

# **1. Einleitung**

## **1.1 Problemstellung**

Biofilme kommen überall in der Natur vor (Gjaltema und Griebe 1995). Sie spielen in der Industrie, in natürlichen Wassersystemen und in der Medizin eine bedeutsame Rolle (Peyton und Characklis 1995), da sie sämtliche Oberflächen bewachsen (Hoyle *et al.* 1990; Gilbert *et al.* 1993; Costerton 1995; Costerton *et al.* 1995; Costerton 1997; Sissons 1997; Costerton 1999; Costerton *et al.* 1999) und daraus resultierend vielfältige Schäden entstehen (Peyton und Characklis 1995).

Besonderes Augenmerk verlangt das Phänomen der Biofilmentstehung aus der Sicht der Medizin. Hier sind Biofilme verantwortlich u.a. für die Entstehung chronischer Infektionen (Hoyle und Costerton 1991; Johnson *et al.* 1998; Costerton *et al.* 1999). Häufige Probleme stellen Implantate (Anwar und Costerton 1990), Katheter, Herzschrittmacher, Operationsbestecke oder Endoskope dar (Costerton 1997, 1999), also Fremdmaterialien, die in den menschlichen Organismus inkorporiert oder mit ihm in Verbindung gebracht werden. Die Oberflächen der Materialien können schon im Vorfeld mit Bakterien bzw. Biofilmen verunreinigt sein, weil die Bakterien durch eigene oder fremde Polymere geschützt werden und so eine bemerkenswerte Resistenz gegenüber Sterilisationsprozessen aufweisen können (Costerton 1997). Die bewachsenen Oberflächen kommen dann mit dem menschlichen Gewebe, d.h. feuchten Oberflächen, in Kontakt, was für sie ideale Wachstumsbedingungen

darstellt (Peyton und Characklis 1995; Costerton *et al.* 1999). Anschließend können die angesprochenen Infektionen entstehen.

Hintergrund dieser Arbeit ist die Bedeutung von Biofilmen in der Zahnmedizin. Aus mikrobiologischer Sicht stellt die bei jedem Menschen ständig entstehende dentale Plaque einen Biofilm dar (Wilson *et al.* 1996b; Liljemark *et al.* 1997; Thrower *et al.* 1997; Embleton *et al.* 1998; Bradshaw und Marsh 1999; Marsh 1999; Wilson 1999). In der Literatur herrscht Einigkeit darüber, dass die dentale Plaque der Auslöser der häufigsten Infektionskrankheiten des Menschen überhaupt ist: Karies und Parodontitis (Hardie und Bowden 1975; Appelbaum *et al.* 1979; Gjermo 1989; Scheie 1994; Fine 1995; Marsh und Bradshaw 1995; Wilson *et al.* 1996b; Bowden und Hamilton 1998; Embleton *et al.* 1998; Gottenbos *et al.* 1999; Wilson 1999). Nach neuesten Erkenntnissen ist Plaque nicht nur für intraorale Erkrankungen, sondern auch für eine Reihe systemischer Erkrankungen verantwortlich (Loesche und Lopatin 1998). Die Wissenschaft ist deshalb schon seit Jahrzehnten mit der Forschung nach effizienten Mitteln zur Biofilmentfernung bzw. Vermeidung ihrer Entstehung beschäftigt (Marsh 1993). Es besteht ein gesteigertes Interesse daran, die mechanische Reinigung durch Kombination mit chemischen Wirkstoffen zu verbessern (Fine 1995; Wilson 1996; Wilson *et al.* 1996a und b; Thrower *et al.* 1997; Pratten *et al.* 1998b; Wilson *et al.* 1998; Wilson 1999). Kernpunkt der Forschung sind antimikrobielle Substanzen (Herles *et al.* 1994). Diese können in Zahnpasten inkorporiert oder in Form von Mundspüllösungen zugeführt werden. Letztere sollen dabei als besonders gute Vehikel geeignet sein (Marsh 1992). Die modernen Mundhygienemittel enthalten heute antimikrobielle Substanzen (McDermid *et al.* 1987), und es sind erste Erfolge zu verzeichnen, indem plaqueinduzierte

Krankheiten vermindert werden konnten (Marsh 1992). Man unterscheidet bei den eingesetzten Mitteln zwischen solchen, die zur Prävention eingesetzt werden, und solchen, die eine Behandlungsmaßnahme darstellen (Patters *et al.* 1983, 1986; Pitten und Kramer 1999; Schierholz *et al.* 1999). Das eigentliche Problem liegt darin begründet, dass Bakterien, die in einer Biofilmformation wachsen, eine merklich höhere Resistenz im Vergleich zu planktonisch gelösten Zellen aufweisen (s. Abschnitt **4.2 Diskussion**). Es mussten daher Modelle entwickelt werden, mit denen Biofilme gezüchtet und dann antimikrobielle Substanzen getestet werden können. In der Literatur werden die unterschiedlichsten Modelle beschrieben (Wimpenny 1996, 1997, 1999). Oft sind diese jedoch kompliziert, kostenintensiv und lassen reproduzierbare Ergebnisse vermissen (Keevil *et al.* 1987). Die fehlende Reproduzierbarkeit und die Vielzahl der unterschiedlichen Kultursysteme machen Vergleiche zwischen Studien schwierig (McLean *et al.* 1999) und lassen eine Reihe von Fragen offen. Außerdem wurden zum Teil für die Zahnmedizin nicht relevante Keime untersucht.

## **1.2 Darstellung von Biofilmen: Definition, Entstehung und Morphologie**

In der Literatur lässt sich keine allumfassende Definition des Begriffs Biofilm finden. Bei der folgenden Definition handelt es sich um den Versuch, möglichst viele in der Literatur genannte Aspekte zum Ausdruck zu bringen. Danach ist ein Biofilm definiert als eine Bakterienakkumulation einzelner Bakterienzellen und Mikrokolonien am Interface zwischen zwei verschiedenen Phasen, eingebettet in eine

hochhydrierte, hauptsächlich anionische Matrix aus bakteriellen Exopolysacchariden und anderen Makromolekülen (Hardie und Bowden 1975; McKee *et al.* 1985; Keevil *et al.* 1987; Brown *et al.* 1988; Marsh 1992; Bryers 1993; Peyton und Characklis 1995; Kinniment *et al.* 1996; Wimpenny 1996; Williams 1997; Wimpenny 1997; Marsh 1999; Schierholz *et al.* 1999; Stickler 1999). Es handelt sich um ein eigenes Ökosystem, das auf Umweltreize reagiert (Costerton *et al.* 1994; Liljemark *et al.* 1997). Costerton (1995) und Costerton *et al.* (1995, 1999) gehen sogar soweit, einen Biofilm als Analogie zu Geweben höherer Organismen anzusehen.

Morphologisch gesehen ist der Biofilm keine homogene Masse, sondern besteht mikromorphologisch aus in die Matrix eingebetteten Zellnestern mit charakteristischem Aussehen: Maiskolben-, Rosetten- und Stoppelbürstenstruktur (Marsh und Bradshaw 1995). Dazwischen liegen Kanäle, die ein ganzes System bilden und in denen ein konvektiver Flüssigkeitsstrom fließt (Costerton *et al.* 1994). So kann ein Transport von Nährstoffen in tiefere Schichten des Biofilms garantiert werden. Umgekehrt verlassen Abfallprodukte der Zellen auf diesem Weg den Biofilm. In den Kanälen herrscht dabei ein anderer Konzentrationsgradient als in der Umgebung des Biofilms.

Makromorphologisch sehen Biofilme oft pilz- oder tulpenförmig aus (Costerton *et al.* 1994; Costerton 1995, 1999; Dibdin und Wimpenny 1999; Roberts *et al.* 1999). Nach Wimpenny (1982) hängt die Kolonieform von einigen intrinsischen und extrinsischen Faktoren ab. Zu den intrinsischen zählen die Zellmorphologie, die Motilität und die Produktion extrazellulären Materials. Die extrinsischen Faktoren umfassen im wesentlichen Diffusionsgradienten in und aus dem Biofilm.

Biofilme entstehen an allen Arten von Phasengrenzen und zeigen eine auffallende Tendenz mit diesen zu interagieren (Costerton *et al.* 1987). Man geht davon aus, dass die Biofilmbildung eine universelle Bakterienstrategie darstellt, die als Schutzmechanismus zu bewerten ist (Costerton *et al.* 1987; Brown und Gilbert 1993; Gilbert 1993; Marsh und Bradshaw 1995; Williams und Pitt 1997; Bowden und Hamilton 1998). Gottenbos *et al.* (1999) definieren den Schutzmechanismus präziser als ein System, das den Stressfaktor der Nährstoffzufuhr reguliert. Außerdem sichert diese Art des Wachstums den Bakterien ein Überleben, wenn sie toxischen Substanzen, z.B. Antiseptika, ausgesetzt sind (Prosser *et al.* 1987; Johnston und Jones 1995; Schierholz *et al.* 1999). Genau in diesem Punkt liegt das Problem der Medizin begründet: sind Biofilme erst einmal entstanden, so sind sie nur sehr schwer wieder entfernbar (Liljemark *et al.* 1997).

Wie weiter oben schon angedeutet, stellt aus der Sicht der Zahnmedizin die dentale Plaque ein klassisches Beispiel für einen Biofilm dar (Wilson 1999), der eine komplexe mikrobiologische Gemeinschaft beherbergt (Kinniment *et al.* 1996). In der dentalen Plaque kommt es zu einer Interaktion von Bakterien zwischen den Phasengrenzen fest (Zahnhartsubstanz) und flüssig (Speichel).

Die Entstehung dentaler Plaque kann in unterschiedliche Stadien eingeteilt werden und läuft wie folgt ab (Hardie und Bowden 1975; Marsh 1992; Hellwig *et al.* 1995; Peyton und Characklis 1995): Auf einer gründlich gereinigten Zahnoberfläche adsorbiert schon nach wenigen Minuten (Bryers 1993; Marsh und Bradshaw 1993) ein unstrukturierter azellulärer Film, die sog. acquired Pellicle. Dieses exogene Zahnoberhäutchen ist 0,1-1 µm dick und besteht aus Speichelproteinen (Liljemark *et al.* 1997). Dazu gehören saure prolinreiche Proteine, Glykoproteine, Serumproteine, Enzyme und

Immunglobuline. Die Eigenladung der Proteine macht eine elektrostatische Bindung an die Kalzium- und Phosphatgruppen des Apatits der Zahnhartsubstanz möglich. An diese Membran heften sich nachfolgend Bakterien (Rosan *et al.* 1982a und b). Es handelt sich dabei selektiv zuerst um grampositive Kokkenbakterien (Kinniment *et al.* 1996), wobei *S. sanguis* als einer der ersten und bedeutendsten Koloniebildner gilt (Appelbaum *et al.* 1979; Rosan *et al.* 1982a und b; Marsh 1993; Marsh und Bradshaw 1993; Scheie 1994; Fine 1995; Larsen und Fiehn 1996; Wilson *et al.* 1996a; Liljemark *et al.* 1997; Embleton *et al.* 1998; Wilson *et al.* 1998; Kolenbrander *et al.* 1999). Es folgen dann *Aktinomyeten*, weitere *Streptokokken*, *Prevotellen*, *Capnocytophagen*, *Propionibakterien* und *Veillonellen*. Somit sind neben den kokkoiden Bakterien auch Stäbchen, filamentöse und fusiforme Bakterien am Aufbau der Plaque beteiligt. Die genannten Bakterienarten gehören zu den sogenannten Frühkolonisatoren (Masius 2001). Als Spätkolonisatoren werden *Treponema spp.*, *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* u.a. bezeichnet. Spezielle Moleküle an den Zelloberflächen der Bakterien, sog. Adhäsine, machen die Bindung möglich (Marsh 1992; Scheie 1994; Ten Cate und Marsh 1994; Bradshaw *et al.* 1995; Marsh und Bradshaw 1995; Bowden und Hamilton 1998; Pratten *et al.* 1998b; Amano *et al.* 1999; Bradshaw und Marsh 1999). Ein Wachstum der Plaque erfolgt durch Teilungsvorgänge mit Mikrokolonieentstehung und nachfolgender Konfluenz derselben zu einem dichten Bakterienteppich (Stickler 1999). Weiterhin sind Akkumulationsvorgänge (vermittelt über spezifische Adhäsions- und Kohäsionsvorgänge), direkter Zellkontakt und/oder Plaquematrixkomponenten beteiligt. Masius (2001) stellt dar, dass nur bestimmte Bakterien miteinander koaggregieren können. Die Koaggregation findet bei den frühen und späten Kolonisatoren

innerhalb ihrer Gruppe statt. *Fusobacterium nucleatum* soll dabei eine Brückenfunktion zwischen den früh- und spätkolonisierenden Bakterien übernehmen: diese Bakterienspezies kann mit beiden Gruppen interagieren (Masius 2001). Die ausgereifte Plaque besteht aus dicht gepackten Bakterien in einer amorphen, anionischen Matrix (Costerton *et al.* 1987; Hoyle *et al.* 1990; Costerton *et al.* 1994; Gottenbos *et al.* 1999). In diesem Zustand sind die Selbstreinigungskräfte der Mundhöhle nicht mehr ausreichend, um die Plaque vom Zahn zu entfernen. Dabei variiert die bakterielle Besiedelung an verschiedenen Stellen der Mundhöhle und sogar an verschiedenen Flächen eines Zahnes (Marsh 1992; Marsh und Bradshaw 1995; Bradshaw und Marsh 1999; Marsh 1999; Stickler 1999).

Die Plaque setzt sich aus einer Vielzahl grampositiver und gramnegativer Aerobier und Anaerobier zusammen (Hardie und Bowden 1975; Gilbert *et al.* 1993; Hellwig *et al.* 1995; Bowden und Hamilton 1998). Für die Entstehung der Karies haben sich *Streptococcus mutans* und *Lactobacillen* als die hauptverantwortlichen Keime herauskristallisiert. Für das Problem der Parodontitis ist *Actinobacillus actinomycetemcomitans* als Auslöser anzusehen. Man darf aber nicht in ein statisches Denkmuster verfallen und nur diese Keime für die Karies- bzw. Parodontitiserstehung verantwortlich machen, da die Mundhöhle von mehreren hundert Bakterienarten besiedelt wird. Fine (1995) beziffert die Keimarten auf über 350. Dieses Ökosystem (Gilbert *et al.* 1997) wirkt in einem physiologischen Zusammenspiel. Es kann zwischen bestimmten Bakterienarten zu einer Symbiose kommen, die die Leistung der Keime verbessert und die metabolische Situation aufrecht erhält (sog. interspecies cross-feeding) (Costerton *et al.* 1995; Costerton 1999).

Außerdem gibt es neben der bakteriellen Komponente noch andere relevante Faktoren (s.u.).

Einigkeit herrscht darüber, dass das Vorhandensein dentaler Plaque ein physiologisches Merkmal darstellt (Seymour und Heasman 1995; Bradshaw *et al.* 1996), auch auf gesundem Schmelz (McKee *et al.* 1985; Pratten *et al.* 1998b) und mit kariogenen Bakterien (Pratten *et al.* 1998b; Marsh 1999). Die Plaque hat dabei eine gewisse Schutzwirkung (Gilbert 1995; Peyton und Characklis 1995). Es wird verhindert, dass die Mundhöhle bzw. von der Mundhöhle ausgehend der Organismus von pathogenen Fremdkeimen besiedelt wird (Costerton *et al.* 1995; Fine 1995; Bradshaw und Marsh 1999). Erst ein gewisses Alter der Plaque und damit eine Änderung der bakteriellen Zusammensetzung bzw. eine Akkumulation von Stoffwechselprodukten der Bakterien bewirkt eine Störung der Balance in der Plaque: sie ist fortan nicht mehr physiologisch, sondern pathogen (Marsh 1993; Bradshaw *et al.* 1996; Marsh 1999). Als kritischer Wert gilt das Alter von drei Tagen. Nach dieser Zeit wird das Milieu in der Plaque kariogen (McKee *et al.* 1985; Millward und Wilson 1989; Marsh 1992, 1993; Embleton *et al.* 1998; Schierholz *et al.* 1999). Vereinfacht dargestellt bewirkt eine Verschiebung des pH-Wertes in den sauren Bereich – infolge bakteriellen Kohlehydratabbaus zu Säuren (Bradshaw *et al.* 1990; Pratten und Wilson 1999) – ein Ungleichgewicht von Re- und Demineralisation der Zahnhartsubstanz zugunsten der Demineralisation (Bradshaw *et al.* 1990; Marsh und Bradshaw 1995; Bowden und Hamilton 1998; Bradshaw und Marsh 1999; Marsh 1999; Pratten und Wilson 1999). Das Kippen des Gleichgewichtes (Marsh 1992) kommt durch eine Abnahme der Pufferwirkung des Speichels (Marsh und Bradshaw 1993) mit steigender Plaquemasse zustande (Marsh und Bradshaw 1995; Bradshaw und Marsh 1999). Es entsteht eine kariöse Läsion



(Hellwig *et al.* 1995). Dabei stellt allerdings die bakterielle Komponente, d.h. die Plaque, nach der heute allgemein anerkannten Kariesätiologie nach König nur einen Faktor dar. Eine ebenfalls wesentliche Rolle spielen der Wirt, das Substrat und die Zeit (Splieth 2000), so dass es sich um eine opportunistische Infektion handelt.

Die Entstehung einer parodontalen Entzündung ist an das Vorhandensein von Plaque geknüpft (Rosan *et al.* 1982a; Patters *et al.* 1983). Hierbei handelt es sich allerdings nicht um einen Säureangriff, sondern um eine proteolytisch enzymatische Gewebeerstörung (Marsh und Bradshaw 1995). Bereits nach drei Tagen ohne Mundhygienemaßnahmen lassen sich an der Gingiva erste Entzündungszeichen erkennen (McKee *et al.* 1985; Millward und Wilson 1989; Brex *et al.* 1990; Marsh 1992), die jedoch reversibel sind. Wie auch bei der Kariesentstehung sind neben der reinen Plaque noch andere Faktoren nötig. Hierzu gehören die Anwesenheit pathogener Keime (*Actinobacillus actinomycetemcomitans* s.o.), ein günstiges Milieu und eine veränderte Resistenzlage des Wirtes. Man bezeichnet daher auch die entzündlichen Parodontopathien heute als opportunistische Infektionen (Hellwig *et al.* 1995). Früher wurden die Karies und die Parodontitis als reine Folge der Plaqueentstehung angesehen. Dabei unterschied man eine unspezifische von einer spezifischen Plaquehypothese. Die unspezifische Plaquehypothese ging von der Quantität der vorhandenen Plaque aus, die spezifische von der in der Plaque vorhandenen Bakterienqualität (Marsh 1993, 1999).

### 1.3 *In vitro* Modelle und deren Entwicklung

Experimentelle Studien natürlicher dentaler Plaque in Form von *in vivo* Untersuchungen an Menschen oder Tieren sind nur eingeschränkt möglich. Für die Prüfung antimikrobieller Substanzen spielen daher in der heutigen Zeit nur *in vitro* Studien mit Modellen eine sinnvolle und bedeutende Rolle. Früher übliche *in vivo* Studien kommen fast nur noch zur Anwendung, wenn die Testphase im Modellversuch abgeschlossen ist (Sissons 1997). Dazu beigetragen haben die Formulierung bzw. die Veränderung ethischer Grundsätze, die es verboten eine Gingivitis durch einfache Plaqueakkumulation zu induzieren (Sissons 1997). Auch der Kostenfaktor teurer klinischer Prüfungen lässt sich durch Modelle erheblich senken (Pratten *et al.* 1998b). In den letzten 20 Jahren hat sich neben dem gesteigerten Bedürfnis einer verbesserten Testung pharmazeutischer Produkte und deren Langzeitwirkungen auch ein Interesse an einer verminderten Anzahl von Tierversuchen für solche Testungen durchgesetzt. Darüber hinaus werfen *in vivo* Studien eine Reihe von Problemen auf, die die Reproduzierbarkeit zwischen verschiedenen Studien, die Wiederholbarkeit innerhalb einer Studie oder die Probengewinnung betreffen, um nur einige Punkte zu nennen (Sissons 1997).

Im Laufe der Zeit wurden die unterschiedlichsten Modelle entwickelt. Heute basieren Aussagen über einen zu erwartenden Effekt *in vivo* auf einer limitierten Anzahl von *in vitro* Tests (McDermid *et al.* 1987; Scheie 1994). Nach Costerton *et al.* (1987), Brown und Gilbert (1993), Costerton *et al.* (1994, 1995), Gilbert (1995), Kinniment *et al.* (1996) und Bradshaw und Marsh (1999) ist jedoch Vorsicht vor einer Extrapolation von *in vitro* Ergebnissen auf die Situation *in vivo* geboten. Das gilt in besonderem Maß für Studien, die Ergebnisse aus Versuchen mit planktonischen Zellen auf die *in vivo* Biofilm-Realität

anwenden (Costerton *et al.* 1995). Nach Anwar *et al.* (1990), Hoyle und Costerton (1991), Gilbert *et al.* (1993) sowie Costerton (1999) werden Untersuchungen zur antimikrobiellen Wirksamkeit immer noch überwiegend an Testsystemen mit planktonischen Bakterien durchgeführt. Das ist allerdings abzulehnen (Pratten *et al.* 1998a und b), da sich planktonische Zellen und Biofilme grundlegend unterscheiden (Costerton 1995; Costerton *et al.* 1995; Bowden und Li 1997; Costerton 1999). In Bezug auf die Adhäsionskinetik von Biofilmen, d.h. das Biofilmwachstum unter Berücksichtigung verschiedener Variablen, warnt Bryers (1993) ebenfalls vor einer einfachen Extrapolation der *in vitro* Simulation auf die *in vivo* Situation.

Alle Testmethoden, die auf der Grundlage eines Modells basieren, müssen bestimmte Bedingungen erfüllen. Nur dann ist es sinnvoll eine Methode allgemein anzuerkennen (Zelver *et al.* 1999). Zu den erwähnten Bedingungen gehören:

a) Möglichst nicht beeinflussbare Messtechniken

Zelver *et al.* (1999) führen als Beispiel die Methode der Wirksamkeitsüberprüfung von Antiseptika auf Biofilme an. Sie schlagen vor, die lebenden Zellen mittels einer Vitalfärbung direkt unter dem Mikroskop, das sozusagen im Versuch zwischengeschaltet ist, auszuzählen. Zusätzlich kann die Aktivität der angehafteten Zellen durch die Respirometrie bestimmt werden. So können Beeinflussungen vermieden werden, die bei der Verdünnungsmethode eine Rolle spielen. Zu beachten ist z.B. die Neutralisationsproblematik (s.a. Abschnitt **4.1 Diskussion**). Gemeint ist hiermit, dass den Biofilmen nach einer bestimmten Einwirkzeit des Antiseptikums ein geeignetes und spezifisches

Neutralisationsmittel zugefügt werden muss. Ansonsten würde das Antiseptikum weiter wirken können, während die verdünnten Zellkulturen auf Platten mit geeigneten Nährmedien für die Auszählung bebrütet werden. Das Neutralisationsmittel muss effektiv sein und darf keine Toxizität besitzen.

b) Wiederholbarkeit

Innerhalb eines Versuches sollen die Ergebnisse gleich sein. Da es sich bei der Wirksamkeitstestung von Antiseptika um mikrobiologische Experimente handelt, ist es nicht möglich immer die exakt gleiche Zellzahl zu erhalten. Aus diesem Grund müssen statistische Grenzen festgelegt werden, innerhalb derer sich die Versuchsergebnisse bewegen dürfen.

c) Reproduzierbarkeit

Mit Reproduzierbarkeit ist gemeint, dass verschiedene Labore oder Studiengruppen gleiche oder innerhalb definierter statistischer Grenzen ähnliche Ergebnisse erzielen müssen, d.h. dass die Reproduzierbarkeit über eine Fehlergrenze definiert ist (McKee *et al.* 1985). Dies ist wichtig, um ein Modell als Standardmethode anerkennen zu können. Als Kriterien für Reproduzierbarkeit gelten das Alter der verwendeten Biofilme (Bradshaw *et al.* 1996), die Verwendung des gleichen Keimes bzw. homogener Populationen (Gilbert *et al.* 1987; Sissons 1997) und die ausschließliche Verwendung von Modellen, die die kontinuierliche Flusskultur-Technik (cfc = continuous flow culture technique) verwenden (Bowden 1999; McLean *et al.* 1999), d.h. die ein steady state erzeugen (Dibdin und Wimpenny 1999). Oftmals bieten Modelle jedoch nur Bedingungen, die nicht reproduzierbar sind (Keevil *et al.* 1987), da in der

Reproduzierbarkeit die größte Schwierigkeit liegt (Gilbert 1987, 1995). Jedes Modell muss demnach sorgfältig entwickelt werden, besonders wenn es die *in vivo* Situation simulieren soll (Liljemark *et al.* 1997).

Der Ruf nach einer solchen Art von Reglements ist schon in den frühen 70er Jahren laut geworden; es sollten gewisse Standardisierungen für Tests eingeführt werden (Ericsson und Sherris 1971).

Generell gesehen sind Modelle einfacher zu kontrollieren, da gezielt spezielle Parameter verändert werden können (Wimpenny 1982; McKee *et al.* 1985; Keevil *et al.* 1987; McDermid *et al.* 1987; Sissons 1997; Wimpenny 1997). Allein die ruhigen, geordneten Verhältnisse im Labor erlauben eine bessere Beobachtung (Anwar *et al.* 1992) und vereinfachen die Forschung wesentlich (Wimpenny 1982). *In vitro* Modelle leisten somit eine mögliche Hilfestellung zum Verständnis der Struktur und Funktionsweise von Biofilmen (Kinniment *et al.* 1996). Diese Informationen könnten wiederum dazu beitragen, die Wirksamkeit antimikrobieller Substanzen zu verbessern sowie neue Produkte zu entwickeln.

In den letzten 30 Jahren sind eine Vielzahl von *in vitro* Modellen entwickelt worden (Wimpenny 1982; McDermid *et al.* 1987; Skowlund 1990). Nur wenige können jedoch die natürlichen Verhältnisse speziell in der Mundhöhle möglichst genau simulieren (Wimpenny 1982). An diesem Punkt teilt sich die Meinung der Forschung in zwei Lager: Die einen fordern von einem Modell höchste Komplexität und Nähe zur Realität (Wimpenny 1982, Sissons 1997), um die natürlichen Gegebenheiten genau nachempfinden

(Pratten *et al.* 1998a) und die Ergebnisse auf die *in vivo* Situation übertragen zu können (s.o.). Die anderen vertreten die Meinung, dass mikrobiologische Tests alleine nicht aussagekräftig sind, da in der Mundhöhle sehr viele Faktoren komplex zusammenwirken (Herles *et al.* 1994). Damit wird impliziert, dass ein Modell niemals eine komplexe Situation imitieren kann (Scheie 1994; Fine 1995; Bowden 1999) und somit eine Übertragung der *in vitro* Ergebnisse auf die *in vivo* Situation nicht zulässig ist (s.o.). Aus diesem Grund ist eine direkte Simulation der Mundhöhle mit einem Modell nicht beabsichtigt (McKee *et al.* 1985). Es müssen lediglich gewisse Parameter erfüllt sein, die für den Versuch von Interesse sind (McKee *et al.* 1985; Herles *et al.* 1994). Dazu gehören unter anderem Praktikabilität (Bowden 1999) und Reproduzierbarkeit (Bradshaw und Marsh 1999) (s.o.).

Unabhängig von der Komplexität, aber abhängig von der zu untersuchenden Fragestellung, muss man das geeignete Modell aus dem vielseitig vorhandenen Angebot herausuchen (Gjaltema und Griebe 1995; Wimpenny 1997).

Eine Einteilung der bekannten Modelle kann auf vielfältigste Weise erfolgen. Gilbert (1995) schlägt eine Gruppierung in replikative und investigative Modelle vor. Replikative Modelle sind so zahlreich denkbar, wie es ökologische Nischen gibt, und versuchen, die Natur genau nachzuahmen. Dabei können verschiedene Variablen wie Temperatur, pH-Wert usw. untersucht werden. Solche Studien haben jedoch nur wenig zum Verständnis der Biofilmphysiologie oder zur Entwicklung von Theorien beigetragen. Auf Grund des Modelldesigns können jedoch Ergebnisse relativ problemlos von der *in vitro* auf die *in vivo* Situation übertragen werden. Im Gegensatz dazu stehen investigative Modelle. Sie versuchen nicht die Natur nachzuahmen,

sondern sie simplifizieren sie und konzentrieren sich auf bestimmte Parameter, die einen Einfluss auf die Struktur und die Funktion von Biofilmen haben. Beispielsweise kann mit dem Roto Torque, Radial Flow und Rotating Disc Reactor sowie in geringerem Umfang mit dem Robbins Device der Effekt von dynamischen Flüssigkeitskräften auf die Bildung von Biofilmen untersucht werden. Schwierigkeiten bereitet jedoch die Reproduzierbarkeit der Experimente. Nachteilig ist außerdem, dass die Ergebnisse nicht ohne Einschränkungen auf die *in vivo* Situation übertragen werden können.

Wimpenny (1996, 1997) teilt die Modelle dagegen anhand einer Hierarchie ein. An erster Stelle steht das Ökosystem selbst. Hierbei handelt es sich eigentlich nicht um ein Modell, sondern um die Darstellung der *in vivo* Situation. Direkt unter diesem Level ist der sog. Mikrokosmos anzusiedeln. Dieser wird definiert als der Versuch, ein intaktes, nur minimal gestörtes Stück eines Ökosystems ins Labor zu überführen und dort unter natürlichen Bedingungen zu studieren. Dies ist im Hinblick auf zahnmedizinische Studien mit dem Begriff des künstlichen Mundes (Ten Cate und Marsh 1994) gleichzusetzen. Wichtig für die Simulation der Mundhöhle ist eine ausreichende Bakterienvielfalt im Versuchsaufbau, d.h. es muss mehr als eine Bakterienart vorhanden sein (Bradshaw *et al.* 1995, 1996; Marsh 1999; McLean *et al.* 1999; Schierholz *et al.* 1999). Der nächst tiefere Level ist dann das *in vitro* Modell. Es spiegelt die natürlichen Gegebenheiten simplifiziert wider und konzentriert sich auf die Untersuchung weniger ausgesuchter Parameter (Ten Cate und Marsh 1994). Ein gutes Modell liefert reproduzierbare und vergleichbare Daten. Nach Brown und Gilbert (1993), Pratten *et al.* (1998a und b) sowie Pratten und Wilson (1999) sind diese Bedingungen nur beim Constant Depth Film Fermenter (CDFF) hinreichend erfüllt. Zu

beachten ist, dass die Grenze zwischen einem Mikrokosmos und einem *in vitro* Modell fließend ist. Gibt man z.B. einen Zahn in einen Chemostat, um auf der Zahnoberfläche einen Biofilm entstehen zu lassen, handelt es sich um einen Mikrokosmos. Wird das Substrat jedoch ausgetauscht, d.h. wird der Zahn durch Hydroxylapatit-Plättchen ersetzt, ist aus dem Mikrokosmos ein *in vitro* Modell geworden (Wimpenny 1997). Auf dem vierten und letzten Level steht das mathematische Modell. Dieses ist sehr abstrakt und behandelt ein reales Phänomen in einer einfachen Art und Weise. Charakteristische Eigenschaften eines Systems werden in mathematische Gleichungen übersetzt. Jede Gleichung versucht Beziehungen zwischen dem Modell und der Realität zu definieren, wobei die Gleichung allgemein gültigen Charakter haben soll. Schlüsselfunktion des mathematischen Modells ist die Vorhersage bestimmter natürlicher Verhaltensweisen, z.B. von Biofilmpopulationen. Vor dem Hintergrund der resultierenden Hypothesen werden dann Experimente entwickelt, die die Hypothesen bestätigen oder widerlegen sollen. Es wurden verschiedene Arten von Modellen erarbeitet und definiert. Einen guten Überblick hat Wimpenny (1997) publiziert. Weitere Beispiele für die mathematische Behandlung der Biofilmproblematik geben Beyenal und Tanyolac (1994), Ojha und Shrivastava (1997, 1998), Kreft *et al.* (1998) sowie Picioreanu *et al.* (2000).

Bei Peyton und Characklis (1995) wird zwischen offenen und geschlossenen Systemen unterschieden. Ein offenes System ist durch ständigen Medienaustausch gekennzeichnet, wie er bei der cfc-Technik (s.o.) gewährleistet ist. Geschlossene Systeme stellen einfache Versuchsgefäße dar, die keinen Medienaustausch erlauben.



Allgemein geht der Trend zu Modellen, die eine Testkörperentnahme während des Versuchs erlauben (Ten Cate und Marsh 1994).

Jedes *in vitro* Modell zu beschreiben würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen. Es sei deshalb auf die Veröffentlichungen von Wimpenny (1996, 1997, 1999) hingewiesen, die einen guten Überblick über die Entwicklung von Modellen, deren Funktionsweise und über die heute gebräuchlichen Geräte geben.