

Bakterien und Ballaststoffe

M. T. Bomar

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

Zusammenfassung

Durch In-vitro-Untersuchungen wurde nachgewiesen, daß die Bakterien *Escherichia coli*, *Bifidobacterium adolescentis* und *Chromobacterium violaceum* bei Anwesenheit von Cellulosepartikeln sowohl in ihrer Vermehrungsgeschwindigkeit als auch in ihrer Stoffwechselaktivität beeinflusst sind.

Nach Homogenisieren im Waring Blendor wurde die schnellste Vermehrung im Medium mit 10%, dann nachlassend mit 5%, 1% bzw. 0% Cellulosepartikeln festgestellt. Die biochemische Aktivität, gemessen am Verbrauch der Glucose und der Intensität der Nitratreduktion, verlief in umgekehrter Reihenfolge. Es scheint, daß die Wirkung der Ballaststoffe im Verdauungstrakt noch um den Faktor „biochemische Aktivität“ der Mikroorganismen zu ergänzen wäre.

Summary

The presence of cellulose particles, so in-vitro studies have shown, influences the growth rate and metabolic activity of the bacteria *Escherichia coli*, *Bifidobacterium adolescentis* and *Chromobacterium violaceum*.

After the homogenization in Waring Blendor, the growth rate has been found to be highest in a medium containing 10% cellulose particles and to show a decreasing tendency in media containing 5%, 1% and 0% cellulose. The biochemical intensity, judged by glucose consumption and intensity of nitrate reduction, showed an inverse tendency. It seems necessary to add also the factor „biochemical activity“ of the microorganisms to the effect of dietary fibres in the intestinal tract.

Schlüsselwörter: Cellulosepartikel, Vermehrung der Bakterien, biochemische Aktivität

1 Einleitung

Erst im letzten Jahrzehnt wurde generell anerkannt, daß die Ballaststoffe in der Nahrung unentbehrlich sind (1, 2, 3, 4, 5). Diese Erkenntnisse sind z. T. aufgrund epidemiologischer Erhebungen (5) gewonnen worden, z. T. durch Versuche mit Menschen (1) und Tieren (1, 6). Alle diese Studien zeigen, bedingt durch verschiedene Anamnesen der „Objekte“, eine große Variabilität (1, 6), der man mittels statistischer Auswertung zu begegnen versuchte.

Die Ursache der positiven Wirkung der Ballaststoffe liegt in der Beeinflussung der Darmfunktion. Als maßgebliche Faktoren werden das Was-

serbindungsvermögen der Ballaststoffe und die Einwirkung von Mikroorganismen auf die Ballaststoffe im Dickdarm genannt (2). Umgekehrt, ein Ballaststoffzusatz zur Diät führte zur quantitativen Veränderung der Zusammensetzung der Kotflora (7). Die Bedeutung des Dickdarms als Wirtsorgan der Bakterienflora ist unumstritten, doch die Rolle der Bakterien erstreckt sich auf das ganze Verdauungssystem – und hier spielen sich die meisten Stoffumwandlungen ab. Ein Einfluß der Ballaststoffe auf diese Parameter ist sehr wahrscheinlich.

In dieser Studie wird versucht, nachzuweisen, daß die Beeinflussung der Mikroorganismen durch die Ballaststoffe sich sowohl in ihrer Vermehrungsgeschwindigkeit als auch in der Änderung der Stoffwechselaktivität äußert.

Wegen der Reproduzierbarkeit wurden In-vitro-Untersuchungen durchgeführt.

2 Material und Methoden

Es wurden Untersuchungen über die Vermehrung von Bakterien und deren biochemischer Aktivität in Flüssigmedien ohne Festpartikel (homogene Lösungen) und in Flüssigmedien mit Cellulosepartikeln durchgeführt.

Testorganismen: *Escherichia coli* (Botanisches Institut der Universität Karlsruhe, K 12); *Bifidobacterium adolescentis* (DSM, Nr. 20083⁺); *Chromobacterium violaceum* (Engler Bunte Institut der Universität Karlsruhe).

Nährmedium: Trypticase Soy Broth Without Dextrose (BBL, Nr. 11774) mit 0,5 % NaNO₃, 0,28 % Hefeextrakt (Merck, Nr. 3753) und 0,05 % sterilfiltrierte Glucose für Versuche mit *E. coli* und *Ch. violaceum*; *Bifidobacter* Medium (DSM, Nr. 58) für *B. adolescentis*. Bei den Untersuchungen über die Glucoseumsetzung wurde Na-Ascorbat nicht zugesetzt, da dieses die Analyse stört. Für die Keimzahlbestimmung wurden den Medien 1,5 % Agar-Agar zugegeben.

Festpartikel: Cellulose aus Baumwolle, reinst, Partikelgröße ca. 0,08 mm Ø (Serva Heidelberg, Typ HL, Nr. 45430).

Keimzahlbestimmung: Es wurden dezimale Verdünnungsreihen durchgeführt und 0,1 ml der Verdünnungsflüssigkeit auf der Agaroberfläche homogen verteilt. Die Inkubation erfolgte bei *E. coli* und *Ch. violaceum* aerob bei 30 °C, bei *B. adolescentis* in N₂-Atmosphäre bei 37 °C.

Glucosebestimmung: Reflektometrische Glucosebestimmung (8, 9) mittels Reflexions-Photometer Reflomat (Clinicon Int., Mannheim) und Reflotest-Glucoseteststreifen mit Glucoseoxidase (Boehringer, Mannheim, Nr. 1666592) mit dem Meßbereich 70–350 mg Glucose/100 ml.

Nitratreduktion (Nitritbestimmung): Es wurde ein qualitativer Nachweis des Nitrits mit der Griess-Ilosvays Reagenzlösung (Merck, Nr. 9023) durchgeführt. Semiquantitativ wurde Nitrit mit Merckoquant Nitrit-Test-Stäbchen (Merck, Nr. 10007) ermittelt.

Durchführung der Versuche: Das Testmedium wurde autoklaviert und mit einer Suspension des jeweiligen Testmikroorganismus beimpft. Es folgte die Verteilung von 50 ml des Testmediums in sterile Erlenmeyerkolben von 100 ml Gesamtvolumen. Die heterogenen Reihen enthielten 1 %, 5 % und 10 % Festpartikel, die in den E-Kolben vorher trocken autoklaviert wurden. Die Inkubation wurde auf einer Schüttelmaschine durchgeführt. Bei dem *Bifidobacterium* wurden die Kolben luftdicht verschlossen. Nach dem Erreichen der logarithmischen Phase der Vermehrung wurde in Intervallen von 1 h der Glucoseverbrauch und der Nitritnachweis im Medium durchgeführt sowie die Keimzahl ermittelt.

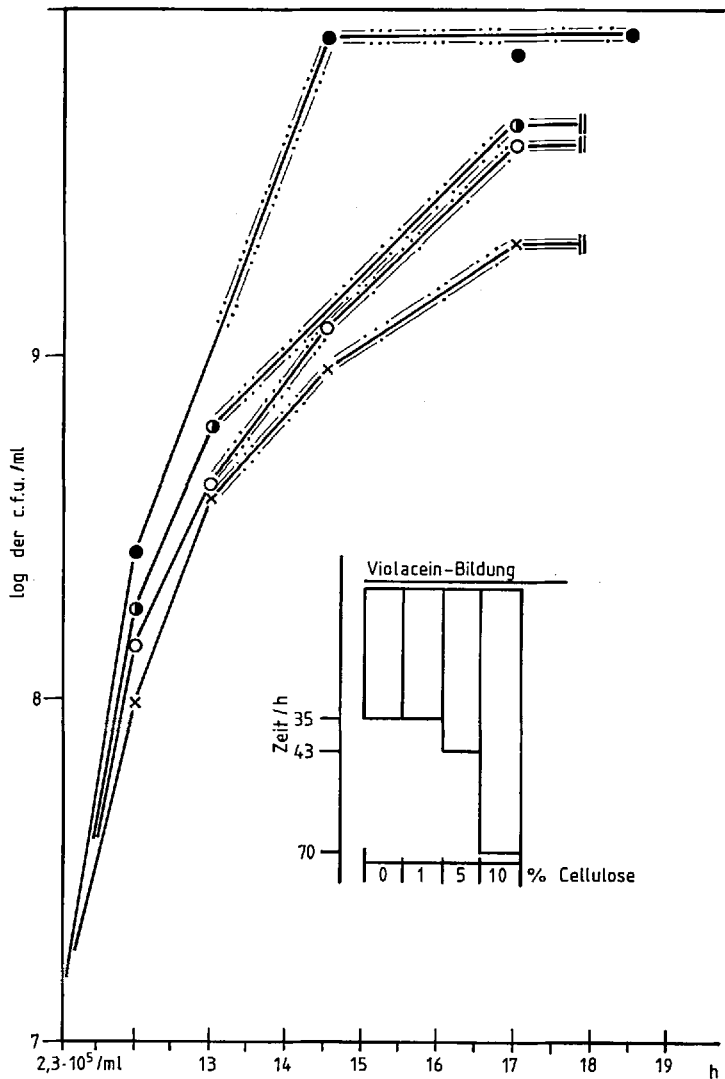


Abb. 1. Biochemische Aktivität von *Ch. violaceum* in Anwesenheit von Cellulosepartikeln (x = 0%; O = 1%; ● = 5%; ● = 10% Cellulose).

Glucose-Utilisation:

keine	(Gl. 350 mg/100 ml)	=	
schwach	(Gl. 350-100 mg/100 ml)	=	
mittel	(Gl. 100- 50 mg/100 ml)	=	
stark	(Gl. 50/100 ml)	=	

Nitratreduktion:

keine	(NO ₂ = 0)	=	
schwach	(NO ₂ = 95 mg/1000 ml)	=	
mittel	(NO ₂ = 5-25 mg/1000 ml)	=	
stark	(NO ₂ = > 25 mg/1000 ml)	=	

3 Ergebnisse und Diskussion

Bei der Untersuchung über die bakterielle Aktivität sind Indikatoren für eine unmittelbare Einschätzung der Vermehrungssituation sehr wichtig, da diese den richtigen Zeitpunkt für die Probenahme anzeigen. Die Wahl des Testorganismus *Chromobacterium violaceum* ermöglichte eine einfache Differenzierung zwischen der Vermehrung und der sekundären Stoffwechselaktivität (Abb. 1).

Wie aus der Abbildung 1 zu entnehmen ist, stimmt die Vermehrungsgeschwindigkeit und die Stoffwechselaktivität, gemessen an der Glucose-Utilisation und Nitrat-Reduzierung, nicht überein. Während die Vermehrung im Medium mit der höchsten Konzentration von Cellulosepartikeln am schnellsten erfolgte, zeigte die Stoffwechselaktivitätsmessung in demselben Medium eine Verlangsamung der biochemischen Umsetzung an. Dies galt auch für die sekundären Stoffwechselprodukte, in diesem Fall für die Bildung von violetterm Pigment *Violacein*. Eine erkennbare Violettfrbung des Mediums wurde am frühesten im homogenen Medium erkennbar, nach ca. 35 h. Die Verlangsamung der *Violacein*bildung war direkt abhängig von der steigenden Konzentration der Cellulosepartikel im Medium. Die Ergebnisse der Vermehrungsuntersuchungen waren etwas überraschend, da man annehmen kann, daß die ermittelte Keimzahl im Medium mit Cellulosepartikeln wahrscheinlich in Wirklichkeit höher liegen mußte als festgestellt: Die Adsorption oder das Anhaften der Zellen auf der Celluloseoberfläche muß unbedingt zu einer Agglomeration der Zellen führen, was wiederum eine niedrigere Ausbeute bei der Keimzahlbestimmung verursacht.

Bei dem Testorganismus *Ch. violaceum* wurde eine höhere Keimdichte festgestellt, die Unterschiede waren überzeugend. Dieses bessere Wachstum war nicht auf die Verfügbarkeit der Cellulose als Kohlenstoffquelle zurückzuführen. Die in dieser Richtung durchgeführten Untersuchungen mit Mineral-Medium, wo die Methodik den Arbeiten über die Produktion von bakterieller Biomasse (SCP) aus der Cellulose übernommen wurde (10), haben dies bewiesen.

Tab. 1 a. Vermehrung von *E. coli* (c.f.u./ml) in Bouillon homogen und in Bouillon heterogen (mit 10 % Cellulose).

Medium	Zeit/h		
	0	16	8
Bouillon homogen	$1,46 \cdot 10^3$	$3,5 \cdot 10^9 \rightarrow^{1)}$	$\rightarrow^{1)} 2,7 \cdot 10^9$ $\rightarrow^{2)} 4,6 \cdot 10^9$
Bouillon heterogen	$1,46 \cdot 10^3$		
a) durch intensives Schütteln homogenisiert*)		$9,8 \cdot 10^9 \rightarrow^{2)}$	Von diesen Suspensionen ($\rightarrow$)
b) Überstand*)		$2,7 \cdot 10^9$	wurde jeweils 1 ml in 50 ml Bouillon homogen übertragen und weiter bebrütet.

*) Art der Probeaufbereitung.

Tab. 2. Vermehrung und biochemische Aktivität von *Bifidobacterium adolescentis* in Anwesenheit von Cellulosepartikeln im Nährmedium.

Bebrütung	c.f.u./ml		Glucoseverbrauch (mg/100 ml)					Nitratreduktion (Nitrit (mg/1000 ml))				
			0	1	5	10	0	1	5	10	0	1
Cellulose %	0	1	5	10	0	1	5	10	0	1	5	10
0	$7,6 \cdot 10^4$	$7,6 \cdot 10^4$	$7,6 \cdot 10^4$	$7,6 \cdot 10^4$	500	500	500	500	0	0	0	0
16	$3,7 \cdot 10^8$	$3,1 \cdot 10^8$	$2,2 \cdot 10^8$	$1,7 \cdot 10^8$	<50	<50	<50	<50	>25	>25	>25	0
17	$3,2 \cdot 10^8$	$2,9 \cdot 10^8$	$1,8 \cdot 10^8$	$2,5 \cdot 10^8$	<50	<50	<50	350-100	>25	>25	>25	<5
18	$4,4 \cdot 10^8$	$3,4 \cdot 10^8$	$1,9 \cdot 10^8$	$1,8 \cdot 10^8$	<50	<50	<50	<50	>25	>25	>25	>25

Der andere Testorganismus, *E. coli*, zeigte eine ausgeglichene Situation. Es wurden keine signifikanten Unterschiede in der Keimzahl ermittelt.

Die mögliche Anhaftung der bakteriellen Zellen auf den Cellulosepartikeln hat veranlaßt die Durchführung eines separaten Versuches über die Vermehrung in homogener Bouillon und in unhomogener Bouillon (10% Cellulose). Wie die Tabelle 1a zeigt, kam es in heterogenem Medium zu einer intensiveren Vermehrung; ein Beweis dafür, daß „Zellenverluste“ durch die Absorption der Bakterien an den Cellulosepartikeln stattfinden, ist durch den Zahlenunterschied im heterogenen Medium/homogenisiert (sehr intensiv) und im Überstand dieses Mediums abzuleiten. Die nachträgliche Überimpfung in das homogene Medium mit einer kurzen Kultivierungszeit hat diesen Befund bestätigt. Die biochemischen Werte zeigen einen ähnlichen Verlauf wie beim *Ch. violaceum*, wie Tabelle 1 zeigt.

Der Ablauf der biochemischen Reaktionen ist im Medium mit Cellulosepartikeln wiederum verlangsamt. Es ist sinnvoll, die unterschiedlichen Reaktionsbedingungen zu berücksichtigen: Bei der Vermehrung befinden sich die Zellen in einem Medium mit einem Überangebot an Nährstoffen, es kann daher zu keiner Wachstumsverzögerung durch Nährstoffmangel kommen. Die biochemische Aktivität dagegen ist ein Ausdruck des Bedarfes der Zellen für ihre Reproduktion und darüber hinaus eine Summe der Reaktionen, die sich außerhalb der Zellen abwickeln. Hier könnte die Behinderung des Kontaktes des Substrates mit Enzymen durch Festpartikel eine der Hauptursachen für den festgestellten quantitativen Unterschied im biochemischen Bereich sein. Es ist möglich, daß die an den Cellulosepartikeln fixierten Zellen bzw. der Komplex Substrat/Zelle einen anderen Reaktionsablauf aufweisen – im Sinne des Monodschen Gesetzes – oder aber, daß die Fixierung der Zellen andere Stoffwechselwege eröffnet (11).

Es scheint, daß die langsamere Abbaurate der Glucose bzw. die langsamere Reduktion vom Nitrat zu Nitrit in Anwesenheit der Cellulosepartikel eine allgemeine Gültigkeit hat. Die Versuche mit dem Darmbakterium *Bifidobacterium adolescentis* zeigen einen sehr ähnlichen Verlauf (Tab. 2).

Die Keimdichte liegt eng beieinander, mit einer diskreten Andeutung zugunsten des homogenen Mediums. Die biochemischen Aktivitäten manifestieren wiederum einen verzögerten Glucoseabbau und eine verzögerte Nitratreduktion in den heterogenen Medien, am deutlichsten im Medium mit 10% Celluloseanteil. Wenn diese *in vitro* erzielten Reaktionen der Mikroorganismen bei der Anwesenheit der Ballaststoffe in der Nahrungsflüssigkeit auch im Darmtrakt zuträfen, wäre es eine interessante Forschungsaufgabe, zu klären, welche Folgereaktionen die Ballaststoffe außer ihrer mechanischen Wirkung und einer eventuellen Wirkung als Nährstoffsubstrat der Mikroorganismen dort auslösen.

Literatur

1. Harmuth-Hoene AE (1980) Der Einfluß von Guarmehl und Agar-Agar auf die Stickstoffbilanz, die Resorption von Mineralstoffen und Spurenelementen und die verdauliche Energie beim Menschen. Berichte der BfE Karlsruhe

2. Feldheim W (1982) Die Bedeutung pflanzlicher Lebensmittel für die Ernährung des Menschen. 5. Joint Congress of CIQ-DGQ, Proceedings, Sept., Kiel, FRG, S. 13-39
3. Huckele M, Leitzmann C (1982) Der Einfluß der Ballaststoffe auf den Gallensäurewechsel des Menschen. *Akt Ernähr* 7:238-248
4. Burkit DP (1983) The development of the fibre hypothesis. In: *Dietary fibre*. Eds: Birch GG and Parker KS. Applied Science Publishers Ltd
5. Trowell H (1976) Definition of dietary fibre and hypothesis that it is a protective factor in certain diseases. *Am J Clin Nutr* 29:417-427
6. Kendall PT, Holme DN (1982) Studies on the digestibility of soya bean products, cereals, cereal and plant by-products in diets of dogs. *J Sci Food Agric* 33:813-822
7. Münzner R, Harmuth-Hoene A-E (1978) Einfluß einer guarhaltigen Diät auf die Fäkalflora von Ratten. *Nutr Metab* 22:368-373
8. Kattermann R, Naroska I (1974) Quantitative Schnellbestimmung der Blutglucose mit der Reflomat-Methode. *Dtsch med Wschr* 99:2603-2605
9. Bürgi, W, Hohenwallner N, Sohmer R, Banauch D (1978) Eine schnelle und einfache Methode zur Bestimmung niedrigerer Blutglucose-Konzentrationen. *Dtsch med Wschr* 103:1835-1839
10. Bomar MT, Schmid S (1973) Control of the bacterial breakdown of cellulose. *Proc Biochem* 8:22-23
11. Mattiasson B, Hahn-Hägerdal B (1982) Microenvironmental effects on metabolic behaviour of immobilized cells. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol* 16:52-55

Eingegangen 17. November 1983

Anschrift des Verfassers:

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