

Inhibitorische Wirkung von Pflanzenextrakten auf *Escherichia coli* und auf mikrobielle Mischpopulationen

STUHLBACHER A. & TRINKAUS P.

1. Einleitung

Die Zugabe von Inhibitoren zur Konservierung von Lebensmitteln, Pharmazeutika und Kosmetika ist in vielen Fällen die zentrale Voraussetzung, um entsprechende Haltbarkeiten und Produktstabilitäten erzielen zu können. Zur Ermittlung der maximalen Haltbarkeit dieser Produkte ist vielfach auch die quantitative Bestimmung der inhibitorischen Wirkung von Substanzen, die den Produkten zur Hemmung des Wachstums eventuell vorhandener Mikroorganismen zugesetzt wurden, erforderlich. Gleichermäßen können mit dieser Methodik die bakterioziden oder bakteriostatischen Wirkungen von Hemmstoffen bestimmt werden.

Ziel dieser Untersuchungen war zunächst das eingesetzte Prüfverfahren zur Feststellung der inhibitorischen Wirkungen von Substanzen hinsichtlich seiner Einsatzmöglichkeiten zu testen und in einem ersten Screening ausgewählte Pflanzenextrakte von Arten, deren keimhemmende Wirkung bereits aus der Literatur weitgehend bekannt war, auf ihre unterschiedliche Wirksamkeit hin zu prüfen.

Die nachfolgend dargelegten Arbeiten erfolgten im Rahmen des Projekts INNUPLANT (Innovative Nutzung von Pflanzen) gefördert durch das Bundesministerium für Verkehr, Infrastruktur und Technologie (SCHNITZER & al. 2001). Eine erste übersichtsmäßige Darstellung der Ergebnisse lieferten STUHLBACHER & TRINKAUS 2002.

2. Material und Methoden

Grundlage der Untersuchungen bildet ein mikrobielles Detektionssystem basierend auf der elektrischen Impedanzmessung. Die Untersuchungen erfolgten unter Verwendung des BacTrac Impedanzanalysators (Mikrobiologisches Multi-Monitoring-System). Durch die mikrobiellen Stoffwechselfvorgänge kommt es zu einer Veränderung der Ionenkonzentration im Kulturmedium und an der Oberfläche der Messelektroden.

Das Messgerät registriert in spezifischer Weise die daraus resultierenden zeitlichen Änderungen der Impedanz. Als Referenzstamm zur Beurteilung der inhibitorischen Wirkungen wurde *Escherichia coli*, ein gramnegatives Bakterium aus der Familie der Enterobacteriaceae, welches sich leicht nachweisen lässt und als Indikator bei fäkalen Verunreinigungen dient (BECKER & REICHLING 1999), eingesetzt.

Zusätzlich zu den Varianten mit Bakterienreinkulturen wurden exemplarische Untersuchungen zur inhibitorischen Wirkung von Pflanzenextrakten an mikrobiellen Mischpopulationen einer Abwasserprobe aus einem Kläranlagenablauf durchgeführt.

Als synthetische Referenzsubstanzen wurden Phenoxyethanol, Benzylalkohol (10% EtOH) und B-, E-, M-,P-Paraben (1:1:1:1, 5% EtOH) eingesetzt.

Die verwendeten Pflanzenextrakte stammten von *Filipendula ulmaria* (96% EtOH),

Alpinia officinarum (96% EtOH), *Populus nigra* (96% EtOH), *Curcuma xanthorrhiza* (96% EtOH) und *Populus balsamifera* (96% EtOH). Bei den zur Familie der Zingiberaceae gehörigen *Alpinia officinarum* und *Curcuma xanthorrhiza* wurden für die Herstellung der Extrakte die Rhizome verwendet, bei *Filipendula ulmaria* (Familie Rosaceae) die oberirdische Phytomasse und bei den beiden Pappelarten (Familie Salicaceae) die Knospen.

Über-Nacht-Kulturen von *Escherichia coli* und einer mikrobiellen Mischkultur wurde mit einer 0,9% NaCl-Lösung auf 5×10^5 verdünnt. Im Doppelansatz wurden anschließend sterile Messzellen mit 9ml sterilem Bimedia 160C befüllt, mit je 1ml der verdünnten Vorkultur beimpft und die zu untersuchenden Pflanzenextrakte in Konzentrationen von 50-200µl zugesetzt.

Die Basisuntersuchungen wurden mit Kulturen von *Escherichia coli* mit einer Ausgangskonzentration von $9 \cdot 10^5$ KBE/ml durchgeführt.

Die Werte für die prozentuellen Keimhemmungen wurden auf eine Kommastelle gerundet.

Sämtliche im Rahmen dieser Arbeit interpretierten Analysedaten sind MACKWITZ & al. 2001 und STEINLECHNER & al. 2001 zu entnehmen.

3. Ergebnisse

3.1 Inhibitorische Wirkungen auf *Escherichia coli*

Das Extrakt aus Knospen von *Populus balsamifera* (Balsam-Pappel) weist mit 100% die mit Abstand effizienteste keimhemmende Wirkung auf. Auf die desinfizierenden Eigenschaften von Harzen aus Knospen der Balsam-Pappel wird später noch detaillierter eingegangen. Etwas schlechter waren die Ergebnisse mit den Extrakten aus *Populus nigra* (Schwarz-Pappel) mit 99,7% und Javanische Gelbwurz (*Curcuma xanthorrhiza*) mit 98,3%, während die Extrakte von Echtem Mädesüß (*Filipendula ulmaria*) mit 92,3% und Galgant (*Alpinia officinarum*) mit 89,3% deutlich schlechter abschnitten.

Noch stärker zeigt sich die Überlegenheit der Extrakte aus Knospen von *Populus balsamifera* gegenüber den anderen Pflanzenextrakten bei geringeren Konzentrationen, und zwar mit Keimhemmungsraten von 99,9%. Deutlich schlechter waren die Ergebnisse mit den Extrakten aus Javanischer Gelbwurz mit 81,0% und aus Schwarz-Pappel mit 56,2%. Die Extrakte von Echtem Mädesüß (*Filipendula ulmaria*) zeigten mit 29,9% und die von Galgant (*Alpinia officinarum*) mit 11,9% nur mehr sehr geringe keimhemmende Wirkungen.

Verglichen mit den synthetischen Substanzen schneiden die Extrakte aus Knospen von *Populus balsamifera* und auch die aus den Rhizomen von *Curcuma xanthorrhiza* unter den angeführten Versuchsbedingungen bei allen Konzentrationen besser ab, wobei auch hier die Unterschiede bei geringeren Konzentrationen (99,9% Keimhemmungsraten bei der Balsampappel gegenüber 41,7% bei Benzylalkohol und 61,4% bei Paraben) deutlicher sind.

Die Gattung *Populus* ist in Europa, Nordamerika, Nordafrika und Asien mit etwa 35 Arten vertreten. Es handelt sich durchwegs um sommergrüne, raschwüchsige, zweihäusige Bäume (selten Sträucher) mit wechselständigen Blättern. Die Gattung wird laut KRÜSSMANN 1977 in vier Sektionen untergliedert, nämlich in die

Sektionen Leuce (Weiß- und Zitter-Pappeln), Leucoides (Großblatt-Pappeln), Tacamahaca (Balsam-Pappeln) und Aigeros (Schwarz-Pappeln). Beim Harz der Knospen der Balsam-Pappel handelt es sich um einen wachsartigen, wohlduftenden Balsam (ätherische Öle und Gerbstoffe) mit desinfizierenden Eigenschaften, der schon von amerikanischen Ureinwohnern gegen Erkältungen, Tuberkulose, Rheumatismus, bei Verbrennungen und offenen Wunden als natürliches Heilmittel verwendet wurde.

In Mitteleuropa wurden und werden die Extrakte zur Heilung von chronischer Polyarthritis, Hämorrhoiden, offenen Wunden, Fieberblasen, Brandwunden, Knochenbrüchen, Blasenleiden, Rheumatismus und Prostataleiden verwendet. Auch vom Einsatz in der Tiermedizin zur Beschleunigung der Wundheilung bei Haustieren wird berichtet (MACKWITZ 1999). Folgende keimhemmende Inhaltstoffe können charakterisiert werden: Phenolglycoside, Gallensäure-Tannine, phenolische Säuren, Salicin, Populin, Chrysin, [alpha]-Caryophyllen, Cineol, Bisabolol, Farnesol, Acetophenon und verschiedene Flavone. Im Vergleich mit herkömmlichen Konservierungsmitteln, die jedoch oftmals krebserregende Substanzen, Verbindungen, die im Verdacht stehen krebserregend zu sein und allergieauslösende Substanzen enthalten (siehe ADLER & MACKWITZ 1991), zeigen diese Extrakte an allen Prokaryontenkulturen (siehe auch STEINLECHNER & al. 2001) und Eukaryontenkulturen ähnliche keimhemmende Wirkung.

Auch aus den Knospen der Schwarz-Pappel (*Populus nigra*) erhält man durch Destillation mit Wasserdampf ein ätherisches Öl (GILDEMEISTER & HOFMANN 1929). Verglichen mit den Zitter- und Grau-Pappeln ist bei der Schwarz-Pappel die Heilkraft stärker (MACHATSCHEK 1999), wie aus dieser Arbeit hervorgeht sind die keimhemmenden Eigenschaften der Schwarz-Pappel jedoch geringer als die der Knospen der Balsam-Pappeln. Bislang durchgeführte phytopathologische Untersuchungen ergaben, dass auch die keimhemmenden Wirkung von Rindensubstanzen auf diverse phytopathogene Pilze bei Balsam-Pappeln oder auch bei Balsam-Pappel-Hybriden wesentlich stärker ist als bei anderen Pappelarten (TRINKAUS 1988, TRINKAUS 2000).

Die Vertreter der Familie Zingiberaceae akkumulieren ätherisches Öl in Ölzellen. Daneben kommen nichtflüchtige Scharfstoffe in vielen Arten vor. Beide Stoffgruppen sind dafür verantwortlich, dass einige Zingiberaceen als Arznei- und Gewürzpflanzen Verwendung finden. In Curcuma-Arten kommen gelb gefärbte Dicinnamoylmethanderivate, sogenannte Curcuminoide (der in Rhizomen von Curcuma-Arten vorkommende gelbe Farbstoff Curcumin ist ein Hauptbestandteil des Currygewürzes – siehe CASPERSON & al. 1984) vor, die an der cholagogenen Wirkung der entsprechenden Drogen (z.B.: das Rhizom von *Curcuma xanthorrhiza*) beteiligt sind (BECKER & REICHLING 1999).

3.2 Inhibitorische Wirkung auf mikrobielle Mischpopulationen

Die Untersuchungsergebnisse an der nativen Probe entsprachen in ihren Keimreduktionsraten im Wesentlichen den oben beschriebenen Ergebnissen der standardisierten Prüfkulturen. Wiederum zeigen die Extrakte aus *Populus balsamifera* von allen Pflanzenextrakten die stärkste Keimhemmung und übertreffen diesbezüglich auch die synthetischen Substanzen.

4. Ausblick auf weitere ähnlich geartete Forschungsaktivitäten

In einem Folgeprojekt werden Extrakte von in Mitteleuropa kultivierbaren Heil- und Gewürzkräutern untersucht, wobei zur Quantifizierung der antibakteriellen Wirkungen Bakterienstämme von *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* und *Staphylococcus aureus* eingesetzt werden (BÖCHZELT & al. 2002). Die diesbezüglichen Ergebnisse befinden sich in Auswertung.

In einem weiteren Projekt werden verschiedene Pflanzenteile von Vertretern der Sektion *Tacamahaca* (Balsam-Pappeln) auf ihre keimhemmenden Wirkungen hin untersucht.

5. Zusammenfassung

Grundlage der Untersuchungen zu den keimhemmenden Wirkung verschiedener Pflanzenextrakte auf *Escherichia coli* und auf mikrobielle Mischpopulationen einer Abwasserprobe ein mikrobielles Detektionssystem basierend auf der elektrischen Impedanzmessung.

Als synthetische Referenzsubstanzen wurden Phenoxyethanol, Benzylalkohol (10% EtOH) und B-, E-, M-,P-Paraben (1:1:1:1, 5% EtOH) eingesetzt.

Die verwendeten Pflanzenextrakte stammten von *Filipendula ulmaria*, *Alpinia officinarum*, *Populus nigra*, *Curcuma xanthorrhiza* und *Populus balsamifera*.

Als Referenzstamm zur Beurteilung der inhibitorischen Wirkungen wurde *Escherichia coli* eingesetzt. Zusätzlich wurden exemplarische Untersuchungen an mikrobiellen Mischpopulationen einer Abwasserprobe durchgeführt.

Von allen Pflanzenextrakten zeigten die Extrakte aus Knospen von *Populus balsamifera* die stärkste Keimhemmung.

Geringere keimhemmende Wirkung wurde mit den Extrakten aus *Populus nigra* (Knospen) und *Curcuma xanthorrhiza* (Rhizom) erzielt, während die Extrakte von *Filipendula ulmaria* (oberirdische Phytomasse) und *Alpinia officinarum* (Rhizom) deutlich schlechter abschnitten.

Die Extrakte von *Populus balsamifera* zeigen auch eine deutlich stärkere inhibitorische Wirkung als die synthetischen Substanzen.

Die Untersuchung an mikrobiellen Mischpopulationen einer Abwasserprobe entsprachen in ihren Keimreduktionsraten weitgehend den Ergebnissen mit den standardisierten Prüfkulturen.

6. Literatur

ADLER A. & MACKWITZ H. 1991: Ökotricks und Bioschwindel.- 4. Aufl., Wien / Frankfurt / Bern.

BECKER H. & REICHLING J. (1999): Grundlagen der pharmazeutischen Biologie.- 4. Aufl., Stuttgart.

BÖCHZELT H.G., MANDL M., STUHLBACHER A., BERGHOLD H., GRAF N., HAAS W., KOINIGG M., STEINLECHNER E., TRINKAUS P. & WAGNER S. (2002): Arbeitspaket 3: Wellness-Produkte auf Basis nachwachsender Rohstoffe.- In: SCHNITZER H. & BÖCHZELT H.G. (Hrsg.).- Innovative Nutzung von Pflanzen –

INNUPLANT.- S. 118-169, Endbericht, Joanneum Research, Graz.

CASPERSON G., HILLER K., HIRTE W., HOFFMANN P., KETZ H.A., NATHO G. & SCHMIDT H. (1984): Rohstoffpflanzen der Erde.- Leipzig, Jena, Berlin.

GILDEMEISTER E. & HOFFMANN F. (1929): Die ätherischen Öle.- 2. Bd., 3. Aufl., Leipzig.

KRÜSSMANN G. (1977): Handbuch der Laubgehölze.- 2. Aufl., Berlin / Hamburg.

MACHATSCHEK M. (1999): Nahrhafte Landschaft.- Wien / Köln / Weimar / Böhlau.

MACKWITZ H. (1999): Optionen-Recherche zum Forschungsprojekt HENRY; ÖKO Park Hartberg – Entwicklungsimpulse durch Nachwachsende Rohstoffe für die Industrie.- Wien / Graz.

MACKWITZ H., BÖCHZELT H.G., STUHLBACHER A., MANDL M., STEINLECHNER E., TRINKAUS P., REINHOFER M., KOINIGG M. & EDER T. (2001): Wellness-Produkte auf Basis Nachwachsender Rohstoffe.- In: SCHNITZER H. & BÖCHZELT H.G. (Hrsg.): Innovative Nutzung von Pflanzen.- Endbericht, Joanneum Research, Graz, S. 93-150.

SCHNITZER H., LANG R.W. BÖCHZELT H.G., LETTMAYER G., MACKWITZ H., RIBITSCH V., FRÜHWALD K., SVOBODA M., MANDL M., STUHLBACHER A., BERGHOLD H., ZAISMANN U., LEITGEB M., REINSTADLER H., ZAHNT B.A., STANGL K., LOMSEK J., GRABHER A., TAFERNER K., RESSEL M., STEINLECHNER E., TRINKAUS P., REINHOFER M., KOINIGG M. & EDER T. (2001): Innovative Nutzung von Pflanzen – INNUPLANT.- Kurzbericht, Joanneum Research, Graz.

STEINLECHNER E., BERGHOLD H., EDER T., KOINIGG M., MACKWITZ H., REINHOFER M., STUHLBACHER A. & TRINKAUS P. (2001): Wellness-Produkte auf Basis nachwachsender Rohstoffe – Modul UMW.- Endbericht, Joanneum Research, Graz.

STUHLBACHER A. & TRINKAUS P. (2002): Prüfung inhibitorischer Pflanzenextrakte.- Nachwachsende Rohstoffe, 23, S. 6.

TRINKAUS P. (1998): Short rotation forestry: Ten Austrian principles from the viewpoint of environment and nature.- Biomass and Bioenergy, Vol. 15, No. 1, S. 109-114.

TRINKAUS P. (2000): Phytopathologische Untersuchungen in Pappelkulturen.- Der Förderungsdienst, 9, S. 310-312.

Auskunft: Dr. Arnold Stuhlbacher Institut für Umweltgeologie und Ökosystemforschung, Joanneum Research, Elisabethstraße 16/18, A 8010 Graz, e-mail: arnold.stuhlbacher@joanneum.at

Mag. Dr. Peter Trinkaus, Institut für Umweltgeologie und Ökosystemforschung, Joanneum Research, Elisabethstraße 16/18, A 8010 Graz, e-mail: peter.trinkaus@joanneum.at

