

Lebendbestimmung kariogener Bakterien mittels Fluoresceindiacetat*)

Von L. Netuschil und G. Schmalz, Tübingen**)

Die Untersuchung der oralen Mikroflora ist wegen des speziellen ökologischen Milieus je nach Fragestellung kompliziert und – auf Grund der Züchtungsproblematik – zeitraubend.

Es wurde deshalb versucht, einen in der Zellbiologie bekannten Schnelltest zur Lebendzellbestimmung auf kariogene Mundhöhlenbakterien anzuwenden. Dabei zeigte sich, daß auch diese Mikroorganismen anfärbbar sind und daß diese Eigenschaft an den aktiven Zellstoffwechsel der Bakterien gebunden ist.

Zahnmedizinische Problematik

Aus dem weiten Spektrum mikrobiologischer Fragestellungen sollen im folgenden einige exemplarisch herausgestellt werden.

Kariesätiologie

Obwohl die entscheidende Rolle der Mikroorganismen im Rahmen der Kariesätiologie seit fast 100 Jahren bekannt ist (Miller 1889, 1890), werden spezielle Aspekte erst in neuester Zeit wieder diskutiert und sind im einzelnen noch ungeklärt. Insbesondere das komplexe Wechselspiel verschiedener Mikroorganismengruppen innerhalb der Plaque, an verschiedenen Stellen der Zähne und unter verschiedenen Ernährungsbedingungen ist weitgehend ungeklärt (Menaker 1980, Newbrun 1978, Schmalz 1979, van Houte 1980). Auf die Problematik bei der Züchtung der Plaque-Mikroflora wurde kürzlich hingewiesen (Netuschil et al. 1981).

Untersuchung zahnärztlicher Werkstoffe

Bei der notwendigen Untersuchung in der Zahnmedizin angewandter Chemikalien und Werkstoffe (Schmalz 1981) auf ihre biologische Verträglichkeit – als Grundvoraussetzung für ihre medizinische Anwendung überhaupt – ist auch deren Einfluß auf die orale Mikroflora von Bedeutung (Finster und Riethe 1963, Schmalz und Rotgans 1977). So können beispielsweise neben toxischen auch das Bakterienwachstum fördernde Eigenschaften zahnärztlicher Materialien nachgewiesen werden, die am Patienten zu einer Gewebeschädigung führen können (Schmalz 1977a, b).

Fissurenversiegelung

Der Erfolg kariesprophylaktischer Maßnahmen, wie sie die Fissurenversiegelung darstellt, wird u. a. an ihrem Einfluß auf die kariogene Mikroflora gemessen. Trotz unbestreitbarer Langzeiterfolge scheint es, als ob manche Mikroorganismen der kariogenen Fissurenflora die Versiegelung zu überleben vermögen (Fellner 1981, Lutz und Schneider 1978, Netuschil 1981, Riethe 1980 u. a.). Die vorliegenden bakteriologischen Daten müßten bezüglich einzelner Mikroorganismengruppen noch abgesichert werden.

Fluorochromierung von Mikroorganismen

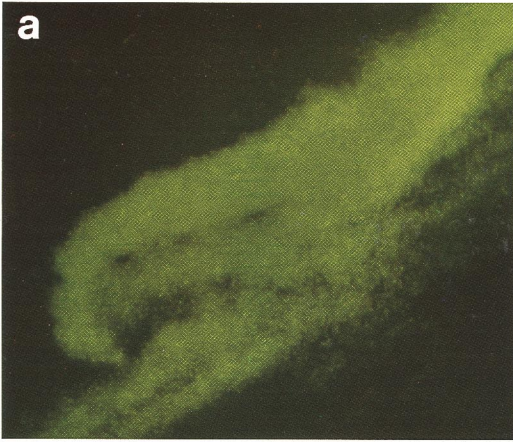
Auf all den angesprochenen Gebieten ist eine sichere, das heißt von äußeren Bedingungen möglichst unabhängige und schnelle Lebendbestimmung der untersuchten Mikroorganismen von grundlegender Bedeutung.

Fluoreszenzfarbstoffe

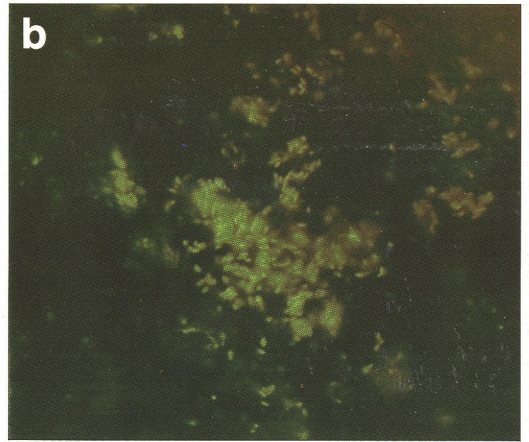
An Versuchen, Zellen anzufärben, um ihre Lebensfähigkeit schnell nachweisen zu können,

*) Herrn Prof. Dr. Dr. Peter Riethe zum 60. Geburtstag gewidmet

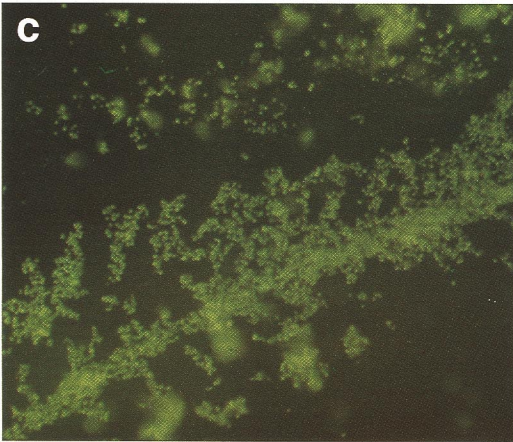
**) Dipl.-Biochem. L. Netuschil und Priv.-Doz. Dr. G. Schmalz, Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der Universität Tübingen, Abt. für Zahnerhaltung, Osianderstraße 2–8, 7400 Tübingen



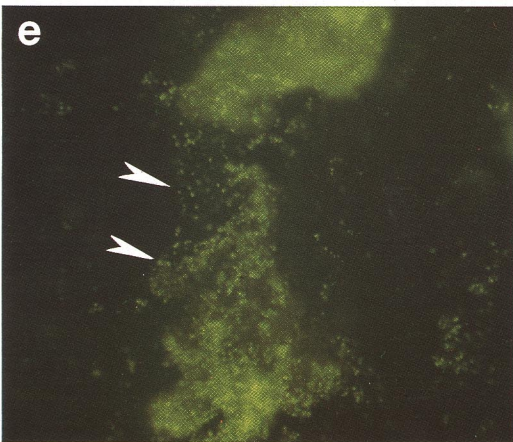
a: *Actinomyces viscosus*, 3 Tage alte Kultur



b: *Lactobacillus casei*, 4 Tage alte Kultur



c, d: *Streptococcus mutans*, 2 Tage alte Kultur, Fluoreszenz- und Phasenkontrastaufnahme derselben Stelle



e, f: wie c, d, aber mit *S. salivarius*, ebenfalls 2 Tage alte Kultur. Die hellen Flecken in den Fluoreszenzaufnahmen c, e, rühren von Bakterien her, die in einer anderen Ebene liegen. Die Pfeile weisen auf Bakterien hin, die mit FDA nicht oder nur noch sehr schwach zur Fluoreszenz angeregt werden können.

Abb. 1: Fluoreszenz- und Phasenkontrastaufnahmen kariogener Mikroorganismen, Fluoreszenz-Anfärbung mit FDA. Vergrößerung 100fach, zur graphischen Reproduktion nochmals 2fach. Alle Fluoreszenzaufnahmen mit Filterblock K2 (470-490 nm) mit Ausnahme der Abb. 1b. Filterblock L2 (450-490 nm).

hat es in der Zellbiologie nicht gefehlt. Dementsprechend umfangreich ist die Zahl der Untersuchungen (Drawert 1968, Stockinger 1964), die meist auf den grundlegenden Arbeiten von Strugger (1941, 1949) basieren.

Der am meisten verwendete Fluoreszenzfarbstoff ist Acridinorange. Seine Anwendung wird einerseits propagiert (Schwartz et al. 1977, Trolldenier 1972), zum Beispiel in der Gewässer-Mikrobiologie (Jones and Simon 1975, Reichardt 1978, Zimmermann 1977). Andererseits wird von den Autoren selbst (Jones and Simon 1975, Schwartz et al. 1977, Trolldenier 1972) und anderen Untersuchern (Reichardt 1978, Ziegler et al. 1975) auf die komplizierte Methodik kritisch hingewiesen, vor allem weil die Indikation tot/lebend nur bei peinlichem Einhalten des methodischen Vorgehens sicher zu stellen ist.

Lebendzellnachweis mit Fluoresceindiacetat (FDA)

Ein grundsätzlich anderer Weg zur Fluoreszenzanfärbung lebender Zellen wurde von Rotman und Papermaster (1966) beschrieben: Sie setzten Fluoresceindiacetat (sowie andere Fluoresceinderivate) ein. Dieser Stoff fluoresziert selbst nicht, wird aber durch enzymatische Hydrolyse zu dem grün fluoreszierenden Fluorescein abgebaut. Die Autoren weisen nach, daß FDA von den Zellen aufgenommen wird und als einziges intrazelluläres Stoffwechselprodukt Fluorescein entsteht. Fluorescein wird von der Zelle gespeichert und ermöglicht so die Fluorochromasie. Andererseits wird extrazellulär angebotenes Fluorescein von den Zellen nicht aufgenommen (es sei denn bei auf das 10^4 -fache gesteigerter externer Konzentration); es kommt nicht zur Fluorochromasie. Diese Befunde und von den gleichen Autoren durchgeführte Vergleichsuntersuchungen mit anderen Fluoresceinverbindungen führen zu folgendem Modell: Die Fluoresceinester, also auch FDA, sind unpolare Substanzen. Sie werden durch die Zellmembran aufgenommen und von der stoffwechselaktiven Zelle enzymatisch zu Fluorescein hydrolysiert. Dieses ist polar und kann deshalb die intakte Zelle nicht verlassen – genauso wie extrazelluläres Fluorescein nicht aufgenommen wird. Folglich wird mehr Fluorescein in der Zelle gebildet als abgegeben werden kann, es kommt zur Anfärbung. Zudem weisen

Rotman und Papermaster (1966) nach, daß die Fluorochromasie an die Lebensfähigkeit der Zelle gebunden ist.

Ziegler und Mitarbeiter (1975) haben die Vital-Fluorochromierung mit FDA auf Mikroorganismen übertragen und kommen zu ähnlichen Ergebnissen.

Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, den Lebendzellnachweis mit Fluoresceindiacetat bei kariogenen Mikroorganismen anzuwenden, um diese schnelle und vergleichsweise einfache Nachweismethode auch bei der Lösung der einleitend erwähnten Fragenkomplexe einsetzen zu können.

Material und Methode

Mikroorganismen

Unser Dank gilt Herrn Prof. Dr. F. Gehring, Würzburg, der freundlicherweise die Referenzkulturen von *Actinomyces viscosus*, *Lactobacillus casei*, *Streptococcus mutans*, Typ d, sowie *Streptococcus salivarius* zur Verfügung stellte. *A. viscosus* und Streptokokken wurden auf Schaedler Agar mit Vitamin K₁ und 5 Prozent Schafblut (Becton Dickinson, Nr. 21539), *L. casei* auf Trypticase Soja Agar (Becton Dickinson, Nr. 21185) durch einfaches Überimpfen bei 37 Grad C anaerob (GasPak-System, Becton Dickinson) kultiviert. Das Alter der zur Fluoreszenzuntersuchung herangezogenen Kulturen betrug zwischen einem Tag und vier Tagen, die entsprechenden genaueren Angaben sind der Legende zu Abb. 1 zu entnehmen. Zur Hitzeinaktivierung wurde eine Flüssigkultur von *Streptococcus mutans* in »Schaedler Broth« (Becton Dickinson, Nr. 12191) sowie in »NIH Thioglycollate Broth« (Difco Laboratories, Nr. 0257-02-8) inokuliert und nach ca. 24 Stunden Wachstum 50 Minuten bei 121°C autoklaviert.

Mikroskopie

Routineuntersuchung ohne Photographie: Zeiss Standard mit Fluoreszenz-Auflichtkondensor IV FI, Reflektor 2 FL mit Interferenzbreitbandfilter, Filterkombination Grün-Anregung BP510-560/FT580/LP590 und Blau-Anregung BP450-490/FT510/LP520. Objektiv Plan 40/0.65, Okularvergrößerung 10x. Hg-Lampe 50 Watt.

Photographische Dokumentation: Leitz Orthoplan mit Aufsicht-Illuminator Ploemopak, Hg-Lampe 200 Watt. Für Phasenkontrast-Aufnahmen Kondensor-Stellung 3, für Fluoreszenzaufnahmen Blauanregung über Filterblock K2 oder L2, Charakteristika: BP 470-490/RKP 510/LP 515 bzw. BP 450-490/RKP 510/BP 525/20. Objektiv NPL Fluotar 60/1.00 Öl. Dieses Objektiv ist für Phasenkontrast-Aufnahmen nicht optimal, es wurde jedoch wegen des direkten Vergleichs Fluoreszenz/Phasenkontrast nicht gewechselt. Die Aufnahmen erfolgten über Vario-tubus und Vario-Orthomat zur automatischen Belichtungsmessung und Photographie. Die Gesamtvergrößerung für Diaaufnahmen (Kodak Ektachrom Tageslicht/ASA 200/24 DIN) war $50 \times 1,25 \times 5 \times 0,32 = 100$ fach. Die Belichtungszeiten wurden automatisch bestimmt und betragen auch bei der Fluoreszenz nicht über 2 Minuten.*)

Anfärbung mit Fluoresceindiaceetat

Mit Fluoresceindiaceetat (FDA) (Sigma, St. Louis, USA) wurde in Aceton eine Stammlösung (5 mg/ml) hergestellt und bei -20°C gelagert. Kurz vor Bedarf wird die Stammlösung 1:500 mit eiskalter PBS (Phosphat-gepufferte physiol. NaCl, pH 7,2) verdünnt. Die Bakterien werden auf Objektträgern ausgestrichen, sofort mit 2 μl FDA-PBS und ca. 10 Sekunden später mit reiner PBS überschichtet. Flüssigkulturen werden 1:1 mit FDA-PBS versetzt. Eine Betrachtung bzw. Photographie ist unmittelbar anschließend möglich.

Ergebnisse

Unsere Untersuchungen ergaben, daß sich auch die kariogenen Mikroorganismen-Stämme wie *Actinomyces viscosus*, *Lactobacillus casei*, *Streptococcus mutans* und *Streptococcus salivarius* mit FDA anfärben lassen (Abb. 1). Bei den Fluoreszenzaufnahmen von *Actinomyces viscosus* (3 Tage alte Kultur, Abb. 1a), *Strep-*

tococcus mutans (2 Tage alte Kultur, Abb. 1c) und *Streptococcus salivarius* (2 Tage alte Kultur, Abb. 1e) wurde zur Anregung Filterblock K2 (470-490 nm) benutzt. Zum Vergleich wurde eine 4 Tage alte Kultur von *Lactobacillus casei* (Abb. 1b) nach Anregung über Filterblock L2 (450-490 nm) photographiert. Auf Grund der kurzwelligen Anregung tritt die intensiv apfelgrüne Farbe der Fluorescein-Fluoreszenz deutlicher in Erscheinung. Die Fluoreszenz verblaßt jedoch während der Anregung dementsprechend schneller als bei Filterblock K2.

Die vergleichenden Fluoreszenz- und Phasenkontrast-Aufnahmen einer 2 Tage alten Kultur von *Streptococcus mutans* (Abb. 1c/1d) sind fast vollständig deckungsgleich, was bedeutet, daß sich annähernd 100 Prozent der Bakterien einfärben lassen. Demgegenüber sind bei einer ebenfalls 2 Tage alten Kultur von *Streptococcus salivarius* (Abb. 1e/1f) Teile des im Phasenkontrast sichtbaren Bakterienausstrichs bereits nicht mehr oder nur noch sehr schwach mit FDA anfärbbar (Pfeile). Bei *Streptococcus salivarius* verstärkt sich dieser Effekt, so daß nach 4 Tagen in Kultur die Keime nicht mehr fluoreszieren. Um nachzuprüfen, ob die Fähigkeit zur Fluorochromasie tatsächlich an die Stoffwechselaktivität lebender Zellen gebunden ist, wurde ein Teil einer Flüssigkultur von *Streptococcus mutans* autoklaviert. Wie erwartet, zeigten die autoklavierten Bakterien – im Gegensatz zu den nicht autoklavierten – keinerlei Fluoreszenz.

Diskussion

Die Fluorochromierung mit FDA wurde anfänglich nur für eukaryotische Zellen beschrieben (Rotman and Papermaster 1966). Die Übertragung des Testverfahrens auf Mikroorganismen erwies sich in der vorliegenden und anderen Arbeiten (Ziegler et al. 1975) als prinzipiell möglich. Jedoch wird auch hier über negative Ergebnisse (Babiuk and Paul 1970, Jones and Simon 1975, Söderström 1977) berichtet. Söderström (1977) spricht von »sehr kläglichen Ergebnissen«, Jones und Simon (1975) von unstimmgem bzw. wenig reproduzierbaren Resultaten bei quantitativen Untersuchungen. Nach Babiuk und Paul (1970) können über 4 Stunden alte

*) Für die Möglichkeit, die entsprechenden Geräte benutzen zu dürfen, möchten wir Herrn Prof. Dr. K. Botzenhart, Hygiene-Institut der Universität Tübingen, sowie Herrn OA Dr. Sönnichsen, Universitäts-Hautklinik, Tübingen, danken.

Kulturen nur noch ungenügend angefärbt werden. Dies steht im Widerspruch zu unseren Befunden, bei denen 1 bis 4 Tage alte Kulturen fluoreszenzgefärbt werden konnten. Eine Abhängigkeit von den Kulturbedingungen besteht allerdings in dem Sinn, daß ältere Kolonien die Fähigkeit zur Fluorochromasie allmählich verlieren. Dies veranschaulichen die Abbildungen 1e und 1f. Bei *Streptococcus salivarius* sind bereits am 2. Tag in Kultur Teile des Zellausstrichs nicht mehr mit FDA anfärbbar. Da sich aber junge Agarkulturen allgemein als gut fluoreszierend darstellen lassen, sollte dies bei weiteren Untersuchungen kein Problem darstellen.

Schrifttum

1. *Babiuk, L. A. and Paul, E. A.*: The use of fluorescein isothiocyanate in the determination of the bacterial biomass in grassland soil. *Canad. J. Microbiol.* 16, 57-62 (1970).
2. *Drawert, H.*: Vitalfärbung und Vitalfluorochromierung pflanzlicher Zellen und Gewebe. *Protoplasmatologia II D 3*. Springer, Wien, New York 1968.
3. *Fellner, U.*: Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen über die Versiegelung der Grübchen und Fissuren. *Med. Diss. Tübingen* 1981.
4. *Finster, W. und Rieth, P.*: Experimentelle und bakteriologische Untersuchungen an Kupferzementen. *Zahnärztl. Welt* 64, 340-344 (1963).
5. *Jones, J. G. and Simon, B. M.*: An investigation of errors in direct counts of aquatic bacteria by epifluorescence microscopy, with reference to a new method for dyeing membrane filters. *J. appl. Bact.* 39, 317-329 (1975).
6. *Lutz, F. und Schneider, P.*: Prophylaktische und therapeutische Versiegelungen. In: *Prophylaxe*. Ed. *Peters, S.*, S. 169-201. Quintessenz-Verlag, Berlin, Chicago, Rio de Janeiro, Tokio 1978.
7. *Menaker, L.*: The biologic basis of dental caries. Harper and Row, Publishers, Hagerstown 1980.
8. *Müller, W. D.*: Die Mikroorganismen der Mundhöhle. Thieme Leipzig 1889, und *Miller W. D.*: The microorganisms of the human mouth. The S. S. White Dental MFG. Co. 1890 bzw. Neuauflage S. Karger, Basel, München, Paris, London, New York, Sydney 1973.
9. *Netuschil, L.*: Mikroflora und Fissurenversiegelung. *Kariesprophylaxe* 3 (1981), im Druck.
10. *Netuschil, L., Michou, A.-M. und Rieth, P.*: Besteckungsmaterialien und Fremdauflagerungen. Vergleichende bakteriologische Untersuchungen. *Kariesprophylaxe* 3, 25-30 (1981).
11. *Newbrun, E.*: *Cariology*. The Williams and Wilkins Company, Baltimore 1978.
12. *Reichardt, W.*: Einführung in die Methoden der Gewässermikrobiologie. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York 1978.
13. *Rieth, P.*: Pro et contra Fissurenversiegelung. *Kariesprophylaxe* 2, 75-85 (1980).
14. *Rotman, B. and Papermaster, B. W.*: Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic esters. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 55, 134-141 (1966).
15. *Schmalz, G.*: Der Einfluß von Methylmethakrylat-Monomer und Dimethylparatoluidin auf das in-vitro-Wachstum von *Streptococcus mutans*. Berichtsheft zur Jahrestagung 1977 des Eugen-Fröhlich-Fonds, Tübingen, 91-94 (1977).
16. *Schmalz, G.*: Der Einfluß verschiedener Frontzahnfüllungsmaterialien auf das in-vitro-Wachstum von *Streptococcus mutans*. *Dtsch. Zahnärztl. Z.* 32, 575-579 (1977).
17. *Schmalz, G.*: *Streptococcus mutans* - Eine Literaturübersicht I/II. *Zahnärztl. Welt* 88, 263-265 und 315-322 (1979).
18. *Schmalz, G.*: Die Gewebeerträglichkeit zahnärztlicher Materialien - Möglichkeiten einer standardisierten Prüfung in der Zellkultur. Thieme, Stuttgart 1981, im Druck.
19. *Schmalz, G. und Rotgans, J.*: Antimikrobielle Eigenschaften kupferhaltiger und nicht-kupferhaltiger Zemente. *Dtsch. Zahnärztl. Z.* 32, 760-762 (1977).
20. *Schwartz, D. S., Larsh, H. W. and Bartels, P. A.*: Enumerative fluorescent vital staining of life and dead pathogenic yeast cells. *Stain Technol.* 52, 203-210 (1977).
21. *Söderström, B. E.*: Vital staining of fungi in pure cultures and in soil with fluorescein diacetate. *Soil Biol. Biochem.* 9, 59-63 (1977).
22. *Stockinger, L.*: Vitalfärbung und Vitalfluorochromierung tierischer Zellen. *Protoplasmatologia II D1*. Springer, Wien 1964.
23. *Strugger, S.*: Die fluoreszenzmikroskopische Unterscheidung lebender und toter Zellen mit Hilfe der Acridinorange-Färbung. *Dtsch. tierärztl. Wschr.* 49, 525-527 (1941).
24. *Strugger, S.*: *Fluoreszenzmikroskopie und Mikrobiologie*. Verlag H. & M. Schaper, Hannover 1949.
25. *Trollenier, G.*: Fluoreszenzmikroskopische Zählung von Bodenbakterien. *Zbl. Bakteriol., II. Abt.* 127, 25-40 (1972).
26. *van Houte, J.*: Bacterial specificity in the etiology of dental caries. *Int. dent. J.* 30, 305-326 (1980).
27. *Ziegler, G. B., Ziegler, E. und Witzhausen, R.*: Nachweis der Stoffwechselaktivität von Mikroorganismen durch Vital-Fluorochromierung mit 3',6'-Diacetylfluorescein. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A* 230, 252-264 (1975).
28. *Zimmermann, R.*: Estimation of bacterial number and biomass by epifluorescence microscopy and scanning electron microscopy. In: *Microbial Ecology of a Brackish Water Environment*. Ed. *Rheinheimer, G.*, 103-120, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York 1977.