

Der Einfluß von Feststoffsubstraten auf Kolonienbildung von Mikroorganismen

M. T. Bomar

Bundesforschungsanstalt für Ernährung – Institut für Biologie –
Karlsruhe, Bundesrepublik Deutschland

Zusammenfassung

Es wurde festgestellt, daß die Bakterien an Kontaktstellen mit sowohl organischen als auch anorganischen Feststoffmaterialien anders wachsen als auf reinen Agarnährböden. Von 16 ad hoc gewählten Bakterienstämmen reagierten folgende Spezies mit intensiverer Kolonienbildung in sinkender Reihenfolge: *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *Streptococcus sanguis*, *S. saprophyticus*, *S. faecalis*, *Escherichia coli*, *Micrococcus flavus*, *Actinomyces viscosus*, *Veillonella* sp., *Enterobacter liquefaciens*, *Yersinia enterocolitica*. *Lactobacillus casei* verhielt sich neutral. *Proteus vulgaris*, *Y. enterocolitica* und *Chromobacterium violaceum* wachsen auf bestimmten Nährböden nur in Anwesenheit der Festpartikel. Die Hefen *Endomyces lactis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodotorula mucilaginosa* und *Cryptococcus nigricans* zeigten bei der Kolonienbildung keine Reaktion auf die Feststoffpartikel.

Die Art des Proteins in Nährböden – tierisch (Fleisch) oder pflanzlich (Sojabohnen) – beeinflußte das Verhalten der Mikroorganismen in diesen Untersuchungen nicht.

Summary

Bacteria have been found to grow differently at contact sites to both organic and anorganic solids as on pure agar media. Of 16 ad hoc selected bacterial strains, the following species (arranged in decreasing order) responded with stronger colony formation: *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *Streptococcus sanguis*, *S. saprophyticus*, *S. faecalis*, *Escherichia coli*, *Micrococcus flavus*, *Actinomyces viscosus*, *Veillonella* sp., *Enterobacter liquefaciens*, *Yersinia enterocolitica*. *Lactobacillus casei* behaved neutral. *Proteus vulgaris*, *Y. enterocolitica* and *Chromobacterium violaceum* grow on certain media only in the presence of solid particles. The yeasts *Endomyces lactis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodotorula mucilaginosa* and *Cryptococcus nigricans* did not respond to solid particles during colony formation.

The kind of protein – animal (meat) or vegetable (soy beans) – did not influence the behaviour of the microorganisms in these experiments.

Schlüsselwörter: Feststoffsubstrate, Kolonienbildung von Mikroorganismen

1 Einleitung

Aus der Praxis im mikrobiologischen Laboratorium ist bekannt, daß die Mikroorganismen im Kontakt mit festen Gegenständen besser entwickelte Kolonien bilden. Es wurde überprüft, inwieweit dieses Verhalten vom Mikroorganismus, von den Nährstoffen und von dem Festsubstrat abhängig ist.

2 Material und Methoden

2.1 Vorversuche

Es wurde untersucht, ob verschiedene, auch technische Substrate das Wachstum der Mikroorganismen beeinflussen. Hierzu wurde Standard-I-Nähragar (Merck, Nr. 7881) in der Petrischale mit dem entsprechenden Testorganismus beimpft; auf die Oberfläche des Nährbodens wurde dann das zu untersuchende Substrat aufgetragen und bei 30 °C inkubiert. Nach 2–3 Tagen erfolgte die Auswertung des Wachstums, d. h. der Kolonienbildung auf der Oberfläche und rund um die aufgetragene Probe. Die verwendeten Mikroorganismen und Materialien sowie die Auswertung sind in dem Teil „Ergebnisse“ wiedergegeben.

2.2 Hauptversuche

- Mikroorganismen: *Escherichia coli*, *Enterobacter liquefaciens*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas fluorescens*, *Yersinia enterocolitica*, *Veillonella* sp., *Chromobacterium violaceum*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus flavus*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus saprophyticus*, *Streptococcus sanguis*, *Lactobacillus casei*, *Actinomyces viscosus*, *Endomyces lactis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Cryptococcus nigricans*, *Rhodotorula mucilaginosa*.
- Nährböden: Standard-I-Nähragar, STA (Merck, Nr. 7881); Sabouraud-Glucose 2 %-Agar, SA (Merck, Nr. 7315); Tryptone Soya Agar, TSA (Oxoid, Nr. CM 131); MRS-Agar, MRS (Merck, Nr. 10660); D.C.L.S. Agar, DCLS (Oxoid, Nr. CM 393); Clostridium Difficile Agar Base, CLOS (Oxoid, Nr. CM 601); Wilkins-Chalgren Anaerobe Agar, WILK (Oxoid, CM 619); CASO-Agar, CASO (Merck, Nr. 5458); Brain Heart Infusion (Difco, Nr. 0037-01) + 1 % Pepton aus Casein (Merck, Nr. 72/3) + 0,5 % Glucose + 0,5 % Hefeextrakt (Merck, Nr. 3753) + 1,5 % Agar, BHA; Veal Infusion Broth (Difco, Nr. 0344-01) + 0,3 % Hefeextrakt + 1,5 % Agar, VEA.
- Ballaststoffe und andere Substrate: Cellulose aus Holz (Serva Heidelberg, Type HBS, reinst.), Partikelgröße Ø ca. 0,08 mm; Cellulose aus Baumwolle (Serva Heidelberg, Type HL, reinst.), Partikelgröße Ø ca. 0,08 mm; Kleie. Diese pulverförmigen Substrate wurden zum Vergleich noch durch Glasperlchen Ø 100–110 µm und Objektdeckgläser ergänzt.
- Durchführung der Untersuchungen: Auf die beimpfte Oberfläche des Nähragars wurde das zu untersuchende autoklavierte Substrat wie folgt aufgetragen: Eine sterile Alu-Schale, in deren Boden sich eine Öffnung von Ø 10 mm befand, wurde auf die Agaroberfläche gelegt und mit dem Substrat in einer Höhe von ca. 2 mm gefüllt. Durch Andrücken mit einem passenden sterilen Gummistopfen wurde das Substrat auf die Nährbodenoberfläche aufgepreßt. Danach wurde die Schale mit Stopfen entfernt. Die festen Objekte (Holz, Papier, Deckglas) wurden direkt auf die beimpfte Nähragaroberfläche gelegt.
- Inkubation: Alle Untersuchungen wurden bei 30 °C durchgeführt. Die Inkubationszeit variierte je nach Testorganismus; als ausreichend wurde die Zeit angesehen, die zur gut erkennbaren Kolonienbildung auf dem Nähragar ohne aufgetragene Probe notwendig war.

3 Ergebnisse und Diskussion

Die Reaktion der verschiedenen Mikroorganismen auf die Anwesenheit von Feststoffen auf der Nähragaroberfläche war unterschiedlich. Während die Baumwoll- und Holzcellulose sich im allgemeinen neutral verhielten, bewirkten Sägespäne aus Kiefern- und Rotbuchenholz deutlich stärkere Kolonienbildung von *B. cereus* und *S. sanguis* an den Kontaktstellen (Abb. 1). Es ist anzunehmen, daß dies durch bestimmte Stoffe im Holz

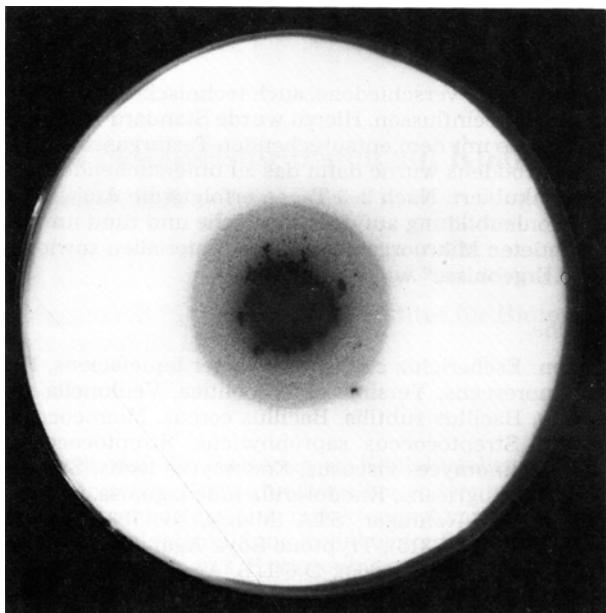


Abb. 1. Zone des stark verstärkten Wachstums um die Kiefern-Sägespäne (*B. cereus*).

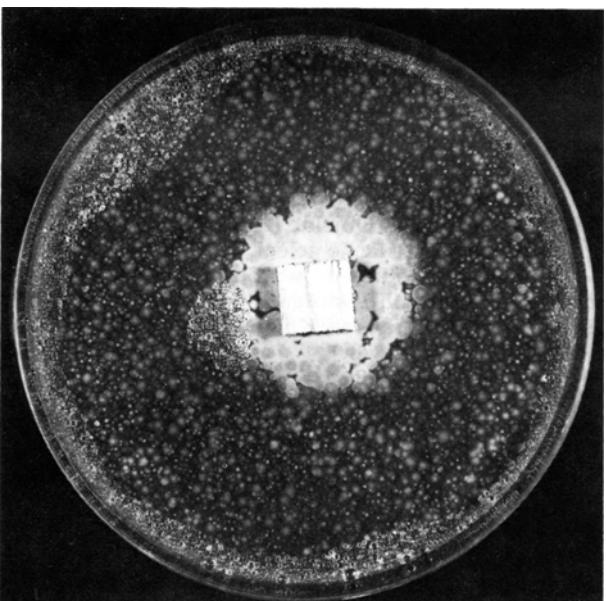


Abb. 2. Zone des stark verstärkten Wachstums um das Holzstück (*B. cereus*).

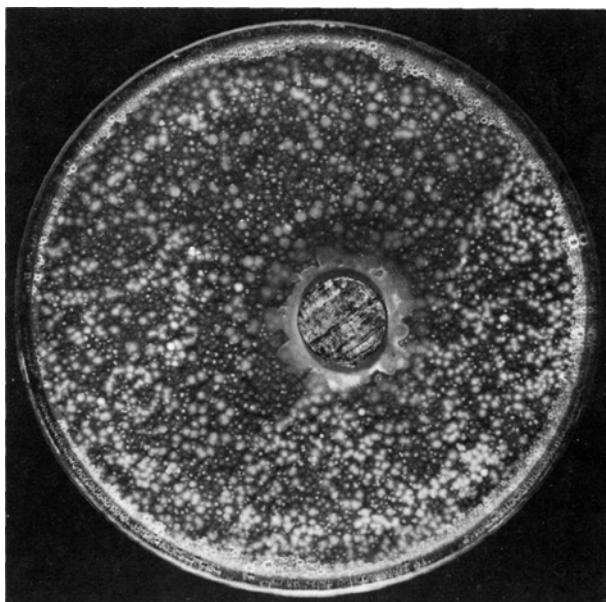


Abb. 3. Zone des stark verstärkten Wachstums um das Korkenstück (*B. cereus*).

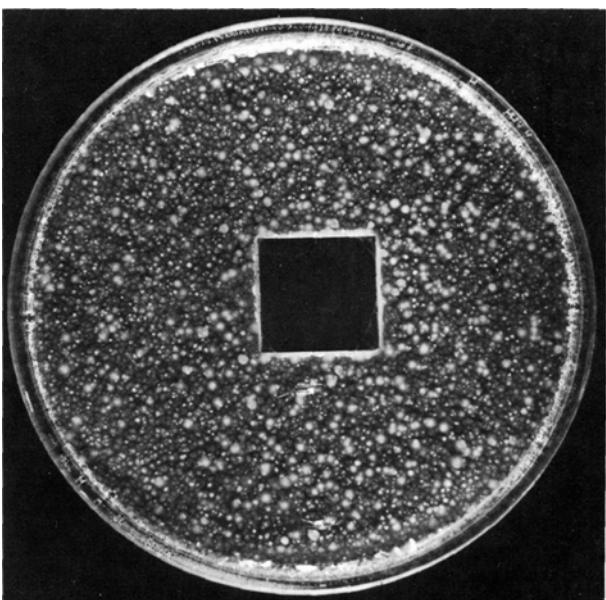


Abb. 4. Zone des verstärkten Wachstums um das Deckglas (*B. cereus*).

Tab. 1. Das Wachstum der Bakterien in Kontakt mit Festpartikeln.

Stamm	Nähr- boden	Art des Substrates				
		Holz-C.	Baum- woll-C.	Kleie	Glas- perlen	Deck- glas
<i>Bacillus cereus</i>	STA	N	N	NXXX	NX	NX
	TSA	N	N	NXXX	NX	N
	CASO	N	N	NXXX	N	NX
	WILK	NX	N	NXXX	N	NX
	CLOS	N	NX	NXXX	N	NX
<i>Bacillus subtilis</i>	STA	N	N	NXXX	N	N
	TSA	N	N	NXXX	N	N
	CASO	N	N	NXXX	N	N
	WILK	N	N	NXXX	N	N
	CLOS	N	N	N	N	N
<i>Lactobacillus casei</i>	STA	N	N	N	N	N
	SA	N	N	N	N	N
	WILK	N	N	N	N	N
	MRS	N	N	N	N	N
<i>Actinomyces viscosus</i>	STA	N	N	N	N	N
	TSA	N	N	NXX	N	N
	DHA	N	N	NXXX	N	N
	VEA	N	N	N	OX	N
<i>Micrococcus flavus</i>	STA	N	N	NXX	N	N
	TSA	N	N	NXX	N	N
	CASO	N	N	NXX	N	N
	WILK	N	N	N	N	N
<i>Streptococcus saprophyticus</i>	STA	N	N	NXX	N	N
	TSA	N	N	NX	N	N
	CASO	N	N	NX	N	N
<i>Streptococcus faecalis</i>	STA	N	NX	N	N	N
	TSA	N	NX	N	N	N
	ENDO	N	NX	N	N	N
	CLOS	N	N	N	N	N
<i>Streptococcus sanguis</i>	STA	N	N	NXXX	N	NX
	TSA	N	N	NXXX	N	NX
	CASO	N	N	NXX	N	NX
	WILK	N	N	NX	N	NX
	CLOS	N	N	NXXX	N	NX
<i>Veillonella sp.</i>	STA	N	N	N	NX	NX
	TSA	N	N	N	NXX	N
	CASO	N	N	N	NX	N
	WILK	N	N	N	N	N
<i>Escherichia coli</i>	STA	N	N	NX	N	NX
	TSA	N	N	N	N	NX
	ENDO	N	N	N	N	NX
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	STA	N	N	N	N	N
	TSA	N	N	N	N	N
	CASO	N	N	N	N	N
	DCLS	N	N	N	N	N

Stamm	Nähr- boden	Art des Substrates				
		Holz-C.	Baum- woll-C.	Kleie	Glas- perlen	Deck- glas
<i>Proteus vulgaris</i>	STA	N	N	NX	N+	NX
	TSA	N	N	NX	N+	NX
	WILK	N	N	NX	N+	N
<i>Enterobacter liquefaciens</i>	STA	N	N	NX	N	NX
	TSA	N	N	NX	N	NX
	WILK	N	N	NX	N	N
	CLOS	N	N	N	N	NX
<i>Yersinia enterocolitica</i>	STA	N	N	NX	N+	N
	TSA	N	N	NX	N+	N
	ENDO	N	N	N	N	N
	CLOS	N	N	N	N	N
<i>Chromobacterium violaceum</i>	STA	O+	N	N	N	N
	TSA	(N)+	N+	N	N	N
	CASO	N+	N+	N	N	N
	WILK	N+	N+	N	N	N
	CLOS	-	-	N	N	N
<i>Endomyces lactis</i>	STA	N	N	N	N	N
	SA	N	N	N	N	N
	WILK	N	N	N	N	N
	MRS	N	N	N	N	N
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	SA	N	N	N	N	N
	CASO	N	N	N	N	N
	WILK	N	N	N	N	N
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	SA	N	N	N	N	NX
	CASO	N	N	N	N	N
	WILK	N	N	N	N	N
<i>Cryptococcus nigricans</i>	STA	N	N	N	N	N
	SA	N	N	N	N	N
	CASO	N	N	N	N	N
	WILK	N	N	N	N	N

Symbole:

- = kein Wachstum auf der Nähragar-Oberfläche
- (N)+ = schwaches Wachstum auf der Nähragar-Oberfläche, starkes auf dem Substrat
- N = normales Wachstum auf der Nähragar-Oberfläche bis zum Substrat
- NX = Zone des leicht verstärkten Wachstums um das Substrat
- NXX = Zone des verstärkten Wachstums um das Substrat
- XXXX = Zone des stark verstärkten Wachstums um das Substrat
- N+ = normales Wachstum auf der Nähragar-Oberfläche, starkes Wachstum auf dem Substrat
- O+ = kein Wachstum auf der Nähragar-Oberfläche, starkes Wachstum auf dem Substrat

Intensität der Kolonienbildung

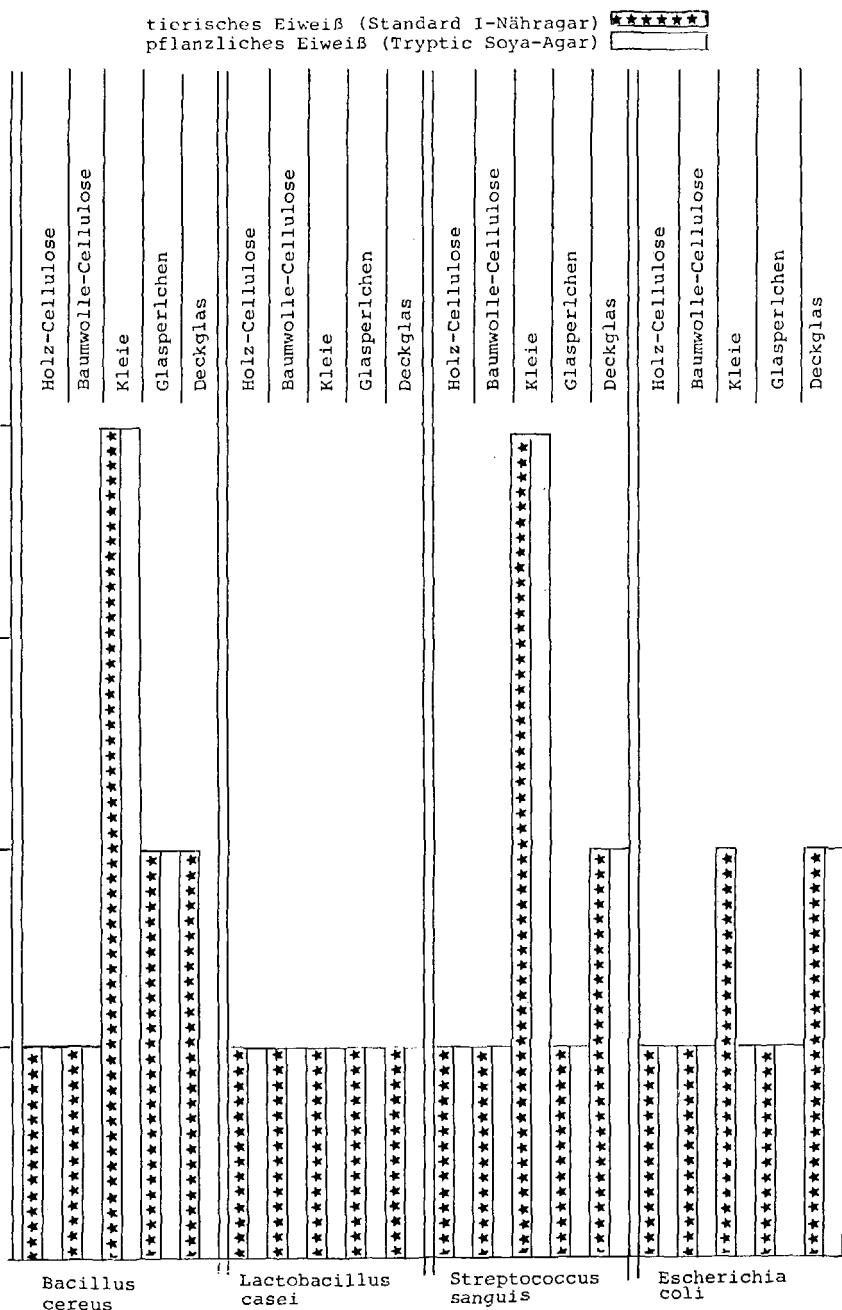


Abb. 5. Einfluß vom tierischen bzw. pflanzlichen Eiweiß auf die Intensität der Kolonienbildung.

verursacht wurde. Ähnliche Ergebnisse wurden mit Kiefernholz und Kork am Stück erzielt (Abb. 2, 3). Die stärkere Kolonienbildung um das Deckglas (für Mikroskopie) kann mit der genannten Vermutung jedoch nicht erklärt werden (Abb. 4).

Die nachfolgend aufgezeichneten Ergebnisse der Untersuchungen über die Interaktion zwischen „Ballaststoffen“ und Mikroorganismen haben die bereits erzielten Erkenntnisse bestätigt (Tab. 1).

In der Tabelle 1 ist neben der Einwirkung der Ballaststoffe auch der eventuelle Einfluß der unterschiedlichen Zusammensetzung des Nährmediums berücksichtigt. Die Annahme, daß tierisches Eiweiß unter Versuchsbedingungen andere Reaktionen auslöst als pflanzliches Eiweiß, hat sich bei der gegebenen Versuchsanordnung nicht bestätigt. Dies ist aus der Abbildung 5 am Beispiel von *B. cereus*, *L. casei*, *S. sanguis* und *E. coli* ersichtlich, die auf Standard-I-Nähragar bzw. Tryptic Soya Agar in Anwesenheit von „Ballaststoffen“ inkubiert wurden.

In der Tabelle 1 ist die sehr positive Wirkung von Kleie auf die Intensität der Kolonienbildung vieler Bakterien dargestellt. Eine Ausnahme bilden *L. casei* und die Hefen, die keine Beeinflussung zeigen.

Welchen Einfluß die Festpartikel auf die Entwicklung von Bakterien haben, zeigen die Ergebnisse mit Glasperlchen oder mit dem Deckglas. Diese weitgehend inerten Materialien haben in vielen Versuchen die Bildung von Kolonien überzeugend verändert: Eine Wachstumsstimulierung wurde bei Anwesenheit von Glasperlchen bei *B. cereus* und *Veillonella* sp. nachgewiesen; im Versuch mit *A. viscosus*, *P. vulgaris* und *Y. enterocolitica* haben sich die Kolonien nur im Bereich der Anhäufung der Glasperlchen gebildet; eine Wachstumsförderung am Rande des Deckglases wurde bei *B. cereus*, *S. sanguis*, *Veillonella* sp., *E. coli*, *P. vulgaris* und *E. liquefaciens* beobachtet. Es wurde keine Korrelation zwischen der Beweglichkeit der Zellen und der Kolonienbildung ermittelt. Für eine Diskussion dieser Ergebnisse waren die Versuche nicht umfangreich genug. Es wird hier nur auf die Tatsache hingewiesen, daß die Festmaterialien unter bestimmten Bedingungen bei der Mehrheit der Mikroorganismen das Wachstum fördern.

Außer bei den schon erwähnten Glasperlchen wurde dieser Effekt sehr attraktiv bei Anwesenheit von Baumwoll- und Holzcellulose mit dem Stamm *Ch. violaceum* beobachtet. Dieser bildete violette Kolonien u. U. nur dort, wo Cellulosepartikel auf dem Nähragar vorhanden waren.

Die Problematik der Feststoffsubstrate kann ohne weiteres auch auf Probleme der Ernährung übergreifen: Dann nämlich, wenn es sich um die Wirkung der Ballaststoffe in der Nahrung handelt. Bei der Vielfalt der Darmbakterien ist es leicht vorstellbar, daß im Verdauungstrakt viele ähnliche Effekte hervorgerufen werden, wahrscheinlich mit entsprechenden biochemischen Reaktionen. Aus dieser Sicht wird es nützlich sein, die Interaktionen zwischen den Ballaststoffen und Bakterien weiter zu studieren.

Eingegangen am 17. November 1983

Anschrift des Verfassers:

Dr. M. T. Bomar, Bundesanstalt für Ernährung, Engesserstraße 20, 7500 Karlsruhe