Back to the Roots

Untersuchung von Miswak auf antibakterielle Wirksamkeit

Seminararbeit von
Svenja Preuß

S. Q. Mehdi

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung 3
1 Einleitung 4
1.1 Mundflora – warum Zähneputzen so wichtig ist 4
1.2 Geschichte des Miswak – zurück zu den Wurzeln 4
1.3 Antibiotika – ein pharmazeutischer Durchbruch 5
1.4 Ziel der Arbeit 5
2 Material und Methoden 6
2.1 Verwendete Materialien 6
2.1.1 Hilfsmittel 6
2.1.2 Verbrauchsmaterialien 6
2.1.3 Verwendete Chemikalien 6
2.1.4 Testsubstanzen 6
2.1.5 Fertige Lösungen 7
2.1.6 Nährmedien 7
2.1.7 Referenzstämme 7
2.2 Methoden 7
2.2.1 Antibakterielle Wirkung von Miswak in vitro – Agardiffusionstest 8
2.2.2 Identifikation der Isolate von der Zahnoberfläche mittels Gesequenzierung 9
2.2.3 Antibakterielle Wirkung von Miswak in-vivo 10
3 Ergebnisse 12
3.1 Antibakterielle Wirkung von Miswak in vitro – Agardiffusionstest 12
3.1.1 Bestimmung der Hemmhöfe verschiedener Substanzen 12
3.1.2 Vergleich der getesteten Substanzen 13
3.2 Identifikation der Isolate von der Zahnoberfläche 13
3.2.1 Bestimmung der Isolate mittels Gensequenzierung 13
3.3 Antibakterielle Wirkung von Miswak in vivo 14
3.3.1 Aerobe Gesamtkeimzahl auf der Zahnoberfläche nach Verwendung einer Miswak-Zahnbürste und einer handelsüblichen Zahnbürste 14
3.3.2 Vergleich der aeroben Gesamtkeimzahlen auf der Zahnoberfläche nach Verwendung einer Miswak-Zahnbürste und einer herkömmlichen Zahnbürste 14

3.3.3 Aerobe Gesamtkeimzahl auf dem Miswakköpfchen sowie auf dem handelsüblichen Zahnbürstenkopf aus Kunststoff 15

3.3.4 Vergleich des Miswakköpfchens mit dem handelsüblichen Zahnbürstenkopf 16

4 Diskussion 16

4.1 In-vitro Experimente 16

4.2 In-vivo Experimente 17

4.3 Eignung des Miswakinhaltsstoffes als Antibiotikum 18

4.4 Ausblick 18

5 Abkürzungsverzeichnis 19

6 Literaturverzeichnis 20

6.1 Internetquellen 20

6.2 Fachzeitschriften 20

6.3 Bücher 21

6.4 Abbildungen 21

Danksagung 22

Zusammenfassung

Infektionserreger sind seit dem 19. Jahrhundert bekannt. Eine wesentliche Rolle bei der Entdeckung von Bakterien als Auslöser von Krankheiten spielte Robert Koch, der damit eine neue Wissenschaft begründete: Die Mikrobiologie. Seitdem wurde eine Vielzahl von Infektionserregern identifiziert und beschrieben. [16] Eine der wichtigsten Therapien im Kampf gegen Mikroorganismen ist der Einsatz von Antibiotika. Die heute eingesetzten Antibiotika zählen zu den Wirkstofftypen, die zwischen 1930 und 1960 eingeführt wurden. Echte Neuerungen gibt es kaum. Schon früh traten erste Bakterien auf, die gegen diese Antibiotika unempfindlich geworden waren. Gerade in medizinischen Bereichen stellen diese zum Teil multiresistenten Keime bei geschwächten Patienten eine ernste Bedrohung dar. [14]

Es ist somit von großer Bedeutung, dass der Medizin für die Behandlung von Infektionskrankheiten neue Substanzen zur Verfügung gestellt werden. Diese sollten, um die bestehenden Antibiotikaresistenzen zu umgehen, nach Möglichkeit wenig mit den bekannten Substanzen gemeinsam haben. Es bietet sich dabei an, auf Stoffe zurückzugreifen, die schon früher eingesetzt wurden, aber in der Zwischenzeit in Vergessenheit geraten sind. [14]

Der Zahnbürstenbaum Salvadora persica ist ein Baum, dessen Wurzelholz, genannt Miswak, schon vor Jahrtausenden zum Zähneputzen verwendet wurde. Heute wird es nur noch regional verwendet. Erste Untersuchungen deuteten darauf hin, dass Miswak auch einen inhibierenden Effekt auf Mikroorganismen hat.

In meiner Arbeit habe ich diesen Effekt in-vitro sowohl mit verschiedenen Referenzstämmen als auch mit Isolaten aus der eigenen Mundhöhle untersucht.

Anhand meiner Ergebnisse lässt sich eindrucksvoll zeigen, dass Miswak in-vitro einen inhibierenden Effekt auf Bakterien hat. Zudem konnte ich in einem In-vivo-Experiment nachweisen, dass Miswak durchaus als Ersatz zur herkömmlichen Zahnbürste verwendet werden kann und dabei die Vermehrung von Bakterien auf der Zahnoberfläche verzögert.

1 Einleitung

1.1 Mundflora – warum Zähneputzen so wichtig ist

In der Mundflora sind einige Milliarden Bakterien aus über 300 verschiedenen Arten zu finden. Durch die Feuchtigkeit, die Wärme und die Nährstoffe in den Speiseresten haben die Mikroorganismen perfekte Lebensbedingungen. [1]

Durch die Nahrungsreste und Speichelbestandteile entsteht ein Zahnbelag, auch Plaque genannt. [2,3]Je mehr Plaque sich auf den Zähnen befindet, umso mehr Bakterien und Krankheitserreger können sich darunter sammeln. Dadurch steigt die Gefahr von Karies. [2] Der Zucker dient als Bindemittel, durch das die Bakterien erst an den Zähnen anhaften. [3] Karies entsteht, wenn diese Bakterien den Zucker des Zahnbelages abbauen und z.B. in Milchsäure umwandeln. [1,2] Diese Säure greift den Zahnschmelz an und zerstört ihn, sodass sich Löcher im Zahn bilden. [2]

Oralstreptokokken können durch eine Verletzung der Mundschleimhaut auch in den Blutkreislauf gelangen und dort eine Blutvergiftung, Abszesse in Hals, Lunge und Leber und sogar Herzklappenfehler verursachen. Um dies zu vermeiden ist eine regelmäßige und gründliche Mund- und Zahnpflege wichtig, da körpereigene Mundreinigungsmaßnahmen nicht in der Lage sind, die widerstandsfähige Plaque zu entfernen. [2]

1.2 Geschichte des Miswak – zurück zu den Wurzeln

Mundhygiene wurde schon seit dem Altertum von verschiedenen Bevölkerungsgruppen auf der ganzen Welt praktiziert. [13,10] Vor einigen Jahrtausenden wurden traditionelle Kauhölzchen aus Ästen und Wurzeln, genannt „Miswak“, in verschiedenen Zivilisationen benutzt. So zum Beispiel vor 7000 Jahren von den Babyloniern und später auch von den Griechen und Römern. Allerdings wird angenommen, dass den meisten Europäern diese Mundhygienemethode noch bis vor ungefähr 300 Jahren unbekannt war. „Miswak“ ist ein Wort aus dem Arabischen und bedeutet übersetzt so viel wie „Zahnputzstock“. [13] Heute werden die Kauhölzchen vor allem in Asien, Afrika, Südamerika und den islamischen Staaten benutzt. [13] Der am weitesten verbreitete, bekannteste und somit auch am häufigsten verwendete Baum ist *Salvadora persica*, der in den europäischen Ländern besser bekannt ist unter dem Namen Zahnputz- oder Zahnstocherbaum. [5] Das Holz wird gekaut und in Wasser eingeweicht, damit die natürlichen Fasern weicher werden und sich teilen. Das Hölzchen wird wie ein Stift gehalten und das Bürstenende in Auf- und Ab- oder in Kreisbewegungen benutzt. Wenn der Bürstenrand ausgefranst ist, wird er abgeschnitten und der neue Rand gekaut. So kann er über einige Wochen benutzt werden. [13,10]

Abbildung1: Miswakholzzweig

Abbildung 2: *Salvadora persica* Baum

1.3 Antibiotika – ein pharmazeutischer Durchbruch

Erste antimikrobielle Therapien wurden schon vor 4500 Jahren in China bei der Behandlung von Infektionen auf der Haut mit schimmeligem Sojaquark angewandt. Auch die Griechen benutzten schon Wein, Myrrhe und anorganische Salze. Die moderne antimikrobielle Behandlung beginnt allerdings erst Anfang des 20. Jahrhunderts mit der Synthese des ersten Antibiotikums Salvarsan durch Paul Ehrlich und Sahachiro Hata. Der eigentliche Durchbruch gelang erst ab 1932 durch die Antibiotika Sulfanomide und Penicillin. Danach entwickelte die pharmazeutische Industrie etliche neue Antibiotika. [14]

Schon kurz nach der Entdeckung von Penicillin traten resistente Staphylokokken auf. Später, um 1950, wiesen um die 80% der Staphylokokken eine Penicillin-Resistenz auf. [9] Ende der 60er Jahre stagnierte die Entwicklung neuer Antibiotika. 2004 warnte man vor der zunehmenden Verbreitung von Problemkeimen, die eine Mehrfachresistenz gegen herkömmliche Antibiotika zeigen. [14]

1.4 Ziel der Arbeit

Da eine baldige Zulassung von neuen Antibiotika nicht in Sicht ist, wäre eine notwendige Alternative der Einsatz von Substanzen, denen eine antimikrobielle Wirkung zugeschrieben wird und die in den letzten Jahren seltener verwendet wurden. [14]

Das Ziel dieser Arbeit besteht darin, nachzuweisen, ob Miswak neben der mechanischen Entfernung des Zahnbelags auch einen inhibitorischen Effekt auf Bakterien besitzt und damit als alternatives Antiinfektiva geeignet wäre. Überprüfen werde ich dies, indem ich die Wirkung des Miswakholzes in-vitro mit verschiedenen Bakterienstämmen teste und in-vivo in einem Selbstversuch den Effekt einer Miswakzahnbürste dem einer herkömmlichen Zahnbürste gegenüberstelle.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Materialien

2.1.1 Hilfsmittel

1. Platinimpföse
2. Drigalski-Spatel
3. Spatellöffel
4. Pinzette
5. Elektrische Pipette
6. Bunsenbrenner
7. Vortex-Gerät
8. Waage
9. Brutschrank, auf 36°C temperierbar
10. Skalpell
11. Lineal
12. Lupe, (6-fache Vergrößerung)
13. Schere
14. Auflichtmikroskop

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

1. 50ml Röhrchen, steril
2. Pipettenspitze, steril (Einweg 100-1000µl)
3. Pipetten, Kunststoff steril (Einweg 25ml)
4. Pasteurpipette, Glas
5. Sterile Plättchen
6. Petrischalen, Durchmesser 90 mm
7. Tupfer in steriler Lösung (Nährbouillon 3ml)
8. Handschuhe
9. Stäbchen in steriler Nährbouillon

2.1.3 Verwendete Chemikalien

1. Destilliertes Wasser
2. Ethanol

2.1.4 Testsubstanzen

1. Antibiotikum; 875/125 mg Filmtablette; Wirkstoffe: Amoxicillin und Clavulansäure“ („Amoxicillin – ratiopharm comp., Ulm)
2. Miswak Salz; SWAK – Zahnsalz; Inhaltsstoffe: Miswakholz, Kristallsalz, Nelkenöl; Stabilisator: Silikate (SWAK Experience UG, Morbach)

3. Miswak (Al-Falah Impex, Karachi, Pakistan)
4. Hopfen (HVG – Fellets 9, HMB- Ernte: 2013, Wolnzach)
5. Miswak Zahnbürste (SWAK Experience UG, Morbach)
6. Zahnbürste (Oral B, Schwalbach am Taunus)
7. Zahnpasta, Meridol (CP GABA GmbH, Hamburg)

2.1.5 Fertige Lösungen

1. 0,9%ige NaCl/0,1%ige Peptonlösung, 9 ml abgefüllt in Reagenzgläsern

2.1.6 Nährmedien

1. Columbia-Agar mit Schafblut (OXOID, Wesel)
2. Petrifilm, Aerobic Count (3M, Neuss)

2.1.7 Referenzstämme

1. *Escherichia coli*, Referenzstammsammlung Labor Dr. Graser
2. *Enterococcus faecalis*, Referenzstammsammlung Labor Dr. Graser

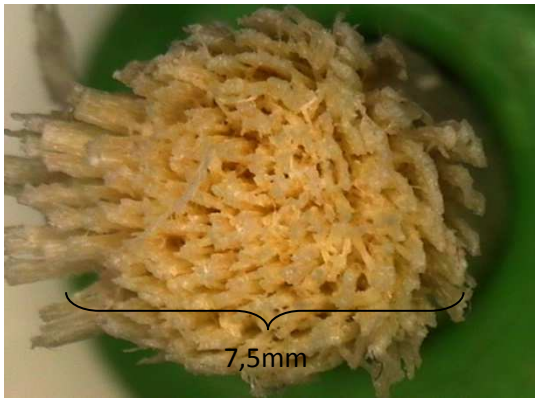


Abbildung 3: Miswakköpfchen, 10-facvergrößert

2.2 Methoden

Alle im Folgenden beschriebenen Versuche wurden nach einer Belehrung nach §12 der Biostoffverordnung zum Umgang mit Krankheitserregern der Risikoklasse 2 im Labor Dr. Graser in Schonungen unter der Aufsicht von Dr. Martin Preuß, dem Leiter der mikrobiologischen Abteilung, durchgeführt.

2.2.1 Antibakterielle Wirkung von Miswak in vitro – Agardiffusionstest

2.2.1.1 Vorbereitung der Testsubstanzen

Zur Herstellung der Antibiotikalösung nimmt man 0,5g eines Antibiotikums, für die Miswak Salzlösung misst man mit Hilfe einer Waage und eines Spatellöffels 1g des Salzes ab und für die Hopfenlösung misst man 1g Hopfen ab. Anschließend löst man alles jeweils in einem Röhrchen mit 10ml destilliertem Wasser auf. Zur Vorbereitung der Testsubstanzen für die fünf Agardiffusionstests braucht man jeweils vier sterile Plättchen. Nun entnimmt man von einer Lösung ca. 1ml und beträufelt damit jeweils fünf Plättchen. Dies wiederholt man dann mit den übrigen Lösungen, bis jeweils fünf Plättchen mit der Antibiotika-, der Salz- und der Hopfenlösung eingeweicht sind und fünf weitere leer bleiben. Von dem Miswakzweig schneidet man mit einem Skalpell ungefähr 2mm dicke Scheiben ab. Diese Scheiben zerteilt man nun in kleine Stücke.

2.2.1.2 Anlegen einer Übernachtkultur mit Hilfe des fraktionierten Ausstrichs

Für die folgenden Versuche werden vitale Bakterien einer Reinkultur benötigt. Diese erhält man durch einen fraktionierten Ausstrich. Dazu wird mit einer Impföse, die zur Sterilisation über einem Bunsenbrenner abgeflammt wurde, ein Teil von einer Bakterienkolonie einer Arbeitskultur abgenommen und streicht sie auf einem Columbia-Blut-Agar aus. Die Petrischalen werden anschließend über Nacht in einen Brutschrank bei 36°C gelegt.

2.2.1.3 Ausplattierung

Mit Hilfe einer sterilen Impföse entnimmt man jeweils von *E. faecalis* und *E. coli* eine Kolonie und resuspendiert sie jeweils in einem Reagenzglas mit einer 0,9% Natriumchlorid-/0,1% Peptonlösung. Nun pipettiert man aus den Resuspensionen jeweils 100µl auf neue Blut-Agar-Platten. Anschließend streicht man mit Hilfe eines Drigalski-Spatels die Flüssigkeit bis zum Rand der Petrischale aus.

2.2.1.4 Agardiffusionstest der Referenzstämme

Für den Agardiffusionstest nimmt man nun die Petrischalen mit den ausplattierten Bakterien *E. coli* und *E. faecalis*. Mit Hilfe einer Pinzette, die zur Sterilisation in Ethanol gehalten und anschließend abgeflammt wird, platziert man jeweils ein Plättchen mit der Antibiotika-, der Salz- und der Hopfenlösung sowie ein leeres auf den Nährböden. Außerdem legt man noch eines der Miswakzweigstücke dazu. Anschließend kommen die Petrischalen wieder über Nacht bei 36°C in den Brutschrank. Am nächsten Tag werden die Hemmhöfe mit einem Lineal ausgemessen und der Durchmesser notiert.

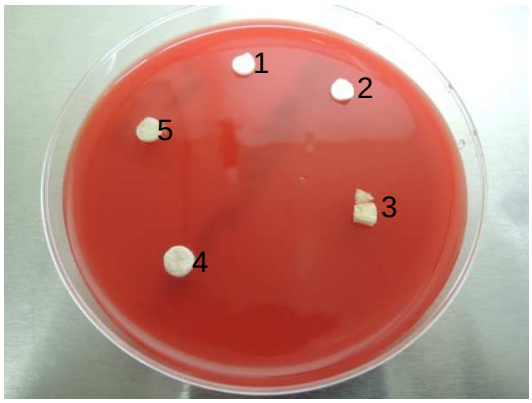


Abbildung 4: Platzierung der Plättchen auf dem Blut-Agar: 1 Antibiotikum (Positivkontrolle), 2 leer (Negativkontrolle), 3 Miswakholz, 4 Miswak-Salz, 5 Hopfenextrakt

2.2.1.5 Entnahme von Keimen von der Zahnoberfläche

Hierzu nimmt man ein Stäbchen aus einem Röhrchen mit steriler Nährbouillon und fährt damit, vor dem Zähneputzen, über die linke, obere Zahnreihe. Anschließend wird das Stäbchen wieder in das Röhrchen gegeben und dieses kurz mit Hilfe des Vortex-Gerätes durchgeschüttelt.

2.2.1.6 Isolation der Keime von der Zahnoberfläche

Zuerst nimmt man das Röhrchen mit dem Abstrich vor dem Putzen und plattiert 100µl der Flüssigkeit auf einem Blut-Agar aus. Dieser wird dann über Nacht bei 36°C bebrütet. Am nächsten Tag entnimmt man mit Hilfe einer Impföse, die zur Sterilisation abgeflammt wird, von der Platte Kulturmaterial von Kolonien, die sich in ihrer Morphologie unterscheiden. Nun streicht man diese mit Hilfe eines fraktionierten Ausstrichs auf einen Blut-Agar. Dies wiederholt man mit einer zweiten und einer dritten Kolonie. Anschließend werden die Petrischalen wieder im Brutschrank bei 36°C über Nacht bebrütet.

2.2.1.7 Agardiffusionstest der Isolate von der Zahnoberfläche

Zuerst bereitet man wieder die fünf Testsubstanzen vor. Danach stellt man eine Resuspension von den Isolaten 1, 2 und 3 her und plattiert sie auf jeweils einem Blut-Agar aus. Nun platziert man wieder die Plättchen mit der Antibiotika-, der Salz- und der Hopfenlösung sowie ein leeres Plättchen auf den Nährböden. Außerdem legt man noch eines der Miswakzweigstücke dazu. Anschließend werden die Petrischalen wieder über Nacht in den Brutschrank gegeben. Am nächsten Tag werden die Hemmhöfe mit einem Lineal ausgemessen und die Durchmesser notiert.

2.2.2 Identifikation der Isolate von der Zahnoberfläche mittels Gesequenzierung

Die isolierten Keime wurden an die „selekt-ID BIOLABS GmbH“ zur Identifikation verschickt. Um den Keim zu bestimmen, wird das 16s rRNA Gene sequenziert und mit einer Datenbank, in der zahlreiche Sequenzen hinterlegt sind, abgeglichen. [4,11]

2.2.3 Antibakterielle Wirkung von Miswak in-vivo

2.2.3.1 Bestimmung der aeroben Gesamtkeimzahl auf der Zahnoberfläche bei Verwendung einer Miswak-Zahnbürste und einer handelsüblichen Zahnbürste

2.2.3.1.1 Entnahme der Keime von der Zahnoberfläche

Zuerst putzt man die Zähne auf der linken Seite mit der Miswak-Zahnbürste, die auf der rechten Seite mit einer herkömmlichen Zahnbürste und Zahnpasta. Mit einem sterilen Stäbchen wird nun von der linken Zahnreihe ein Abstrich gemacht und mit einem weiteren ein Abstrich der rechten Zahnreihe. Die Stäbchen werden nun in ihr jeweiliges Röhrchen mit Nährbouillon gesteckt. Damit sich die Bakterien in der Bouillon verteilen, werden die Röhrchen kurz mit einem Vortex-Gerät gut durchgeschüttelt. Anschließend entfernt man das Stäbchen aus dem Röhrchen. Diesen Vorgang wiederholt man nach 4, 8 und 12 Stunden.

2.2.3.1.2 Herstellung einer Verdünnungsreihe

Um die Anzahl der koloniebildenden Einheiten herauszufinden, muss man eine Verdünnungsreihe anlegen, da die Ansätze eine zu hohe Konzentration von vermehrungsfähigen Mikroorganismen aufweisen und dadurch eine Auszählung direkt aus dem Testansatz nicht möglich ist. Hierzu benötigt man für jede Ausgangslösung vier Reagenzgläser mit einer Natriumchlorid-Peptonlösung. Aus der Ausgangslösung wird mit einer Pipette 1ml in das erste Reagenzglas pipettiert. Mit Hilfe des Vortex wird es gleichmäßig vermischt. Danach wird aus diesem wiederum 1ml entnommen, in das nächste Reagenzgläschen gegeben und wieder im Vortex homogenisiert. Dies wiederholt man bis zum vierten Reagenzgläschen. Nun hat man eine Verdünnungsstufe von 10^{-4}.

2.2.3.1.3 Bestimmung der aeroben Gesamtkeimzahl von der Zahnoberfläche mit Hilfe von Petrifilmen

Nun benötigt man Petrifilme. Dies sind gebrauchsfertige Nährböden, die ein Geliermittel enthalten sowie einen Indikator, der sich bei Bakterien rosa bis rot verfärbt. So wird später eine leichtere Zählung der Kolonien ermöglicht. Um verwertbare Ergebnisse zu erzielen, werden die Verdünnungsstufen so gewählt, dass zwischen 10 bis 200 Kolonien je Petrifilm zu erwarten sind. Also wählt man für die Abstriche, die nach dem Putzen gemacht wurden, die Verdünnungsstufen 0 bis -4. Man macht einen Doppelansatz, das bedeutet, dass man für jede Verdünnungsstufe zwei Petrifilme verwendet. Diese werden auf einer ebenen Fläche platziert. Nun entnimmt man mit Hilfe einer sterilen Pipette 1ml der verschiedenen Verdünnungsstufe. Man fängt mit der höchsten Verdünnungsstufe an. Man hebt die Folie auf dem Petrifilm leicht an und pipettiert die Flüssigkeit in die Mitte. Anschließend deckt man die Folie wieder langsam und vorsichtig darüber. Damit die Probe gleichmäßig verteilt wird, legt man einen Stempel an und drückt für ungefähr 10s auf

die Mitte. Nun lässt man die Probe einige Zeit liegen, damit sich das Gel verfestigen kann. Danach werden die Petrifilme für 2 Tage im Brutschrank bei 36°C bebrütet. Nach zwei Tagen können die Petrifilme entnommen und die Kolonien mit Hilfe einer Lupe gezählt werden. Hierbei beginnt man mit der niedrigsten Verdünnungsstufe. Es werden nur Petrifilme ausgewertet, auf denen zwischen 10 und 200 Kolonien gewachsen sind. Die Konzentration aerober Mikroorganismen in der Ausgangslösung berechnet man anschließend mit folgender Formel.

$$3*(A+B+C+D+.../m*1+n*0,1+...)*10^{x}$$

Hierbei stehen A,B,C,D usw. für die Ergebnisse bei der Auszählung der Kolonien auf den Petrifilmen, m für die Anzahl der Proben der niedrigsten auswertbaren Verdünnungsstufe, n für die Anzahl der nächst höheren usw. und x für den Faktor der niedrigsten auswertbaren Verdünnungsstufe. Man multipliziert dies noch mit dem Faktor 3, da man mit 3ml Ausgangslösung beginnt, aber nur 1ml für die Verdünnungsreihe entnommen wird.

2.2.3.1.4 Bestimmung der aeroben Gesamtkeimzahl auf dem Miswakköpfchen und dem handelsüblichen Zahnbürstenkopf

Zuerst schneidet man die Borsten der handelsüblichen Zahnbürste ab und überführt sie in ein Röhrchen mit Nährbouillon. Nun nimmt man das benutzte Miswakköpfchen und legt es ebenfalls in ein Röhrchen. Beide werden auf dem Vortex durchgeschüttelt und so homogenisiert. Jetzt legt man eine Verdünnungsreihe von 0 bis -2 an. Anschließend beimpft man die Petrifilme ebenfalls von 0 bis -2 und bebrütet diese dann bei 36°C für zwei Tage im Brutschrank. Nach zwei Tagen werden die Kolonien ausgezählt und gegebenenfalls die Konzentration in der Ausgangslösung berechnet.

3 Ergebnisse

3.1 Antibakterielle Wirkung von Miswak in vitro – Agardiffusionstest

3.1.1 Bestimmung der Hemmhöfe verschiedener Substanzen

	E. coli	***E. faecalis***	**Isolat1**	**Isolat2**	**Isolat3**
Antibiotika	23mm	34mm	62mm	40mm	60mm
Hopfen	0	10mm	n.a.	14mm	16mm
SWAK-Salz	0	0	16mm	15mm	14mm
Miswakholz	0	11mm	17mm	19mm	32mm
Negativkontolle	0	0	n.a.	0	0

Tabelle 1: Es sind die Hemmhöfe der Substanzen Antibiotika, Hopfen, SWAK-Salz und Miswakholz dargestellt. Diese Substanzen sind auf den Teststämmen *E. coli, E. faecalis* und den Isolaten 1, 2 und 3 von der Zahnoberfläche untersucht wurden. Außerdem ist in der Tabelle zusätzlich noch die Negativkontrolle, ein leeres Plättchen mit aufgeführt. Die Negativkontrolle sowie der Hopfen konnten bei Isolat2 nicht ausgewertet werden, da der Hemmhof des Antibiotikums diese Plättchen mit einschloss.

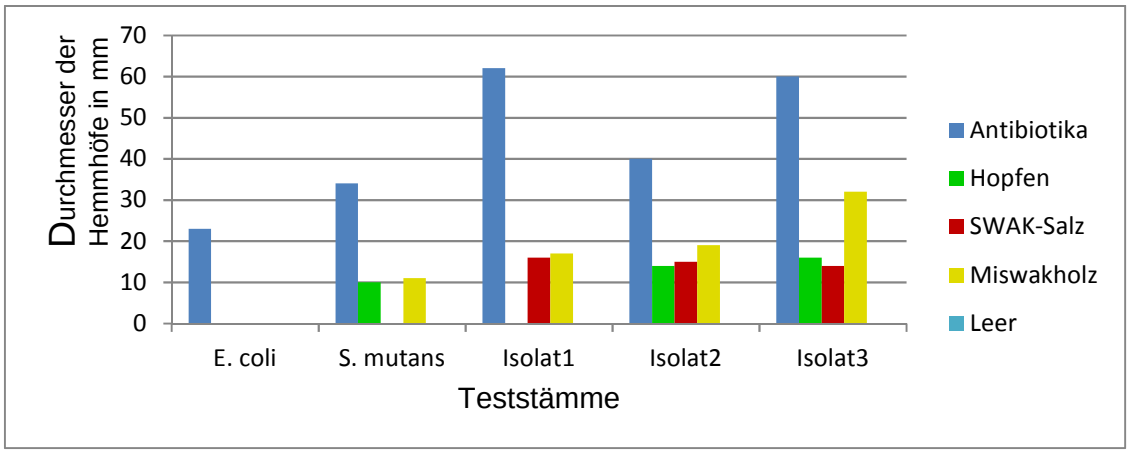
Abbildung 5: Agardiffusionstest *E. faecalis*

Abbildung 6: Agardiffusionstest Isolat1

Abbildung 7: Agardiffusionstest Isolat2

Abbildung 8: Agardiffusionstest Isolat3

3.1.2 Vergleich der getesteten Substanzen



Grafik 1: In dieser Grafik sind die Hemmhöfe der Testsubstanzen Antibiotika, Hopfen, SWAK-Salz und Miswakholz dargestellt. Diese Substanzen sind auf den Teststämmen E. coli, E. faecalis und den Isolaten 1, 2 und 3 untersucht wurden. Außerdem ist in der Grafik zusätzlich noch die Negativkontrolle, ein leeres Plättchen mit aufgeführt, welches für alle Teststämme den Wert 0 annimmt. Die Negativkontrolle sowie der Hopfen konnten bei Isolat1 nicht ausgewertet werden, da der Hemmhof des Antibiotikums diese Plättchen mit einschloss. Diese nehmen in der Grafik ebenfalls die Werte 0 an.

Das Antibiotikum inhibierte als einzige Testsubstanz alle Bakterienstämme. Hopfen und das Miswakholz zeigten bei allen Bakterien außer *E. coli* eine Wirkung. Im Gegensatz zum SWAK-Salz, welches weder auf *E. coli,* noch auf *E. faecalis* eine Auswirkung zeigte. Das Antibiotikum hatte bei allen Teststämmen auch den größten inhibierenden Effekt. Allerdings besaß das Miswakholz bei *E. faecalis* und den Isolaten 1, 2 und 3 nach dem Antibiotikum die stärkste Auswirkung. Das Antibiotikum hatte den größten Hemmhof bei Isolat1, der Hopfen und das Miswakholz bei Isolat3 und das SWAK-Salz bei Isolat1. Den kleinsten Hemmhof zeigten das Antibiotikum bei *E. coli*, der Hopfen und das Miswakholz bei *E. faecalis* und das SWAK-Salz bei Isolat3. Der Hopfen sowie die Negativkontrolle konnten bei dem Isolat1 nicht ausgewertet werden, da der Hemmhof des Antibiotikums diese Plättchen mit einschloss.

Außerdem wuchs bei dem Agardiffusionstest von Isolat1 ein weiteres Bakterium um das SWAK-Salz und das Miswakholzstück.

3.2 Identifikation der Isolate von der Zahnoberfläche

Die folgenden Bilder zeigen die Keime von der Zahnoberfläche. Man sieht deutlich die unterschiedliche Morphologie der verschiedenen Keime.

3.2.1 Bestimmung der Isolate mittels Gensequenzierung

Der Abgleich der Sequenzdaten der 16s rRNA Sequenzierung mit der Datenbank durch „selekt-ID BIOLABS GmbH“ ergab folgende Ergebnisse:

Isolat1 ist die grampositive Kokke *Rothia dentocariosa*, welche früher als *Stomatococcus mucilaginosus* bekannt war. Sie ist Teil der natürlichen Flora der oberen Atemwege sowie

des Rachenraumes und wird häufig mit Karies assoziiert. Invasive Erkrankungen treten überwiegend bei immungeschwächten, aber selten bei gesunden Patienten auf. [12] Isolat2 ist *Neisseria macacae* und gehört zu den gramnegativen Oxydase-positiven Diplokokken. Die meisten sind harmlos und leben auf der Schleimhaut und der Zahnoberfläche. [7,15]. Isolat3 ließ sich nicht identifizieren.

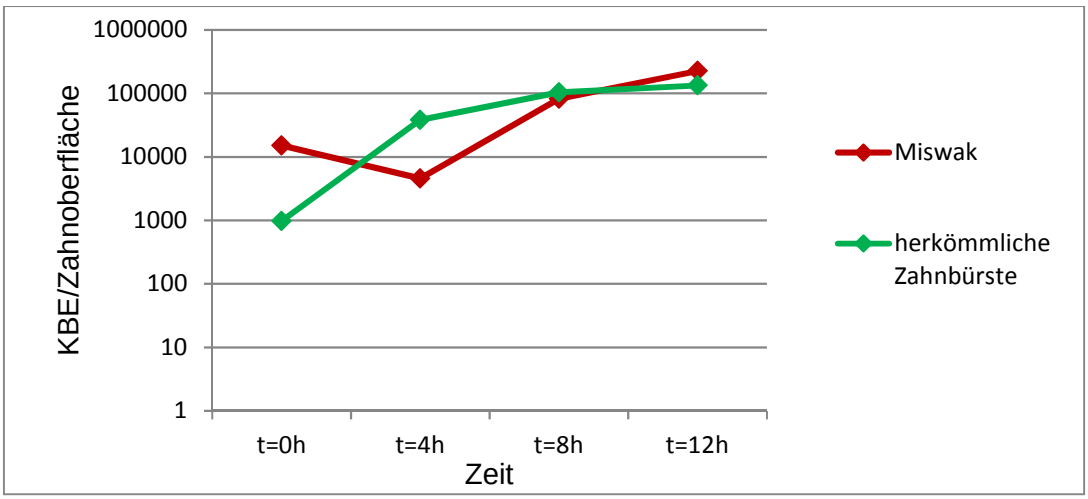
3.3 Antibakterielle Wirkung von Miswak in vivo

3.3.1 Aerobe Gesamtkeimzahl auf der Zahnoberfläche nach Verwendung einer Miswak-Zahnbürste und einer handelsüblichen Zahnbürste

	Aerobe Gesamtkeimzahl t=0h (KBE/Zahnoberfläche)	**Aerobe Gesamtkeimzahl t=4h (KBE/Zahnoberfläche)**	**Aerobe Gesamtkeimzahl t=8h (KBE/Zahnoberfläche)**	**Aerobe Gesamtkeimzahl t=12h (KBE/Zahnoberfläche)**
Miswak	$1{,}52 \times 10^4$	$4{,}58 \times 10^3$	$8{,}25 \times 10^4$	$2{,}25 \times 10^5$
Normale Zahnbürste	$9{,}75 \times 10^2$	$3{,}83 \times 10^4$	$1{,}04 \times 10^5$	$1{,}34 \times 10^5$

Tabelle 2: In dieser Tabelle ist die aerobe Gesamtkeimzahl auf der Zahnoberfläche dargestellt, nachdem mit der Miswak-Zahnbürste und der herkömmlichen Zahnbürste geputzt wurde. Die Werte wurden zu den Zeiten t=0h, t=4h, t=8h und t=12h nach dem Putzen mit Miswak und der herkömmlichen Zahnbürste ermittelt.

3.3.2 Vergleich der aeroben Gesamtkeimzahlen auf der Zahnoberfläche nach Verwendung einer Miswak-Zahnbürste und einer herkömmlichen Zahnbürste



Grafik 2: In diesem Diagramm sind die Werte der aeroben Gesamtkeimzahl auf der Zahnoberfläche nach dem Putzen mit einer Miswak-Zahnbürste und einer herkömmlichen Zahnbürste im zeitlichen Verlauf dargestellt.

Direkt nach dem Putzen (t=0h) war die aerobe Gesamtkeimzahl auf der Zahnoberfläche, die mit Miswak geputzt wurde, mehr als 10^2-mal so hoch wie die auf der Zahnoberfläche, die mit einer herkömmlichen Zahnbürste geputzt wurde. Allerdings stieg die mikrobielle Belastung bei der herkömmlichen Zahnbürste dann deutlich an und war nach 4 Stunden 10^2-mal so hoch wie am Anfang. Dagegen ist die mikrobielle Belastung beim Miswak nach 4 Stunden gefallen. Nach 8 Stunden ist bei beiden die Gesamtkeimzahl angestiegen. Obwohl dies beim Miswak schneller geschah als bei der herkömmlichen Zahnbürste, war die mikrobielle Belastung nach 8 Stunden beim Misak trotzdem geringer als bei der herkömmlichen Zahnbürste. Die Werte liegen aber doch sehr nah beieinander. Nach 12 Stunden ist die aerobe Gesamtkeimzahl von der Miswak-Zahnoberfläche ein wenig größer als die der herkömmlichen Zahnbürste. Die Steigung beim Miswak ist größer als die bei der normalen Zahnbürste, aber die Steigung hat bei beiden abgenommen. Am Ende ist die mikrobielle Belastung auf der Zahnoberfläche, die mit Miswak geputzt wurde, ungefähr 15-mal so hoch wie am Anfang. Die Belastung auf der Zahnoberfläche, die mit der herkömmlichen Zahnbürste geputzt wurde, ist im am Ende ungefähr 137-mal so hoch wie am Anfang.

3.3.3 Aerobe Gesamtkeimzahl auf dem Miswakköpfchen sowie auf dem handelsüblichen Zahnbürstenkopf aus Kunststoff

	Aerobe Gesamtkeimzahl (KBE / Bürstenkopf)
Miswakköpfchen	$1{,}2 \times 10^2$
Zahnbürstenkopf	$1{,}2 \times 10^4$

Tabelle 3: In dieser Tabelle wird die aerobe Gesamtkeimzahl auf dem Miswakköpfchen der aeroben Gesamtkeimzahl auf dem handelsüblichen Zahnbürstenkopf gegenübergestellt. Dies wird in der Einheit KBE/Bürstenkopf angegeben.

Abbildung 24: Verdünnungsreihe, Petrifilme, Miswakköpfchen, Doppelansatz, nach 1 Tag

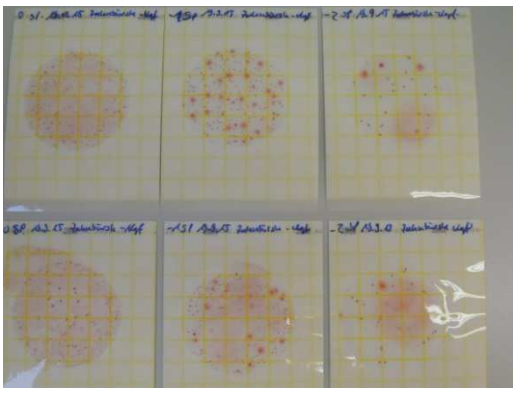
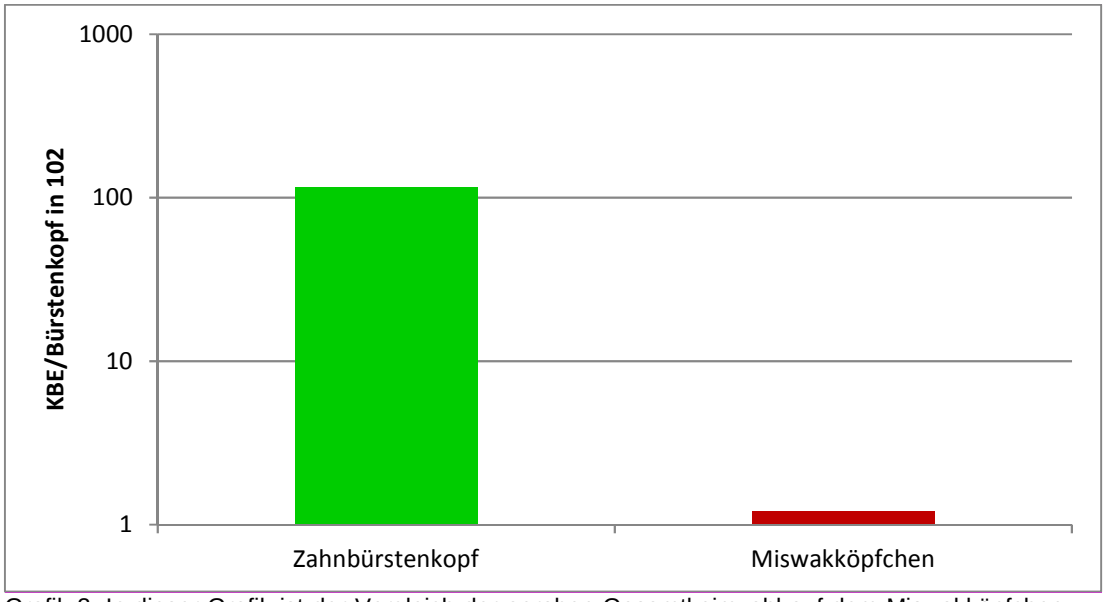


Abbildung 25: Verdünnungsreihe, Petrifilme, herkömmlicher Zahnbürstenkopf , Doppelansatz, nach 1 Tag

3.3.4 Vergleich des Miswakköpfchens mit dem handelsüblichen Zahnbürstenkopf



Grafik 3: In dieser Grafik ist der Vergleich der aeroben Gesamtkeimzahl auf dem Miswakköpfchen mit der aeroben Gesamtkeimzahl auf dem handelsüblichen Zahnbürstenkopf dargestellt.

Das Miswakköpfchen zeigt eine deutlich geringere aerobe Gesamtkeimzahl als der handelsübliche Zahnbürstenkopf. Die Anzahl der KBE des Zahnbürstenkopfes ist 10^2 -mal so hoch wie die des Miswakköpfchens.

4 Diskussion

4.1 In-vitro Experimente

Im Rahmen dieser Arbeit soll die Frage geklärt werden, ob die Verwendung eines Zahnbürstenaufsatzes aus Miswakholz nur eine alternative mechanische Reinigung der Zahnoberfläche darstellt oder darüber hinaus auch mikrobielles Wachstum unterbindet und somit der Medizin einen Ansatz liefert neue Wirkstoffe im Kampf gegen Bakterien zu entwickeln.

Dazu wurden zuerst zwei Bakterienstämme, die sich im Hinblick auf ihre Gramfärbung unterscheiden, mit Hilfe eines Agardffusionstests untersucht.

Dieser Agardiffusionstest mit dem gramnegativen Referenzstamm *E. coli* und dem grampositiven Referenzstamm *E. faecalis* hat deutlich gezeigt, dass der Inhaltsstoff des Miswakholzes einen inhibierenden Effekt auf Mikroorganismen hat.

Allerdings wirkt dieser nur bei dem grampositiven Bakterium *E. faecalis*. Bei dem gramnegativen Bakterium *E. coli* ließ sich hingegen keine Wirkung feststellen. Diese beiden verschiedenen Bakterienarten unterscheiden sich im Wesentlichen durch ihre Zellwand. Bei grampositiven Bakterien ist die Zellwand deutlich dicker als bei den gramnegativen.

Dafür besitzen gramnegative Bakterien noch eine zusätzliche äußere Zellmembran. Dies könnte ein erster Hinweis sein, dass die Wirkung des Miswak in Zusammenhang mit der Zellwandsynthese steht. [16]

Nach dem ersten Agardiffusionstest mit den oben genannten Referenzstämmen wurde die Untersuchung auf Isolate von der Zahnoberfläche ausgedehnt. Bei diesen Isolaten handelt es sich um aerobe Bakterien, denn bei Erwachsenen herrschen in der supragingivalen Plaque grampositive aerobe Kokken vor. Dagegen sind in der subgingivalen Plaque hauptsächlich grampositive Anaerobier zu finden. [8]

In diesem in-vitro Versuch hat man deutlich gesehen, dass Miswak auf alle drei getesteten Isolate aus dem Mund einen inhibierenden Effekt hat. Da es sich beim Isolat1 um das grampositive Bakterium Rothia dentocariosa handelt, während das Isolat2 eine gramnegative Diplokokke der Gattung Neisseria ist, wirken folglich sowohl das Miswakholz als auch das SWAK-Salz inhibierend auf beide, grampositive und gramnegative Bakterien.

Diese Beobachtung wird auch unterstützt durch eine frühere in-vitro Studie, deren Ergebnis besagt, dass die in Miswak vorliegenden wirksamen Substanzen ein breites Spektrum an antibakterieller Aktivität zeigen und Auswirkungen auf fast alle Bakterienarten, unabhängig von der Gram-Färbung, aufweisen. [6,10]

Daraus lässt sich schließen, dass Miswak möglicherweise doch keine Auswirkung auf die Zellwandsynthese hat, da es auch bei einem gramnegativen Bakterium wirkt. Deshalb muss Miswak einen anderen Wirkungsmechanismus besitzen.

4.2 In-vivo Experimente

Das in-vitro Experiment hat gezeigt, dass Miswak eine inhibierende Wirkung auf einige Bakterien hat. Nun wurde die Untersuchung auf ein in-vivo Experiment ausgedehnt. Damit wurde untersucht, ob der Inhaltsstoff von Miswak auch im Mund selbst eine antibakterielle Wirkung hat.

Die Ergebnisse der quantitativen Bestimmung der bakteriellen Besiedelung der Zahnoberfläche bei Verwendung einer Miswak-Zahnbürste und einer handelsüblichen Zahnbürste deuten darauf hin, dass Miswak zwar bei dem Putzvorgang selbst weniger Bakterien entfernt als die herkömmliche Zahnbürste. Dies könnte an der größeren Oberfläche des herkömmlichen Zahnbürstenkopfs liegen. Aber danach inaktiviert Miswak, im Gegensatz zu der herkömmlichen Zahnbürste mit Zahnpasta, weitere Bakterien. Dies deutet darauf hin, dass der Inhaltsstoff als eine Art Schutz auf den Zähnen bleibt und weiterhin für eine gewisse Zeit das Wachstum von Bakterien inhibiert und sogar einige Bakterien abtötet. Da ein durchschnittlicher Mensch meist am Morgen und am Abend Zähne putzt, befinden sich auf der mit Miswak geputzten Zahnoberfläche in diesem relevanten Zeit-

raum von ungefähr 12 Stunden zwischen dem morgendlichen und abendlichen Zähneputzen insgesamt betrachtet weniger Bakterien als auf der Zahnoberfläche, die mit der herkömmlichen Zahnbürste geputzt wurde. Daraus lässt sich folgern, dass man die Miswak-Zahnbürste durchaus als Ersatz für die herkömmliche Zahnbürste verwenden kann. Das Experiment hat deutlich gezeigt, dass Miswak auch in einem in-vivo Experiment eine inhibierende Wirkung hat. Die Bakterienzahl auf der Zahnoberfläche, die mit Miswak geputzt wurde, nahm nach dem Putzen stark ab, während sie bei der Zahnoberfläche, die mit der herkömmlichen Zahnbürste geputzt wurde, die ganze Zeit über anstieg.

Darüber hinaus ist das Miswakköpfchen auch nach längerem Gebrauch weniger mikrobiell belastet als die herkömmliche Zahnbürste. Dadurch werden, auf längere Zeit gesehen, weniger Bakterien von der Zahnbürste in den Mund und auf die Zahnoberflächen übertragen.

4.3 Eignung des Miswakinhaltsstoffes als Antibiotikum

Die Versuche lassen erkennen, dass Miswak sowohl in einem in-vitro Experiment als auch in einem in-vivo Experiment einen inhibierenden Effekt auf Mikroorganismen aufweist. Miswak wurde in den westlichen Ländern in den letzten Jahren kaum verwendet, da dort in den meisten Läden nur konventionelle und elektrische Zahnbürsten angeboten werden. Also könnte man den Wirkstoff des Miswakholzes isolieren und eventuell versuchen, ein neues Antibiotikum als Alternative zu den bekannten Antibiotika, die auf Grund von Resistenzen nicht mehr wirken, zu entwickeln. [16]

Allerdings wäre dieses aus Miswak gewonnene, neue Antibiotikum auch kein Allheilmittel, da es auf einige Mikroorganismen ebenfalls keine Wirkung zeigt. So zum Beispiel bei *E. coli* oder dem Bakterium, welches im Versuch um das Holz und das Miswak-Salz gewachsen ist.

Überdies ist eine wesentliche Ursache der Problematik mit bakteriellen Resistenzen die genetische Variabilität der Bakterien, die es ihnen ermöglicht, gegen jedes Antibiotikum Resistenzen entwickeln zu können. [16]

4.4 Ausblick

Weiterführend könnte man die Wirkungsweise des Miswakinhaltsstoffes herausfinden, indem man weitere Agardiffusionstests mit Bakterien durchführt, die genau eine, bereits bestimmte Resistenz aufweisen. [16]

Außerdem könnte man in Tests mit resistenten Bakterienstämmen herausfinden, ob ein Miswak-Antibiotikum geeignet wäre, das Problem der Resistenzbildung zu umgehen. Dazu wären weiterführende Versuche mit mehrfachresistenten Bakterien notwendig.

5 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
E. coli	*Escherichia coli*
E. faecalis	*Enterococcus faecalis*
S. mutans	*Streptococcus mutans*
KBE	Koloniebildende Einheiten
n.a	Nicht auswertbar
NaCl	Natriumchlorid
%	Prozent
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
G	Gramm
Mg	Milligramm
Ml	Milliliter
Mm	Millimeter
H	Stunden
comp.	Company
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
HVG	Hopfenverwertungsgenossenschaft
UG	Unternehmergesellschaft

6 Literaturverzeichnis

6.1 Internetquellen

[1] Opti Dent Suisse Lexikon: „Mundflora, Bakterien, Viren und Pilze im Mund, Zahnmedizin“ http://www.zahn-lexikon.com/index.php/m/40-a-z/r-lexikon/2204-mundflora, aufgerufen am 09.09.2015

[2] Opti Dent Suisse Lexikon: „Zahnkaries, Loch im Zahn, Kariologie bei Zahnerkrankungen“ http://www.zahnarzt-zahnbehandlung.com/index.php/medizin-zahn/kariologie?showall=&start=6, aufgerufen am 09.09.2015

[3] Opti Dent Suisse Lexikon: „Zahnpflege“ http://www.zahn-lexikon.com/index.php/z?id=556:zahnpflege&catid=53, aufgerufen am 09.09.2015

[4] selekt-ID BIOLABS GmbH: http://www.selekt-id.de/bestimmung-von-mikroorganismen-durch-sequenzvergleich-des16s-rrna-gens-bzw-der-its-regionen/, aufgerufen am 25.10.2015

[5] Spektrum Lexikon: „*Salvadora persica*“ http://www.spektrum.de/lexikon/arzneipflanzen-drogen/salvadora-persica/12833, aufgerufen am 10.09.2015

6.2 Fachzeitschriften

[6] Amir Alireza, RG., et al., Inhibitory activity of Salvadora persica extracts against oral bacterial strains associated with periodontitis: An in-vitro study, in: J Oral Biol Craniofac Res. 2014 Jan-Apr, Nr. 4(1), S. 19-23

[7] Bennett, JS., et al., A genomic approach to bacterial taxonomy: an examination and proposed reclassification of species within the genus Neisseria, in: Microbiology, 2012 Jun, Nr. 158(Pt 6), S. 1570–1580

[8] Daniluk, T., et al., Aerobic and anaerobic bacteria in subgingival and supragingival plaques of adult patients with periodontal disease, in: Adv Med Sci. 2006, Nr. 51 Suppl 1, S. 81-5

[9] Gradmann, C., Antibiotika und Antibiotikaresistenz – Infektionskrankheiten und ihre Kontrolle im 20. Jahrhundert, in: Krankenhaushygiene up2date, 2014 Juni, Nr. 2, S. 109 – 120

[10] Haque, MM., et al., A review of the therapeutic effects of using miswak (Salvadora Persica) on oral health, in: Saudi Med J. 2015 May, Nr. 36(5), S. 530–543

[11] Janda, JM., 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls, in: J Clin Microbiol. 2007 Sep, Nr. 45(9), S. 2761–2764

[12] Ramanan, P., et al., Rothia Bacteremia: a 10-Year Experience at Mayo Clinic, Rochester, Minnesota, in: J Clin Microbiol, 2014 Sep, Nr. 52(9), S. 3184–3189

[13] Sukkarwalla, A., et al., Efficacy of miswak on oral pathogens, in: Dent Res J (Isfahan). 2013 May, Nr. 10(3), S. 314-20

[14] Tomanski, D., et al., Alte Antibiotika im neuen Glanz – Wiederentdeckung älterer Antibiotika im Zeitalter der Problemkeime, in: Krankenhaushygiene up2date, 2013 Sep, Nr. 3, S. 185 – 196

[15] Weyand, NJ., et al., Neisseria infection of rhesus macaques as a model to study colonization, transmission, persistence, and horizontal gene transfer, in: Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Feb 19, Nr. 110(8), S. 3059–3064

6.3 Bücher

[16] Kayser, FH., Medizinische Mikrobiologie, Zürich, Verlag Thieme, ^{12}2010

6.4 Abbildungen

Abbildung 2: http://allmiswak.weebly.com/miswak-tree.html, aufgerufen am 05.11.2015, 15.13 Uhr

Abbildung 13:
http://www2.hawaii.edu/~johnb/micro/m140/syllabus/week/handouts/m140.7.1.htm, aufgerufen am 05.11.2015, 15.16 Uhr

Abbildungen Titelblatt:

Salvadora persica Baum:
https://www.flickr.com/photos/sqmehdi/6890521865/in/photostream/, aufgerufen am 05.11.2015, 16.54 Uhr

Zähne: http://www.keil-zahnarzt.de/vorsorge.html, aufgerufen am 05.11.2015, 17.00 Uhr

Antibiotika: http://gesund.co.at/was-sind-antibiotika-25940/, aufgerufen am 05.11.2015, 17.03 Uhr

Danksagung

Die Versuche wurden in den Räumlichkeiten des analytischen Labors von Frau Dr. Graser in Schonungen durchgeführt. Ohne die freundliche Unterstützung durch Frau Dr. Graser wäre die Realisierung meiner Arbeit nicht möglich gewesen, da sie mir die Materialien und die Geräte, die ich für den Versuch benötigt habe, zur Verfügung gestellt hat.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Preuß, Leiter der Mikrobiologie im Labor von Frau Dr. Graser, für seine überaus engagierte Betreuung bei allen Versuchen und seine Geduld beim Einweisen in die mikrobiologischen Arbeitstechniken. Er war es auch, der dieses interessante und hochaktuelle Thema vorgeschlagen hat und mir dadurch einen faszinierenden Einblick in die Welt der Mikroorganismen gewährt hat.

Bedanken möchte ich mich auch bei meiner Lehrerin Frau Renninger für ihre fundierte Einweisung in die Methodik der Seminararbeit und ihre Bereitschaft, jederzeit die Arbeitsschritte zu besprechen.