

Aus dem Institut für Umweltmedizin und Krankenhaushygiene
der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau

**Untersuchungen zur antibakteriellen Wirkung eines
senföhlhaltigen Pflanzenpräparates (Angocin® *Anti-Infekt N*)
auf mundpathogene Keime**

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung des Zahnmedizinischen Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Albert-Ludwigs-Universität
Freiburg im Breisgau

Vorgelegt 2017

von Anne Schüller
geboren in Aachen

Dekanin:	Prof. Dr. Kerstin Krieglstein
1. Gutachter:	Prof. Dr. med. Uwe Frank
2. Gutachter:	Prof. Dr. Ali Al-Ahmad
Jahr der Promotion:	2017

Inhaltsverzeichnis

Darstellungsverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung.....	8
1.1 Hintergrund	8
1.2 Fragestellung	12
2 Material und Methoden.....	14
2.1 Materialien	14
2.2 Kultivierung und Austestung der Bakterien	16
2.3 Teststämme	17
2.4 Der Gastest.....	24
2.4.1 Abwiegen der Konzentrationen von Kapuzinerkresse und Meerrettich	24
2.4.2 Kultivierung der Bakterienspezies.....	25
2.4.3 Herstellung der bakteriellen Stammlösung	25
2.4.4 Versuchsdurchführung	26
2.4.5 Auswertung.....	27
2.5 Die Agardilution	27
2.5.1 Herstellung des Agars zum Gießen der Platten	27
2.5.2 Herstellung der Verdünnungsreihe und Gießen der Platten.....	28
2.5.3 Beimpfen der hergestellten Testplatten	30
2.5.4 Auswertung.....	31
3 Ergebnisse.....	33
3.1 Auswertung der Gastests	33
3.2 Auswertung der Agardilution.....	49
3.2.1 Die minimale Hemmkonzentration	50

3.2.2 Die minimale bakterizide Konzentration	51
3.2.3 Korrelation der Ergebnisse des Gastests und der Agardilution	53
Diskussion	55
3.3 Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse	55
3.4 Klinische Nutzbarkeit	57
3.5 Kritische Betrachtung der Methodik.....	63
3.6 Fazit	64
Zusammenfassung.....	65
Anhang	67
Literaturverzeichnis	77
Danksagung	80
Erklärung der Eigenständigkeit.....	81

Darstellungsverzeichnis

Abbildung 1: Kapuzinerkresse und Meerrettich.....	8
Abbildung 2: Enzymatische Spaltung von Glucotropaeolin in aktives Benzyl-ITC ...	10
Abbildung 3: Erkrankungen und beteiligte Mikroorganismen	10
Abbildung 4: Bakterienspezies, die getestet wurden.....	17
Abbildung 5: Vorkommen der Teststämme bei den wichtigsten oralen Erkrankungen	18
Abbildung 6: Menge der Kapuzinerkresse/ Meerrettichwurzel für den Gasversuch ..	25
Abbildung 7: Schematische Darstellung des Gastestes	26
Abbildung 8: Konzentrationen an Senfölen für die Agardilution	29
Abbildung 9: Vorbereiteter Multipoint-Inokulator zum Beimpfen der Platten	30
Abbildung 10: Positivkontrolle des Agardilutionsversuches	31
Abbildung 11: Ergebnisse der MHK Werte für die jeweiligen Bakterienstämme.....	34
Abbildung 12: Auswertung Gastest <i>Campylobacter concisus</i>	35
Abbildung 13: MHK Werte aus Gastest <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> ..	36
Abbildung 14: Auswertung Gastest <i>Prevotella intermedia</i>	37
Abbildung 15: Auswertung Gastest <i>Campylobacter rectus</i>	38
Abbildung 16: Auswertung Gastest <i>Parvimonas micra</i>	39
Abbildung 17: Auswertung Gastest <i>Prevotella baroniae</i>	40
Abbildung 18: Auswertung Gastest <i>Fusobacterium naviforme</i>	41
Abbildung 19: Auswertung Gastest <i>Veillonella parvula</i>	42
Abbildung 20: Auswertung Gastest <i>Porphyromonas gingivalis</i>	43
Abbildung 21: Auswertung Gastest <i>Clostridium perfringens</i>	44
Abbildung 22: Auswertung <i>Cardiobacterium hominis</i>	45
Abbildung 23: Auswertung Gastest <i>Eikenella corrodens</i> , 177	47
Abbildung 24: Auswertung Gastest <i>Eikenella corrodens</i> , 178	47
Abbildung 25: Auswertung Gastest <i>Haemophilus aphrophilus</i>	48
Abbildung 26: Auswertung Gastest <i>Kingella kingae</i>	49
Abbildung 27: MHK Werte in der Agardilution für die verschiedenen Bakterienspezies	50
Abbildung 28: MBK Werte nach 48h für die verschiedenen Bakterienspezies	52
Abbildung 29: Korrelation der MHK Werte aus dem Gastest und der Agardilution ..	53
Abbildung 30: orale Erkrankungen und deren Behandlungswege	57
Abbildung 31: Röntgenbild eines Patienten mit schwerer Parodontitis	58

Abbildung 32: Kenndaten der Bakterien mit Laufnummer und Stammsammlungsnummer.....	67
Abbildung 33: Daten aus Gastest für <i>Campylobacter concisus</i>	67
Abbildung 34: Daten aus Gastest für <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	68
Abbildung 35: Daten aus Gastest für <i>Prevotella intermedia</i>	68
Abbildung 36: Daten aus Gastest für <i>Campylobacter rectus</i>	69
Abbildung 37: Daten aus Gastest für <i>Parvimonas micra</i>	69
Abbildung 38: Daten aus Gastest für <i>Prevotella baroniae</i>	70
Abbildung 39: Daten aus Gastest für <i>Fusobacterium naviforme</i>	70
Abbildung 40: Daten aus Gastest für <i>Veillonella parvula</i>	70
Abbildung 41: Daten aus Gastest für <i>Porphyromonas gingivalis</i>	71
Abbildung 42: Daten aus Gastest für <i>Clostridium perfringens</i>	71
Abbildung 43: Daten aus Gastest für <i>Cardiobacterium hominis</i>	72
Abbildung 44: Daten aus Gastest für <i>Eikenella corrodens</i> , 177	72
Abbildung 45: Daten aus Gastest für <i>Eikenella corrodens</i> , 178	73
Abbildung 46: Daten aus Gastest für <i>Haemophilus aphrophilus</i>	73
Abbildung 47: Daten aus Gastest für <i>Kingella kingae</i>	74
Abbildung 48: MHK und MBK Daten aus Agardilution	75
Abbildung 49: Poster ICAAC, 17. - 21.09.2015 San Diego.....	76

Abkürzungsverzeichnis

ATCC	American Type Culture Collection
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkultur GmbH
HCB	Hefe-Cystein-Blut
ITC	Isothiocyanaten
IUK	Institut für Umweltmedizin und Krankenhaushygiene
K	Kontrolle
KBE	Kolonien-Bildende Einheiten
KK	Kapuzinerkressenkraut
KOH	Kaliumlauge
MBK	minimale bakterizide Konzentration
MHK	minimale Hemmkonzentration
MW	Meerrettichwurzel
WK	Wachstumskontrolle
HACEK	Abkürzung Bakterien
NaOCl	Natriumhypochlorit
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid

1 Einleitung

1.1 Hintergrund

Die Kapuzinerkresse (*Tropaeoli majoris herba*) wurde im Jahre 2013 zur Arzneipflanze des Jahres gewählt. Damit wird deutlich, dass es sich nicht nur um eine essbare und gelb-rot blühende Pflanze handelt, sondern ihr weitere heilende Eigenschaften zugeschrieben werden. Meerrettich (*Armoraciae rusticae radix*) ist eine Pflanze, deren Wurzel nicht nur als Gemüse, sondern auch in der Pflanzenheilkunde verwendet wird.

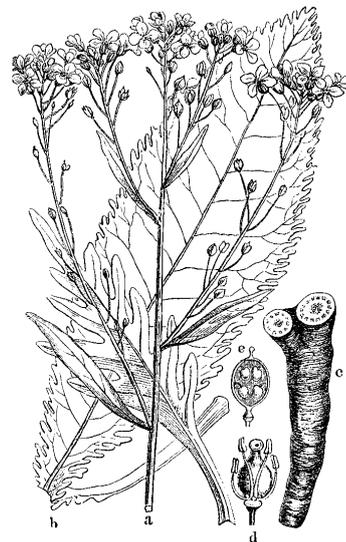


Abbildung 1: Kapuzinerkresse und Meerrettich

(Quelle: <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/9/9a/Nsr-slika-189.png>)

Quelle: http://de.wikipedia.org/wiki/Kapuzinerkressen#/media/File:Tropaeolum_minus2.jpg)

Da diese beiden Pflanzen natürliche Antibiotika enthalten, bilden sie die Grundlage in einigen pflanzlichen Medikamenten (Repha GmbH, 2007), wie in Angocin®. Die bereits bestehenden Daten zur Wirkung von Angocin® *Anti-Infekt N* belegen die Wirksamkeit dieses Medikamentes im Bereich gram-positiver Bakterien. Beispielsweise beschrieb Halbeisen (1954) bereits, dass Kapuzinerkresse gut wirksam gegen gram-positive Bakterien, wie *E. coli*, Enterokokken und *Staph. aureus*, ist.

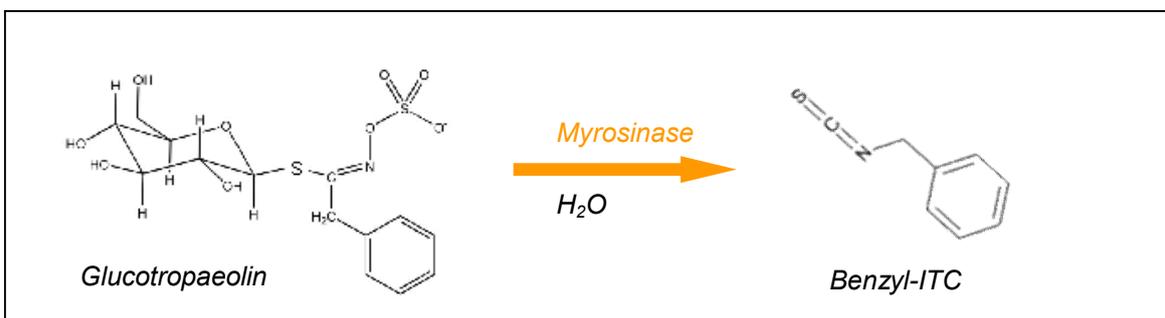
Neuere Forschungen zeigen, dass Angocin® *Anti-Infekt N* (Fa. Repha Biologische Arzneimittel, Langehagen) als Therapeutikum bei akuter Sinusitis, akuter Bronchitis und akuter Blasenentzündung gute Wirksamkeit

erzielt (Goos K.H., Albrecht U., Schneider B., 2006). Neben dem bekannten Einsatz als Mund- und Rachentherapeutikum sowie bei Harnwegsentzündungen, soll im Rahmen dieses Forschungsprojektes gezeigt werden, dass der Einsatz über den Bereich der bisher getesteten Keime hinaus auch wirksam ist um somit die Wirkung von Angocin® *Anti-Infekt N* auf ein größeres bakterielles Spektrum erweitern zu können. Zielsetzung dieser Doktorarbeit war daher, relevante pathogene Keime des Mundbereiches wie u. a. Porphyromonas gingivalis und Prevotella intermedia auf die antibakterielle Wirksamkeit von Angocin® *Anti-Infekt N* zu testen. Die meisten mundpathogenen Bakterien gehören in die Klasse der gram-negativen, anaeroben Bakterien. Testungen natürlicher Antibiotika auf dieses Keimspektrum wurden bislang nicht durchgeführt und stellen somit ein interessantes Forschungsgebiet dar, damit der Weg bereitet wird für einen möglichen Einsatz natürlicher Antibiotika im zahnärztlich-chirurgischen Bereich.

Angocin® *Anti-Infekt N* ist ein Nativpräparat aus getrocknetem Kapuzinerkressenkraut (KK; *Tropaeoli majoris herba*) und Meerrettichwurzel (MW; *Armoraciae rusticae radix*). Kapuzinerkressenkraut und Meerrettichwurzel sind Pflanzen, die ätherische Öle enthalten. Kienholz beschrieb schon 1960, dass ätherische Öle, welche bei der Zerstörung von Pflanzenzellen frei werden, erhebliche antibakterielle Wirkung besitzen. Dabei wirken die Senföle sowohl bakteriostatisch als auch bakterizid. Aus diesem Grund findet Angocin® *Anti-Infekt N* bereits zur Behandlung von Infektionen des oberen Respirationstraktes und bei Harnwegsinfekten Verwendung, wie in mehreren Studien bereits belegt wurde (Conrad A., Kolberg T., Engels I., Frank U., 2006; Goos K.H., Albrecht U., Schneider B., 2006). Das Medikament befindet sich seit 1958 im Verkehr (Goos K.H., Albrecht U., Schneider B., 2006), wurde jedoch seitdem in der Rezeptur verändert. Wie bereits erwähnt beruht die Wirkung des Medikamentes Angocin® *Anti-Infekt N* auf der Wirksamkeit von Senfölen (Isothiocyanaten = ITC). Die Senföle werden bei oraler Einnahme von Angocin freigesetzt. Die wirksamen Isothiocyanate sind Benzyl-Isothiocyanat, Allyl-Isothiocyanat und 2-Phenylethyl-Isothiocyanat. Während die beiden letzteren Senföle aus dem

Meerrettich freigesetzt werden wird Benzyl-Isothiocyanat aus Kapuzinerkresse freigesetzt (Conrad A., Biehler D., Nobis T., Richter H., Engels I., Frank U., 2013). In den Pflanzen liegen diese Senföle laut Goos K.H., Albrecht U., Schneider B. (2006) als Glucosinolate in Form von inaktiven Vorstufen vor und werden nach Einnahme im Gastrointestinaltrakt durch das Enzym Myrosinase gespalten (vgl. Abbildung 2), wodurch die aktiven und flüchtigen Senföle freigesetzt werden.

Abbildung 2: Enzymatische Spaltung von Glucotropaeolin in aktives Benzyl-ITC



Die in dieser Arbeit getesteten Bakterien, bis auf den Referenzstamm, spielen eine wichtige Rolle bei Mund-, Schleimhaut- und Zahnumgebungsentzündungen (Burkhardt F., 1992). Für einen Überblick über die Beteiligung der verschiedenen Bakterien an oralen Erkrankungen siehe Abbildung 3. So spielen beispielsweise *Treponema denticola* aber auch *Campylobacter rectus* eine Rolle bei der Entstehung von Parodontitis. *Porphyromonas gingivalis* könnte bei Parodontitis als auch bei Periimplantitis und Pulpitis beteiligt sein (Lamont R.J., Jenkinson H.F., 2010).

Abbildung 3: Erkrankungen und beteiligte Mikroorganismen

Erkrankung	involvierte Mikroorganismen
Gingivitis	Actinomyces, Fusobacterium, Bacteroides, Prevotella
Parodontitis	Aggregatibacter, Porphyromonas, Treponema, Tannerella, Fusobacterium, Prevotella, Campylobacter, Eikenella
Implantitis	Porphyromonas, Prevotella
Pulpitis	Fusobacterium, Parvimonas, Porphyromonas
Halitosis	Fusobacterium, Porphyromonas, Prevotella, Treponema
Pharyngitis	Haemophilus
Tonsillitis	Haemophilus

Quelle: Oral Microbiology at a Glance

Die getesteten Bakterien gehören in zwei Klassen von Bakterien, die anaeroben und die mikroaerophilen Bakterien. Unter Anaerobiern versteht man in der medizinischen Mikrobiologie Bakterien, welche unter Luftsauerstoff nicht oder nur bedingt wachsen (Burkhardt F., 1992). Deshalb müssen diese Bakterien in experimentellen Situationen unter sauerstofffreien Bedingungen getestet werden. Diese Bedingungen sind gewährleistet, wenn die Bakterien in Aerocult Töpfen mit entweder GazPak (Becton Dickinson, 260678) oder Microbiology Anaerocult (Becton Dickinson, 1.13807) kultiviert werden. Zu den Bakterien, die der Klasse der Anaerobier zugeordnet sind, gehören im Rahmen dieses Projektes die Bakterien *Campylobacter concisus*, *Prevotella intermedia*, *Campylobacter rectus*, *Parvimonas micras*, *Prevotella baroniae*, *Fusobacterium naviforme*, *Veillonella parvula*, *Porphyromonas gingivalis* und *Clostridium perfringens*. Bakterien, die in die Klasse der Anaerobier gehören, sind die häufigsten im Menschen vorkommende Klasse an Bakterien und laut Burkhardt (1992) übertreffen strikte Anaerobier auf der Mund- und Rachenschleimhaut die übrigen Bakteriengruppen um das Dreißigfache.

Die andere Klasse an Bakterien, die getestet werden sollte, waren die mikroaerophilen Bakterien. Diese sind abzugrenzen von den strengen Anaerobiern, da diese fakultativ anaerob und aerob sind. Dies bedeutet, dass sie bei bis zu 10% CO₂ Luftgemisch wachsen können (Burkhardt F., 1992). Folgende der getesteten Bakterien gehören zu dieser Klasse: *Eikenella corrodens* (beide Stämme), *Kingella kingae*, *Haemophilus aphrophilus* und *Cardiobacterium hominis*.

Die vorhandenen Testsubstanzen, getrocknetes, gemahlene Kapuzinerkressenkraut (KK) und getrocknete, gemahlene Meerrettichwurzel (MW), verfügen über ungünstige physikalische Eigenschaften. Genau betrachtet bedeutet das eine schlechte Löslichkeit der gemahlene Pflanzenpartikel. Deshalb können diese Substanzen nicht in den üblichen Testverfahren, nämlich dem Bouillons- bzw. Agardilutionsverfahren eingesetzt werden. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit ein Gastest zur Testung der Bakterien eingesetzt. Dieser Gastest wurde bereits in ähnlicher Weise in den 1950er und 1960er Jahren (Winter A.G.,

1954; Winter A.G., Willeke L., 1952) zur Untersuchung von der antibakteriellen Wirkung flüchtiger ätherischer Öle entwickelt. Dabei werden auf den Agar in den Kontaktschalen die Bakterien ausplattiert und in den Deckel die zu testenden Substanzen eingewogen, so dass nach Verschließen der Schalen das Senföl auf die Bakterien wirken kann.

Des Weiteren wurden zur Erzielung der Vergleichbarkeit mit anderen antibakteriell wirkenden Präparaten die Bestimmung der „minimalen Hemmkonzentration“ (MHK) und die Bestimmung der „minimalen bakteriziden Konzentration“ (MBK) angestrebt. Diese Werte erlauben verschiedene antibakteriell wirksame Präparate klinisch relevanter Erreger, wie Phytotherapeutika und Antibiotika, miteinander zu vergleichen. Da auch in diesem Fall die physikalischen Eigenschaften der Testsubstanzen, vor allem die schlechte Löslichkeit, die Testung erschweren werden, müssen synthetisch hergestellte, kommerziell erhältliche Senföle (Isothiocyanate) an dieser Stelle eingesetzt werden. Die Testung findet mit Hilfe der Agardilutionsmethode statt. Dafür wurden mit verschiedenen Konzentrationen an Senfölen angereicherte Hefe-Cyctein-Blut-Agar-Platten (HCB-Agar-Platten) gegossen, auf welchen die Bakterien ausplattiert wurden und das Wachstum beobachtet wurde.

1.2 Fragestellung

Der Einsatz von senföhlhaltigen Pflanzenpräparaten (Angocin® *Anti-Infekt N*) in der Zahnmedizin findet zurzeit nur vereinzelt statt. Arlom (2010) berichtet von umfangreichem Einsatz von Angocin® *Anti-Infekt N* nach Osteotomien und Zahnextraktionen mit dem Ergebnis schnellerer und komplikationsloserer Heilungsverläufe. Darüber hinaus spielt der Einsatz dieser Substanzen in der Zahnmedizin eine geringe Rolle.

Die Fragestellung der antibakteriellen Wirksamkeit von senföhlhaltigen Pflanzenpräparaten (Angocin® *Anti-Infekt N*) auf mundpathogene Keime wurde in drei Forschungsprojekte eingeteilt, mittels derer verschiedener Methoden die Wirkung von den Nativsubstanzen auf die Bakterienspezies gezeigt werden sollte. Zuerst, um den Gastest und die Agardilution durchführen zu können, wurde die Kultivierung und die Austestung der Wachstumsbedingungen der mundpathogenen Keime erprobt. Nach erfolgreichem Abschluss dieses Teilprojektes folgte die Testung der

antibakteriellen Wirksamkeit der Nativsubstanzen KK und MW mit Hilfe des modifizierten Gastestes. Als letztes und drittes Teilprojekt wurden für alle Spezies die MHK und die MBK mittels Agardilutionsverfahren, also einem weiteren, anderen Testverfahren, bestimmt. Diese beiden Methoden, der Gastest und die Agardilution, testen auf der einen Seite die Nativsubstanzen Kapuzinerkressenkraut und Meerrettichwurzel und auf der anderen Seite die synthetisch hergestellten Senföle.

Ziel des vorliegenden Projektes war somit im Rahmen von umfangreichen In-vitro-Testungen der verschiedenen Bakterien zu zeigen, inwieweit die Testsubstanzen Kapuzinerkressenkraut und Meerrettichwurzelpulver und synthetischen, naturidentischen Senföle eine antibakterielle, beziehungsweise eine bakteriostatische oder bakterizide Wirkung auf die Teststämme hatten. Bis auf die Erfahrungsberichte von Arlom (2010) ist wenig über den Einsatz von senföhlhaltigen Pflanzenpräparaten in der Zahnmedizin bekannt. Ein möglicher Einsatz von Angocin® *Anti-Infekt N* in der zahnärztlichen Chirurgie oder bei parodontalen Erkrankungen wäre dabei vorstellbar.

2 Material und Methoden

Das Kapitel Material und Methoden wird in drei methodische Teilbereiche unterteilt. Zuerst das Anzüchten der Bakterien, an zweiter Stelle die Testung der antibakterielle Wirkung der Nativsubstanzen auf die verschiedenen Bakterienspezies mit Bestimmung der MHK Werte und an dritter Stelle die Agardilution zum Austesten der synthetischen Senföle ebenfalls mit Bestimmung der MHK und MBK Werte. Auf die einzelnen methodischen Verfahren wird im Folgenden näher eingegangen.

2.1 Materialien

Folgende Testsubstanzen, Chemikalien, Materialien und Geräte wurden im Rahmen der Doktorarbeit verwendet:

- **Testsubstanzen**

Die Glucosinolat-haltigen Nativsubstanzen wurden von der Firma Repha® Biologische Arzneimittel GmbH (Langehagen) bereit gestellt. Es handelt sich um Laborproben der Rohstoffe, die zur Herstellung des Medikamentes Angocin® *Anti-Infekt N* verwendet wurden. Sie wurden im Kühlschrank lichtgeschützt und trocken bei 4°C gelagert.

1. Kapuzinerkresse 2011 (Prüfnummer 18834, Hersteller Martin Bauer)
2. Meerrettichwurzel 2010 (Prüfnummer 17604, Hersteller Peter)

Die synthetisch hergestellten Isothiocyanate (Senföle) wurden bei verschiedenen Herstellern, siehe unten, bestellt.

3. Allyl-Isothiocyanat (Merck, KGaA Darmstadt, Art.-Nr. 8.00260.005)
4. Benzyl-Isothiocyanat (Sigma-Aldrich®, Steinheim, Art.-Nr. 252492-25G)
5. 2-Phenylethyl-Isothiocyanat (Fluka® Analytical, Buchs SG, Schweiz, Art.-Nr. 77972)

- **Chemikalien**

Folgende Materialien kamen in den verschiedenen Versuchen zum Einsatz:

1. Agar-Agar, dänisch (Roth, 4508)

2. Natriumchlorid (Sodiumchlorid AnalaR-Normapur, 27810.295)
3. Trypton/Pepton aus Casein (Roth, 8952)
4. Glucose (Sigma, G 7528)
5. Hefeextract (BD, 212750)
6. Fleischextrakt (Merck, 1.03979)
7. Tryptic soy broth (Difco)
8. Aqua VE
9. KOH (9,09%-ig)
10. Vitamin K1-Lösung (alk. 1% ig)
11. Heminlösung (0,05%-ig)
12. L-Cysteinlösung (Appli Chem. A 3698.0050)
13. Schafsblut, defibrilliert (Fa. Biolab, IN-VITRO DIAGNOSTIK)
14. Schafsblut (Fa. Acila Ag, Nr. 2101051)
15. PBS (Dulbecco Biochrom AG, Berlin)
16. 1% Tweenlösung (Tween® 80 for synthesis, Merck Schuchardt OHG, Hohenbrunn)
17. 0,1% N-Acetyl-Muraminsäure (Sigma, A3007)

- **Materialien**

1. Eppendorf Tubes (1,5ml, Eppendorf AG, Art.-Nr. 03001 20.086)
2. Wattestäbchen steril
3. Trigalski-Spatel
4. Cell Culture Tube (Greiner Bio-one, 12mm, Nr. 163160)
5. Kontaktschale (94*16mm, Durchmesser/Höhe, Greiner Bio-one GmbH)
6. Glaskolben (Schott Duran, 50ml)
7. Glasröhrchen mit Stopfen (10 ml)
8. Mikrotiterplatte (96-well-Platte, Greiner Bio-one GmbH)

- **Geräte**

Die hier aufgelisteten Geräte wurden während der Versuchsdurchführungen verwendet:

1. Brutschrank B1, 32,5°C (Mettler)
2. Brutschrank B7, 36°C bei 5% CO₂, (Heraeus Instruments)

3. Brutschrank B11, 35,6°C (Thermo Scientific)
4. Waage W2 (Scaltec, min. 0,02g bis max. 150g)
5. Feinwaage W3 (Sartorius MC210P, min. 1mg bis max. 210g)
6. Mc Farland Standard (bioMérieux, IVD, 70900)
7. Anaerocult® Töpfe
8. GazPak, Anaerobe Container System (Becton Dickinson, 260678)
9. Microbiology Anaerocult (Merck, 1.13807)
10. Dry Anaerobic Indicator Strips auf Methylenblaubasis (Becton Dickinson, 271051)
11. Columbia-Agar mit Schafsblut plus (PB5039A, Oxoid)
12. HCB-Agar-Platten, hergestellt im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Uni Freiburg
13. Magnetrührer IKA®, RCT classic
14. Vortec IKA®, MS2 Minishaker
15. Dispensette® (Brank GmbH und Co KG, Werheim)
16. Multipoint-Inokulator mit Stempel (Firma Mast Diagnostica Laboratoriums-Präparate GmbH, Reinfelden)
17. Handzähler (Infactory innovations & trade GmbH, Wien, Österreich)

2.2 Kultivierung und Austestung der Bakterien

Der erste Teil des Forschungsprojektes galt der Kultivierung, beziehungsweise dem Austesten der jeweiligen Wachstumsbedingungen der Bakterienspezies. Dabei wurde geschaut auf welchen Nährböden und unter welchen Bedingungen die Bakterienstämme am besten wachsen konnten. Die Bakterien, die im Rahmen dieses Projektes angezüchtet und im Folgenden getestet wurden, sind in Abbildung 4 dargestellt. Für die genauen Kenndaten der Bakterien, wie Laufnummer und Stammsammlungsnummer siehe im Anhang Abbildung 32.

Abbildung 4: Bakterienspezies, die getestet wurden

Spezies
Campylobacter concisus
Aggregatibacter actinomycetemcomitans
Prevotella intermedia (Prevotella nigrescens)
Campylobacter rectus
Parvimonas micra (Peptostreptococcus micros)
Prevotella baroniae
Fusobacterium naviforme
Veillonella parvula
Porphyromonas gingivalis
Clostridium perfringens (Referenzstamm)
Cardiobacterium hominis
Eikenella corrodens
Eikenella corrodens, kleine Kolonien
Haemophilus aphrophilus
Kingella kingae

Die Stämme waren teilweise in der Stammsammlung des Institutes für Umweltmedizin und Krankenhaushygiene (IUK) vorhanden, wurden bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkultur (DSMZ) erworben oder durch das Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Freiburg zur Verfügung gestellt. Die Stämme wurden dort jeweils bei -80° C gelagert.

Bevor mit dem Gastest begonnen werden konnte, wurden für alle Bakterien optimale Züchtungsbedingungen ausgetestet, um so zu gewährleisten, dass die Bakterien für die jeweilige Testung optimal gewachsen und nicht älter als 48 bis 72 Stunden waren.

2.3 Teststämme

Im folgenden Abschnitt werden die Bakterien, die im Rahmen des Projektes getestet wurden, beschrieben. Dabei wird sowohl auf ihr Mitwirken bei oralen Erkrankungen, (vgl. Abbildung 5) als auch auf ihre Wachstumsbedingungen, Pathogenität und Gramfärbung eingegangen.

Abbildung 5: Vorkommen der Teststämme bei den wichtigsten oralen Erkrankungen

Erkrankung	Gingivitis	Parodontitis	Periimplantitis	Pulpitis (infizierte Wurzelkanäle)
involvierte Bakterien	Fusobacterium spezies	Aggregatibacter actinomycetemcomitans (lokalisierte)	Porphyromonas gingivalis	Fusobacterium spezies
	Bacteroides	Porphyromonas gingivalis	Prevotella intermedia	Porphyromonas gingivalis
	Prevotella intermedia	Treponema denticola	Fusobacterium spezies	Parvimonas micra
	Actinomyces	(Tanerella forsythia)	Aggregatibacter actinomycetemcomitans	
		Fusobacterium nucleatum Prevotella intermedia Campylobacter rectus Eikenella corrodens		

Quelle: Oral Microbiology at a Glance

Campylobacter concisus:

Das Bakterium *Campylobacter concisus* ist ein gram-negatives, bewegliches, anaerobes, korkenzieherförmiges Bakterium, welches in der Mundhöhle ebenfalls mit chronischer Parodontitis assoziiert ist (Lamont R.J., Jenkinson H.F., 2010). Es wächst nach anaerober Bebrütung im Microbiology Anaerocult (Merck) im Brutschrank B 11 bei (circa) 35,6°C (Thermo Scientific) auf Columbia-Agar oder auf HCB-Agar-Platten, so dass nach 3 Tagen deutliches Wachstum in Form von grauen großen Kolonien zu sehen war.

Aggregatibacter actinomycetemcomitans:

Aggregatibacter actinomycetemcomitans ist ein anaerobes, gram-negatives Bakterium, welches vor allem mit lokalisierter beziehungsweise juveniler aggressiver Parodontitis assoziiert ist (Lamont RJ, Jenkinson HF., 2010). Es wächst auf HCB-Agar-Platten innerhalb von 48 bis 72 Stunden unter anaeroben Bedingungen und bildet graue Kolonien.

Prevotella intermedia:

Prevotella intermedia gehört in die Klasse der *Prevotella*, welche gerne auch in der Oropharyngealfloora vorkommen (Burkhardt F., 1992). Wie Abbildung 3 und Abbildung 5 zeigen, ist *Prevotella intermedia* bei Gingivitis, Parodontitis

und Periimplantitis, aber auch bei Halithosis zu finden (Lamont R.J., Jenkinson H.F., 2010). Prevotella sind meist gramnegative, sporenlose Stäbchenbakterien. Bei einigen Prevotellaarten wie auch bei Prevotella intermedia kann eine schwarze Pigmentierung vorkommen. Seine Pathogenität ist stark. Nach 48 bis 72 stündiger Bebrütung im Brutschrank B1 bei 32,5°C (Mermert) zeigten diese Stämme deutliches Wachstum auf HCB-Agar-Platten.

Campylobacter rectus:

Campylobacter rectus ist ein gram-negatives, bewegliches, anaerobes, stark pathogenes Bakterium, welches in der Mundhöhle meist mit chronischer Parodontitis assoziiert ist (Lamont R.J., Jenkinson H.F., 2010). Im Gegensatz zu den anderen Bakterien, welche meist nach 3 Tagen schon deutlich erkennbares Wachstum zeigten, war bei diesem Bakterienstamm erst nach 4 bis 5 Tagen Wachstum zu beobachten. Es wächst auf HCB-Agar-Platten unter anaeroben Bedingungen im Brutschrank B 11 bei (circa) 35,6°C (Thermo Scientific).

Parvimonas micra (Peptostreptococcus micros):

Parvimonas micra ist ein anaerobes, gram-positives Bakterium starker Pathogenität. Es ist häufig bei infizierten Wurzelkanälen anzutreffen (vgl. Abbildung 3 und Abbildung 5). Außerdem wurde Parvimonas micra auch bei Stomatitis und bei Gehirnabszessen isoliert. Die Möglichkeit einer Ausbreitung dieses Bakteriums und damit der Verursachung einer systematisch-sekundären Folgeinfektion im Gehirn stellt ein hohes Risiko dar (Lamont R.J., Jenkinson H.F., 2010). Des Weiteren ist Parvimonas micra auch an der Entstehung von Gelenkentzündungen beteiligt. Seine Anzucht fand auf HCB-Agar-Platten unter anaeroben Bedingungen statt. Innerhalb von 48 Stunden war deutliches Wachstum in Form von kleinen, grau-weißen Kolonien auf den Nährböden zu erkennen.

Prevotella baroniae:

Prevotella baroniae ist auch ein gram-negatives, sporenloses Stäbchenbakterium, jedoch im Gegensatz zu Prevotella intermedia nicht

pigmentiert. Nach ebenfalls 48 bis 72 stündiger Bebrütung im Brutschrank B1 bei 32,5°C (Memmert) zeigten diese Stämme deutliches Wachstum auf HCB-Agar-Platten.

Fusobacterium naviforme:

Das *Fusobacterium naviforme* gehört in die Gattung der Fusobakterien und ist stark pathogen. Fusobakterien sind gram-negative, faden- oder auch spindelförmige Bakterien, die zur normalen Mund- und Darmflora gehören (Burkhardt F., 1992). Diese Bakterien sind häufig bei Gingivitis und Parodontitis (vgl. Abbildung 3 und Abbildung 5) und an dentogenen Infektionen, wie zum Beispiel Abszessen oder Sinusitis, beteiligt. Außerdem kommen sie bei pleuropulmonalen Infektionen, also auch im Brustraum vor (Burkhardt F., 1992).

Ursprünglich gingen wir (fälschlicherweise, wie sich später herausstellte) davon aus, dass der Stamm *Fusobacterium naviforme* eine *Tanerella forsythia* war. Da *Tanerella forsythia* ein Bakterium ist, für das die Besonderheit gilt, dass es nur mit einem Ammenstamm wächst, haben wir dies bei der Testung berücksichtigt. Der Ammenstamm war in diesem Fall ein *Staphylococcus aureus* (ATCC Stamm). Beim Kultivieren dieser Bakterienspezies wurde deshalb auf die Platten mit den Nährböden zusätzlich, der genannte Ammenstamm mit ausplattiert. Bei den später durchgeführten Versuchen wurden den Nährböden für die Gastests als Ammenersatz 0,001% N-Acetyl-Muraminsäure (Sigma, A3007) zugesetzt. Erst im späteren Verlauf der Arbeit stellte sich heraus, dass der Stamm nicht *Tanerella forsythia* sondern *Fusobacterium naviforme* ist. *Fusobacterium naviforme* wächst sowohl mit als auch ohne Ammenstamm, das Hinzufügen des Ammenstammes wäre also nicht nötig gewesen. Das Herstellen der Testplatten soll im folgenden Abschnitt dennoch beschrieben werden.

Die speziellen Testplatten, die später im Gastest eingesetzt wurden, wurden wie folgt hergestellt. Für insgesamt 0,5 Liter Medium benötigte man:

- Tryptic soy broth (Difco), 15g
- Hefeextract (BD, 212750), 2g

- Pepton aus Casein (Roth, 8952), 2g
- Agar-Agar, dänisch (Roth, 4508), 7,5g
- 475ml destilliertes Wasser,
- 0,1% N-Acetyl-Muraminsäure (Sigma, A3007), (1µl)
- Schafsblut (Fa. Acila Ag, Opestraße 14 Mörfelden, Nr. 2101051), 25ml

Diese Materialien wurden alle in eine sterile Glasflasche hinein gewogen und mittels magnetischem Rührfisch auf einem Magnetrührer (IKA® RCT classic) geschwenkt, anschließend autoklaviert und zum Abkühlen bis auf 50°C stehen gelassen. Danach wurde dem Agar 25ml Schafsblut (Fa. Acila Ag) zusetzt. Dann wurde N-Acetyl-Muraminsäure steril filtriert und in den Agar hinein pipettiert, so dass eine Endkonzentration von 0,001 (w/v) entstand. Zuletzt wurden die Platten gegossen. Dafür wurde mit Hilfe der Dispensette® die entsprechende Menge Agar in die Kontaktschalen gegeben und diese zum Trocknen zur Seite gestellt.

Auf den Platten wurde der Gastest für *Fusobacterium naviforme* durchgeführt. Für die Versuchsbeschreibung siehe Kapitel 2.4.4..

Veillonella parvula:

Veillonellen, benannt nach dem französischen Bakteriologen Veillon, gehören in die Gruppe der streng anaeroben gram-negativen Kokken und sind geringgradig pathogen. Gram-negative Kokken können vor allem bei Eiterungsprozessen in den verschiedensten Körperregionen, wie auch im Mund-, Kiefer- und Gesichtsbereich, vorkommen (Burkhardt F., 1992). Im Rahmen der Kultivierung wächst das Bakterium *Veillonella parvula* sowohl auf Columbia-Agar, als auch auf HCB-Agar komplikationslos innerhalb von 48 Stunden bei circa 36,5°C im Brutschrank B11 oder Brutschrank B1 bei circa 32,5°C. Zu erkennen sind dann grau-weiße Kolonien.

Porphyromonas gingivalis:

Die Gattung *Porphyromonas* umfasst schwarzpigmentierte asaccharolytische Arten (Burkhardt F., 1992). Es sind gram-negative, kurze Stäbchenbakterien. *Porphyromonas gingivalis* ist ebenfalls in der Mundhöhle anzutreffen und ist unter den oralen Mikroorganismen als das pathogenste Bakterium

einzustufen (Lamont R.J., Jenkinson H.F., 2010). Wie in Abbildung 3 zu sehen, ist es an der Entstehung von Parodontitis und Periimplantitis beteiligt. Die Bebrütung im Brutschrank B1 oder B11 der Gattung *Porphyromonas gingivalis* dauerte länger als bei den anderen Stämmen. So war bis zu einer Woche nötig bis ausreichendes Wachstum der Bakterien zu sehen war, um diese im Rahmen des Gastestes zu verwenden. Wie die vorhergegangenen Bakterien wächst auch *Porphyromonas gingivalis* auf HCB-Agar-Platten.

Clostridium perfringens:

Clostridium perfringens ist ein Bakterienstamm, welcher hauptsächlich in der Darmflora bei Menschen vorkommt (Burkhardt F., 1992). Es handelt sich um ein gram-positives, anaerobes, stäbchenförmiges Bakterium der Gattung *Clostridium*. Im Rahmen dieses Projektes wurde der Stamm als Referenzstamm eingesetzt. Sein Wachstum findet auf HCB-Agar-Platten statt. Er kann innerhalb von 48 bis 72 Stunden unter anaeroben Bedingungen, wie die anderen Anaerobier, kultiviert werden.

Cardiobacterium hominis:

Cardiobacterium hominis ist ein mäßig pathogenes Bakterium, welches in die Klasse der gram-negativen Aerobier (microaerophil) gehört (Burkhardt F., 1992). Man findet es in der normalen oropharyngeal Flora (<http://en.wikipedia.org/wiki/HACEK>) und ist Teil der HACEK Gruppe. Dieser Zusammenschluss an Bakterien kann Verursacher von Endokarditis sein. Nach 24 bis 48 stündiger Bebrütung im 5% CO₂ Schrank sind auf den Nährböden, Columbia-Agar-Platten oder HCB-Agar-Platten erste Kolonien zu erkennen.

Eikenella corrodens (Nr. 177):

Eikenella corrodens gehört in die Klasse der mikroaerophilen, also fakultativ aeroben Keime. Es handelt sich um ein gram-negatives Bakterium mäßiger Pathogenität. Seine Rolle in der Mundhöhle spielt es vor allem bei der Entstehung von Parodontitis (vgl. Abbildung 3 und Abbildung 5) (Lamont RJ, Jenkinson HF., 2010). Das Bakterium wächst sowohl auf Columbia-Blut-Platten als auch auf HCB-Agar-Platten in einer mit circa 5% CO₂

angereicherten Atmosphäre innerhalb von 24 bis 48 Stunden. Seine Anzüchtung fand deshalb im Brutschrank B7 von Heraeus Instruments bei 36°C und bei 5% CO₂ statt.

Eikenella corrodens, Stamm ohne Hof (Nr. 178):

Es wurden in den Versuchen zwei verschiedene *Eikenella corrodens* Stämme getestet. Wie auch bei *Eikenella corrodens* (Nr. 177) handelt es sich um ein mikroaerophiles Bakterium, welches unter 5% CO₂ im Brutschrank innerhalb von 24 bis 48 Stunden problemlos auf HCB-Agar-Platten wächst.

Haemophilus aphrophilus:

Haemophilus aphrophilus ist häufig im oberen Respirationstrakt und in der Mundhöhle, dort vor allem im Parodontalbereich, zu finden (Burkhardt F., 1992). Das Bakterium gehört in die Klasse der mikroaerophilen Bakterien und wächst auf Columbia-Agar und auf HCB-Agar-Platten unter aeroben Bedingungen unter 5% CO₂ innerhalb von 48-72 Stunden. Seine Pathogenität ist mäßig.

Kingella kingae:

Die Gattung der *Kingella* wurde nach der Bakteriologin King benannt (Burkhardt F., 1992). Kingellen sind unbewegliche Stäbchen mäßiger Pathogenität. Kingellen sind ebenfalls Teil der HACEK Gruppe und sind somit Verursacher von Endokarditis und Infektionen im Rachenbereich (http://en.wikipedia.org/wiki/Kingella_kingae). Sie wachsen sowohl auf normalen Columbia-Agar mit Schafsblut als auch auf HCB-Agar-Platten bei 36,5°C im Brutschrank B7 von Heraeus Instruments bei 5% CO₂ innerhalb von 48 Stunden. Eine weitere Eigenschaft des Bakteriums ist die Hämolyse auf Schafsblut-Agar-Platten.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass es sich bei den Bakterien *Campylobacter concisus*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, *Campylobacter rectus*, *Parvimonas micra*, *Prevotella baroniae*, *Fusobacterium naviforme*, *Veillonella parvula*, *Porphyromonas gingivalis* und *Clostridium perfringens* um streng anaerobe Bakterien handelt,

welche in Anaerocult-Töpfen mit Hilfe von Gaz Pak (Becton Dickinson, 260678) oder Microbiology Anaerocult (Merck, 1.13807) und Dry Anaerobic Indicator Strips auf Methylenblaubasis (Becton Dickinson, 271051) kultiviert werden konnten. Die Bakterien *Cardiobacterium hominis*, *Eikenella corrodens* (177, 178), *Haemophilus aphrophilus* und *Kingella kingae* gehören in die Klasse der mikroaerophilen, fakultativ anaeroben Bakterien und konnten von daher unter aeroben Bedingungen bei 5% CO₂ angezüchtet werden. Wie in den vorhergehenden Abschnitten aufgeführt wachsen die meisten Bakterien auf HCB-Agar-Platten.

2.4 Der Gastest

Der Gastest ist ein Test, der darauf basiert, dass die Versuchssubstanzen, wie in diesem Fall Kapuzinerkresse und Meerrettichpulver, die mit Wasser vermischt werden, Senföle freisetzen. Diese diffundieren in dem Versuchsaufbau durch den Gasraum und können so auf die Bakterien wirken (Conrad A., Kohlberg T., Engels I., Frank U., 2006). Dieses Testverfahren wurde schon in den 1950er Jahren zur Untersuchung antibakterieller Wirkung von flüchtigen ätherischen Ölen verwendet (Winter A.G., 1954; Winter A.G., Willeke L., 1952).

Im folgenden Kapitel wird der Ablauf des Gasversuches beschrieben. Pro Bakterium wurde der Gastest jeweils dreimal durchgeführt. Dies war wichtig, um die gewonnenen Daten mehrmals bestätigen zu können. Die Durchführung des Gastestes gliedert sich auch in drei Teile. An erster Stelle das Abwiegen der Testsubstanzen, dann folgte die Herstellung der bakteriellen Stammlösung und als letztes die Durchführung des Gastestes.

2.4.1 Abwiegen der Konzentrationen von Kapuzinerkresse und Meerrettich

Als erstes wurden pro bakterieller Testreihe mit Hilfe der Feinwaage W3 von Sartorius MC210P (min. 1mg bis max. 210g) die beiden Testsubstanzen in den entsprechenden Mengen (vgl. Abbildung 6) gemeinsam in den Deckel der Kontaktschale gewogen. Dafür wurde Meerrettichwurzel (MW) 2010 (Prüfnummer: 17604, Hersteller Peter) und Kapuzinerkresse (KK) 2011 (Prüfnummer 18834, Hersteller Martin Bauer) verwendet. Wie Abbildung 6 zu

entnehmen ist, richten sich die abgewogenen Mengenangaben nach der Konzentrationen der KK und der MW, die in den Tabletten/Tablettenanteilen Angocin enthalten sind. Laut Herstellerangaben (siehe Homepage Fa. Repha) entspricht eine Tablette Angocin 200mg Kapuzinerkressenkraut und 80mg Meerrettichwurzel. Nach Abwiegen der zu testenden Konzentrationen entstanden 7 Schalen pro Testreihe, also bei 3 Durchgängen insgesamt 21 Kontaktschalen je Bakterienspezies.

Abbildung 6: Menge der Kapuzinerkresse/ Meerrettichwurzel für den Gasversuch

Beschriftung der Schalen/ Konz.-Nummer	Kapuzinerkresse in mg	Meerrettichwurzel in mg	Konzentration/ Tablette Angocin®
1	12,5mg	5mg	1/16 Tablette
2	25mg	10mg	1/8Tablette
3	50mg	20mg	¼ Tablette
4	100mg	40mg	½ Tablette
5	200mg	80mg	1 Tablette
6	400mg	160mg	2 Tabletten
Wachstumskontrolle	0mg	0mg	0

2.4.2 Kultivierung der Bakterienspezies

Die Bakterien wurden für die Versuchsdurchführung aus der Stammsammlung frisch auf den entsprechenden Nährboden ausplattiert (vgl. Kapitel 2.3). Anschließend wurden die Bakterien im Brutschrank B1 bei 32,5°C oder Brutschrank B11 bei circa 35,6 °C für die entsprechende Brutzeit inkubiert. Für die Versuchsdurchführung waren die Bakterienspezies nicht älter als 48 bzw. 72 Stunden (abhängig von der jeweiligen Wachstumsgeschwindigkeit).

2.4.3 Herstellung der bakteriellen Stammlösung

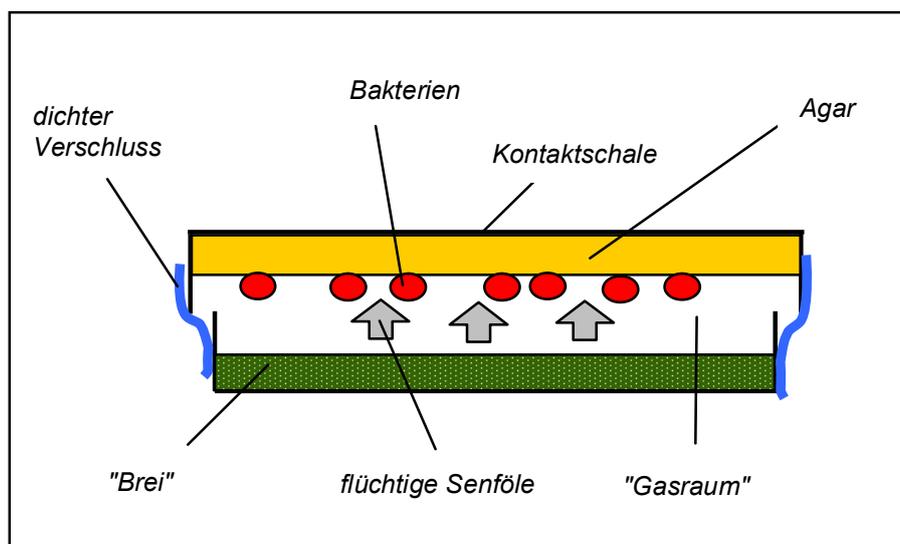
Nach dem Abwiegen der Testsubstanzen in die Deckel der Kontaktschalen wurden die bakteriellen Stammlösungen in passende Konzentrationen eingestellt und via Mc Farland Standard (IVD, 70900) geprüft. Die frisch gewachsenen Bakterien wurden mit einem sterilen Wattestäbchen von den Platten abgetragen und in ein rotes Cell Culture Tube mit 1 ml PBS (Dulbecco Biochrom AG) gegeben. Durch Mischen der Bakterien im Vortec (MS2

Minishaker, IKA®) wurde die Trübung auf Mc Farland Standard 3, was einer Konzentration von 10^8 Bakterien pro ml entspricht, eingestellt. Danach erfolgte in 2 Verdünnungsschritten die Verdünnung auf die Endkonzentration von 10^4 Bakterien pro ml. Dafür wurden auf dem ersten Cell Culture Tube (Greiner bio-one) 10 μ l Bakteriensuspension entnommen und in ein Eppendorfröhrchen gegeben, welches mit 990 μ l PBS (Dulbecco Biochrom AG) gefüllt war. Dies wurde nochmals wiederholt, so dass dann die benötigte Endkonzentration von 10^4 /ml vorlag.

2.4.4 Versuchsdurchführung

Aus den hergestellten frischen Bakteriensuspensionen wurden 20 μ l auf den für die Bakterienspezies entsprechenden Agar (vgl. Kapitel 2.3) pipettiert und mit einem Trigalski-Spatel gleichmäßig verteilt. Danach wurden zu dem Gemisch an nativen Testsubstanzen 2ml steriles PBS (Dulbecco Biochrom AG) pipettiert und mit der Pipettenspitze das PBS vorsichtig in die Testsubstanzen eingerührt, so dass ein zäher Brei entstand. Der Agar mit den ausgespatelten Bakterien befand sich im Boden, im Deckel befanden sich die zu testenden unsterilen, nativen Substanzen. Der Boden wurde auf den Deckel gestellt und die Kontaktschalen mit Parafilm verschlossen. Die Dämpfe der Testsubstanzen konnten so auf die Bakterien wirken.

Abbildung 7: Schematische Darstellung des Gastestes



Die Kontaktschalen wurden im anaeroben Milieu, wie bereits in Kapitel 2.3 beschrieben, gelagert und zur Bebrütung in den Brutschrank B1 bei 32,5 °C gestellt. Ob die Bakterien wirklich unter anaeroben Bedingungen waren, konnte mittels Dry Anaerobic Indicator Strips (Becton Dickinson, 271051) überprüft werden. Diese Indikatorstreifen verfärbten sich unter anaeroben Bedingungen von Blau nach Weiß.

2.4.5 Auswertung

Nach 48 beziehungsweise 72 Stunden, je nach Bakterium, erfolgte die Kontrolle auf bakterielles Wachstum. Dafür wurden die Platten geöffnet, die Bakterienanzahl bestimmt und die Platten wieder verschlossen und in den Anaerocult Töpfen zurück in den Brutschrank gestellt. Die Daten wurden in entsprechenden Excel Tabellen (vgl. Kapitel 3.1 und Anhang) dokumentiert. Für die genauere Beschreibung des Wachstums der Bakterien siehe Kapitel 3.1 im Ergebnisteil.

2.5 Die Agardilution

Agardilutionsverfahren sind Verfahren, bei denen Nährböden hergestellt werden die unterschiedliche Konzentrationen an Testsubstanzen enthalten. Im Rahmen dieses Projektes enthielten die Nährböden unterschiedliche Konzentrationen an synthetischen Senfölen. Für die Auswertung wurde kontrolliert, bei welchen Konzentrationswerten die zu testenden Substanzen noch auf die Bakterien wirken. Dabei wird die jeweilige Menge der synthetischen Senföle dem flüssigen Agar beigemischt und anschließend in Kontaktschalen gegossen. Wie bereits in der Einleitung beschrieben, wurden für die Bestimmung der MHK und der MBK Werte im Labor sogenannte modifizierte HCB-Platten, also mit verschiedenen synthetischen Senfölkonzentrationen zugesetzte HCB-Agar-Platten, hergestellt.

2.5.1 Herstellung des Agars zum Gießen der Platten

Die Herstellung der mit verschiedenen Senfölkonzentrationen modifizierten HCB-Agar-Platten bestand aus drei Schritten. Im ersten Schritt wurden die festen Bestandteile abgewogen, im zweiten Schritt wurden die Flüssigreagenzien zugegeben und im dritten Schritt erfolgte nach dem

Autoklavieren die Zugabe des Schafsblutes. Feste Bestandteile des HCB-Agar-Platten waren wie folgt:

- Agar-Agar, dänisch (Roth, 4508) 18g
- Natriumchlorid (Sodiumchlorid AnalaR-Normapur, 27810.295) 5g
- Trypton/Pepton aus Casein (Roth, 8952) 10g
- Glucose (Sigma, G 7528) 2g
- Hefeextrakt (BD, 212750) 5g
- Fleischextrakt (Merck 1.03979) 2g

Nach dem entsprechenden Abwiegen dieser Bestandteile auf der Waage W2 von Scaltec wurden diese mit 1 Liter Aqua VE aufgefüllt und mittels Rührfisch auf dem Magnetrührer gemischt bis sich die Bestandteile aufgelöst hatten. Im zweiten Schritt wurden folgende Flüssigreagenzien hinzugeben:

- KOH (9,09%-ig), 5,4ml
- Vitamin K1-Lösung (alk. 1% ig), 0,1ml
- Heminlösung (0,05%-ig), 10ml
- L-Cysteinlösung (3%-ig), 10ml

Nach wiederholtem Mischen wurde die Flüssigkeit bei 121°C für 15 Minuten autoklaviert. Als der Agar auf die entsprechende Gießtemperatur (ca. 50°C) abgekühlt war, wurde 100ml Schafsblut (Fa. Acila Ag) hinzu gegeben und erneut gerührt.

2.5.2 Herstellung der Verdünnungsreihe und Gießen der Platten

Im nächsten Schritt wurden die modifizierten HCB-Platten mit Hilfe der Verdünnungsreihe aus Senfölen hergestellt. Dazu wurden zunächst zehn der sterilen Glaskolben mit den Nummern 1-10 entsprechend den Konzentrationen an Senfölen beschriftet (vgl. Abbildung 8) und weitere zwei als Positivkontrollen markiert.

Abbildung 8: Konzentrationen an Senfölen für die Agardilution

Glaskolben/Röhrchen	Kontrolle	1	2	3	4	5
Senfölgelhalt in %	0%	0.063%	0.031%	0.016%	0.008%	0.004%
Senfölgelhalt in mg/ml	0	0,67	0,34	0,17	0,08	0,04

Glaskolben/Röhrchen	6	7	8	9	10	Kontrolle
Senfölgelhalt in %	0.002%	0.001%	0.0005%	0.000125%	$6,24^{-05}\%$	0%
Senfölgelhalt in mg/ml	0,02	0,01	0,005	0,0025	$1,25^{-03}$	0

Je Versuchsreihe wurden also insgesamt 12 Glaskolben vorbereitet, für jede zu gießende Agarplatte je ein Kolben. Um die Verdünnungsreihe herzustellen wurde in den Glaskolben mit der Nummer 1 3,975ml der einprozentigen Tweenlösung gegeben. In die Glaskolben mit der Nummerierung 2-10 und in die zwei Positivkontrollen wurden jeweils 2ml der einprozentigen Tweenlösung gegeben.

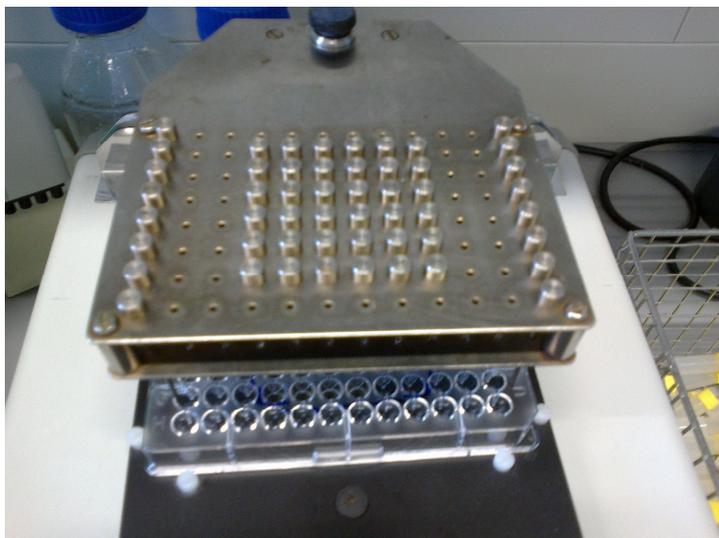
Für die Herstellung des ITC Gemisches wurden 47,25µl Allyl-ITC; 62,5µl Benzyl-ITC, 15,75µl 2-Phenylethyl-ITC zusammen in ein Glasröhrchen gegeben. Das ergab 125,5µl Gemisch. Dieses ITC Gemisch wurde gründlich gemengt. Somit erhielt man eine 100% Senföllösung. Aus diesem Gemisch wurden 25µl entnommen und in den Glaskolben Nummer 1 gegeben. Ausgehend von Glaskolben Nummer 1, in dem sich ein doppeltes Volumen befand, erfolgte die zehnmahlige Verdünnung. Dafür wurde die Lösung in Glaskolben 1 mit der Pipette mehrfach aufgezogen, um ein gutes Durchmischen des Senföles mit dem Tween zu erreichen. Danach wurden aus dem Glaskolben Nummer 1 mit der Pipette 2ml der Tween-Senföllösung entnommen und in den Glaskolben Nummer 2 gegeben. Dort wurde das Mischen durch mehrmaliges Aufziehen der Pipette wiederholt und weitere 2ml Tween-Senföllösung entnommen. Das Procedere wurde so bis zum letzten Glaskolben Nummer 10 wiederholt, bis alle Glaskolben die entsprechenden Konzentrationen an Senföl enthielten. Die übrigen 2ml Tween-Senföllösung aus Glaskolben 10 wurden verworfen. Beide Positivkontrollen enthielten nur 2ml der einprozentigen Tweenlösung und kein Senfölgemisch. Die Positivkontrollen dienten dazu, die Wachstumsfähigkeit der Testbakterien zu zeigen. Das Gießen der Platten erfolgte unter der

Sterilbank. Dafür wurde der Agar mit der Dispensette® in der entsprechenden Menge entnommen, in die Kolben gefüllt und nach kurzem Schwenken in die Kontaktschalen gegeben. Die Kontaktschalen waren entsprechend den Glaskolben mit den Senfölkonzentrationen beziehungsweise als Positivkontrolle markiert. Pro Kontaktschale wurden 20ml Agar hinein gegeben, bestehend aus 2 ml Senfölgemisch aus den Glaskolben und 18ml HCB-Agar aus der Dispensette®. Jede Platte enthielt nun eine unterschiedliche Konzentration an Senfölen.

2.5.3 Beimpfen der hergestellten Testplatten

Die erstarrten Agarplatten wurden mit den Bakterien beimpft. Dafür wurden in Cell Culture Tubes (12ml, Greiner bio-one) 1 ml PBS (Dulbecco Biochrom AG) eingefüllt, die Bakterien mit einem sterilen Wattestäbchen aus den Anaerocult Töpfen entnommen und in die Cell Culture Tubes auf McFarland Standard 0,5 (bioMérieux) eingestellt. Daraufhin folgte ebenfalls eine Verdünnung der Bakteriensuspension. Dafür wurden 100 µl der auf 0,5 Mc Farland eingestellten Bakteriensuspension genommen und in 900 µl Bouillon gegeben. Nach kurzem Schwenken auf dem Vortec wurden je Röhrchen 100µl Bakteriensuspension entnommen und in die dem Pippetierschema entsprechende Position (well) der Mikrotiterplatte pipettiert. Bei *Fusobacterium naviforme* erfolgte die Zugabe von 1µl 0,1% N-Acetyl-Muraminsäure. Mit dem Multipoint-Inokulator (Firma Mast) (vgl. Abbildung 9) wurden die Platten beimpft.

Abbildung 9: Vorbereiteter Multipoint-Inokulator zum Beimpfen der Platten

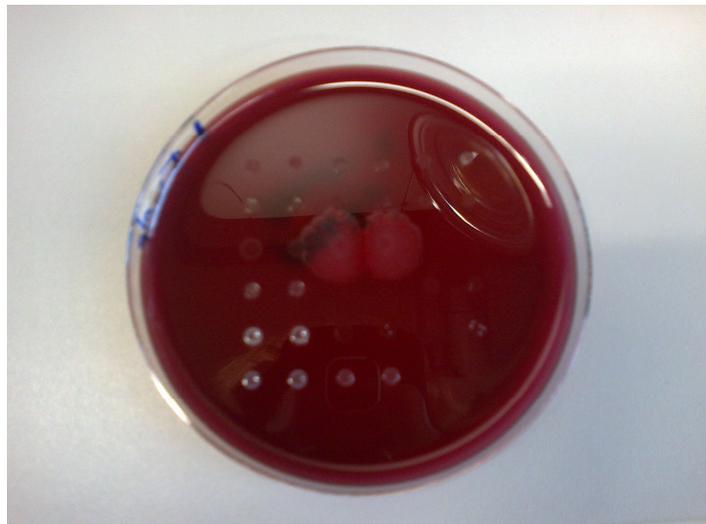


Anschließend wurden diese unter anaeroben Bedingungen zurück in die Aerocult Töpfe gestellt und im Brutschrank B1 bei 32,5°C mehrere Tage bebrütet. Pro Versuchsreihe waren 12 Kontaktschalen in einem Anaerocult Topf.

2.5.4 Auswertung

Für die Auswertung der Versuche wurden zuerst die Positivkontrollen inspiziert, um sicher zu stellen, dass die Bakterien überhaupt gewachsen waren.

Abbildung 10: Positivkontrolle des Agardilutionsversuches



Wenn die Bakterien auf den Positivkontrollen gewachsen waren, wurden die beimpften Platten nach 48 und 72 Stunden visuell auf bakterielles Wachstum kontrolliert. Dafür wurden die Platten aus den Anaerocult Töpfen entnommen und die Medien auf Bakterienwachstum geprüft. Die Werte der Konzentrationen, bei denen gerade kein Wachstum mehr auf den Platten zu sehen war, wurden als MHK Werte notiert. Für die Auswertung der Ergebnisse siehe Kapitel 3.2.1.

Für die Bestimmung der MBK Werte wurden nach 48 Stunden Inkubationszeit von den Stellen, die noch kein sichtbares Bakterienwachstum zeigten, mit einem sterilen Tupfer Bakterien von der Platte entnommen und auf eine neue, senfölfreie HCB-Platte ausplattiert. Diese Platten, die zur Kontrolle der MBK Werte dienen, wurden erneut in Anaerocult Töpfen gelagert, bebrütet

und nach 48 beziehungsweise 72 Stunden erneut auf Bakterienwachstum beurteilt. Auf die Ergebnisse der Bestimmung der MBK Werte wird in Kapitel 3.2.2 näher eingegangen.

3 Ergebnisse

3.1 Auswertung der Gastests

Für die Auswertung des Gastestes wurden pro Bakterienstamm und pro Versuchsreihe die Kontaktschalen geöffnet, angeschaut und auf bakterielles Wachstum geprüft. Auf den Nährböden, auf denen Wachstum zu sehen war, wurden die Kolonien-bildenden-Einheiten (KBE) gezählt und in entsprechenden Tabellen (vgl. Anhang) festgehalten. Ebenfalls notiert wurden die Schalenbeschriftungen beziehungsweise die entsprechenden Konzentrationsnummern, bei denen kein bakterielles Wachstum mehr stattgefunden hatte. Diese Werte entsprechen den MHK Werten. Die minimale Hemmkonzentration (MHK) ist definiert als die niedrigste Wirkstoffkonzentration, bei der kein sichtbares Wachstum mehr festzustellen ist (Pankey G.A., Sabath L.D., 2004). Für alle Bakterienstämme wurden die MHK Werte standardisiert nach 48 Stunden erhoben. Einen allgemeinen Überblick über die Konzentrationsnummern, bei denen kein bakterielles Wachstum mehr stattgefunden hatte, sind in der folgenden Abbildung 11 zu finden. Der jeweilige Konzentrationswert pro Bakterienstamm in der unten stehenden Tabelle gibt den (über alle durchgeführten Versuche) jeweils höchsten Konzentrationswert an, der nötig war, um das Wachstum der Bakterien zu hemmen. Für die Menge an Kapuzinerkresse und Meerrettichpulver (beziehungsweise die dem Konzentrationswert entsprechende Tablettenmenge), die dem Konzentrationswert in der zweiten Spalte der folgenden Abbildung 11 entspricht, vergleiche mit Abbildung 6.

Abbildung 11: Ergebnisse der MHK Werte für die jeweiligen Bakterienstämme

Bakterium	MHK aus Gastest, Konzentration KK/MW	entsprechende Tablettenmenge	entsprechende Menge an KK	entsprechende Menge an MW
Campylobacter concisus	5	1 Tablette	200mg	80mg
Aggregatibacter actinomycetemcomitans	4	½ Tablette	100mg	40mg
Prevotella intermedia	4	½ Tablette	100mg	40mg
Campylobacter rectus	4	½ Tablette	100mg	40mg
Parvimonas micra	4	½ Tablette	100mg	40mg
Prevotella baroniae	3	¼ Tablette	50mg	20mg
Fusobacterium naviforme	4	½ Tablette	100mg	40mg
Veillonella parvula	keine Hemmung	0	0mg	0mg
Porphyromonas gingivalis	3	¼ Tablette	50mg	20mg
Clostridium perfringens	5	1 Tablette	200mg	80mg
Cardiobacterium hominis	4	½ Tablette	100mg	40mg
Eikenella corrodens, 177	5	1 Tablette	200mg	80mg
Eikenella corrodens, 178	5	1 Tablette	200mg	80mg
Haemophilus aphrophilus	5	1 Tablette	200mg	80mg
Kingella kingae	4	½ Tablette	100mg	40mg

für alle Stämme wurden die Werte nach 48 Stunden Wachstum erhoben

Aus Abbildung 11 ist zu entnehmen, dass für fast alle Bakterien außer dem Bakterium *Veillonella parvula*, eine Hemmung stattgefunden hatte. Das bedeutet, dass eine ½ Tablette Angocin® *Anti-Infekt N* (vgl. Abbildung 6) bei den empfindlicheren Keimen wie zum Beispiel *Parvimonas micra* und *Prevotella intermedia* und 2 Tabletten Angocin® *Anti-Infekt N* bei unempfindlicheren Keimen wie *Cardiobacterium hominis*, benötigt wurden, um das jeweilige Wachstum des Bakteriums zu hemmen.

Im folgenden Abschnitt wird auf die Stämme einzeln eingegangen und dabei graphisch dargestellt, wie sich das Wachstum des jeweiligen Bakteriums pro Versuch innerhalb von 48 und 72 Stunden entwickelt beziehungsweise verändert hat. In den Graphiken ist einfach abzulesen, bei welchen Konzentrationswerten kein Wachstum mehr zu sehen war. Dieser Wert entspricht dem Schnittpunkt mit der X-Achse, wobei die Konzentration an KK und MW von Wert 1 zu Wert 6 zunimmt.

In Abbildung 12 ist zu sehen, dass das Wachstum des *Campylobacter concisus* in der Konzentration 5 gehemmt wurde. Dort waren nach 48 Stunden keine Bakterien zu zählen. Nach 72 Stunden jedoch waren auch in der Konzentration 5 und in Konzentration 6 wieder Bakterienkolonien zu erkennen. Folglich kann gesagt werden, dass keine bakterizide Wirkung zu sehen war, sondern nur eine geringe bakteriostatische Wirkung, da die Bakterien anfänglich im Wachstum gehemmt, aber nicht abgetötet wurden. Diese Wirkung trat nur in der höchsten Konzentration an KK und MW auf, entsprechend der Menge von 1-2 Tabletten.

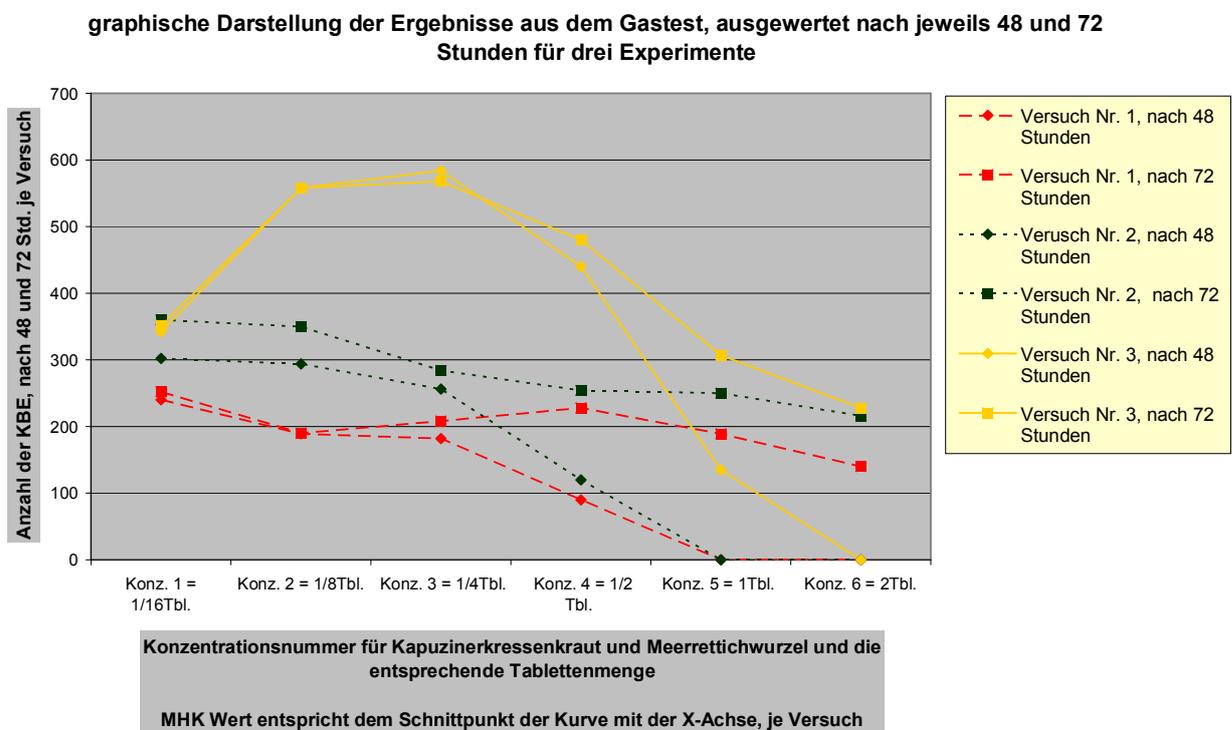


Abbildung 12: Auswertung Gastest *Campylobacter concisus*

In der folgenden Abbildung 13 sind die Ergebnisse für *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* zu sehen. Aus der Graphik ist abzulesen, dass der MHK bei Konzentrationen zwischen 3 und 5 lag. Das bedeutet, dass bei einer Konzentration, die mindestens einer $\frac{1}{4}$ Tablette entspricht, die Bakterien abgetötet wurden, da sowohl nach 48 als auch nach 72 Stunden kein Wachstum zu sehen war.

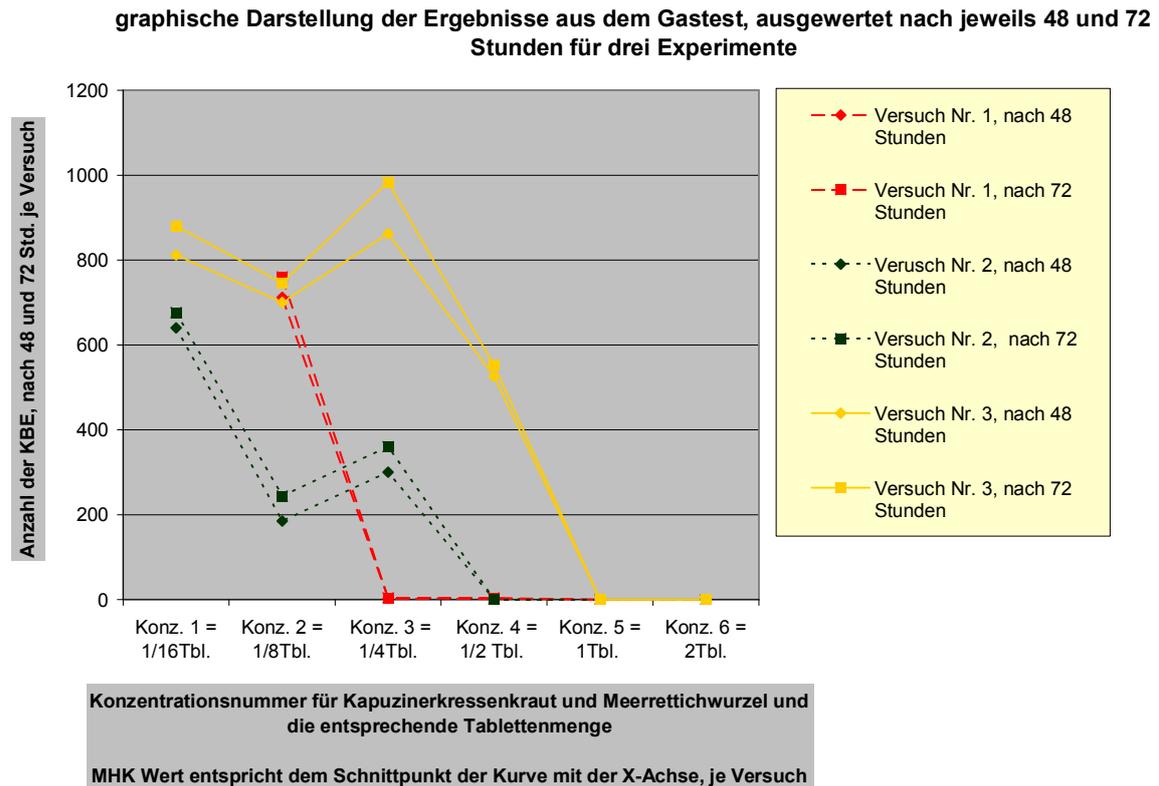


Abbildung 13: MHK Werte aus Gastest *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

In der graphischen Darstellung der Ergebnisse aus dem Gastest für *Prevotella intermedia* ist der MHK Wert von einer Konzentration von 4 (vgl. Abbildung 14) abzulesen. Nach 48 Stunden waren in den hohen Konzentrationen keine Bakterien zu sehen. Dies bedeutet, dass *Prevotella intermedia* auf KK und MW empfindlich reagiert, da schon bei der Konzentration 4, die 1/2 Tablette entspricht, kein Wachstum mehr stattgefunden hat.

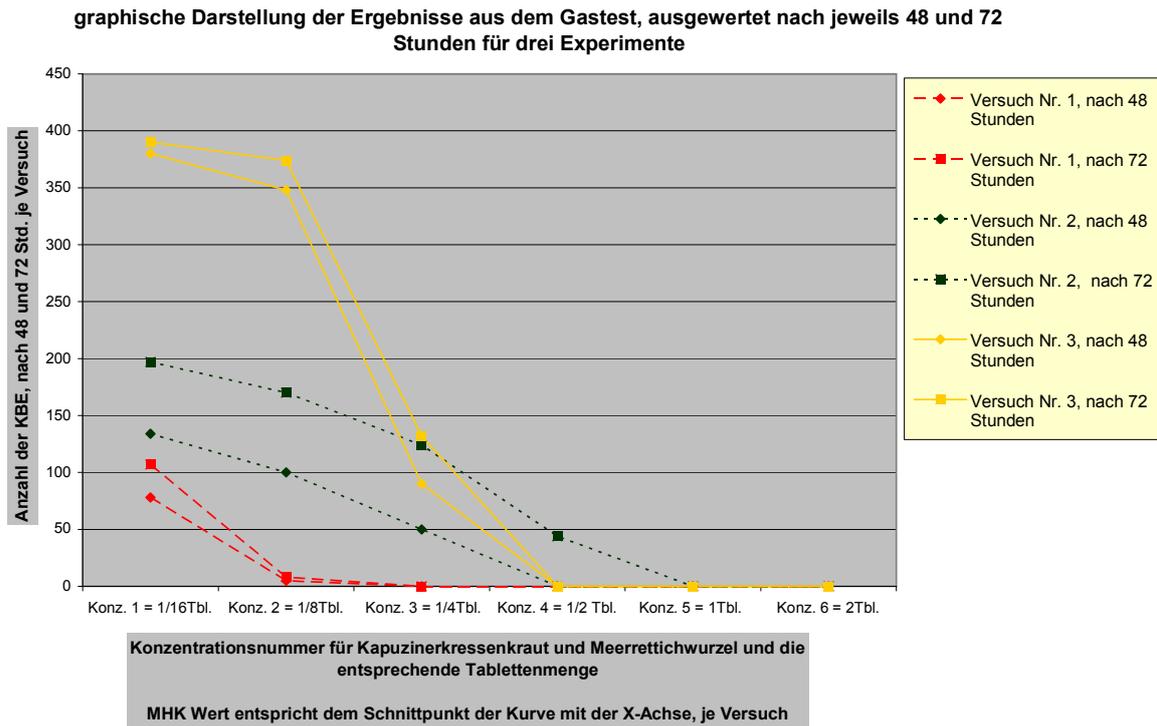


Abbildung 14: Auswertung Gastest *Prevotella intermedia*

Der MHK Wert für *Campylobacter rectus* ist wie für *Prevotella intermedia* bei einer Konzentration von 4 (graphisch in Abbildung 15 dargestellt). Hier ist zu sehen, dass die Bakterien in Konzentration 4 abgetötet wurden, in den niedrigeren Konzentrationen allerdings Wachstum stattfand.

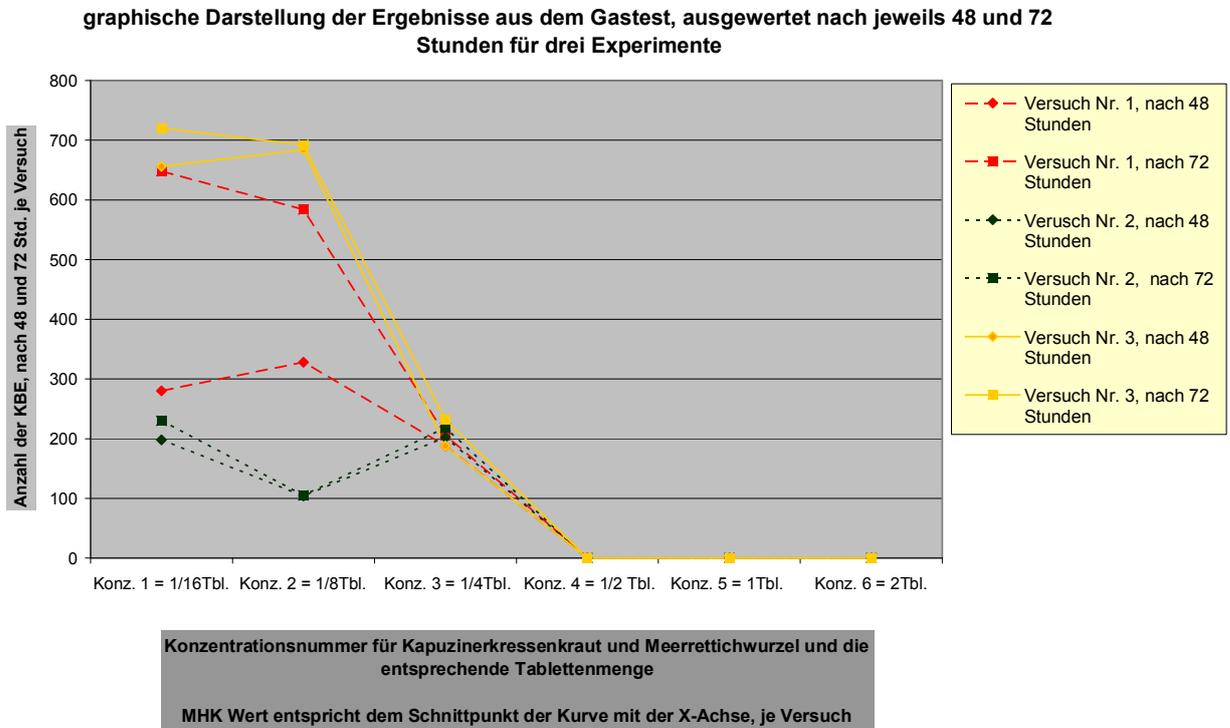


Abbildung 15: Auswertung Gastest *Campylobacter rectus*

Der MHK von *Parvimonas micra* lag ebenfalls bei einer Konzentration von 4. In den niedrigeren Konzentrationen fand Wachstum statt wie Abbildung 16 entnommen werden kann.

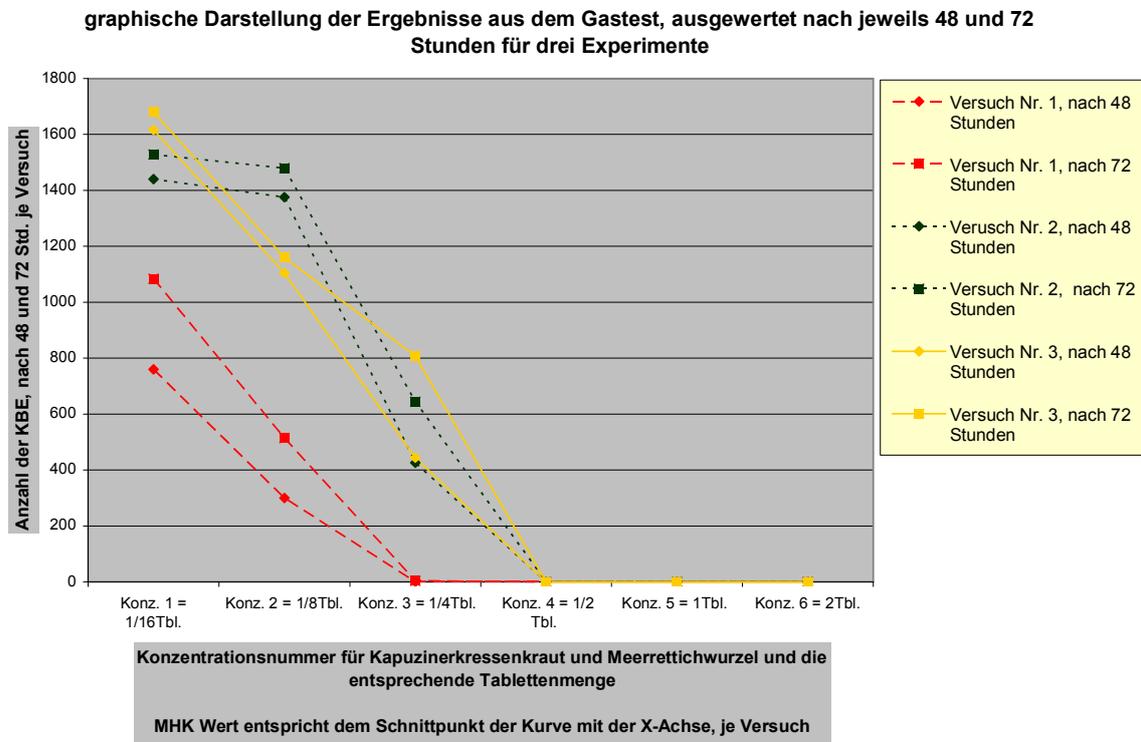


Abbildung 16: Auswertung Gastest *Parvimonas micra*

Wie in Abbildung 17 zu sehen, lag der MHK von *Prevotella baroniae* bei einer Konzentration von 3. Die Abbildung 17 gibt einen genaueren Überblick über die einzelnen Versuche. Dabei ist zu sehen, dass bei zwei Versuchen eine Hemmung in der Konzentration 3 stattgefunden hatte, während für einen Versuch eine höhere Konzentration von 4 nötig war, um eine Hemmung zu erzielen. Der wahre MHK für *Prevotella baroniae* liegt also zwischen den Konzentrationswerten von 3 und 4.

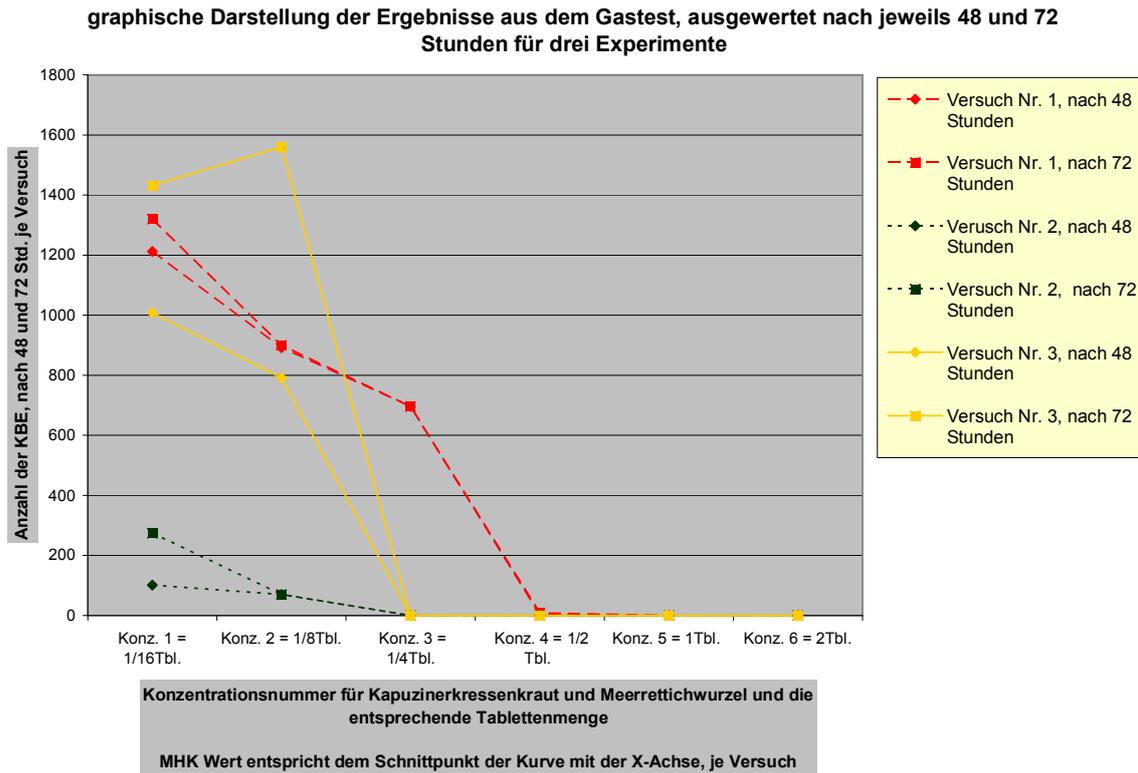


Abbildung 17: Auswertung Gastest *Prevotella baroniae*

Der MHK von *Fusobacterium naviforme* lag bei einer Konzentration von 4. Aus der Abbildung 18 ist zu erkennen, dass sowohl nach 48 Stunden, als auch nach 72 Stunden das Bakterienwachstum in den hohen Konzentrationen gehemmt wurde, erst nach > 96 Stunden fand in den hohen Konzentrationen wieder Wachstum statt.

graphische Darstellung der Ergebnisse aus dem Gastest, ausgewertet nach jeweils 48, 72 und >92 Stunden für ein Experiment

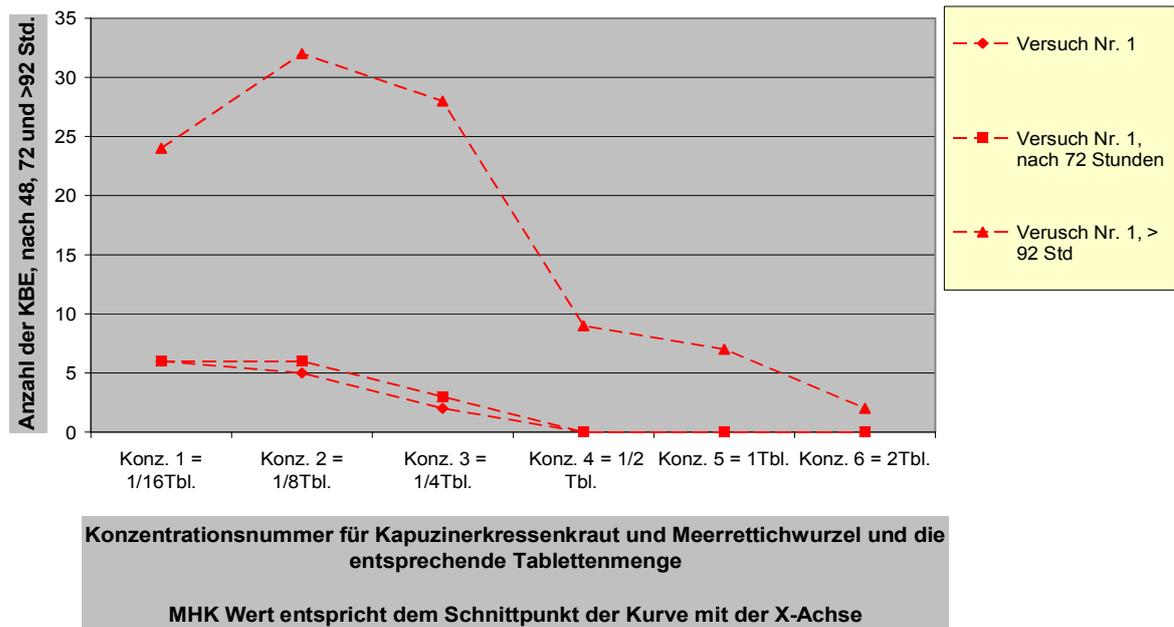


Abbildung 18: Auswertung Gastest *Fusobacterium naviforme*

Für *Veillonella parvula* wurden im Rahmen der Gastests keine MHK Werte gefunden. In den Versuchen hat keine Hemmung stattgefunden, wie in Abbildung 19 deutlich zu sehen ist. Daraus lässt sich annehmen, dass *Veillonella parvula* nicht empfindlich auf KK und MW beziehungsweise Senföle reagiert.

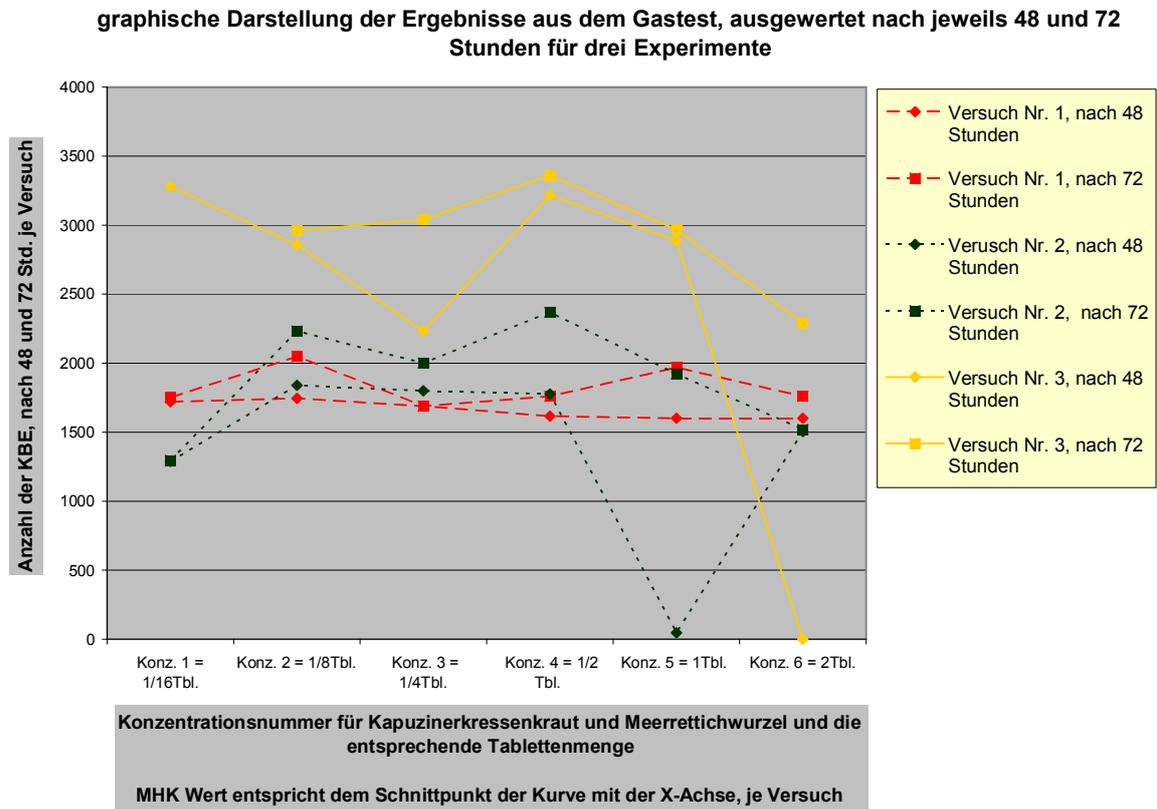


Abbildung 19: Auswertung Gastest *Veillonella parvula*

Der MHK von *Porphyromonas gingivalis* lag bei einer Konzentration von 3. Wenn man die Ergebnisse der Versuche genauer betrachtet (vgl. Abbildung 41), ist nur bei einem Versuch eine einzelne Kolonie in der Konzentration 4 gewachsen. Insofern kann man sagen, dass der MHK Wert für zwei Versuche bei 3 und für einen Versuch bei 4 lag. Da auch nach 72 Stunden keine Bakterienkolonien gewachsen waren, ist davon auszugehen, dass die Senföle auf *Porphyromonas gingivalis* eine bakterizide Wirkung haben und *Porphyromonas gingivalis* somit empfindlich auf Senföle reagiert.

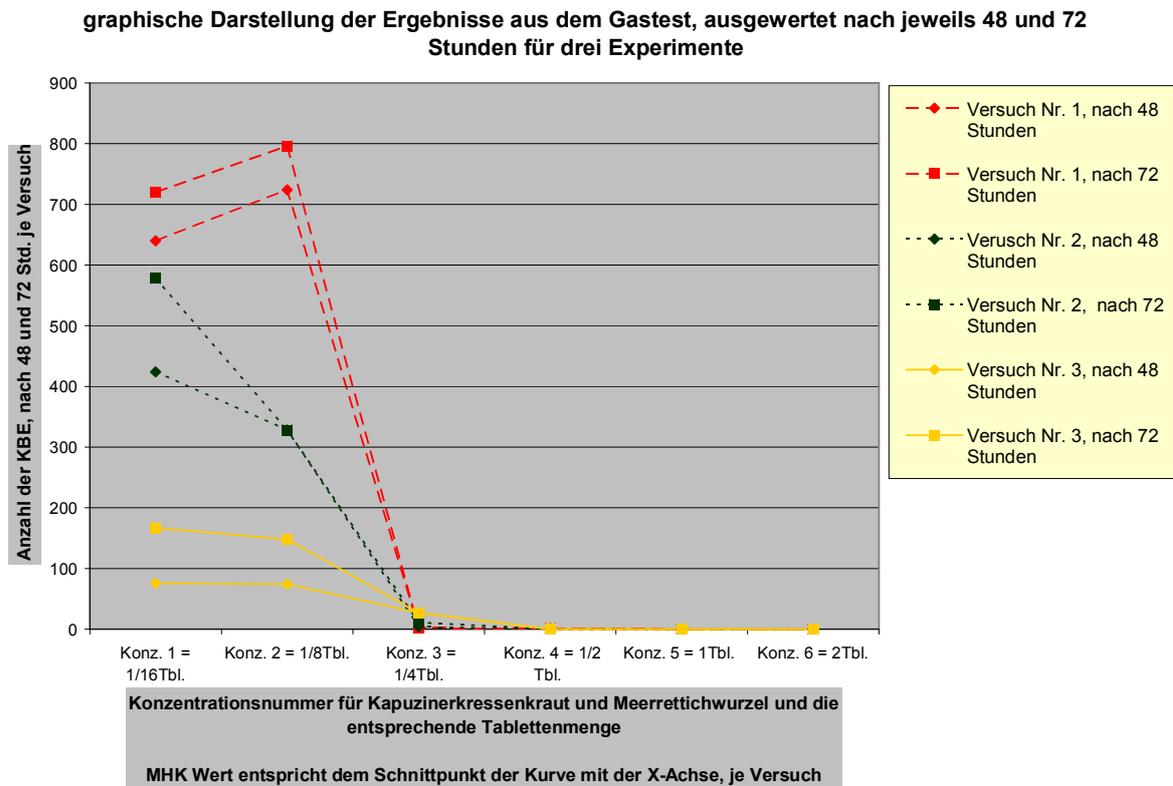


Abbildung 20: Auswertung Gastest *Porphyromonas gingivalis*

Der MHK von *Clostridium perfringens* lag bei einer Konzentration von 5. Auch hier ist bei einer genauen Betrachtung der Ergebnisse (vgl. Abbildung 21) zu erkennen, dass die Wirkung der Senföle auf das Bakterium bakteriziden Charakters war, denn nach 72 Stunden war kein Wachstum festzustellen.

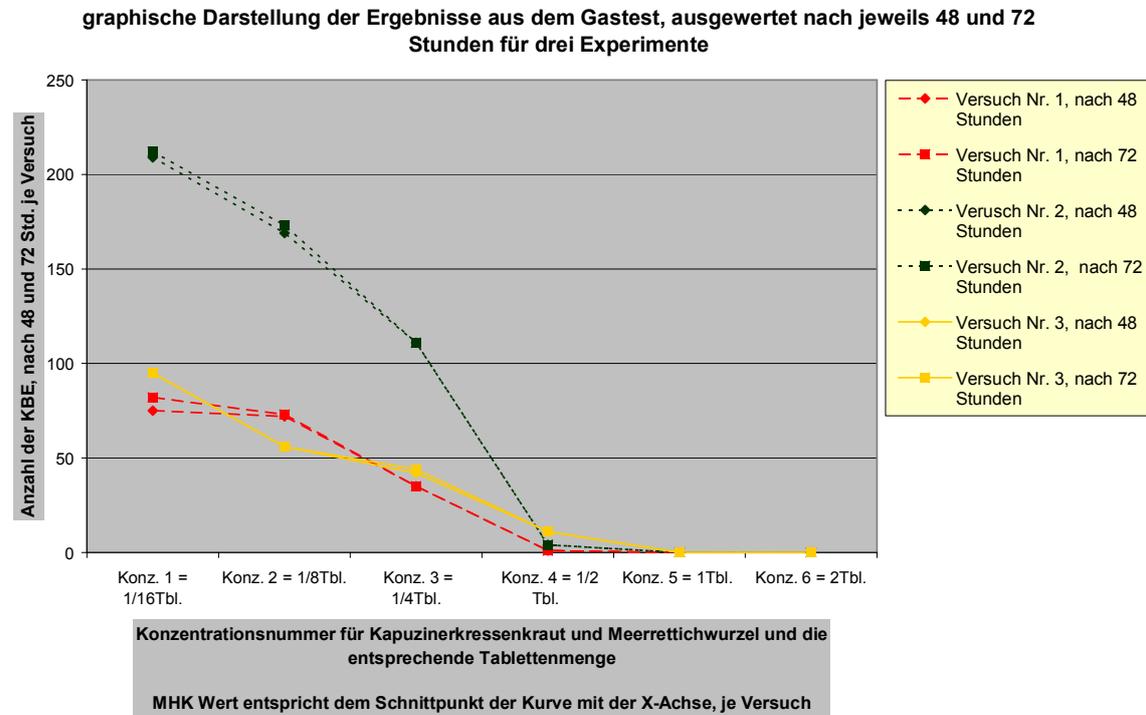


Abbildung 21: Auswertung Gastest *Clostridium perfringens*

Aus Abbildung 22 ist abzulesen, dass der MHK von *Cardiobacterium hominis* bei einer Konzentration von 4 lag. Nach 48 Stunden war bei keinem der drei Versuche Wachstum auf der Platte mit der Konzentration 4 zu sehen. Nach 72 Stunden allerdings waren auch in den hohen Konzentrationen, sprich 5 und 6, Wachstum zu sehen. Dies spricht für eine anfängliche bakteriostatische Hemmung des Wachstums, allerdings nur in den hohen Konzentrationen und nur innerhalb kurzer Zeit.

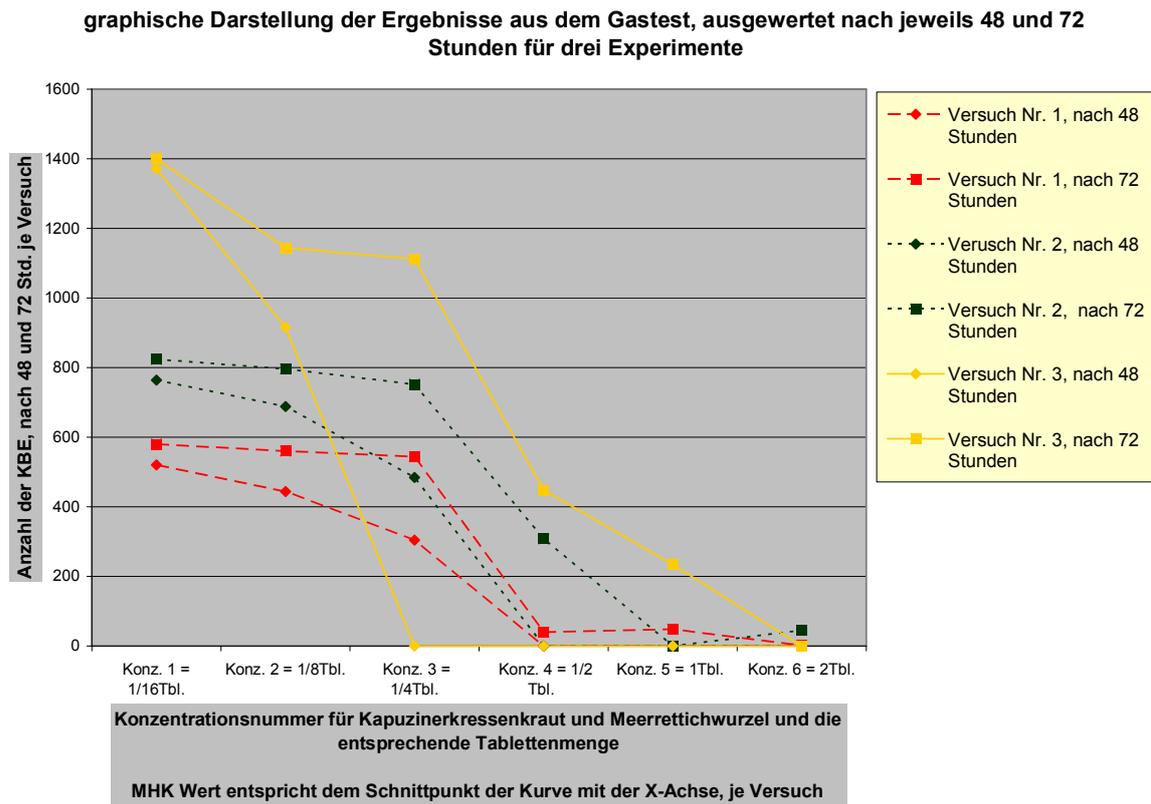


Abbildung 22: Auswertung *Cardiobacterium hominis*

Der MHK von *Eikenella corrodens*, 177 und für *Eikenella corrodens*, 178 lag bei beiden Stämmen bei einer Konzentration von 5 (vgl. Abbildung 23 und Abbildung 24). Folglich reagierten beide Stämme erst ab einer eher hohen Konzentration, die einer Tablette Angocin entspricht, mit einer Hemmung des Bakterienwachstums. Nach 72 Stunden war jedoch bei beiden Stämmen immer noch kein Wachstum zu sehen, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass eine bakterizide Wirkung auf die Bakterien eingetreten ist.

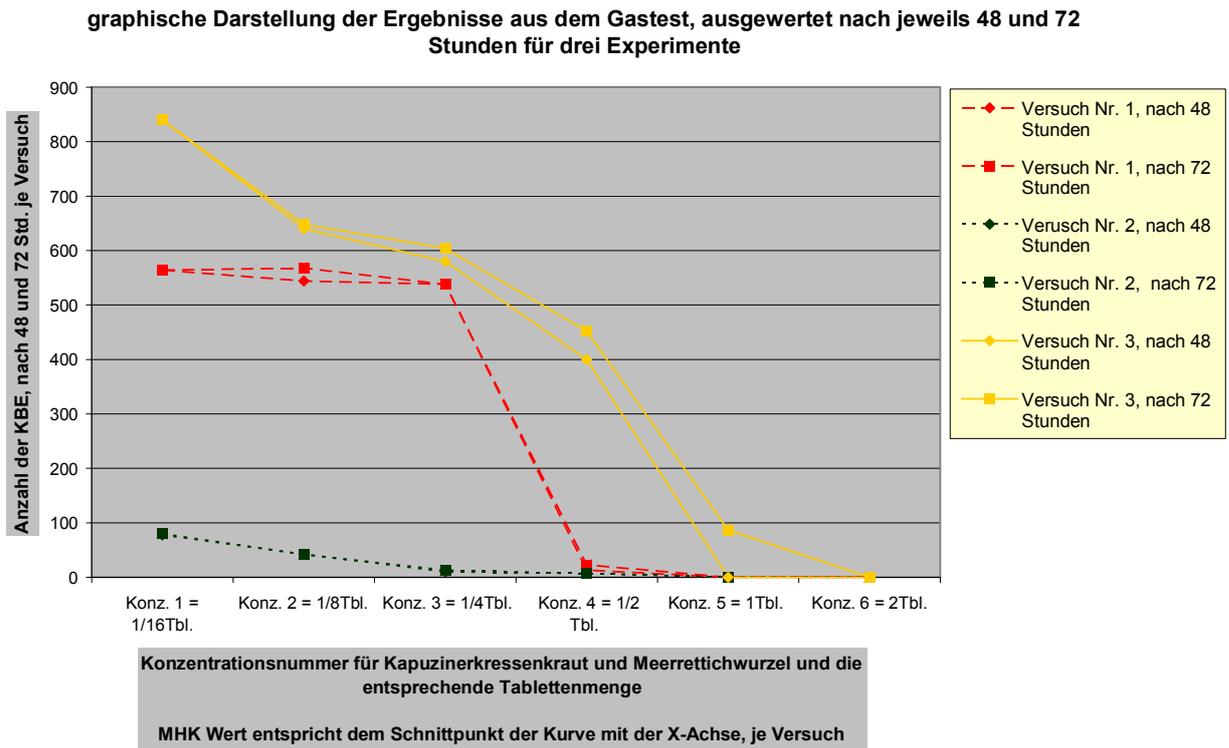


Abbildung 23: Auswertung Gastest Eikenella corrodens, 177

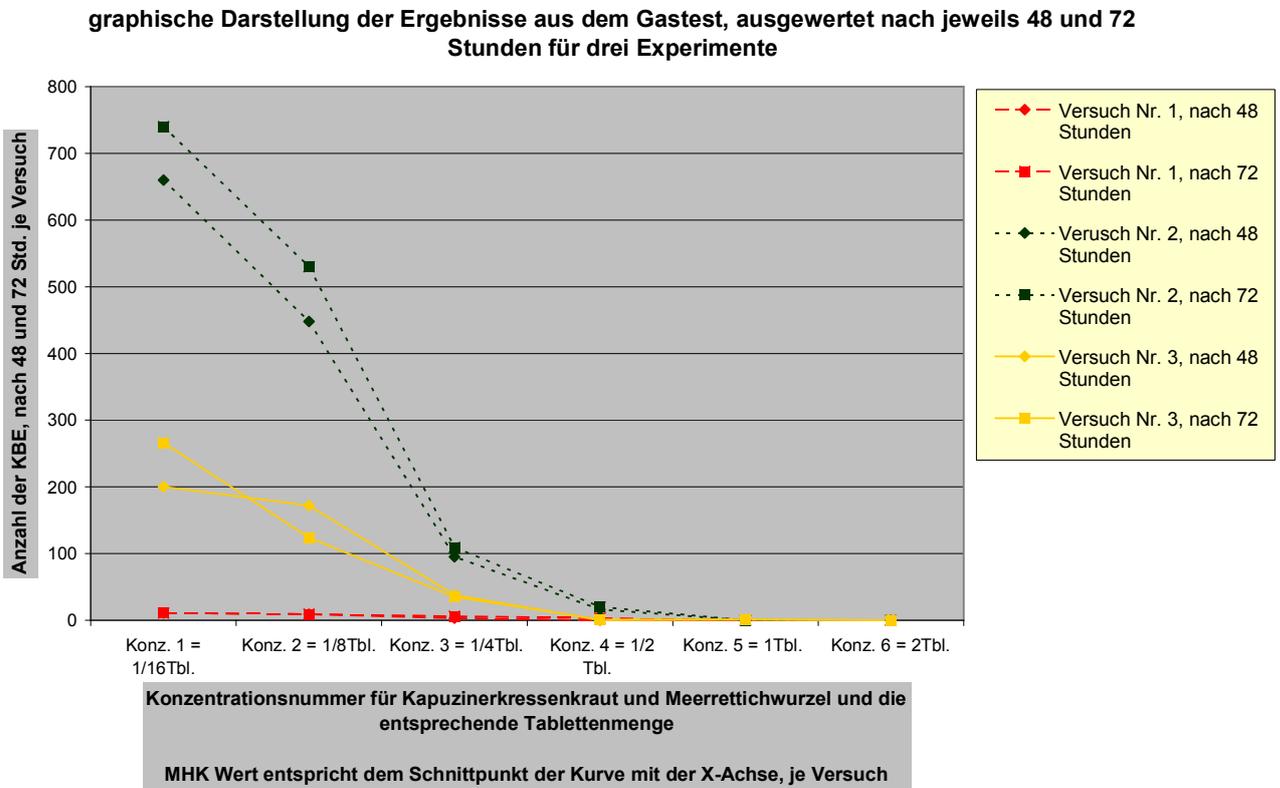


Abbildung 24: Auswertung Gastest Eikenella corrodens, 178

Haemophilus aphrophilus wurde nach 48 Stunden in der Konzentration 5 und 6 im Wachstum gehemmt (vgl. Abbildung 25). Ein fehlendes Wachstum war ebenfalls nach 72 Stunden festzustellen. Deshalb konnte angenommen werden, dass die nativen Substanzen KK und MW eine bakterizide Wirkung auf Haemophilus aphrophilus hatten.

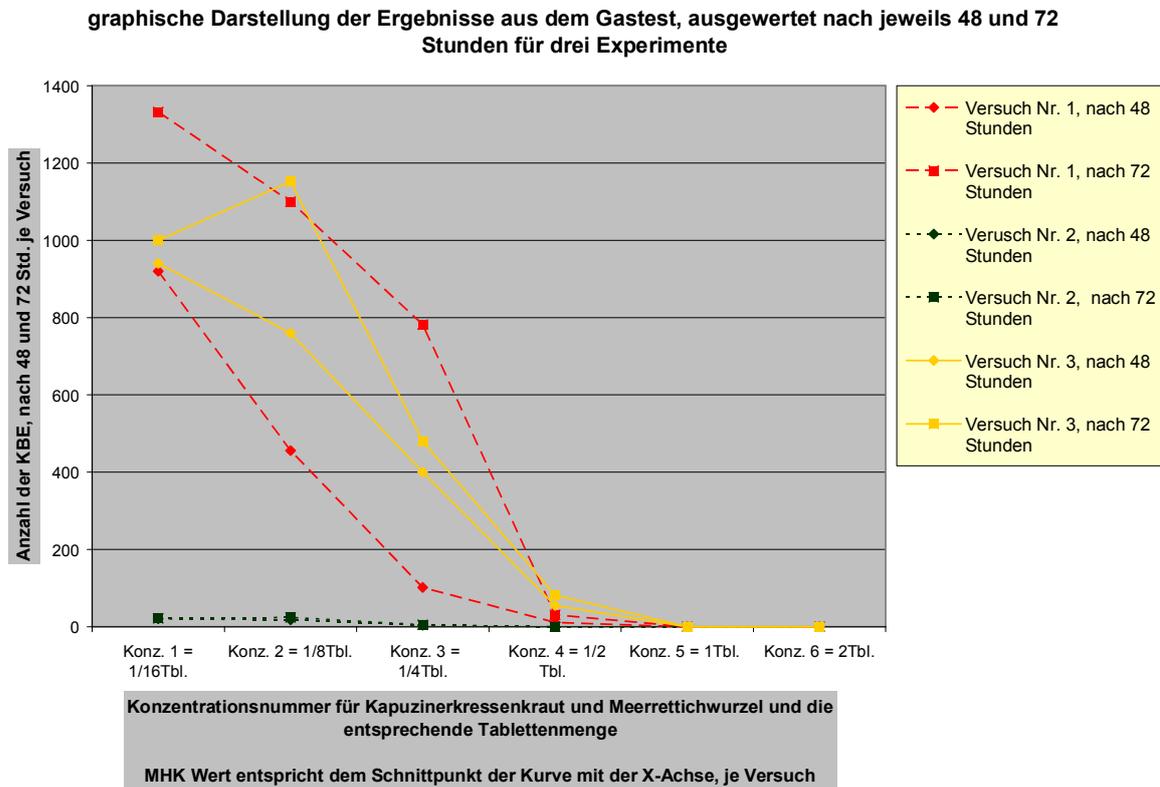


Abbildung 25: Auswertung Gastest Haemophilus aphrophilus

Für *Kingella kingae* lag der MHK bei einer Konzentration von 4. *Kingella kingae* gehört damit zu den empfindlicheren Stämmen, die schon bei einer geringeren Konzentration im Wachstum gehemmt wurden. Wie bei *Haemophilus aphrophilus* war auch hier nach 72 Stunden in keinem der drei Versuche Wachstum zu sehen, weshalb wir von einer bakteriziden Wirkung auf dieses Bakterium ausgehen.

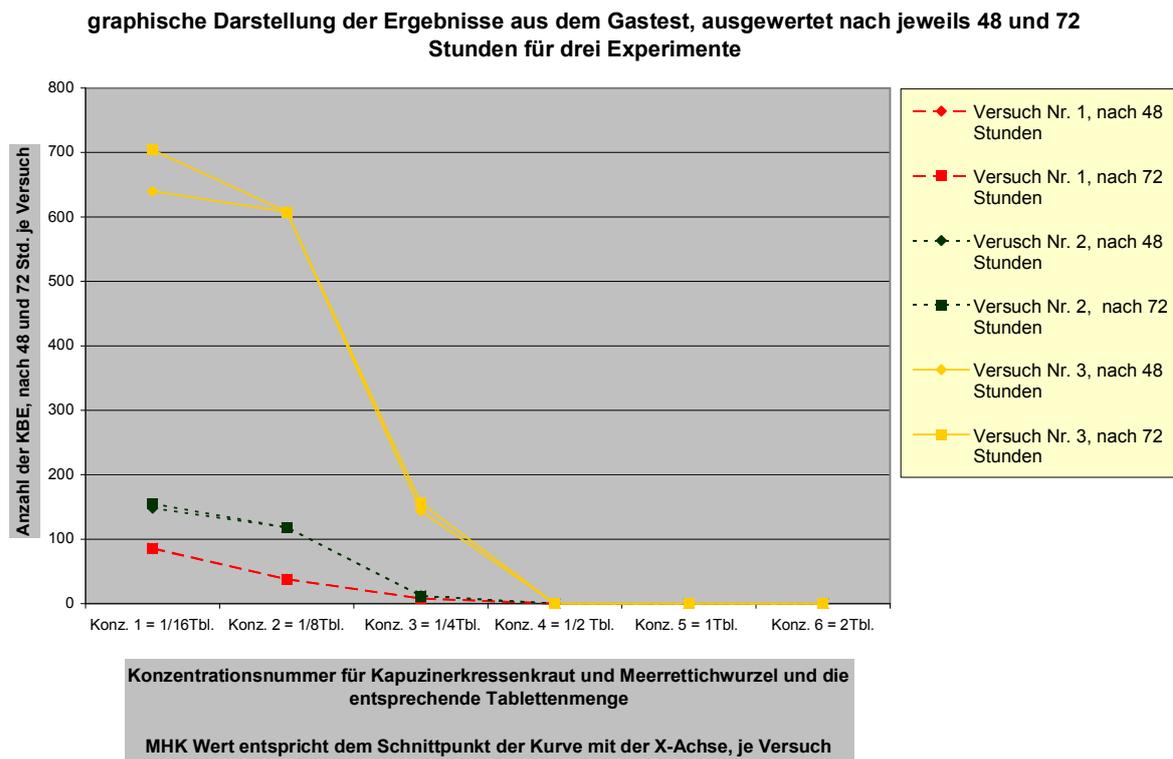


Abbildung 26: Auswertung Gastest *Kingella kingae*

3.2 Auswertung der Agardilution

Als zweiter Test wurde im Rahmen des Forschungsprojektes neben dem Gastest noch die Agardilution durchgeführt. Auch hier wurden die MHK Werte pro Bakterienstamm erhoben, außerdem wurden noch die MBK Werte für jeden Stamm notiert. Eine genaue Beschreibung erfolgt in den nachfolgenden Abschnitten.

3.2.1 Die minimale Hemmkonzentration

Die Kontaktschalen mit den Bakterien wurden auf die minimale Hemmkonzentration (MHK) hin untersucht. Die minimale Hemmkonzentration ist definiert als die niedrigste Wirkstoffkonzentration, also im Falle dieses Versuchsaufbaus die Konzentration der synthetischen Senföle ohne sichtbares Wachstum (Pankey G.A., Sabath L.D., 2004). Unter Hemmung versteht man Bakteriostase, also ein Verhindern des Wachstums der Bakterien. Dabei werden die Bakterienspezies beispielsweise in einer Wachstumsphase gehalten (Pankey G.A., Sabath L.D., 2004). Da die Auswertung visuell stattfand kann man also den MHK Wert als den Wert verstehen, bei dem kein bakterielles Wachstum mehr sichtbar war. Auch bei der Agardilution fand die Auswertung der MHK Werte nach 48 Stunden statt. Die Werte in Abbildung 27 geben einmal den Mittelwert über alle Versuche an und des Weiteren den Bereich an Werten, der in den verschiedenen Experimenten gefunden wurde. Das bedeutet, an den Werten kann man ablesen, auf welcher der jeweiligen Platten und entsprechend damit auch bei welcher Konzentration an Senfölen kein bakterielles Wachstum mehr zu sehen war. In Abbildung 8 sind die entsprechenden Konzentrationen an Senfölen pro Platte abzulesen. Je geringer der Zahlenwert (vgl. 1te Spalte), desto höher der Senfögehalt.

Abbildung 27: MHK Werte in der Agardilution für die verschiedenen Bakterienspezies

Bakterium	MHK Bereich	MHK Mittelwert	Konzentration Senföle %	Konzentration Senföl mg/ml
<i>Campylobacter concisus</i>	4 - 7	< 6	0,002%	0,02
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	5 - 6	< 6	0,002%	0,02
<i>Prevotella intermedia</i> (<i>Prevotella nigrescens</i>)	4 - 6	5	0,004%	0,04
<i>Campylobacter rectus</i>	4 - 6	> 5	0,004%	0,04
<i>Parvimonas micra</i> (<i>Pepotstreptococcus micros</i>)	4 - 6	5	0,004%	0,04
<i>Prevotella baroniae</i>	4 - 6	5	0,004%	0,04
<i>Fusobacterium naviforme</i>	4 - 6	< 5	0,004%	0,04
<i>Veillonella parvula</i>	0 - 1	< 1	0,063%	0,67
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	5 - 8	< 7	0,001%	0,01
<i>Clostridium perfringens</i> (Referenzstamm)	3 - 7	> 5	0,004%	0,04
<i>Cardiobacterium hominis</i>	6 - 9	7	0,001%	0,01
<i>Eikenella corrodens</i> , ohne Hof	3 - 5	> 4	0,008%	0,08
<i>Eikenella corrodens</i> , kleine Kolonien	3 - 5	> 4	0,008%	0,08
<i>Haemophilus aphrophilus</i>	4 - 7	> 6	0,002%	0,02
<i>Kingella kingae</i>	5 - 8	< 7	0,001%	0,01

MHK Werte der Agardilution, nach 48h standardisiert erhoben

In der Abbildung 27 wird deutlich, dass die meisten Bakterien empfindlich auf Senföle reagieren. Wie bereits im Gastest zeigt sich in den Ergebnissen des Agardilutionsversuches, dass *Veillonella parvula* unempfindlich reagiert und keine Hemmung des Wachstums stattfindet. Für alle anderen Bakterien variiert die nötige Menge an Senfölen um das bakterielle Wachstum zu hemmen. Die Werte liegen zwischen 0,01mg/ml und 0,08mg/ml. So bedeutet beispielsweise ein MHK Mittelwert von 4, dass bei einer Senfölkonzentration von 0,008% gemittelt über alle Versuche, was einem Senfölgelhalt von 0,08mg/ml entspricht, eine Hemmung des Bakterienwachstums stattgefunden hatte. Der jeweilige Mittelwert wurde berechnet, indem die einzelnen MHK Werte aus den Versuchen addiert und durch die Anzahl der vorhandenen MHK Werte geteilt wurden. Für die Werte der einzelnen Stämme pro Experiment siehe Abbildung 48 im Anhang.

3.2.2 Die minimale bakterizide Konzentration

Für die Kontaktschalen mit den Bakterien wurde auch die minimale bakterizide Konzentration (MBK) der synthetischen Senföle bestimmt, also die Eigenschaft der Senföle, die Bakterien abzutöten und nicht nur im Wachstum zu hemmen. Die minimale bakterizide Konzentration ist definiert als die Konzentration, bei der 99,9% der Bakterien abgetötet werden (Pankey G.A., Sabath L.D., 2004). Wie in Kapitel 2.5.4 beschrieben, wurden für die Beurteilung der MBK Werte die jeweiligen Bakterien, bei denen eine Hemmung stattgefunden hatte, von den Platten des Agardilutionsversuches mit Hilfe eines sterilen Tupfers entnommen und auf senfölfreie Platten ausplattiert. Diese Platten wurden nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden inspiziert und es wurde abgelesen, ob die Bakterien erneut gewachsen waren (somit nur eine bakteriostatische Wirkung vorlag) oder die Bakterien tatsächlich abgetötet wurden. Die folgende Abbildung 28 gibt einen Überblick über die jeweiligen MBK Werte pro Bakterienstamm.

Abbildung 28: MBK Werte nach 48h für die verschiedenen Bakterienspezies

Bakterium	MBK Versuch 1 pro Bakterium	Konzentration Senföle %	Konzentration Senföl mg/ml	MBK Versuch 2 pro Bakterium
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	4	0.031%	0,34	
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	4	0.016%	0,17	
<i>Prevotella intermedia</i> (<i>Prevotella nigrescens</i>)	6	0.016%	0,17	
<i>Campylobacter rectus</i>	6	0.016%	0,17	5
<i>Parvimonas micra</i> (<i>Pepotstreptococcus micros</i>)	6	0.016%	0,17	1
<i>Prevotella baroniae</i>	6	0.016%	0,17	1
<i>Fusobacterium naviforme</i>	6	0.031%	0,34	2
<i>Veillonella parvula</i>	1	0.125%	1,35	0
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	7	0.008%	0,08	8
<i>Clostridium perfringens</i> (Referenzstamm)	6	0.031%	0,34	1
<i>Cardiobacterium hominis</i>		0.016%	0,17	1
<i>Eikenella corrodens</i> , ohne Hof	5	0.063%	0,67	0
<i>Eikenella corrodens</i> , kleine Kolonien	4	0.031%	0,34	0
<i>Haemophilus aphrophilus</i>	6	0.008%	0,08	1
<i>Kingella kingae</i>	6	0.016%	0,17	3

MBK Werte standardisiert nach 48h erhoben

Auch hier wird wieder bestätigt, dass *Veillonella parvula* auf Senföle nicht empfindlich reagierte. Der Bakterienstamm wurde weder im Wachstum gehemmt noch abgetötet. Jedoch zeigte sich bei fast alle anderen Bakterienstämmen auch keine Hemmung des Wachstums mehr. Aus dem Vergleich der MHK Werte in Abbildung 27 mit den MBK Werten aus Abbildung 28 ist ersichtlich, dass sich die Werte nicht entsprechen. Dies bedeutet, dass die Bakterien in ihrem Wachstum nur gehemmt wurden, nicht aber abgetötet. Nur bei sehr hohen Konzentrationen zwischen 0,031% und 0,125% Senföl konnte ein bakterizider Effekt beobachtet werden. Als Resultat zeigt sich also, dass bei den meisten Bakterienstämmen der Effekt nur bakteriostatisch und nicht bakterizid war.

3.2.3 Korrelation der Ergebnisse des Gastests und der Agardilution

Zum Schluss wurde die Frage der Korrelation der antibakteriellen Aktivität zwischen den beiden verschiedenen Testverfahren betrachtet. In der Literatur gibt es keine Angaben über eine Korrelation der antibakteriellen Aktivität zwischen synthetischen Senfölen und den nativen Substanzen Kapuzinerkressenkraut (KK) und Meerrettichwurzel (MW). Daher konnte eine Korrelation dieser Werte nur abschätzend nachgegangen werden, indem die Ergebnisse der Tests miteinander verglichen wurden. Dafür wurde geschaut, wo die antibakterielle Aktivität von synthetischem ITC mit der von getrocknetem Kapuzinerkressenkraut und Meerrettichwurzel vergleichbar ist. Daraus ließ sich folgern, dass eine bestimmte Menge X nativer Substanz und eine Menge Y der synthetischen ITC eine vergleichbare antibakterielle Aktivität vorweisen. Für die jeweiligen Werte, bei denen davon ausgegangen werden konnte, dass ähnliche antibakterielle Aktivitäten also eine Hemmung für beide Substanzen vorlagen, vergleiche Abbildung 29.

Abbildung 29: Korrelation der MHK Werte aus dem Gastest und der Agardilution

Bakterium	entsprechende Menge an KK	entsprechende Menge an MW	Konzentration Senföle %	Konzentration Senföl mg/ml
Campylobacter concisus	200mg	80mg	0,002%	0,02
Aggregatibacter actinomycetemcomitans	100mg	40mg	0,002%	0,02
Prevotella intermedia	100mg	40mg	0,004%	0,04
Campylobacter rectus	100mg	40mg	0,004%	0,04
Parvimonas micra	100mg	40mg	0,004%	0,04
Prevotella baroniae	50mg	20mg	0,004%	0,04
Fusobacterium naviforme	100mg	40mg	0,004%	0,04
Veillonella parvula	0mg	0mg	0,063%	0,67
Porphyromonas gingivalis	50mg	20mg	0,001%	0,01
Clostridium perfringens	200mg	80mg	0,004%	0,04
Cardiobacterium hominis	100mg	40mg	0,001%	0,01
Eikenella corrodens, 177	200mg	80mg	0,008%	0,08
Eikenella corrodens, 178	200mg	80mg	0,008%	0,08
Haemophilus aphrophilus	200mg	80mg	0,002%	0,02
Kingella klingae	100mg	40mg	0,001%	0,01

Korrelation der MHK Werte zwischen den Ergebnissen des Gastestes und der Agardilution, Werte geben Menge je Spezies an, bei denen eine Hemmung stattfand

Zusammenfassend lässt sich aus der Abbildung 29 ablesen, dass die antibakterielle Aktivität von 50-100 mg Kapuzinerkressenkraut, beziehungsweise 20-80 mg Meerrettichwurzel einer antibakteriellen Aktivität von synthetischen Senfölen zwischen 0,01 bis 0,08 mg/ml zu entsprechen scheinen.

Diskussion

3.3 Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse

Ziel der Arbeit war es zu untersuchen, ob mundpathogene Keime empfindlich auf senföhlhaltige Pflanzenpräparate reagieren. Zusammenfassend ergab sich, dass fast alle getesteten mundpathogenen Bakterien in beiden Testmethoden, folglich sowohl im Gastest unter Testung der nativen Substanzen als auch in der Agardilution, in der die synthetischen Senföle getestet wurden, empfindlich reagierten. Der einzige Bakterienstamm, welcher nicht auf die Senföle, weder in nativer noch in synthetischer Form, reagierte war das Bakterium „*Veillonella parvula*“. Dieser Stamm zeigte sich in allen Versuchen unempfindlich gegenüber den Senfölen. Die anderen Bakterienstämme wurden alle in ihrem Wachstum gehemmt. Dies bedeutet, dass die im Rahmen dieses Projektes getesteten Bakterien auf die Senföle und folglich auch auf Angocin® *Anti-Infekt N* reagierten. Die eingangs in dieser Arbeit aufgeworfene Frage, bei welcher Konzentration an Senfölen eine Hemmung des bakteriellen Wachstums stattfindet, konnte somit beantwortet werden. Wie schon im Ergebnisteil veranschaulicht, variierten die MHK und MBK Werte dabei je nach Bakterienspezies. Generell lagen die MHK Werte für die senföhlhaltigen Pflanzenpräparate zwischen 50mg bis 200mg Kapuzinerkresse und 20mg bis 80mg Meerrettichwurzel. Diese Mengen entsprechen $\frac{1}{4}$ bis 1 Tablettenmenge Angocin® *Anti-Infekt N*. Für die Anwendung von Angocin® *Anti-Infekt N* bedeutet dies, dass bei der Einnahme einer Tablette die meisten anaeroben und aeroben Bakterienstämme, welche im Rahmen dieses Projektes getestet wurden, in ihrem Wachstum beeinflusst werden. Die empfindlichsten Bakterienstämme dieser Arbeit sind *Porphyromonas gingivalis* und *Prevotella baroniae*, die mit einem MHK von drei, entsprechend der Menge einer $\frac{1}{4}$ Tablette, bereits im Wachstum gehemmt werden.

Die Interpretation der MBK Werte ergibt, dass mehrheitlich kein eindeutiger Endpunkt in der Hemmung und in der Menge an KK und MW definiert werden kann. Wie Abbildung 28 zu entnehmen ist, entsprechen die MBK Werte den

MHK Werten nicht, beziehungsweise nur bei wenigen Spezies, wie *Campylobacter rectus* und *Porphyromonas gingivalis*. Dies spricht im Allgemeinen für eine eher bakteriostatische als eine bakterizide Wirkung. Für die meisten Bakterienstämme wurde also keine minimale bakterizide Konzentration (MBK) gefunden, so dass die Bakterien nicht komplett abgetötet sondern nur gehemmt wurden.

Es soll an dieser Stelle noch darauf hingewiesen werden, obwohl die Effekte der Senföle auf die Bakterienspezies hauptsächlich bakteriostatischer Natur sind, dies keineswegs nachteilig für die Patienten ist. Heizmann P. und Heizmann W. R. (2007) berichten vom gleichwertigen Erfolg bakteriostatisch und bakterizid wirksamer Antibiotika. Des Weiteren erscheint die Einteilung in bakteriostatisch und bakterizid, vor allem aus klinischer Sicht, willkürlich. Laut Pankey G.A. und Sabath L.D. (2004) sollten antibiotisch wirksame Substanzen grundsätzlich eher als beides beschrieben werden, bakteriostatisch und bakterizid. Im experimentellen Kontext spielen viele Einflussfaktoren für die Werte eine Rolle. Darunter fallen die Wachstumsbedingungen, die Testdauer und die Bakteriendichte. Diese Werte werden jedoch streng kontrolliert.

In vivo sind sowohl die Konzentration der Bakterien als auch die der antibakteriell wirkenden Substanzen deutlich variabler. Wichtig ist hier, dass das Wachstum der Bakterien gehemmt und unterdrückt wird. Für die Abräumung der Bakterien sorgt dann das körpereigene Immunsystem. Daher spielt im klinischen Gebrauch die Dosis eine erhebliche Rolle. Diese sollte der therapeutischen Indikation angepasst werden um seine antibakterielle Wirkung zu zeigen und das Immunsystem des Körper bei der Bekämpfung der Bakterien zu unterstützen.

Nachdem die Ergebnisse zusammenfassend dargestellt wurden, sollte die Frage der klinischen Nutzbarkeit und damit auch die der Relevanz der im Rahmen dieses Forschungsprojektes erhobenen Daten im nächsten Abschnitt diskutiert werden.

3.4 Klinische Nutzbarkeit

Im Folgenden wird auf die Behandlung der in den Abbildung 3 und Abbildung 5 dargestellten Erkrankungen eingegangen. Dabei soll zunächst kurz erläutert werden, was die Ursache der jeweiligen Erkrankung ist. Weiterhin ist es wichtig zu verstehen, welche unterschiedlichen Behandlungen bis dato für die einzelnen Erkrankungen erfolgen und welche Möglichkeiten es gibt, alternative Behandlungswege einzuschlagen beziehungsweise wie die aus den neuen Daten gezogenen Erkenntnisse bezüglich senföhlhaltiger Pflanzenpräparate innerhalb der Zahnmedizin nutzbar gemacht werden könnten.

Insbesondere soll dabei auf die Behandlungsweisen von Parodontitis, Periimplantitis und Pulpitis eingegangen werden. Für einen groben Überblick über die Behandlungen der einzelnen oralen Erkrankungen siehe folgende Abbildung 30.

Abbildung 30: orale Erkrankungen und deren Behandlungswege

Erkrankung	Behandlungsmöglichkeit
Gingivitis	Beseitigung der bakteriellen Beläge Lokal unterstützende Mundspüllösung
Parodontitis	Mechanische Entfernung, zusätzlich Antibiotikagabe lokal oder systemisch (besonders in schweren Fällen üblich)
Periimplantitis	Mechanische Entfernung, zusätzlich Antibiotikagabe ggf. Entfernung des Implantates
Pulpitis	Biomechanische Entfernung und Reinigung der Wurzelkanäle

Quelle: Einführung in die Zahnerhaltung

Unter Parodontitis versteht man eine Entzündung des Zahnhalteapparates (Herrera D., Matesanz P., Bascones-Martinez A., Sanz M. 2012; Leszczynska A., Busczko P., Busczko W., Pietruska M., 2011), welche von verschiedenen, in Abbildung 3 bereits erwähnten Bakterien, verursacht wird und mit schlechter Mundhygiene assoziiert ist. Unter Gingivitis kann ein früheres Stadium verstanden werden, bei dem nur das Zahnfleisch betroffen ist. Der

Zahnhalteapparat ist bei einer Gingivitis noch nicht betroffen. (Leszczynska A., Buczko P., Busczko W., Pietruska M., 2011). Eine Gingivitis an sich ist bei Verbesserung der Mundhygiene reversibel, bei Nicht-Behandlung kann sie aber in eine Parodontitis übergehen. Auf folgendem Röntgenbild ist der Rückgang des Zahnhalteapparates, vor allem des Knochens, deutlich zu erkennen.

Abbildung 31: Röntgenbild eines Patienten mit schwerer Parodontitis



Laut Hellwig E, Klimek J, Attin T. (2009) besteht die Therapie der Parodontitis vornehmlich in der mechanischen Entfernung der bakteriellen Anlagerung an dem Zahn beziehungsweise der Wurzeloberfläche durch geeignete Instrumente, wobei das Ziel ist, plaque- und zahnsteinfreie orale Verhältnisse zu schaffen. Diese Meinung wird allgemein in der Literatur über die Behandlung von Parodontitis unterstützt (Herrera D., Matesanz P., Bascones-Martinez A., Sanz M., 2012; Leszczynska A., Buczko P., Busczko W., Pietruska M., 2011; Drisko C.L., 2014). Herrera D., Matesanz P., Bascones-Martinez A., Sanz M. (2012) beschreiben, dass neben der mechanischen Entfernung, welche gewissen Limitationen unterliegt, wie unter anderem die nicht ausreichende Zugänglichkeit zu den betroffenen Stellen, zusätzlich antibiotische Therapie indiziert ist, um die Behandlungsergebnisse zu verbessern. Die Kombination aus mechanischer Entfernung der bakteriellen Beläge und Antibiotikagabe führt laut Literatur zur deutlichen Verbesserung der Parodontitis (Leszczynska A., Buczko P., Busczko W., Pietruska M.,

2011). Dies ist besonders der Fall, wenn Hinweise auf schwere Fälle der Erkrankung, wie stark erhöhte Taschentiefen und Blutungen, vorliegen. Drisko (2014) empfiehlt die Gabe von Antibiotika bei akuter, schwerer, generalisierter chronischer oder aggressiver Parodontitis. Wichtig ist jedoch, dass gerade die medikamentöse Therapie, in Form von Antibiotikagabe, nur adjuvant stattfinden sollte und nicht als alleinige Therapie indiziert sein darf. (Hellwig E, Klimek J, Attin T., 2009; Herrera D., Matesanz P., Bascones-Martinez A., Sanz M. 2012; Drisko C.L., 2014) Grundsätzlich kann die Anwendung von Antibiotikatherapie lokal oder systemisch erfolgen, beginnend ab dem Moment der mechanischen Reinigung (Herrera D., Matesanz P., Bascones-Martinez A., Sanz M. 2012; Leszczynska A., Buczko P., Busczko W., Pietruska M., 2011). Systemisch erfolgt die Einnahme meist in Form von Antibiotika, während die lokale Behandlung erfolgt, indem direkt auf die betroffene Stelle antibakteriell wirkende Gels oder Spülungen aufgetragen werden. Zu den häufigsten Antibiotika die therapiebegleitend eingesetzt werden gehören Amoxicillin und Metronidazol (Herrera D., Matesanz P., Bascones-Martinez A., Sanz M. 2012; Drisko C.L., 2014).

Neben der Parodontitis kann es auch zur Periimplantitis kommen, welche mit entzündlichen Veränderungen am Weichgewebe und Knochenabbau um das Implantat einhergeht (Hellwig E., Klimek J., Attin T., 2009). Die Periimplantitis weist Ähnlichkeiten zu den plaquebedingten Entzündungen an natürlichen Zähnen auf (Mishler O.P., Shiau H.J., 2014). Ebenso wie bei Parodontitis ist die häufigste Ursache für eine Periimplantitis unzureichende Mundhygiene und bakterielle Anlagerung des das Implantat umgebenden epithelialen Gewebes. Daraus resultiert eine entzündliche Reaktion des umliegenden Gewebes, welche sich bis zum darunterliegenden Knochen ausbreiten kann (Mishler O.P., Shiau H.J., 2014). Eine Unterscheidung, ähnlich der zwischen Gingivitis und Parodontitis, lässt sich auch hier vornehmen und wird eingeteilt in die Mukositis und die Periimplantitis. Bei der Mukositis ist nur die Schleimhaut des das Implantat umgebenden Gewebes betroffen, während bei der Periimplantitis Knochenabbau beziehungsweise Knochenbeteiligung mit einhergeht (Lindhe J., Meyle J., 2008). Wie in Abbildung 5 bereits gezeigt spielen gram-negative Bakterien hier eine

entscheidende Rolle. Zur Behandlung der Periimplantitis ist die Reinigung der betroffenen Stelle durch den Zahnarzt Mittel der Wahl, um die bakterielle Kolonisierung an der Implantatoberfläche mechanisch zu beseitigen (Mombelli A., De´caillot F. 2011, Mishler O.P., Shiau H.J., 2014). Dabei kann unterschieden werden zwischen nicht-chirurgischem und chirurgischem Vorgehen. Verschiedenste Instrumente (Küretten, Ultraschall, Laser) sind vorhanden, um die Beläge zu entfernen und um eine geeignete Plaquekontrolle zu erreichen, wobei die Empfehlung zur Behandlung einer Periimplantitis je nach Literatur abweicht. Es gibt folglich keine einheitlichen Behandlungsansätze (Romanos G.E., Weitz D., 2012). Algraffee H., Borumandi F., Cascarini L. (2012) empfehlen bei der Mukositis einen nicht chirurgischen Zugang, für die Periimplantitis aber einen chirurgischen Zugang in Kombination mit lokaler oder systemischer Gabe von Antibiotika. Die Gabe von Antibiotika scheint sich auch bei Periimplantitis positiv auf den Heilungsverlauf der Entzündung auszuwirken (Mishler O.P., Shiau H.J. 2014; Romanos G.E., Weitz D., 2012). Dem Körper wird damit die Möglichkeit gegeben, gesundes Gewebe wieder aufzubauen, so dass krankhaft erhöhte Sondierungstiefen wieder zurück gehen. Röntgenologisch zeigt sich dann auch wieder eine Zunahme des Knochens an den betroffenen Stellen (Rams T. E., Degener J. E., van Winkelhoff A. J., 2014). Die Ursachen und Behandlungen von Parodontitis und Periimplantitis weisen somit Ähnlichkeiten auf. Auch die Gefahr des Entstehens einer Periimplantitis bei Patienten, die bereits vorher unter einer Parodontitis litten, ist erhöht (Algraffee H., Borumandi F., Cascarini L., 2012).

Unter einer Pulpitis versteht man eine Entzündung der Pulpa (Zahnmark) durch Mikroorganismen. Es gibt verschiedene Formen der Pulpitis, die bei anhaltendem Reiz zum Absterben der Pulpa führen oder in das periapikale Gewebe übertreten. Die in diesen Fällen indizierte Behandlung ist die Wurzelkanalbehandlung, also die Entfernung der infizierten Pulpa, die biomechanische Aufbereitung der Wurzelkanäle mit geeigneten Instrumenten und der daraufhin folgende bakteriendichte Verschluss des Zahnes (Hellwig E., Klimek J., Attin T., 2009). Biomechanische Aufbereitung bedeutet einerseits das entzündete Gewebe mit Instrumenten zu entfernen und

andererseits den Einsatz von Spülungen. Zu den antibakteriellen Spülungen, die im Rahmen der Wurzelkanalbehandlung eingesetzt werden, gehören beispielsweise Natriumhypochlorit (NaOCl) und Chelatverbindungen wie Zitronensäure oder Wasserstoffperoxid (H₂O₂). Die Gabe von Antibiotika gehört nicht zur Standardbehandlung der Pulpitis, wird jedoch von einigen Zahnärzten zur Schmerzreduktion eingesetzt. George R. (2014) rät, unter anderem auf Grund der fragwürdigen Effektivität bei der Schmerzreduktion und des zunehmenden Potentials der Bakterien Antibiotika Resistenzen zu bilden, von dem Gebrauch ab. Gezeigt wurde, dass die an der Pulpitis beteiligten Bakterien die Fähigkeit besitzen, einen Biofilm zu kreieren. Der Biofilm erleichtert via horizontalem Gentransfer die Möglichkeit zur Resistenzbildung unter den Bakterien (Al-Ahmad A. et al. 2014). Deshalb sollte bei der Behandlung der Pulpitis der Einsatz von Antibiotika gut abgewägt werden.

Bei Antibiotikagabe sind die vermehrt auftretenden Resistenzen der Bakterien gegenüber den Antibiotika ein nicht unterschätzbares Risiko und sowohl die Suche nach Alternativen als auch ein reduzierter Einsatz ist aus diesem Grund dringend nötig. (Allen H.K., Trachsel J., Looft T., Casey T.A., 2014; Bronzwaer S.L.A.M., Cars O., Buchholz U., Mölsted S., Goettsch W., Veldhuijzen I.K., Kool J.L., Sprenger M.J.W., Degener J.E., 2002).

Wegen zunehmender Resistenzentwicklungen und aufgrund unerwünschter Nebenwirkungen, sowohl systemisch als auch lokal, wird deshalb ein vorsichtiger Umgang mit Antibiotikagabe bei Parodontitis empfohlen (Herrera D., Matesanz P., Bascones-Martinez A., Sanz M., 2012; Leszczynska A., Buczko P., Busczko W., Pietruska M., 2011). Die Indikation zur Gabe von Antibiotika sollte daher im Falle der Parodontitis streng gestellt werden und nur bei bestimmten Patienten erfolgen. Zu diesen gehören im allgemeinen Patienten mit schweren Verlaufsformen von Parodontitis wie der generalisierten oder lokalisierten aggressiven Parodontitis und der chronischen Parodontitis (Herrera D., Matesanz P., Bascones-Martinez A., Sanz M., 2012; Leszczynska A., Buczko P., Busczko W., Pietruska M., 2011). Der Einsatz von Antibiotika bei Periimplantitis ist ebenfalls häufig (Rams T. E., Degener J. E., van Winkelhoff A. J., 2014). Resistenzen der Bakterien, die

an Periimplantitis beteiligt sind, gegenüber den Dosen an Antibiotika die üblicherweise eingesetzt werden, konnten bereits in in-vitro Studien nachgewiesen werden. Dabei zeigten mehr als 70% der Spezies Resistenzen gegenüber Einzeldosen der üblichen Antibiotika wie Clindamycin, Amoxicillin, Metronidazol (Rams T. E., Degener J. E., van Winkelhoff A. J., 2014). Die Folge davon ist, dass die Antibiotika, die in der zahnärztlichen Praxis zum Einsatz kommen, keine Wirkung auf die Pathogene zeigen. Aus diesem Grund wird hier einerseits der Einsatz von Testungen empfohlen, um die Antibiotika genau auf die bakteriellen Erreger abstimmen zu können, da Kombinationen der Präparate weniger Resistenzen zeigen (Rams T. E., Degener J. E., van Winkelhoff A. J., 2014). Andererseits ist eine Alternative in Erwägung zu ziehen, um den Einsatz von Antibiotika umgehen zu können. Es wird angenommen, dass die allgemeine Zunahme an Antibiotika Resistenzentwicklungen mit dem erhöhten Gebrauch und Missbrauch von Antibiotika sowohl beim Menschen als auch bei Tieren und Pflanzen einher geht (Andersson D.I., Hughes D., 2011). Bronzwaer S.L.A.M. et al (2002) zeigten in ihrer europaweiten Studie, dass es eine Korrelation gibt zwischen Gebrauch von Antibiotika und Antibiotika Resistenzen.

Als Ersatz für klassische Antibiotika kommen Substanzen in Frage, deren Bestandteile Bakterien hemmen (Allen H.K., Trachsel J., Looft T., Casey T.A., 2014). Senföhlhaltige Pflanzenpräparate wie beispielsweise Angocin® *Anti-Infekt N*, welches seine bakterienhemmende Wirkung in diesem Projekt gezeigt hat, könnten deshalb eingesetzt werden, da sie die oben genannte Voraussetzung mitbringen. Vorteile hierbei sind vor allem das Fehlen von und dadurch auch das Verhindern des Entstehens weiterer Antibiotikaresistenzen. Antibiotikaresistenzentstehung, wie bereits beschrieben, wird durch einen zu starken oder ungeeigneten Einsatz von Antibiotika unterstützt und hervorgerufen (Bronzwaer S.L.A.M., Cars O., Buchholz U., Mölsted S., Goettsch W., Veldhuijzen I.K., Kool J.L., Sprenger M.J.W., Degener J.E., 2002). Außerdem greifen natürliche Antibiotika im Gegensatz zu klassischen Antibiotika die Darmbakterien nicht an, so dass die natürliche Darmflora nicht gestört wird (Repha GmbH, 2007). Die allgemein bessere Verträglichkeit von pflanzlichen Antibiotika und das geringere Auftreten von Nebenwirkungen

sprechen zudem für deren Einsatz (Goos K.H., Albrecht U., Schneider B., 2007).

Zur klinischen Nutzbarkeit, wie in Kapitel 1.1 erwähnt, schreibt Arlom (2010) bereits von dem gewinnbringenden Einsatz von Angocin® *Anti-Infekt N* in der Zahnmedizin. Dabei wird über die positive Beeinflussung von Heilungsverläufen nach Extraktionen, Osteotomien und Implantationen berichtet.

Ein Ausblick auf die Nutzung senföhlhaltiger pflanzlicher Präparate in der Zahnmedizin könnte also zum einen zur Beeinflussung von Heilungsverläufen eingesetzt werden und zum anderen im Rahmen der Therapie von Parodontitis und Periimplantitis angezeigt sein. Aufgrund der bakterienhemmenden Wirkung eignet es sich deren Einsatz therapiebegleitend zusätzlich zur mechanischen Reinigung durch den Zahnarzt als medikamentöse Unterstützung.

Klinische Studien über den Einsatz von senföhlhaltigen Pflanzenpräparaten als Alternative zur adjuvanten Antibiotikatherapie bei Parodontitis oder Periimplantitis stehen allerdings noch aus und wären wünschenswert zur Sicherung der Daten im klinischen Kontext.

Zuletzt lässt sich noch einmal hervorheben, dass Plaque assoziierte Erkrankungen, worunter die Parodontitis und die Periimplantitis fallen, relativ resistent gegenüber einer Therapie mit Antibiotika sind, solange der Biofilm nicht mechanisch zerstört wird (Mombelli A., De´caillet F., 2011). Diese Tatsache unterstreicht noch mal die Wichtigkeit der Behandlung durch den Zahnarzt, da die Gabe von antibakteriell wirkenden pflanzlichen Präparaten nur dann erfolgversprechend ist, wenn sie parallel und zusätzlich mit der Tätigkeit des Zahnarztes stattfindet.

3.5 Kritische Betrachtung der Methodik

Abschließend soll die Methodik, die im Rahmen dieses Projektes eingesetzt wurde, kritisch betrachtet werden. Sowohl die Durchführung der Testung mit dem Gastest und der Agardilution als auch die Erhebung der Ergebnisse unterliegen Schwankungen. So ist zum Beispiel der MBK Wert ein häufig

eingesetzter Wert, um Aussagen über die Bakterizidie von Bakterien treffen zu können, der jedoch trotz seiner häufigen Verwendung mit technischen Problemen einher geht. Mitunter ist die fehlende Standardisierung der Techniken zur Bestimmung des MBKs eine weitere Einschränkung (Pankey G.A., Sabath L.D., 2004). Außerdem fällt bei genauer Betrachtung der Ergebnisse auf, dass die Streubreite der Daten sehr groß ist, was für eine schlechte Reliabilität der Daten spricht.

3.6 Fazit

Auf Basis der Daten dieses Projektes wurde die mögliche klinische Nutzbarkeit senföhlhaltiger Pflanzenpräparate diskutiert. Da die Daten jedoch nur im Rahmen einer experimentellen Studie im Labor erhoben wurden, sollte vor allem die klinische Nutzbarkeit in patientenbezogenen Folgestudien getestet werden, um die Frage der Wirksamkeit senföhlhaltiger Pflanzenpräparate in vivo zu belegen.

Zusammenfassung

Senföhlhaltige Pflanzenpräparate, beispielsweise das Nativpräparat Angocin® *Anti-Infekt N*, welches aus getrocknetem Kapuzinerkressenkraut (KK) und Meerrettichwurzel (MW) besteht, wurde gegenüber klinisch wichtigen mundpathogenen Bakterien getestet. Methodisch wurde die Empfindlichkeit mittels zwei verschiedener Verfahren geprüft, dem Gastest zur Testung der Nativsubstanzen und der Agardilution zur Testung der synthetischen Senföle. Der Frage der Korrelation zwischen der antibakteriellen Aktivität der zwei durchgeführten Tests wurde ebenfalls nachgegangen, indem die Werte miteinander verglichen wurden. Der Bereich der antibakteriellen Aktivität bei den Nativsubstanzen lag zwischen 50mg KK /20mg MW und 200mg KK /80mg MW, was einer antibakteriellen Aktivität der synthetischen Senföle von 0,01-0,06 mg/ml entspricht. Die maximal getestete Konzentration lag bei 400mg KK beziehungsweise 160mg MW im Gastest und bei 0,67mg/ml der synthetischen Senföle in der Agardilution. Dabei wurde zudem auch der Frage nachgegangen, ob das Wachstum des Bakteriums nur gehemmt (bakteriostatische Wirkung) oder ob das Bakterium abgetötet wurde (bakterizide Wirkung). Die Ergebnisse der Versuche bestätigen, dass exklusiv eines Bakterienstammes (*Veillonella parvula*) bei allen anderen mundpathogenen Bakterien eine Hemmung des Wachstums stattfand. Der Wert, bei dem für die meisten Bakterien eine Hemmung sichtbar war, lag bei 100mg KK und 40mg MW im Gastest und bei 0,02mg/ml Senföle in der Agardilution. Schlussfolgernd kann gesagt werden, dass senföhlhaltige Pflanzenpräparate wie beispielsweise Angocin® *Anti-Infekt N* auf mundpathogene Keime eine bakteriostatische Wirkung zeigen. Die Ergebnisse befürworten den Einsatz senföhlhaltiger Pflanzenpräparate innerhalb der Zahnmedizin. Somit kann man senföhlhaltige Pflanzenpräparate nutzen, um sie begleitend bei der Behandlung einer Parodontitis und Periimplantitis einzusetzen und dort eine Hemmung der pathogenen Keime zu bewirken.

Die Daten aus der vorliegenden Forschungsarbeit wurden auf der ICAAC, welche vom 17.-21.09.2015 in San Diego stattfand, vorgestellt. Das zugehörige Poster befindet sich im Anhang.

Anhang

Abbildung 32: Kenndaten der Bakterien mit Laufnummer und Stammsammlungsnummer

Spezies	Laufnummer	Stammsammlungsnummer
<i>Campylobacter concisus</i>	49	9297
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	54	
<i>Prevotella intermedia</i> (<i>Prevotella nigrescens</i>)	75	FB77/26-2
<i>Campylobacter rectus</i>	107	B65/15-4b
<i>Parvimonas micra</i> (<i>Pepotstreptococcus micros</i>)	111	10282
<i>Prevotella baroniae</i>	113	43707
<i>Fusobacterium naviforme</i>	115	260102
<i>Veillonella parvula</i>	117	FB76/13-11
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	121	260102
<i>Clostridium perfringens</i> (Referenzstamm)	124	ATCC 13124
<i>Cardiobacterium hominis</i>	125	DSMZ 8339
<i>Eikenella corrodens</i> , ohne Hof	177	
<i>Eikenella corrodens</i> , kleine Kolonien	178	B25/16-2b
<i>Haemophilus aphrophilus</i>	184	FR39/17-7
<i>Kingella kingae</i>	224	DSMZ 7536

Abbildung 33: Daten aus Gastest für *Campylobacter concisus*

		Konz. 1	Konz. 2	Konz. 3	Konz. 4	Konz. 5	Konz. 6
Experiment 1	nach 48 Stunden	240	189	182	90	0	0
	nach 72 Stunden	252	190	208	228	189	140
Experiment 2	nach 48 Stunden	302	294	256	120	0	0
	nach 72 Stunden	360	350	284	254	250	216
Experiment 3	nach 48 Stunden	342	558	584	440	135	0
	nach 72 Stunden	352	558	568	480	307	228

Anzahl der KBE je Experiment, gezählt nach 48 und 72 Stunden

Abbildung 34: Daten aus Gastest für *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

		Konz. 1	Konz. 2	Konz. 3	Konz. 4	Konz. 5	Konz. 6
Experiment 1	nach 48 Stunden		712	3	2	0	0
	nach 72 Stunden		760	4	4	0	0
Experiment 2	nach 48 Stunden	640	185	300	0	0	0
	nach 72 Stunden	676	244	360	0	0	0
Experiment 3	nach 48 Stunden	812	700	862	526	0	0
	nach 72 Stunden	880	746	984	552	0	0

Anzahl der KBE je Experiment, gezählt nach 48 und 72 Stunden

Abbildung 35: Daten aus Gastest für *Prevotella intermedia*

		Konz. 1	Konz. 2	Konz. 3	Konz. 4	Konz. 5	Konz. 6
Experiment 1	nach 48 Stunden	78	5	0	0	0	0
	nach 72 Stunden	107	8	0	0	0	0
Experiment 2	nach 48 Stunden	134	100	50	0	0	0
	nach 72 Stunden	197	170	124	44	0	0
Experiment 3	nach 48 Stunden	380	348	90	0	0	0
	nach 72 Stunden	390	374	132	0	0	0

Anzahl der KBE je Experiment, gezählt nach 48 und 72 Stunden

Abbildung 36: Daten aus Gastest für *Campylobacter rectus*

		Konz. 1	Konz. 2	Konz. 3	Konz. 4	Konz. 5	Konz. 6
Experiment 1	nach 48 Stunden	280	328	188	0	0	0
	nach 72 Stunden	648	584	206	0	0	0
Experiment 2	nach 48 Stunden	198	104	202	0	0	0
	nach 72 Stunden	230	105	218	0	0	0
Experiment 3	nach 48 Stunden	656	684	188	0	0	0
	nach 72 Stunden	720	692	232	0	0	0

Anzahl der KBE je Experiment, gezählt nach 48 und 72 Stunden

Abbildung 37: Daten aus Gastest für *Parvimonas micra*

		Konz. 1	Konz. 2	Konz. 3	Konz. 4	Konz. 5	Konz. 6
Experiment 1	nach 48 Stunden	760	300	0	0	0	0
	nach 72 Stunden	1084	514	4	0	0	0
Experiment 2	nach 48 Stunden	1440	1376	426	0	0	0
	nach 72 Stunden	1528	1480	644	0	0	0
Experiment 3	nach 48 Stunden	1616	1104	444	0	0	0
	nach 72 Stunden	1680	1160	808	0	0	0

Anzahl der KBE je Experiment, gezählt nach 48 und 72 Stunden

Abbildung 38: Daten aus Gastest für *Prevotella baroniae*

		Konz. 1	Konz. 2	Konz. 3	Konz. 4	Konz. 5	Konz. 6
Experiment 1	nach 48 Stunden	1212	892	696	2	0	0
	nach 72 Stunden	1320	900	696	9	0	0
Experiment 2	nach 48 Stunden	101	70	0	0	0	0
	nach 72 Stunden	274	70	0	0	0	0
Experiment 3	nach 48 Stunden	1008	792	0	0	0	0
	nach 72 Stunden	1432	1560	0	0	0	0

Anzahl der KBE je Experiment, gezählt nach 48 und 72 Stunden

Abbildung 39: Daten aus Gastest für *Fusobacterium naviforme*

		Konz. 1	Konz. 2	Konz. 3	Konz. 4	Konz. 5	Konz. 6
Experiment 1	nach 48 Stunden	6	5	2	0	0	0
	nach 72 Stunden	6	6	3	0	0	0
	nach 92 Stunden	24	32	28	9	7	2

Anzahl der KBE, gezählt nach 48, 72 und 92 Stunden

Abbildung 40: Daten aus Gastest für *Veillonella parvula*

		Konz. 1	Konz. 2	Konz. 3	Konz. 4	Konz. 5	Konz. 6
Experiment 1	nach 48 Stunden	1720	1744	1688	1616	1600	1600
	nach 72 Stunden	1752	2048	1688	1760	1968	1760
Experiment 2	nach 48 Stunden	1288	1840	1800	1776	47	1504

Experiment 3	nach 72 Stunden	1296	2232	2000	2368	1920	1520
	nach 48 Stunden	3280	2856	2232	3216	2888	0
	nach 72 Stunden		2960	3040	3360	2968	2288

Anzahl der KBE je Experiment, gezählt nach 48 und 72 Stunden

Abbildung 41: Daten aus Gastest für *Porphyromonas gingivalis*

		Konz. 1	Konz. 2	Konz. 3	Konz. 4	Konz. 5	Konz. 6
Experiment 1	nach 48 Stunden	640	724	2	1	0	0
	nach 72 Stunden	720	796	2	1	0	0
Experiment 2	nach 48 Stunden	424	328	4	0	0	0
	nach 72 Stunden	578	328	11	0	0	0
Experiment 3	nach 48 Stunden	76	74	27	0	0	0
	nach 72 Stunden	167	148	27	0	0	0

Anzahl der KBE je Experiment, gezählt nach 48 und 72 Stunden

Abbildung 42: Daten aus Gastest für *Clostridium perfringens*

		Konz. 1	Konz. 2	Konz. 3	Konz. 4	Konz. 5	Konz. 6
Experiment 1	nach 48 Stunden	75	72	35	1	0	0
	nach 72 Stunden	82	73	35	1	0	0
Experiment 2	nach 48 Stunden	209	169	111	4	0	0
	nach 72 Stunden	212	173	111	4	0	0
Experiment 3	nach 48 Stunden	95	56	42	11	0	0

	nach 72 Stunden	95	56	44	11	0	0
--	--------------------	----	----	----	----	---	---

Anzahl der KBE je Experiment, gezählt nach 48 und 72 Stunden

Abbildung 43: Daten aus Gastest für *Cardiobacterium hominis*

		Konz. 1	Konz. 2	Konz. 3	Konz. 4	Konz. 5	Konz. 6
Experiment 1	nach 48 Stunden	520	444	304	0	0	0
	nach 72 Stunden	580	560	544	40	48	1
Experiment 2	nach 48 Stunden	764	688	484	0	0	0
	nach 72 Stunden	824	796	752	308	0	45
Experiment 3	nach 48 Stunden	1372	916	0	0	0	0
	nach 72 Stunden	1400	1144	1112	448	234	0

Anzahl der KBE je Experiment, gezählt nach 48 und 72 Stunden

Abbildung 44: Daten aus Gastest für *Eikenella corrodens*, 177

		Konz. 1	Konz. 2	Konz. 3	Konz. 4	Konz. 5	Konz. 6
Experiment 1	nach 48 Stunden	564	544	538	13	0	0
	nach 72 Stunden	564	568	538	23	0	0
Experiment 2	nach 48 Stunden	78	42	10	7	0	0
	nach 72 Stunden	80	42	13	7	0	0
Experiment 3	nach 48 Stunden	840	640	580	400	0	0
	nach 72 Stunden	840	648	604	452	87	0

Anzahl der KBE je Experiment, gezählt nach 48 und 72 Stunden

Abbildung 45: Daten aus Gastest für Eikenella corrodens, 178

		Konz. 1	Konz. 2	Konz. 3	Konz. 4	Konz. 5	Konz. 6
Experiment 1	nach 48 Stunden	11	9	3	0	0	0
	nach 72 Stunden	11	9	6	3	0	0
Experiment 2	nach 48 Stunden	660	448	95	16	0	0
	nach 72 Stunden	740	530	109	20	0	0
Experiment 3	nach 48 Stunden	200	172	38	0	1	0
	nach 72 Stunden	266	124	35	1	1	0

Anzahl der KBE je Experiment, gezählt nach 48 und 72 Stunden

Abbildung 46: Daten aus Gastest für Haemophilus aphrophilus

		Konz. 1	Konz. 2	Konz. 3	Konz. 4	Konz. 5	Konz. 6
Experiment 1	nach 48 Stunden	920	456	102	11	0	0
	nach 72 Stunden	1332	1100	782	31	0	0
Experiment 2	nach 48 Stunden	21	18	4	0	0	0
	nach 72 Stunden	22	24	5	0	0	0
Experiment 3	nach 48 Stunden	940	760	400	55	0	0
	nach 72 Stunden	1000	1152	480	82	0	0

Anzahl der KBE je Experiment, gezählt nach 48 und 72 Stunden

Abbildung 47: Daten aus Gastest für *Kingella kingae*

		Konz. 1	Konz. 2	Konz. 3	Konz. 4	Konz. 5	Konz. 6
Experiment 1	nach 48 Stunden	85	38	8	0	0	0
	nach 72 Stunden	86	38	8	0	0	0
Experiment 2	nach 48 Stunden	148	118	12	0	0	0
	nach 72 Stunden	155	118	12	0	0	0
Experiment 3	nach 48 Stunden	640	608	144	0	0	0
	nach 72 Stunden	704	608	156	0	0	0

Anzahl der KBE je Experiment, gezählt nach 48 und 72 Stunden

Abbildung 48: MHK und MBK Daten aus Agardilution

Datum	19.2.			19.2.		19.2.			20.2.		20.2.		6.6.	
Versuch	5			6		7			8		9		10	
Auswertungstag	21.2.	22.2.	nach 48h	21.2.	22.2.	21.2.	22.2.	nach 48h	22.2.	25.2.	22.2.	25.2.	9.6.	nach 48h
Bakterium	MHK	MHK	MBK	MHK	MHK	MHK	MHK	MBK	MHK	MHK	MHK	MHK	MHK	MBK
Campylobacter concisus	6	4	4	4	3				7	5				
Aggregatibacter actinomycetemcomitans	6	4	4	6	5				n.k.W.	5				
Prevotella intermedia (Prevotella nigrescens)	6	6	6	4	4				n.k.W.	5				
Campylobacter rectus	6	6	6	4	5				n.k.W.	6			6	5
Parvimonas micra (Peptostreptococcus micros)	6	6	6	4	4				6	5			4	1
Prevotella baroniae	6	6	6	4	4				n.k.W.	5			1	1
Fusobacterium naviforme	6	6	6	4	3				n.k.W.	4				2
Veillonella parvula	1	1	1	1	1				1	1			0	0
Porphyromonas gingivalis	7	7	gewachs	7	5				n.k.W.	5			8	8
Clostridium perfringens (Referenzstamm)	6	6	6	3	1				7	2			1	1
Cardiobacterium hominis	6	6	gewachs	n.k.W	6	7	6	gewach	9	9	7	4	5	1
Eikenella corrodens, ohne Hof	5	5	5	3	2	5	5	5	5	5	4	4	1	0
Eikenella corrodens, kleine Kolonien	5	4	4	3	3	5	5	5	5	4	4	4	3	0
Haemophilus aphrophilus	6	6	6	4	4	7	5	gewachs	7	6	7	7	2	1
Kingella kingae	6	6	6	5	5	7	7	7	7	6	8	4	4	3

Sowohl die MHK als auch die MBK Daten wurden nach 48h erhoben. Übersichtstabelle aller durchgeführten Versuche; n.k.W.= noch kein Wachstum

Abbildung 49: Poster ICAAC, 17. - 21.09.2015 San Diego



Herbal Isothiocyanates (ITC) Unfold High Antimicrobial Activity Against Bacterial Pathogens of the Oral Cavity

Key words: Isothiocyanates, Oral Microorganisms, Antimicrobial Activity

Klaus Biehler¹, Anne Schüller¹, Uwe Frank^{1,2}

¹Freiburg University Hospital, Institute for Environmental Health Sciences, Freiburg, Germany

²Heidelberg University Hospital, Centre of Infectious Diseases, Heidelberg, Germany

Background:

Isothiocyanates (ITC) extracted from herbage such as nasturtium (*Tropaeoli majoris herba*, Figure 1a) and horseradish (*Armoracia rusticanae radix*, Figure 1b) have been reported to exert antimicrobial activity.

Objective:

To determine the in-vitro antimicrobial activities of a combination of herbal benzyl-, and phenylethyl-, allyl-ITCs against a variety of bacterial pathogens of the oral cavity.



Figure 1a: Nasturtium (*Tropaeolum majus*) Benzyl-ITC



Figure 1b: Horseradish (*Armoracia rusticana*) Allyl-ITC; 2-Phenylethyl-ITC

Material and Methods:

A variety of anaerobic and facultative-anaerobic microorganisms were tested (Table 1). Susceptibility testing was performed by agar-dilution technique for synthetic ITC (according to CLSI standards) and a gas test system for plant powders (Figure 2). Synthetic ITCs Benzyl-, Allyl- and 2-Phenylallyl-ITC were mixed according to proportions as marketed in a licensed preparation of a herbal drug containing a combination of dried and grinded nasturtium and horseradish (REPHA GmbH, Germany).



Figure 2: Testing antimicrobial efficacy of plant-derived ITC

Results:

Synthetic ITC: Minimal inhibitory concentrations (MICs) ranged from < 0.00012% ITC to 0.125% ITC. *Haemophilus aphrophilus* was the most susceptible strain with an MIC of 0.04% ITC. The highest MIC was measured for *Veillonella parvula* with 0.125% ITC.

Plant powders: Result confirm the hypothesis that biological ITC from nasturtium and horseradish have potent inhibitory properties.

Conclusion:

ITC derived from common herbage, i.e. nasturtium and horseradish, demonstrate impressive antimicrobial activity against pathogens of the oral cavity.

Bacterienspecies	Synthetic ITC		Plant powders	
	MIC ITC %	MBC ITC %	MIC mg	Inhibition of growth
<i>Campylobacter concisus</i>	0.008	0.008	200/80	25/10
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	0.004	0.063	200/80	50/20
<i>Fusobacterium naviforme</i>	0.016	0.031	50/20	-
<i>Prevotella intermedia</i>	0.016	0.016	100/40	12.5/5
(<i>Prevotella nigrescens</i>)				
<i>Campylobacter rectus</i>	0.008	0.008	100/40	12.5/5
<i>Parvimonas micra</i>	0.008	0.008	100/40	25/10
<i>Prevotella baroniae</i>	0.008	0.125	50/20	50/20
<i>Tanarella forsythia</i>	0.000125	0.0005	50/20	25/10
<i>Veillonella parvula</i>	≥0.125	≥0.125	<400/160	25/10
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	<0.000125	0.001	-	-
<i>Cardiobacterium hominis</i>	0.008	0.016	200/80	-
<i>Eikenella corrodens</i>	0.016	0.031	200/80	25/10
<i>Eikenella corrodens</i> (small colonies)	0.004	0.008	200/80	25/10
<i>Haemophilus aphrophilus</i>	0.004	0.008	200/80	12.5/5
<i>Kingella kingae</i>	0.001	0.008	200/80	-
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	0.004	0.031	100/40	12.5/5
<i>Clostridium perfringens</i>	0.008	0.063	200/80	12.5/5

Table 1: Minimal Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of a synthetic ITC mixture and MICs for plant powders.

Literaturverzeichnis

1

Groos K.H., Albrecht U., Schneider B. (2006) Wirksamkeit und Verträglichkeit eines pflanzlichen Arzneimittels mit Kapuzinerkressenkraut und Meerrettich bei akuter Sinusitis, akuter Bronchitis und akuter Blasenentzündung im Vergleich zu anderen Therapie unter den Bedingungen der täglichen Praxis. *Arzneimittelforschung* 56 (3): 249-257

2

Groos KH., Albrecht U., Schneider B. (2007) Aktuelle Untersuchungen zur Wirksamkeit und Verträglichkeit eines pflanzlichen Arzneimittels mit Kapuzinerkressenkraut und Meerrettich bei akuter Sinusitis, akuter Bronchitis und akuter Blasenentzündung bei Kindern im Vergleich zu anderen Antibiotika. *Arzneimittelforschung* 57 (4): 238-246

3

Conrad A., Biehler D., Nobis T., Richter H., Engels I., Biehler K., Frank U. (2013) Broad Spectrum Antibacterial Activity of a Mixture of Isothiocyanates from Nasturtium (*Tropaeoli majoris herba*) und Horseradish (*Armoraciae rusticanae radix*). *Drug Research* 63: 1-4

5

Conrad A., Kohlberg T., Engels I., Frank U. (2006) In-vitro-Untersuchungen zur antibakteriellen Wirksamkeit einer Kombination aus Kapuzinerkressenkraut (*Tropaeoli majoris herba*) und Meerrettichwurzel (*Armoraciae rusticanae radix*). *Arzneimittelforschung* 56 (12): 842-849.

6

Halbeisen T.H. (1954) Untersuchungen über die antibiotischen Wirkstoffe von *Tropaeolum maius* (Kapuzinerkresse). *Die Naturwissenschaften* 16: 378-379

7

Lamy E., Scholtes C., Herz C., Mersch-Sundermann. (2011) Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of isothiocyanates. *Drug Metabolism Reviews* 1-21

8

Burkhardt F. (1992) Mikrobiologische Diagnostik. 2. Aufl. Thieme, Stuttgart, New York.

9

Lamont R.J., Jenkinson H.F. (2010) Oral Microbiology at a Glance. 1. Aufl. Wiley-Blackwell, New York.

10

Arlom C. (2010) Angocin Anti-Infekt N Phytopharmakologische Antibiose nach zahnärztlich-chirurgischen Eingriffen. *GZM Praxis und Wissenschaft* 15: 50-51

11

Winter A.G. (1954) Untersuchungen über Antibiotika aus höheren Pflanzen. X Mitteilung: Untersuchungen über die Natur der flüchtigen antibiotischen Wirkstoffe aus *Tropaeolum maius*. *Naturwissenschaften* 14: 337-338

12

Winter A.G., Willeke L. (1952) Untersuchungen über Antibiotika aus höheren Pflanzen: VI. Mitteilung: Gasförmige Hemmstoffe aus *Tropaeolum maius* und ihr Verhalten im menschlichen Körper bei Aufnahme von *Tropaeolum*-Salat per os. *Naturwissenschaften* 39: 236-237

13

Hellwig E., Klimek J., Attin T. (2009) Einführung in die Zahnerhaltung. 5. Aufl. Deutscher Zahnärzterverlag, Köln

14

Herrera D., Matesanz P., Bascones-Martínez A., Sanz M. (2012) Local and Systematic antimicrobial Therapy in Periodontics. *Journal of Evidence Based Dental Practice* 12: 50-60

15

Leszczynska A., Buczko P., Busczko W., Pietruska M. (2011) Periodontal pharmacotherapy – an updated review. *Advances in Medical Sciences* 12: 123-131

16

Mishler O.P., Shiao H.J. (2014) Management of Peri-Implant Disease: a current appraisal. *J Evid Base Dent Pract* 14: 53-59

17

Mombelli A., De´caillot F. (2011) The characteristics of biofilms in peri-implant disease. *J Clin Periodontol* 38: 203–213

18

Drisko C.L. (2014) Periodontal Debridement: Still the treatment of choice. *Journal of Evidence Based Dental Practice* 14: 33–41

19

Lindhe J., Meyle J., on behalf of Group D of the European Workshop on Periodontology. (2008) Peri-implant diseases: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol* 35:282-5

20

Romanos G.E., Weitz D. (2012) Therapy of Peri-Implant Diseases. Where is the evidence? *J Evid Base Dent Pract* 12: 204-208

21

Algraft H., Borumandi F., Cascarini L. (2012). Review Peri-Implantitis. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 50: 689–694

22

Rams T. E., Degener J. E., van Winkelhoff A. J. (2014). Antibiotic resistance in human peri-implantitis microbiota. *Clin. Oral Impl. Res* 25: 82–90

23

George R. (2014). Insufficient evidence to assess the effectiveness of antibiotics for irreversible pulpitis. *Evid Based Dent* 15:10-1

24

Al-Ahmad A., Ameen H., Pelz K., Karygianni L., Wittmer A., Anderson A. C., Spitzmüller B., Hellwig E. (2014) Antibiotic Resistance and Capacity for Biofilm Formation of Different Bacteria Isolated from Endodontic Infections Associated with Root-filled Teeth JOE 40: 223-230

25

Pankey G.A., Sabath L.D. (2004) Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of Gram-positive bacterial infections. Clin Infect Dis 38: 864–7

26

Heizmann P., Heizmann W. R. (2007) Bakteriostase – Bakterizidie. Medizinische Klinik 102: 720-726

27

Allen H.K., Trachsel J., Looft T., Casey T.A. (2014) Finding alternatives to antibiotics. Annals of the new york academy of sciences 1-10

28

Andersson D.I., Hughes, D. (2011) Persistence of antibiotic resistance in bacterial populations. FEMS Microbiol. Rev. 35: 901–911

29

Repha GmbH, biologische Arzneimittel. (2007) Pflanzliche Antibiotika – die sanfte Heilung aus der Natur 2-11

30

Kienholz M. (1960) Die antibakterielle Wirkung ätherischer Öle aus Meerrettichwurzel. Arzneimittel – Forschung (Drug Research) 10: 917

31

Bronzwaer S.L.A.M., Cars O., Buchholz U., Mölsted S., Goettsch W., Veldhuijzen I.K., Kool J.L., Sprenger M.J.W., Degener J.E. and participants in the European Antimicrobial Resistance Surveillance System. (2002) The Relationship between Antimicrobial Use and Antimicrobial Resistance in Europe. Emerging Infectious Disease Vol 8. No 3: 278-282

Danksagung

Erster Dank gilt dem Institut für Umweltmedizin und Krankenhaushygiene Freiburg, das ihr Labor zur Verfügung stellte, so dass ich die Möglichkeit hatte, deren Räume und Materialien für das Forschungsprojekt zu nutzen. Außerdem möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene Freiburg für ihre Hilfe bedanken.

Ein ganz großer Dank geht an meinen Doktorvater Professor Dr. med. Uwe Frank für seine immer währende Unterstützung in fachlichen Fragen, für die Finkenwerder Scholle und Latte Macchiatos mit Hazelnut Flavour. Du bist der beste Doktorvater, den man sich wünschen kann. Ich hoffe, dass wir uns auch nach dieser Zeit noch mal treffen werden.

Vielen Dank an Dr. Klaus Biehler für all die Hilfe und Unterstützung, besonders, was die Arbeit und Forschung im Labor angeht. Danke, dass ich dich immer wieder fragen durfte und du immer freundlich und hilfsbereit alles geduldig beantwortet hast. Auch an Inge Engels geht mein Dank, die mit ihren klugen Ratschlägen und viel Hilfe zur Seite stand.

Abschließend danke ich meiner kleinen Schwester für Hilfe in Computer- und Formatierfragen sowie meinen Eltern für Beistand und Motivation, und natürlich G. für seine Unterstützung in jeglicher Form.

Erklärung der Eigenständigkeit

Hiermit erkläre ich, dass ich die Arbeit selbstständig angefertigt habe und keine anderen Hilfsmittel als die im Quellen- und Literaturverzeichnis sowie die im Anmerkungsapparat genannten, verwendet habe. Alle Stellen, an denen Wortlaut oder Sinn anderen Werken entnommen wurden, sind unter Angabe der Quellen als Entlehnung kenntlich gemacht.

Schüller, Anne

Name, Vorname

Freiburg,

Ort, Datum, Unterschrift