

**In-vitro-Studie zur antibakteriellen Wirkung von Kiefernkernholz-Extrakt  
auf orale Mundspezies**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor medicinae dentariae (Dr. med. dent.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der  
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von  
Nicole Senft

November 2011

Gutachter:

1. PD Dr. med. dent. Sigrun Eick, Klinik für Parodontologie, Universität Bern
2. PD Dr. med. dent. Arndt Günsh, Klinik für konservierende Zahnheilkunde, Friedrich-Schiller-Universität Jena
3. Prof. Dr. med. habil. Wolfgang Pfister, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Friedrich-Schiller-Universität Jena

Tag der öffentlichen Verteidigung:

04.09.2012



**I Abkürzungsverzeichnis**

Abb.	Abbildung
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CHX	Chlorhexidindigluconat
CPC	Cetylpyridiniumchlorid
et al.	und andere
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
KBE	Koloniebildende Einheiten
KKH	Kiefernkernelholz
MHK	Minimale Hemmstoffkonzentration
MRSA	Methicillin-resistenter Staphylokokkus aureus
NaOCl	Natriumhypochlorit
p	Wahrscheinlichkeit (Verteilung)
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDT	Photodynamische Therapie
Tab.	Tabelle
u. a.	unter anderem
z. B.	zum Beispiel

<b>II</b>	<b>Inhaltsverzeichnis</b>	
<b>I</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>4</b>
<b>II</b>	<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>5</b>
<b>III</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>7</b>
<b>IV</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>8</b>
<b>1</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>11</b>
2.1	Bedeutung und Möglichkeiten der oralen Desinfektion.....	11
2.2	Mikroflora der Mundhöhle.....	15
2.2.1	Mikrobielle Gemeinschaften einer gesunden Mundhöhle.....	16
2.2.2	Erkrankungen der Mundhöhle als Folge pathogener Lebensgemeinschaften.....	18
2.3	Bedeutung von Holz als mögliche antimikrobielle Substanz.....	22
2.3.1	Aufbau und Funktion eines Baumstammes.....	22
2.3.2	Antibakterielle Eigenschaften verschiedener Holzarten.....	23
2.4	Kiefernkernholz.....	25
2.4.1	Untersuchungen zu Kiefernkernholz.....	26
2.4.2	Untersuchungen zu Kiefernkernholzextrakten.....	29
<b>3</b>	<b>Ziele der Arbeit</b> .....	<b>30</b>
<b>4</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>32</b>
4.1	Materialien.....	32
4.1.1	Mikroorganismen und Zellkulturen.....	32
4.1.2	Kiefernkernholzextrakt.....	34
4.1.3	Herstellung der Bakteriensuspensionen.....	35
4.2	Methoden.....	36
4.2.1	Bakterizide Wirkung.....	36
4.2.2	Wachstumshemmender Effekt.....	37
4.2.3	KKH-Extrakt: Wirkungen auf Biofilme.....	38
4.2.3.1	Wirkung auf einen entstehenden oralen Biofilm.....	39
4.2.3.2	Wirkung auf einen jungen etablierten Biofilm.....	41
4.3	Statistische Auswertung.....	44

<b>5</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>45</b>
5.1	Bakterizide Wirkung gegenüber oralen Spezies .....	45
5.1.1	Orale Streptokokken.....	45
5.1.2	Grampositive anaerobe Bakterien.....	47
5.1.3	Porphyromonas gingivalis.....	49
5.1.4	Weitere kapnophile und gramnegative Anaerobier.....	50
5.1.5	Superinfektionserreger.....	52
5.2	Minimale Hemmstoffkonzentration.....	54
5.3	Auswirkung von Kiefernkernel-Extrakten auf Biofilme.....	56
5.3.1	Bildung von Biofilmen auf Kiefernkernel-Extrakt getränkten Oberflächen.....	56
5.3.2	Einfluss von Kiefernkernel auf biofilmttragende Oberflächen.....	58
5.4	Zusammenfassende Ergebnisbetrachtung.....	61
<b>6</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>62</b>
6.1	Methodik.....	62
6.1.1	Bakterizide Wirkung.....	63
6.1.2	Minimale Hemmstoffkonzentration.....	64
6.1.3	Wirkungen auf Biofilme.....	65
6.2	Ergebnisse.....	66
6.3	Mögliche klinische Anwendung.....	70
<b>7</b>	<b>Schlussfolgerungen.....</b>	<b>72</b>
<b>8</b>	<b>Literatur- und Quellenverzeichnis.....</b>	<b>73</b>
8.1	Internetverzeichnis.....	85
8.2	Bildnachweis.....	85
	<b>Ehrenwörtliche Erklärung.....</b>	<b>86</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>87</b>

### III Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Makroskopische Gliederung eines Baumstammes im Querschnitt.....	22
Abb. 2:	Bakterizide Wirkung verschiedener Konzentrationen KKH-Extrakt auf orale Streptokokken zu drei Zeitpunkten im Vergleich zur Kontrolllösung.....	45
Abb. 3:	Keimabtötende Wirkung von 1-fach konzentriertem KKH-Extrakt auf die verschiedenen Streptokokkenspezies nach einer Einwirkzeit von 60 Minuten.....	46
Abb. 4:	Bakterizide Wirkung verschiedener Konzentrationen KKH-Extrakt auf grampositiv-anaerobe Keime orale Streptokokken zu drei Zeitpunkten im Vergleich zur Kontrolllösung.....	47
Abb. 5:	Keimabtötende Wirkung von 1-fach konzentriertem KKH-Extrakt auf die verschiedenen grampositiv-anaerobe Keime nach einer Einwirkzeit von 60 Minuten.....	48
Abb. 6:	Bakterizide Wirkung verschiedener Konzentrationen KKH-Extrakt auf <i>Porphyromonas gingivalis</i> und seiner klinischen Isolate zu drei Zeitpunkten im Vergleich zur Kontrolllösung.....	49
Abb. 7:	Keimabtötende Wirkung von 1-fach konzentriertem KKH-Extrakt auf die verschiedenen <i>Porphyromonas gingivalis</i> Spezies nach einer Einwirkzeit von 60 Minuten.....	50
Abb. 8:	Bakterizide Wirkung verschiedener Konzentrationen KKH-Extrakt auf kapnophile und gramnegative Anaerobier zu drei Zeitpunkten im Vergleich zur Kontrolllösung.....	50
Abb. 9:	Keimabtötende Wirkung von 1-fach konzentriertem KKH-Extrakt auf die verschiedenen kapnophilen und gramnegativen anaeroben Bakterien nach einer Einwirkzeit von 60 Minuten.....	51
Abb. 10:	Bakterizide Wirkung verschiedener Konzentrationen KKH-Extrakt auf Superinfektionserreger zu drei Zeitpunkten im Vergleich zur Kontrolllösung.....	52
Abb. 11:	Keimabtötende Wirkung von 1-fach konzentriertem KKH-Extrakt auf die verschiedenen Superinfektionserreger nach einer Einwirkzeit von 60 Minuten.....	53
Abb. 12:	Summierte minimale Hemmstoffkonzentration von fünf Bakteriengattungen nach einer Stunde Einwirkzeit.....	54
Abb. 13:	Bildung eines <i>S. mutans</i> -Biofilms auf KKH-Extrakt beschichteten Oberflächen verschiedener Konzentration.....	56

Abb. 14:	Bildung eines <i>P. gingivalis</i> -Biofilms auf KKH-Extrakt beschichteten Oberflächen verschiedener Konzentration.....	57
Abb.15:	Bildung eines komplexen Biofilms auf KKH-Extrakt beschichteten Oberflächen verschiedener Konzentration.....	58
Abb. 16:	Einfluss von KKH-Extrakt verschiedener Konzentrationen auf einen etablierten <i>S. mutans</i> -Biofilm nach einer 6-stündigen Reifungsphase.....	59
Abb. 17:	Einfluss von KKH-Extrakt verschiedener Konzentrationen auf einen etablierten <i>P. gingivalis</i> -Biofilm nach einer 6-stündigen Reifungsphase.....	59
Abb. 18:	Einfluss von KKH-Extrakt verschiedener Konzentration auf einen etablierten komplexen Biofilm nach einer 6-stündigen Reifungsphase.....	60

#### **IV Tabellenverzeichnis**

Tab. 1:	Übersicht der untersuchten Mikroorganismen.....	32
Tab. 2:	Prozentuale Auswertung der ermittelten Wachstumshemmung bezogen auf getestete Bakterienstämme (Anzahl der sensiblen Keime in Prozent).....	55

## 1 Zusammenfassung

Karies und Parodontitis sind trotz intensiver Präventionsmaßnahmen und ausgereifter Therapiekonzepte die bedeutendsten Erkrankungen des stomatologischen Systems. Gezielte Behandlungen führten in den letzten Jahren zu stetig steigenden Ausgaben im Gesundheitswesen.

In der Pathogenese dieser beiden Erkrankungen spielen orale Mikroorganismen eine wesentliche Rolle. Ein Problem der Therapie dieser oralen Infektionen ist die Biofilmbildung. Mit zunehmendem Reifungsgrad der Plaque steigt auch deren Resistenz, vor allem gegenüber chemisch-pharmakologischen Interventionen. Für die Plaquekontrolle stehen dem Patienten Mischpräparate in Form von Zahnpasten und Mundspüllösungen zur Verfügung. In einem Großteil dieser Produkte lassen sich ätherische Öle nachweisen. Vor allem Mundspüllösungen besitzen erst durch die Kombination verschiedenster Pflanzeninhaltsstoffe ein breites Wirkspektrum.

Der holzverarbeitende Betrieb Wilms<sup>®</sup> mit Geschäftssitz in Bad Essen-Barkhausen erkannte bereits Anfang der 60er Jahre das bakterizide Potential seiner aus Kiefernkerneholz angefertigten Produkte.

In dieser In-vitro-Studie wurde ein Kiefernkerneholzextrakt (Wilms<sup>®</sup>) untersucht. Das aus dem Kernholz der Kiefer extrahierte Substrat wurde in Bezug auf seine antibakteriellen Eigenschaften gegenüber 28 kariogenen und parodontalpathogenen Mikroorganismen getestet. Somit sind erstmalig die rein chemisch-pharmakologischen Stoffeigenschaften durch die Herstellung einer Extrakt-Lösung betrachtet worden.

Zum einen wurden zeit- und konzentrationsabhängige Untersuchungen konzipiert, in denen das Verhalten von Einzelkeimen gegenüber KKH-Extrakten geprüft wurde. Jede mikrobielle Spezies wurde dazu für 10, 30 und 60 Minuten vier unterschiedlichen KKH-Extrakt-Konzentrationen (0,05-, 0,1-, 0,5-, 1-fach) ausgesetzt. Weiterhin wurde die minimale Hemmstoffkonzentration bestimmt.

Zum anderen sollte der Frage nachgegangen werden, inwiefern sich Etablierung bzw. Reifung von Biofilmen beeinflussen lassen. Auf handelsüblichen Objektgläsern wurden dafür

Biofilme aus aeroben und anaeroben Spezies entwickelt. Vor und nach der Formation der Biofilme wurden die Glasträger fünf Minuten dem KKH-Extrakt ausgesetzt.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass KKH-Extrakte antibakterielle Eigenschaften besitzen. In Abhängigkeit von Konzentration und Zeit liegen unterschiedliche Empfindlichkeiten der einzelnen Keime vor. Die Mehrheit der getesteten Mikroorganismen konnte bei einer 0,5-fach konzentrierten Lösung abgetötet werden. Mit steigender Konzentration konnte eine Wirkungsverstärkung festgestellt werden. Die parodontalpathogene Spezies *Porphyromonas gingivalis* wurde unter den getesteten Extrembedingungen nahezu vollständig abgetötet.

Die Akkumulation der Mikroorganismen auf Oberflächen wurde erschwert, wenn diese vor Adhäsion und Organisation der Keime mit dem KKH-Extrakt beschichtet wurden. Diese Biofilme etablierten sich schlechter auf Oberflächen. Keime, die bereits in einem Biofilm-Verbund organisiert waren, wiesen eine deutlich höhere Resistenz gegenüber der Testsubstanz auf. Sie zeigten nach Extraktzugabe keine wachstumshemmenden Veränderungen.

Im Vergleich mit anderen, auf Pflanzenextrakten basierenden, oralen Desinfizienzien wird deutlich, dass KKH-Extrakte ähnliche antibakterielle Eigenschaften aufweisen.

Aufgrund der Erkenntnisse stellen KKH-Extrakte ein nützliches Agens - vor allem gegen das parodontalpathogene Keimspektrum - dar.

## **2 Einleitung**

### **2.1 Bedeutung und Möglichkeiten der oralen Desinfektion**

Seit 1991 verzeichnet die Kassenzahnärztliche Bundesvereinigung (KZBV) in Deutschland einen kontinuierlichen Kostenanstieg für konservativ-chirurgische Eingriffe. Innerhalb des Zeitraumes von 1991 bis 2009 stiegen die Kosten um 28 %.

Diese Entwicklung trifft seit fünf Jahren auch für Parodontalbehandlungen zu. Im Vergleich zu den Vorjahren sind die finanziellen Belastungen für parodontalchirurgische Eingriffe durchschnittlich doppelt so hoch ausgefallen wie die für konservierende Leistungen. In Zahlen ausgedrückt bedeutet dieser Trend für das Jahr 2009 im konservierenden Bereich eine 1,6%ige und für Parodontalbehandlungen eine 3,8%ige Zunahme der Ausgaben im Vergleich zum Vorjahr (KZBV Jahrbuch 2010).

Eine mögliche Ursache für die steigende Kostenentwicklung wird mit der Zunahme von Zahnbetterkrankungen und den einhergehenden Gingivitiden mit Zahnfleischrückgang begründet. Infolgedessen steigt die Zahl sichtbarer Wurzeloberflächen. So weisen 21,5 % der Erwachsenen und 45,0 % der Senioren mindestens eine kariöse oder gefüllte Wurzeloberfläche auf. Die IV. deutsche Mundgesundheitsstudie belegt, dass 52,7 % der Erwachsenen zwischen dem 35. und 44. Lebensjahr Taschentiefen zwischen 4 - 5 mm bzw. 20,5 % bereits stärker ausgeprägte Sondierungstiefen von mehr als 6 mm aufweisen. Mit zunehmendem Lebensalter nimmt auch der Anteil von Parodontitiden mit einer CPI-Grad-4-Beteiligung zu. Davon sind bereits 39,8 % der Senioren betroffen (DMS IV).

Ausschlaggebend für Erkrankungen der Mundhöhle sind Mikroorganismen, die sich zu Biofilmen formatieren und humanpathogene Eigenschaften ausbilden können. Die Folgen sind vielfältig. Karies, Parodontitis, Endodontitis und Mundschleimhautrekrankungen sind nur einige Krankheitsbilder, die mit hohen Keimbelastungen und spezifischem Keimvorkommen einhergehen (Aparna et al. 2008).

Bestimmte orale Bakterien konnten mit einigen systemischen Erkrankungen in Zusammenhang gebracht werden. Bakterielle Endokarditiden, Aspirationspneumonien, Osteomyelitiden bei Kindern, ein geringes Geburtsgewicht insbesondere bei Frühgeborenen und kardiovaskuläre Erkrankungen sind nur einige Beispiele, bei denen sich oral-pathogene

Keime nachweisen lassen (Agueda et al. 2008, Besimo 2008, Aas et al. 2005, Munro et al. 2004).

Die Förderung der Mundgesundheit und die Biofilmbkontrolle werden im Wesentlichen durch mechanische, chemische und biologische Faktoren bestimmt. An erster Stelle steht die mechanische Intervention durch Zahnbürste, Zahnseide, Interdentalraumbürstchen und Zungenreiniger. Dadurch wird die Biofilmbildung unterbrochen und die Plaque von Zahn- bzw. Gewebsoberflächen entfernt (Dörfler et al. 2007).

Chemische oder auch pharmakologische Maßnahmen in Form von Mundspüllösungen und Gelen unterstützen die mechanische Reinigung der Mundhöhle durch eine zusätzliche Keimzahlreduktion. Da Mundspüllösungen in der alleinigen Anwendung ohne physikalische Intervention nicht effizient sind, ist ihre Verwendung nur als zusätzliche, unterstützende Hygienemaßnahme sinnvoll (Pitten et al. 2001). Der biologische Faktor wird maßgeblich von den Ernährungsgewohnheiten geprägt. Biofilme als Folge der Metabolisierung niedermolekularer Kohlenwasserstoffe entwickeln sich unter anderem substratabhängig. Dieser biologische Faktor ist individuell unterschiedlich und neben der Ernährung auch von der Zeit, dem Wirt und der Keimbelastung bzw. -qualität abhängig (König 1972).

Im Folgenden soll ein Überblick über etablierte chemisch-pharmakologische Inhaltsstoffe gegeben werden. Besonders relevante Wirkstoffe bzw. Wirkstoffgruppen werden anschließend kurz charakterisiert.

In der Zahnheilkunde stehen für diese antimikrobiellen Substanzen verschiedene Applikationsformen wie Zahnpasten, Mundspüllösungen oder Zahnpflegekaugummi zur Verfügung.

Auf dem Markt erhältliche Mundspüllösungen enthalten vor allem Chlorhexidin (CHX), Cetyl-Pyridinium-Chlorid (CPC), Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), ätherische Öle (Eukalyptus-, Teebaumöl), Amin- und Zinnfluoride, Zink-Ionen und Triclosan als Inhaltsstoffe. Für die chemisch-pharmakologische Plaquekontrolle sind Alkaloide (Sanguinarin), Antibiotika, Bisbiguanidine, Detergentien (Hexitidin, Natriumlaurylsulfate), Phenole und Polyalkohole ebenfalls wesentliche Bestandteile eines systematischen Mundhygieneregimes geworden (Güth 2008, Marsh 2004, David 1997).

Alle diese Substanzen haben das Ziel, die humanpathogenen Eigenschaften der Krankheitserreger durch unterschiedliche Angriffspunkte im Stoffwechsel zu reduzieren.

Chlorhexidin: Aufgrund des breiten Wirkspektrums gegen grampositive und -negative Mikroorganismen, der hohen Substantivität in der Mundhöhle und der geringen toxischen Dosis von 2 g/kg bei oraler Gabe ist CHX in vielen Anwendungsbereichen einsetzbar. Für die Gingivitis-therapie ist die Hemmung des supragingivalen Bakterienwachstums essentiell. Zudem unterstützt CHX die Erfolgsrate des subgingivalen Scalings. Weitere Anwendung findet CHX in der Therapie der oralen Candidiasis und Halithosis, aber auch in der täglichen Mundhygiene (Güth 2008, Munro et al. 2004). Im Konzentrationsbereich von 0,2 - 2 % wird CHX als Zusatzspülung bei Wurzelkanalbehandlungen eingesetzt. Es hat sich bei Kontaminationen mit Enterokokken und Pilzen als sinnvolles Präparat erwiesen (Barthel et al. 2006).

Wasserstoffperoxid: Die Anwendung von  $H_2O_2$  führt zu einer signifikanten Reduktion von Entzündungsparametern und besitzt somit antibakterielle Eigenschaften. Niedrige Konzentrationen von 1,5 % und weniger haben keine negativen Einflüsse auf die Mundgesundheit. Auch höhere Konzentrationen von 6 % werden bei einmaliger Gabe pro Tag vom Gewebe gut toleriert. Lediglich die Häufigkeit der Anwendung limitiert den sicheren Einsatz. So kann 4-mal tägliches Spülen einer 1,5 % konzentrierten  $H_2O_2$ -Lösung zu Erythemen und Weichgewebsirritationen führen (Walsh 2000).

Natriumhypochlorit: Bei invasiven Eingriffen wird der oralen Antiseptik neben der bereits genannten CHX-Applikation unter anderem auch durch die Anwendung von Natriumhypochlorit (NaOCl) Rechnung getragen. Im Rahmen von Wurzelkanalbehandlungen sind neben der mechanischen Aufbereitung des Wurzelkanalsystems die antimikrobiellen Wirkungen von Spüllösungen für einen Therapieerfolg essentiell. Goldstandard ist 0,5 - 5%iges Natriumhypochlorit. Es zeichnet sich durch ein breites Spektrum bezüglich endodontisch relevanter Keime bei geringer Toxizität aus. Zudem unterstützt es durch seine gewebeauflösenden und neutralisierenden Eigenschaften den Aufbereitungsprozess (Barthel et al. 2006).

Alternativ zu diesen in der Arznei- und Kosmetikindustrie etablierten Präparaten existieren in der wissenschaftlichen Literatur neuere Ansatzpunkte zur Erweiterung antimikrobiell-orientierter Therapieoptionen.

Photodynamische Therapie: Das Prinzip der Photodynamischen Therapie (PDT) beruht auf der Tatsache, dass sich nicht-toxische Photosensitizer (meist Methylenblau) im Gewebe anreichern und durch Licht bestimmter Wellenlängen aktivieren lassen. Infolgedessen werden einwertiger Sauerstoff und freie Radikale gebildet, die zytotoxisch auf Bakterien wirken. In-vitro-Studien belegen eine Hemmung des Biofilmwachstums von 32 %, bei planktonisch vorkommenden Bakterien sogar von 63 % (Malik et al. 2010, Fontana et al. 2009). Klinische Erkenntnisse bestärken den Einsatz der PDT als unterstützende Intervention zur Behandlung von Parodontitiden (Sigusch et al. 2010, Dai et al. 2009).

Ozontherapie: Dreiwertiger Sauerstoff besitzt ein breites antimikrobielles Spektrum gegen Bakterien und Pilze. Es zerstört die Zellwände und die zytoplasmatische Membran dieser Mikroorganismen. Währenddessen bindet sich Ozon an Glykoproteine, Glykolipide oder andere Aminosäuren. Dadurch werden enzymatische Stoffwechselwege gehemmt und es kommt zum Zelltod. Die In-vitro-Wirksamkeit ist unumstritten, jedoch existieren zum Teil widersprüchliche Angaben über das Ausmaß des Wirkspektrums gegenüber der oralen Keimflora (Azarpazhooh und Limkeback 2008).

Ätherische Öle: Ätherische Öle mit ihren mehr als 100 Inhaltsstoffen lassen ein besonderes Potential vermuten. Listerine, das wohl bekannteste zahnmedizinische Präparat, dessen präventive Wirkung gegenüber Karies bereits seit 1889 bekannt ist, enthält ätherische Öle wie Thymol, Eukalyptol und Menthol (Adams und Addy 1994).

In den letzten Jahren erweckte Teebaumöl ein besonderes Interesse. Es konnte gezeigt werden, dass es gegen (multi)resistente Mikroorganismen wachstumshemmende Wirkung besitzt. In-vitro-Studien belegen, dass Teebaumöl effektiv gegen *MRSA*-Stämme und Imidazol-resistente Pilze ist. Zum Teil besitzt es eine stärker ausgeprägte Effektivität, als die konventionell eingesetzten Präparate (Kwieciński et al. 2009, Traboulsi et al. 2008, Bagg et al. 2006, Brady et al. 2006, Takarada et al. 2004). Auf dem Markt erhältliche Teebaumöl-Lösungen und -Gele, wie Tebodont, basieren auf diesen Erkenntnissen und bestätigen die antibakteriellen Eigenschaften gegenüber oralpathogenen Keimen. Durch den Rückgang von

Entzündungen und der Reduktion des Plaquebefalls können Gingivaindizes verbessert und die negativen Auswirkungen chronischer Gingivitiden reduziert werden. Teebaumöl kann in seiner Effektivität mit dem in der Praxis gängigen Chlorhexidin mithalten (Soukoulis und Hirsch 2004, Saxer et al. 2003).

Synthetisch hergestellte Wirkstoffe oder aus Pflanzen gewonnene Extrakte können die Behandlungsalternativen bereichern. Ein bis dato in der wissenschaftlichen Literatur noch nicht erfasstes Pflanzenöl sind die Extrakte des Kiefernknollenholzes. Welche Keimgruppen besonders auf Kiefernknollenholz-Extrakte ansprechen, soll diese Studie verifizieren.

## **2.2 Mikroflora der Mundhöhle**

Im Jahr 1683 skizzierte Anthony van Leeuwenhøek die ersten Keime, die er aus einem Abstrich seiner Mundhöhle gewonnen hatte. In sieben Zeichnungen beschrieb er Morphologie und Fortbewegung seiner Beobachtungsobjekte (Avila et al. 2009).

Bis dato lassen sich in der Mundhöhle 500 (Kolenbrander et al. 2002, Lamont 2002) - und wie andere Studien berichten - bis zu über 700 Mikroorganismen nachweisen. Wie viele Mikroorganismen tatsächlich in der Mundhöhle etabliert sind, lässt sich nur schwer bestimmen. Viele von diesen Spezies sind mit den heute verwendeten mikrobiologischen Techniken nicht kultivierbar. Man geht davon aus, dass mit den aktuellen Methoden 50 % der in der Mundhöhle lebenden Keime erfasst worden sind (Hojo et al. 2009, Aas et al. 2005, Jenkinson und Lamont 2005).

Die Mundhöhle ist von Natur aus keimbelastet. Dies ist für ihre normale, physiologische Entwicklung notwendig. Ein Großteil dieser Mikroorganismen lebt in einer symbiotischen Gemeinschaft miteinander und für gewöhnlich in einer kommensalen Beziehung zum menschlichen Organismus. Sie schützen vor einem übermäßigen Befall von pathogenen Keimen. Störungen der ortsansässigen Mikroflora können zu einer übermäßigen Proliferation pathogener Keime führen und somit das Risiko für Erkrankungen begünstigen (Marsh 2004).

### 2.2.1 Mikrobielle Gemeinschaften einer gesunden Mundhöhle

Die gesunde Mundhöhle beherbergt viele Spezies. Zu diesen zählen *Streptococcus*-, *Actinomyces*-, *Veillonella*-, *Fusobacterium*-, *Porphyromonas*-, *Prevotella*-, *Treponema*-, *Neisseria*-, *Haemophilis*-, *Eubacteria*-, *Lactobacterium*-, *Capnocytophaga*-, *Eikenella*-, *Leptotrichia*-, *Peptostreptococcus*-, *Staphylococcus*- und *Propionibacterium*-Spezies (Avila et al. 2009).

Grampositive Streptokokken, wie *Streptococcus salivarius* und *S. sanguinis*, sind die ersten Bakterien, die mit Speichelproteinen interagieren. Sie gehören zu den Frühbesiedlern und bilden damit die Grundlage für die Biofilmbildung (Rönström et al. 1977). Bereits vier Stunden nach Reinigung der Zahnoberfläche bildet sich ein Biofilm, der sich zu 60 - 90 % aus Streptokokken zusammensetzt. Die Streptokokken besitzen die Fähigkeit, in zahlreichen Interaktionen zwischen der eigenen Spezies, Wirtsproteinen und anderen Frühbesiedlern zu treten und so durch einen multifunktionellen Austausch mit ihrer Umgebung zu kommunizieren. Weitere Frühbesiedler sind Aktinomyzeten, Veillonellen und Neisserien (Avila et al. 2009, Jenkinson und Lamont 2005, Kolenbrander et al. 2002).

Die Interaktionen zwischen Bakterium und Speichelproteinen, wie Agglutinine, Glykoproteine oder Enzyme (Alpha-Amylase), wird durch die auf der Bakterienaußenseite befindlichen Pili-Proteine ermöglicht (Okahashi et al. 2011). Wesentliche Mechanismen für die initiale Bakterienadhäsion ist die Erkennung von Oligosacchariden durch Proteinadhäsine, Lektin-like-Reaktionen, Protein-Protein-Interaktionen und Reaktionen mit Antigen-Polypeptiden (Jenkinson und Lamont 2005, Loesche 1986). So wird die Adhäsion von Mutans-Streptokokken durch die Produktion von wasserunlöslichen Glukanen und den Oberflächenantigenen I/II ermöglicht (Takahashi et al. 2010).

Orale Mikroorganismen leben nicht isoliert voneinander, sondern bedürfen Gemeinschaften. Die Koaggregation zwischen verschiedenen Bakterien-Spezies und auch die Auto-Aggregation innerhalb einer Spezies stehen in einem engen Zusammenhang mit der Entstehung und Entwicklung dentaler Plaque und Biofilmen. Ausgeprägte Interaktionspartner sind Aktinomyzeten, Veillonellen, Prevotellen und Fusobakterien (Shen et al. 2005). Während der Ausbildung vielfältiger Kommunikationsnetze werden zunehmend die Gingiva und die Wangenschleimhaut von Mikroorganismen penetriert (Avila et al. 2009).

Die mikrobiellen Gemeinschaften haben Strategien entwickelt, die es ihnen ermöglichen, gegenüber verschiedensten mechanischen, chemischen und biologischen Irritationen zu bestehen. Unter anderem gelingt dies durch Biofilm- und Nischenbildung sowie durch den Aufbau ausgereifter Kommunikationssysteme. Als „quorum sensing“ wird in diesem Zusammenhang die Ausschüttung von Signalmolekülen einer Bakterienzelle bezeichnet. Wird ein bestimmter konzentrationsabhängiger Schwellenwert überschritten, kommt es zu einer gezielten Umstellung des Stoffwechsels anderer Bakterien (Avila et al. 2009, Aparna et al. 2008, Hellwig et al. 2007, Jenkinson und Lamont 2005).

Mikroorganismen und Biofilme lassen sich an verschiedenen Stellen in der Mundhöhle lokalisieren. Neben Zunge, Mukosa, Füllungen und prothetischen Arbeiten ist der Befall von Zahnoberflächen und deren umgebenden Strukturen ein beliebtes Reservoir (Aas et al. 2005).

#### Supragingivale Plaque

Supragingivale Biofilme sind heterogener aufgebaut als subgingivale. Prinzipiell lassen sich zwei Schichten erkennen, die in vier Typen unterteilt werden. Typ 1 wird als Aktinomyzeten-Typ bezeichnet, der 2. Typ weist eine vermehrte Interaktion mit Kokken auf (Aktinomyzeten-Kokken-Typ). Fadenbakterien, Streptokokken und Hefen bilden den 3. Typ. Im 4. Typ lassen sich Streptokokken und Laktobazillen nachweisen. Die abschließende Zelllage, die alle vier Typen gemeinsam haben, bildet ein Streptokokken-Laktobazillen-Biofilm (Zijnge et al. 2010). Laktobazillen und Aktinomyzeten sind an der Initiation und dem Fortschreiten der Wurzelkaries beteiligt. Bei der Isolation von Bakterien auf Wurzeloberflächen können überwiegend *Actinomyces israelii* und *A. naeslundii* gefunden werden (Brailsford et al. 2001).

#### Subgingivale Plaque

Die subgingivale Plaque setzt sich hauptsächlich aus drei Schichten zusammen. In der ersten und damit ältesten Zone befinden sich *Actinomyces*-Spezies. *Tannerella forsythia*, *Fusobacterium nucleatum* und andere gramnegative, anaerobe Spezies bilden eine intermediäre Schicht. Diese wird letztlich von einer Aggregation aus *Cytophaga*-, *Flavobacterium*- und *Bacteroides*-Spezies abgeschlossen (Zijnge et al. 2010).

Diese Interaktionen illustrieren die Komplexität solcher multibakteriellen Gemeinschaften. Man geht davon aus, dass das Überleben einzelner Keime außerhalb dieser Biofilme nicht

möglich ist. Der Grund dafür ist in den metabolischen Abhängigkeiten zu finden (Jenkinson und Lamont 2005).

Die Beziehungen zwischen zwei Keimen können antagonistischer oder synergistischer Natur sein. Das Zusammenleben vollzieht sich zwischen den mikrobiellen Besiedlern nicht immer konfliktfrei. Der Nachweis von bakteriotoxischen Stoffen, wie Wasserstoffperoxid und anderen Bakteriozinen, spricht für antagonistische Interaktionen im Biofilm (Kuramitsu und Wang 2006, Jenkinson und Lamont 2005).

Gewöhnlich zeigen fakultativ anaerob lebende Mikroorganismen wenige Tendenzen, mit obligat anaeroben Keimen zu aggregieren. Im Gegensatz dazu ist *Fusobacterium nucleatum* in der Lage, mit aeroben als auch mit anaeroben Bakterien zu kommunizieren und an Gewebe bzw. Immunglobuline zu binden. Es bildet damit das Brückenglied zwischen Früh- und Spätbesiedlern. Durch die Anwesenheit von *F. nucleatum* verbessern sich die Wachstumsbedingungen von *Porphyromonas gingivalis*. In Folge dessen werden indirekt mehr Anaerobier in den Biofilm integriert (Diaz 2002, Kolenbrander et al. 2002, Bradshaw et al. 1998). *P. gingivalis* ist neben *F. nucleatum* einer der wenigen Keime, der mehrwertig Interaktionen mit verschiedenen Streptokokken-Spezies, wie *S. gordonii*, entwickeln kann (Jenkinson und Lamont 2005, Lamont et al. 2002).

### **2.2.2 Erkrankungen der Mundhöhle als Folge pathogener Lebensgemeinschaften**

Für die Aufrechterhaltung der Mundgesundheit sind Biofilme notwendig. Andererseits sind Biofilme ebenfalls in der Lage, pathogene Eigenschaften auszubilden. Pathogen können diese Mikroorganismen durch verschiedene Faktoren werden. Erkrankungen dieser Art haben eine multifaktorielle Ätiologie, die zeit-, substrat-, wirts- und keimabhängig ist (König 1972). Diese Pathogenität variiert mit den Standortbedingungen und verstärkt sich in Folge insuffizienter Mundhygiene.

Neben diesen Faktoren ist die Immunlage gegenüber der ortsständigen Keimflora für das Fortschreiten dieser Infektionskrankheiten ausschlaggebend. Die größte Herausforderung für pathogene Mikroorganismen stellt demnach die Immunantwort des Wirtes dar. Um dieses zu überwinden, bilden sie gemischte Biofilme aus kommensalen Bakterien und potentiellen, pathogenen Spezies (Avila et al. 2009).

Karies: Bei der Alterung des Biofilms ändert sich die Mikroflora von Non-Streptokokken-dominant zu Aktinomyzeten-dominant. Für die Demineralisation von Zahnoberflächen ist die bakterielle Säureproduktion als Ergebnis des Kohlenhydrat-Stoffwechsels und der daraus resultierende pH-Wert-Abfall verantwortlich (Takahashi et al. 2010, Loesche 1986). Kariöse Läsionen sind bekannt, dass sie eine Reihe von Streptokokken-Spezies, Laktobazillen, Aktinomyzeten, Prevotellen und mitunter Candida-Stämme beherbergen. Mutans-Streptokokken sind Pionierkeime, die die Initiation der Karies wesentlich mitbestimmen (Jenkinson und Lamont 2005).

Parodontitis: In der subgingivalen Plaque lassen sich circa 500 Bakterien nachweisen. Allerdings stehen nur wenige dieser Keime mit der Genese marginaler Parodontitiden im Zusammenhang. Ebenso erkranken nicht alle Träger parodontalpathogener Keime an einer Parodontitis (Beikler et al. 2005). Das Keimspektrum, die Abwehrlage des Infizierten oder eine Medikamenteneinnahme können diese Entwicklung begünstigen. Dabei stehen verschiedene Mikroben mit unterschiedlichen Erkrankungsformen in Verbindung (Hellwig et al. 2007).

Gramnegative Keime sind wesentlich an der Entstehung von Parodontalerkrankungen beteiligt. Es ist bekannt, dass der Einfluss von *Aggregatibacter*-Spezies zu einer Aktivitätsänderung von Fibroblasten und somit im Zusammenhang von Parodontopathien zum Knochenabbau führt (Sanderink et al. 2004).

*Porphyromonas gingivalis* und *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* sind nachweislich in der subgingivalen Plaque und in parodontalen Taschen zu finden. Ein wesentliches Problem ist, dass diese subgingivalen Biofilme widerstandsfähig und kaum eliminierbar sind (Sanderink et al. 2004). Darüber hinaus können diese bei Bakteriämien, Endokarditiden und Wundinfektionen eine Rolle spielen (López et al. 2011, Zambon et al. 1985).

Eine Klassifikation verschiedener Parodontitisformen bezieht sich auf deren Erkrankungsverlauf. Zwischen den beiden am häufigsten vorkommenden Parodontitiden - der chronischen und der aggressiven Parodontitis - bestehen keine signifikanten Unterschiede in der Zusammensetzung der Keimflora (Rescala et al. 2010). Vor allem die Leitkeime *P. gingivalis*, *Tannerella forsythia* und *Treponema denticola*, die auch gemeinhin dem „roten Komplex“ zugeordnet werden, stellen ein hohes Risiko in der Entwicklung parodontaler

Krankheiten dar. Mit marginalen Parodontitiden kann bereits *T. forsythia* assoziiert werden. Dieser kommensal lebende Keim bezieht seine Stoffwechselkomponenten durch Interaktionen mit *F. nucleatum* bzw. *P. gingivalis*. Eine höhere Virulenz entwickeln *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum* und *T. denticola*, wenn diese in einem Biofilm integriert sind (Jenkinson und Lamont 2005).

Im parodontal-geschädigten Gebiss und im Rahmen von Abszessen ist mit der Anwesenheit von *Prevotella intermedia* und *P. oralis* zu rechnen. Zudem treten diese bei komplexen Gingivitiden, wie der nekrotisierend-ulzerierenden Gingivitis und der Schwangerschaftsgingivitis, auf (Sanderink et al. 2004).

*Capnocytophaga gingivalis* ist in der Lage, IgA zu spalten. Er ist somit befähigt, auf Schleimhautoberflächen zu adhären. Nachweislich ist er ebenfalls, wie der *Campylobacter rectus*, mit marginalen Parodontitiden in Zusammenhang zu bringen und auch in Parodontitis typischen Regionen zu finden (Sanderink et al. 2004).

Endodontitis: Enterokokken besitzen die ausgeprägte Eigenschaft, Dentin rasch zu infiltrieren und im Rahmen von Wurzelkanalinfektionen zu apikalen Parodontitiden zu führen. Das Vorkommen von *Enterococcus faecalis* im apikalen Wurzelkanalsystem wird zwischen 24 - 77 % angegeben. Er ist somit Leitkeim bei persistierenden, asymptomatisch verlaufenden, periapikalen Läsionen. Für sein Überleben ist *E. faecalis* nicht auf das Vorhandensein einer Keimflora angewiesen, sondern ist fähig, isoliert im Wurzelkanalsystem zu existieren (Pirani et al. 2006, Stuart et al. 2006). Infektionen der Zahnwurzel und des Pulpasystems sind polymikrobiell und beinhalten bis zu 100 verschiedene Keime (Jenkinson und Lamont 2005).

Maldolor: Der für Entzündungen typisch gangränöse Mundgeruch entsteht durch Desulfatierungsprozesse von Aminosäuren. Diese Geruchbildung wird durch Interaktionen verschiedener Keime hervorgerufen. Leitkeime für dieses Symptom sind *F. nucleatum* und *P. gingivalis*. Grampositive Bakterien, wie *S. salivarius*, unterstützen die vom *P. gingivalis* ausgehende Geruchsbildung (Sterer et al. 2006, Sanderink et al. 2004).

Pilz-Infektionen: *Candida albicans* ist ein ortsständiger Keim der gewöhnlichen Mundhöhlenflora. Kommt es durch diverse Faktoren, wie Xerostomie, Diabetes mellitus,

Immunsuppression u. a., zu einer Verschiebung der Qualität der Standortflora, kann sich daraus das Krankheitsbild der oralen Candidose entwickeln ([www.whocollab.od.mah.se/expl/oralmuc.html](http://www.whocollab.od.mah.se/expl/oralmuc.html)). Der gewöhnlich saprophytisch lebende *C. albicans* ist überwiegend auf bukkalen Schleimhautoberflächen anzutreffen. Zudem ist er auch in kontaminierten Wurzelkanalsystemen nachweisbar, die als therapieresistent in Erscheinung treten (Siqueira et al. 2004). Seine ausgeprägte Pathogenität deutet darauf hin, dass *C. albicans* kein signifikantes Bestreben hat mit anderen Keimen zu aggregieren (Shen et al. 2005). Gegenüber temporär eingebrachten medizinischen Einlagen auf Kalziumhydroxidbasis kann *C. albicans* Resistenzen entwickeln (Siqueira et al. 2004).

Abszesse und Wundinfektionen: Die klinische Relevanz von *Eikenella corrodens* zeigt sich vor allem bei immunsuppressiver Abwehrlage. So konnten einige Abszessarten, Wundinfektionen und Endokarditiden mit diesem Bakterium in Zusammenhang gebracht werden (Chen 1992).

Biofilme sind hoch organisierte Gemeinschaften von Mikroorganismen, die als solche eine solide Basis gegen widrige Umwelteinflüsse entwickelt haben. Die Mehrheit von Erkrankungen oraler Gewebe haben eine polymikrobielle Ätiologie (Jenkinson und Lamont 2005). Um diese Entwicklung aufzuhalten, ist es nötig, bereits präventiv der Initiation kariöser und parodontogener Läsionen vorzubeugen. Die Ansprüche an antibakteriell wirksame Substanzen sind hoch. Sie sollen der Biofilmbildung entgegenwirken und/oder die Pathogenität einer bereits etablierten Plaque reduzieren (Marsh 2004). Die Prävention von Kolonisation und Wachstum dieser Bakterien kann ein Schlüssel für die Kontrolle oraler Erkrankungen sein.

## 2.3 Bedeutung von Holz als mögliche antimikrobielle Substanz

### 2.3.1 Aufbau und Funktion eines Baumstammes

Es stehen unterschiedliche Komponenten eines Holzes zur Gewinnung antibakteriell wirksamer Substanzen zur Verfügung. Bei der Betrachtung eines Baumstammquerschnittes lassen sich sechs Bereiche erkennen (Abbildung 1).

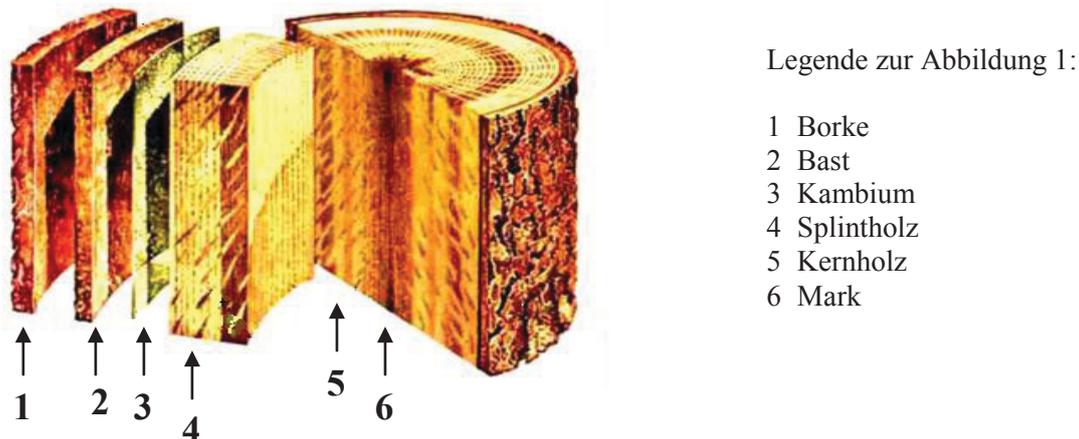


Abbildung 1: Makroskopische Gliederung eines Baumstammes im Querschnitt

Quelle: A. Milling - Holz ein natürlicher Werkstoff mit antibakteriellen Eigenschaften? Vergleichende Untersuchung zum Überleben von Bakterien auf Holz und Kunststoff mit mikrobiologischen und molekularen Methoden. 1999. [www.wilms.com/Hygiene/forschungen/BBA\\_HolzEinNW.pdf](http://www.wilms.com/Hygiene/forschungen/BBA_HolzEinNW.pdf)

Den äußeren Abschluss des Baumes bildet die Borke (1). Dieses tote Abschlussgewebe entsteht über mehrere Jahre und schützt das Pflanzengewebe vor Umwelteinflüssen. Das Kambium (3) gibt Zellen nach innen und nach außen gerichtet ins Holz ab und führt somit zum Dickenwachstum. Gewebe, welches nach außen abgegeben wird, bezeichnet man als Bast (2). Diese sekundäre Rinde transportiert in Wasser gelöste Nährstoffe aus der Krone in die Wurzel. Zellen, die sich vom Kambium ausgehend in das Innere des Holzgewebes entwickeln, bilden das Splintholz (4). Es ist der Teil des Holzes in dem ein Wassertransport, von der Wurzel zur Krone gerichtet, stattfindet. Im Gegensatz zum Kernholz (5) sind die Parenchymzellen des Splintholzes noch stoffwechselaktiv. Kernholz besitzt kein lebendes Holzparenchym. Es wird vermutet, dass die Pflanze sekundäre Stoffwechselprodukte aus den Wachstumszonen entfernen kann. Diese würden auf lebende Zellen hemmend oder toxisch wirken. Die Anhäufung dieser Substanzen führt zum Tod lebender Zellen und es kommt zur Kernholzbildung. Die Einlagerung von Tanninen, Gerbstoffen und anderer sekundärer Pflanzenstoffe in die Zellwände des Kernholzes, bezeichnet man als Verkernung.

Dadurch hebt sich das hellere Splintholz von dem oftmals dunkler gefärbten Kernholz ab. Durch diesen Prozess wird das tote Kernholz vor dem Abbau durch Mikroorganismen geschützt und ist somit härter und widerstandsfähiger gegenüber Schädlingen. Das Kernholz hat die Aufgabe, die Sprossachse mechanisch zu stabilisieren und das im Herzen des Holzes liegende Mark (6) zu schützen. Im Mark findet der entgegengerichtete Nährstofftransport von der Krone in die Wurzel statt. Ausgehend von diesem Kernstück sind auch Transportmöglichkeiten in waagerechter Richtung über die Markstrahlen möglich (Lüttge et al. 2010, Wagenitz et al. 2008, Raven et al. 2006).

### **2.3.2 Antibakterielle Eigenschaften verschiedener Holzarten**

Seit mehr als 50 Jahren befassen sich Studien mit möglichen bakteriziden Eigenschaften von Hölzern. Stingl und Domig (2010) stellten in ihrer Literaturrecherche der letzten Jahrzehnte diesbezüglich widersprüchliche Aussagen fest. In den letzten 10 Jahren der Holzforschung scheint sich eine Trendwende hin zum Holz mit hygienischen Aspekten anzudeuten. Bei der Betrachtung von Hölzern ergeben sich zwei Themenschwerpunkte - der Feststoff Holz und die daraus extrahierbaren Lösungen.

In der von Stingl und Domig 2010 verfassten Arbeit „Holz und Hygiene“ werden Publikationen zum Holz als Festwerkstoff beleuchtet. Der Werkstoff Holz vereint physikalische und chemische Faktoren, welche die folgenden Schlussfolgerungen zu lassen: Der anatomische Aufbau des Holzes ist relevant für das Ausmaß der Bakterizität. Der Durchmesser von Zellen oder Gefäßen, Verbindungswege zwischen den Zellen und die zusätzliche Verstopfung der Poren durch Verthyllung sind ausschlaggebend für die bakteriziden Eigenschaften des Holzes. Eine Ausgangsfeuchte des Holzes von 10 - 15 % beeinträchtigt die Lebensgrundlage für pathogene Keime signifikant. Im Gegensatz dazu hat die Oberflächenstruktur nur einen geringen Einfluss. Ebenso ausschlaggebend ist die Art der Schnittführung des Holzes für die Eindringtiefe von Mikroorganismen. Quergeschnittene Hölzer nehmen Mikroben bis zu 4 mm in tiefer gelegene Zellschichten auf. Im Kontrast dazu, vermögen längsgeschnittene Bretter diese nur in Tiefen von 0,3 - 0,7 mm fortzuleiten.

Diese physikalischen Eigenschaften sind für den Feststoff charakteristisch und entfallen dadurch bei der Betrachtung von Holzextrakten. Holz ist dem Holzextrakt durch physikalische und chemische (Einlagerung sekundärer Extraktstoffe, wie Polyphenole) Faktoren bei der Ausbildung antibakterieller Eigenschaften überlegen.

Die Ausbeute extrahierbarer, antibakteriell wirksamer Substanzen variiert sehr stark und ist vom verwendeten Pflanzenmaterial abhängig. Der Gewinn ist bei der Verwendung des Blattwerkes etwa 7-mal höher als bei der Verarbeitung des Kernholzes. Dieser Ertrag sinkt zunehmend von der Borke (1,6-fach) zum Splintholz, aus dem sich nur noch 1/3 der Extraktmenge im Vergleich zum Kernholz gewinnen lassen (Cheng 2005).

Hervorzuheben ist, dass die Art der Gewinnung von Extrakten und der Teil des verwendeten Holzes eine entscheidende Rolle auf die antimikrobielle Effektivität hat. Anhaltspunkte lassen vermuten, dass alkoholisch gewonnene Extrakte und Essenzen, die mittels Dampfdestillation extrahiert worden sind, ein unterschiedliches Wirkspektrum besitzen (Johnston et al. 2001). Ausschlaggebend für den Gehalt antibakteriell wirksamer Substanzen sind demnach die Art des angewandten Extraktionsverfahrens mit den entsprechenden Lösungsmitteln und der Bestandteil der verwendeten Pflanze (Baker et al. 2000). Obwohl sich aus dem Holz, im Vergleich zum Blattwerk, nur wenige Stoffkomponenten isolieren lassen, ist die qualitative antimikrobielle Wirkung des Kernholzes ausgeprägter als bei anderen Pflanzengewebe (Manter 2007, Cheng et al. 2005, Hart und Shrimpton 1979).

Als Kernholz werden die inneren Schichten eines sich im Wachstum befindlichen Baumes beschrieben, in denen lebende Zellen ihre Stoffwechselaktivität eingestellt haben. Es dient somit als Reservoir für Speichersubstanzen, die von dort entnommen oder umgewandelt werden (Anon. 1957).

In den letzten Jahren wurden vermehrt Studien durchgeführt, die die mikrobiologischen Eigenschaften des Kernholzes untersucht haben. Dabei ergaben sich oftmals sehr spezifische Wirkspektren - abhängig von der Art des untersuchten Holzextraktes. Nicht alle Baumarten sind in der Lage, Kernholz zu bilden. Aus diesem Grund wird zwischen obligatorischen, wie Eiche und Kiefer, fakultativen (Buche, Pappel), verzögerten (Hagebuche) und hellen (Fichte, Tanne) Farbkernbildnern, unterschieden (Bariska 2000).

Extrakte des Kernholzes der Eibe (*Taxus baccata*) zeigen gegen Pilze und gram-negative, jedoch nicht gegen grampositive Bakterien antimikrobielle Eigenschaften. Zedern- (*Chamaecyparis nootkatensis*) und Douglasienkernholz-Extrakte (*Pseudotsuga menziesii*) sind ebenfalls in der Lage, Pilze und das gramnegative Keimspektrum zu inhibieren (Erdemoglu et al. 2001, Johnston et al. 2001).

Untersuchungen, die einzelne Komponenten des Kernholzes betrachtet haben, zeigen, dass überwiegend Flavonoide für die antibakterielle Aktivität gegen kariogene Mikroorganismen verantwortlich sind (Osawa et al. 1992, Sato et al. 2003). Grampositive Bakterien, wie Mutans-Streptokokken, Aktinomyzeten und Laktobazillen, besitzen gegenüber diesen Flavonoiden eine hohe Anfälligkeit (Tsuchiya 1994).

## 2.4 Kiefernkernelholz

Das Kernholz der Kiefer (*Pinus sylvestris*) entwickelt sich während des Umbaus von Splintholz unter dem Einfluss ungesättigter Kohlenwasserstoffe und Kohlenstoffdioxid, die wesentlich an der Regulation der Kernholzbildung beteiligt sind (Nilsson et al. 2002).

Vor allem chemisch ist Kiefernkernelholz durch den hohen Gehalt freier Fettsäuren (in Form von Öl-, Linol- und Linolensäure), die in dem ihn umgebenden Splintholz nur in Spuren nachweisbar sind, gekennzeichnet (Nuopponen et al. 2004, Saranpää et al. 1987). Es wird angenommen, dass für die Kernholzbildung verschiedene Faktoren ausschlaggebend sind. Neben der Alterung und dem Untergang von Parenchymzellen, wachstumsregulierender Substanzen und der Anreicherung von Kohlenwasserstoffen sind es Polyphenole, die zu einer Verkernung führen (Piispanen et al. 2002). Phenole, zu denen auch das Pinosylvin gehört, zeigen herausragende Effekte, die für die Beständigkeit des Holzes verantwortlich sind. Lignane und Flavonoide werden ebenfalls in großen Mengen während dieses Umbauprozesses gebildet. Diese Komponenten sind ebenso, wie die Phenole, entscheidend für den Schutz des Kernholzes gegen Fäulniserreger und kommen ebenfalls in hohen Konzentrationen im Kernholz der Kiefer vor (Ekeberg et al. 2006, Hart und Shrimpton 1979).

Über die Inhaltsstoffe von Kiefernkernelholz existieren viele Studien (Ekeberg 2006, Nuopponen et al. 2004, Nilsson 2002, Piispanen 2002, Hart et al. 2000, Saranpää 1987). Anhand anderer Untersuchungen, die diese Stoffgruppen auf ihre antibakteriellen Fähigkeiten überprüft haben (Ferrazzano 2011, Dalleau et al. 2008, Sato et al. 1996, Osawa et al. 1992), ergeben sich Zusammenhänge, die das Potential des Kiefernkernelholzes nur erahnen lassen.

Bis dato existieren in der internationalen Literatur keine systematischen Abhandlungen zu diesem Thema.

Der holzverarbeitende Betrieb Wilms<sup>®</sup> mit dem Geschäftssitz in Bad Essen-Barkhausen machte Anfang der 60er Jahre die Beobachtung, dass Streugut, welches für die Bestallungen von Zuchtvieh verwendet wurde, zu deutlich weniger Infektionen und Erkrankungen der Tiere führte (Wilms<sup>®</sup> 2011 [www.wilms.com/Hygiene/De/Historie.aspx](http://www.wilms.com/Hygiene/De/Historie.aspx)). Diese Beobachtungen veranlassten das Unternehmen, aus Eigeninitiative mehrere Forschungsarbeiten in Auftrag zu geben, die ihr Produkt, das Kiefernkernelholz, untersucht haben.

Durch das spezielle Wasch- und Trocknungsverfahren des Wilms HygieneHolzes<sup>®</sup> können Keime schneller ins Holzinnere aufgenommen und dort den bakteriziden Holzinhaltsstoffen ausgesetzt werden. Mit dem sogenannten K3-HygieneHolz-Verfahren wird nur ein Teil der Zellstrukturen des Holzes zerstört. Dadurch steigt der Gehalt an aktiv antibakteriellen Substanzen (Strehlein et al. 2004, Schönwälder et al. 2002). Gegenüber den üblichen Verfahrenstechniken konnte die antibakterielle Effektivität des HygieneHolzes<sup>®</sup> gesteigert werden (Daschner 2002, Schönwälder et al. 2002, Schönwälder 2000).

Prinzipiell ergaben sich zwei Forschungsschwerpunkte. Zum einen Untersuchungen, die das Kernholz als Feststoff untersuchten und zum anderen durch Destillation in Lösung gebrachte Extraktstoffe.

#### **2.4.1 Untersuchungen zu Kiefernkernelholz**

Bakterien werden durch rein physikalische Kräfte im Holz festgehalten. Die Keimreduktion findet somit durch die Verlagerung von Bakterien in tieferen Holzschichten statt. Die poröse und hygroskopische Oberfläche entzieht den Bakterien Wasser und tötet sie dadurch ab. Holzinhaltsstoffe wirken zusätzlich antibakteriell. Allerdings ist das Überleben von Keimen abhängig von der Bakterienbelastung und dem Wassergehalt des Holzes. Es gilt, je höher die Keimdichte und die Feuchte des Holzes, umso länger lassen sich Keime auf den Oberflächen nachweisen (Schönwälder 2002, Schönwälder 2000).

In einer Vergleichsstudie, bei der neben anderen Nadel- und Laubhölzern das Kernholz der gemeinen Kiefer (*Pinus sylvestris*) und dessen Splintholz in ihrer bakteriziden Wirksamkeit überprüft wurden, bewies Kiefernkernelholz die besten antimikrobiellen Eigenschaften. Kiefern Splintholz erzielte, wie die Hölzer anderer Baumarten, schlechtere Werte (Fürst 2007, Schönwälder 2000). Damit wurde die Studie von Cheng et al. (2005) bestätigt, in der

festgestellt wurde, dass die qualitative, antibakterielle Wirksamkeit von Kernholz, verglichen mit anderen Holzbestandteilen, am ausgeprägtesten ist.

Inwiefern sich die positiven Eigenschaften des Kiefernkerneholzes gegen andere herkömmlich verwendete Oberflächenmaterialien durchsetzen können, belegen eine Reihe von Studien, die verschiedene leicht zu hygienisierende Materialien untersucht haben.

In einer vom Institut für Umwelt- und Krankenhaushygiene Freiburg durchgeführten Untersuchung zeigten HygieneHölzer<sup>®</sup> stets weniger Keimbelastungen als Kunststoffe bzw. kunststoffbeschichtete Materialien (Schuster et al. 2006, Daschner 2003, Daschner 2002). Auch mit nosokomialen Keimen kontaminierte HygieneHolz<sup>®</sup>-Unterlagen erzielten im Vergleich zu Polyethylenoberflächen bessere Ergebnisse. Nicht nur innerhalb der Werkstoffklasse „Holz“, sondern auch im Vergleich mit gut zu reinigenden Materialien des Alltags, besitzt Kiefernkerneholz wesentlich bessere hygienische Eigenschaften als Kunststoffe (Schuster et al. 2006, Wirmer 2005, Boursillon et al. 2005, Steinkamp 2004, Daschner 2002).

Schönwälder (2002) zeigte, dass innerhalb von zwei Stunden keine Bakterien auf HygieneHolz<sup>®</sup>-Oberflächen mehr nachgewiesen werden können. Unbehandeltes Kiefernkerneholz ist in der Lage, dies innerhalb von vier Stunden zu erzielen. Für Glas, Stahl und Kunststoffe waren diese Effekte erst nach Tagen zu beobachten. Zum Teil konnten Verunreinigungen noch am 5. Tag (Glas, Stahl) bzw. 9. Tag (Kunststoffe) nach Versuchsbeginn festgestellt werden (Vainio-Kailia et al. 2009, Schönwälder 2002). Somit ist auch der Einsatz von Kiefernkerneholz im Krankenhausalltag unbedenklich (Schuster 2006, Strehlein 2004).

Ein weiterer Bereich, der sensibel auf das Vorkommen humanpathogener Keime reagiert, sind Unternehmen des lebensmittelverarbeitenden Gewerbes. Dort ist der Umgang mit Holz lange umstritten gewesen und dadurch aus diesem Bereich entfernt worden. Es konnte allerdings festgestellt werden, dass Holzpaletten aus Kiefernkerneholz eine um 50 % geringere Keimbelastung aufweisen. Nach dem sechs Monate andauernden Versuch zeigten handelsübliche Paletten aus Holz bzw. Kunststoff einen erheblich ausgeprägteren mikrobiellen Bewuchs (Steinkamp 2000).

Andere Hölzer (Fichte, Buche oder Pappel) waren bezüglich der Keimbelastung mit Kunststoffen oder kunststoffbeschichteten Oberflächen vergleichbar (Schönwälder 2002).

Mit dem Ziel, Kiefernkerneholz in das tägliche Leben zu integrieren, untersuchte Wilms<sup>®</sup> ihr Produkt, inwiefern es positive Auswirkungen auf die Lebensqualität des Menschen haben kann. Unter diesem Aspekt wurden Allergien fokussiert.

Eine vom Institut für Hygiene und Umweltmedizin der Ernst-Moritz-Arndt Universität Greifswald durchgeführte Studie zur Allergielinderung durch in Schlafmatten eingebrachte Kernholzspäne stellte eine Steigerung der Lebensqualität von Hausstaubmilbenallergiker fest. Entsprechend den Angaben des Unternehmens konnte eine Verringerung der Milbenpopulation um bis zu 80 % erzielt werden (Koburger et al. 2010). Weitere Versuche mit diesen Spänematten auf Kiefernkerneholzbasis bzw. mit Kiefernkerneholzoberflächen beschreiben eine Reduktion von Schimmelpilzorganismen. *Aspergillus fumigatus* und *A. flavus* ließen sich innerhalb von 30 Minuten um 50 % reduzieren. Nach vier Tagen konnten nur noch 10 % des Anfangsbestandes nachgewiesen werden (Timke 2009).

Die Schwerpunkte bisheriger Studien zum Kiefernkerneholz bezogen sich somit überwiegend auf das Keimspektrum nosokomialer Infektionen. Die antimikrobiellen Eigenschaften von Kiefernkerneholz gegenüber *MRSA*-Stämmen, (multiresistenten) *Escherichia coli*, multiresistenten *Pseudomonas aeruginosa*, *Penicillium camembertii*, *C. albicans* und *Mykobacterium terrae* sowie *Acinetobacter baumannii* wurden erfasst (Fürst 2007, Wirmer 2005, Strehlein 2004, Steinkamp 2004, Daschner 2002, Schönwälder 2002, Schönwälder 2000). Ferner beschäftigten sich Studien mit *Listeria monocytogenes* und dem (Vancomycin-resistenten) *E. faecalis* (Vainio-Kailia et al. 2009, Fürst 2007, Ludwig 2006, Kühn 2006, Wirmer 2005, Strehlein 2004, Schönwälder 2002, Daschner 2002). Neben der Reduktion von *Candida*-Spezies ist die Verwendung von Kiefernkerneholz in der Prävention von der für den Menschen tödlich verlaufenden Aspergillose, ausgelöst durch *A. fumigatus* und *A. flavus*, sinnvoll (Timke 2009).

### **2.4.2 Untersuchungen zu Kiefernkernelholzextrakten**

Die Auswirkungen wässriger Kiefernkernelholzextrakte wurden bisher nur in Bezug auf antivirale Effekte überprüft. Gegenstand dieser Studien war die Bestimmung der Empfindlichkeit von Influenza A und des Herpes-Simplex-Virus Typ I auf verschiedenen konzentrierte Kiefernkernelholzlösungen gewesen (Ludwig 2006, Kühn 2006).

Abhängig von der Inkubationsdauer und der Extraktkonzentration war eine Reduktion des Virustiters bei Influenza A infizierten Wirtszellen um 100 % und beim Vogelgrippevirus um 90 % möglich. Weiterführende Untersuchungen zeigten frühzeitige Störungen im Replikationszyklus und lassen dadurch vermuten, dass das Extrakt bereits zum Zeitpunkt der Virus-Adsorption einen Einfluss haben könnte (Ludwig 2006).

### 3 Ziele der Arbeit

In der wissenschaftlichen Literatur sind die antimikrobiellen Eigenschaften von Kiefernkerneholz bisweilen selten erfasst. Überwiegend haben sich Studien dem Kiefernkerneholz in Form des Feststoffes verschrieben. Untersuchungen betonen die herausragenden, antibakteriellen Eigenschaften des Kiefernkerneholz-Oberflächenmaterials. Diese Studien zeigten, dass dieses Holz im täglichen Umgang - sogar im Krankenhausalltag - wieder Einzug halten kann. Gegenüber einer Keim- und Virusvermehrung wurde es als unbedenklich eingestuft.

Ein bis dato noch nicht ins Auge gefasster Forschungsschwerpunkt ist die Beantwortung der Frage, inwiefern wässrige Extrakte aus dem Kerneholz der Kiefer einen wachstumshemmenden Einfluss auf orale Mikroorganismen haben können.

In Zusammenarbeit mit der Firma Wilms<sup>®</sup> HygieneHolz mit Firmensitz in Bad Essen-Barkhausen sollte diese In-vitro-Studie angefertigt werden.

In der Mundhöhle vorkommende Mikroorganismen existieren im Wesentlichen in zwei unterschiedlichen Erscheinungsformen - zum einen in losen, frei schwimmenden Zellverbänden und zum anderen in ortsständigen, komplex organisierten Strukturen auf den Zahnoberflächen, der Zahnplaque. Ausgehend von diesem Wissen und der Arbeitshypothese ergaben sich somit im Wesentlichen zwei Versuchsansätze. Unter Laborbedingungen waren Mikroorganismen in planktonischer Form und im Biofilmverbund zu testen.

Zur Prüfung der These, inwiefern KKH-Extrakte wachstumshemmende Wirkungen besitzen, welche Bedingungen dafür erforderlich sind und welche Parameter sich negativ auswirken können, wurden vier verschiedene Versuche ausgearbeitet.

Die Mikroorganismen sollten bezüglich ihrer Sensibilität gegenüber KKH-Extrakten in vier verschiedenen Wirkstoffkonzentrationen nach 10-, 30- und 60-minütiger Exposition untersucht werden. Um anschließend die Frage beantworten zu können, ab welcher Konzentration von einem maximal wachstumshemmenden Effekt auszugehen ist, wurde die MHK mittels der Mikrodilutionsmethode bestimmt.

Inwiefern es relevant ist, antibakteriell wirksame Substanzen vor der Bildung eines Biofilms auf Oberflächen aufzutragen, klärt ein weiterer Versuchsschwerpunkt.

Dabei sollte anhand von drei verschiedenen Biofilmkonstellationen gezeigt werden, welchen Einfluss der Zeitpunkt der KKH-Extrakt-Exposition - vor bzw. nach der Biofilmreifung - für die Akkumulation von Keimen haben kann.

Diese Arbeit soll grundlegend die antimikrobiellen Eigenschaften von Kiefernkernel-Extrakten anhand eines ausgewählten Keimspektrums der Mundhöhlenflora aufzeigen.

Die daraus gewonnenen Erkenntnisse dienen dazu, alternative Therapieansätze in der antibakteriellen Behandlung von Karies, Gingivitiden und Parodontitiden durch Pflanzenextrakte zu entwickeln.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Materialien

#### 4.1.1 Mikroorganismen und Zellkulturen

Im folgenden Abschnitt soll eine kurze Übersicht über die Auswahl der untersuchten Keime, deren Nährmedien und den Kulturbedingungen gegeben werden.

Die Selektion der Bakterien wurde anhand ihrer Prävalenz und Bedeutung bei kariösen und parodontalen Infektionen getroffen. Es wurde Wert auf ein umfangreiches Spektrum von Keimen und deren klinischer Manifestation gelegt. Insgesamt kam eine Auswahl von 28 Mikroorganismen (Tabelle 1) zustande.

**Tabelle 1: Übersicht der untersuchten Mikroorganismen**

Spezies	Zellmorphologie	Stoffwechselverhalten
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	Grampositive Kokken	fakultativ anaerob
<i>S. sanguinis</i> ATCC 10556	Grampositive Kokken	fakultativ anaerob
<i>S. salivarius</i> ATCC 7073	Grampositive Kokken	fakultativ anaerob
<i>S. intermedius</i> ATCC 27335	Grampositive Kokken	fakultativ anaerob
<i>S. sobrinus</i> ATCC 33478	Grampositive Kokken	fakultativ anaerob
<i>S. constellatus</i> ATCC 27823	Grampositive Kokken	fakultativ anaerob
<i>S. gordonii</i> ATCC 10558	Grampositive Kokken	fakultativ anaerob
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Grampositive Kokken	fakultativ anaerob
<i>Parvimonas micra</i> ATCC 33270	Grampositive Kokken	anaerob
<i>Actinomyces viscosus</i> ATCC 15987	Grampositive Stäbchen	fakultativ anaerob
<i>A. naeslundii</i> ATCC 43013	Grampositive Stäbchen	fakultativ anaerob
<i>A. israelii</i> ATCC 12102	Grampositive Stäbchen	anaerob
<i>A. odontolyticus</i> ATCC 17982	Grampositive Stäbchen	anaerob
<i>Eikenella corrodens</i> ATCC 23834	Gramnegative Stäbchen	fakultativ anaerob
<i>Tannerella forsythia</i> ATCC 43037	Gramnegative Stäbchen	anaerob
<i>Prevotella oralis</i> ATCC 33269	Gramnegative Stäbchen	anaerob
<i>Fusobacterium nucleatum</i> ATCC 25586	Gramnegative Stäbchen	anaerob

<i>Capnocytophaga gingivalis</i> ATCC 33624	Gramnegative Stäbchen	fakultativ anaerob
<i>Campylobacter rectus</i> ATCC 33238	Gramnegative Stäbchen	anaerob
<i>Propionibacterium acnes</i> ATCC 6919	Grampositive Stäbchen	anaerob
<i>Aggregatibacter</i> <i>actinomycetemcomitans</i> Y4	Gramnegative Stäbchen	fakultativ anaerob
<i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277	Gramnegative Stäbchen	anaerob
<i>P. gingivalis</i> M5-1-2	Gramnegative Stäbchen	anaerob
<i>P. gingivalis</i> J361-1	Gramnegative Stäbchen	anaerob
<i>P. gingivalis</i> JH16	Gramnegative Stäbchen	anaerob
<i>P. gingivalis</i> J374	Gramnegative Stäbchen	anaerob
<i>P. gingivalis</i> MaRL	Gramnegative Stäbchen	anaerob
<i>Candida albicans</i> ATCC 76615	Sprosspilze	fakultativ anaerob

Als stellvertretende Leitkeime von chronischen und aggressiven Parodontitiden wurden *Aggregatibacter*-Spezies und verschiedene klinische Isolate von *P. gingivalis* untersucht. Die Mikroorganismen wurden unter sterilen Bedingungen der Stammhaltung des Instituts für Medizinische Mikrobiologie des Universitätsklinikums Jena entnommen.

Zur Inokulation wurden verschiedene Nährmedien eingesetzt. Dabei richtete sich die Auswahl des Mediums nach der Bakterienspezies und der Inkubationsatmosphäre. Columbiaagar (Fa. OXOID, Wesel) mit 5 % Schafblut zeichnet sich durch gute Eigenschaften gegenüber dem Wachstum empfindlicher Streptokokken und der Verbesserung des Hämolyseverhaltens aus. Schaedlernährboden (Fa. OXOID, Wesel) wurde für den speziellen Nachweis anaerob wachsender Mikroorganismen verwendet. Die Kultivierung von *C. albicans* wurde auf Sabouraud-Glucose-Agar (Fa. OXOID, Wesel) vorgenommen. Zusätzlich wurden Flüssignährmedien in Form von Mueller-Hinton-Bouillon (Fa. OXOID, Wesel), Wilkins-Chalgren-Bouillon (Fa. OXOID, Wesel), Hirn-Herz-Bouillon (Fa. OXOID, Wesel) und Schaedler-Bouillon (Fa. OXOID, Wesel) verwendet.

Die Proben wurden im Brutschrank (Thermo Scientific, Steril Cycle, CO<sub>2</sub> Incubator, Hepa class 100) bei einer Temperatur von 37 °C inkubiert. In Abhängigkeit des zu kultivierenden

Mikroorganismus erfolgte die Inkubation aerober (fakultativ anaerober) Bakterien in Gegenwart von Sauerstoff bei 37 °C, wohingegen anaerobe Spezies in spezielle Kulturgefäße eingebracht wurden und durch Zugabe eines Anaerogensystems (Fa. OXOID, Wesel) eine entsprechende sauerstofffreie Atmosphäre entstand. Um die Dichtigkeit der Kulturgefäße zu überprüfen und somit ein störungsfreies Wachstum der Bakterien zu garantieren, wurden Indikatoren eingebracht. Diese zeigen mittels Farbumschlag an, ob ein ungewollter Luftzutritt erfolgte.

#### 4.1.2 Kiefernkernelholzextrakt

Die Firma Wilms<sup>®</sup> hatte zwei Stammlösungen Kiefernkernelholzextrakt (Wilms<sup>®</sup>, HygieneHolz, Bad Essen-Barkhausen) mit vorgegebener Konzentration (2-fach und 1-fach) zur Verfügung gestellt.

Unter sterilen Bedingungen wurden von beiden zu untersuchenden KKH-Extrakt-Konzentrationen 10%ige Verdünnungen hergestellt. Somit wurden zwei weitere Lösungen getestet:

- 2-fach
- 1-fach
- 0,5-fach (1350 µl PBS und 150 µl 2-facher KKH-Extrakt-Lösung)
- 0,01-fach(1350 µl PBS und 150 µl 1-facher KKH-Extrakt-Lösung)

Jede Bakteriensuspension wurde den vier verschiedenen KKH-Extrakt-Lösungen in einem Mischungsverhältnis von 1 : 1 ausgesetzt. Hierbei war zu berücksichtigen, dass durch den Zusatz der Keimsuspensionen die hergestellten Primärlösungen verdünnt wurden. Die Suspension aus Bakterien und KKH-Extrakt entsprach somit einer 1-, 0,5-, 0,1- bzw. 0,05-fach konzentrierten KKH-Extrakt-Lösung. Zur Kontrolle der Ergebnisse diente je ein Versuchsansatz ohne KKH-Extrakt-Zusatz, in dem eine 1 : 1 Suspension aus Keim und PBS vorbereitet wurde.

### 4.1.3 Herstellung der Bakteriensuspensionen

Die Bakterienstämme wurden vor Versuchsbeginn der Stammhaltung entnommen und frisch kultiviert. Für die Experimente wurden Keimkonzentrationen von  $10^4$  -  $10^5$  KBE/ml benötigt, die mit dem Spektrophotometer (Pharmacia Biotek Ultrospec 2000) ermittelt wurden. Eine optische Dichte  $OD_{640} = 0,1$  entsprach einer Bakterienkonzentration von ca.  $2 \times 10^8$ /ml. Somit konnte zur Berechnung weiterer Verdünnungsstufen folgender Zusammenhang formuliert werden:

$$\frac{OD_{640}}{0,1} = \frac{1000 \mu l}{x}$$

Vor Beginn jeder Messung wurde das Gerät mit dem verwendeten Suspensionsmedium (PBS), welches zuvor in eine Messküvette in ausreichender Menge eingebracht wurde, standardisiert.

In einem weiteren Schritt wurde mit einem sterilen Wattetupfer ein Teil der frisch kultivierten Bakterien von der Nährbodenplatte entnommen und in einem Polypropylen-Röhrchen mit einer beliebiger Menge PBS gelöst. Wenn eine leichte Trübung erkennbar war, wurden  $100 \mu l$  dieser Suspension entnommen und in eine Messküvette pipettiert. Diese musste aufgrund des in der Verhältnisgleichung angeführten Gesamtbezugsvolumens von  $1000 \mu l$  mit  $900 \mu l$  PBS aufgefüllt werden. Mittels Spektrophotometer wurde bei vorausgesetzter Wellenlänge die optische Dichte bestimmt. Aus der Ermittlung der optischen Dichte erfolgte die Berechnung des Bakterienvolumens, das nötig war, um eine Suspension von  $2 \times 10^8$  KBE/ml herzustellen. Um anschließend zu den benötigten Bakterienmengen von  $10^4$  -  $10^5$  KBE/ml zu gelangen, wurde in jedem Schritt eine 1 : 10 Verdünnung erzeugt.

Im Einzelnen bedeutete dies, dass von der hergestellten Suspension mit  $10^8$  KBE/ml  $100 \mu l$  entnommen und anschließend in einem Eppendorfgesäß mit  $900 \mu l$  PBS resuspendiert wurden. Somit war eine Lösung von  $2 \times 10^7$  Keimen je Milliliter entstanden.

Pro Pipettiervorgang war somit eine um eine Zehnerpotenz reduzierte Bakterienmenge hergestellt worden. Analog erfolgte das weitere Verdünnungsprocedere.

## 4.2 Methoden

Zur Untersuchung der Wirkung des KKH-Extraktes auf orale Spezies wurden verschiedene Versuchsansätze geplant und durchgeführt. Das Hauptaugenmerk richtete sich dabei auf:

1. die bakterizide Wirkung,
2. den wachstumshemmenden Effekt,
3. die Wirkung auf einen entstehenden oralen Biofilm und
4. die Wirkung auf einen jungen etablierten Biofilm.

Die Versuchsabschnitte zu den Punkten 3 und 4 sollten dabei die Wirkungstendenz auf die Möglichkeit der Behinderung des Biofilms durch wässrige Extrakte analysieren. Es sollte dargestellt werden, ob KKH-Extrakte eine Alternative zur Hemmung des Plaquewachstums sein können.

### 4.2.1 Bakterizide Wirkung

Ziel dieses Versuches war es, die Wirkung von vier Konzentrationen KKH-Extrakt auf 28 verschiedene Mikroorganismen, einschließlich fünf klinischer Isolate von *P. gingivalis*, in den Zeitintervallen von 10, 30 und 60 Minuten zu untersuchen. Es wurden  $10^4$  und  $10^5$  KBE/ml eingesetzt. Anschließend wurde die Zahl der koloniebildenden Einheiten bestimmt. Der Versuch erfolgte in mindestens vier Einzelbestimmungen.

#### **Vorbereitende Maßnahmen:**

Entsprechend der Beschreibung im Abschnitt 4.1.2 wurden vier KKH-Extrakt-Konzentrationen und Kontrollproben vorbereitet. Das zu untersuchende Bakterium wurde in Suspension gebracht und eine Konzentration von  $10^4$  bzw.  $10^5$  KBE/ml (Abschnitt 4.1.3) hergestellt.

#### **Durchführung:**

Um eine ausgewogene Zusammenstellung von Wirkstoff und Bakterium zu erhalten, wurden die Keimsuspensionen  $10^4$  und  $10^5$  KBE/ml mit jeweils einer KKH-Extrakt-Konzentration im Verhältnis 1 : 1 gemischt.

Zu 100 µl KKH-Extrakt-Lösung wurden 100 µl Bakteriensuspension hinzugegeben. Nach dem Durchmischen wurden die Tubes im Brutschrank 10, 30 und 60 Minuten bei 37 °C inkubiert.

Nach Ablauf der Einwirkzeiten erfolgte die Entnahme aus dem Inkubator. Mit einer Transferpipette wurden je 100 µl aus jedem Tube entnommen und einzeln auf eine dafür vorbereitete Nährbodenplatte gebracht. Für eine homogene Verteilung wurden die Bakterien mit einem Glasspatel auf den Agarplatten verstrichen. Nach aerober bzw. anaerober Inkubation erfolgte die quantitative Auswertung nach zwei bzw. fünf Tagen mit dem AcoLyte (Synbiosis).

In Probeversuchen konnte festgestellt werden, dass es nahezu unmöglich war, die Bakterienzahlen auf einer Nährbodenplatte zu kultivieren und anschließend sicher auszuzählen. Aus diesem Grund wurden die 100 µl Bakterien-KKH-Extrakt-Suspensionen nochmals 1 : 100 verdünnt. Diese Verdünnungen wurden bei der Ermittlung der Anzahl der gebildeten Kolonien berücksichtigt.

#### **4.2.2 Wachstumshemmender Effekt**

In diesem Versuchsabschnitt wurde der Schwerpunkt auf die minimale Hemmstoffkonzentration gelegt. Sie gibt an, ab welcher Wirkstoffkonzentration eine Wachstumshemmung eintritt.

Vor Versuchsbeginn wurde eine PBS-Lösung mit einer zusätzlichen Verdünnungsstufe von  $10^3$  KBE/ml (Verfahren Abschnitt 4.1.3) hergestellt. 100 µl dieser Suspension wurden mit 900 ml Bouillon gelöst.

Um möglichst effektiv und steril zu arbeiten, wurden 96er-Well-Platten (Cellstar<sup>®</sup>, Fa. Greiner bio-one) verwendet. So konnten sechs Bakterienstämme auf einer Platte positioniert werden. Der Versuch erfolgte in Doppelbestimmungen.

Die Mikroorganismen wurden den vier KKH-Extrakt-Konzentrationen und der PBS-Kontrolle hinzugefügt. In einem Verhältnis von 1 : 1 wurden  $10^3$  KBE/ml mit dem Wirkstoff zusammengebracht und resuspendiert.

Damit den Bakterien genügend Nährstoffe zum Wachstum zur Verfügung standen, wurde in Abhängigkeit von der Bakterienspezies Mueller-Hinton- bzw. Wilkins-Chalgren-Bouillon hinzugegeben. Anaerobe Stämme erhielten zusätzlich zum Gesamtvolumen 5 % Schafblut. Über Nacht erfolgte die Inkubation bei 37 °C im Brutschrank unter aeroben bzw. anaeroben Bedingungen.

Am folgenden Tag konnte anhand der Trübungsstärke eine Aussage getroffen werden, inwiefern eine Wachstumshemmung zustande kam. Da mitunter eine Aussage auf Grund der Eigentrübung der Bouillon schwierig war, erfolgte zusätzlich eine Subkultur auf Nährbodenplatten. Jede Platte erhielt fünf gleich große Segmente, die jeweils mit einer Bakterien-Wirkstoff-Kombination beimpft wurde. Mit einer Impföse wurde pro Segment ein Ausstrich vorgenommen. Die Auswertung erfolgte nach einer Wachstumszeit von zwei bzw. fünf Tagen. Als minimale Wachstumshemmung galt hier eine Reduktion der Zahl koloniebildender Einheiten um mindestens 99 %.

Die beschriebene Mikrodilutionsmethode stellt ein anerkanntes und in der Mikrobiologie etabliertes Versuchsverfahren dar (Hübner et al. 2007). Kontaminationen der Testbouillon konnten durch eine Modifizierung des Testverfahrens in Form eines zusätzlichen Keimausstriches auf einer Nährbodenplatte ausgeschlossen werden.

#### **4.2.3 KKH-Extrakt: Wirkungen auf Biofilme**

Akkumulationen von Mikroorganismen in Biofilmen zeigen eine andere Resistenzlage, als es in Vorversuchen, in denen der separierte Keim untersucht wurde, vermuten lässt. Aus diesem Grund wurden Auswirkungen auf einen entstehenden, zum anderen auf einen bereits gereiften Biofilm untersucht. Zur Sicherung der Ergebnisse wurden zwei Ansätze geplant und durchgeführt.

Jeweils drei Biofilme verschiedener Zusammensetzung wurden verwendet. Zunächst wurde die Wirkung des KKH-Extraktes auf zwei Single-Spezies-Biofilme untersucht.

Zum einen handelte es sich um einen Biofilm, gebildet vom aerob wachsendem *S. mutans* ATCC 25175 und zum anderen um einen Biofilm, der von der anaerob wachsenden Spezies *P. gingivalis* ATCC 33277 gebildet wurde.

Weiterhin wurde ein komplexer parodontalpathogener Biofilm, bestehend aus *S. sanguinis* 108a, *F. nucleatum* ATCC 25586, *A. viscosus* ATCC 15987 und *P. gingivalis* M5-1-2, getestet. Jeder Film wurde einheitlich auf einem Trägermaterial etabliert.

### **Vorbereitende Maßnahmen**

Die Bakterien wurden zwei Tage vor Versuchsbeginn frisch passagiert und bei 37 °C im Brutschrank aerob bzw. anaerob inkubiert.

Die kultivierten Bakterienstämme wurden am folgenden Tag mit einem Wattetupfer von einer ca. 1 cm<sup>2</sup>-dicht-bewachsenen Fläche entnommen und in ihre jeweiligen flüssigen Nährmedien überführt. Über Nacht erfolgte auch hier die aerobe bzw. anaerobe Inkubation bei 37 °C.

Diese Bouillonvorkulturen setzten sich wie folgt zusammen:

Single-Spezies:      • *S. mutans* ATCC 25175 in 10 ml Mueller-Hinton-Bouillon  
                             • *P. gingivalis* ATCC 33277 in 50 ml Schaedler-Bouillon

Komplexer Biofilm: • *P. gingivalis* M5-1-2 in 100 ml Schaedler-Bouillon  
                             • *F. nucleatum* ATCC 25586 in 40 ml Schaedler-Bouillon  
                             • *A. viscosus* ATCC 15586 in 40 ml Schaedler-Bouillon  
                             • *S. sanguinis* 108a in 10 ml Hirn-Herz-Bouillon

#### **4.2.3.1 Wirkung auf einen entstehenden oralen Biofilm**

Schwerpunkt dieses Versuchs war die Beantwortung der Frage, ob KKH-Extrakt die Bildung eines Biofilms verhindern bzw. beeinträchtigen kann. Zudem sollte festgestellt werden, ob es Unterschiede zwischen einer aerob und einer anaerob wachsenden Bakterienspezies gab.

### **Durchführung**

Unter der Sterilwerkbank (Biowizard, GoldenLine, x-tra, Kojair) wurden die vier verschiedenen KKH-Extrakt-Konzentrationen (Abschnitt 4.1.2) sowie eine Kontrolle mit PBS hergestellt.

50 ml jeder Konzentration wurden in je ein Polypropylen-Röhrchen à 50 ml pipettiert. Somit konnten die Trägermaterialien in insgesamt fünf Röhrchen, von denen jeweils vier eine andere

KKH-Extrakt-Konzentration und ein weiteres die Kontrollprobe (PBS) enthielt, vollständig eingetaucht werden. Als Trägermaterial für den Biofilm dienten handelsübliche Objektgläser. Die Objektträger wurden für fünf Minuten in die entsprechende KKH-Extrakt-Lösung getaucht. Dieses Zeitintervall konnte zur Vorbereitung der Bakteriensuspensionen genutzt werden.

### **Herstellung der Bakteriensuspensionen**

In-vivo werden für die Etablierung von Bakterienfilmen auf Oberflächen Proteine als adhärenente Struktur benötigt. Dieses, mit einer Pellicel vergleichbare Gefüge, wurde unter Laborbedingungen durch den Zusatz von synthetischem Speichel (60 ml) für jeden Biofilm erreicht.

#### *Streptococcus mutans* ATCC 25175

In einem Erlenmeyerkolben wurden 36 ml 37 °C temperierter synthetischer Speichel und 290 ml frische Mueller-Hinton-Bouillon vermengt. Anschließend wurden 3 ml der *S. mutans*-Vorkultur (Abschnitt 4.2.3: Vorbereitende Maßnahmen) in diese Lösung pipettiert. Davon sind jeweils 50 ml in fünf Polypropylen-Röhrchen gegeben worden.

#### *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277

Anaerobier benötigen zum sicheren Wachstum neben einer geeigneten Nährlösung zusätzlich Schafblut. Aus diesem Grund wurde der Primärlösung, bestehend aus 36 ml synthetischem Speichel und 180 ml Schaedler-Bouillon, zusätzlich 24 ml Schafblut hinzugefügt. Nachdem auch hier 30 ml der Vorkultur (Abschnitt 4.2.3: Vorbereitende Maßnahmen) resuspendiert und anschließend homogen im Glaskolben verteilt waren, wurde dieses Volumen, analog dem Vorgehen beim *S. mutans* ATCC 25175, auf die Röhrchen verteilt.

#### Komplexer Biofilm

Von den erzeugten Vorkulturen (Abschnitt 4.2.3: Vorbereitende Maßnahmen) wurden 60 ml *P. gingivalis* M5-1-2, 20 ml *F. nucleatum* ATCC 25586, 20 ml *A. viscosus* ATCC 15987 sowie 5 ml *S. sanguinis* 108a entnommen, in einen ausreichend großen Kolben gegeben und anschließend mit 10 ml Schafblut, 24 ml synthetischem Speichel und 100 ml Schaedler-Bouillon versetzt.

Auch hier wurden fünf 50-ml-Röhrchen für den Biofilm bereitgestellt und mit dieser hergestellten Bakterien-Nährbouillonlösung befüllt. Jedes vorbereitete Polypropylen-Röhrchen enthielt somit 50 ml Keimsuspension.

#### **Etablierung der Bakterien auf dem Trägermaterial**

Die Objektträger, die fünf Minuten dem KKH-Extrakt ausgesetzt waren, wurden entnommen und in je eines der die Keimsuspension enthaltenden Polypropylen-Röhrchen überführt. Während der folgenden 24 Stunden konnten sich Biofilme unter den gegebenen Versuchsbedingungen (37 °C aerob/anaerob) auf den KKH-Extrakt-beschichteten Objektträgern bilden.

Am darauffolgenden Tag wurden die Objektträger vorsichtig entnommen und kurz in PBS getaucht, damit sich lose anhaftende Bakterien lösen konnten. Um den gebildeten Biofilm vom Trägermaterial zu entfernen, wurde ein Ultraschallwasserbad (Bandelin Sonorex Super RK 102H) vorbereitet. Jeder Objektträger wurde in ein separates Polypropylen-Röhrchen mit 50 ml PBS überführt und dem Ultraschall ausgesetzt. Dieses Verfahren erfolgte bei einer Frequenz von 25 kHz für einen Zeitraum von fünf Minuten.

Anschließend wurden mit dem Vortex-2-Genie (Scientific Industries) die Proben neu aufbereitet. Nur so konnte sichergestellt werden, dass der Biofilm mit den ihm aufgelagerten Bakterien homogen im PBS verteilt war.

Auf die vorbereiteten Nährbodenplatten wurden 100 µl dieser Lösung pipettiert, mit einem Glasspatel verteilt und 24 Stunden aerob bzw. 96 Stunden anaerob bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Ermittlung der koloniebildenden Einheiten.

#### **4.2.3.2 Wirkung auf einen jungen etablierten Biofilm**

Bei diesem Versuchsabschnitt wurde die Problematik aufgegriffen, inwiefern das KKH-Extrakt einen Effekt auf einen bereits vorhandenen Biofilm hat. Demzufolge wurden Biofilme auf den Objektträgern etabliert, die anschließend dem KKH-Extrakt (in vier Konzentrationen: 1-, 0,5-, 0,1- und 0,05-fach) bzw. PBS ausgesetzt waren. Ob eine weitere Proliferation, eine Reduktion oder eine Stagnation der Biofilmbildung eintrat, wurde nach sechs Stunden Reifung in einem Nährmedium bestimmt. Der Versuch wurde in einer Doppelbestimmung durchgeführt.

### **Vorbereitende Maßnahmen**

Drei Biofilme wurden überprüft. Dementsprechend standen die im Versuchsabschnitt 4.2.3 verwendeten Bakterienfilme, bestehend aus *S. mutans* ATCC 25175, *P. gingivalis* ATCC 33277 und dem komplexen Biofilm, zur Verfügung.

### **Herstellung der Bakteriensuspension**

Zwei Tage vor Versuchbeginn wurden auch hier die zu testenden Stämme frisch passagiert und nach Verstreichen von 24 Stunden in ihre jeweiligen Nährmedien zur Gewinnung einer Vorkultur (Abschnitt 4.2.3: Vorbereitende Maßnahmen) überführt.

#### ***Streptococcus mutans* ATCC 25175**

36 ml synthetischer Speichel und 290 ml Mueller-Hinton-Bouillon wurden in einem Glaskolben vermengt. 3 ml der *S. mutans*-Vorkultur (Abschnitt 4.2.3: Vorbereitende Maßnahmen) sind in einem weiteren Schritt in diese Lösung pipettiert worden.

#### ***Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277**

Die Bakterienmischung setzte sich aus 36 ml synthetischem Speichel und 180 ml Schaedler-Bouillon zusammen. Zudem fügte man 24 ml Schafblut und 30 ml der *P. gingivalis*-Vorkultur (Abschnitt 4.2.3: Vorbereitende Maßnahmen) hinzu.

#### **Komplexer Biofilm**

Von den erzeugten Vorkulturen (Abschnitt 4.2.3: Vorbereitende Maßnahmen) wurden 60 ml *P. gingivalis* M5-1-2, 20 ml *F. nucleatum* ATCC 25586, 20 ml *A. viscosus* ATCC 15987 sowie 5 ml *S. sanguinis* 108a entnommen und in einem Erlenmeyerkolben gegeben.

Anschließend wurde diese Lösung mit 10 ml Schafblut, 24 ml Speichelersatzlösung und 100 ml Schaedler-Bouillon angesetzt.

### **Etablierung auf dem Trägermaterial**

Pro Biofilmansatz wurde eine Glasküvette mit jeweils zehn Trägerplatten bestückt und mit der vorbereiteten Keimlösung befüllt. Die Objektgläser konnten in ausreichendem Abstand - gleichmäßig benetzt - voneinander platziert werden. Über Nacht fand bei 37 °C und entsprechender Atmosphäre die Inkubation statt.

Bei der Entnahme war eine gut sichtbare Schmierschicht auf den Glasplättchen erkennbar. Am Versuchstag wurden die zu überprüfenden KKH-Extrakt-Konzentrationen (1-, 0,5-, 0,1-, 0,05-fach) wie üblich frisch angefertigt und in  $3 \times 10$  Polypropylen-Röhrchen gefüllt.

### **Durchführung**

Die Transfergefäße wurden aus dem Inkubator entnommen. Jeweils zwei der bakterienfilmbehafteten Objektträger eines Ansatzes wurden mit steriler Pinzette entnommen und für fünf Minuten in eine Verdünnung der KKH-Extrakt-Lösung getaucht.

Dieses Verfahren ist für die drei Biofilmsätze und den vier KKH-Extrakt-Konzentrationen einschließlich einer Kontrolle gleichermaßen durchgeführt worden. Pro Biofilm wurden zwei Objektträger mit einer KKH-Extrakt-Konzentration beschichtet. Die benetzten Objektträger wurden anschließend für sechs Stunden in Küvetten mit Nährbouillon (Mueller-Hinton-/Schaedler-Bouillon) gegeben. Nur Träger einer Verdünnungsstufe bzw. eines Bakterienfilms wurden hierbei in ein und dasselbe Transfergefäß platziert.

Jeweils zwei Objektgläser eines Bakterienansatzes und einer Verdünnungsstufe wurden nach sechs Stunde entnommen und auch hier in zwei mit PBS befüllten Polypropylen-Röhrchen dem Ultraschallbad für eine Dauer von fünf Minuten zugeführt.

Nachdem die Bakterienfilme von den Objektträgern entfernt wurden, erfolgte die Entnahme von jeweils 100  $\mu\text{l}$  und das Ausplattieren auf einer entsprechenden Nährbodenplatte. Anschließend wurden diese bei einer Temperatur von 37 °C in den Brutschrank gegeben.

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte über die Zahl der koloniebildenden Einheiten, die mit dem Acolyte quantifiziert wurden.

### 4.3 Statistische Auswertung

Zur statistischen Absicherung wurde ein Students-T-Test durchgeführt. Mit diesem können signifikante Unterschiede zwischen zwei Grundgesamtheiten statistisch ermittelt werden.

Es wurde die Keimbelastung nach 60 Minuten dauernder Exposition unter Standard- und 1-fach konzentrierten Wirkstoffbedingungen einem T-Test unterzogen.

Das Signifikanzniveau von  $p < 5 \%$  wird in den Diagrammen mit \*, von  $p < 1 \%$  mit \*\* und von  $p \leq 0,1 \%$  mit \*\*\* gekennzeichnet. Diese p-values geben darüber Auskunft, mit welcher Wahrscheinlichkeit die Unterschiede zwischen den Grundgesamtheiten fehlerbehaftet sind.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Bakterizide Wirkung gegenüber oralen Spezies

Bei der Prüfung der bakteriziden Wirkung wurden die Stämme den KKH-Extrakt-Konzentrationen einer Zeit von 10, 30 und maximal 60 Minuten ausgesetzt. Analysiert wurden die Auswirkungen der Parameter „Zeit“ und „Konzentration“ auf verschiedene Keimspektren. Eine Änderung der Keimzahl wurde unter gegebenen Bedingungen quantitativ ermittelt und prozentual ausgewertet. Zusätzlich erfolgte eine stammspezifische Auswertung für die Ergebnisse des 60 Minuten dauernden Einflusses einer 1-fachen KKH-Extrakt-Konzentration. Zur besseren Übersicht wurden die geprüften Mikroorganismen in Gruppen zusammengefasst.

#### 5.1.1 Orale Streptokokken

Zur Gruppe oraler Streptokokken wurden in Abbildung 2 *S. mutans* ATCC 25175, *S. sanguinis* ATCC 10556, *S. salivarius* ATCC 7073, *S. intermedius* ATCC 27335, *S. sobrinus* ATCC 33478, *S. constellatus* ATCC 27823 und *S. gordonii* ATCC 10558 zusammengefasst.

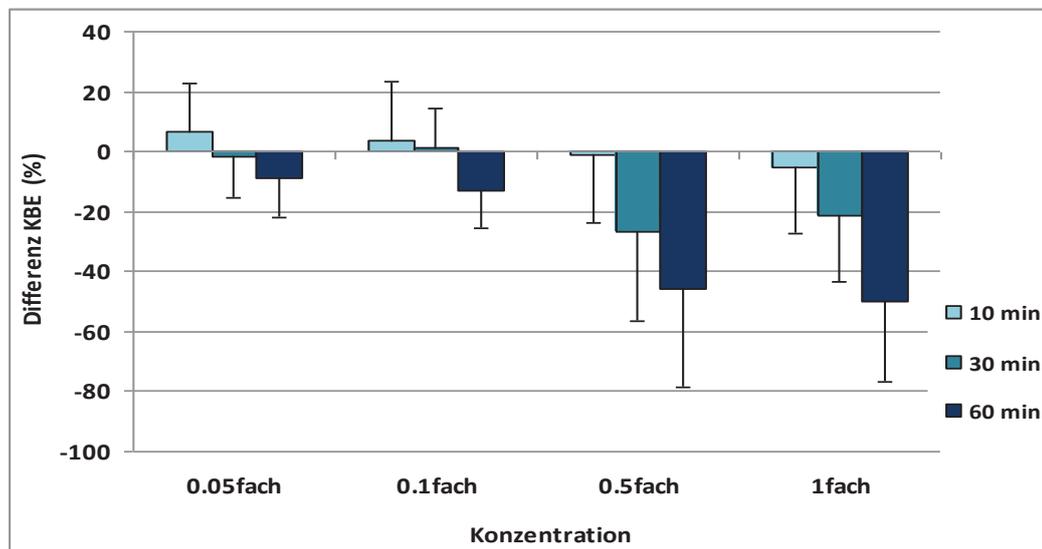


Abbildung 2: Bakterizide Wirkung verschiedener Konzentrationen KKH-Extrakt auf orale Streptokokken zu drei Zeitpunkten im Vergleich zur Kontrolllösung

Die Graphik belegt, dass Streptokokken zum einen durch Verlängerung der Einwirkzeit und zum anderen durch hohe Wirkstoffdosen in ihrer Zahl vermindert werden konnten. Eine

Abtötung, unabhängig von der Wirkdauer, trat ab einer 0,5-fach und höher konzentrierten Lösung auf. Unter den getesteten Bedingungen konnten maximal 50 % des Anfangsbestandes eliminiert werden.

Die stammspezifische Graphik (Abbildung 3) veranschaulicht, dass einzelne Mikroorganismen eine deutlich geringere Resistenz gegenüber den getesteten Extrembedingungen aufwiesen, als es Abbildung 1 vermuten lässt.

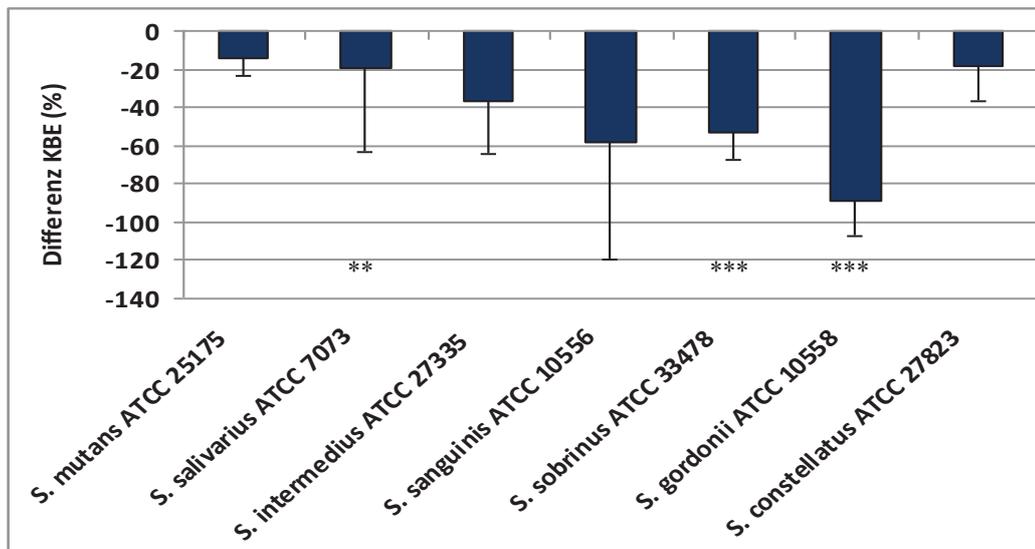


Abbildung 3: Keimabtötende Wirkung von 1-fach konzentriertem KKH-Extrakt auf die verschiedenen Streptokokkenspezies nach einer Einwirkzeit von 60 Minuten

Nachweislich konnte die Keimzahl von *S. sobrinus* ATCC 33478 und *S. gordonii* ATCC 10558 bei 1-fach konzentriertem KKH-Extrakt-Zusatz und dessen 60-minütiger Applikation um 54 % bzw. 89 % herabgesetzt werden. Die höchste, statistisch abgesicherte Resistenz verzeichnete *S. salivarius* ATCC 7073 mit einer 20%igen Wachstumshemmung.

### 5.1.2 Grampositive anaerobe Bakterien

Die Abbildung 4 zeigt die Ergebnisse der grampositiven anaeroben Bakterien (*A. viscosus* ATCC 15987, *A. naeslundii* ATCC 43013, *A. israelii* ATCC 12102, *A. odontolyticus* ATCC 17982, *Propionibacterium acnes* ATCC 6919 und *P. micra* ATCC 33270) in der Zusammenfassung.

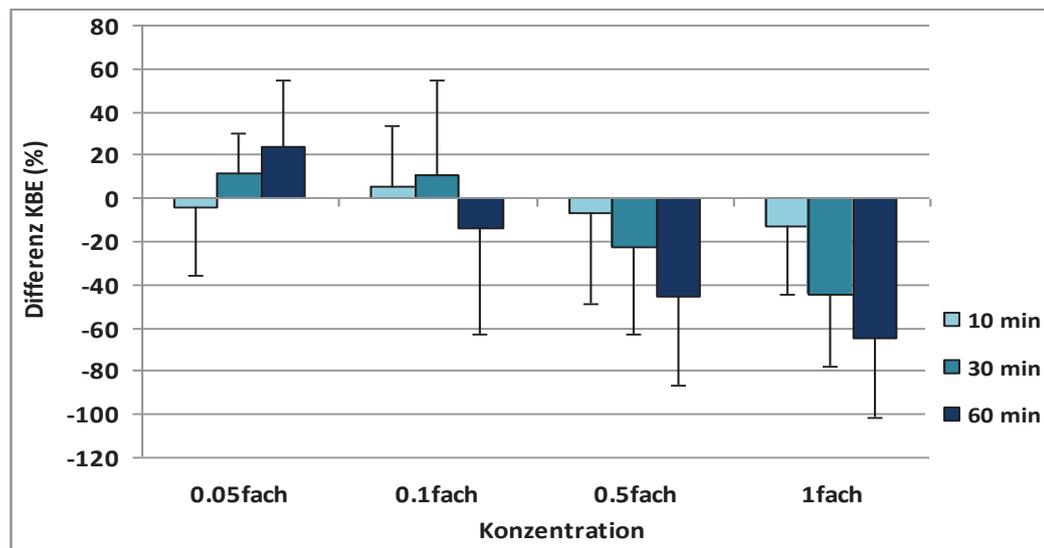


Abbildung 4: Bakterizide Wirkung verschiedener Konzentrationen KKH-Extrakt auf grampositiv- anaerobe Keime orale Streptokokken zu drei Zeitpunkten im Vergleich zur Kontrolllösung

Im Vergleich zu Kontrollproben konnte im niedrig dosierten Bereich eher eine Vermehrung der Spezies festgestellt werden. Eine bakterizide Tendenz war ab einer Konzentration von 0,1 und einer maximalen Einwirkzeit von 60 Minuten vorhanden. Ein proportionaler Zusammenhang von Wirkdosis und Zeit war ab Konzentrationen von 0,5- und 1-fachem KKH-Extrakt-Zusatz erkennbar. Maximal konnten unter gegebenen Bedingungen in dieser Gruppe 60 % der Mikroorganismen eliminiert werden.

Anhand der Darstellung der einzelnen Bakterienstämme (Abbildung 5) kann festgestellt werden, dass *P. micra* ATCC 33270 (100 %) und *A. naeslundii* ATCC 43013 (97 %) nahezu vollständig abgetötet werden konnten. *P. acnes* ATCC 6919 zeigte eine durchschnittliche Reduktion ihrer KBE um 70 %.

Mit einer Keimzahlverminderung von 22 % bildete *A. odontolyticus* ATCC 17982 in dieser Klassifikation gegenüber den 1-fach konzentrierten Lösungen und 60 Minuten andauernden Testbedingungen die stärkste Resistenz aus.

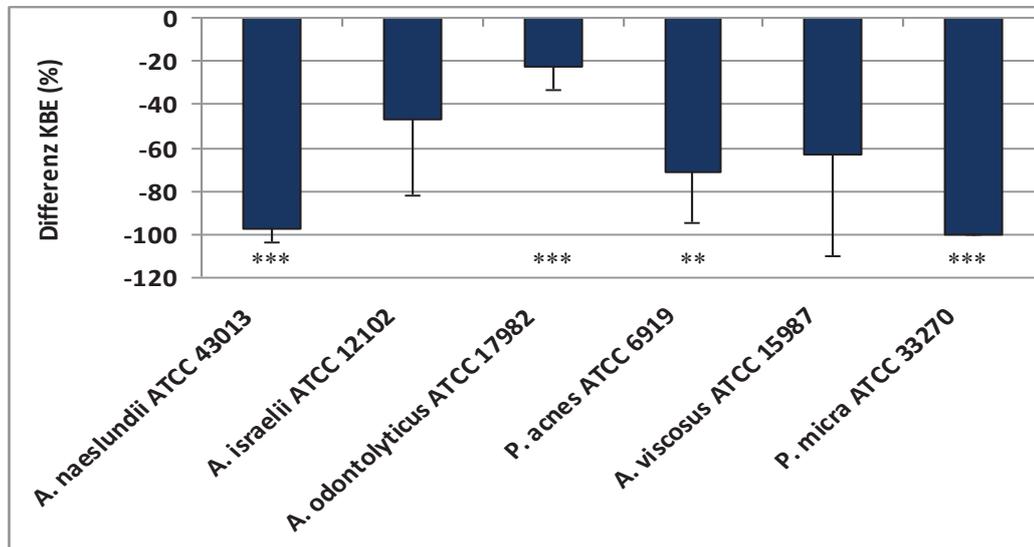


Abbildung 5: Keimabtötende Wirkung von 1-fach konzentriertem KKH-Extrakt auf die verschiedenen grampositiv-anaerobe Keime nach einer Einwirkzeit von 60 Minuten

### 5.1.3 Porphyromonas gingivalis

In der grafischen Darstellung (Abbildung 6) sind die gemittelten Messwerte von *P. gingivalis* ATCC 33277, *P. gingivalis* M5-1-2, *P. gingivalis* J361-1, *P. gingivalis* JH16-1 und *P. gingivalis* J374-1 sowie *P. gingivalis* MaRL aufgeführt.

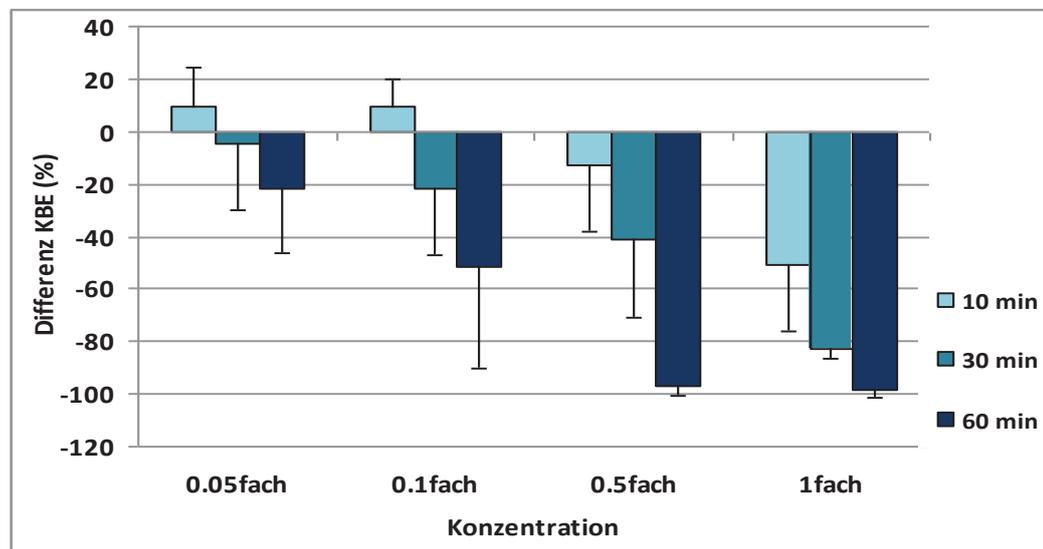


Abbildung 6: Bakterizide Wirkung verschiedener Konzentrationen KKH-Extrakt auf *Porphyromonas gingivalis* und seiner klinischen Isolate zu drei Zeitpunkten im Vergleich zur Kontrolllösung

Nach 30-minütiger Inkubation zeigten alle Proben eine konzentrationsunabhängige Wachstumshemmung. Ein proportionaler Zusammenhang ist erkennbar. Mit steigender Konzentration und längerer Einwirkzeit konnten zunehmend mehr Bakterien abgetötet werden. Ein Maximum (98,5 %) der antibakteriellen Aktivität war bei 0,5-fach ebenso wie bei 1-fach konzentrierten Lösungen nach 60 Minuten gegeben.

Bei vier von sechs getesteten *Porphyromonas gingivalis*-Stämmen konnten nach einstündiger KKH-Extrakt-Exposition keine Keime nachgewiesen werden (Abbildung 7). Zwei klinische Isolate (*P. gingivalis* JH16-1, *P. gingivalis* MaRL) zeigten eine geringfügige Lebensfähigkeit von 1 bzw. 4 %. Die Zuverlässigkeit der Ergebnisse kann mit einer statistischen Sicherheit von 99,5 % belegt werden und spiegelt damit die herausragende bakterizide Wirkung, insbesondere gegenüber parodontalpathogenen Keimen, wider.

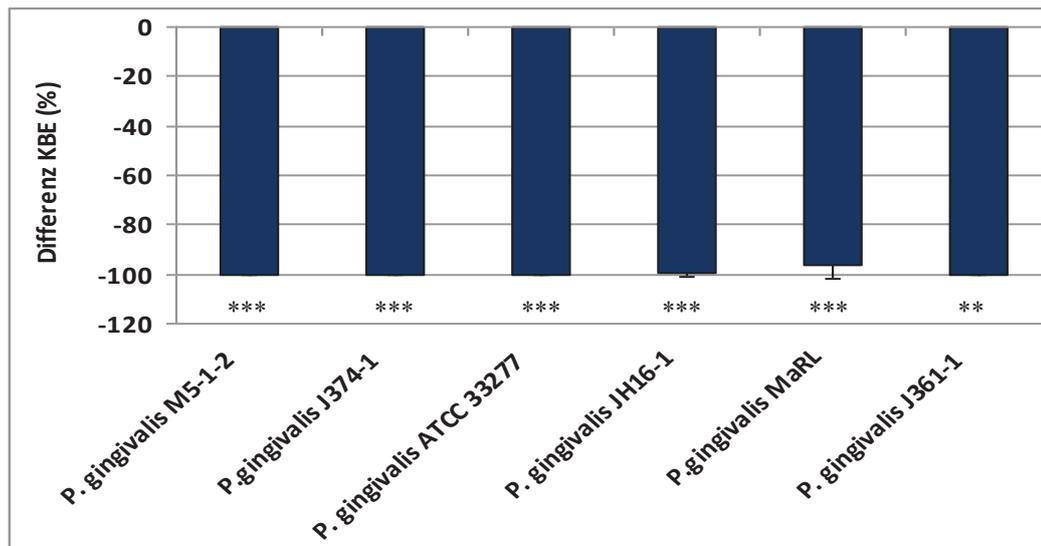


Abbildung 7: Keimabtötende Wirkung von 1-fach konzentriertem KKH-Extrakt auf die verschiedenen *Porphyromonas gingivalis* Spezies nach einer Einwirkzeit von 60 Minuten

#### 5.1.4 Weitere kapnophile und gramnegative Anaerobier

Die verbliebenen getesteten Bakterienspezies, wie *E. corrodens* ATCC 23834, *C. gingivalis* ATCC 33624 sowie *A. actinomycetemcomitans* Y4, *T. forsythia* ATCC 43037, *P. oralis* ATCC 33269, *F. nucleatum* ATCC 25586 und *C. rectus* ATCC 33238, wurden zu einer weiteren Gruppe (Abbildung 8) zusammengefasst.

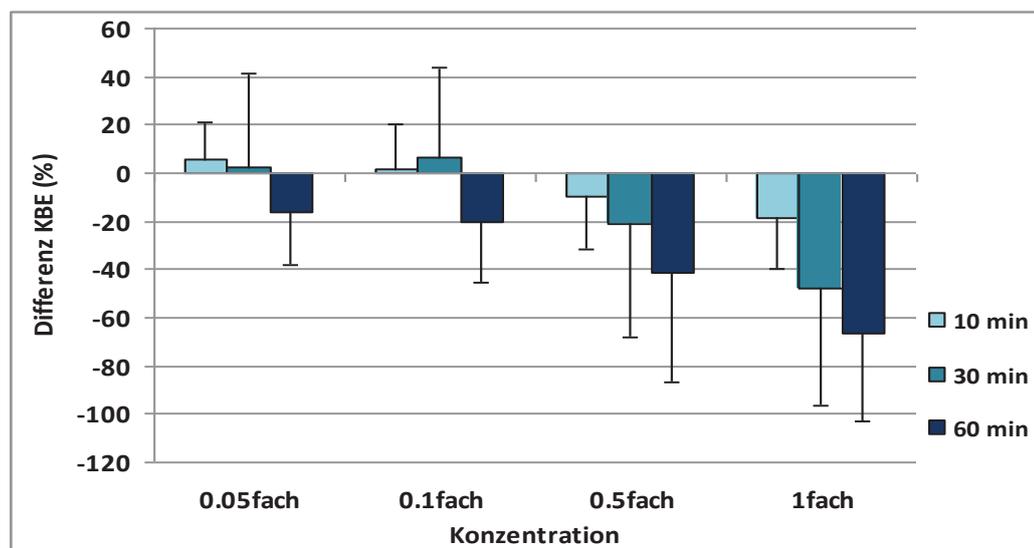


Abbildung 8: Bakterizide Wirkung verschiedener Konzentrationen KKH-Extrakt auf kapnophile und gramnegative Anaerobier zu drei Zeitpunkten im Vergleich zur Kontrolllösung

Alle KKH-Extrakt-Konzentrationen besaßen ein keimreduzierendes Potential, das im niedrig konzentrierten Bereich (0,05 und 0,1) zeitabhängig war. Nach 60 Minuten Einwirkzeit betrug die antibakterielle Aktivität mindestens 20 % (0,05-fach) und erreichte maximal 64 % (1-fach).

Vier von sieben Stämmen dieser Gruppe (Abbildung 9) wurden durch 1-fache KKH-Lösung nahezu vollständig (95 % - 100 %) eliminiert. *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 wies die geringste Empfindlichkeit gegenüber KKH-Extrakten auf. Nach 60 Minuten Einwirkung von 1-fach konzentriertem KKH-Extrakt betrug die Eliminationsrate 60 %.

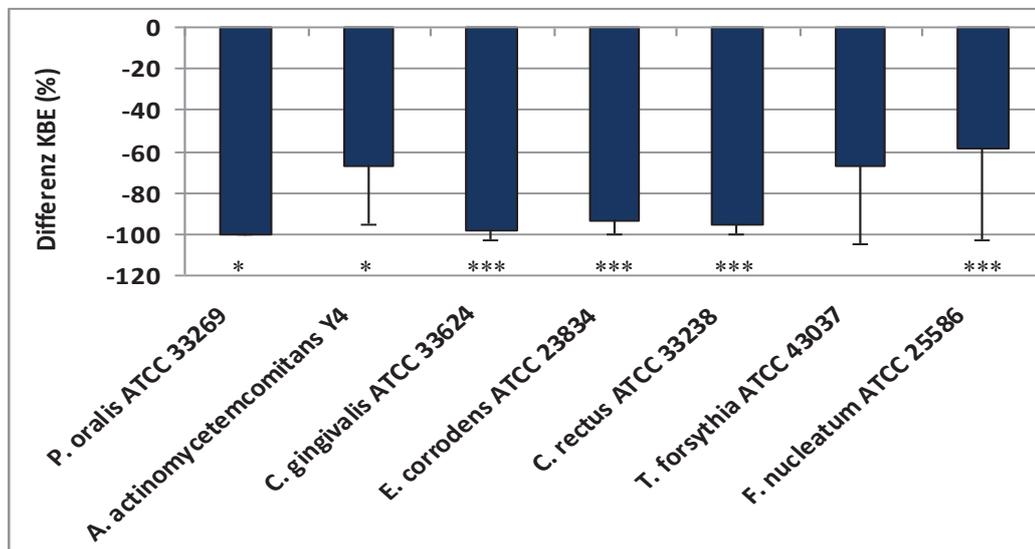


Abbildung 9: Keimabtötende Wirkung von 1-fach konzentriertem KKH-Extrakt auf die verschiedenen kapnophilen und gramnegativen anaeroben Bakterien nach einer Einwirkzeit von 60 Minuten

### 5.1.5 Superinfektionserreger

Die Ergebnisse von *E. faecalis* ATCC 29212 und *C. albicans* ATCC 76615 sind in der Abbildung 10 als Superinfektionserreger erfasst.

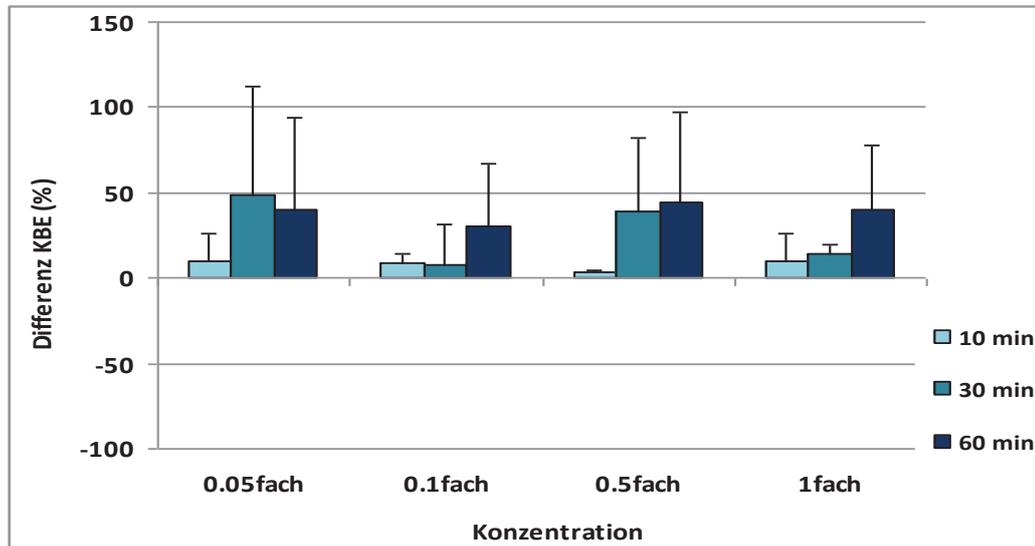


Abbildung 10: Bakterizide Wirkung verschiedener Konzentrationen KKH-Extrakt auf Superinfektionserreger zu drei Zeitpunkten im Vergleich zur Kontrolllösung

Die Graphik zeigt, dass KKH-Extrakte keine keimabtötende Wirkung auf die „Superinfektionserreger“ besaßen. Vielmehr könnte hier eine Wachstumsförderung vorgelegen haben.

Aus der Einzeldarstellung (Abbildung 11) geht hervor, dass beide Spezies unter den getesteten Extrembedingungen (60 Minuten, 1-fach konzentriert) ein um 13 % (*E. faecalis* ATCC 29212) bis 43 % (*C. albicans* ATCC 76615) erhöhtes Keimwachstum verzeichneten.

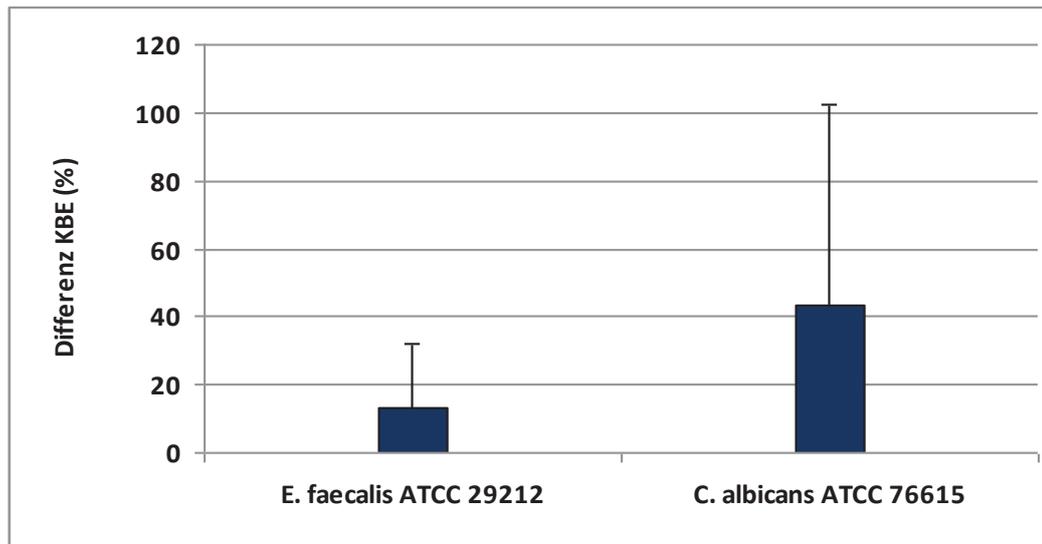


Abbildung 11: Keimabtötende Wirkung von 1-fach konzentriertem KKH-Extrakt auf die verschiedenen Superinfektionserreger nach einer Einwirkzeit von 60 Minuten

## 5.2 Minimale Hemmstoffkonzentration

Zur Bestimmung der minimalen Hemmstoffkonzentration wurden die Mikroorganismen 18 Stunden im Nährmedium mit den verschiedenen KKH-Extrakt-Konzentrationen inkubiert. Die Abbildung 12 zeigt dazu die in Gruppen zusammengefassten Keime mit den kumulativen Hemmstoffkonzentrationen.

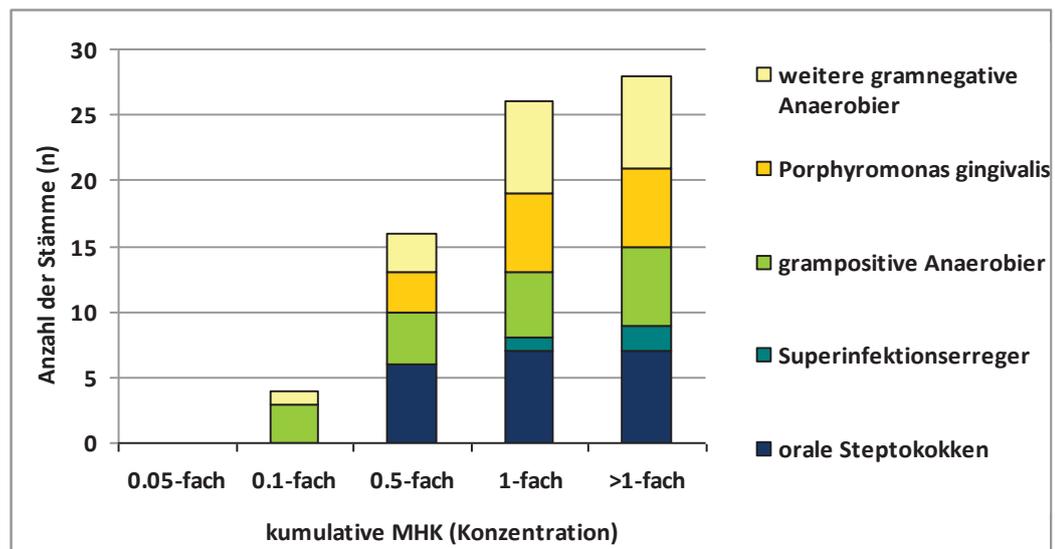


Abbildung 12: Summierte minimale Hemmstoffkonzentration von fünf Bakteriengattungen nach einer Stunde Einwirkzeit

0,05-fach konzentrierte KKH-Extrakt-Lösungen wiesen keine wachstumshemmende Wirkung auf. Grampositiv-anaerob wachsende Bakterienspezies zeigten die geringsten Resistenzen. Die Hälfte dieser Bakteriengattung konnte bereits bei einer 0,1-fach konzentrierten KKH-Extrakt-Lösung abgetötet werden. Mit steigender Konzentration konnten zusätzliche Keimgruppen abgetötet werden.

Die geringste Wirkstoffkonzentration bei der mindestens 90 % der getesteten Stämme im Wachstum gehindert werden konnten, entsprach einer 1-fach konzentrierten KKH-Extrakt-Lösung ( $MHK_{90} = 1\text{-faches KKH-Extrakt}$ ). Auch eine 1 : 1 Verdünnung auf 0,5-fach konzentriertes KKH-Extrakt führte zu einer effektiven Wachstumshemmung von 50 % ( $MHK_{50} = 0,5\text{-faches KKH-Extrakt}$ ) der getesteten Bakterienstämme.

Nachfolgend zeigt Tabelle 2 die prozentuale Aufteilung der eliminierten Keimstämme in Abhängigkeit von den getesteten Konzentrationen.

**Tabelle 2: Prozentuale Auswertung der ermittelten Wachstumshemmung bezogen auf getestete Bakterienstämme (Anzahl der sensiblen Keime in Prozent)**

Mikroorganismen	Minimale Hemmkonzentration Anzahl der Stämme (% der Gruppe)				
	0,05	0,1	0,5	1	>1
<b>gramnegative Stäbchen (n)</b>	-	1 (12,5)	2 (25)	4 (62,5)	-
<b>Porphyromonas gingivalis Ssp.</b>	-	-	3 (50)	3 (50)	-
<b>grampositive anaerobe Bakterien</b>	-	3 (50)	1 (16,7)	1 (16,7)	1 (16,7)
<b>Superinfektionserreger</b>	-	-	-	1 (50)	1 (50)
<b>orale Streptokokken</b>	-	-	6 (85,7)	1 (14,2)	-

Aus dieser Darstellung können Sensibilitäten einzelner Keimgruppierungen auf KKH-Extrakt-Konzentrationen entnommen werden. Die höchste Empfindlichkeit bei möglichst geringer Konzentration zeigten grampositive anaerobe Bakterien, bei denen bereits 0,1-fach konzentrierte Lösungen die Hälfte der untersuchten Stämme vollständig im Wachstum hemmten.

Vorwiegend kariogene Streptokokken benötigten eine höhere Konzentration (0,5-fach), damit ein Großteil der Stämme (85,7 %) in ihrer Vermehrung unterdrückt wurde. Zu gleichen Anteilen sprachen *Porphyromonas gingivalis*-Stämme auf 0,5- und 1-fache Konzentrationen an.

Ausgeprägte Resistenzen verzeichneten die anderen gramnegativen Stäbchen und Superinfektionserreger. Diese benötigten zur effektiven Reduktion die höchste getestete Dosierung von KKH-Extrakt-Zusätzen (mindestens 1-fach konzentriert).

### 5.3 Auswirkung von Kiefernkernel-Extrakten auf Biofilme

#### 5.3.1 Bildung von Biofilmen auf Kiefernkernel-Extrakt getränkten Oberflächen

Für einen Zeitraum von fünf Minuten wurden Objektgläser in KKH-Extrakt-Lösungen getränkt. Anschließend wurde die Keim-Speichel-Lösung zugegeben und die Proben 24 Stunden inkubiert.

##### *Streptococcus mutans* ATCC 25175

Abbildung 13 zeigt die graphische Auswertung der Ergebnisse. Alle getesteten KKH-Extrakt-Konzentrationen verminderten die Biofilmbildung.

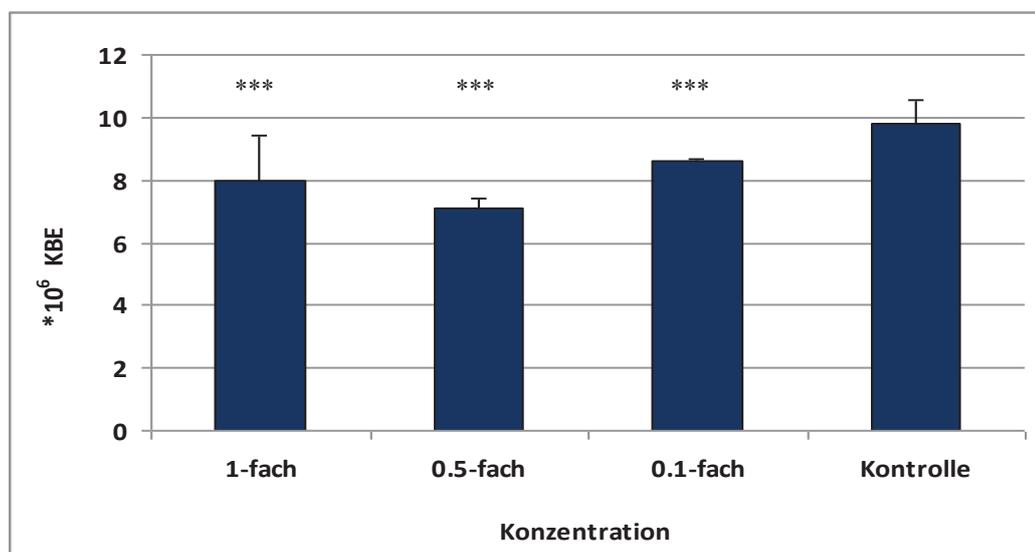


Abbildung 13: Bildung eines *S. mutans*-Biofilms auf KKH-Extrakt beschichteten Oberflächen verschiedener Konzentration

Unter den Versuchsbedingungen von 0,5- und 0,1-fach konzentrierten Lösungen konnte ein eindeutiger Zusammenhang von Konzentration und Keimnachweis hergestellt werden. Im Vergleich zu den Kontrollproben war eine Hemmung der Biofilmbildung auf bis zu 73 % bei einer 0,5-fach konzentrierten KKH-Extrakt-Lösung möglich ( $p < 0,01$ ). Mit sinkender

Konzentration (0,1-fach) konnte noch eine Reduktion auf 88 % im Vergleich zum Kontrollwert ( $p < 0,05$ ) nachgewiesen werden.

Bei Verwendung des höchstkonzentrierten KKH-Extraktes (1-fach) war eine Verminderung der Zahl von *S. mutans* ATCC 25175 auf 82 % ( $p < 0,01$ ) feststellbar. Somit lag dieser Wert zwischen der niedrigstkonzentrierten und der mittleren Verdünnungsstufe.

#### *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277

KKH-Extrakte zeigten in dieser Versuchsreihe keinen wachstumshemmenden Einfluss auf die Biofilmbildung des *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277-Stammes (Abbildung 14).

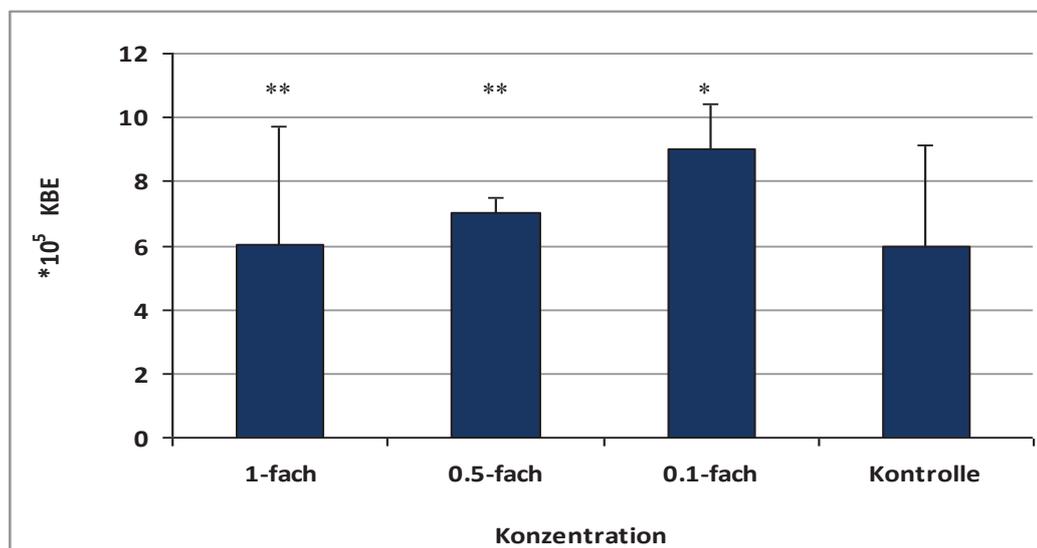
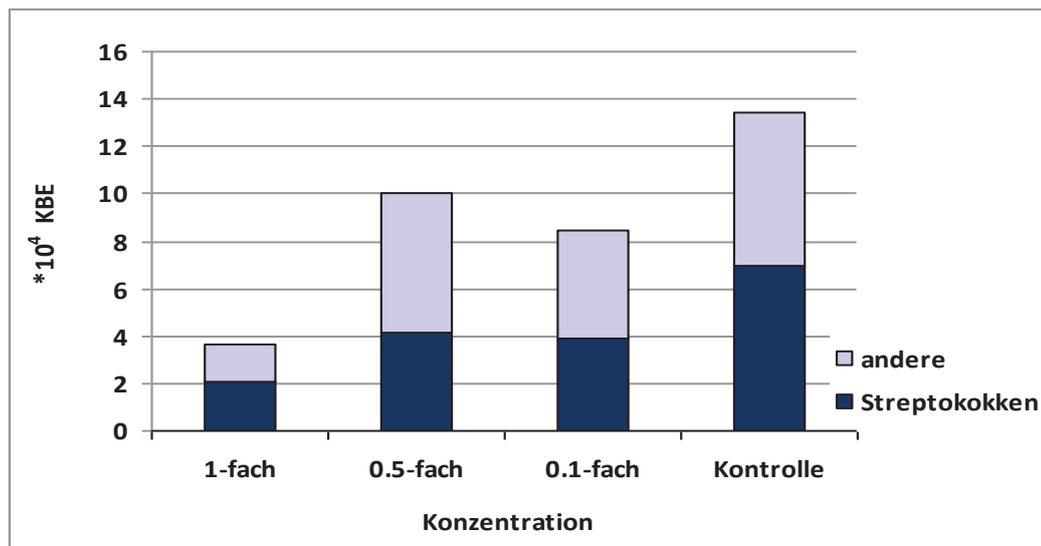


Abbildung 14: Bildung eines *P. gingivalis*-Biofilms auf KKH-Extrakt beschichteten Oberflächen verschiedener Konzentration

#### Komplexer Biofilm

In der grafischen Auswertung (Abbildung 15) zeigt sich ein hemmender Einfluss von KKH-Extrakt auf die Bildung eines Multi-Spezies-Biofilms. Eine um 73 % reduzierte Bakterienzahl innerhalb des Biofilms konnte bei der maximal getesteten Dosis (1-fach) verzeichnet werden. Erheblichen Einfluss auf das Ausmaß des Biofilmwachstums zeigte das Vorhandensein oraler Streptokokken. So war das Verhältnis von Streptokokken zu andern Keimspektren in einem Versuchsansatz annähernd 1 : 1.



**Abbildung 15: Bildung eines komplexen Biofilms auf KKH-Extrakt beschichteten Oberflächen verschiedener Konzentration**

1-fach konzentriertes KKH-Extrakt verminderte signifikant ( $p < 0,05$ ) die Anlagerung von *S. sanguinis* 108a als auch der anderen - im Biofilm kooperierenden - Keime (*F. nucleatum* ATCC 25586, *A. viscosus* ATCC 15987, *P. gingivalis* M5-1-2).

### 5.3.2 Einfluss von Kiefernkerholz auf biofilmtragende Oberflächen

24 Stunden vor Versuchsbeginn wurden Biofilme bestimmter Bakterien auf Glasoberflächen etabliert, die anschließend fünf Minuten dem KKH-Extrakt verschiedener Konzentrationen ausgesetzt waren. Nach sechsstündiger Inkubation in einem Nährmedium wurde die Zahl der noch im Biofilm vorhandenen vitalen Bakterien bewertet.

In der Ergebnisauswertung sind Grafiken erstellt worden, die den Einfluss der Testsubstanz nach einer Proliferationsphase von sechs Stunden widerspiegeln.

#### *Streptococcus mutans* ATCC 25175

Das Diagramm (Abbildung 16) veranschaulicht, dass KKH-Extrakte, unabhängig von der Konzentration, keinen wachstumshemmenden Einfluss auf den *S. mutans*-Film hatten. Die 0,5- und 0,1-fach konzentrierten Testsubstanzen führten tendenziell zu einer annähernd gleich stark ausgebildeten Wachstumsrate, die im Mittel 64 % über der Vergleichsgruppe lag.

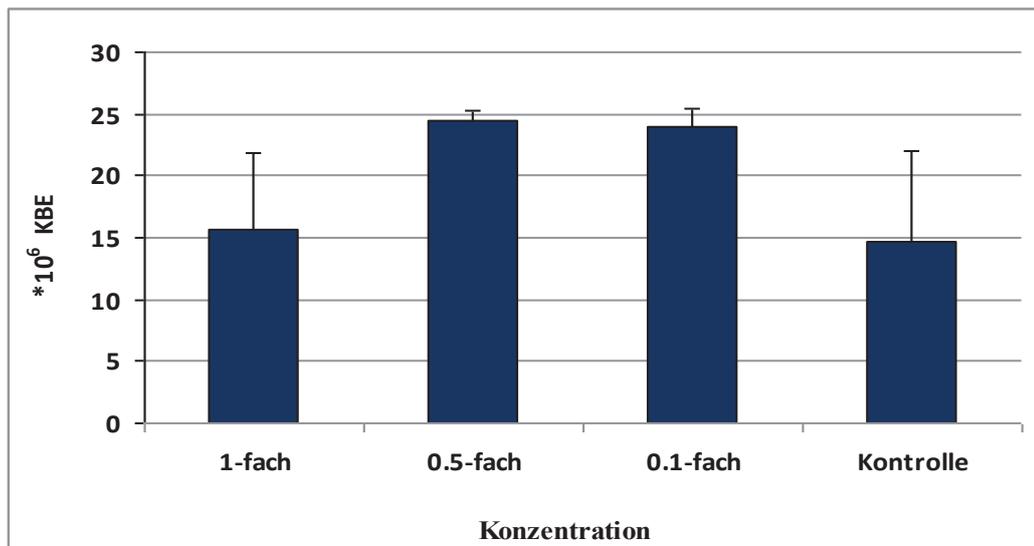


Abbildung 16: Einfluss von KKH-Extrakt verschiedener Konzentrationen auf einen etablierten *S. mutans*-Biofilm nach einer 6-stündigen Reifungsphase

*Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277

*Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 zeigte ein inhomogenes Verhalten gegenüber Konzentrationsunterschieden (Abbildung 17). Statistisch signifikante Unterschiede konnten nicht nachgewiesen werden.

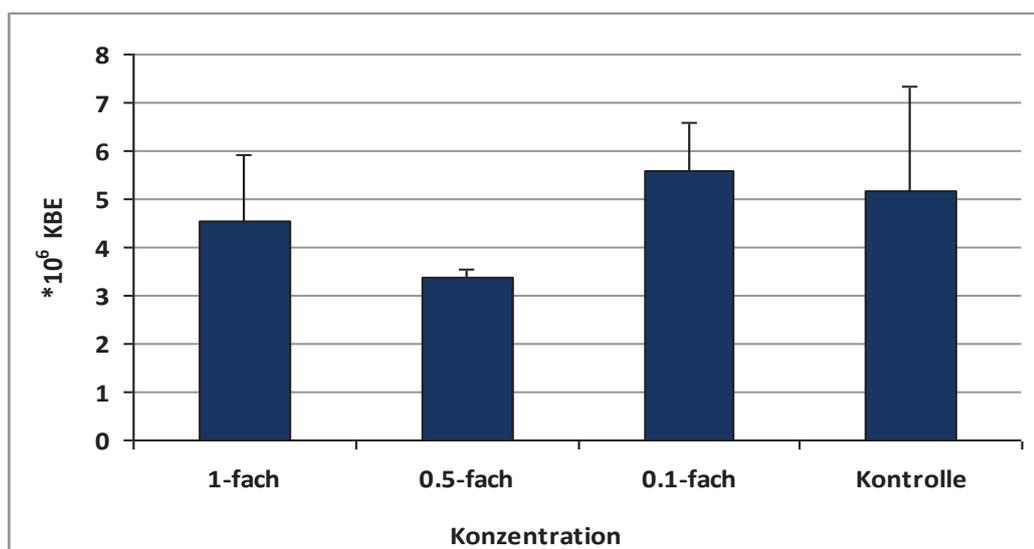
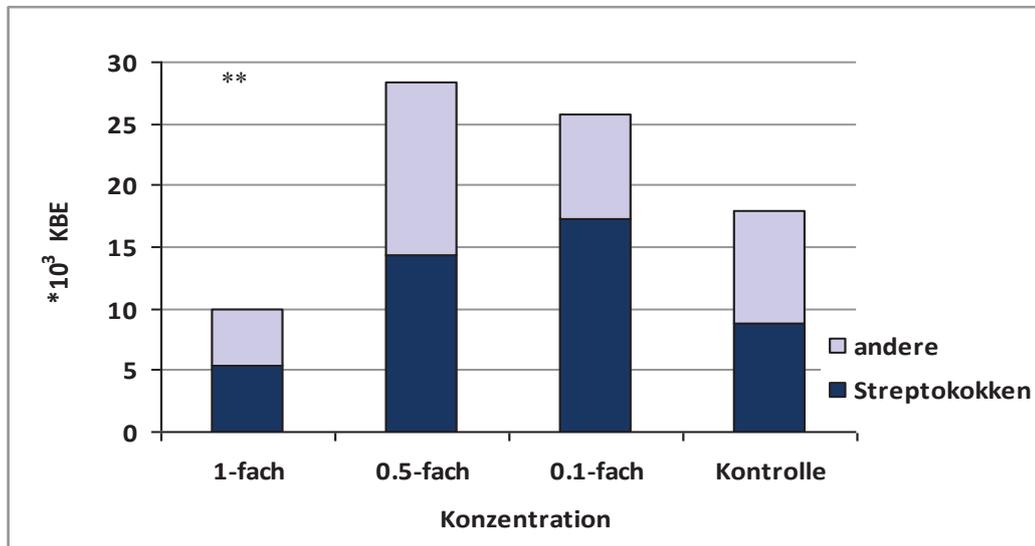


Abbildung 17: Einfluss von KKH-Extrakt verschiedener Konzentrationen auf einen etablierten *P. gingivalis*-Biofilm nach einer 6-stündigen Reifungsphase

### Komplexer Biofilm

Entsprechend der Abbildung 18 zeigten wachstumshemmende Effekte 1-fach konzentrierte KKH-Extrakt-Lösungen. Im Vergleich zur Referenzprobe konnte die Keimbildung um 45 % ( $p < 0.05$ ) reduziert werden.



**Abbildung 18: Einfluss von KKH-Extrakt verschiedener Konzentration auf einen etablierten komplexen Biofilm nach einer 6-stündigen Reifungsphase**

Im mittleren und niedrig dosierten Bereich konnte mit sinkender Konzentration ein zunehmendes Vorhandensein von Streptokokken und eine verminderte Anzahl von Parodontitisekeimen nachgewiesen werden. In diesem Intervall führten KKH-Extrakte zu einer verstärkten Biofilmbildung, bei der vor allem Streptokokken vermehrt etabliert wurden.

## 5.4 Zusammenfassende Ergebnisbetrachtung

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass KKH-Extrakte einen wachstumshemmenden Effekt auf die getesteten, vorwiegend oralen Bakterienstämme haben können.

Hervorzuheben ist, dass vor allem die parodontalpathogene Spezies *Porphyromonas gingivalis* in den Einzeltestungen nahezu vollständig abgetötet werden konnten. Ausnahme bildeten Superinfektionserreger, bei denen eine wachstumsfördernde Reaktion nachgewiesen werden konnte.

Die Mehrheit der getesteten Mikroorganismen konnte bei einer 0,5-fach konzentrierten Lösung abgetötet werden. Mit steigender Konzentration war es möglich gewesen, auch den restlichen Anteil lebender Keime zu eliminieren.

Die Akkumulation der Mikroorganismen auf Oberflächen wurde erschwert, wenn diese vor Adhäsion und Organisation der Keime mit dem KKH-Extrakt beschichtet wurden. Diese Biofilme etablierten sich schlechter auf Oberflächen. Dieser Zusammenhang galt insbesondere für das aerobe Keimspektrum.

Keime, die bereits in einem Biofilm-Verbund organisiert waren, wiesen eine deutlich höhere Resistenz gegenüber der Testsubstanz auf. Sie zeigten nach Extraktzugabe keine wachstumshemmenden Veränderungen.

## 6 Diskussion

Die Recherche der allgemein genutzten und anerkannten Datenbanken ergab, dass keine vergleichbaren Studien, die den Einfluss wässriger KKH-Extrakte auf orale Bakterien und Pilze untersucht haben, existieren. Zur Diskussion wurden deswegen vorwiegend Studien über Teebaumöl und andere ätherische Öle mit ähnlichem Versuchsaufbau herangezogen.

Diese Arbeit soll einen Einblick in das antibakterielle Potential von KKH-Extrakten geben. Es wurde auf etablierte und standardisierte Methoden zurückgegriffen, die die Auswirkungen auf solitäre als auch auf komplexe Lebensformen untersuchen sollten.

### 6.1 Methodik

Sämtliche Untersuchungsreihen wurden in zwei Versuchsansätzen geplant und durchgeführt, um mögliche Einflussgrößen, wie die Herstellung verdünnter KKH-Extrakt-Lösungen, zu minimieren. Zudem wurden bei den Untersuchungen Keimausstriche auf Nährbodenplatten vorgenommen, damit mögliche Kontaminationen erkannt werden konnten.

Die Zusammensetzungen der 1-fachen und 2-fachen KKH-Extrakt-Stammlösungen wurden vom Hersteller nicht bekannt gegeben. Es ist davon auszugehen, dass die 1-fache KKH-Extrakt-Lösung der Gebrauchskonzentration entspricht.

Die Stammlösungen wurden gebrauchsfertig in Glasflaschen geliefert. Während der gesamten Versuchsreihe wurden diese gekühlt und lichtgeschützt gelagert. Dadurch konnte die Konstanz der Testsubstanz in allen Versuchen garantiert werden. Da Pflanzenextrakte gewöhnlich umweltabhängigen Schwankungen unterliegen (Piispanen und Saranpää 2002) und somit Unterschiede in der Wirkstärke auftreten könnten, wurde das Extrakt nach dem Herstellungsprozess in ausreichender Menge zur Verfügung gestellt.

Planktonisch vorkommende Bakterien reagieren wesentlich sensibler auf Desinfizienzien als jene, die in einem Biofilm vergesellschaftet sind (Høiby et al. 2010, Thrower et al. 1997). Deshalb sollte auch unter Laborbedingungen eine Beurteilung der Effizienz von antibakteriellen Substanzen im Biofilmverbund erfolgen (Wilson 1996).

### 6.1.1 Bakterizide Wirkung

Bei Time-Kill-Versuchen hängt die Zeitdauer der Versuchsbedingungen von der zu testenden Keimflora, deren Vorkommen, der Applikationsform der Testsubstanz und dem Anwendungsbereich ab.

Das Ausmaß der bei Testungen von Pflanzenextrakten verwendeten Versuchszeit variiert enorm. Beispielsweise findet Teebaumöl auch in der Zahnmedizin Anwendung. Limitiert wird das Wirkpotential jedoch durch eine verhältnismäßig kurze Anwendungsdauer. Orientiert an dem üblichen Gebrauch von Mundspüllösungen sind in Teebaumölstudien geringe Zeitintervalle von Sekunden bis wenigen Minuten verbreitet (Drake et al. 2011, Hammer et al. 2003). Andere Autoren, wie Kwieciński et al. (2009) und Brady et al. (2006), verlängerten die Testbedingungen des Teebaumöles gegenüber *S. aureus* und dessen multiresistenten Vertreter (*MRSA*) auf 15, 30 und 60 Minuten bzw. auf 1, 2, und 3 Stunden.

Vor dem Hintergrund des zahnmedizinischen Einsatzes mit kurzen Expositionszeiten wurden in dieser Studie die Testkeime relativ langen Zeitintervallen von 10, 30 und 60 Minuten dem KKH-Extrakt ausgesetzt. Dieses Vorgehen wird dadurch begründet, dass die antibakterielle Wirkung von Mundspüllösungen oder auch Zahnpasten über die Zeit des unmittelbaren Kontaktes anhält (Pan et al. 2000, Jenkins et al. 1994).

Das synthetisch hergestellte Chlorhexidin zeichnet sich durch eine besonders hohe Substantivität aus und ist somit als Goldstandard für die orale Antiseptik definiert worden. Aufgrund seiner positiven Molekülladung bindet es bevorzugt an die anionischen Bestandteile von Bakterienoberflächen und unterbindet deren Stoffwechsel. Durch die ebenfalls negativ geladenen Proteinstrukturen auf Zahn- und Mundschleimhautoberflächen verweilt das CHX erheblich über die reine Spülzeit in der Mundhöhle. Nachweislich ist CHX in seiner aktiven Form mehr als zwölf Stunden in der Mundhöhle vorzufinden (Arweiler 2009).

In dieser In-vitro-Studie konnte den physiologischen Einflussgrößen, wie der Elimination durch Schluckvorgänge aus der Mundhöhle oder substanzspezifischen Eigenschaften, nicht Rechnung getragen werden. Aus diesem Grund sind Untersuchungen über die Substantivität von KKH-Extrakten notwendig.

### 6.1.2 Minimale Hemmstoffkonzentration

Die Untersuchungsverfahren zur Empfindlichkeitsprüfung von Mikroorganismen gegenüber antimikrobiell wirksamen Substanzen sind standardisiert, z. B. durch DIN und EUCAST (<https://ars.rki.de/MikroMethoden.aspx>, <http://www.eucast.org>).

Zur Bestimmung der MHK wurde die Mikrodilutionsmethode gewählt. Hübner et al. (2007) fassen die Vorteile der Mikrodilutionsmethode wie folgt zusammen: gute Standardisierbarkeit, Eignung für das Routinelabor, effiziente und kostengünstige Testung sowie die leichte Bestimmung der MBK. Problematisch bei diesem Verfahren ist die visuelle und nicht standardisierte Beurteilung der Trübung. Brady et al. (2006) umgingen in ihren Teebaumöluntersuchungen diesem individuellen Faktor, indem Tetrazolium (MTT) zusätzlich in die Mikrotiterplatten gegeben wurde. Dieses Salz wird bei metabolischer Aktivität reduziert und führt somit zu einem Farbumschlag. Ein Keimwachstum wird durch die Bildung einer roten Farbe sicher erkannt.

Da mit diesem Verfahren auch keine Unterscheidung von Mischkulturen möglich ist, wurden in dieser In-vitro-Studie zusätzlich Keimausstriche auf Nährbodenplatten vorgenommen.

Es besteht die Möglichkeit, dass sich die Erreger unter Laborbedingungen derart verändern, dass sie für das klinische Isolat nicht mehr repräsentativ erscheinen. Deshalb wurden auch klinische Isolate der *Porphyromonas gingivalis*-Spezies berücksichtigt.

Andere Möglichkeiten der Empfindlichkeitsbestimmung sind die Agardilutions- und Agardiffusionsmethode. Allerdings erlaubt die visuelle Ablesung der Agardiffusionsmethode und die oftmals unscharfen Hemmhofgrenzen keine sichere Auswertung und mindert die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Zum anderen eignet sich die Methode nicht für langsam wachsende Keime - wie Anaerobier (Hübner et al. 2007).

Die MHK-Bestimmung einer Testsubstanz bewertet keine Biofilmbildung. Daher sollte die Effektivität einer antimikrobiellen Substanz auch durch seine Biofilm-Eliminationskonzentration (BEC) beschrieben werden. Dies entspricht der Konzentration, die benötigt wird, um einen Organismus, der in einem Biofilm kooperiert ist, abzutöten (Wilson 1996).

### 6.1.3 Wirkungen auf Biofilme

Die Biofilmversuche unterschieden sich im Wesentlichen durch den Zeitpunkt des Auftragens des KKH-Extraktes – vor bzw. nach der Initiierung des Biofilms. Als Trägermaterial für die Keimbesiedelung wurden handelsübliche Objektgläser gewählt.

Brady et al. (2006) initiierten ebenfalls einen Biofilm auf Glasscheibchen. Die Glasträger wurden in konische Behälter mit der Testsubstanz gegeben. Diese wurden geschüttelt und in einem Inkubator für eine Stunde bei 37 °C gelegt. Dem gegenüber etablierten Agarwal et al. (2008) einen *C. albicans*-Biofilm auf Mikrotiterplatten. Zur Adhäsion des Keimes auf der Oberfläche wurde eine Wachstumszeit von 90 Minuten veranschlagt. Der Versuchsablauf von Brady et al. (2006) und Agarwal et al. (2008) unterscheidet im Wesentlichen in der Auswahl des Keimträgers und der Reifungsdauer. Nachfolgende Arbeitsschritte, wie die Ablösung von Mikroorganismen durch ein Ultraschallbad, sind identisch und wurden auch in dieser Studie analog ausgeführt.

Wesentlicher Nachteil dieser eher statischen Untersuchungsmethode ist, dass physiologische Einflussgrößen, wie die Fließrate des Speichels und die Verdünnung der Testsubstanz in der Mundhöhle, nicht berücksichtigt werden.

Eine Alternative zu dieser Art der Biofilm-Testung nutzen Pan et al. (2010). Diese Arbeitsgruppe verwendete in In-vitro-Versuchen ein rezirkulierendes Durchflussmodell (recirculation flow-through biofilm model – RFTB). Speichel wurde mit einer Fließrate von 0,8 ml/min für 24 Stunden über den induzierten Biofilm gegeben. Während der folgenden 60 Stunden wurde jede Mundspüllösung fünf Mal appliziert. Anschließend erfolgte die Auswertung.

Dieses dynamische Untersuchungsverfahren steht den physiologischen Bedingungen näher als die zuvor beschriebene Methode. Allerdings ist der Aufwand für dieses Modell sehr groß. Für die vorliegende Studie wurde der Einsatz eines einfachen Biofilms als ausreichend angesehen.

## 6.2 Ergebnisse

Damit Stoffe als „antibakteriell“ bezeichnet werden können, müssen diese bestimmte Eigenschaften erfüllen. Zum einen muss der Biofilmbildung vorgebeugt und die Integrität eines bereits vorhandenen Keimverbundes gestört werden. Substanzen, die diese Bedingungen erfüllen, werden als „Antiplaque-Agenzien“ bezeichnet. Werden spezifische plaquerelevante Keime abgetötet und somit dem weiteren Biofilmwachstum vorgebeugt, können diese Substanzen nach Wilson (1996) als „antimikrobielle Agenzien“ ausgewiesen werden.

Die Auswertung der Einzelkeim-Versuche ergab, dass die getesteten anaeroben Keime empfindlicher auf KKH-Extrakte reagierten als aerobe Keime. Insbesondere der anaerobe *P. gingivalis* konnte nahezu vollständig eliminiert werden. Unter den anaeroben Spezies zeigten grampositive und -negative Keime ein ähnliches Empfindlichkeitsverhalten. Bei den aeroben Spezies konnten bei einer 60-minütigen Einwirkzeit einer 1-fach konzentrierten KKH-Extrakt-Lösung durchschnittlich 50 % der Bakterien abgetötet werden. Von den getesteten Keimen dieser Gruppe reagierte *S. gordonii* mit einer Eradikationsrate von 89 % am empfindlichsten.

Filоче et al. untersuchten 2005 verschiedene ätherische Öle u. a. auch Cool Mint Listerine bezüglich ihrer antibakteriellen Eigenschaften gegenüber *S. mutans*-Kulturen. Dieses Produkt enthält verschiedene Essenzen aus Thymian, Eukalyptus und Minze. Bei einer 50%igen Cool Mint Listerine-Lösung konnten solitär-lebende *S. mutans* Keime um bis zu ca. 80 % gehemmt werden.

Ein eindeutiger, antimikrobieller Effekt von KKH-Extrakten auf *S. mutans* konnte in dieser Studie nicht festgestellt werden.

Der *S. mutans*-Keim ist für die Initiierung kariöser Prozesse bedeutend. Da sich dieser bereits bei einer 50%igen Cool Mint Listerine-Lösung größtenteils eliminieren lässt, erscheint die karieshemmende Wirkung der Listerine dem KKH-Extrakt überlegen.

Eine andere Untersuchungsreihe verglich drei auf dem Markt erhältliche Mundspüllösungen mit unterschiedlichen Wirkkomponenten. Zum einen wurde auch hier das pflanzenextrakt-haltige Cool Mint Listerine-Präparat betrachtet und zum anderen das synthetisch hergestellte Peridex, ein 0,12%iges CHX-Präparat. Unter dem Aspekt, dass auch chemische Zusätze

Einfluss auf die antibakteriellen Eigenschaften haben können, wurde ein weiteres natürlich gewonnenes Präparat frei von Alkohol- und Konservierungsstoffen - Natural dentist - hinzugezogen. Anhand von 40 getesteten Keimspezies wies Natural dentist im Vergleich mit Listerine signifikant geringere MHKs bei Aktinomyzeten und parodontalpathogenen Keimen wie *T. forsythia* und *Prevotella*-Spezies auf (Haffajee et al. 2008).

Ähnliche Keime sprechen im gleichen Maße auf das Natural dentist-Präparat als auch auf KKH-Extrakte an. Die Studie um Haffajee et al. (2008) zeigte aber auch, dass Peridex die geringste MHK in Bezug auf das gesamte getestete Keimspektrums aufwies und somit die beste antimikrobielle Aktivität besaß. Die Gemeinsamkeiten zwischen Natural Dentist und dem KKH-Extrakt sind die alkohol- und konservierungsstofffreie Zusammensetzung sowie die bevorzugte Wachstumshemmung grampositiver Anaerobier bei geringen Konzentrationen. Es bleibt zu klären, ob KKH-Extrakte in ihrer antibakteriellen Wirkung - ähnlich wie Natural Dentist - dem CHX-Präparat unterlegen ist.

Eine weitere Substanz, die in ihrer natürlichen Form Anwendung findet, ist Teebaumöl. Bei MHK-Bestimmungen beobachteten Kulik et al. (2000), dass *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum* und *P. gingivalis* auf Teebaumöl-Lösungen und -Gele am empfindlichsten reagierten. Teebaumöl ist schon in niedrig konzentrierten Bereichen gegen das gramnegative, vor allem parodontalpathogene, Keimspektrum effizient. Die ausgeprägtesten Resistenzen wiesen *S. mutans* und *P. intermedia* auf. Da Teebaumöl im Konzentrationsbereich von 2 – 5 % Anwendung findet, inhibiert bereits 2%iges Teebaumöl *S. mutans*, *S. sanguinis*, *A. actinomycetemcomitans*, *A. naeslundii*, *F. nucleatum*, *P. intermedia*, *P. gingivalis* und *C. albicans* effektiv (Juliano et al. 2008, Hammer et al. 2003, Kulik et al. 2000).

Die Wirkstoffkonzentration, bei der erstmals KKH-Extrakte Keime abtöten konnten, entsprach der 10%igen KKH-Extrakt-Gebrauchskonzentration (0,1-fach) und bezog sich überwiegend auf das grampositive, anaerobe Keimspektrum (*A. naeslundii*, *A. israelii*). Durch eine Konzentrationserhöhung gelang es aber auch, das parodontalpathogene Keimspektrum zu eradizieren. Hierfür war jedoch die Gebrauchskonzentration (1-fach) notwendig.

Es ist festzuhalten, dass verschiedene Keimspektren unterschiedlich auf Teebaumöl bzw. KKH-Extrakte reagieren. Zur Eliminierung gramnegativ-anaerober Keime ist bereits niedrig konzentriertes Teebaumöl ausreichend. Im Gegensatz dazu sprachen in erster Linie

grampositiv-anaerobe Bakterien auf gering konzentrierte KKH-Extrakt-Lösungen an. Beide Pflanzenextrakte vermögen prinzipiell die gleichen Keime abzutöten, jedoch ist dies in hohem Maße von der Substanzkonzentration abhängig. Unter Betrachtung der klinischen Relevanz bestimmter Mikroorganismen (Parodontalerkrankungen) und der effektiven Konzentrationsstärke übertrifft das Teebaumöl den Wirkungsbereich des KKH-Extraktes und ist diesem somit überlegen.

Es ist nicht auszuschließen, dass die Wirksamkeit von KKH-Extrakten durch Kombination mit anderen ätherischen Ölen zu synergistischen Effekten führen kann. So kann das Wachstum obligat anaerober und kapnophiler Mikroorganismen (*F. nucleatum*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *S. sanguinis*, *S. sobrinus*, *A. actinomycetemcomitans*, *E. corrodens*) durch Teebaumöl in Kombination mit Pfefferminzöl im Konzentrationsbereich von weniger als 0,6 % gehemmt werden. Teebaum- und Pfefferminzöle sind demnach in der Lage, 2/3 obligat anaerob wachsender und kapnophil-lebender Bakterien abzutöten (Allaker und Douglas 2009, Shapiro et al. 1994).

Damit auch KKH-Extrakte 67 % der Keime abtöten können, ist die 1-fache Gebrauchskonzentration notwendig. Inwiefern andere Pflanzenöle synergistisch das Wirkpotential von KKH-Extrakten beeinflussen, sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Die Auswirkungen auf Superinfektionserreger könnten in Kombination mit anderen ätherischen Ölen verstärkt werden. Es konnte gezeigt werden, dass *C. albicans* und *E. faecalis* unter den getesteten Extrembedingungen einer 60 Minuten andauernden Exposition mit der 1-fach konzentrierten KKH-Extrakt-Lösung zu keinem gewünschten Ergebnis führte. Eine Ursache könnte durch die für Superinfektionserreger geringe Wirkzeit von 60 Minuten begründet werden. Bereits Juliano et al. (2008) zeigten, dass 1%iges Teebaumöl erst nach 120 Minuten in der Lage ist, Hefezellen abzutöten. Bei niedrig dosierten Teebaumölessenzen von 0,5 - 0,25 % verlängert sich die bakterizid-wirksame Zeit auf 300 Minuten. Weitere Studien sollten daher angestrebt werden.

Die unterschiedliche Wirksamkeit von Antiseptika auf grampositive und -negative Bakterien ist Gegenstand einiger Untersuchungen gewesen. Das überprüfte KKH-Extrakt ist ein wässriges Extrakt mit entsprechenden hydrophilen Eigenschaften. Phospholipide auf der

Zelloberfläche der Bakterien sind für deren hydrophile Natur verantwortlich. Die Zellwand gramnegativer Bakterien begrenzt jedoch den Eintritt in die Zelle. Ursächlich dafür sind Lipopolysaccharide, die den Eintritt wässriger Substanzen in die Bakterienzelle unterbinden. Es ist davon auszugehen, dass gramnegative Bakterien widerstandsfähiger als ihre grampositiven Vertreter sind. Vor allem gegenüber Phenolen sollten gramnegative Bakterien daher unempfindlicher reagieren (Russell 1991).

Die antibakterielle Wirkung des Kiefernkernholzes wird jedoch durch den hohen Gehalt von Polyphenolen, Terpenen und Taninen begründet (Ferrazzano et al. 2011, Dalleau et al. 2008, Sato et al. 1996, Osawa et al. 1992). Phenole zerstören in hohen Konzentrationen die Bakterienzellwand und führen auch bereits bei geringen Dosierungen zu einer Enzymhemmung (David 1997).

Eine Erklärung des Wirkmechanismus einzig und allein durch die Betrachtung der physikochemischen Eigenschaften ist aber nicht ausreichend. Es sind daher weitere Untersuchungen notwendig, welche die antimikrobielle Wirkweise aufdecken.

Strategisch verbessern Mikroorganismen ihre Lebensbedingungen und sichern ihr Überleben, indem Biofilmkomplexe ausgebildet werden. Biofilmverbände stellen damit eine Herausforderung für antimikrobielle Agentien dar. Diese Substanzen müssen somit befähigt sein, den gesamten Biofilm bis in die tiefsten Schichten zu durchdringen. Bestimmte Zellen sind in diesem Verbund in der Lage, auch bei begrenztem Nährstoffangebot, ihren Stoffwechsel aufrecht zu erhalten, indem sie diesen verlangsamen. Dadurch sind diese Keime weniger anfällig gegenüber antimikrobiellen Detergentien (Aparna et al. 2008, Pan et al. 2000).

Bei der Betrachtung der Biofilm-Versuche war es nicht möglich, eine eindeutige Aussage zu treffen. Innerhalb der Mono-Spezies-Biofilme *S. mutans* und *P. gingivalis* wurden unterschiedliche Empfindlichkeiten gegenüber KKH-Extrakten ermittelt. Aus diesem Grund sind weiterführende Untersuchungen in-vitro als auch in-vivo anzustreben, damit verlässliche Ergebnisse vorliegen, welche die sichere Indikation von KKH-Extrakten anzeigen.

Andere Autoren stellten fest, dass der Verbund aus Keimen im Biofilm eine Barriere auch für ätherische Öle darstellt. So zeigten Filoche et al. (2005), dass in *S. mutans*-Biofilmkulturen

die Wachstumshemmung der 50%igen Cool Mint Listerine nicht zum Tragen kommt und somit uneffektiv ist. Bei dieser Cool Mint Listerine-Lösung betrug die Hemmung des Biofilmwachstums für *S. mutans* weniger als 50 %. Die Einzelkeime waren also zweimal anfälliger als ihre Biofilmkulturen.

Ausschlaggebend für die Effektivität oraler Antiseptika ist die Ausprägung der Biofilmreifung. Anschaulich wird dies in den KKH-Extrakt-Biofilmversuchen zum kariogenen *S. mutans*. Hier zeigte sich, dass planktonisch vorkommende Mikroorganismen auf KKH-Extrakt-benetzten Oberflächen erschwert formierten. Ausgebildete Biofilme hingegen wurden in ihrem Stoffwechsel nicht negativ beeinflusst.

Andere ätherische Mundspüllösungen - zum Beispiel auf der Basis von Zimt- und Teebaumöl - vermögen das Wachstum kariogener Bakterien während der planktonischen Phase ebenso wie in der Biofilmkultur zu hemmen (Islam et al. 2007).

### 6.3 Mögliche klinische Anwendung

Die Zahnplaque lässt sich effizient durch die Zahnbürste beseitigen. Diese mechanische Intervention wird durch Zahnpasten unterstützt. Die antibakteriellen Eigenschaften, vor allem pflanzlicher Zahncremes, variieren enorm. Abhängig von der Zusammensetzung lassen sich auf dem Markt entsprechende Präparate finden, deren antibakteriellen Eigenschaften gegenüber bestimmten Spezies begrenzt sind. Aufgrund der hohen Selektivität pflanzlicher Zahncremes ist die sichere Anwendung erst durch den Nachweis bestimmter Keime sinnvoll (Lee et al. 2004).

Die Untersuchungen von Lee et al. zeigten, dass pflanzliche Zahnpasten, wie „Dental Gel“ [NutriBiotic, Lakeport, Calif.], in der Lage sind verschiedene Keimspezies effektiv zu eradizieren. Andere Präparate, wie „Dental Herb“ [Franklin Botanical Laboratory, Northridge, Calif.] scheinen auf Infektionen mit *S. sanguinis* begrenzt zu sein. In der Studie konnte das Wachstum von *S. mutans*, *A. viscosus* oder *C. albicans* durch diese Zahncreme nicht gehemmt werden.

Das KKH-Extrakt erschwerte in dieser Studie die Plaqueneubildung und könnte somit als zusätzliche, oberflächenaktive Komponente in Zahncremes sinnvoll sein. Die Erstbesiedler

auf Zahnoberflächen sind Aktinomyzeten. Durch Schluckvorgänge sinkt der Anteil antibakterieller Substanzen in der Mundhöhle. Da KKH-Extrakte auch bei geringen Konzentrationen - vor allem gegen diese Spezies - effektiv sind, kann der Initiierung von Plaque durch Frühbesiedler entgegengewirkt werden.

Aufgrund der positiven Ergebnisse im parodontalpathogenen Keimspektrum ist auch die Verwendung von KKH-Extrakten als slow-release- bzw. LDD-Präparat (local delivery devices) denkbar. Auf dem Markt erhältliche Präparate, wie das Ligosan, enthalten Doxycyclin, andere Tetracyclin, Minocyclin, Metronidazol oder Chlorhexidin. Vor allem antibiotikahaltige Applikationsformen bergen das Risiko der Resistenzbildung in sich (Eickholz et al. 2002, Greenstein 2000, Mombelli 1998).

Durch das Einbringen eines viskösen, hochdosierten Präparates in die Zahnfleischtasche soll eine Depotwirkung erreicht werden. Abhängig vom Medikament verbleiben diese dann über 24 Stunden bis hin zu mehreren Tagen im Sulkus. Das Problem der Resistenzbildung von Mikroorganismen durch geringe Wirkstoffkonzentrationen oder zu kurze Verabreichungsdauer kann somit durchbrochen werden (Mombelli 1998).

Dies sind nur zwei mögliche Optionen, bei denen KKH-Extrakte zur Anwendung kommen könnten. Andere pflanzliche Präparate könnten durch diesen Bestandteil auch ergänzt werden.

## 7 Schlussfolgerungen

Die untersuchten KKH-Extrakte besitzen antibakterielle Eigenschaften. Das Ausmaß der Keimreduktion ist allerdings von der Zeit, der Konzentration und von der Keimflora abhängig.

Bereits im niedrig konzentrierten Bereich sind KKH-Extrakte besonders gegenüber der anaeroben parodontalpathogenen Keimflora wirksam. Damit ein umfangreiches Wirkspektrum erzielt werden kann, sollte das KKH-Extrakt jedoch mindestens in der 1-fachen Gebrauchskonzentration angewendet werden.

Die KKH-Extrakte zeigen eine verminderte Wirksamkeit auf Bakterien im Biofilm. Die Bildung von Biofilmen kann durch das Extrakt inhibiert werden, allerdings besteht keine bakterizide Wirkung auf bereits etablierte Biofilme.

KKH-Extrakte scheinen somit ähnliche antimikrobielle Eigenschaften, wie andere rein auf Pflanzenextrakten basierende Mundspüllösungen, zu besitzen. Goldstandard für die orale Desinfektion sind und bleiben demnach Chlorhexidin-Präparate. Allerdings können KKH-Extrakte in der forcierten Behandlung von Parodontopathien ergänzend eingesetzt werden. Ebenso kann durch die Kombination mit anderen Pflanzenextrakten ein breites Wirkspektrum ermöglicht werden.

## 8 Literatur- und Quellenverzeichnis

- Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. 2005. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol.* 43 (11): 5721-5732.
- Adams D, Addy M. 1994. Mouthrinses. *Adv Dent Res.* 8 (2): 291-301.
- Agarwal V, Lal P, Pruthi V. 2008. Prevention of *Candida albicans* biofilm by plant oils. *Mycopathologia* 165 (1): 13-19.
- Allaker RP, Douglas CW. 2009. Novel anti-microbial therapies for dental plaque-related diseases. *Int J Antimicrob Agents* 33 (1): 8-13.
- Anonymous. 1957. International glossary of terms used in wood anatomy: Prepared by the Int. Assoc. Wood Anatomists. *Trop. Woods.* 107: 1-36.
- Aparna MS, Yadav S. 2008. Biofilms: microbes and disease. *Braz J Infect Dis.* 12 (6): 526-530.
- Arweiler NB. 2009. Die Anwendung von Chlorhexidin zur Prophylaxe und Therapie. *Zahnärzteblatt Baden-Württemberg.* Ausgabe 2009-05.
- Avila M, Ojcius DM, Yilmaz Ö. 2009. The oral microbiota: living with a permanent guest. *DNA Cell Biol.* 28 (8): 405-411.
- Azarpazhooh A, Limeback H. 2008. The application of ozone in dentistry: a systematic review of literature. *J Dent.* 36 (2): 104-116.
- Bagg J, Jackson MS, Sweeney MP, Ramage G, Davies AN. 2006. Susceptibility to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil of yeasts isolated from the mouths of patients with advanced cancer. *Oral Oncol.* 42 (5): 487-492.
- Baker GF, Lowe RF, Southwell IA. 2000. Comparison of oil recovered from tea tree leaf by ethanol extraction and steam distillation. 2000. *J Agric Food Chem.* 48 (9): 4041-4043.

- Bariska M. 2000. Einführung in die Holzartenkunde. ETH- Eidgenössische Technische Hochschule Zürich. Department Forstwissenschaften. 1-15.
- Barthel C, Georgi M, Schäfer E, Petschelt A, Flachsenberg S, Neuber T, Kockapan C, Weiger R, Hülsman M. 2006. Die Wurzelkanalspülung. Stellungnahme der AG Endodontologie und Traumatologie der DGZ. DDZ 10/2006.
- Beikler T, Karch H, Flemmig TF. 2005. Mikrobiologische Diagnostik in der Parodontitistherapie – Gemeinsame Stellungnahme der Deutschen Gesellschaft für Parodontologie (DGP) und der Deutschen Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde (DGZMK).
- Besimo CE. 2008. Orale und systemische Erkrankungen. Teil 1: Eine auf Evidenz basierende Übersicht ihrer Wechselwirkungen. Schweiz. Zschr. GanzheitsMedizin. 20 (7/8): 406-411.
- Boursillon D, Riethmüller V. 2005. Holz und Hygiene- ein Widerspruch?. Die Verwendung von Schneidbrettern aus Holz ist hygienisch sicher, S. 16.
- Bradshaw DJ, Marsh PD, Watson GK, Allison C. 1998. Role of *Fusobacterium nucleatum* and coaggregation in anaerobe survival in planktonic and biofilm oral microbial communities during aeration. *Infect Immun.* 66 (10): 4729-4732.
- Brady A, Loughlin R, Gilpin D, Kearney P, Tunney M. 2006. In vitro activity of tea-tree oil against clinical skin isolates of meticillin-resistant and -sensitive *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci growing planktonically and as biofilms. *J Med Microbiol.* 55 (Pt 10): 1375-1380.
- Brailsford SR, Shah B, Simons D, Gilbert S, Clark D, Ines I, Adams SE, Allison C, Beighton D. 2001. The predominant aciduric microflora of root-caries lesions. *J Dent Res.* 80 (9): 1828-1833.
- Chen CK, Wilson ME. 1992. *Eikenella corrodens* in human oral and non-oral infections: a review. *J Periodontol.* 63 (12): 941-953.

- Cheng SS, Lin HY, Chang ST. 2005. Chemical composition and antifungal activity of essential oils from different tissues of Japanese Cedar (*Cryptomeria japonica*). *J Agric Food Chem.* 53 (3): 614-9.
- Dai T, Huang YY, Hamblin MR. 2009. Photodynamic therapy for localized infections-state of the art. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 6 (3-4): 170-188.
- Dalleau S, Cateau E, Bergès T, Berjeaud JM, Imbert C. 2008. In vitro activity of terpenes against *Candida* biofilms. *Int J Antimicrob Agents.* 31 (6): 572-576.
- Daschner F, Schuster A, Schmidt-Eisenlohr E. 2002. Wie hygienisch und sinnvoll ist Holz im Patientenzimmer, *Krh.-Hyg. + Inf.verh.* 28 Heft4 (2006): 131-137.
- Daschner F. 2002. Mikrobiologische Untersuchungen mit Hygieneholz der Firma Wilms®. Institut für Umweltmedizin und Krankenhaushygiene am Uniklinikum Freiburg
- David G. 1997. Antimikrobielle Wirkstoffe in der Zahnheilkunde - Wegweiser durch den Dschungel der Präparate. *Bayerisches Zahnärzteblatt Heft 12/97*, S. 36-38.
- Diaz PI, Zilm PS, Rogers AH. 2002. *Fusobacterium nucleatum* supports the growth of *Porphyromonas gingivalis* in oxygenated and carbon-dioxide-depleted environments. *Microbiology.* 148 (Pt 2): 467-472.
- DMS IV. Vierte Deutsche Mundgesundheitsstudie. Institut der Deutschen Zahnärzte. Köln 2006, S. 17-21
- Drake D, Villhauer AL. 2011. An in vitro comparative study determining bactericidal activity of stabilized chlorine dioxide and other oral rinses. *J Clin Dent* 22 (1): 1-5.
- Dörfler CE, Schiffner U, Staehle HJ. 2007. Häusliche mechanische Zahn- und Mundpflege. Stellungnahme der deutschen Gesellschaft für Zahn-, Mund- Kieferheilkunde/DGZMK.

- Eickholz P, Kim TS, Bürklin T, Schacher B, Renggli HH, Schaecken MT, Holle R, Kübler A, Ratka-Krüger P. 2002. Non-surgical periodontal therapy with adjunctive topical doxycycline: a double-blind randomized controlled multicenter study. *J Clin Periodontol* 29 (2): 108-117.
- Ekeberg D, Flaete PO, Eikenes M, Fongen M, Naess-Andresen CF. 2006. Qualitative and quantitative determination of extractives in heartwood of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) by gas chromatography. *J Chromatogr A*. 1109 (2): 267-272.
- Erdemoglu N, Sener B. 2001. Antimicrobial activity of the heartwood of *Taxus baccata*. *Fitoterapia*. 72: 59-61.
- Ferrazzano GF, Amato I, Ingenito A, Zarrelli A, Pinto G, Pollio A. 2011. Plant polyphenols and their anti-cariogenic properties: a review. *Molecules*. 16 (2): 1486-1507.
- Filoche SK, Soma K, Sissons CH. 2005. Antimicrobial effects of essential oils in combination with chlorhexidine digluconate. *Oral Microbiol Immunol* 20 (4): 221-225.
- Fontana CR, Abernethy AD, Som S, Ruggiero K, Doucette S, Marcantonio RC, Boussios CI, Kent R, Goodson JM, Tanner ACR, Soukos NS. 2009. The antibacterial effect of photodynamic therapy in dental plaque-derived biofilms. *J Periodontal Res*. 44 (6): 751-759.
- Fürst D. 2007. Vergleichende Untersuchung der antimikrobiellen Wirksamkeit von sieben verschiedenen Hölzern. Institut für Umweltmedizin und Krankenhaushygiene der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i. Br.
- Greenstein G. 2000. Nonsurgical periodontal therapy in 2000: a literature review. *J Am Dent Assoc* 131 (11): 1580-1592.
- Güth JF. 2008. Untersuchung der Effektivität zweier Mundspüllösungen mit antibakteriellen Wirkstoffen bei der Bekämpfung und Entstehung von Mundgeruch. Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie der Ludwig-Maximilians-Universität zu München.

- Haffajee AD, Yaskell T, Socransky SS. 2008. Antimicrobial effectiveness of an herbal mouthrinse compared with an essential oil and a chlorhexidine mouthrinse. *J Am Dent Assoc* 139 (5): 606-611.
- Hammer KA, Carson CF, Riley TV. 2003. Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *J Appl Microbiol* 95 (4): 853-860.
- Hart PH, Brand C, Carson CF, Riley TV, Prager RH, Finlay-Jones JJ. 2000. Terpinen-4-ol, the main component of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil), suppresses inflammatory mediator production by activated human monocytes. *Inflamm. res.* 49: 619–626.
- Hart JH, Shrimpton DM. 1979. Role of stilbenes in resistance of wood to decay. *Phytopathology.* 69 (10): 1138-1143.
- Hellwig E, Klimek J, Attin T. 2007. Einführung IN Die Zahnerhaltung. Urban & Fischer Elsevier Verlag München. 4. Auflage S. 371.
- Hojo K, Nagaoka S, Ohshima T, Maeda N. 2009. Bacterial interactions in dental biofilm development. *J Dent Res.* 88 (11): 982-990.
- Hübner NO, Sciermoch K, Kramer A. 2007. Vergleich von Methoden zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration und Schlussfolgerungen zur Weiterentwicklung der Methoden. *GMS Krankenhaushyg Interdiszip.* 2 (2):Doc34.
- Høiby N, Bjarnsholt T, Givskovb M, Molinc S, Ciofub O. 2010. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents* 35 (4): 322-332.
- Islam B, Khan SN, Khan AU. 2007. Dental caries: from infection to prevention. *Med Sci Monit* 13 (11): RA 196-203.
- Jenkinson HF, Lamont RJ. 2005. Oral microbial communities in sickness and in health. *Trends Microbiol.* 13 (12): 589-595.

- Johnston WH, Karchesy JJ, Constantine GH, Craig AM. 2001. Antimicrobial activity of some Pacific Northwest woods against anaerobic bacteria and yeast. *Phytother Res.* (7): 586-588.
- Juliano C, Demurtas C, Piu L. 2008. In vitro study on the anticandidal activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) essential oil combined with Chitosan. *Flavour Fragr.* 23: 227–231
- Koburger T, Pitts D, Kramer A. 2010. Results of a field study on the influence of HygienicWood mattress toppers on the number of mites in bed dust and the state of health of people with house dust mite allergies. *GMS Krankenhaushyg Interdiszip.* 5 (2):Doc04.
- Kolenbrander PE. 2000. Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems. *Annu Rev Microbiol.* 54: 413-437.
- Kolenbrander PE, Andersen RN, Blehert DS, Eglund PG, Foster JS, Palmer RJ. 2002. Communication among oral Bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66 (3): 486–505.
- König KG. 1972. Drug possibilities in dental caries prevention. *Zahnartzl Prax.* 23 (2): 38-39.
- Kulik E, Lenkeit K, Meyer J. 2000. Antimicrobial effects of tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*) on oral microorganisms. *Schweiz Monatsschr Zahnmed* 110 (11): 125-130.
- Kuramitsu HK, Wang BY. 2006. Virulence properties of cariogenic bacteria. *BMC Oral Health.* 6 Suppl 1: S11.
- Kühn J. 2006. Wirksamkeit von Pinus Vital Pflegewasser gegen Herpes Simplex-Virus Typ I. Institut für Medizinische Mikrobiologie – Klinische Virologie, Universitätsklinikum Münster. [www.wilms.com](http://www.wilms.com)

- Kwieciński J, Eick S, Wojcik K. 2009. Effects of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil on *Staphylococcus aureus* in biofilms and stationary growth phase. *Int J Antimicrob Agents*. 33 (4): 343-347.
- KZBV Jahrbuch Statistik. 2010. [http://www.kzbv.de/statistik/JB10\\_34\\_35\\_37.pdf](http://www.kzbv.de/statistik/JB10_34_35_37.pdf). [24.06.2011].
- Lamont RJ, El-Sabaeny A, Park Y, Cook GS, Costerton JW, Demuth DR. 2002. Role of the *Streptococcus gordonii* SspB protein in the development of *Porphyromonas gingivalis* biofilms on streptococcal substrates. *Microbiology*. 148 (Pt 6): 1627-1636.
- Lee SS, Zhang W, Li Y. 2004. The antimicrobial potential of 14 natural herbal dentifrices Results of an in vitro diffusionmethod study. *JADA*. Vol. 135: 1133-1141.
- Loesche W J. 1986. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev*. 50 (4): 353-380.
- López R, Dahlén G, Retamales C, Baelum V. 2011. Clustering of subgingival microbial species in adolescents with periodontitis. *Eur J Oral Sci*. 119 (2): 141-150.
- Ludwig S. 2006. Kiefernkernelholz gegen Grippe?. Institut für Molekulare Virologie, Zentrum für Molekularbiologie der Entzündung. [www.wilms.com](http://www.wilms.com).
- Lüttge U, Kluge M, Thiel G. 2010. Botanik – die umfassende Biologie der Pflanzen, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA Weinheim, 1.Auflage. S. 694-698.
- Malik R, Manocha A, Suresh DK. 2010. Photodynamic therapy--a strategic review. *Indian J Dent Res*. 21 (2): 285-291.
- Manter DK, Kelsey RG, Karchesy JJ. 2007. Antimicrobial activity of extractable conifer heartwood compounds toward *Phytophthora ramorum*. *J Chem Ecol*. 33 (11): 2133-2147.

- Marsh PD. 2004. Dental plaque as a microbial biofilm. *Caries Res.* 38: 204-211.
- Mombelli A. 1998. Antibiotics in periodontal therapy. Their use within the framework of a treatment concept. *Schweiz Monatsschr Zahnmed* 108 (10): 968-981.
- Munro CL, Grap MJ. 2004. Oral health and care in the intensive care unit: state of the science. *Am J Crit Care.* 13 (1): 25-33. discussion 34.
- Nilsson M, Wikman S, Eklund L. 2002. Induction of discolored wood in Scots pine (*Pinus sylvestris*). *Tree Physiol.* 22 (5): 331-338.
- Nuopponen M, Willför S, Jääskeläinen AS, Vuorinen T. 2004. A UV resonance Raman (UVRM) spectroscopic study on the extractable compounds in Scots pine (*Pinus sylvestris*) wood. Part II. Hydrophilic compounds. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 60 (13): 2963-2968.
- Okahashi N, Nakata M, Terao Y, Isoda R, Sakurai A, Sumitomo T, Yamaguchi M, Kimura RK, Oiki E, Kawabata S, Ooshima T. 2011. Pili of oral *Streptococcus sanguinis* bind to salivary amylase and promote the biofilm formation. *Microb Pathog.* 50 (3-4): 148-154.
- Osawa K, Yasuda H, Maruyama T, Morita H, Takeya K, Itokawa H. 1992. Isoflavanones from the heartwood of *Swartzia polyphylla* and their antibacterial activity against cariogenic bacteria. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 40 (11): 2970-4.
- Pan P, Barnett ML, Coelho J, Brogdon C, Finnegan MB. 2000. Determination of the in situ bactericidal activity of an essential oil mouthrinse using a vital stain method. *J Clin Periodontol* 27 (4): 256-261.
- Pan PC, Harper S, Ricci-Nittel D, Lux R, Shi W. 2010. In-vitro evidence for efficacy of antimicrobial mouthrinses. *J Dent* 38 Suppl 1: S. 16-20.
- Piispanen R, Saranpää P. 2002. Neutral lipids and phospholipids in Scots pine (*Pinus sylvestris*) sapwood and heartwood. *Tree Physiol.* 22 (9): 661-666.

- Pirani C, Bertacci A, Cavrini F, Foschi F, Acquaviva GL, Prati C, Sambri V. 2006. Recovery of *Enterococcus faecalis* in root canal lumen of patients with primary and secondary endodontic lesions. *New Microbiologica*. 31: 235-240.
- Pitten FA, Rosin M, Kramer A. 2001. Leitlinienentwurf: Indikationen und Wirkstoffauswahl zur prophylaktischen und therapeutischen Mundhöhlenantiseptik. Deutsche Gesellschaft für Krankenhaushygiene. *Hyg Med* 26. Jahrgang- Heft 10.
- Raven PH, Evert RF, Eichhorn SE. 2006. *Biologie der Pflanzen*. de Gruyter-Verlag, 4. Auflage. S: 678f.
- Rescala, B, Rosalem W, Teles RP, Fischer RG, Haffajee AD, Socransky SS, Gustafsson A, Figueredo CM. 2010. Immunologic and microbiologic profiles of chronic and aggressive periodontitis subjects. *J Periodontol*. 81 (9): 1308-1316.
- Rönström A, Edwardsson S, Attström R. 1977. *Streptococcus sanguis* and *streptococcus salivarius* in early plaque formation on plastic films. *J Periodontal Res* 12 (5): 331-339.
- Russell AD. 1991. Mechanisms of bacterial resistance to non-antibiotics: food additives and food and pharmaceutical preservatives. *J Appl Bacteriol* 71 (3): 191-201.
- Sanderink RBA, Bernhardt H, Knoke M, Meyer J, Weber C, Weiger R. 2004. *Curriculum Orale Mikrobiologie und Immunologie*. Quintessenz Verlags-GmbH Berlin 2004, Seiten: 239f, 242f, 244f, 369- 379.
- Saranpää P, Nyberg H. 1987. Lipids and sterols of *Pinus sylvestris* L. sapwood and heartwood. *Trees*. 1: 82-87.
- Sato M., Fujiwara S, Tsuchiya H, Fujii T, Iinuma M, Tosa H, Ohkawa Y. 1996. Flavones with antibacterial activity against cariogenic bacteria. *J Ethnopharmacol*. 54 (2-3): 171-176.

- Sato M, Tanaka H, Fujiwara S, Hirata M, Yamaguchi R, Etoh H, Tokuda C. 2003. Antibacterial property of isoflavonoids isolated from *Erythrina variegata* against cariogenic oral bacteria. *Phytomedicine*. 10 (5): 427-433.
- Saxer UP, Stäuble A, Szabo SH, Menghini G. 2003. Effect of mouthwashing with tea tree oil on plaque and inflammation. *Schweiz Monatsschr Zahnmed*. 113 (9): 985-996.
- Schönwälder A. 2000. Hygienische und phytosanitäre Eigenschaften von Holz und Holzprodukten. Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für Pflanzenvirologie, Mikrobiologie und biologische Sicherheit Braunschweig.
- Schönwälder A, Kehr R, Wulf A, Smalla K. 2002. Wooden boards affecting the survival of bacteria? *Holz Roh-Werkst*. 60 (4): 249-257.
- Schuster A, Schmidt-Eisenlohr E, Daschner F. 2006. Wie hygienisch und sinnvoll ist Holz in Patientenzimmern? *Krh.-Hyg. + Inf.verh*. 28 Heft 4: 131-137.
- Shapiro S, Meier A, Guggenheim B. 1994. The antimicrobial activity of essential oils and essential oil components towards oral bacteria. *Oral Microbiol Immunol* 9 (4): 202-208.
- Shen S, Samaranayake LP, Yip HK. 2005. Coaggregation profiles of the microflora from root surface caries lesions. *Arch Oral Biol*. 50 (1): 23-32.
- Sigusch BW, Engelbrecht M, Volpel A, Holletschke A, Pfister W, Schutze J. 2010. Full-mouth antimicrobial photodynamic therapy in *Fusobacterium nucleatum*-infected periodontitis patients. *J Periodontol*. 81 (7): 975-981.
- Siqueira JF, Sen BH. 2004. Fungi in endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 97 (5): 632-641.
- Soukoulis S, Hirsch R. 2004. The effects of a tea tree oil-containing gel on plaque and chronic gingivitis. *Aust Dent J*. 49 (2): 78-83.

- Steinkamp H. 2000. Untersuchungen zur Einführung von Hygiene-Platten aus Holz zum Einsatz in der Lebensmittelindustrie. Deutsches Institut für Lebensmitteltechnik e.V. Quakenbrück.
- Steinkamp H. 2004. Antibakterielle Wirkung von Holz -Einsatz als Filter- und Absorptionsmaterial. Deutsches Institut für Lebensmitteltechnik e.V. Quakenbrück.
- Sterer N, Rosenberg M. 2006. Streptococcus salivarius promotes mucin putrefaction and malodor production by Porphyromonas gingivalis. J Dent Res. 85 (10): 910-914.
- Stingl R, Domig KJ, Teischinger A. 2009. Holz und Hygiene; Ständiger Hygieneausschuss zur Beratung des Bundesministers für Gesundheit im Bereich Lebensmittelhygiene. Bundesministerium für Gesundheit Wien.
- Strehlein M, Wirmer J, Schmidt-Eisenlohr E, Daschner F. 2004. Nutzung von Holz im Krankenhaus unbedenklich Holzwirtschaft. Holz-Zentralblatt 71: 951-952.
- Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB. 2006. Enterococcus faecalis: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. J Endod. 32 (2): 93-98.
- Takahashi N, Nyvad B. 2011. The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. J Dent Res. 90 (3): 294-303.
- Takarada K, Kimizuka R, Takahashi N, Honma K, Okuda K, Kato T. 2004. A comparison of the antibacterial efficacies of essential oils against oral pathogens. Oral Microbiol Immunol. 19 (1): 61-64.
- Thrower Y, Pinney RJ, Wilson M. 1997. Susceptibilities of Actinobacillus actinomycetemcomitans biofilms to oral antiseptics. J Med Microbiol 46 (5): 425-429.
- Timke M. 2009. Wilms® HygieneHolz- Einsatz gegen Aspergillose. Deutsches Institut für Lebensmitteltechnik Quakenbrück. [www.wilms.com](http://www.wilms.com).

- Traboulsi RS, Mukherjee PK, Ghannoum MA. 2008. In vitro activity of inexpensive topical alternatives against *Candida* spp. isolated from the oral cavity of HIV-infected patients. *Int J Antimicrob Agents*. 31 (3): 272-276.
- Tsuchiya H, Sato M, Inuma M, Yokoyama J, Ohyama M, Tanaka T, Takase I, Namikawa I. (1994). Inhibition of the growth of cariogenic bacteria in vitro by plant flavanones. *Experientia*. 50 (9): 846-849.
- Vainio-Kaila T, Kyyhkynen A, Viitaniemi P, Siitonen A. 2010. Pine heartwood and glass surfaces: easy method to test the fate of bacterial contamination. *Eur. J. Wood Prod.*
- Wagenitz G. 2008. Wörterbuch der Botanik – Morphologie – Anatomie – Taxonomie – Evolution.. Nikol-Verlag Hamburg 2008. 2. erweiterte Auflage. S.: 36, 50, 54, 168, 302.
- Walsh L J. 2000. Safety issues relating to the use of hydrogen peroxide in dentistry. *Aust Dent J* 45 (4): 257-269; quiz 289.
- Wilson M. 1996. Susceptibility of oral bacterial biofilms to antimicrobial agents. *J Med Microbiol* 44 (2): 79-87.
- Wirmer J. 2005. Antimikrobielle Wirkung von Kiefernkernelholz. Aus dem Institut für Umweltmedizin und Krankenhaushygiene der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i.Br.
- Zambon J J. 1985. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 12 (1): 1-20.
- Zijngel V, van Leeuwen MB. 2010. Oral biofilm architecture on natural teeth. *PLoS One*. 5 (2): e9321.

## 8.1 Internetverzeichnis

<https://ars.rki.de/MikroMethoden.aspx>

<http://www.eucast.org>

WHO. 2011: [www.whocollab.od.mah.se/expl/oralmuc.html](http://www.whocollab.od.mah.se/expl/oralmuc.html)

Wilms<sup>®</sup>. 2011: [www.wilms.com](http://www.wilms.com).

[www.wilms.com/Hygiene/De/Historie.aspx](http://www.wilms.com/Hygiene/De/Historie.aspx)

[www.wilms.com/Hygiene/forschungen/BBA\\_HolzEinNW.pdf](http://www.wilms.com/Hygiene/forschungen/BBA_HolzEinNW.pdf)

## 8.2 Bildnachweis

Milling A. 1999. Holz ein natürlicher Werkstoff mit antibakteriellen Eigenschaften? Vergleichende Untersuchung zum Überleben von Bakterien auf Holz und Kunststoff mit mikrobiologischen und molekularen Methoden. [www.wilms.com/Hygiene/forschungen/BBA\\_HolzEinNW.pdf](http://www.wilms.com/Hygiene/forschungen/BBA_HolzEinNW.pdf)

## **Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Person bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt hat:

- Frau PD Dr. S. Eick

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Wingerode, 23.11.2011

---

Nicole Senft

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen herzlich bedanken, die mich bei der Erstellung dieses Manuskriptes unterstützt haben.

Ich danke Herrn **Prof. Dr. W. Pfister** für das Überlassen des Promotionsthemas und die organisatorische Betreuung.

Mit zahlreichen Anregungen und Ratschlägen stand mir während des gesamten Arbeitsprozesses **Frau PD Dr. Eick** mit Rat und Tat zur Seite. Sie unterstützte mich bei den mikrobiologischen Versuchen und der anschließenden statistischen Auswertung. Für die intensive und kontinuierliche Zusammenarbeit verdient Frau Dr. Eick meine höchste Anerkennung. Aufrichtigen Dank Frau Dr. Eick!

Die Arbeit im Labor erleichterte mir Frau **C. Ranke**, medizinisch-technische Assistentin, durch ihre Unterstützung bei der Ausführung der Versuchsabläufe und durch die ein oder anderen aufbauenden Worte.

Bei dieser Gelegenheit möchte ich mich bei den gesamten Mitarbeitern der Medizinischen Mikrobiologie bedanken. Insbesondere durch die tatkräftige Unterstützung von Herrn **F. Rost**, Frau **S. Kochan** und Frau **C. Vökel** konnten die Versuche unter bestmöglichen Bedingungen umgesetzt werden. Trotz des hohen Materialaufwandes standen mir immer genügend Arbeitsutensilien zur Verfügung. Die Herstellung der Nährbodenplatten, das Reinigen und Autoklavieren meiner Materialien erleichterte meinen Arbeitsablauf und erfolgte stets unkompliziert.

Einen Dank an die **Firma Wilms®** für die Bereitstellung des Kiefernkernel-Extraktes.

Für die Lektorentätigkeit bedanke ich mich bei Frau **S. Gunkel**, die mir in allen grammatikalischen und orthografischen Fragen stets richtliniengetreu antworten konnte.

Jahrelange Bestärkung in meinem Handeln habe ich durch **Hedda Busch** erfahren dürfen.

Außerdem bedanke ich mich bei **meinen Eltern**, die mir dieses Studium ermöglicht und mich auf diesem Weg begleitet und bestärkt haben.