2016). Erosion remineralization efficacy of gel-to-foam fluoride toothpastes in situ: A randomized clinical trial. *Caries Res*, 50, 62–70.

- [Nel et al., 2009] Nel AE, Mädler L, Velego D, Xia T, Hoek EMV, Somasundaran P, Klaessig F, Castranova V and Thompson M (2009). Understanding biophysicochemical interactions at the nano–bio interface. *Nature Materials*, 8, 543–557.
- [Pan et al., 2007] Pan Y, Neuss S, Leifert A, Fischler M, Wen F, Simon U, Schmid G, Brandau W and Jähnen-Dechent W (2007). Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles. *Small*, 3(11), 1941–1949.
- [Papadopoulos et al., n.d.] Papadopoulos KK, Trautmann S, Fecher-Trost C, Barghasch A and Hannig M (n.d.). Proteomanalyse des initialen in-situ Biofilms auf Dentin unter erosiven Einflüssen. ZMK-Klinik, Universität des Saarlandes, Homburg.
- [Petersen et al., 2005] Petersen PE, Bourgeois D, Ogawa H, Estupinan-Day S and Ndiaye C (2005). The global burden of oral diseases and risks to oral health. *Bulletin of the World Health Organization*, 83, 661–669.
- [Peulen und Wilkinson, 2011] Peulen TO and Wilkinson KJ (2011). Diffusion of nanoparticles in a biofilm. *Environmental Science & Technology*, 45(8), 3367–3373.
- [Prada-López et al., 2015] Prada-López I, Quintas V and Tomás I (2015). The intraoral device of overlaid disk-holding splints as a new in situ oral biofilm model. *Journal of Clinical and Experimental Dentistry*, 7(1), 126–132.
- [Pratten et al., 2016] Pratten J, Wiecek J, Mordan N, Lomax A, Patel N, Spratt D and Middleton AM (2016). Physical disruption of oral biofilms by sodium bicarbonate: an in vitro study. *International Journal of Dental Hygiene*, 14(3), 209–214.
- [Reich et al., 2012] Reich M, Hannig C, Al-Ahmad A, Bolek R and Kümmerer K (2012). A comprehensive method for determination of fatty acids in the initial oral biofilm (pellicle). *Journal of Lipid Research*, 53(10), 2226–2230.
- [Reynolds et al., 2003] Reynolds EC, Cai F, Shen P and Walker GD (2003). Retention in plaque and remineralization of enamel lesions by various forms of calcium in a mouthrinse or sugar-free chewing gum. *Journal of Dental Research*, 82(3), 206–211.
- [Rose, 2000] Rose RK (2000). Binding characteristics of streptococcus mutans for calcium and casein phosphopeptide. *Caries Res*, 34, 427–431.
- [Roveri und Iafisco, 2010] Roveri N and Iafisco M (2010). Evolving application of biomimetic nanostructured hydroxyapatite. *Nanotechnology, Science and Applications*, 3, 107–125.

- [Rupf et al., 2012] Rupf S, Balkenhol M, Sahrhage TO, Baum A, Chromik JN, Ruppert K, Wissenbach DK, Maurer HH and Hannig M (2012). Biofilm inhibition by an experimental dental resin composite containing octenidine dihydrochloride. *Dental Materials*, 28(9), 974–984.
- [Rykke et al., 1995] Rykke M, G Smistad., Rölla G and Karlsen J (1995). Micelle-like structures in human saliva. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 4(1), 33–44.
- [Schlafer und Meyer, 2016] Schlafer S and Meyer RL (2016). Confocal microscopy imaging of the biofilm matrix. *Journal of Microbiological Methods*.
- [Schwiertz et al., 2009] Schwiertz J, Wiehe A, Gräfe S, Gitter B and Epple M (2009). Calcium phosphate nanoparticles as efficient carriers for photodynamic therapy against cells and bacteria. *Biomaterials*, 30(19), 3324–3331.
- [Seneviratne et al., 2011] Seneviratne CJ, Zhang CF and Samaranayake L (2011). Dental plaque biofilm in oral health and disease. *Chin J Dent Res*, 14(2), 87–94.
- [Sokolova und Epple, 2011] Sokolova V and Epple M (2011). Synthetic pathways to make nanoparticles fluorescent. *Nanoscale*, 3, 1957–1962.
- [Stewart, 2003] Stewart PS (2003). Diffusion in biofilms. *Journal of Bacteriology*, 185(5), 1485–1491.
- [Sutherland, 2001] Sutherland IW (2001). The biofilm matrix - an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends in Microbiology*, 9(5), 222–227.
- [Takenaka et al., 2009] Takenaka S, Pitts B, Trivedi HM and Stewart PS (2009). Diffusion of macromolecules in model oral biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(6), 1750–1753.
- [Thurnheer und Belibasakis, 2016] Thurnheer T and Belibasakis GN (2016). Incorporation of staphylococci into titanium-grown biofilms: an in vitro “submucosal” biofilm model for peri-implantitis. *Clinical Oral Implants Research*, 27(7), 890–895.
- [Thurnheer et al., 2003] Thurnheer T, Gmür R, Shapiro S and Guggenheim B (2003). Mass transport of macromolecules within an in vitro model of supragingival plaque. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(3), 1702–1709.
- [Tschoppe et al., 2011] Tschoppe P, Zandim DL, Martus P and Kielbassa AM (2011). Enamel and dentine remineralization by nano-hydroxyapatite toothpastes. *Journal of Dentistry*, 39(6), 430–437.

- [Venegas et al., 2006] Venegas SC, Palacios JM, Apella MC, Morando PJ and Blesa MA (2006). Calcium modulates interactions between bacteria and hydroxyapatite. *Journal of Dental Research*, 85(12), 1124–1128.
- [Vukosavljevic et al., 2014] Vukosavljevic D, Custodio W, Buzalaf MAR, Hara AT and Siqueira WL (2014). Acquired pellicle as a modulator for dental erosion. *Archives of Oral Biology*, 59(6), 631–638.
- [Wang et al., 2008] Wang L, Guan X, Yin H, Moradian-Oldak J and Nancollas GH (2008). Mimicking the self-organized microstructure of tooth enamel. *The journal of physical chemistry C, Nanomaterials and interfaces*, 112(15), 5892–5899.
- [Wang et al., 2016] Wang M, Gao B and Tang D (2016). Review of key factors controlling engineered nanoparticle transport in porous media. *Journal of Hazardous Materials*, 318, 233–246.
- [Wierichs et al., 2016] Wierichs RJ, Zelck H, Doerfer CE, Appel P, Paris S, Esteves-Oliveira M and Meyer-Lueckel H (2016). Effects of dentifrices differing in fluoride compounds on artificial enamel caries lesions in vitro. *Odontology*, (pp. 1–10).
- [Wood et al., 2000] Wood SR, Kirkham J, Marsh PD, Shore RC, Nattress B and Robinson C (2000). Architecture of intact natural human plaque biofilms studied by confocal laser scanning microscopy. *Journal of Dental Research*, 79(1), 21–27.
- [Xiao et al., 2012] Xiao J, Klein MI, Falsetta ML, Bingwen L, Delahunty CM, Yates JR, Heydorn A and Koo H (2012). The exopolysaccharide matrix modulates the interaction between 3D architecture and virulence of a mixed-species oral biofilm. *Mitchell AP, ed. PLoS Pathogens*, 8(4), e1002623.
- [Ximénez-Fyvie et al., 2000] Ximénez-Fyvie LA, Haffajee AD and Socransky SS (2000). Comparison of the microbiota of supra- and subgingival plaque in health and periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 27(9), 648–657.
- [Yamada et al., 2015] Yamada M, Foote M and Prow TW (2015). Therapeutic gold, silver, and platinum nanoparticles. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 7(3), 428–445.
- [Yassen et al., 2011] Yassen GH, Platt JA and Hara AT (2011). Bovine teeth as substitute for human teeth in dental research: a review of literature. *Journal of Oral Science*, 53(3), 273–282.

- [Yen et al., 2009] Yen HJ, Hsu SH and Tsai CL (2009). Cytotoxicity and immunological response of gold and silver nanoparticles of different sizes. *Small*, 5(13), 1553–1561.
- [Yönel et al., 2016] Yönel N, Bikker FJ, Lagerweij MD, Kleverlaan CJ, van Loveren C, Azen B, Aetiner S and van Strijp AJP (2016). Anti-erosive effects of fluoride and phytosphingosine: an in vitro study. *European Journal of Oral Sciences*, 124(4), 396–402.
- [Young et al., 1997] Young A, Rykke M, Smistad G and Ralla G (1997). On the role of human salivary micelle-like globules in bacterial agglutination. *European Journal of Oral Sciences*, 105(5), 485–494.
- [Zijnge et al., 2010] Zijnge V, van Leeuwen MBM, Degener JE, Abbas F, Thurnheer T, Gmür R and Harmsen HJM (2010). Oral biofilm architecture on natural teeth. *Bereswill S, ed. PLoS ONE*, 5(2), 1–9.

7 Danksagung

Ich möchte meinem Doktorvater Prof. Dr. Matthias Hannig, Direktor der Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und präventive Zahnheilkunde des Universitätsklinikums des Saarlandes, für die freundliche Bereitstellung des Themas sowie für die Beratung und Unterstützung im Rahmen meiner Doktorarbeit und während meiner gesamten Studienzeit in Homburg bedanken.

Ich danke außerdem Prof. Dr. Peter Lipp, Institut für Molekulare Zellbiologie der Universität des Saarlandes, und seinem Mitarbeiter Dr. Qinghai Tian für die freundliche Bereitstellung von MATLAB und ihre Hilfe bei der Auszählung der Nanopartikel.

Weiterhin danke ich allen wissenschaftlichen Mitarbeitern der AG Prof. Dr. Hannig, insbesondere Dr. Natalia Umanskaya und Dr. Simone Grass, für die Betreuung und Hilfsbereitschaft während der Versuchsreihen. Ich danke außerdem Dr. Helmut Jennewein, der mir für die Durchführung der Experimente die notwendige Flexibilität ermöglicht hat.

Ich danke Frau Wiebke Hoth-Hannig, Birgit Leis und Belinda König für die freundliche Anleitung am Transmissionselektronenmikroskop. Ein herzlicher Dank geht außerdem an Norbert Pütz, der mich mit viel Geduld in unzähligen Sitzungen am Rasterelektronenmikroskop angeleitet und unterstützt hat.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern Jörn und Sigrid Schäfer für ihre liebevolle moralische Unterstützung auf meinem gesamten Lebensweg. Ich danke meinen Schwestern Lynn und Valerie für ihre Freundschaft.

Zum Schluss danke ich meinem Lebensgefährten Denis Riegelmann - für alles.

Anhang

Abkürzungsverzeichnis

AAP	American Association of Periodontology
Abb.	Abbildung
BSE	back scattered electrons
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
Ca	Calcium
CDC	Center for Disease Control and Prevention
CHX	Chlorhexidin
CLSM	Konfokale Laserscanmikroskopie
CPP-ACP	Casein Phosphopeptid — amorphes Calciumphosphat
Cu	Kupfer
DDAS	Dodecanyl Succinic Anhydride
dH ₂ O	Wasser, destilliert
DMFT	decayed missing filled teeth
DMS V	Fünfte Deutsche Mundgesundheitsstudie
EDX	energy dispersive X-Ray spectroscopy
<i>et. al.</i>	<i>et alii</i>
Eu	Europium
FISH	fluorescent in situ hybridization
g	Gramm
Gd	Gadolinium
ggf.	gegebenenfalls
HCl	Salzsäure
h	Stunden
kDa	Kilodalton
M	Mol
MMP	Matrixmetalloproteinase
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter

μl	Mikroliter
mm	Millimeter
NaOCl	Natriumhypochlorid
n.d.	no date
NIR	Nahinfrarotspektroskopie
nm	Nanometer
NP	Nanopartikel
ppm	parts per million
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
pH	potentia Hydrogenii
REM	Rasterelektronenmikroskop
SE	Sekundärelektronen
sec	Sekunden
SiO ₂	Siliciumdioxid
spp.	<i>species</i>
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TiO ₂	Titandioxid
U	Umdrehungen
u. a.	unter anderem
v. a.	vor allem
z. B.	zum Beispiel
Zn	Zink
z. T.	zum Teil

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Schemazeichnung eines Goldnanopartikels	12
Abb. 2	Schemazeichnung zum Zerteilen der Rinderzähne	13
Abb. 3	Schemazeichnung zum Zerteilen der Labialflächen in Prüfkörperrohlinge . .	14
Abb. 4	Schleifen einer planen Schmelzoberfläche	14
Abb. 5	Fertigstellung des Prüfkörpers	15
Abb. 6	Vorbereitete Trageschiene regio 24-26	16
Abb. 7	Schemazeichnung Applikation der Goldnanopartikel auf den Probenträger .	18
Abb. 8	Schemazeichnung Blockface-Präparat in Aufsicht (A) mit Prüfkörper (*) und Probennummer (Pfeil), Seitenansicht (B) nach Anschliff (gestrichelte Linie) und Schliifffläche (C)	21
Abb. 9	Schliffrichtungen: Araldit zu Schmelz (A), horizontal (B), Schmelz zu Aral- dit (C)	21
Abb. 10	Prüfkörper mit Biofilm (Pfeil): Nach dem Ätzzvorgang ist eine negative Schmelzstufe (A) sichtbar.	22
Abb. 11	Applikation der Goldnanopartikel (rote Suspension) auf Biofilmproben . . .	24
Abb. 12	Prüfkörper und Probennummern vor Einbettung in Araldit	25

Abb. 13	Gesputtertes Blockface-Präparat mit sichtbarer negativer Schmelzstufe (Pfeil)	26
Abb. 14	Positionierung des Aralditblocks auf dem Probeteller (*) zur Analyse der Biofilmquerschnittsfläche (A) und der Biofilmunterseite (B)	26
Abb. 15	Fluoreszenzmikroskopische Analyse einer 1:10-Verdünnung	28
Abb. 16	Freie Goldnanopartikel	29
Abb. 17	Gebundene Goldnanopartikel auf sphärischen Trägerpartikeln	29
Abb. 18	Bakterieller Zellverband (A) auf der Schmelzoberfläche (B)	30
Abb. 19	EDX-Analyse: Nachweis von Gold im Bereich der Cluster	31
Abb. 20	EDX-Analyse: Nachweis von Gold im Bereich freier Nanopartikel	31
Abb. 21	Blockface-Testschliffe	32
Abb. 22	Geätztes Blockface-Präparat	33
Abb. 23	Übersichtsaufnahme 24-h-Biofilm Proband 1: Typisches Bild einer dünnen Pellikelschicht (A) mit inselartigen dickeren Pellikelschichten (Pfeile) und bakteriellen Aggregaten (B)	34
Abb. 24	Übersichtsaufnahme 24-h-Biofilm Proband 2: Typisches Bild einer dicken Pellikelschicht (A) mit großflächigen bakteriellen Aggregaten (B)	34

Abb. 25 Gleichmäßig verteilte Goldnanopartikel (Pfeile) auf einer dünnen Pellikelschicht (A) nach 10 min Einwirkzeit und einmaliger Spülung. Die Prismenstruktur des Schmelzes ist erkennbar (*).	36
Abb. 26 Nach 30 min Einwirkzeit befinden sich deutlich mehr Nanopartikel (Pfeile) mit Tendenz zur Clusterbildung (Kreis) auf der Pellikeloberfläche.	36
Abb. 27 Nanopartikel (Pfeile) auf dicker Pellikelschicht mit heterogener, globulärer Oberflächenstruktur (A) und einzelnen Bakterienzellen (*)	37
Abb. 28 „Early colonizer “(*) besiedeln die Pellikelschicht (A). Nach 10 min Einwirkzeit und einmaliger Spülung sind freie Goldnanopartikel (Pfeile) und gebundene Goldnanopartikel (Kreis) zu erkennen.	37
Abb. 29 Komplexes, dreidimensionales Netzwerk aus Stäbchen (A) und Kokken (B) mit Goldnanopartikeln (Pfeile) nach 10 min Einwirkzeit und einmaliger Spülung .	38
Abb. 30 Nach 20-facher Spülung befinden sich immer noch zahlreiche Goldnanopartikel auf der Biofilmoberfläche.	38
Abb. 31 Nach 24 h finden sich auch bei den Proben mit 30 min Einwirkzeit deutlich weniger Nanopartikel (Pfeile) auf dünneren Pellikelschichten.	39
Abb. 32 In Regionen bakterieller Aggregate lässt sich nach 24 h eine Anhäufung von Nanopartikeln (Pfeile) feststellen.	39
Abb. 33 Genau wie auf bakteriellen Aggregaten (A) häufen sich die Nanopartikel nach 24 h auf dickeren Pellikelschichten (B).	40

Abb. 34 Es besteht keine Diffusionstendenz in Poren und Kanäle (*) des Biofilmmatzwerks. Stattdessen ist eine Anhäufung von Nanopartikeln (Pfeile) an einzelnen Bakterienzellen zu erkennen.	40
Abb. 35 Auf den Kontrollproben ohne Biofilm finden sich deutlich weniger Nanopartikel (Pfeile) als auf den Prüfkörpern mit 24-h-Biofilm.	41
Abb. 36 Anhäufung von Nanopartikeln in einer Schleifspur (Pfeile) auf einem Schmelzprüfkörper ohne Biofilm.	41
Abb. 37 Statistische Auswertung: Vergleich Biofilm Proband 1, Biofilm Proband 2 und biofilmfreie Schmelzproben im Hinblick auf die Anlagerung von Goldnanopartikeln	42
Abb. 38 Statistische Auswertung: Vergleich verschiedener Biofilmqualitäten	43
Abb. 39 Blockface-Präparat: Obere Bildhälfte Aralditfläche, untere Bildhälfte angeätzter Schmelz außerhalb der Fokusebene. Einige Nanopartikel wurden durch das Schleifen freigelegt (Pfeile durchgängig), andere liegen in tieferen Bildebenen (Pfeile gestrichelt).	44
Abb. 40 Blick auf die Unterseite einer dünnen Pellikel: Es sind vergleichbar viele Goldnanopartikel sichtbar, wie in der Aufsicht.	45
Abb. 41 Abdrücke Interprismatischer Schmelzdefekte (*) in der Pellikelunterseite. Sie verdecken (Kreis), im Gegensatz zu dünneren Pellikelschichten (A), die Sicht auf Nanopartikel (Pfeile).	46
Abb. 42 Blick auf die Unterseite einer dicken Pellikel (A) mit einzelnen Bakterienzellen (*). Es sind im Vergleich zur Aufsicht kaum Nanopartikel zu erkennen. . .	46

Abb. 43 Auf der Unterseite der bakteriellen Aggregate sind keine Nanopartikel zu sehen.	47
Abb. 44 Die Ansicht der Biofilmunterseite ermöglicht einen Blick auf ein komplexes, verflochtenes Netzwerk mit zahlreichen Poren und Kanälen. Innerhalb dieser Poren und Kanäle sind keine Nanopartikel sichtbar.	47
Abb. 45 Schmelzseite A, Biofilmseite B: Der Ultradünnschnitt zeigt mehrschichtige, bakterielle Zellaggregate (*) mit aufgelagerten Nanopartikeln (Pfeile) bei 18.500-facher Vergrößerung.	49
Abb. 46 Schmelzseite A, Biofilmseite B: Der Ultradünnschnitt zeigt mehrschichtige, bakterielle Zellaggregate (*) mit aufgelagerten Nanopartikeln (Pfeile) bei 23.000-facher Vergrößerung.	49
Abb. 47 Schmelzseite A, Biofilmseite B: Der Ultradünnschnitt zeigt einzelne Nanopartikel (Pfeile) im Bereich einer dünnen Pellikelschicht bei 30.000-facher Vergrößerung.	50
Abb. 48 Schmelzseite A, Biofilmseite B: Der Ultradünnschnitt zeigt einzelne Nanopartikel (Pfeile) im Bereich einer dünnen Pellikelschicht bei 49.000-facher Vergrößerung.	50
Abb. 49 Vergleich Qualität der REM-Analysen von Nanopartikeln auf fixiertem (a) und nicht fixiertem (b) Biofilm	55
Abb. 50 MatLab: Kontrolle der Zählgenauigkeit, oben gezählte Nanopartikel, unten tatsächlich vorhandene Nanopartikel	60
Abb. 51 Der Elektronenstrahl (Pfeil) trifft das Blockface-Präparat tendenziell auf der Unterseite (A), rechtwinklig (B) oder tendenziell von der Oberseite (C)	62

Abb. 52 Der Elektronenstrahl trifft das Blockface-Präparat tendenziell auf der Unterseite (A), rechtwinklig (B) oder tendenziell von der Oberseite (C) 62

Abb. 53 Bakterielle Aggregate (*) im Blockface-Präparat: Das Araldit (A) hat den Biofilm nicht vollständig infiltriert. Es sind einzelne oberflächliche Goldnanopartikel (Pfeil) zu erkennen. In der Tiefe der Bakterienzellschicht finden sich keine Nanopartikel. 63

Abb. 54 Links Oberfläche einer dünnen Pellikel (A) auf Prüfkörper mit Prismenstruktur (Pfeile) und Schmelzrissen (*), sowie rechts einer dicken Pellikel (B) und bakterieller Aggregate (C) 64

Abb. 55 Schemazeichnung Biofilmquerschnittsfläche 64

Abb. 56 Links Unterseite einer dünnen Pellikel (A) mit Abdrücken interprismatischer Schmelzdefekte (Pfeile) und infiltrierten Schmelzrissen, sowie rechts einer dicken Pellikel (B) und bakterieller Aggregate (C) 64

Material- und Methodenverzeichnis

1. Alginat Blueprint X-creme, Dentsply DeTrey, Konstanz, Deutschland
2. Araldit Araldite Resin CY212, Agar Scientific, Stansted, UK
3. Aufbewahrungskassette B801003080, Plano, Wetzlar, Deutschland
4. Befestigungssilikon President light body, Coltne/Whaledent GmbH & Co. KG, Langenau, Deutschland
5. Beschleuniger 2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol, Agar Scientific, Stansted, UK
6. Bildbearbeitungssoftware Axio Vision 29A, Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
7. Bleicitrat pro analysi Lead(II) nitrate, Merck, Darmstadt, Deutschland
8. Brutschrank Inkubator Classic.Line B28, Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland
9. Cacodylsäure Cacodylsäure Natriumsalz Trihydrat, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
10. Chloroform Trichloromethane Merck, Darmstadt, Deutschland
11. DDAS Dodecyl Succinic Anhydride, Agar Scientific, Stansted, UK
12. Diamantmesser Diamond Knives Ultra 45°, DiATOME, Hatfield, USA
13. Digitalkamera Axio Cam MRc5, Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
14. Ethanol $\geq 99,5\%$, Ph.Eur., reinst. Ethylalkohol, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
15. Fluoreszenzmikroskop Axioskop, Axio Imager A1, Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
16. Glutaraldehyd Glutaraldehyde Solution 50% in H₂O, Merck, Darmstadt, Deutschland
17. Goldnanopartikel In vitro Fluorescent Spherical Gold NPs 10 nm, Nanopartz Inc., Loveland/Colorado, USA
18. Hygrophor Schraubröhre 50 ml, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
19. Isopropylalkohol 2-Propanol 70%, Otto Fischar GmbH & Co KG, Saarbrücken, Deutschland
20. Klebeband, metallisch, aluminisiertes Band, G265, Plano, Wetzlar, Deutschland
21. Klebefolien, doppelseitig, Leit-Tabs 12 mm, Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland

22. Kochsalzlösung 0,9% NaCl, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
23. Kohlegarn E428A, Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland
24. Kolbenhubpipetten Transferpette, Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
25. Life/Dead-Staining-Kit LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit L7012, Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham/Massachusetts, USA
26. Natriumhypochlorid-Lösung 3% DAC, Aug. Hedinger GmbH & Co KG, Stuttgart, Deutschland
27. Objektträgerglas Microscope Slides, VWR, Radnor/Pennsylvania, USA
28. Osmium Tetroxide, Electron Microscopy Sciences, Hatfield, USA
29. Papierwischtücher Light-Duty Tissue Wipers, VWR, Radnor/Pennsylvania, USA
30. Phosphorsäure 37,5% Phosphoric Acid, Kerr Italia Srl., Scafati, Italien
31. Pioloform Pioloform FN65 Pulver 10 g, Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland
32. Probenhalter 0,5“Aluminium Specimen Tubs, Agar Scientific, Stansted, UK
33. Quecksilber-Lampe Kompaktlichtquelle HXP 120, Leistungselektronik JENA, Jena, Deutschland
34. Reaktionsgefäß Eppendorf Save-Lock Tubes 1 ml, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
35. REM XL 30 ESEM FEG, Fei Company, Eindhoven, Niederlande
36. Salzsäure Salzsäure 37% reinst, Zentrales Chemielager der Universität des Saarlandes, Saarbrücken, Deutschland
37. Schleif- und Poliergerät MetaServ 250 Twin, Buehler, Illinois, USA
38. Schleifpapier SiC Grinding Paper 250 mm, Buehler, Illinois, USA
39. Schlitzblenden G2500C, Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland
40. Silikoneinbettform Pelco 106, Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland
41. Software, Statistik MATLAB 8.6 (R2015b), TheMathWorks, Inc, Massachusetts, USA
42. Sputter Coater SCD 030, Oerlikon Balzers Coating AG, Balzers, Liechtenstein
43. Superhartgips Fujirock EP beige, GC Germany GmbH, Bad Homburg, Deutschland

44. Thymollösung Thymol 0,1% Lösung, Apotheke im Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar, Deutschland
45. Tiefziehfolien Duran 1,0x125 mm, Scheu-Dental, Iserlohn, Deutschland
46. Transmissionselektronenmikroskop Tecnai 12, Fei Company, Eindhoven, Niederlande
47. Trennscheibe, diamantiert, Schleiftrennmaschine WOCO 50p, Conrad GmbH, Clausthal, Deutschland
48. Überkopfrührer RW16 basic, IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
49. Ultramikrotoms Leica EM UC7, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
50. Ultraschallbad Sonorex RK 100 H, Bandelin, Berlin, Deutschland
51. Uranylacetat Uranyl Acetate Dihydrate, Merck, Darmstadt, Deutschland
52. Verschlussfolie Parafilm, Merck, Darmstadt, Deutschland
53. Vibrationsschüttler Vortex-Genie 2, Scientific Industries, Inc., New York, USA
54. Wasser, destilliert Aqua B. Braun, Ecotainer, 1000 ml, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
55. Wiegeschalen 72x72 mm, Polyvinylchlorid PVC, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
56. Wippschüttler Typ Rocky 1000, Labortechnik Fröbel GmbH, Lindau, Deutschland
57. Zellkulturplatten Cellstar, Greiner Bio-One International GmbH, Frickenhausen, Deutschland
58. Zitronensäure Trisodium citrate reinst, Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland

Produktinformation Goldnanopartikel

Product Family	In vitro Fluorescent Spherical Gold NPs			
Product Number	C16A1-10-600-TM-50			
Lot#	C1615			
Appearance	Gold			
Form	Colloid			
Conjugation	Au/polymer/Dy600/Methyl polymer			
Supernatant	PBS			
Diameter	nm	measured	DLS, TEM, UV/VIS	10
SPR Abs	OD	measured	UV/VIS	70
Volume	ml	measured		1.0
OD-ml	OD-ml	calc		70
PDI	stddev/size	measured	DLS/TEM	15%
SPR Peak	nm	measured	UV/VIS	518
pH		measured	Orion	7
Zeta Potential	mV	measured	DLS	17
Conjugate	mcg			20
Concentration	nps/ml	calc		3.74E+14
Wt. conc.	mg/ml	calc		3.5
ppm		calc		3500
Wt. %	%	calc		0.35
Molarity	uM	calc		0.598671
Molar Ext.	M-1cm-1	calc		1.12E+08
Fluorescence				Dy600

MATLAB-Quellcode zum Auszählen der Nanopartikel

```

function countParticles
    H=30; % Intensity difference of pixels.
    hat=3; % Minimum Distance of two individual particles.
    maximumNumberOfPixelPerParticle=5;

    Path=uigetdir();
    if Path==0
        return;
    end

    Info=SearchAllFiles({Path});
    for k=1:numel(Info)
        currFile=fullfile(Info(k).Path,Info(k).FileName);
        I=ReadTif(currFile);
        I=I(1:420,:);

countOfParticles=countSingleImage(I,H,hat,maximumNumberOfPixelPerParticle);
        fprintf('
%s\t%s:\t%d\n',Info(k).Path,Info(k).FileName,countOfParticles);
    end
end

function
countOfParticles=countSingleImage(I,H,hat,maximumNumberOfPixelPerParticle)
    I=double(I);

    % First threshold
    bw=imextendedmax(I,H,8);
    bw=imdilate(bw,strel('disk',hat,0));
    bw=imerode(bw,strel('disk',hat,0));

    % Second threshold
    % h=fspecial('disk',10);
    % h=h==max(h(:));
    % h=(h-ordfilt2(h, 1, [0,1,0;1,1,1;0,1,0],'zeros'))==1;
    % hsum=sum(h(:));
    %
    % bw2=I>(ordfilt2(I, hsum-1, [0,1,0;1,1,1;0,1,0],'zeros')+H);
    %
    % bw=bw1&bw2;

    % subplot(2,1,2);imshow(bw); colormap gray
    Label=bwconncomp(bw,ones(3,3,3));
    area = cellfun(@numel, Label.PixelIdxList);
    idxToKeep=area<=maximumNumberOfPixelPerParticle;
    Label.PixelIdxList=Label.PixelIdxList(idxToKeep);
    Label.NumObjects=sum(idxToKeep);
    clear idxToKeep area;

    Label=labelmatrix(Label);
    bw_to_check=Label>0;

```

```
Label=bwconncomp(Label>0,ones(3,3,3));
countOfParticles=Label.NumObjects;
matVis(I,bw_to_check)

end

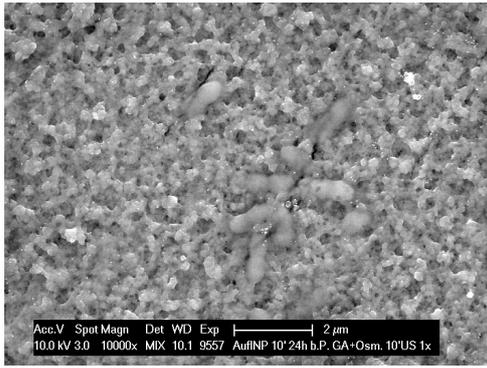
function Info=SearchAllFiles(FolderOrFile)
Info=struct('Path',{},'FileName',{});
for k=1:numel(FolderOrFile)
    if exist(FolderOrFile{k},'dir')==7
        CurrList=dir(fullfile(FolderOrFile{k}));
        for j=1:numel(CurrList)
            if ~strcmpi(CurrList(j).name(1),'.')

Info=cat(1,Info,SearchAllFiles(fullfile(FolderOrFile{k},CurrList(j).name)));
                end
            end
        elseif exist(FolderOrFile{k},'file')==2
            [CurrPath,CurrFileName,CurrExt]=fileparts(FolderOrFile{k});
            if strcmpi(CurrExt,'.tif')
                m=numel(Info);
                Info(m+1,1).Path=CurrPath;
                Info(m+1,1).FileName=[CurrFileName,CurrExt];
            end
        end
    end
end
end
```

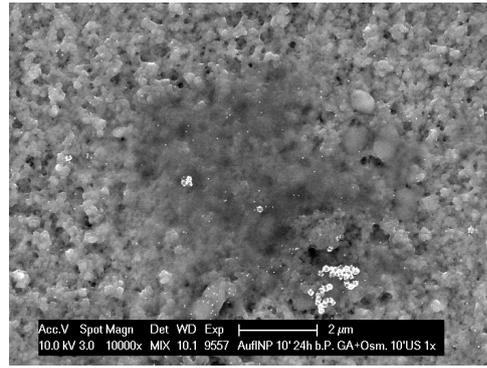
Statistische Auswertung Proband 1¹

Präparatnummer	Bild	Anzahl NP
9557	P1_10'_1x (1)	565
9557	P1_10'_1x (2)	372
9557	P1_10'_1x (3)	589
9557	P1_10'_1x (4)	557
9558	P1_10'_1x (1)	399
9558	P1_10'_1x (2)	326
9558	P1_10'_1x (3)	290
9558	P1_10'_1x (4)	278
9559	P1_10'_20x (1)	1037
9559	P1_10'_20x (2)	387
9559	P1_10'_20x (3)	517
9559	P1_10'_20x (4)	650
9560	P1_10'_20x (1)	321
9560	P1_10'_20x (2)	216
9560	P1_10'_20x (3)	88
9560	P1_10'_20x (4)	129
9561	P1_10'_24h (1)	138
9561	P1_10'_24h (2)	114
9561	P1_10'_24h (3)	113
9561	P1_10'_24h (4)	153
9562	P1_10'_24h (1)	29
9562	P1_10'_24h (2)	157
9562	P1_10'_24h (3)	29
9562	P1_10'_24h (4)	165
9563	P1_30'_1x (1)	297
9563	P1_30'_1x (2)	285
9563	P1_30'_1x (3)	408
9563	P1_30'_1x (4)	675
9564	P1_30'_1x (1)	740
9564	P1_30'_1x (2)	643
9564	P1_30'_1x (3)	944
9564	P1_30'_1x (4)	2235
9565	P1_30'_20x (1)	371
9565	P1_30'_20x (2)	126
9565	P1_30'_20x (3)	92
9565	P1_30'_20x (4)	707
9566	P1_30'_20x (1)	1211
9566	P1_30'_20x (2)	917
9566	P1_30'_20x (3)	1659
9566	P1_30'_20x (4)	1251
9567	P1_30'_24h (1)	1123
9567	P1_30'_24h (2)	315
9567	P1_30'_24h (3)	146
9567	P1_30'_24h (4)	220
9568	P1_30'_24h (1)	109
9568	P1_30'_24h (2)	102
9568	P1_30'_24h (3)	367
9568	P1_30'_24h (4)	86

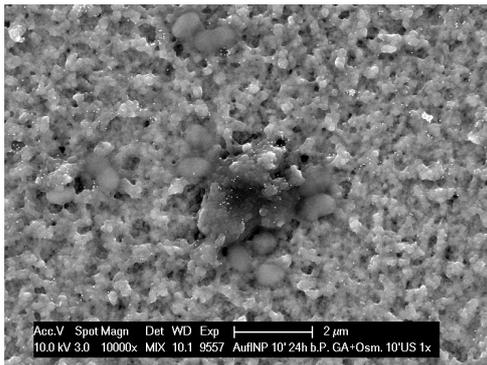
¹P1: Proband 1; 10': 10 min Einwirkzeit der Nanopartikel; 30': 30 min Einwirkzeit der Nanopartikel; 1x: einmalige Spülung der Proben mit dH₂O; 20x: 20-malige Spülung der Proben mit dH₂O; 24h: 24-stündige Lagerung der Proben in dH₂O



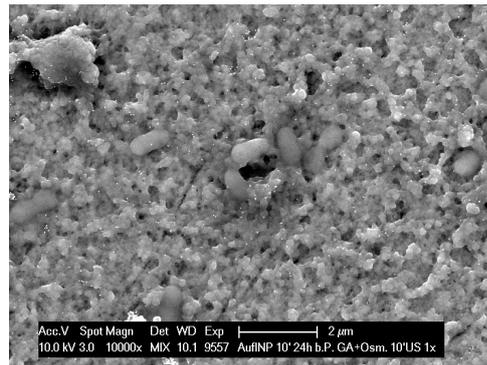
P1_10'_1x (1) 9557



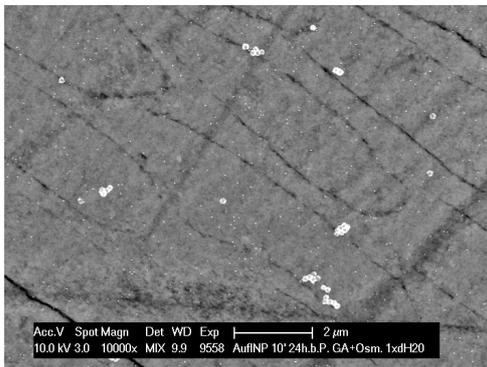
P1_10'_1x (2) 9557



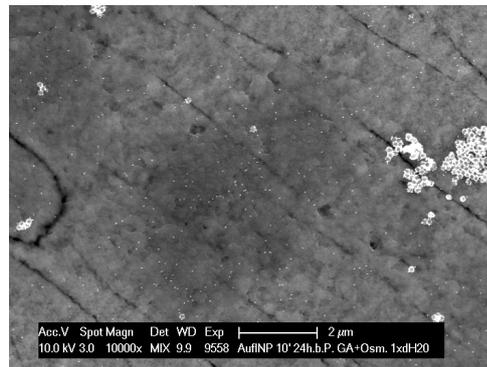
P1_10'_1x (3) 9557



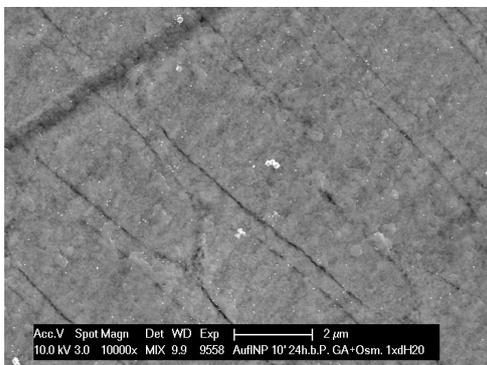
P1_10'_1x (4) 9557



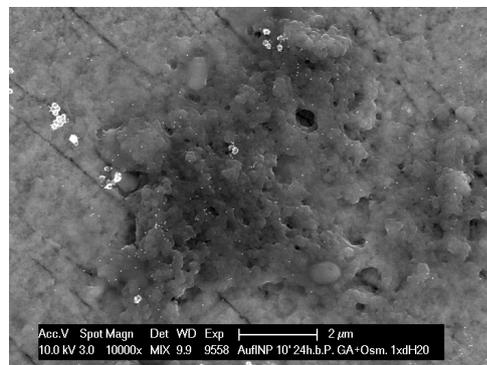
P1_10'_1x (1) 9558



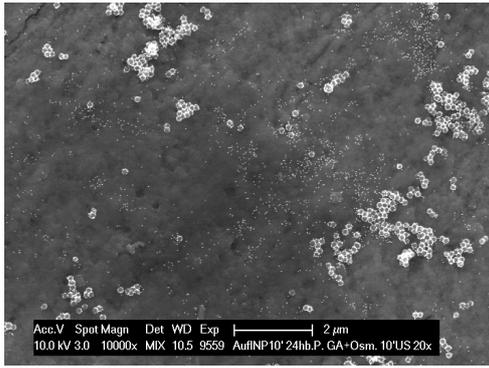
P1_10'_1x (2) 9558



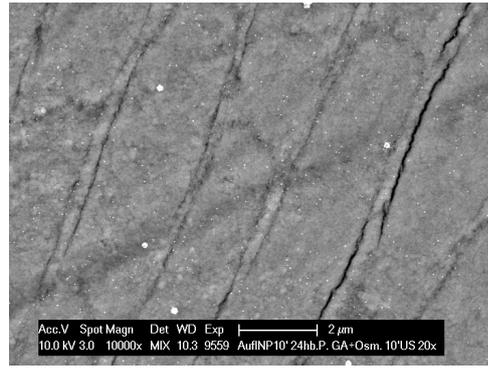
P1_10'_1x (3) 9558



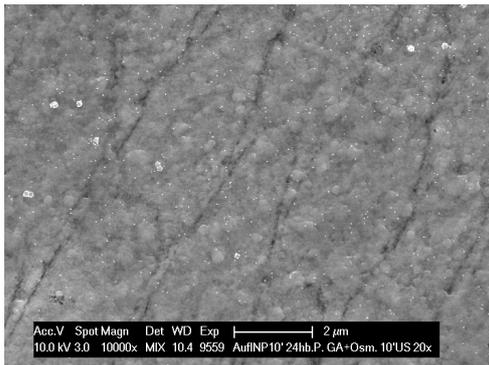
P1_10'_1x (4) 9558



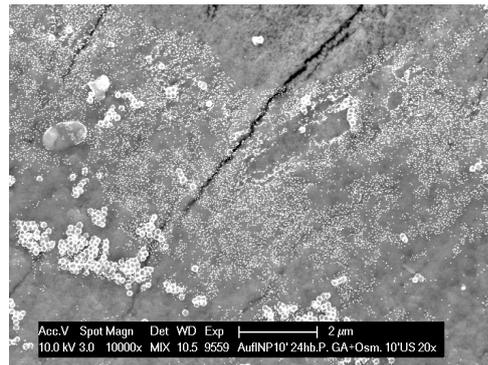
P1_10'_20x (1) 9559



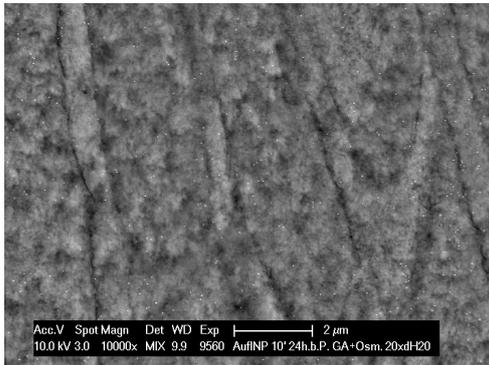
P1_10'_20x (2) 9559



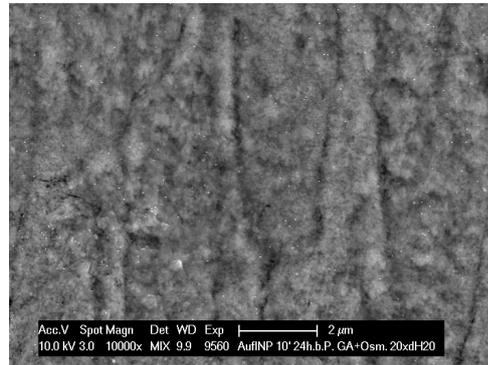
P1_10'_20x (3) 9559



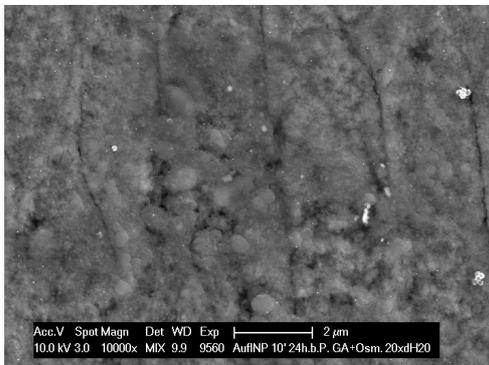
P1_10'_20x (4) 9559



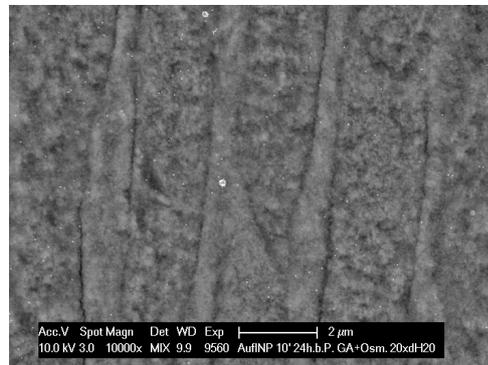
P1_10'_20x (1) 9560



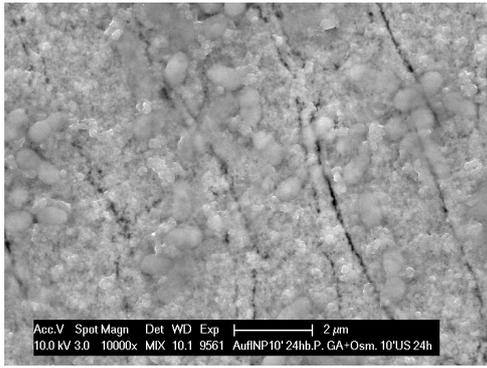
P1_10'_20x (2) 9560



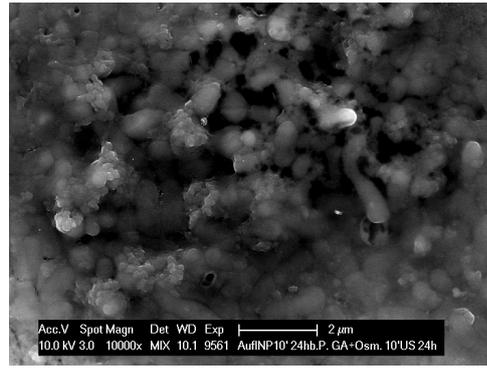
P1_10'_20x (3) 9560



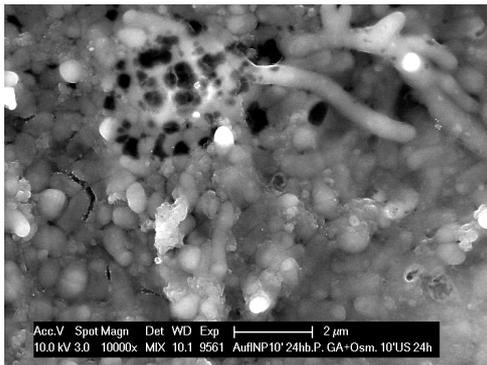
P1_10'_20x (4) 9560



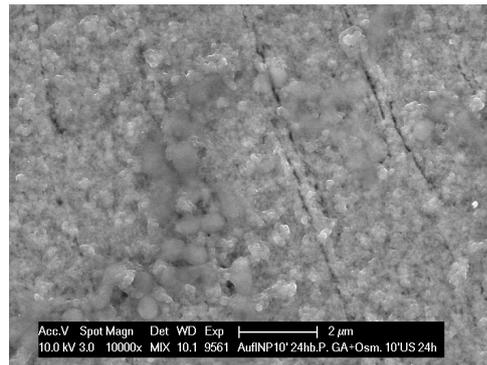
P1_10'_24h (1) 9561



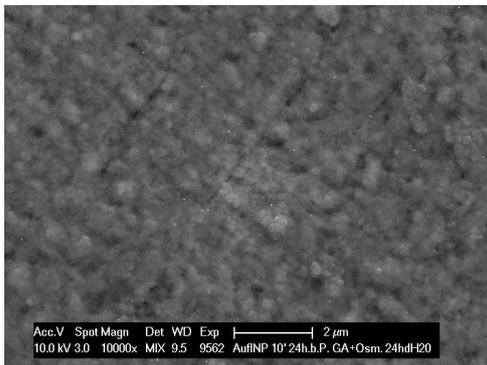
P1_10'_24h (2) 9561



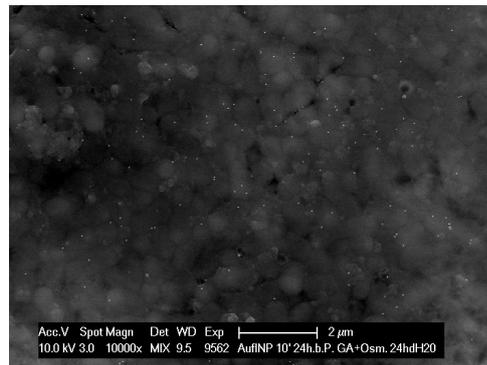
P1_10'_24h (3) 9561



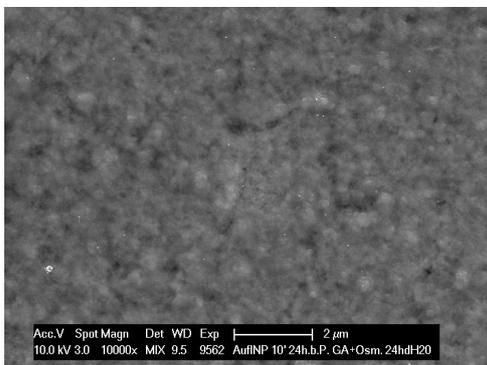
P1_10'_24h (4) 9561



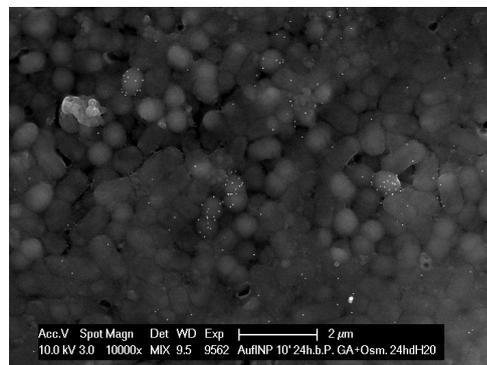
P1_10'_24h (1) 9562



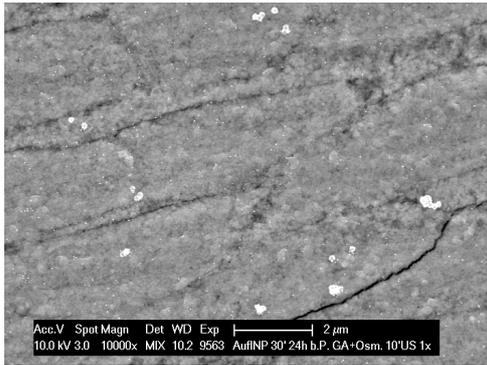
P1_10'_24h (2) 9562



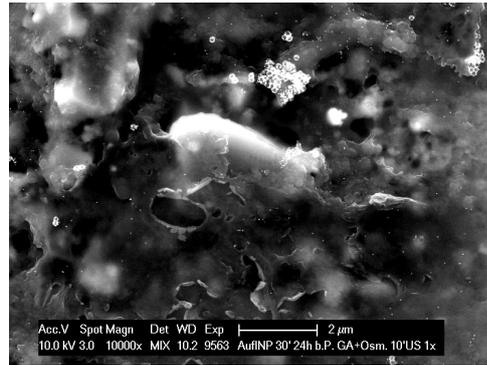
P1_10'_24h (3) 9562



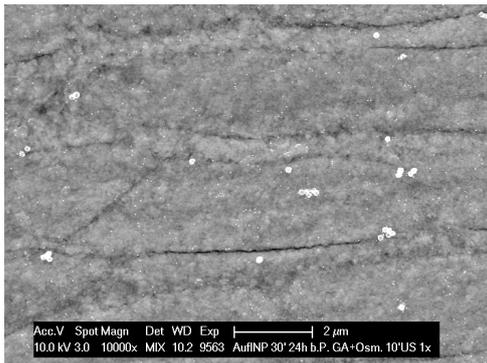
P1_10'_24h (4) 9562



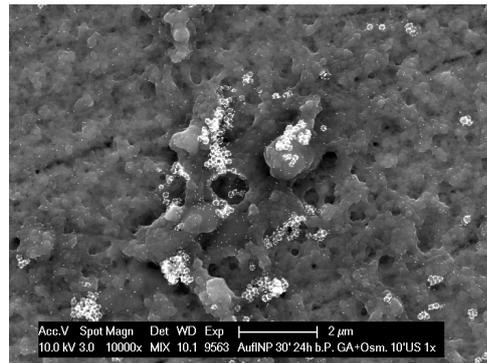
P1_30'_1x (1) 9563



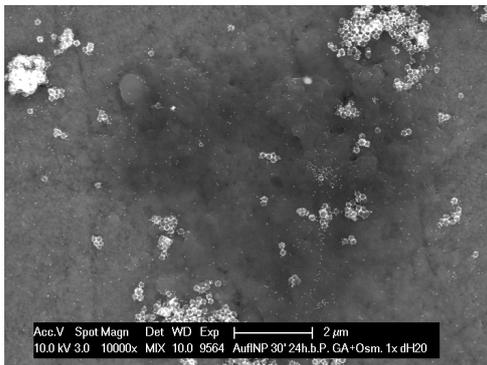
P1_30'_1x (2) 9563



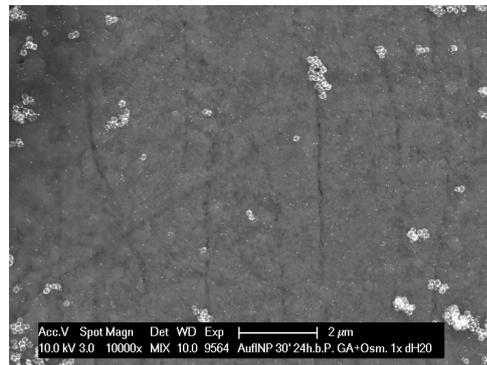
P1_30'_1x (3) 9563



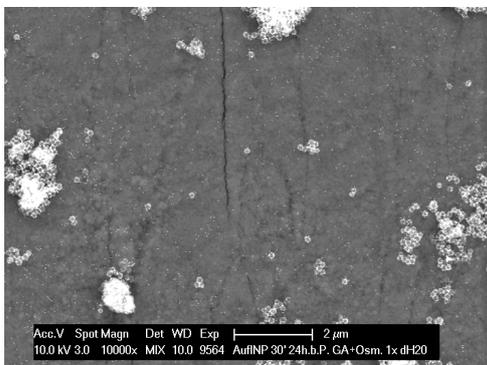
P1_30'_1x (4) 9563



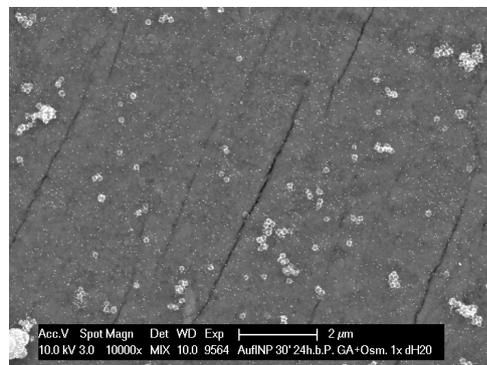
P1_30'_1x (1) 9564



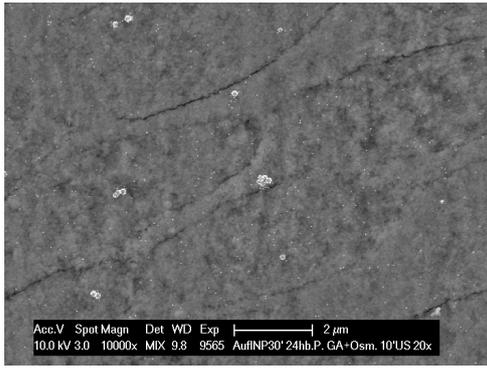
P1_30'_1x (2) 9564



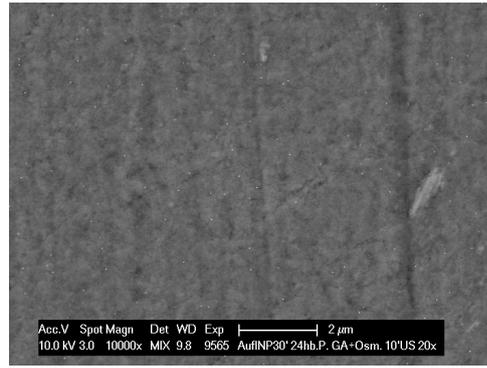
P1_30'_1x (3) 9564



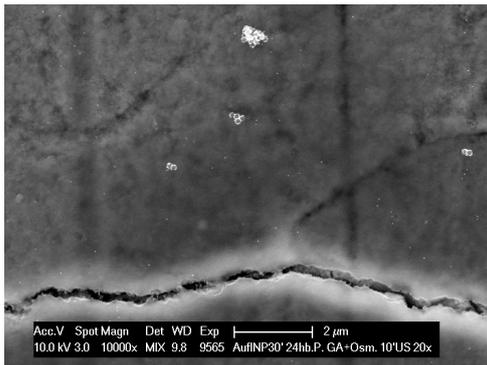
P1_30'_1x (4) 9564



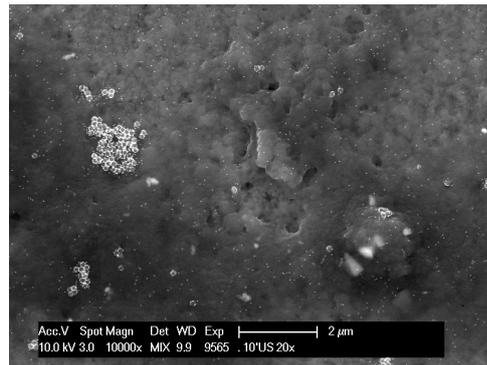
P1_30'_20x (1) 9565



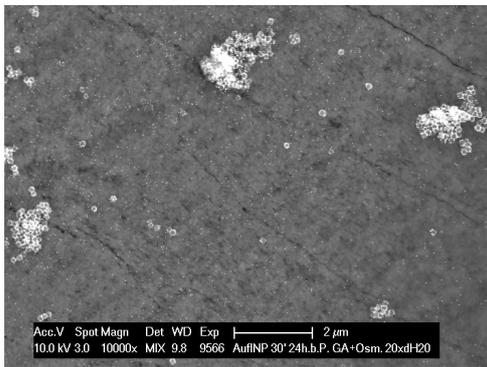
P1_30'_20x (2) 9565



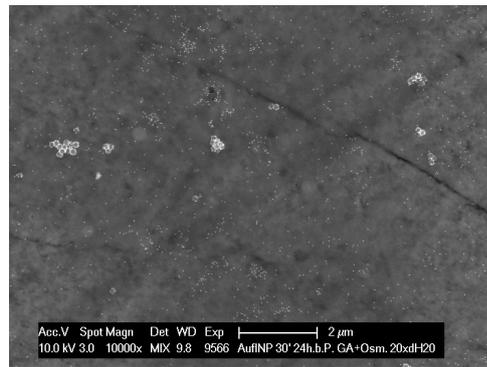
P1_30'_20x (3) 9565



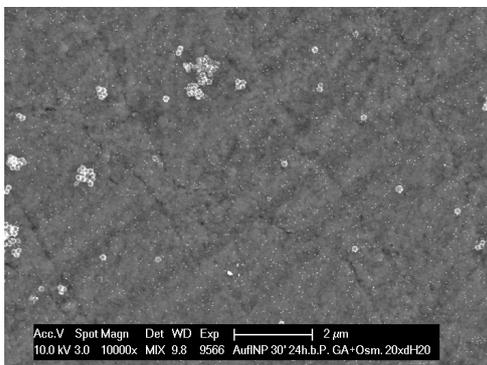
P1_30'_20x (4) 9565



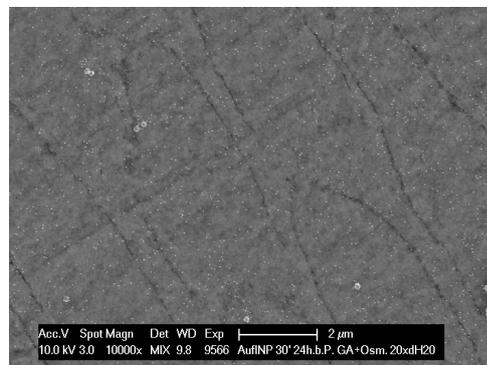
P1_30'_20x (1) 9566



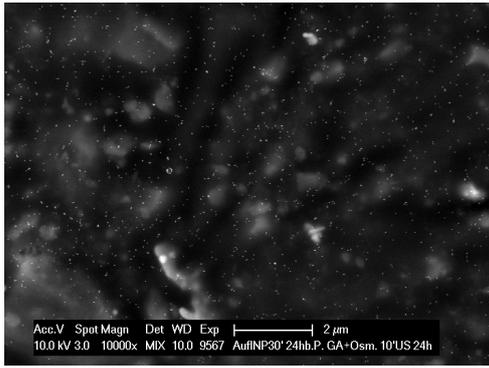
P1_30'_20x (2) 9566



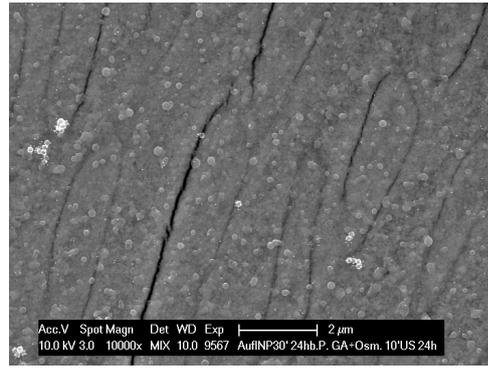
P1_30'_20x (3) 9566



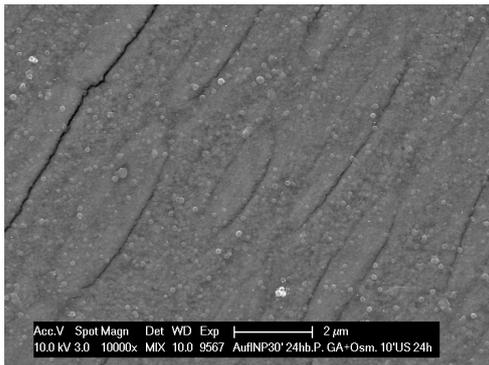
P1_30'_20x (4) 9566



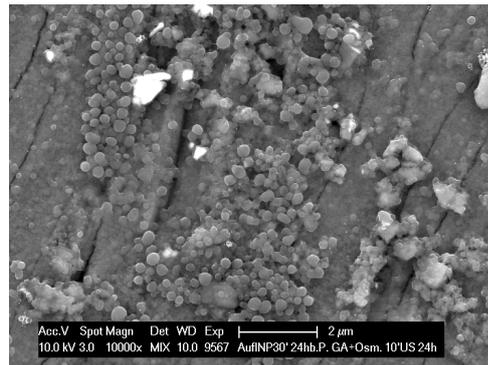
P1_30'_24h (1) 9567



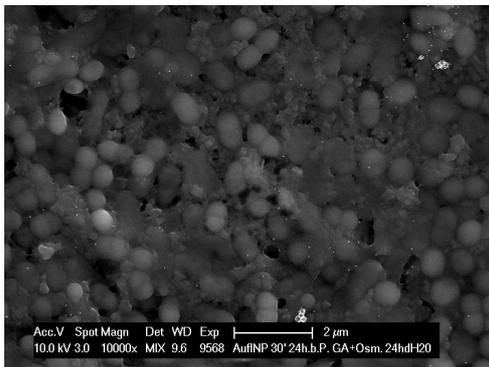
P1_30'_24h (2) 9567



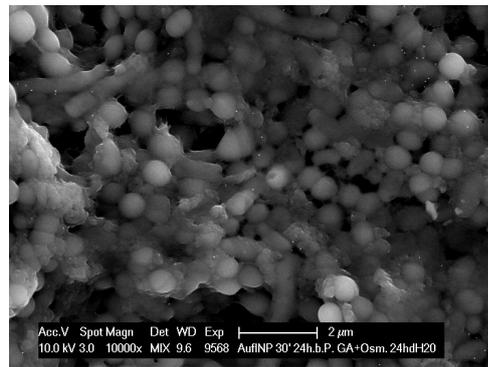
P1_30'_24h (3) 9567



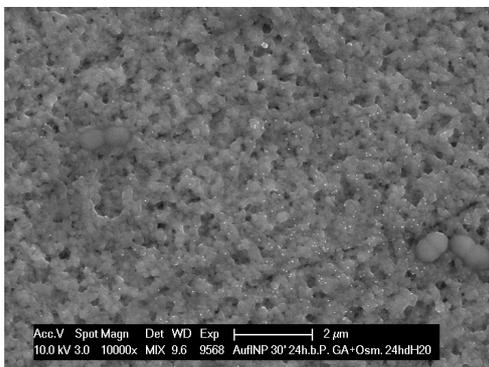
P1_30'_24h (4) 9567



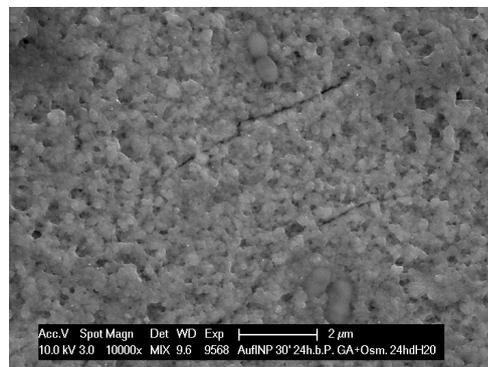
P1_30'_24h (1) 9568



P1_30'_24h (2) 9568



P1_30'_24h (3) 9568

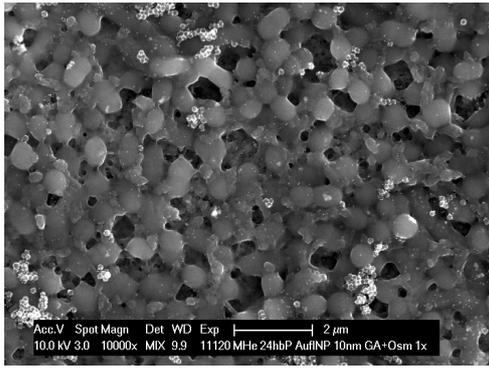


P1_30'_24h (4) 9568

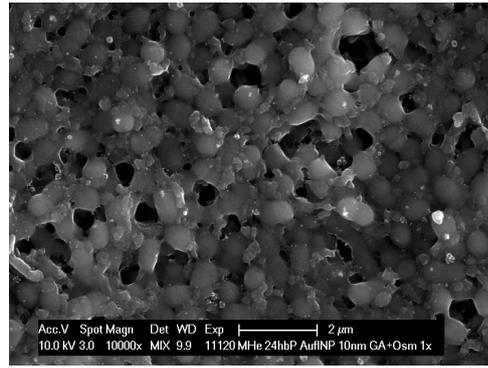
Statistische Auswertung Proband 2²

Präparatnummer	Bild	Anzahl NP
11120	P2_10'_1x (1)	679
11120	P2_10'_1x (2)	338
11120	P2_10'_1x (3)	531
11120	P2_10'_1x (4)	696
11121	P2_10'_1x (1)	753
11121	P2_10'_1x (2)	457
11121	P2_10'_1x (3)	500
11121	P2_10'_1x (4)	319
11122	P2_10'_20x (1)	123
11122	P2_10'_20x (2)	500
11122	P2_10'_20x (3)	665
11122	P2_10'_20x (4)	957
11123	P2_10'_20x (1)	317
11123	P2_10'_20x (2)	402
11123	P2_10'_20x (3)	701
11123	P2_10'_20x (4)	423
11124	P2_10'_24h (1)	1099
11124	P2_10'_24h (2)	1299
11124	P2_10'_24h (3)	871
11124	P2_10'_24h (4)	1209
11125	P2_10'_24h (1)	562
11125	P2_10'_24h (2)	843
11125	P2_10'_24h (3)	787
11125	P2_10'_24h (4)	577
11126	P2_30'_1x (1)	2107
11126	P2_30'_1x (2)	494
11126	P2_30'_1x (3)	1482
11126	P2_30'_1x (4)	891
11127	P2_30'_1x (1)	742
11127	P2_30'_1x (2)	530
11127	P2_30'_1x (3)	144
11127	P2_30'_1x (4)	102
11128	P2_30'_20x (1)	684
11128	P2_30'_20x (2)	1152
11128	P2_30'_20x (3)	2189
11128	P2_30'_20x (4)	774
11129	P2_30'_20x (1)	330
11129	P2_30'_20x (2)	826
11129	P2_30'_20x (3)	778
11129	P2_30'_20x (4)	506
11130	P2_30'_24h (1)	2736
11130	P2_30'_24h (2)	1681
11130	P2_30'_24h (3)	2747
11130	P2_30'_24h (4)	1990
11131	P2_30'_24h (1)	1703
11131	P2_30'_24h (2)	2291
11131	P2_30'_24h (3)	1199
11131	P2_30'_24h (4)	1008

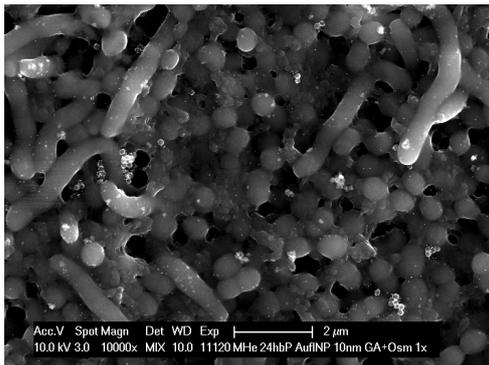
²P2: Proband 2; 10': 10 min Einwirkzeit der Nanopartikel; 30': 30 min Einwirkzeit der Nanopartikel; 1x: einmalige Spülung der Proben mit dH₂O; 20x: 20-malige Spülung der Proben mit dH₂O; 24h: 24-stündige Lagerung der Proben in dH₂O



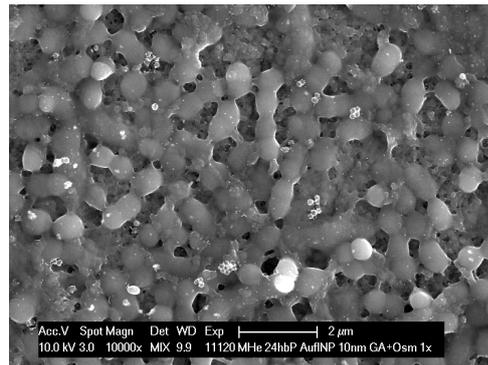
P2_10'_1x (1) 11120



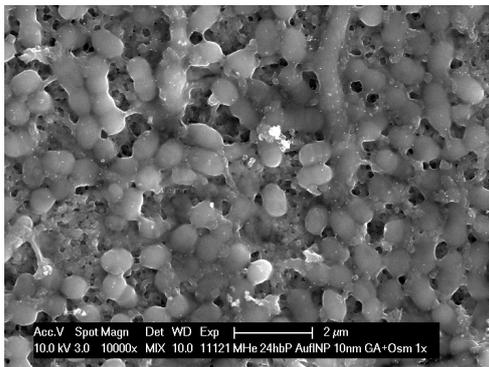
P2_10'_1x (2) 11120



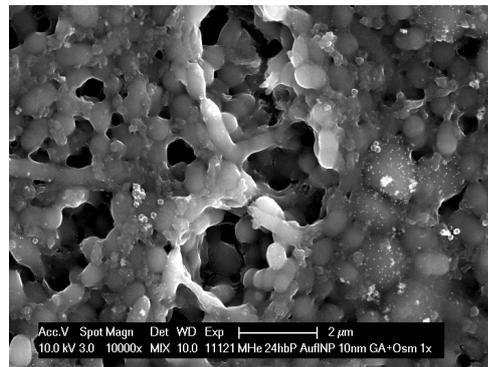
P2_10'_1x (3) 11120



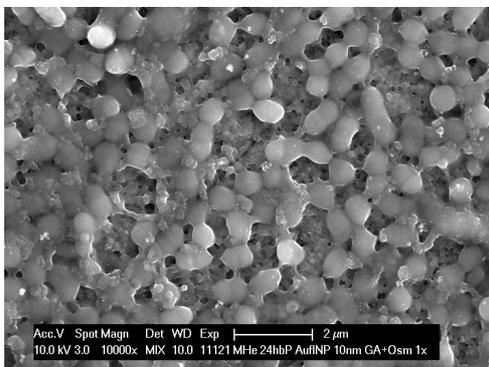
P2_10'_1x (4) 11120



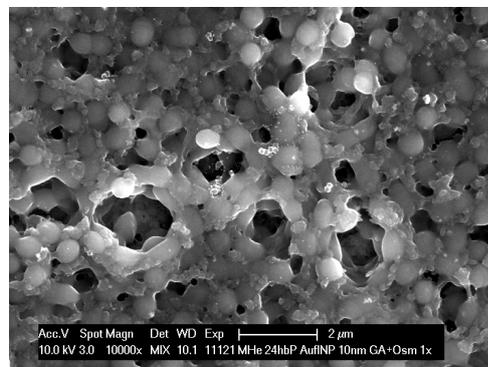
P2_10'_1x (1) 11121



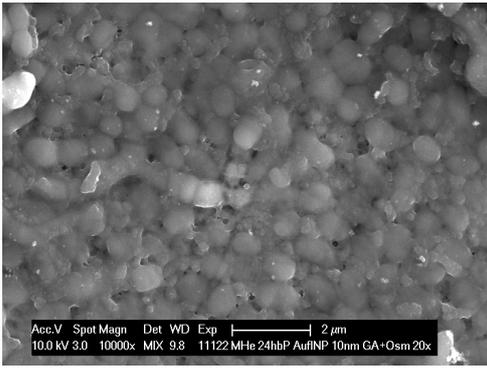
P2_10'_1x (2) 11121



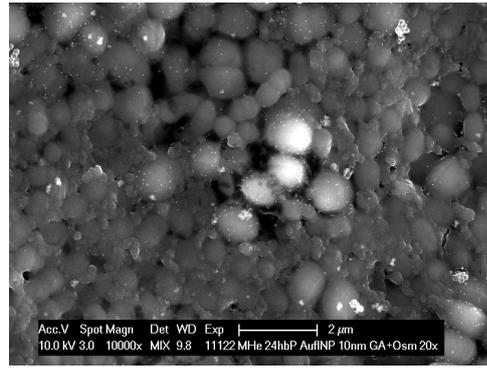
P2_10'_1x (3) 11121



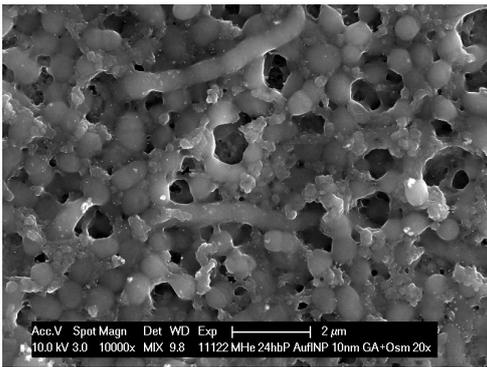
P2_10'_1x (4) 11121



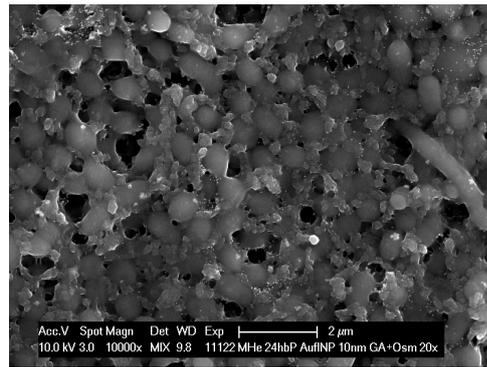
P2_10'_20x (1) 11122



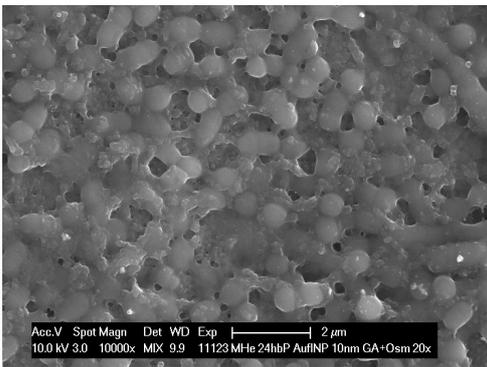
P2_10'_20x (2) 11122



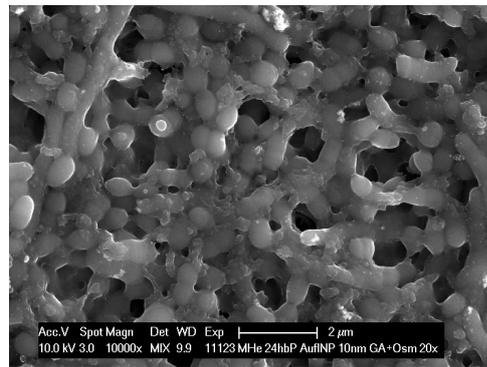
P2_10'_20x (3) 11122



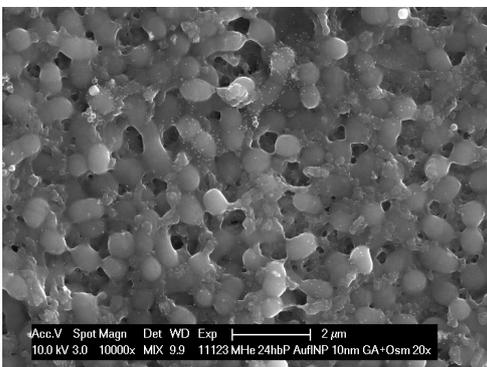
P2_10'_20x (4) 11122



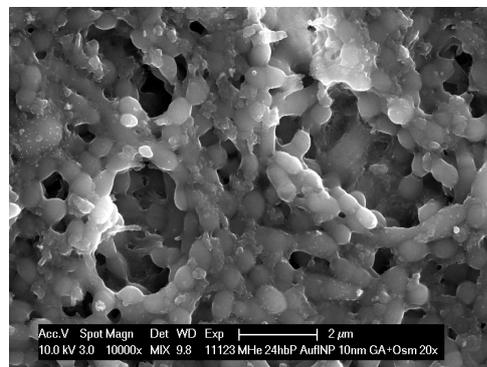
P2_10'_20x (1) 11123



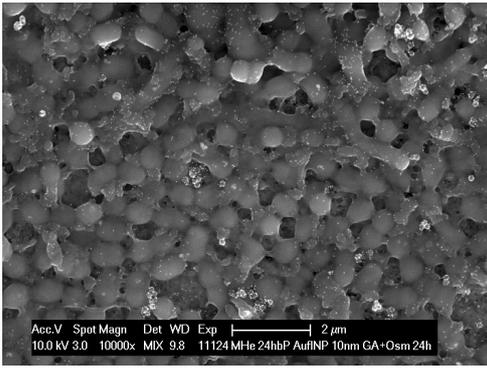
P2_10'_20x (2) 11123



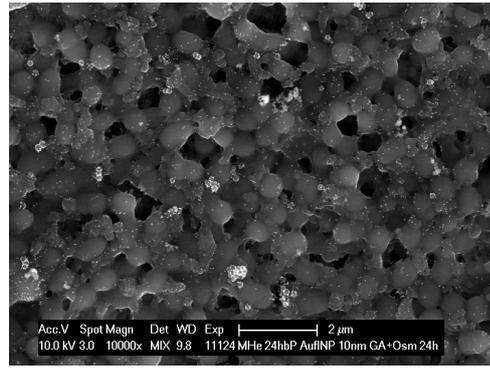
P2_10'_20x (3) 11123



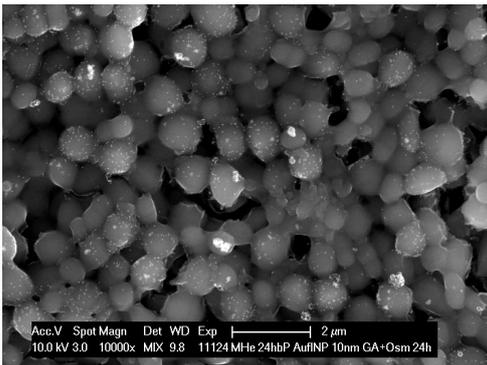
P2_10'_20x (4) 11123



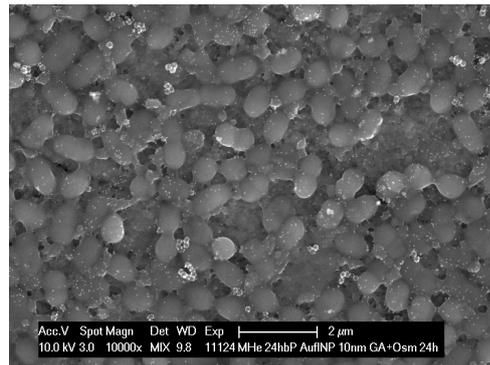
P2_10'_24h (1) 11124



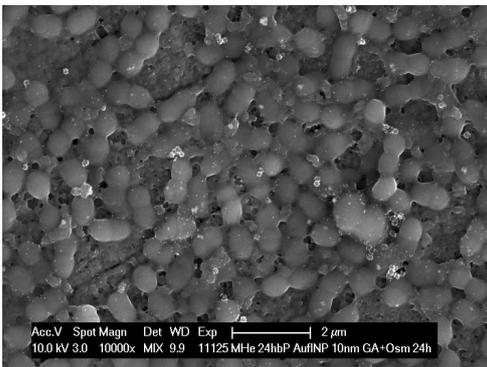
P2_10'_24h (2) 11124



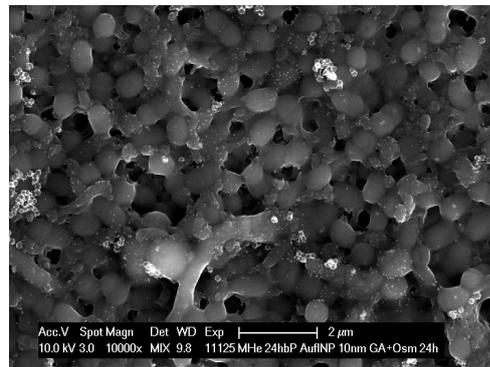
P2_10'_24h (3) 11124



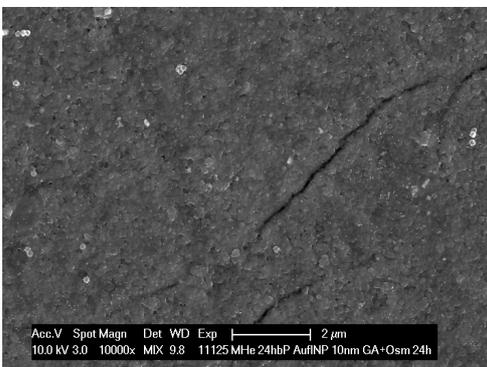
P2_10'_24h (4) 11124



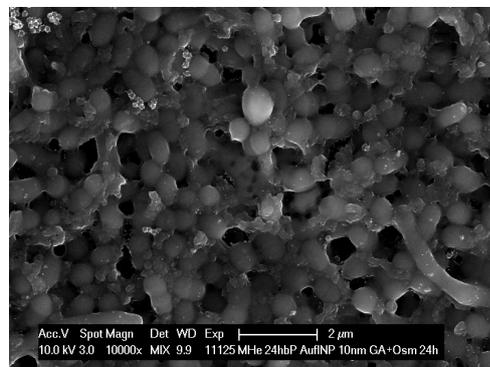
P2_10'_24h (1) 11125



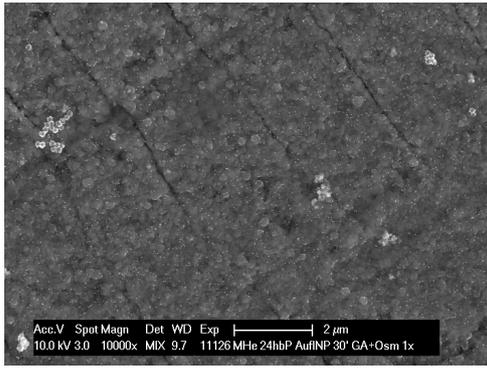
P2_10'_24h (2) 11125



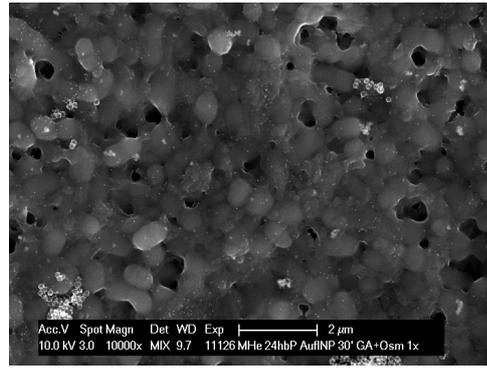
P2_10'_24h (3) 11125



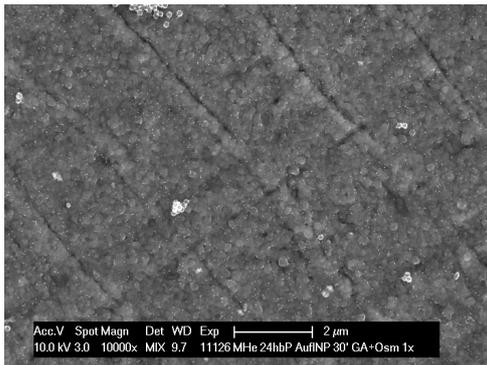
P2_10'_24h (4) 11125



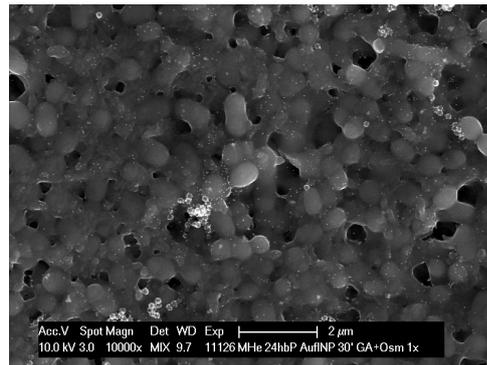
P2_30'_1x (1) 11126



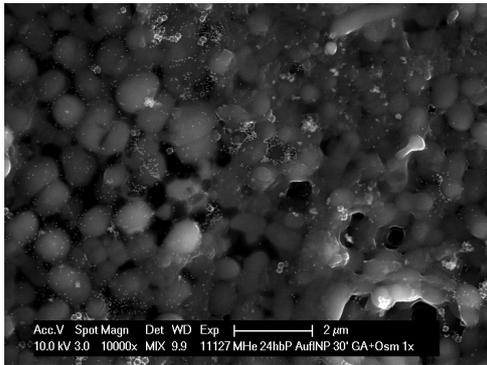
P2_30'_1x (2) 11126



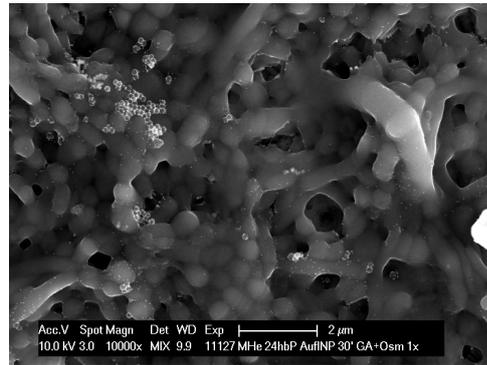
P2_30'_1x (3) 11126



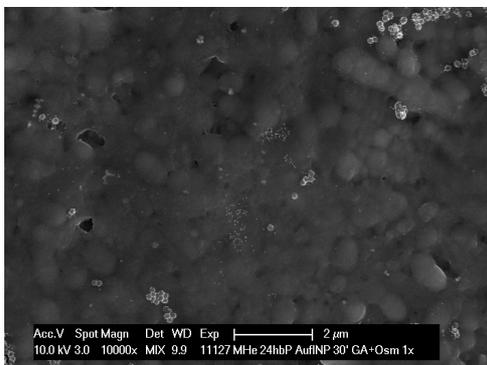
P2_30'_1x (4) 11126



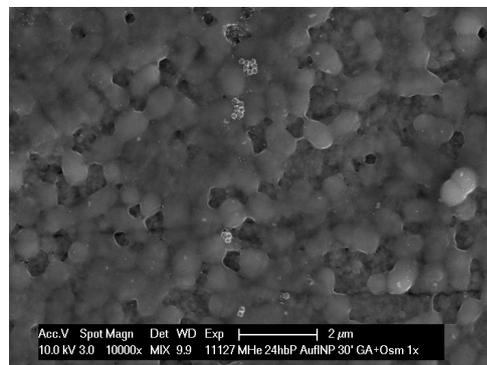
P2_30'_1x (1) 11127



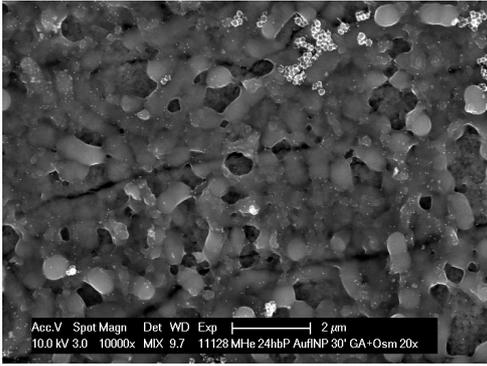
P2_30'_1x (2) 11127



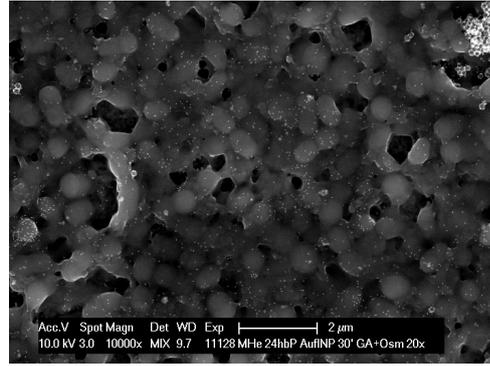
P2_30'_1x (3) 11127



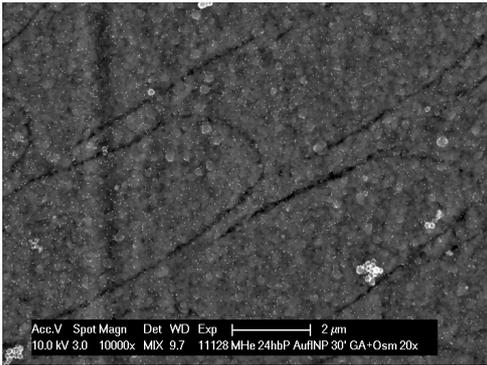
P2_30'_1x (4) 11127



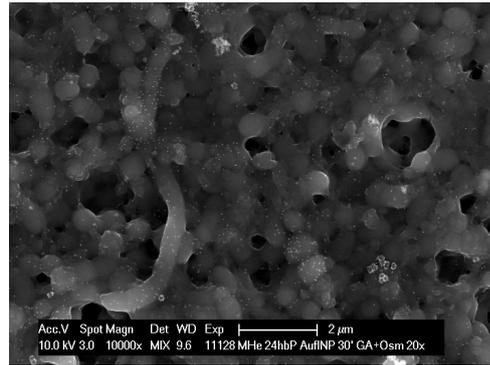
P2_30'_20x (1) 11128



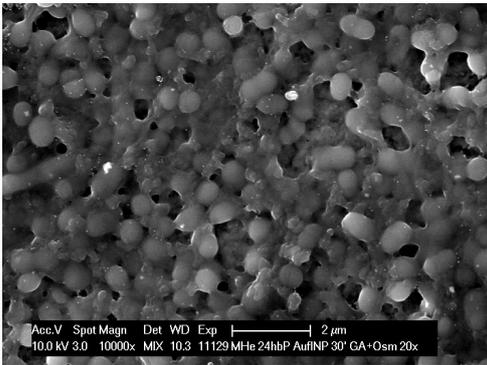
P2_30'_20x (2) 11128



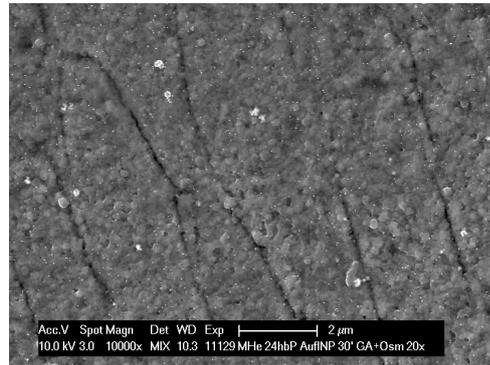
P2_30'_20x (3) 11128



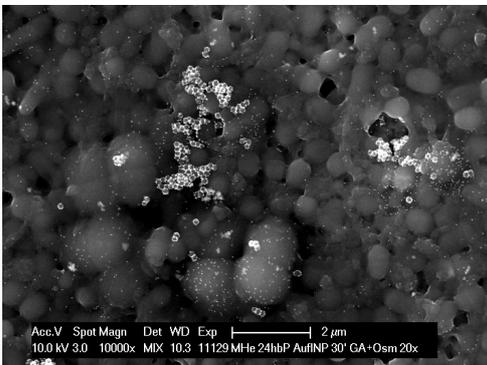
P2_30'_20x (4) 11128



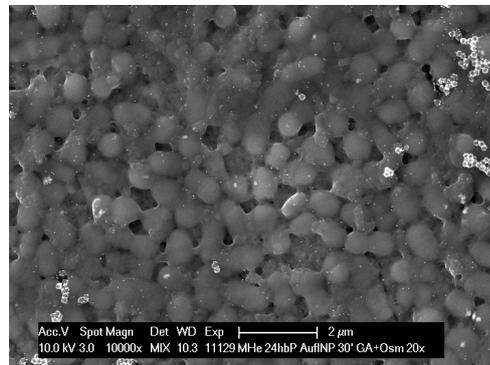
P2_30'_20x (1) 11129



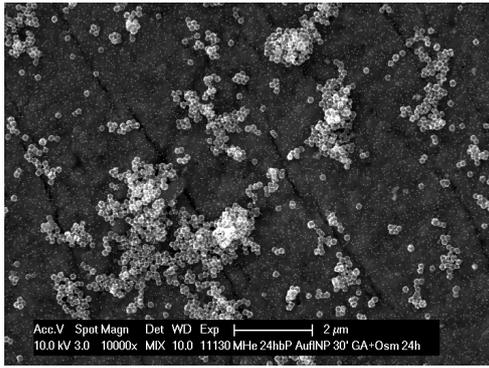
P2_30'_20x (2) 11129



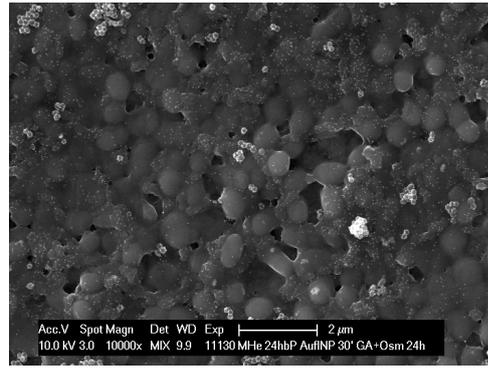
P2_30'_20x (3) 11129



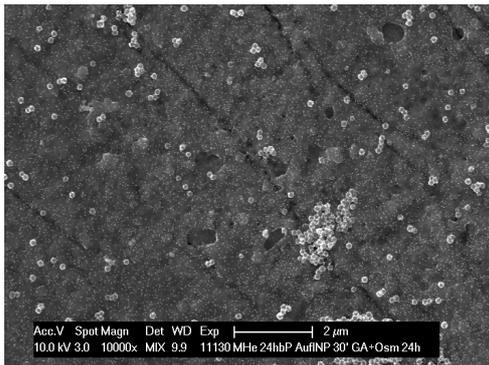
P2_30'_20x (4) 11129



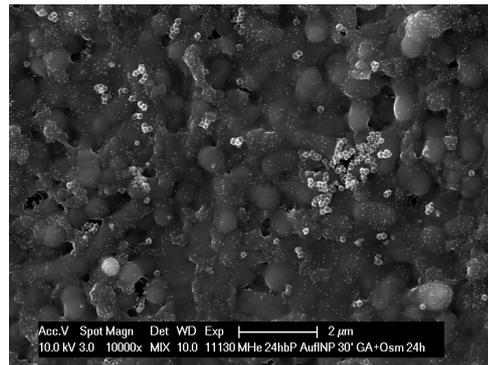
P2_30'_24h (1) 11130



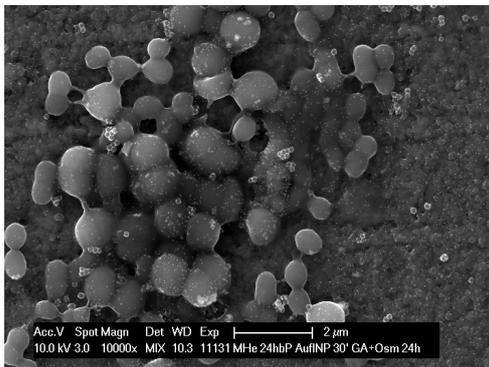
P2_30'_24h (2) 11130



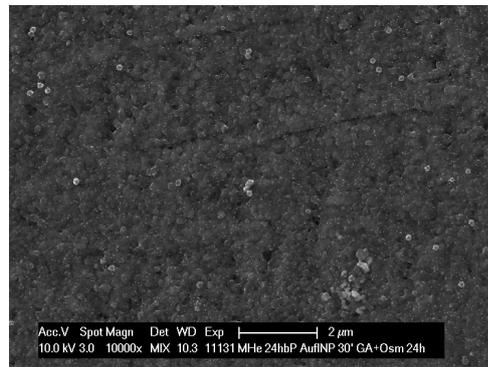
P2_30'_24h (3) 11130



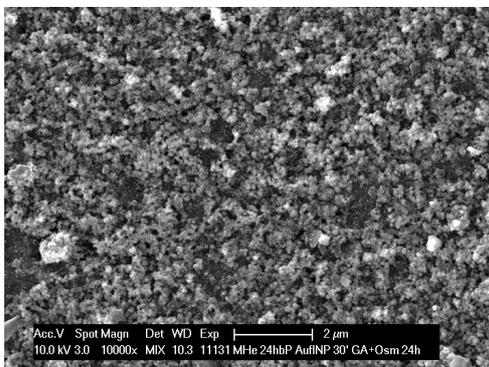
P2_30'_24h (4) 11130



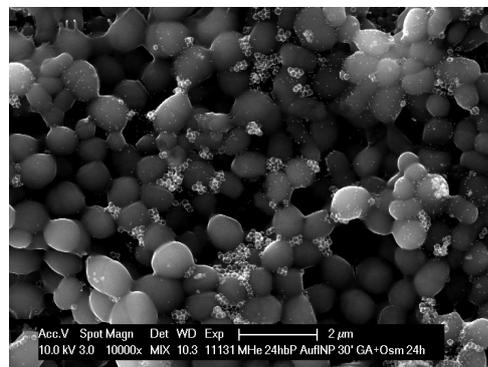
P2_30'_24h (1) 11131



P2_30'_24h (2) 11131



P2_30'_24h (3) 11131

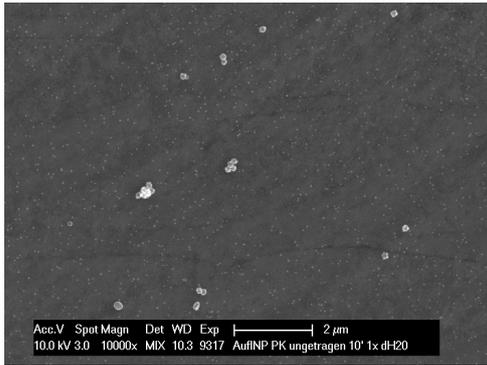


P2_30'_24h (4) 11131

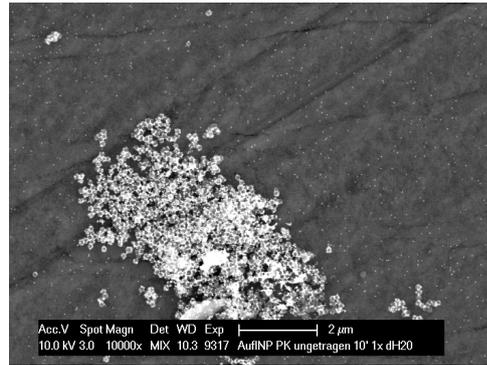
Statistische Auswertung der Prüfkörper ohne Pellikel³

Präparatnummer	Bild	Anzahl NP
9317	neg_10'_1x (1)	989
9317	neg_10'_1x (2)	747
9317	neg_10'_1x (3)	1454
9317	neg_10'_1x (4)	498
9318	neg_10'_1x (1)	14
9318	neg_10'_1x (2)	17
9318	neg_10'_1x (3)	87
9318	neg_10'_1x (4)	179
9319	neg_10'_20x (1)	36
9319	neg_10'_20x (2)	145
9319	neg_10'_20x (3)	163
9319	neg_10'_20x (4)	42
9320	neg_10'_20x (1)	271
9320	neg_10'_20x (2)	171
9320	neg_10'_20x (3)	342
9320	neg_10'_20x (4)	115
9321	neg_10'_24h (1)	166
9321	neg_10'_24h (2)	268
9321	neg_10'_24h (3)	146
9321	neg_10'_24h (4)	259
9322	neg_10'_24h (1)	70
9322	neg_10'_24h (2)	279
9322	neg_10'_24h (3)	721
9322	neg_10'_24h (4)	28
9323	neg_30'_1x (1)	122
9323	neg_30'_1x (2)	10
9323	neg_30'_1x (3)	135
9323	neg_30'_1x (4)	9
9324	neg_30'_1x (1)	71
9324	neg_30'_1x (2)	92
9324	neg_30'_1x (3)	217
9324	neg_30'_1x (4)	53
9325	neg_30'_20x (1)	25
9325	neg_30'_20x (2)	97
9325	neg_30'_20x (3)	31
9325	neg_30'_20x (4)	47
9326	neg_30'_20x (1)	213
9326	neg_30'_20x (2)	1675
9326	neg_30'_20x (3)	248
9326	neg_30'_20x (4)	325
9327	neg_30'_24h (1)	432
9327	neg_30'_24h (2)	12
9327	neg_30'_24h (3)	29
9327	neg_30'_24h (4)	75
9328	neg_30'_24h (1)	41
9328	neg_30'_24h (2)	28
9328	neg_30'_24h (3)	30
9328	neg_30'_24h (4)	45

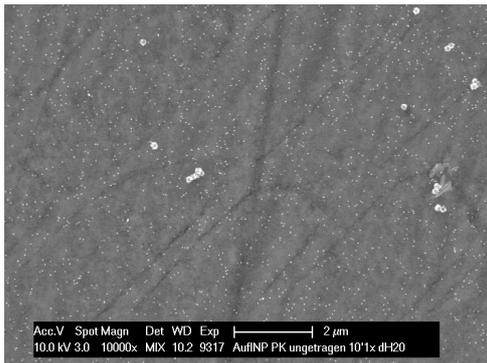
³neg: biofilmfreie Schmelzproben; 10': 10 min Einwirkzeit der Nanopartikel; 30': 30 min Einwirkzeit der Nanopartikel; 1x: einmalige Spülung der Proben mit dH₂O; 20x: 20-malige Spülung der Proben mit dH₂O; 24h: 24-stündige Lagerung der Proben in dH₂O



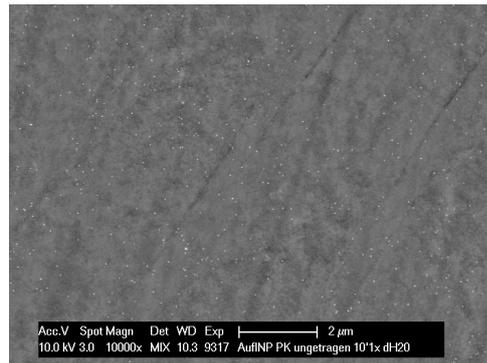
neg_10'_1x (1) 9317



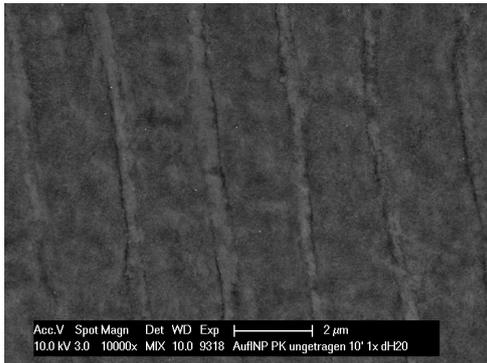
neg_10'_1x (2) 9317



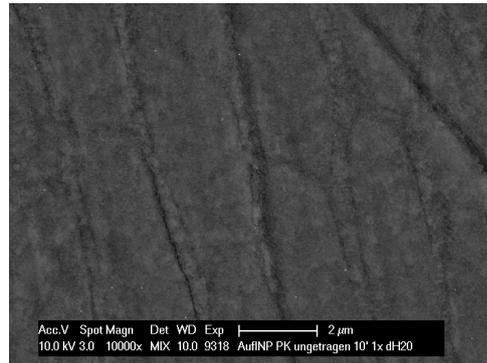
neg_10'_1x (3) 9317



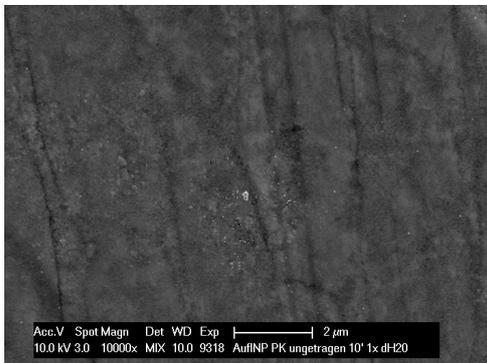
neg_10'_1x (4) 9317



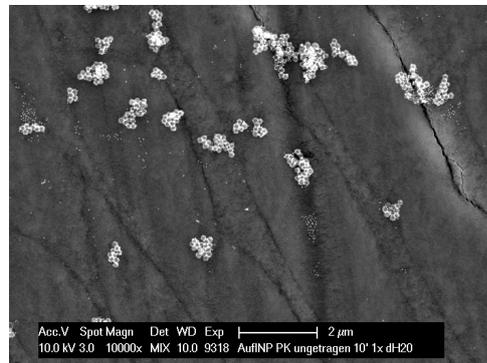
neg_10'_1x (1) 9318



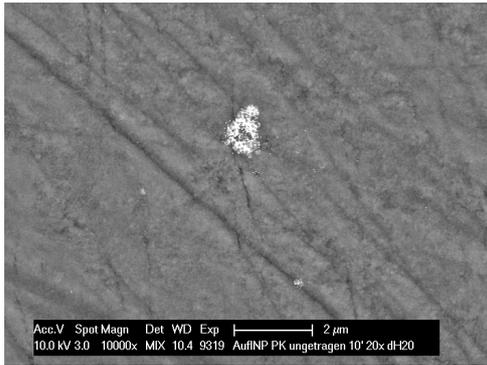
neg_10'_1x (2) 9318



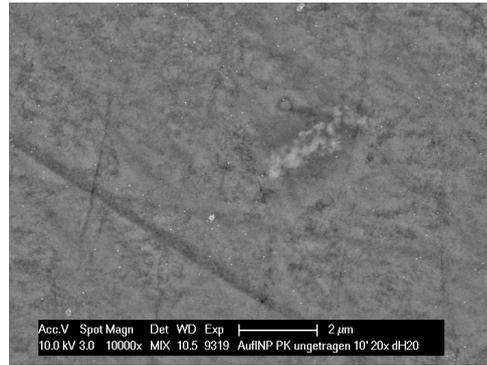
neg_10'_1x (3) 9318



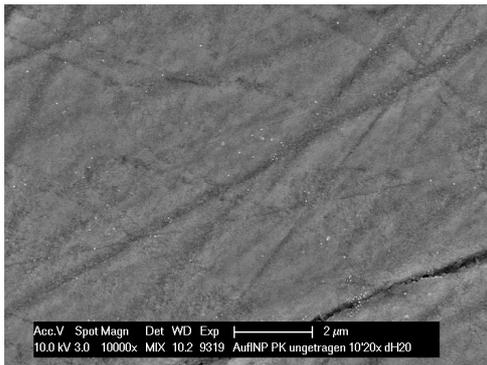
neg_10'_1x (4) 9318



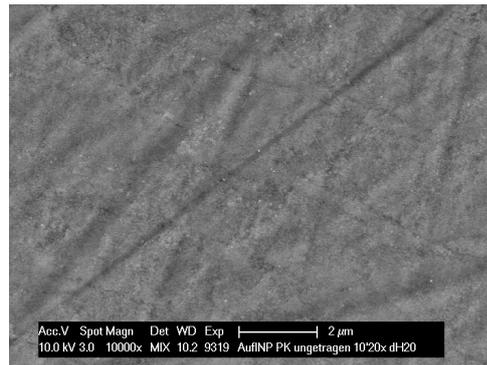
neg_10'_20x (1) 9319



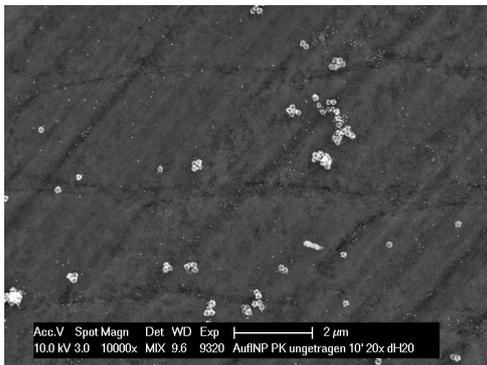
neg_10'_20x (2) 9319



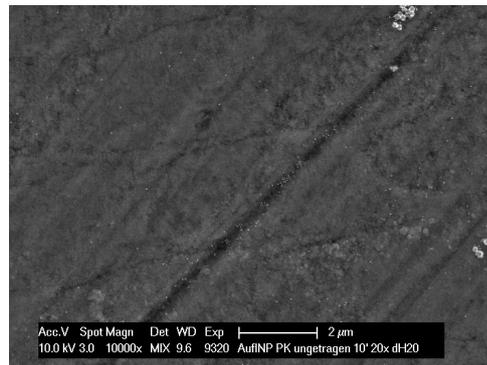
neg_10'_20x (3) 9319



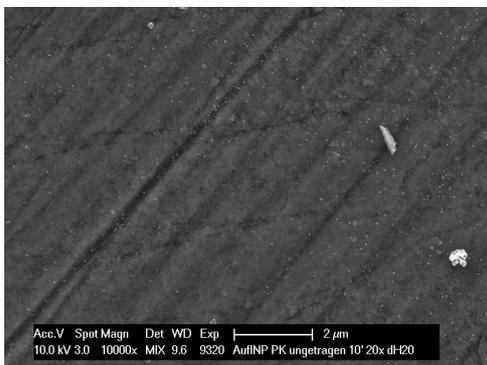
neg_10'_20x (4) 9319



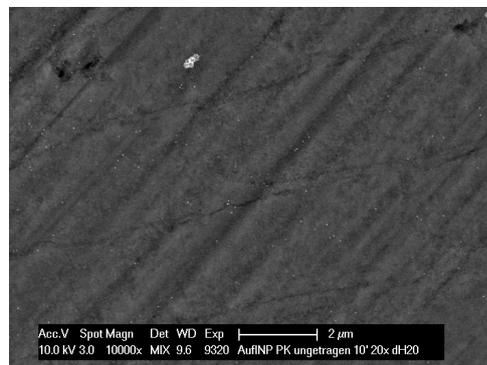
neg_10'_20x (1) 9320



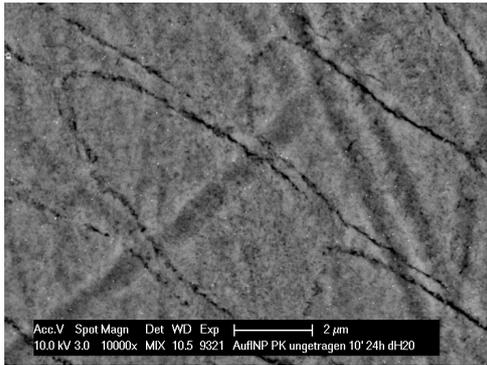
neg_10'_20x (2) 9320



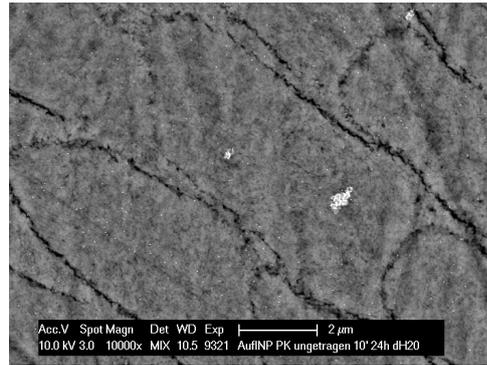
neg_10'_20x (3) 9320



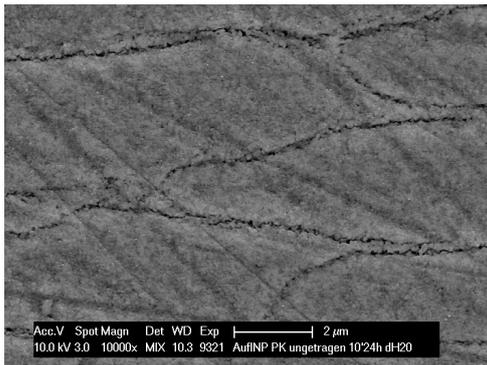
neg_10'_20x (4) 9320



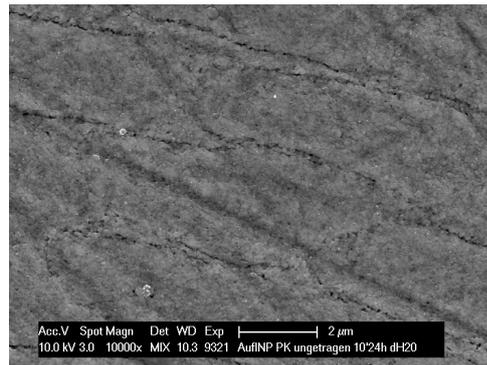
neg_10'_24h (1) 9321



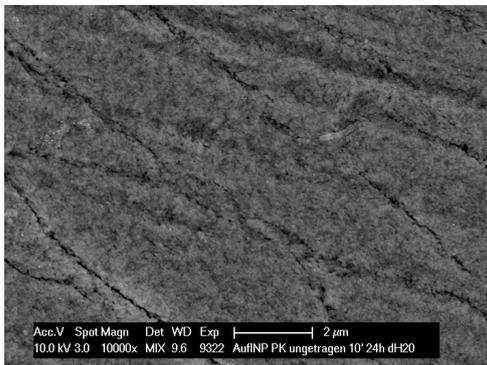
neg_10'_24h (2) 9321



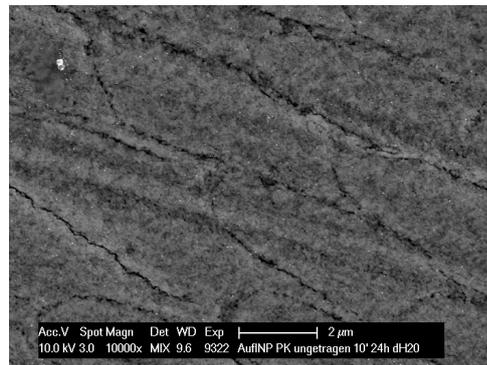
neg_10'_24h (3) 9321



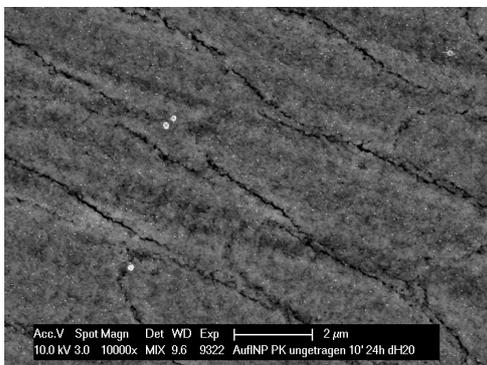
neg_10'_24h (4) 9321



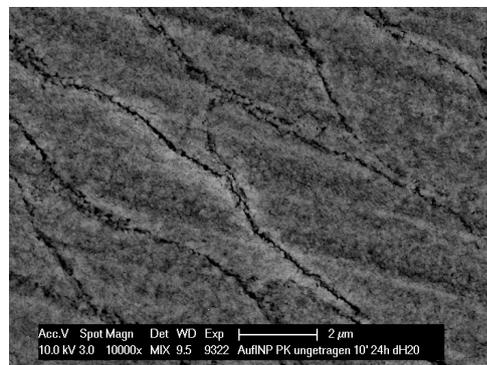
neg_10'_24h (1) 9322



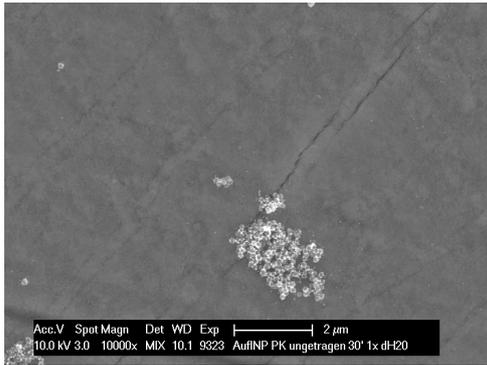
neg_10'_24h (2) 9322



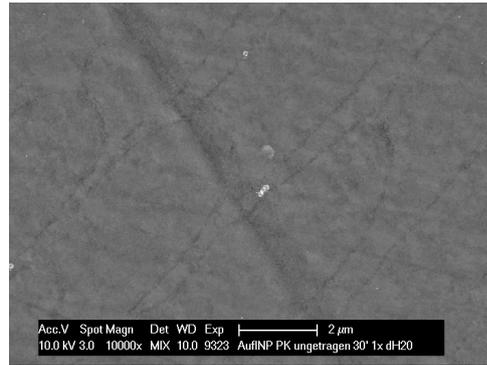
neg_10'_24h (3) 9322



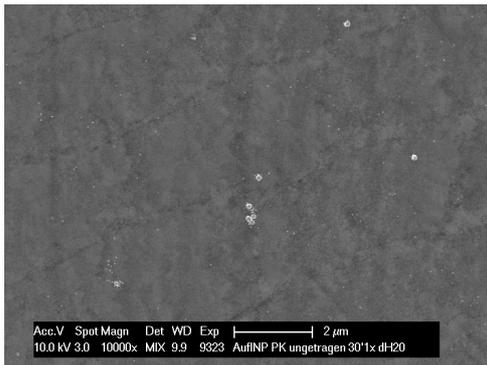
neg_10'_24h (4) 9322



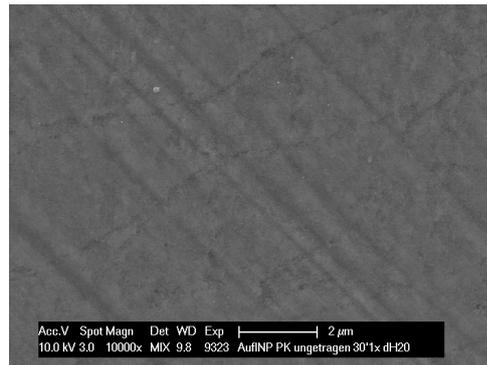
neg_30'_1x (1) 9323



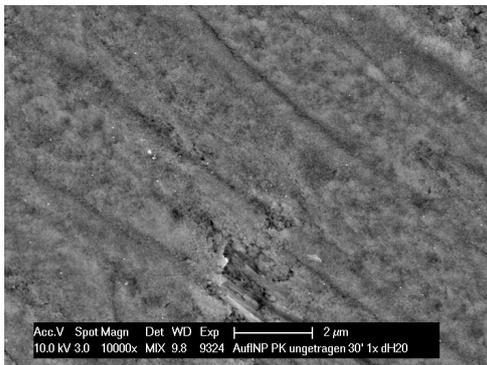
neg_30'_1x (2) 9323



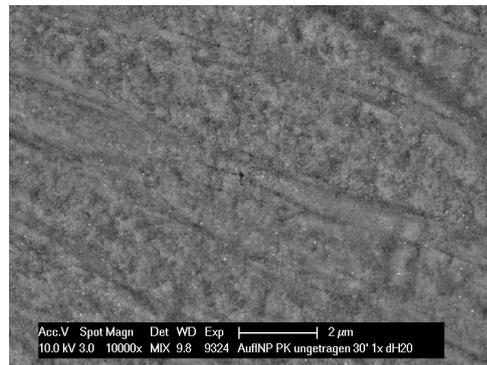
neg_30'_1x (3) 9323



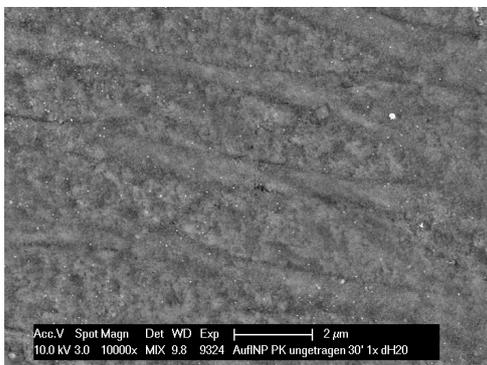
neg_30'_1x (4) 9323



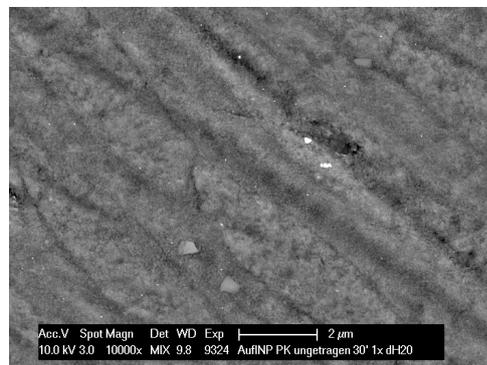
neg_30'_1x (1) 9324



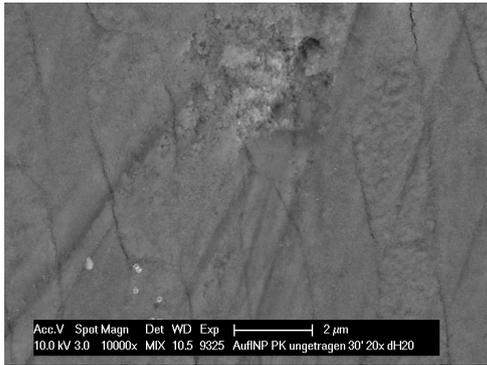
neg_30'_1x (2) 9324



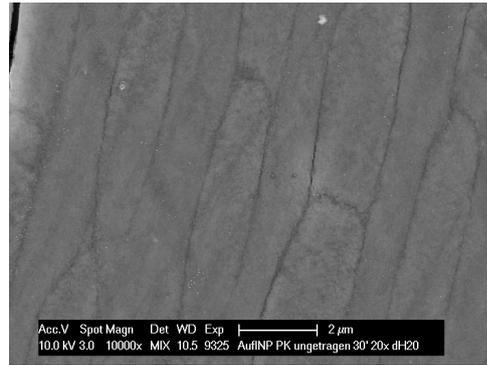
neg_30'_1x (3) 9324



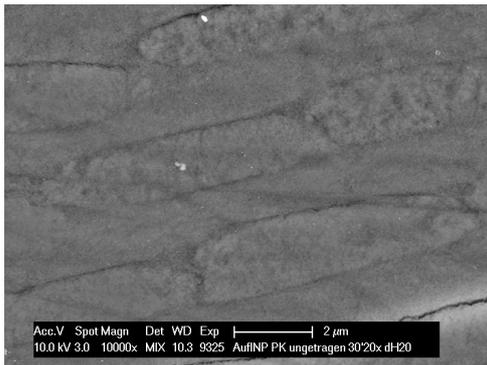
neg_30'_1x (4) 9324



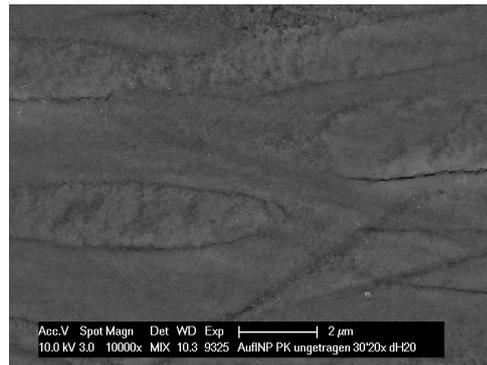
neg_30'_20x (1) 9325



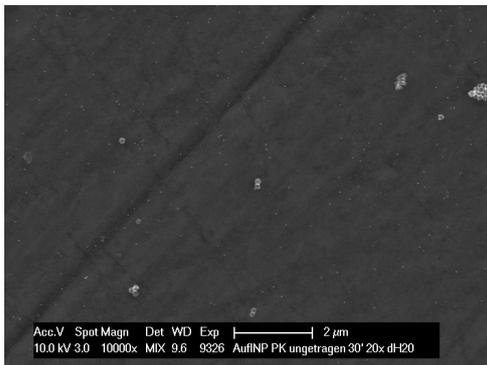
neg_30'_20x (2) 9325



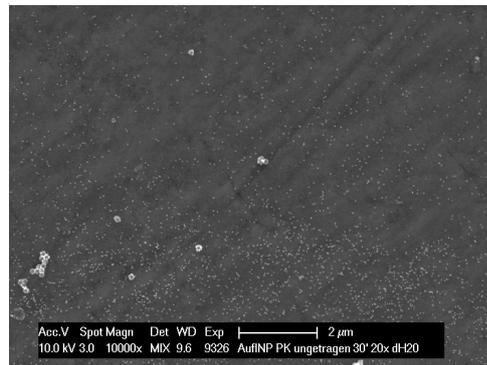
neg_30'_20x (3) 9325



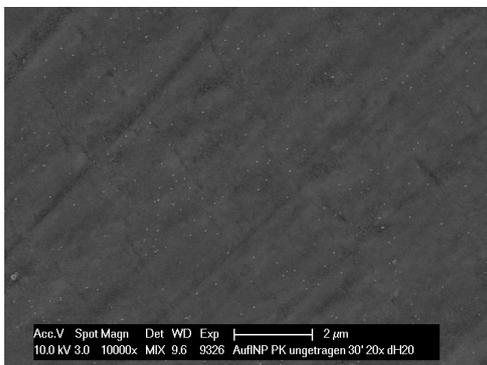
neg_30'_20x (4) 9325



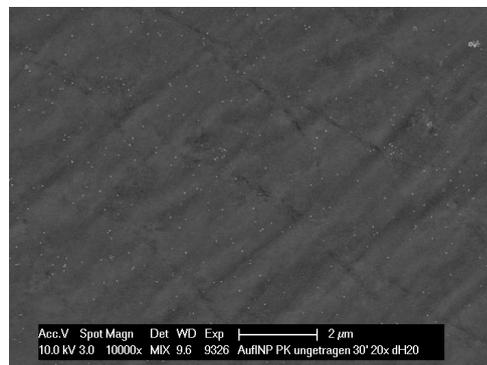
neg_30'_20x (1) 9326



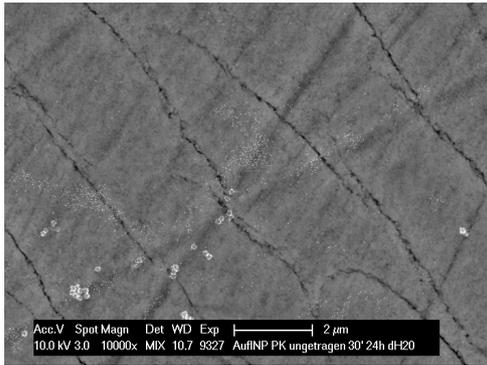
neg_30'_20x (2) 9326



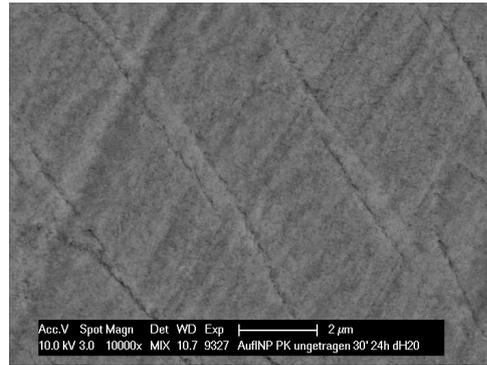
neg_30'_20x (3) 9326



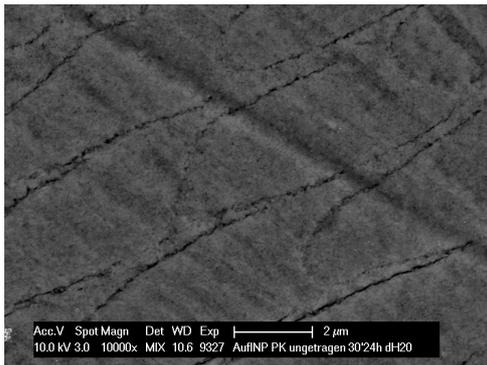
neg_30'_20x (4) 9326



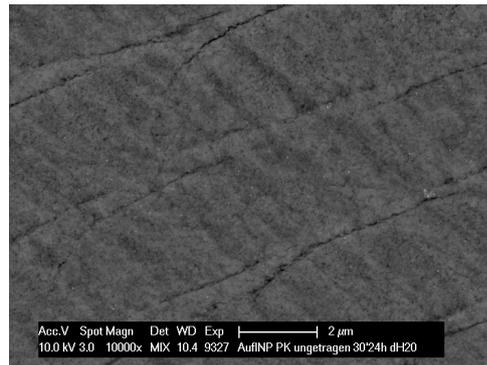
neg_30'_24h (1) 9327



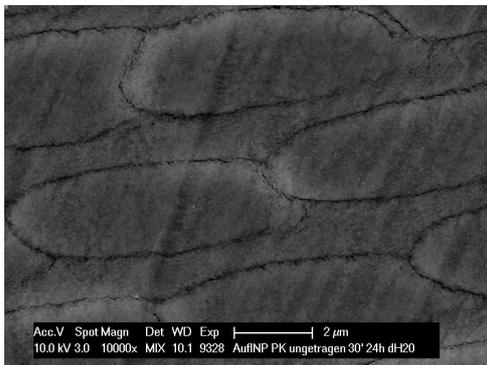
neg_30'_24h (2) 9327



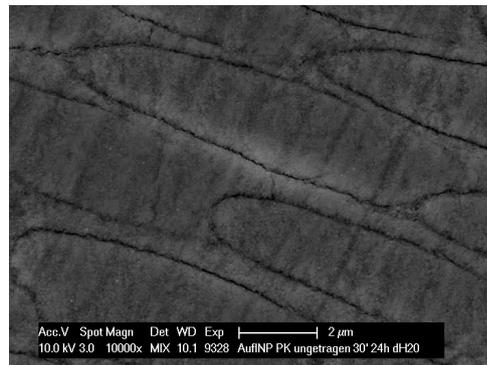
neg_30'_24h (3) 9327



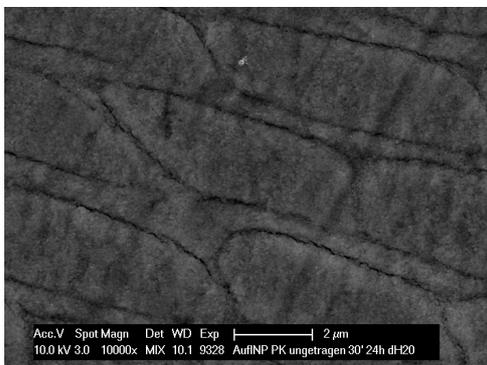
neg_30'_24h (4) 9327



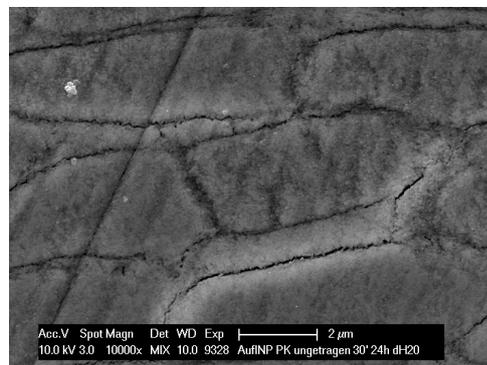
neg_30'_24h (1) 9328



neg_30'_24h (2) 9328



neg_30'_24h (3) 9328



neg_30'_24h (4) 9328