

## **Ein Beitrag zur Bestimmung des bakteriellen Kotstickstoffs bei Ratten**

**H. Müller und A.-E. Harmuth-Hoene**

Zentrallaboratorium für Isotopentechnik und Institut für Biochemie,  
Bundesforschungsanstalt für Ernährung, Karlsruhe

### *Zusammenfassung*

Es wird eine einfache Methode zur Isolierung der Kotbakterien von Ratten vorgestellt, die hohe Ausbeuten und einen hohen Reinheitsgrad gewährleistet. In dem Bakterienisolat wurden Gesamtstickstoff und 2,6-Diamino-pimelinsäure (DAP) bestimmt und aus beiden Werten ein Faktor berechnet, der es gestattet, aus dem DAP-Gehalt des Kotes den Anteil des Bakterienstickstoffs im Kot zu ermitteln. Im Kot von Ratten, die eine halbsynthetische Kontrolldiät erhielten (4 % Cellulose), betrug der Umrechnungsfaktor 15,7. Bei Zusatz von 8 % Guarmehl zur Kontrolldiät (im Austausch gegen Stärke) wurde ein drastischer Anstieg des DAP-Gehaltes im Kot und dadurch bedingt eine deutliche Verringerung des Umrechnungsfaktors auf 11,5 beobachtet. Wurde statt des Guarmehlzusatzes der Celluloseanteil von 4 auf 12 % erhöht, zeigte sich keine Veränderung des Faktors. Offensichtlich wird die Aktivität der Darmflora durch Guarmehl wesentlich stärker beeinflusst als durch Cellulose. Die Ergebnisse lassen eine deutliche Abhängigkeit des Umrechnungsfaktors von der Art des dem Futter zugesetzten Ballaststoffes erkennen.

### *Summary*

A simple method is described by which the fecal flora of rats has been isolated with high recovery and a high purity grade. Total nitrogen and 2,6-diamino-pimelic acid were determined in the isolated bacteria. From both values a factor was calculated, which permits the estimation of fecal bacterial nitrogen from fecal DAP content. In the feces of rats on a semisynthetic control diet (4 % cellulose) this factor was 15.7. Addition of 8 % guar (by substitution for starch) resulted in a drastic increase in fecal DAP content thus lowering the factor to 11.5. When the proportion of cellulose in the control diet was raised from 4 to 12 %, no change in the factor was observed. This indicates a pronounced effect on the bacterial activity by guar but not by cellulose. It is concluded that the factor used to calculate fecal microbial nitrogen from fecal DAP content is dependent on the kind of dietary fiber ingested.

*Schlüsselwörter:* Cellulose, Guarmehl, Bakterienisolierung, Bakterienstickstoff, 2,6-Diamino-pimelinsäure-Bestimmung

### **Einleitung**

Schwerverdauliche Polysaccharide – auch Ballaststoffe genannt – führen zu einer signifikanten Erhöhung der Stickstoffausscheidung mit dem Kot bei wachsenden Ratten (3). Nach eigenen Untersuchungen (4) ist diese

Erhöhung vorwiegend auf Stickstoff endogener Herkunft und nicht auf einen Anstieg von unverdaulichem Nahrungsprotein zurückzuführen. Somit stellte sich die Frage der genauen Differenzierung des endogenen Kotstickstoffs. Endogener oder metabolischer Kotstickstoff – auch Darm-Verlust-Stickstoff genannt – entstammt vorwiegend den Sekreten der Pankreasdrüse und des Verdauungstraktes (2). Neben den Verdauungsekreten tragen auch abgeschilferte Darmepithelzellen zur endogenen Stickstoffausscheidung mit dem Kot bei (7). Der Bakterienstickstoff im Kot ist aber ebenfalls endogener Herkunft, wenn man den endogenen Kotstickstoff als Differenz von Gesamt-Kotstickstoff und unverdaulichem Nahrungsstickstoff definiert. Hierzu gibt es aber auch abweichende Meinungen (1), nach denen der Bakterienstickstoff nicht zum endogenen Stickstoff zu rechnen sei, mit der Begründung, daß die bakterielle Eiweißsynthese im Dickdarm exogener Natur sei. Dabei wird jedoch übersehen, daß der von den Bakterien aufgenommene Stickstoff überwiegend endogenen Ursprungs ist. Seine Mitberücksichtigung im endogenen Kotstickstoff scheint deshalb gerechtfertigt. Die modernen Bestimmungsmethoden unter Zuhilfenahme  $^{15}\text{N}$ -markierter Verbindungen als Tracer (8, 5) lassen eine weitergehende Differenzierung nicht zu.

Der bakterielle Stickstoffanteil im Gesamt-Kotstickstoff bzw. im endogenen Kotstickstoff läßt sich über die 2,6-Diamino-pimelinsäure-(DAP-) Bestimmung ermitteln (4). Die Methodik für die Bestimmung der DAP – einem Zellwandbestandteil gramnegativer Bakterien – wurde von Mason (9) und von Hutton et al. (6) erarbeitet. Für die Bestimmung des Anteils an Bakterienstickstoff im Gesamt-Kotstickstoff muß der Umrechnungsfaktor von DAP auf Bakterienstickstoff bekannt sein, der nur über die Gewinnung eines reinen Bakterienisolates zu ermitteln ist.

In der vorliegenden Untersuchung wurde unter Verwendung einer modifizierten Methode zur Abtrennung der Bakterien aus dem Rattenkot geprüft, ob dieser Umrechnungsfaktor von der Diät abhängig ist.

## Material und Methoden

### 1 Tierfütterung und -haltung

Es wurden 9 männliche Sprague-Dawley-Ratten mit einer Lebendmasse zwischen 90 und 100 g einzeln in Stoffwechsellkäfigen unter Standardbedingungen (22°C, 65% relative Luftfeuchte, 12. Std. Tag- und Nachtzyklus) gehalten. Die Zusammensetzung der semisynthetischen Versuchsdiäten, die jeweils 3 Tiere erhielten, ist in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Die Mineralstoffe, Spurenelemente und Vitamine wurden den Diäten in optimalen Mengen zugesetzt. Jedes Tier erhielt täglich 12 g Futter, das stets restlos verzehrt wurde. Wasser wurde ad libitum angeboten. Nach einer 4tägigen Adaptionsperiode wurde allen Tieren 75 mg Glycin – gelöst in 0,5 ml dest. Wasser – per Schlundsonde verabreicht. Dadurch wurden die gleichen Versuchsbedingungen aufrechterhalten, die in Versuchen zur  $^{15}\text{N}$ -Markierung der Ratte für die Bestimmung des endogenen Kot-N gewählt worden waren (4).

### 2 Kotsammlung

Das Sammeln der Kotproben wurde am Tage nach der Glycingabe begonnen und über einen Zeitraum von 8 Tagen fortgesetzt. Die täglich von den 3 Tieren jeder

Tab. 1. Zusammensetzung der Versuchsdiäten in %.

Komponenten	Kontrolldiät	Guarmehldiät	Cellulose-angereicherte Diät
Casein	22	22	22
Maisstärke	53	45	45
Zucker	10	10	10
Maiskeimöl	3	3	3
Mineralstoffe	6	6	6
Vitamine	2	2	2
Cellulose	4	4	12
Guarmehl	-	8	-

Versuchsgruppe ausgeschiedenen Kotmengen wurden vereinigt, gewogen und eingefroren. Für die Isolierung der Bakterien wurden die Kotproben der Tage 5–8 ausgewählt.

### 3 Isolierung der Bakterien

- a) Die Kotproben (ca. 4 bis 10 g) der Tage 5 und 6 wurden jeweils in 250 ml destilliertem Wasser mit dem Ultra-Turrax homogenisiert, in 6 Aliquote aufgeteilt und nach der Vorschrift von Mason (9) 15 min bei 5000 g zentrifugiert. Die zusammen mit den schleimigen oberen Schichten der Rückstände abgehobenen Überstände wurden 30 min bei 20 000 g zentrifugiert und die Überstände verworfen. Die Rückstände wurden anschließend mit jeweils 20 ml dest. Wasser versetzt, mit dem Glasstab gerührt, bis sich eine milchig-trübe Lösung bildete, und erneut 30 min bei 20 000 g zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen.
- b) In Abänderung der Vorschrift a) wurden die durch die Behandlung mit dem Ultra-Turrax gewonnenen Homogenisate von den Kotproben der Tage 7 und 8 durch 3fache Siebung mit Veco-Präzisions-Siebeinsätzen (Durchmesser 75 mm) abnehmender Maschenweite (250 → 100 → 40  $\mu$ ) vorgereinigt. Der Durchgang bei 40  $\mu$ m wurde wie unter a) angegeben portioniert und anschließend 10 min bei 1000 g zentrifugiert. Die Überstände wurden vorsichtig abgehoben und nochmals 30 min bei 20 000 g zentrifugiert. Nach dem Abdekantieren der Überstände wurden zu den Rückständen jeweils 20 ml dest. Wasser gegeben und Waschworgang und Zentrifugation wie bei a) beschrieben durchgeführt. Der so erhaltene Rückstand ist ein reines Bakteriengemisch, wie die mikroskopische Untersuchung zeigte.

### 4 Stickstoff- und Diamino-pimelinsäure-Bestimmung

Die vereinigten Bakterienisolate aus den Kotproben der Tage 5 und 6 bzw. 7 und 8 wurden mit jeweils 50 ml 6 M HCl in 100 ml Laborflaschen mit ISO-Gewinde (Schott-Duran-Glas) 8 Stunden bei 120–125 °C im Trockenschrank hydrolysiert und anschließend filtriert. Die Filtrate wurden für die separaten Stickstoff- und DAP-Bestimmungen halbiert und im Vakuum-Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt.

#### a) Stickstoffbestimmung

Die Stickstoffbestimmung erfolgte nach der Mikro-Kjeldahl-Methode mit  $K_2SO_4/Se$ -Tabletten als Katalysator und einem  $H_2SO_4/H_3PO_4$ -Gemisch, dem gegen Ende des Aufschlusses noch Perhydrol ( $H_2O_2$ ) zugesetzt wurde. Das bei der Destillation in Borsäure absorbierte  $NH_3$  wurde durch Titration mit 0,1 M HCl unter Verwendung eines Mischindikatoren bestimmt.

## b) DAP-Bestimmung

Die Bestimmung der DAP erfolgte in Anlehnung an die Vorschrift von Mason (9). Bei der Ionenaustauschchromatographie wurden 5-ml-Fractionen gesammelt, von denen jeweils 2 ml mit 4 ml saurem Ninhydrin-Reagenz im siedenden Wasserbad zur Farbreaktion gebracht wurden. Die photometrische Messung erfolgte bei 2 verschiedenen Wellenlängen (440 und 410 nm), um Extinktionswerte eliminieren zu können, die nicht von der DAP herrührten. Dünnschichtchromatographische Untersuchungen mit verschiedenen Adsorbentien und Fließmittelgemischen zeigten, daß die DAP-Fractionen außerdem noch in größeren Konzentrationen Isoleucin und/oder Leucin neben einer in geringer Konzentration vorliegenden unbekannteren ninhydrinpositiven Verbindung enthielten. Diese Verbindungen stören die DAP-Bestimmung mit dem genannten Reagenz nicht.

## Ergebnisse

In den Tabellen 2 und 3 sind die Ergebnisse zusammengefaßt. Zunächst ist zu erkennen, daß die Kotmengen stark von der Zusammensetzung der Versuchsdiäten abhängen. Diese Unterschiede sind nicht allein durch einen unterschiedlichen Wassergehalt, sondern durch die Menge der mit der Diät zugeführten Ballaststoffe sowie durch das Ausmaß ihrer bakteriellen Zersetzung bedingt. Bei der Aufarbeitung der Kotproben fiel schon der unangenehme Geruch jener Proben auf, die von Tieren der Guarmehl-Gruppe stammten. Das deutete auf einen starken mikrobiellen Abbau dieser Kotproben hin. Die nach unserer Vorschrift (3b in Material und Methoden) gewonnenen Bakterienmengen aus den Kotproben der Tiere der Guarmehl-Gruppe waren gegenüber denen von Tieren der beiden anderen Versuchsgruppen stark erhöht. Beim Vergleich der in den Tabellen 2 und 3 wiedergegebenen Versuchsergebnisse ist klar zu erkennen, daß durch unsere Abtrennungsmethode (3b) wesentlich höhere Bakterienausbeuten erzielt wurden. Entscheidend ist der Reinheitsgrad der isolierten Bakterienmengen, der nach der von uns konzipierten Methode der fraktionierten Siebung wesentlich höher liegt. Dies lassen die höheren

Tab. 2. Stickstoff- und DAP-Gehalt von Rattenkotbakterien, isoliert nach Mason (9).

Versuchsdiät	Kotmenge <sup>a</sup> (g)	N <sub>2</sub> -Gehalt der isolierten Bakterien (mg)	DAP <sup>b</sup> -Gehalt der isolierten Bakterien (µg) <sup>c</sup>	DAP % des Bakt.- Stickstoffs	Umrechnungsfaktor F <sup>d</sup>
Kontrolldiät	9,45	2,35	130,5 ± 17,9	5,55 ± 0,76	18,0 ± 2,5
Guarmehldiät	14,14	4,87	390,0 ± 51,3	8,01 ± 1,05	12,5 ± 1,6
Cellulose-angereicherte Diät	18,02	1,79	83,8 ± 0,4	4,68 ± 0,02	21,4 ± 0,1

<sup>a</sup> Vereinigte Kotproben der 3 Versuchsratten von 2 Versuchstagen

<sup>b</sup> 2,6-Diamino-pimelinsäure

<sup>c</sup> n = 4-7

<sup>d</sup>  $F = \frac{\text{Bakterien} - N \text{ (mg)}}{\text{DAP (mg)}}$

Tab. 3. Stickstoff- und DAP-Gehalt von Rattenkotbakterien, isoliert nach der Vorschrift 3b in Material und Methoden.

Versuchsdiät	Kot- menge <sup>a</sup> (g)	N <sub>2</sub> -Gehalt der isolier- ten Bakte- rien (mg)	DAP <sup>b</sup> -Ge- halt der iso- lierten Bak- terien (µg) <sup>c</sup>	DAP % des Bakt.- Stickstoffs	Umrech- nungs- faktor F <sup>d</sup>
Kontrolldiät	10,15	6,64	423,4 ± 21,8	6,38 ± 0,33*	15,7 ± 0,8*
Guarmehldiät	13,79	30,78	2667,6 ± 278,8	8,67 ± 0,91	11,5 ± 1,2
Cellulose-ange- reicherte Diät	18,90	5,96	383,6 ± 26,4	6,44 ± 0,44**	15,5 ± 1,1**

<sup>a</sup> Vereinigte Kotproben der 3 Versuchsratten von 2 Versuchstagen

<sup>b</sup> 2,6-Diamino-pimelinsäure

<sup>c</sup> n = 4-7

<sup>d</sup>  $F = \frac{\text{Bakterien} - \text{N (mg)}}{\text{DAP (mg)}}$

\* signifikanter Unterschied zu den entsprechenden Werten in Tabelle 2, p < 0,05

\*\* signifikanter Unterschied zu den entsprechenden Werten in Tabelle 2, p < 0,001

Werte der auf den Bakterienstickstoff bezogenen DAP-Gehalte besonders in Kotproben mit geringem Bakterienanteil (Kontrolldiät und Cellulose-angereicherte Diät) in Tabelle 3 erkennen.

## Diskussion

Viele Autoren (9, 6, 12, 11) benutzten bisher die DAP als Marker zur Bestimmung des Bakterienanteils im Chymus und im Kot. Neben Untersuchungen bei Wiederkäuern und Schweinen wurden auch Rattenversuche unter verschiedenen Gesichtspunkten durchgeführt. Um den Faktor zur Berechnung des Bakterienstickstoffs aus dem DAP-Gehalt zu bestimmen, wurden unterschiedliche Methoden zur Isolierung der Bakterien verwendet. Es war zu erwarten, daß dieser Faktor diät- und speziesabhängig unterschiedliche Werte (11,5-26,1) im Kot annehmen kann, weil die Zusammensetzung der Fäkalflora stets großen Schwankungen unterliegt. Diese Unterschiede können aber auch auf Verunreinigungen der Bakterienisolate beruhen.

Unsere Untersuchungsergebnisse zeigen eine deutliche Abhängigkeit des Umrechnungsfaktors von der Art, nicht dagegen von der Menge des aufgenommenen Ballaststoffes. Aufgrund seiner Molekularstruktur wird Guarmehl von der Darmflora wesentlich stärker abgebaut als Cellulose, was zu einer erhöhten Keimzahl und Veränderungen in der Fäkalflora führt und – wie gezeigt werden konnte – zu einem deutlich erniedrigten Umrechnungsfaktor. Unser Befund, daß sich mit Erhöhung des Celluloseanteils in der Diät der Umrechnungsfaktor nicht ändert, bestätigt die Ergebnisse von Poppe und Meier (11), in deren Versuchen mit Schweinen der Zusatz von Strohmehl und die Verwendung unterschiedlicher Proteinträger ebenfalls ohne Einfluß auf den Umrechnungsfaktor blieb. Auf die Zunahme der Gesamtkeimzahl nach Umstellung der Ernährung von

Ratten auf eine guarmehlhaltige Diät haben Münzner und Harmuth-Hoene (10) hingewiesen. Der geschätzte Anteil gramnegativer Keime im Kotasstrich der Kontrolltiere lag bei 35–40 %, bei Tieren der Guarmehl-Gruppe dagegen unter 10 %. Nach der allgemeinen Erkenntnis, daß die 2,6-Diamino-pimelinsäure gramnegative Bakterien repräsentiert, wäre aber ein Ansteigen gramnegativer Keime bei Guarmehlverfütterung zu erwarten gewesen. Diese Diskrepanz kann nicht erklärt werden.

#### Danksagung

Für die zuverlässige Betreuung der Versuchstiere und die Durchführung der Stickstoffanalysen danken wir Frl. P. Crocoll und Frau R. Manderla.

#### Literatur

1. Bergner U, Bergner H (1983) Methodische Untersuchungen zur endogenen Kot-N-Ausscheidung  $^{15}\text{N}$ -markierter Versuchsratten. Arch Tierernähr 33:317–325
2. Cuthertson D, Tilstone PWJ, Bigwood EJ (1972) Protein and amino acid functions. International Encyclopaedia of Food and Nutrition, Vol 11, Pergamon Press, Oxford New York Toronto Sydney Braunschweig
3. Harmuth-Hoene AE, Schwerdtfeger E (1979) Effect of indigestible polysaccharides on protein digestibility and nitrogen retention in growing rats. Nutr Metab 23:399–407
4. Harmuth-Hoene AE, Müller H (1984) Der Einfluß von Guarmehl auf die endogene Stickstoffausscheidung in Ratten, bestimmt mit Hilfe der N-15-Tracertechnik. Z. Ernährungswiss (in Vorbereitung)
5. Hernández M, Simon O, Bergner H (1981) Eine neue Methode zur Prüfung der Qualität von Nahrungsproteinen für den Erhaltungsstoffwechsel. 3. Mitt: Methodische Untersuchungen an  $^{15}\text{N}$ -markierten ausgewachsenen Ratten. Arch Tierernähr 31:651–660
6. Hutton K, Bailey FJ, Annison EF (1971) Measurement of the bacterial nitrogen entering the duodenum of the ruminant using diaminopimelic acid as a marker. Br J Nutr 25:165–173
7. Krawielitzki K, Bock HD (1976) Zur Problematik des Stickstoff-Stoffwechsels monogastrischer Tierarten. Arch Tierernähr 26:83–98
8. Krawielitzki K, Smulikowska S (1977) Versuche zur Bestimmung des endogenen und exogenen fäkalen N-Anteiles monogastrischer Tierarten. Arch Tierernähr 27:39–47
9. Mason VC (1969) Some observations on the distribution and origin of nitrogen in sheep faeces. J Agric Sci, Camb 73:99–111
10. Münzner R, Harmuth-Hoene AE (1978) Einfluß einer guarmehlhaltigen Diät auf die Fäkalflora von Ratten. Nutr Metab 22:368–373
11. Poppe S, Meier H (1983) Zur Aminosäurezusammensetzung der Kotbakterien beim Schwein. Arch Tierernähr 33:151–154
12. Siddons RC, Beever DE, Nolan JV (1982) A comparison of methods for the estimation of microbial nitrogen in duodenal digesta of sheep. Br J Nutr 48:377–389

Eingegangen 24. Oktober 1983

Für die Verfasser:

Dr. H. Müller, Bundesforschungsanstalt für Ernährung, Engesserstraße 20, D-7500 Karlsruhe