

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR ZAHNERHALTUNG UND PARODONTOLOGIE
PROF. DR. G. SCHMALZ
AUS DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**ETABLIERUNG EINES *IN-VITRO* BIOFILMMODELLES
AUS DREI DENTALEN BAKTERIENSTÄMMEN**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Laura Karla Tabenski

2012

Dekan:

Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Gottfried Schmalz

2. Berichterstatter:

PD Dr. Tim Maisch

Tag der mündlichen Prüfung:

30. Mai 2012

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	4
2.	Literaturübersicht	6
2.1.	Allgemeines zu Biofilmen.....	6
2.2.	Die Phasen der Biofilmbildung.....	7
2.3.	Die Biofilmbildung.....	8
2.3.1.	Die initiale Adhäsion.....	9
2.3.2.	Proliferation und Reifung des Biofilmes.....	10
2.3.3.	Die extrazelluläre polymere Matrix und ihre Bedeutung.....	12
2.3.4.	Der reife Biofilm und die Phase der Ablösung.....	13
2.4.	Biofilmforschung <i>in-vitro</i>	13
2.5.	Die Bakterienarten.....	15
2.5.1.	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	15
2.5.2.	<i>Actinomyces naeslundii</i>	16
2.5.3.	<i>Enterococcus faecalis</i>	18
2.6.	Resistenz von Biofilmen gegen antiseptische Substanzen.....	20
2.7.	Antimikrobielle photodynamische Therapie (aPDT).....	22
3.	Fragestellung	25
4.	Material	26
4.1.	Verwendete Mikroorganismen.....	26
4.2.	Medien und Chemikalien.....	26
4.3.	Zellkulturen.....	27
4.4.	Technische Geräte.....	28
4.5.	PCR-Komponenten.....	29

4.6.	Fluoreszenzfarbstoffe.....	29
5.	Methodik	31
5.1.	Sicherheitsvorkehrungen.....	31
5.2.	Verwendete Nähr- und Kulturmedien.....	31
5.2.1.	BHI-Medium.....	31
5.2.2.	Modifiziertes PYG-Medium.....	32
5.2.3.	Künstliches Speichelmedium.....	32
5.3.	Inkubation der Bakterien.....	33
5.4.	Herstellung von Gefrierkulturen.....	33
5.5.	Kultivierung der Bakterien.....	34
5.5.1.	<i>Enterococcus faecalis</i>	34
5.5.2.	<i>Actinomyces neaslundii</i>	34
5.5.3.	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	35
5.6.	Biofilmmodell.....	35
5.7.	Möglichkeiten des Keimnachweises.....	37
5.8.	Quantitative real-time Polymerasekettenreaktion.....	38
5.8.1.	Primer.....	39
5.8.2.	Master-Mix.....	40
5.8.3.	PCR-Protokoll.....	41
5.8.4.	Exemplarischer Aufbau eines PCR-Laufes.....	43
5.8.5.	Festlegung der Standardreihe der drei Bakterien.....	44
5.8.6.	Bestimmung und Bedeutung des Crossing points.....	45
5.8.7.	Schmelzkurvenanalyse und Schmelzpunkt.....	46
5.8.8.	DNA-Isolierung.....	46
5.8.9.	Agarose-Gelelektrophorese.....	47

5.9.	Fluoreszenzfärbung der extrazellulären polymeren Substanz.....	47
5.10.	Mehrkanal-3D-Fluoreszenzmikroskopie.....	48
5.11.	Live-Dead-Färbungen.....	48
5.12.	Datenerfassung und statistische Auswertung.....	49
6.	Ergebnisse	50
6.1.	Nachweis der extrazellulären Matrix im Biofilm.....	50
6.2.	Nachweis der biofilmbildenden Bakterien im Biofilm.....	53
6.2.1.	Quantitativer und semiquantitativer Nachweis mittels real-time PCR...	53
6.2.2.	Spezifität und Kreuzreaktivität der verwendeten Primer.....	53
6.2.2.1.	Spezifitätsuntersuchung des Primerpaares AN1/2.....	55
6.2.2.2.	Spezifitätsuntersuchung des Primerpaares FN1/2.....	58
6.2.2.3.	Spezifitätsuntersuchung des Primerpaares EF1/2.....	61
6.2.2.4.	Spezifitätsuntersuchung des neuen EF-P4-Primerpaares.....	65
6.3.	LIVE/DEAD- Färbungen.....	67
6.4.	Bakterienwachstum im Biofilm.....	69
6.4.1.	Künstliches Speichelmedium.....	69
6.4.2.	BHI-Medium.....	73
7.	Diskussion	74
8.	Ausblick	87
9.	Zusammenfassung	88
10.	Abkürzungsverzeichnis	90
11.	Danksagung	92
12.	Lebenslauf	93
13.	Literatur	94

1. Einleitung

In der menschlichen Mundhöhle findet man natürliche mikrobielle Biofilme an diversen Oberflächen, im allgemeinen Plaque genannt. Nach den Autoren Keijser *et al.* ist die Zusammensetzung der oralen Mikroflora sehr verschieden und besteht schätzungsweise aus 19.000 Stammtypen, was beträchtlich höher ist als ursprünglich angenommen [123]. Eine gründliche und regelmäßige Mundhygiene kann die Anlagerung der dentalen Plaque weitgehend verhindern und vor damit verbundenen gesundheitlichen Schäden schützen. Ein Überschuss an dentaler Plaque jedoch, meist durch schlechte Mundhygiene, verursacht zum Beispiel parodontale Erkrankungen, Karies und Wurzelkanalinfektionen [42,108,148]. In der Geschichte der Mikrobiologie wurden Mikroorganismen ursprünglich als planktonische, frei schwebende Zellen dargestellt. Erst mit Entdeckung der ersten mikroskopischen Darstellung von Mikroorganismen durch van Leeuwenhoek (1632-1723), wurde bewusst, dass Mikroorganismen an freie Oberflächen binden und an diesen uneingeschränkt wachsen können. Dies führte zu weiteren Studien, in denen mit Oberflächen assoziierte Biofilme entdeckt wurden.

Ein Biofilm ist eine dreidimensionale Struktur, in der verschiedene Bakterienarten in der Lage sind, als Gemeinschaft, nahezu alle Grenzflächen (Oberfläche/Luft, Oberfläche/Flüssigkeit, Flüssigkeit/Luft oder Flüssigkeit/Flüssigkeit) zu besiedeln [54]. Bakterielle Biofilme entstehen nicht nur in der Mundhöhle, sondern sind ubiquitär vorkommend. In der Medizin verwendete Werkstoffe, wie Implantate, Instrumente, Apparaturen, etc. entwickeln auf ihren Oberflächen in Wechselwirkung mit der biologischen Umgebung häufig Biofilme. Diese können unerwünschte Reaktionen auslösen, wie z.B. Thrombenbildung bei Blutkontakt, Abstoßungsreaktionen, Periimplantitis infolge von Plaquebildung auf Implantaten bei Speichelkontakt, oder Entzündungen durch Biofilme auf Kontaktlinsen [40]. Biofilme entstehen sowohl auf Fremdmaterialien als auch auf körpereigenen Strukturen (wie z.B. auf Zähnen, Zunge, Gefäßen). Aber auch systemische Krankheitsprozesse scheinen durch Biofilm-assoziierte Bakterien hervorgerufen zu werden, wie z.B. Mittelohrentzündungen, zystische Fibrose, chronische Prostatitis und angeborene Herzklappen-Endokarditis [70]. Bakterien im Biofilm sind durch eine weitgehend nicht permeable Schicht vor externen Einflüssen wie Antibiotika gut geschützt [213].

Obwohl die genetische Ausstattung der jeweiligen Bakterien im Biofilm genau mit entsprechender, frei beweglicher Mikroben übereinstimmt, ist ihr biochemisches Verhalten sehr verschieden. So werden „Biofilm-Bakterien“ von Antibiotika kaum beeinflusst, auch gegenüber Desinfektionsmittel, wie z.B. CHX, sind Biofilme ca.150-200.000 mal resistenter [238]. Bakterien, die üblicherweise durch CHX gehemmt werden, können im Biofilm resistent werden [146].

Ein Großteil der Studien, in welchen antiseptische Mittel und Methoden zur Eliminierung von Mikroorganismen untersucht wurden, basieren auf Versuchen mit planktonisch kultivierten Bakterien [50,84,144]. Das Ziel dieser Studie war daher die Etablierung eines adhärenenten, polymikrobiellen Biofilmes um *in-vivo* Bedingungen besser zu simulieren und somit zukünftig die Wirkung antibakterieller Substanzen auf biofilmähnliche Strukturen realitätsnäher untersuchen zu können.

2. Literaturübersicht

2.1. Allgemeines zu Biofilmen

Marshall beobachtete erstmals 1976 die Beteiligung von „sehr feinen extrazellulären Polymer-Fibrillen“ bei der Verankerung der Bakterien an Oberflächen [152]. Costerton *et al.* beschrieben, dass Gemeinschaften von aneinander gereihten Bakterien in aquatischen Systemen in eine Glykokalix-Matrix eingebunden sind, die aus Polysacchariden besteht. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Matrix-Bestandteile an der Adhäsion beteiligt sind [51]. Im Jahr 1987 berichteten Costerton *et al.*, dass Biofilme aus einzelnen Zellen und Mikrokolonien bestehen, die in einer wässrigen anionischen Matrix eingebettet sind [49]. 1995 hoben Costerton *et al.* hervor, dass sich Biofilme an Oberflächen, Zwischenflächen und aneinander anheften können und nahmen die Begriffe „Mikrobielle Aggregate“ und „adhärente Population“ in ihre Definition mit auf [52]. Zur gleichen Zeit konnten Costerton *et al.* zeigen, dass der Prozess der Biofilmbildung von spezifischen Genen reguliert wird, die während der initialen Adhäsion zwischen den Zellen übertragen werden [52]. Weitere Studien haben gezeigt, dass in adhärent wachsenden Bakterien bis zu 45 Gene exprimiert werden, die bei den gleichen planktonisch wachsenden Bakterien nicht nachweisbar sind. Ein Genaustausch findet nur zwischen adhärent wachsenden Bakterien statt und nicht zwischen adhärenten und planktonischen oder zwischen planktonischen Mikroorganismen [71]. Zu der bisherigen Definition des Biofilmes wurden somit weitere Eigenschaften hinzugenommen, wie die veränderte Wachstumsgeschwindigkeit und die Genübertragung zwischen adhärent wachsenden Bakterien.

Die heutige anerkannte Definition des Biofilmes lautet:

„eine mikrobiell adhärente Gemeinschaft, charakterisiert durch Zellen, die irreversibel an eine Oberfläche, Zwischenfläche oder aneinander angeheftet sind, eingebettet in eine Matrix aus extrazellulären polymeren Substanzen, die durch sie selbst produziert wird. Sie weisen einen sich verändernden Phänotyp auf, abhängig von der Wachstumsgeschwindigkeit und der Gentranskription der adhärent wachsenden Bakterien“ [71].

Biofilme können von einer einzigen (Monospezies-Biofilm), mehreren oder vielen verschiedenen Bakterienspezies (Multispezies-Biofilm) gebildet werden [6,7,71,251] und können auf Schichtdicken von mehr als 5 mm anwachsen [49,52]. Sie sind vielfältig strukturiert. Sie beinhalten lebende Biomasse, abgestorbenen Zelldetritus und Matrixsubstanz. 90% aller Mikroorganismen sind in Biofilmen organisiert [71,258]. Ein klassischer Biofilm besteht zu 80-90% aus Wasser. Das Trockengewicht setzt sich zu 70% aus Bakterien zusammen, den restlichen Gewichtsanteil nimmt die Matrix ein. Sie entstehen an Grenzflächen zwischen zwei Phasen, wie zwischen Gas- und Flüssigphase (z.B. an der Wasseroberfläche), zwischen Flüssig- und Festphase (z.B. Schiffsrümpfe) oder zwischen verschiedenen Flüssigphasen (z.B. Öl in Wasser) [54,69,241,242]. Makromorphologisch zeigen sich typische pilz- oder tulpenförmige Strukturen mit dazwischenliegenden Kanälen, die nicht nur dem Transport von Nährstoffen und dem Abtransport verbrauchter Stoffwechselprodukte dienen [28,48,52,64], sondern auch der Zell-zu-Zell Kommunikation und somit dem genetischen Informationsaustausch zwischen Bakterien. Die Biofilmstruktur wird beeinflusst durch Nährstoffangebot, Strömungsbedingungen, Oberflächenstrukturen und Bakterienspezies [49,59]. Die Existenz in Biofilmen bietet Mikroorganismen reichliche Vorteile. So können sie Nährstoffe in der Biofilmmatrix speichern um natürliche Limitationen auszugleichen. Durch metabolische Wechselwirkungen ist ihnen eine synergistische „Arbeitsteilung zwischen unterschiedlichen Spezies“ gewährleistet. Außerdem haben Mikroorganismen in Biofilmen, im Vergleich zu planktonisch lebenden Bakterien, eine gesteigerte Resistenz gegenüber äußeren Einflüssen, wie Austrocknung, Scherkräfte, antibakteriellen Agenzien und Phagozytose [53,71,83,94].

2.2. Die Phasen der Biofilmbildung

Die Biofilmbildung läuft nach einem generell anerkannten Schema ab. Zunächst erfolgt die initiale Adhäsion von Mikroorganismen an Materialoberflächen [33,183], dann wächst und reift der Biofilm durch Co-Adhäsions- und Co-Aggregationsmechanismen, sowie durch die Produktion von Matrixsubstanz [126,149,150]. Es findet interbakterielle Kommunikation und Genexpression statt [85,126,191,208,258], bis sich ein stationäres Gleichgewicht zwischen

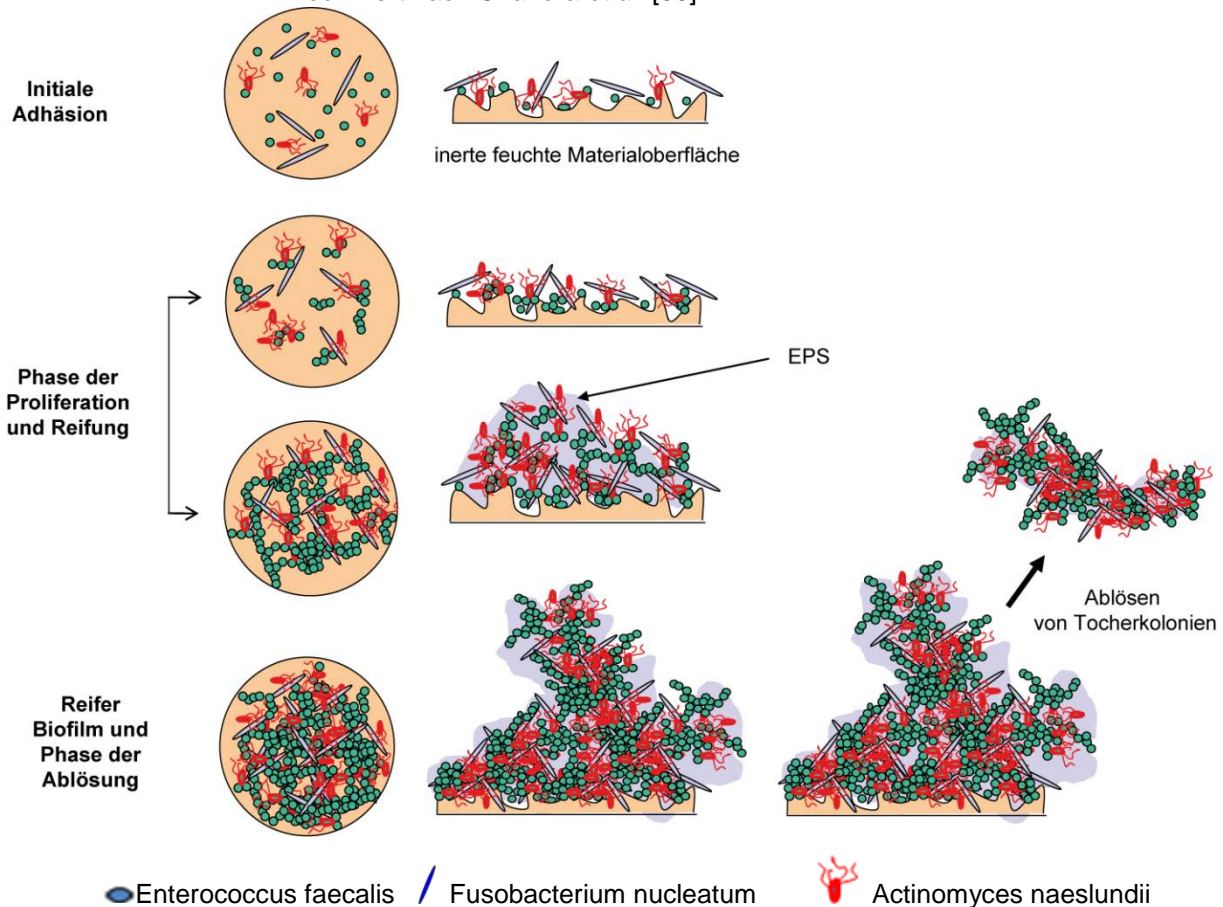
Biofilmwachstum und der Phase der Ablösung einstellt [149,150]. In sehr vielen Studien wurde die orale Biofilmbildung *in-vitro* untersucht, die Wirkung antimikrobeller Substanzen auf *in-vitro* gewachsene Biofilme oder die Komplexität der adhären gewachsenen bakteriellen Gemeinschaft (eine genaue Übersicht über *in-vitro* Biofilmmodelle ist unter 2.4. aufgeführt) [29,36,145,176,185]. Jedoch lassen sich die *in-vivo* Bedingungen nur schwer *in-vitro* simulieren [234], denn schon allein circa 50% der oralen Mikroorganismen sind *in-vitro* nicht kultivierbar [1].

2.3. Die Biofilmbildung

Die Biofilmbildung lässt sich in drei Phasen einteilen (Abb. 1),

1. die initiale Adhäsion der Bakterien auf einer feuchten Oberfläche
2. die Phase der Proliferation und Reifung
3. die Phase des ausgereiften Biofilmes und Ablösung von Tochterkolonien

Abbildung 1 Schematische Darstellung der dreistufigen Biofilmbildung am Beispiel der in dieser Arbeit verwendeten Bakterien, modifiziert nach Chandra *et al.* [39]



2.3.1. Die initiale Adhäsion

Bakterien brauchen für die initiale Adhäsion an Materialien eine Oberfläche, die ihnen die Adhäsion über verschiedene Adhäsine, Fimbrien oder Filamente erlaubt. Eine frisch gereinigte Schmelzoberfläche stellt Bakterien keinerlei Verankerungsmöglichkeit dar. Jedoch wird eine gesäuberte Schmelzoberfläche durch den in der Mundhöhle vorhandenen Speichel innerhalb von Sekunden mit einer Proteinschicht, der Pellikel, bedeckt [31,35,77]. Diese Pellikelschicht spielt aufgrund von adhäsivvermittelten Wechselwirkungen eine sehr wichtige Rolle bei der initialen Adhäsion und Etablierung von Bakterien auf Oberflächen [150,191]. Die Pellikel besteht aus Proteinen, Glycoproteinen, Lipiden, Glykolipiden, Immunglobulinen und Kohlenhydraten aus der umgebenden Mundflüssigkeit und enthält extrazelluläre Moleküle, wie saure prolinreiche Proteine, Amylase, Lysozym, Statherine und Immunglobuline [4]. Die Pellikel bietet den Zahnhartsubstanzen einen anti-erosiven Schutz und reguliert über Diffusion von Calcium und Phosphat sowohl Demineralisations-, als auch Remineralisationsprozesse [261-263].

Die Pellikel bildet die Basis der dentalen Biofilmbildung [47]. Zunächst binden Biomoleküle aus Speichel und Sulkusfluid, an die Schmelzoberfläche [26,95]. Dabei sind Phosphoproteine (z.B. Statherine, Histatine, prolinreiche Proteine) die ersten adsorbierenden Proteine, da sie eine hohe Affinität zu Hydroxylapatit aufweisen [103,140]. Die initiale Bindung planktonischer Mikroorganismen an die entstehende Pellikel ist zu diesem Zeitpunkt als eher zufällig einzustufen (Abb.1). Dieser zufällige Kontakt planktonischer Mikroorganismen mit der Oberfläche erfolgt passiv über Brown'sche Bewegungen, aktiv durch die Bewegung der Mikroorganismen, durch Sedimentationsprozesse bzw. durch Flüssigkeitsströmungen [183,197]. Nach physikalisch-chemischen Interaktionen zwischen Oberfläche und Mikroorganismen, wie van der Waals- und elektrostatischen Wechselwirkungen, sind die Mikroorganismen zunächst reversibel und schwach mit ihrer Oberfläche verbunden [30,33,149,150,198]. Pionierkeime in der initialen Phase der Besiedlung sind beispielsweise *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mitis*, *Actinomyces spp.*, *Haemophilus spp.*, *Eikenella corrodens*, *Veillonella*, *Campylobacter*, *Prevotella melaninogenica* [63,72,73,103]. Diese Erstbesiedler besitzen Anheftungsstrukturen wie Adhäsine und Fimbrien, die dann über stereochemische Wechselwirkungen eine irreversible Bindung mit der Pellikel eingehen

[150]. Neben der Adhäsion-vermittelten Bindung der Mikroorganismen an eine Oberfläche, spielen auch die Ablagerung von unlöslichen Polysacchariden bei der Anheftung von oralen Bakterien an eine Oberfläche eine wesentliche Rolle. So sezernieren *Streptokokken* der Mutans-Gruppe ein alpha 1,3 Glycanmolekül auf die Zahnoberfläche, wodurch den initialen Besiedlern die Anheftung erleichtert wird [243,244].

2.3.2. Proliferation und Reifung des Biofilmes

Nach der initialen Adhäsion dieser Erstbesiedler an eine Oberfläche reift der Biofilm durch metabolische, genetische und chemische Kommunikationsprozesse der Bakterien untereinander. Diese interbakterielle Kommunikation und die weitere Bindung von Bakterien an die initialen Erstbesiedler unterliegen zwei unterschiedlichen Prozessen. Über Co-Aggregationsmechanismen (Bindung von genetisch verschiedenen Bakterien in der planktonischen Phase) und Co-Adhäsionsmechanismen (Bindung planktonischer Bakterien an bereits adhärenente Bakterien) beginnt die Reifung eines typischen Biofilmes [126]. Bakterielle Co-Aggregationen können intraarttypisch, interarttypisch und multiarttypisch sein [129]. Auch hier spielen die exprimierten Adhäsine auf den Bakterien eine wichtige Rolle, wobei die interzelluläre Adhäsion jedoch sehr selektiv erfolgt. Bei einer Anzahl von bis zu 19.000 Stammtypen verschiedener Mikroorganismen in der Mundhöhle ergeben sich zahlreiche Bindungsmöglichkeiten untereinander [123]. *In-vivo* konnte jedoch nachgewiesen werden, dass die Bakterien untereinander spezifisch selektiv mit nur bestimmten Spezies Bindungen eingehen. Nach Kolenbrander *et al.* [129] können die bakteriellen Besiedler eines Biofilmes in drei Gruppen aufgeteilt werden. Diese sind Frühbesiedler, Spätbesiedler und Bakterien, die als Brückenglieder zwischen diesen beiden Gruppen dienen können. Früh- und Spätbesiedler können untereinander keine Co-Aggregationen eingehen, aber auch zwischen Spezies verschiedener Frühbesiedler gibt es Limitationen der Co-Aggregation. Gibbons und Nygaard untersuchten die Co-Aggregation von oralen Bakterien, indem sie 23 Stämme paarweise testeten. Sie fanden heraus, dass nur fünf der 253 Paare eine starke Co-Aggregation aufwiesen. Diese fünf Bakterienstämme stellten Paare dar, die zusammengesetzt waren aus einem Streptokokken (*Streptococcus sanguis* 31 /

Streptococcus sanguis 34 / *Streptococcus salivarius* SS2 / *Streptococcus salivarius* 9GS2) und einem *Actinomyces* spp. (*Actinomyces naeslundii* I) oder *Cocobacillus* (*Cocobacillus* 26) [91].

Mikroorganismen in Biofilmen leben in einer symbiontischen Gemeinschaft mit komplexer Kommunikation. Diese interbakterielle Kommunikation wird als „Quorum-Sensing“ (QS) bezeichnet. Bakterien koordinieren ihre von der Zelldichte abhängige Genexpression durch die Ausscheidung kleiner Signalmoleküle [156]. Ist ein bestimmter extrazellulärer Konzentrationsgrenzwert erreicht, binden diese Moleküle an einen Rezeptor und aktivieren auf diese Weise das QS-System [86]. Es konnte nachgewiesen werden, dass QS in einigen Bakterienspezies die Biofilmbildung reguliert [104,118]. Eine der wichtigsten Vorgänge während der interbakteriellen Kommunikation ist die Regulation der Genexpression. Steigt die Zelldichte in einer Population bis zu einem bestimmten Schwellenwert an, werden die Bakterien zur Transkription spezifischer Genprodukte angeregt, was zu einer phänotypischen Änderung der Funktionen dieser Mikroorganismen führt [223]. Der Informationsaustausch erfolgt über Signalmoleküle, die von den Bakterien produziert und in die Umgebung sezerniert werden. Zunächst sondern sie eine Reihe von Signalmolekülen in sehr geringer Menge in das umgebende Medium aus. Bei wachsender Populationsdichte steigt die Anzahl der Signalmoleküle und somit auch die Aktivierung verschiedener Gene [87]. Die Art der Signalmoleküle ist unterschiedlich für gram-negative und gram-positive Bakterien. Gram-positive Bakterien scheiden Peptidmoleküle zur interzellulären Signaltransduktion aus [14,106], gram-negative Bakterien arbeiten mit verschiedenen acylierten Homoserinlactonen, die als Autoinducer fungieren [85,87]. Autoinducer können die Transkription verschiedener Gene induzieren, aber auch ihre eigene Produktion und Wirkung verstärken [223]. Über den Austausch von genetischen Elementen innerhalb der Biofilmgemeinschaft können beispielsweise Antibiotikaresistenzen übertragen werden [58,138,217,222,227]. Dies erschwert die antiseptische Behandlung von Biofilmen. Co-Adhäsion und Co-Aggregation bieten Bakterien die Möglichkeit, Signale untereinander weiterzugeben und auszutauschen. Diese metabolische und genetische interbakterielle Kommunikation ist im Wesentlichen verantwortlich für die Biofilmstruktur, die Populationszusammensetzung und ihre Interaktionen [126]. Untersuchungen von co-aggregierenden Bakterien zeigten, dass die Co-Adhäsion bei diesen Gruppen 5-10 mal stärker ist, als zwischen ihren nicht co-aggregierenden,

planktonisch lebenden Analogen [17]. In einem reifenden Biofilm sind die beteiligten Mikroorganismen sich ständig ändernden Umweltbedingungen ausgesetzt. Um sich diesen anzupassen ist ein Informationsaustausch untereinander erforderlich. So wird strikt anaeroben Mikroorganismen, wie zum Beispiel dem *Fusbacterium nucleatum*, unter aeroben Mundhöhlenbedingungen durch Co-Aggregation mit O₂-verbrauchenden Aerobiern und fakultativen Anaerobiern das Überleben ermöglicht [21,23]. Ohne diesen Informationsaustausch mit Aerobiern können die anaeroben Fusobakterien nur weniger als fünf Minuten in der Mundhöhle überleben [22].

2.3.3. Die extrazelluläre polymere Matrix und ihre Bedeutung

Für den interbakteriellen Zusammenhalt der Mikroorganismen ist die Ausbildung einer extrazellulären polymeren Matrix ein wesentlicher Aspekt in der Reifung und Proliferationsphase des Biofilmes. Diese extrazelluläre polymere Substanz (EPS) wird von beteiligten Bakterien selbst produziert und formt und füllt den Raum zwischen den Zellen aus (Abb. 1). Die EPS kann bei planktonisch lebenden Mikroorganismen nicht nachgewiesen werden.

Die EPS ist verantwortlich für die Stabilität und Funktionalität des Biofilmes [190,229]. Bakterien bilden die EPS aus Saccharose, sie besteht hauptsächlich aus Polysacchariden, Glykoproteinen, Proteinen, verschiedenen Lipiden und Nukleinsäuren. Der Hauptbestandteil ist jedoch Wasser [2,49,82]. Die Nukleinsäuren in der EPS spielen als extrazelluläre DNA eine wichtige Rolle in der Biofilmstabilität, bei der Zell-Kommunikation und als interzelluläre Verbindungen zwischen Biofilmzellen [82,174,218,247]. Früher ging man davon aus, dass Polysaccharide die initiale Adhäsion oraler Keime initiieren. Heute weiß man, dass die EPS die Pathogenität des Biofilmes ausmacht und diesen als „universeller Kleber“ zusammenhält [208]. Die EPS stellt für Säuren und Zucker keine Diffusionsbarriere dar [65,153,154], vielmehr können die Zuckermoleküle über die EPS in die tieferen Schichten des Biofilmes penetrieren [66,81]. Durch die EPS kann in einer sauerstoffhaltigen Umgebung ein komplett anderes Milieu entstehen, das bis zur Anaerobiose führen kann. Somit können Mikroorganismen mit unterschiedlichen Anforderungen in einem gemeinsamen Mikrohabitat existieren [229].

Durch Ausbildung der kompakten EPS-Strukturen in einer polymikrobiellen Gemeinschaft können antimikrobielle Agenzien nur in sehr geringer Menge in die Biofilmstrukturen penetrieren. Außerdem binden sich Antibiotika dauerhaft an die extrazelluläre Substanz, was zur Resistenzentwicklung von antibakteriellen Substanzen gegen Biofilmstrukturen beitragen kann [71,88].

2.3.4. Der reife Biofilm und die Phase der Ablösung

Ein ausgereifter Biofilm ist ein dynamisches System und unterliegt einem ständigen strukturellen Wandel. In dieser Phase der Biofilmbildung besitzt der Biofilm eine Dicke von ca. 50-300µm [143]. Makromorphologisch findet man in einem reifen Biofilm Gebiete mit einer sehr hohen Bakteriendichte, welche sich mit Arealen flüssigkeitsgefüllter Kanäle abwechseln [255,256]. Diese Kanäle dienen einem effektiven Transport aller Nährstoffe und Sauerstoff, sowie dem Abtransport von Stoffwechselprodukten aus tieferen Schichten des Biofilmes [59,222].

Aus einem reifen Biofilm lösen sich die oberen Bakterienverbände ab und werden über den Speichel an neue Siedlungsflächen weitertransportiert (Abb.1) [149]. Somit bilden sich Tochterzellen oder Tochterverbände aus. Dieser Prozess unterliegt biophysikalischen, genetischen und kommunikativen Regulationsmechanismen [56,138,217,222].

2.4. Biofilmforschung *in-vitro*

In-vitro-Biofilmmodelle ermöglichen ein Verständnis über Mechanismen der Biofilmbildung, das mikrobielle Zusammenleben in einem Biofilm und Resistenzentwicklungen der im Biofilm existierenden Mikroorganismen. Zahlreiche Studien untersuchten die Wirkung antimikrobieller Substanzen auf planktonisch kultivierte Bakterien. Jedoch unterscheiden sich adhärente, in einem Biofilm gewachsene Bakterien phänotypisch und physiologisch von planktonisch gewachsenen Bakterien. Eine typische Eigenschaft von adhärent gewachsenen Bakterien ist z.B. die gesteigerte Resistenz gegen antimikrobielle Agenzien [71,221]. Die Untersuchung der Biofilmbildung *in-vitro* findet außerhalb des lebenden

Organismus statt, dennoch müssen diese Modelle ausreichend gute Vergleiche zu *in-vivo* Bedingungen darstellen. Dies betrifft Parameter wie die Auswahl der Bakterien, Temperatur, pH und Sauerstoffpartialdruck aber auch mechanische und biochemische Umgebungseigenschaften. Grundsätzlich werden bei der Biofilmforschung zwei Untersuchungsziele verfolgt. Zum einen wird die Wirkung antimikrobieller Agenzien auf adhären, in einer Gemeinschaft gewachsenen Bakterien untersucht, zum anderen die Komplexität dieser bakteriellen Gemeinschaft um z.B. therapeutisch die Entwicklung von Resistenzbildungen umgehen zu können. Für die Etablierung eines Biofilmmodelles *in-vitro* haben sich im Laufe der letzten Jahre zwei unterschiedliche Forschungsmodelle durchgesetzt. Das MTP-Biofilmmodell („mikrotiter plate-based model“) ist eines der meist angewandten Biofilmmodelle *in-vitro* [5,8,171,184]. In diesen Modellen wächst der Biofilm statisch auf Kunststoffoberflächen. MTP-Modelle sind geschlossene Systeme ohne Durchflusseigenschaften [107]. MTP-Modelle eignen sich zur Untersuchung antimikrobieller Substanzen auf Biofilmen, wie beispielsweise die Wirkung verschiedener Antibiotika, Desinfektionsmittel, Chemikalien und die Erforschung von Quorum-sensing-Inhibitoren [5,8,171,175,184]. Bestimmte Parameter wie die Zusammensetzung von Wachstumsmedium, Inkubationstemperatur, Luftfeuchtigkeit, die Anwesenheit oder Abwesenheit von Scherbewegungen, von O₂ oder CO₂ können in einem MTP-Modell einfach variiert werden [133,219]. Verschiedene Autoren beschreiben auf dem MTP-Modell basierende Variationsmodelle wie z.B. das „Calgary Biofilm-Modell“ oder der „Biofilm Ring Test“. Das Prinzip gleicht dem MTP-Modell.

Das zweite Modell für die Erforschung von Biofilmen *in-vitro* basiert auf einem Durchflusssystem („flow displacement biofilm model“). Es ist ein offenes System, indem ein kontinuierlicher Austausch zwischen frischem und verbrauchtem Wachstumsmedium stattfindet [34,107]. Die Durchflusssysteme können in zwei Untergruppen unterteilt werden, das „continuous flow stirred tank reaktor“-System, CFSTR, und das „plug flow reactor“-System, PFR [107]. Bei dem CFSTR-System ist die Zuflussrate des frischen Mediums gleich der Abflussrate des verbrauchten Mediums ohne Konzentrationsveränderung in diesem System (kontinuierliche Fließbewegung). In dem PFR-System bewegt sich der Zufluss stufenweise mit frischem Medium in Fließrichtung (axiale Richtung), eine Durchmischung findet jedoch nur in radialer Richtung statt (partieller Austausch). Im Gegensatz zum

CFSTR-System ändern sich im PFR-System die umgebenden Bedingungen mit zunehmender Zuflussrate.

2.5. Die Bakterienarten

2.5.1. *Fusobacterium nucleatum*

Fusobacterium nucleatum weist eine Genomgröße von $2,4 \times 10^6$ auf und gehört dem Bakterienstamm des *Fusobacterium* an, welches zu der Familie der *Bacteroidaceae* gehört [15,44]. Charakteristisch handelt es sich hierbei um strikt anaerobe, unbewegliche, gram-negative, zigarrenförmige Bakterien mit spitzen Enden, die oft zur Mitte hin dicker werden. Die meisten Bakterienzellen sind zwischen 5 und 10 μm lang [15]. Obwohl das Bakterium eigentlich anaerob ist, wächst es aber auch bei bis zu 6% Sauerstoffgehalt in der Umgebung [22,125]. Bradshaw *et al.* untersuchten die Überlebensrate strikt anaerober Bakterien in einem Wachstumsmodell in dem zunächst anaerobe Bedingungen herrschten und das später mit Sauerstoff begast wurde [21]. Es zeigte sich, dass die obligaten Anaerobier sowohl in der planktonischen Wachstumsphase als auch in der Phase der Biofilmbildung überlebt haben. Eine weitere Untersuchung von Bradshaw *et al.* zeigte, dass diese strikt anaeroben Bakterien nicht überlebt haben, wenn keine fakultativ anaeroben Mikroorganismen dabei waren [22]. Diese Untersuchungen bewiesen auch, dass die Anaerobier aufgrund der „intimate interspecies interactions“ überlebten.

Fusobakterien sind normalerweise Bewohner der Mundhöhle, des Darms und des weiblichen Genitaltraktes [112]. Manchmal werden sie auch von Lungen- und Beckenabzessen isoliert [16,76,120]. *Fusobacterium nucleatum* kommt hauptsächlich bei Patienten mit Parodontopathien vor [45,111], *Fusobacterium nucleatum* subsp. *poymorphum* in gesunden Zahnfleischtaschen und *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* hauptsächlich in parodontal erkrankten Zahnfleischtaschen [22,194].

Fusobacterium nucleatum wird normalerweise aus multibakteriellen Infektionen isoliert, es ist selten der alleinige Krankheitserreger. In Verbindung mit Spirochäten (*Treponema viridans* und anderen) ruft es klassische fusospirochätäre Infektionen, wie akute ulcerative Gingivitis, Vincent`s Angina und Cancrum oris, hervor [194]. *Fusobacterium nucleatum* benötigt nährstoffreiche Medien für sein Wachstum. Es

lässt sich sehr gut in Medien, die Typtikase, Peptone oder Yeast-Extrakt enthalten, kultivieren [12,13].

Fusobacterium nucleatum besitzt die Fähigkeit mit anderen pathogenen Keimen Anhäufungen (Aggregate) in parodontal erkrankten Zahnfleischtaschen zu bilden und dient als Brückenglied zwischen Früh- und Spätbesiedlern. Es nimmt sowohl an der Bakterienadhäsion als auch an der bakteriellen Co-Aggregation teil und scheint somit eine Schlüsselrolle in dem multibakteriellen Co-Aggregationsnetzwerk zu spielen [16].

Das Bakterium weist im Gegensatz zu Erstbesiedlern keine intra-arttypische Co-Aggregation auf [16,129], co-aggregiert jedoch mit allen anderen Bakterienstämmen [130]. Diese Fähigkeit, mit einer großen Vielfalt von Partnerstämmen co-aggregieren zu können, ist sehr selten und ist auf das *Fusobacterium* beschränkt [130]. Nur sehr wenige Frühbesiedler gehen untereinander Co-Aggregationen ein, mit Spätbesiedlern können sie gar keine Aggregationen eingehen. Spätbesiedler gehen auch keine Aggregationen untereinander ein [129,248]. Alle diese Gruppen co-aggregieren jedoch mit *Fusobacterium nucleatum* [9,128], was dessen Schlüsselrolle als Brückenbakterium erklärt [127].

Weiterhin scheint *Fusobacterium nucleatum* eine zentrale Spezies in der physikalischen Interaktion zwischen gram-positiven und gram-negativen Bakterien zu sein. Diese Interaktionen spielen wahrscheinlich eine wichtige Rolle im Prozess der Biofilmbildung [207].

Periasamy und Kolenbrander zeigten jedoch in ihrer Studie, dass das *Fusobacterium nucleatum* die Anwesenheit eines bestimmten Erstbesiedlers erfordert, um im Biofilm wachsen zu können. So wies *Fusobacterium nucleatum* in Kombination mit *Streptococcus oralis* keinerlei Wachstum auf. Erst nach Beifügen von *Actinomyces oris* konnte ein Wachstum des *Fusobacterium nucleatum* hervorgerufen werden [173].

2.5.2. *Actinomyces naeslundii*

Actinomyces naeslundii sind gram-positive, stäbchenförmige Bakterien. Sie besiedeln unter anderem die Mundhöhle und sind Mitverursacher von Parodontitis und Wurzelkaries. *Actinomyces naeslundii* gehören zur Familie der

Actinomycetaceae („Strahlenpilze“) und sind Fadenbakterien, die in verzweigten Geflechten wachsen. Mikroskopisch stellen sie sich als gerade oder leicht gebogene 0,2-1,0 µm dicke, unbewegliche Stäbchen oder als schlanke, leicht gewellte, bis 1µm dicke Fäden dar. Sie sind fakultativ anaerob, ihre Sauerstofftoleranz variiert. Die Optimaltemperatur zur Kultivierung humanmedizinisch bedeutsamer Arten beträgt zwischen 35°C und 37°C.

Marsh *et al.* beschrieben in ihrem Buch „Oral Microbiology“ [151], dass die Art, die als *Actinomyces naeslundii* bezeichnet wird, jetzt aus zwei Stämmen besteht, die früher als *Actinomyces viscosus* und *Actinomyces naeslundii* klassifiziert waren. Unterschieden werden konnten die beiden Stämme nur durch die Katalase-Positivität des *Actinomyces viscosus*. Phänotypische und serologische Untersuchungen zeigten, dass ein großes Maß an Heterogenität zwischen diesen beiden Gruppen besteht. Nach Durchführung einer DNA-DNA-Hybridisierung wurde vorgeschlagen, *Actinomyces naeslundii* als eine Art festzulegen, mit zwei Genospezies – Genotyp 1 und Genotyp 2, denn auf genetischer Ebene konnten zwei Arten unterschieden werden. Es konnten jedoch keine unterschiedlichen Phänotypen gefunden werden. Eine Unterscheidung der Genospezies, ist nur mit serologischen Tests möglich. Henssge *et al.* schlugen 2009, basierend auf ihren Ergebnissen, folgende Aufteilung der Genotypen und deren Benennung vor (Tabelle 1) [109].

Tabelle 1	Aufteilung des <i>Actinomyces naeslundii</i> in seine Genotypen mit entsprechender Benennung nach Henssge <i>et al.</i> [109]
<i>Actinomyces naeslundii</i> Genotyp 1	<i>Actinomyces naeslundii sensu stricto</i> (ATCC 1204 ^T = NCTC 10301 ^T = CCUG 2238 ^T)
<i>Actinomyces naeslundii</i> Genotyp 2	<i>Actinomyces oris sp.nov.</i> (ATCC 27044 ^T = CCUG 34288 ^T)
<i>Actinomyces naeslundii</i> WVA 963	<i>Actinomyces johnsonii sp.nov.</i> (ATCC 49338 ^T = CCUG 34287 ^T)

Auf der Oberfläche von *Actinomyces naeslundii* - Zellen kann man zwei Arten von Fimbrien finden. Sie sind sowohl an der Co-Aggregation, dem direkten Kontakt zwischen Zellen, als auch an der Co-Adhäsion, Wechselwirkung zwischen Zellen und Oberflächen, beteiligt. *Actinomyces naeslundii* sind eine Bakterienart, die viele wichtige Eigenschaften besitzt. Sie sind von großer Bedeutung bei der Herstellung

von Antibiotika und anderen therapeutisch nützlichen Verbindungen. Weiterhin scheinen sie eine Hauptrolle im Kreislauf der organischen Substanzen im Ökosystem Boden zu spielen [134,249]. *Actinomyces naeslundii* sind ein wichtiger Erstbesiedler des oralen Biofilmes und stellen eine der Hauptkomponenten dessen dar. Nach Kilian *et al.* [124] und Li *et al.* [137] machen *Actinomyces naeslundii* 27% der Erstbesiedler aus. Sie sind Pionierkeime bei der Entstehung oraler Biofilme und können sich gut an sich stark verändernde, lokale Bedingungen anpassen [167]. Nach Diaz *et al.* [63] läuft die initiale Plaquebildung immer nach einem bestimmten Schema ab, beginnend mit der Besiedlung durch *Streptococci* und *Actinomyces*. Während der Ausreifung des Biofilmes scheint *Actinomyces naeslundii* gegenüber anderen Bakterienstämmen Vorherrschaft zu gewinnen [188,215,231]. Dies steht in Zusammenhang mit unterschiedlichem Wachstumsverhalten und/oder Nährstoffbedarf dieser Bakterienstämme [232,233,240,260].

2.5.3. *Enterococcus faecalis*

Die Bezeichnung *Enterococcus faecalis* wurde erstmals 1903 in einer Veröffentlichung von Thiercelin und Jonhauud für grampositive Diplokokken aus dem menschlichen Verdauungstrakt verwendet [235]. Es handelt sich hierbei um grampositive Bakterien, die zum Teil kurze Ketten oder Paare bilden und zur physiologischen Flora des Magendarmtraktes bei Mensch und Tier gehören.

Enterokokken-Kolonien sind ungefähr 2mm im Durchmesser, von runder Gestalt, glatt und hellgrau. Enterokokken sind unbegeißelt und daher unbeweglich [200]. Die meisten Enterokokken wachsen unter anaeroben Bedingungen bei Temperaturen von 10°C bis 45°C und einem pH-Wert des Mediums bis zu 9,6 [200], sie tolerieren jedoch pH-Werte bis 11,9 [204].

In der Zahnmedizin wird *Enterococcus faecalis* mit persistierender apikaler Parodontitis in Verbindung gebracht [100,101]. Obwohl sie nur einen Teil der initialen Flora darstellen, konnte *Enterococcus faecalis* häufig in gefüllten Wurzelkanälen mit Anzeichen einer chronischen apikalen Parodontitis gefunden werden [189,210,225]. Zareba *et al.* [264], Xiao *et al.* [257], Rich *et al.* [186], Nallapareddy *et al.* [162] und Love [141] wiesen die Haftung von *Enterococcus faecalis* an extrazellulären Matrixproteinen einschließlich Kollagen Typ I nach, das ein Hauptbestandteil des

Dentins ist [139]. Somit erfüllt *Enterococcus faecalis* die Grundvoraussetzung für den Beginn von infektiösen Krankheiten – die Fähigkeit den Wirt besiedeln zu können [121].

Enterococcus faecalis wird häufig als Testkeim gewählt, da er sich leicht identifizieren lässt, sowohl unter aeroben als auch fakultativ anaeroben Bedingungen wächst, leicht zu kultivieren und nicht anspruchsvoll ist [98,99,170]. Im Vergleich zu anderen, in der Mundflora vorhandenen Bakterien, besiedelt *Enterococcus faecalis* die Wurzelkanäle relativ schnell [170]. *Enterococcus faecalis* sind resistent gegen extreme Umwelteinflüsse, seine Resistenz gegen einige antiseptische Mittel, wie z.B. Calciumhydroxid [37,80,98,170], vor allem in niedrigen Konzentrationen, sowie die, in Studien festgestellte, Korrelation mit periapikalen Entzündungen, machen diese Bakterienart zu einem geeigneten Testobjekt in der zahnmedizinischen Forschung [131,157,212,226].

Die Bedingungen, unter welchen Biofilme in infizierten Wurzelkanälen *in-vivo* entstehen, sind noch nicht vollständig bekannt [230], jedoch konnten nach Wurzelspitzenresektionen aus Wurzelspitzenresten Biofilme isoliert werden [161,230]. Al-Ahmad *et al.* [3] erhielten in ihrer Studie Ergebnisse, die darauf schließen ließen, dass *Enterococcus faecalis in-vivo* als ein Teil der supragingivalen Plaque mit anderen oralen Bakterien co-aggregiert. Nach Denotti *et al.* ist die erhöhte Resistenz von *Enterococcus faecalis* gegen diverse antimikrobielle Substanzen auch damit zu erklären, dass diese Bakterienart in infizierten Wurzelkanälen einen Biofilm bildet [61]. *Enterococcus faecalis* kann auf unterschiedliche Art und Weise an verschiedene Oberflächen binden, abhängig vom Typen des Isolaten [62,132]. In typischen Wurzelkanalinfektionen geht *Enterococcus faecalis* zuerst über physikalische Wechselwirkungen eine Verbindung mit der Gewebeoberfläche ein, als nächstes entsteht eine dauerhafte Verbindung über spezielle bakterielle Adhäsine, wie Ace, EfaA, oder Esp an der Wirtsoberfläche [237]. Ist die Bakterienzelle fest verbunden, kann sie verfügbare Nährstoffe nutzen. Hierzu benötigt sie die Biofilmstruktur, um auf diese Weise mit dem Abwehrmechanismus des Wirtes umgehen zu können, und um Abwehrkräfte gegen antibakterielle Agenzien aufzubauen [61].

In den Untersuchungen von Duggan *et al.* erwiesen sich 100% der untersuchten und ausgewerteten Stämme als „Biofilm-Bildner“ [74]. Sandoe *et al.* beschrieben, dass *Enterococcus faecalis* dickere Biofilme bildet, wenn es in einem nährstoffarmen

Medium kultiviert wird, im Vergleich zu Medien mit einem hohen Nährstoffgehalt [196].

2.6. Resistenz von Biofilmen gegen antiseptische Substanzen

Die erhöhte Widerstandsfähigkeit von in Biofilmen lebenden Bakterien gegen antiseptische Substanzen stellt ein wesentliches Problem bei der Behandlung von Infektionen dar. Sie ist bis zu tausendfach höher als die Widerstandsfähigkeit planktonischer Bakterien [94]. Derzeit schätzt das NIH (NIH SBIR/STTR Study and Control of Microbial Biofilms program announcement, release date 21 April 1999), dass Biofilme für über 80% aller im Körper vorgehenden Infektionen verantwortlich sind. Biofilmbakterien sind nicht nur gegen antibakterielle Substanzen resistent, sondern auch gegen die immunologische Abwehrreaktion des Wirtes [105].

Dentale Erkrankungen können heutzutage durch eine sorgfältige, mechanische Mundhygiene kontrolliert werden. Mundhygieneprodukte werden daher so gestaltet, dass sie geprüfte antiplaque und antibakterielle Substanzen enthalten, um so dem Ziel der idealen Mundhygiene näher zu kommen [11,19,198].

Chlorhexidin (CHX) ist eines der weltweit vorrangig verwendeten Antiseptika und stellt den Goldstandard für die Munddesinfektion dar. CHX wird in der Zahnmedizin meist als Digluconat verwendet. CHX weist eine gute Substantivität auf und ca. 30% der CHX-Menge einer Mundspülung wird in der Mundhöhle zurückgehalten [55].

Es besitzt eine Breitspektrumwirksamkeit gegen gram-positive und gram-negative Bakterien als auch gegen *Candida albicans*, und reduziert Plaque, Karies und Gingivitis [198]. In hohen Konzentrationen wirkt CHX bakterizid und zerstört die bakterielle Zellmembran unwiderruflich. Gram-positive Bakterien scheinen gegen CHX sensibler zu sein als einige gram-negative, wie z.B. *Pseudomonas aeruginosa* [101,206,209].

In subletalen Konzentrationen kann CHX mit dem Stoffwechsel der oralen Bakterien interferieren, indem es sowohl die Zuckierzufuhr und Säureproduktion von kariogenen Streptokokken verhindert, als auch verschiedene Funktionen der Zellmembran unterbindet [147]. CHX ist wirksam gegenüber sich entwickelnden, aber auch reifen Biofilmen [114,115,119,182,245].

Ya Shen *et al.* wiesen nach, dass Bakterien in reifen Biofilmen (drei Wochen und älter) widerstandsfähiger gegen CHX waren als Bakterienzellen in frischen und jungen Biofilmen (zwei Tage bis zwei Wochen) [203].

Aber auch mit einer Antibiotika-Therapie sind Biofilminfektionen oft nur sehr schwer zu behandeln [71,113,160,228]. Der Grund hierfür ist, dass Bakterien in einem Biofilm mit einem Schutzfilm umgeben sind und daher weniger anfällig für die Wirkung von Antibiotika und Bioziden sind. Ist dieser Schutzfilm erst einmal durchbrochen, sinkt die Resistenz der Bakterien [193].

Nach zahlreichen Autoren und Studien gibt es nicht nur eine Ursache für die Fähigkeit von Biofilmen, selbst hohe Konzentrationen von Antibiotika zu tolerieren [27,60,75,116,142,216,224,239].

Im Gegensatz zu planktonischen Bakterien existiert eine verringerte Penetration von Antibiotika in die Biofilmmatrix [71,88]. Obwohl diese keine vollständige Barriere darstellt, scheinen antimikrobielle Substanzen chemisch mit den extrazellulären Bestandteilen des Biofilmes zu reagieren, oder sie docken an anionische Polysaccharide an [136,205]. Obwohl die EPS die Diffusion von Antibiotika behindern kann, können manche Antibiotika den Biofilm trotzdem gut penetrieren. Dies scheint sowohl von dem Biofilm, als auch von der Art der Antibiotika abhängig zu sein [52]. Nichols *et al.* zeigten mit mathematischen Berechnungen, dass β -Lactam-Antibiotika in Biofilme penetrieren können, solange die β -Lactamase-Konzentration der Bakterien in diesen Biofilmen gering ist [164]. Hoiby *et al.* fanden in ihren Untersuchungen heraus, dass β -Lactam-Antibiotika in Kombination mit Aztreonam oder in Kombination mit Meropenem effektiv *Pseudomonas aeruginosa*-Biofilme zerstören konnten [113]. Biofilme bieten dann eine gute Diffusionsbarriere, wenn das Antibiotikum in den äußeren Schichten des Biofilmes deaktiviert wurde, bevor es diesen vollständig penetrieren kann [220]. Ist die Konzentration an chromosomaler β -Lactamase der Bakterien eines Biofilmes hoch, so wird vermehrt extrazelluläre β -Lactamase in der extrazellulären Substanz produziert. Dies führt zu einer Inaktivierung des β -Lactam-Antibiotikums bevor es die tieferen Schichten des Biofilmes erreichen kann [113].

Auch das Mikromilieu des Biofilmes ist anders im Vergleich zu planktonischen Bakterien. So reduzieren, zum Beispiel, veränderter pH-Wert und Sauerstoffgehalt die Aktivität von antimikrobiellen Substanzen [22].

In Biofilmen scheint eine reduzierte Wachstumsrate der Bakterien zu existieren, die sie weniger anfällig für Antibiotika macht [54]. Es ist möglich, dass dieser Wechsel zum wachstumsarmen Stadium der Bakterien ein wichtiger Mechanismus für das Überleben in nährstoffarmen Gebieten ist [43]. Portenier *et al.* beschrieben, dass der Hungermodus einer der Hauptgründe für die Widerstandskraft von *Enterococcus faecalis* sein kann [177]. In diesem Zustand scheinen Bakterien ihr metabolisches Gleichgewicht zu regulieren, weg von der Vermehrung, hin zur Energieeinsparung [89]. Die meisten Antibiotika wirken effektiver gegen Bakterien, die aktiv wachsen. So können zum Beispiel Ampicillin und Penicillin keine stagnierten Zellen töten. Cephalosporin und Fluorochinolon besitzen zwar die Fähigkeit, nicht wachsende Zellen zu töten, jedoch ist ihre Wirksamkeit gegen wachsende und sich teilende Zellen viel größer [54].

Auch die Fähigkeit der Bakterien miteinander zu kommunizieren, das sogenannte Quorum sensing (QS) scheint eine große Rolle in der erhöhten Antibiotikaresistenz von Bakterien zu spielen. Durch QS können Bakterien ihr Verhalten koordinieren und es verändern, um sich auf diese Weise einer neuen Umgebung anzupassen. Diese Veränderungen stehen in Beziehung zur Verfügbarkeit von Nährstoffen, der Konkurrenz gegenüber anderen Mikroorganismen und der Verhinderung von Angriffen des Immunsystems des Wirts [59]. QS könnte aber auch eines der Schwachpunkte darstellen, mit dessen Hilfe man Biofilminfektionen bekämpfen kann. Bedingt durch diese Rolle von QS bei der Biofilmbildung, werden zur Zeit QS-Inhibitoren als vielversprechende Antibiofilm-Antibiotika vorgeschlagen [78].

2.7. Antimikrobielle photodynamische Therapie (aPDT)

Ein viel versprechender Therapieansatz in der Zahnheilkunde ist die Anwendung der antimikrobiellen photodynamischen Therapie. Mit dieser Behandlungsmethode wird die nicht thermische Elimination von Zellen, Mikroorganismen oder Molekülen mit Laserenergie niedriger Leistungsstärke angestrebt [24,25,155]. Die antimikrobielle photodynamische-Therapie basiert auf Lichtbestrahlung (sichtbares Licht) und einer speziellen chemischen Verbindung (z.B. Methylenblau, Toluidinblau) dem sogenannten Photosensibilisator (lichtaktivierbarer Wirkstoff). Separat angewendet

ist die jeweilige Dosis Licht und Photosensibilisator zu klein, um therapeutische Effekte zu erzielen. Die kombinierte Anwendung von beiden Faktoren in speziellen Konfigurationen, kann therapeutische Effekte sichern. Der Photosensibilisator ist eine chemische Verbindung, die durch Anwendung von Lichtenergie in einen angeregten Zustand wechselt. Aufgrund darauffolgender photochemischer Reaktionen werden reaktive Sauerstoffspezies, wie z.B. Singulett-Sauerstoff und hochreaktive Radikale erzeugt, durch die oxidativ zelluläre Bestandteile zerstört werden [38]. Bei Ausschalten der Lichtzufuhr wird diese Wirkung wieder unterbrochen [155].

Der Grundstein der modernen Phototherapie wurde schon Anfang des 19. Jahrhunderts gelegt. 1899 bewies Oscar Raab, dass einige chemische Verbindungen, wie Acridin oder Eosin unter Einfluss von Licht einen zytotoxischen Effekt entwickeln können. Niels Finson erhielt 1903 den Nobelpreis für die Anwendung der Bogen-Lampe als Lichtquelle in der photodynamischen Therapie [81].

Die aPDT wird bereits in der Zahnmedizin als Therapieverfahren vorgeschlagen, z.B. in der zahnärztlichen Chirurgie, in der systematischen Parodontitistherapie oder im Rahmen der Endodontie. Die Eliminierung von Bakterien aus Wurzelkanälen beispielsweise durch aPDT wird gägenwärtig untersucht. *Enterococcus faecalis*, ein häufig persistierender Keim nach Wurzelkanalbehandlungen, lässt sich nach Untersuchungen von Fonseca *et al.*, mit Anwendung der aPDT zu 99,9% eliminieren [84]. Hierbei wurden die Bakterien mit dem Photosensibilisator Toluidinblau 5 min inkubiert und anschließend mit einem 50mW Diodenlaser bei einer Wellenlänge von 660nm bestrahlt. Am Lehrstuhl für Zahnerhaltung und Parodontologie des Klinikums der Universität Regensburg wurde in Kooperation mit dem Lehrstuhl der Dermatologie des Klinikums der Universität Regensburg ein antimikrobielles Forschungsprojekt zur aPDT durchgeführt. An drei dentalen Bakterienstämmen (*Streptococcus mutans*, *Agregatibacter actinomycetemcomitans* und *Enterococcus faecalis*) wurde die antibakterielle Wirkung des Photosensibilisators Photosan in Kombination mit 10% EDTA untersucht mit dem Ergebnis einer wirksamen Phototoxizität gegen diese Bakterien [144]. Sowohl diese Untersuchungen als auch die Untersuchungen von Fonseca *et al.* basieren jedoch auf planktonisch kultivierten Mikroorganismen. *In-vivo* sind die Bedingungen jedoch anders als *in-vitro*. Bakterien wachsen nicht planktonisch, sondern fügen sich in Gemeinschaften zusammen und

bilden ausgeprägte Biofilmkolonien [50]. Die Anwendung und Wirkung der aPDT auf bakterielle Biofilme stellt ein interessantes neues Forschungsgebiet dar.

3. Fragestellung

Verschiedene Arten von Bakterien sind in der Lage als Gemeinschaft nahezu alle Oberflächen, wie z.B. auch die Zahnoberfläche, zu besiedeln. In der Folge kommt es zur Bildung einer komplexen dreidimensionalen Struktur, dem Biofilm. Allerdings werden Biofilmmodelle, bestehend aus einer Spezies als zunehmend ungeeignet angesehen, da dies nicht der klinischen Realität entspricht. Das Ziel dieser Untersuchung war daher die Etablierung eines polymikrobiellen *in-vitro* Biofilmmodelles. Es sollten drei unterschiedliche Bakterienstämme ausgewählt werden, die adhärent eine Oberfläche besiedeln können und Merkmale einer biofilmähnlichen Struktur entwickeln können - ein Frühbesiedler (*Actinomyces naeslundii*), ein Brückenbakterium (*Fusobacterium nucleatum*) und ein Bakterium, das die Fähigkeit besitzt in allen Phasen der Biofilmbildung zu leben (*Enterococcus faecalis*).

Dabei sollte das Wachstumsverhalten jedes einzelnen der drei Bakterienstämme zu vier verschiedenen Kulturzeitpunkten (12h, 24h, 48, 72h) untersucht und quantifiziert werden. Die Validierung erfolgte mit der quantitativen real-time Polymerasekettenreaktion (q-rt-PCR).

4. Material

4.1. Verwendete Mikroorganismen

Die primären tiefgefrorenen Bakterienkulturen von *Enterococcus faecalis* und *Actinomyces naeslundii* stammten aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Regensburg. Das *Fusobacterium nucleatum* wurde von der Deutschen Gesellschaft von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Braunschweig, Deutschland, DGMZ) bezogen.

Tabelle 2		Verwendete Mikroorganismen	
Spezies		Bezeichnung	
<i>Enterococcus faecalis</i>		ATCC 29212	
<i>Actinomyces naeslundii</i>		T14V	
<i>Fusobacterium nucleatum</i>		ATCC 10953	

4.2. Medien und Chemikalien

Brain-Heart-Broth

(Fluka®, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Germany)

Künstliches Speichelmedium (nach Pratten) [180]

(verwendetes Medium für die Biofilmbildung)

- *Lablemco* (Oxoid®, Basingstoke, Hampshire, England)
- *Proteose Peptone* (BD®, Becton, Dickinson and Company, Sparks USA)
- *Yeast-Extract / Typ III hog gastric mucin*
(Fluka®, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Germany)
- *Sodium chloride / Urea / Saccharose*
(Roth®, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany)
- *CaCl₂* (Merck®, Merck KGaA, Darmstadt, Germany)

Modifiziertes PYG-Medium

(Medium zur Kultivierung des anaeroben *Fusobacterium nucleatum*)

- *Trypticase Peptone* (BD®, Becton, Dickinson and Company, Sparks USA)
- *Peptone / Glucose* (Oxoid®, Basingstoke, Hampshire, England)
- *Yeast-Extract / Beef-Extract / Cysteine-HCl / Resazurin / Vitamin K*
(Fluka®, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Germany)
- *Haemin* (Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Regensburg)
- *Tween 80 / K₂HPO₄ / NaHCO₃ / KH₂PO₄ / MgSO₄·7H₂O / CaCl₂·2H₂O*
(Merck® KGaA, Darmstadt, Germany)

Agarose

Pulver für die Gelelektrophorese (Ultra Pure, Invitrogen Ltd., USA)

Frischblutplatten

(Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Regensburg)

Steriles PBS

(ohne Ca und Mg, Dulbecco`s PBS 1x, PAA Laboratories GmbH, Pasching Austria)

4.3. Zellkulturen

- *96 Well Mikrotiterplatten*
(Cell Culture Plate, Costar®, Corning, New York)
- *6 Well Mikrotiterplatten*
(Cell culture Dishes, Cellstar®, Greiner bio one GmbH, Frickenhausen, Germany)
- *Permanox Objektträger*
(Chamber Slide™ System, Lab Tek®, Inter Med, Nunc, Naperville)
- Falkons 50ml; 15ml
(Cellstar® Tubes, Greiner bio one GmbH, Frickenhausen, Germany)

- *Reaktionsgefäße 1,6ml*
(Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf)
- *Genbox Jar 7l*
(Biomerieux, Marcy-l'Étoile, Frankreich)
- *Gasgenerator*
(GENbox anaer, Biomerieux, Marcy-l'Étoile, Frankreich)
- *Anaerobier-Indikator*
(Biomerieux, Marcy-l'Étoile, Frankreich)
- *Anaerobiertüte*
(GENbag anaer, Biomerieux, Marcy-l'Étoile, Frankreich)

4.4. Technische Geräte

Mikroskope

- Mehrkanal-3D-Fluoreszenzmikroskop
(Carl Zeiss, AxioImager Z1, ApoTome, Germany)
- Fluoreszenzmikroskop
(Carl Zeiss, MicroImaging GmbH, Germany)

Zentrifugen

- Mini-Spin
(Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Germany)
- Zentrifuge
(Eppendorf, Hamburg, Germany)

Light Cycler II

(Roche Diagnostics, Germany)

Thermomixer

(Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Germany)

Vortex

(VWR International, Germany)

Waage

(Sartorius AG Göttingen, Germany)

Werkbank

(Herasafe, Hanau, Germany)

Horizontal-Schüttler

(HS 501 digital, IKA-Labortechnik)

Spectrophotometer

(Beckman DU® 640, Beckman Coulter GmbH, USA)

Ultraschallbad

(USR30H, Merck Eurclab GmbH, Germany)

4.5. PCR-Komponenten

- *Light Cycler® Cappillares (20µl)*
(Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)
- *Sybr® Premix Ex Taq™*
(Takara® Biotechnology, California)
- *Primer*
(EF1/2, AN1/2, FN1/2, EFP4r/f, EFP2r/f, EFP1r/f) (Sigma-Aldrich™)
- *Milipore- Wasser*
(Wasser für Molekularbiologie 1ml, Roth®, Karlsruhe, Germany)

4.6. Fluoreszenzfarbstoffe

Concanavalin A

Farbstoff für die Anfärbung der extrazellulären polymeren Substanz (Molecular Probes™, Invitrogen detection technologies, USA)

SYTO 9 / Propidium iodide

Farbstoff für die Live/Dead-Färbungen (Molecular Probes™, Invitrogen detection technologies, USA)

5. Methodik

5.1. Sicherheitsvorkehrungen

Die Durchführung der Versuche erfolgte unter sterilen Arbeitsbedingungen an einer sterilen Werkbank. Die DNA-Isolierung und die PCR-Arbeiten wurden an speziell dafür vorgesehenen Arbeitsplätzen durchgeführt. Der Arbeitsbereich wurde vor und nach jeder Nutzung gereinigt und desinfiziert. Die Desinfektion von nicht sterilisierbaren Arbeitsgeräten und -flächen wurde mit einer 70%igen Ethanol Lösung durchgeführt. Diese wurde im eigenen Labor hergestellt. Bei allen Laborarbeiten wurden Schutzbrille, Nitril-Handschuhe und Mundschutz getragen. Zur Händedesinfektion vor, während und nach Durchführung der Versuche wurde Mucasept (Merz) verwendet.

5.2. Verwendete Nähr- und Kulturmedien

Die in dieser Arbeit verwendeten Medien wurden alle in 500ml Flaschen portioniert und im Autoklaven (Varioklav Dampfsterilisatoren, H+P Labortechnik GmbH, Deutschland) 20min bei 121°C autoklaviert. Das sterile Medium wurde bis zum Einsatz im Laborkühlschrank bei +4°C gelagert. Die Lagerdauer überschritt nie einen Zeitraum von zwei Wochen.

5.2.1. BHI-Medium

Für die Herstellung dieses Kultivierungsmediums wurde Brain-Heart-Broth Pulver verwendet. Dabei wurden 37g des Pulvers in 1000ml destilliertem Wasser gelöst. Das BHI-Medium wurde für die Bakterienanzucht von *Enterococcus faecalis* und *Actinomyces naeslundii* verwendet. Außerdem diente es auch als Negativnachweis für die Bakterienadhäsion auf dem Boden der verwendeten 96 Well-Mikrotiterplatten. Für die Kultivierung der Bakterien wurde das Medium nach Herstellerangaben angefertigt. Für das Biofilmmodell wurde das Medium zusätzlich mit Stickstoff begast,

um den Sauerstoff aus dem Medium zu entfernen. Hierzu wurde das Medium solange begast, bis 0% Sauerstoff in dem Medium durch eine Messsonde angezeigt wurde. Somit waren auch dem strikt anaeroben *Fusobacterium nucleatum* optimale Wachstumsbedingungen gewährleistet.

5.2.2. Modifiziertes PYG-Medium

Das modifizierte PYG-Medium ist das empfohlene Medium der DSMZ (Deutsche Gesellschaft von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) zur Kultivierung strikt anaerober Bakterien.

In 950ml destilliertem Wasser wurden 5,0g Trypticase Peptone, 5,0g Peptone, 10,0g yeast extract, 5,0g beef extract, 5,0g Glucose, 2,0g K_2HPO_4 , 1,0ml Tween 80, 0,5g Cysteine-HCl x H_2O , 1,0g Resazurin, 40ml Salzlösung, 10ml Haemin Lösung und 0,2ml Vitamin K_1 Lösung gelöst. Für die Haemin – Lösung wurde 50mg Haemin in 1ml 1N NaOH gelöst und mit 100ml destilliertem Wasser aufgefüllt. Diese Lösung wurde im Kühlschrank bei +4°C gelagert. Für die Vitamin K_1 – Lösung wurde 0,1ml Vitamin K_1 in 20ml 95%igem Ethanol gelöst. Diese wurde dann steril filtriert und im Kühlschrank bei +4°C aufbewahrt. Die Salzlösung musste für jede Mediumherstellung neu angefertigt werden. Diese bestand aus 2,0g NaCl, 10,0g $NaHCO_3$, 1,0g KH_2PO_4 , 1,0g K_2HPO_4 , 0,5g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ und 0,25g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ aufgefüllt mit 1000ml destilliertem Wasser (angegebene Reihenfolge war einzuhalten). Die Vitamin K_1 Lösung, die Haemin-Lösung und Cysteine wurden erst in das Medium hinzugefügt, nachdem es gekocht und unter CO_2 -Bedingungen in einer Genbox Jar 7l bei Raumtemperatur abgekühlt wurde. Bei einem pH-Wert von 7,2 musste das Medium mit Stickstoff begast werden bis kein Sauerstoff mehr in diesem nachzuweisen war. Anschließend wurde das Medium bei 120°C 20min autoklaviert und bei +4°C gelagert.

5.2.3. Künstliches Speichelmedium

Das künstliche Speichelmedium diente als Kultivierungsmedium im Adhäsionsversuch der Bakterien. Hierzu wurde das Protokoll nach Pratten *et al.* [180]

verwendet. In den Versuchen der vorliegenden Arbeit wurde das Medium zusätzlich mit 1g/l Saccharose versetzt, da sich in Vorversuchen zeigte, dass die Zugabe von Saccharose die Adhäsion der Bakterien positiv beeinflusst. Zusätzlich wurde das Medium mit Stickstoff begast, bis die Sauerstoffkonzentration in dem Medium 0% betrug. Somit wurden auch dem *Fusobacterium nucleatum* optimale Lebensbedingungen gewährleistet.

5.3. Inkubation der Bakterien

Die Bakterienkulturen wurden in einer Wärmekammer bei 37°C ohne CO₂-Zusatz inkubiert. Der Luftdruck und die Luftfeuchtigkeit in der Wärmekammer wurden durch die Umgebungsatmosphäre bestimmt. Bei geschlossener Wärmekammer herrschte in der Kammer Dunkelheit.

In der Wärmekammer war ein Horizontal-Schüttler (HS 501 digital, IKA Labortechnik) positioniert, der für die Bakterienkultivierung verwendet wurde.

5.4. Herstellung von Gefrierkulturen

Für die Bakterienanzucht des *Enterococcus faecalis* und des *Actinomyces naeslundii* diente das BHI-Medium, das *Fusobacterium nucleatum* wurde mit dem mod. PYG-Medium kultiviert. Für die Herstellung der Gefrierkulturen von *Enterococcus faecalis* und *Actinomyces naeslundii* wurden 200µl der Bakteriensuspension in 50ml BHI-Medium resuspendiert und über Nacht bei 37°C in der Wärmekammer inkubiert. Am nächsten Tag wurde die jeweilige Suspension zentrifugiert und in 12,5ml BHI-Medium resuspendiert. Dazu wurde im Verhältnis 1:1 12,5ml 87% steriles Glycerin hinzugegeben und vermischt. Anschließend wurden 500µl-Portionen der Suspension in Reaktionsgefäße (1,6ml) aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Für die Herstellung der Gefrierkulturen des *Fusobacterium nucleatum* wurden Frischkulturen bei der DSMZ bestellt. Das Lyophilysat von *Fusobacterium nucleatum* wurde in dem dafür empfohlenen modifizierten PYG-Medium resuspendiert. Ein Teil der Suspension wurde in Flüssigkultur anaerob auf einem Horizontal-Schüttler bei 37°C inkubiert, der andere Teil der Suspension wurde auf Frisch-Blutplatten

ausgestrichen und ebenfalls anaerob bei 37°C inkubiert. Die Inkubationsdauer betrug 72h. Anaerobe Bedingungen wurden mittels der Genbox Jar 7I und mit Hilfe eines Gasgenerators hergestellt. Als Nachweis für anaerob vorherrschende Bedingungen diente ein Anaerobier-Indikator. Nach 72h wurde die Suspension zentrifugiert und in 12,5ml PYG-Medium resuspendiert. Auch hier wurde zu gleichen Mengen steriles Glycerin hinzugefügt (12,5ml) und vermengt. Anschließend wurden 500µl-Portionen der Suspension in Reaktionsgefäße (1,6ml) aliquotiert und bei –80°C gelagert.

Die Keimbestimmung erfolgte in regelmäßigen Abständen im Institut für Mikrobiologie und Hygiene des Klinikums der Universität Regensburg.

5.5. Kultivierung der Bakterien

5.5.1. *Enterococcus faecalis*

Zur Kultivierung von *Enterococcus faecalis* wurde ein bei –80°C gelagertes Gefrier-Cryo aufgetaut. Daraus wurden 80µl entnommen und in 5ml BHI-Medium angeimpft. Die Bakteriensuspension wurde unter aeroben Bedingungen bei 37°C auf einem Horizontal-Schüttler in einer Übernachtskultur kultiviert. Nach Ablauf der Inkubationsdauer wurde die Bakterienkultur bei 3000 Upm 5 min zentrifugiert. Nach zweimaligem Waschvorgang mit sterilem PBS wurde das erhaltene Bakterienpellet in 5ml künstlichen Speichel resuspendiert. Die optische Dichte wurde am Spectrophotometer auf 0,1 bei 650 nm eingestellt, was einer Bakterienzahl von ca. 10^{4-5} Bakterien/ml entsprach.

5.5.2. *Actinomyces naeslundii*

Das Kultivierungsverfahren des *Actinomyces naeslundii* entsprach dem des *Enterococcus faecalis*. Um eine Übernachtskultur zu erhalten wurden 80µl aus der zuvor hergestellten Gefrierkultur entnommen und in 5ml BHI-Medium angeimpft. Auch hier wurden die Übernachtskulturen zentrifugiert und zweimal in sterilem PBS gewaschen. Die optische Dichte der Bakteriensuspension wurde am

Spectrophotometer auf 0,1 bei 650nm eingestellt was einer Bakterienzahl von ca. 10^{4-5} Bakterien/ml entsprach.

5.5.3. *Fusobacterium nucleatum*

Das *Fusobacterium nucleatum* wurde ebenfalls aus -80°C gelagerten Gefrierkulturen hergestellt. Aus einer Gefrier-Cryo wurden $250\mu\text{l}$ entnommen und in 5ml modifiziertem PYG-Medium resuspendiert. Die angeimpfte Bakterienkultur wurde in einer Anaerobiertüte platziert, ein Gasgenerator sorgte für anaerobe Bedingung. Diese wurden an einem Indikatorstreifen kontrolliert. Das darauffolgende Zuschweißen der Anaerobiertüte diente einem dichten Verschluss. Bei einer Temperatur von 37°C wurde die Bakteriensuspension auf einem Horizontal-Schüttler inkubiert. Nach 72h Inkubationsdauer wurde die Bakterienkultur bei 2500Upm 5min zentrifugiert und das Bakterienpellet zweimalig mit sterilem PBS gewaschen. Nach dem Waschvorgang wurde das Pellet in 5ml künstlichem Speichelmedium, das zuvor mit Stickstoff begast wurde, resuspendiert und am Spectrophotometer eine optische Dichte von 0,1 bei 650nm eingestellt. Dies entsprach einer Bakterienzahl von ca. 10^{4-5} Bakterien/ml.

5.6. Biofilmmodell

Der Versuch der Etablierung eines Biofilmes wurde in der vorliegenden Arbeit anhand von zwei verschiedenen Medien durchgeführt - dem BHI-Medium und dem künstlichen Speichelmedium. Im Gegensatz zu dem künstlichen Speichelmedium zeigte das BHI-Medium schon in Vorversuchen keinerlei Adhäsionsverhalten der Bakterien und wurde in den Experimenten als Negativkontrolle mitgeführt. Künstliches Speichelmedium wies schon in Vorversuchen, unter dem Lichtmikroskop, eine erkennbare Adhärenz der Bakterien auf dem 96 Well-Mikrotiterplattenboden auf. Für die Herstellung einer adhärennten Bakterienkultur wurden 96 Well-Mikrotiterplatten (tissue culture treated) verwendet. Diese mussten mit dem Kultivierungsmedium vorbehandelt werden. Dafür wurde $200\mu\text{l}$ künstliches Speichelmedium in die Wells der Mikrotiterplatten pipettiert und für 30min bei

Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationsdauer wurde das gesamte Medium mit einer Pipette entfernt. Durch diese Vorbehandlung wurde den Bakterien eine feuchte Oberfläche für die Adhäsion gewährleistet. In jede Vertiefung der 96 Well-Mikrotiterplatte wurden jeweils 80µl von jeder der zuvor hergestellten Bakteriensuspension pipettiert. Um die Sauerstoffzufuhr für das anaerobe *Fusobacterium nucleatum* so gering wie möglich zu halten, wurde dieses als letztes aus dem Inkubator entnommen und vorbereitet. Nach jeder neuen Bakterienzugabe wurde die Suspension mittels Pipette vermischt.

Als nächstes wurden die 96 Well-Mikrotiterplatten in der Genbox Jar 7l platziert, zusammen mit einem Gasgenerator und einem Anaerobier-Indikatorstreifen. Die Box wurde verschlossen und bei 37°C inkubiert.

Die Inkubationsdauer betrug 12h, 24h, 48h und 72h. Für jeden Zeitpunkt wurde eine eigene 96 Well-Mikrotiterplatte verwendet. Als Negativkontrolle wurde bei jedem Versuchsansatz eine separate 96 Well-Mikrotiterplatte mit 240µl des verwendeten Mediums ohne Bakterien befüllt und mitgeführt.

Nach je 24h Inkubation wurde die Anaerobier-Box aus der Wärmekammer entnommen und geöffnet um die Bakteriensuspension zu waschen und frisches Medium hinzuzufügen. Dies wurde, mit Ausnahme des 12h-Zeitpunktes, bei allen Zeitpunkten durchgeführt. Somit ergaben sich für den 24h-Zeitpunkt ein Waschvorgang, für den 48h-Zeitpunkt zwei Waschvorgänge und für den 72h-Zeitpunkt drei Waschvorgänge. Dabei wurde zunächst das alte Medium mit einer Pipette abgesaugt. Für den Waschvorgang wurde steriles PBS verwendet. Nach einmaligem Waschen wurde erneut 240µl künstliches Speichelmedium in die Wells der Mikrotiterplatten pipettiert. Das Absaugen des verbrauchten Mediums, der Waschvorgang und die frische Mediumzugabe erforderten sehr vorsichtiges Arbeiten, um die, bis zu diesem Zeitpunkt adhärent gewachsenen Bakterien, nicht von dem Mikrotiterplattenboden zu lösen. Durch den Waschvorgang entstehende Risse in der adhärent gewachsenen Bakterienstruktur würden zum Verlust der Biofilmstruktur führen. Des Weiteren musste die Zufuhr von Sauerstoff so gering wie möglich gehalten werden. Die Mikrotiterplatten wurden mit einem neuen Gasgenerator und Anaerobier-Indikator in der Genbox Jar 7l platziert und diese erneut in der Wärmekammer inkubiert. Nach weiteren 24h erfolgte ein erneuter Waschvorgang.

Nach Ablauf der jeweiligen Kulturzeitpunkte wurde die entsprechende 96 Well-Mikrotiterplatte aus der Genbox Jar 7l entnommen und die in den Wells gewachsene

Bakteriensuspension zweimal vorsichtig mit sterilem PBS gewaschen. Auch die Negativkontrollen wurden nach Ablauf der Inkubationszeitpunkte gewaschen und für die DNA-Isolierung vorbereitet.

Für die Auswertung der Keime musste der Biofilm in einem Ultraschallbad bearbeitet werden, um so dessen dreidimensionale Struktur zu zerstören. Hierfür wurde der Biofilm aus fünf Wells gepoolt, mit einer Pipettenspitze wurde der adhären Biofilm ausgeschabt und in einem Reaktionsgefäß (1,6ml) in 1ml sterilem PBS gelöst. Um die Matrix des Biofilmes zu zerstören und die Bakterien zu vereinzeln wurde die Suspension 3min im Ultraschallbad und weitere 30sec auf dem Vortex separiert.

5.7. Möglichkeiten des Keimnachweises

Um das Verhalten von Keimen in einer Biofilmstruktur beurteilen zu können, musste ein Nachweisverfahren etabliert werden, um die verwendeten Keime voneinander unterscheiden zu können. Dieses Verfahren musste spezifisch für die einzelnen Keime sein, um so das Wachstumsverhalten im Zeitverlauf jedes einzelnen Keimes interpretieren zu können.

Folgende Möglichkeiten des Keimnachweises wurden untersucht:

- I) Quantitativer Nachweis mittels Selektivagarplatten
- II) Qualitativ chemischer Nachweis mittels Anwendung der bunten Reihe
- III) Quantitative real-time Polymerasenkettenreaktion

zu I) Durch Ausplattieren der im Biofilm gewachsenen Bakterien auf entsprechende Selektivagarplatten können die Bakterienstämme qualitativ und quantitativ ausgewertet werden. Es stellte sich jedoch im Verlauf der Versuche heraus, dass auf Grund der Beimischung des toxischen Schwermetalles Cadmium in das Selektiv-Agarmedium für den *Actinomyces naeslundii* an dem Institut für Mikrobiologie der Universität Regensburg diese Agarplatten nicht hergestellt werden konnten. Genauso wenig können diese Selektivplatten gewerblich erworben werden. Deswegen musste für die Quantifizierung eine andere Methode gewählt werden.

zu II) Eine qualitative Nachweismethode von verschiedenen Bakterienarten kann mit Anwendung der Bunten Reihe erfolgen. Dies ist ein chemisches Nachweisverfahren zur Identifizierung von Bakterien anhand verschiedener Merkmale. Dabei werden Enzymaktivitäten, der Abbau von Substraten und bestimmte Fähigkeiten der Bakterien untersucht. Die Ergebnisse (positiv/negativ) werden mit einer Tabelle verglichen und somit kann mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit das gesuchte Bakterium einer bestimmten Spezies zugeordnet werden. In dieser Arbeit mit den hier verwendeten Bakterienarten war die Anwendung der Bunten Reihe nicht möglich. Der Nachweis für das *Fusobacterium nucleatum* ist nur mit dem Indol-Test möglich, jedoch reagiert der *Actinomyces naeslundii* mit der Indol-Färbung ebenfalls positiv, was eine qualitative Unterscheidung dieser beiden Bakterienarten nicht möglich machte.

zu III) Die in dieser Arbeit verwendete Methode zur Keimdifferenzierung war die quantitative real-time Polymerasenkettenreaktion. Dieses Auswertungsverfahren eignete sich auf Grund seiner Spezifität optimal als quantitativer Nachweis der drei gemeinsam gewachsenen Keime. Mittels der quantitativen real-time Polymerasenkettenreaktion kann aus einem Bakteriengemisch spezifisch die DNA jedes einzelnen Bakteriums nachgewiesen werden und über eine Standardreihe die DNA-Konzentration dieser Bakterien ermittelt werden. Jedoch wird mit dieser Methode die DNA sowohl von lebenden Bakterien als auch von toten Bakterien detektiert. Somit ist mit der quantitativen real-time Polymerasenkettenreaktion zunächst nur eine relative Aussage über die Keimanzahl im Biofilm möglich. Eine prozentuale Angabe der lebenden Bakterien im Biofilm erfolgte in weiteren Versuchen durch die LIVE/DEAD-Färbung.

5.8. Quantitative real-time Polymerasenkettenreaktion

Die real-time PCR ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren. Mit Hilfe des SYBR-Green-PCR Systems (Sybr® Premix Ex Taq™) ist es möglich DNA zu amplifizieren und quantifizieren. Das System nutzt den Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green, der an der doppelsträngigen DNA-Helix bindet. Da der Farbstoff keine Sequenzspezifität aufweist, wird der zu amplifizierende DNA-Abschnitt durch die

spezifische Sequenz der entsprechenden PCR-Primer festgelegt. An dem entstehenden Amplifikat, welches durch die Polymerase synthetisiert wird, binden mehrere Moleküle des Farbstoffes. Die Fluoreszenzintensität des Farbstoff-DNA-Komplexes wurde bei einem Wellenlängenbereich von 500-600nm nach der Amplifikationsphase eines jeden abgeschlossenen Zyklus gemessen. Dabei ist die Fluoreszenzintensität proportional zur synthetisierten DNA-Menge. Ein PCR-Zyklus besteht aus drei Schritten. Zunächst erfolgt die thermische Denaturierung. Hierbei wird der DNA-Doppelstrang bei 90-95°C aufgetrennt und es entstehen zwei einzelsträngige DNA-Templatemoleküle. Im zweiten Schritt, der Annealing-Phase, werden die Primer an komplementäre Sequenzen des einzelsträngigen DNA-Stranges bei 45-60°C hybridisiert. Die Temperatur hängt hier von den eingesetzten Primern ab. Als Drittes erfolgt die Elongation, die Synthese des dazwischen gelegenen DNA-Abschnittes, welche bei 72°C durch die TAQ-Polymerase erfolgt. Die Zyklenzahl, die Temperatur und die Zeit pro Reaktionsschritt sind individuell programmierbar.

In der hier beschriebenen Arbeit erfolgte die real-time PCR mit dem Light-Cycler der Firma Roche (Light cycler II, Roche Diagnostics, Germany). Die Prä-PCR Arbeiten wurden an einem dafür gekennzeichnetem Arbeitsplatz durchgeführt. Prä- und Post-PCR Produkte wurden räumlich voneinander getrennt gehalten, um Kontamination und Verunreinigungen zu vermeiden.

5.8.1. Primer

Primer sind einzelsträngige Oligonukleotide, die zu einem definierten Bereich der Template-DNA komplementär sind. Sie lagern sich während der Annealing-Temperatur an die entsprechenden Bereiche an und dienen als Ansatzpunkt für die DNA-Polymerase. Die Auswahl dieser Startermoleküle bestimmt die Spezifität, Sensitivität und Reproduzierbarkeit der PCR. Die hier verwendeten Primer mussten zunächst mit Millipore-Wasser nach Herstellerangaben verdünnt werden. Anschließend wurden 100µl-Portionen der hergestellten Primerlösung abgefüllt und bei -20°C gelagert.

Tabelle 3		Primersequenzen für die Amplifikation von 16sRNA-Gensequenzen für die drei unterschiedlichen Bakterien
Oligo-Name	Sequenz (5'-3')	Fragmentgröße in Basenpaaren
EF-P4 forward	CTCAGGACGAACGCTGGCGG	480
EF-P4 reverse (NCBI-Primer tool)	CGTCAGGGGACGTTTACTACTAAC	
EF-P1 forward	CGCTGGCGGGCGTGCCTAATA	397
EF-P1 reverse (NCBI-Primer tool)	TTCACTCACGCGGCGTTGCT	
EF-P2 forward	GGACCCGCGGTGCATTAGCT	182
EF-P2 reverse (NCBI-Primer tool)	TCACTCACGCGGCGTTGCTC	
EF-1 forward	GACTACCAGGGTATCTAATC	285
EF-2 reverse	AGCAGCCGCGGTAATA	
AN-1 forward	GGCTGCGATACCGTGAGG	104
AN-2 reverse	TCTGCGATTACTAGCGACTCC	
FN-1 forward	CTTAGGAATGAGACAGAGATG	138
FN-2 reverse	TGATGGTAACATACGAAAGG	

EF= *Enterococcus faecalis*, AN=*Actinomyces naeslundii* FN= *Fusobacterium nucleatum*

5.8.2. Master-Mix

Für die real-time PCR wurde ein Master-Mix hergestellt. Das Pipettierschema für den Master Mix setzt sich wie folgt zusammen. Tabelle 4 zeigt das Pipettierschema für dem Mastermix.

Tabelle 4		Pipettierschema für den Master-Mix
Reagenzien	Menge in µl/Kapillare	
DNA	1	
SYBR-Green	10	
Primer forward	0,5	
Primer reverse	0,5	
Milipore Wasser	8	
Gesamtvolumen	20	

Der Master-Mix wurde zunächst ohne DNA hergestellt. Es wurden 19µl des Mastermixes in die Kapillaren pipettiert. 1µl der jeweiligen DNA wurde dann in die Kapillaren hinzugegeben. Diese wurden mit einem Deckel verschlossen und bei 1200 x g 15sec in einer Minispin-Zentrifuge zentrifugiert.

5.8.3. PCR-Protokoll

Jeder einzelne PCR-Lauf hat ein eigenes PCR-Protokoll, in dem die Zeit- und Temperaturangaben für die initiale Denaturierung, für die Amplifikationsphase, für die Schmelzkurve und für die Abkühlungsphase festgelegt sind. In den Vorversuchen wurde das Protokoll für den *Enterococcus faecalis* nach Denotti *et al.* [61] und für das *Fusobacterium nucleatum* und den *Actinomyces naeslundii* nach Periasamy *et al.* [172] verwendet und auf Spezifität untersucht. Im Laufe der Versuchsdurchführung wurden die jeweiligen Protokolle nach eigenen Voruntersuchungen optimiert (Tab.5).

Tabelle 5	Die verwendeten PCR-Protokolle für die PCR-Läufe der jeweiligen Bakterien.
Produkt	PCR-Protokoll
EF-1/2 (forward/reverse) [61]	initiale Denaturierung : 1x (30s“ 95°C) Amplifikation: 40x (0s“ 95°C, 10s“ 50°C, 12s“ 72°C, 0s“ 72°C) Schmelzkurve: 1x (0s“ 95°C, 0s“ 45°C, 0s“ 95°C) Abkühlung: 1x (30s“ 40°C)
AN-1/2 (forward/reverse) FN-1/2 (forward/reverse) [172]	initiale Denaturierung: 1x (30s“ 95°C) Amplifikation: 40x (30s“ 95°C, 60s“ 56°C, 0s“ 56°C, 10s“ 72°C) Schmelzkurve: 1x (0s“ 95°C, 0s“ 45°C, 0s“ 95°C) Abkühlung: 1x (30s“ 40°C)
AN-1/2 (forward/reverse) optimiert nach eigenen Voruntersuchungen	initiale Denaturierung: 1x (30s“ 95°C) Amplifikation: 40x (30s“ 95°C, 60s“ 62°C, 0s“ 62°C, 10s“ 72°C) Schmelzkurve: 1x (0s“ 95°C, 0s“ 45°C, 0s“ 95°C) Abkühlung: 1x (30s“ 40°C)
EF-P4 (forward/reverse) EF-P1 (forward/reverse) EF-P2 (forward/reverse) EF-1/2 (forward/reverse) optimiert nach eigenen Voruntersuchungen	initiale Denaturierung : 1x (30s“ 95°C) Amplifikation: 40x (0s“ 95°C, 10s“ 68°C, 12s“ 72°C, 0s“ 72°C) Schmelzkurve: 1x (0s“ 95°C, 0s“ 45°C, 0s“ 95°C) Abkühlung: 1x (30s“ 40°C)

Während der real time PCR wurden initiale Denaturierung, Amplifikation und die abschließende Schmelzkurvendarstellung fortlaufend protokolliert.

5.8.4. Exemplarischer Aufbau eines PCR-Laufes

Tabelle 6		Exemplarischer Aufbau eines PCR-Laufes zur Quantifizierung der drei unterschiedlichen Bakterien aus dem Biofilm	
Aufteilung der Proben	Produkte eines PCR-Durchlaufs	Konzentrationen	
Standardreihe	DNA des gesuchten Keimes	50ng/µl	
	DNA des gesuchten Keimes	5ng/µl	
	DNA des gesuchten Keimes	0,5ng/µl	
	DNA des gesuchten Keimes	0,05ng/µl	
	DNA des gesuchten Keimes	0,005ng/µl	
Biofilm-DNA Proben	72h-Biofilmzeitpunkt	unverdünnt	
	72h-Biofilmzeitpunkt	1:10-Verdünnung	
	72h-Biofilmzeitpunkt	1:100-Verdünnung	
	48h-Biofilmzeitpunkt	unverdünnt	
	48h-Biofilmzeitpunkt	1:10-Verdünnung	
	48h-Biofilmzeitpunkt	1:100-Verdünnung	
	24h-Biofilmzeitpunkt	unverdünnt	
	24h-Biofilmzeitpunkt	1:10-Verdünnung	
	24h-Biofilmzeitpunkt	1:100-Verdünnung	
	12h-Biofilmzeitpunkt	unverdünnt	
	12h-Biofilmzeitpunkt	1:10-Verdünnung	
	12h-Biofilmzeitpunkt	1:100-Verdünnung	
Kontrolle	Mediumkontrolle	unverdünnt	
	Mediumkontrolle	1:10-Verdünnung	
	Mediumkontrolle	1:100-Verdünnung	
	Wasserkontrolle (Milipore-Wasser)	unverdünnt	

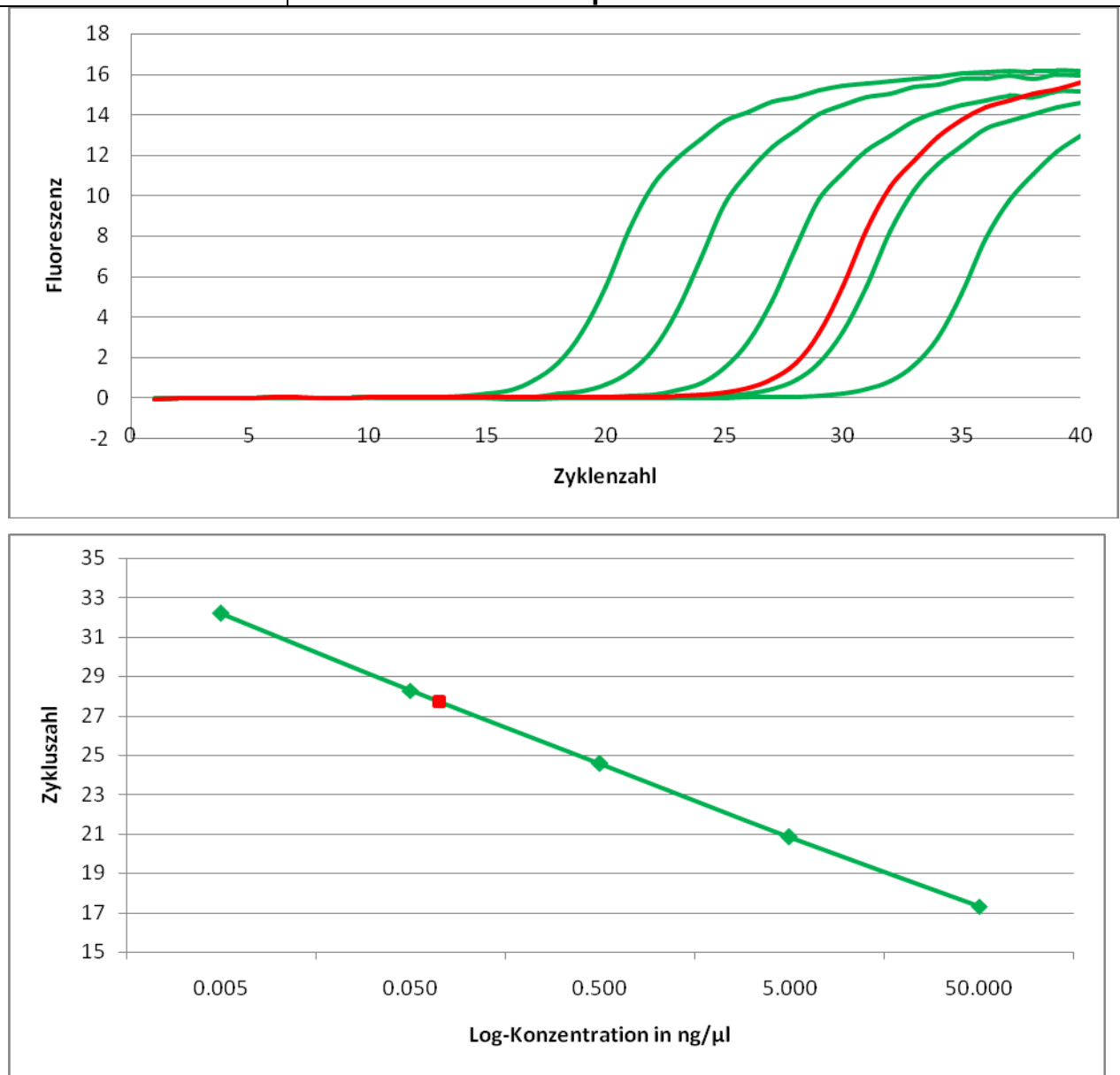
Bei jedem PCR-Durchlauf wurden zwei Negativkontrollen mitgeführt. Zum einen die aus dem Biofilmmodell beschriebene Mediumkontrolle, zum anderen eine Milipore-Wasserprobe. Die Biofilmproben wurden für die Quantifizierung auf 1:10 und 1:100 verdünnt. Tabelle 6 zeigt exemplarisch den Aufbau eines PCR-Laufes zur Quantifizierung der Bakterien aus dem gewachsenen Biofilm.

5.8.5. Festlegung der Standardreihe der jeweiligen Bakterien

Zur Fluoreszenzquantifizierung wurden Proben mit einer DNA-Standardreihe mit bekannter Konzentration der einzelnen Bakterien verglichen. Mit Hilfe dieser Standardkurve lässt sich die Konzentration der gesuchten Proben ermitteln. Die Konzentrationen des Standards wurden logarithmisch verdünnt und deckten den Bereich von 50ng/μl DNA bis 0,005ng/μl DNA ab (Abb.2). Die in dieser Arbeit untersuchten Proben sollten innerhalb dieses Standards verlaufen, um eine Extrapolation zu vermeiden. Abbildung 2 zeigt exemplarisch die im Rahmen dieser Arbeit festgelegte Standardreihe für den *Actinomyces naeslundii* für den positiven Nachweis einer unbekanntes DNA-Probe von *Actinomyces naeslundii*. Die rote Fluoreszenzkurve ist das amplifizierte PCR-Fragment der DNA des *Actinomyces naeslundii* mit einer unbekanntes DNA-Konzentration. Mittels dieser Standardreihe lässt sich dann die DNA-Konzentration des amplifizierten PCR-Fragmentes quantifizieren.

Abbildung 2

Exemplarische Darstellung einer im Rahmen dieser Arbeit festgelegten Standardreihe für den *Actinomyces naeslundii* mit dem AN1/2-Primerpaar



Obere Abbildung: Grün: Fünf Standardkurven des *Actinomyces naeslundii* mit einer Konzentration von 50ng/μl-0,005ng/μl DNA in 1:10-Verdünnungen. Rot: Amplifiziertes *Actinomyces naeslundii* PCR-Fragment mit unbekannter DNA-Konzentration.
Untere Abbildung: zugehörige Standardreihe zur Quantifizierung unbekannter DNA-Konzentrationen

5.8.6. Bestimmung und Bedeutung des Crossing points

Zur Auswertung der Ergebnisse muss der C_P -Wert (Crossing Point) bestimmt werden. Während der Startphase der PCR ist die DNA-Menge noch begrenzt, in der Endphase ist die DNA-Menge der Zielsequenz so stark angestiegen, dass DNA-

Fragmente immer häufiger miteinander hybridisieren können und die Aktivität der Polymerase dann wieder gehemmt wird. In der exponentiellen Phase verdoppelt sich die Zielsequenz unter optimalen Bedingungen. Der Anfang der exponentiellen Phase wird zur Quantifizierung verwendet. Der C_p -Wert gibt den Cycluswert an, bei dem die Fluoreszenz signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt. Je mehr DNA-Menge zu Beginn der Reaktion vorhanden ist, desto weniger Zyklen sind erforderlich um den Punkt zu erreichen, bei dem das Fluoreszenzsignal das Hintergrundrauschen deutlich übersteigt [92].

5.8.7. Schmelzkurvenanalyse und Schmelzpunkt

Am Ende eines jeden PCR-Laufes wurde eine Schmelzkurve erstellt, die für jedes amplifizierte PCR-Produkt eine spezifische und eindeutig definierbare Schmelztemperatur aufzeigen sollte. Diese steht in Abhängigkeit mit dem Cytosin-Guanin-Gehalt und der Fragmentgröße des Amplifikats. Durch Aufheizen des Cyclers in konstanten Intervallen kann jede Sekunde die Fluoreszenzintensität gemessen werden. Je stärker die DNA denaturiert ist, desto weniger CYBR-Green bindet an das synthetisierte Amplifikat. Bei zunehmender Denaturierung kommt es zu einem proportionalen Abfall der Fluoreszenz. Der Punkt, an dem die DNA komplett als Einzelstränge vorliegt und somit ein abrupter Fluoreszenzabfall auftritt, wird als Schmelzpunkt definiert.

5.8.8. DNA-Isolierung

Die DNA-Isolierung erfolgte nach dem Protokoll von Quiagen (Gentra Puregene Handbook 09/2007). Für die DNA-Isolierung wurde der Biofilm zunächst im Ultraschallbad vorbehandelt um die Bakterien aus dem adhären gewachsenen Biofilm zu vereinzeln. Die DNA dieses Bakteriengemisches wurde nach dem Protokoll für gram-positive Bakterien isoliert

5.8.9. Agarose-Gelelektrophorese

Zur Identifikation der Fragmentgröße der amplifizierten PCR-Produkte wurden die, nach einer real-time PCR synthetisierten Amplifikate in ein Reaktionsgefäß (1,6ml) abzentrifugiert und davon 8µl auf ein Agarosegel aufgetragen. Es wurde ein 0,8%iges Agarosegel hergestellt. Die Agarose wurde abgewogen, 1xTAE-Puffer (Rezept für 50xTAE: 2 M Tris-Base, 1M Eisessig, 50mM EDTA, pH 8,0) hinzugefügt und in der Mikrowelle aufgeköcht. Insgesamt wurden 8µl jeder Probe in die Gel-Tasche eingefüllt, bestehend aus 2µl Ficoll (Ladepuffer) und 6µl DNA. In die erste und letzte Tasche wurden 5µl eines Größenmarkers pipettiert. Nach elektrophoretischer Auftrennung bei 100V wurde das Gel in ein Ethidiumbromid-Bad gegeben, um so die Fragmente zu färben. Visualisiert wurde die DNA unter UV-Licht und mit einer Kamera (UVP, Visi Doc ITM Imaging System, USA) dokumentiert.

5.9. Fluoreszenzfärbung der extrazellulären polymeren Substanz

Der Nachweis der Fluoreszenzfärbungen der extrazellulären polymeren Substanz (EPS) erfolgte mit dem Farbstoff Concanavalin A. Concanavalin A färbt die spezifischen Zuckerreste in der EPS an und lässt sich mit dem Fluoreszenzfilter Texas Red als Rotfärbung mit einem Fluoreszenzmikroskop visualisieren. Zur besseren Darstellung der Bakterien wurden diese mit Farbstoff SYTO 9 angefärbt, welches alle Bakterien (intakte und zerstörte Zellmembran) grün fluoreszieren lässt. Um die extrazelluläre Substanz mit einem Fluoreszenzmikroskop untersuchen zu können, musste der Biofilm auf Permanox Objektträgern wachsen. Diese Objektträger können eine unterschiedliche Anzahl an Kammern besitzen, wobei die Kammerwände abziehbar sind. In diesen Kammern wurde ein 72h-Biofilm wie zuvor beschrieben hergestellt. 0,2mg Concanavalin A wurden in 1ml NaHCO₃ gelöst. Pro Kammer wurden 1ml der Concanavalin A-Lösung pipettiert und 30min unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubationsdauer wurde der Biofilm zweimal mit sterilem PBS gewaschen. Die Wände der Kammern wurden dann abgezogen und mit einem Deckglas wurde der angefärbte Biofilm fixiert. Tabelle 7 zeigt die verwendeten Farbstoffe mit den zugehörigen Filtersets zur Detektion.

Tabelle 7	Verwendete Farbstoffe und zugehörige Filtersets zur Detektion				
Farbstoff und Markierung	Exciter	Dichroider Spiegel	Emitter	Filteransatz von OmegaOptical	Art
SYTO9	475AF40 (XF1073)	505 DRLP (XF2010)	535AF 45(XF3084)	XF100	Bandpass
Propidium iodide, ConcanavalinA	560AF55 (XF1067)	595DRLP (XF2029)	645AF75 (XF3081)	XF102	Bandpass

5.10. Mehrkanal-3D-Fluoreszenzmikroskopie

Die Mehrkanal 3D Fluoreszenzmikroskopie ist eine neuere mikroskopische Methode zur Untersuchung der dreidimensionalen Struktur von Biofilmen. Ohne spezielle Präparation können in definierten Abständen (μm) optische Serienabschnitte durch x- y- und z-Ebenen des Untersuchungsobjektes gelegt werden. Somit können aus zweidimensionalem Datensatz dreidimensionale Rekonstruktionen erstellt werden. Hierbei können Schichten bis zu einer Dicke von $100\mu\text{m}$ analysiert werden. Mit dem in dieser Arbeit verwendeten Mehrkanal-3D-Fluoreszenzmikroskop erfolgten zusammengesetzte Schichtaufnahmen zur Visualisierung der extrazellulären Matrix in der dreidimensionalen Biofilmstruktur und für den Lebend/Tod-Nachweis. Mit der Axiovision Software erfolgte die Datenerfassung.

5.11. Live-Dead-Färbungen

Mit der quantitativen real-time Polymerasenkettenreaktion kann zwar eine absolute Quantifizierung der DNA der Keime erfolgen, jedoch kann diese Methode nicht intakte DNA von zerstörter DNA unterscheiden. Somit gibt diese Methode keine Auskunft über die Menge an toten Mikroorganismen im Biofilm. Hierfür wurden LIVE/DEAD-Färbungen durchgeführt um eine prozentuale Angabe über die Menge an toten Mikroorganismen zu erhalten.

Für die LIVE/DEAD Färbungen wurde der Biofilm Viability Kit von Invitrogen verwendet. Diese Untersuchung ermöglichte es, mittels eines Fluoreszenzmikroskopes gleichzeitig lebende und tote Zellen sichtbar zu machen. Der Farbstoff SYTO 9 ist ein grün fluoreszierender Farbstoff, der alle Bakterien anfärbt, sowohl die mit intakter als auch die mit zerstörter Membran. Propidiumjodid, ein rot fluoreszierender Farbstoff, färbt nur die Bakterien mit zerstörter Membran an. Die beiden Farbstoffe wurden im gleichen Verhältnis miteinander vermischt, um in einer Messung sowohl die lebenden, als auch die toten Bakterien erfassen und abbilden zu können. Mit dem Fluoreszenzmikroskop konnten die toten, rot gefärbten und die vitalen, grün gefärbten Zellen beobachtet werden.

5.12. Datenerfassung und statistische Auswertung

Das Wachstum des Biofilmes wurde nach 12, 24, 48 und 72 Stunden gemessen. Für jeden Zeitpunkt wurden 12 Stichproben pro Biofilm hergestellt und unverdünnt, 1:10 und 1:100 verdünnt mit dem Light Cycler-System semiquantitativ ausgewertet. In jeder Probe wurde jeder der drei verwendeten Bakterienstämme untersucht. Somit wurden 144 Biofilm Stichproben hergestellt. Damit ergaben sich insgesamt 432 Light Cycler-Läufe.

Mit der Systemsoftware wurde das „second derivative maximum“ bestimmt. Aus diesem Abszissen (=Zyklus)wert wurde mit der bei jedem PCR-Lauf mitgeführten Standardkurve die Konzentration des gerade untersuchten Bakteriums bestimmt.

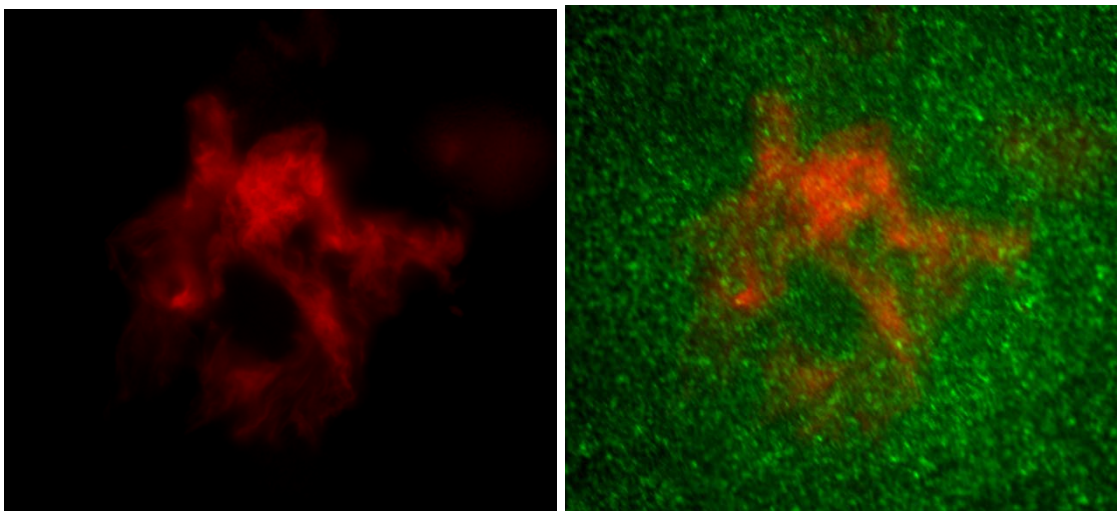
Die deskriptive Darstellung erfolgte als Mediane mit zugehörigen 25-75% Quantilen. Zur Überprüfung der Signifikanz wurde der Mann-Whitney-Test und die Error-Rates-Methode (ERM) auf dem Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ angewandt.

6. Ergebnisse

6.1. Nachweis der extrazellulären Matrix im Biofilm

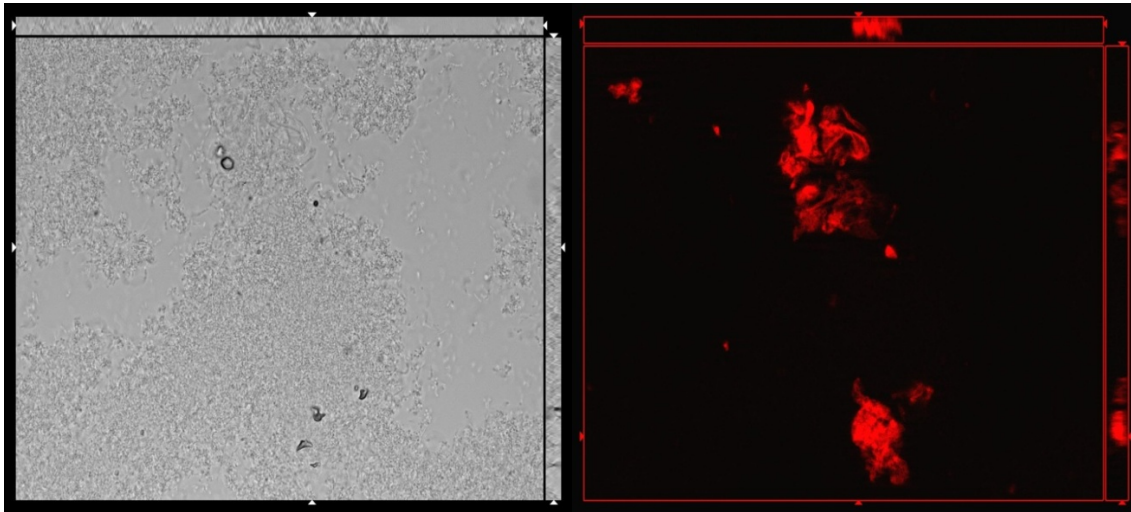
Die extrazelluläre polymere Matrix ist maßgeblich für die biologischen und chemischen Prozesse in einem Biofilm. Durch die Anfärbung der spezifischen Zuckerreste der extrazellulären Matrix mit dem Farbstoff Concanavalin A, kann die extrazelluläre Matrix im Biofilm visualisiert werden. Der hierbei verwendete Filter Texas Red lässt die extrazelluläre Matrix rot fluoreszieren. Die Beurteilung der Biofilmstrukturen erfolgte sowohl mit einem Fluoreszenzmikroskop (Abbildung 3) als auch mit einem Mehrkanal-3D-Fluoreszenzmikroskop (Abbildung 4). Mit dem Mehrkanal-3D-Fluoreszenzmikroskop konnte aus einem zwei-dimensionalen Bilddatensatz eine drei-dimensionale Rekonstruktion erstellt werden. Die unten aufgezeigten Graphiken zeigen exemplarische Aufnahmen der extrazellulären Matrix. In der Durchlichtaufnahme kann man stark besiedelte Bakterienareale erkennen die teilweise Lücken in ihrer Struktur aufweisen. Diese Lücken könnten auf die Ausbildung von Versorgungskanälen in den unteren Schichten der Biofilmstruktur hinweisen (Abb. 4).

Abbildung 3 Exemplarische Darstellung der EPS mit dem Fluoreszenzfarbstoff Concanavalin A in einer Fluoreszenzaufnahme



Links: Fluoreszenzaufnahmen der extrazellulären polymeren Substanz (EPS) in einem Biofilm mit dem Farbstoff Concanavalin A (rot).
Rechts: Kolokalisation der EPS und Biofilm. Die Bakterien im Biofilm wurden mit SYTO 9 markiert und sind grün dargestellt.

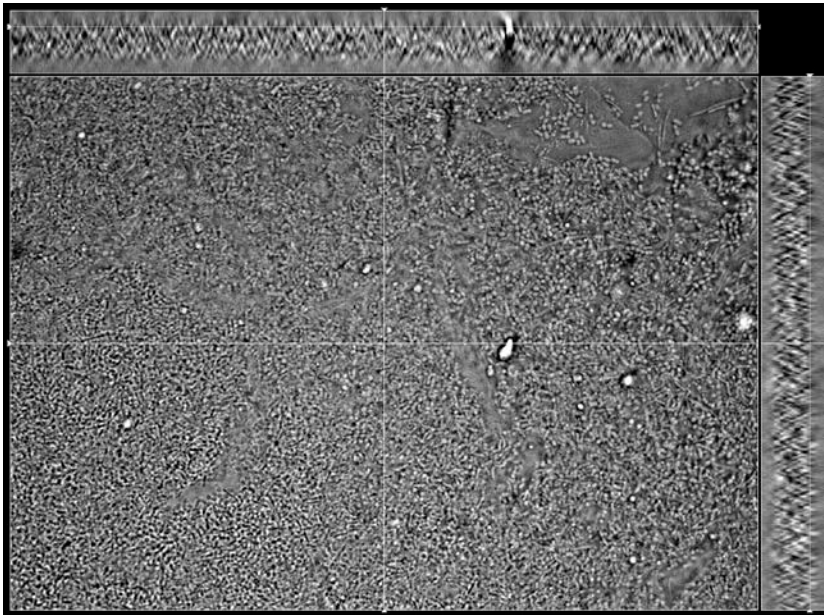
Abbildung 4 Dreidimensionale exemplarische Darstellung der EPS mit dem Fluoreszenzfarbstoff Concanavalin A



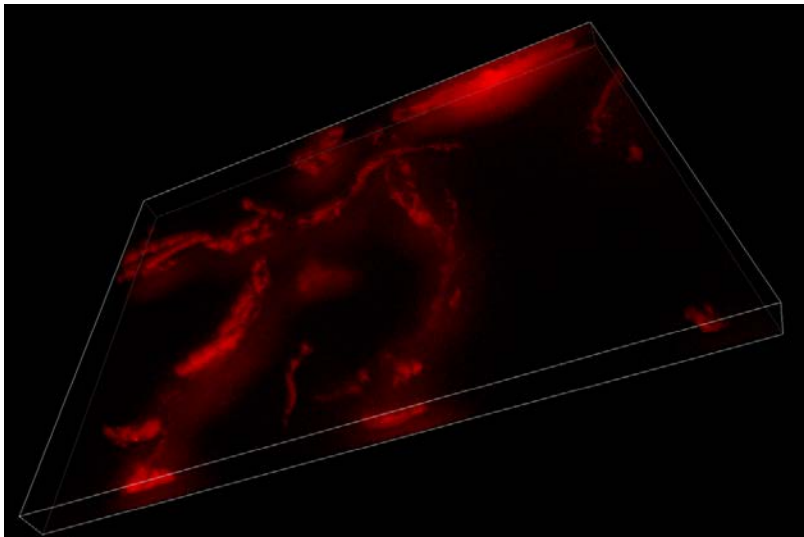
Links: Durchlichtaufnahme eines auf Permanox-Objekträgern hergestellten Biofilmes.

Rechts: korrespondierendes Fluoreszenzbild, mit Concanavalin A angefärbte extrazelluläre polymere Substanz. Die Skalierung an oberen und rechten Randbereich zeigt die Fluoreszenzverteilung in unterschiedlichen Ebenen entlang der x (Breite), y (Länge), und z (Tiefe)-Achse.

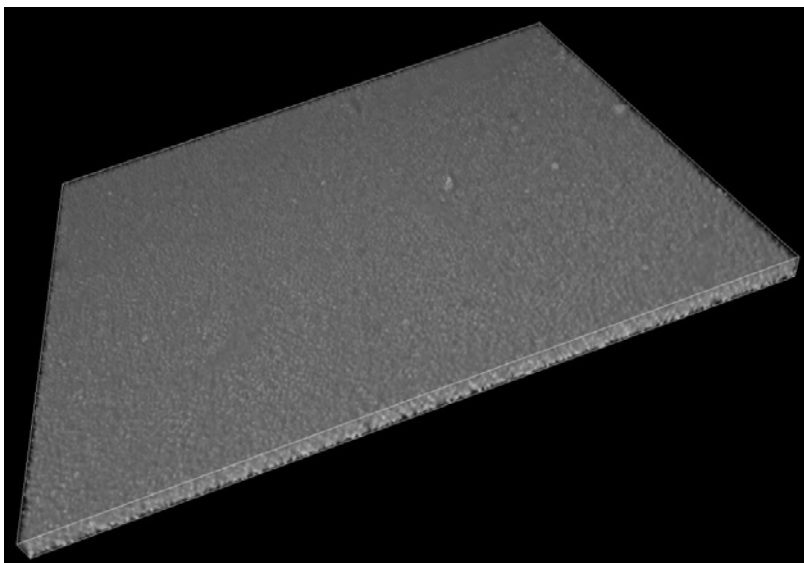
Abbildung 5 Dreidimensionale exemplarische Darstellung der EPS mit dem Fluoreszenzfarbstoff Concanavalin A



a) Durchlichtaufnahme eines auf Permanox-Objektträgern hergestellten Biofilmes. Die Skalierung am oberen und rechten Randbereich zeigt die bakterielle Verteilung in unterschiedlichen Ebenen entlang der x (Breite), y (Länge), und z (Tiefe)-Achse.



b) zu Abb. 5a) zugehörige dreidimensionale Fluoreszenzaufnahme der extrazellulären Matrix. Der verwendete Farbstoff ist Concanavalin A. Die Matrix ist in allen Schichten des Biofilmes nachweisbar.



c) zu Abb. 5a,b zugehörige dreidimensionale Durchlichtaufnahme des Biofilmes bestehend aus 10 Einzelbildern aus verschiedenen Ebenen.

6.2. Nachweis der biofilmbildenden Bakterien im Biofilm

6.2.1. Quantitativer und semiquantitativer Nachweis mittels real-time PCR

Die hier aufgeführten Ergebnisse zum Nachweis der Bakterien im Biofilm wurde mittels real-time Polymerasenkettenreaktion durchgeführt. Die Auswertung erfolgte dann semi-quantitativ, da die Gesamt-DNA-Menge der verwendeten Bakterien bestimmt wurde, denn die real-time PCR-Methode kann nicht die DNA von lebenden und toten Bakterien unterscheiden. Mit den zusätzlich durchgeführten Durch Anwendung von LIVE/DEAD-Färbungen kann eine prozentuale Angabe an lebenden und toten Bakterien in dem Biofilm angegeben werden. Somit sollte es möglich sein, unterschiedliche Bakterien in einem Biofilm sowohl qualitativ als auch semi-quantitativ voneinander zu unterscheiden.

6.2.2. Spezifität und Kreuzreaktivität der verwendeten Primer

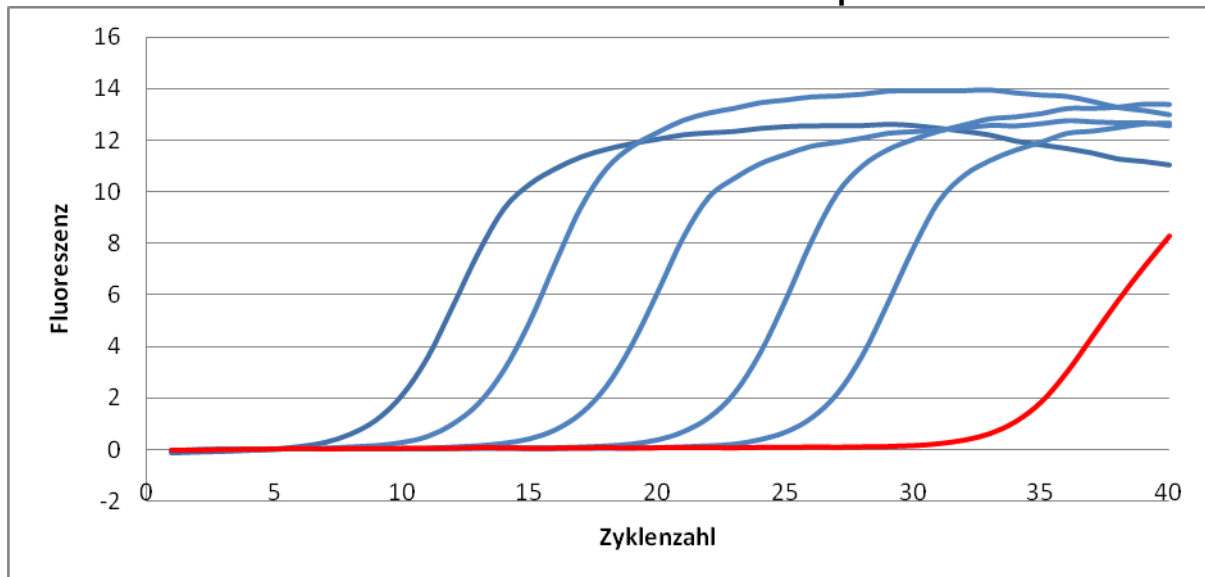
Bevor die qualitative und quantitative Auswertung der drei Bakterien im Biofilm mit dem Light Cycler erfolgen konnte, mussten die Primer auf ihre Spezifität für die jeweiligen Bakterien untersucht werden. Dabei wurden die Primer auf Kreuzreaktivität mit der DNA der jeweiligen anderen Bakterien untersucht.

Für den Spezifitätsnachweis der amplifizierten PCR-Produkte müssen im Rahmen dieser Arbeit zwei Kriterien erfüllt werden.

I) Das entstehende Fluoreszenzsignal eines amplifizierten PCR-Fragmentes unter Verwendung eines spezifischen Primerpaares (z.B. das Primerpaar EF1/2 für den *Enterococcus faecalis*) mit der DNA eines der beiden anderen Bakterien (*Fusobacterium nucleatum/Actinomyces naeslundii* untersucht mit Primerpaar EF1/2), soll nicht innerhalb des für das spezifische Bakterium (in diesem Fall *Enterococcus faecalis* untersucht mit Primerpaar EF1/2) festgesetzten Standards detektiert werden. Abbildung 6a zeigt exemplarisch die Standardreihe für die PCR-Produkte der DNA des *Enterococcus faecalis* mit Primerpaar EF1/2 (blau). Die rote Fluoreszenzkurve zeigt das Signal für das amplifizierte PCR-Produkt des

Fusobacterium nucleatum mit dem Primerpaar EF1/2. Alle Fluoreszenzsignale außerhalb des Standards wurden nicht bewertet.

Abbildung 6a Exemplarische Darstellung der Standardreihe für den *Enterococcus faecalis* mit dem Primerpaar EF1/2

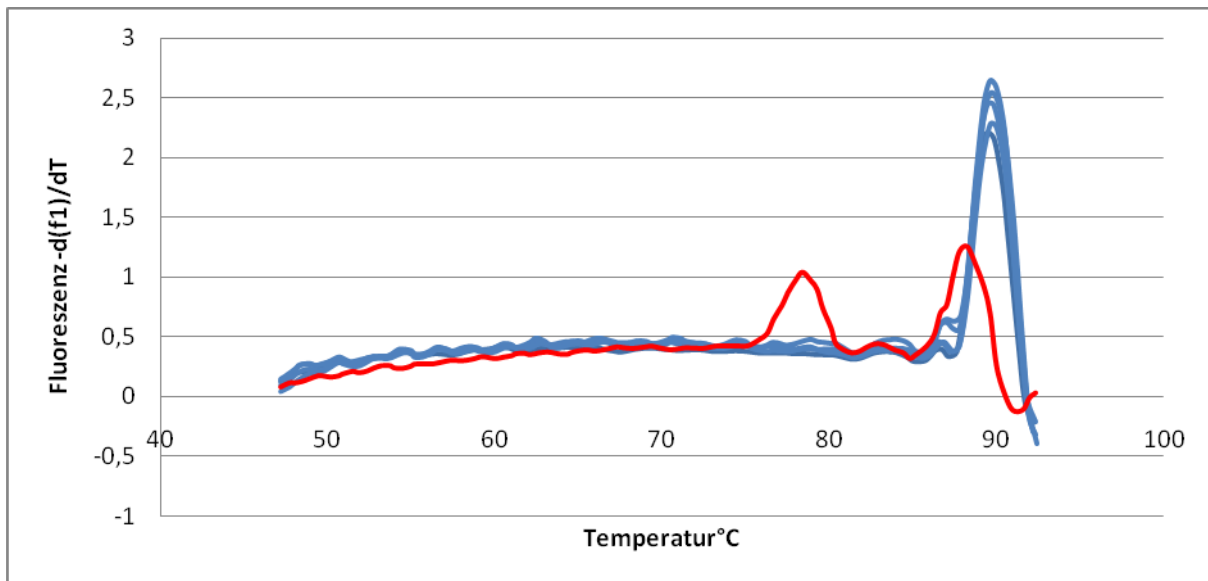


Blau: Standardreihe der PCR-Fragmente des *Enterococcus faecalis* mit dem Primerpaar EF1/2. DNA-Konzentrationen betragen von 50ng/μl-0,005ng/μl in 1:10-Verdünnungen.

Rot: Fluoreszenzkurve des amplifizierten PCR-Fragmentes unter Verwendung von DNA von *Fusobacterium nucleatum* mit dem Primerpaar EF1/2.

II) Das zweite Kriterium ist die spezifische Schmelztemperatur der jeweilig amplifizierten PCR-Fragmente durch die real-time PCR mit den entsprechenden Primerpaaren für jede Bakterienspezies. Jedes PCR-Produkt weist einen spezifischen, eindeutig definierbaren Schmelzpunkt auf. Der Schmelzpunkt ist der Punkt, an dem eine Auftrennung der PCR-Fragmente in DNA-Einzelstränge erfolgt und somit ein abrupter Fluoreszenzabfall auftritt. Abbildung 6b zeigt die zugehörige Schmelzkurvenanalyse zu Abbildung 6a. Die Schmelzpunkte der Standardreihe des *Enterococcus faecalis* liegen bei allen PCR-Fragmenten bei 89,7°C. Der Schmelzpunkt für das PCR-Fragment des *Fusobacterium nucleatum* mit dem Primerpaar EF1/2 zeigt einen anderen, unspezifischen Schmelzpunkt. Dies gilt als Nachweis, dass das EF1/2-Primerpaar die amplifizierten PCR-Fragmente des *Fusobacterium nucleatum* nicht spezifisch erkennt. Auf diese Weise können falsch positive Ergebnisse ausgeschlossen werden.

Abbildung 6b Zugehörige Schmelzkurvenanalyse zur Abb.6a für den *Enterococcus faecalis* mit dem Primerpaar EF1/2



Blau: Schmelzpunkte der Standardreihe, spezifisch für die PCR-Fragmente des *Enterococcus faecalis* mit dem EF1/2-Primerpaar, bei 89,7°C.
Rot: Schmelzpunkt des amplifizierten PCR-Fragmentes unter der Verwendung der DNA von *Fusobacterium nucleatum* mit dem EF1/2-Primerpaar.

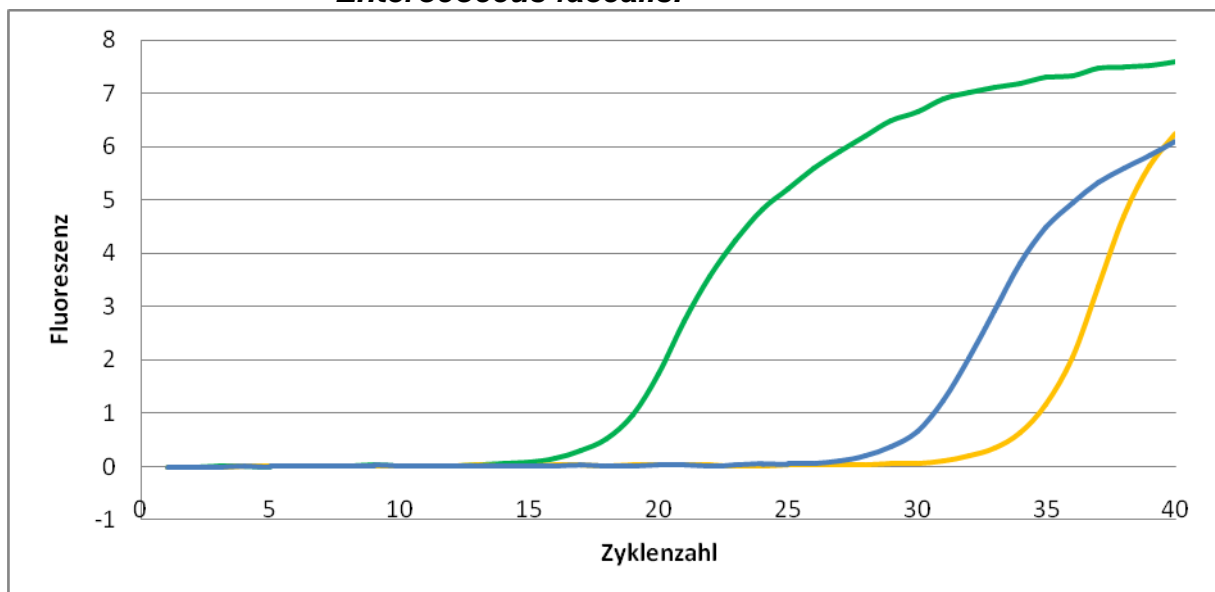
In der vorliegenden Arbeit lag der spezifische Schmelzpunkt für das 16s PCR-Fragment von *Enterococcus faecalis* bei 89,7°C +/- 0,5°C, für *Actinomyces naeslundii* bei 86,3°C +/- 0,5°C und für *Fusobacterium nucleatum* bei 86,6°C +/- 0,5°C, untersucht mit dem spezifischen Primerpaar der jeweiligen Bakterien.

6.2.2.1. Spezifitätsuntersuchung des Primerpaares AN1/2

In Vorversuchen musste zunächst die Spezifität der Primer für den Nachweis der jeweiligen Bakterien überprüft werden, um so eine Quantifizierung möglich zu machen. Jedes eingesetzte Primerpaar wurde mit der DNA der drei Bakterien auf Reaktivität und Spezifität untersucht. Abbildung 7a zeigt die Fluoreszenzkurvenanalyse für das *Actinomyces naeslundii*-Primerpaar (AN1/2) untersucht mit der DNA aller drei Bakterien (*Actinomyces naeslundii*, *Fusobacterium nucleatum*, *Enterococcus faecalis*). Die Abszisse gibt die Zyklenzahl an, die Ordinate das Fluoreszenzsignal. Je spezifischer der Primer an die PCR-Fragmente der DNA bindet, desto früher erscheint das Fluoreszenzsignal und desto spezifischer ist der

Primer für den jeweiligen Bakterienstamm. Das amplifizierte PCR-Fragment des *Actinomyces naeslundii* mit dem AN1/2-Primerpaar liegt innerhalb des in dieser Arbeit festgesetzten Standards (50ng/µl-0,005ng/µl DNA) für den *Actinomyces naeslundii*. Die amplifizierten PCR-Produkte für den *Enterococcus faecalis* und das *Fusobacterium nucleatum* liegen außerhalb des für den *Actinomyces naeslundii* festgesetzten Standards. Abbildung 7a ist zu entnehmen, dass das Signal für den *Enterococcus faecalis* 20 Zyklen später und für das *Fusobacterium nucleatum* 15 Zyklen später erscheint als beim *Actinomyces naeslundii*, somit ergibt das AN1/2-Primerpaar, untersucht auf das *Fusobacterium nucleatum* und den *Enterococcus faecalis*, ein weit schwächeres Fluoreszenzsignal als mit der DNA des *Actinomyces naeslundii*, bei gleicher DNA-Konzentration (32ng/µl).

Abbildung 7a Fluoreszenzkurvenanalyse für den *Actinomyces naeslundii*-Primer (AN1/2) untersucht mit der DNA des *Actinomyces naeslundii*, *Fusobacterium nucleatum* und *Enterococcus faecalis*.

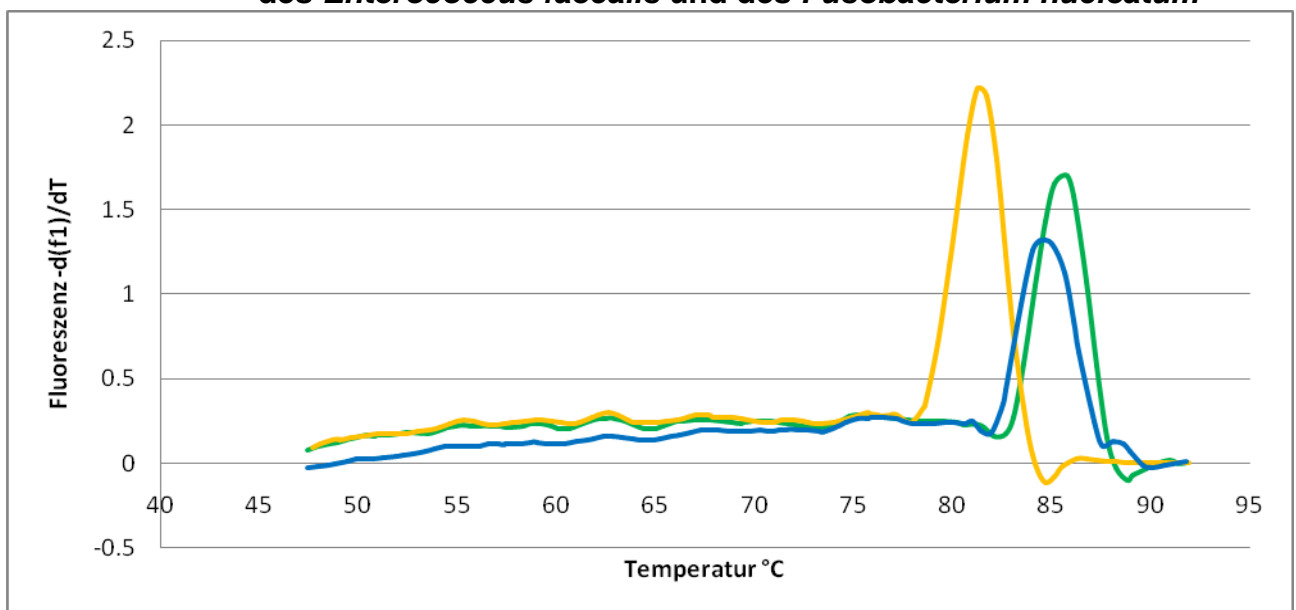


Die grüne Kurve gibt das Fluoreszenzsignal für den *Actinomyces naeslundii*, die gelbe Kurve für das *Fusobacterium nucleatum* und die blaue Kurve für den *Enterococcus faecalis* jeweils untersucht mit dem Primerpaar AN1/2 an. Die Konzentrationen der DNA der Bakterien betrug jeweils 32ng/µl.

Die Spezifität des Primerpaares (AN1/2) wurde mit der Schmelzkurvenanalyse der jeweiligen PCR-Fragmente überprüft und bestätigt. Abbildung 7b zeigt die dazugehörige Schmelzkurvenanalyse für das amplifizierte PCR-Fragment durch das

Primerpaar AN1/2. Das PCR-Fragment von *Actinomyces naeslundii* hat somit einen spezifischen Schmelzpunkt bei $86,3^{\circ}\text{C} \pm 0,5$. Abbildung 7b zeigt die Schmelzkurvenanalyse der erhaltenen PCR-Fragmente unter Verwendung der DNA von *Fusobacterium nucleatum* und der DNA von *Enterococcus faecalis* jeweils mit dem AN1/2-Primerpaar. Deutlich kann man einen jeweils abweichenden Schmelzpunkt erkennen. Der Schmelzpunkt für das *Fusobacterium nucleatum* weist eine Temperaturabweichung von $6,3^{\circ}\text{C}$ auf, für den *Enterococcus faecalis* eine Temperaturabweichung von 2°C . Somit kann eine Kreuzreaktivität des *Actinomyces naeslundii*-Primerpaares (AN1/2) mit der DNA des *Fusobacterium nucleatum* und des *Enterococcus faecalis* ausgeschlossen werden. Dies wurde in Wiederholungsversuchen bestätigt.

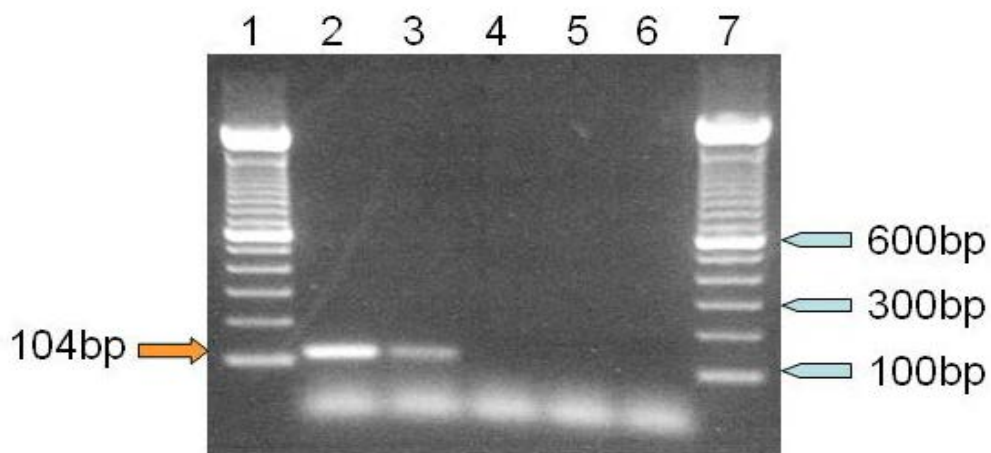
Abbildung 7b Schmelzkurvenanalyse (zu Abb.7a) für den *Actinomyces naeslundii*-Primer (AN1/2) untersucht mit der DNA des *Actinomyces naeslundii*, des *Enterococcus faecalis* und des *Fusobacterium nucleatum*



Die grüne Kurve gibt die Schmelztemperatur für das amplifizierte PCR-Fragment von *Actinomyces naeslundii*, die gelbe Kurve die Schmelztemperatur für das amplifizierte PCR-Fragment von *Fusobacterium nucleatum* und die blaue Kurve für das amplifizierte PCR-Fragment von *Enterococcus faecalis* an, untersucht mit dem Primer AN1/2 für den Nachweis von *Actinomyces naeslundii*.

Für die Spezifitätsversuche wurde zur Bestätigung der Ergebnisse die Gelelektrophorese durchgeführt. Abbildung 7c zeigt in Spalte 2 und 3 die amplifizierten PCR-Produkte für die DNA des *Actinomyces naeslundii*, mit dem Primerpaar AN 1/2. Die Fragmentgröße von 104bp stimmt mit den Vorgaben vom NCBI-Primer tool überein. Die DNA des *Enterococcus faecalis* (Spalte 4) und die DNA des *Fusobacterium nucleatum* (Spalte 5) konnte mit dem Primerpaar AN1/2 nicht amplifiziert werden. Spalte 6 zeigt die Wasserkontrolle. Das Primerpaar AN1/2 erkennt spezifisch die DNA des *Actinomyces naeslundii*.

Abbildung 7c Gelelektrophoretische Darstellung der amplifizierten PCR-Produkte für den *Actinomyces naeslundii* mit dem Primerpaar AN1/2



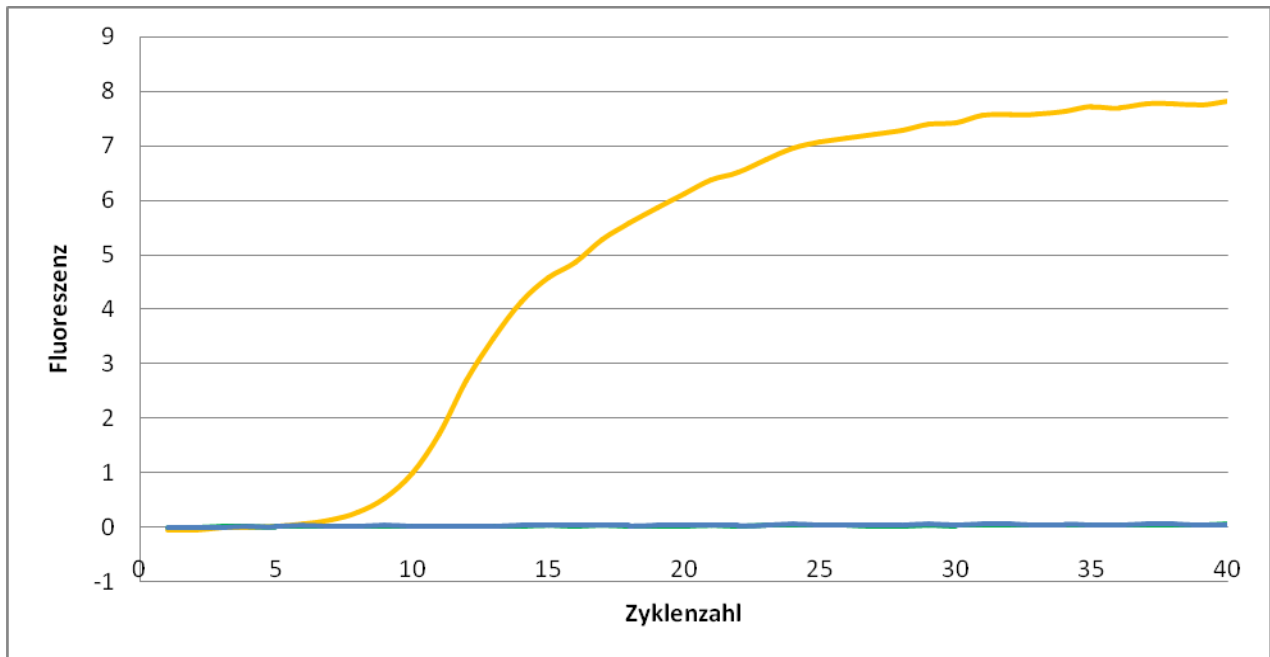
Spezifitätsnachweis der DNA des *Actinomyces naeslundii* mit dem Primerpaar AN1/2 mit einer erwarteten Fragmentgröße von 104bp (NCBI-Primer tool). Alle hier dargestellten amplifizierten PCR-Produkte (2-6) wurden mit dem Primerpaar AN1/2 durchgeführt. 1 und 7: Größenmarker; 2 und 3: amplifiziertes PCR-Produkt für die DNA des *Actinomyces naeslundii* mit einer Fragmentgröße von 104bp; 4: *Enterococcus faecalis*-DNA; 5: *Fusobacterium nucleatum*-DNA; 6: Wasserkontrolle. Das Primerpaar AN1/2 erkennt spezifisch die DNA des *Actinomyces naeslundii*.

6.2.2.2. Spezifitätsuntersuchung des Primerpaares FN1/2

Das *Fusobacterium nucleatum*-Primerpaar FN1/2 und das *Enterococcus faecalis*-Primerpaar EF1/2 wurden entsprechend dem *Actinomyces naeslundii* auf Spezifität und Kreuzreaktivität untersucht. Abbildung 8a zeigt die Fluoreszenzkurvenanalyse des FN1/2-Primerspaars mit der DNA des *Fusobacterium nucleatum*, des *Enterococcus faecalis* und des *Actinomyces naeslundii*. In diesem Fall ist die Fluoreszenzkurve schon ausreichend um die Spezifität des FN1/2-Primerspaars für

das *Fusobacterium nucleatum* zu beweisen, da dieses Primerpaar nicht mit der DNA des *Enterococcus faecalis* und *Actinomyces naeslundii* reagiert (Abb.8a). Die dazugehörige Schmelzkurvenanalyse (Abb. 8b) bestätigt die Fluoreszenzkurvenanalyse (Abb 8a).

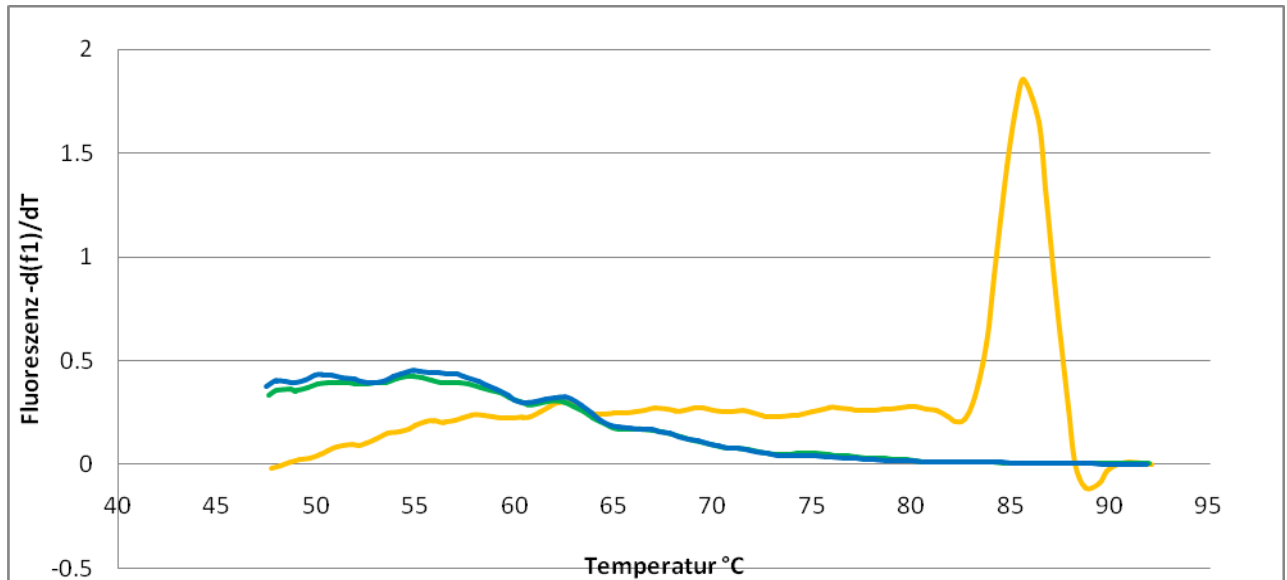
Abbildung 8a Fluoreszenzkurvenanalyse für das *Fusobacterium nucleatum*-Primerpaar (FN1/2) untersucht mit der DNA des *Fusobacterium nucleatum*, des *Actinomyces naeslundii*, und des *Enterococcus faecalis*



Die gelbe Kurve gibt das Fluoreszenzsignal für das amplifizierte PCR-Fragment von *Fusobacterium nucleatum*, die grüne Kurve für das amplifizierte PCR-Fragment von *Actinomyces naeslundii*, und die blaue Kurve für das amplifizierte PCR-Fragment von *Enterococcus faecalis* an. Die Konzentrationen der DNA der Bakterien betrug jeweils 24ng/µl.

Die spezifische Schmelztemperatur für das amplifizierte PCR-Fragment mit dem *Fusobacterium nucleatum*-Primerpaar (FN1/2) liegt bei 86,6°C. Abb. 8b zeigt für die DNA des *Enterococcus faecalis* und des *Actinomyces naeslundii* untersucht mit dem FN1/2-Primerpaar keinen Schmelzpunkt an. Somit kann eine Kreuzreaktivität des *Fusobacterium nucleatum*-Primerpaares (FN1/2) mit der DNA des *Actinomyces naeslundii* und des *Enterococcus faecalis* ausgeschlossen werden. Dies wurde in Versuchswiederholungen bestätigt.

Abbildung 8b Schmelzkurvenanalyse (zur Abb.8a) für das *Fusobacterium nucleatum*- Primerpaar (FN1/2) untersucht mit der DNA des *Fusobacterium nucleatum*, des *Actinomyces naeslundii*, und des *Enterococcus faecalis*



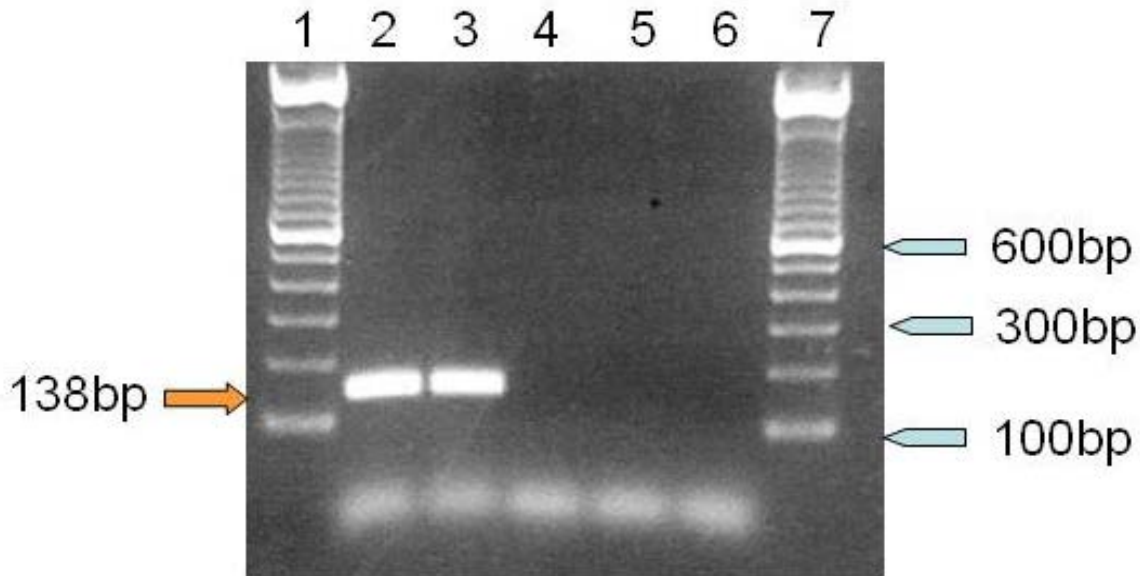
Die gelbe Kurve gibt die Schmelztemperatur für das amplifizierte PCR-Fragment von *Fusobacterium nucleatum*, die blaue Kurve die Schmelztemperatur für das amplifizierte PCR-Fragment von *Enterococcus faecalis* und die grüne Kurve für das amplifizierte PCR-Fragment von *Actinomyces naeslundii* an, untersucht mit dem Primerpaar des *Fusobacterium nucleatum* FN1/2.

Für die Spezifitätsversuche wurde zur Bestätigung der Ergebnisse die Gel-Elektrophorese durchgeführt. Abbildung 8c zeigt in Spalte 2 und 3 die amplifizierten PCR-Produkte für die DNA des *Fusobacterium nucleatum*, mit dem Primerpaar FN 1/2.

Die Fragmentgröße von 138bp stimmt mit den Vorgaben vom NCBI-Primer tool überein. Die DNA des *Actinomyces naeslundii* (Spalte 4) und die DNA des *Enterococcus faecalis* (Spalte 5) konnte mit dem Primerpaar FN1/2 nicht amplifiziert werden. Spalte 6 zeigt die Wasserkontrolle. Das Primerpaar FN1/2 erkennt spezifisch die DNA des *Fusobacterium nucleatum*.

Abbildung 8c

Gelelektrophoretische Darstellung der Fragmentgröße der amplifizierten PCR-Produkte für das *Fusobacterium nucleatum* mit dem Primerpaar FN 1/2

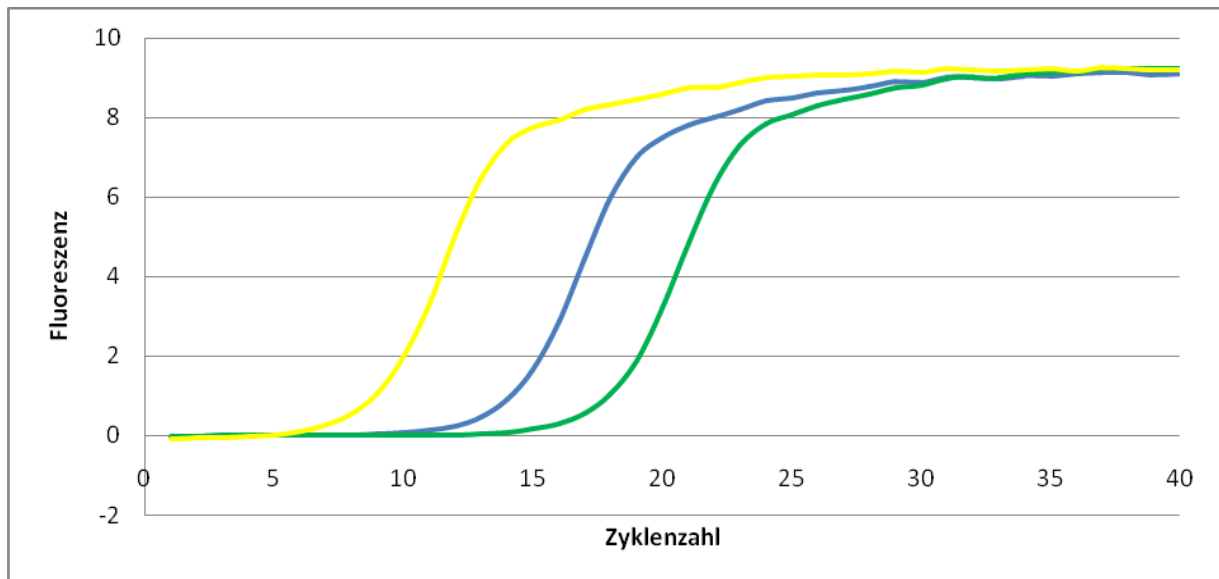


Spezifitätsnachweis der DNA des *Fusobacterium nucleatum* mit dem Primerpaar FN1/2 mit einer erwarteten Fragmentgröße von 138bp (NCBI-Primer tool). Alle hier dargestellten amplifizierten PCR-Produkte (2-6) wurden mit dem Primerpaar FN1/2 durchgeführt. 1 und 7: Größenmarker; 2 und 3: amplifiziertes PCR-Produkt für die DNA des *Fusobacterium nucleatum* mit einer Fragmentgröße von 138bp; 4: *Actinomyces naeslundii*-DNA; 5: *Enterococcus faecalis*-DNA; 6: Wasserkontrolle. Das Primerpaar FN1/2 erkennt spezifisch die DNA des *Fusobacterium nucleatum*.

6.2.2.3. Spezifitätsuntersuchung des Primerpaares EF1/2

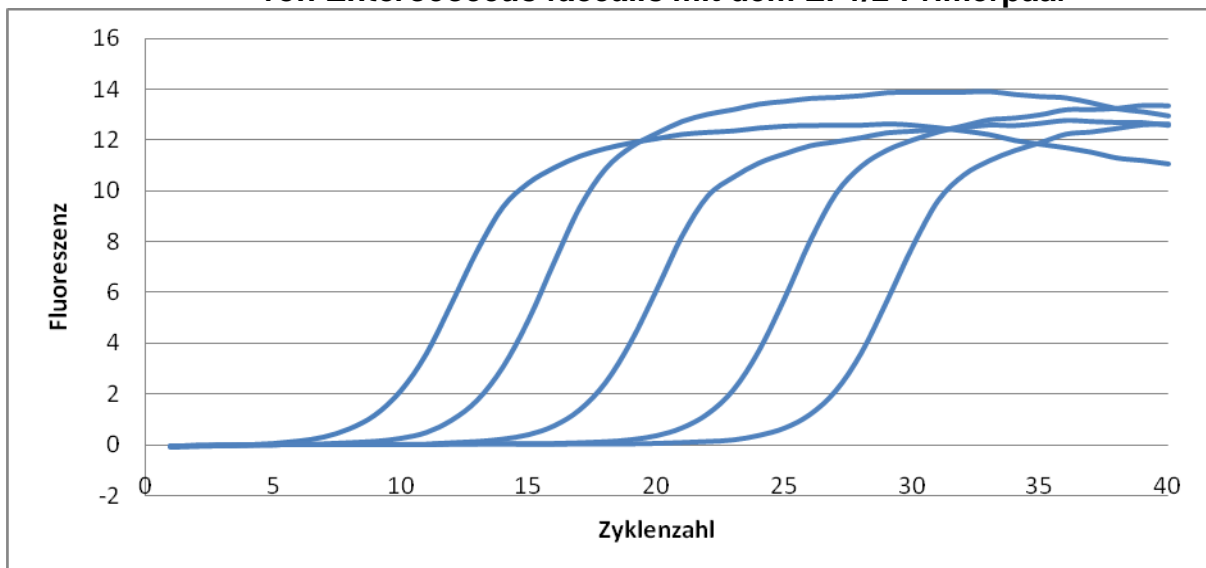
Der zunächst verwendete Primer für den spezifischen Nachweis von *Enterococcus faecalis* (Seite 40, EF-1 forward und EF-2 reverse) wurde aus der Publikation von Denotti et al. [61] entnommen und auf Kreuzreaktivität mit der DNA des *Actinomyces naeslundii* und des *Fusobacterium nucleatum* untersucht. Das Fluoreszenzsignal für die DNA des *Fusobacterium nucleatum* mit dem EF1/2-Primerpaar erscheint fünf Zyklen vor dem Fluoreszenzsignal des *Enterococcus faecalis* und innerhalb des Standards für den *Enterococcus faecalis* (Abb. 9a,b). Somit ist dieses Primerpaar nicht geeignet, spezifisch DNA von *Enterococcus faecalis* zu detektieren. Ebenso wird durch das Primerpaar EF1/2 ein PCR-Fragment innerhalb des *Enterococcus faecalis* Standards amplifiziert, wenn als Test-DNA, DNA von *Actinomyces naeslundii* eingesetzt wird (Abb.9a). Das Primerpaar EF1/2 erkennt somit die DNA aller drei Bakterienarten und ist deswegen für die weiteren Untersuchungen nicht geeignet.

Abbildung 9a Fluoreszenzkurvenanalyse für das *Enterococcus faecalis*-Primerpaar (EF1/2) untersucht mit der DNA des *Enterococcus faecalis*, *Actinomyces naeslundii* und *Fusobacterium nucleatum*



Die gelbe Kurve gibt das Fluoreszenzsignal für das *Fusobacterium nucleatum*, die blaue Kurve für den *Enterococcus faecalis* und die grüne Kurve für den *Actinomyces naeslundii* an. Die Konzentrationen der DNA der Bakterien betrug jeweils 12ng/μl. Der EF1/2- Primer erkennt die DNA alle drei Bakterien.

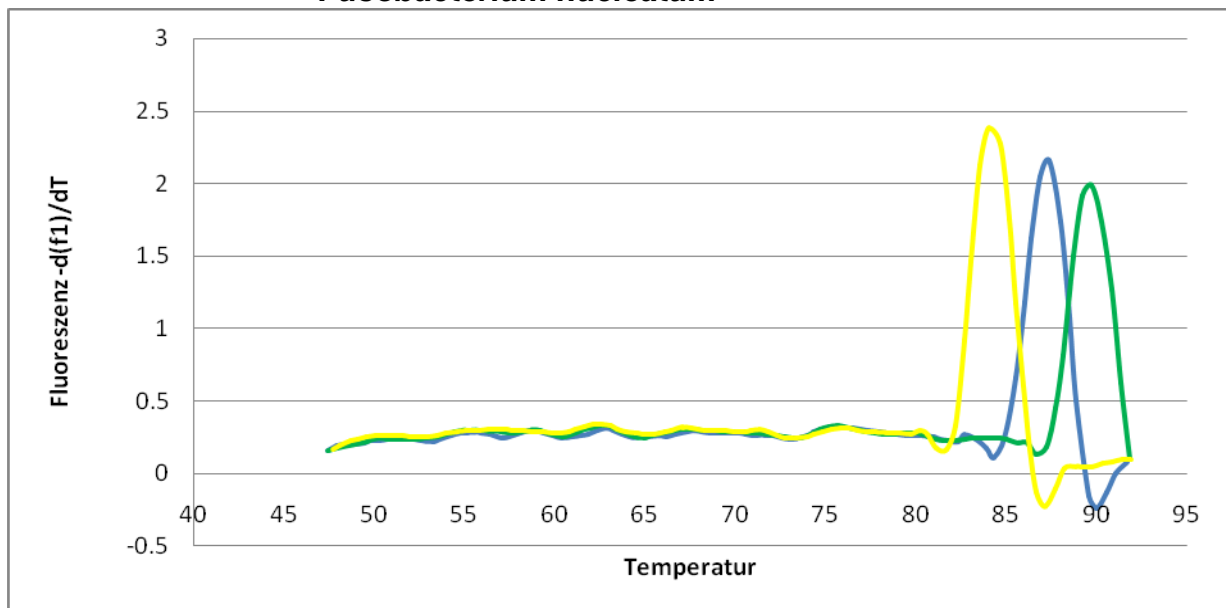
Abbildung 9b zugehörige DNA-Standardkurve zur Abb.9a für den Nachweis von *Enterococcus faecalis* mit dem EF1/2-Primerpaar



Die dazugehörige Schmelzkurvenanalyse (zu Abb.9c) zeigt die Spezifität des Primerpaares EF1/2 untersucht mit der DNA der drei in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme. Der hier dargestellte Schmelzpunkt des *Fusobacterium nucleatum*

mit dem EF1/2-Primerpaar zeigt eine Temperaturabweichung von 5°C und der Schmelzpunkt des *Actinomyces naeslundii* mit dem EF1/2-Primerpaar zeigt eine Temperaturabweichung von 3°C.

Abbildung 9c Schmelzkurvenanalyse (zur Abb.9a,b) des *Enterococcus faecalis*-Primerpaares (EF1/2) untersucht mit der DNA des *Enterococcus faecalis*, *Actinomyces naeslundii* und des *Fusobacterium nucleatum*



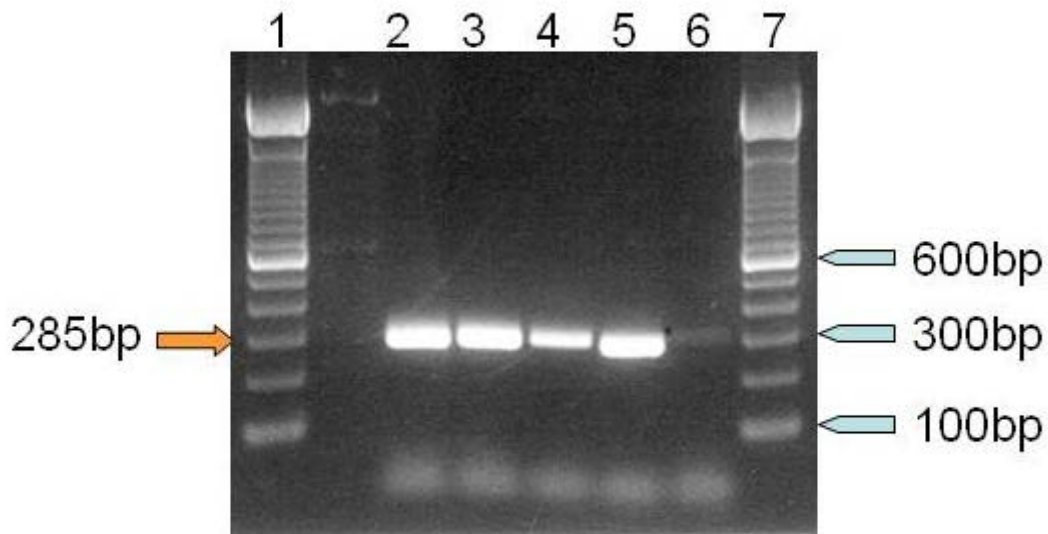
Die blaue Kurve gibt den Schmelzpunkt für den *Enterococcus faecalis*, die gelbe Kurve den Schmelzpunkt für das *Fusobacterium nucleatum* und die grüne Kurve den Schmelzpunkt für den *Actinomyces naeslundii* an, untersucht mit dem Primerpaar des *Enterococcus faecalis* (EF1/2). Die spezifische Schmelztemperatur für das EF1/2-Primerpaar liegt bei 89,7°C.

Für die Spezifitätsversuche wurde zur Bestätigung der Ergebnisse die Gel-Elektrophorese durchgeführt. Abbildung 9d zeigt in Spalte 2 und 3 die amplifizierten PCR-Produkte für die DNA des *Enterococcus faecalis*, mit dem Primerpaar EF 1/2.

Die Fragmentgröße von 285bp stimmt mit den Vorgaben vom NCBI-Primer tool überein. Sowohl die DNA des *Actinomyces naeslundii* (Spalte 4) als auch die DNA des *Fusobacterium nucleatum* (Spalte 5) konnten mit dem Primerpaar EF1/2 mit einer Fragmentgröße von 285bp amplifiziert werden. Spalte 6 zeigt die Wasserkontrolle. Das Primerpaar EF1/2 erkennt somit die DNA des *Enterococcus faecalis* nicht spezifisch und ist für die vorliegende Arbeit als Primerpaar für den *Enterococcus faecalis* nicht geeignet.

Abbildung 9d

Gelelektrophoretische Darstellung der Fragmentgrößen der amplifizierten PCR-Produkte mit dem Primerpaar EF1/2



Spezifitätsnachweis der DNA des *Enterococcus faecalis* mit dem Primerpaar EF1/2 mit einer erwarteten Fragmentgröße von 285bp (NCBI-Primer tool). Alle hier dargestellten amplifizierten PCR-Produkte (2-6) wurden mit dem Primerpaar EF1/2 durchgeführt. 1 und 7: Größenmarker; 2 und 3: amplifiziertes PCR-Produkt für die DNA des *Enterococcus faecalis* mit einer Fragmentgröße von 285bp; 4: *Actinomyces naeslundii*-DNA; 5: *Fusobacterium nucleatum*-DNA; 6: Wasserkontrolle

Das EF1/2-Primerpaar erfüllte die definierten Kriterien nicht und wurde somit nicht zur Auswertung verwendet. Daher wurde für diese Arbeit ein neues spezifischeres Primerpaar für den Nachweis von *Enterococcus faecalis* mit Hilfe des NCBI-Primer tools gesucht. Dazu wurden primär drei verschiedene *Enterococcus faecalis* Primerpaare neu ausgewählt und auf Kreuzreaktionen mit der DNA von *Actinomyces naeslundii* und *Fusobacterium nucleatum* untersucht (Tabelle 8).

Tabelle 8		
<i>Enterococcus faecalis</i> spezifische Primerpaare ausgewählt mit Hilfe des NCBI-Primer tools		
EF-P4 forward	EF-P1 forward	EF-P2 forward
EF-P4 reverse	EF-P1 reverse	EF-P2 reverse

Die Computeranalyse ergab für die von dem NCBI Primer tool untersuchten Primer keinerlei Kreuzreaktionen mit den anderen Bakterien. Das EF-P4 Primerpaar

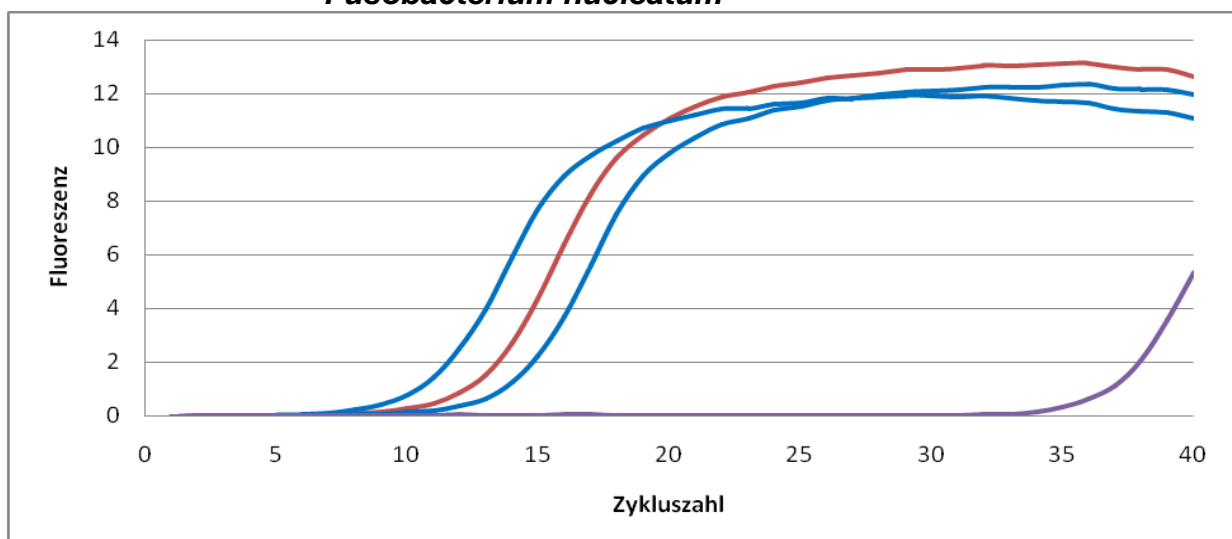
(forward und reverse) wurde für alle weiteren PCR-Läufe für die quantitative Auswertung der Keime ausgewählt und hinsichtlich seiner Spezifität überprüft.

6.2.2.4. Spezifitätsuntersuchung des neuen EF-P4-Primerpaares

Abbildung 10a zeigt die Fluoreszenzkurvenanalyse für das EF-P4-Primerpaar und Abbildung 10b die dazugehörige Schmelzkurvenanalyse. Die Analyse zeigt, dass dieses Primerpaar (EF-P4) die DNA von *Enterococcus faecalis* in einem DNA-Gemisch aus allen drei Bakterien (*Enterococcus faecalis*, *Actinomyces naeslundii* und *Fusobacterium nucleatum*) spezifisch erkennt (Abb. 10a, b, braune Kurve). Bei einem DNA-Gemisch bestehend jedoch nur aus der DNA des *Fusobacterium nucleatum* und des *Actinomyces naeslundii* wird ein Signal detektiert, das sich außerhalb der definierten Standardreihe befindet (Abb.10a,b, lila-Kurve).

Das hier verwendete Primerpaar EF-P4 erkennt spezifisch die DNA des *Enterococcus faecalis*. Die Schmelzkurvenanalyse bestätigte dieses Ergebnis (Abb.10b)

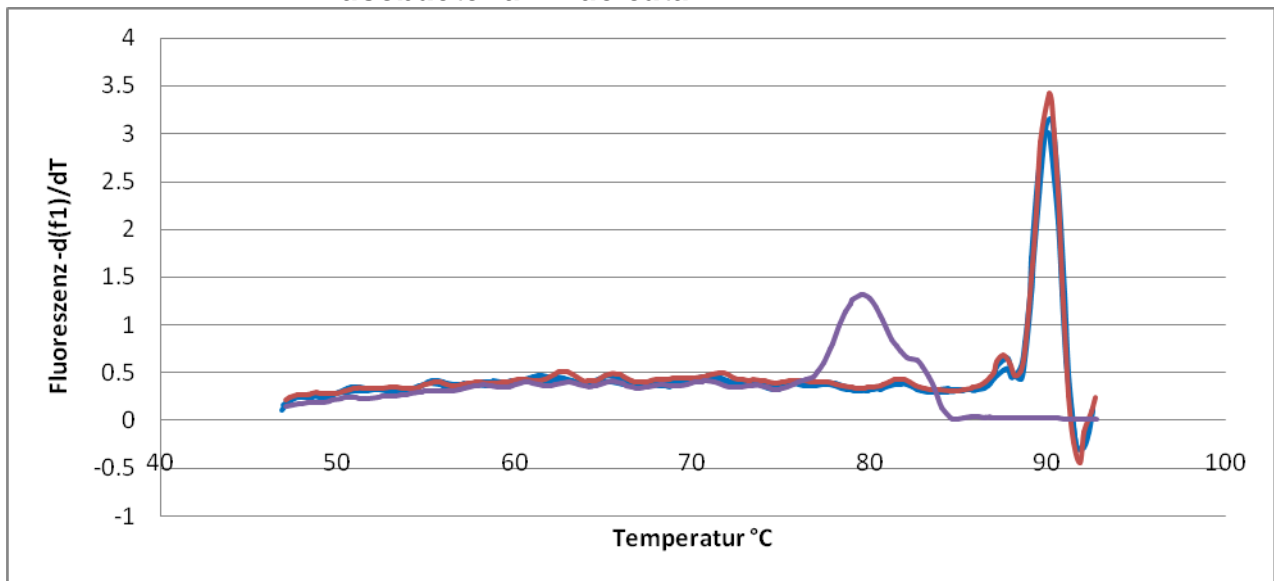
Abbildung 10a Fluoreszenzkurvenanalyse für den *Enterococcus faecalis*-Primer (EF-P4 forward/reverse) untersucht mit der DNA des *Enterococcus faecalis*, *Actinomyces naeslundii* und *Fusobacterium nucleatum*



Die blauen Kurven zeigen das Fluoreszenzsignal für den *Enterococcus faecalis* in einer Konzentration von 7ng/µl und 0,7ng/µl. Die braune Kurve ist ein DNA-Gemisch aus *Enterococcus faecalis*, *Fusobacterium nucleatum* und *Actinomyces naeslundii*. Es erscheint ein sehr frühes Fluoreszenzsignal, bei Zyklus 12. Die Lila-Kurve ist ein DNA-Gemisch aus *Actinomyces naeslundii* und *Fusobacterium nucleatum*.

Abbildung 10b

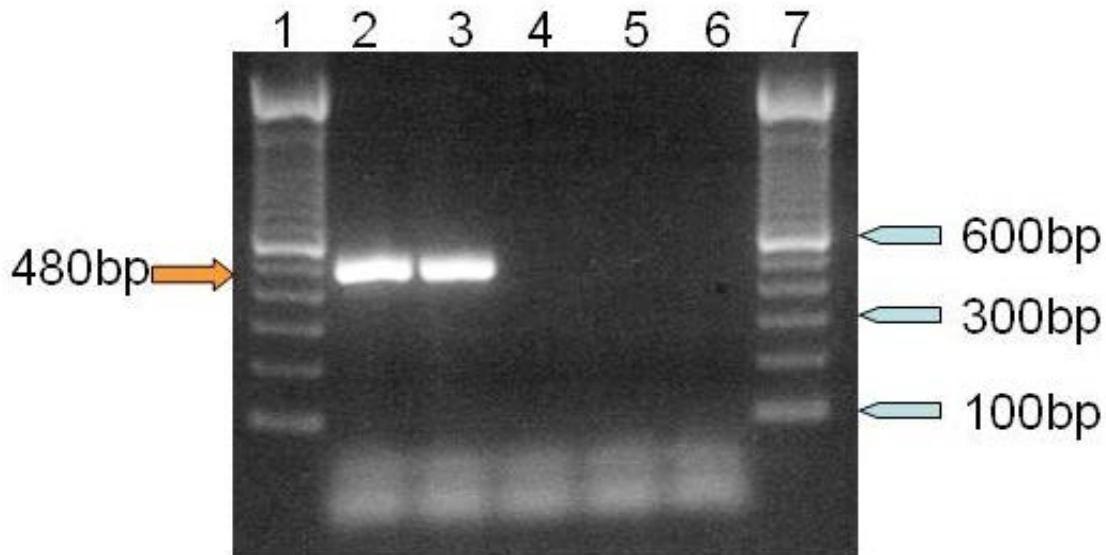
Schmelzkurvenanalyse (zur Abb.10a) des *Enterococcus faecalis*-Primerpaares (EF-P4) untersucht mit der DNA des *Enterococcus faecalis*, *Actinomyces naeslundii* und des *Fusobacterium nucleatum*.



Die blauen Kurven geben das Fluoreszenzsignal für den *Enterococcus faecalis* an. Die Spezifische Schmelztemperatur liegt bei 89,7°C. Die braune Kurve, ein DNA-Gemisch aus *Enterococcus faecalis*, *Fusobacterium nucleatum* und *Actinomyces naeslundii* erscheint bei dem Schmelzpunkt vom *Enterococcus faecalis*. Die Lila-Kurve, ein DNA-Gemisch aus *Actinomyces naeslundii* und *Fusobacterium nucleatum* liegt weit außerhalb des Schmelzpunktes für den *Enterococcus faecalis*.

Für die Spezifitätsversuche wurde zur Bestätigung der Ergebnisse die Gel-Elektrophorese durchgeführt. Abbildung 10c zeigt in Spalte 2 und 3 die amplifizierten PCR-Produkte für die DNA des *Enterococcus faecalis*, mit dem Primerpaar EF-P4. Die Fragmentgröße von 480bp stimmt mit den Vorgaben vom NCBI-Primer tool überein. Die DNA des *Actinomyces naeslundii* (Spalte 4) und die DNA des *Fusobacterium nucleatum* (Spalte 5) konnte mit dem Primerpaar EF-P4 nicht amplifiziert werden. Spalte 6 zeigt die Wasserkontrolle. Das Primerpaar EF-P4 erkennt spezifisch die DNA des *Enterococcus faecalis*.

Abbildung 10c Gelelektrophoretische Darstellung der Fragmentgröße der amplifizierten PCR-Produkte für den *Enterococcus faecalis* mit dem Primerpaar EF-P4

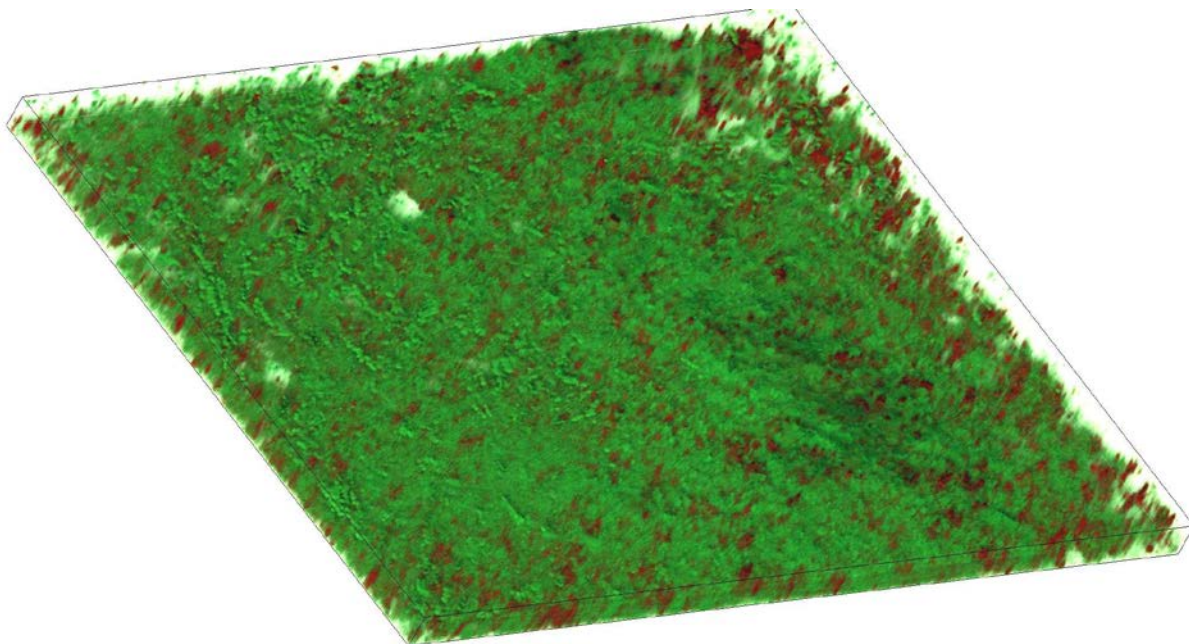
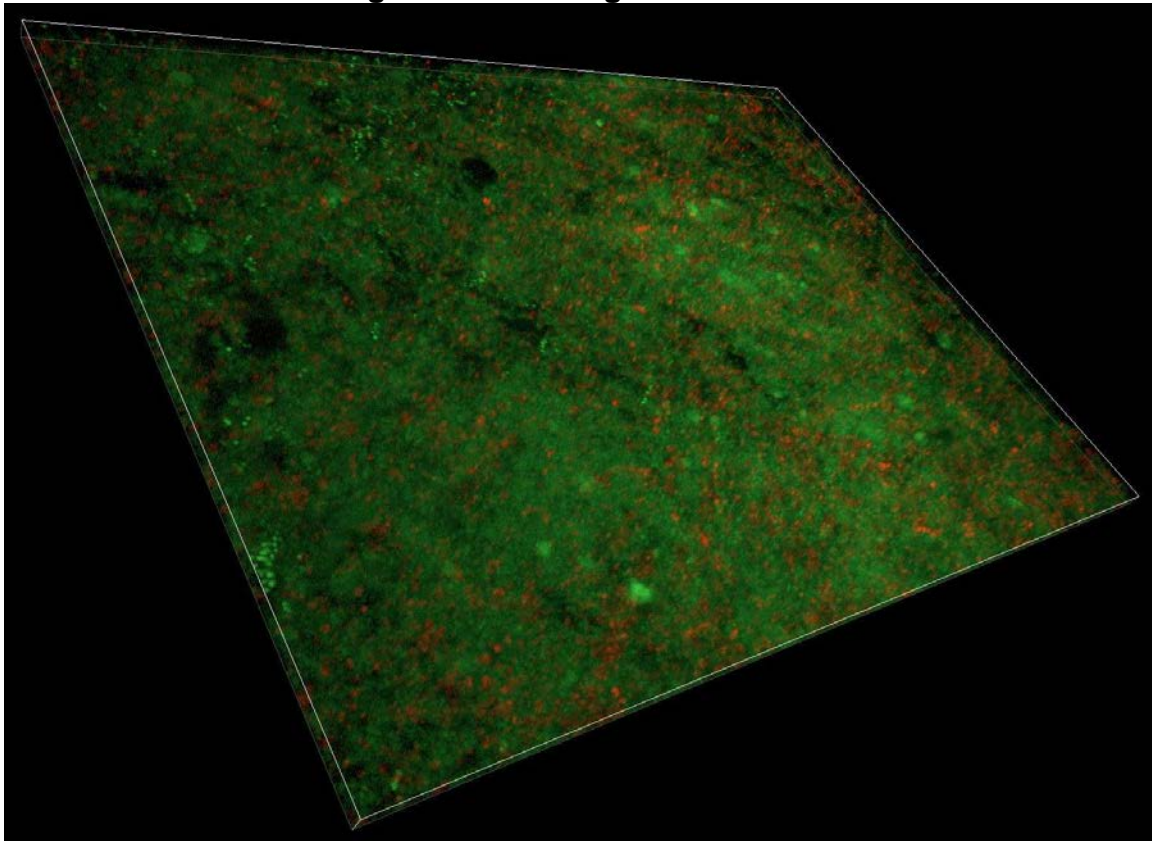


Spezifitätsnachweis der DNA des *Enterococcus faecalis* mit dem Primerpaar EFP4f/r mit einer erwarteten Fragmentgröße von 480bp (NCBI-Primer tool). Alle hier dargestellten amplifizierten PCR-Produkte (2-6) wurden mit dem Primerpaar EF-P4 durchgeführt. 1 und 7: Größenmarker; 2 und 3: amplifiziertes PCR-Produkt für die DNA des *Enterococcus faecalis* mit einer Fragmentgröße von 480bp; 4: *Actinomyces naeslundii*-DNA; 5: *Fusobacterium nucleatum*-DNA; 6: Wasserkontrolle. Das Primerpaar EF-P4 erkennt spezifisch die DNA des *Enterococcus faecalis*.

6.3. LIVE/DEAD- Färbungen

Mit Hilfe von LIVE/DEAD-Färbungen kann man sowohl lebende (grün) als auch tote (rot) Bakterien im Biofilm unterscheiden. Dazu wurden 72 Stunden alte Biofilme hergestellt und nach LIVE/DEAD-Färbung beurteilt. Eine Beurteilung von 10 unabhängig gewachsenen Biofilmen ergab, dass im Median 49,5% (range: 46% – 53%) der Bakterien im Biofilm lebend waren. Abbildung 11 zeigt exemplarisch eine Fluoreszenzaufnahme (dreidimensional) eines Biofilmes mit gefärbten lebenden Bakterienzellen (grün) und gefärbten toten Bakterienzellen (rot).

Abbildung 11 Dreidimensionale Fluoreszenzaufnahme einer Live/Dead Färbung eines *in-vitro* gewachsenen Biofilmes



Exemplarische dreidimensionale Darstellung eines auf Permanox-Objekträgern gewachsenen Biofilmes. Diese dreidimensionale Darstellung erfolgte aus 10 Einzelaufnahmen aus unterschiedlichen Ebenen des Biofilmes. Grün zeigt die lebendigen Bakterienzellen (Farbstoff SYTO 9), rot zeigt die toten Bakterienzellen (Farbstoff Propidiumjodid)

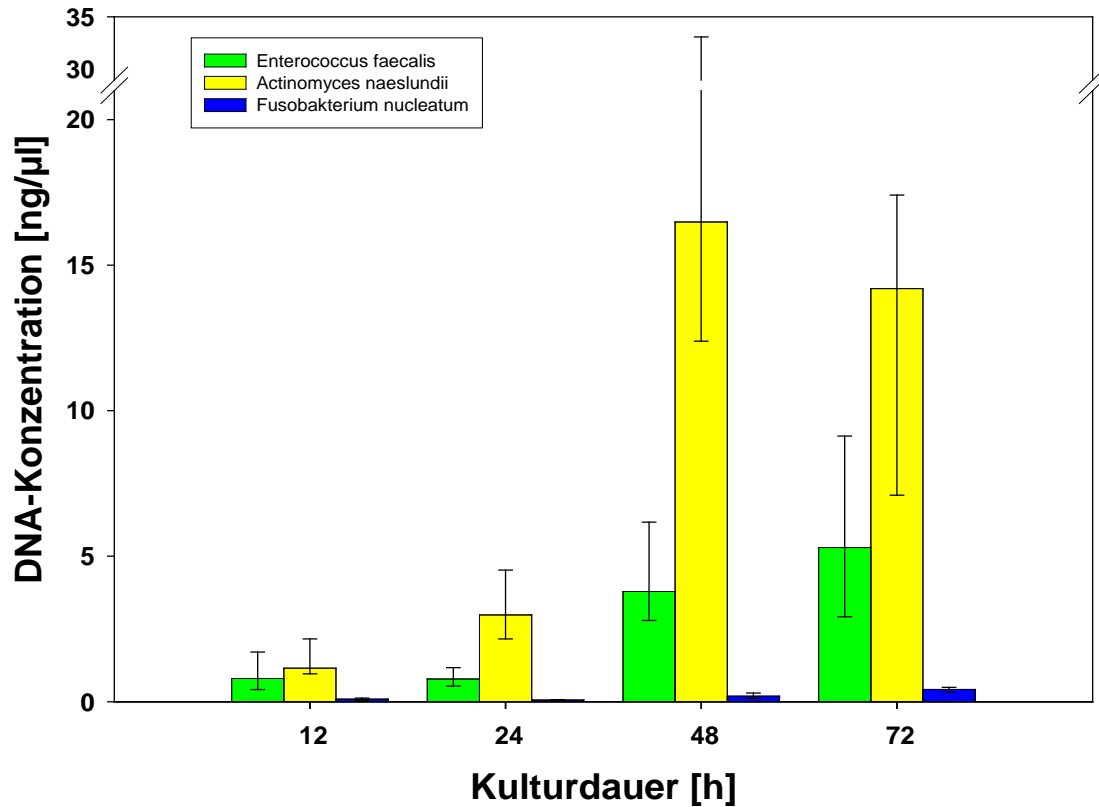
6.4. Bakterienwachstum im polymikrobiellen Biofilm

6.4.1. Künstliches Speichelmedium

Als Maß für das Wachstum im Biofilm wurde die Zu/Abnahme der DNA-Menge der einzelnen Bakterien im Zeitverlauf mit Hilfe der real-time PCR bestimmt. Alle drei untersuchten Bakterienstämme, *Enterococcus faecalis*, *Fusobacterium nucleatum* und *Actinomyces naeslundii* sind in einem Biofilm adhärent gewachsen (Abb. 12, 13) und zeigten tendenziell ein, mit der Kulturdauer zunehmendes Wachstum, dargestellt als zunehmende DNA-Konzentration. Während der Kulturdauer von 72h wuchs *Enterococcus faecalis* von 0,8 ng/µl (12 h) auf 5,3 ng/µl, *Actinomyces naeslundii* von 1,2 ng/µl auf 14,2 ng/µl und *Fusobacterium nucleatum* von 0,09 ng/µl auf 0,4 ng/µl (Abb. 12,13).

Die Wachstumssteigerung von *Actinomyces naeslundii* zwischen aufeinander folgenden Messzeiten war von Beginn an signifikant, *Enterococcus faecalis* und *Fusobacterium nucleatum* wuchsen ab dem 24h Messpunkt signifikant (Tab. 9). Mit Ausnahme der DNA-Konzentrationen von *Enterococcus faecalis* gegen *Actinomyces naeslundii* zum Zeitpunkt 12h waren die DNA-Konzentrationen aller anderen Bakterien gegeneinander signifikant verschieden zu jedem Messzeitpunkt (Tab. 10).

Abbildung 12 Bakterienwachstum der drei in dieser Arbeit verwendeten Bakterien (*Enterococcus faecalis*, *Actinomyces naeslundii*, *Fusobacterium nucleatum*) zu vier verschiedenen Kulturzeitpunkten.



Die Bakterien zeigten tendenziell ein, mit der Kulturdauer zunehmendes Wachstum. Die *Fusobacterium nucleatum* Daten sind mit veränderter Ordinatenkalierung in der folgenden Abbildung 13 wiederholt dargestellt.

Abbildung 13

Wiederholende Darstellung der *Fusobacterium nucleatum* Daten aus Abb.12 mit veränderter Ordinatenkalierung.

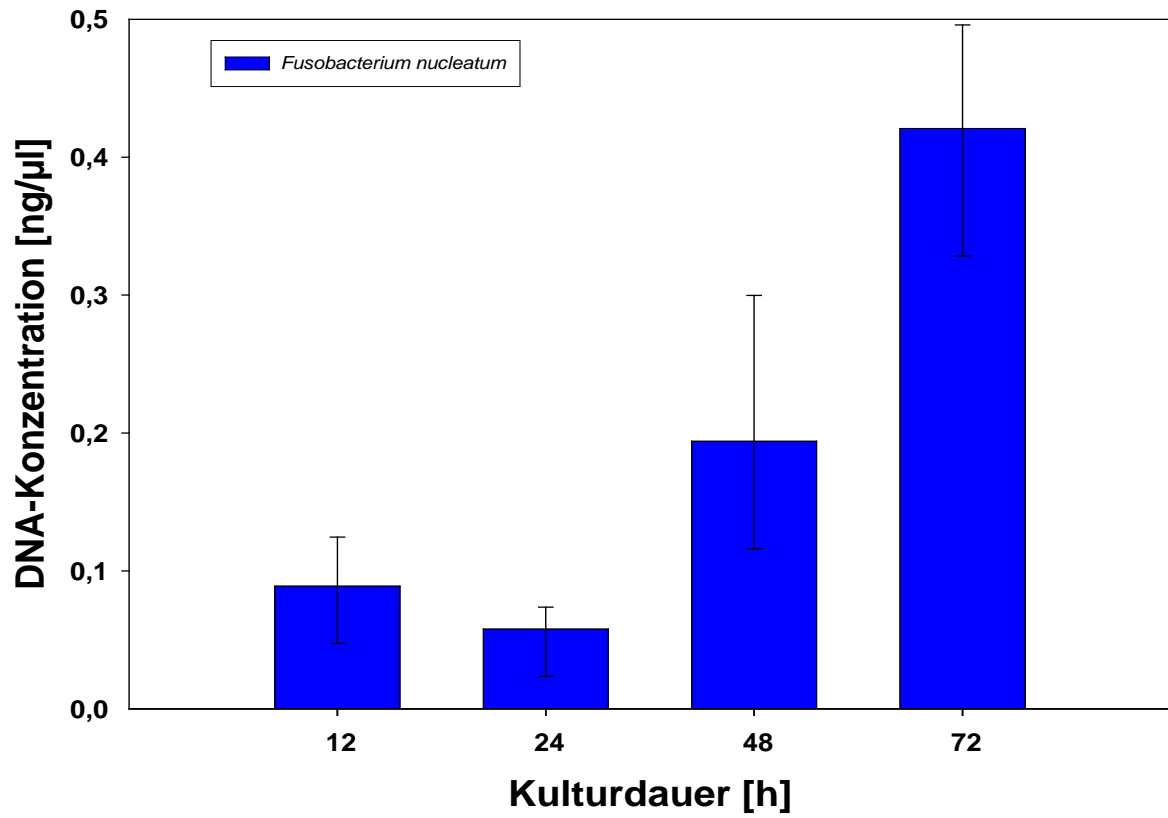


Tabelle 9		Signifikanzwerte der Kulturzeiten gegeneinander.			
		12h	24h	48h	72h
12h	EF		Ns	0,041	0,015
	AN		0,026	0,002	0,002
	FN		ns	0,026	0,002
24h	EF			0,041	0,041
	AN			0,004	0,002
	FN			0,002	0,002
48h	EF				ns
	AN				ns
	FN				0,009
72h	EF				
	AN				
	FN				

EF= *Enterococcus faecalis*, AN= *Actinomyces naeslundii*, FN= *Fusobacterium nucleatum*, ns= nicht signifikant

Tabelle 10	Signifikanzwerte bezogen auf die Bakterien pro Kulturdauer.		
Kulturdauer	EF:AN	EF:FN	AN:FN
12h	ns	0,002	0,002
24h	0,004	0,002	0,002
48h	0,004	0,002	0,002
72h	0,041	0,002	0,002

EF= *Enterococcus faecalis*, AN= *Actinomyces naeslundii*, FN= *Fusobacterium nucleatum*, ns= nicht signifikant

6.4.2. BHI-Medium

Der Versuchsaufbau des Biofilmmodelles mit BHI-Medium wurde ebenfalls mit der quantitativen real-time PCR ausgewertet. Hier ergaben sich jedoch Werte, die außerhalb des Standards lagen. Mit der Schmelzkurvenanalyse konnte man nachweisen, dass die amplifizierten PCR-Produkte unspezifische Schmelzpunkte aufwiesen. Sie unterschieden sich um mehr als 5°C von den spezifischen Schmelzpunkten der jeweiligen Bakterien. Dies zeigt, dass eine Biofilmbildung mit dem BHI-Medium nicht erfolgt ist. Zwischen diesen Bakterien fand somit vermutlich keine Co-Aggregationen und Co-Adhäsionen statt und ein Großteil der Keime wurde in den Waschvorgängen gewaschen.

7. Diskussion

Der Biofilm

Eine Literaturstelle besagt, dass die Physiologie einer planktonisch existierenden Bakterienart grundsätzlich verschieden ist zu der entsprechenden Mikrobie in einem Biofilm [53]. Nimmt man jedoch in Betracht, dass Monoinfektionen in der freien Natur so gut wie gar nie auftreten, erklärt das die Meinung einiger Autoren, die besagen, dass die Verwendung von planktonischen Bakterienkulturen für Versuche mit antimikrobiellen Substanzen zwar positive Ergebnisse liefern, jedoch nicht mit den klinischen Ergebnissen korrelieren können [168,236]. Das Verhalten von Bakterien ist in großem Maße unterschiedlich zu dem der planktonischen Artgenossen und dies sollte in *in-vitro* Versuchen in Betracht gezogen werden [250]. Im Vergleich zu planktonischen Zellen sind Biofilme bis zu 1000-fach resistenter gegen Phagozytose, Antikörper und zahlreiche Antibiotika [53,54,178]. Ein vorher avirulenter Krankheitserreger kann, in einem Biofilm existierend, in einen virulenten umgewandelt werden, oder ein ursprünglich antibiotikasensitives Bakterium ist plötzlich antibiotikaresistent [178]. Planktonisch kultivierte Bakterien, wie *Enterococcus faecalis* und andere grampositive Organismen (*Lactobacillus praecei*, *Streptococcus gordonii*, *Olsnella uli*) wiesen eine ähnlich hohe alkalische Toleranz auf. Dagegen wurde das Wachstum von *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus oralis* und *Fusobacterium nucleatum* durch die alkalische Belastung deutlich geschwächt. Dieser Unterschied in der alkalischen Toleranz der sieben getesteten Bakterienarten trat nicht auf, wenn sie in Biofilmen getestet wurden. Sie wiesen dann alle eine ähnlich hohe alkalische Toleranz auf [42]. Diese Ergebnisse bewiesen nicht nur, dass sich in Wurzelkanälen vorkommende Bakterien an alkalische Bedingungen anpassen können, sondern liefert auch weitere Bestätigung für die höhere Resistenz gegen Umwelteinflüsse von Biofilmbakterien, im Vergleich zu planktonisch wachsenden Bakterien [41]. Dieses Wissen, zusammen mit der Tatsache, dass Monoinfektionen in der freien Natur sehr selten sind, war der Grund für die Etablierung eines *in-vitro* Biofilmmodelles im Rahmen der vorliegenden Arbeit.

Diskussion der Bakterien

Das Ziel dieser Studie war ein *in-vitro* Biofilmmodell, bestehend aus drei verschiedenen Bakterienstämmen, zu etablieren. Heutzutage wissen wir, dass nicht alle Krankheiten durch die Wirkung eines einzelnen pathogenen Keimes hervorgerufen werden. Das trifft speziell auf die Mundhöhle zu, in der alle bakteriellen Erkrankungen durch mehr als einen Erreger hervorgerufen werden. Frühere Studien des dentalen Biofilmes beschäftigten sich hauptsächlich mit der Kultivierung von Streptokokken [63,67,102]. Dies beruhte auf vorhergehende Kultivierungsstudien, die bewiesen, dass genau diese Bakteriengruppe in der initialen Phase der Biofilmbildung auf Zähnen vorrangig sind [137,167]. In dieser Arbeit wurde als einer der Bakterienstämme *Actinomyces naeslundii* ausgewählt. *Actinomyces naeslundii* gehört zu den ersten Besiedlern der oralen Oberflächen und können bis zu 27% der Pionierbakterien ausmachen [124,137,167]. Li [137] und Marsh [151] beschrieben *Actinomyces naeslundii* als wichtigen Frühbesiedler des oralen Biofilmes. Nyvad *et al.* [167] bestätigten *Actinomyces naeslundii* als einen Pionierkeim bei der Entstehung des oralen Biofilmes, ein Bakterium, das sich gut an stark verändernde Bedingungen anpassen kann. Die *Actinomyces*-Art gewinnt während der Reifung des Biofilmes an Bedeutung. Dies scheint, nach einigen Autoren, auf Kosten der Streptokokken zu geschehen [188,215,231]. Bekannt ist, dass alle Frühbesiedler des oralen Biofilmes Co-aggregation mit Streptokokken und/oder *Actinomyces naeslundii* eingehen, den zwei Zelltypen, die mehr als 90% der lebensfähigen Mikroorganismen des initialen Biofilmes ausmachen [109]. Weiterhin weist *Actinomyces naeslundii* Polymorphismus auf. In der initialen Phase der Biofilmbildung dominiert die kokkoide Form, wogegen die stäbchen- und fadenförmigen Actinomyceten nach 24-48 Stunden der Biofilmbildung vorrangig sind [165].

Auch *Fusobacterium nucleatum* spielt eine zentrale Rolle in der oralen Biofilmbildung, co-aggregiert jedoch nur mit ausgewählten Partnern [128]. In der vorliegenden Studie fiel die Auswahl auf diese Bakterienart, da *Fusobacterium nucleatum* das häufigste gram-negative Bakterium ist, das auch in gesunden Regionen der Mundhöhle vorgefunden wird [127]. Seine Anzahl steigt jedoch in parodontal erkrankten Zahnfleischtaschen an [158]. Außerdem wird *Fusobacterium*

nucleatum als ein Brückenbakterium zwischen Früh- und Spätbesiedlern angesehen, da Frühbesiedler zwar ausgiebig untereinander und mit *Fusobacterium nucleatum* co-aggregieren, jedoch nicht mit Spätbesiedlern. Diese gehen dagegen Verbindungen mit *Fusobacterium nucleatum* ein [128]. Socransky *et al.* beschrieben, dass *Fusobacterium nucleatum* immer dann auftritt, wenn *Treponema denticola* und *Porphyromonas gingivalis* anwesend sind [214]. Dies lässt darauf schließen, dass *Fusobacterium nucleatum* zeitlich vor den beiden anderen Bakterienstämmen auftritt und für die Kolonisation von manchen Bakterienarten sogar von Notwendigkeit sein kann [127]. Bradshaw *et al.* bewiesen schon in ihrer Studie 1998, dass *Fusobacterium nucleatum* als Brückenbakterium zwischen sonst nicht co-aggregierenden Bakterien dienen kann und auf diese Weise die Möglichkeit besitzt drei Bakterienarten-Aggregate zu bilden [23].

In der vorliegenden Studie wurde für die Etablierung des Biofilmmodelles als dritter Bakterienstamm *Enterococcus faecalis* ausgewählt. *Enterococcus faecalis* hat in vielen Studien seine wichtige Rolle in persistierenden endodontischen Infektionen bewiesen [132,159,162,226]. Denselben Autoren zufolge besitzt dieses Bakterium über besondere Strategien, Biofilme zu bilden. Nach Kristich *et al.*, die durch unabhängige experimentelle Ansätze die Biofilmbildung mit *Enterococcus faecalis* untersuchten, bildet dieses Bakterium robuste Biofilme, dessen Entwicklung sich an das vorherrschende Ökosystem anpasst [132]. Die Pathogenität von *Enterococcus faecalis* wird durch die Adhäsion des Bakteriums an die Dentinoberfläche determiniert [132,162,192]. Dies wird ermöglicht durch potentielle Virulenzfaktoren, wie das „Collagen-Binding-Protein“ und das „Serine-Protein“ [117]. Die genetischen Bestimmungsfaktoren der Biofilmbildung durch *Enterococcus faecalis* sind noch nicht wirklich bekannt, man weiß jedoch, dass die Biofilmbildung durch die ausgeschiedene Metalloproteine, Ge1E, gefördert wird. Distel *et al.* stellten in ihrer Studie die Hypothese auf, dass die bekannte Persistenz von *Enterococcus faecalis* gegen gängige antiseptische Mittel, auf deren Fähigkeit beruht, Biofilme zu bilden [68]. Die Autoren gaben an, dass nach einer Inkubationszeit von 160 Tagen lebende Kolonien von *Enterococcus faecalis* in der für Biofilm typischen pilzform auftraten. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass es in der vorliegenden Studie gelang, mit den drei ausgewählten Bakterienstämmen, *Actinomyces naeslundii*,

Fusobacterium nucleatum und *Enterococcus faecalis*, *in-vitro* einen Biofilm herzustellen.

Diskussion der Methode

Um einen therapeutischen Erfolg bei der Eliminierung der bakteriellen dreidimensionalen Biofilmstruktur *in-vivo* zu erreichen, müssen die Wirkung antiseptischer Agenzien auch auf Biofilme untersucht werden. Hierfür ist die Etablierung eines Biofilmmodelles *in-vitro* essentiell, da antimikrobielle Substanzen auf planktonisch kultivierte Bakterien anders und häufig effektiver wirken als auf adhärent, in einem Biofilm gewachsene Bakterien. Durch Ausbildung einer miteinander kommunizierenden Gemeinschaft (QS), ändern die im Biofilm kultivierten Bakterien, verglichen zu planktonisch kultivierten Bakterien, ihre geno- und phänotypischen Profile [97]. Dadurch weisen diese Bakterien eine erhöhte Resistenz gegenüber antimikrobielle Substanzen auf [94]. Zahlreiche Versuche erproben die Wirkung unterschiedlicher antimikrobieller Agenzien auf planktonisch kultivierte Bakterien *in-vitro* mit Erfolg, die jedoch klinisch nicht die gleichen therapeutischen Ergebnisse erzielen [57,168]. Wimpenny *et al.* [253] stellten in den 90er Jahren eine Modellhierarchie für die Forschung an Bakterien auf, in der die einfachste Form der mikrobiellen Forschung Schüttelkulturen mit planktonischer Lebensform darstellten. Realitätsgetreuer sind jedoch Studien mit mehreren integrierten Bakterienstämmen, durch welche ermöglicht wird, *in-vitro* ein Ökosystem entstehen zu lassen. *In-vivo* Untersuchungen werden an lebenden Organismen durchgeführt, aus ethischen Gründen ist jedoch der Handlungsspielraum eingeschränkt. Außerdem ist die Reproduzierbarkeit und Wiederholbarkeit des Versuchsaufbaues, verglichen zu *in-vitro* Versuchen, nicht gegeben, da am lebenden Organismus deutliche individuelle Unterschiede vorliegen. *In-vitro* herrschen standardisierte Bedingungen, die vorhandenen Untersuchungsparameter sind bekannt und können je nach Fragestellung entsprechend einfach modifiziert werden [68,252]. Die Möglichkeit der Reproduzierbarkeit und Wiederholbarkeit von *in-vitro* Versuchen erlaubt die gewonnen Ergebnisse objektiv auszuwerten und zu beurteilen.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Methode erarbeitet, *in-vitro* einen Biofilm herzustellen. Es gibt nach Coeyne *et al.* zwei mögliche Modellsysteme für *in-vitro*

Biofilm-Testverfahren. Zum einen ein geschlossenes System („microtiterplate based biofilm model“-MTP), in dem der Biofilm unter statischen Bedingungen wächst, zum anderen ein Durchflusssystem (flow displacement biofilm model“) in dem ein kontinuierlicher Austausch zwischen verbrauchtem und frischem Medium und Nährstoffen stattfindet [46]. Dynamische Biofilmmodelle eignen sich gut für die Erforschung des bakteriellen Zusammenspiels der in einem Biofilm lebenden Bakterien und das Verständnis über Quorum sensing-Mechanismen [126]. Der Vorteil von dynamischen Biofilmmodellen ist, dass die Scherbewegungen, die in der Mundhöhle durch die Speichelfließrate herrschen, *in-vitro*, simuliert werden können. Diese Scherbewegungen stellen einen der erforderlichen Parameter zu Biofilmentstehung dar. Guggenheim *et al.* beschreiben jedoch wiederum Nachteile in der Anwendung von Durchflusssystemen [97]. Die Laborarbeiten sind intensiver und die experimentelle Variabilität eingeschränkt. Für diese Modelle ist außerdem eine spezielle Ausstattung notwendig und die Erstellung eines solchen Systems ist häufig sehr aufwändig [97]. Des Weiteren wachsen mehrere Biofilme gemeinsam in einem 500-1000ml Reaktorgefäß, das für die Untersuchung verschiedener antimikrobieller Substanzen ungünstig ist. So kann pro Versuch nur eine antimikrobielle Substanz untersucht werden.

Statische Biofilmmodelle haben keinen kontinuierlichen Durchfluss mit einer bestimmten Fließrate, jedoch ermöglicht die statische Biofilmforschung eine höhere experimentelle Durchsatzrate. Mit statischen Biofilmmodellen können ohne größeren Arbeitsaufwand in einem Versuchsaufbau mehrere unterschiedliche Parameter getestet werden [97].

Das geschlossene Modellsystem gleicht nach Coeyne *et al.* eher *in-vivo* Bedingungen als das Durchflusssystem [46]. Periasamy *et al.* verglichen in ihrer Studie die Biofilmbildung von ein, zwei oder drei Bakterienarten unter statischen und dynamischen Bedingungen. In ihren Ergebnissen erzielte das statische Biofilmmodell eine bessere Biofilmbildung als das dynamische Modell [173]. Die vorliegende Studie sollte die Möglichkeit bieten, in zukünftigen Studien die Wirkung der antimikrobiellen Photodynamischen Therapie an Biofilmen zu untersuchen, wofür ein statisches Biofilmmodell besser geeignet ist als ein dynamisches Modell. Das Hauptziel der Arbeit war, dass die ausgewählten Bakterien einen Biofilm bilden, eingebettet in einer extrazellulären polymeren Matrix, durch die Bakterien miteinander kommunizieren

und durch Quorum sensing Signale ihre geno- und phänotypischen Eigenschaften ändern.

In dem Biofilmmodell der vorliegenden Arbeit wurde alle 24 Stunden das Kultivierungsmedium (künstliches Speichelmedium) gewechselt. Durch die frische Mediumzugabe war den Bakterien eine Zufuhr neuer Nährstoffe gewährleistet. Das verbrauchte Medium und nicht adhärente oder tote, am Wellplattenboden liegende Zellen wurden durch den jeweils zweimaligen Waschvorgang entfernt.

Der Biofilm in der vorliegenden Studie wurde auf 96- Well-Mikrotiterplatten (tissue culture treated) kultiviert. Bevor die verwendeten Bakterien in die Wells pipettiert wurden, wurden die Wells mit künstlichem Speichelmedium für 30min vorkonditioniert, um einen Speichelfilm auf dem Wellplattenboden zu produzieren. Dieser Speichelfilm sollte die Pelikel, die sich innerhalb weniger Sekunden auf der Zahnoberfläche bildet, simulieren, um den Erstbesiedlern als Substrat für die initiale Adhäsion zu dienen. Diese Vorbehandlung mit dem Biofilmmedium beschreiben mehrere Autoren in ihren Versuchen [10,96,180]. Die Inkubationszeit für die Vorkonditionierung einer Oberfläche variiert von Studie zu Studie. Pratten *et al.* beschreiben in ihrem Modell ein Vorkonditionierung mit künstlichem Speichelmedium über einen Zeitraum von einer Minute [179,180]. Guggenheim *et al.* beschreiben eine Inkubationszeit von 4h um einen Speichelfilm zu bilden [97]. Arslan *et al.* beschreiben eine Vorbehandlung mit dem Biofilmwachstumsmedium von 30min [10]. In der hier vorliegenden Studie hat sich eine Vorkonditionierung von 30min mit künstlichem Speichelmedium bewährt.

Die Bildung eines Biofilmes wurde in der vorliegenden Studie anhand zwei unterschiedlicher Medien untersucht, Brain-Heart-Broth-Medium (BHI-Medium) und künstliches Speichelmedium (KS-Medium). BHI-Medium ist ein nährstoffreiches Medium, das sich für die Kultivierung vieler anspruchsvoller Mikroorganismen eignet, sowohl für Aerobier als auch für Anaerobier und *Candida albicans*. BHI-Medium wird in vielen Biofilmstudien für die Biofilmbildung verwendet. Sena *et al.* untersuchten die antimikrobielle Wirkung von NaOCl und CHX auf Monospecies-Biofilme, die mit BHI-Medium gewachsen sind [201]. Estrela *et al.* stellten ebenfalls einen Monospezies-Biofilm in Wurzelkanälen von extrahierten humanen Zähnen mit *Enterococcus faecalis* her [79]. Visualisierung des Biofilmes erfolgte mit dem Elektronenmikroskop, eine Quantifizierung fand nicht statt. Die Studie lieferte allerdings keine weiteren Ergebnisse über das Vorhandensein einer extrazellulären

Matrix oder einen prozentualen Anteil an lebenden Bakterien in dem Biofilm. In der hier beschriebenen Studie sollte zunächst BHI-Medium als Kultivierungsmedium für den Biofilm verwendet werden. Hierfür wurde das Medium einmal nach Herstellerangaben hergestellt und einmal zusätzlich mit Stickstoff begast, um den obligaten Anaerobiern das Überleben zu ermöglichen. Die Methode, das Medium sauerstofffrei herzustellen, wurde in der vorliegenden Arbeit entwickelt. In Vorversuchen wurde jedoch zunächst untersucht, in wie weit die Bakterien auf dem Wellplattenboden adhären. Sowohl das BHI-Medium mit, als auch ohne Sauerstoff zeigte bei visueller Betrachtung der Biofilmkultur, planktonisch frei bewegliche Bakterienklumpen, die nach einem Waschvorgang entfernt werden konnten. Nach 72 Stunden Bakterienwachstum konnten mit einem Lichtmikroskop keine adhärenen Bakterien visualisiert werden. Die daraufhin durchgeführte quantitative real-time Polymerasekettenreaktion bestätigte diese Ergebnisse. So stellte sich für die vorliegende Studie das BHI-Medium als nicht geeignetes Kultivierungsmedium heraus.

Speichel spielt bei der Biofilmbildung in der Mundhöhle eine wesentliche Rolle. Mehrere Autoren geben an, dass Speichel einen bestimmenden Parameter für die Bakterienspezies und die Bakterienanzahl während der initialen Adhäsion darstellt [90,199]. Speichel ist an der Pellicelbildung auf der Zahnoberfläche beteiligt und dient als Substrat für die bakterielle Adhäsion. Die Interaktion der Bakterien mit Speichel modifiziert deren bakterielle Oberfläche [180]. In der Literatur beschreiben Autoren die Verwendung von Speichel als geeignetes Kultivierungsmedium für die Biofilmbildung *in-vitro* [96,97,180]. Speichel kann in Form von Spenderspeichel oder als künstliches Speichelmedium verwendet werden. Der Mensch produziert ca. 1,5 Liter Speichel pro Tag. In Studien, in denen humaner Speichel als Biofilmkultivierungsmedium verwendet wird, wird der Speichel häufig von mehreren unterschiedlichen Spendern gesammelt [173]. Es gestaltet sich sehr schwierig bei der Verwendung von humanem Speichel eine große Menge als Kultivierungsmedium bereitzustellen [202]. Weiterhin spricht gegen die Anwendung von humanem Speichel der hohe Gehalt an Mundhöhlenkeimen in den Speichelproben selbst. Die Anwendung von definierten Bakterienmischkulturen für Adhäsionsversuche wird dadurch nicht möglich. Ein weiteres Problem bei der Anwendung von humanem Speichel stellt auch die Zusammensetzung hinsichtlich Salzionen, Glykoproteinen und Immunglobulinen dar, die bei unterschiedlichen Spendern erheblich variieren

kann [169]. Für vergleichende Untersuchungen ist eine definierte Zusammensetzung der Kultivierungsmedien zu empfehlen [18,202]. Deswegen wurde in der vorliegenden Arbeit künstliches Speichelmedium als Kultivierungsmedium für die Biofilmbildung verwendet. Es wurde das künstliche Speichelmedium nach Pratten *et al.* hergestellt, da nach deren Ergebnissen dieses künstliche Speichelmedium dem humanen Speichel sehr ähnlich scheint und ein gutes Kultivierungsmedium für unterschiedliche Bakterienspezies darstellt [180]. Durch die Verwendung von Peptonen und Hefeextrakt stehen den Bakterien die notwendigen Aminosäureanteile zur Fermentierung zur Verfügung [122]. Muzin dient als Nährstoffquelle und als Speichelerersatz hinsichtlich der Glykoproteinadsorption und der Pellicelbildung als konditionierender Oberflächenfilm [20,211,254]. Zusätzlich wurde in der vorliegenden Arbeit das Medium mit 1g/l Saccharose modifiziert. Das künstliche Speichelmedium stellte sich in der vorliegenden Arbeit als geeignetes Kultivierungsmedium für die Biofilmbildung der drei ausgewählten Bakterienarten heraus. Die Herstellung des Mediums wurde in der vorliegenden Arbeit durch die Begasung mit Stickstoff modifiziert, um den obligaten Anaerobiern optimale Wachstumsbedingungen zu ermöglichen.

Diskussion der Ergebnisse

Quantifizierung und Visualisierung

Für die qualitative und quantitative Auswertung der in einem Biofilm gewachsenen Bakterienarten gibt es verschiedene Möglichkeiten. Eine klassische Methode stellt der Nachweis mittels Selektivagarplatten dar. So beschreiben Guggenheim *et al.* die quantitative Auswertung der in einem Biofilm gewachsenen Bakterien durch Anwendung von Kulturtechniken [97]. Jedoch lassen sich einige Bakterienarten, wie obligate Anaerobier, nur schwierig mittels Selektivagarplatten quantifizieren und die Auswertung kann zu falschen Ergebnissen führen. Bei der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung erfolgt der Nachweis einzelner Bakterienspezies innerhalb von Biofilmen mittels speziesspezifischer Oligonukleotide [246]. Durch gezielte Anfärbung können verschiedene Bakterienarten visualisiert werden und ihr prozentualer Anteil zur Gesamtpopulation mit einer Computersoftware ausgewertet werden. Bei

größerem Untersuchungsmaterial ist die FISH-Technik wegen erhöhtem Zeitaufwand bei der visuellen mikroskopischen Auswertung weniger geeignet. Hier ist die quantitative real-time Polymerasenkettenreaktion als Auswertungsverfahren vorzuziehen [181]. Mit dieser Methode ist die Identifizierung von Mikroorganismen und ihre speziesspezifische Detektion möglich. Bei Kenntnis und Anwendung der spezifischen Primerpaare zu den ausgewählten Bakterienarten, stellt diese Methode ein einfaches und reproduzierbares Nachweisverfahren dar. In der vorliegenden Studie erfolgte die quantitative Auswertung mittels quantitativer real-time Polymerasenkettenreaktion. Hierbei ist die Auswahl von spezifischen Primerpaaren und der Ausschluss von Kreuzreaktionen essentiell. Das in dieser Arbeit zunächst untersuchte Primerpaar EF1/2 war in der Studie von Denotti *et al.* spezifisch für den *Enterococcus faecalis* bei Bildung eines Monospezies-Biofilmes [61]. In der vorliegenden Studie stellte sich jedoch heraus, dass das Primerpaar EF1/2 nicht speziesspezifisch für *Enterococcus faecalis* war. Es ging Kreuzreaktionen sowohl mit der DNA des *Actinomyces naeslundii* als auch mit der DNA des *Fusobacterium nucleatum* ein. Dies hätte bei Anwendung des EF1/2 Primerpaares in der vorliegenden Studie zu falsch positiven Ergebnissen geführt. Deswegen wurde mit Hilfe des NCBI-Primer tools ein spezifischer Primer für den *Enterococcus faecalis* gesucht und auf Kreuzreaktionen mit den anderen beiden Bakterienarten untersucht. Auf diese Weise konnten in dieser Arbeit spezifische Primerpaare ausgewählt werden, die die einzelnen Bakterienarten unterscheiden können.

Die quantitative real-time Polymerasenkettenreaktion hat jedoch den Nachteil, dass sowohl lebende Bakterienzellen als auch Bakterien mit zerstörter Zellmembran quantifiziert werden. Biofilmforscher setzen hierfür die Vitalitätsfärbung (LIVE/DEAD-Färbung) ein, um einen prozentualen Anteil an lebendigen und toten Bakterienzellen zu erhalten [96,265]. Zaura und ten Cate untersuchten die Vitalität von Biofilmen vor und nach der Behandlung mit 0,2%igem CHX [265]. In ihren Ergebnissen zeigt ein 48 Stunden kultivierter Biofilm eine Vitalität von ca. 60% auf. Sanchez *et al.* beschrieben in ihren *in-vitro* kultivierten Biofilmen nach 72 Stunden eine homogene Verteilung von lebenden Zellen mit einer durchschnittlichen Vitalität von 60,7% [195]. In der vorliegenden Arbeit waren nach einer 72-stündigen Kultivierungszeit im Median 49,5% (range: 46% – 53%) der Bakterien im Biofilm lebend. Eine gängige Methode zur Visualisierung unterschiedlicher Fluoreszenzfärbungen eines Biofilmes ist die Anwendung der Mehrkanal-3D-Fluoreszenzmikroskopie. Hierbei kann die

dreidimensionale Biofilmstruktur in verschiedenen Schichten untersucht werden. Durch Anwendung unterschiedlicher Fluoreszenzfarbstoffe, wie bspw. Fitc, Ethidiumbromid, Propidiumjodid, Syto-Farbstoffe oder Concanavalin A, können verschiedene Mechanismen und Strukturen in einem Biofilm dargestellt werden. Dabei ist darauf zu achten, dass die Farbstoffe die komplette Bakterienpopulation anfärbt, die Farbstoffe müssen durch die Biofilmstruktur penetrieren. Weiterhin beschreiben Zaura und ten Cate, dass die Visualisierung unmittelbar nach der Inkubationszeit der Fluoreszenzfarbstoffe (bis zu 15 min) erfolgen muss, da der Farbstoff nicht für längere Zeit in den Zellen zurückgehalten wird [265]. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Visualisierung unmittelbar nach der Inkubationszeit der Fluoreszenzfarbstoffe.

Die extrazelluläre polymere Substanz (EPS) stellt das Grundgerüst eines Biofilmes dar. Sie macht 50-90% der gesamten Biofilmmasse aus [69,82]. Die EPS setzt sich aus Polysacchariden, Proteinen, Lipiden, und Nukleinsäuren zusammen. Sie formt den Raum zwischen Mikroorganismen aus und hält sie in ihrer dreidimensionalen Struktur zusammen [51,82,229]. Die EPS dient der Kommunikation einer bakteriellen Gemeinschaft, gewährt den Schutz vor mechanischen und chemischen Einflüssen und begünstigt den Austausch von Genen in einer bakteriellen Gemeinschaft. Um *in-vitro* hergestellte bakterielle Mischkulturen als Biofilme definieren zu können, sollte ihre extrapolymeren Substanz nachgewiesen werden. Durch eine selektive Anfärbung von Polysacchariden oder Glykoproteinen mit verschiedenen histochemischen Farbstoffen (Alcainblau, Kongorot, Fluorochrom, Calcofluor White, Concanavalin A) kann die EPS mit einem Fluoreszenzmikroskop visualisiert werden.

Der in der vorliegenden Arbeit verwendete Fluoreszenzfarbstoff, ConA, ist ein fluoreszenzmarkiertes Lektin, das spezifisch an Zuckermoleküle bindet und den Nachweis für N-Acetylglucosamine liefert [163]. Die extrazelluläre polymere Substanz konnte in der vorliegenden Studie erfolgreich nachgewiesen werden. Die Darstellung der EPS zeigt eine in mehreren Schichten homogene Verteilung der EPS. Jedoch bedeckt die Matrix nicht die komplette Biofilmstruktur des Biofilmes. Sporadisch auftauchende Unterbrechungen der EPS im Biofilm könnten aufgrund der partiellen Austrocknung des Biofilmes nach der Fluoreszenzfärbung oder durch Einreißen der Biofilmstruktur während der Waschvorgänge an diesen Stellen entstanden sein. Eine weitere Überlegung ist, dass nur ein Fluoreszenzfarbstoff für die Visualisierung der EPS verwendet wurde. Die gleichzeitige Anwendung mehrerer verschiedener

Farbstoffe ist für zukünftige Untersuchungen zu überlegen, da somit eine selektive Markierung mehrerer Zuckerkomponenten möglich wird.

Inkubationszeiten

Innerhalb weniger Sekunden bildet sich auf der Schmelzoberfläche die Pellicel aus, die als Substrat für die Adhäsion initialer bakterieller Frühbesiedler dient. Die dentale Pellicel wird zunächst von Streptokokken besiedelt. Nyvad *et al.* fand in seinen Untersuchungen heraus, dass 60-90% der kultivierbaren Bakterien nach 4 Stunden Biofilmbildung aus Streptokokken besteht, wie *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis* und *Streptococcus oralis* [166]. Der initiale Biofilm besteht hauptsächlich aus Streptokokken und kurzen Stäbchen [187]. Nach 24h Biofilmwachstum enthält der Biofilm mehrere unterschiedliche Bakterienarten die miteinander co-aggregieren und komplexe Strukturen ausbilden.

Bei der Durchführung von *in-vitro* Versuchen entscheidet sich die Auswahl der Inkubationszeiten für die Biofilmbildung je nach verwendetem Modell und Fragestellung. Gilbert *et al.* unterscheiden *in-vitro* Studien in replikative und investigative Modelle. Die replikativen Modelle stellen die naturgetreue Variante dar, das heißt die Forschung an ausgereiften, komplexen Biofilmen [93]. Dies stellen hauptsächlich *in-vivo* oder *in-situ*-Versuche dar. Bei *in-vivo* Testverfahren wird beispielsweise der Biofilm aus der Mundhöhle von Probanden entnommen und untersucht. Hierbei besteht jedoch die Gefahr der Zerstörung des Biofilmes während des Ablösens. Bei *in-situ* Modellen werden geeignete Trägersysteme zur Biofilmforschung eingesetzt. Forscher züchten hierbei Biofilme auf speziellen Trägersystemen, die in der Mundhöhle angebracht werden. Durch die einfache Möglichkeit der Abnahme dieser Trägersysteme lassen sich die Biofilme im unversehrten Zustand untersuchen. Für replikative Modellsysteme wird eine lange Inkubationszeit empfohlen, über Tage bis Wochen, da hier die Generierung reifer Biofilme im Vordergrund steht. Bei investigativen Biofilmmodellen konzentriert sich die Forschung auf die Beeinflussung bestimmter Parameter auf Form und Struktur des Biofilmes. Dabei werden die natürlichen Gegebenheiten vereinfacht dargestellt. Anders als bei replikativen Modellen werden hier kurze Inkubationszeiten von Minuten [32] bis zu 2-3 Tagen empfohlen [110,135].

In der vorliegenden Studie sollte die Biofilmbildung bzw. das Bakterienwachstum zu vier verschiedenen Zeitpunkten und dabei das Wachstumsverhalten der drei ausgewählten Bakterien untersucht werden. Es wurde das Wachstum nach 12, 24, 48 und 72 Stunden Inkubationszeit untersucht. Je nach Untersuchungsziel wählen Biofilmforscher unterschiedliche Inkubationszeitpunkte des Biofilmes aus. Wird die initiale Adhäsion verschiedener Bakterienspezies auf Oberflächen untersucht, werden Inkubationszeiten von 1 bis 4 Stunden untersucht bis hin zu 12 Stunden. So wiesen Xie *et al.* in ihren Studien nach, dass Wachstum und Adhäsion nach 1-3 Stunden einsetzt [258].

In der vorliegenden Studie ist nach einer Inkubationsdauer von 12 Stunden *Actinomyces naeslundii* signifikant gewachsen. Dies bestätigt die Ergebnisse vieler Autoren, die *Actinomyces naeslundii* als Frühbesiedler beschreiben [124,137,167]. Allerdings zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Studie auch, dass *Actinomyces naeslundii* zu allen Zeitpunkten signifikant gewachsen. Dies beweist, dass *Actinomyces naeslundii* sowohl in der initialen Phase der Biofilmbildung überlebensfähig ist, als auch bei zunehmender Biofilmdichte die Wachstumsrate nicht einstellt. *Actinomyces naeslundii* ist sowohl in supra- als auch subgingivalen Biofilmen nachweisbar [259]. Streptokokken werden hauptsächlich in supragingivalen Biofilmen identifiziert [126]. Diese Tatsache und die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass *Actinomyces naeslundii* in mehreren Phasen der Biofilmbildung überlebensfähig ist, denn auch zu einem späteren Zeitpunkt war die Gesamtvitalität des Biofilmes nicht beeinträchtigt.

Enterococcus faecalis ist eine Bakterienart, mit welcher zahlreiche Studien in planktonischer Kultivierungsform oder als Monospezies-Biofilm durchgeführt wurden. Vergleichende Studien mit Kultivierung polymikrobieller Biofilme unter Einbeziehung von *Enterococcus faecalis* sind zum heutigen Zeitpunkt selten. In der vorliegenden Studie konnte nach einer Inkubationsdauer von 12 Stunden eine dem *Actinomyces naeslundii* vergleichende Anzahl an Enterokokken festgestellt werden. Zwischen 12 und 24 Stunden Inkubation stagniert das Wachstum des *Enterococcus faecalis* zunächst. In der initialen Phase der Biofilmbildung, in der Mikroorganismen schwach und reversibel mit der speichelbenetzten Oberfläche Verbindungen eingehen, scheint *Enterococcus faecalis* beteiligt zu sein. *Actinomyces naeslundii* vermehrt sich jedoch nach 12 Stunden Inkubationsdauer aktiv und trägt hauptsächlich zur primären

Zunahme der Biofilmdichte bei *Enterococcus faecalis* scheint sich zunächst an die Umgebungsbedingungen eines Biofilmes anpassen zu müssen. Denn nach einer Inkubationsdauer von 48 und 72 Stunden, zeigt *Enterococcus faecalis* erneut eine signifikante, stetig ansteigende Wachstumszunahme. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie konnten eine Beteiligung von *Enterococcus faecalis* in Biofilmen bestätigen. In einem Biofilm existierend, hat *Enterococcus faecalis* die Möglichkeit, seine entwickelten Resistenzen gegen antimikrobielle Substanzen an weitere Bakterienarten zu übertragen [42]. Deswegen ist es sinnvoll, bei der Untersuchung antimikrobieller Substanzen auf Biofilme, *Enterococcus faecalis* als Biofilm-bildenden Mikroorganismus mit zu verwenden.

Fusobacterium nucleatum ist verglichen zu *Actinomyces naeslundii* und *Enterococcus faecalis* zu allen Inkubationszeitpunkten nicht signifikant gewachsen. Durch den jeweils nach 24h Inkubation durchgeführten Waschvorgang wurde der Biofilm für wenige Minuten einer Sauerstoffzufuhr ausgesetzt. Hierdurch können gerade zu Beginn des Biofilmwachstums viele der obligaten Anaerobier weggewaschen worden sein. Diese benötigen eine sehr viel längere Inkubationszeit zum Wachsen und treten zu einem späteren Zeitpunkt in den Biofilm ein. Obligate Anaerobier können erst in einem Biofilm überleben und wachsen, wenn die Umweltbedingungen zunehmend anaerob werden. Bei zunehmender Biofilmdichte wird in tieferen Schichten der Biofilm zunehmend anaerob und lebensfähig für obligate Anaerobier. Dies bewiesen auch Periasamy *et al.* in ihrer Studie. Hierbei wurde die Biofilmbildung mit einer, zwei oder drei Bakterienarten untersucht [173]. Die auf Adhärenz, Co-aggregation und Co-adhäsion getesteten Bakterienarten waren Aerobier, wie *Streptococcus gordinii* und *Streptococcus oralis*, fakultative Anaerobier, wie *Actinomyces oris*, und obligate Anaerobier, wie *Fusobacterium nucleatum* und *Porphyromonas gingivalis*. Die Studie wies nach, dass die ausgewählten obligaten Anaerobier keine Monospecies-Biofilme bilden konnten. Bei den Aerobiern und bei *Actinomyces oris* (fakultativer Anaerobier) konnten jedoch Adhärenz und Bakterienvermehrung in der Monospezies Biofilmbildung nachgewiesen werden. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass die Kombination von *Fusobacterium nucleatum* und *Streptococcus oralis* zu keiner Biofilmbildung geführt hat. Es war nicht möglich mit einem Aerobier und einem obligaten Anaerobier einen Biofilm zu bilden. Erst die Hinzunahme eines fakultativen Anaerobiers (*Actinomyces oris*) hat die Biofilmbildung ermöglicht. Dies zeigt, dass für

eine Biofilmbildung fakultative Anaerobier notwendig sind. Durch deren Sauerstoffverbrauch werden anaerobe Bedingungen geschaffen und den obligaten Anaerobiern das Überleben ermöglicht [22]. In der vorliegenden Studie konnte nach einer Inkubationsdauer von 72 Stunden eine signifikante Wachstumszunahme von *Fusobacterium nucleatum* verglichen zu 12, 24, 48 Stunden Inkubation nachgewiesen werden. Dies beweist, dass *Fusobacterium nucleatum* erst nach 72 Stunden Inkubation in einem Biofilm zu wachsen beginnt, wenn die Bedingungen in der bakteriellen Gemeinschaft zunehmend anaerob werden. Eine längere Inkubationszeit als 72 Stunden für die Biofilmbildung mit *Fusobacterium nucleatum* ist zu empfehlen, um das Verhalten von *Fusobacterium nucleatum* in einem Biofilm besser beurteilen zu können.

8. Ausblick

Die Etablierung eines *in-vitro* Biofilmmodells ist die Voraussetzung für die Untersuchung antimikrobieller Substanzen, denn Bakterien in planktonischer Form kommen in der Natur kaum vor. In der vorliegenden Studie konnte mit drei verschiedenen Bakterienstämmen eine *in-vitro* Biofilmbildung nachgewiesen werden. Die Bakterien sind zu allen Zeitpunkten gewachsen und der Nachweis der extrazellulären polymeren Substanz in dem Biofilm beweist die komplexe dreidimensionale mikrobielle Gemeinschaft. In zukünftigen Studien kann das Biofilmmodell durch Hinzunahme weiterer Bakterienarten oder verschiedener Materialoberflächen ausgebaut werden. Die Wirkung der antimikrobiellen photodynamischen Therapie auf Biofilme ist ein sehr vielversprechender Therapieansatz, der in zukünftigen Studien auf das Biofilmmodell untersucht werden kann, um somit auch Hinweise zu bekommen, ob beispielsweise die EPS eines Biofilmes Einfluss auf die Sensitivität gegenüber des photodynamischen Effektes besitzt.

9. Zusammenfassung

Monoinfektionen treten in der freien Natur so gut wie nie auf, daher liefert die Verwendung von planktonisch kultivierten Bakterien zur Testung antimikrobieller Substanzen zwar zufriedenstellende Ergebnisse, diese können jedoch nicht mit klinischen Ergebnissen korrelieren [168,236]. Mikroorganismen haben verglichen zu planktonisch lebenden Bakterien eine gesteigerte Resistenz gegen äußere Einflüsse, wie Austrocknung, Scherkräfte, antibakterielle Substanzen und Phagozytose [53,71,83]. Um einen therapeutischen Erfolg bei der Eliminierung der dreidimensionalen Biofilmstruktur *in-vivo* zu erreichen, muss die Wirkung antiseptischer Agenzien auch auf Biofilme *in-vitro* untersucht werden. Hierfür ist die Etablierung eines *in-vitro* Biofilmmodelles die Voraussetzung, da antimikrobielle Substanzen auf planktonisch kultivierte Bakterien häufig effektiver wirken, als auf adhärent wachsende Bakterien [51].

Die Etablierung eines *in-vitro* Biofilmmodelles erfolgte mit drei, in verschiedenen Phasen der Biofilmbildung vorkommenden Bakterienstämmen, *Actinomyces naeslundii*, *Fusobacterium nucleatum* und *Enterococcus faecalis*. Für die Herstellung einer adhärenen Bakterienkultur wurden 96 Well-Mikrotiterplatten (tissue culture treated) verwendet. Die Biofilmbildung wurde anhand zwei unterschiedlicher Medien untersucht, dem BHI-Medium und einem künstlichen Speichelmedium nach Pratten *et.al.* [180], dem 1g/l Saccharose zugefügt wurden und das mit Stickstoff desoxygeniert wurde. Nach einer 30minütigen Vorbehandlung der Mikrotiterplatten mit dem jeweiligen Kultivierungsmedium wurden jeweils 80µl der zuvor hergestellten Bakteriensuspensionen in die Wells der Mikrotiterplatten pipettiert. Die Biofilmbildung fand unter statischen, anaerobischen Bedingungen statt. Anaerobe Verhältnisse wurden mittels einer Genbox (Genbox Jar 7l) und einem Gasgenerator hergestellt. Es wurde das Wachstumsverhalten zu den Inkubationszeiten 12, 24, 48 und 72 Stunden untersucht. Als Maß für das Wachstum im Biofilm wurde die Veränderung der DNA-Menge der jeweiligen Bakterienstämme über die 16s Gensequenz mit der quantitativen real-time PCR (Light Cycler, Roche) bestimmt (n=12). Mittels LIVE/DEAD-Färbung (Biofilm Viability Kit von Invitrogen) wurde der prozentuale

Anteil lebender Bakterien im Biofilm ermittelt (n=10), wobei nicht spezifiziert wurde welche Arten dies waren. Ein essentieller Nachweis eines Biofilmes mit seiner dreidimensionalen Struktur ist die Entstehung einer extrazellulären polymeren Substanz (EPS). Die EPS wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff Concanavalin A (ConA) nachgewiesen. Sowohl die LIVE/DEAD-Färbungen, als auch die ConA-Färbungen wurden durch zusammengesetzten Schichtaufnahmen visualisiert.

Die *in-vitro* Biofilmbildung mit dem BHI-Medium zeigte, im Gegensatz zum künstlichen Speichelmedium, keinerlei Adhäsionsverhalten der Bakterien. Mit Anwendung des künstlichen Speichelmediums sind alle drei untersuchten Bakterienarten adhärent in einem Biofilm signifikant gewachsen und zeigten tendenziell ein, mit der Kulturdauer zunehmendes Wachstum, dargestellt als zunehmende DNA-Konzentration. Die Auswertung von 10 unabhängig gewachsenen Biofilmen ergab, dass nach einer 72-stündigen Kultivierungszeit im Median 49,5% (range: 46% – 53%) der Bakterien im Biofilm lebend waren. Die Fluoreszenzfärbung der extrazellulären polymeren Substanz mit ConA konnte die Matrix in dem *in-vitro* gewachsenen Biofilm nachweisen und beweist die komplexe dreidimensionale mikrobielle Gemeinschaft.

Die *in-vitro* Biofilmbildung aus drei verschiedenen Bakterienstämmen konnte mit künstlichem Speichel als Kultivierungsmedium erfolgreich nachgewiesen werden.

10. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AN	<i>Actinomyces naeslundii</i>
a PDT	antimikrobielle Photodynamische Therapie
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Brain Heart Infusion
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
CaCl ₂ x2H ₂ O	Calciumchlorid-Dihydrat
CFSTR	continious flow stirred tank reactor
CHX	Chlorhexidin
CO ₂	Kohlendioxid
Cp	Crossing point
DNA	desoxiribonucleatic acid
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EF	<i>Enterococcus faecalis</i>
EPS	extrazelluläre polymere Substanz
et al.	et alii
etc.	et cetera
FN	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
g	Gramm
h	Stunden
HCl	Chlorwasserstoff
H ₂ O	Wasser
K	Kalium
K ₂ HPO ₄	Dikaliumhydrogenphosphat
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
l	Liter
M	Molar
MgSO ₄ x7H ₂ O	Magnesiumsulfat-Heptahydrat
min	Minuten
ml	Mililiter

mm	Milimeter
mM	Millimolar
MTP	microtiter plate
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaOCl	Natriumhypochlorit
NaOH	Natriumhydroxid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NCTC	National Collection of Type Cultures
ng/μl	Nanogramm pro Mikroliter
NIH	National Institutes of Health
nm	Nanometer
ns	nicht signifikant
O ₂	Sauerstoff
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerasenkettenreaktion
PFR	plug flow reactor
ppm	parts per million
PYG	Peptone–Yeast Extract–Glucose
q-rt-PCR	quantitative real time Polymerasenkettenreaktion
QS	Quorum sensing
SBIR	Small Business Innovation Research
subsp.	subspecies
STTR	Small Business Technology Transfer
TAE	Tris-Acetat-Ethylendiamintetraacetat
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
z.B.	zum Beispiel
α	alpha
μm	Micrometer
%	Prozent

11. Danksagung

Mein erster Dank gilt Herrn Professor Dr. med. dent. G. Schmalz für die freundliche Überlassung des Themas, die Anleitung zu wissenschaftlichen Arbeiten und die großzügige Unterstützung bei der Durchführung der Versuche. Vielen Dank, in Ihrer Poliklinik lernen zu dürfen.

Herrn PD Dr. rer. nat. T. Maisch gebührt mein ganz besonderer Dank für die überaus engagierte und unermesslich geduldige Betreuung während der gesamten Durchführung der Versuche, für die fachliche Kompetenz auf dem Gebiet der Mikrobiologie, für die vielen nützlichen Anregungen und Tipps bezüglich dieser Dissertation. Vielen Dank vor allem für Ihr Vertrauen und die Möglichkeit selbstständig und engagiert arbeiten zu dürfen.

Herrn Dr. rer. nat. K.-A. Hiller möchte ich ganz besonderers danken für die hilfreiche Unterstützung und den enormen Zeitaufwand bei der Erarbeitung der statistischen Ergebnisse sowie für die Erstellung der Tabellen und Graphiken. Vielen Dank für Ihre stetige Motivation und Geduld.

Bedanken möchte ich mich herzlich bei Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Landthaler für die Bereitstellung des Laborplatzes der Dermatologie des Universitätsklinikums Regensburg.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. U. Reischl möchte ich für die kompetente und überaus freundliche Unterstützung bei der Erstellung der real-time PCR bedanken. Vielen Dank für die konstruktive Hilfestellung.

Herrn Francesco Santarelli danke ich für die Hilfe bei der Erstellung und Auswertung der Fluoreszenzaufnahmen und der überaus geduldigen Einweisung in die labortechnischen Arbeiten, sowie interessante und konstruktive Ideen bei der Versuchsdurchführung.

Weiterhin möchte ich mich herzlichst beim ganzen Laborteam der Dermatologie des Universitätsklinikums Regensburg bedanken, das mich so freundlich aufgenommen hat und mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand.

Bedanken möchte ich beim Laborteam der Zahnerhaltung und Parodontologie des Universitätsklinikums Regensburg für die nette Aufnahme und Motivation, ganz besonders Andreas Eidt für die initiale Einweisung in mikrobiologische Arbeiten.

Bei meinen Kolleginnen (ganz besonders dem Phantomkursteam) möchte ich mich für die Unterstützung während meiner Versuchsdurchführung bedanken. Vielen Dank für eure Bereitschaft mich zu vertreten, wenn die Laborarbeiten meine Person längere Zeit beanspruchten.

Dem Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Regensburg möchte ich für die Bereitstellung des Fluoreszenzmikroskopes danken.

Meinen Geschwistern, Elisabeth und Isabelle, möchte ich meinen ganz speziellen Dank aussprechen - vielen Dank für die Zeit die ihr mir gewidmet habt, und dass ihr immer für mich da seid, ich liebe euch!

Zuletzt möchte ich jedoch ganz besonders meinen Eltern danken, ohne eure unermüdliche Liebe und Unterstützung hätte ich bis heute Vieles nicht erreichen können. Ich danke euch für eure unermessliche Geduld, für eure Motivation und euren Glauben an mich. Ich liebe euch!

12. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Laura Karla Tabenski
Geburtsdatum: 05.08.1982 in Würzburg
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung

1989 - 1993 Anton-Kliegel-Volksschule Bad Kissingen
1993 - 2000 Jack-Steinberger Gymnasium Bad Kissingen
2000 - 2003 Frobeniusgymnasium Hammelburg
Juni 2003 Abitur am Frobeniusgymnasium Hammelburg

Hochschulausbildung

2003 Vorsemester für Medizin in Köln
2004 - 2009 Studium der Zahnmedizin an der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
November 2009 Staatsexamen der Zahnheilkunde an der Julius-
Maximilians-Universität Würzburg
Dezember 2009 Approbation als Zahnärztin

Beruflicher Werdegang

Dez. 2009 – Juni 2010 Assistenz Zahnärztin in der zahnärztlichen Praxis
Msc. Dr. med. dent. Barbara Tabenski
seit Juli 2010 Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Poliklinik für
Zahnerhaltung und Parodontologie,
Prof. Dr. med. dent. Gottfried Schmalz,
Universitätsklinikum Regensburg

13. Literatur

- [1] Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol* 2005 Nov;43(11):5721-32.
- [2] Ahn SJ, Wen ZT, Burne RA. Effects of oxygen on virulence traits of *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol* 2007 Dec;189(23):8519-27.
- [3] Al-Ahmad A, Maier J, Follo M, Spitzmuller B, Wittmer A, Hellwig E, et al. Food-borne enterococci integrate into oral biofilm: an in vivo study. *J Endod* 2010 Nov;36(11):1812-9.
- [4] Al-Hashimi I, Levine MJ. Characterization of in vivo salivary-derived enamel pellicle. *Arch Oral Biol* 1989;34(4):289-95.
- [5] Ali L, Khambaty F, Diachenko G. Investigating the suitability of the Calgary Biofilm Device for assessing the antimicrobial efficacy of new agents. *Bioresour Technol* 2006 Oct;97(15):1887-93.
- [6] Allesen-Holm M, Barken KB, Yang L, Klausen M, Webb JS, Kjelleberg S, et al. A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Mol Microbiol* 2006 Feb;59(4):1114-28.
- [7] Amerongen AV, Veerman EC. Saliva-the defender of the oral cavity. *Oral Dis* 2002 Jan;8(1):12-22.
- [8] Amorena B, Gracia E, Monzon M, Leiva J, Oteiza C, Perez M, et al. Antibiotic susceptibility assay for *Staphylococcus aureus* in biofilms developed in vitro. *J Antimicrob Chemother* 1999 Jul;44(1):43-55.
- [9] Andersen RN, Ganeshkumar N, Kolenbrander PE. *Helicobacter pylori* adheres selectively to *Fusobacterium* spp. *Oral Microbiol Immunol* 1998 Feb;13(1):51-4.
- [10] Arslan SY, Leung KP, Wu CD. The effect of lactoferrin on oral bacterial attachment. - *Oral Microbiol Immunol* 2009 Oct;24(5):411-6 2009;(- 1399-302X (Electronic)).
- [11] Baehni PC, Takeuchi Y. Anti-plaque agents in the prevention of biofilm-associated oral diseases. *Oral Dis* 2003;9 Suppl 1:23-9.
- [12] Bakken V, Høgh BT, Jensen HB. Growth conditions and outer membrane proteins of *Fusobacterium nucleatum*. *Scand J Dent Res* 1990 Jun;98(3):215-24.
- [13] Bakken V, Høgh BT, Jensen HB. Utilization of amino acids and peptides by *Fusobacterium nucleatum*. *Scand J Dent Res* 1989 Feb;97(1):43-53.
- [14] Balaban N, Goldkorn T, Gov Y, Hirshberg M, Koyfman N, Matthews HR, et al. Regulation of *Staphylococcus aureus* pathogenesis via target of RNAIII-activating Protein (TRAP). *J Biol Chem* 2001 Jan 26;276(4):2658-67.

- [15] Bolstad AI. Sizing the *Fusobacterium nucleatum* genome by pulsed-field gel electrophoresis. *FEMS Microbiol Lett* 1994 Oct 15;123(1-2):145-51.
- [16] Bolstad AI, Jensen HB, Bakken V. Taxonomy, biology, and periodontal aspects of *Fusobacterium nucleatum*. *Clin Microbiol Rev* 1996 Jan;9(1):55-71.
- [17] Bos R, van der Mei HC, Busscher HJ. Co-adhesion of oral microbial pairs under flow in the presence of saliva and lactose. *J Dent Res* 1996 Feb;75(2):809-15.
- [18] Bowden GH. Controlled environment model for accumulation of biofilms of oral bacteria. *Methods Enzymol* 1999;310:216-24.
- [19] Brading MG, Marsh PD. The oral environment: the challenge for antimicrobials in oral care products. *Int Dent J* 2003 Dec;53(6 Suppl 1):353-62.
- [20] Bradshaw DJ, Homer KA, Marsh PD, Beighton D. Metabolic cooperation in oral microbial communities during growth on mucin. *Microbiology* 1994 Dec;140 (Pt 12):3407-12.
- [21] Bradshaw DJ, Marsh PD, Allison C, Schilling KM. Effect of oxygen, inoculum composition and flow rate on development of mixed-culture oral biofilms. *Microbiology* 1996 Mar;142 (Pt 3):623-9.
- [22] Bradshaw DJ, Marsh PD, Watson GK, Allison C. Oral anaerobes cannot survive oxygen stress without interacting with facultative/aerobic Species as a microbial community. *Lett Appl Microbiol* 1997;25:385-7.
- [23] Bradshaw DJ, Marsh PD, Watson GK, Allison C. Role of *Fusobacterium nucleatum* and coaggregation in anaerobe survival in planktonic and biofilm oral microbial communities during aeration. *Infect Immun* 1998 Oct;66(10):4729-32.
- [24] Braun A. Antimikrobielle Photodynamische Therapie (aPDT) bei der parodontalen Behandlung. *Quintessenz Team* 2007;37: 63-68.
- [25] Braun A. Anwendungen und Möglichkeiten der antimikrobiellen Photodynamischen Therapie (aPDT). *Laserzahnheilkunde* 2007;4:159-164.
- [26] Brex M, Ronstrom A, Theilade J, Attstrom R. Early formation of dental plaque on plastic films. 2. Electron microscopic observations. *J Periodontal Res* 1981 Mar;16(2):213-27.
- [27] Brown MR, Barker J. Unexplored reservoirs of pathogenic bacteria: protozoa and biofilms. *Trends Microbiol* 1999 Jan;7(1):46-50.
- [28] Bryers JD. Bacterial biofilms. *Curr Opin Biotechnol* 1993 Apr;4(2):197-204.
- [29] Buegers R, Rosentritt M, Handel G. Bacterial adhesion of *Streptococcus mutans* to provisional fixed prosthodontic material. *J Prosthet Dent* 2007 Dec;98(6):461-9.

- [30] Busscher HJ, Cowan MM, van der Mei HC. On the relative importance of specific and non-specific approaches to oral microbial adhesion. *FEMS Microbiol Rev* 1992 Jun;8(3-4):199-209.
- [31] Busscher HJ, De Jong HP, van Pelt AW, Arends J. The surface free energy of human dental enamel. *Biomater Med Devices Artif Organs* 1984;12(1-2):37-49.
- [32] Busscher HJ, Doornbusch GI, van der Mei HC. Adhesion of mutants streptococci to glass with and without a salivary coating as studied in a parallel-plate flow chamber. *J Dent Res* 1992 Mar;71(3):491-500.
- [33] Busscher HJ, van der Mei HC. Physico-chemical interactions in initial microbial adhesion and relevance for biofilm formation. *Adv Dent Res* 1997 Apr;11(1):24-32.
- [34] Busscher HJ, van der Mei HC. Microbial adhesion in flow displacement systems. *Clin Microbiol Rev* 2006 Jan;19(1):127-41.
- [35] Busscher HJ, Weerkamp AH, van der Mei HC, van Pelt AW, De Jong HP, Arends J. Measurement of the surface free energy of bacterial cell surfaces and its relevance for adhesion. *Appl Environ Microbiol* 1984 Nov;48(5):980-3.
- [36] Busscher HJ, White DJ, tema-Smit J, van der Mei HC. Efficacy and mechanisms of non-antibacterial, chemical plaque control by dentifrices--an in vitro study. *J Dent* 2007 Apr;35(4):294-301.
- [37] Bystrom A, Claesson R, Sundqvist G. The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. *Endod Dent Traumatol* 1985 Oct;1(5):170-5.
- [38] Ceburkov O, Gollnick H. Photodynamic therapy in dermatology. *Eur J Dermatol* 2000 Oct;10(7):568-75.
- [39] Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J Bacteriol* 2001 Sep;183(18):5385-94.
- [40] Chandra J, Patel JD, Li J, Zhou G, Mukherjee PK, McCormick TS, et al. Modification of surface properties of biomaterials influences the ability of *Candida albicans* to form biofilms. *Appl Environ Microbiol* 2005 Dec;71(12):8795-801.
- [41] Chavez de Paz LE. Redefining the persistent infection in root canals: possible role of biofilm communities. - *J Endod* 2007 Jun;33(6):652-62 Epub 2007 Mar 23 2007;(- 0099-2399 (Print)).
- [42] Chavez de Paz LE, Bergenholtz G, Dahlen G, Svensater G. Response to alkaline stress by root canal bacteria in biofilms. - *Int Endod J* 2007 May;40(5):344-55 Epub 2007 Feb 27 2007;(- 0143-2885 (Print)).

- [43] Chavez de Paz LE, Hamilton IR, Svensater G. Oral bacteria in biofilms exhibit slow reactivation from nutrient deprivation. - *Microbiology* 2008 Jul;154(Pt 7):1927-38 2008;(- 1350-0872 (Print)).
- [44] Citron DM. Update on the taxonomy and clinical aspects of the genus *fusobacterium*. *Clin Infect Dis* 2002 Sep 1;35(Suppl 1):S22-S27.
- [45] Civen R, Jousimies-Somer H, Marina M, Borenstein L, Shah H, Finegold SM. A retrospective review of cases of anaerobic empyema and update of bacteriology. *Clin Infect Dis* 1995 Jun;20 Suppl 2:S224-S229.
- [46] Coenye T, Nelis HJ. In vitro and in vivo model systems to study microbial biofilm formation. *J Microbiol Methods* 2010 Nov;83(2):89-105.
- [47] Costerton JW. Overview of microbial biofilms. *J Ind Microbiol* 1995 Sep;15(3):137-40.
- [48] Costerton JW. Introduction to biofilm. *International J Antimicrob Agents* 1999;11(3-4) 2173221,237-9.
- [49] Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG, Ladd TI, Nickel JC, Dasgupta M, et al. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol* 1987;41:435-64.
- [50] Costerton JW, Ellis B, Lam K, Johnson F, Khoury AE. Mechanism of electrical enhancement of efficacy of antibiotics in killing biofilm bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 1994 Dec;38(12):2803-9.
- [51] Costerton JW, Geesey GG, Cheng KJ. How bacteria stick. *Sci Am* 1978 Jan;238(1):86-95.
- [52] Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. - *Annu Rev Microbiol* 1995;49:711-45 1995;(- 0066-4227 (Print)).
- [53] Costerton JW, Lewandowski Z, Debeer D, Caldwell D, Korber D, James G. Biofilms, the customized microniche. *J Bacteriol* 1994 Apr;176(8):2137-42.
- [54] Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999 May 21;284(5418):1318-22.
- [55] Cummins D. Mechanism of action of clinically proven antiplaque agents. In: Embery G, Rolla G, editors. *Clinical and biological aspects of dentifrices*. Oxford (England): Oxford University Press; 1992. p. 205-28.
- [56] Cvitkovitch DG, Li YH, Ellen RP. Quorum sensing and biofilm formation in *Streptococcal* infections. *J Clin Invest* 2003 Dec;112(11):1626-32.
- [57] D'Arcangelo C, Varvara G, De FP. An evaluation of the action of different root canal irrigants on facultative aerobic-anaerobic, obligate anaerobic, and microaerophilic bacteria. *J Endod* 1999 May;25(5):351-3.
- [58] Davey ME, O'Toole GA. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000 Dec;64(4):847-67.

- [59] Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW, Greenberg EP. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* 1998 Apr 10;280(5361):295-8.
- [60] De BD, Srinivasan R, Stewart PS. Direct measurement of chlorine penetration into biofilms during disinfection. *Appl Environ Microbiol* 1994 Dec;60(12):4339-44.
- [61] Denotti G, Piga R, Montaldo C, Erriu M, Pilia F, Piras A, et al. In Vitro Evaluation of *Enterococcus faecalis* Adhesion on Various Endodontic Medicaments. *Open Dent J* 2009;3:120-4.
- [62] Di RR, Creti R, Venditti M, D'Amelio R, Arciola CR, Montanaro L, et al. Relationship between biofilm formation, the enterococcal surface protein (Esp) and gelatinase in clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *FEMS Microbiol Lett* 2006 Mar;256(1):145-50.
- [63] Diaz PI, Chalmers NI, Rickard AH, Kong C, Milburn CL, Palmer RJ, Jr., et al. Molecular characterization of subject-specific oral microflora during initial colonization of enamel. *Appl Environ Microbiol* 2006 Apr;72(4):2837-48.
- [64] Dibdin G, Wimpenny J. Steady-state biofilm: practical and theoretical models. *Methods Enzymol* 1999;310:296-322.
- [65] Dibdin GH. Diffusion of sugars and carboxylic acids through human dental plaque in vitro. *Arch Oral Biol* 1981;26(6):515-23.
- [66] Dibdin GH, Shellis RP. Physical and biochemical studies of *Streptococcus mutans* sediments suggest new factors linking the cariogenicity of plaque with its extracellular polysaccharide content. *J Dent Res* 1988 Jun;67(6):890-5.
- [67] Dige I, Nilsson H, Kilian M, Nyvad B. 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* 2007 Dec;115(6):459-67.
- [68] Distel JW, Hatton JF, Gillespie MJ. Biofilm formation in medicated root canals. - *J Endod* 2002 Oct;28(10):689-93 2002;(- 0099-2399 (Print)).
- [69] Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* 2002 Sep;8(9):881-90.
- [70] Donlan RM. Biofilms and device-associated infections. *Emerg Infect Dis* 2001 Mar;7(2):277-81.
- [71] Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002 Apr;15(2):167-93.
- [72] Douglas CW. Bacterial-protein interactions in the oral cavity. *Adv Dent Res* 1994 Jul;8(2):254-62.
- [73] Douglas CW. The binding of human salivary alpha-amylase by oral strains of streptococcal bacteria. *Arch Oral Biol* 1983;28(7):567-73.

- [74] Duggan JM, Sedgley CM. Biofilm formation of oral and endodontic *Enterococcus faecalis*. - J Endod 2007 Jul;33(7):815-8 Epub 2007 Apr 16 2007;(- 0099-2399 (Print)).
- [75] Dunne WM, Jr., Mason EO, Jr., Kaplan SL. Diffusion of rifampin and vancomycin through a *Staphylococcus epidermidis* biofilm. Antimicrob Agents Chemother 1993 Dec;37(12):2522-6.
- [76] Dzink JL, Socransky SS, Haffajee AD. The predominant cultivable microbiota of active and inactive lesions of destructive periodontal diseases. J Clin Periodontol 1988 May;15(5):316-23.
- [77] Ericson T, Pruitt KM, Arwin H, Lundstrom I. Ellipsometric studies of film formation on tooth enamel and hydrophilic silicon surfaces. Acta Odontol Scand 1982;40(4):197-201.
- [78] Estrela AB, Heck MG, Abraham WR. Novel approaches to control biofilm infections. Curr Med Chem 2009;16(12):1512-30.
- [79] Estrela C, Sydney GB, Figueiredo JA, Estrela CR. A model system to study antimicrobial strategies in endodontic biofilms. J Appl Oral Sci 2009 Mar;17(2):87-91.
- [80] Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. Int Endod J 2002 Mar;35(3):221-8.
- [81] Finsen NR. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1903. Nobel Lectures, Physiology or Medicine 1901-1921, Elsevier Publishing Company, Amsterdam 1967.
- [82] Flemming HC, Wingender J. Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs)--Part I: Structural and ecological aspects. Water Sci Technol 2001;43(6):1-8.
- [83] Flemming HC, Wingender J, Mayer C, Koerstgens V, Borchard W. Cohesiveness in biofilm matrix polymers. In: Allison,D., Gilbert,P., Lappin-Scptt,H.M., Wilson,M.: Community structure and cooperation in biofilms. Cambridge University Press p 87-105 2000.
- [84] Fonseca MB, Junior PO, Pallota RC, Filho HF, Denardin OV, Rapoport A, et al. Photodynamic therapy for root canals infected with *Enterococcus faecalis*. Photomed Laser Surg 2008 Jun;26(3):209-13.
- [85] Frias J, Olle E, Alsina M. Periodontal pathogens produce quorum sensing signal molecules. Infect Immun 2001 May;69(5):3431-4.
- [86] Fuqua C, Greenberg EP. Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling. Nat Rev Mol Cell Biol 2002 Sep;3(9):685-95.
- [87] Fuqua C, Winans SC, Greenberg EP. Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. Annu Rev Microbiol 1996;50:727-51.

- [88] Fux CA, Costerton JW, Stewart PS, Stoodley P. Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol* 2005 Jan;13(1):34-40.
- [89] Giard JC, Hartke A, Flahaut S, Boutibonnes P, Auffray Y. Glucose starvation response in *Enterococcus faecalis* JH2-2: survival and protein analysis. *Res Microbiol* 1997 Jan;148(1):27-35.
- [90] Gibbons RJ. Role of adhesion in microbial colonization of host tissues: a contribution of oral microbiology. *J Dent Res* 1996 Mar;75(3):866-70.
- [91] Gibbons RJ, Nygaard M. Interbacterial aggregation of plaque bacteria. *Arch Oral Biol* 1970 Dec;15(12):1397-400.
- [92] Gibson UE, Heid CA, Williams PM. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res* 1996 Oct;6(10):995-1001.
- [93] Gilbert P. The value of iv-vitro models to the study of biofilms. In: Wimpenny J, Handley P, Gilbert P, Lappin-Scott H (eds), *Life and death of biofilm*. BioLine:13-16 1995.
- [94] Gilbert P, Das J, Foley I. Biofilm susceptibility to antimicrobials. *Adv Dent Res* 1997 Apr;11(1):160-7.
- [95] Gristina AG, Naylor P, Myrvik Q. Infections from biomaterials and implants: a race for the surface. *Med Prog Technol* 1988;14(3-4):205-24.
- [96] Guggenheim B, Giertsen E, Schupbach P, Shapiro S. Validation of an in vitro biofilm model of supragingival plaque. *J Dent Res* 2001 Jan;80(1):363-70.
- [97] Guggenheim B, Guggenheim M, Gmur R, Giertsen E, Thurnheer T. Application of the Zurich biofilm model to problems of cariology. *Caries Res* 2004 May;38(3):212-22.
- [98] Haapasalo HK, Siren EK, Waltimo TM, Orstavik D, Haapasalo MP. Inactivation of local root canal medicaments by dentine: an in vitro study. *Int Endod J* 2000 Mar;33(2):126-31.
- [99] Haapasalo M, Orstavik D. In vitro infection and disinfection of dentinal tubules. *J Dent Res* 1987 Aug;66(8):1375-9.
- [100] Haapasalo M, Ranta H, Ranta KT. Facultative gram-negative enteric rods in persistent periapical infections. *Acta Odontol Scand* 1983;41(1):19-22.
- [101] Hancock HH, III, Sigurdsson A, Trope M, Moiseiwitsch J. Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North American population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001 May;91(5):579-86.
- [102] Hannig C, Hannig M, Rehmer O, Braun G, Hellwig E, Al-Ahmad A. Fluorescence microscopic visualization and quantification of initial bacterial colonization on enamel in situ. *Arch Oral Biol* 2007 Nov;52(11):1048-56.
- [103] Hannig M, Joiner A. The structure, function and properties of the acquired pellicle. *Monogr Oral Sci* 2006;19:29-64.

- [104] Hardie KR, Heurlier K. Establishing bacterial communities by 'word of mouth': LuxS and autoinducer 2 in biofilm development. *Nat Rev Microbiol* 2008 Aug;6(8):635-43.
- [105] Harriott MM, Noverr MC. *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* form polymicrobial biofilms: effects on antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2009 Sep;53(9):3914-22.
- [106] Havarstein LS, Hakenbeck R, Gaustad P. Natural competence in the genus *Streptococcus*: evidence that streptococci can change phenotype by interspecies recombinational exchanges. *J Bacteriol* 1997 Nov;179(21):6589-94.
- [107] Heersink J, Goerres D. Reactor design considerations. In: Hamilton, M., Heersink, J., Buckingham-Meyer, K., Goeres, D. (Eds.), *The Biofilm Laboratory: Step by Step. Protocols for Experimental Design, Analysis, and Data Interpretation* 2011.
- [108] Hellstrom MK, Ramberg P, Krok L, Lindhe J. The effect of supragingival plaque control on the subgingival microflora in human periodontitis. *J Clin Periodontol* 1996 Oct;23(10):934-40.
- [109] Henssge U, Do T, Radford DR, Gilbert SC, Clark D, Beighton D. Emended description of *Actinomyces naeslundii* and descriptions of *Actinomyces oris* sp. nov. and *Actinomyces johnsonii* sp. nov., previously identified as *Actinomyces naeslundii* genospecies 1, 2 and WVA 963. *Int J Syst Evol Microbiol* 2009 Mar;59(Pt 3):509-16.
- [110] Herles S, Olsen S, Afflitto J, Gaffar A. Chemostat flow cell system: an in vitro model for the evaluation of antiplaque agents. *J Dent Res* 1994 Nov;73(11):1748-55.
- [111] Hill GB. Preterm birth: associations with genital and possibly oral microflora. *Ann Periodontol* 1998 Jul;3(1):222-32.
- [112] Hillier SL, Krohn MA, Rabe LK, Klebanoff SJ, Eschenbach DA. The normal vaginal flora, H₂O₂-producing lactobacilli, and bacterial vaginosis in pregnant women. *Clin Infect Dis* 1993 Jun;16 Suppl 4:S273-S281.
- [113] Hoiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents* 2010 Apr;35(4):322-32.
- [114] Hope CK, Wilson M. Analysis of the effects of chlorhexidine on oral biofilm vitality and structure based on viability profiling and an indicator of membrane integrity. *Antimicrob Agents Chemother* 2004 May;48(5):1461-8.
- [115] Houari A, Di MP. Effect of chlorhexidine and benzalkonium chloride on bacterial biofilm formation. *Lett Appl Microbiol* 2007 Dec;45(6):652-6.
- [116] Hoyle BD, Alcantara J, Costerton JW. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm as a diffusion barrier to piperacillin. *Antimicrob Agents Chemother* 1992 Sep;36(9):2054-6.

- [117] Hubble TS, Hatton JF, Nallapareddy SR, Murray BE, Gillespie MJ. Influence of *Enterococcus faecalis* proteases and the collagen-binding protein, Ace, on adhesion to dentin. *Oral Microbiol Immunol* 2003 Apr;18(2):121-6.
- [118] Irie Y, Parsek MR. Quorum sensing and microbial biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol* 2008;322:67-84.
- [119] Johnson JL, Moore LV, Kaneko B, Moore WE. *Actinomyces georgiae* sp. nov., *Actinomyces gerencseriae* sp. nov., designation of two genospecies of *Actinomyces naeslundii*, and inclusion of *A. naeslundii* serotypes II and III and *Actinomyces viscosus* serotype II in *A. naeslundii* genospecies 2. *Int J Syst Bacteriol* 1990 Jul;40(3):273-86.
- [120] Kapatral V, Anderson I, Ivanova N, Reznik G, Los T, Lykidis A, et al. Genome sequence and analysis of the oral bacterium *Fusobacterium nucleatum* strain ATCC 25586. *J Bacteriol* 2002 Apr;184(7):2005-18.
- [121] Kayaoglu G, Erten H, Orstavik D. Growth at high pH increases *Enterococcus faecalis* adhesion to collagen. *Int Endod J* 2005 Jun;38(6):389-96.
- [122] Keevil CW, Williamson MI, Marsh PD, Ellwood DC. Evidence that glucose and sucrose uptake in oral streptococcal bacteria involves independent phosphotransferase and proton-motive force-mediated mechanisms. *Arch Oral Biol* 1984;29(11):871-8.
- [123] Keijser BJ, Zaura E, Huse SM, van der V, Schuren FH, Montijn RC, et al. Pyrosequencing analysis of the oral microflora of healthy adults. *J Dent Res* 2008 Nov;87(11):1016-20.
- [124] Kilian M, Larsen MJ, Fejerskov O, Thylstrup A. Effects of fluoride on the initial colonization of teeth in vivo. *Caries Res* 1979;13(6):319-29.
- [125] Kirkbride CA, Gates CE, Libal MC. Ovine and bovine abortion associated with *Fusobacterium nucleatum*. *J Vet Diagn Invest* 1989 Jul;1(3):272-3.
- [126] Kolenbrander PE. Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems. *Annu Rev Microbiol* 2000;54:413-37.
- [127] Kolenbrander PE, Andersen RN, Blehert DS, Eglund PG, Foster JS, Palmer RJ, Jr. Communication among oral bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 2002 Sep;66(3):486-505, table.
- [128] Kolenbrander PE, Andersen RN, Moore LV. Coaggregation of *Fusobacterium nucleatum*, *Selenomonas flueggei*, *Selenomonas infelix*, *Selenomonas noxia*, and *Selenomonas sputigena* with strains from 11 genera of oral bacteria. *Infect Immun* 1989 Oct;57(10):3194-203.
- [129] Kolenbrander PE, London J. Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. *J Bacteriol* 1993 Jun;175(11):3247-52.
- [130] Kolenbrander PE, Palmer RJ, Jr., Rickard AH, Jakubovics NS, Chalmers NI, Diaz PI. Bacterial interactions and successions during plaque development. *Periodontol* 2000 2006;42:47-79.

- [131] Komorowski R, Grad H, Wu XY, Friedman S. Antimicrobial substantivity of chlorhexidine-treated bovine root dentin. *J Endod* 2000 Jun;26(6):315-7.
- [132] Kristich CJ, Li YH, Cvitkovitch DG, Dunny GM. Esp-independent biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol* 2004 Jan;186(1):154-63.
- [133] Krom BP, Cohen JB, Elhaney Feser GE, Cihlar RL. Optimized candidal biofilm microtiter assay. *J Microbiol Methods* 2007 Feb;68(2):421-3.
- [134] Lacey J. Ecology of actinomycetes in fodder and related substrates, p. 161-168. In: M. Mordarski, W. Kurylowicz and J. Jeljaszewicz (ed.), *Nocardia and Streptomyces: proceedings of international symposium on Nocardia and Streptomyces*, Warsaw. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart; 1976.
- [135] Larsen T, Fiehn NE. Development of a flow method for susceptibility testing of oral biofilms in vitro. *APMIS* 1995 May;103(5):339-44.
- [136] Lewis K. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2001 Apr;45(4):999-1007.
- [137] Li J, Helmerhorst EJ, Leone CW, Troxler RF, Yaskell T, Haffajee AD, et al. Identification of early microbial colonizers in human dental biofilm. *J Appl Microbiol* 2004;97(6):1311-8.
- [138] Li YH, Lau PC, Lee JH, Ellen RP, Cvitkovitch DG. Natural genetic transformation of *Streptococcus mutans* growing in biofilms. *J Bacteriol* 2001 Feb;183(3):897-908.
- [139] Linde A, Goldberg M. Dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993;4(5):679-728.
- [140] Lindh L. On the adsorption behaviour of saliva and purified salivary proteins at solid/liquid interfaces. *Swed Dent J Suppl* 2002;(152):1-57.
- [141] Love RM. *Enterococcus faecalis*--a mechanism for its role in endodontic failure. *Int Endod J* 2001 Jul;34(5):399-405.
- [142] Mah TF, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol* 2001 Jan;9(1):34-9.
- [143] Main C, Geddes DA, McNee SG, Collins WJ, Smith DC, Weetman DA. Instrumentation for measurement of dental plaque thickness in situ. *J Biomed Eng* 1984 Apr;6(2):151-4.
- [144] Maisch T, Wagner J, Papastamou V, Nerl HJ, Hiller KA, Szeimies RM, et al. Combination of 10% EDTA, Photosan, and a blue light hand-held photopolymerizer to inactivate leading oral bacteria in dentistry in vitro. *J Appl Microbiol* 2009 Nov;107(5):1569-78.
- [145] Mandel ID. Dental caries. *Am Sci* 1979 Nov;67(6):680-8.
- [146] Marrie TJ, Costerton JW. Prolonged survival of *Serratia marcescens* in chlorhexidine. *Appl Environ Microbiol* 1981 Dec;42(6):1093-102.

- [147] Marsh PD. Controlling the oral biofilm with antimicrobials. *J Dent* 2010 Jun;38 Suppl 1:S11-S15.
- [148] Marsh PD. Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life-style. *J Clin Periodontol* 2005;32 Suppl 6:7-15.
- [149] Marsh PD. Microbiologic aspects of dental plaque and dental caries. *Dent Clin North Am* 1999 Oct;43(4):599-vi.
- [150] Marsh PD, Bradshaw DJ. Dental plaque as a biofilm
16. *J Ind Microbiol* 1995 Sep;15(3):169-75.
- [151] Marsh PD, Martin MV. *Oral microbiology*. Churchill Livingstone Elsevier; 1999.
- [152] Marshall KC. *Interfaces in microbial ecology*. Harvard University Press, Cambridge, Mass 1976;44-7.
- [153] McNee SG, Geddes DA, Weetman DA. Diffusion of sugars and acids in human dental plaque in vitro. *Arch Oral Biol* 1982;27(11):975-9.
- [154] McNee SG, Geddes DA, Weetman DA, Sweeney D, Beeley JA. Effect of extracellular polysaccharides on diffusion of NaF and [14C]-sucrose in human dental plaque and in sediments of the bacterium *Streptococcus sanguis* 804 (NCTC 10904). *Arch Oral Biol* 1982;27(11):981-6.
- [155] Meisel P, Kocher T. Photodynamic therapy for periodontal diseases: state of the art. *J Photochem Photobiol B* 2005 May 13;79(2):159-70.
- [156] Miller MB, Bassler BL. Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol* 2001;55:165-99.
- [157] Molander A, Reit C, Dahlen G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 1998 Jan;31(1):1-7.
- [158] Moore WE, Moore LV. The bacteria of periodontal diseases. *Periodontol* 2000 1994 Jun;5:66-77.
- [159] Murray BE. The life and times of the *Enterococcus*. *Clin Microbiol Rev* 1990 Jan;3(1):46-65.
- [160] Musk DJ, Jr., Hergenrother PJ. Chemical countermeasures for the control of bacterial biofilms: effective compounds and promising targets. *Curr Med Chem* 2006;13(18):2163-77.
- [161] Nair PN, Henry S, Cano V, Vera J. Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after "one-visit" endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005 Feb;99(2):231-52.
- [162] Nallapareddy SR, Qin X, Weinstock GM, Hook M, Murray BE. *Enterococcus faecalis* adhesin, ace, mediates attachment to extracellular matrix proteins collagen type IV and laminin as well as collagen type I. *Infect Immun* 2000 Sep;68(9):5218-24.

- [163] Neu TR, Lawrence JR. Lectin-binding analysis in biofilm systems. *Methods Enzymol* 1999;310:145-52.
- [164] Nichols WW, Evans MJ, Slack MP, Walmsley HL. The penetration of antibiotics into aggregates of mucoid and non-mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *J Gen Microbiol* 1989 May;135(5):1291-303.
- [165] Nyvad B, Fejerskov O. Transmission electron microscopy of early microbial colonization of human enamel and root surfaces in vivo. *Scand J Dent Res* 1987 Aug;95(4):297-307.
- [166] Nyvad B, Kilian M. Comparison of the initial streptococcal microflora on dental enamel in caries-active and in caries-inactive individuals. *Caries Res* 1990;24(4):267-72.
- [167] Nyvad B, Kilian M. Microbiology of the early colonization of human enamel and root surfaces in vivo. *Scand J Dent Res* 1987 Oct;95(5):369-80.
- [168] Ohara P, Torabinejad M, Kettering JD. Antibacterial effects of various endodontic medicaments on selected anaerobic bacteria. *J Endod* 1993 Oct;19(10):498-500.
- [169] Okte E, Sultan N, Dogan B, Asikainen S. Bacterial adhesion of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes to titanium implants: SEM evaluation. A preliminary report. *J Periodontol* 1999 Nov;70(11):1376-82.
- [170] Orstavik D, Haapasalo M. Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. *Endod Dent Traumatol* 1990 Aug;6(4):142-9.
- [171] Peeters E, Nelis HJ, Coenye T. Resistance of planktonic and biofilm-grown *Burkholderia cepacia* complex isolates to the transition metal gallium. *J Antimicrob Chemother* 2008 May;61(5):1062-5.
- [172] Periasamy S, Kolenbrander PE. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* builds mutualistic biofilm communities with *Fusobacterium nucleatum* and *Veillonella* species in saliva. *Infect Immun* 2009 Sep;77(9):3542-51.
- [173] Periasamy S, Kolenbrander PE. Mutualistic biofilm communities develop with *Porphyromonas gingivalis* and initial, early, and late colonizers of enamel. *J Bacteriol* 2009 Nov;191(22):6804-11.
- [174] Petersen FC, Tao L, Scheie AA. DNA binding-uptake system: a link between cell-to-cell communication and biofilm formation. *J Bacteriol* 2005 Jul;187(13):4392-400.
- [175] Pitt WG, McBride MO, Barton AJ, Sagers RD. Air-water interface displaces adsorbed bacteria. *Biomaterials* 1993 Jul;14(8):605-8.
- [176] Pollock JJ, Katona LI, Goodman H, Cho MI, Iacono VJ. Bacteriolysis of *Streptococcus mutans* BHT by lysozyme and inorganic anions normally present in human saliva. *Arch Oral Biol* 1981;26(9):711-6.

- [177] Portenier I, Waltimo T, Orstavik D, Haapasalo M. The susceptibility of starved, stationary phase, and growing cells of *Enterococcus faecalis* to endodontic medicaments. *J Endod* 2005 May;31(5):380-6.
- [178] Potera C. Forging a link between biofilms and disease. *Science* 1999 Mar 19;283(5409):1837, 1839.
- [179] Pratten J, Smith AW, Wilson M. Response of single species biofilms and microcosm dental plaques to pulsing with chlorhexidine. *J Antimicrob Chemother* 1998 Oct;42(4):453-9.
- [180] Pratten J, Wills K, Barnett P, Wilson M. In vitro studies of the effect of antiseptic-containing mouthwashes on the formation and viability of *Streptococcus sanguis* biofilms. - *J Appl Microbiol* 1998 Jun;84(6):1149-55 1998;(- 1364-5072 (Print)).
- [181] Pratten J, Wilson M, Spratt DA. Characterization of in vitro oral bacterial biofilms by traditional and molecular methods. *Oral Microbiol Immunol* 2003 Feb;18(1):45-9.
- [182] Pusateri CR, Monaco EA, Edgerton M. Sensitivity of *Candida albicans* biofilm cells grown on denture acrylic to antifungal proteins and chlorhexidine. *Arch Oral Biol* 2009 Jun;54(6):588-94.
- [183] Quirynen M, Bollen CM. The influence of surface roughness and surface-free energy on supra- and subgingival plaque formation in man. A review of the literature. *J Clin Periodontol* 1995 Jan;22(1):1-14.
- [184] Ramage G, Vande WK, Wickes BL, Lopez-Ribot JL. Standardized method for in vitro antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 2001 Sep;45(9):2475-9.
- [185] Reese S, Guggenheim B. A novel TEM contrasting technique for extracellular polysaccharides in in vitro biofilms. *Microsc Res Tech* 2007 Sep;70(9):816-22.
- [186] Rich RL, Kreikemeyer B, Owens RT, LaBrenz S, Narayana SV, Weinstock GM, et al. Ace is a collagen-binding MSCRAMM from *Enterococcus faecalis* 1. *J Biol Chem* 1999 Sep 17;274(38):26939-45.
- [187] Rickard AH, Gilbert P, High NJ, Kolenbrander PE, Handley PS. Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. *Trends Microbiol* 2003 Feb;11(2):94-100.
- [188] Ritz HL. Microbial population shifts in developing human dental plaque. *Arch Oral Biol* 1967 Dec;12(12):1561-8.
- [189] Rocas IN, Siqueira JF, Jr., Santos KR. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod* 2004 May;30(5):315-20.
- [190] Romani AM, Fund K, Artigas J, Schwartz T, Sabater S, Obst U. Relevance of polymeric matrix enzymes during biofilm formation. *Microb Ecol* 2008 Oct;56(3):427-36.

- [191] Rosan B, Lamont RJ. Dental plaque formation. *Microbes Infect* 2000 Nov;2(13):1599-607.
- [192] Rozdzinski E, Marre R, Susa M, Wirth R, Muscholl-Silberhorn A. Aggregation substance-mediated adherence of *Enterococcus faecalis* to immobilized extracellular matrix proteins. *Microb Pathog* 2001 Apr;30(4):211-20.
- [193] Russell AD. Biocide use and antibiotic resistance: the relevance of laboratory findings to clinical and environmental situations. *Lancet Infect Dis* 2003 Dec;3(12):794-803.
- [194] Samaranayake LP. *Essential microbiology for dentistry*. 3rd edition ed. Elsevier Sciences; 2006.
- [195] Sanchez MC, Llama-Palacios A, Blanc V, Leon R, Herrera D, Sanz M. Structure, viability and bacterial kinetics of an in vitro biofilm model using six bacteria from the subgingival microbiota. *J Periodontal Res* 2011 Apr;46(2):252-60.
- [196] Sandoe JA, Witherden IR, Cove JH, Heritage J, Wilcox MH. Correlation between enterococcal biofilm formation in vitro and medical-device-related infection potential in vivo. *J Med Microbiol* 2003 Jul;52(Pt 7):547-50.
- [197] Scheie AA. Mechanisms of dental plaque formation. *Adv Dent Res* 1994 Jul;8(2):246-53.
- [198] Scheie AA, Petersen FC. Antimicrobials in caries control. In: Fejerskov O, Kield E, editors. *Dental caries. The Disease and its clinical Management*. Wiley-Blackwell Munksgaard; 2008.
- [199] Sela MN, Badihi L, Rosen G, Steinberg D, Kohavi D. Adsorption of human plasma proteins to modified titanium surfaces. *Clin Oral Implants Res* 2007 Oct;18(5):630-8.
- [200] Selbitz H.J. *Lehrbuch der Veterinärmedizinischen Bakteriologie*. Gustav-Fischer-Verlag; 1992.
- [201] Sena NT, Gomes BP, Vianna ME, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, et al. In vitro antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine against selected single-species biofilms. *Int Endod J* 2006 Nov;39(11):878-85.
- [202] Shellis RP. A synthetic saliva for cultural studies of dental plaque. - *Arch Oral Biol* 1978;23(6):485-9 1978;(- 0003-9969 (Print)).
- [203] Shen Y, Stojicic S, Haapasalo M. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine against bacteria in biofilms at different stages of development. *J Endod* 2011 May;37(5):657-61.
- [204] Sherman JM. THE STREPTOCOCCI. *Bacteriol Rev* 1937 Dec;1(1):3-97.
- [205] Shigeta M, Tanaka G, Komatsuzawa H, Sugai M, Suginaka H, Usui T. Permeation of antimicrobial agents through *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: a simple method. *Chemotherapy* 1997 Sep;43(5):340-5.

- [206] Shuping GB, Orstavik D, Sigurdsson A, Trope M. Reduction of intracanal bacteria using nickel-titanium rotary instrumentation and various medications. *J Endod* 2000 Dec;26(12):751-5.
- [207] Signat B, Roques C, Poulet P, Duffaut D. *Fusobacterium nucleatum* in Periodontal Health and Disease. *Curr Issues Mol Biol* 2011 Jan 10;13(2):25-36.
- [208] Simmonds RS, Tompkins GR, George RJ. Dental caries and the microbial ecology of dental plaque: a review of recent advances. *N Z Dent J* 2000 Jun;96(424):44-9.
- [209] Siqueira JF, Jr. Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. *Int Endod J* 2001 Jan;34(1):1-10.
- [210] Siqueira JF, Jr., Rocas IN, Souto R, de UM, Colombo AP. Actinomyces species, streptococci, and Enterococcus faecalis in primary root canal infections. - *J Endod* 2002 Mar;28(3):168-72 2002;(- 0099-2399 (Print)).
- [211] Sissons CH, Cutress TW, Hoffman MP, Wakefield JS. A multi-station dental plaque microcosm (artificial mouth) for the study of plaque growth, metabolism, pH, and mineralization. *J Dent Res* 1991 Nov;70(11):1409-16.
- [212] Sjogren U, Figdor D, Persson S, Sundqvist G. Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 1997 Sep;30(5):297-306.
- [213] Slots J. Primer for antimicrobial periodontal therapy. *J Periodontal Res* 2000 Apr;35(2):108-14.
- [214] Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL, Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1998 Feb;25(2):134-44.
- [215] Socransky SS, Manganiello AD, Propas D, Oram V, van HJ. Bacteriological studies of developing supragingival dental plaque. *J Periodontal Res* 1977 Mar;12(2):90-106.
- [216] Spoering AL, Lewis K. Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials. *J Bacteriol* 2001 Dec;183(23):6746-51.
- [217] Stanley NR, Lazazzera BA. Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation. *Mol Microbiol* 2004 May;52(4):917-24.
- [218] Steinberger RE, Holden PA. Extracellular DNA in single- and multiple-species unsaturated biofilms. *Appl Environ Microbiol* 2005 Sep;71(9):5404-10.
- [219] Stepanovic S, Djukic N, Djordjevic V, Djukic S. Influence of the incubation atmosphere on the production of biofilm by staphylococci. *Clin Microbiol Infect* 2003 Sep;9(9):955-8.
- [220] Stewart PS. Theoretical aspects of antibiotic diffusion into microbial biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 1996 Nov;40(11):2517-22.

- [221] Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 2001 Jul 14;358(9276):135-8.
- [222] Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol* 2002;56:187-209.
- [223] Stoodley P, Wilson S, Hall-Stoodley L, Boyle JD, Lappin-Scott HM, Costerton JW. Growth and detachment of cell clusters from mature mixed-species biofilms. *Appl Environ Microbiol* 2001 Dec;67(12):5608-13.
- [224] Suci PA, Mittelman MW, Yu FP, Geesey GG. Investigation of ciprofloxacin penetration into *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 1994 Sep;38(9):2125-33.
- [225] Sundqvist G. Ecology of the root canal flora. *J Endod* 1992 Sep;18(9):427-30.
- [226] Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjogren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998 Jan;85(1):86-93.
- [227] Suntharalingam P, Cvitkovitch DG. Quorum sensing in streptococcal biofilm formation. *Trends Microbiol* 2005 Jan;13(1):3-6.
- [228] Sutherland I. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology* 2001 Jan;147(Pt 1):3-9.
- [229] Sutherland IW. The biofilm matrix--an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol* 2001 May;9(5):222-7.
- [230] Svensäter G, Bergenholtz G. Biofilms in endodontic infections. *Endodontic Topics* 2004;9:27-36.
- [231] Syed SA, Loesche WJ. Bacteriology of human experimental gingivitis: effect of plaque ages. *Infect Immun* 1978 Sep;21(3):821-9.
- [232] Takahashi N, Kalfas S, Yamada T. Phosphorylating enzymes involved in glucose fermentation of *Actinomyces naeslundii*. *J Bacteriol* 1995 Oct;177(20):5806-11.
- [233] Takahashi N, Yamada T. Catabolic pathway for aerobic degradation of lactate by *Actinomyces naeslundii*. *Oral Microbiol Immunol* 1996 Jun;11(3):193-8.
- [234] Tanzer JM, Grant L, Thompson A, Li L, Rogers JD, Haase EM, et al. Amylase-binding proteins A (AbpA) and B (AbpB) differentially affect colonization of rats' teeth by *Streptococcus gordonii*. *Microbiology* 2003 Sep;149(Pt 9):2653-60.
- [235] Thiercelin E., Jouhaud L. Reproduction de l'entérocoque; taches centrales; granulations peripheriques et microblastes. *Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie Paris* 1903;(55):686-8.

- [236] Thrower Y, Pinney RJ, Wilson M. Susceptibilities of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* biofilms to oral antiseptics. *J Med Microbiol* 1997 May;46(5):425-9.
- [237] Toledo-Arana A, Valle J, Solano C, Arrizubieta MJ, Cucarella C, Lamata M, et al. The enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol* 2001 Oct;67(10):4538-45.
- [238] Tonetti M. The topical use of antibiotics in periodontal pockets. In Lang NP, Karring T (eds) *Proceedings of the 2nd European workshop on Periodontology chemicals*. Quintessenz, Berlin; 1997.
- [239] Tuomanen E, Cozens R, Tosch W, Zak O, Tomasz A. The rate of killing of *Escherichia coli* by beta-lactam antibiotics is strictly proportional to the rate of bacterial growth. *J Gen Microbiol* 1986 May;132(5):1297-304.
- [240] van der Hoeven JS, van den Kieboom CW. Oxygen-dependent lactate utilization by *Actinomyces viscosus* and *Actinomyces naeslundii*. *Oral Microbiol Immunol* 1990 Aug;5(4):223-5.
- [241] Vassilakos N, Arnebrant T, Glantz PO. Adsorption of whole saliva onto hydrophilic and hydrophobic solid surfaces: influence of concentration, ionic strength and pH. *Scand J Dent Res* 1992 Dec;100(6):346-53.
- [242] Vassilakos N, Rundegren J, Arnebrant T, Glantz PO. Adsorption from salivary fractions at solid/liquid and air/liquid interfaces. *Arch Oral Biol* 1992;37(7):549-57.
- [243] Vickerman MM, Clewell DB, Jones GW. Sucrose-promoted accumulation of growing glucosyltransferase variants of *Streptococcus gordonii* on hydroxyapatite surfaces. *Infect Immun* 1991 Oct;59(10):3523-30.
- [244] Vickerman MM, Jones GW. Sucrose-dependent accumulation of oral streptococci and their adhesion-defective mutants on saliva-coated hydroxyapatite. *Oral Microbiol Immunol* 1995 Jun;10(3):175-82.
- [245] Vitkov L, Hermann A, Krautgartner WD, Herrmann M, Fuchs K, Klappacher M, et al. Chlorhexidine-induced ultrastructural alterations in oral biofilm. *Microsc Res Tech* 2005 Oct;68(2):85-9.
- [246] Wecke J, Kersten T, Madela K, Moter A, Gobel UB, Friedmann A, et al. A novel technique for monitoring the development of bacterial biofilms in human periodontal pockets. *FEMS Microbiol Lett* 2000 Oct 1;191(1):95-101.
- [247] Whitchurch CB, Tolker-Nielsen T, Ragas PC, Mattick JS. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science* 2002 Feb 22;295(5559):1487.
- [248] Whittaker CJ, Klier CM, Kolenbrander PE. Mechanisms of adhesion by oral bacteria. *Annu Rev Microbiol* 1996;50:513-52.
- [249] Williams ST. Streptomycetes in the soil ecosystem, p.137-142. In M Mordarski, W. Kurylowicz, and J. Jeljaszewicz (ed.), *Nocardia and*

Streptomyces: proceedings of the international symposium on Nocardia and Streptomyces. Warsaw. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart; 1976.

- [250] Wilson M. Susceptibility of oral bacterial biofilms to antimicrobial agents. *J Med Microbiol* 1996 Feb;44(2):79-87.
- [251] Wimpenny J, Manz W, Szewzyk U. Heterogeneity in biofilms. *FEMS Microbiol Rev* 2000 Dec;24(5):661-71.
- [252] Wimpenny JW. Responses of microorganisms to physical and chemical gradients. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1982 Jun 11;297(1088):497-515.
- [253] Wimpenny JW. The validity of models. *Adv Dent Res* 1997 Apr;11(1):150-9.
- [254] Wong L, Sissons C. A comparison of human dental plaque microcosm biofilms grown in an undefined medium and a chemically defined artificial saliva. - *Arch Oral Biol* 2001 Jun;46(6):477-86 2001;(- 0003-9969 (Print)).
- [255] Wood SR, Kirkham J, Marsh PD, Shore RC, Nattress B, Robinson C. Architecture of intact natural human plaque biofilms studied by confocal laser scanning microscopy. *J Dent Res* 2000 Jan;79(1):21-7.
- [256] Wood SR, Kirkham J, Shore RC, Brookes SJ, Robinson C. Changes in the structure and density of oral plaque biofilms with increasing plaque age. *FEMS Microbiol Ecol* 2002 Mar 1;39(3):239-44.
- [257] Xiao J, Hook M, Weinstock GM, Murray BE. Conditional adherence of *Enterococcus faecalis* to extracellular matrix proteins. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1998 Aug;21(4):287-95.
- [258] Xie H, Cook GS, Costerton JW, Bruce G, Rose TM, Lamont RJ. Intergeneric communication in dental plaque biofilms. *J Bacteriol* 2000 Dec;182(24):7067-9.
- [259] Ximenez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. Microbial composition of supra- and subgingival plaque in subjects with adult periodontitis. *J Clin Periodontol* 2000 Oct;27(10):722-32.
- [260] Yaling L, Tao H, Jingyi Z, Xuedong Z. Characterization of the *Actinomyces naeslundii* ureolysis and its role in bacterial aciduricity and capacity to modulate pH homeostasis. *Microbiol Res* 2006;161(4):304-10.
- [261] Zahradnik RT. Modification by salivary pellicles of in vitro enamel remineralization. *J Dent Res* 1979 Nov;58(11):2066-73.
- [262] Zahradnik RT, Moreno EC, Burke EJ. Effect of salivary pellicle on enamel subsurface demineralization in vitro. *J Dent Res* 1976 Jul;55(4):664-70.
- [263] Zahradnik RT, Propas D, Moreno EC. Effect of salivary pellicle formation time on in vitro attachment and demineralization by *Streptococcus mutans*. *J Dent Res* 1978 Nov;57(11-12):1036-42.

- [264] Zareba TW, Pascu C, Hryniewicz W, Wadstrom T. Binding of enterococci to extracellular matrix proteins. *Adv Exp Med Biol* 1997;418:721-3.
- [265] Zaura-Arite E, van MJ, Ten Cate JM. Conofocal microscopy study of undisturbed and chlorhexidine-treated dental biofilm. *J Dent Res* 2001 May;80(5):1436-40.