

Einsatz der gnotobiotischen Ratte zur Erfassung der in vivo-Aktivität von *Bifidobacterium-β-Galaktosidase*¹

J. SCHULZE, R. HERZOG, H.-J. ZUNFT und F.-K. GRÜTTE

Die Höhe der β -Galaktosidase-Aktivität von Bifidobakterien wird unter in vitro-Kultivierungsbedingungen wesentlich von der Zusammensetzung des Nährbodens beeinflusst. Durch den Einsatz gnotobiotischer (keimfreier und mit *Bifidobacterium longum* monoassoziierter) Ratten ließ sich im Chymus zwischen der β -Galaktosidase-Aktivität mucosalen und mikrobiellen Ursprungs differenzieren. Bei keimfreien Tieren findet man im Chymus von Dünn- und Dickdarm etwa 10—20 % der auf g Feuchtmasse bezogenen Aktivität, die in der Mucosa gemessen wird. Monoassoziation mit *B. longum* beeinflusst die lactosespaltende Aktivität des Dünndarminhalts nicht, steigert jedoch die Aktivität des Dickdarminhalts auf den 2fachen Wert der mucosalen Aktivität. Die Verfütterung von Lactose führt bei den monoassozierten Tieren im Inhalt von Caecum und Colon sowie in den Faeces zu einer weiteren mehrfachen Erhöhung der β -Galaktosidase-Aktivität.

Einleitung

Am Abbau der Lactose im Intestinaltrakt der Mammalia ist sowohl das lactosespaltende Enzym (β -Galaktosidase, E.C. 3.2.1.23) des Makroorganismus (im Bürstensaum von hauptsächlich Jejunum und Ileum lokalisiert) als auch das von Mikroorganismen der Darmflora beteiligt. Zahlreiche Untersuchungen liegen zur Ontogenese und zur Aktivitätsbeeinflussung des mucosalen Enzyms vor (Übersicht bei KOLDOVSKY [1]). Weniger bekannt ist das Ausmaß der mikrobiellen Lactose-Spaltung im Darmlumen [2, 3]. Doch gerade dieser Vorgang ist bedeutungsvoll bei der Lactose-Verdauung im Zusammenhang mit der spezifischen mikroökologischen Wirkung von Frauenmilch [4], unabhängig davon, ob quantitativ dominante oder besonders stoffwechselaktive Keimgruppen der Intestinalflora Einfluß nehmen. In Experimenten mit monoassozierten gnotobiotischen Ratten konnte bereits nachgewiesen werden, daß durch nutritive Lactosegaben die Stoffwechselleistung der fäkal ausgeschiedenen Bifidobakterien verändert werden kann [5]. Im folgenden wird die Aktivität von Bifidobakterien in den Faeces und in daraus isolierten Kolonien sowie an verschiedenen Orten des Gastrointestinaltraktes gnotobiotischer Ratten untersucht, um Hinweise auf den Umfang der Beteiligung dieser Mikroorganismen am intestinalen Lactose-Abbau zu erhalten.

¹ Herrn Professor Dr. H. HAENEL zum 65. Geburtstag gewidmet

Methodik

Versuchstiere

Keimfreie und von Geburt an mit *Bifidobacterium longum* monoassoziierte gnotobiotische Ratten (WAG, Rij, Nachzucht Rehbrücke) im Alter von 60 bis 78 Tagen wurden unter standardisierten Bedingungen (12/12 h Hell-Dunkel-Rhythmus, 23 ± 1 °C, 65% relative Luftfeuchtigkeit) in Isolatoren zu zweit je Käfig (Horn-Käfig) auf Zellstoff als Einstreu gehalten. Strahlensterilisiertes Futter (25 KGy, VEB Keradenta Radeberg, Abt. Bestrahlungstechnik) und autoklaviertes Wasser standen ad libitum zur Verfügung.

Versuchsdiäten

Standard-Diät für Gnotobionten bestehend aus Haltungsfutter für Kleinnager (Rezeptur D, Futtermittelwerk Altglienicke) angereichert mit einer Vitaminmischung [6]. Lactose-Diät bestehend aus 72,5% Haltungsfutter, 20% Lactose, 5,4% Casein, 0,9% Pflanzenöl, 0,7% Mineralstoffmischung [7], 0,5% Vitaminmischung [6].

Versuchsgruppen

- Gruppe 1: 3 ♂♂, 2 ♀♀ keimfrei, Standard Diät;
- Gruppe 2: 3 ♂♂, 6 ♀♀ mit *B. longum* monoassoziiert, Standard-Diät;
- Gruppe 3: 5 ♂♂ keimfrei, Lactose-Diät;
- Gruppe 4: 6 ♂♂ mit *B. longum* monoassoziiert, Lactose-Diät.

Versuchsablauf

Über einen Versuchszeitraum von 4 Wochen wurden den Tieren entsprechend der Gruppeneinteilung die Versuchsdiäten verabfolgt. Während der letzten beiden Wochen wurden von den monoassoziierten Tieren (Gruppe 2 und 4) täglich frische Faecesproben entnommen und Keimzahl, pH sowie β -Galaktosidase-Aktivität bestimmt. Letztere Bestimmung erfolgte entweder direkt in den Faeces sofort nach deren Entnahme oder in Kolonien, die aus diesen Faeces durch Auftropfen und Kultivierung auf Nährbodenplatten erhalten wurden. In beiden Fällen galt die Keimzahl als Bezugsgröße. Für vergleichende Untersuchungen mit Nährbodenvarianten wurden die Zellen im Vibrationshomogenisator (VHG 1, Ballotini: 400 μ m, 5 min) aufgeschlossen. Am Ende des Versuchszeitraumes wurden die Tiere durch Halswirbeldislokation getötet. Im Chymus von Magen (Ma), Dünndarm, 1. Hälfte (D_1), Dünndarm 2. Hälfte (D_2), Caecum (Cae), Colon (Co) und in den Faeces (F) sowie in der Mucosa von D_1 , D_2 und Co wurde die β -Galaktosidase-Aktivität sofort nach Probenentnahme, die unter Eiskühlung erfolgte, bestimmt [8].

Anzucht der Bifidobakterien

Frisch entnommene Faeces mit dest. Wasser 1:10, anschließend mit Phosphatpuffer nach SÖRENSEN, pH 6,8, auf 1:10 Mill. verdünnen; Verdünnung auf Petrischalen mit Standardmedium auftropfen und Tropfen einziehen lassen; Tropfstellen mit Uhrgläsern, die mit einer *Serratia-marcescens*-Kultur beschichtet sind, abdecken; 3 Tage bei 37 °C bebrüten; nach Öffnen der Petrischalen Kolonien auszählen oder zur β -Galaktosidase-Aktivitätsbestimmung weiter bearbeiten.

Medien für die Kultivierung von Bakterien

Standardmedium: 28,5 g Glucose-Nährbouillon-Trockensubstanz (Staatl. Institut für Immunpräparate und Nährmedien, Berlin), 0,5 ml Tween 80, 15,0 g Agar agar mit dest. Wasser zu 1000 ml lösen, 12 min autoklavieren (121 °C), filtrieren; anschließend 250 mg Cystin unter sterilen Bedingungen zugeben und pH auf 7,0 einstellen; nach Abkühlen auf 52–55 °C 30 ml Humanerythrozyten-Sediment steril zusetzen und in Petrischalen ausgießen.

Modifikation des Standardmediums durch wahlweise Zusätze von 0,4% Bramsch-Hefeextrakt, 0,1–0,6% Glucose oder 0,1–1,0% Lactose.

Messung der β -Galaktosidase-Aktivität

In Chymus, Faeces, isolierten Kolonien von Bifidobakterien und Intestinalmucosa wurde die β -Galaktosidase-Aktivität nach DAHLQVIST [9] mit geringen Veränderungen der Methode (0,1 M Acetatpuffer, pH 5,8, Inkubationstemperatur 42 °C, Inkubationszeit 20 min, Abbruch durch 3minütiges Erhitzen im siedenden Wasserbad) bestimmt.

Ergebnisse

Nach Monoassoziation keimfreier Ratten mit *Bifidobacterium longum* konnten sich die Bakterien in allen Regionen des Magen-Darm-Kanals ansiedeln und vermehren. Tab. 1 enthält die durchschnittliche Keimzahl im Inhalt verschiedener Magen-Darm-Abschnitte und in den Faeces unter Standard- und Lactose-Diät von je 6 monoassoziierten Tieren. Die Monoassoziation führte nur zu einer unbedeutenden Veränderung des Faeces-pH unter Standard-Diät (vor Assoziation: $6,95 \pm 0,21$, $n = 12$, nach Assoziation: $7,33 \pm 0,36$, $n = 8$). Die Bifidobakterien bewirkten jedoch in Gegenwart von Lactose ein signifikantes ($p < 0,001$) Absinken des pH auf $6,14 \pm 0,28$ ($n = 8$).

Tabelle 1

Keimzahlen (*B. longum*) im Intestinaltrakt und Faeces von je 6 monoassoziierten Ratten mit Standard-Diät bzw. Lactose-Diät

Darmabschnitt	Keimzahl [lg/g FS]	
	Standard-Diät	Lactose-Diät
Magen	$7,2 \pm 0,9$	$7,9 \pm 1,6$
Dünndarm (1. Hälfte)	$5,6 \pm 1,3$	$7,7 \pm 1,8$
Dünndarm (2. Hälfte)	$5,7 \pm 1,1$	$7,8 \pm 0,7$
Caecum	$9,0 \pm 0,3$	$10,0 \pm 0,3$
Colon	$9,2 \pm 0,2$	$9,8 \pm 0,3$
Faeces	$9,4 \pm 0,3$	$10,1 \pm 0,1$

Die Faeces-Untersuchung der Tiere von Gruppe 2 und 4 auf die β -Galaktosidase-Aktivität der anzüchtbaren Keime brachte in Abhängigkeit von der Methodik (Aktivitätsbestimmung direkt in den Faeces nach deren Entnahme oder in Einzelkolonien, die aus den Faeces über Nährbodenplatten isoliert wurden) unterschiedliche Ergebnisse. Die auf Lebendkeime bezogene Aktivität war in jedem Falle bei kultivierten Bifidobakterien geringer. Sie betrug 2–41 % ($15,0 \pm 9,4$; $n = 72$) der sofort nach Entnahme der Faeces gemessenen Aktivität, wobei keine Proportionalität zwischen den absoluten Aktivitätswerten bestand.

Nährbodenvariationen ergaben unter sonst gleichen Kultivierungsbedingungen starke Schwankungen sowohl im Zellwachstum der Bifidobakterien als auch in der spezifischen Aktivität der aus diesen Keimen gewonnenen β -Galaktosidase (Tab. 2).

Ohne zusätzliche Keimkultivierung wurde die chymale und mucosale lactose-spaltende Aktivität in den einzelnen Darmabschnitten untersucht.

Abb. 1 enthält die zusammengefaßten Ergebnisse. Im Mageninhalt wurden bei allen Versuchsgruppen nur sporadisch Aktivitäten nachgewiesen, die in der Darstellung nicht

Tabelle 2
Einfluß der Nährbodenzusammensetzung auf Wachstum und Gehalt an β -Galaktosidase von *B. longum*

Nährboden	Zellfeuchtmasse [g]	β -Galaktosidase-Aktivität nach Zellaufschluß	
		gesamt [μ kat]	spezifisch [μ kat/g Prot]
Standardmedium	4,5	1,38	156
Standardmedium + Hefeextrakt	4,7	1,60	117
Standardmedium + Hefeextrakt + 0,1 % Glucose	0,5	1,27	110
Standardmedium + Hefeextrakt + 0,3 % Glucose	0,7	0,90	69
Standardmedium + Hefeextrakt + 0,6 % Glucose	0,9	0,59	32
Standardmedium + Hefeextrakt + 0,1 % Lactose	1,1	1,34	54
Standardmedium + Hefeextrakt + 1,0 % Lactose	1,2	0,07	4

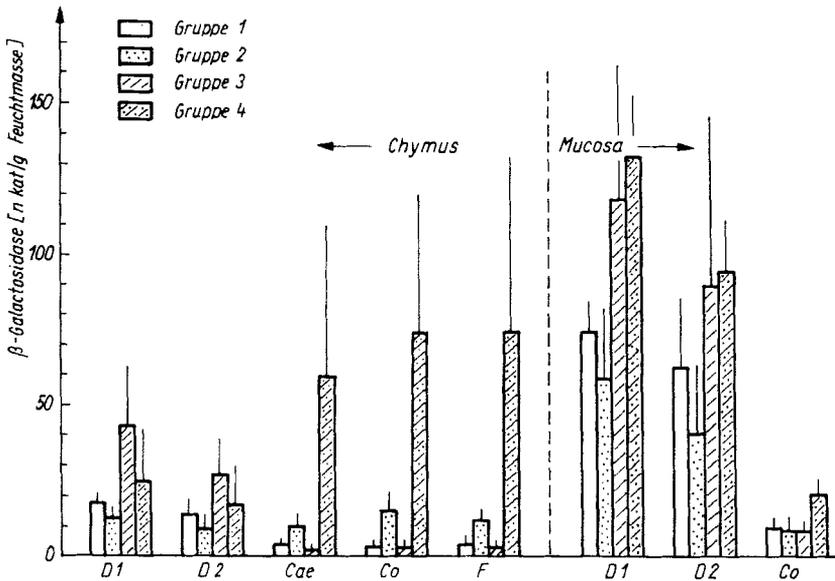


Abb. 1.
 β -Galaktosidase-Aktivität in Chymus und Mucosa mit und ohne Lactose ernährter gnotobiotischer Ratten

enthalten sind. Bei keimfreien Tieren unter Standard-Diät (Gruppe 1) nimmt die Aktivität vom proximalen Dünndarm bis hin zum Colon einschließlich Faeces ab. Ähnlich verhält sich der Aktivitätsverlauf bei mit Lactose gefütterten keimfreien Tieren (Gruppe 3). Allerdings weisen beide Dünndarmabschnitte dieser Tiere gegenüber Gruppe 1 höhere Aktivitäten auf ($p < 0,05$). Monoassoziation mit *B. longum* verursacht in Caecum, Colon und Faeces einen Anstieg der Aktivität, der unter Lactose-Futter (Gruppe 4) besonders groß und wegen erheblicher Schwankungen nur mit $p < 0,05$ signifikant ist. Die mucosale β -Galaktosidase-

Aktivität wird durch den Keimstatus nicht beeinflusst. Lactose-Futter (Gruppe 3 und 4) ruft in der Dünndarm-Mucosa eine allerdings nicht statistisch zu sichernde Aktivitätssteigerung hervor.

Diskussion

Die Erfassung von Stoffwechselleistungen einzelner Mikroorganismen innerhalb eines mikroökologischen Systems bereitet vor allem methodische Schwierigkeiten. Im konventionellen Organismus stellen sich die biochemischen Aktivitäten von Vertretern der Darmflora nur summarisch dar. Der Substratabbau kann sich über Kaskaden von Stoffwechselprozessen verschiedener Genera, Spezies und Subspezies abwickeln. Umfang und Anteil ihrer Einzelleistungen bleiben verborgen. Isoliert man aus komplexen mikroökologischen Systemen einzelne Keime oder Keimgruppen durch selektive Kultivierungsmethoden, so wird man zwar in die Lage versetzt, biochemische Leistungen definierter Mikroorganismen zu verfolgen, begibt sich aber auch in Gefahr, durch veränderte äußere Bedingungen Untersuchungen an Mikroorganismen mit einer artifiziell modifizierten Stoffwechsellage durchzuführen. So sind auch die Ergebnisse im ersten Teil dieser Arbeit zu interpretieren. Überraschend ist, daß bereits nach einer *in vitro*-Passage die β -Galaktosidase-Aktivität der Bifidobakterien derartig stark abnimmt. Da die Parameter der Aktivitätsabnahme in keinem erkennbaren Verhältnis zur absoluten Aktivität oder zu anderen Merkmalen stehen, kann mit der Methode der Kultivierung von Bifidobakterien auf Spezialnährböden keine Aussage über deren Aktivität im Darmlumen gewonnen werden. Bei der Testung der Nährbodenzusammensetzung ist auffällig, daß eine Erhöhung der Glucose- oder Lactosezusätze die Verminderung der Gesamt- wie auch der spezifischen β -Galaktosidase-Aktivität zur Folge hat, möglicherweise ein Ergebnis der *in vitro* herrschenden statischen Verhältnisse.

Metaboliten, die unter *in vivo*-Bedingungen aus dem Intestinaltrakt absorbiert werden, verbleiben unter diesen Bedingungen im Substrat und führen zur Hemmung der Aktivität, ungeachtet der durch starke Puffersysteme hervorgerufenen pH-Konstanz. Nach BULLEN u. a. [10] soll bereits die substantielle Gegenwart von Essigsäure/Acetat eine antimikrobielle Wirkung hervorrufen.

Der Einsatz gnotobiotischer Versuchstiere bietet für derartige Untersuchungen den erheblichen Vorteil, daß zur Kultivierung definierter Keimgruppen ein *in vivo*-System mit im Rahmen der biologischen und biochemischen Individualität konstanten Kultivierungsbedingungen zur Verfügung steht. Bei der Interpretation der Ergebnisse muß allerdings berücksichtigt werden, daß durch das Fehlen von Interaktionen mit weiteren Mikroorganismen auch bei diesem Modell die tatsächlichen Verhältnisse nicht im vollen Umfang widerspiegelt werden können. Das vorliegende Untersuchungsmaterial vermittelt jedoch einen Überblick über die Anteile von mucosaler und chymaler β -Galaktosidase-Aktivität in den einzelnen Magen-Darm-Abschnitten. Die in der Mucosa keimfreier Ratten (Gruppe 1) gefundenen Aktivitäten entsprechen den aus der Literatur bekannten Werten [11]. Die Tendenz zur Steigerung der mucosalen Aktivität durch Lactose-Nahrungen (Abb. 1) entspricht den unter konventionellen Bedingungen erhobenen Befunden [12]. Eine signifikante Erhöhung ist jedoch erst nach einer längeren Versuchszeit zu erwarten.

Da auch unter keimfreien Verhältnissen im Chymus aller Darmabschnitte β -Galaktosidase-Aktivität nachgewiesen werden konnte, muß bei künftigen Untersuchungen berücksichtigt werden, daß im Lumen — durch Desquamation von Enterocyten hervorgerufen —

ständig lactosespaltende Aktivitäten mucosalen Ursprungs vorhanden sind. Unter Berücksichtigung der in den Ergebnissen nicht ausgewiesenen Gesamtmasse an Mucosa und Chymus ergeben überschlägige Kalkulationen, daß im Lumen des Dünndarms keimfreier Ratten etwa 50–75% der mucosalen Gesamtaktivität vorhanden sind. Die Monoassoziation mit Bifidobakterien beeinträchtigt diese Relationen aufgrund der geringen Keimzahlen im Dünndarm nur unwesentlich. Die höheren Aktivitäten in distalen Darmabschnitten stehen im direkten Verhältnis zu den dort gefundenen Keimzahlen. Der Aktivitätsanstieg im Chymus von Caecum und Colon sowie in den Faeces monoassoziierter Tiere nach Lactosefütterung (Gruppe 4) bestätigt frühere Ergebnisse [3, 5] und ist ein Hinweis darauf, daß sich die Intestinalflora schneller an nutritive Variationen zu adaptieren vermag als der Makroorganismus.

Von POIFFAIT u. a. [13] wird eingeschätzt, daß die Darmflora zu 40% am Lactoseabbau beteiligt ist. Nach ADRIAN [2] sind die mikrobiellen Aktivitäten im Verhältnis 1:11,8:4,1 auf den Dünndarm, das Caecum und das Colon verteilt.

Trotz hoher Keimzahlen und hoher β -Galaktosidase-Aktivität im Lumen des distalen Intestinaltraktes erfolgt nur eine geringfügige pH-Wert-Absenkung in den Faeces bei Gruppe 4. Diese Ergebnisse untermauern frühere Befunde, wonach die Präsenz hoher Bifidobakterien-Keimzahlen für die starke pH-Wert-Erniedrigung unter Frauenmilch nicht direkt verantwortlich ist [14].

Nach den vorliegenden Ergebnissen liefern Untersuchungen zum Stoffwechselverhalten von Darmflorabestandteilen mittels in vitro-Kultivierungstechniken keine verlässlichen Daten. Der Einsatz gnotobiotischer Versuchstiere bietet gegenüber anderen Methoden den Vorteil, unter mikroökologisch konstanten Bedingungen die Stoffwechselleistung von Reinkulturen definierter Mikroorganismen unmittelbar messen zu können.

Summary

J. SCHULZE, R. HERZOG, H.-J. ZUNFT and F.-K. GRÜTTE: Utilization of the gnotobiotic rat for determining the in vivo activity of *Bifidobacterium* β -galactosidase

Under the conditions of in vitro cultivation, the height of the β -galactosidase activity of *Bifidobacterium spec.* is essentially influenced by the composition of the culture medium.

The use of gnotobiotic (germ-free and monoassociated with *Bifidobacterium longum*) rats permitted to differentiate in the chyme between β -galactosidase activities of mucosal and microbial origin. In germ-free animals, the chyme in the small intestine and the colon contains nearly 10–20% of the activity measured in the mucosa (in each case expressed as g on a wet-weight basis).

Monoassociation with *B. longum* does not affect the lactose-splitting activity of the chyme in the small intestine, but increases the activity of the chyme in the colon to twice the value of the mucosal activity.

In the monoassociated animals, feeding of lactose leads to a further multiple increase of the chymal β -galactosidase activity in the caecum, colon and faeces.

Резюме

Ю. ШУЛЬЦЕ, Р. ХЕРЦОГ, Х.-Й. ЦУНФТ и Ф.-К. ГРЮТТЕ: Использование безмикробных крыс для определения in-vivo-активности β -галактозидазы бифидобактерий

На уровень активности β -галактозидазы бифидобактерий, в условиях культивирования in vitro, существенно влияет состав питательной среды.

При использовании гнотобиотических (безмикробных и моноассоциированных *Bifidobacterium longum*) крыс в химусе можно дифференцировать β -галактозидазную активность мукозального и

микробиологического происхождения. У безмикробных животных в химусе тонкой и толстой кишок находят примерно 10—20% активности, измеряемой в слизистой (соотнесенная в каждом случае на г сырой массы).

Моноассоциация с *B. longum* не влияет на расщепляющую лактозу активность кишечного содержимого, увеличивает, однако, активность содержимого толстого кишечника вдвое по сравнению с мукосальной активностью.

Кормление лактозой приводит у моноассоциированных животных в слепой кишке, толстой кишке и кале к дальнейшему повышению активности β -галактозидазы химуса.

Literatur

- [1] KOLDOVSKY, O., in P. J. RANDLE, D. F. STEINER und W. J. WHELAN, Carbohydrate metabolism and its disorders, S. 481—521. Academic Press, London 1981.
- [2] ADRIAN, J., und R. FRANGNE, Intern. Z. Vitamin- u. Ernähr.-Forsch. **48**, 170—176 (1978).
- [3] КИМ, К.-И., N. J. BENEVENGA und R. H. GRUMMER, J. Nutrit. **109**, 856—863 (1979).
- [4] GRÜTTE, F.-K., und R. NOACK, in J. C. SOMOGYI und H. HAENEL (Eds.), Nutrition in early childhood and its effects in later life. Bibl. Nutrit. Dieta **31**, 40—54 (1982).
- [5] SCHULZE, J., R. HERZOG und F.-K. GRÜTTE, in H. BERNHARDT und M. KNOKE (Hrsg.), Mikroökologie des Magen-Darm-Kanals des Menschen, Mikrobielle Umwelt und antimikrobielle Maßnahmen **6**, 64—67 (1982).
- [6] MIYAKAWA, M., in M. MIYAKAWA und T. D. LUCKEY (Eds.), Advances in germfree research and gnotobiology, S. 48—62. CRC Press, Ohio 1968.
- [7] MCCOLLUM, E. V., und N. SIMMONDS, J. biol. Chem. **33**, 55—89 (1918).
- [8] ZUNFT, H.-J., J. SCHULZE, H. GÄRTNER und F.-K. GRÜTTE, Ann. Nutrit. Metabolism **27**, 470—476 (1983).
- [9] DAHLQVIST, A., Analyt. Biochem. **22**, 99—107 (1968).
- [10] BULLEN, C. L., und P. V. TEARLE, J. Med. Microbiol. **9**, 335—344 (1976).
- [11] REDDY, B. S., und B. S. WOSTMANN, Arch. Biochem. Biophysics **113**, 609—616 (1966).
- [12] GRÜTTE, F.-K., J. SCHULZE und H. GÄRTNER, Nahrung **11**, 901—902 (1967).
- [13] POIFFAIT, A., C. DAVID und J. ADRIAN, Intern. Z. Vitamin- u. Ernähr.-Forsch. **52**, 96—101 (1982).
- [14] GRÜTTE, F.-K., und W. MÜLLER-BEUTHOW, Nahrung **23**, 455—465 (1979).

Dr. J. SCHULZE, RENATE HERZOG, Dr. H.-J. ZUNFT und Dr. F.-K. GRÜTTE, Zentralinstitut für Ernährung, DDR-1505 Bergholz-Rehbrücke, Arthur-Scheunert-Allee 114—116

Eingegangen 31. 8. 1983