

Negin Kavian-Jahromi

Mikrobiologische Untersuchungen zur antimikrobiellen Wirkung von Lärchenholz mit Fokus auf den Einsatz in hygienisch sensiblen Bereichen

107 - Translationale Gesundheitsforschung – Brücken bauen von
Grundlagenwissenschaft zu angewandter Forschung

Abstract

Bezüglich der antimikrobiellen Wirkung von Holz, insbesondere Lärchenholz, gibt es stark divergierende Meinungen. Diese stark variierenden Ergebnisse sind vor allem auf die großen Unterschiede in den Versuchsbedingungen und experimentellen Abläufen in den bis dato durchgeführten Studien zurückzuführen. Bei der Durchführung der Experimente mit Lärchenholz wurden selbst unter standardisierten Versuchsbedingungen starke Schwankungen in der keimreduzierenden Wirkung zwischen den einzelnen Baumindividuen, den Standorten und den Lärchenspezies festgestellt.

Im Rahmen dieser Studie wurde versucht, die antimikrobielle Wirkung von Lärchenholz mit Hilfe von mikrobiologischen Methoden festzustellen. Als Testkeime wurden *K. pneumoniae* und MRSA herangezogen. Als Untersuchungsmaterial wurden sowohl Späne als auch Würfel von Lärchenkern- und -splintholz herangezogen. Die Messzeitpunkte wurden auf 0, 3 und 24 Stunden nach der Inokulation festgelegt.

Keywords:

Antimikrobielle Wirkung von Lärchenholz
Lärchenkernholz und Lärchensplintholz
Holzwürfel und Holzspäne

1. Einleitung

Seit den 1970er Jahren wurden zahlreiche Studien zur Beurteilung der hygienischen Eigenschaften von Holz durchgeführt (Gilbert / Watson 1971, Schulz 1995). Mit der Einführung von Schneideunterlagen aus Kunststoff in der fleischverarbeitenden Industrie wurde zunehmend Kritik in Bezug auf die Verwendung von Schneideunterlagen aus Holz geäußert. Studien, welche die hygienischen Eigenschaften von Schneidebrettern aus Kunststoff mit jenen aus Holz verglichen, kamen stets zu dem Ergebnis, dass Holz schlechtere hygienische Eigenschaften aufweist als Kunststoffe. Die AutorInnen einer Studie, welche sich mit der Vermeidung von Kreuzkontaminationen in der Küche befasste, konnten diese Ergebnisse jedoch erstmals widerlegen (Ak et al. 1994, Gilbert /

Watson 1971). Aufgrund der divergierenden Ergebnisse bezüglich des Hygienestatus von Holz äußerte Schulz kritisch, dass es in den bis dato durchgeführten Studien große Divergenzen in den Versuchsbedingungen sowie experimentellen Herangehensweisen gab. Weiters merkte er kritisch an, dass wichtige Holzeigenschaften, wie z.B. die Schnittrichtung oder der Feuchtigkeitsgehalt von Holz, in den bis zu diesem Zeitpunkt durchgeführten Studien kaum oder gar nicht beachtet wurden, diese jedoch, nach Schulz Meinung, eine wichtige Rolle spielen, um die hygienischen Eigenschaften von Holz objektiv beurteilen zu können (Schulz 1995). Ebenso merkt Carpentier kritisch an, dass diese Unterschiede bei der Interpretation der Ergebnisse beachtet werden müssen (Carpentier 1997).

Aufgrund der divergierenden Ergebnisse bezüglich des Hygienestatus von Holz und der kritischen Äußerungen von Schulz und Carpentier planten Milling et al. ihre Studien systematischer und bezogen wichtige Holzeigenschaften wie z.B. Holzart, Schnittrichtung oder Feuchtigkeitsgehalt des Holzes mit ein und kamen zu dem Ergebnis, dass die antimikrobielle Wirkung von Holz durch ein Zusammenwirken von physikalischen und chemischen Eigenschaften zustande kommt. Weiters stellten sie fest, dass die antimikrobielle Wirkung von Holz nicht generalisiert betrachtet werden kann, sondern von zahlreichen Faktoren, aber vor allem von der Holzart, abhängig ist (Milling et al. 2005, Schönwalder 1999, Schönwalder et al. 2000, Schönwalder et al. 2002).

Vor allem bezüglich der antimikrobiellen Wirkung von Lärchenholz gibt es stark divergierende Meinungen, da festgestellt wurde, dass die keimreduzierende Wirkung zwischen den Lärchenspezies bzw. den einzelnen Baumindividuen schwankt und vom Standort sowie dem verwendeten Bakterienstamm abhängig ist. Außerdem weisen Kern- und Splintholz unterschiedliche Konzentrationen an sekundären Pflanzeninhaltsstoffen auf, sogar zwischen innerem und äußerem Lärchenkernholz konnten unterschiedliche Konzentrationen an sekundären Pflanzeninhaltsstoffen nachgewiesen werden (Koch et al. 2007, Milling 2005, Milling et al. 2005, Windeisen / Wegener 2002).

Die Verwendung von Holz als Bau- und Werkstoff in hygienisch sensiblen Bereichen wie z.B. Krankenhäusern würde zahlreiche Vorteile mit sich bringen. Strehlein et al. sehen den Vorteil in der Verwendung von Holz z.B. darin, dass Desinfektionsmittel eingespart werden könnten (Strehlein et al. 2004). Schuster et al. argumentieren auch, dass durch ein Umfeld, in dem sich PatientInnen wohl und behaglich fühlen, der Genesungsprozess durchaus gefördert werden kann im Vergleich zu einer Umgebung, die fremd und abweisend wirkt (Schuster et al. 2006).

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Holzproben

Die für die empirischen Versuche verwendeten Holzproben stammen von der europäischen Lärche (*Larix decidua*), welche zur Familie der Kieferngewächse (*Pinaceae*) zählt. Das Testmaterial stammt

vom selben Baumindividuum, wobei das Alter des Holzes zwischen 100-130 Jahren liegt. Nach Durchführung der klassischen Holz Trocknung wurden die Holzproben bei Raumtemperatur von $23,95^{\circ}\text{C} \pm 3,35^{\circ}\text{C}$ und einem Feuchtigkeitsgehalt von $46,80\% \pm 20,40\%$ gelagert. Das Probenmaterial wurde weder mit Reinigungsmitteln noch mit Alkoholen vorbehandelt, da diese einen Einfluss auf die antimikrobielle Wirkung des Holzes haben könnten.

2.1.1.1. Holzspäne

Es wurden Lärchenspäne sowohl vom Kern- als auch vom Splintholz als Testmaterial herangezogen. Für alle Testansätze mit Lärchenkern- und Splintholz wurde eine Ausgangsmenge von 0,1g Spänen verwendet.

2.1.1.2. Holzwürfel

Die Holzwürfel liegen als Querschnitt vor, haben eine Seitenlänge von 1cm, eine Dicke von 0,5cm und ein Durchschnittsgewicht von 0,27g.

2.1.2. Standardisierte Keimsuspension

Um eine möglichst valide Aussage bezüglich einer potentiellen Keimzahlveränderung in Wechselwirkung mit dem Holz machen zu können, wurde für die mikro- und molekularbiologischen Untersuchungen eine standardisierte Keimsuspension (Microbiologics® - EPOWER™) von Klebsiella pneumoniae (*K. pneumoniae*) und Methicillin-resistenter Staphylococcus aureus (MRSA) verwendet.

Als Verdünnungsmenge wurden 10ml Phosphat Buffered saline (PBS) verwendet, um eine Suspension mit einer Keimzahl von 10^6 koloniebildende Einheit (KBE)/ml zu erhalten. Damit eine mögliche Keimzahlveränderung der Suspension verhindert werden kann, wurde die Suspension innerhalb von 30min zur Inokulation der Holzproben eingesetzt.

2.2. Methoden

2.2.1. Inokulation der Holzproben

Für Testansätze, bei denen mit Holzspänen gearbeitet wurde, wurden 0,1g Sägespäne mit 200µl der standardisierten Keimsuspension inokuliert. Bei Durchführung der Experimente mit Holzwürfeln wurde das Gewicht des Würfels ermittelt und die Inokulationsmenge so gewählt, dass jeweils 0,1g der Holzprobe mit 200µl Keimsuspension versehen wurde. Die Messzeitpunkte wurden auf 0 Stunden, direkt nach der Inokulation mit der Keimsuspension, 3 Stunden und 24 Stunden nach dem Auftragen der Keimsuspension festgelegt. Die Inkubation der Proben erfolgte bei Raumtemperatur. Die Testgefäße wurden während der Inkubationszeit abgedeckt, um eine Kontamination mit Fremdkeimen zu vermeiden.

2.2.2. Keimzahlbestimmung aus flüssigem Medium

Nach Ablauf der Inkubationsintervalle wurde das Reagenzglas, in welchem sich die Holzspäne befanden, mit 3ml PBS aufgefüllt und 10s stark gemischt, um möglichst viele Keime vom Holz abzulösen und in die Flüssigkeit freizugeben. 20µl dieser Flüssigkeit wurden entnommen und auf eine Mikrotiterplatte übertragen, um eine Verdünnungsreihe mit PBS herstellen zu können. Von jeder Verdünnungsstufe wurden 3gtt von jeweils 10µl auf einen Müller-Hinton-Agar pipettiert. Nach Kultivierung der Platten bei 37°C für 24 Stunden erfolgte das Auszählen der Kolonien pro Tropfen und die Berechnung des arithmetischen Mittelwertes jener Verdünnungsstufe, auf der noch Wachstum vorhanden war.

2.2.3. Mikrobiologischer Abklatsch

Nach Inokulation der Holzwürfel mit der jeweiligen Keimsuspension wurden diese zu den drei Messzeitpunkten auf Universalmedien (Columbia-Blutagar) abgeklatscht und 24 Stunden im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte das Auszählen der gewachsenen Kolonien auf den Platten.

3. Ergebnisse

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe des Programms IBM SPSS Statistics Version 21. Für die Messungen der empirischen Daten wurde ein Stichprobenumfang von n=15 festgelegt.

3.1. Holzspäne

Zum ersten Messzeitpunkt konnte bei beiden Keimen eine höhere Keimdichte auf Kernholz als auf Splintholz festgestellt werden. Auf den Kernholzspänen, welche mit *K. pneumoniae* inokuliert worden waren, konnten maximal 1×10^4 KBE/ml pro 0,1g Holz nachgewiesen werden, während die Splintholzspäne zum Zeitpunkt 0 Stunden maximal 1×10^3 KBE/ml pro 0,1g Holz zeigten. Die MRSA Kernholzspäne wiesen maximal 5×10^3 KBE/ml pro 0,1g Späne auf. Auf den Splintholzspänen konnten maximal 1×10^3 KBE/ml pro 0,1g Holz nachgewiesen werden. Die Referenzproben (Bakteriensuspension ohne Holzkontakt) zeigten höhere KBE als die Proben.

Zum dritten Messzeitpunkt wies die *K. pneumoniae* eine geringe Reduktion auf Kern- und Splintholz auf. Eine deutliche Reduktion der Keimzahl auf Kern- (maximale KBE/ml von 4×10^3) und Splintholz war beim MRSA feststellbar. Die Gegenüberstellung der Proben und Referenzen zeigten erneut geringere KBE/ml auf den Holzproben.

Die 24 Stunden Messzeitpunkte wiesen unabhängig vom Holztyp bei *K. pneumoniae* eine geringere Keimzahlreduktion als bei MRSA auf. Auf Kernholz war eine leichte Vermehrung der *K. pneumoniae* erwiesen. Auf den MRSA Platten konnte kein Keimwachstum auf Kernholz festgestellt werden,

4

während die Splintholzproben im Schnitt im Vergleich zu den 3 Stunden Ergebnissen keine Änderung zeigten. Die 24 Stunden Referenzproben zeigten im Vergleich zu den 3 Stunden Kontrollen eine Zunahme der Keimzahlen.

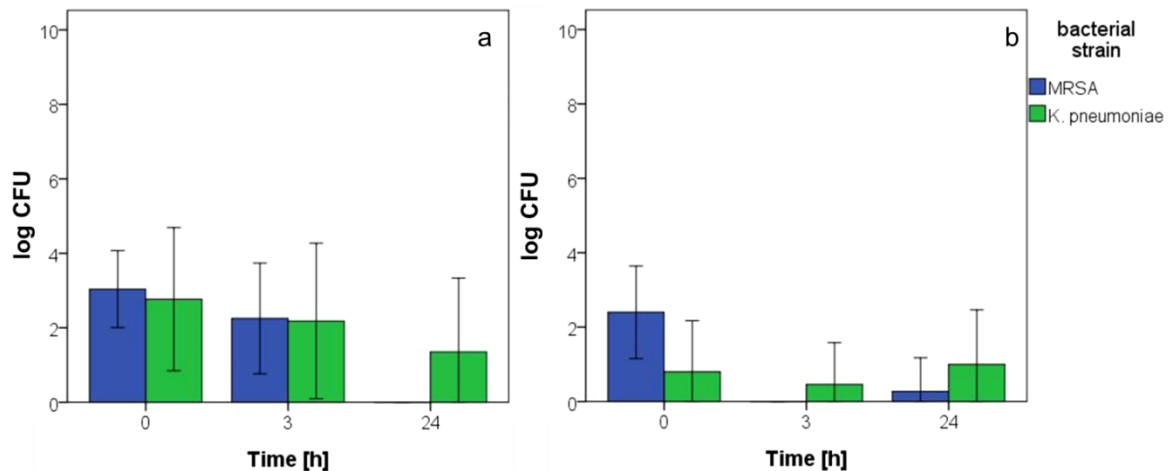


Abb. 1: KBE von MRSA und K. pneumoniae auf Holzspäne von a) Kernholz und b) Splintholz nach 0, 3 und 24 Stunden

3.2. Holzwürfel

Zum Zeitpunkt 0 Stunden (sofortige Abklatschentnahme nach Inokulation) war auf den Kernholzwürfeln im Vergleich zu dem Splintholz sowohl bei K. pneumoniae als auch beim MRSA eine höhere Keimzahl nachweisbar. Ebenso ist ein signifikanter Unterschied zwischen beide Keimarten sichtbar: Die K. pneumoniae wies auf Kernholz bei n=15 zum Messzeitpunkt 0 Stunden 13×10^5 bis 51×10^5 KBE/ml pro 0,27g auf, während auf den Kernholzwürfeln, welche mit MRSA inokuliert worden waren, 70×10^5 bis 92×10^5 KBE/ml pro 0,27g gezählt wurden. Als Referenzprobe wurde die jeweilige Bakteriensuspension ohne Holzkontakt auf ein Universalmedium ausgestrichen und analog zu den Proben kultiviert und ausgezählt. Auf den Referenzplatten waren nach 0 Stunden für beide Keime auf Kern- und Splintholz höhere Keimzahlen nachweisbar als auf den Holzwürfelplatten.

Die 3 Stunden Würfelabklatsche ergaben eine Reduktion beider Keime auf Kern- und Splintholz, wobei sowohl K. pneumoniae als auch MRSA eine stärkere Keimzahlreduktion auf Kernholz aufwiesen. Auch hier ist bei der Gegenüberstellung von Probe und Kontrolle eine höhere Keimzahl auf der Referenzprobe nachweisbar.

Nach 24 Stunden gab es eine erneute Keimzahlreduktion. Auf 14 Kernholz- und 15 Splintholzwürfeln war kein K. pneumoniae Wachstum nachweisbar. Da der MRSA bei 0 Stunden eine höhere Keimzahl aufwies, war die Keimzahlreduktion nach 24 Stunden im Vergleich zur K. pneumoniae niedriger. Hier zeigten zehn Kernholz- und 14 Splintholzwürfel kein MRSA Wachstum.

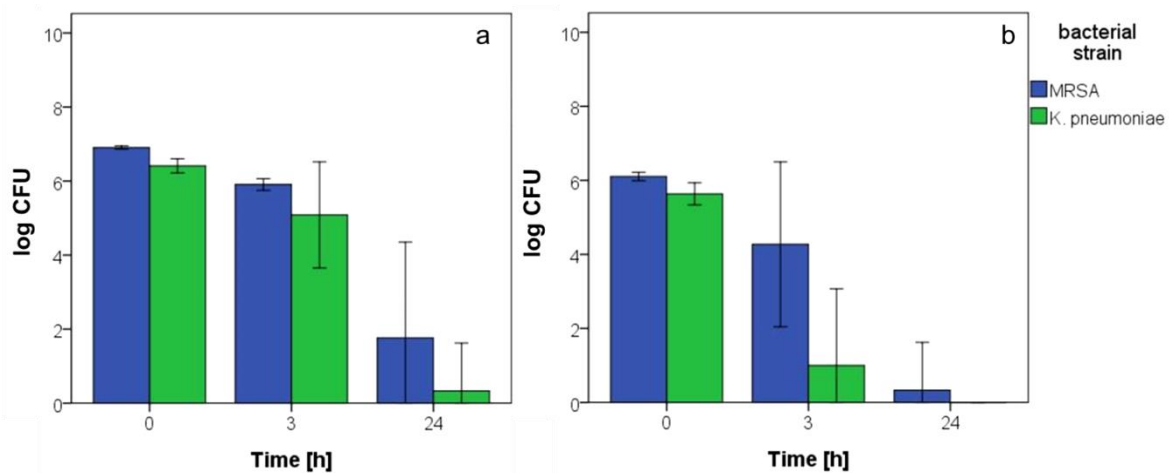


Abb. 2: KBE von MRSA und K. pneumoniae auf Holzwürfel von a) Kernholz und b) Splintholz nach 0, 3 und 24 Stunden

4. Zusammenfassung

Im Rahmen der mikrobiologischen Untersuchungen konnten Unterschiede der antimikrobiellen Wirkung des Lärchenholzes zwischen Holztyp, Holzform und Keimart festgestellt werden. Es konnte bewiesen werden, dass Lärchensplintholz im Vergleich zu -kernholz eine stärkere antimikrobielle Wirkung aufweist. Dies ist darauf zurückzuführen, dass das Splintholz größere Poren besitzt und somit Flüssigkeiten schneller in das Holzinnere transportiert werden. Folglich ist die Holzoberfläche schneller keimfrei.

Weiters wiesen die Lärchenwürfel eine stärkere Keimzahlreduktion auf als die Lärchenspäne. Dies könnte daraus resultieren, dass die Würfel sowohl hygroskopische Eigenschaften als auch Holzinhaltstoffe besitzen, welche die keimabtötende Wirkung von Holz bewirken (Gehring et al. 2000, Milling et al. 2005, Prechter et al. 2002, Schönwalder 1999, Schönwalder et al. 2002). Die Lärchenspäne besitzt jedoch aufgrund ihrer Dünne keine hygroskopische Eigenschaft. Somit kann vermutet werden, dass die antimikrobielle Wirkung von Holz durch das Zusammenspiel von Hygroskopizität und Pflanzenextraktstoffen begünstigt wird. Ein weiterer Grund für den Nachweis der schwächeren Keimabnahme auf Späne ist, dass diese im Vergleich zu den Lärchenwürfeln innerhalb der drei Messzeitpunkte nicht trocknen konnten. Nach Inokulation der Probe wurde das Testgefäß verschlossen und somit das feuchte Milieu beibehalten.

Des Weiteren wollte festgestellt werden, ob in der keimhemmenden Wirkung von Lärchenholz Unterschiede zwischen den verwendeten Bakterienstämmen feststellbar sind. Die Analyse der Wachstumsmuster der beiden Testkeime MRSA und K. pneumoniae auf den Holzproben bestätigte, dass beide Keime auf Lärchenholz ein unterschiedliches Wachstumsmuster aufweisen. Die K. pneumoniae wies im Vergleich zum MRSA eine raschere Keimzahlabnahme auf. Dieser Unterschied

in den Ergebnissen zwischen den beiden Bakterienstämmen kann anhand des ungleichen Zellwandaufbaus von grampositiven und gramnegativen Bakterien begründet werden. Der grampositive MRSA besitzt eine dickere Zellwand als die gramnegative *K. pneumoniae*.

5. Ausblick

In zukünftigen Studien, die die antimikrobielle Wirkung von Holz untersuchen, insbesondere von Lärchenholz mit dem Ziel, eine Eignung des Einsatzes des Holzes in hygienisch sensiblen Bereichen festzustellen, wäre es sinnvoll, neben der Auswahl von exakt standardisierbaren und reproduzierbaren Testverfahren auch darauf zu achten, praxisnahe Bedingungen so gut wie möglich zu simulieren. Dies würde z.B. das Heranziehen von soliden Holzkörpern als Untersuchungsmaterial erfordern und eine Inokulation des Holzes mit Untersuchungsmaterialien, mit denen Holz in der Praxis typischerweise kontaminiert werden könnte. Der Ausschluss bzw. die genaue Bestimmung einer Fremdkontamination des Untersuchungsmaterials, da dieses einen Einfluss auf dessen antimikrobielle Wirkung haben könnte, sowie das Heranziehen von Referenzmaterialien, wie z.B. Kunststoffen oder Metallen bzw. Kiefernholz, welches eine bekannte antimikrobielle Wirkung aufweist, wäre sinnvoll.

Literaturliste/ Quellenverzeichnis:

- Ak, N.O./Cliver, D.O./Kaspar, C.W. (1994): Cutting boards of plastic and wood contaminated experimentally with bacteria. In: J. Food Prot. 57, 16-22.
- Carpentier, B. (1997): Sanitary quality of meat chopping board surfaces: a bibliographical study. In: Food Microbiol. 14, 31-37.
- Gehring, M./Schnell, G./Zürcher, E./Kucera, L.J. (2000): Hygienische Eigenschaften von Holz- und Kunststoffbrettern in der Nahrungsmittelverarbeitung und -präsentation: Ein Vergleich. In: Holz Roh Werkst. 58, 265-269.
- Gilbert, R.J./Watson H.M (1971): Some laboratory experiments on various meat preparation surfaces with regard to surface contamination and cleaning. In: J. Food Technol. 6, 163-170.
- Koch, G./Rehbein, M./Lenz, M.T. (2007): Natürliche Dauerhaftigkeit Sibirischer Lärche. In: Holz-Zentralblatt Sonderdruck Nr.22.
- Milling, A. (2005): Holz – ein natürlicher Werkstoff mit antibakteriellen Eigenschaften? Vergleichende Untersuchungen zum Überleben von Bakterien auf Holz und Kunststoff mit mikrobiologischen und molekularen Methoden. Braunschweig, Techn. Univ., Diss.
- Milling, A./Kehr, R./Wulf, A./Smalla, K. (2005): Survival of bacteria on wood and plastic particles: Dependence on wood species and environmental conditions. In: Holzforschung 59, 72-81.
- Prechter, S./Betz, M./Cerny, G./Wegener, G./Windeisen, E. (2002): Hygienische Aspekte von Schneidebrettern aus Holz bzw. Kunststoff. In: Holz Roh Werkst. 60, 239-248.
- Schönwalder, A. (1999): Hygienische Aspekte bei Holz und Holzprodukten. In: AFZ-Der Wald 15, 789-791.
- Schönwalder, A./Kehr, R./Wulf, A./Smalla, K. (2002): Wooden boards affecting the survival of bacteria? In: Holz Roh Werkst. 60, 249-257.
- Schönwalder, A./Kehr, R./Wulf, A./Smalla, K. (2000): Antibakterielle Eigenschaften von Holz beachtenswert. In: Holz-Zentralblatt 147, 2037-2038.
- Schulz, H. (1995): Holz im Kontakt mit Lebensmitteln. Hat Holz antibakterielle Eigenschaften? In: Holz-Zentralblatt 84, 1395-1400.
- Schuster, A./Schmidt-Eisenlohr, E./Daschner, F. (2006): Wie hygienisch und sinnvoll ist Holz in Patientenzimmern? In: Krankenhaushygiene + Infektionsverhütung 28, 131-137.
- Strehlein, M./Wirmer, J./Schmidt-Eisenlohr, E./Daschner, F. (2004): Nutzung von Holz im Krankenhaus unbedenklich. In: Holz-Zentralblatt 71, 951-952.
- Windeisen, E./Wegener, G. (2002): Investigation of the correlation between extractives content and natural durability in 20 cultivated larch trees. In: Holz Roh Werkst. 60, 373-374.