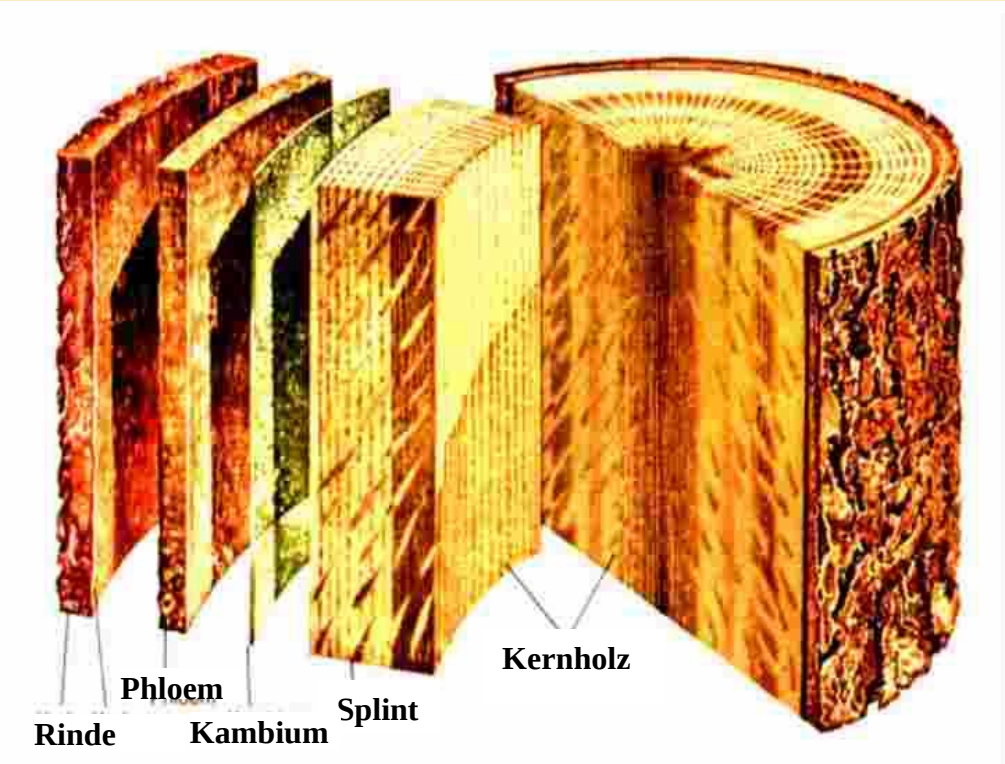
Holz – ein natürlicher Werkstoff mit antibakteriellen Eigenschaften?

Vergleichende Untersuchungen zum Überleben von Bakterien auf Holz und Kunststoff mit mikrobiologischen und molekularen Methoden

Annett Milling



Aufbau des Stammes

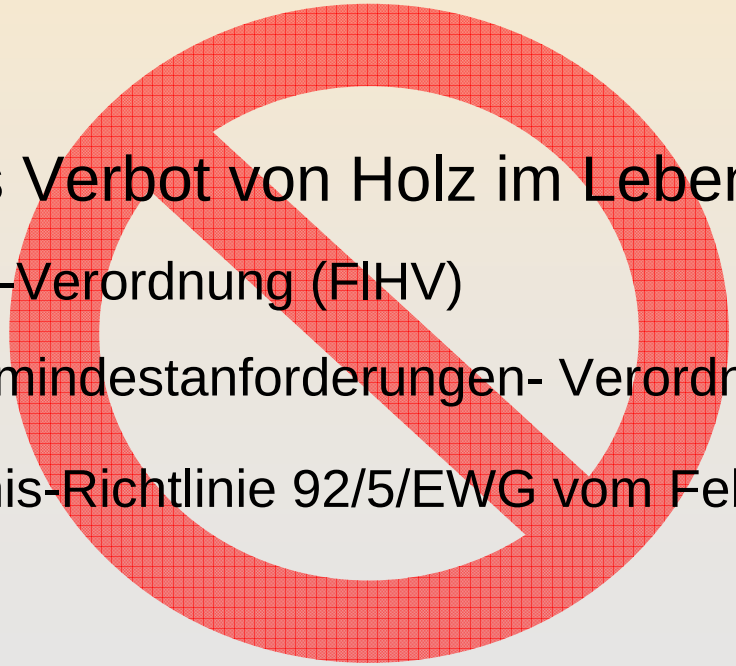
Holzverwendung:

- Baustoff (Fundamentpfähle, Bauteile)
- Bauhilfsstoff (Schalungen, Gerüste)
- Fenster, Türen, Treppen, Fußböden, Möbel
- Werkstoff (Sperrholz, Spanplatten)
- Chemierohstoff
- Energieträger
- **Schneidunterlagen, Küchengeräte**
- **Verpackungs- und Transportmittel (Kisten, Fässer, Paletten)**

Holz ist unhygienisch

stets höhere Keimgehalte auf Holzflächen im Vergleich zu Kunststoff und Metall vor und nach Einsatz von Reinigungs- und Desinfektionsmitteln

Problem: Holz ist porös und hygroskopisch



weitgehendes Verbot von Holz im Lebensmittelsektor

- Fleischhygiene-Verordnung (FlHV)
- Geflügelfleischmindestanforderungen- Verordnung (GFlMindV)
- Fleischerzeugnis-Richtlinie 92/5/EWG vom Februar 1992

Holz ist hygienisch

Studie von Ak et al. (1994)
Food Research Inst., University of Wisconsin – Madison

- Geringere Keimbelastung von Holz- im Vergleich zu Kunststoffbrettchen
- Keimreduktion an Holzoberflächen bereits nach wenigen Minuten
- Gute Reinigung von Holzbrettchen

Fragestellungen

1. Überleben Testbakterien auf und im Holz, und von welchen Parametern ist ihr Überleben auf dem Holz abhängig?
2. Sind die Bakterien auf und im Holz abgestorben oder nur inaktiviert bzw. in ihren Lebensfunktionen eingeschränkt?
3. Wie wird das Überleben bakterieller Gemeinschaften durch Holz beeinflusst?
4. Sind die Laborergebnisse in die Praxis übertragbar?

Experimentelle Herangehensweise

Umfassende systematische Analyse der Interaktionen zwischen Bakterien und Holz durch völlig neue experimentelle Herangehensweise:

Analyse:	kultivierungsabhängig kultivierungsunabhängig
Material:	Holz (*Pinus silvestris* L., *Picea abies* Karst., *Larix decidua* Mill., *Acer pseudoplatanus* L., *Fagus silvatica* L., *Quercus robur* L., *Populus nigra* L.) Kunststoff (Polyethylen (PE))
Materialzustand:	Sägespäne, Sägemehl Brettchen
Bakterien:	*Escherichia coli* pIE639 (*sat3*) *Enterococcus faecium* (*vanA*) Hühnergülle (bakterielle Gemeinschaft)

Experimentelle Herangehensweise

Inokulation mit *E. coli* oder *E. faecium*

Inkubation

Ablösung der Bakterien durch Behandlung im Stomacher-Blender

Kultivierungsabhängige Analyse

Plattierung auf Plate Count Agar mit Antibiotika

Bestimmung der Keimzahl

Kultivierungsunabhängige Analyse

Extraktion der Gesamt-DNA aus einem Bakterienpellet (und Aufreinigung)

PCR-Amplifikation

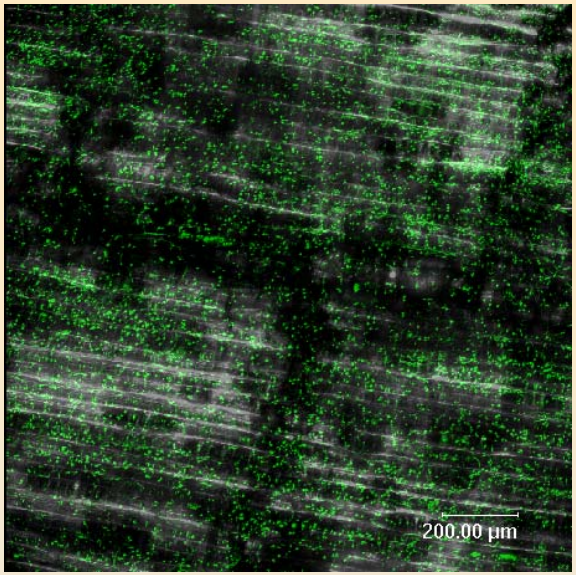
Agarose-Gelelektrophorese

Southern Blot

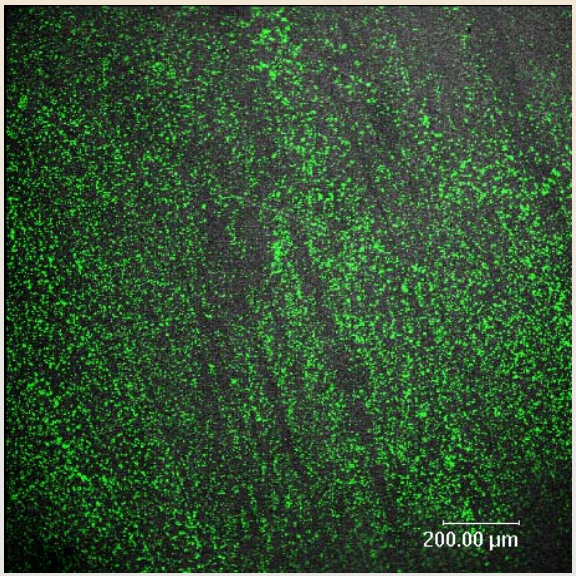
Hybridisierung

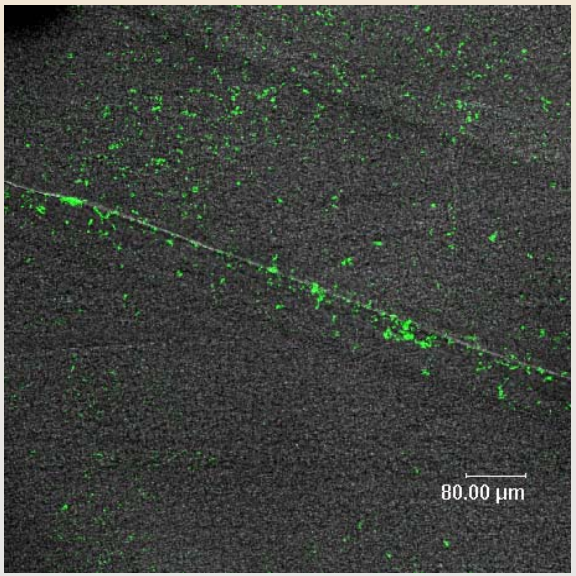
Bakterienverteilung nach Inokulation

Kiefer nach 2 h



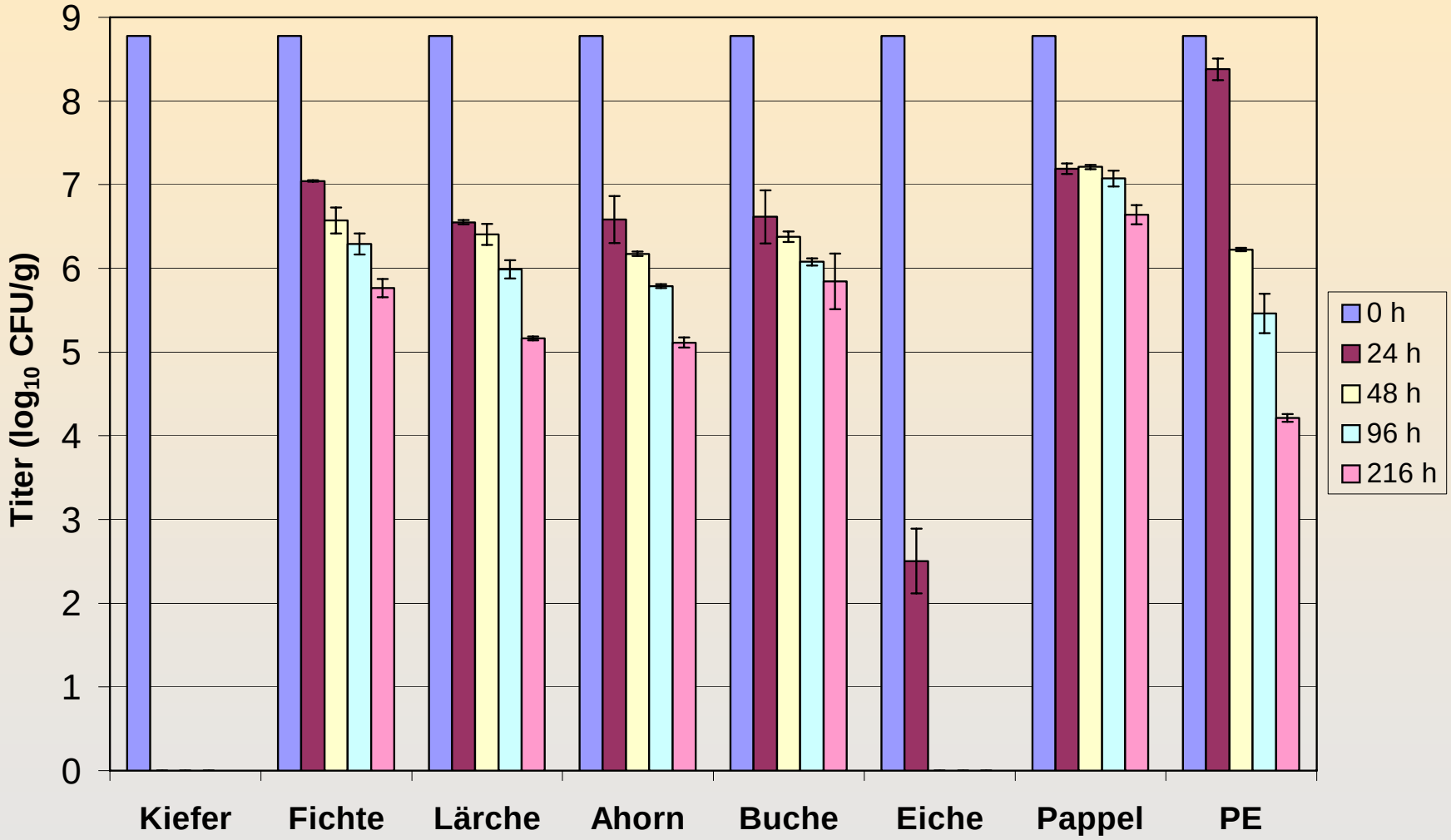
Polyethylen nach 2 h



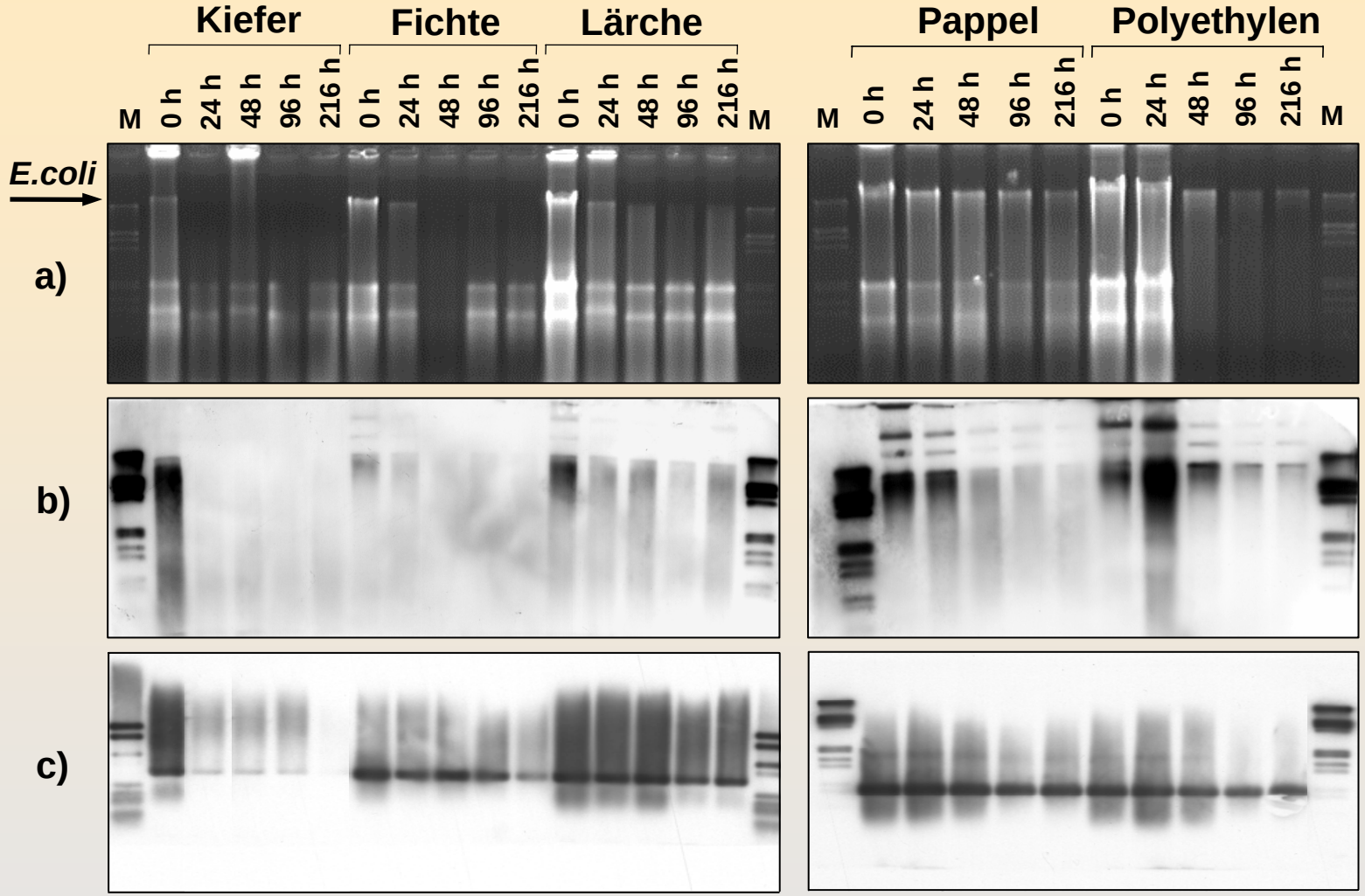


CLSM-Aufnahmen: Dr. Monika Götz

Überleben von *E. coli* pIE639 auf Holz und Kunststoff



Überleben von *E. coli* pIE639

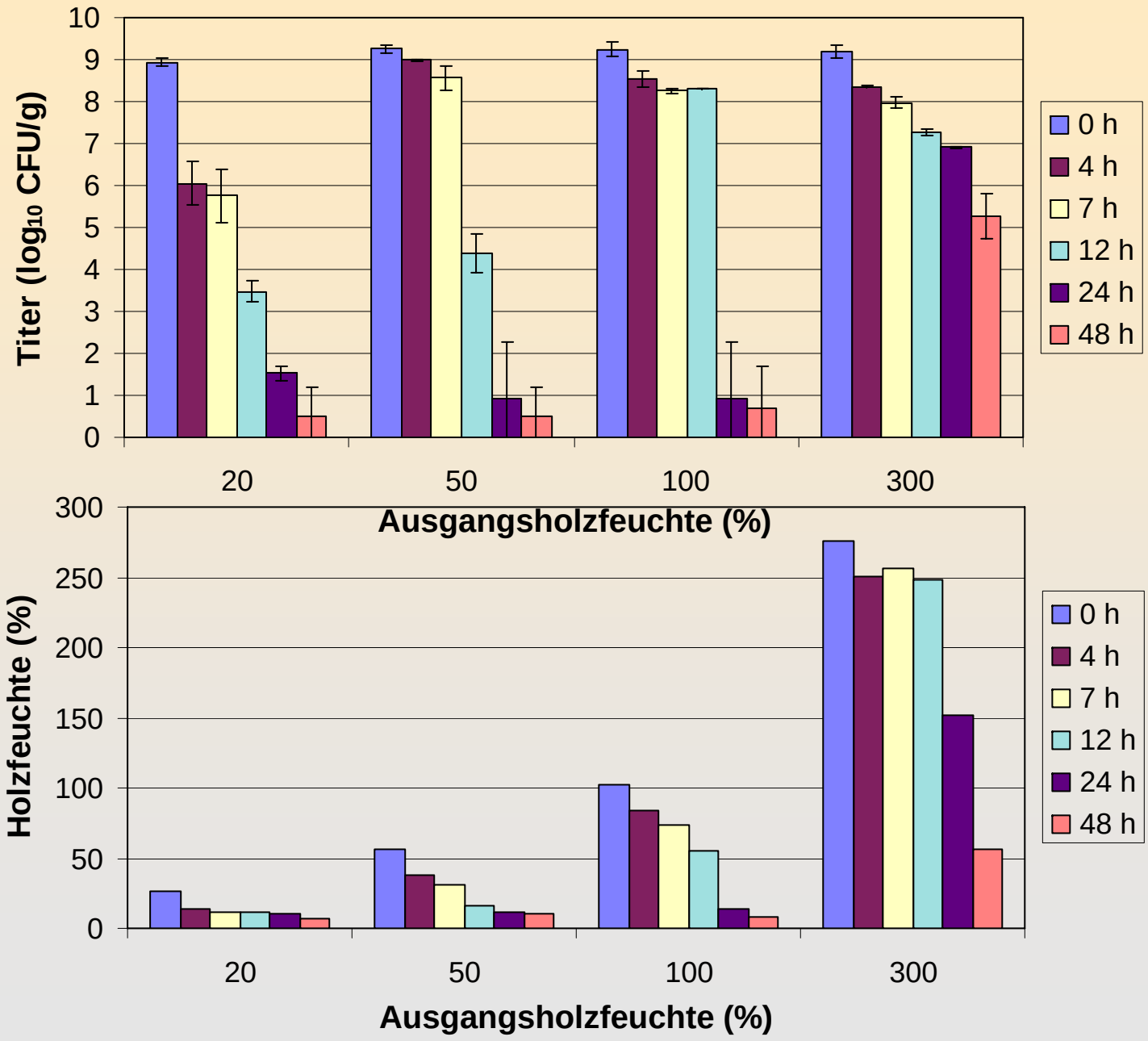


a) Agarosegel der Roh-DNA

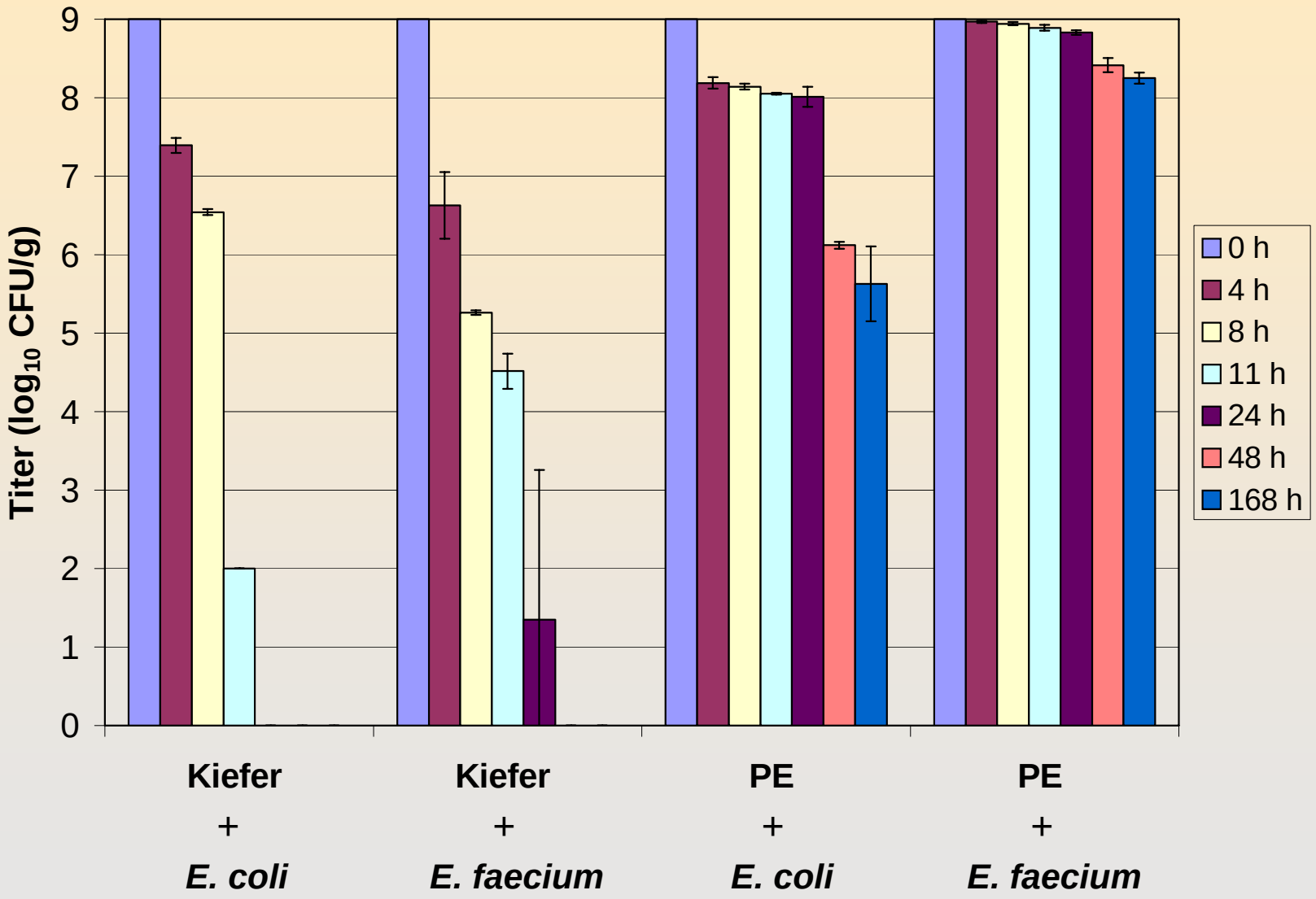
b) Southern Blot der Roh-DNA nach Hybridisierung mit *sat3*

c) Southern Blot der PCR-Produkte nach Hybridisierung mit *sat3*

Überleben von *E. coli* pIE639 auf Kiefernholz



Überleben von *E. coli* und *E. faecium* auf Kiefernholz und Kunststoff



Experimentelle Herangehensweise

Inokulation mit Hühnergülle

Inkubation

Ablösung der Bakterien durch Behandlung im Stomacher-Blender

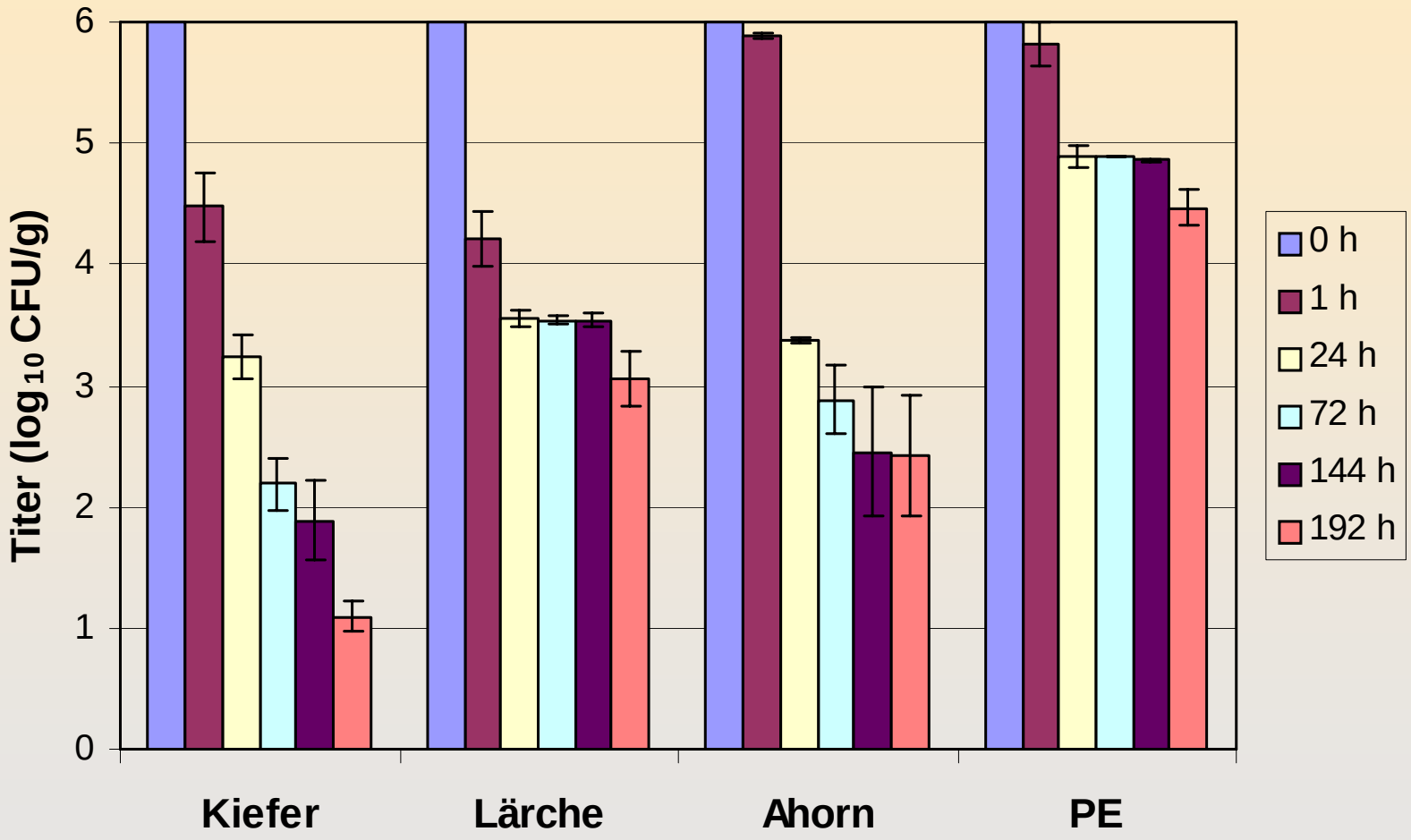
Kultivierungsabhängige Analyse

- Plattierung auf Universal- und Selektivnährmedien
- Bestimmung der Keimzahl

Kultivierungsunabhängige Analyse

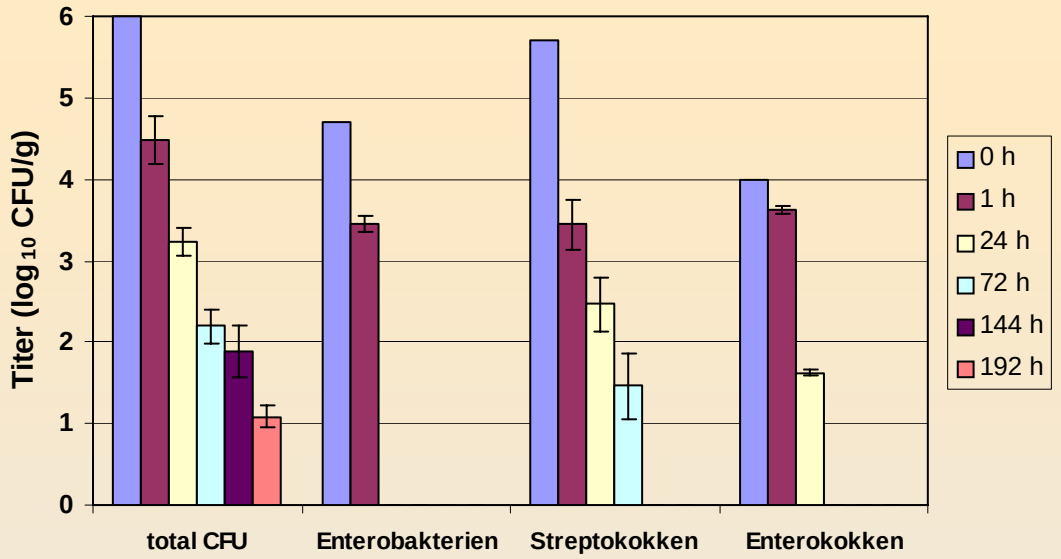
- Extraktion der Gesamt-DNA aus einem Bakterienpellet und Aufreinigung
- PCR-DGGE mit universellen und gruppenspezifischen Primern
- Bandenextraktion, Klonierung, Sequenzierung

Inokulation verschiedener Hölzer und Kunststoff mit Hühnergülle

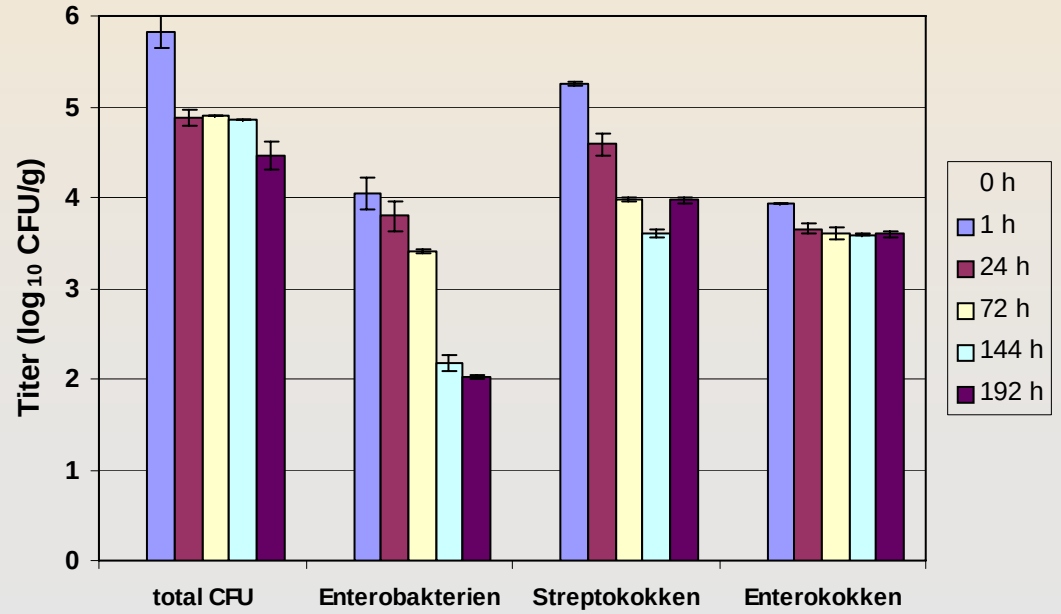


Inokulation verschiedener Hölzer und Kunststoff mit Hühnergülle

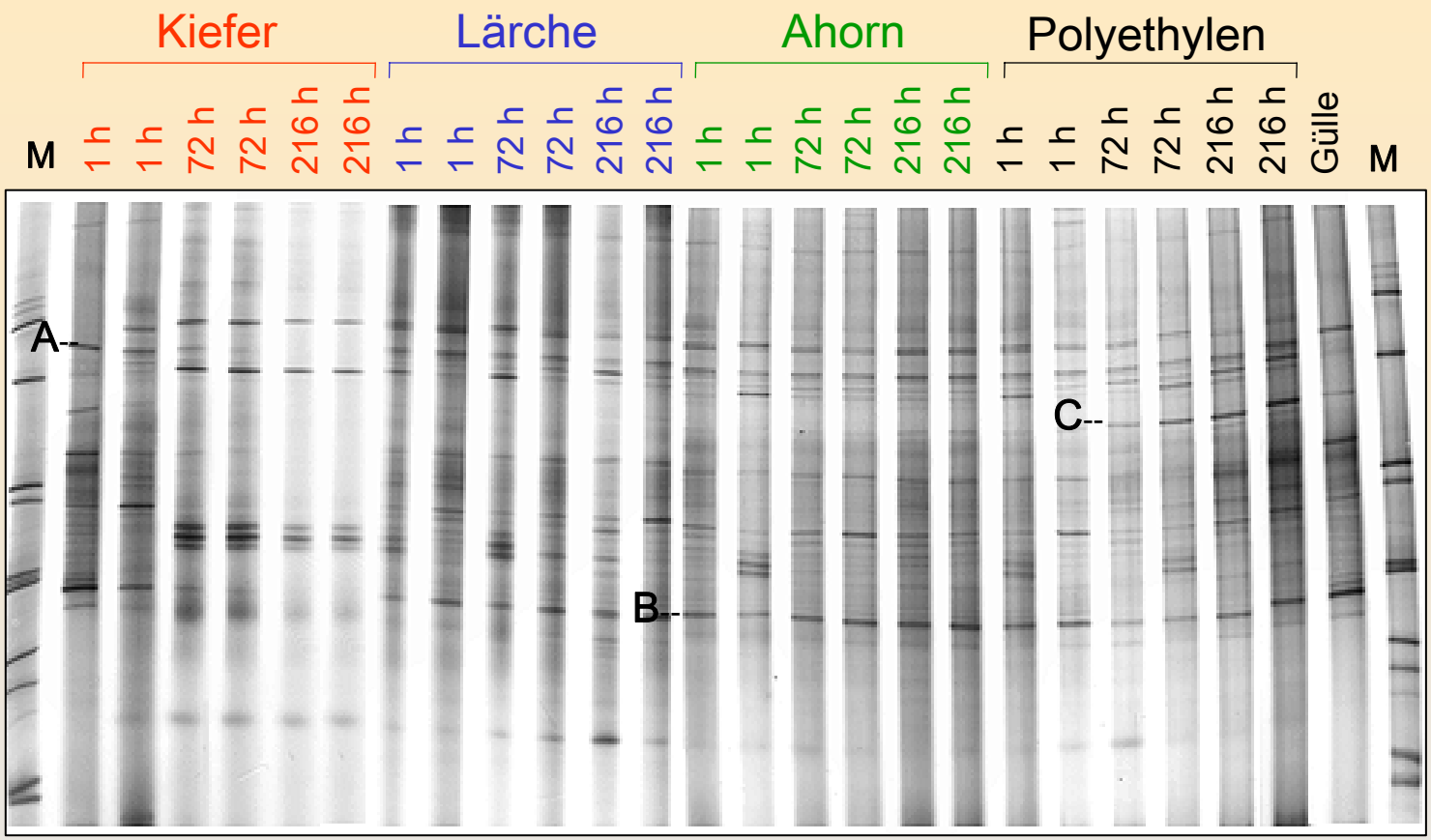
Kiefer



Polyethylen



Inokulation verschiedener Hölzer und Kunststoff mit Hühnergülle



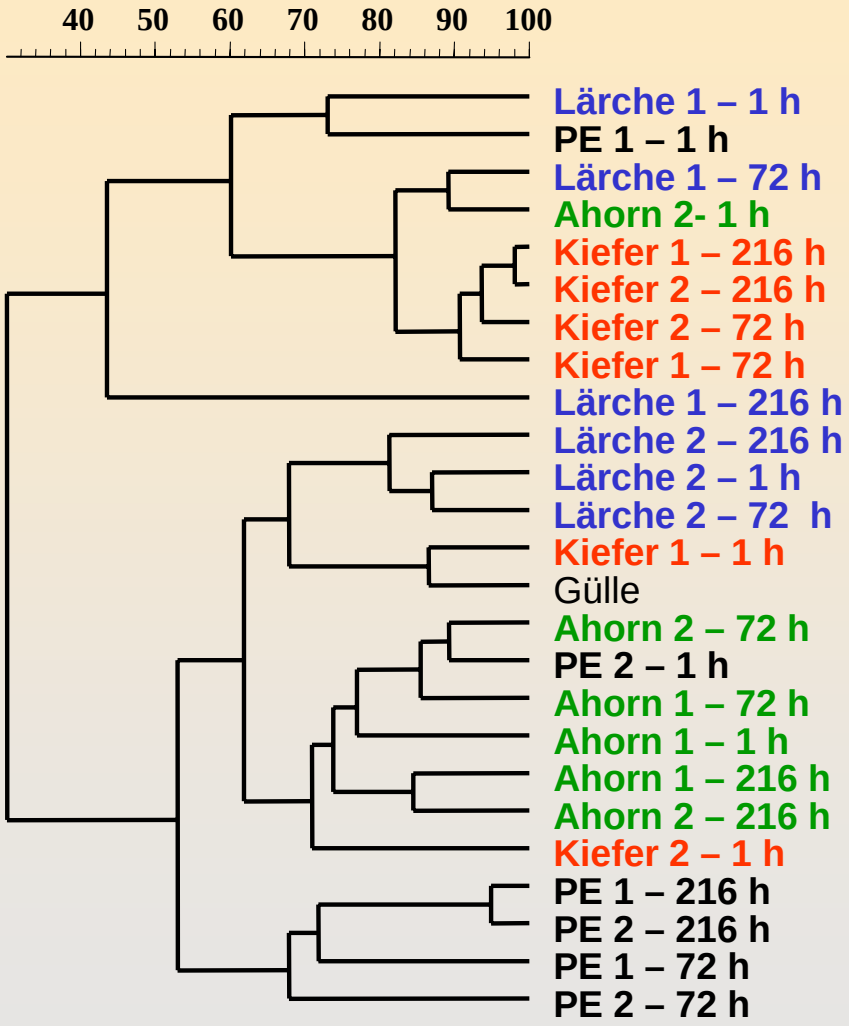
DGGE von 16S rDNA-Fragmenten für Bakterien (*E.coli*: 968-1401)

A: nicht-kult. Gram-pos. Bakterium aus dem Hühnerdarm (98,9%)

B: *Brachybacterium tyrofermentas* (99,7%)

C: *Moraxella* sp. (100 %)

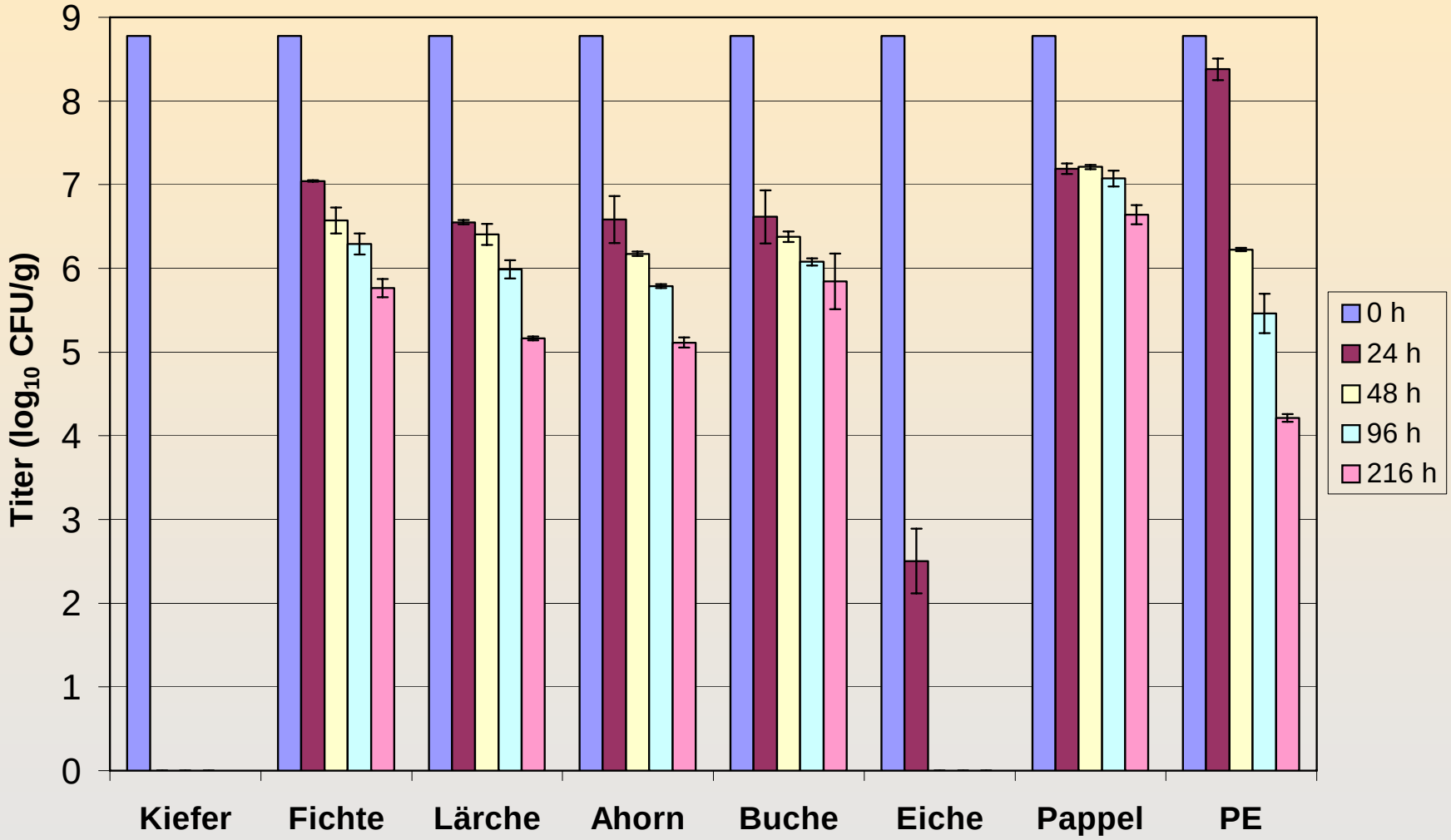
Inokulation verschiedener Hölzer und Kunststoff mit Hühnergülle



Physikalische und chemische Erklärungsansätze:

- Bakterien werden nur durch rein physikalische Kräfte in den Holzporen festgehalten.
- Ein „scheinbarer Keimabbau“ findet durch eine Verlagerung der Bakterien von der Oberfläche in tiefere Holzschichten statt.
- Das poröse und hygroskopische Holz entzieht den Bakterien das für ihre Lebensaktivität und Vermehrung benötigte Wasser und tötet diese dadurch ab.
- Holzinhaltsstoffe wirken antibakteriell.

Überleben von *E. coli* pIE639 auf Holz und Kunststoff



Physikalische und chemische Erklärungsansätze:

- Das poröse und hygroskopische Holz entzieht den Bakterien das für ihre Lebensaktivität und Vermehrung benötigte Wasser und tötet diese dadurch ab.
- Holzinhaltsstoffe wirken antibakteriell.

Charakterisierung der antibakteriellen Wirkung von Holz

Holzart	Alkohol-Benzol-Extrakte [%]	Ether-Extrakte [%]	Holzart	Ethanol-Extrakt [%]
Europ. Fichte	2,34	0,78	Tanne	2
Kiefer	3,32	**1,92**	Fichte	2,5
Kiefer-Splint	3,47	-	Lärche	4,5
Kiefer-Kern	**5,88**	-	**Kiefer**	**9**
Hainbuche	1,99	-	Rotbuche	1,5
Gemeine Buche	1,20	0,31	Esche	3
Spitzahorn	2,02	0,45	Ahorn	3
Bergahorn	2,45	-	Pappel	3,5
Eiche	-	0,72	Birke	3,5
Eiche-Splint	2,4	-	Erle	5
Eiche-Kern	**4,4**	-	Nussbaum	5
			Linde	**10**
			Robinie	**11**
			Eiche	**12**

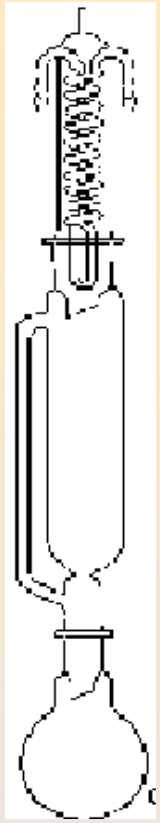
Extraktstoffgehalte einiger Laub- und Nadelholzarten (Fengel und Grosser 1975, Dix und Marutzky 1987, Kubel et al. 1988, Lange et al. 1989, Lange 1995)

Charakterisierung der antibakteriellen Wirkung von Holz

Holzspäne
+
Wasser

Heißwasser-
extraktion

(2 h, 80°C)



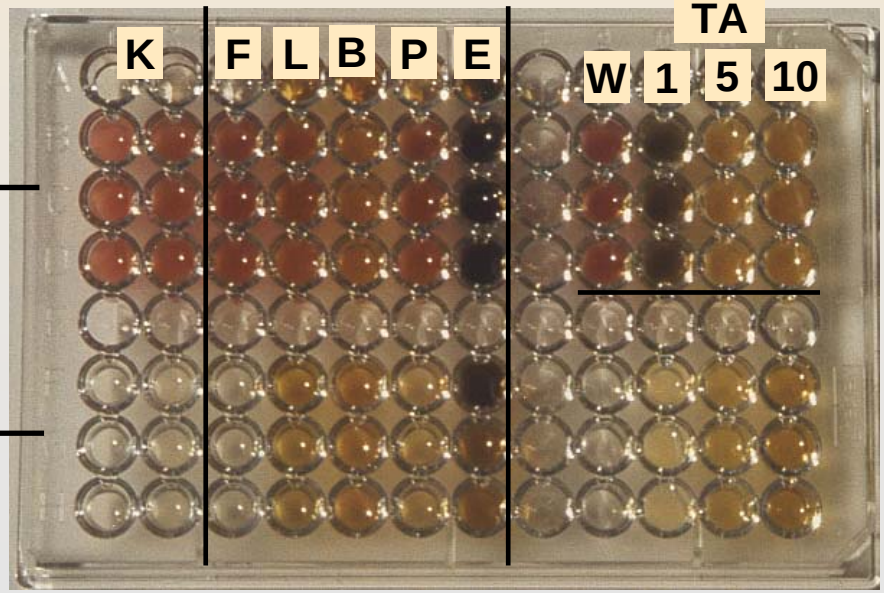
ÜN–Kultur + Extrakt

Inkubation, ÜN, 37°C

+ Tetrazoliumchlorid

Inkubation, 30 min, 37°C

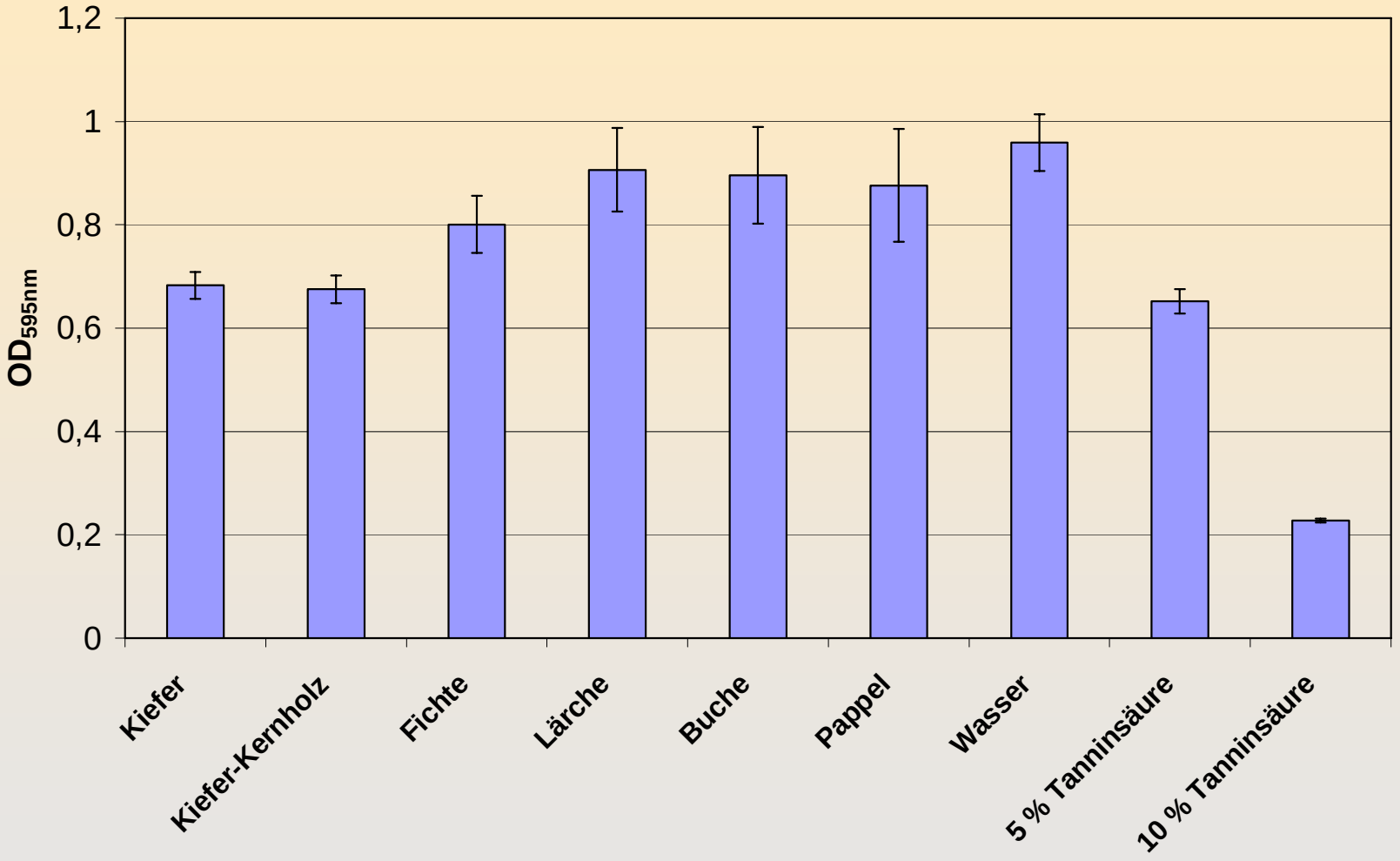
OD-Messung



10^9 CFU/ml

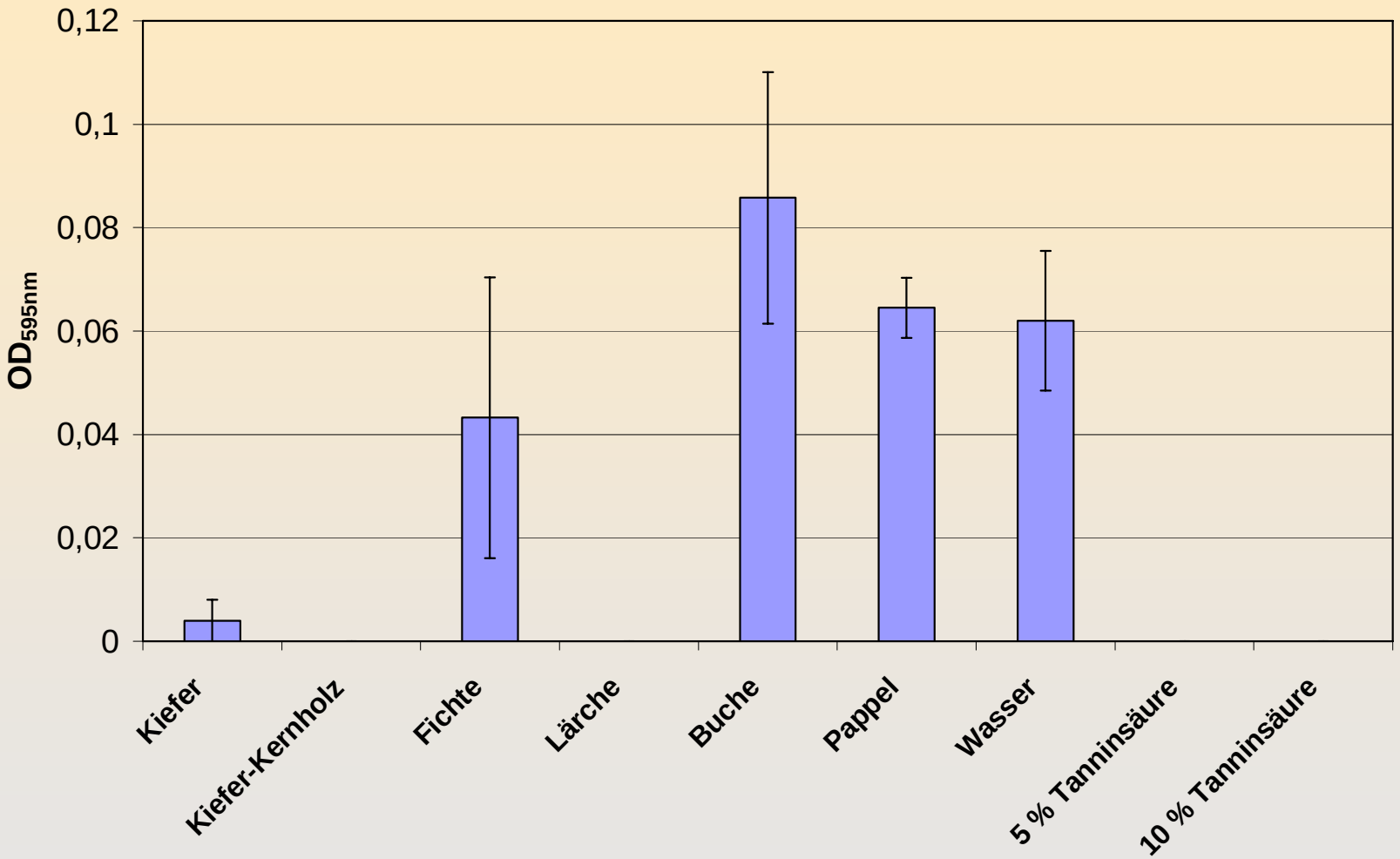
10^8 CFU/ml

Wirkung von Heißwasserextrakten auf *E. coli* pIE639



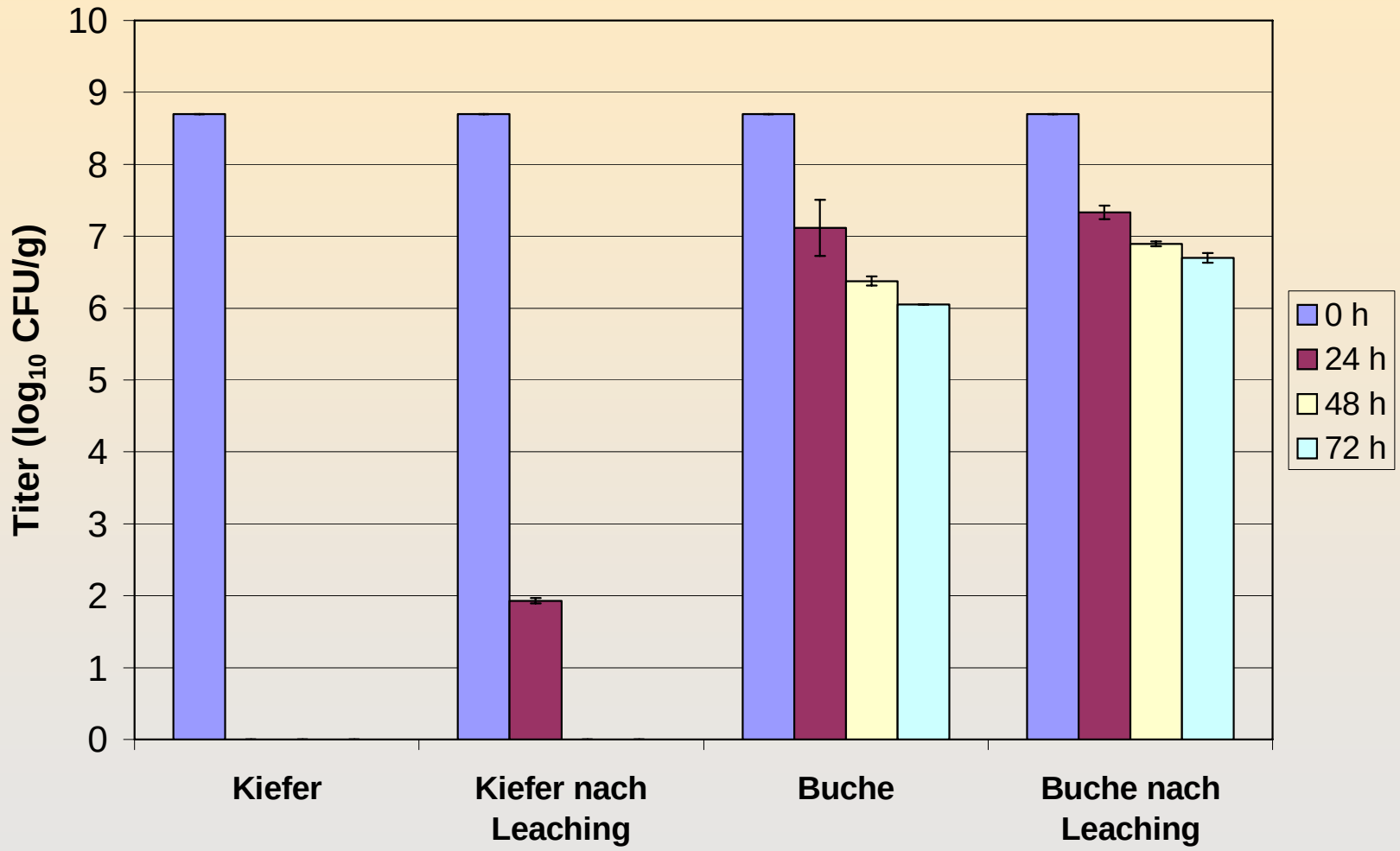
Inokulation: 10^9 CFU/ml

Wirkung von Heißwasserextrakten auf *E. faecium*



Inokulation: 10^6 CFU/ml

Charakterisierung der antibakteriellen Wirkung



Zusammenfassung

- Die hygienischen Eigenschaften von Holz können nicht universell eingeschätzt, sondern müssen differenziert beurteilt werden.
- Die hygienischen Eigenschaften von Holz hängen hauptsächlich von der Holzart selbst ab, aber auch von anderen Faktoren wie der Art und Konzentration der Bakterien, der Holzfeuchte, den Umgebungstemperaturen und der relativen Luftfeuchte.
- Für Kiefern- und Eichenholz konnten eindeutig antibakterielle Eigenschaften nachgewiesen werden ↷ hygienischer Vorteil gegenüber anderen Holzarten und Kunststoff.
- Die Entwicklung der DNA-Gehalte auf den Holz- und Kunststoffspänen korrelierte mit den ermittelten Keimzahlen. Die antibakterielle Wirkung von Kiefernholz wurde kultivierungs-unabhängig bestätigt.

Zusammenfassung

- Die DGGE-Profile machten eine Dynamik in der Struktur der bakteriellen Gemeinschaft der Hühnergülle besonders auf Kiefernholz- und Kunststoffspänen während der Inkubation deutlich.
- Die Ergebnisse, die in den Untersuchungen zum Überleben von Bakterien auf Holzspänen gewonnen wurden, waren tendenziell auf das Überleben von Bakterien auf kompakten Flächen übertragbar.
- Neben der hygroskopischen Wirkung von Holz konnte auch die Beteiligung von Holzinhaltsstoffen an der antibakteriellen Wirkung nachgewiesen werden.

Ausblick

- Auch in der Praxis konnten die guten hygienischen Eigenschaften von Produkten aus Kiefernholz bestätigt werden.

Danksagung

Heinrich Wilms
Fa. Gustav Wilms Holzverpackungen, Bad Essen-Barkhausen

Dr. Helmut Steinkamp
Deutsches Institut für Lebensmitteltechnik e.V., Quakenbrück

PD Dr. Kornelia Smalla, BBA, Braunschweig

Dr. Rolf Kehr, BBA, Braunschweig

Arbeitsgruppe Smalla

Pinus sylvestris L. (Gemeine Kiefer)