Scheuer, R. (2016) Mitteilungsblatt Fleischforschung Kulmbach 55, Nr. 212, 29-32

Erfassung der Bioaktivität von Mikroorganismen auf Grundlage von Redoxpotential-Werte-Verläufen

R. SCHEUER

Zusammenfassung

Wird das „Gleichgewicht“ in einem Messmedium mit Mikroflora durch eine kurzzeitige Änderung der Milieu-Bedingungen gestört, zeigen sich in den kontinuierlich gemessenen Redoxpotential-Werte-Verläufen charakteristische Peaks mit definierten Kompensationszeiten (Zeitraum bis zur erneuten Einstellung des Gleichgewichts. Die Kompensationszeiten dieser „Störpeaks“ stehen in enger Korrelation zur Bioaktivität/Vitalität der untersuchten Mikroflora, und sie sind somit geeignete Kenngrößen, sowohl zur Optimierung biotechnologischer Prozess-Steuerungen, als auch dazu, den Einfluss bioaktiver Substanzen auf die Stoffwechsel-Aktivitäten von Mikroorganismen zu bestimmen.

Schlüsselwörter Redoxpotential – Bioaktivität – Kompensationszeit

Einleitung

Das Wachstum einer statischen Bakterienkultur kann in vier Phasen eingeteilt werden: Anlaufphase, Exponentielle Phase, Stationäre- und Absterbe-Phase (Abb. 1).

Mikroben verfügen über eine hohe Anpassungsfähigkeit ihres Stoffwechsels an Veränderungen des sie umgebenden Milieus. Das Ausmaß dieser Fähigkeit, d. h. die Bioaktivität/Vitalität der Keime, ist nicht nur von den spezifischen Eigenschaften und Anforderungen der einzelnen Mikroorganismen-Gruppen abhängig, sondern vielmehr auch von dem Entwicklungs-Stadium (der Wachstumsphase) in dem sich die Mikroben gerade befinden. Für eine Optimierung biotechnologischer Prozess-Führungen ist es daher unabdingbar, die Aktivität der Mikroflora in den Reaktoren kontinuierlich zu verfolgen, um eine hohe Ausbeute an erwünschten Fermentations-Produkten oder an der Gesamt-Biomasse zu erhalten. Darüber hinaus könnten geeignete „Vitalitäts-Sensoren“ auch dazu eingesetzt werden, den Einfluss bioaktiver Substanzen auf das Verhalten verschiedener Bakterienkulturen zu messen, beispielsweise zur Bestimmung der Wirksamkeit eines Pharmakophors unter definierten Bedingungen.

Die Anforderungen an Sensoren für die „Bioproduktion“ sind besonders hoch (PONS, 1992). Mit den meisten der heute verwendeten Sensoren ist es jedoch nur möglich den Gesamt-Feststoffgehalt zu bestimmen und nicht zwischen Gesamt-

Biomasse und Feststoff-Partikeln zu unterscheiden. Ein weiterer Nachteil ist es, dass es sich in der Regel um reine „offline Verfahren“ handelt. Daher können ausschließlich diskontinuierliche Messungen durchgeführt werden, was wiederum einen hohen Zeitaufwand und hohe Kosten zur Folge hat.

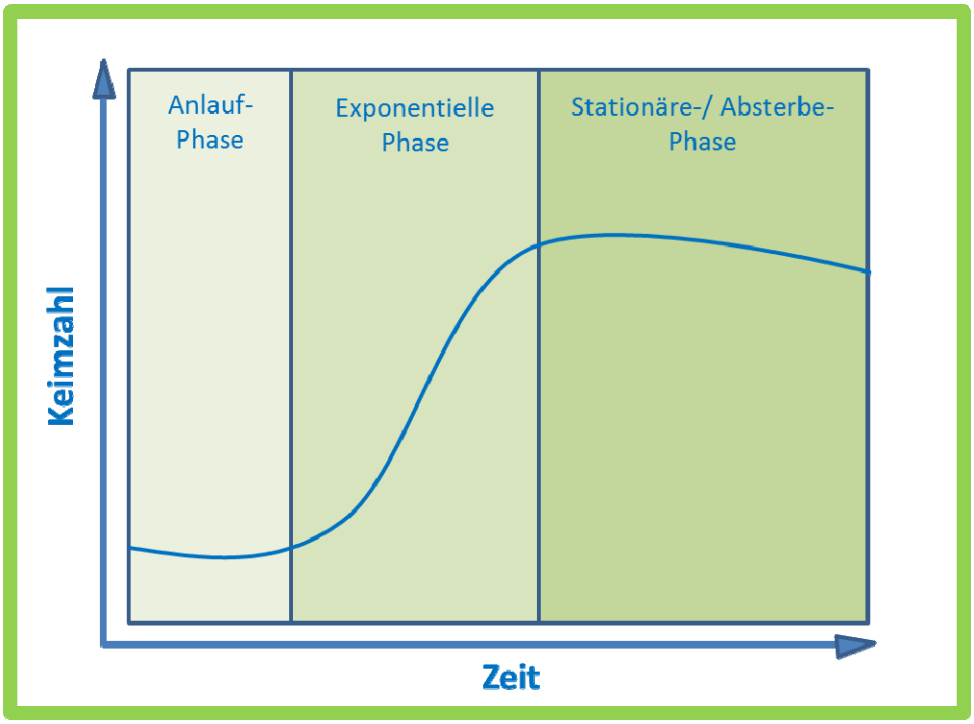

Abb. 1: Ideale Wachstums-Kurve einer statischen Bakterienkultur

Bei einer Untersuchungsreihe, die wir zunächst mit Blick auf eine Erfassung der Zusammenhänge zwischen Redoxpotential-Werte-Verläufen und Keimwachstums-Werten durchgeführt haben, zeigte es sich, dass „Störpeaks“ bei den kontinuierlich gemessenen Redoxpotential-Verläufen auftraten, wenn zur Bestimmung der Keimzahl notwendige Manipulationen in der Messprobe durchgeführt wurden. Die Kompensationszeiten, die anhand dieser „Störpeaks“ bestimmt werden konnten, standen in einer engen Korrelation zur Bioaktivität der untersuchten Mikroflora. Einzelne Ergebnisse dieser Untersuchungsreihen sollen hier nochmals dargestellt werden (RÖDEL und SCHEUER, 2002).

Material und Methoden

Messanordnung zur Bestimmung der Redoxpotentiale

Das System zur kontinuierlichen Messung der Redoxpotentiale bestand aus Einstab-Messketten der Fa. Schott, Typ Sa Pt 6140, einem Datenlogger der Fa. Ahlborn, ALMEMO 2590-9 V5® und einer Datenerfassungs-Anlage mit Software der Fa. akrobit® software, AMR WinControl. Die Potentialwerte wurden zu Beginn der Messung, nach kurzer Einstellphase, elektronisch auf den Wert „Null“ kalibriert.

Messmedien und Versuchsaufbau

In unserem Versuchsaufbau waren die Messreihen parallel angeordnet: zwei Messkolben mit Standard I Nährbouillon (Merck) beimpft mit log 3,6 KBE *Listeria innocua* sowie zwei Messkolben ebenfalls mit Standard I Nährbouillon, beimpft mit log 4,9 KBE *Lactobacillus sake.* Alle Messkolben der beiden Reihen wurden mit Redoxelektroden versehen und die Potentiale über einen Zeitraum von etwa 90 Stunden kontinuierlich, bei einer nahezu konstanten Temperatur im Bereich von ca. 25 bis 26 °C, aufgezeichnet. In Zeitabständen von 24 Stunden wurden aus jeweils einem Messkolben der Messreihen kleine Proben für die Keimzählung vorgenommen.

Ergebnisse

Der Verlauf der Keimvermehrung ist in Abbildung 2 dargestellt. *Listeria innocua* (punktmarkierte rote Linie) zeigt vom Startpunkt eine steil ansteigende Wachstumskurve (Exponentielle Phase). Nach etwa 24 bis 36 Stunden bleibt die Wachstumskurve nahezu konstant und fällt danach leicht ab (Stationäre-/Absterbe-Phase). *Lactobacillus sake* verhält sich prinzipiell sehr ähnlich (punktmarkierte grüne Linie). Die Wachstums-Kurve für diese Keimart verläuft aber weitaus flacher. So bleibt die Keimzahl nach Erreichen der stationären Phase um ca. eine Zehnerpotenz unter der Keimzahl von *Listeria innocua*, obwohl die Ausgangs-Keimzahl von *Lactobacillus sake* um mehr als eine Zehnerpotenz höher lag.

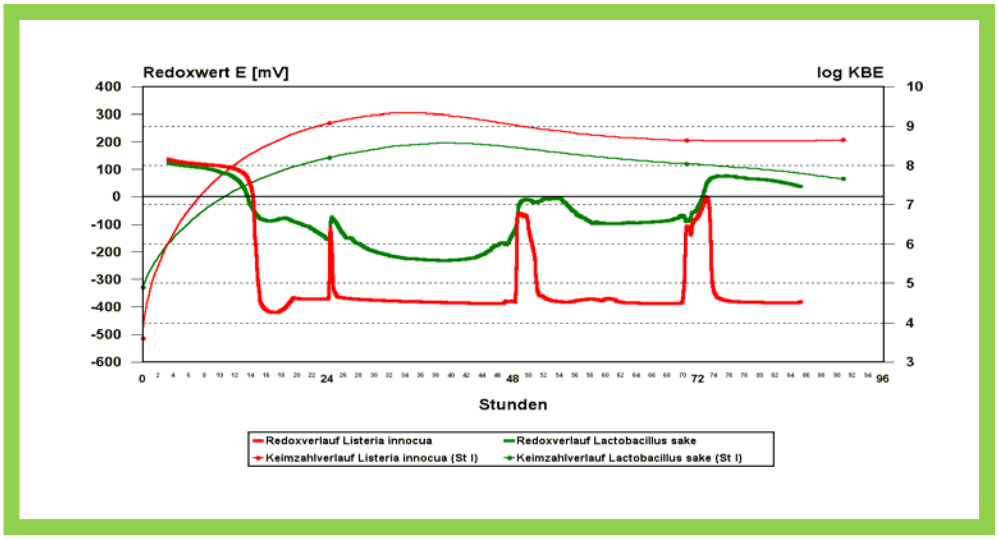

Abb. 2: Die oberen punktmarkierten Kurven zeigen den Wachstums-Verlauf von *Listeria innocua* und *Lactobacillus sake* in Standard I – Nährbouillon bei 25 – 26 °C. Darunter (fette Linien) sind die entsprechenden Kurven für das Redoxpotential E [mV] dargestellt; Jahresbericht BAFF, Kulmbach, (2002) S. 61-62

In Abbildung 2 ist weiterhin der Verlauf der kontinuierlich gemessenen Potential-Kurven für die geprüften Keime dargestellt. Zur besseren Übersicht wurden für die einzelnen Verläufe die Farben der entsprechenden Wachstumskurven gewählt. Die Potentialwerte zeigen zu Beginn kaum eine Veränderung, fallen aber nach ca. 15 Stunden steil ab (entspricht der Exponentiellen Phase) und schwenken entsprechend der Wachstumskurven dann wieder ein (entspricht der Stationären Phase). In Analogie zum verstärkten Wachstum von *Listeria innocua*, im Vergleich zu *Lactobacillus sake*, zeigt auch die entsprechende Potentialkurve einen

stärkeren Abfall. Diese verstärkte Abnahme der Potentialwerte hängt ganz offensichtlich mit der vergleichsweise höheren Stoffwechsel-Aktivität von *Listeria innocua* zusammen.

Zu den Zeitpunkten der Probenahme traten in den Potentialkurven charakteristische Störungen (Störpeaks) auf. Der Vorgang der Probennahme, d. h. die Elektrode wurde aus dem Medium entfernt, das Medium kurz umgeschwenkt, mit einer Pipette eine kleine Probenmenge entnommen und anschließend die Elektrode wieder eingesetzt, störte das Messumfeld nur kurzzeitig. Diese Störung dürfte in erster Linie durch den verstärkten Eintrag von Luftsauerstoff in das Nährmedium bedingt worden sein.

Erwartungsgemäß steigen dadurch die Potentiale steil in den positiveren Bereich an. Da die Art der Störung während der gesamten Versuchsdauer identisch und vergleichsweise kurz war, d. h. kürzer als eine Minute, ist die Zeitdauer zwischen dem steilen Anstieg der Messwerte bis zur Rückkehr auf die Grundlinie (Kompensationszeit) im Wesentlichen von der Bewehrung des Systems abhängig, die wiederum unmittelbar von der Aktivität des Stoffwechsels der Mikroorganismen abhängt.

So kehrt die Potentialkurve von *Listeria innocua* (rote Linie, erster Messpunkt, 24 Std.) bereits nach etwa 84 Minuten in den Grundzustand zurück. Bei *Lactobacillus sake* (grüne Linie, erster Messpunkt, 24 Std.) dauert die Kompensationszeit mit ca. 190 Minuten etwa doppelt so lang. *Lactobacillus sake* zeigt auch einen deutlich flacheren Anstieg der Wachstumskurve, was mit einer entsprechend geringeren Stoffwechsel-Aktivität verbunden ist. Mit abnehmender Stoffwechsel-Aktivität, d. h. mit dem Übergang der Keime von der Vermehrungs-Phase in die Stationäre Phase verbreitern sich die Peaks in zunehmendem Maße. Die Stoffwechsel-Aktivität der Keime ist herabgesetzt, von außen eingebrachte Störungen können nur nach deutlich verlängerten Zeiträumen ausgeglichen werden. Am zweiten Messpunkt (48 Std.) ist beispielsweise der Peak von *Listeria innocua* auf etwa 200 Minuten verbreitert, während der für *Lactobacillus sake* bereits ca. 650 Minuten beträgt.

Diskussion

Entscheidend für die Beurteilung der Stoffwechsel-Aktivitäten einer Kultur von Mikroorganismen sind eindeutig die Kompensationszeiten, während die Höhe des Peaks von der Art der Störung und von der Größe des vorliegenden Potentials im Messmedium bestimmt wird. Die Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass das beschriebene Verfahren zur Messung der Stoffwechsel-Aktivitäten von Mikroorganismen geeignet erscheint und damit ein guter Sensor für die Bestimmung der Bioaktivität sein könnte. Mit dieser Messmethode wäre es danach nicht nur möglich die Prozess-Führung in biotechnologischen Reaktoren mit einem „online-Verfahren“ zu überprüfen und zu steuern, sondern auch, Substanzen, die die Stoffwechsel-Aktivität der Mikroorganismen beeinflussen, zeitnah mit relativ geringem methodischen Aufwand simultan qualitativ und quantitativ während unterschiedlicher Wachstumsphasen auf ihre Wirksamkeit hin testen zu können.

Literatur

Pons, M. N. (1992): Bioprocess Monitoring and Control, Hanser Verlag München, Wien, New York, Barcelona

Rödel, W., Scheuer, R. (2002): Erfassung kinetischer Phänomene mit der Redoxpotentialmessung, Jahresbericht BAFF, Kulmbach, S. 61-62