

The Effect of Erythrosine-mediated Photodynamic Therapy on Intraorally Formed Biofilm on Titanium Surface

Se Hwan Park¹, Si Young Lee², Beom-Seok Chang¹, Heung-Sik Um¹, and Jae-Kwan Lee^{1*}

¹Department of Periodontology, Research Institute for Oral Sciences, College of Dentistry, Gangneung-Wonju National University, Gangneung 210-702, Korea

²Department of Oral Microbiology, Research Institute for Oral Sciences, College of Dentistry, Gangneung-Wonju National University, Gangneung 210-702, Korea

(received July 12, 2012 ; revised September 6, 2012 ; accepted September 11, 2012)

The purpose of this study was to assess the efficacy of photodynamic therapy (PDT) using erythrosine and a halogen light source to treat a biofilm formed on a machined surface titanium disk *in vivo*. Ten volunteers carried an acrylic appliance containing six machined surface titanium disks on the upper jaw over a period of five days. After the five days of biofilm formation period, the disks were removed. PDT using 20 μ M erythrosine and halogen light was then applied to the biofilms formed on the disks. Experimental samples were divided into a negative control group (no erythrosine and no irradiation), E0 group (erythrosine 60s + no irradiation), E30 group (erythrosine 60s + halogen light 30s), and E60 group (erythrosine 60s + halogen light 60s). Following PDT, the bacteria in the biofilm were found to be detached from each disk. Each suspension with detached bacteria were diluted and cultivated on a blood-agar plate for five days under anaerobic conditions. The cultivated bacterial counts in the E60 group were significantly lower than the control group (86.4%) or E0 group (76.7%). In the experimental groups also, the light exposure time and bacterial counts showed a negative correlation. In conclusion, PDT using erythrosine and halogen light has bactericidal effects on biofilms

formed on a titanium disk *in vivo*. Notably, applying 20 μ M erythrosine and 60 seconds of halogen light irradiation had a significantly potent effect.

Key words: photodynamic therapy, erythrosine, halogen dental curing light, biofilm, titanium

서 론

구강 내에 식립된 치과용 임플란트에 병원성 구강세균이 군집하면 치주염과 유사한 임플란트 주위염의 발생 가능성이 증가한다[1]. 임플란트에 바이오필름이 부착되면 임플란트 인접 조직에 염증과 골흡수가 나타나며, 이것은 임플란트의 실패와 직결된다[2,3]. 임플란트의 구성요소 중에서 상부보철물과 지대주는 구강 세균에 노출되기 가장 쉬운 부분이며, 일반적으로 임플란트의 지대주는 기계 절삭형 표면을 갖는 티타늄이 가장 보편적으로 사용된다.

Mombelli 등 [4]은 임플란트 주위염을 치료하기 위해서 질병의 진행 정도에 따라 누적차단유지요법(cumulative interceptive supportive therapy; CIST)을 제안하였다. 이러한 누적차단유지요법에서 가장 기본이 되는 방법이 기계적 세정이다. 기계적 세정에는 초음파 치석제거기, 금속 큐렛, 티타늄 합금 큐렛, 공기 분말 마모기기 등이 사용될 수 있으나, 이러한 기구들의 사용은 티타늄 표면에 손상을 준다고 보고되었다[5,6]. 손상된 티타늄 표면

*Correspondence to: Jae-Kwan Lee, Department of Periodontology, Research Institute for Oral Sciences, College of Dentistry, Gangneung-Wonju National University, 7 Jukheon-gil, Gangneung-si, Gangwon-do, 210-702, Korea.
Tel: +82-33-640-3199, Fax: +82-33-640-3113,
E-mail: periojk@gwnu.ac.kr

에는 구강 바이오필름의 형성이 더 용이하므로[7-9], 티타늄 표면을 손상시키지 않고 치주병원균을 제거하는 방법의 필요성이 요구되어 왔다.

광역학 치료(photodynamic therapy, PDT)는 티타늄 표면 손상 없이 세균을 제거할 수 있는 방법 중 하나이다. 의료계에서 암의 치료를 위해 개발된 광역학 치료는 세포에 흡수되는 특정 파장의 빛을 통해 활성화되는 광민감제가 산소가 있는 환경에서 일중항 산소와 활성 산소를 형성하여, 세포를 사멸시킨다는 개념에 기초한다 [10]. 치과영역에서의 광역학 치료는 두경부 암 치료뿐만 아니라, 치아와 점막의 감염 치료를 위해 다양한 연구들이 진행되고 있다[11].

구강 내의 바이오필름 형성은 서로 다른 500여종의 세균이 관여하는 복잡한 과정이고[12-16], 실험실에서 재현에 한계가 있다. 이를 극복하기 위해 Al-Ahmad 등 [17]은 구내 가철성 장치를 이용해 바이오필름을 형성하는 방법을 제안하였고, 구내 장치를 5일간 장착한 후 얻어진 바이오필름의 두께는 디스크의 종류에 따른 유의한 차이를 보이지 않는다고 보고하였다.

많은 연구들이 치주질환을 유발하는 세균에 대한 광역학 치료의 효과를 보고하였지만[18-20], 대부분 실험실에서 배양한 현탁액 상의 세균이나 단일 세균종의 바이오필름을 이용한 연구였다. 실험실에서 배양한 바이오필름에 대한 광역학 치료의 효과는 다양한 세균종이 형성하는 구강 바이오필름에 대한 효과와 다를 수 있다. 또한, 현재까지 구강 내에서 티타늄 표면에 형성한 바이오필름을 이용해 광역학 치료의 효과를 평가한 연구는 드문 실정이다.

이번 연구는 구강 내에서 티타늄 표면에 형성한 바이오필름에 erythrosine과 치과용 할로젠 램프를 이용한 광역학 치료의 효과를 평가하였다.

재료 및 방법

티타늄 디스크의 준비

직경 5 mm, 두께 1 mm의 티타늄 디스크를 300번과 800번 실리콘 카바이드 사포를 사용하여 균일한 표면을 갖도록 만들었다. 디스크를 각각 유리튜브에 넣고 trichlorethylene과 순수 에탄올을 각각 사용한 초음파 세척을 15분간 2회 시행하고, 50°C 오븐에서 24시간 동안 건조한 후 멸균하였다. 준비가 완료된 디스크 중 4개는 SurfTest SJ-400(Mitutoyo, Japan)으로 표면 거칠기를 측정하였다.

연구대상 및 장치

진진질환이 없고, 최근 6개월 이내에 항생제를 사용

하지 않은 19명의 지원자가 연구에 참여하였다. 연구 대상의 평균 연령은 22.9세(19세~26세)로 남성이 13명, 여성이 9명이었다. 대상자의 상악 인상을 채득하여 얻은 모형을 이용해, Al-Ahmad 등 [17]이 고안한 가철성 장치를 응용하여 장치를 제작하였다. 각 장치에는 양쪽으로 3개씩, 총 6개의 티타늄 디스크를 치과 인상용 콤파운드(Peri-Compound, Nimi Chemical Industrial Co., Japan)를 이용하여 고정하였다(Fig. 1). 장치의 티타늄 디스크를 70% 에탄올로 닦고, 멸균된 생리식염수로 헹궈낸 후, 실험 대상자의 구강에 장착하였다. 대상자는 5일간, 식사 시와 구강위생행위 시를 제외하고 항상 장치를 장착하도록 하였다. 구강에서 장치를 제거한 경우에는 생리식염수에 보관하도록 하였다.

각 연구 대상에게 연구의 목적 및 취지를 설명하고 동의를 구하였다. 이 연구는 강릉원주대학교 치과병원 임상시험심사위원회의 승인을 받았다. (IRB 2011-10-1)

광민감제와 광원

Erythrosine (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)을 광민감제로 사용하였으며, 1 mM의 용액을 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.2)로 만든 후, 필터(0.22 μ m)를 사용하여 멸균하고 -20°C에 보관하며 실험에 사용하였다. Erythrosine에 대한 광원은 통상적으로 사용되는 직경 8 mm의 halogen curing unit (XL 3000, 3M ESPE, St. Paul, MN USA)를 사용하였으며, power output은 radiometer (Light intensity meter, Dentamerica, San Joes, CA, USA)로 측정하여 500 mW/cm² 이었다.

광역학 치료

5일 후 대상자의 구강에서 장치를 수거하여, 디스크가 매몰되어 있는 콤파운드 부위만 분리하여 즉시 멸균된 phosphate buffered saline(PBS)이 채워진 수조에 보관하였다. PBS 내에서 티타늄 디스크를 바이오필름이 손

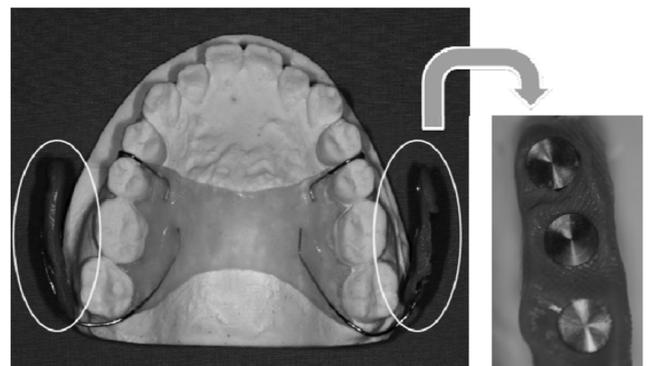


Fig. 1. Acrylic appliance. Three titanium disks placed on each side of appliance.

Table 1. Surface roughness of titanium disk

Disks	Ra (μm)
Disk 1	0.42
Disk 2	0.37
Disk 3	0.31
Disk 4	0.36
Mean \pm SD	0.36 \pm 0.04

상되지 않게 치과용 탐침으로 조심스럽게 장치로부터 분리하였다(Fig. 2). 6개의 디스크 중 무작위로 선택된 3개는 대조군으로 사용하고, 나머지 3개의 디스크는 각각 E0군, E30군, E60군으로 설정하여 erythrosine를 이용한 광역학 치료를 시행하였다(Table 2).

24-well plate에 티타늄 디스크가 잠길 수 있도록 20 μM erythrosine 500 μL 를 채운 후 티타늄 디스크의 바이오필름이 형성된 면을 위로 향하게 하여 위치시켰다. 60초 후 티타늄 디스크와 1 cm의 거리를 유지하면서 치과용 할로겐 광중합기(XL 3000, 3M ESPE, St. Paul, MN USA)를 이용하여 E30군은 30초, E60군은 60초 동안 광조사를 시행하였다.

세균배양

PDT 후, 디스크를 2 ml의 PBS와 직경 1 mm의 유리구슬 5개가 담긴 시험관으로 이동하였다. 각 시험관을 15분 이상, 디스크 상의 바이오필름이 육안으로 확인되지 않을 때까지 vortexing을 시행하여 부착된 세균을 디스크로부터 떨어뜨려 현탁액을 만들었다. 현탁액은 PBS로 단계 희석하였고, 각 희석액 중 50 μL 를 혈액한천배지 (Blood Agar Plate, 한일코메드, 대한민국)에 도말하고, 37°C, 90% 질소, 5% 이산화탄소, 5% 수소 조건의 혐기성 배양기

Table 2. Photodynamic therapy protocol

Group	Treatment	N
Control	No treatment	29
E0	20 μM Erythrosine 60 sec.	10
E30	20 μM Erythrosine 60 sec. + Halogen light 30 sec.	10
E60	20 μM Erythrosine 60 sec. + Halogen light 60 sec.	10

**Fig. 2.** Titanium disk used in biofilm formation. After disk preparation (left) and biofilm formation (right).

(Bactron Anaerobic Chamber, Sheldon Manufacturing Inc., USA) 내에서 5일간 배양하였다. 실험 대상자의 구강에서 장치를 수거한 후 세균 배양까지의 과정은 2시간 이내에 완료되었다.

5일 후, 대상자 당 모든 군의 군락형성단위(colony forming unit; CFU)가 측정이 가능한 희석농도에서 각 배지에 형성된 군락을 계수화 하였다. 각 군락의 수에 희석농도를 역으로 계산하여 디스크 상의 생활력이 있는 세균의 수를 산출하였다.

통계학적 분석

각 군간 세균배양 결과의 차이를 분석하기 위해 SPSS statistics 19(IBM, USA)를 이용하였고, 통계적 유의수준은 95% 신뢰구간으로 설정하였다. 세균 배양 결과에 대한 각 군간의 차이를 알아보기 위해 비모수적 분석법 중 Kruskal-Wallis 검정을 시행하였고, 사후 검정은 Bonferroni 검정을 시행하였다. 실험군에서 광조사 시간과 세균 배양 결과의 상관관계를 조사하기 위해 Spearman의 rho 상관계수 분석을 시행하였다.

결 과

무작위로 선택된 4개 디스크의 평균 표면거칠기 값은 $0.36 \pm 0.04 \mu\text{m}$ 로 비교적 일정한 표면거칠기를 가짐을 확인할 수 있었다(Table 1).

총 19명의 실험 대상자 중 6명은 장치 장착 시 불편감을 원인으로 장치장착을 중단하여 실험에서 제외하였다. 13명 중 1명은 실험기간 중 항생제 복용으로, 2명은

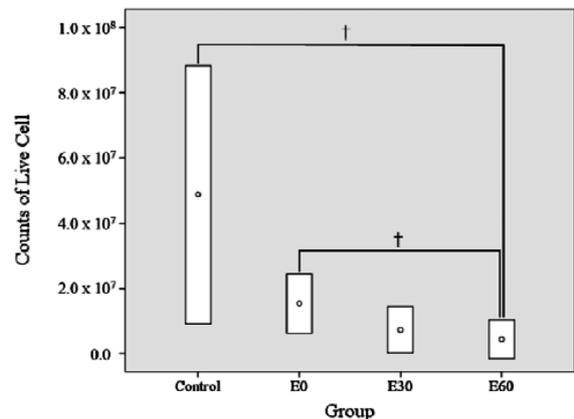
**Fig. 3.** Counts of live bacteria. Count of cultivated bacteria in E60 group was significantly less than control group and E0 group ($P < 0.0125$). Control No treatment, E0 20 μM Erythrosine 60 sec, E30 20 μM Erythrosine 60 sec. + Halogen light 30 sec, E60 20 μM Erythrosine 60 sec. + Halogen light 60 sec.

Table 3. Counts of live bacteria from biofilm on titanium disk

	Control (CFU/ml)			E0 (CFU/ml)	E30 (CFU/ml)	E60 (CFU/ml)
1	4.80×10^6	6.40×10^6	9.20×10^6	6.40×10^6	3.20×10^6	1.60×10^6
2	1.92×10^7	1.16×10^7	2.17×10^8	1.72×10^7	2.24×10^7	1.64×10^7
3	3.60×10^6	1.60×10^6	8.00×10^5	4.00×10^6	4.00×10^5	4.00×10^5
4	4.08×10^8	3.00×10^7	1.64×10^7	4.16×10^7	2.80×10^7	2.32×10^7
5	†	4.40×10^6	4.80×10^7	1.08×10^7	8.00×10^5	0
6	6.80×10^6	1.08×10^7	1.32×10^7	1.88×10^7	4.00×10^6	4.00×10^5
7	1.08×10^7	8.00×10^6	1.00×10^7	4.80×10^6	3.60×10^6	8.00×10^5
8	3.08×10^5	9.48×10^5	1.32×10^5	1.36×10^5	2.40×10^4	4.00×10^3
9	4.00×10^6	3.60×10^6	2.08×10^7	2.68×10^7	1.04×10^7	1.20×10^6
10	2.68×10^5	4.60×10^5	7.76×10^5	7.60×10^5	4.04×10^5	1.56×10^5

† : Excluded by disk loss

장치 수거 후 실험실에서의 오염으로 인해 제외하여 10명을 대상으로 60개의 바이오필름이 형성된 디스크를 얻었다. 60개 중 대조군으로 배정된 하나의 디스크는 실험과정 중 소실되어 제외하였다.

혈액 한천 배지상에 형성된 세균 군락의 수는 대조군에서 가장 많았고, 광조사 시간이 증가할수록 감소하는 경향을 보였다. 군락형성단위로부터 계산된 살아있는 세균의 수(Table 3, Fig. 3)는 E60군과 대조군, E60군과 E0군이 통계적으로 유의한 차이를 보였고, 대상자 내에서 E60군은 대조군에 비해 평균 86.4%, E0군에 비해 평균 76.7%의 세균 수 감소를 보였다. E0군, E30군, E60군은 광조사 시간의 증가에 따라 세균 수가 감소하는 음의 상관관계를 나타냈다(correlation coefficient -0.519, P = 0.003).

고 찰

이번 연구에서는 구강 내에서 티타늄 표면에 형성한 바이오필름에 erythrosine과 치과용 할로겐 램프를 이용한 광역학 치료의 효과를 평가하였다.

Wood 등 [21]은 고정성 장치를 이용하여 인간의 구강 내에서 소의 범랑질 상에 7일 동안 바이오필름을 형성하였고, 이 바이오필름에 시행한 광역학 치료가 세균 수 감소에 효과적임을 보고하였다. 또한 Haas 등 [20]은 다양한 표면의 티타늄 상에 실험실에서 형성한 바이오필름에 대한 광역학 치료의 결과 역시 세균수 감소에 효과적임을 보고하였다. 이번 연구에서는 구강 내에서 티타늄 표면 상에 재현된 바이오필름에 대한 광역학 치료를 시행하였고, 그 결과 세균 수 감소에 효과적이었다.

Al-Ahmad 등 [17]은 구강위생행위 시를 제외한 5일간의 구내 장치 장착을 통해 디스크 표면특성과 상관없이

유사한 두께의 바이오필름이 형성됨을 보고하였다. Nakazato 등 [22]은 유사한 연구에서 가철성 장치의 구내 장착 48시간 후 디스크 상의 세균 부착과 조성은 디스크의 표면특성에 따른 차이가 없다고 주장하였다. 또한 Bürgers 등 [9]은 음식 섭취와 구강위생행위를 12시간 동안 제한하고, 구강 내에 다른 표면 거칠기를 갖는 티타늄 디스크를 위치시켜 형성된 바이오필름의 차이를 비교하는 실험을 시행하였고, 더 거친 표면의 디스크 상에 더 많은 바이오필름이 형성되었다고 보고하였다.

이번 연구에서는 동일한 기계 절삭형 표면의 티타늄 디스크상에 구강 바이오필름을 형성하였고, 형성된 바이오필름은 광역학 치료의 효과를 평가하기에 적절했다. 그러나 실험 대상자중 31.6%가 장치 장착시의 불편을 이유로 장착 기간 중에 실험에서 이탈한 것을 고려하면, 장치의 형태 개선이나 장착시간의 감소를 고려하는 것도 필요하다.

이번 연구에서는 전신 병력과 항생제 사용여부만 확인하고 추가적인 배제요건 없이 대상자를 선정하였다. Uzel 등 [23]은 구강위생행위가 없는 상태에서 깨끗한 치아의 표면에 치은연상 바이오필름의 형성은 치주염의 유무에 상관없이 바이오필름의 양과 조성에 차이가 없다고 밝혔다. 또한, Tanner 등 [24]은 같은 구강 내에서 임플란트 상의 세균군집은 치아와 유사하다고 하였다. 이번 연구에 사용된 티타늄 디스크의 상황은 구강 내의 치은연상과 유사하다고 볼 수 있다. 따라서, 실험 대상자의 치주질환 유무는 티타늄 디스크상의 세균 조성에 영향을 끼치지 않았을 것이다.

인간의 구내에서 임플란트 상에 바이오필름 형성을 조사한 연구들을 살펴보면, 초기에 가장 많은 비율을 차지하는 세균이 *Streptococcus* 종이다[22,25,26]. Al-Ahmad 등 [17]의 연구에 따르면, 가철성 장치를 이용하여 사람

의 구강에서 5일간 생성한 바이오필름의 조성을 분석한 결과 디스크의 종류에 상관 없이 *Streptococcus* 종이 가장 우세하였고 (10.67-26.13%), 그 외에, *Fusobacterium nucleatum* (2.30-5.02%), *Actinomyces naeslundii* (1.94-5.00%), *Veillonella* 종(1.13-3.40%) 등이 발견되었다. *Streptococcus* 종은 그람 양성 통성 혐기성균으로 이번 연구에서 세균 배양에 사용된 혐기성 환경과 혈액한천배지는 *Streptococcus* 종에 대한 광역학 치료의 효과를 평가하기에 적절하다. 그러나 바이오필름 내에 존재할 것으로 예상되는 다른 세균에 대한 광역학 치료의 효과를 확인하기 위해서는 다른 배지나 배양환경, 혹은 추가적인 세균 검출 방법이 필요하다.

Zanin 등 [27]의 연구에 따르면 *S. mutans* 바이오필름에 광조사만 시행하거나 광민감제만 적용하는 것은 대조군과 통계적으로 유의한 차이를 나타내지 못하였다. 이 결과는 이번 연구의 대조군과 erythrosine만 적용한 E0군의 비교와 유사한 결과이다. 그러나 E0군은 대조군에 비해 세균수가 감소하는 양상을 보였는데, 이는 이번 실험이 완전한 암실에서 진행되지 않은 관계로 어느 정도 erythrosine의 활성화가 이루어진 것으로 생각된다. 이번 연구에서는 할로겐 광원을 이용해 광조사만 시행한 실험군은 포함되지 않았다. 더 정확한 광원의 효과를 알아보기 위해서는 바이오필름에 광조사만 시행한 연구가 추가로 필요하다.

치과영역의 광역학 치료에 사용되는 광민감제 중 하나인 erythrosine은 식용 염료, 인쇄용 잉크, 치태 착색제 등으로 사용되는 분홍색의 합성물로, 인체에 독성이 없음이 확인되었다 [28]. Wood 등 [29]은 *Streptococcus mutans* 바이오필름에 대한 erythrosine과 methylene blue, photofrin을 사용한 광역학 치료의 효과를 비교한 결과 erythrosine이 methylene blue나 photofrin보다 더 효과적인 광민감제임을 확인하였다.

이번 연구에 사용된 광원과 광민감제는 광중합형 레진의 중합기와 치태착색제로 치과 임상에서 흔히 사용되는 재료이다. 추가적인 장비의 구입 없이 실제 임상에 광역학 치료를 도입할 수 있다는 점에서 erythrosine과 할로겐 램프를 이용한 광역학 치료는 다른 특수한 광민감제나 저장도 다이오드 레이저 등을 이용한 광역학 치료에 비해 경제적이다.

이번 연구에 사용된 할로겐 램프는 400 - 520 nm 파장의 청색광을 방출한다. 그러나, erythrosine은 약 450 - 550 nm 파장 영역의 빛을 흡수하고, 최대 효과를 나타낼 수 있는 λ_{max} 는 530 nm이다. 이번 연구에서 20 μ M erythrosine과 할로겐 광원을 이용한 광역학 치료는 인간의 구강에서 티타늄 디스크에 형성한 바이오필름 내

의 세균 수 감소에 효과적이었지만, 450~550 nm 파장의 빛을 방출하는 광원을 사용한다면 erythrosine을 광민감제로 사용하는 광역학 치료의 효과를 더욱 증가시킬 수 있을 것이다. 향후 erythrosine의 흡수 파장을 고려한 광원에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Scarano A, Piattelli M, Caputi S, Favero GA, Piattelli A. Bacterial adhesion on commercially pure titanium and zirconium oxide disks: an *in vivo* human study. *J Periodontol*. 2004;75:292-6.
2. Paquette DW, Brodala N, Williams RC. Risk factors for endosseous dental implant failure. *Dent Clin North Am*. 2006;50:361-74, vi.
3. Quirynen M, De Soete M, van Steenberghe D. Infectious risks for oral implants: a review of the literature. *Clin Oral Implants Res*. 2002;13:1-19.
4. Mombelli A, Lang NP. The diagnosis and treatment of peri-implantitis. *Periodontol* 2000. 1998;17:63-76.
5. Matarasso S, Quaremba G, Coraggio F, Vaia E, Cafiero C, Lang NP. Maintenance of implants: an *in vitro* study of titanium implant surface modifications subsequent to the application of different prophylaxis procedures. *Clin Oral Implants Res*. 1996;7:64-72.
6. Augthun M, Tinschert J, Huber A. In vitro studies on the effect of cleaning methods on different implant surfaces. *J Periodontol*. 1998;69:857-64.
7. O'Mahony A, MacNeill SR, Cobb CM. Design features that may influence bacterial plaque retention: a retrospective analysis of failed implants. *Quintessence Int*. 2000;31:249-56.
8. Elter C, Heuer W, Demling A, Hannig M, Heidenblut T, Bach FW, et al. Supra- and subgingival biofilm formation on implant abutments with different surface characteristics. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2008;23:327-34.
9. Burgers R, Gerlach T, Hahnel S, Schwarz F, Handel G, Gosau M. *In vivo* and *in vitro* biofilm formation on two different titanium implant surfaces. *Clin Oral Implants Res*. 2010;21:156-64.
10. Soukos NS, Goodson JM. Photodynamic therapy in the control of oral biofilms. *Periodontol* 2000. 2011;55:143-66.
11. Konopka K, Goslinski T. Photodynamic therapy in dentistry. *J Dent Res*. 2007;86:694-707.
12. Foster JS, Kolenbrander PE. Development of a multispecies oral bacterial community in a saliva-conditioned flow cell. *Appl Environ Microbiol*. 2004;70:4340-8.
13. Kolenbrander PE, Andersen RN, Blehert DS, Eglund PG, Foster JS, Palmer RJ, Jr. Communication among oral bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2002;66:486-505.
14. Kroes I, Lepp PW, Relman DA. Bacterial diversity within the human subgingival crevice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96:14547-52.

15. Moore WE, Moore LV. The bacteria of periodontal diseases. *Periodontol* 2000. 1994;5:66-77.
16. Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, Sahasrabudhe A, Dewhirst FE. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol*. 2001;183:3770-83.
17. Al-Ahmad A, Wiedmann-Al-Ahmad M, Faust J, Bachle M, Follo M, Wolkewitz M, Hannig C, Hellwig E, Carvalho C, Kohal R. Biofilm formation and composition on different implant materials *in vivo*. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2010;95:101-9.
18. Wilson M, Burns T, Pratten J. Killing of *Streptococcus sanguis* in biofilms using a light-activated antimicrobial agent. *J Antimicrob Chemother*. 1996;37:377-81.
19. Soukos NS, Mulholland SE, Socransky SS, Doukas AG. Photodestruction of human dental plaque bacteria: enhancement of the photodynamic effect by photomechanical waves in an oral biofilm model. *Lasers Surg Med*. 2003; 33:161-8.
20. Haas R, Dortbudak O, Mensdorff-Pouilly N, Mailath G. Elimination of bacteria on different implant surfaces through photosensitization and soft laser. An *in vitro* study. *Clin Oral Implants Res*. 1997;8:249-54.
21. Wood S, Nattress B, Kirkham J, Shore R, Brookes S, Griffiths J, Robinson C. An *in vitro* study of the use of photodynamic therapy for the treatment of natural oral plaque biofilms formed *in vivo*. *J Photochem Photobiol B*. 1999;50:1-7.
22. Nakazato G, Tsuchiya H, Sato M, Yamauchi M. *In vivo* plaque formation on implant materials. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1989;4:321-6.
23. Uzel NG, Teles FR, Teles RP, Song XQ, Torresyap G, Socransky SS, Haffajee AD. Microbial shifts during dental biofilm re-development in the absence of oral hygiene in periodontal health and disease. *J Clin Periodontol*. 2011; 38:612-20.
24. Tanner A, Maiden MF, Lee K, Shulman LB, Weber HP. Dental implant infections. *Clin Infect Dis*. 1997;25 Suppl 2:S213-7.
25. Subramani K, Jung RE, Molenberg A, Hammerle CH. Biofilm on dental implants: a review of the literature. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2009;24:616-26.
26. Furst MM, Salvi GE, Lang NP, Persson GR. Bacterial colonization immediately after installation on oral titanium implants. *Clin Oral Implants Res*. 2007;18:501-8.
27. Zanin IC, Goncalves RB, Junior AB, Hope CK, Pratten J. Susceptibility of *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic therapy: an *in vitro* study. *J Antimicrob Chemother*. 2005;56:324-30.
28. Lin GH, Brusick DJ. Mutagenicity studies on FD&C red No.3. *Mutagenesis*. 1986;1:253-9.
29. Wood S, Metcalf D, Devine D, Robinson C. Erythrosine is a potential photosensitizer for the photodynamic therapy of oral plaque biofilms. *J Antimicrob Chemother*. 2006;57: 680-4.