

Antimikrobielle Eigenschaften von Bürzeldrüsensekreten

Markus Santhosh Braun, Stefan Zimmermann, Frank Sporer & Michael Wink

Markus Santhosh Braun, Stefan Zimmermann, Frank Sporer & Michael Wink 2020: Antimicrobial activity of preen gland secretions. *Vogelwarte* 58: 247-254.

Many bird species possess preen glands with secretions, that are regularly distributed on the entire plumage. The glandular secretions are attributed numerous functions, but most of them have not yet been scientifically proven. In this study, we analyzed the antimicrobial activity of preen gland secretions of different bird species. Literature data on this topic exist, but are contradictory. Some authors assume, that lipids of the preen gland inhibit microbial growth. In our analyses, the secretions of 7 out of 26 bird species (27 %) showed antimicrobial effects. These effects were further investigated using turkeys (*Meleagris gallopavo*). We found that the activity of the preen gland secretions of turkeys was multiplied in the presence of the enzyme keratinase. Since keratinase is produced by feather-degrading microorganisms, this indicates a specific defense mechanism to prevent feather deterioration. In addition, the active components were not as expected lipophilic, but located in the aqueous phase of preen gland secretions. These findings only partially confirm the hypothesis that antimicrobial defense is mediated by extracts of preen gland secretions.

✉ MSB, FS, MW: Institut für Pharmazie und Molekulare Biotechnologie, Universität Heidelberg, INF 364, 69120 Heidelberg. E-Mail: markus.braun@gmx.ch, wink@uni-heidelberg.de
SZ: Zentrum für Infektiologie, Abt. Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Universitätsklinikum Heidelberg, INF 324, 69120 Heidelberg

1 Einleitung

Das auffälligste Merkmal der Vögel sind Federn. Das Federkleid dient, neben dem Vogelflug, der Thermo-regulation und der Kommunikation. Außerdem ist es eine natürliche Barriere gegen schadhafte Umwelteinflüsse. Es erlaubt Vögeln selbst widrigsten Bedingungen zu trotzen. Federn sind robust aufgebaut und bestehen zu ca. 90 % aus Keratin, einem der am schwersten zersetzbaren, von Lebewesen hervorgebrachten Baustoffen der Natur (Lovette & Fitzpatrick 2016).

Dennoch haben auch Federn Feinde: Federmilben, Mallophagen und Mikroorganismen können Federn angreifen und zerstören. Insbesondere gibt es Bakterien und Pilze, die sich auf den Abbau von Federn spezialisiert haben, indem sie mit Hilfe von Enzymen (Keratinasen) das Keratin der Federn in kleine Bruchstücke zerlegen, um sich davon zu ernähren. Dieser Vorgang geht mit der Störung der Federintegrität einher, was die Funktion der Federn und damit das Überleben der betroffenen Vögel gefährdet (Gunderson 2008). Beim Fehlen entsprechender Schutzmaßnahmen können Federn sogar komplett abgebaut werden. Dies ist exemplarisch in Abb. 1 anhand der Feder einer Saatkrähe (*Corvus frugilegus*) dargestellt.

Federzersetzende Mikroorganismen (FDM) wurden bereits auf Federn unterschiedlichster Vogelarten nachgewiesen. Da Vögel trotzdem selten in bedeutendem Ausmaß unter Federschäden leiden, ist davon auszugehen, dass sie entsprechende Abwehrmechanismen entwickelt haben.

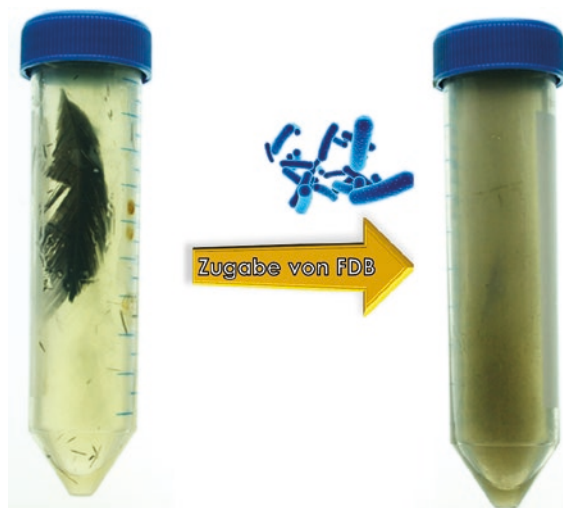


Abb. 1: Abbau der Feder einer Saatkrähe durch federzersetzende Mikroorganismen (FDM) der Art *Bacillus licheniformis*. – Degradation of the feather of a Rook (*Corvus frugilegus*) by the feather-degrading microorganism (FDM) *Bacillus licheniformis*.

Die Bürzeldrüse könnte dabei eine maßgebliche Rolle spielen. Bürzeldrüsensekrete sind wachsartige Substanzen, die während des Putzens im Gefieder verteilt werden. Sie bestehen hauptsächlich aus langkettigen Fettsäuren und Alkoholen, die zu hochlipophilen Esterwachsen kondensiert sind. Bürzeldrüsensekrete sind für die wasserabweisende Eigenschaft von Federn mitverantwortlich und halten das Gefieder geschmeidig (Jacob

& Ziswiler 1982). Weitere mögliche Funktionen sind mannigfaltig, aber noch nicht belegt. Beispielsweise könnten Bürzeldrüsensekrete eine Rolle bei der Partnerwahl, der Verwandtenerkennung, der Abwehr von Raubfeinden und der Entsorgung von Giftstoffen spielen. Über antibakterielle und fungizide Fähigkeiten von Bürzeldrüsensekreten gibt es einige Studien, die allerdings keine abschließende Beurteilung zulassen (Moreno-Rueda 2017). Ebenso geht im Hinblick auf die lipophile Natur der Sekrete die Mehrzahl der Autoren dieser Veröffentlichungen davon aus, dass diese Wirkung auf Lipiden beruht (Lipidhypothese). Nach heutiger Datenlage ist noch unklar, auf welchem Wege Bürzeldrüsensekrete ihre vermeintliche antimikrobielle Aktivität ausüben könnten und ob generell eine antimikrobielle Aktivität besteht.

In wenigen speziellen Fällen (Wiedehopf *Upupa epops*) produzieren in Bürzeldrüsensekreten lebende, symbiontische Bakterien antimikrobielle Substanzen und verleihen den Sekreten auf diese Art und Weise eine antibiotische Wirkung (Soler et al. 2008). Zwar wurden auch in den Bürzeldrüsensekreten anderer Vogelarten Bakterien entdeckt, diese sind offenbar aber eher Kommensalen als Symbionten und als solche vermutlich nicht an der Synthese antimikrobieller Wirkstoffe beteiligt (Braun et al. 2016; Braun et al. 2018a; Braun et al. 2018b; Braun et al. 2018c; Braun et al. 2019b; Braun et al. 2019a).

Ziel dieser Untersuchung war es, durch systematisches Testen der Bürzeldrüsensekrete von ca. 30 Vogelarten die bisherige Datenlage bezüglich des antimikrobiellen Potenzials der Sekrete zu erweitern. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob die Lipidhypothese zutrifft oder ob antimikrobielle Aktivitäten durch alternative Substanzklassen vermittelt werden. Da uns eine große Menge von Bürzeldrüsensekreten von Truthühnern vorlag, lag der Schwerpunkt auf dieser Art.

2 Material und Methoden

Probenentnahme

Zahlreiche Kooperationspartner stellten Bürzel verstorbener Tiere für dieses Projekt zur Verfügung, darunter Auffang-

stationen, Naturschutzorganisationen, Geflügelhöfe und Universitäten. Die Bürzel wurden präpariert, die Bürzeldrüsen mit 70-prozentigem Ethanol desinfiziert und die Bürzeldrüsensekrete unter sterilen Bedingungen entnommen. Daneben stammten viele Sekrete von der Beprobung lebender Tiere, welche in Gefangenschaft gehalten oder in freier Wildbahn für Monitoringprojekte gefangen wurden (z. B. ISMEGA). Die Bürzeldrüsen dieser Tiere wurden wie zuvor beschrieben desinfiziert, die Sekrete durch sanftes Massieren der Bürzeldrüse an die Körperoberfläche gebracht und in sterilen Gefäßen ins Institut für Pharmazie und Molekulare Biotechnologie der Universität Heidelberg überführt. Dort wurden sie bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

Mikroorganismen und Kultivierung

Die Mikroorganismen, die zur Untersuchung der antimikrobiellen Eigenschaften von Bürzeldrüsensekreten herangezogen wurden, entstammten sieben unterschiedlichen Gattungen, die allesamt auf Vögeln nachgewiesen wurden (Hubalek 1974; Berrang et al. 2000; Shawkey et al. 2003). Alle Mikroorganismen, mit Ausnahme der Federisolate, wurden bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) erworben. Ferner wurden mehrere Isolate des methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) von Patienten des Universitätsklinikums Heidelberg getestet (Tab. 1).

Alle Bakterien wurden auf Columbia Agar mit 5 % Schafsblood angezüchtet, die Pilze auf Sabouraud Dextrose Agar.

Chemische Extraktion von Bürzeldrüsensekreten

Extraktion und Nachweis der fettliebenden Substanzen

Um herauszufinden, ob Lipide für eine eventuell vorhandene antimikrobielle Aktivität von Bürzeldrüsensekreten verantwortlich sind (Lipidhypothese), wurden alle fettlöslichen Bestandteile der Sekrete abgetrennt und gesondert getestet (Braun et al. 2018c). Der Erfolg der Extraktion wurde durch chemischen Analytik sichergestellt. Zunächst wurden Bürzeldrüsensekrete von 30 Truthühnern kombiniert und fraktioniert. Die Lipide wurden gemäß der Methode von Bligh und Dyer (1959) mittels Chloroform/Methanol extrahiert. Dieser Lipidextrakt wurde ohne Vorbehandlung einer gaschromatographischen Untersuchung (GLC) zugeführt. Um Esterwachse nachzuweisen, wurde ein Teil des Extrakts zusätzlich gemäß Ichihara & Fukubayashi (2010, bzw.

Tab. 1: Im Rahmen der Studie verwendete Mikroorganismen. – *Microorganisms used in this study.*

Reich	Zellwand	Art	Stamm
Bakterien	Gram positiv	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
		<i>Staphylococcus aureus</i>	MRSA (10 Isolate)
		<i>Staphylococcus auricularis</i>	ATCC 33753
		<i>Kocuria rhizophila</i>	Federisolat
		<i>Bacillus megaterium</i>	ATCC 14580
	Gram negativ	<i>Escherichia coli</i>	XL1-Blue MRF ⁺
<i>Pseudomonas monteilii</i>		Federisolat	
Pilze	Chitinhaltig	<i>Candida lactiscondensi</i>	ATCC 60137
		<i>Aspergillus niger</i>	Isolat aus Erdboden

Rijpstra *et al.* 2007) in seine Einzelkomponenten hydrolysiert und derivatisiert. Die daraus freigesetzten Fettsäure- und Alkoholderivate wurden mittels Massenspektrometrie (GLC/MS) gemäß Sawaya & Kolattukudy (1972) analysiert. Die restliche Substanz wurde für die antimikrobiellen Tests verwendet.

Extraktion der wasserliebenden Substanzen

Der zweite Teil der Fraktionierung der Bürzeldrüsensekrete, zielte auf deren wasserlösliche Phase ab. Hierzu wurden die Sekrete von Truthühnern mit Wasser extrahiert, die Wasserextrakte gefriergetrocknet, und anschließend in antimikrobiellen Tests untersucht.

Untersuchung von Bürzeldrüsensekreten auf antimikrobielle Eigenschaften

Allgemeine Vorgehensweise

Die Bürzeldrüsensekrete von 26 Vogelarten wurden bzgl. ihrer antimikrobiellen Eigenschaften in Hemmhofests und Mikrodilutionen (s. u.) untersucht. Die für diese erweiterten Testserien (Kombinationstests, Absterbekinetiken und chemische Analytik) benötigten erheblichen Mengen an Bürzeldrüsensekreten standen lediglich von Truthühnern zur Verfügung.

Hemmhofests

Hemmhofests wurden gemäß Braun *et al.* (2018) für alle 26 Vogelarten durchgeführt. Dafür wurden die zu testenden Bakterien und Pilze mittels eines Densitometers auf 0,5 McFarland-Einheiten eingestellt und auf Agarplatten ausgestrichen. Daraufhin wurden zylinderförmige Nöpfchen (6 mm Durchmesser) in die Agarplatten gestanzt und mit 4 mg einer Suspension aus Bürzeldrüsensekret oder Lipidextrakt in Cremophor RH40 (Stabilisator) beschickt. Ein weiteres Nöpfchen wurde mit 0,25 mg Wasserextrakt beladen. Der Effekt auf FDM wurde durch die Zugabe von 12,5 U Keratinase zum Bürzeldrüsensekret nachgestellt. Des Weiteren wurden als Kontrollen Ampicillin, Cremophor RH40 und Keratinase verwendet.

Mikrodilutionen

Mikrodilutionen der in Cremophor RH40 stabilisierten Bürzeldrüsensekrete wurden gemäß Clinical & Laboratory Standards Institute (2012) durchgeführt. Die Proben wurden in unterschiedliche Verdünnungsstufen auf einer Mikrotiterplatte mit Bakterien oder Pilzen inkubiert und die minimale Konzentration bestimmt, bei der keinerlei Wachstum der Mikroorganismen zu beobachten war (minimale Hemmkonzentration, MHK). Alle Experimente wurden dreimal durchgeführt (Doppelbestimmung pro Platte).

Kombinationstests

Um den Einfluss von FDM auf die Aktivität von Bürzeldrüsensekreten näher zu beleuchten, wurden Kombinationstests durchgeführt. Hierbei wurden Verdünnungsreihen der kombinierten Substanzen (Bürzeldrüsensekret und Keratinase) in Mikrotiterplatten angelegt und gegen Bakterien getestet. Insgesamt wurden die Tests gegen 10 Stämme von *S. aureus* (inkl. MRSA) durchgeführt.

Die Interpretation der Ergebnisse fußte auf zwei mathematischen Modellen, nämlich der „Unabhängigkeit nach Bliss“

(Bliss 1956; Greco *et al.* 1995) und der Loewe Additivität (Loewe *et al.* 1927). Erstere geht davon aus, dass zwei Wirkstoffe gleichzeitig und unabhängig voneinander (d.h. an unterschiedlichen Angriffspunkten) wirken, während letztere annimmt, dass zwei Drogen nicht gleichzeitig wirksam sein können (sie zielen auf denselben Angriffspunkt ab, um den sie konkurrieren). Beide Modelle geben Werte zurück, welche die Interaktion zweier Substanzen beschreibt und anhand derer möglicher Synergismen, d.h. überproportionaler Wirkungsverstärkungen, zu erkennen sind. Auf Grundlage der Loewe Additivität war es zudem möglich, die Interaktion zwischen Bürzeldrüsensekreten und Keratinase graphisch als Isobologramm graphisch darzustellen.

Absterbekinetik

Absterbekinetiken sind im Gegensatz zu den bislang erwähnten Tests in der Lage zwischen hemmenden und tödenden Wirkungen zu differenzieren. Hierfür wurden bestimmte Konzentrationspaare der Kombinationstests ausgewählt und nachverfolgt, ob und wie schnell Bakterien (hier der Krankenhauskeim MRSA Stamm NCTC10442) absterben. Dazu wurden Proben in folgenden Konzentrationen hergestellt:

1. hohe Konzentration von Bürzeldrüsensekret (2048 µg/ml)
2. hohe Konzentration von Keratinase (64 U/ml)
3. hohe Konzentration von Bürzeldrüsensekret und geringe Konzentration von Keratinase (2048 µg/ml and 8 U/ml)
4. geringe Konzentration von Bürzeldrüsensekret und hohe Konzentration von Keratinase (512 µg/ml and 64 U/ml)
5. hohe Konzentration von Bürzeldrüsensekret und hohe Konzentration von Keratinase (2048 µg/ml and 64 U/ml)

Proben wurden mit 5×10^5 koloniebildenden Einheiten (KBE)/ml MRSA vermischt und in Reagenzgläsern bei 35 °C für 30 h geschüttelt. Die Zahl überlebender MRSA wurde zu Beginn der Inkubation, nach 20 min, 45 min, 75 min, 2 h, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h und 30 h bestimmt, indem Zellsuspensionen auf Agarplatten ausgestrichen, diese inkubiert und die Anzahl anwachsender MRSA-Kolonien ausgezählt wurden.

3 Ergebnisse

Untersuchung von Bürzeldrüsensekreten auf antimikrobielle Eigenschaften

Nur wenige Bürzeldrüsensekrete waren antimikrobiell (Tab. 2).

Da sich Truthühner als vielversprechende Kandidaten erwiesen und genügend Probenmaterial zur Verfügung stand, wurden die Bürzeldrüsensekrete dieser Art eingehender untersucht. Alle nachfolgenden Tests beziehen sich daher auf das Bürzeldrüsensekret von Truthühnern.

Chemische Extraktion von Bürzeldrüsensekreten

Der Nachweis der Wachse mittels GLC und GLC/MS über ihre Einzelkomponenten (Fettsäuren und Alkohole) verlief erfolgreich und war die Voraussetzung für die nachfolgenden antimikrobiellen Tests der Lipidfraktion des Bürzeldrüsensekrets.

Tab. 2: Ergebnisse der antimikrobiellen Tests von in Cremophor RH40 gelösten Bürzeldrüsensekreten. – : inaktiv, + : aktiv, +/- : aktiv bis inaktiv, s/- : schwach aktiv bis inaktiv. n = Anzahl getesteter Vögel. – Results of the antimicrobial screenings of preen gland secretions stabilized in Cremophor RH40. n = number of screened birds.

Vogelart	Wissenschaftlicher Name	n	Antimikrobielle Aktivität (Anzahl positiv getesteter Individuen)	
Truthuhn	<i>Meleagris gallopavo</i>	50	+ ¹	(50)
Bienenfresser	<i>Merops apiaster</i>	22	–	(0)
Kohlmeise	<i>Parus major</i>	22	–	(0)
Blaumeise	<i>Cyanistes caeruleus</i>	15	s/-	(6)
Buntspecht	<i>Dendrocopos major</i>	14	s/-	(4)
Turmfalke	<i>Falco tinnunculus</i>	11	s/-	(3)
Kleiber	<i>Sitta europaea</i>	10	–	(0)
Rotkehlchen	<i>Erithacus rubecula</i>	8	s/-	(1)
Mäusebussard	<i>Buteo buteo</i>	7	–	(0)
Nilgans	<i>Alopochen aegyptiacus</i>	6	+/-	(2)
Steinkauz	<i>Athene noctua</i>	5	–	(0)
Kernbeißer	<i>Coccothraustes coccothraustes</i>	5	–	(0)
Rabenkrähe	<i>Corvus corone</i>	5	–	(0)
Mönchsgrasmücke	<i>Sylvia atricapilla</i>	4	s/-	(1)
Eisvogel	<i>Alcedo atthis</i>	3	–	(0)
Stockente	<i>Anas platyrhynchos</i>	3	–	(0)
Kolkrabe	<i>Corvus corax</i>	3	–	(0)
Seeadler	<i>Haliaeetus albicilla</i>	3	–	(0)
Haussperling	<i>Passer domesticus</i>	3	–	(0)
Amsel	<i>Turdus merula</i>	3	–	(0)
Nordamerika-Schleiereule	<i>Tyto furcata</i>	3	–	(0)
Gartenbaumläufer	<i>Certhia brachydactyla</i>	2	–	(0)
Weißstorch	<i>Ciconia ciconia</i>	2	–	(0)
Mittelspecht	<i>Dendrocoptes medius</i>	2	–	(0)
Buchfink	<i>Fringilla coelebs</i>	2	–	(0)
Gimpel	<i>Pyrrhula pyrrhula</i>	1	–	(0)

Indikatorstämme waren *Staphylococcus auricularis*, *Kocuria rhizophila*, *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas monteilii* und *Escherichia coli*.

¹ Die MHKs waren >2048 µg/mL, aber die Durchmesser der Hemmhöfe lagen zwischen 8 und 10,5 mm. – Indicator strains were *Staphylococcus auricularis*, *Kocuria rhizophila*, *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas monteilii* and *Escherichia coli*. MICs were >2048 µg/mL, but diameters of zones of inhibition were between 8 and 10.5 mm.

Hemmhofests

Die Bürzeldrüsensekrete von Truthühnern waren schwach aktiv gegen alle getesteten Mikroorganismen, die sich im Zusammenspiel mit Keratinase allerdings synergistisch steigern ließ (Abb. 2). Dieser Synergismus ist auf Substanzen der Wasserphase des Sekrets zurückzuführen, da hier nach Keratinasezugabe eine Aktivitätszunahme festzustellen war (Abb. 3), während der Lipidextrakt nicht im Stande war, das Wachstum von Mikroorganismen zu verringern.

Mikrodilutionen und Kombinationstests

Die MHK von Bürzeldrüsensekret ohne Keratinase lag bei >2048 µg/ml. Auch Keratinase war bei allen getesteten Konzentrationen nicht antimikrobiell (MHK >64 U/ml).

Wurden beide Substanzen kombiniert, kam es unabhängig vom getesteten Bakterienstamm zu einem starken Synergismus. Dieser Synergismus ist in Abb. 4 und Abb. 5 für repräsentative Bakterienstämme dargestellt.

Abb.2: Antimikrobielle Aktivität von unbehandeltem Bürzeldrüsensekret mit (gelb) und ohne (blau) Keratinase. Gezeigt sind Mittelwerte + Standardabweichungen. Keratinase alleine war nicht aktiv. Bei MRSA handelt es sich um den Stamm NCTC 10442. – *Antimicrobial activity of native preen gland secretion with (yellow) and without (blue) keratinase. Values are means + standard deviations. Keratinase alone was not active. MRSA refers to strain NCTC 10442.*

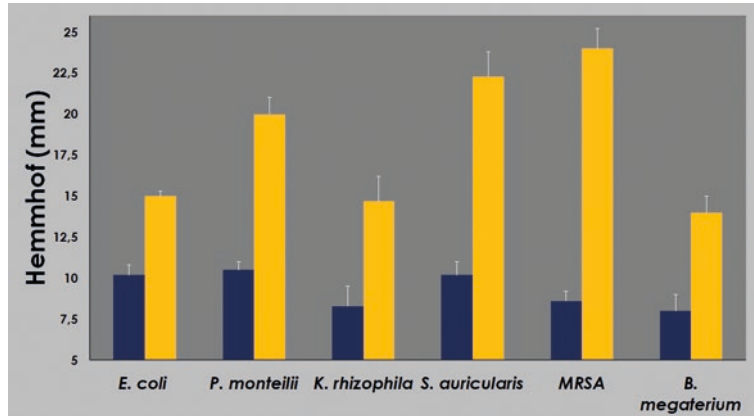


Abb. 3: Hemmhof test von Bürzeldrüsensekret mit und ohne Keratinase. Zu sehen ist eine Agarplatte, die mit *S. auricularis* bewachsen ist (grobkörnige Bereiche). In die Agarplatte wurden Näpfchen eingestanzt, welche mit unterschiedlichen Proben aufgefüllt wurden und sich in den Agar ausbreiten und potentiell antimikrobielle Aktivität zeigen (unbewachsene Bereiche). (1): Bürzeldrüsensekret, (2): Bürzeldrüsensekret und Keratinase, (3): Wasserextrakt, (4): Wasserextrakt und Keratinase, (5): Stabilisator und Keratinase (Negativkontrolle), (6): Ampicillin (Positivkontrolle). – *Diffusion test of preen gland secretion with and without keratinase against S. auricularis. (1): Preen gland secretion, (2): gland secretion with keratinase, (3) water extract, (4) water extract and keratinase, (5): stabilizer and keratinase (negative control), (6): ampicillin (positive control).*

Abb.4: Antimikrobielle Effekte der Kombination unterschiedlicher Konzentrationen von Bürzeldrüsensekret und Keratinase auf *Staphylococcus aureus* im 3D-Wachstumsgraphen. 100 % Wachstum bezieht sich auf das Wachstum der Negativkontrolle (Medium ohne Keratinase und ohne Bürzeldrüsensekret) – *Antimicrobial effects of the combination of different concentrations of preen gland secretions and keratinase against Staphylococcus aureus in a 3D-response surface graph. 100 % growth refers to the growth in the negative control (medium without keratinase and without preen gland secretion).*

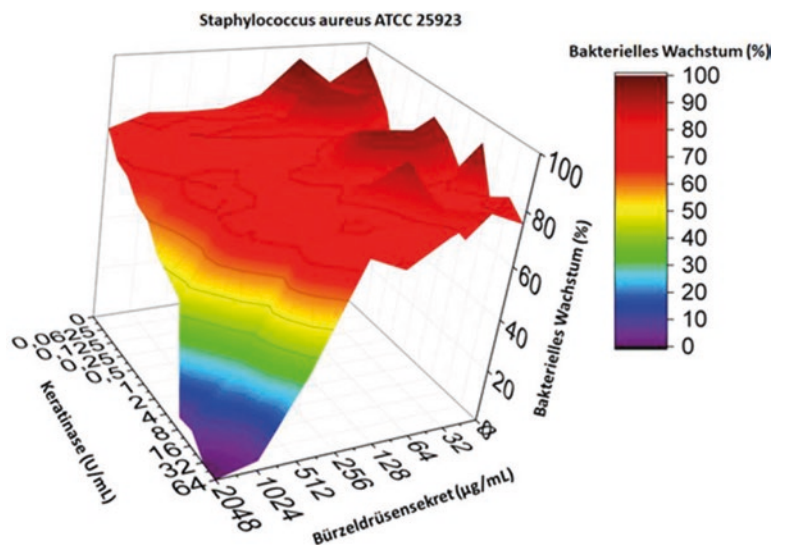


Abb. 5: Isobologramm repräsentativer Staphylokokken. Die Kombination aus Bürzeldrüsensekret und Keratinase führt zu einer Vervielfältigung der antimikrobiellen Aktivitäten. – *Isobologram of representative staphylococcal strains. The combination of preen gland secretions and keratinase results in amplifications of antimicrobial activities.*

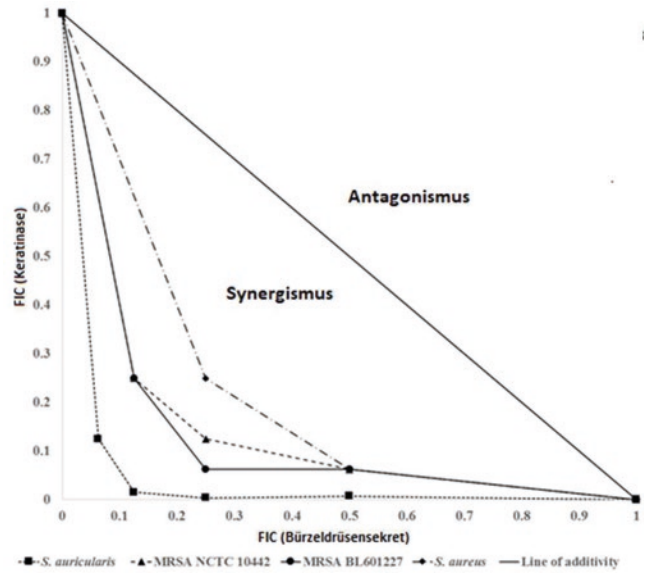
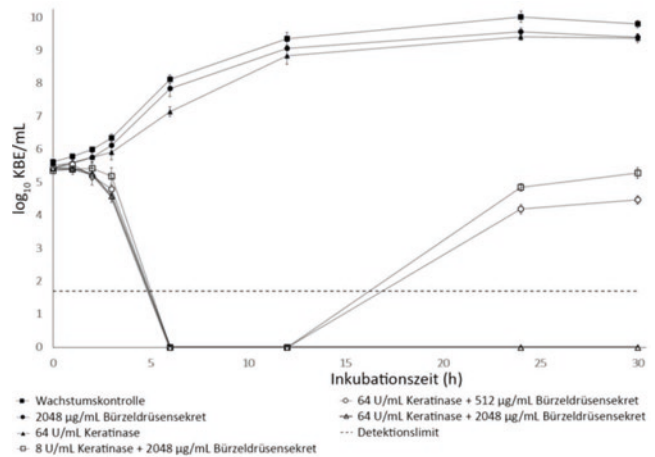


Abb. 6: Wachstumskinetik von MRSA NCTC 10442 unter dem Einfluss von Keratinase und Bürzeldrüsensekret. – *Growth kinetics of MRSA NCTC 10442 when exposed to keratinase and preen gland secretion.*



Absterbekinetik

Wie schon in den vorigen Kombinationstests vermochten es Bürzeldrüsensekret und Keratinase alleine nicht, Bakterien am Wachstum zu hindern. Auch hier gab es aber einen starken Synergismus, wenn beide Substanzen kombiniert wurden. Nach 6 h waren keine lebensfähigen Zellen des Krankenhauskeims MRSA mehr nachweisbar (Abb. 6).

4 Diskussion

In der Mehrzahl der Fälle konnten keine antimikrobiellen Effekte der getesteten Bürzeldrüsensekrete nachgewiesen werden. Ausnahmen bildeten u. a. die Bürzeldrüsensekrete von Truthühnern und Nilgänsen *Alopochen aegyptiacus*. Das Bürzeldrüsensekret von Truthühnern wurde in erweiterten Tests genauer untersucht. Fraktionierungen ergaben, dass die antimikrobiellen Komponenten in der Wasserphase lagen und nicht, wie häufig vermutet, in der Lipidfraktion.

Des Weiteren vervielfachte sich die antimikrobielle Aktivität dieser Bürzeldrüsensekrete durch die Zugabe von Keratinase. Da Keratinase von federzersetzenden Mikroorganismen (FDM) produziert wird, um Federn abzubauen, erscheint es wahrscheinlich, dass Bürzeldrüsensekrete spezifisch gegen FDM gerichtet sind, andere (unschädliche) Bakterien aber nicht abtöten.

Bei den antimikrobiellen Substanzen könnte es sich um Peptide handeln, die einer Aktivierung durch Enzyme (Keratinase) bedürfen. Die zahlreichen Negativbefunde unserer Arbeit könnten darauf beruhen, dass die Expression solcher Peptide häufig durch äußere Faktoren (z. B. Infektionen) induziert werden muss. Während FDM auf in Gefangenschaft in hoher Dichte gehaltenen Vögeln schnell von einem Individuum auf das andere „springen“ und schnell den gesamten Bestand stark befallen können, ist dieses Risiko bei anderen Vögeln sehr viel geringer. In ersten Fall sollten also häufiger und mehr antimikrobielle Peptide produziert werden, während dies im zweiten Fall die Ausnahme

darstellen könnte. Dies wiederum würde die Abwesenheit von antimikrobiellen Eigenschaften bei der Mehrzahl der untersuchten Bürzeldrüsensekrete erklären.

In der Literatur kursieren einige Berichte, welche von antibiotischen Effekten von Bürzeldrüsensekreten sprechen. Diese stehen aber nur scheinbar im Widerspruch zu unseren Untersuchungen, wie die nachfolgende Analyse der entsprechenden Literaturstellen zeigt.

Shawkey *et al.* (2003) konnten zeigen, dass Bürzeldrüsensekret des Hausgimpels (*Haemorhous mexicanus*) antimikrobiell sind. Allerdings greifen diese vorzugsweise FDM an (Shawkey *et al.* 2003). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass Keratinasen auch die Bürzeldrüsensekrete dieser Vogelart aktivieren

Weitere Berichte, welche antimikrobielle Eigenschaften von Bürzeldrüsensekreten überzeugend darlegen, stammen von Martin-Vivaldi *et al.* (2010). Allerdings wurde gezeigt, dass diese Eigenschaften auf symbiontischen Bakterien beruhen, welche im Bürzeldrüsensekret von Wiedehopfen leben und diesem seine antibiotische Wirkung verleihen (Martin-Vivaldi *et al.* 2010). Dieser Befund ist anscheinend eine Besonderheit der Hornvögel und Hopfe (Bucerotiformes). Ein ähnlicher Mechanismus ist im Fall des Truthuhns unwahrscheinlich (Braun *et al.* 2018c).

1996 zeigten Bandyopadhyay und Bhattacharyya, dass Lipide aus den Bürzeldrüsen von Haushühnern (*Gallus gallus*) eine schwache antimikrobielle Wirkung ausüben können. In einer neueren, von Wellman-Labadie und Kollegen durchgeführten Studie gelang es allerdings nicht, diese Ergebnisse zu reproduzieren (Wellman-Labadie *et al.* 2010).

Gelegentlich werden im Zusammenhang mit antimikrobiellen Eigenschaften von Bürzeldrüsensekreten die Arbeiten von Baxter und Trotter (1969) sowie Pugh und Evans (1970) zitiert. Diese kommen zum Schluss, dass Federlipide über antimikrobielle Eigenschaften verfügen können. Die Aussagekraft dieser Studien im Zusammenhang mit Lipiden aus der Bürzeldrüse muss allerdings kritisch hinterfragt werden, denn Federlipide unterscheiden sich in ihrer Zusammensetzung deutlich von Bürzeldrüsensekreten. Ganz im Gegensatz zu den Wachsestern der Bürzeldrüse, enthalten Federlipide einen hohen Anteil freier Fettsäuren und freier Alkohole (>55%, Jacob (1975))(Jacob & Grimmer 1975), welche nachgewiesenermaßen Bakterien und Pilze hemmen (Menon & Menon 2000; Mukherjee *et al.* 2013).

Jacobs und Mitarbeiter (1997) zeigten, dass die Substanz 3,7-Dimethyloctan-1-ol des Bürzeldrüsensekrets von Basstölpeln *Morus bassanus* Bakterien und Pilze schwach hemmt (Jacob *et al.* 1997), weshalb sie seither häufig herangezogen wird, um antimikrobielle Eigenschaften von Bürzeldrüsensekreten zu belegen. Bei dieser Studie ist allerdings zu beachten, dass freies 3,7-Dimethyloctan-1-ol laut Autoren im Bürzeldrüsensekret der Basstölpel gar nicht vorkommt. Vielmehr wurde dieser Alkohol erst durch hydrolytische Aufspal-

tung der Bürzelwachse freigesetzt. Hintergrund dieser Vorgehensweise ist, dass Jürgen Jacob seinen Schwerpunkt nicht auf die Bestimmung der antimikrobiellen Eigenschaften von Bürzeldrüsensekreten legte, sondern deren Chemotaxonomie, also der systematischen Einordnung unterschiedlicher Vogelarten in höherrangige Taxa basierend auf der Zusammensetzung ihrer Bürzeldrüsenlipide. Um diese Zusammensetzung sicher zu bestimmen, war es damals unumgänglich die Wachsester der Bürzeldrüse in freie Fettsäuren und freie Alkohole aufzuspalten. Diese sind, wie oben beschrieben, antimikrobiell. Allerdings könnte die Studie Jacobs auf eine indirekte Aktivität von Bürzeldrüsensekreten hindeuten. Durch äußere Faktoren wie z. B. UV-Strahlung könnten auf das Federkleid aufgetragene Wachsester der Bürzeldrüse hydrolysiert werden und dadurch antimikrobielle freie Fettsäuren und Alkohole entstehen. Ein ähnlicher Mechanismus ist denkbar, wenn Esterase-positive Bakterien der Federn Bürzelwachse hydrolysieren. Vorläufige Tests unseres Labors bestätigten bereits, dass einige Bakterien, welche von Federn isoliert wurden, Esterasen produzieren und damit grundsätzlich im Stande wären, die inaktiven Wachsester der Bürzeldrüsen in antimikrobiell aktive Substanzen zu überführen (Braun und Wink, unveröffentlichte Daten).

Damit wirft diese Studie zwei Hypothesen zur Wirkung von Bürzeldrüsensekreten auf:

- Hydrophile Bestandteile der Bürzeldrüsensekrete von Vögeln wirken spezifisch gegen federzersetzende Mikroorganismen nachdem sie von denselben aktiviert werden.
 - Inaktive, lipophile Bestandteile der Bürzeldrüsensekrete werden durch äußere Einflüsse (z. B. UV oder Mikroorganismen) in antimikrobielle Komponenten überführt.
- Beide Hypothesen müssen durch Studien überprüft werden, um die Funktionsweise von Bürzeldrüsensekreten zu entschlüsseln.

Dank

Wir bedanken uns herzlichst bei unseren zahlreichen Kooperationspartnern (darunter Geflügelspezialitäten Annerose Ziegler GbR, Bammental und Ullrichs Putenhof, Helmstadt-Bargen) welche uns Probenmaterial zur Verfügung gestellt oder dieses Projekt durch ihre Unterstützung in sonstiger Weise ermöglicht haben.

5 Zusammenfassung

Viele Vogelarten besitzen Bürzeldrüsen mit Sekreten, die auf das gesamte Gefieder regelmäßig verteilt werden. Den Drüsensekreten werden zahlreiche Funktionen zugesprochen, die aber mehrheitlich noch nicht wissenschaftlich belegt sind. In dieser Studie haben wir die antimikrobielle Aktivität von Bürzeldrüsensekreten unterschiedlicher Vogelarten analysiert. Literaturdaten zu diesem Thema sind teils widersprüchlich.

Einige Autoren gehen aber davon aus, dass Lipide der Bürzeldrüsensekrete mikrobielles Wachstum hemmen. In unseren Analysen hatten die Sekrete von sieben von 26 Vogelarten antimikrobielle Wirkungen. Diese wurden am Beispiel des Truthuhns *Meleagris gallopavo* in weiteren Untersuchungen getestet. Dabei stellte sich heraus, dass die Aktivität der Bürzeldrüsensekrete von Truthühnern in Kombination mit dem Enzym Keratinase vervielfacht werden konnte. Da Keratinase von federzeretzenden Mikroorganismen gebildet wird, deutet dies auf einen gezielt gegen solche Mikroben gerichteten Abwehrmechanismus hin. Darüber hinaus befanden sich die aktiven Komponenten nicht wie erwartet unter den Lipiden, sondern in der wässrigen Phase der Bürzeldrüsensekrete. Diese Befunde bestätigen nur teilweise die Hypothese, dass Bürzeldrüsenextrakte der antimikrobiellen Abwehr dienen.

6 Literatur

- Bandyopadhyay A & Bhattacharyya SP 1996: Influence of fowl uropygial gland and its secretory lipid components on growth of skin surface bacteria of fowl. *Indian J. Exp. Biol.* 34: 48-52.
- Berrang M, Bühr R & Cason J 2000: *Campylobacter* recovery from external and internal organs of commercial broiler carcass prior to scalding. *Poult. Sci.* 79: 286-290.
- Bligh EG & Dyer WJ 1959: A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37: 911-917.
- Bliss C 1956: The calculation of microbial assays. *Bacteriol. Rev.* 20: 243.
- Braun MS, Wang E, Zimmermann S, Boutin S & Wink M 2018a: *Kocuria uropygioeca* sp. nov. and *Kocuria uropygialis* sp. nov., isolated from the preen glands of great spotted woodpeckers (*Dendrocopos major*). *Syst. Appl. Microbiol.* 41: 38-43.
- Braun MS, Wang E, Zimmermann S, Wagner H & Wink M 2019a: *Kocuria tytonicola*, new bacteria from the preen glands of American barn owls (*Tyto furcata*). *Syst. Appl. Microbiol.* 42: 198-204.
- Braun MS, Wang E, Zimmermann S, Wagner H & Wink M 2019b: *Kocuria tytonis* sp. nov., isolated from the uropygial gland of an American barn owl (*Tyto furcata*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 69: 447-451.
- Braun MS, Wang E, Zimmermann S & Wink M 2018b: *Corynebacterium heidelbergense* sp. nov., isolated from the preen glands of Egyptian geese (*Alopochen aegyptiacus*). *Syst. Appl. Microbiol.* 41: 564-569.
- Braun MS, Zimmermann S, Danner M, Rashid HO & Wink M 2016: *Corynebacterium uropygiale* sp. nov., isolated from the preen gland of turkeys (*Meleagris gallopavo*). *Syst. Appl. Microbiol.* 39: 88-92.
- Braun MS, Zimmermann S & Wink M 2018c: Birds, feather-degrading bacteria and preen glands: the antimicrobial activity of preen gland secretions from turkeys (*Meleagris gallopavo*) is amplified by keratinase. *FEMS Microbiol. Ecol.* 94: fiy117.
- CLSI 2012: Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard - ninth edition. Wayne, PA, Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Greco WR, Bravo G & Parsons JC 1995: The search for synergy: a critical review from a response surface perspective. *Pharmacol. Rev.* 47: 331-385.
- Gunderson AR 2008: Feather-Degrading Bacteria: A New Frontier in Avian and Host-Parasite Research? *The Auk* 125: 972-979.
- Hubalek Z 1974: Fungi associated with free-living birds in Czechoslovakia and Yugoslavia. *Acta scientiarum naturalium Academiae Scientiarum Bohemoslovacae*, Brno. Frankfurt, Universitätsbibliothek Johann Christian Senckenberg.
- Chihara K & Fukubayashi Y 2010: Preparation of fatty acid methyl esters for gas-liquid chromatography. *J. Lipid Res.* 51: 635-640.
- Jacob J, Eigener U & Hoppe U 1997: The structure of preen gland waxes from peleciform birds containing 3,7-dimethyloctan-1-ol - an active ingredient against dermatophytes. *Z Naturforsch C* 52: 114-123.
- Jacob J & Grimmer G 1975: Gefiederlipide der Ringeltaube *Columba palumbus*. *Z Naturforsch C* 30: 363-368.
- Jacob J & Ziswiler V 1982: The uropygial gland. *Avian Biol. D. S. Farner, J. R. King and K. C. Parkes*. New York, Academic Press. 6: 199-314.
- Loewe S, Käer E & Muischnek H 1927: Über Kombinationswirkungen. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* 120: 25-40.
- Lovette IJ & Fitzpatrick JW 2016: *Handbook of Bird Biology*. Pondicherry, John Wiley & Sons.
- Martin-Vivaldi M, Pena A, Peralta-Sanchez JM, Sanchez L, Ananou S, Ruiz-Rodriguez M & Soler JJ 2010: Antimicrobial chemicals in hoopoe preen secretions are produced by symbiotic bacteria. *Proc Biol Sci* 277: 123-130.
- Menon GK & Menon J 2000: Avian epidermal lipids: functional considerations and relationship to feathering. *Am. Zool.* 40: 540-552.
- Moreno-Rueda G 2017: Preen oil and bird fitness: a critical review of the evidence. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 92: 2131-2143.
- Mukherjee K, Tribedi P, Mukhopadhyay B & Sil AK 2013: Antibacterial activity of long-chain fatty alcohols against mycobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 338: 177-183.
- Rijpsstra WIC, Reneerkens J, Piersma T & Damsté JSS 2007: Structural identification of the β -hydroxy fatty acid-based diester preen gland waxes of shorebirds. *J. Nat. Prod.* 70: 1804-1807.
- Sawaya WN & Kolattukudy P 1972: Structure and biosynthesis of diesters of alkane-2,3-diols of the uropygial glands of Ring-necked Pheasants. *Biochemistry* 11: 4398-4406.
- Shawkey MD, Pillai SR & Hill GE 2003: Chemical warfare? Effects of uropygial oil on feather-degrading bacteria. *J. Avian Biol.* 34: 345-349.
- Soler JJ, Martin-Vivaldi M, Ruiz-Rodriguez M, Valdivia E, Martin-Platero AM, Martinez-Bueno M, Peralta-Sanchez JM & Mendez M 2008: Symbiotic association between hoopoes and antibiotic-producing bacteria that live in their uropygial gland. *Funct. Ecol.* 22: 864-871.
- Wellman-Labadie O, Lemaire S, Mann K, Picman J & Hincke MT 2010: Antimicrobial activity of lipophilic avian eggshell surface extracts. *J. Agric. Food Chem.* 58: 10156-10161.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Vogelwarte - Zeitschrift für Vogelkunde](#)

Jahr/Year: 2020

Band/Volume: [58_2020](#)

Autor(en)/Author(s): Braun Markus Santosh, Zimmermann Stefan, Sporer Frank, Wink Michael

Artikel/Article: [Antimikrobielle Eigenschaften von Bürzeldrüsensekreten 247-254](#)