Aus der Universitätsklinik für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
Abteilung für Zahnerhaltungskunde und Parodontologie
der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i. Br.

Vergleich verschiedener Vitalfärbeverfahren zur Detektion und Quantifizierung adhärenter Mikroorganismen im initialen oralen Biofilm

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des Zahnmedizinischen Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Albert-Ludwigs-Universität
Freiburg i. Br.

Vorgelegt 2011
von Pune Nina Tawakoli
geboren in Vorwerk

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c.mult Hubert Blum

1.Gutachter: Prof. Dr. Christian Hannig

2.Gutachter: Prof. Dr. Bernd Heimrich

Jahr der Promotion: 2011

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1
2 Literaturübersicht 3
2.1 Orale Biofilmbildung 3
2.1.1 Pellikelbildung 3
2.1.2 Initiale bakterielle Besiedlung, Ausbildung der Plaque und Maturation des Biofilms 5
2.2 Verfahren zur Quantifizierung und Visualisierung des oralen Biofilms 8
2.2.1 Elektronenoptische Verfahren 9
2.2.2 Klassische Kulturverfahren 10
2.2.3 Fluoreszenzmikroskopische Verfahren (DAPI, FISH) 10
2.3 Vitalfärbeverfahren 12
2.3.1 Vitalität und Vitalitätszustände von Mikroorganismen 12
2.3.2 Gängige Vitalfärbeverfahren 14
2.4 Fragestellung 17
3 Material und Methoden 18
3.1 Versuchsplan 18
3.2 Materialliste 20
3.2.1 Geräte, Instrumente und Software 20
3.2.2 Chemikalien und Reagenzien 21
3.2.3 Angesetzte Lösungen 22
3.2.4 Weitere Versuchsmaterialien 24
3.3 Probanden 24
3.4 Probekörper 25
3.5 Orale Exposition 25
3.6 Verfahren zur Visualisierung von adhärenten Mikroorganismen 26
3.6.1 Prinzipielle Vorbereitung und Auswertung der Proben bei allen Vitalfärbeverfahren 27
3.6.2 Fluorescein-Diacetat und Sytox red 28
3.6.3 Fluorescein-Diacetat und Propidiumiodid 29
3.6.4 BacLight 30
3.6.5 Calcein AM und Sytox red 31
3.6.6 Carboxyfluorescein-Diacetat und Sytox red 32
3.6.7 Carboxyfluorescein-Diacetat und Propidiumiodid 33
3.6.8 4,5,6,7-Tetrachlorofluorescein-Diacetat und Propidiumiodid 34
3.6.9 Calcein AM und Propidiumiodid 35
3.6.10 Syto 9 green und Sytox red 36
3.6.11 Fluorescein-Diacetat und Ethidiumbromid 37
3.7 Bestimmung der kolonie-bildenden Einheiten 37
3.8 Statistik 39
4 Ergebnisse 40
4.1 Charakteristika verschiedener Kombinationen von Vitalfluoreszenzfarbstoffen 40
4.1.1 Fluorescein-Diacetat/Sytox red 40
4.1.2 Fluorescein-Diacetat/Propidiumiodid 40
4.1.3 BacLight 43
4.1.4 Calcein AM/Sytox red 43
4.1.5 Carboxyfluorescein-Diacetat/Sytox red 45

4.1.6 Carboxyfluorescein-Diacetat/Propidiumiodid 46
4.1.7 4,5,6,7-Tetrachlorofluorescein-Diacetat/Propidiumiodid 46
4.1.8 Calcein AM/Propidiumiodid 46
4.1.9 Syto 9 green/Sytox red 48
4.1.10 Fluorescein-Diacetat/Ethidiumbromid 48
4.2 Zusammenfassende Beurteilung der Verfahren 50
4.3 Anwendung ausgewählter Verfahren zur Quantifizierung vitaler und avitaler Mikroorganismen bei 6 Probanden 51
4.3.1 Synoptische Darstellung der Ergebnisse der Vitalfärbeverfahren 51
4.3.2 Zusammenfassende Darstellung aller detektierten Mikroorganismen 53
4.3.3 Ergebnisse des Kulturverfahrens 55
5 Diskussion 57
6 Zusammenfassung 67
6.1 Deutsch 67
6.2 Englisch 68
7 Abkürzungsverzeichnis 69
8 Datenanhang 70
9 Literaturverzeichnis 73
10 Danksagung 89
11 Lebenslauf 90

1 Einleitung

Zahlreiche Menschen leiden unter den Folgen von Karies und Parodontopathien [Marsh und Bradshaw 1995]. Bakterielle Biofilme sind Ursache dieser Erkrankungen [Lemos *et al*. 2010; Lenander-Lumikari und Loimaranta 2000; Listgarten und Loomer 2003; Marsh 2006; Moore und Moore 1994; Schaudinn *et al*. 2009; van der Velden *et al*. 2006; Zijnge *et al*. 2010]. Dabei kommt der initialen bakteriellen Adhärenz ein besonderer Stellenwert zu [Hannig M und Hannig C 2007a, b]. Zunächst entsteht innerhalb von Sekunden ein weitestgehend bakterienfreier Proteinfilm auf der Schmelzoberfläche, die Pellikel. Dieser besteht aus adsorbierten Speichelproteinen und Glycoproteinen sowie Lipiden aus der umgebenden Mundflüssigkeit [Hannig M und Joiner 2006]. Im Folgenden verdickt sich der Proteinfilm durch Interaktion von supramolekulären Pellikel-Präkursoren mit der Schmelzoberfläche [Vitkov *et al*. 2004]. Erst sekundär erfolgt die bakterielle Biofilmbildung auf Basis der Pellikel. Streptokokken und grampositive Stäbchen lagern sich initial reversibel vor allem im Bereich von Oberflächenrauigkeiten an. [Al-Ahmad *et al*. 2009; Cassels *et al*. 1995; Diaz *et al*. 2006; Dige *et al*. 2009; Finke *et al*. 2002; Hannig C *et al*. 2007b; Palmer *et al*. 2003]. Dieser unspezifischen bakteriellen Besiedlung folgt eine spezifische insbesondere durch Fimbrien vermittelte Adhärenz an die Pellikel [Marsh und Bradshaw 1995, Marsh und Martin 1999]. Durch die Teilung, die Anlagerung weiterer Mikroorganismen und die Ausbildung der extrazellulären Matrix entsteht ein dreidimensionaler Biofilm, die Plaque. Die Detektierung und Quantifizierung der adhärenten Mikroorganismen ist in der Mikrobiologie nach wie vor von großer Bedeutung. Um beispielsweise die Wirksamkeit oraler Therapeutika zu evaluieren, sind verlässliche Verfahren zum Nachweis und zur Differenzierung vitaler und avitaler Bakterien im Biofilm nötig [Hannig C *et al*. 2010]. Für eine Simulation der Biofilmbildung am Zahnschmelz scheint die Verwendung *in situ* exponierter Probekörper besonders geeignet zu sein [Hannig C und Hannig M 2009a; Hannig C *et al*. 2005; Hannig M *et al*. 2005; Lemos *et al*. 2010]. Moderne Vitalfärbeverfahren, mit Hilfe derer man nach Einfärbung der Schmelzoberfläche die Bakterienzahl unter dem Fluoreszenzmikroskop bestimmen kann, erlauben heute die Untersuchung der initialen Bakterienbesiedlung an *in situ* exponierten Proben. Für die Unterscheidung der vitalen und avitalen Zellen können verschiedene Farbstoffkombinationen verwendet werden. Parallel zu der schwierigen Definition und Bestimmung des Vitalitätszustandes wird der Einsatzbereich dieser Verfahren jedoch oftmals durch ihre Toxizität und Farbinstabilität unter dem Mikroskop eingeschränkt [Decker 2001; Hannig C 2010; Wallis und Whittaker 1974]. Erschwerend kommt außerdem

hinzu, dass heute eine hohe Vielfalt verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe auf dem Markt angeboten wird. Für ein erfolgreiches Live/Dead-Staining von *in situ* exponierten Schmelzproben, ist daher die richtige Auswahl und Kombination dieser Fluoreszenzfarbstoffe von großer Relevanz.

Ziel der vorliegenden Studie war es, verschiedene Vitalfärbeverfahren zur Visualisierung und Quantifizierung adhärenter Mikroorganismen im initialen oralen Biofilm zu vergleichen. Die initiale bakterielle Adhärenz wurde an *in situ* getragenen bovinen Schmelzproben nach Vitalfärbung mit verschiedenen Verfahren epifluoreszenzmikroskopisch untersucht und mit Hilfe von Kulturverfahren verifiziert.

2 Literaturübersicht

Als Biofilm werden dreidimensional strukturierte Aggregate adhärenter Mikroorganismen in einer extrazellulären polymeren Matrix (EPS) bezeichnet [Hannig M und Hannig C 2007a, Donlan 2002; Flemming und Wingender 2001a]. Entstehungsort sind Grenzflächen (z. B. fest-flüssig) mit ausreichendem Wasserangebot und mikrobiell verwertbaren Nährstoffen [Flemming und Wingender 2001a, b]. Da diese Voraussetzungen nahezu ubiquitär gegeben sind, lassen sich Bioadhäsionsprozesse mit anschließender Biofilmbildung nicht nur im Mund finden. Biofilme sind weit verbreitet in der Natur, in technischen Systemen und im medizinischen Bereich, wie beispielsweise in den Schlauchsystemen zahnmedizinischer Behandlungseinheiten, auf Kontaktlinsen, Implantaten sowie Herzklappen [Behlau und Gilmore 2008; Costerton *et al*. 1987,Costerton *et al*. 2005; Costerton *et al*. 1995; Gaudie 2006; Hall-Stoodley *et al*. 2005; Lemos *et al*. 2010].

Der orale Biofilm entsteht auf Basis der Pellikel. Innerhalb von Sekunden werden oral exponierte Oberflächen von einer Proteinschicht aus adsorbierten Speichelproteinen, der Pellikel, bedeckt [Hannig M 1999a; Skjørland *et al*. 1995; Vacca Smith und Bowen 2000]. Durch eine weitere kontinuierliche Adsorption von Biomolekülen gewinnt die Pellikel langsam an Dicke [Hannig M 1999a; Skjørland *et al*. 1995]. Erst sekundär bildet sich ein bakterieller Biofilm mit charakteristischer dreidimensionaler Strukturierung und einer extrazellulären Matrix aus Mikroorganismen und Proteinen [Hannig M und Joiner 2006; Hannig M und Hannig C 2007a; Lendenmann 2000].

2.1 Orale Biofilmbildung

2.1.1 Pellikelbildung

Als Pellikel wird der Protein- und Glycoproteinfilm bezeichnet, der sich nahezu sofort auf allen oral exponierten Festkörperoberflächen ausbildet [Hannig C und Hannig M 2009b]. Sie weist sowohl protektive und antimikrobielle als auch die bakterielle Kolonisation der Zahnoberfläche begünstigende Eigenschaften auf [Hannig M *et al*. 2004; Hannig M und Hannig C 2007a]. Die Pellikel wirkt neben der benetzenden Funktion als Lubrikant, Ionendepot für die Remineralisation und als Erosionsschutz auf den Zähnen. In der weiteren Funktion als sogenannter *conditioning film* werden jedoch die bakterielle Adhärenz und der bakterielle Metabolismus begünstigt [Hannig C und Hannig M 2009a; Hannig M und Hannig

C 2007a; Hannig M und Joiner 2006; Lendenmann *et al*. 2000]. Elektronenmikroskopisch lässt sich zeigen, dass die Proteine und Glycoproteine den Mikroorganismen während der ersten Phase der Bioadhäsion überlegen sind [Hannig M 1999b]. Über van der Waals Kräfte sowie hydrophobe Wechselwirkungen kommt es zu spontanen Interaktionen zwischen den Proteinen und der Schmelzoberfläche. Diese Bindungen bilden sich schneller aus als die spezifische Adhärenz der Mikroorganismen [Brecx *et al*. 1981; Gristina *et al*. 1988]. An der Schmelzoberfläche befindet sich eine Ionenschicht aus positiv geladenen Kalziumionen, da diese schneller in Lösung gehen als die darunter gelegenen Phosphationen [Bennick *et al*. 1979; Hay 1973; Moreno *et al*. 1978, 1982]. Durch Interaktion bestimmter Speichelproteine, sogenannter Pellikel-Präkursoren, mit dieser Doppelschicht an der Schmelzoberfläche entsteht ein wenige Nanometer dicker Film [Hannig M und Joiner 2006]. Bei diesen Pellikel-Präkursoren handelt es sich um Phosphoproteine wie Statherin, Histatin und prolinreiche Proteine, die an positiv geladene Kalziumionen der Schmelzoberfläche binden [Embery *et al*. 1986; Siqueira *et al*. 2010; Yao *et al*. 1999]. Weiterhin sind auch Muzin MG1 und 2, Amylase, Cystatine, Lysozym, Carboanhydrasen, Lactoferrin und bakterielle Glycosyltransferasen bereits in der initialen Pellikel zu finden [Al-Hashimi und Levine 1989; Hannig C *et al*. 2004; Hannig C *et al*. 2005a, b, c; Hannig C *et al.* 2006; Hannig C *et al.* 2007b; Hannig C *et al.* 2008b; Mayhall und Butler 1976; Sønju *et al*. 1974; Sønju 1975; Soares *et al*. 2004; Vacca Smith und Bowen 2000; Yao *et al*. 2001].

Bisher wurde angenommen, dass in der Pellikel nur eine Fraktion der Speichelbestandteile enthalten ist und die Bioadhäsion hochselektiv verläuft [Hannig C *et al*. 2005a; Hannig M und Joiner 2006; Vacca Smith und Bowen 2000; Yao *et al*. 2003]. Einer Studie von Siquiera *et al*. (2007) zufolge scheinen Pellikel und Speichel mehr gemeinsame Komponenten zu enthalten, als bisher angenommen. Hauptbestandteile der Pellikel sind Speichelproteine, wie beispielsweise Glycoproteine und auch Plasmaproteine, die zum größten Teil aus dem Sulkusfluid stammen und daher in höherer Konzentration am Gingivalsaum auftreten [Al-Hashimi und Levine 1989; Carlén *et al*. 1998, 2003; Li *et al*. 2004; Ørstavik und Kraus 1973, 1974; Rüdiger *et al*. 2002]. Die Speichelproteine liegen in Form globulärer mizellartiger Aggregate vor [Young *et al*. 1999]. Diese supramolekularen Pellikel-Präkursoren haben einen Durchmesser von 100-500 nm und eine negativ geladene Außenhülle sowie einen hydrophoben Kern [Young *et al*. 1997]. Als Speicherort für Pellikelproteine und zum Schutz vor Speichelproteasen spielen die globulären Strukturen eine wichtige Rolle bei der Pellikelbildung [Soares *et al*. 2004; Vitkov *et al*. 2004]. Es wird vermutet, dass nicht einzelne

Proteine für die schnelle Pellikelbildung verantwortlich sind, sondern diese Proteinagglomerate [Hannig M und Hannig C 2007a].

Unter physiologischen Bedingungen erreicht die Pellikel *in vivo* nach 2-3 min in der ersten schnellen Adsorptionsphase eine initiale Dicke, die sie für ca. 30 min beibehält. Anschließend verdreifacht sich die Pellikeldicke durch eine kontinuierliche Adsorption von Biomolekülen, die Pellikelbildung soll nach 120 Minuten ein Plateau erreichen [Hannig M 1999a; Sønju und Rølla 1973; Skjørland *et al*.1995]. Bei der Vernetzung der Pellikelbestandteile untereinander sind epitheliale Transglutaminasen von Bedeutung [Bradway *et al*. 1989, 1992]. Möglicherweise spielen die dadurch katalysierten Transaminierungsreaktionen für die intrinische Pellikelreifung eine größere Rolle als die Proteolyse [Hannig C *et al*. 2008a]. Zudem kann man davon ausgehen, dass die Pellikel durch exogene Proteolyse, Dephospholierung, Adsorption und Desorption einem ständigen Reifungsprozess unterliegt [Hajishengallis *et al*. 1992; Hannig C *et al*. 2005a, b; Hannig M und Joiner 2006]. Durch dieses *In-vivo*-Remodelling erhöht die Pellikel durch Reifung und Vernetzung ihre Festigkeit [Hannig M und Bössmann 1989a, b; Skjørland *et al*. 1995; Vacca Smith und Bowen 2000; Yao *et al*. 1999, 2000].

2.1.2 Initiale bakterielle Besiedlung, Ausbildung der Plaque und Maturation des Biofilms

Nach der initialen Biofilmbildung, die hauptsächlich durch die Adsorption von Proteinen und Glycoproteinen bestimmt wird, folgt sekundär die bakterielle Besiedlung der Pellikel [Brecx *et al*. 1981; Gristina *et al*. 1988; Hannig C und Hannig M 2009a; Hannig M und Hannig C 2007a; Hannig M und Hannig C 2006; Hannig M 1999b]. Zunächst lagern sich verschiedene Streptokokkenspezies, wie *S. sanguis, S. oralis und S. mitis* sowie grampositive Stäbchen, wie beispielsweise Actinomyces (*A. neaslundii, A. viscosus*) unspezifisch und reversibel an Oberflächenrauigkeiten an [Al-Ahmad *et al*. 2009; Cassels *et al*. 1995; Diaz *et al*. 2006; Dige *et al*. 2009; Finke *et al*. 2002; Hannig C *et al*. 2007b; Lie und Gusberti 1978; Lie 1979; Palmer *et al*. 2003; Quirynen *et al*. 2003; Socranski *et al*. 1977; Theilade *et al*. 1982]. Dieser initialen bakteriellen Annäherung an die Zahnoberfläche liegen physiko-chemische Kräfte großer Reichweite zugrunde [Cassels *et al*. 1995; Christersson 1991; Lie und Gusberti 1978]. Durch die räumliche Nähe der Mikroorganismen zur Pellikel folgt dann die spezifische, meist über Fimbrien vermittelte, irreversible Interaktion über stereo-chemische Wechselwirkungen [Marsh und Bradshaw 1995, Marsh und Martin 1999]. Weitere bakterielle Strukturen für die

rezeptorvermittelte Anhaftung an die Pellikel sind die Adhäsine. Diese bestehen aus Lipoteichonsäure, Lektinen, kohlenhydratbindenden Proteinen oder Polysaccharidschichten an der Bakterienoberfläche (EPS) [Liljemark und Bloomquist 1996, Marsh und Bradshaw 1995, Marsh und Martin 1999]. Als spezifische Rezeptoren für die Primärflora dienen teilweise einzelne Pellikelbestandteile wie beispielsweise Glycoproteine, Amylase und prolinreiche Proteine. [Chaudhuri *et al*. 2007; Douglas 1990; Nobbs *et al*. 2009]. Auch die mizellartigen globulären Strukturen der Pellikel (SMG, engl. salivary micelle-like globule) scheinen eine gewisse Rolle bei der Adhärenz von Streptokokken zu spielen [Young *et al*. 1997]. So konnte bereits nachgewiesen werden, dass sowohl vom Gesamtspeichel als auch vom Parotisspeichel isolierte SMGs eine Bakterienagglutination fördern. SMG-freie Speichelreste hingegen lösen nur geringe oder keine Agglutinationsreaktionen aus [Young *et al.* 1997]. Eine besondere Stellung nehmen zudem die Amylase und die Glycosyltransferase ein [Chaudhuri *et al*. 2007; Hannig C und Hannig M 2009a; Hannig C *et al*. 2008b; Hannig C *et al*. 2007b; Hannig C *et al*. 2005; Tanzer *et al*. 2003]. Beide Enzyme konnten in aktiver Form bereits in der initialen Pellikel nachgewiesen werden [Hannig C und Hannig M 2009a; Hannig C *et al*. 2008b]. Das in den Speicheldrüsen synthetisierte Enzym Amylase dient zum einen als spezifischer Rezeptor für Streptokokken (*S. sanguis, S. gordonii, S. mitis, S. parasanguis, S. christa, S. salivarius*) [Chaudhuri *et al*. 2007; Hannig C und Hannig M 2009a, Nobbs *et al*. 2007]. Zum anderen begünstigt es den bakteriellen Metabolismus durch Zufuhr von Stärkehydrolysaten [Hannig C *et al*. 2004; Hannig M *et al*. 2003]. Die von Streptokokken gebildeten Glycosyltransferasen sind an der Bildung der Plaquematrix beteiligt. Sie nutzen die α-glycosidische Bindung der Saccharose, um extrazelluläre Polysaccharide, die sogenannten Glucane, zu synthetisieren [Rølla *et al*. 1983; Scheie und Rølla 1986; Scheie *et al*. 1987]. Diese wasserunlöslichen Glucane sind als bakterielle Rezeptoren wirksam [Hiroi *et al*. 1992]. Es wurden drei Isoformen der Glycosyltransferase in der initialen Pellikel nachgewiesen (Glycosyltransferase B, C, D) [Hannig C *et al*. 2008a].

Im Anschluss an die initiale bakterielle Adhärenz über Adhäsine und spezifische Rezeptoren der Pellikel lagern sich sekundär Mikroorganismen an der Schmelzoberfläche an [Marsh und Bradshaw 1995]. Diese Koaggregation weiterer Bakterien erfolgt durch Interaktion mit Glycolipiden, Fibrinogen und Kollagen. Im Laufe der Biofilmmaturation bildet sich zunehmend eine extrazelluläre Matrix in Form löslicher und unlöslicher Glucane aus [Costerton 1995; Costerton *et al*. 1995; Palmer *et al*. 2003; Kuramitsu 1974a, 1974b; Scheie 1994]. Lösliche Glucane (EPS) können von anderen Bakterien verstoffwechselt werden [Flemming und Wingender 2001a]. Die unlöslichen Polysaccharide dienen der strukturellen

Integrität der entstehenden Plaque und fördern die bakterielle Adhärenz an die Pellikel [Flemming und Wingender 2001a, b; Kuramitsu 1974a, b; Sutherland 2001].

Im Laufe der Biofilmreifung scheint sich das Verhältnis der einzelnen Bakterienstämme zu verschieben [Al-Ahmad *et al.* 2007, 2009, 2010b]. Es konnte ein charakteristisches Verteilungsmuster aufgezeigt werden: Die ersten 12 h der *In-situ*-Biofilmbildung sind vor allem durch die Zunahme der Streptokokkenanzahl gekennzeichnet [Al-Ahmad *et al.* 2009]. Al-Ahmad konnte nachweisen, dass die Streptokokken auch in der 24-h-Plaque überwiegen, jedoch nach sieben Tagen wieder abnehmen (2007). Nach initialer Abnahme gramnegativer Bakterien am Beispiel von *Fusobacterium nucleatum* wurde nach 7 Tagen eine beachtliche Zunahme beobachtet [Al-Ahmad *et al*. 2007].

Charakteristisch für die Bakterien im Biofilm scheinen zudem die veränderten Eigenschaften und eine erhöhte Pathogenität im Vergleich zu den planktonischen Bakterien zu sein [Al-Hashimi und Levine 1989; Carlén *et al*. 1998; Flemming und Wingender 2001a, b; Jefferson *et al*. 2005; Stoodley *et al*. 2002]. Die einzelnen Organismen des Biofilms bilden durch ihre unmittelbare Nähe zueinander zahlreiche Wechselwirkungen aus und können synergistische Gemeinschaften entwickeln. Wen *et al*. (2010) konnten die wechselseitige Interaktion verschiedener Bakterien durch den Vergleich von Mono-Spezies-Modellen mit Dual-Spezies-Modellen aufzeigen. Streptokokken wie *S. mutans* scheinen im Dual-Spezies-Modell mit *S. oralis* oder mit Laktobazillen wie beispielsweise *L. casei* eine deutlich verbesserte Biofilmbildung aufzuweisen. Gegenwärtige Studien lassen vermuten, dass die Kommunikations- und Signalwege der einzelnen Organismen im Biofilm auf einem Vesikeltransfer beruhen [Remis *et al*. 2010]. Zusätzlich bietet der Biofilm den Mikroorganismen Schutz und eine erhöhte Toleranz gegenüber pH- und Temperaturschwankungen. Hydrodynamische Scherkräfte bestimmen die Flüssigkeitsbewegungen sowie die Bakterienadhärenz *in vivo* [Harrison *et al*. 2006, Liu und Tay 2002]. Die räumliche Nähe der Zahnoberfläche zu den Weichgeweben und der stetige Kontakt üben weiterhin Einfluss auf die Biofilmbildung aus. Daher sind zur präzisen und zielgerechten Erforschung der oralen Biofilmbildung insbesondere *In-situ-Studien* von großer Relevanz [Hannig C *et al*. 2005; Hannig M *et al*. 2005; Lemos *et al*. 2010].

2.2 Verfahren zur Quantifizierung und Visualisierung des oralen Biofilms

Die Visualisierung und Quantifizierung adhärenter Bakterien kann mithilfe vieler unterschiedlicher Verfahren durchgeführt werden [Hannig C *et al.* 2010]. Mit den klassischen Kulturverfahren kann man vitale Mikroorganismen auf Blutagarplatten kultivieren und auszählen. Um einen Einblick in den bakteriellen Biofilm zu gewinnen, können neben der Lichtmikroskopie oder den elektronenoptischen Verfahren, wie beispielsweise dem Transmissionselektronenmikroskop (TEM), dem Rasterelektronenmikroskop (REM bzw. SEM, engl. scanning electron microscope) und dem Environmental Scanning Electron Microskop (ESEM), moderne fluoreszenzmikroskopische Methoden angewandt werden [Hannig C *et al.* 2010]. Durch den Einsatz moderner Vitalfärbeverfahren lassen sich Mikroorganismen durch fluoreszierende Farbstoffe visualisieren und anschließend epifluoreszenzmikroskopisch untersuchen [Al-Ahmad *et al*. 2009; Berney *et al*. 2007; Decker 2001; Hannig C *et al*. 2010; Hannig C *et al*. 2009; Hannig C *et al*. 2008b; Hannig C *et al*. 2007a; Takenaka *et al*. 2009]. Eine Ergänzung ist durch die Anwendung eines konfokalen Laser-Mikroskops (CLSM, engl. confocal laser scanning microscope) möglich. Diese neuere Technik bietet die Möglichkeit, den dentalen Biofilm ohne Strukturschädigung dreidimensional zu erforschen [Palmer und Sternberg 1999]. In Kombination mit den Vitalfärbeverfahren ist die Differenzierung von lebenden und toten Bakterien in den verschiedenen Schichten des Biofilms bzw. den verschiedenen Ebenen des Pellikels möglich [Auschill *et al*. 2004; Auschill *et al*. 2002; Auschill *et al*. 2001; Dige *et al*. 2009; Yang *et al*. 2006; Zaura-Arite *et al.* 2001]. Da mit jedem Verfahren unterschiedliche Charakteristika des Biofilms erfasst werden können, ist eine Kombination verschiedener Verfahren sinnvoll [Hannig C *et al*. 2010; Hannig C *et al*. 2007a]. Um beispielsweise das Verhältnis von lebenden und toten Bakterien in den verschiedenen Schichten des Biofilm zu bestimmen, scheint die kombinierte Untersuchung mit dem konfokalen Lasermikroskop, der Visualisierung und Quantifizierung der Gesamtbakterienzahl anhand der Vitalfärbeverfahren oder DAPI geeignet zu sein. Als Ergänzung können rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen dienen [Al-Ahmad *et al*. 2010a; Arweiler *et al*. 2004; Jung *et al*. 2010; Tamura *et al*. 2008; Zaura-Arite und ten Cate 2000].

2.2.1 Elektronenoptische Verfahren

Während lichtmikroskopische und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen lediglich zur Quantifizierung der Bakterien herangezogen werden können, ermöglichen die elektronenoptischen Verfahren Einblicke in die Ultrastruktur der Bakterien und ihrer Umgebung [Hannig C *et al*. 2008b, Hannig C *et al*. 2009, Hannig C *et al*. 2010; Hannig M 1999a]. Zu den Nachteilen der elektronenoptischen Verfahren zählt die aufwendige Vorbereitung durch Fixier-, Dehydratations- und Beschichtungsprozesse [Hannig M 1999a; Hannig C *et al*. 2010].

Die verschiedenen Verfahren unterscheiden sich durch ihren unterschiedlichen Aufbau und ihr Einsatzspektrum. Während die zu untersuchende Probenoberfläche im Fall rasterelektronenmikroskopischer Aufnahmen (REM bzw. SEM, engl. scanning electron microscope) durch einen dünnen Elektronenstrahl gerastert wird, durchstrahlen die Elektronen bei der Transmissionsmikroskopie (TEM, engl. transmission electron microscope) das Probenmaterial. Eine Grundvorraussetzung für den TEM-Einsatz bildet daher die Anfertigung von Ultradünnschnitten. Die morphologische Charakterisierung des bakteriellen Biofilms kann durch beide Techniken ermöglicht werden, während die Quantifizierung der Mikroorganismen schwierig ist [Brecx *et al*. 1985; Bergmans *et al*. 2005; Hannig C *et al*. 2010; Hannig M 1997; Hannig M *et al*. 2004; Hannig M *et al*. 2005; Lie 1977; Reese und Guggenheim 2007].

Eine spezielle Variante des Rasterelektronenmikroskops stellt das Environmental Scanning Electron Microscope (ESEM) dar. Im Gegensatz zu den anderen elektronenoptischen Verfahren ermöglicht das ESEM eine weniger vorbereitungsaufwendige Anwendung. Die zu untersuchenden Proben erfordern keine Dehydratation, Fixation oder Beschichtung [Hannig C *et al*. 2010]. Allerdings können Bakterien teilweise nicht ausreichend präzise visualisiert werden, da die Elektronenbestrahlung des Mikroskops auf vitale und unfixierte Zellen schädigend wirken kann [Bergmans *et al*. 2005]. Außerdem scheint die dreidimensionale Abbildung in manchen Fällen nur bedingt möglich zu sein [Hannig C *et al.* 2010].

Die Kryopräparation CEMOVIS (engl. Cryo-electron microscopy of vitreous sections) eröffnet die Möglichkeit, ultradünne Ausschnitte verglaster Proben auch im wässrigen Zustand zu evaluieren [Al-Amoudy *et al*. 2004]. Allerdings erfordert dieses Verfahren eine hochspezielle Ausstattung und eine komplexe Vorbereitung [Bouchet-Marquis und Fakan 2009].

2.2.2 Klassische Kulturverfahren

Eine klassische Methode zur Quantifizierung adhärenter Mikroorganismen ist die Erfassung der kolonie-bildenden Einheiten (CFU). Dafür werden die Bakterien zunächst ultraschallgestützt in eine Lösung desorbiert. Anschließend wird die Bakterien-Suspension gleichmäßig auf verschiedene Nährmedien ausplattiert und unter speziellen Brutverhältnissen kultiviert [Hannig C *et al*. 2007a].

Die Bestimmung der kolonie-bildenden Einheiten für die Bakterienvielfalt im oralen Biofilm wird durch die verfahrensbedingte Selektion eingeschränkt. Es können nur lebende, stoffwechselaktive Bakterien kultiviert werden [Aas *et al*. 2005, Kolenbrander 2000; Netuschil *et al*. 1996]. Ca. 50% der Bakterienarten, die in der Mundhöhle detektierbar sind, lassen sich nicht kultivieren [Aas *et al*. 2005]. Ein weiterer Nachteil dieses Verfahrens ist die Geräte- und Zeitaufwendigkeit, sowie die Desorptions- und Dispersionsvorgänge während der Vorbereitung, die zu Fehlmessungen führen können. Außerdem ist die Quantifizierung semi-planktonischer, adhärenter Bakterien bzw. eines desorbierten Biofilms schwierig [Hannig C *et al*. 2007a]. Aufgrund der vielen Einschränkungen durch klassische Kulturverfahren stellen Untersuchungen der kolonie-bildenden Einheiten keinen Goldstandard mehr dar [Amman *et al.* 1995; Hannig C *et al.* 2010]. Es empfiehlt sich, neben der CFU weitere Methoden zur Visualisierung, Quantifizierung und Identifikation der Bakterien als Referenz anzuwenden [Amann *et al*. 1995].

2.2.3 Fluoreszenzmikroskopische Verfahren (DAPI, FISH)

Als Fluorochrome werden fluoreszierende Stoffe bezeichnet, die nach Anregung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge (Excitation) Licht einer anderen Wellenlänge emittieren. Fluoreszenzmikroskope können mithilfe spezieller Filter selektiv das emittierte Licht darstellen.

Heute erlauben moderne fluoreszenzmikroskopische Verfahren wie die Vitalfärbungen, die Fluoreszenz-*In-Situ*-Hybridisierung (FISH) und die DAPI-Färbung die Untersuchung der initialen bakteriellen Kolonisation an *in situ* exponierten Proben [Hannig C *et al*. 2010].

Die Fluoreszenz-*In-Situ*-Hybridisierung ist zur Differenzierung einzelner adhärenter Mikroorganismenspezies geeignet [Al-Ahmad *et al*. 2007; Al-Ahmad *et al*. 2009; Amann 1995; Bottari *et al*. 2006; Moter und Göbel 2000; Netuschil *et al*. 1996; Sunde *et al*. 2003; Wuertz *et al*. 2004]. Dazu müssen die Probekörper mit Fixier- und Hybridisierungsvorgängen

vorbereitet werden [Al-Ahmad 2007]. Der Vorgang, bei dem sich an einem Einzelstrang einer RNA bzw. DNA ein komplementärer Einzelstrang anlagert, wird als Hybridisierung bezeichnet. Die verwendeten Einzelstrang-Oligonukleotidsonden zeichnen sich durch eine Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen aus. Da sich die Oligonukleotidsonden an ribosomale RNA anlagern, müssen die zu untersuchenden Zellen eine ausreichend hohe Anzahl intakter Ribosomen aufweisen. Daher ist die Anwendung von FISH auf vitale Zellen beschränkt, deren hohe Ribosomenanzahl die biologische Aktivität der Zellen spiegelt [Moter und Göbel 2000].

Die Differenzierung verschiedener Bakterienspezies wird durch die Verwendung spezifischer Oligonukleotidsonden für bestimmte Bakterienspezies ermöglicht [Amann 1995]. Die Anwendung unterschiedlicher Fluoreszenzmarker ermöglicht zudem die gleichzeitige Differenzierung der verschiedenen Bakterienspezies. Für die Anfärbung von Eubakterien kann beispielsweise der Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein verwendet werden. Nach Anregung mit Licht der Wellenlänge $\lambda = 496$ emittiert Fluorescein grünes Licht der Wellenlänge 520-530 nm. Streptokokken können zum Beispiel mit dem rot fluoreszierenden Cyanin-Farbstoff (Emissionswellenlänge von 670 nm) bei einer maximalen Anregung von 649 nm quantifiziert werden [Al-Ahmad *et al*. 2007]. Für die mikroskopische Auswertung der Probenpräparation mit FISH wurde die Anwendung der konfokalen Lasermikroskopie und des Epifluoreszenzmikroskops beschrieben [Thurnheer *et al*. 2001; Al-Ahmad *et al*. 2007; Dige *et al*. 2007; Hannig C *et al*. 2007a; Al-Ahmad *et al*. 2009a; Al-Ahmad *et al*. 2009b]. Die Grenzen und Nachteile der Fluoreszenz-*In-Situ*-Hybridisierung liegen in der limitierten Anzahl der verfügbaren Oligonukleotidsonden sowie der Färbung lediglich vitaler Zellen [Amann *et al*. 1990; Amann 1995; Amann *et al*. 1995; Hannig C *et al*. 2007a].

Mit DAPI lässt sich die Visualisierung adhärenter Bakterien relativ schnell und einfach durchführen. Allerdings sind die verschiedenen Bakterienarten nicht differenzierbar und es ist nicht möglich eine Aussage über den Vitalitätszustand zu treffen. Als Fluoreszenzfarbstoff dient 4´,6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI). Dieser bindet an Adenin- und Thymin-reiche DNA-Regionen bzw. interkaliert in die RNA. Nach Anregung mit ultraviolettem Licht fluoresziert DAPI mit blauer Farbe (Wellenlänge $\lambda = 461$ nm). Mit speziellen optischen Filtern lassen sich aufgrund der unterschiedlichen Emissionsmaxima angefärbte DNA und RNA differenzieren, damit man DNA-spezifische Abbildungen, wie beispielsweise von den Zellkernen, erhalten kann [Tanious *et al*. 1992; Krishan und Dandekar 2005].

2.3 Vitalfärbeverfahren

Bei der Untersuchung der Wirkung antibakterieller Substanzen stellt sich insbesondere die Frage nach dem Vitalitätszustand der behandelten Mikroorganismen. Um die vitalen von den avitalen Zellen zu differenzieren, werden unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe verwendet. Die prozentuale Berechnung der Gesamtvitalität einer Biofilmprobe ist möglich.

Toxizität und mangelnde Stabilität der Färbung schränken die gängigen Methoden erheblich ein und unterstreichen die Notwendigkeit nach der Suche geeigneterer Vitalfärbeverfahren zur Evaluation des adhärenten oralen Biofilms auf *in situ* exponierten Proben [Hannig C. *et al*. 2010].

2.3.1 Vitalität und Vitalitätszustände von Mikroorganismen

Ein wichtiger Aspekt bei der Suche nach zuverlässigen Verfahren zur Detektion und Quantifizierung vitaler Mikroorganismen ist auch die Untersuchung und Definition ihrer Vitalitätsstadien [Decker 2001]. Mithilfe der klassischen Kulturverfahren können lediglich kultivierbare, vitale Bakterien dargestellt werden, die über eine ausreichend hohe Zellteilungs- und Replikationsfähigkeit zur Ausbildung von Kolonien verfügen. Oliver (1995) konnte lediglich bei ca. 30 nicht-sporenbildenden Bakterienspezies unter Reduktion der Substratzufuhr eine Korrelation mit der Kultivierbarkeit nachweisen. Die Bakterien scheinen zu schlafen und sind vital, jedoch nicht kultivierbar (VBNC engl. viable but not culturable). Die Zellen sind durch reduzierte Stoffwechselaktivität bei gleichzeitiger Wachstumsreduktion bzw. Stillstand gekennzeichnet [Colwell *et al.* 1985]. Dieser Zustand lässt sich nicht mit Kulturverfahren erfassen. Unabhängig vom Vitalitätszustand ist nur die Hälfte der oralen Spezies kultivierbar [Aas *et al*. 2005; Mason *et al.* 1986; Oliver 1995].

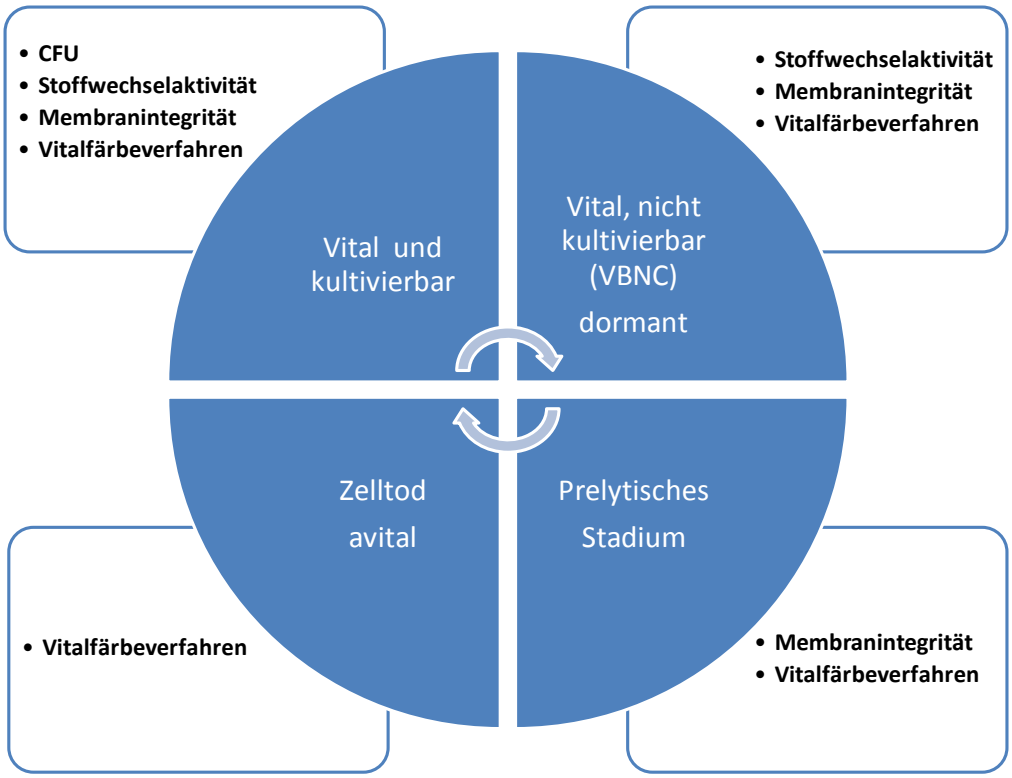

Abbildung 1: Mikrobielle Vitalitätsstadien: charakteristische Eigenschaften und Nachweisverfahren. CFU = Kolonie-bildende Einheiten (engl. colony forming units); modifiziert nach E. M. Decker

Ein bakterieller Dormanz-Zustand wurde ebenfalls von Stevenson (1978) beschrieben. Hierbei handelt es sich um ein reversibles Zwischenstadium, das entweder zur Stoffwechselaktivität, zum Zelltod oder zur Zelllyse durch Verlust der Membranintegrität führen kann. Dieser Schlafzustand stellt eine Überlebensstrategie für Mikroorganismen dar [Kaprelyants *et al.* 1993 Roszak und Colwell 1987a, b]. Eine Übersicht über die verschiedenen Vitalitätsstadien gibt Abbildung 1.

Heute lässt sich die Stoffwechselaktivität bzw. die Vitalität der Bakterien durch unterschiedliche Verfahren messen und visualisieren [Amann *et al*. 1995; Chadhuri et al. 2007; Hannig C *et al*. 2007a; Hannig C *et al*. 2010; Moter und Göbel 2000; Netuschil *et al*. 1996; Schreiber *et al*. 2010; von Ohle *et al*. 2010]. Bei Anwendung der Vitalfärbeverfahren scheinen die Färbeeigenschaften der Fluoreszenzfarbstoffe vom physiologischen Zustand der Bakterien abzuhängen [Barbesti *et al*. 2000; Berney *et al*. 2007]. Bakterien, die sich in einer

schnellen Wachstumsphase befinden und eine hohe Stoffwechselaktivität aufweisen, fluoreszieren intensiver als ruhende Zellen. Möglicherweise haben diese ruhenden Bakterien, bedingt durch die geringere Substratzufuhr und Veränderungen in der Zellmembran, eine höhere Resistenzeigenschaft und eine geringere Fluoreszenzneigung durch die erschwerte Zellpenetration [Donelli *et al*. 1998; Signoretto *et al*. 2002]. Die exakte Differenzierung der Zustandsstadien stellt daher nach wie vor eine große Herausforderung der modernen Mikrobiologie dar [Decker 2001; Hannig *et al.* 2010; C Lloyd und Hayes 1995; Mason *et al*. 1986].

2.3.2 Gängige Vitalfärbeverfahren

Es sind heute viele verschiedene Vitalfärbeverfahren (Live/Dead stain, Tot/Lebend-Färbung) zur Darstellung adhärenter Bakterien verfügbar [Hannig C *et al*. 2010]. Ihre Anwendung ermöglicht weitere Einblicke in den bakteriellen Biofilm [Arweiler *et al*. 2010; Arweiler *et al*. 2008; Arweiler *et al*. 2006; Decker 2001; Hannig C *et al*. 2010; Peeters *et al*. 2008]. Die Differenzierung des Vitalitätszustandes von Mikroorganismen wird durch unterschiedliche Kombinationen fluoreszierender Farbstoffe ermöglicht. Für die Darstellung vitaler Zellen findet häufig das Fluorogen Fluorescein-Diacetat (FDA) Anwendung. FDA ist farblos und fluoresziert erst nach intrazellulärer Verstoffwechslung zu Fluorescein. In der Zelle akkumuliert Fluorescein und emittiert grünes Licht [Guilbault und Kramer 1965; Peak et al. 2010]. Die enzymatische Umwandlung durch Esterasen setzt eine vitale Zelle voraus, die toten Zellen fluoreszieren nicht.

Im Gegensatz zu FDA, dessen schnelles Entweichen aus der Zelle Alternativfarbstoffe erfordert, scheint Carboxyfluorescein-Diacetat aufgrund seiner negativen Ladung länger in der Zelle zu akkumulieren [Leeder *et al*. 1989; Decker 2001]. Das Farbmolekül Calcein entsteht durch intrazelluläre enzymatische Abspaltung der Acetoxymethyl-Gruppe aus dem ursprünglichen Calcein AM. Calcein verbreitet sich in der ganzen Zelle einschließlich der Mitochondrien und dem Zellkern. Es hat die Eigenschaft, Calcium zu binden und fluoresziert intensiv grün [Liminga *et al*. 1999]. Andere Vitalfärbeverfahren basieren auf der Bindung an DNA oder RNA, wie zum Beispiel SYTO 17 und Syto 9 green mit der Fähigkeit, intakte Zellmembranen passiv zu penetrieren. Bei Akkumulation der Farbstoffe in Zellen mit beschädigter Membran erhöht sich die rote Fluoreszenz um den Faktor 1000. Es werden mit hoher Affinität die DNA und RNA lebender und toter eukaryotischer Zellen sowie auch

grampositiver und gramnegativer Bakterien angefärbt [Monis *et al*. 2005; Wlodkowic *et al*. 2008; Wojcik und Dobrucki 2008].

Ein gängiges Verfahren zur Anfärbung avitaler Mikroorganismen stellt Ethidiumbromid (Etbr) dar. Die Penetration der relativ großen Etbr-Moleküle durch beschädigte Zellmembranen basiert auf einer Interkalation in die DNA und lässt diese Zellen rot fluoreszieren [Cassina *et al*. 2010; Johnson *et al*. 2003; Monaco 2010]. Positive Ames-Tests deuten auf eine mutagene Wirkung des Farbstoffs hin [Ames *et al*. 1975]. Die ebenso in den Sicherheitsdatenblättern verschiedener Hersteller (Carl-Roth GmbH, AppliChem, Merck KgaA) dokumentierte Toxizität lenkte den Fokus auf die Untersuchung und Entwicklung alternativer Vitalfärbeverfahren [Hannig C *et al*. 2010; Wallis und Whittaker 1974]. Propidiumiodid (PI) ist als Vitalfarbstoff gegenüber Etbr überlegen und penetriert lediglich beschädigte Zellen, während Ethidiumbromid nach relativ kurzer Zeit auch Bakterien mit primär intakten Zellmembranen anfärbt [Dangl *et al*. 1982; Decker 2001]. Zudem weist PI als weiteren Vorteil eine geringere Polarität als Etbr auf und verfügt dadurch über eine höhere Affinität zur DNA [Beletsky und Umanski 1990; Lopez-Amoros *et al*. 1995]. Als weitere Alternative steht der modifizierte Ethidium-Homodimer-1-Farbstoff mit verbesserter DNA-Affinität und geringerer Zellpermeabilität zur Verfügung [Glazer *et al*. 1990]. Die in unterschiedlicher Farbe erhältlichen Varianten der SYTOX-Reihe basieren ebenfalls auf der DNA bzw. RNA-Färbung und penetrieren beschädigte Zellenmembranen. Die vitalen Bakterien sind von der Färbung ausgeschlossen [Roth *et al*. 1997; Ahmed *et al*. 2007].

Farbstoff		**Excitation λ (nm)**	**Emission λ (nm)**
DAPI		358	461
FDA	(Fluorescein-Diacetat)	490	515
CFDA	(5(6)-Carboxyfluorescein-Diacetat)	492	517
Calcein AM		485	520
Syto 9		485	498
TFDA	(4,5,6,7-Tetrachlorofluorescein-Diacetat)	515	536
PI	(Propidiumiodid)	535	617
Etbr	(Ethidiumbromid)	524	605
Sytox red		640	658
Cyanin		649	670

Tabelle 1: Excitations- und Emissionsmaxima gängiger Fluoreszenzfarbstoffe

Als klassisches Vitalfärbeverfahren dentaler Biofilme wurde erstmals von Netuschil *et al*. (1983) die Vitalfluoreszenzuntersuchung mit der Färbekombination FDA/Etbr beschrieben. Mit diesem Verfahren lassen sich vitale von avitalen Mikroorganismen differenzieren [Arweiler *et al*. 2010; Arweiler *et al*. 2008; Arweiler *et al*. 2006; Arweiler *et al*. 2002; Auschill *et al*. 2001; Ji und Ling 2007; Netuschil 1989]. Es werden zwei unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe, Fluorescein-Diacetat (FDA) und Ethidiumbromid (Etbr) verwendet, um die adhärenten Bakterien zu visualisieren. Mit FDA werden die vitalen Zellen dargestellt, während für die stoffwechselinaktiven, avitalen Zellen eine Gegenfärbung mit Ethidiumbromid notwendig ist. Die Farbinstabilität, die kurze Färbedauer und die Toxizität der Farbstoffe führte zur verstärkten Anwendung anderer Kombinationen [Decker 2001; Hannig *et al*. 2010].

Syto 9 und Propidiumiodid scheinen sich für die Darstellung oraler Streptokokkenstämme zu eignen [Weiger *et al*. 1999; Decker 2001]. Diese Kombination wird im BacLight Viability Kit verwendet. Da der Vitalfarbstoff Syto 9 green sowohl die vitalen als auch die avitalen Zellen penetriert und PI lediglich die avitalen Bakterien färbt, kann die präzise Auswertung der Daten zu Schwierigkeiten führen. Insbesondere die Färbeeigenschaften und Fluoreszenzintensität in Korrelation mit dem Vitalitätszustand der Bakterien ist nach wie vor eine Herausforderung [Barbesti *et al.* 2000; Berney *et al*. 2007].Während intakte Zellen eine intensive rote Fluoreszenz aufweisen, scheint der Nachweis vitaler Bakterien durch unterschiedliche Fluoreszenzintensitäten die Detektion zu erschweren [Berney *et al*. 2007; Christiansen *et al*. 2003]. In der Literatur gibt es bisher wenige Hinweise auf die Erprobung weiterer alternativer Vitalfärbe-Kombinationen zur Visualisierung adhärenter Mikroorganismen, die an *in situ* exponierten Schmelzproben durchgeführt und evaluiert worden sind. Um die neuen vorliegenden Fluoreszenzfarbstoffe, insbesondere an *in vivo* oder *in situ* gebildeten bakteriellen Biofilmen zu vergleichen, sind weiterführende Studien unerlässlich [Hannig C *et al*. 2010].

2.4 Fragestellung

Die Visualisierung und Quantifizierung adhärenter vitaler und avitaler Bakterien ist in der Mikrobiologie nach wie vor von großer Relevanz [Hannig C *et al*. 2010]. Um beispielsweise die Wirksamkeit oraler Therapeutika oder die Effizienz verschiedener Desinfektionen und Reinigungsverfahren zu überprüfen, sind verlässliche Methoden nötig, um die Vitalität adhärenter Bakterien auf *in situ* exponierten Proben zu untersuchen [Larsen *et al.* 2008].

Es sind heute viele verschiedene Vitalfluoreszenzverfahren verfügbar, von denen einige durch hohe Giftigkeit und andere durch Instabilität der Färbung gekennzeichnet sind [Decker 2001; Patel und Canuel 1976; Leeder *et al.* 1989; Shchyolkina und Borisova 1997]. In der vorliegenden Studie wurden daher verschiedene Verfahren und Vitalfärbekomponenten zur Visualisierung und Quantifizierung vitaler und avitaler adhärenter Mikroorganismen im initialen oralen Biofilm evaluiert. Ziel war es, verlässliche Nachweismethoden an die Gegebenheiten *in situ* exponierter Schmelzproben zu adaptieren. An bovinen Schmelzproben wurden die adhärenten Bakterien nach Vitalfärbung mit verschiedenen Verfahren epifluoreszenzmikroskopisch untersucht und mit Hilfe von Kulturverfahren verifiziert.

3 Material und Methoden

3.1 Versuchsplan

In der Studie wurden mit verschiedenen Vitalfärbeverfahren adhärente Mikroorganismen auf *in situ* exponierten Schmelzprüfkörpern quantifiziert. Aus zehn verschiedenen Vitalfärbekombinationen der Vorversuchsreihe für vitale und avitale Zellen (*Tab. 2*) wurden 5 Verfahren für die Hauptversuche ausgewählt. Als Auswahlkriterien galten die Differenzierbarkeit vitaler und avitaler Mikroorganismen, die Farbstabilität und der Aufwand der jeweiligen Verfahren (*Abb. 2*).

Lebend/aktiv	**Tot/inaktiv**
Syto 9	PI
FDA	Etbr
FDA	PI/Sytox red
CFDA	PI/Sytox red
TFDA	PI
Syto 9	Sytox red
Calcein AM	PI/Sytox red
PI = Propidiumiodid, FDA = Fluorescein-Diacetat, *CFDA = 5(6)-Carboxyfluorescein-Diacetat,* *TFDA = 4,5,6,7-Tetrachlorofluorescein-Diacetat*	

Tabelle 2: Farbkombinationen der Vorversuche. Die Vorversuche erfolgten an Prüfkörpern, die 60 min in der Mundhöhle getragen wurden.

Es stellten sich sechs gesunde Probanden zur Verfügung, auf individuell hergestellten Tiefziehschienen bovine Schmelzproben zu tragen. Die Prüfkörper wurden im Seitenzahnbereich bukkal im Oberkiefer auf der Schiene fixiert. Nach einer Tragedauer von 120 min wurden die Schmelzproben für 10 s mit 0,9%iger NaCl-Lösung abgespült und mit den Vitalfärbeverfahren evaluiert.

Insgesamt wurden in den Hauptversuchen fünf verschiedene Vitalfärbeverfahren in zwei Durchläufen untersucht Für jedes Verfahren wurden 2 Schmelzproben bukkal in der Mundhöhle exponiert. Zwei Prüfkörper jedes Durchlaufes wurden der ultraschallgestützten Desorption der Bakterien zugeführt, um die CFU als Referenz zu bestimmen (*Abb. 2*).

Bovine Schmelzproben (n = 84)

Desinfektion in NaOCl, Ethanol und aqua bidest. im Ultraschallbad, Lagerung in aqua bidest. bis zur Weiterbearbeitung

↓

Initiale Biofilmbildung

6 Probanden, 84 Schmelzproben, Schmelzprobenfixierung auf individuell hergestellten Schienen, bukkal im Oberkiefer, orale Exposition für 120 min, 2 Durchläufe je Proband,

10 s Waschen der Proben mit 0,9%iger NaCl-Lösung

↓ ↓

1. Durchlauf			*2. Durchlauf*			
Live/Dead Färbung: BacLight kit vital: Syto 9 avital: Propidium-iodid	Live/Dead Färbung: Fluorescein Diacetat/ Propidium-iodid	CFU aerob: CO anaerob: HCB	Live/Dead Färbung: Fluorescein Diacetat/ Sytox red	Live/Dead Färbung: Carboxy-fluorescein Diacetat/ Sytox red	Live/Dead Färbung: Calcein AM/ Sytox red	CFU aerob: CO anaerob: HCB

↓

Auswertung der Vitalfärbeverfahren unter dem Epifluoreszenzmikroskop und Auszählung der CFU je Agarplatte

↓

Umrechnen in Bakterienzahl/ cm^2

Abbildung 2:Versuchsplanung zur Quantifizierung von adhärenten Bakterien nach 120 min oraler Exposition mit 6 verschiedenen Verfahren bei 6 Probanden.
CO = Columbia-Blut-Agarplatte, HCB = Hefe-Cystein-Blutagarplatte

In den Hauptversuchen wurden als Vitalfärbeverfahren im ersten Durchlauf BacLight sowie die Färbung mit Fluorescein-Diacetat und Propidumiodid angewendet. Während des zweiten Durchlaufes wurden für die vitalen Mikroorganismen Fluorescein-Diacetat, Calcein AM und Carboxyfluorescein-Diacetat mit Sytox red für die avitalen Zellen kombiniert. Nach einer Tragezeit von 120 min und dem anschließenden Waschen mit einer NaCl-Lösung folgte die Einbettung der Proben in weichbleibendes Silikon (Gammasil Tec A 85 base) auf Objektträgern. Nach Zugabe der Färbungen und der Eindeckelung mit Deckgläsern und

Immersionsöl erfolgte die Auswertung mit Hilfe des Epifluoreszenzmikroskops. Die vitalen Bakterien fluoreszierten unter dem FDA-Filter grün, während die avitalen Bakterien durch die Anwendung des Ethidiumbromid-Filters rot dargestellt wurden.

Zur Auswertung der kolonie-bildenden Einheiten (CFU) wurden die Schmelzproben jeweils eine Minute lang im Ultraschallbad behandelt, bevor die Suspension in verschiedenen Verdünnungen auf Columbia-Blut (CO, aerob) bzw. Hefe-Cystein-Blutagarplatten (HCB, anaerob) ausplattiert wurde. Nach zwei (CO) bzw. fünf Tagen (HCB) wurden die Kolonien mit einem computergestützten Programm (Quantity One 4.5, Universal Hood) ausgezählt.

3.2 Materialliste

3.2.1 Geräte, Instrumente und Software

Axioskop II plus (ZEISS, Oberkochen, Deutschland)

AxioCam HRc (ZEISS, Oberkochen, Deutschland)

AxioVision 4.5 (Carl Zeiss Imaging Solutions GmbH)

Brutschrank Ehret Typ 3256 (Dipl. Ing. W. Ehret GmbH, Emmendingen, Deutschland)

Brutschrank HERAcell 150 CO2 Incubator (Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, Deutschland)

Computergestützte Software zur Auszählung der CFU: Quantity One 4.5 (GelDoc EQ Universal Hood) (BioRadLife Science Group, Hercules, USA)

Drigalskispatel (Karl Hecht KG, Sondheim, Deutschland)

Lichtfilter für Ethidiumbromid: Filtersatz 15 (BP 546/12, FT 580, LP 590) (ZEISS, Oberkochen, Deutschland)

Lichtfilter für FDA: Filtersatz 09 (BP 450-490, FT 510, LP 515) (ZEISS, Oberkochen, Deutschland)

Pipettenspitzen: Greiner (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland)

Schleifeinheit: Knuth-Rotor-3 (Struers, Willich, Deutschland)

Statistikprogramm SPSS 18.0 (SPSS GmbH Software)

Tiefziehgerät Erkopress (Erkodent, Erich Kopp GmbH, Pfalzgrafenweiler, Deutschland)

Ultraschallgerät Sonorex Digital 10p (Bandelin, Berlin, Deutschland)

Zahnärztliche Pinzette (HU-Friedy Europe, Leimen, Deutschland)

3.2.2 Chemikalien und Reagenzien

4,5,6,7-Tetrachlorofluorescein-Diacetat (TFDA) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)

5(6)-Carboxyfluorescein-Diacetat (CFDA) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)

Aceton (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Aqua ad injectabilia (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland)

Calcein AM (Fluka Analytical) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)

Columbia-Blut-Agarplatten (CO-Platten) (Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene des Universitätsklinikums Freiburg, Freiburg, Deutschland)

Ecotainer® NaCl 0,9% (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland)

Ethanol absolut) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)

Ethidiumbromid 1% (Etbr) (Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland)

Fluorescein-Diacetat (FDA) (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA)

Hefe-Cystein-Blut-Agarplatten (HCB-Platten) (Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene des Universitätsklinikums Freiburg, Freiburg, Deutschland)

LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit (Molecular Probes L7007) (Invitrogen Ltd., Paisley, United Kingdom)

Natriumhypochlorit 3% (Hedinger, Stuttgart, Deutschland)

Phosphatpuffer (PBS-Dulbecco) (Biochrom AG, Berlin, Deutschland)

Propidiumiodid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)

SYTO® Green-Fluorescent Nucleic Acid Stains (Molecular Probes SYTO® 9) (Invitrogen Ltd., Paisley, United Kingdom)

SYTOX® Red Dead Cell Stain (Molecular Probes) (Invitrogen Ltd., Paisley, United Kingdom)

Thymol (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)

3.2.3 Angesetzte Lösungen

Fluorescein-Diacetat (FDA) und Ethidiumbromid (Etbr):

FDA:	5 mg/ml Aceton, Lagerung bei 2-8°C mindestens 6 Monate haltbar
Etbr:	0,5 mg/ml NaCl, Lagerung bei +20°C unter Lichtabschluss mindestens 6 Monate haltbar

BacLight:

Invitrogen L7007 Bacterial Viability Kit

Component A:	Syto 9, 1,67 mM/Propidiumiodid, 1,67 mM, 300 µl DMSO
Component B:	Syto 9, 1,67 mM/Propidiumiodid, 18,3 mM, 300 µl DMSO Lagerung bei -20°C unter Lichtabschluss mindestens 1 Jahr haltbar

Fluorescein-Diacetat (FDA) und Propidiumiodid (PI):

FDA:	25 µl/ml Aceton, Lagerung bei 2-8°C mindestens 6 Monate haltbar
PI:	2,5 µl/ml NaCl, Lagerung der Propidiumiodid-Lösung bei 2-6°C unter Lichtabschluss mindestens 6 Monate haltbar

Calcein AM und Sytox red:

Calcein AM:	25 µl/ml Aceton, Lagerung bei -18°C, mindestens 1 Jahr haltbar
Sytox red:	5 nmol/ml NaCl, Lagerung bei -20°C unter Lichtabschluss mindestens 1 Jahr haltbar

Carboxyfluorescein-Diacetat (CFDA) und Sytox red:

CFDA:	25 µl/ml Aceton, Lagerung bei -20°C unter Lichtabschluss mindestens 6 Monate haltbar
Sytox red:	5 nmol/ml NaCl, Lagerung bei -20°C unter Lichtabschluss mindestens 1 Jahr haltbar

Fluorescein-Diacetat (FDA) und Sytox red:

FDA:	25 µl/ml Aceton, Lagerung bei 2-8°C mindestens 6 Monate haltbar
Sytox red:	5 nmol/ml NaCl, Lagerung bei -20°C unter Lichtabschluss mindestens 1 Jahr haltbar

Syto 9 green und Sytox red

Syto 9 green:	5 µmol/ml NaCl, Lagerung bei -20°C unter Lichtabschluss mindestens 1 Jahr haltbar
Sytox red:	5 nmol/ml NaCl, Lagerung bei -20°C unter Lichtabschluss mindestens 1 Jahr haltbar

4,5,6,7-Tetrachlorofluorescein-Diacetat (TFDA) und Propidiumiodid (PI):

TFDA:	25 µl/ml Aceton, Lagerung bei -20°C unter Lichtabschluss mindestens 6 Monate haltbar
PI:	2,5 µl/ml NaCl, Lagerung der Propidiumiodid Lösung, bei 2-6°C unter Lichtabschluss mindestens 6 Monate haltbar

Lagerung der Rinderzähne:

Thymol-Lösung (0,1%):	1 mg Thymol/1000 ml dest. H_2O, mindestens 1 Jahr haltbar

3.2.4 Weitere Versuchsmaterialien

Aquasil Ultra (Dentsply DeTray GmbH, Konstanz, Deutschland)

BBL GasPak Anaerobic System Envelopes (Becton Dickinson, New Jersey, USA)

Ceram X Mono (Dentsply DeTray GmbH, Konstanz, Deutschland)

Deckgläser (Bresser Optics, Cornwall, United Kingdom)

Immersionsöl (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)

Nitra-Tex Handschuhe (Ansell Healthcare Europe NV, Brüssel, Belgien)

Objektträger (R. Langenbrick, Teningen, Deutschland)

Präzisionwischtücher (Kimberly-Clark Professional, Kent, United Kingdom)

Safe-lock tubes 1,5 ml (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)

Schleifpapier, Körnung: 600, 1000, 1200, 2400, 4000 FEPA P (Struers-GmbH, Erkrath, Deutschland)

Sekundenkleber, Loctite 401 (Loctite Deutschland GmbH, München, Deutschland)

Silikon: Gammasil Tec A 85 base (Müller-Omicron GmbH & Co. KG, Lindlar, Deutschland)

Tiefziehfolie Erkodur 1,5 mm (Erkodent, Erich Kopp GmbH, Pfalzgrafenweiler, Deutschland)

Trepanbohrer mit innerem Durchmesser von 5 mm, Spezialanfertigung (Gebr. Brasseler GmbH & Co. KG, Lemgo, Deutschland)

3.3 Probanden

Es nahmen sechs gesunde, weibliche (2) und männliche (4) Probanden im Alter von 24-27 Jahren an der Studie teil. Durch die Anamnese der Probanden wurden zu Beginn Schwangerschaft, Nikotinkonsum und Allgemeinerkrankungen ausgeschlossen. Im Anschluss wurde eine visuelle zahnmedizinische Untersuchung durchgeführt. Bei keinem der Probanden konnten unversorgte kariöse Läsionen oder Parodontopathien diagnostiziert werden.

An den Versuchstagen sollten die Probanden ihre Zähne lediglich mit Wasser reinigen und auf den Gebrauch von Zahnpasta verzichten, um eine standardisierte Pellikelbildung und

initiale bakterielle Adhärenz auf den Proben sicherzustellen. Die Einnahme von Mahlzeiten war während der Tragedauer der individuellen Schienen sowie 1h vor Beginn der Versuchsreihen untersagt, das Trinken von Wasser hingegen war zulässig. Positive Voten der Ethikkomission der Universität Freiburg lagen vor (Antrag: #222/08, #239/09).

3.4 Probekörper

Die Schmelzproben wurden aus extrahierten bovinen BSE-negativen Unterkieferfrontzähnen aus dem Schlachthof in Freiburg gewonnen. Nach der Extraktion wurden die Zähne bis zur weiteren Bearbeitung in 0,1%iger Thymol-Lösung gelagert. Mit Hilfe eines diamantierten Trepanbohrers (Innendurchmesser 5 mm) wurden anschließend runde Schmelzproben aus den Facialflächen der Zahnkronen herauspräpariert und unter Wasserkühlung mit Schleifpapier bis zur Körnung 1200 FEPA P geschliffen. Die Schmelzseite wurde anschließend sukzessiv bis 4000 FEPA P finiert.

Zur Desinfektion und Reinigung wurden die Schmelzproben einen Tag vor der oralen Exposition im Ultraschallbad mit verschiedenen Lösungen aufbereitet.

Die Reinigung erfolgte 2 min mit 3%igem Natriumhypochlorit im Ultraschallbad. Danach wurden die Schmelzproben für weitere 3 min mit einer 70%igen Ethanollösung im Ultraschallbad desinfiziert. Abschließend erfolgte eine ultraschallgestützte Reinigung für 10 min in aqua bidest.. Um die Ausbildung einer Hydrathülle zu ermöglichen, wurden die Proben anschließend bis zur oralen Anwendung über 24 h in einer frischen aqua bidest.-Lösung gelagert.

3.5 Orale Exposition

Die Schmelzproben wurden von den Probanden auf individuell hergestellten Tiefziehschienen (Erkodur 1,5 mm) im Oberkiefer getragen (*Abb. 3*). Um eine möglichst einheitliche Pellikelbildung auf dem Schmelz zu gewährleisten, haben die Probanden während der Tragezeit auf Nahrungsverzehr verzichtet.

Die Schmelzproben wurden auf Höhe der Molaren bzw. Prämolaren bukkal im Oberkiefer mit Hilfe von dünnfließendem Silikon so befestigt, dass eine bakterielle Adhärenz lediglich auf der Schmelzoberfläche möglich war. Die Schmelzprobenränder sowie die Unterseiten wurden durch das Silikon vollständig abgedeckt. In den Vorversuchen wurden die Schmelzproben 60

min getragen, in der Hauptversuchsreihe 120 min. Nach der Tragezeit und der Ausbildung des Biofilms auf den Schmelzprüfkörpern wurden diese mit einer zahnärztlichen Pinzette und einer Sonde vorsichtig von der Schiene entfernt und anschließend den weiteren Untersuchungen zugeführt.

Abbildung 3: Individuelle Oberkiefer-Tiefziehschiene mit (a, b) und ohne (c) fixierte Rinderschmelzproben. Für jedes Verfahren wurden 2 Proben für die orale Exposition an der Schiene befestigt. Im 1. Durchlauf wurden 3 Proben je Seite bukkal und im 2. Durchlauf jeweils 4 Schmelzproben bukkal befestigt. Nach oraler Exposition konnten Probenpaare en-bloc inklusive Befestigungssilikon (d) abgenommen werden.

3.6 Verfahren zur Visualisierung von adhärenten Mikroorganismen

In den Vorversuchen wurden für alle Vitalfärbungen zwei unterschiedliche Verfahren für die Vorbereitung der *in situ* exponierten Schmelzproben untersucht. Nach Exposition und Waschung wurde die Hälfte der Proben für 5-15 min in der zu untersuchenden Färbelösung unter Lichtabschluß inkubiert. Anschließend wurden die Proben durch eine Spülung mit Kochsalzlösung von überschüssigen Farbkomponenten gereinigt und mittels Sekundenkleber auf einem Objektträger befestigt. Nach Eindeckelung mit einem Deckglas und Immersionsöl erfolgte die Auswertung unter dem Mikroskop.

Die übrigen Proben wurden mit weichbleibendem Silikon auf einem Objektträger befestigt (*Abb. 4*). Die Färbelösung wurde anschließend auf die Schmelzoberfläche pipettiert, eingedeckelt und mit Immersionsöl unter dem Mikroskop untersucht. Für die Hauptversuche wurde ausschließlich die Vorbereitung mittels Silikonkittung durchgeführt.

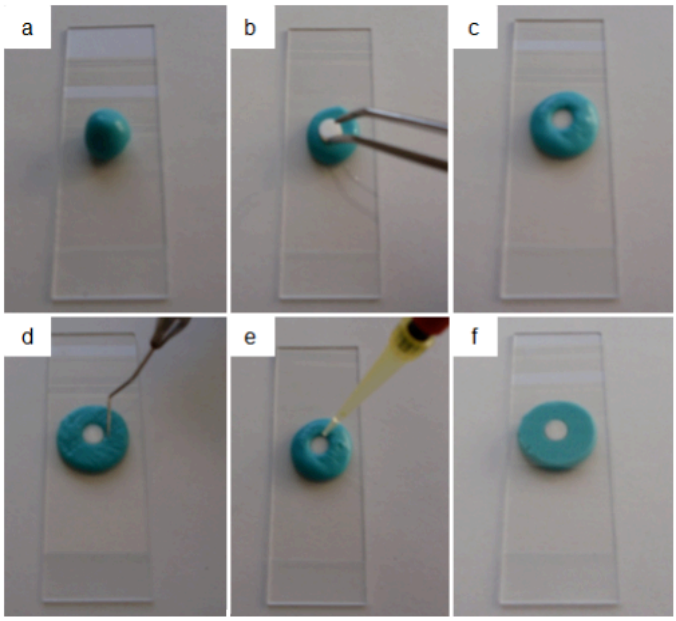

Abbildung 4: Vorbereitung der in situ exponierten Schmelzproben mittels Silikonkittung. Auf einen Objektträger wird weichbleibendes Silikon aufgebracht (a). Nach Waschen der exponierten Probekörper folgt die vorsichtige Einbettung in das Silikon (b). Die Schmelzoberfläche bildet eine Kavität, während die Silikonränder eine Abdichtung für die Färbelösung bilden (c, d, e). Nach Einfärbung (e) und Eindeckelung mit einem Deckglas (f) folgt die mikroskopische Auswertung.

3.6.1 Prinzipielle Vorbereitung und Auswertung der Proben bei allen Vitalfärbeverfahren

Für alle Live/Dead-Verfahren wurden die Proben mit Silikon auf den Objektträgern eingebettet und nach den individuellen Färbungen epifluoreszenzmikroskopisch ausgewertet. Um die Probekörper nach der oralen Exposition von Speichelrückständen zu reinigen, wurden die Proben zunächst aus 20 cm Abstand 10 s lang mit 0,9%iger NaCl-Lösung aus einer Spritzflasche abgespült. Im Anschluss wurden die Proben mit einer kleinen Menge weichbleibendem Silikon (Gammasil Tec A 85 base) auf Objektträgern befestigt (*Abb. 4*). Dadurch wurde die Schmelzprobenoberfläche dargestellt, während die Rückseite und Ränder

der Proben mit Silikon verdeckt wurden. Bei den Hauptversuchen wurden die Live/Dead-Färbungen (FDA/Sytox red, FDA/PI, Syto 9/PI, Calcein AM/Sytox red, CFDA/Sytox red) auf die Schmelzoberfläche pipettiert, bzw. die Schmelzproben bei dem BacLight Verfahren 10 min lang vor der Silikoneinbettung in der Färbung eingelegt und anschließend eingedeckelt.

Die Auszählung der vitalen bzw. avitalen Zellen war unter dem Epifluoreszenzmikroskop möglich. Unter dem FDA-Filter wurden bei 1000facher Vergrößerung die grün erscheinenden vitalen Bakterien ausgezählt, während der Etbr-Filter Aufschluss über die avitalen rot fluoreszierenden Zellen gab. Anhand eines Rasterfeldes (0,0156 cm^2) konnte die Bakterienzahl/cm^2 nach der Auszählung bestimmt werden. Für beide Vitalitätszustände wurden mindestens zehn Felder ausgezählt.

3.6.2 Fluorescein-Diacetat und Sytox red

Prinzip

Lebende Zellen sind in der Lage, Fluorescein-Diacetat, das in die Zelle diffundiert, zu fluoreszierendem Fluorescein zu hydrolysieren [Breeuwer *et al*. 1995; Guilbault und Kramer 1965]. Unter dem FDA-Filter des Epifluoreszenzmikroskops erscheinen diese vitalen Zellen grün (Excitation 490 nm, Emission 515 nm) [Breeuwer *et al*.1995]. Sytox red dringt in zerstörte Zellmembranen ein und bindet an DNA. Nach kurzer Inkubationszeit fluoresziert es unter dem Mikroskop bei Verwendung des Etbr-Filters leuchtend rot (Excitation 640 nm, Emission 658 nm). Da der Fluoreszenzfarbstoff lediglich durch zerstörte Membranen penetriert, werden nur avitale Zellen angefärbt, während die stoffwechselaktiven, vitalen Zellen für Sytox red nicht permeabel sind [Ahmed *et al*. 2007].

Durchführung

Die Färbelösung wurde während der oralen Exposition der Schmelzproben vorbereitet. Für eine FDA-Stammlösung von 25 µl/ml wurden 25 mg des FDA-Pulvers in 10 ml Aceton aufgelöst und anschließend 1µl der Vorverdünnung zu 99 µl 0,9%iger NaCl-Lösung pipettiert.

Das kühl gelagerte Sytox red wurde an den Versuchstagen auf Zimmertemperatur erwärmt und zu einer Stammlösung von 5 nmol/ml verdünnt. Hierzu wurden 1 µl Sytox red mit 1000 µl 0,9%iger NaCl-Lösung verdünnt. Für die Vitalfluoreszenzfärbelösung wurden gleiche

Volumina beider Stammlösungen in ein steriles Eppendorfgefäß pipettiert. Nachdem die oral exponierten Schmelzproben mit Kochsalzlösung abgewaschen und in weichbleibendes Silikon eingebettet worden waren, erfolgte die Färbung mit 5 µl der angesetzten Lösung. Die Proben wurden nach Zugabe von einem Tropfen Immersionsöl unter dem Mikroskop ausgewertet.

Auswertung

Die Auszählung der vitalen bzw. avitalen Zellen war unter dem Epifluoreszenzmikroskop möglich. Unter dem FDA-Filter wurden bei 1000facher Vergrößerung die grün erscheinenden, vitalen Bakterien ausgezählt, während der Ethidiumbromid-Filter Aufschluss über die avitalen rot leuchtenden Zellen gab.

3.6.3 Fluorescein-Diacetat und Propidiumiodid

Prinzip

Bei diesem Verfahren werden die vitalen Zellen mit Fluorescein-Diacetat (FDA) angefärbt und die avitalen mit Propidiumiodid (PI). Lebende Zellen sind stoffwechselaktiv und setzen FDA durch Esterasen der Zellmembran zu einem grün fluoreszierenden Produkt um (Excitation 490 nm, Emission 515 nm) [Breeuwer et al.1995]. Bei nekrotischen oder toten Zellen ist die Membran permeabler, PI-Moleküle dringen in die Zelle ein und binden an DNA und RNA der Zelle und färben diese rot-orange (Excitation 535 nm, Emission 617 nm). Das Propidiumiodid-Molekül hat durch die geringe Polarität eine besonders hohe Affinität zu DNA [Beletsky und Umansky, 1990; Lopez-Amoros *et al*. 1995].

Durchführung

Um eine FDA-Konzentration von 25 µl/ml Aceton zu erhalten, wurde zunächst eine Stammlösung mit einer FDA-Konzentration von 5 mg/ml Aceton hergestellt. Hierzu wurden 10 mg FDA abgewogen und in 2 ml Aceton aufgelöst. Anschließend wurde die Stammlösung mit NaCl auf 25 µl/ml weiter verdünnt. Für die Propidiumiodid-Stammlösung wurden 2,5 mg Propidiumiodid in 1 ml 0,9%iger NaCl-Lösung gegeben. 1 µl dieser Lösung wurde anschließend mit 999 µl 0,9%iger NaCl verdünnt, um die Endkonzentration von 2,5 µl/ml

NaCl zu erreichen. Nach der Silikonkittung wurde eine Mischung aus gleichen Volumina beider Stammlösungen auf die Schmelzproben pipettiert (*Abb. 4e*).

Auswertung

Nach der Präparation der Schmelzprüfkörper mit der Vitalfluoreszenzfärbung wurden die Proben unter dem Epifluoreszenzmikroskop bei 1000facher Vergrößerung ausgezählt. Die vitalen Zellen waren unter dem FDA-Filter leuchtend grün erkennbar, die toten Bakterien unter dem Ethidiumbromid-Filter rot-orange.

3.6.4 BacLight

Prinzip

Das LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit enthält zwei Nukleinsäure Farbstoffe, das grün fluoreszierende Syto 9 green und das rot fluoreszierende Propidiumiodid. Diese Farbstoffe unterscheiden sich in ihrer Eigenschaft, vitale Bakterienzellen zu penetrieren. Syto 9 färbt vitale und avitale Zellen, während Propidiumiodid nur die Bakterien mit zerstörter Membran durchdringen kann und dort die Wirkung des fluoreszierenden Syto 9 aufhebt, bzw. überlagert [Peeters *et al*. 2008, Berney *et al*. 2007]. Die gering geladenen PI-Moleküle haben eine hohe Affinität zur DNA und können länger in den avitalen Zellen akkumulieren [Beletsky und Umansky 1990; Lopez-Amoros *et al*. 1995]. Die vitalen Bakterien fluoreszieren grün (Excitation 485 nm, Emission 498 nm), während die toten Bakterien mit zerstörter Membran rot fluoreszieren (Excitation 535 nm, Emission 617 nm).

Durchführung

Die im Bacterial Viability Kit zur Verfügung gestellten Komponenten A und B (L7007 Component A: Syto9 1,67 mM/ Propidiumiodid 1,67 mM; Component B: Syto 9 dye 1,67 mM/ Propidiumiodid 18,3 mM) wurden zu gleichen Teilen in einem sterilen Eppendorfgefäß miteinander gemischt und gevortext. Anschließend wurden 2 µl der Mischung zu 1 ml 0,9%iger NaCl-Lösung pipettiert. Die getragenen Schmelzproben wurden von der Schiene gelöst und nach kurzem Abwaschen mit einer NaCl-Lösung in der angesetzten Färbelösung für 10 min unter Lichtabschluss inkubiert. Im Gegensatz zu den anderen Vitalfärbeverfahren verblieb die Färbelösung während der Auswertung nicht zwischen der Schmelzoberfläche und

dem Deckgläschen, sondern wurde wieder mit 0,9%iger NaCl-Lösung nach der Inkubationszeit abgewaschen. Ein spezielles Immersionsöl (Component C: BacLight mounting oil) des Viability Kits wurde vor der Auszählung auf das Deckgläschen hinzugefügt.

Auswertung

Mit dem FDA-Filter wurden die vitalen Zellen neongrün dargestellt. Die avitalen Zellen fluoreszierten unter dem Ethidiumbromid-Filter leuchtend rot.

3.6.5 Calcein AM und Sytox red

Prinzip

Calcein AM dringt durch die Zellmembran in vitale Zellen ein, wo die Acetoxymethyl-Gruppe enzymatisch durch Esterasen abgespalten wird. Das hierdurch entstehende Calcein verbreitet sich in der ganzen Zelle einschließlich der Mitochondrien und des Zellkernes. Intrazellulär ist Calcein in der Lage, Calcium zu binden und führt damit zu einer leuchtend grünen Fluoreszenz (Excitation 485 nm, Emission 520 nm) [Ahmed *et al*. 2007; Liminga *et al*. 1999]. Sytox red penetriert die Membranen zerstörter Zellen und bindet an DNA. Nach kurzer Inkubation fluoresziert es unter dem Etbr-Filter rot (Excitation 640 nm, Emission 658 nm) [Ahmed *et al*. 2007].

Durchführung

Zu Beginn der Versuchsreihen wurde eine Calcein AM-Vorverdünnung hergestellt, indem 1 mg Calcein AM mit 1 ml Aceton vermischt wurde. Für die Färbungen wurden 25 µl der Vorverdünnung mit 925 µl 0,9%iger NaCl-Lösung zu einer 25 µl/ml Färbelösung vermischt. Als Farbstoff für die avitalen Zellen wurde hier ebenfalls Sytox red verwendet. Nach der Erwärmung auf Zimmertemperatur wurde 1 µl Sytox red zu 1000 µl 0,9%iger NaCl-Lösung pipettiert (Endkonzentration 5 nmol/ml). Anschließend wurden je 5 µl beider Färbelösungen in ein steriles Eppendorfgefäß gegeben und luftdicht verschlossen. Nach der Einkittung in Silikon wurden 5 µl der Färbung auf die Schmelzproben pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten waren die Proben für die mikroskopische Auswertung vorbereitet.

Auswertung

Unter dem Epifluoreszenzmikroskop wurden die vitalen Zellen mit dem FDA-Filter hellgrün dargestellt. Die avitalen Zellen fluoreszierten unter dem FDA-Filter hellrot bis orange und unter dem Ethidiumbromid-Filter rot.

3.6.6 Carboxyfluorescein-Diacetat und Sytox red

Prinzip

Unspezifische intrazelluläre Esterasen hydrolysieren das durch die Zellmembran penetrierte Carboxyfluorescein-Diacetat zu fluoreszierendem Carboxyfluorescein. Im Gegensatz zum Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein enthält Carboxyfluorescein mehr negative Ladungen, die einen länger anhaltenden Verbleib in den vitalen Zellen gewährleisten [Sellers *et al*. 1994]. Aufgrund der notwendigen Hydrolyse durch Esterasen findet dieser Vorgang nur in stoffwechselaktiven Zellen statt. Angefärbte Zellen emittieren grünes Licht (Excitation 492 nm, Emission 517 nm). Die avitalen Zellen mit zerstörter Zellmembran werden durch den Fluoreszenzfarbstoff Sytox red penetriert. Sytox red bindet an DNA und fluoresziert unter dem Ethidiumbromid-Filter rot (Excitation 640 nm, Emission 658 nm) [Ahmed *et al*. 2007].

Durchführung

Analog zum Vitalfärbeverfahren mit Fluorescein-Diacetat und Sytox red wird auch hier mit einer Carboxyfluorescein-Diacetat-Konzentration von 25 µl/ml gearbeitet. Alle Versuchsreihen mit CFDA wurden aus einer Stammlösung erstellt. Zu diesem Zweck wurden 10 mg CFDA in 1 ml Aceton aufgelöst. Von dieser Stammlösung wurden 3 µl zu 997 µl 0,9%iger NaCl-Lösung pipettiert. Für die Färbung der avitalen Zellen wurde 1 µl Sytox red in 1000 µl NaCl-Lösung zu einer Konzentration von 5 nmol/ml vermischt. Beide Färbelösungen wurden zu gleichen Teilen vermischt und bei Raumtemperatur in einem Eppendorfgefäß gelagert. Nach der Silikonkittung wurden die oral exponierten Schmelzproben mit 5 µl der Färbung inkubiert und für die Auswertung unter dem Epifluoreszenzmikroskop eingedeckelt.

Auswertung

Unter dem FDA-Filter fluoreszierten die vitalen Zellen neongrün, die avitalen unter dem Ethidiumbromid-Filter leuchtend rot.

3.6.7 Carboxyfluorescein-Diacetat und Propidiumiodid

Prinzip

Carboxyfluorescein-Diacetat Moleküle diffundieren passiv in die Zellen [Breeuwer *et al*. 1995]. In der Zelle erfolgt eine Hydrolyse durch unspezifische Esterasen und das grün fluoreszierende Carboxyfluorescein wird akkumuliert (Excitation 492 nm, Emission 517 nm). Zellen mit zerstörter Zellmembran werden von Propidiumiodid penetriert. Die PI-Moleküle binden an DNA und RNA und fluoreszieren rot (Excitation 535 nm, Emission 617 nm) [Davey und Hexley 2011; Peeters *et al*. 2008].

Durchführung

Für die Herstellung der Färbelösungen wurden 3 µl der Carboxyfluorescein-Diacetat Stammlösung (10 mg/ml Aceton) zu 997 µl 0,9%iger NaCl-Lösung pipettiert.

Um eine Propidiumiodid-Konzentration von 2,5 µl/ml zu erhalten, wurden zunächst 2,5 mg Propidiumiodid in 1 ml 0,9%iger NaCl-Lösung pipettiert. Im Anschluss wurde 1 µl dieser Lösung mit 999 µl 0,9%iger NaCl verdünnt. Gleiche Volumina beider Vitalfärbungen wurden in ein steriles Eppendorfgefäß pipettiert und bei Raumtemperatur unter Lichtabschluss bis zur Anwendung gelagert.

Auswertung

Unter dem FDA-Filter des Epifluoreszenzmikroskops erschienen die vitalen Bakterien grün. Die avitalen Zellen fluoreszierten unter dem Ethidiumbromid-Filter hellrot.

3.6.8 4,5,6,7-Tetrachlorofluorescein-Diacetat und Propidiumiodid

Prinzip

Der Fluoreszenzfarbstoff Tetrachlorofluorescein-Diacetat (TFDA) penetriert vitale Zellen. Die angefärbten Zellen emittieren grünes Licht (Excitation 515 nm, Emission 536 nm). Propidiumiodid dringt durch zerstörte Membranen von Zellen und bindet dort an DNA und RNA [Davey und Hexley 2011; Peeters *et al*. 2008]. Unter dem Ethidiumbromid-Filter des Epifluoreszenzmikroskops fluoreszieren die durch PI angefärbten Zellen rot (Excitation 535 nm, Emission 617 nm).

Durchführung

Es wurde eine TFDA-Stammlösung (25 mg/ml Aceton) hergestellt, ausgiebig gevortext und für 3 min im Ultraschallbad behandelt. Im Anschluss wurde 1 µl der Stammlösung zu 999 µl 0,9%iger NaCl-Lösung pipettiert (25 µl/ml). Für die Propidiumiodid-Stammlösung wurden 2,5 mg Propidiumiodid in 1 ml 0,9%iger NaCl-Lösung pipettiert. 1 µl dieser Lösung wurde anschließend mit 999 µl 0,9%iger NaCl verdünnt (2,5 µl/ml NaCl). Nach der Probeneinkittung in Silikon wurde eine Mischung aus gleichen Volumina beider Stammlösungen auf die Proben pipettiert.

Auswertung

TFDA färbt die vitalen Zellen grün. Im Hintergrund fluoreszierten viele Farbpartikel mit. Die avitalen Zellen wurden durch Propidiumiodid hellrot gefärbt. Die Live/Dead Auswertung erfolgte mit dem FDA-Filter für die vitalen und dem Ethidiumbromid-Filter für die avitalen Bakterien.

3.6.9 Calcein AM und Propidiumiodid

Prinzip

Calcein AM durchdringt die Zellmembranen vitaler Zellen und wird dort durch enzymatische Abspaltung der Acetoxymethyl-Gruppen zum Calcium-bindenden Calcein. Calcein fluoresziert in vitalen Zellen grün (Excitation 485 nm, Emission 520 nm) [Ahmed *et al*. 2007; Liminga et al.1999]. Die Zellmembranen zerstörter oder nekrotischer Zellen sind permeabler und akkumulieren den Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid. In der Zelle bindet PI an DNA und RNA und färbt diese rot-orange (Excitation 535 nm, Emission 617 nm) [Davey und Hexley 2011; Beletsky und Umansky 1990; Lopez-Amoros *et al*. 1995].

Durchführung

Für die Herstellung der Calcein AM Färbelösung wurden 25 µl der bei -20°C im Kühlschrank gelagerten Stammlösung (1 mg Calcein AM in 1 ml Aceton) mit 925 µl NaCl vermischt. Für die Propidiumiodid-Färbung der avitalen Zellen wurde 1 µl der Stammlösung (2,5 mg/ml NaCl) mit 999 µl 0,9%iger NaCl verdünnt. Die gleichen Volumina beider Färbungen wurden in einem Eppendorfgefäß gevortext und anschließend auf die oral exponierten Schmelzproben pipettiert (5 µl je Schmelzprobe).

Auswertung

Die vitalen Zellen wurden unter dem FDA-Filter grün dargestellt, während die PI-gefärbten avitalen Zellen rot erschienen (Ethidiumbromid-Filter). Es war eine schnelle Auszählung erforderlich, da die Farbstabilität geringer war als bei den anderen Live/Dead Verfahren.

3.6.10 Syto 9 green und Sytox red

Prinzip

Bei Syto 9 handelt es sich um ein relativ kleines Molekül, das vitale und avitale Zellen markiert (Excitation 485 nm, Emission 498 nm) [Decker 2001; Peeters *et al*. 2008; Jefferson *et al*. 2005], während Sytox red nur zerstörte Zellmembranen penetriert und an die DNA bindet. Nach kurzer Inkubationszeit fluoresziert es unter dem Mikroskop bei Verwendung des Etbr-Filters leuchtend rot (Excitation 640 nm, Emission 658 nm). [Ahmed *et al*. 2007; Monis *et al*. 2005].

Durchführung

An den Versuchstagen wurden die bei -20° C gelagerten Fluoreszenzfarbstoffe Syto 9 green sowie Sytox red auf Zimmertemperatur erwärmt. Syto 9 green wurde anschließend für 30 s zentrifugiert, um die darin enthaltene DMSO-Lösung von der Färbung zu trennen. Um eine Konzentration von 5 nmol/ml zu erhalten, wurde 1 µl der Syto 9 green Lösung in ein Eppendorfgefäß zu 1 ml NaCl pipettiert.

Für die avitalen Zellen wurden 1 µl der Sytox red Lösung mit 1000 µl NaCl vermischt, um die empfohlene Konzentration von 5 nmol/ml zu erhalten [Roth *et al*. 1997; Ahmed *et al*. 2007]. Beide Fluoreszenzfarblösungen wurden im Anschluss zu gleichen Teilen vermischt und auf die in Silikon gekitteten Schmelzproben pipettiert.

Auswertung

Die mit Syto 9 green behandelten Zellen wurden unter dem FDA-Filter leuchtend grün dargestellt und unter dem Ethidiumbromid-Filter neonrot. Die Differenzierung vitaler und avitaler Zellen war somit kaum möglich.

3.6.11 Fluorescein-Diacetat und Ethidiumbromid

Prinzip

Fluorescein-Diacetat wird in vitalen Zellen durch Esterasen der Zellmembran zum grün fluoreszierenden Fluorescein umgewandelt (Excitation 490 nm, Emission 515 nm) [Breeuwer et al.1995]. Da der Fluoreszenzfarbstoff schnell wieder aus der Zelle entweicht, zeigt die FDA-Färbung nur eine geringe Stabilität [Leeder *et al*. 1989; Decker 2001]. Ethidiumbromid färbt avitale und zum Teil vitale Mikroorganismen unter dem Epifluoreszenzmikroskop rot (Excitation 524 nm, Emission 605 nm) [Dangl *et al*. 1982; Decker 2001].

Durchführung

Für die FDA-Stammlösung wurden 10 mg FDA in 2 ml Aceton gelöst (5 mg/ml). Für die Färbung der avitalen Zellen wurde zunächst eine Ethidiumbromidvorverdünnung mit 50 µl der 1%igen Ethidiumbromidlösung und 950 µl NaCl hergestellt. Für die Vitalfluoreszenzlösung wurden anschließend je 5 µl der FDA-Stammlösung und der Ethidiumbromidvorverdünnung zu 1 ml 0,9%iger NaCl-Lösung pipettiert und gevortext.

Auswertung

Die vitalen Zellen fluoreszierten unter dem FDA-Filter grün, während die avitalen Zellen unter dem Ethidiumbromid-Filter orange-rotes Licht emittierten.

3.7 Bestimmung der kolonie-bildenden Einheiten

Prinzip

Eine klassische Methode zur Quantifizierung von Bakterien ist die Erfassung der kolonie-bildenden Einheiten (CFU). Dafür werden die Mikroorganismen in einer Suspension gleichmäßig auf ein Nährmedium ausplattiert und anschließend unter speziellen Brutverhältnissen kultiviert. Dabei kann eine Kolonie entweder aus einer einzelnen Bakterienzelle entstehen oder durch mehrere nah aneinander liegende Zellen auf dem Nährmedium. Bedingt durch die enge räumliche Nähe können sich die Bakterien zusammenlagern und in einer gemeinsamen Kolonie heranreifen. Als Nährmedium wurden Columbia- (CO, aerob) bzw. Hefe-Cystein-Blutagarplatten (HCB, anaerob) verwendet.

Während die aeroben und fakultativ aeroben Bakterien auf CO-Platten unter aeroben Bedinungen mit 5% CO_2-Atmosphäre zu Kolonien heranreifen, werden die anaeroben Bakterien in einer sauerstoffreduzierten, kohlenstoffdioxidreichen Brutkammer auf HCB-Platten inkubiert.

Durchführung

Die Schmelzproben wurden so auf der Tiefziehschiene fixiert, dass die Ränder und die Rückseite der Proben vollständig durch das Silikon abgedeckt wurden. Dadurch wurde sichergestellt, dass nur die adhärenten Bakterien auf der Schmelzoberfläche ermittelt wurden.

Nach der oralen Inkubation der Proben wurden diese vorsichtig aus der Schiene entnommen und mit 0,9% NaCl-Lösung abgespült und jeweils in ein steriles Eppendorfgefäß mit 1 ml steriler NaCl-Lösung überführt. Anschließend erfolgte die Desorption der Mikroorganismen von den Proben für 1 min im Ultraschallbad unter Eiskühlung. Die Suspension wurde auf 10^1, 10^2 und 10^3 mit 0,9%iger NaCl-Lösung weiterverdünnt und vorsichtig gevortext. Mithilfe von sterilen Drigalskispateln wurden je 100 µl der Verdünnungsreihen gleichmässig auf Columbia-Blutagarplatten (CO, aerob) und 100 µl auf Hefe-Cystein-Blutagarplatten (HCB, anaerob) verteilt. Die CO Platten wurden für 2 Tage in einem Brutschrank (HERAcell 150 CO_2 Incubator) bis zur Auswertung inkubiert. Die HCB-Platten wurden 5 Tage mit CO_2-Paks (BBL GasPak Anaerobic System Envelopes) zur Bildung einer sauerstoffarmen, kohlenstoffdioxidreichen Atmosphäre in einer Kammer bebrütet.

Auswertung

Nach Ablauf der Kultivierungszeit in den Brutschränken wurden die ausgebildeten Kolonien auf den Agarplatten ausgezählt. Bei niedrigen Verdünnungen wurde die Bakterienzahl mithilfe eines computergestützten Programms ermittelt (Quantity One, Universal Hood). Um die Kolonien anschließend in die Bakterienzahl/cm^2 umzurechnen, wurde die Anzahl der Kolonien pro Agarplatte unter Berücksichtigung der jeweiligen Verdünnung durch die Oberfläche der Proben dividiert (0,196 cm^2).

3.8 Statistik

Die statistische Auswertung wurde mittels einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) und dem Tukey-Test durchgeführt. Der Tukey-Test erlaubte einen paarweisen Vergleich (Signifikanzlevel $p \leq 0,05$). Ferner wurde zusätzlich der nichtparametrische Kuskal-Wallis-Test durchgeführt (Signifikanzlevel $p \leq 0,05$). Alle statistischen Analysen erfolgten mithilfe der Software PASW Statistics 18.

4 Ergebnisse

Die Visualisierung und Quantifizierung der Mikroorganismen durch die Fluoreszenzfärbeverfahren und kolonie-bildenden Einheiten wurde ausschließlich an *in situ* exponierten Schmelzproben durchgeführt.

Dabei konnte unabhängig vom Verfahren eine hohe intraindividuelle und interindividuelle Variabilität der Mikroorganismen beobachtet werden. Die Bestimmung der Gesamtbakterienzahl anhand der kolonie-bildenden Einheiten (CFU) weist keine Korrelation mit den Ergebnissen der Vitalfärbeverfahren auf. Die verschiedenen Vitalfärbeverfahren zeigen im Vergleich miteinander ähnliche Resultate.

Zum Vergleich der verschiedenen Vitalfärbeverfahren wurden daher die Parameter Farbstabilität, Abbildungsqualität unter dem Mikroskop sowie auch die Differenzierbarkeit der vitalen und avitalen Bakterien und die allgemeinen Vorbereitungskriterien berücksichtigt.

4.1 Charakteristika verschiedener Kombinationen von Vitalfluoreszenzfarbstoffen

4.1.1 Fluorescein-Diacetat/Sytox red

Das intrazellulär zu Fluorescein umgewandelte Fluorescein-Diacetat färbt die vitalen, stoffwechselaktiven Zellen grün (*Abb. 5a*). Durch die Gegenfärbung mit Sytox red fluoreszieren die avitalen Zellen mit beschädigter Zellmembran rot (*Abb. 5b*). Die grüne Fluoreszenz verblasst schnell, so dass bei der Auszählung eine schnelle Durchführung angezeigt ist. Insbesondere unter dem FDA-Filter ist eine deutliche Unterscheidung zwischen den vitalen und avitalen Zellen möglich, da neben den vitalen grünen Bakterien auch die avitalen roten Zellen dargestellt werden (*Abb. 5a*). Unter dem Etbr-Filter hingegen leuchten die avitalen Zellen intensiv rot, während die vitalen Zellen teilweise in einem schwachen Rotton fluoreszieren, was die Differenzierung unter diesem Filter erschwert.

4.1.2 Fluorescein-Diacetat/Propidiumiodid

Fluorescein-Diacetat penetriert als Fluorescein vitale stoffwechselaktive Zellen und färbt diese grün. Propidiumiodid färbt die avitalen Zellen mit hoher Affinität zur DNA an [Lopez-Amoros *et al*. 1995]. Während vor allem Diplokokken durch FDA dargestellt wurden (*Abb.*

5a), scheint Propidiumiodid Kokken- und stäbchenförmige Bakterien einzeln sowie auch in Ketten und Haufen agglomeriert anzufärben (*Abb. 5d, Abb. 6b, d und f*). Unter dem FDA-Filter sind neben den vitalen, durch Fluorescein gefärbten Bakterien, auch teilweise die avitalen Bakterien durch eine schwache rot-orange Färbung visualisiert (*Abb. 5c, Abb. 6c, e*). Die Differenzierung der vitalen und avitalen Zellen ist mit dieser Färbekombination gut möglich.

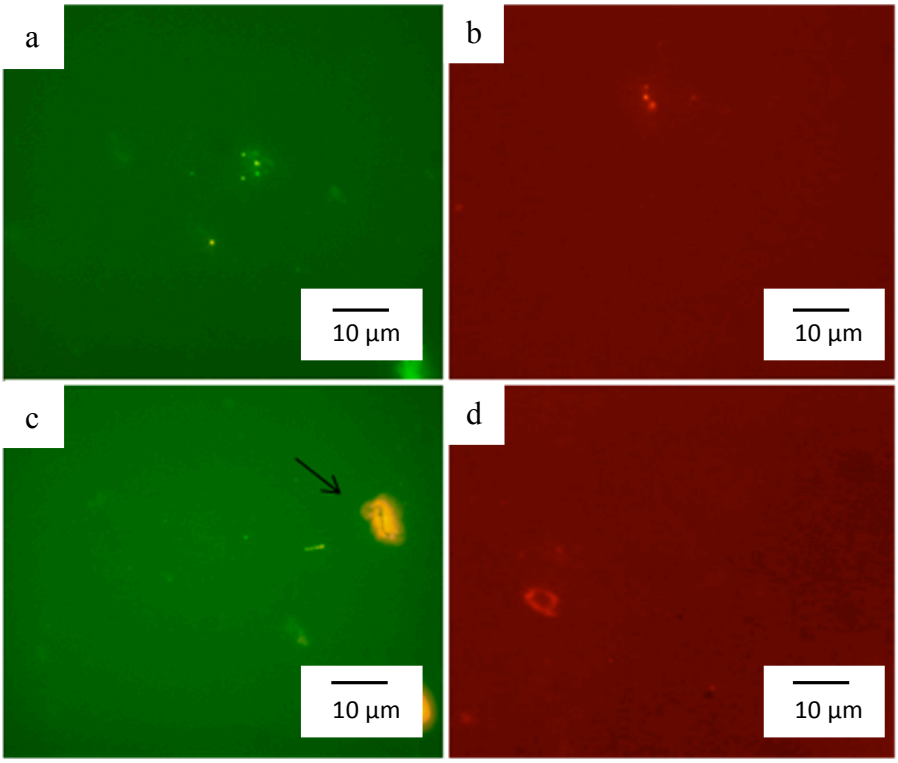

Abbildung 5: Auswertung der FDA/Sytox red-Färbung (a, b) und der FDA/Propidiumiodid-Färbung (c, d) unter dem Epifluoreszenzmikroskop. Bild a und b zeigen eine klare Differenzierung vitaler und avitaler Bakterien nach der FDA/Sytox red-Färbung unter dem FDA-Filter bzw. Etbr-Filter (Bild a: 60-min-Pellikel, FDA-Filter; Bild b: 120-min-Pellikel, Etbr-Filter). Mit der FDA/Propidiumiodid-Färbung können avitale Mikroorganismen unter dem FDA-Filter dargestellt werden (Bild c, Pfeil). Bild c und d zeigen die vitalen (grün) und avitalen (rot) Mikroorganismen auf bukkalen 120-min-Pellikelproben verschiedener Probanden. Orginalvergrößerung 1000fach.

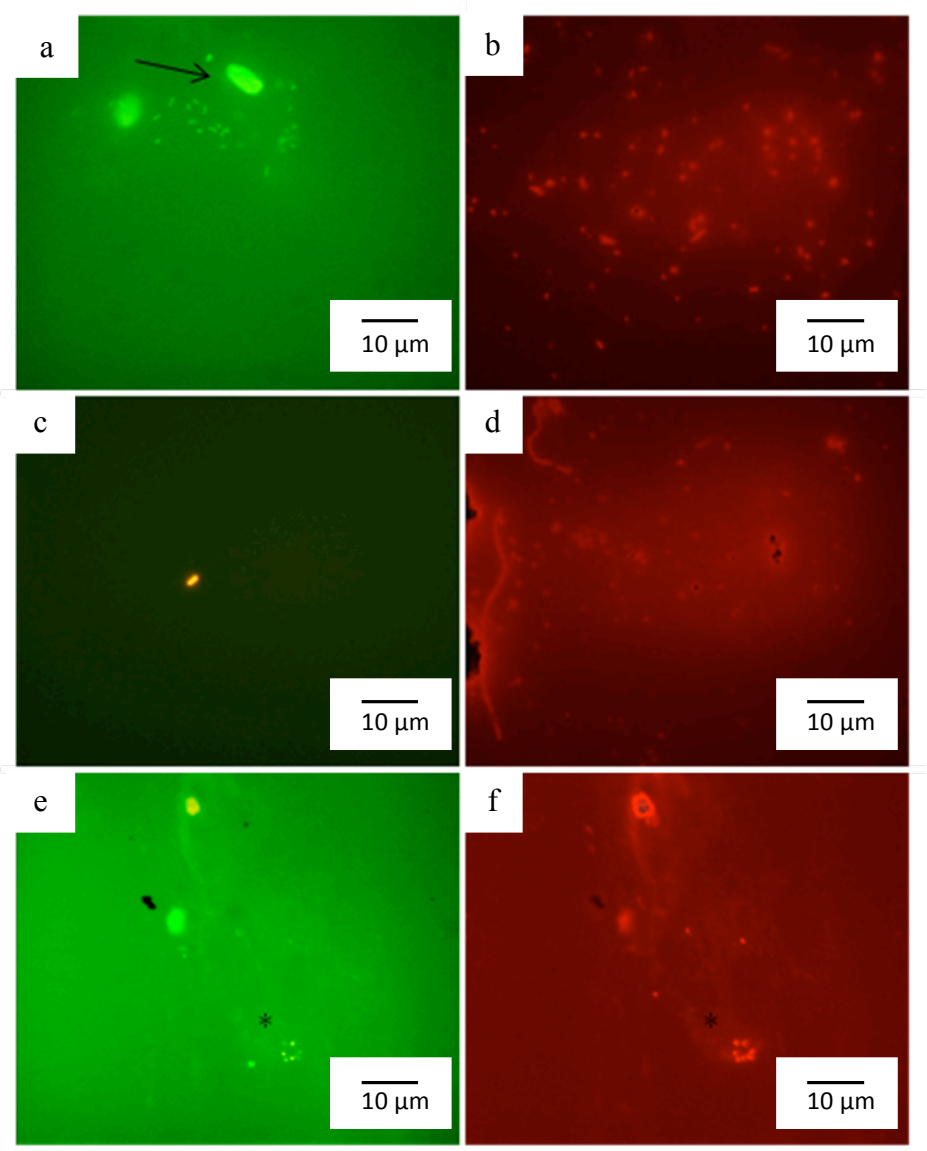

*Abbildung 6: Auswertung der FDA/Propidiumiodid-Färbung unter dem Epifluoreszenzmikroskop. Betrachtung verschiedener Abschnitte einer bukkalen 60-min-Pellikel mit dem FDA-Filter (Bild a, c, e) bzw. Etbr-Filter (Bild b, d, f). Die avitalen Bakterienagglomerate können mit beiden Filtern detektiert werden (Bild e und f: *). Bild a zeigt vitale Bakterien neben grün fluoreszierenden Zellkernen von abgeschilferten Epithelzellen (Pfeil).*

4.1.3 BacLight

Das LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit enthält eine Kombination von 2 Vitalfluoreszenzfarbstoffen zur Visualisierung verschiedener vitaler und avitaler Bakterienstämme. Syto 9 green penetriert die vitalen intakten Zellen sowie auch die avitalen Zellen und fluoresziert mit grüner Farbe. Als Gegenfärbung dient Propidiumiodid (PI). Avitale Zellen sind durch eine höhere Permeabilität der Zellmembran gekennzeichnet. PI penetriert diese Zellen und überlagert mit der roten Fluoreszenz die Wirkung des Syto 9 green. Unter dem Mikroskop sind einzelne Mikroorganismen, Ketten oder kleine Bakterienagglomerate sichtbar (*Abb. 7a, b*). Die relativ geringe Hintergrundfluoreszenz vereinfacht die Auszählung unter dem Mikroskop. Im Vergleich zu den auf Fluorescein basierenden Vitalfärbeverfahren zeichnet sich die Darstellung vitaler Zellen teilweise durch eine intensivere grüne Fluoreszenz aus. Die vitalen und avitalen Zellen lassen sich gut differenzieren. Aufgrund des relativ raschen Verblassens ist wie bei der FDA/Sytox red und FDA/PI-Kombination ein relativ zügiges Vorgehen angezeigt.

4.1.4 Calcein AM/Sytox red

Das in vitalen Zellen aktivierte Calcein fluoresziert in grüner Farbe. Die Calcein-Moleküle verteilen sich dabei in der gesamten Zelle einschließlich der Mitochondrien und dem Zellkern [Liminga *et al.* 1999]. Die Gegenfärbung mit Sytox red färbt lediglich avitale Zellen rot. Unter dem Mikroskop war nach einer kurzen Inkubationszeit (5 min) eine Differenzierung vitaler und avitaler Zellen möglich (*Abb. 7c, d*). Anschließend war eine ausreichende Farbstabilität für die epifluoreszenzmikroskopische Auswertung gegeben. Die avitalen Zellen wurden bei dieser Kombination eher schwach angefärbt (*Abb. 7d*). Abbildung 8c zeigt eine intensive Fluoreszenz der vitalen Zellen auf. Nach der initial benötigten Inkubationszeit der Methode war trotz der schwachen Färbung avitaler Zellen eine gute Unterscheidung vitaler und avitaler Zellen möglich.

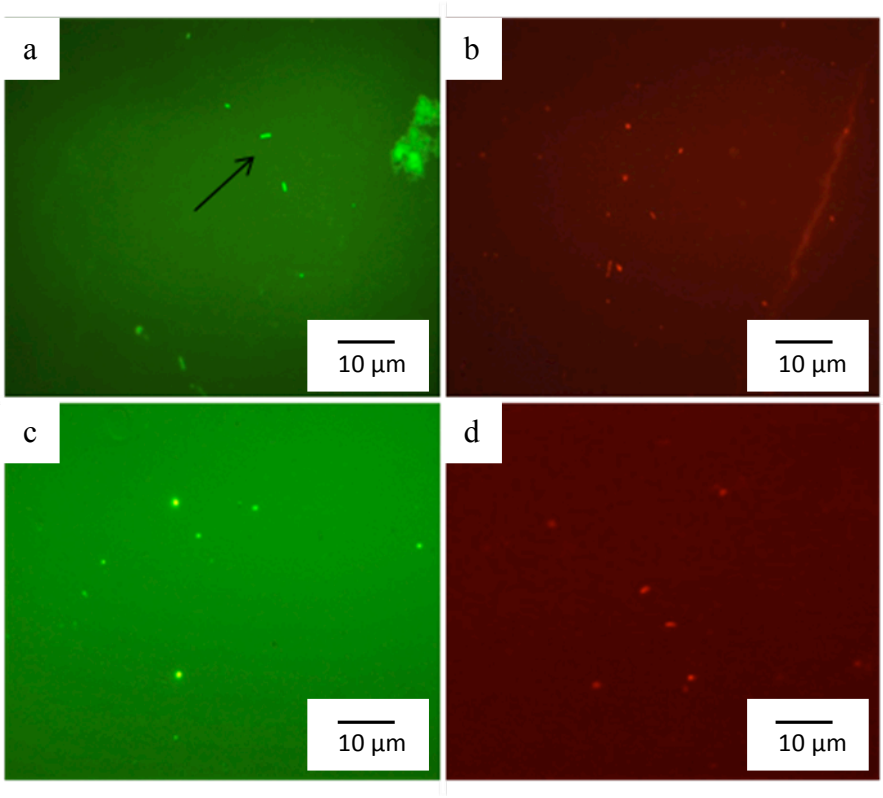

Abbildung 7: Auswertung der BacLight-Färbung (a, b) und der Calcein AM/Sytox red-Färbung (c, d) unter dem Epifluoreszenzmikroskop. Bild a und b zeigen Abschnitte einer bukkalen 120-min-Pellikel nach Anwendung des BacLight-Verfahrens. Vitale Bakterien (Pfeil: grüne Fluoreszenz) können unter dem FDA-Filter gut dargestellt werden. Bild b zeigt avitale Zellen mit dem Ethidiumbromid-Filter nach 120 min oraler Exposition. Mit der Calcein AM/Sytox red-Färbung ist die Visualisierung vitaler Zellen möglich (Bild c: 120-min-Pellikel, FDA-Filter). Bild d zeigt demgegenüber eine schwache Fluoreszenz avitaler Zellen nach 120 min oraler Exposition (Etbr-Filter).

4.1.5 Carboxyfluorescein-Diacetat/Sytox red

Das grün fluoreszierende Carboxyfluorescein akkumuliert in den Zellen, während eine Gegenfärbung durch das rot fluoreszierende Sytox red eine Differenzierung der avitalen Zellen unter dem Mikroskop ermöglicht. Die angefärbten avitalen Zellen emittieren unter dem Etbr-Filter rotes Licht (*Abb. 8b, d*). Die vitalen Zellen fluoreszieren mit unterschiedlicher Intensität (*Abb. 8a, c*). Bei der Auszählung der vitalen Bakterien wurden ausschließlich Zellen berücksichtigt, die eine intensiv grüne Fluoreszenz aufwiesen. Durch die ausreichend lange Farbstabilität (> 30 min) der Färbekombination und durch die gute Differenzierbarkeit vitaler und avitaler Zellen, war eine einfache Auswertung unter dem Epifluoreszenzmikroskop möglich.

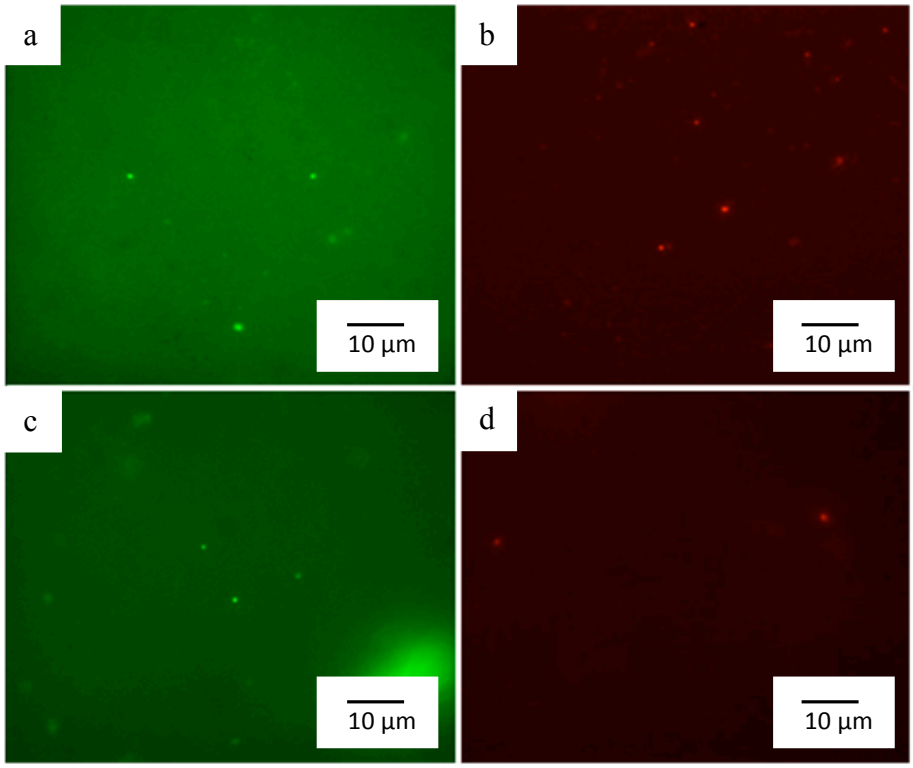

Abbildung 8: Auswertung der Carboxyfluorescein-Diacetat/Sytox red-Färbung unter dem Epifluoreszenzmikroskop. Bild a und b stellen vitale (grün) und avitale (rot) Bakterien einer 120-min-Pellikel dar. Bild c und d zeigen unterschiedliche Abschnitte einer 60-min-Pellikel unter dem FDA-Filter (Bild c) und Etbr-Filter (Bild d) verschiedener Probanden.

4.1.6 Carboxyfluorescein-Diacetat/Propidiumiodid

Das in vitalen Zellen akkumulierende Carboxyfluorescein und das zur Gegenfärbung avitaler Zellen angewandte Propidiumiodid scheinen in der verwendeten Konzentration (CFDA: 25 µl/ml; PI: 2,5 µl/ml) nur schwach zu fluoreszieren (*Abb. 9a, b*). Zudem wurden in dieser Kombination, wenn auch in hoher Anzahl, vor allem einzelne Bakterien detektiert. Es konnten kaum Ketten oder Bakterienagglomerate visualisiert werden. Möglicherweise ist dies auf das schnelle Verblassen der Färbung zurückzuführen.

4.1.7 4,5,6,7-Tetrachlorofluorescein-Diacetat/Propidiumiodid

Die Kombination TFDA/PI führt unter dem Mikroskop zu beträchtlichen Hintergrundfärbungen und erschwert die Datenerfassung. Trotz der intensiven grünen Fluoreszenz vitaler Mikroorganismen war die Auszählung unter dem FDA-Filter sowie auch unter dem Etbr-Filter problematisch (*Abb. 9c, d*). Neben der Hintergrundfluoreszenz wurde die Auswertung durch Farbpigmente und Artefakte erschwert.

4.1.8 Calcein AM/Propidiumiodid

Das grün fluoreszierende Calcein und das mit einem schwachen Rotton fluoreszierende Propidiumiodid verblassten unter dem Mikroskop rasch (*Abb. 9e, f*). Während der Visualisierung und Auszählung konnte das Verblassen der Vitalfluoreszenzfarbstoffe beobachtet werden. Die Hintergrundfärbung unter dem FDA-Filter variierte zwischen hellgrüner und grüngelber Fluoreszenz und erschwerte die Auszählung vitaler Zellen.

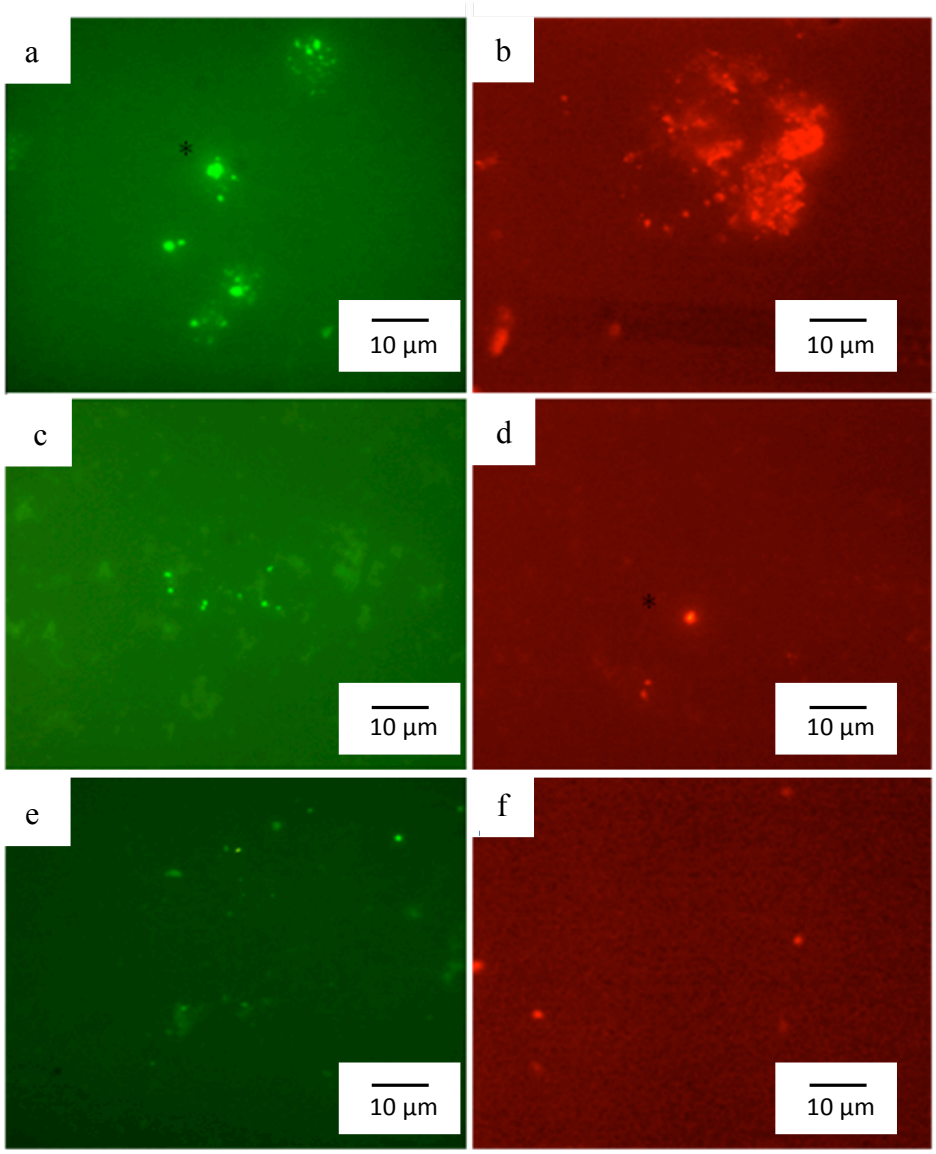

Abbildung 9: Auswertung der Carboxyfluorescein-Diacetat/Propidiumiodid-Färbung (a, b), der 4,5,6,7-Tetrachlorofluorescein-Diacetat/Propidiumiodid Färbung (c, d) und der Calcein AM/Propidiumiodid-Färbung (e, f) unter dem Epifluoreszenzmikroskop. Bild a und b zeigen vitale (Bild a) und avitale (Bild b) Bakterien nach Live/Dead-Färbung mit Carboxyfluorescein-Diacetat/Propidiumiodid. Bild c und d stellen Abschnitte einer 120-min-Pellikel nach Anwendung der 4,5,6,7-Tetrachlorofluorescein-Diacetat/Propidiumiodid-Färbung dar (Bild c: vitale Zellen, FDA-Filter; Bild d: avitale Zellen, Etbr-Filter). Bei einigen Fluoreszenzphänomenen scheint es sich um Farbpigmente der Farblösungen zu handeln und nicht um vitale oder avitale Zellen. Beispiele für die Farbpigmente sind in Bild a und d markiert (*). Bild e und f zeigen Abschnitte bukkaler Pellikelproben mit der Calcein AM/Propidiumiodid-Färbung nach 120 min oraler Exposition. Die vitalen Zellen leuchten in einem intensiven Grünton; die avitalen Zellen in einem schwachen Rotton.

4.1.9 Syto 9 green/Sytox red

Während Syto 9 green die vitalen und avitalen Zellen penetriert und grün fluoresziert, penetriert Sytox red ausschließlich beschädigte, avitale Zellen [Monis *et al*. 2005]. Unter dem Mikroskop fluoreszierten dieselben Zellen jedoch im gleichen Ausschnitt unter dem FDA-Filter grün und unter dem Etbr-Filter rot (*Abb. 10a, b*). Daher war eine Differenzierung der vitalen und avitalen Mikroorganismen nicht möglich. Die starke Hintergrundfärbung durch Syto 9 green unter dem FDA-Filter erschwerte ebenso die Auszählung der Bakterien (*Abb. 10a*). Diese Farbstoffkombination wurde bei den Hauptversuchen nicht berücksichtigt.

4.1.10 Fluorescein-Diacetat/Ethidiumbromid

Fluorescein akkumuliert intrazellulär in vitalen Zellen und fluoresziert grün. Die relativ großen Ethidiumbromid-Moleküle penetrieren die vitalen und avitalen Zellen und führen mit der DNA-Interkalation zu einer roten Fluoreszenz [Dangl *et al*. 1982; Decker 2001]. Unter dem Mikroskop ist eine Differenzierung vitaler und avitaler Zellen kurzzeitig möglich (*Abb. 10c-f*). Allerdings war die Auszählung aufgrund der geringen Farbstabilität bzw. des raschen Verblassens der grünen Fluoreszenz (vitale Zellen) erschwert. Das Ausbleichen der grün fluoreszierenden Zellen konnte beobachtet werden. Innerhalb kurzer Zeit fluoreszierten alle Zellen rot. Der Umgang mit den Farbstoffen erforderte aufgrund ihrer Toxizität eine besondere Achtsamkeit bei der Vorbereitung und Anwendung [Ames *et al.* 1975; Decker 2001; Hannig C *et al*. 2010].

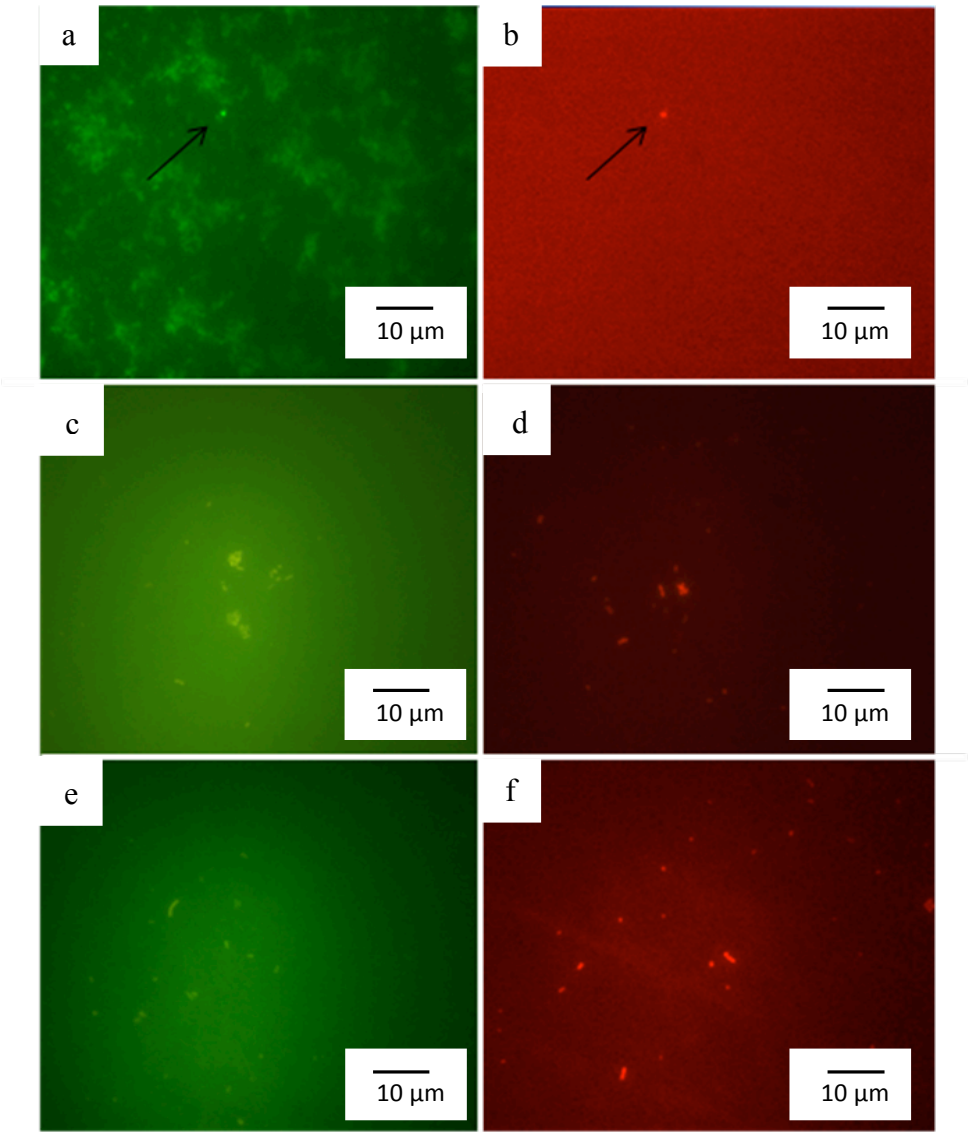

Abbildung 10: Auswertung der Syto 9 green/Sytox red-Färbung (a, b) und Fluorescein-Diacetat/Ethidiumbromid-Färbung (c-f) unter dem Epifluoreszenzmikroskop. Bild a und b: Betrachtung eines Abschnittes einer bukkalen 120-min-Pellikelprobe nach Behandlung mit Syto 9 green/Sytox red mit dem FDA-Filter bzw. dem Etbr-Filter. Es ist keine Differenzierung vitaler und avitaler Zellen möglich; die gleiche Zelle ist in Bild a und b unter den verschiedenen Filtern markiert (Pfeil). Die Fluorescein-Diacetat/Ethidiumbromid-Färbung ermöglicht eine Differenzierung der vitalen und avitalen Bakterien (Bild c-f). Bild c und e zeigen vitale Mikroorganismen mit grüner Fluoreszenz auf den Abschnitten einer 60-min-Pellike1 (FDA-Filter); die avitalen Zellen fluoreszieren rot (Bild d, f).

4.2 Zusammenfassende Beurteilung der Verfahren

Die in den Vor- und Hauptversuchen durchgeführten Vitalfärbeverfahren wurden hinsichtlich der Parameter Farbstabilität, Differenzierbarkeit vitaler und avitaler Bakterien evaluiert und miteinander verglichen. Ebenfalls berücksichtigt wurde die Praktikabilität der Methoden. Die synoptische Evaluation wurde tabellarisch zusammengefasst:

	Farbe vitaler Bakterien	Farbe avitaler Bakterien	Farbstabilität	Differenzierung vital/avital	Vorteile +	Nachteile -	Gesamt-urteil
Syto 9/PI (BacLight kit)	FDA-Filter: neongrün	FDA-Filter: orange-rot Etbr-Filter: neonrot	Verblassen nach 15-20 min	deutlich		10 min Inkubationszeit	+
FDA/Etbr	FDA-Filter: neongrün	Etbr-Filter rot	hohe Intensität, schnelles Verblassen	deutlich		Toxizität d. Etbr.-Farbstoffs	-
FDA/PI	FDA-Filter: neongrün	FDA-Filter: orange-rot Etbr-Filter rot	ausreichend lange sichtbar	deutlich			+
CFDA/PI	FDA-Filter: grün	Etbr-Filter blassrot	schnelles Verblassen	erschwert		tote Bakterien nur schwach rot	-
TFDA/PI	FDA-Filter: grün	Etbr-Filter blassrot	lange sichtbar	nicht deutlich		fleckiger Hintergrund, schlecht zählbar	-
Calcein AM/PI	FDA-Filter: grün	Etbr-Filter rot	schnelles Verblassen	erschwert			O
Syto 9/ Sytox red	FDA-Filter: neongrün	Etbr-Filter neonrot	nicht aussagekräftig, alle Zellen fluoreszieren bereits initial rot	nicht differenzierbar		fleckiger Hintergrund im FDA-Filter	-
CFDA/ Sytox red	FDA-Filter: neongrün	Etbr-Filter neonrot	ausreichend lange sichtbar	deutlich			+
FDA/ Sytox red	FDA-Filter: neongrün Etbr-Filter hellrot, gelblich	FDA-Filter: schwachrot Etbr-Filter neonrot	schnelles Verblassen der grünen Fluoreszenz (vitale Zellen)	deutlich	avital & vital im FDA-Filter erkennbar		+
Calcein AM/ Sytox red	FDA-Filter: neongrün	Etbr-Filter blassrot	erst nach ca. 5 min Inkubationszeit stabil und auszählbar	anfangs nicht möglich, erst nach 5 min		5 min Inkubationszeit	O

Tabelle 3: Zusammenfassende Beurteilung der Vitalfluoreszenzfärbeverfahren. Gesamtbeurteilung in + = zuverlässig; 0 = verwendbar; - = ungeeignet

4.3 Anwendung ausgewählter Verfahren zur Quantifizierung vitaler und avitaler Mikroorganismen bei 6 Probanden

Die Verfahren, die sich in den Vorversuchen als geeignet und farbstabil erwiesen hatten, wurden an *In-situ*-Proben von 6 Probanden angewandt, um die Methoden zu vergleichen. Insgesamt wurden in den Hauptversuchen fünf unterschiedliche Färbekombinationen miteinander verglichen: FDA/Sytox red, FDA/PI, Syto 9/PI [BacLight], Calcein AM/Sytox red, CFDA/Sytox red. Für jedes Vitalfärbeverfahren wurden zwei Schmelzprüfkörper 120 min, bukkal auf einer individuell angefertigten Tiefziehschiene oral exponiert. Zusätzlich zu den Vitalfärbeverfahren wurden oral exponierte Schmelzproben für die Ermittlung der kolonie-bildenden Einheiten (CFU) verwendet. Die Ergebnisse des quantitativen Vergleichs der vitalen und avitalen Bakterien sowie die Bestimmung der kolonie-bildenden Einheiten wurden für alle Probanden zusammengefasst und verglichen (*Abb. 11-13*).

4.3.1 Synoptische Darstellung der Ergebnisse der Vitalfärbeverfahren

Die Auswertung der Vitalitätsverteilung mit Hilfe der verschiedenen Vitalfärbeverfahren zeigt deutliche Unterschiede zu einander(*Abb. 11*).

Insgesamt errechnet sich aus allen Verfahren ein Mittelwert von 2,9 ± 0,8 x 10^4 cm^{-2} (Gesamtbakterienzahl vitaler und avitaler Bakterien). Die vitalen Bakterien (Mittelwert aller Verfahren: 2,9 ± 0,8 x 10^4 cm^{-2}) und die avitalen Bakterien (Mittelwert aller Verfahren: 2,9 ± 0,8 x 10^4 cm^{-2}) sind im Durchschnitt zu gleichen Teilen vertreten (*Abb. 12*). Mit dem Live/Dead-Verfahren FDA/Sytox red konnte im Vergleich die höchste Bakterienzahl detektiert werden. Die maximalen mittleren Werte für die vitalen Zellen konnten ebenfalls mit dem FDA/Sytox red-Verfahren nachgewiesen werden. Die niedrigste Gesamtbakterienzahl wurde mit dem CFDA/Sytox red-Verfahren ermittelt.

Im Vergleich der Vitalfärbeverfahren wurde kein signifikanter Unterschied der Anzahl vitaler Bakterien (ANOVA: $p = 0{,}338$) und avitaler Bakterien (ANOVA: $p = 0{,}413$) aufgezeigt.

Die durch die verschiedenen Vitalfärbeverfahren ermittelten Werte für die vitalen und für die avitalen Zellen wurden paarweise miteinander verglichen. Innerhalb der Vergleichsgruppe, in der die Anzahl vitaler Zellen miteinander verglichen wurde, konnte kein signifikanter Unterschied ermittelt werden. Im paarweisen Vergleich der mit den verschiedenen Verfahren

detektierten avitalen Zellen, konnte analog kein signifikanter Unterschied aufgezeigt werden (vital Tukey-Test: p = 0,335; avital Tukey-Test: 0,295).

Die zusätzliche statistische Auswertung mit dem nicht parametrischen Kruskal-Wallis-Test ergab für die fünf verschiedenen Vitalfärbeverfahren keine signifikanten Unterschiede (vital p = 0,530; avital p = 0,712).

Eine synoptische Übersicht der paarweisen Vergleiche aller 5 Vitalfärbeverfahren findet sich im Datenanhang (*Tab. 5, 6*).

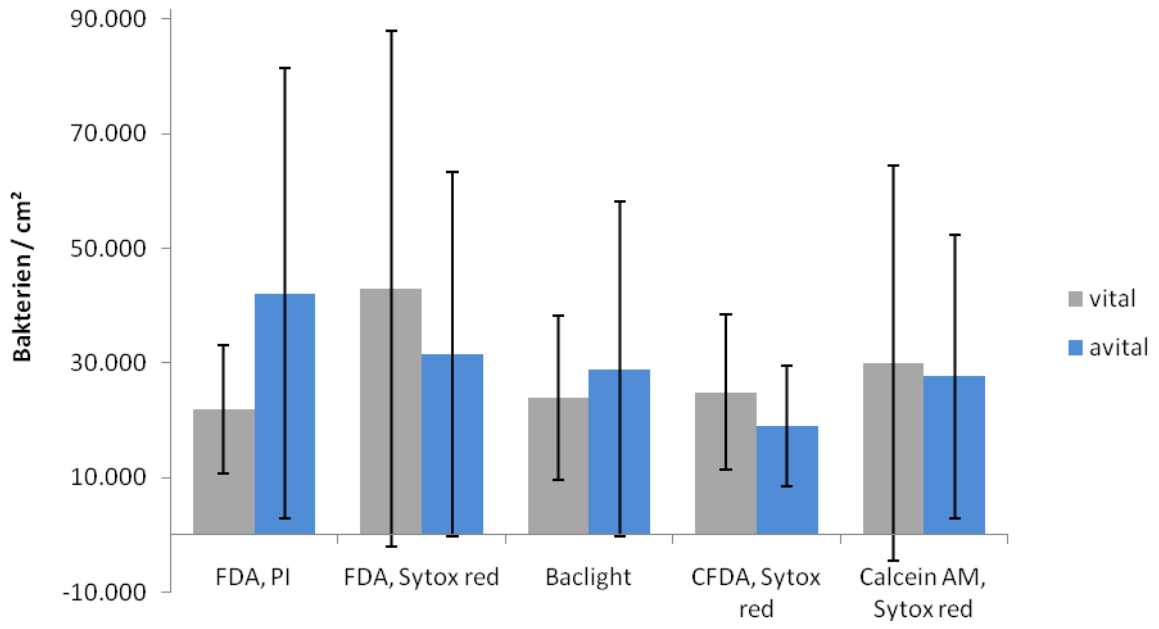

Abbildung 11: Synoptische Gegenüberstellung der Ergebnisse der Vitalfärbeverfahren, Anzahl vitaler und avitaler Zellen.

4.3.2 Zusammenfassende Darstellung aller detektierten Mikroorganismen

Die in den Hauptversuchen angewendeten Vitalfärbeverfahren ermöglichen die Differenzierung vitaler und avitaler Zellen. Bei allen sechs Probanden wurde die Höhe der mittleren Bakterienzahl für beide Vitalitätsstadien ermittelt und für jedes Verfahren gegenübergestellt. Abbildung 12 stellt den prozentualen Vergleich vitaler und avitaler Bakterien dar.

Die 5 verschiedenen Färbekombinationen unterscheiden sich vor allem hinsichtlich des Verhältnisses detektierter vitaler und avitaler Bakterien.

Mit den Vitalfärbungen Syto 9/PI [BacLight] und Calcein AM/Sytox red konnte ein annähernd gleiches Verhältnis vitaler und avitaler Bakterien erfasst werden. Mit Syto 9/PI wurden 45% vitale und 55% avitale Mikroorganismen detektiert. Das Vitalfärbeverfahren anhand der Calcein AM/Sytox red-Färbekombination erfasste 52% vitale und 48% avitale Bakterien.

Unter Anwendung der FDA/Sytox red- und CFDA/Sytox red-Verfahren wurde ein Lebend/Tot-Verhältnis von 3:2 ermittelt (FDA/Sytox red: 58% vital, 42% avital; CFDA/Sytox red: 57% vital, 43% avital). Mit beiden Vitalfärbungen wurden mehr vitale Zellen detektiert.

Ein deutlich abweichendes Verhältnis mit einem hohen Anteil avitaler Bakterien wurde bei der Färbekombination FDA/PI ermittelt. Das Lebend/Tot-Verhältnis betrug 1:2 (vital: 34%, avital: 66%) (*Abb. 12*).

Die maximale Anzahl vitaler Bakterien wurde mit 14,3 x 10^4 Bakterien/cm² bei der Färbekombination FDA/Sytox red erfasst. Der minimale Wert wurde ebenfalls bei FDA/Sytox red mit 0,8 x 10^4 Bakterien/cm² gefunden (*Tab. 4*). Das Maximum an avitalen Bakterien wurde mit 14 x 10^4 Bakterien/cm² bei FDA/PI detektiert. Im Minimum fanden sich 0,5 x 10^4/cm² avitale Bakterien auf einer mit Syto 9/PI gefärbten Probe (*Tab. 4*).

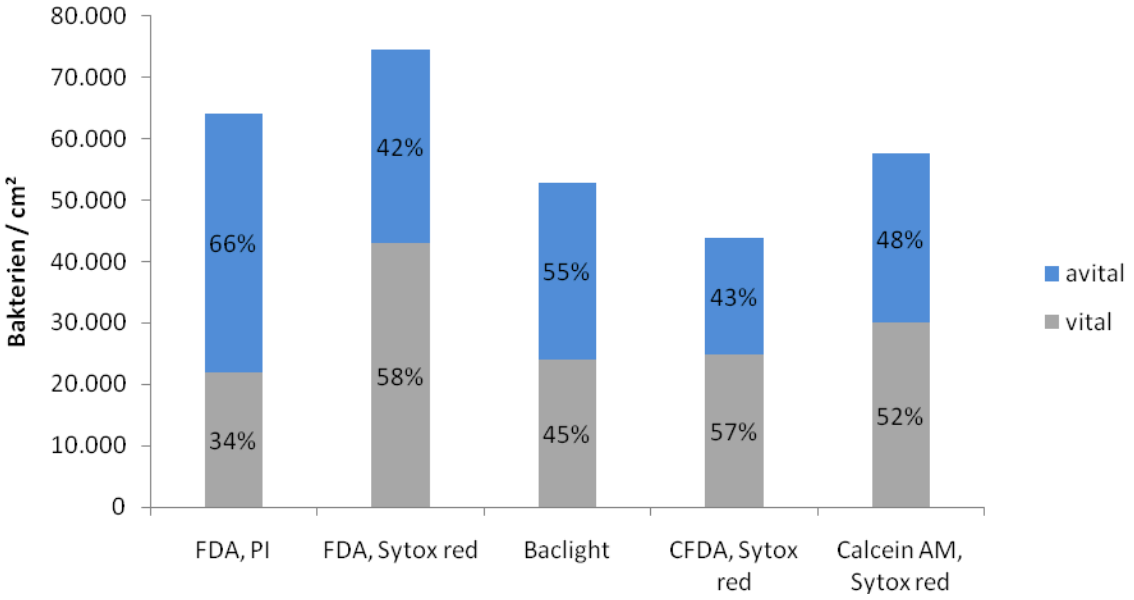

Abbildung 12: Zusammenfassende Darstellung aller detektierten Bakterien in der 120-min-Pellikel, prozentuale Verteilung vitaler und avitaler Mikroorganismen

	Maximal- und Minimalwerte detektierter Bakterien mit allen Vitalfärbeverfahren [10^4/cm²]			
	vital		avital	
	Minimum	Maximum	Minimum	Maximum
FDA/PI	0,8	4,7	1,1	14
FDA/Sytox red	0,8	14,3	0,6	10
Syto 9/PI	1	5,1	0,5	11
CFDA/Sytox red	1,1	4,7	0,8	3,9
Calcein AM/ Sytox red	0,8	11,2	0,7	8,3

Tabelle 4: Gegenüberstellung der maximalen und der minimalen Bakterienanzahl für die mit den verschiedenen Verfahren gefundenen vitalen und avitalen Bakterien.
Expositionszeit t = 120 min, n = 12 Proben/Verfahren, 6 Probanden.

4.3.3 Ergebnisse des Kulturverfahrens

In der Hauptversuchsreihe wurden bei allen 6 Probanden in beiden Durchläufen adhärente Bakterien mithilfe der kolonie-bildenden Einheiten quantifiziert. Da für jedes Verfahren jeweils 2 Schmelzproben verwendet wurden, zeigt Abbildung 13 die zusammenfassende Darstellung von 24 *in situ* exponierten Proben.

Für die Bestimmung der CFU wurden die Bakterien nach oraler Exposition (t = 120 min) mit Ultraschall von der Probenoberfläche desorbiert. Anschließend erfolgte die Ausplattierung auf verschiedenen Blutagarplatten. Für die Auszählung der aeroben und anaeroben Kolonien wurde ein computergestütztes Programm angewendet.

Insgesamt wurde mit diesem Verfahren eine sehr hohe Variabilität beobachtet. Deutliche Unterschiede in der Bakterienanzahl konnten zwischen den einzelnen Probanden sowie auch innerhalb der gleichen Durchläufe beobachtet werden. Tabelle 8 zeigt die durch CFU erfassten Minimal- und Maximalwerte für die aeroben und anaeroben Kolonien bei den einzelnen Probanden. Innerhalb der aeroben Kolonien wurde bei einem Probanden in einer Messung 1,4 x 10^4 CFU/cm² und 151,4 x 10^4 CFU/cm² ermittelt. Demgegenüber wies ein anderer Proband sehr geringe Unterschiede zwischen den Minimal- und Maximalwerten anaerober Kolonien auf (Minimalwert: 42,2 x 10^4 CFU/cm²; Maximalwert: 130,7 x 10^4 CFU/cm²). Die ermittelten Werte innerhalb eines Probanden schwankten dementsprechend zwischen dem Faktor 3 und dem Faktor 100 (*Tab. 8*)

Tabelle 9 zeigt den Vergleich der aeroben und der anaeroben Kolonien. Beide sind durchschnittlich zu gleichen Teilen vertreten (Aerobier: 89 ± 138,4 x 10^4 cm^{-2}; Anaerobier: 99,1 ± 154,3 x 10^4 cm^{-2}).

Mit den kolonie-bildenden Einheiten wurden erheblich mehr Bakterien detektiert als durchschnittlich bei allen Vitalfärbeverfahren (Mittelwert aller durch Vitalfärbeverfahren erfassten vitalen Bakterien: 2,9 ± 0,8 x 10^4 cm^{-2}). Die durch CFU und durch Vitalfärbeverfahren ermittelten Werte differieren um den Faktor 30.

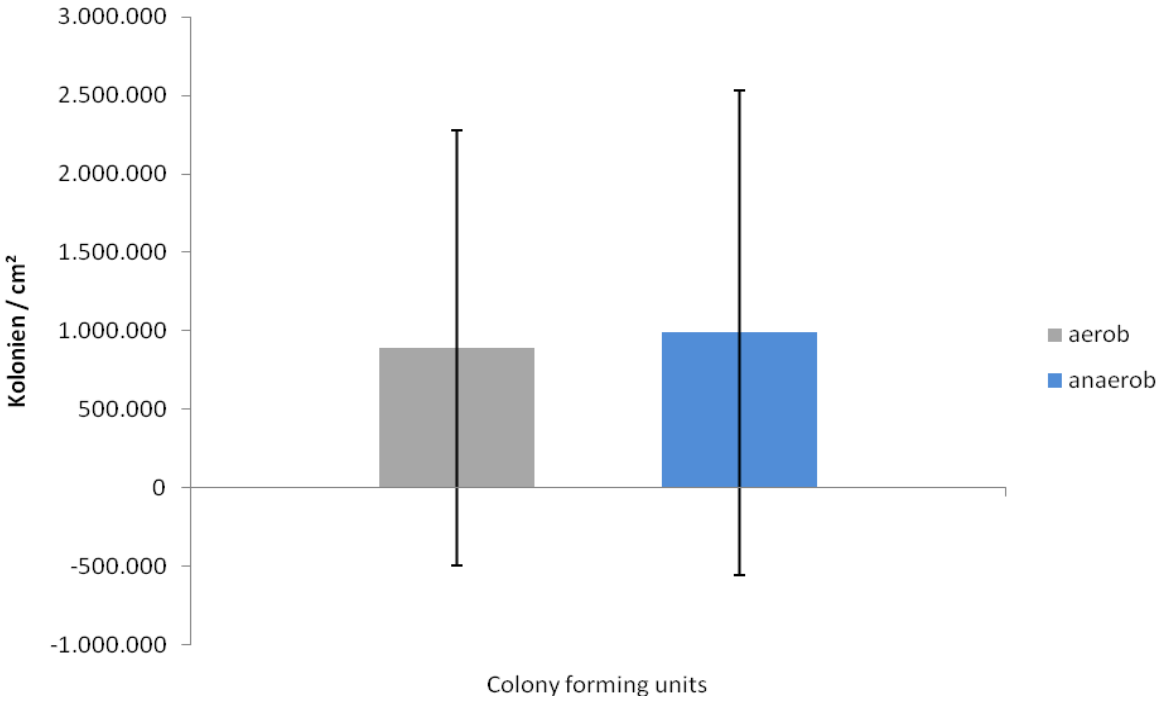

Abbildung 13: Zusammenfassende Darstellung der aeroben und anaeroben Kolonie-bildenden Einheiten unter Berücksichtigung aller sechs Probanden mit jeweils zwei bukkal exponierten Schmelzproben. Orale Expositionszeit t = 120 min.

5 Diskussion

Erstmalig wurden in der vorliegenden Studie verschiedene Vitalfärbeverfahren zur Visualisierung und Quantifizierung adhärenter Mikroorganismen im initialen oralen Biofilm miteinander verglichen. Im Gegensatz zur dreidimensionalen Strukturierung und Verteilung der Bakterien im maturierten Biofilm zeigen sich bei der initialen Kolonisierung randomisiert verteilte einzelne Mikroorganismen und Aggregate.

Die Bioadhäsionsprozesse in der Mundhöhle wurden bereits in mehreren Studien mithilfe von *In-vitro*-Modellen untersucht [Decker 2001; Guggenheim *et al*. 2009; Standar *et al*. 2010; von Ohle *et al.* 2010; Wang 2010]. Eine naturgetreue Imitation scheint mit diesen Modellen jedoch nur bedingt möglich zu sein. Es wurden charakteristische Unterschiede zwischen *in vitro* und *in vivo* gebildeten Biofilmen festgestellt [Flemming und Wingender 2001a, b; Schreiber *et al*. 2010; Zijnge *et al*. 2010]. *In vivo* scheinen die Mikroorganismen unterschiedlichen Einflüssen ausgesetzt zu sein, die ihre Eigenschaften und Pathogenität verändern [Al-Hashimi und Levine 1989; Carlén *et al*. 1998; Jefferson *et al*. 2005; Stoodley *et al*. 2002]. Die Wechselwirkung und Interaktion der Bakterien untereinander sowie mit der Schmelzoberfläche und unter dem Einfluss hydrodynamischer Scherkräfte und Flüssigkeitsbewegungen in der Mundhöhle ist *in vitro* kaum simulierbar – so auch der Einfluss natürlichen Speichels und der Pellikelbildung *in vivo* [Tanzer *et al*. 2003]. Für eine möglichst genaue Imitation der oralen Verhältnisse scheinen daher *In-situ*-Versuche mit Schmelzprobekörpern zur Pellikel- und Biofilmuntersuchung am besten geeignet zu sein [Hannig C *et al*. 2010; Hannig C und Hannig M 2009a; Hannig C *et al*. 2005; Hannig M *et al*. 2005; Larsen *et al*. 2008; Lemos *et al*. 2010].

In dieser Studie wurde die initiale Adhärenz an *in situ* exponierten bovinen Schmelzproben untersucht. Bovine Schmelzproben weisen ähnliche physikalische Eigenschaften und eine ähnliche chemische Zusammensetzung auf wie humaner Zahnschmelz [Esser *et al*. 1998; Davidson *et al*. 1973; Reis *et al*. 2004; Turssi *et al*. 2010]. Zudem ist die standardisierte Probengewinnung aus bovinen Zähnen einfacher als aus humanen [Hannig C *et al*. 2004; Hannig C *et al*. 2005b; Hannig M *et al*. 2004b]. Man kann annehmen, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen der Pellikelbildung bzw. der Bioadhäsion auf bovinem und humanem Schmelz gibt. Untersuchungen zum Vergleich boviner Dentin und Schmelzproben zeigen dagegen bedeutende Unterschiede auf [Jung *et al*. 2010; Galhano *et al*. 2009; Turssi *et al*. 2010]. Direkte Studien zum Vergleich der Biofilmbildung auf den Zahnhartsubstanzen unterschiedlicher Spezies stehen jedoch noch aus.

Die Schmelzproben wurden für die vorliegende Studie aus extrahierten bovinen BSE-negativen Unterkieferzähnen gewonnen und anschließend in frischer 0,1%iger Thymol-Lösung gelagert. Als Phenolderivat besitzt Thymol eine antiseptische Wirkung und wirkt vor allem in niedrigen Konzentrationen bakterizid [Qiu *et al*. 2010]. Zusammen mit den antioxidativen Eigenschaften und der langanhaltenden Wirkung eignet sich Thymol für die Anwendung als Desinfektionsmittel [Wei und Shibamoto 2010].

Aus den Facialflächen der Zahnkronen wurden runde Schmelzproben gewonnen und anschließend mit Schleifpapier plan geschliffen. Durch das Finieren der Schmelzoberfläche verliert der Schmelz seine natürliche gewölbte Oberflächenform. Es ist denkbar, dass die Bakterienadhärenz *in vivo* geringe Unterschiede zu finierten Schmelzprüfkörpern aufweisen könnte.

Vor der oralen Exposition wurden die Schmelzproben zur Desinfektion und Reinigung ultraschallgestützt mit 3%igem NaOCl und 70%igem Ethanol aufbereitet. Die simultane Ultraschallbehandlung führt zur vollständigen Entfernung adhärenter Proteinschichten und Bakterien von der Oberfläche [Hannig M *et al*. 2005, Jung *et al*. 2010, Rehmer 2008]. Natriumhypochlorit wirkt antibakteriell und wird auch zur Reinigung von Wurzelkanälen verwendet [Giardino *et al.* 2009; Carson *et al.* 2005]. Ethanol wird als antibakterielles und antivirales Desinfektionsmittel verwendet [Moorer 2003]. Nach den Spülungen wurden die Proben in aqua bidest. ultraschallgestützt von den vorherigen Lösungen gereinigt. Bis zur oralen Anwendung folgte die Lagerung in frischem aqua bidest.. Zur möglichst genauen Simulation der Bedingungen *in vivo* und zur Vorbeugung von Mineralverlusten ist die Feuchthaltung der Proben notwendig. Auf diese Weise kann sich eine Hydrathülle an der gereinigten Schmelzoberfläche ausbilden und bei oraler Exposition eine weitestgehend ungestörte Pellikelbildung ermöglichen [Hannig C *et al.* 2007a; Hannig M und Joiner 2006; Rehmer 2008].

Zur oralen Exposition der Schmelzproben wurden für alle Probanden individuelle Tiefziehschienen hergestellt. Die Schmelzproben wurden parallel zu den Zahnreihen mit Silikon an den bukkalen Flächen der Tiefziehschienen befestigt [Hannig C *et al.* 2010; Hannig C *et al.* 2005a; Hannig M und Balz 2001]. Um eine genaue Auszählung der Bakterienanzahl auf der Schmelzprobenoberfläche zu ermöglichen, wurden die Schmelzränder und –rückseiten mit Silikon bedeckt. Somit wurde zur Untersuchung der bukkalen Glattflächen lediglich die Schmelzoberfläche exponiert und Fehlmessungen durch dort befindliche Bakterien vorgebeugt. Die Schmelzproben wurden bukkal auf der Schiene

fixiert, da in mehreren Studien eine höhere bukkale Bakterienanzahl bzw. Biofilmdicke im Vergleich zu palatinalen Flächen aufgezeigt wurde [Al-Ahmad *et al.* 2009; Al-Ahmad *et al.* 2007; Arweiler *et al.* 2004; Auschill *et al.* 2004; Hannig C *et al.* 2007a].

Die oralen Expositionszeiten der Schmelzproben orientierten sich an zahlreichen Studien der Arbeitsgruppe zu initialen Bioadhäsionsprozessen [Al-Ahmad *et al.* 2009; Deimling *et al.* 2007; Hannig C *et al.* 2006; Hannig C *et al.* 2008b]. In den Vorversuchen hat sich in Übereinstimmung mit den vorherigen Studien eine Expositionsdauer von 60-120 min bewährt. Nach dieser Zeit ist eine ausreichende Bakterienzahl unter dem Epifluoreszenzmikroskop detektierbar. Um standardisierte Bedingungen zu gewährleisten, verzichteten alle Probanden während der Tragedauer auf Nahrung und Getränke mit Ausnahme von Wasser. Am Versuchstag reinigten die Probanden ihre Zähne ausschließlich mit Wasser, um einheitliche Bedingungen sicherzustellen.

In den Vorversuchen wurden verschiedene Verfahren zur Vorbereitung und Färbung der Schmelzprüfkörper erprobt. Alle in den Vorversuchen evaluierten Färbekombinationen wurden mit zwei unterschiedlichen Verfahren durchgeführt. Ein Färbeverfahren bestand darin, die Schmelzproben nach oraler Exposition in der frisch angesetzten Färbelösung zu inkubieren und im Anschluss mittels Sekundenkleber auf einem Objektträger zu fixieren. Diese Proben waren meist durch eine schwächere Fluoreszenz und geringere Farbstabilität gekennzeichnet. Möglicherweise könnte die Abbindereaktion des Sekundenklebers die Interaktion der Farbstoffe mit den Bakterien negativ beeinflussen. In den Hauptversuchen dieser Studie wurden die Färbeverfahren mit einer Silikonkittung durchgeführt. Dafür wurden die exponierten Proben in weichbleibendem Silikon auf dem Objektträger eingebettet. Die Schmelzoberfläche bildete dadurch den Boden eines „Färbebeckens“ und wurde durch die Silikonränder zirkulär begrenzt (*Abb. 4*). Die verschiedenen Vitalfärbekombinationen wurden auf die Schmelzprobenoberfläche pipettiert und inkubierten während des Mikroskopierens.

Eine allgemeine Schwierigkeit der Auswertung der meisten Vitalfärbeverfahren ist die Ebenenfindung unter dem Epifluoreszenzmikroskop. Bei 1000facher Vergrößerung kann man mit dem Etbr-Filter bzw. mit dem FDA-Filter avitale und vitale Zellen in einem Rasterfeld auszählen. Während der Auszählung ist jedoch eine kontinuierliche Fokussierung notwendig, um die Bakterien zu detektieren. Mit Hilfe einer an das Mikroskop angeschlossenen Kamera (maximale einstellbare Auflösung bei AxioCam HRc Microscanning: bis 4164 x 3120 Pixel) lässt sich die exponierte Probenoberfläche fotografisch dokumentieren. Allerdings kann nur eine eingestellte Ebene abgebildet werden.

Um die schwierige Einstellung der Ebene unter dem Mikroskop zu vermeiden und einen durch den Zeitaufwand am Mikroskop resultierenden Einfluss auf die Auszählung zu verhindern, kann anstelle der epifluoreszenzmikroskopischen Auswertung das konfokale Laser-Mikroskop (CLSM) benutzt werden. Mit dem CLSM ist die exponierte Schmelzoberfläche dreidimensional darstellbar und eine Auszählung der fluoreszierenden Mikroorganismen möglich [Hannig C *et al.* 2010]. Zur Darstellung von lebenden und toten Bakterien in den verschiedenen Schichten des Biofilms kann nach vorheriger Fluoreszenzfärbung die Auswertung anhand des konfokalen Lasermikroskops erfolgen [Al-Ahmad *et al*. 2010a; Arweiler *et al*. 2004; Jung *et al*. 2010; Tamura *et al*. 2008; Zaura-Arite und ten Cate 2000]. Dieses Verfahren eignet sich besonders für Untersuchungen initialer Bioadhäsionsprozesse [Jung *et al*. 2010]. Die Visualisierung plaquebedeckter Zahnhartsubstanzen wird jedoch teilweise durch die Autofluoreszenz der Porphyrine beeinträchtigt [Buchalla *et al.* 2004; Yoshimi *et al.* 2003].

Anhand rasterelektronenmikroskopischer Abbildungen lassen sich heute Oberflächen mit hoher Schärfentiefe darstellen und können ergänzende Informationen über die Textur, Anfärbung und Oberflächenbeschaffenheit geben [Hannig C *et al.* 2010; Hannig M *et al.* 1997; Hannig M *et al.* 2005]. Aufgrund der sehr kleinen Probenausschnitte weisen REM-Aufnahmen für Untersuchungen zur Lokalisation und Verteilung der Bakterien auf *in situ* exponierten Proben eine geringe Aussagekraft auf. Geeignet scheinen die REM-Aufnahmen jedoch für das generelle Ausmaß der bakteriellen Besiedlung und somit zur Verifizierung der zu untersuchenden Probekörper zu sein. Informationen zur Vitalität der Bakterien können mit elektronenoptischen Verfahren gewonnen werden, wenn bei hoher Vergrößerung Destruktionen der Zellmembran oder auch der Deformation und Lyse von Bakterienzellen beobachtet werden.

Bei den Auszählungen unter dem Epifluoreszenzmikroskop wurden mindestens 10 Rasterfelder unter dem Etbr- und dem FDA-Filter bestimmt. Eine Rasterfeldfläche umfasst 0,0156 cm², die gesamte Schmelzprobenoberfläche beträgt 0,196 cm². Um die Quantifizierung der Bakterien unter dem Epifluoreszenzmikroskop zu präzisieren, sollten möglichst viele repräsentative Rasterfelder ausgezählt werden. Somit können unterschiedlich lokalisierte Bakterienagglomerate und Aggregate erfasst werden. Die ermittelte Bakterienzahl/cm² ist eine Annäherung und dient der grundlegenden Einschätzung des Ausmaßes der bakteriellen Kolonisation.

Mit den modernen Live/Dead-Verfahren wurden in dieser Studie vitale und avitale Bakterien differenziert. Diese Differenzierung physiologischer Bakterienzustände in vital/tot wird in der Literatur intensiv und kontrovers diskutiert [Colwell *et al.* 1985; Decker 2001; Kaprelyants *et al.* 1993; Mason *et al.* 1986; Oliver 1995; Roszak und Colwell 1987a, b; Stevenson 1978]. Aktuelle Definitionen unterteilen den Bakterienzustand in mehrere mögliche, ineinander übergehende Phasen [Aas *et al.* 2005; Colwell *et al.* 1985; Decker 2001; Mason *et al.* 1986; Oliver 1995; Stevenson 1978]. Die vitalen wachstumsfähigen Zellen können demzufolge von wachstumsfähigen aber unkultivierbaren Bakterien differenziert werden, die auf Nährmedien nicht wachsen [Decker 2001]. Dormante Zellen befinden sich in einem reversiblen Zwischenstadium, das entweder zur Stoffwechselaktivität, zum Zelltod oder zur Zelllyse übergehen kann [Stevenson 1978]. Weiterhin wird das prelytische Bakterienzellstadium von den avitalen Bakterien unterschieden. Die präzise Differenzierung der einzelnen Vitalitätsstadien ist anhand der Vitalfärbeverfahren nur schwer möglich. Es konnte jedoch eine Abhängigkeit der Stoffwechselaktivität der Mikroorganismen vom Fluoreszenzverhalten beobachtet werden [Barbesti *et al*. 2000; Berney *et al*. 2007]. Befinden sie sich in einer schnellen Wachstumsphase mit einer hohen Stoffwechselaktivität, so scheinen die Zellen intensiver zu fluoreszieren als ruhende Zellen [Oltmanns 1996]. Möglicherweise weisen dormante Bakterien durch veränderte Zellmembraneigenschaften ein höheres Resistenzverhalten und eine reduzierte Fluoreszenzneigung durch die erschwerte Penetration der Zellmembran auf [Donelli *et al*. 1998; Signoretto *et al*. 2002]. In der vorliegenden Studie wurden bei den epifluoreszenzmikroskopischen Auszählungen der Bakterien lediglich eindeutig differenzierbare Zellen berücksichtigt. Die Erfassung dieser Selektionsangabe ist für den Vergleich mit anderen Studien von großer Relevanz. Da die Quantifizierung der Bakterien *in situ* stark von äußeren Einflüssen abhängt und physiologisch eine hohe Variabilität aufweist, sollten zur genauen Bestimmung der Bakterienanzahl bei allen Probanden einheitliche Bedingungen eingehalten werden, wie beispielsweise die Nahrungskarenz während der Probenexposition [Arweiler *et al.* 2008; Hannig C *et al.* 2007a; Rehmer 2008].

Die hohe inter- und intraindividuelle Variabilität der Bakterienanzahl bzw. Verteilung auf den Schmelzproben wurde in mehreren Studien aufgezeigt und auch in den Untersuchungen der vorliegenden Studie bestätigt [Rehmer 2008; Hannig C *et al*. 2004; Rykke *et al*. 1990].

Es ist jedoch auch denkbar, dass die hohe Variabilität der Bakterienzahl auf eine unterschiedliche Selektivität der Färbungen hindeutet. Möglicherweise sind die Abweichungen auf unterschiedliche Interaktionen der Farbstoffe mit verschiedenen

Bakterienspezies zurückzuführen. Syto 9 und Propidiumiodid (BacLight) eignen sich beispielsweise besonders für die Darstellung oraler Streptokokkenstämme [Weiger *et al*. 1999; Decker 2001].

In verschiedenen Studien konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei den Bakterien der initialen Adhärenz vor allem um Streptokokken handelt [Dige *et al*. 2007; Jung *et al*. 2010]. Jung *et al*. (2010) konnte eine generelle Differenzierbarkeit der verschiedenen Bakterienformen anhand epifluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen nach Anfärbung mit FISH aufzeigen. Dabei konnten bereits nach 30 min unregelmäßig verteilte Bakterien mit einer kokkenförmigen Struktur auf der Schmelzoberfläche nachgewiesen werden. Die Untersuchung mit FISH und dem konfokalen Lasermikroskop konnte den hohen Streptokokkenanteil während der Phase der initialen Adhärenz belegen [Jung *et al*. 2010]. Als eine mögliche Erklärung für die Dominanz der Streptokokken wird die schnelle Wachstumsrate im Vergleich zu anderen Bakterienspezies diskutiert [Beckers und van der Hoeven 1984]. Zudem konnte bereits nachgewiesen werden, dass bestimmte Pellikelkomponenten wie beispielsweise die Amylase und die prolinreichen Proteine als spezifische Rezeptoren für Streptokokken wirken [Chaudhuri *et al.* 2007; Douglas 1994; Hannig C 2004, 2007; Vacca Smith *et al.* 1996]. Der hohe initiale Streptokokkenanteil könnte daher auch mit der begünstigten Anhaftung an die Pellikel erklärt werden.

In der vorliegenden Studie wurden verschiedene Vitalfärbeverfahren miteinander verglichen. Primärziel war die Suche nach Alternativen zu toxischen und instabilen konventionellen Färbungen wie der Ethidiumbromid/Fluorescein-Diacatat-Methode. Zur Verifizierung der Untersuchungen wurde die Bestimmung der kolonie-bildenden Einheiten herangezogen. In der Mikrobiologie dienten die klassischen Kulturverfahren (CFU) lange Zeit als Goldstandard. Zahlreiche Studien zur Untersuchung des mikrobiellen Biofilms erfordern die Bakterienzüchtung auf speziellen Nährmedien [Guggenheim *et al.* 2001; Hannig C *et al.* 2007a; Jin und Yip 2002]. Es sind jedoch nur 50% aller oralen Bakterien auf einem Nährmedium kultivierbar [Aas *et al.* 2005]. Dennoch ergaben sowohl die Vorversuche als auch die Hauptversuche, die mit sechs Probanden durchgeführt wurden, ähnliche quantitative Ergebnisse: Die mit den CFU bestimmte Bakterienanzahl liegt deutlich höher als die Ergebnisse der Vitalfärbeverfahren. In den Hauptversuchen wurde eine nahezu gleich hohe Anzahl an aeroben und anaeroben Kolonien erfasst (Aerobier: 89 ± 138,4 x 10^4 cm^{-2}; Anaerobier: 99,1 ± 154,3 x 10^4 cm^{-2}). Die in den Hauptversuchen detektierten vitalen Bakterien umfassen insgesamt 2,9 ± 0,8 x 10^4 cm^{-2}. Die ermittelten Werte zwischen CFU und Vitalfärbeverfahren differieren demnach um den Faktor 30. Diese Variabilität und die durch

CFU bestimmte hohe Bakterienanzahl im Vergleich zu anderen Verfahren wurde bereits in mehreren Studien beschrieben [Rehmer 2008; Hannig C *et al.* 2007b; Jung *et al.* 2010]. Unter dem Epifluoreszenzmikroskop sind Bakterienagglomerate nur schwer auszählbar [Rehmer 2008]. Für die Bestimmung der CFU werden die adhärenten Mikroorganismen durch Ultraschalldesorption in einer Lösung verteilt. Diese erforderliche Desorption der einzelnen Bakterien und Bakterienagglomerate führt vermutlich bei der Auszählung der Blutagarplatten durch die Separierung der Bakterienagglomerate zu einer höheren Bakterienanzahl. Rehmer (2008) weist außerdem auf den Unterschied zwischen der Vitalität hin, die durch Vitalfärbeverfahren untersucht wird und der Kultivierbarkeit der Bakterien, welche durch die Kultivierung auf Agarplatten untersucht wird [Kaprelyants *et al.* 1993; Netuschil *et al.* 1996]. Demzufolge scheinen Kulturverfahren für die Erforschung oraler Bioadhäsionsprozesse weniger geeignet zu sein.

Eine andere Möglichkeit zur Verifizierung epifluoreszenzmikroskopischer Verfahren wäre mit der DAPI-Färbung denkbar. Anstatt die in den Vitalfärbeverfahren bestimmten vitalen Zellen mit den durch CFU ermittelten Kulturen zu vergleichen, könnte die Gesamtzahl der mit Vitalfärbeverfahren detektierten Bakterien den DAPI-Ergebnissen gegenübergestellt werden. Ebenso wäre die Ergänzung mit FISH denkbar. Rehmer (2008) hat in einer Gegenüberstellung verschiedener Verfahren die Vitalfärbung (Färbekombination FDA/Etbr), die Fluoreszenz-*In*-*Situ*-Hybridisierung (FISH für Eubakterien) und die Fluoreszenzfärbung mittels DAPI miteinander vergleichen. Mit der DAPI-Färbung wurden die vitalen und avitalen Mikroorganismen erfasst. Bei der Vitalfärbung wurden die einzeln ermittelten Werte der vitalen und avitalen Bakterien zu einer Gesamtanzahl zusammengefasst. Mit der Fluoreszenz-*In*-*Situ*-Hybridisierung wurden alle Eubakterien dargestellt. Aus der Vergleichsstudie konnten quantitativ die meisten Mikroorganismen mit dem Vitalfärbeverfahren ermittelt werden, wobei statistisch kein signifikanter Unterschied zur DAPI-Färbung aufgezeigt werden konnte. Im Durchschnitt wurde hingegen die geringste Zahl detektierter Mikroorganismen bei der Bestimmung der Fluoreszenz-*In*-*Situ*-Hybridisierung ermittelt. Die unterschiedlichen Ergebnisse der Studie resultieren daraus, dass DAPI und die Vitalfärbeverfahren sowohl die vitalen als auch die avitalen Bakterien detektieren, während die Oligonukleotidsonden der FISH lediglich an intakte Ribosomen anhaften können und folglich die vitalen Zellen dargestellt werden. Im Vergleich zu den avitalen Zellen weisen diese eine höhere Anzahl an Ribosomen auf [Amann *et al.* 1995]. Sinnvoller wäre daher der Vergleich von den mit FISH erfassten Zellen mit den vitalen Bakterien, die mit der Vitalfärbung detektiert wurden.

Zwischen den einzelnen Vitalfärbeverfahren dieser Studie konnten im Vergleich untereinander statistisch keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden. Die Färbungen mit FDA/Sytox Red und CFDA/Sytox Red ergeben ähnliche Verteilungen vitaler und avitaler Bakterien (*Abb. 11, 12*). Eine naheliegende Erklärung ist die chemische Strukturverwandschaft zwischen Fluorescein-Diacetat und dem Derivat Carboxyfluorescein-Diacetat. Beide Vorstufen der Fluoreszenzfarbstoffe passieren die Zellmembran durch passive Diffusion und werden intrazellulär durch Hydrolyse zum entsprechenden Fluorochrom umgewandelt [Breeuwer *et al.* 1995]. Die ähnlichen Substanzeigenschaften in Bezug auf die Aufnahme, Hydrolyse und den Efflux aus den zu färbenden Zellen steht im guten Einklang mit den Ergebnissen der Auswertung dieser beiden Fluoreszenzfarbstoffe und erklärt die analoge prozentuale Verteilung der angefärbten Zellen.

Die Auswertung der Vitalfärbeverfahren ergab eine durchschnittliche Verteilung der vitalen und avitalen Zellen von je 50%. Ein hoher Anteil avitaler Bakterien wurde auch in anderen Studien beschrieben: Rehmer (2008) ermittelte in Untersuchungen mit unterschiedlichen intraoralen Inkubationszeiten einen durchschnittlichen avitalen Bakterienanteil von 40%. Er gibt zwei mögliche Erklärungen für diese Verteilung an: entweder adhärieren tote Zellen am Schmelz oder ein großer Anteil der adhärenten Bakterien wird kontinuierlich durch Enzyme wie beispielsweise Lysozym inaktiviert [Hannig C *et al*. 2005b]. Möglicherweise interagieren Pellikelproteine wie Amylase weiterhin mit spezifischen Membranrezeptoren der avitalen Zellen [Marsh und Bradshaw 1995; Marsh und Martin 1999]. Dadurch könnten avitale Zellen über einen längeren Zeitraum an der Schmelzoberfläche haften bleiben. Die lytische Inaktivierung lässt sich gut mit dem Nachweis von Lysozym erklären, welches schon nach einer Minute in aktiver Konformation in der Pellikel vorhanden ist [Hannig C *et al*. 2005b].

In den Versuchen konnte gezeigt werden, dass Färbekombinationen mit Sytox red für die Darstellung der avitalen Zellen eine geringere Anzahl toter Mikroorganismen aufzeigen, als Propidiumiodid. Es ist naheliegend, dass im Fall von Ethidiumbromid, die bakterizide Eigenschaft des Farbstoffes eine Wirkung auf die Bakterien ausübt. Die Interaktion des toxischen Ethidiumbromids mit den Bakterien könnte zu einem höheren avitalen Bakterienanteil führen. Bereits unter dem Mikroskop konnte während den Auswertungen dieser Studie beobachtet werden, wie initial vital dargestellte Zellen ihre Vitalität verloren und rot fluoreszierten. In der Auswertung mit Propidiumiodid wurden prozentual die meisten avitalen Bakterien detektiert (*Abb. 11; 12*). Mit der FDA/PI-Färbung lag ein avitaler Bakterienanteil von über 60% vor. Dieses Vital/Tot-Verhältnis unterscheidet sich von den anderen Vitalfärbeverfahren. Denkbare Gründe könnten die Polarität der PI-Moleküle sein,

die eine höhere Affinität zur DNA bewirken. Zusätzlich könnte die Molekülgröße des Propidiumiodids eine Rolle bei der Zellpenetration spielen. Zudem besteht die Möglichkeit, dass Propidiumiodid durch bakterizide Eigenschaften einen Einfluss auf die Zellvitalität ausübt. In neueren Studien wurde aktuell die Penetrationseigenschaft der PI-Moleküle genauer untersucht: Davey und Hexley (2011) haben in einer Studie die Färbeeigenschaft von Propidiumiodid auf Saccharomycesstämmen untersucht, die verschiedenen Stressbedingungen ausgesetzt waren. Die Stressbedingungen führen bei den Zellen zu einer Änderung ihrer Permeabilität und letztendlich durch die zerstörte Zellmembran zum Zelltod. Durch die veränderte Membraneigenschaft sind PI-Moleküle in der Lage, die Zellen zu penetrieren und intrazellulär zu akkumulieren. Die Fluoreszenz ist unter dem Mikroskop nachweisbar. Davey und Hexley (2011) beschreiben in ihrer Studie eine Subpopulation von ca. 7% der Stress ausgesetzten Zellen, die nach PI-Exposition nicht avital werden, sondern die Eigenschaft der Zellrehabilitation besitzen. Nach Aufnahme der PI-Moleküle gelingt es diesem Zellanteil, ihre Zellmembran zu reparieren. Eine erneute PI-Exposition hat keinen Einfluss auf die Zellen. Dieses Färbeverfahren scheint zu einer Überbestimmung der avitalen Zellen zu führen und ist im Vergleich zu den anderen Verfahren weniger geeignet. Bei Färbungen mit Propidiumiodid müsste berücksichtigt werden, dass PI-positive Zellen nicht nur primär avitale Zellen darstellen [Davey und Hexley 2011]. Dies betont die komplexe und kontrovers diskutierte Unterteilung der Vitalitätsstadien und dessen fließende Übergänge ineinander. Studien zur PI-Anfärbung von Stressbedingungen ausgesetzten Streptokokkenstämmen stehen noch aus.

Ausblick:

Für die Untersuchung der Wirkung oraler Therapeutika sowie unterschiedlicher Spüllösungen und Desinfektionsmittel können folgende Live/Dead-Färbungen in gleicher Weise zur Anwendung gebracht werden: BacLight, FDA/Sytox red, Calcein AM/Sytox red und CFDA/Sytox red.

Mit den Fluoreszenzfarbstoffen können auch die oralen Bioadhäsionsprozesse auf unterschiedlichen Materialoberflächen weiterführend untersucht werden. Zudem könnte die Vitalitätsverteilung im Biofilm und auf kariösen Läsionen verglichen werden.

Schlussfolgerungen:

- Es konnten zuverlässige Alternativen zur klassischen Vitalfärbung (FDA/Etbr) etabliert werden. Die Live/Dead-Färbungen BacLight, FDA/Sytox red, Calcein AM/Sytox red und CFDA/Sytox red sind geeignete Optionen.
- Epifluoreszenzmikroskopische Auszählungen ermöglichen eine grundlegende Einschätzung des Ausmaßes der bakteriellen Kolonisation. Das Verhältnis der vitalen/avitalen Zellen ist eine aussagekräftige Größe für die Quantifizierung adhärenter Bakterien während der initialen bakteriellen Adhärenz.
- Die Anwendung der klassischen Kulturverfahren ist als Goldstandard für die Evaluation des initialen Biofilms nicht geeignet.

6 Zusammenfassung

6.1 Deutsch

Fragestellung: Orale Biofilme spielen eine zentrale Rolle bei der Entwicklung und dem Verlauf von Karies und Parodontopathien. Um geeignete Prophylaxekonzepte zu erarbeiten, ist das Verständnis oraler Bioadhäsionsprozesse notwendig. Ziel dieser Studie war es, verschiedene Vitalfärbeverfahren zur Visualisierung und Quantifizierung der initialen Adhärenz an *in situ* exponierten Schmelzproben zu untersuchen und verlässliche Alternativen zur Färbung mit Ethidiumbromid zu etablieren.

Material und Methode: Die initiale bakterielle Kolonisation wurde an *in situ* getragenen bovinen Schmelzproben untersucht (n = 6 Probanden). Die Probekörper wurden bukkal an Oberkiefer-Tiefziehschienen befestigt. Nach Vorversuchen mit verschiedenen Vitalfärbeverfahren wurden fünf verschiedene Live/Dead-Verfahren in zwei Durchläufen untersucht (FDA/PI, Syto 9/PI [BacLight], FDA/Sytox red, Calcein AM/Sytox red, CFDA/Sytox red). Nach einer intraoralen Expositionszeit von 120 min wurden die Schmelzprüfkörper für die verschiedenen Vitalfärbeverfahren vorbereitet und den jeweiligen Verfahren zugeführt. Die Auswertung erfolgte unter dem Epifluoreszenzmikroskop. Zusätzlich zu den Vitalfärbeverfahren wurden bei jedem Durchlauf die kolonie-bildenden Einheiten nach ultraschallgestützter Desorption bestimmt.

Ergebnisse: Die fünf Live/Dead-Verfahren zeichneten sich durch Farbstabilität, Anwenderfreundlichkeit und gute Differenzierbarkeit vitaler und avitaler Mikroorganismen aus. Insgesamt wurde mit diesen Vitalfärbeverfahren eine durchschnittliche Bakterienanzahl von $2{,}9 \pm 0{,}8 \times 10^4$ cm^{-2} ermittelt. Mit den Vitalfärbungen Syto 9/PI und Calcein AM/Sytox red konnte ein nahezu gleiches Verhältnis vitaler und avitaler Mikroorganismen detektiert werden (Syto 9/PI: 45% vital, 55% avital; Calcein AM/Sytox red: 52% vital, 48% avital). Die Vitalfärbungen CFDA/Sytox red und FDA/Sytox red erfassten ein Lebend/Tot-Verhältnis von 3:2. Ein davon abweichendes Verhältnis mit einem hohen Anteil avitaler Bakterien wurde bei der Färbekombination FDA/PI ermittelt (vital: 34%, avital: 66%).

Schlussfolgerung: Geeignete Verfahren für die Differenzierung vitaler und avitaler Bakterien im initialen oralen Biofilm sind folgende Live/Dead-Färbungen: BacLight, FDA/Sytox red, Calcein AM/Sytox red und CFDA/Sytox red. Diese Färbeverfahren sind adäquate Alternativen zu toxischen und instabilen konventionellen Methoden wie der FDA/Etbr-Färbung.

6.2 Englisch

Aims: Oral biofilms are essential for the development and formation of caries and periodontitis. In order to establish suitable therapies the comprehension of oral bioadhesion is necessary. The aim of the present study was to investigate different fluorescence-based, two-colour viability assays for visualization and quantification of initial bacterial adherence on *in situ* exposed enamel slabs, and to establish reliable alternatives to the ethidium bromide staining procedure.

Materials and Methods: Initial bacterial colonization was carried out *in situ* on bovine enamel slabs (n = 6 subjects), fixed buccally to individually manufactured upper jaw splints. A total of five different live/dead assays were investigated in two throughputs (FDA/PI, Syto 9/PI [BacLight], FDA/Sytox red, Calcein AM/Sytox red, CFDA/Sytox red). After 120 min of oral exposure, the specimens were prepared for the different fluorescence methods. Analysis was performed with an epifluorescence microscope. In addition to the staining protocols, the number of colony forming units was quantified after ultrasonically induced desorption.

Results: The five live/dead assays were distinguished by stability of the colour, good applicability and reliable differentiation of viable and avital cells (FDA/PI, Syto 9/PI [BacLight], FDA/Sytox red, Calcein AM/Sytox red und CFDA/Sytox). These methods identified an average bacterial quantity of $2,9 \pm 0,8 \times 10^4$ cm^{-2}. Quantification with Syto 9/PI and Calcein AM/Sytox red yielded an almost equal distribution of viable and avital cells (Syto 9/PI: 45% viable and 55 % avital; Calcein AM/Sytox red: 52% viable and 48% avital). In the CFDA/Sytox red and FDA/Sytox red assays the monitored live/dead distribution was approximately 3:2. An aberrant dispersal was detected with FDA/PI only (viable: 34%, avital: 66%).

Conclusion: The following live/dead assays are reliable techniques for differentiation of viable and avital bacteria in the initial oral biofilm: BacLight, FDA/Sytox red, Calcein AM/Sytox red and CFDA/Sytox red. These fluorescence-based staining procedures are applicable alternatives to toxic and instable conventional assays, such as the staining procedure based on ethidium bromide.

7 Abkürzungsverzeichnis

bidest.	doppelt destilliert
BSE	bovine spongiforme Enzephalopathie
CEMOVIS	cryo-electron microscopy of virtuous sections
CFDA	Carboxyfluorescein-Diacetat
CFU	colony forming units (Kolonie-bildende Einheiten)
CLSM	confocal laser scanning microscope
CO	Columbia Blut (Agarplatten)
DAPI	4´, 6-Diamidino-2-Phenylindol
DNA	desoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ESEM	environmental scanning electron microscope
Etbr	Ethidiumbromid
Eub.	Eubakterien
FDA	Fluoresceindiacetat
FISH	Fluoreszenz-*In-Situ*-Hybridisierung
Gl.	Glandula
HCB	Hefe-Cystein-Blut (Agarplatten)
min	Minute
MG1 (MUC5B)	high molecular weight mucin glycoprotein
MG2 (MUC7)	low molecular weight mucin glycoprotein
NaCl	Natriumchlorid
p	Signifikanzniveau
PI	Propidiumiodid
(r) RNA	(ribosomal) ribonucleic acid
s	Sekunde
SEM	scanning electron microscope
SD	Standardabweichung
Strep.	Streptokokken
TEM	transmission electron microscope
TFDA	Tetrachlorofluorescein-Diacetat
VBNC	vital but not culturable

8 Datenanhang

	Vergleich der Vitalfärbeverfahren, vitale Bakterien, Tukey-Test			
	FDA/ Sytox red	**Syto 9**/PI	**CFDA**/Sytox red	**Calcein AM**/ Sytox red
FDA/PI	0,335	1,000	0,999	0,950
FDA/Sytox red		0,438	0,491	0,771
Syto 9/PI			1,000	0,982
CFDA/Sytox red				0,991

*Tabelle 5: Paarweiser Vergleich der Ergebnisse aller Vitalfärbeverfahren für **vitale** Bakterien. Orale Expositionszeit t = 120 min, n = 12 Proben/Verfahren, 6 Probanden,* Signifikanzniveau p≤0,05.

	Vergleich der Vitalfärbeverfahren, avitale Bakterien, Tukey-Test			
	FDA/ **Sytox red**	Syto 9/**PI**	CFDA/**Sytox red**	Calcein AM/ **Sytox red**
FDA/**PI**	0,894	0,794	0,295	0,730
FDA/**Sytox red**		0,999	0,824	0,997
Syto 9/**PI**			0,915	1,000
CFDA/**Sytox red**				0,948

*Tabelle 6: Paarweiser Vergleich der Ergebnisse aller Vitalfärbeverfahren für **avitale** Bakterien. Orale Expositionszeit t = 120 min, n = 12 Proben pro Verfahren, 6 Probanden,* Signifikanzniveau p≤0,05.

	Vitalfärbeverfahren, Anzahl der Bakterien [10^4/cm²] MW ± SD	
	vital	avital
FDA/PI	2,2 ± 1,1	4,2 ± 3,9
FDA/Sytox red	4,3 ± 4,5	3,2 ± 3,2
Syto 9/PI	2,4 ± 1,4	2,9 ± 2,9
CFDA/Sytox red	2,5 ± 1,4	1,9 ± 1,0
Calcein AM/ Sytox red	3,0 ± 3,4	2,8 ± 2,5
Gesamtwerte aller Verfahren	2,7 ± 0,4	3,0 ± 2,9

Tabelle 7: Vitalfärbeverfahren zur Darstellung vitaler und avitaler adhärenter Bakterien. Expositionszeit t = 120 min, n = 12 Proben/Verfahren, 6 Probanden,
Signifikanzniveau p≤0,05. MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung.

	Maximal- und Minimalwerte detektierter Bakterien mit CFU [10^4/cm^2]			
	aerobe Kolonien		anaerobe Kolonien	
Probanden	Minimum	Maximum	Minimum	Maximum
1	16,2	417,2	16,4	510
2	3,6	70,9	3,8	43,9
3	3,7	31,4	2,4	65,3
4	1,4	151,4	42,2	130,7
5	2,5	87,1	12,2	398
6	17,4	417,2	16,4	509,9

Tabelle 8: Gegenüberstellung der maximalen und der minimalen Bakterienanzahl für die mit den kolonie-bildenden Einheiten (CFU) detektierten aeroben und anaeroben Bakterien bei allen Probanden. Expositionszeit t = 120 min, n = 24 Proben, 6 Probanden.

9 Literaturverzeichnis

Aas, J. P. (2005). *Defining the normal bacterial flora of the oral cavity.* J Clin Microbiol 43: 5721-5732.

Ahmed, S., Liu, C. C., & Nawshad, A. (2007). *Mechanisms of palatal epithelial seam disintegration by transforming growth factor (TGF) beta3.* Dev Biol 309: 193-207.

Al-Ahmad, A., Follo, M., Selzer, A. C., Hellwig, E., Hannig, M., & Hannig, C. (2009). *Bacterial colonization of enamel in situ investigated using fluorescence in situ hybridization.* J Med Microbiol 58: 1359-1366.

Al-Ahmad, A., Roth, D., Wolkewitz, M., Wiedmann-Al-Ahmad, M., Follo, M., Ratka-Krüger, P., Deimling, D., Hellwig, E., & Hannig, C. (2010a). *Change in diet and oral hygiene over an 8-week period: effects on oral health and oral biofilm.* Clin Oral Investig 14: 391-396.

Al-Ahmad, A., Wiedmann-Al-Ahmad, M., Faust, J., Bächle, M., Follo, M., Wolkewitz, M., Hannig, C., Hellwig, E., Carvalho, C., & Kohal, R. (2010b). *Biofilm formation and composition on different implant materials in vivo.* J Biomed Mater Res B Appl Biomater 95:101-109.

Al-Ahmad, A., Wunder, A., Auschill, T. M., Follo, M., Braun, G., Hellwig, E., & Arweiler, N. B. (2007). *The in vivo dynamics of Streptococcus spp., Actinomyces naeslundii, Fusobacterium nucleatum and Veillonella spp. in dental plaque biofilm as analysed by five-colour multiplex fluorescence in situ hybridization.* J Med Microbiol 56: 681-687.

Al-Amoudi, A., Chang, J. J., Leforestier, A., McDowall, A., Salamin, L. M., Norlén, L. P. O., Richter, K., Blanc, N. S., Studer, D., & Dubochet, J. (2004). *Cryo-electron microscopy of vitreous sections.* EMBO J 23: 3583–3588.

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

Ames BN, M. J., Mccann, J., & Yamasaki, E. (1975). *Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test.* Mutat Res 31: 347-364.

Amann, R. I., Binder, B. J., Olson, R. J., Chisholm, S. W., Devereux, R., & Stahl, D. A. (1990). *Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations.* Appl Environ Microbiol 56: 1919-1925.

Amann, R. I., Ludwig, W., & Schleifer, K. H. (1995). *Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation.* Microbiol Rev 59: 143-169.

Amman, R. I. (1995). *In situ identification of micro-organisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes.* Molecular Microbial Ecology Manual. A.D.L. Akkermans, J.D. van Elsas and F. J. de Bruijin. Dordrecht, the Netherlands, Kluwer Publishers. 3.3.6.: 1-15.

Arweiler, N. B., Auschill, T. M., Baguley, N., Netuschil, N., & Sculean, A. (2003). *Efficacy of an amine fluoride-triclosan mouthrinse as compared to the individual active ingredients.* J Clin Periodontol 30: 192-196.

Arweiler, N. B., Auschill, T. M., Donos, N., & Sculean, A. (2002). *Antibacterial effect of an enamel matrix protein derivative on in vivo dental biofilm vitality.* Clin Oral Investig 6: 205-209.

Arweiler, N. B., Boehnke, N., Sculean, A., Hellwig, E., & Auschill, T. M. (2006). *Differences in efficacy of two commercial 0.2% chlorhexidine mouthrinse solutions: a 4-day plaque re-growth study.* J Clin Periodontol 33: 334-339.

Arweiler, N. B., Hellwig, E., Sculean, A., Hein, N., & Auschill, T. M. (2004). *Individual vitality pattern of in situ dental biofilms at different locations in the oral cavity.* Caries Res 38: 442-447.

Arweiler, N. B., Lenz, R., Sculean, A., Al-Ahmad, A., Hellwig, E., & Auschill, T. M. (2008). *Effect of food preservatives on in situ biofilm formation.* Clin Oral Investig 12: 203-208.

Auschill, T. M., Arweiler, N. B., Brecx, M., Reich, E., Sculean, A., & Netuschil, L. (2002). *The effect of dental restorative materials on dental biofilm.* Eur J Oral Sci 110: 48-53.

Auschill, T. M., Arweiler, N. B., Netuschil, L., Brecx, M., Reich, E., & Sculean, A. (2001). *Spatial distribution of vital and dead microorganisms in dental biofilms.* Arch Oral Biol 46: 471-476.

Auschill, T. M., Hellwig, E., Sculean, A., Hein, N., & Arweiler, N. B. (2004). *Impact of the intraoral location on the rate of biofilm growth.* Clin Oral Investig 8: 97-101.

Barbesti, S., Citterio, S., Labra, M., Baroni, M. D., Neri, M. G., & Sgorbati, S. (2000). *Two and three-color fluorescence flow cytometric analysis of immunoidentified viable bacteria.* Cytometry 40: 214-218.

Beckers, H. J., & van der Hoeven, J. S. (1984). *The effects of mutual interaction and host diet on the growth rates of the bacteria Actinomyces viscosus and Streptococcus mutans during colonization of tooth surfaces in di-associated gnotobiotic rats*. Arch Oral Biol 29: 231-236.

Behlau, I., & Gilmore, M. (2008). *Microbial biofilms in ophthalmology and infectious disease.* Arch Ophthalmol 126: 1572-1581.

Beletsky, I. P., & Umansky, S. R. (1990). *A new assay for cell death.* J Immunol Methods 134: 201-205.

Bell, A., Creanor, S. L., Foye, R. H., & Saunders, W. P. (1999). *The effect of saliva on fluoride release by a glass-ionomer filling material.* J Oral Rehabil 26: 407-412.

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

Bergmans, L., Moisiadis, P., Van Meerbeek, B., Quirynen, M., & Lambrechts, P. (2005). *Microscopic observation of bacteria: review highlighting the use of environmental SEM.* Int Endod J 38: 775-788.

Berney, M., Hammes, F., Bosshard, F., Weilenmann, H. U., & Egli, T. (2007). *Assessment and Interpretation of Bacterial Viability by Using the LIVE/DEAD BacLight Kit in Combination with Flow Cytometry.* Appl Environ Microbiol 73: 3283-3290.

Bottari, B., Ercolini, D., Gatti, M., & Neviani, E. (2006). *Application of FISH technology for microbiological analysis: current state and prospects.* Appl Microbiol Biotechnol 73: 485-494.

Bouchet-Marquis, C., & Fakan, S. (2009). *Cryoelectron microscopy of vitreous sections: a step further towards the native state.* Methods Mol Biol 464: 425-439.

Bradway, S., Bergay, E., Jones, P., & Levine, M. (1989). *Oral mucosal pellicle. Adsorption and transpeptidation of salivary components to buccal epithelial cells.* Biochem J 261:887-896.

Bradway, S., Bergey, E., Scannapieco, F., & Ramasubbu, N. (1992). *Formation of salivary-mucosal pellicle: the role of transglutaminase.* Biochem J 284: 557-564.

Brecx, M., Holm-Pedersen, P., & Theilade, J. (1985). *Early plaque formation in young and elderly individuals.* Gerodontics 1: 8-13.

Brecx, M., Rönstrom, A., Theilade, J., & Attström, R. (1981). *Early formation of dental plaque on plastic films. 2. Electron microscopic observations.* J Periodontal Res 16: 213-227.

Breeuwer, P., Drocourt, J. L., Bunschoten, N., Zwietering, M. H., Rombouts, F. M., & Abee, T. (1995). *Characterization of uptake and hydrolysis of fluorescein diacetate and carboxyfluorescein diacetate by intracellular esterases in Saccharomyces cerevisiae, which result in accumulation of fluorescent product.* Appl Environ Microbiol 61: 1614-1619.

Buchalla, W., Lennon, A. M., & Attin, T. (2004). *Fluorescence spectroscopy of dental calculus*. J Periodontal Res 39: 327-332.

Carlén, A., Börjesson, A., Nikdel, K., & Olsson, J. (1998). *Composition of pellicles formed in vivo on tooth surfaces in different parts of the dentition, and in vitro on hydroxyapatite.* Caries Res 32: 447-455.

Carlén, A., Rüdiger, S., Loggner, I., & Olsson, J. (2003). *Bacteria-binding plasma proteins in pellicles formed on hydroxyapatite in vitro and on teeth in vivo.* Oral Microbiol Immunol 18: 203-207.

Carson, K. R., Goodell, G. G., & McClanahan, S. B. (2005). Comparison of the antimicrobial activity of six irrigants on primary endodontic pathogens. J Endod 31: 471-473.

Cassels, F. H. (1995). *Adhesin receptors of human oral bacteria and modeling of putative adhesin-binding domains.* J Ind Microbiol 15: 176-185.

Cassina, V., Seruggia, D., Beretta, G. L., Salerno, D., Brogioli, D., Manzini, S., et al. (2010). *Atomic force microscopy study of DNA conformation in the presence of drugs.* Eur Biophys J im Druck.

Chaudhuri, B. R., Rojek, J., Vickerman, M. M., Tanzer, J. M., & Scannapieco, F. A. (2007). *Interaction of salivary alpha-amylase and amylase-binding-protein A (AbpA) of Streptococcus gordonii with glucosyltransferase of S. gordonii and Streptococcus mutans.* BMC Microbiol 7: 60.

Christersson, C. E. (1991). *On salivary film formation and bacterial retention to solids. A methodological and experimental in vitro study.* Swed Dent J Suppl 77: 1-82.

Christiansen, T., Michaelsen, S., Wümpelmann, M., & Nielsen, J. (2003). *Production of savinase and population viability of Bacillus clausii during high-cell-density fed-batch cultivations.* Biotechnol Bioeng 83: 344-352.

Colwell, R. R., Brayton, P. R., Grimes, D. J., Roszak, D. B., Huq, S. A., & Palmer, L. M. (1985). *Viable but Non-Culturable Vibrio cholerae and Related Pathogens in the Environment: Implications for Release of Genetically Engineered Microorganisms.* Nature Biotechnology 3: 817-820.

Costerton, J. L.-S. (1995). *Microbial biofilms.* Annu Rev Microbiol 49: 711-745.

Costerton, J. (1995). *Overview of microbial biofilms.* J Ind Microbiol 15: 137-140.

Costerton, J. W., Cheng, K. J., Geesey, G. G., Ladd, T. I., Nickel, J. C., Dasgupta, M., & Marrie, T. J. (1987). *Bacterial biofilms in nature and disease.* Annu Rev Microbiol 41: 435-464.

Costerton, J. W., Montanaro, L., & Arciola, C. R. (2005). *Biofilm in implant infections: its production and regulation.* Int J Artif Organs 28: 1062-1068.

Dangl, J. L., Parks, D. R., Oi, V. T., & Herzenberg, L. A. (1982). *Rapid isolation of cloned isotype switch variants using fluorescence activated cell sorting.* Cytometry 2: 395-401.

Davey, H. M., & Hexley, P. (2011). *Red but not dead? Membranes of stressed Saccharomyces cerevisiae are permeable to propidium iodide*. Environ Microbiol 13: 163-171.

Davidson, C. L., Boom, G., & Arends, J. (1973). Calcium distribution in human and bovine surface enamel. Caries Res 7: 349-359.

Dawes, C., Jenkins, G. N., & Tonge, C. H. (1963). *The Nomenclature of the Integuments of the Enamel Surface of Teeth.* Br Dent J 115: 65-68.

Decker, E. M. (2001). *The ability of direct fluorescence-based, two-colour assays to detect different physiological states of oral streptococci.* Lett Appl Microbiol 33: 188-192.

Deimling, D., Hannig, C., Hoth-Hannig, W., Schmitz, P., Schulte-Mönting, J., & Hannig, M. (2007). *Non-destructive visualisation of protective proteins in the in situ pellicle.* Clin Oral Investig 11: 211-216.

Diaz, P. I., Chalmers, N. I., Rickard, A. H., Kong, C., Milburn, C. L., Palmer, R. J. Jr., & Kolenbrander, P. E. (2006). *Molecular characterization of subject-specific oral microflora during initial colonization of enamel.* Appl Environ Microbiol 72: 2837-2848.

Dige, I., Nilsson, H., Kilian, M., & Nyvad, B. (2007). *In situ identification of streptococci and other bacteria in initial dental biofilm by confocal laser scanning microscopy and fluorescence in situ hybridization.* Eur J Oral Sci 115: 459-467.

Dige, I., Raarup, M. K., Nyengaard, J. R., Kilian, M., & Nyvad, B. (2009). *Actinomyces naeslundii in initial dental biofilm formation.* Microbiology 155: 2116-2126.

Donelli, G., Matarrese, P., Fiorentini, C., Dainelli, B., Taraborelli, T., Di Campli, E., Di Bartolomeo, S., & Cellini, L. (1998). *The effect of oxygen on the growth and cell morphology of Helicobacter pylori.* FEMS Microbiol Lett 168: 9-15.

Donlan, R. M. (2002). *Biofilms: Microbial Life on Surfaces.* Emerg Infect Dis 8: 881–890.

Douglas, C. (1994). *Bacterial-protein interactions in the oral cavity.* Adv Dent Res 8: 254-262.

Douglas, C. (1990). *Characterization of the alpha-amylase receptor of Streptococcus gordonii NCTC 7868.* J Dent Res 69: 1746-1752.

Embery, G., Heaney, T. G., & Stanbury, J. B. (1986). *Studies on the organic polyanionic constituents of human acquired dental pellicle.* Arch Oral Biol 31: 623-625.

Esser, M., Tinschert, J., & Marx, R. (1998). *Materialkennwert der Zahnhartsubstanz des Rindes im Vergleich zur humanen Zahnhartsubstanz*. Dtsch Zahnarztl Z 53: 713-717 .

Finke, M., Parker, D. M., & Jandt, K. D. (2002). *Influence of soft drinks on the thickness and morphology of in situ acquired pellicle layer on enamel.* J Colloid Interface Sci 251: 263-270.

Flemming, H. C., & Wingender, J. (2001). *Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs) - Part I: Structural and ecological aspects.* Water Sci Technol 43:1-8.

Flemming, H. C., & Wingender, J. (2001). *Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs) - Part II: Technical aspects.* Water Sci Technol 43: 9-16.

Galhano, G., de Melo, R. M., Valandro, L. F., & Bottino, M. A. (2009). *Comparison of resin push-out strength to root dentin of bovine- and human-teeth*. Indian J Dent Res 20: 332-336.

Gaudie, W. (2006). *Contamination of dental unit waterlines: a re-evaluation.* J N Z Soc Periodontol 89: 12-16.

Giardino, L., Savoldi, E., Ambu, E., Rimondini, R., Palezona, A., & Debbia, E. A. (2009). *Antimicrobial effect of MTAD, Tetraclean, Cloreximid, and sodium hypochlorite on three common endodontic pathogens*. Indian J Dent Res 20: 391.

Glazer, A. N., Peck, K., & Mathies, R. A. (1990). *A stable double-stranded DNA-ethidium homodimer complex: application to picogram fluorescence detection of DNA in agarose gels.* Proc Natl Acad Sci U S A 87: 3851-3855.

Glockmann, E., Gehroldt, C., & Triemer, K. (1997). *Freisetzung von Fluorid aus unterschiedlichen Glasionomerzementen.* Dtsch Zahnärztl Z 52: 668-672.

Gristina, A., Naylor, P., & Myrvik, Q. (1988). *Infections from biomaterials and implants: a race for the surface.* Med Prog Technol 14: 205-224.

Guggenheim, B., Giertsen, E., Schüpbach, P., & Shapiro, S. (2001). *Validation of an in vitro biofilm model of supragingival plaque*. J Dent Res 80: 363-370.

Guggenheim, B., Gmür, R., Galicia, J. C., Stathopoulou, P. G., Benakanakere, M. R., Meier, A., Thurnheer, T., & Kinane, D. F. (2009). *In vitro modeling of host-parasite interactions: the 'subgingival' biofilm challenge of primary human epithelial cells*. BMC Microbiol 9: 280.

Guilbault, G. G., & Kramer, D. N. (1965). *Fluorometric procedure for measuring the activity of dehydrogenases.* Anal Chem 37: 1219-1221.

Hajishengallis, G., Nikolova, E., & Russell, M. (1992). *Inhibition of Streptococcus mutans adherence to saliva-coated hydroxyapatite by human secretory immunoglobulin A (S-IgA) antibodies to cell surface protein antigen I/II: reversal by IgA1 protease cleavage.* Infect Immun 60: 5057-5064.

Hannig, C., & Hannig, M. (2009a). *Enzyme in der Pellikel - eine Synopsis.* Dtsch Zahnärztl Z 64: 533-547.

Hannig, C., & Hannig, M. (2009b). *The oral cavity - a key system to understand substratum-dependent bioadhesion on solid surfaces in man.* Clin Oral Investig 13: 123-139.

Hannig, C., Attin, T., Hannig, M., Henze, E., Brinkmann, K., & Zech, R. (2004). *Immobilisation and activity of human alpha-amylase in the acquired enamel pellicle.* Arch Oral Biol 49: 469-475.

Hannig, C., Berndt, D., Hoth-Hannig, W., & Hannig, M. (2009). *The effect of acidic beverages on the ultrastructure of the acquired pellicle - an in situ study.* Arch Oral Biol 54: 518-526.

Hannig, C., Follo, M., Hellwig, E., & Al-Ahmad, A. (2010c). *Visualization of adherent micro-organisms using different techniques.* J Med Microbiol 59: 1-7.

Hannig, C., Hannig, M., & Attin, T. (2005a). *Enzymes in the acquired enamel pellicle.* Eur J Oral Sci 113: 2-13.

Hannig, C., Hannig, M., Rehmer, O., Braun, G., Hellwig, E., & Al-Ahmad, A. (2007a). *Fluorescence microscopic visualisation and quantification of initial bacterial colonization on enamle in situ.* Arch Oral Biol 52: 1048-1056.

Hannig, C., Hoch, J., Becker, K., Hannig, M., & Attin, T. (2005b). *Lysozyme activity in the initially formed in situ pellicle.* Arch Oral Biol 50: 821-828.

Hannig, C., Huber, K., Lambrichts, I., Gräser, J., D'Haen, J., & Hannig, M. (2007b). *Detection of salivary alpha-amylase and lysozyme exposed on the pellicle formed in situ on different materials.* J Biomed Mater Res A 83: 98-103.

Hannig, C., Ruggeri, A., Al-Khayer, B., Schmitz, P., Spitzmüller, B., Deimling, D., Huber, K., Hoth-Hannig, W., Bowen, W. H., & Hannig, M. (2008a). *Electron microscopic detection and activity of glucosyltransferase B, C, and D in the in situ formed pellicle.* Arch Oral Biol 53: 1003-1010.

Hannig, C., Spies, B., Spitzmüller, B., & Hannig, M. (2010a). *Efficacy of enzymatic mouth rinses for immobilisation of protective enzymes in the in situ pellicle.* Arch Oral Biol 55: 1-6.

Hannig, C., Spitzmüller, B., Hellwig, E., & Hannig, M. (2008b). *Intrinsic enzymatic crosslinking and maturation of the in situ pellicle.* Arch Oral Biol 53 : 416-422.

Hannig, C., Spitzmüller, B., Lux, H. C., Altenburger, M., Al-Ahmad, A., & Hannig, M. (2010b). *Efficacy of enzymatic toothpastes for immobilisation of protective enzymes in the in situ pellicle*. Arch Oral Biol 55: 463-469.

Hannig, C., Wasser, M., Becker, K., Hannig, M., Huber, K., & Attin, T. (2006). *Influence of different restorative materials on lysozyme and amylase activity of the salivary pellicle in situ.* J Biomed Mater Res A 78: 755-761.

Hannig, M. (1997). *Transmission electron microscopic study of in vivo pellicle formation on dental restorative materials.* Eur J Oral Sci 105: 422-433.

Hannig, M. (1999a). *Transmission electron microscopy of early plaque formation on dental materials in vivo.* Eur J Oral Sci 107: 55-64.

Hannig, M. (1999b). *Ultrastructural investigation of pellicle morphogenesis at two different intraoral sites during a 24-h period.* Clin Oral Investig 3: 88-95.

Hannig, M., & Balz, M. (1999). *Influence of in vivo formed salivary pellicle on enamel erosion.* Caries Res 33: 372-379.

Hannig, M., & Bössmann, K. (1989a). *Pellicula dentis (I) – Ultrastrukturelle Vielfalt als Ausdruck komplexer Bildung und Reifung.* Quintessenz 40: 1319-1327.

Hannig, M., & Bössmann, K. (1989b). *Pellicula dentis (II) – Ultrastrukturelle Vielfalt als Ausdruck komplexer Bildung und Reifung.* Quintessenz 40: 1485-1489.

Hannig, M., & Hannig, C. (2007a). *Der initiale orale Biofilm – pathogen oder protektiv?* Oralprophylaxe 29: 73–82 .

Hannig, M., & Hannig, C. (2007b). *Does a dental biofilm, free of bacteria, exist in situ?* Parodontologie et Implantologie orale 26: 187-200.

Hannig, M., & Joiner, A. (2006). *The structure, function and properties of the acquired pellicle.* Monogr Oral Sci 19: 29-64.

Hannig, M., Döbert, A., Stigler, R., Müller, U., & Prokhorova, S. A. (2004a). *Initial salivary pellicle formation on solid substrates studied by AFM.* J Nanosci Nanotechnol 4: 532-538.

Hannig, M., Fiebiger, M., Güntzer, M., Döbert, A., Zimehl, R., & Nekrashevych, Y. (2004b). *Protective effect of the in situ formed short-term salivary pellicle.* Arch Oral Biol 49: 903-910.

Hannig, M., Hess, N. J., Hoth-Hannig, W., & De Vrese, M. (2003). *Influence of salivary pellicle formation time on enamel demineralization - an in situ pilot study.* Clin Oral Investig 7: 158-161.

Hannig, M., Khanafer, A., Hoth-Hannig, W., Al-Marrawi, F., & Açil, Y. (2005). *Transmission electron microscopy comparison of methods for collecting in situ formed enamel pellicle.* Clin Oral Investig 9: 30-37.

Hara, A., & Zero, D. (2010). *The caries environment: saliva, pellicle, diet, and hard tissue ultrastructure.* Dent Clin North Am 54: 455-467.

Harrison, J. C. (2006). *The use of microscopy and three-dimensional visualization to evaluate the structure of microbial biofilms cultivated in the Calgary Biofilm Device.* Biol Proced Online: 194-215.

Hay, D. (1973). *The interaction of human parotid salivary proteins with hydroxyapatite.* Arch Oral Biol 18: 1517-1529.

Hiroi, T., Fukushima, K., Kantake, I., Namiki, Y., & Ikeda, T. (1992). *De novo glucan synthesis by mutants streptococcal glucosyltransferases present in pellicle promotes firm binding of Streptococcus gordonii to tooth surfaces.* FEMS Microbiol Lett 75: 193-198.

Jefferson, K. K., Goldmann, D. A., & Pier, G. B. (2005). *Use of confocal microscopy to analyze the rate of vancomycin penetration through Staphylococcus aureus biofilms.* Antimicrob Agents Chemother 49: 2467-2473.

Jepras, R. I., Carter, J., Pearson, S. C., Paul, F. E., & Wilkinson, M. J. (1995). *Development of a robust flow cytometric assay for determining numbers of viable bacteria.* Appl Environ Microbiol 61: 2696-2701.

Ji, Y. K., & Ling, J. Q. (2007). *Spatial distribution of dead and vital bacteria in the native dental biofilm.* Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi 42: 294-297.

Jin, Y., & Yip, H. K. (2002). *Supragingival calculus: formation and control*. Crit Rev Oral Biol Med 13: 426-441.

Johnson, I. M., Kumar, S. G., & Malathi, R. (2003). *De-intercalation of ethidium bromide and acridine orange by xanthine derivatives and their modulatory effect on anticancer agents: a study of DNA-directed toxicity enlightened by time correlated single photon counting.* J Biomol Struct Dyn 20: 677-686.

Jung, D. J., Al-Ahmad, A., Follo, M., Spitzmüller, B., Hoth-Hannig, W., Hannig, M., & Hannig, C. (2010). *Visualization of initial bacterial colonization on dentine and enamel in situ.* J Microbiol Methods 81: 166-174.

Kaplan, J. M. (2003). *Biofilm growth and detachment of Actinobacillus actinomycetemcomitans.* J Bacteriol 185: 1399-1404.

Kaprelyants, A. S., Gottschal, J. C., & Kell, D. B. (1993). *Dormancy in non-sporulating bacteria.* FEMS Microbiol Rev 10: 271-285.

Kolenbrander, P. E. (2000). *Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems.* Annu Rev Microbiol 54: 413-437.

Krishan, A., & Dandekar, P. D. (2005). *DAPI fluorescence in nuclei isolated from tumors.* J Histochem Cytochem 53: 1033-1036.

Kuboki, Y., Teraoka, K., & Okada, S. (1987). *X-ray photoelectron spectroscopic studies of the adsorption of salivary constituents on enamel.* J Dent Res 66: 1016-1019.

Kuramitsu, H. (1974a). *Adherence of Streptococcus mutans to dextran synthesized in the presence of extracellular dextransucrase.* Infect Immun 9: 764-765.

Kuramitsu, H. (1974b). *Characterization of cell-associated dextransucrase activity from glucose-grown cells of Streptococcus mutans.* Infect Immun 10: 227-235.

Larsen, P., Olesen, B. H., Nielsen, P. H., & Nielsen, J. L. (2008). *Quantification of lipids and protein in thin biofilms by fluorescence staining.* Biofouling 24: 241-250.

Leeder, J. S., Dosch, H. M., Harper, P. A., Lam, P., & Spielberg, S. P. (1989). *Fluorescence-based viability assay for studies of reactive drug intermediates.* Anal Biochem 177: 364-372.

Lemos, J., Abranches, J., Koo, H., Marquis, R., & Burne, R. (2010). *Protocols to study the physiology of oral biofilms.* Methods Mol Biol 666: 87-102.

Lenander-Lumikari, M., & Loimaranta, V. (2000). *Saliva and dental caries.* Adv Dent Res 14: 40-47.

Lendenmann, U. G. (2000). *Saliva and dental pellicle - a review.* Adv Dent Res 14: 22-28.

Li, J., Helmerhorst, E., Troxler, R., & Oppenheim, F. (2004). *Identification of in vivo pellicle constituents by analysis of serum immune responses.* J Dent Res 83: 60-64.

Lie, T. G. (1978). *Dental plaque morphology as revealed by direct observation and by replicating techniques.* Acta Odontol Scand 36: 279-288.

Lie, T. (1979). *Morphologic studies on dental plaque formation.* Acta Odontol Scand 37: 73-85.

Lie, T. (1977). *Scanning and transmission electron microscope study of pellicle morphogenesis.* Scand J Dent Res 85: 217-231.

Liljemark, W. F., & Bloomquist, C. (1996). *Human oral microbial ecology and dental caries and periodontal diseases.* Crit Rev Oral Biol Med 7: 180-198.

Liminga, G., Jonsson, B., Nygren, P., & Larsson, R. (1999). *On the mechanism underlying calcein-induced cytotoxicity.* Eur J Pharmacol 383: 321-329.

Listgarten, M., & Loomer, P. (2003). *Microbial identification in the management of periodontal diseases. A systematic review.* Ann Periodontol 8: 182-192.

Liu, Y. T. (2002). *The essential role of hydrodynamic shear force in the formation of biofilm and granular sludge.* Water Res 36: 1653-1665.

Lloyd, D., & Hayes, A. J. (1995). *Vigour, vitality and viability of microorganisms.* FEMS Microbiology Letters, 133: 1–7.

López-Amorós, R., Comas, J., & Vives-Rego, J. (1995). *Flow cytometric assessment of Escherichia coli and Salmonella typhimurium starvation-survival in seawater using rhodamine 123, propidium iodide, and oxonol.* Appl Environ Microbiol 61: 2521-2526.

Marsh, P. D. (2003). *Are dental diseases examples of ecological catastrophes?* Microbiology 149: 279-294.

Marsh, P. D., & Bradshaw, D. J. (1995). *Dental plaque as a biofilm.* J Ind Microbiol 15: 169-175.

Marsh, P. D., & Martin, M. V. (1999). *Oral Microbiology.* Oxford: Butterworth-Heinemann.

Marsh, P. D. (2006). *Dental plaque as a biofilm and a microbial community - implications for health and disease.* BMC Oral Health 6 Suppl 1: 14.

Mason, C. A., Hamer, G., & Bryers, J. D. (1986). *The death and lysis of microorganisms in environmental processes.* FEMS Microbiology Letters 39: 373–401.

Mason, C., Hamer, G., & Bryers, J. (1986). *The death and lysis of microorganisms in environmental processes.* FEMS Microbiology Letters 39: 373–401.

Mayhall, C. W., & Butler, W. T. (1976). *The carbohydrate composition of experimental salivary pellicles.* J Oral Pathol 5: 358-370.

Moe, K., Mimura, J., Ohnishi, T., Wake, T., Yamazaki, N., Nakai, M., & Misawa, N. (2010). *The mode of biofilm formation on smooth surfaces by Campylobacter jejuni.* J Vet Med Sci 72: 411-416.

Monaco, R. R. (2010). *Capture of a Transition State Using Molecular Dynamics: Creation of an Intercalation Site in dsDNA with Ethidium Cation.* J Nucleic Acids 2010. pii: 702317.

Monis, P. T., Giglio, S., & Saint, C. P. (2005). *Comparison of SYTO9 and SYBR Green I for real-time polymerase chain reaction and investigation of the effect of dye concentration on amplification and DNA melting curve analysis.* Anal Biochem 340: 24-34.

Moore, W., & Moore, L. (1994). *The bacteria of periodontal diseases.* Periodontol 2000 5: 66-77.

Moorer, W. R. (2003). *Antiviral activity of alcohol for surface disinfection*. Int J Dent Hyg 1: 138-142.

Moreno, E., Kresak, M., & Hay, D. (1978). *Adsorption of two human parotid salivary macromolecules on hydroxy-, fluorhydroxy- and fluorapatites.* Arch Oral Biol 23: 525-533.

Moreno, E., Kresak, M., & Hay, D. (1982). *Adsorption thermodynamics of acidic proline-rich human salivary proteins onto calcium apatites.* J Biol Chem 257: 2981-2989.

Moter, A., & Göbel, U. (2000). *Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms.* J Microbiol Methods 41: 85-112.

National Toxicology Program, Department of National Health and Human. *Testing Status: Ethidium bromide.* Online im Internet: http://ntp.niehs.nih.gov/index.cfm?objectid=BDAF3AE4-123F-7908-7BE09D1BEA25B435 [Stand: 03.11.2010, 17:07].

Netuschil, L. (1983). *Vitalfärbung von Plaque- Mikroorganismen mit Fluoresceindiacetat und Ethidiumbromid.* Dtsch Zahnarztl Z 38: 914-917.

Netuschil, L., Brecx, M., Vohrer, K. G., & Riethe, P. (1996). *Vital fluorescence to assess in vitro and in vivo the antibacterial effects of amalgams.* Acta Stomatol Belg 93: 129-134.

Netuschil, L., Reich, E., & Brecx, M. (1989). *Direct measurement of the bactericidal effect of chlorhexidine on human dental plaque.* J Clin Periodontol 16: 484-488.

Nobbs, A. H., Zhang, Y., Khammanivong, A., & Herzberg, M. C. (2007). *Streptococcus gordonii Hsa environmentally constrains competitive binding by Streptococcus sanguinis to saliva-coated hydroxyapatite.* J Bacteriol 189: 3106-3114.

Nobbs, A. L. (2009). *Streptococcus adherence and colonization.* Microbiol Mol Biol Rev 73: 407-450, Table of Contents.

Oliver, J. D. (1995). *The viable but non-culturable state in the human pathogen Vibrio vulnificus.* FEMS Microbiol Lett 133: 203-208.

Oltmanns, R. (1996). *Fluoreszenzfarbstoffe zur Vitalitätsbestimmung von Mikroorganismen.* Diplomarbeit, Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen (RWTH) Deutschland.

Ørstavik, D., & Kraus, F. (1974). *The acquired pellicle: enzyme and antibody activities.* Scand J Dent Res 82: 202-205.

Ørstavik, D., & Kraus, F. (1973). *The acquired pellicle: immunofluorescent demonstration of specific proteins.* J Oral Pathol 2: 68-76.

Palmer, R. J., & Sternberg, C. (1999). *Modern microscopy in biofilm research: confocal microscopy and other approaches.* Curr Opin Biotechnol 10: 263-268.

Palmer, R. J., Gordon, S. M., Cisar, J. O., & Kolenbrander, P. E. (2003). *Coaggregation-mediated interactions of streptococci and actinomyces detected in initial human dental plaque.* J Bacteriol 185: 3400-3409.

Patel, D. J., & Canuel, L. L. (1976). *Ethidium bromide-(dC-dG-dC-dG)2 complex in solution: intercalation and sequence specificity of drug binding at the tetranucleotide duplex level.* Proc Natl Acad Sci 73: 3343–3347.

Peak, E., Chalmers, I. W., & Hoffmann, K. F. (2010). *Development and validation of a quantitative, high-throughput, fluorescent-based bioassay to detect schistosoma viability.* PLoS Negl Trop Dis 4: e759.

Peeters, E., Nelis, H. J., & Coenye, T. (2008). *Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates.* J Microbiol Methods 72: 157-165.

Qiu, J., Wang, D., Xiang, H., Feng, H., Jiang, Y., Xia, L., Dong, J., Lu, J., Yu, L., & Deng, X. (2010). *Subinhibitory concentrations of thymol reduce enterotoxins A and B and alpha-hemolysin production in Staphylococcus aureus isolates*. PLoS One 5: e9736.

Quirynen, M. V. (1993). *An in vivo study of the influence of the surface roughness of implants on the microbiology of supra- and subgingival plaque.* J Dent Res 72: 1304-1309.

Reese, S., & Guggenheim, B. (2007). *A novel TEM contrasting technique for extracellular polysaccharides in in vitro biofilms.* Microsc Res Tech 70: 816-822.

Rehmer, O. (2008). *Detektion und Visualisierung von Mikroorganismen in der In-situ-Pellikel mit verschiedenen Verfahren.* Dissertation, Medizinische Fakultät, Universität Freiburg.

Reis, A. F., Giannini, M., Kavaguchi, A., Soares, C. J., & Line, S. R. (2004). *Comparison of microtensile bond strength to enamel and dentin of human, bovine, and porcine teeth*. J Adhes Dent 6: 117-121.

Remis, J. P., Costerton, J. W., & Auer, M. (2010). *Biofilms: structures that may facilitate cell-cell interactions.* ISME J 4: 1085-1087.

Rølla, G., Ciardi, J. E., & Bowen, W. H. (1983). *Identification of IgA, IgG, lysozyme, albumin, alpha-amylase and glucosyltransferase in the protein layer adsorbed to hydroxyapatite from whole saliva.* Scand J Dent Res 91: 186-190.

Rølla, G., Ciardi, J. E., & Bowen, W. H. (1983). *Identification of IgA, IgG, lysozyme, albumin, alpha-amylase and glucosyltransferase in the protein layer adsorbed to hydroxyapatite from whole saliva.* Scand J Dent Res 91: 186-190.

Roszak, D. B., & Colwell, R. R. (1987). *Metabolic activity of bacterial cells enumerated by direct viable count.* Appl Environ Microbiol 53: 2889-2893.

Roszak, D. B., & Colwell, R. R. (1987). *Survival strategies of bacteria in the natural environment.* Microbiol Rev 51: 365-379.

Roth, B. L., Poot, M., Yue, S. T., & Millard, P. J. (1997). *Bacterial viability and antibiotic susceptibility testing with SYTOX green nucleic acid stain.* Appl Environ Microbiol 63: 2421-2431.

Rüdiger, S., Carlén, A., Meurman, J., Kari, K., & Olsson, J. (2002). *Dental biofilms at healthy and inflamed gingival margins.* J Clin Periodontol 29: 524-530.

Rykke, M., Sønju, T., & Rølla, G. (1990). *Interindividual and longitudinal studies of amino acid composition of pellicle collected in vivo.* Scand J Dent Res 98: 129-134.

Sawhney, R., & Berry, V. (2009). *Bacterial biofilm formation, pathogenicity, diagnostics and control: An overview.* Indian J Med Sci 63: 313-321.

Schaudinn, C., Gorur, A., Keller, D., Sedghizadeh, P., & Costerton, J. (2009). *Periodontitis: an archetypical biofilm disease.* J Am Dent Assoc 140: 978-986.

Scheie, A. A., & Rølla, G. (1986). *Cell-free glucosyltransferase in saliva.* Caries Res 20: 344-348.

Scheie, A. A., Eggen, K. H., & Rølla, G. (1987). *Glucosyltransferase activity in human in vivo formed enamel pellicle and in whole saliva.* Scand J Dent Res 95: 212-215.

Scheie, A. (1994). *Mechanisms of dental plaque formation.* Adv Dent Res 8: 246-253.

Schreiber, F. S. (2010). *Denitrification in human dental plaque.* BMC Biol 8: 24.

Sellers, J. R., Cook, S., & Goldmacher, V. S. (1994). *A cytotoxicity assay utilizing a fluorescent dye that determines accurate surviving fractions of cells.* J Immunol Methods 172: 255-264.

Shchyolkina, A. K., & Borisova, O. F. (1997). *Stabilizing and destabilizing effects of intercalators on DNA triplexes.* FEBS Lett 419: 27-31.

Shigetani, Y., Okamoto, A., Abu-Bakr, N., Tanabe, K., Kondo, S., & Iwaku, M. S. (2003). *Caries diagnosis using a laser fluorescence system - observation of autofluorescence of dental caries*-. Dent Mater J 22: 56-65.

Sicherheitsdatenblatt gemäß 1907/2006/EG, Artikel 31. Carl-Roth GmbH + Co. KG.

Sicherheitsdatenblatt gemäß 1907/2006/EG, Artikel 31. Merck KGaA.

Sicherheitsdatenblatt gemäß 1907/2006/EG, Artikel 31. Applichem Abteilung Qualitätskontrolle.

Signoretto, C., Lleò, M. M., & Canepari, P. (2002). *Modification of the peptidoglycan of Escherichia coli in the viable but nonculturable state.* Curr Microbiol 44: 125-131.

Siqueira, W., Margolis, H., Helmerhorst, E., Mendes, F., & Oppenheim, F. (2010). *Evidence of intact histatins in the in vivo acquired enamel pellicle.* J Dent Res 89: 626-630.

Sissons, C. H., Cutress, T. W., Hoffman, M. P., & Wakefield, J. S. (1991). *A multi-station dental plaque microcosm (artificial mouth) for the study of plaque growth, metabolism, pH, and mineralization.* J Dent Res 70: 1409-1416.

Skjørland, K., Rykke, M., & Sønju, T. (1995). *Rate of pellicle formation in vivo.* Acta Odontol Scand 53: 358-362.

Socransky, S. S., Manganiello, A. D., Propas, D., Oram, V., & van Houte, J. (1977). *Bacteriological studies of developing supragingival dental plaque.* J Periodontal Res 12: 90-106.

Sønju, T. (1975). *Investigations of some salivary glycoproteins and their possible role in pellicle formation.* Nor Tannlaegeforen Tid 85: 393-403.

Sønju, T., & Rølla, G. (1973). *Chemical analysis of the acquired pellicle formed in two hours on cleaned human teeth in vivo. Rate of formation and amino acid analysis.* Caries Res 7: 30-38.

Standar, K., Kreikemeyer, B., Redanz, S., Münter, W. L., Laue, M., & Podbielski, A. (2010). *Setup of an in vitro test system for basic studies on biofilm behavior of mixed-species cultures with dental and periodontal pathogens*. PLoS One 5: pii: e13135.

Stevenson, L. (1978). *A case for bacterial dormancy in aquatic systems.* Microbial Ecology 4: 127-133.

Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D., & Costerton, J. (2002). *Biofilms as complex differentiated communities.* Annu Rev Microbiol 56: 187-209.

Sunde, P. T., Olsen, I., Göbel, U. B., Theegarten, D., Winter, S., Debelian, G. J., Tronstad, L., & Moter, A. (2003). *Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of bacteria in periapical lesions of asymptomatic root-filled teeth.* Microbiology 149: 1095-1102.

Sutherland, I. (2001). *Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework.* Microbiology 147: 3-9.

Takenaka, S., Pitts, B., Trivedi, H. M., & Stewart, P. S. (2009). *Diffusion of macromolecules in model oral biofilms.* Appl Environ Microbiol 75: 1750-1753.

Tamura, A., Ara, T., Imamura, Y., Fujii, T., & Wang, P. L. (2008). *The effects of antibiotics on in vitro biofilm model of periodontal disease.* Eur J Med Res 13: 439-445.

Tanious, F. A., Veal, J. M., Buczak, H., Ratmeyer, L. S., & Wilson, W. D. (1992). *DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) binds differently to DNA and RNA: minor-groove binding at AT sites and intercalation at AU sites.* Biochemistry 31: 3103-3112.

Tanzer, J. M., Grant, L., Thompson, A., Li, L., Rogers, J. D., Haase, E. M. & Scannapieco, F. A. (2003). *Amylase-binding proteins A (AbpA) and B (AbpB) differentially affect colonization of rats' teeth by Streptococcus gordonii.* Microbiology 149: 2653-2660.

Theilade, E., Theilade, J., & Mikkelsen, L. (1982). *Microbiological studies on early dento-gingival plaque on teeth and Mylar strips in humans.* J Periodontal Res 17: 12-25.

Thurnheer, T., Gmür, R., Giertsen, E., & Guggenheim, B. (2001). *Automated fluorescent in situ hybridization for the specific detection and quantification of oral streptococci in dental plaque.* J Microbiol Methods 44: 39-47.

Turssi, C. P., Messias, D. F., Corona, S. M., & Serra, M. C. (2010). *Viability of using enamel and dentin from bovine origin as a substitute for human counterparts in an intraoral erosion model*. Braz Dent J 21: 332-336.

Vacca Smith, A. M., & Bowen, W. (2000). *In situ studies of pellicle formation on hydroxyapatite discs.* Arch Oral Biol 45: 277-291.

Vacca Smith, A. M., Venkitaraman, A. R., Quivey, R. G., & Bowen, W. H. (1996). *Interactions of streptococcal glucosyltransferases with alpha-amylase and starch on the surface of saliva-coated hydroxyapatite.* Arch Oral Biol 41: 291-298.

Van der Velden, U., Abbas, F., Armand, S., Loos, B., Timmerman, M., Van der Weijden, G., et al. (2006). *Java project on periodontal diseases. The natural development of periodontitis: risk factors, risk predictors and risk determinants.* J Clin Periodontol 33(8): 540-548.

Vitkov, L., Hannig, M., Nekrashevych, Y., & Krautgartner, W. (2004). *Supramolecular pellicle precursors.* Eur J Oral Sci 112(4): 320-325.

von Ohle, C., Gieseke, A., Nistico, L., Decker, E. M., DeBeer, D., & Stoodley, P. (2010). *Real-time microsensor measurement of local metabolic activities in ex vivo dental biofilms exposed to sucrose and treated with chlorhexidine.* Appl Environ Microbiol 76: 2326-2334.

Wallis, O. C., & Whittaker, P. A. (1974). *Induction of Petite Mutation in Yeast by Starvation in Glycerol.* Journal of General Microbiology 84: 1-1 8.

Wang, P. L. (2010). *Roles of oral bacteria in cardiovascular diseases--from molecular mechanisms to clinical cases: Treatment of periodontal disease regarded as biofilm infection: systemic administration of azithromycin*. J Pharmacol Sci 113: 126-133.

Wei, A., & Shibamoto, T. (2010). Antioxidant/lipoxygenase inhibitory activities and chemical compositions of selected essential oils. J Agric Food Chem 58: 7218-7225.

Weiger, R., Decker, E. M., Krastl, G., & Brecx, M. (1999). *Deposition and retention of vital and dead Streptococcus sanguinis cells on glass surfaces in a flow-chamber system.* Arch Oral Biol 44: 621-628.

Wen, Z. Y. (2010). *Biofilm formation and virulence expression by Streptococcus mutans are altered when grown in dual-species model.* BMC Microbiol 10:111.

Wlodkowic, D., Skommer, J., & Darzynkiewicz, Z. (2008). *SYTO probes in the cytometry of tumor cell death.* Cytometry A 73: 496-507.

Wojcik, K., & Dobrucki, J. W. (2008). *Interaction of a DNA intercalator DRAQ5, and a minor groove binder SYTO17, with chromatin in live cells--influence on chromatin organization and histone-DNA interactions.* Cytometry A 73: 555-562.

Wolf, J., & Neuwirt, F. (1941). *Reparative Vorgänge an der Oberfläche natürlich und künstlich hervorgerufener Schmelzdefekte*. Dtsch. Zahn Mund und Kieferheilk 8:349.

Wuertz, S., Okabe, S., & Hausner, M. (2004). *Microbial communities and their interactions in biofilm systems: an overview.* Water Sci Technol 49: 327-336.

Yang, Y., Sreenivasan, P. K., Subramanyam, R., & Cummins, D. (2006). *Multiparameter assessments to determine the effects of sugars and antimicrobials on a polymicrobial oral biofilm.* Appl Environ Microbiol 72: 6734-6742.

Yao, Y., Grogan, J., Zehnder, M., Lendenmann, U., Nam, B., Wu, Z., et al. (2001). *Compositional analysis of human acquired enamel.* Arch Oral Biol 46(4): 293-303.

Yao, Y., Lamkin, M., & Oppenheim, F. (2000). *Pellicle precursor protein crosslinking characterization of an adduct between acidic proline-rich protein (PRP-1) and statherin generated by transglutaminase.* J Dent Res 79: 930-8.

Young, A., Rykke, M., & Rølla, G. (1999). *Quantitative and qualitative analyses of human salivary micelle-like globules.* Acta Odontol Scand 57: 105-110.

Young, A., Rykke, M., Smistad, G., & Rølla, G. (1997). *On the rôle of human salivary micelle-like globules in bacterial agglutination.* Eur J Oral Sci 105: 4854-94.

Zarrini, G., Delgosha, Z. B., Moghaddam, K. M., & Shahverdi, A. R. (2010). *Post-antibacterial effect of thymol*. Pharm Biol 48: 633-636.

Zaura-Arite, E., & ten Cate, J. M. (2000). *Effects of fluoride- and chlorhexidine-containing varnishes on plaque composition and on demineralization of dentinal grooves in situ.* Eur J Oral Sci 108: 154-161.

Zaura-Arite, E., van Marle, J., & ten Cate, J. M. (2001). *Confocal Microscopy Study of Undisturbed and Chlorhexidine-treated Dental Biofilm.* J Dent Res 80: 1436-1440.

Zijnge, V., van Leeuwen, M. B., Degener, J. E., Abbas, F., Thurnheer, T., Gmür, R., et al. (2010). *Oral biofilm architecture on natural teeth.* PLoS One 5(2): e9321.

10 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. C. Hannig für die Überlassung dieses interessanten Themas, die stets zügigen Rückmeldungen in allen Phasen der Arbeit sowie die ausgezeichnete Betreuung.

Bei Dr. Al-Ahmad möchte ich mich für die fachkundige Betreuung bei allen Laborfragen sowie der Hilfeleistung in allen statistischen Fragen bedanken. Frau Spitzmüller und Frau Braun danke ich herzlichst für die motivierte Einführung in die labortechnische Arbeit und die hilfsbereite Unterstützung zu jeder Zeit. Prof. Dr. B. Heimrich danke ich herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens. Ebenso gilt ein Dankeschön meinen zuverlässigen Probanden.

Für die liebevolle Unterstützung und die Abwechslungen zwischen Labor- und Schreibarbeit danke ich meinen Eltern und meiner Schwester Maryam. Danke an die besten Freunde, die man sich wünschen kann.

11 Lebenslauf

Seite 90 (Lebenslauf) enthält persönliche Daten und ist deshalb nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung