

In vitro-Versuche zur Wirkung von *Saccharomyces cerevisiae*-Keimen auf Enterobakterien

W. Böckeler, J. Arnoldi, Ute Vögtle-Junkert

Einleitung

Die *Enterobacteriaceae* sind von ihren Substratansprüchen her eine recht uneinheitliche Gruppe: man findet sie auf Pflanzen, im Boden, in Gewässern, Abwässern, Lebensmitteln u. ä. Ihr gehören aber auch die wichtigsten fakultativen anaeroben Mikroorganismen der Darmflora des Menschen und der Tiere an. Neben dem Darmtrakt können Harn- und Gallenwege, Bauchraum und Respirationstrakt von ihnen besiedelt werden, wo sie unter Umständen zu eitrigen Entzündungen führen.

Ein Teil der Bakterien des Gastrointestinaltraktes des Menschen kann als hochinfektiös und pathogen angesehen werden (z. B. Salmonellen), während ein anderer Teil zu seiner physiologischen Fäkalflora gerechnet wird (1). Hierzu gehören fakultativ pathogene Erreger (v. a. *E. coli*), die erst bei entsprechender Disposition (z. B. Ungleichgewicht der körpereigenen Flora) zu schweren bakteriellen Erkrankungen führen können.

Im Zusammenhang mit geeigneten Mitteln zur Behandlung gastrointestinaler Störungen wird auch (und das schon seit Jahrhunderten) der therapeutische Effekt von Hefezellen erwähnt. Ihr Einsatz wird besonders bei Reisediarrhoen, Antibiotika-induzierten Diarrhoen und bei Akne empfohlen.

Während dreier Reisen nach Südamerika mit insgesamt 50 Probanden haben wir in je einer 4wöchigen Feldstudie mit Hilfe von lyophilisierten *Saccharomyces cerevisiae* (Hansen)-Keimen (DG 7014) prophylaktisch und therapeutisch Reisediarrhoen mit sehr gutem Erfolg behandeln können. Bislang sind Bemühungen, die daran beteiligten Wirkmechanismen zu erklären, immer noch unbefriedigend (2).

Ein Abdichten der enteroresorptiven Darmzellen gegen ein Anheften der Bakterien, wie früher angenommen (3), ist nach neueren Untersuchungen (2, 4, 5) nicht mehr in Betracht zu ziehen.

Daher muß nach anderen Zusammenhängen gesucht werden, die zur Erklärung des therapeutischen Effekts von *Saccharomyces cerevisiae* auf Darmbakterien herangezogen werden.

Denkbar wäre nunmehr neben einer systemischen Wirkung (5) eine Unterstützung der apathogenen Darmflora (7) oder eine Schädigung der pathogenen Keime durch Hefe-Metabolite. Wir haben uns experimentell der zweiten Frage zugewandt und zur Vermeidung physiologischer Nebeneffekte in vitro-Versuche sowohl mit opportunistisch- als

auch ständig-pathogenen Enterobakterien (6) durchgeführt, Wachstumskurven über Lebendkeimzahlen (LK) erstellt und die Abläufe an Zellwand und Zytoplasma der Bakterien transmissionselektronenmikroskopisch (TEM) verfolgt.

Material und Methoden

Hefestamm und Bakterienstämme

Als Hefe verwendeten wir *Saccharomyces cerevisiae* DG 7014, Stamm Hansen (als Lyophilisat).

Gegen *Saccharomyces cerevisiae* getestet wurden zum einen Fäulnis- und Entzündungserreger, die auch Diarrhoen verursachen können (siehe unter 1 - 4) und zum anderen solche, die bei entsprechend disponierten Personen für Enteritiden, Enterokolitiden und bakterielle Ruhr verantwortlich sind (siehe unter 5 - 9):

1. *Proteus vulgaris*, ATCC e 13315 / IFAM Nr. 1011 (+)
2. *Enterobacter aerogenes* (+)
3. *Escherichia coli*, Stamm JM 101 (+)
4. *Escherichia coli*, Stamm K 12 (+)
5. *E. coli* Dysp. poly V II (*)
6. *Shigella flexneri* (*)
7. *Salmonella typhimurium* (*)
8. *Salmonella enteritidis* (*)
9. *Yersinia e 3+* (*)

(+) = als Lyophilisat aus dem Inst. F. Allg. Mikrobiologie (IfAM) der Universität, D-2300 Kiel.

(*) = als Lyophilisat der Universität, D-2300 Kiel.

Kulturmedium

Für die Mischkulturen wurde PYG (Pepton-Yeast-Extrakt-Glucose) aus drei verschiedenen Nährmedien sowohl für die Hefezellen (DG 7014) als auch für die zu züchtenden aeroben Bakterien als am besten geeignetes Medium ausgesucht (Tab. 1).

Sowohl die Rein- als auch die Mischkulturen wurden nach 1%iger Beimpfung der Nährlösung und anschließender Stickstoffbegasung anaerob bei 30° C auf dem Schütteltisch im Brutraum bebrütet.

TABELLE 1
Kulturmedien für Hefezellen und Enterobakterien

PYG		YM		NB (Nutrient Broth)	
Pepton	10 g	Pepton	5 g	Pepton	5 g
Yeast-Extrakt	5 g	Yeast-Extrakt	3 g	Beef-Extrakt	3 g
		Malz-Extrakt	3 g		
Glucose	5 g	Glucose	10 g		
Na Cl	2 g				
Aqua bidest.	1000 ml	Aqua bidest.	1000 ml	Aqua bidest.	1000 ml
pH 7,2 mit Na OH		pH 7,2 mit Na OH		pH 7,2 mit Na OH	

Handhabung der Kulturen

Zunächst erfolgte eine Animpfung jeweils einer Vorkultur (5 ml) von jedem Stamm im oben angegebenen Medium und Wachstum bei 37° C im Brutraum. Aus dieser Vorkultur wurden die Stämme 1%ig auf 50 ml des jeweiligen Optimalmediums geimpft (Startkultur). Diese Startkultur diente nach 24 Stunden Bebrütung bei 37° C der Animpfung des eigentlichen Versuches.

Die Animpfung der Mischkulturen (1%ig) erfolgte mit Impfgut aus den Startkulturen jeweils auf Medium PYG. Die Bebrütungstemperatur betrug 37° C im Brutraum auf einem Schütteltisch und die angeimpfte Menge wurde jeweils auf 400 ml in 1-Liter-Erlenmeyerkolben angesetzt.

Die Gesamtzahl der jeweiligen Start- und Versuchskulturen wurde mit der Thoma Zählkammer und die optische Dichte (OD) mit einem Gilford Spektralphotometer bei 660 nm in Quarzküvetten (Schichtdicke 1 cm) bestimmt.

Die Lebendkeimzahlbestimmung erfolgte durch Ausplattierung von Verdünnungsstufen einer Flüssigkulturprobe auf PYG. Die Platten wurden 24 Stunden bzw. 48 Stunden bei 37° C bebrütet und anschließend die gewachsenen Kolonien nach lichtmikroskopischer Kontrolle ausgezählt.

Präparation für die Elektronenmikroskopie

Durch Zugabe von 3%igem Glutardialdehyd zur Nährlösung wurden die Präparate zur Vorfixierung für 2,5 Std. bei 4° C aufbewahrt. Anschließend wurden die Lösungen filtriert (Maschenweite des Filters 0,2 µm), der Rückstand auf dem Filter mit 0,1% Nobelagar überschichtet und bei 45° C zum Erstarren gebracht. Nach der Aufteilung des Agar in Blöckchen (Stirnfläche ca. 1 mm²) wurden diese mit dem daran anhaftenden Bakteriensediment in Kellenburger Puffer aufgenommen.

Die Fixierung erfolgte in 1%igem Osmiumtetroxyd, gelöst in Kellenburger Puffer, über 3 Std. bei 4° C. Danach 3 × 10 min. Waschen in Kellenburger Puffer.

Die Entwässerung wurde über EtOH-Stufen (30, 50, 70, 90%) je 15 min. bei 4° C und die Trocknung anschließend über einem Molekularsieb (2 × 96 und 2 × 100%) durchgeführt. Bei 70% EtOH wurde mit 1%igem Uranylacetat (1 Std., 1° C) eine Blockkontrastierung vorgenommen. Einbettung in Erl.

Ergebnisse

In-vivo-Untersuchungen ergaben, daß sich die Hefezellen nicht entlang der Dünndarmschleimhaut anlagern und so eine Barriere bilden. Man findet sie eher im Lumen verteilt, mitunter Agglomerate bildend (Abb. 3.1).

1. Wertetabelle mit Lebendkeimzahlen (LK) und Wachstumskurven der Bakterien

Alle Messungen erfolgten in drei Parallelen. In den Tabellen sind jeweils die arithmetischen Mittelwerte aufgeführt.

Sowohl die Tabelle 2 als auch die Abb. 1.1 bis 1.4 und 2.1 bis 2.5 mit den Wachstumskurven zeigen in jedem Fall die antagonistische Wirkung der Hefen auf die LK der Enterobakterien. Bei den fakultativ/opportunistisch-pathogenen Stämmen (Tab. 2, 1 bis 4) wurde zunächst die Tendenz getestet. Dabei stellte sich schon nach 24 Std. eine 10 bis 100fache Reduzierung der LK ein. Bei *P. vulgaris* verringerte sie sich sogar um das Hunderttausend- nach 24 Std. und um das Millionenfache nach 48 Stunden.

Mit Ausnahme von *E. coli Dysp. poly* werden die pathogenen Keime (siehe Tab. 2, 5 bis 9) in Anwesenheit der Hefe nach 48 Std. um das 100- bis 145fache in ihrem Wachstum gehemmt. Den stärksten Rückgang der LK nach 24 Std. in der Mischkultur weist *Yersinia* (um das ca. 30fache) auf.

Der Verlauf der Wachstumskurven ist besonders gut in den Abbildungen 2.5 bis 2.9 zu vergleichen: Während die Lagphase der Kontroll- und der Mischkulturen bei allen fünf Teststämmen noch etwa dem gleichen Anstieg folgen, ist innerhalb der exponentiellen Phase schon eine deutliche Verzögerung zu beobachten. Lediglich bei *S. typhimurium* wird von der Mischkultur nach 12 Std. der gleiche Peak wie von der Kontrollkultur erreicht, dann setzt aber, genauso wie bei den übrigen ständig-pathogenen Stämmen, gegenüber der Kontrolle eine deutlich schnellere Absterbephase ein.

TABELLE 2
Logarithmische Werte der Lebendkeimzahl (LK) der Enterobakterien und mit und ohne *Saccharomyces cerevisiae* DG 7014 nach 24 bzw. 48 Std.

Bakt./Reinkultur	LK Reinkultur Bakterien		LK Mischkultur Hefe + Bakterien		Abnahme d. Bakt. LK um ca. 24 / 48 Std.
	24 Std. log.	48 Std.	24 Std. log.	48 Std.	
1. <i>P. vulgaris</i>	9.012837	8.4313363	3.509202	2.146128	100.000× / 1 Mio. ×
2. <i>E. aerogenes</i>	9.271841	—	7.984077	—	20×
3. <i>E. coli</i> , JM 101	8.665580	—	7.799340	—	10×
4. <i>E. coli</i> K 12	8.880813	—	6.880813	—	100×
5. <i>E. coli</i> Dysp.	8.928907	8.895974	7.982271	7.431363	10×/ 25×
6. <i>Sh. flexneri</i>	7.974511	7.866877	6.690196	5.838849	20×/100×
7. <i>S. typhimurium</i>	9.017033	9.089905	7.992995	6.863322	10×/145×
8. <i>S. enteritidis</i>	8.921686	8.914343	7.944482	7.025305	10×/100×
9. <i>Yersinia e 3+</i>	9.542825	8.922725	7.992995	6.863322	30×/125×

2. TEM-Untersuchungen (Abb. 3.2 bis 3.9)

Die Abbildungen 3.2a und 3.3a zeigen eine Reinkultur von *Shigella flexneri* im transmissionselektronenmikroskopischen Bild:

Das Zytoplasma ist gleichmäßig verteilt und die Zellwand umspannt gleichmäßig das Zytoplasma.

Demgegenüber steht die völlige Denaturierung der stäbchenförmigen Shigellen in der Mischkultur in Anwesenheit von *Saccharomyces cerevisiae* (Abb. 3.2b und 3.3b). Wichtig dabei ist, daß nicht nur juvenile, sondern auch ausgewachsene Bakterien angegriffen werden.

Die Denaturierung stellt sich je nach Bakterien-, aber auch Hefestamm, als ein mehr oder weniger schneller Prozeß dar, der immer nach etwa demselben Muster abläuft: erste Denaturierungserscheinungen werden gekennzeichnet durch Zusammenfließen des Zytoplasmas, wodurch die homogene Granulierung verlorengeht. An deren Stelle treten vereinzelt dunkle Inseln sowie eine gröber gekörnte, elektronendichte Zeichnung, besonders entlang der Zytoplasmamembran (Abb. 3.5). Bei den weniger kontrastierten Bereichen, die ebenfalls dort auftreten, handelt es sich um Nukleotide.

Der Vermischungsprozeß von Zytoplasma-Granula setzt sich fort, die Zellwand beginnt sich kräuselnd vom Zellkörper abzuheben (Abb. 3.6 bis 3.8), und elektronenlichte Bereiche im Bakterium deuten auf eine gänzliche Entmischung des Zytoplasmas hin.

Die Zytoplasmamembran kann bisweilen aufreißen, wodurch das Bakterium instabil wird, abknickt und auslaufen kann. Es bleiben dann oft nur noch leere Zellwandhüllen übrig (Abb. 3.9).

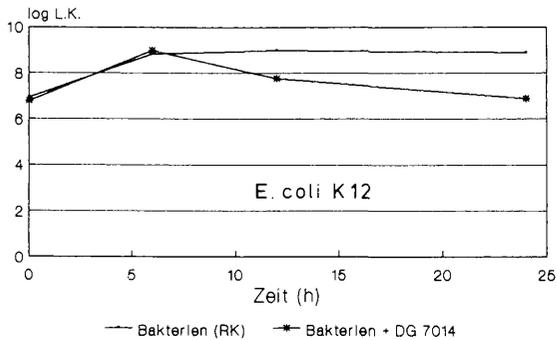
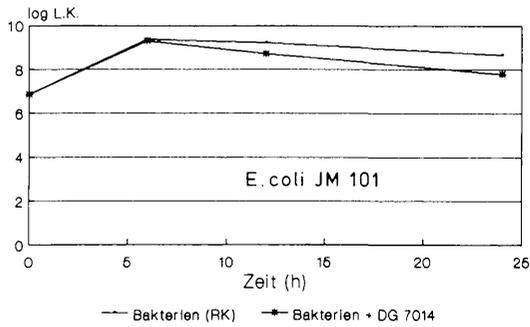
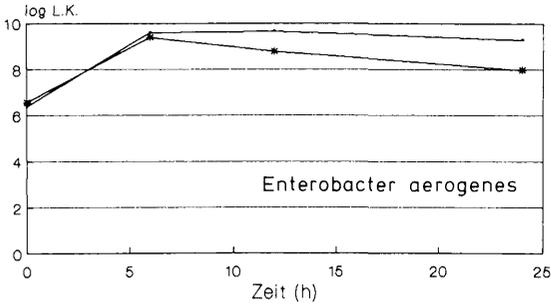
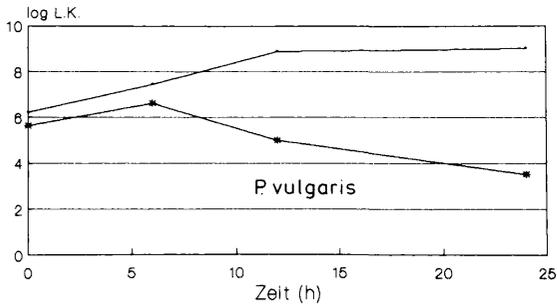
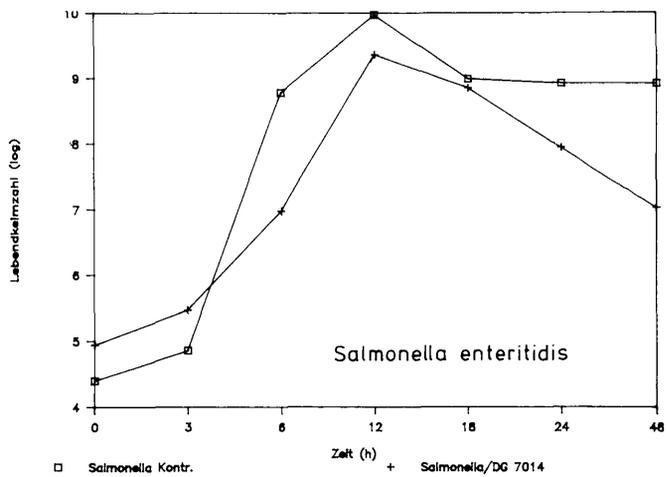
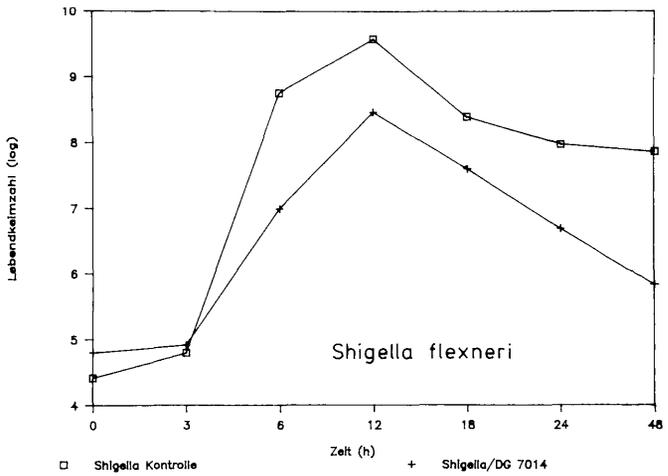
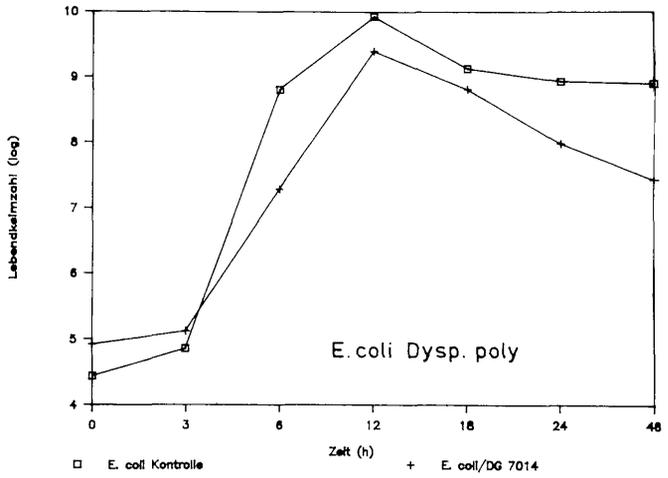


Abb. 1.1 - 1.4:
Wachstumskurven der
getesteten fakultativ patho-
genen Bakterienkulturen mit
und ohne *Saccharomyces*
cerevisiae DG 7014

RK = Reinkultur



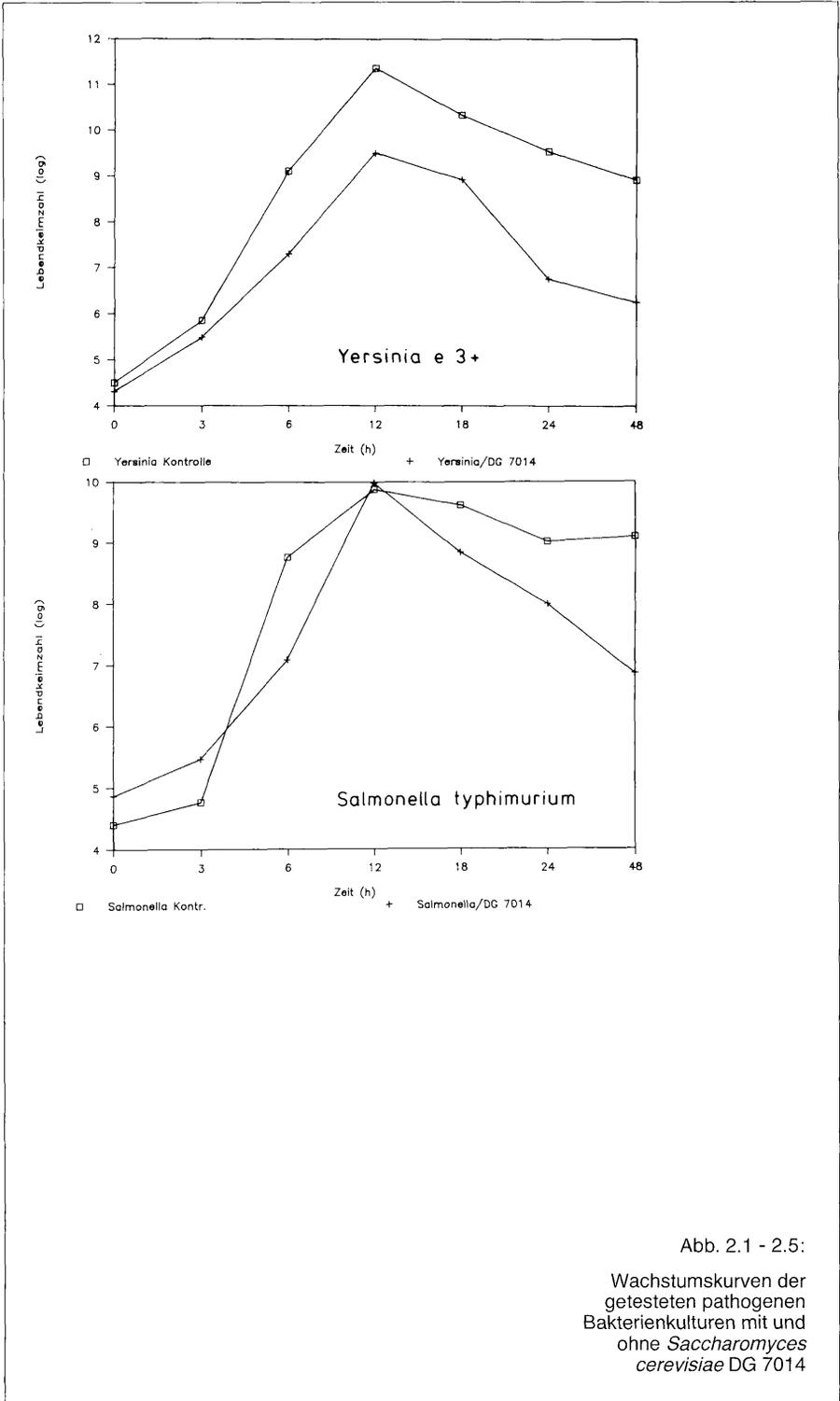


Abb. 2.1 - 2.5:

Wachstumskurven der getesteten pathogenen Bakterienkulturen mit und ohne *Saccharomyces cerevisiae* DG 7014

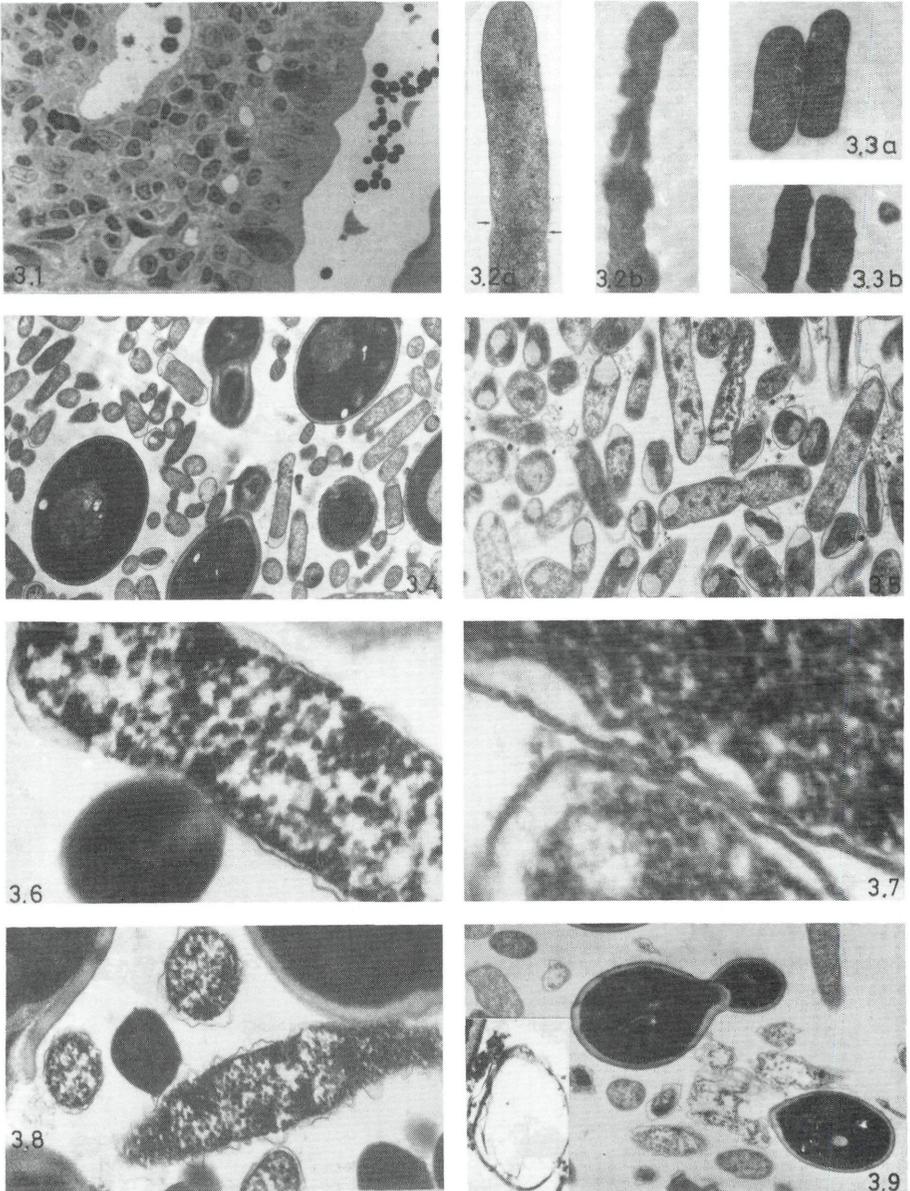


Abb. 3.1 - 3.9:

Phasen im Denaturierungsprozess der Enterobakterien in Anwesenheit von *Saccharomyces cerevisiae* (DG 7014) im TEM-Bild (Erläuterungen siehe Text)

- 3.1: Ansammlung von Hefezellen in Dünndarmkrypte und Lymphgefäß (Ratte) • 3.2a - 3.3b: *Shigella flexneri* 3.2a: ausgewachsen, Kontrolle (17.000×), Pfeil = Teilungseinschnürung mit Mesosom • 3.2b: ausgewachsen, + DG 7014, 24 Std. (17.000×)
3.3a: juvenil, Kontrolle (10.000×) • 3.3b: juvenil, + DG 7014, 24 Std. (10.000×)
3.4: *Escherichia coli* JM 101 + DG 7014, 12 Std. (6.000×) • 3.5: *S. enteritidis* + DG 7014, 24 Std. (10.000×) • 3.6: *Proteus vulgaris* + DG 7014, 24 Std. (45.000×) • 3.7: *E. coli* K 12 + DG 7014, 24 Std. (1.000.000×) • 3.8: *P. vulgaris* + DG 7014, 24 Std. (20.000×) • 3.9: *P. vulgaris* + DG 7014, 24 Std. (8.500×) Inset = *E. coli* K 12 + DG 7014, 24 Std. (20.000×)

Diskussion

Abb. 3.1 belegt zunächst, daß der therapeutische Effekt der Hefezellen gegenüber Bakterien also nicht wie bisher angenommen, im wesentlichen auf ihrer Anlagerung an die Darmzotten beruht, um diese vor Anheftung von Enterobakterien mechanisch zu schützen (3).

Darüberhinaus lassen die vorliegenden Untersuchungen die Annahme zu, daß Stoffwechselprodukte der Hefezellen die Bakterien direkt schädigen. Dabei ist der Wirkungsmechanismus offensichtlich ein anderer als er von den Penicillinen oder Cephalosporinen (sog. Beta-Lactam-Antibiotika) her bekannt ist: wird durch diese die Zellwandsynthese (Quervernetzung von Peptidoglykan-Strängen) juveniler Bakterien gestört, so erfolgt im vorliegenden Fall der Denaturierungsprozeß allem Anschein von „innen“ heraus. Das bedeutet, daß die Hefemetabolie zunächst von der Bakterienzelle inkorporiert und dann wirksam werden. Diese Annahme wird durch zwei Beobachtungen gestützt: einmal aus der chronologischen Abfolge des Denaturierungsprozesses, wobei zunächst Zytoplasmaentmischungen und erst später eine Destabilisierung durch Nachlassen des Turgors erfolgt, und zwar bei noch — soweit im EM zu beurteilen — stabiler Zellwand. Zum anderen belegen die Abbildungsvergleiche (3.2a und 3.2b), daß auch ausgewachsene Bakterienzellen (hier Shigella) angegriffen werden.

Welche biochemischen Vorgänge hierfür verantwortlich sind, ob ein autolytisches Enzym freigesetzt wird (z. B. Murein-Hydrolase), wodurch es zur Lysis und zum Tod der Zelle kommt, kann noch nicht gesagt werden.

Hier verdienten Untersuchungen über Vorgänge an der Zytoplasmamembran, aber auch zu Aktivierungsmechanismen zur Autolyse verstärkte Aufmerksamkeit.

Nach unseren bisherigen Erfahrungen wirken die Hefen nicht auf grampositive Bakterien. Es fällt auf, daß zwei verschiedene Stämme einer Bakterienart (*E. coli*) im unterschiedlichen Maße durch DG 7014 denaturiert werden: der Stamm K 12 wesentlich mehr als JM 101.

Dem positiven klinischen Bild nach einer Prophylaxe bzw. Therapie mit Hefezellen (DG 7014), das wir bei unseren Feldstudien in Paraguay gewonnen haben, steht die Tatsache gegenüber, daß in-vitro, und sicher auch in-vivo, gerade darmeigene, und daher erhaltenswerte (apathogene *E. coli*) Bakterien angegriffen werden. Hier könnte die Überlegung an Bedeutung gewinnen, wonach es wohl die eigenen Darmbakterien sind, die bei physiologischen Umstellungen besonders bei Fernreisen, von ihrem distalen Aufenthaltsort im Darm (wo sie normalerweise von den Hefezellen nicht erreicht werden können), nach proximal (Jejunum/Ileum) wandern und auf ihre Umgebung toxisch wirken. Im Dünndarm können sie dann von den Stoffwechselprodukten der Hefezellen erreicht werden. Parallel-Untersuchungen ergaben, daß die Wirksamkeit abhängig ist vom verwendeten Hefestamm. Das bedeutet, daß sich Hefe-Metabolite qualitativ und / oder quantitativ unterscheiden müssen. Hier könnten Versuche mit einzelnen Komponenten zu einem therapeutisch günstigen Isolat führen.

Wenn auch durch viele Berichte und durch eigene Untersuchungen an Probanden kein Zweifel mehr am positiven therapeutischen Effekt der Hefezellen bei Reisediarrhoen besteht, so ist ihre Anwendung bei ständig pathogenen Keimen trotz des bedingt bakteriziden Einflusses doch problematisch. Dieser begann sich in den in-vitro-Versuchen erst nach 48 Stunden abzuzeichnen.

Zusammenfassung

Um einen möglichen Denaturierungseffekt auf Enterobakterien durch Hefezellen (*Saccharomyces cerevisiae* DG 7014) festzustellen, wurden vier opportunistisch- und 5 ständig-pathogene Bakterienstämme in Mischkulturen und im Transmissionselektronenmikroskop (TEM) untersucht.

In allen Fällen wurde ein Antagonismus nachgewiesen, der den therapeutischen Effekt der Hefezellen besonders bei Reisediarrhoen erklären könnte. Dieser beruht nach elektronenmikroskopischen Untersuchungen weder auf einem Membrankontakt beider Organismen, noch auf einer barriereähnlichen Anlagerung der Hefen an die Darmzotten. Vielmehr spielt die Ausscheidung von Stoffwechselprodukten, die von den Bakterien aufgenommen werden und zunächst Zytoplasma- und dann Wandschädigungen hervorrufen, eine Rolle. Dabei scheint die qualitative und / oder quantitative Zusammensetzung der Sekretionsprodukte wichtig zu sein.

Ob es neben diesem topischen auch noch einen systemischen Effekt gibt, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

Summary

In-vitro-experiments on the influence of *Saccharomyces cerevisiae* on enterobacteriaceae.

In order to evaluate the antagonistic effect of *Saccharomyces cerevisiae* on enterobacteriaceae 4 opportunistic and 5 pathogenetic species of bacteria were investigated by culture and transmission electronmicroscopy.

It is most likely, that the metabolites of the yeast cells are responsible for the denaturation of the bacteria within 24 to 48 hours. First the cytoplasm and then the cell wall will be deranged. In young and adult bacteria as well it seems, that the composition of the metabolites of *Saccharomyces cerevisiae* play an important role in the degree of the bactericidal efficacy.

The effect of denaturation is neither due to a direct cell-to-cell contact between bacteria and yeast cell nor to a barrier like formation of the *Saccharomyces cerevisiae* along the enteroresorptive epithelia of the small intestine.

Key words

Antagonism, *Saccharomyces cerevisiae*, Diarrhoea, yeast cells, bactericidal effect.

Literatur

1. BRANDIS, H. G. PULVERER:
Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie, 6. Aufl., G. Fischer Verlag Stuttgart/New York, 1988.
2. BÖCKELER, W., H. P. DREYER W. SASS:
Elektronenmikroskopische Darstellungen von *Saccharomyces cerevisiae* in der Ratte.
GIT Suppl. 6, (1986),7376.
3. BRUGIER, S. F. PATTE:
Antagonisme in vitro entre l'ultralevure et differents germes bacteriens.
Med. Paris 45, (1975), 38.
4. SASS, DREYER, BÖCKELER, HAMELMANN, SEIFERT:
Z. Gastroenterologie 25, (1987) 306 - 315.
5. ARNOLDI, J., W. BÖCKELER Ute VÖGTLE-JUNKERT:
Die Kinetik peroral aufgenommener Zn⁶⁵-markierter *Saccharomyces cerevisiae*-Keime im Rattenorganismus.
Mitt. Österr. Ges. Trop. Med. u. Parasitol. (im Druck).
6. WISSMANN, E.:
Medizinische Mikrobiologie, (6. Auflage, G. Thieme Verlag, Stuttgart/New York, 1986.
7. LEWENSTEIN, A., G. FRIGERIO M. MORONI:
Biological properties of *Streptococcus faecium* SF 68, A new approach for the treatment of diarrheal diseases.
Curr. Ther. Res. 26 (1979), 967 - 981.

KORRESPONDENZADRESSE:

PD Dr. Wolfgang Böckeler,
Zoologisches Institut der Universität Kiel
Olsenhausenstraße 40
D-2300 Kiel · Bundesrepublik Deutschland

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Mitteilungen der Österreichischen Gesellschaft für Tropenmedizin und Parasitologie](#)

Jahr/Year: 1989

Band/Volume: [11](#)

Autor(en)/Author(s): Böckeler Wolfgang, Arnoldi J., Vögtle-Junkert Ute

Artikel/Article: [In vitro-Versuche zur Wirkung von Saccharomyces cerew's/ae-Keimen auf Enterobakterien. 211-221](#)