

2. Material und Methoden

2.1. Organismen

Es wurden Untersuchungen zum H₂-Metabolismus von intestinalen Bakterien mit *Methanobrevibacter* RT-1 und *Desulfovibrio* sp. (DSM 7057) durchgeführt. Den Stamm *Methanobrevibacter* RT-1 (MILLER et al., 1986) stellte freundlicherweise Frau Dr. Terry Miller (Albany, USA) zur Verfügung. Alle weiteren Organismen wurden im Zuge der vorliegenden Arbeit aus humanen Faeces isoliert und werden an entsprechender Stelle beschrieben (3.1.). Alle für die Validierung einer spezifischen Oligonukleotidsonde verwendeten Bakterienstämme sind in Abschnitt 7.3. alphabetisch aufgeführt.

2.2. Nährmedien

Zur Kultivierung anaerober Bakterien wurden mit einem Butylgummi- oder Kautschukstopfen sowie einem Schraubdeckel gasdicht verschlossene 16-ml-Glasröhrchen (Ochs, Bovenden) oder Serumflaschen (148 - 1000 ml, Zscheile & Klinger, Hamburg) verwendet. Vor dem Sterilisieren der Medien wurde die Gasphase in den Gefäßen durch N₂/CO₂ (80/20, v/v), H₂/CO₂ (80/20, v/v), N₂ oder H₂ ersetzt. Dazu wurden die Gefäße mit Hilfe einer Kanüle und einer Vakuumpumpe (Vakuubrand, Wertheim) unter Schütteln evakuiert und anschließend mit den oben genannten Gasen begast. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt, wobei das eingeleitete Gas bzw. Gasgemisch über einen erhitzten Palladiumkatalysator geleitet wurde, um restliche Spuren von Sauerstoff zu beseitigen.

L-Cysteinhydrochlorid, NaHCO₃ und Na₂S x 9 H₂O wurde den Medien nach dem Begasen aber vor dem Autoklavieren zugegeben. 1,4-Dithiothreitol (DTT) und die Vitaminlösung wurden erst kurz vor der Inokulation aus einer steril filtrierten, anaeroben Stammlösung zugefügt. Sofern nicht anders angegeben, wurden die Medien für 20 min bei 121°C und $1,2 \times 10^5$ Pa autoklaviert.

Feste Medien wurden durch Zusatz von 1,5% (w/v) Agar (Serra, Heidelberg) zur entsprechenden Nährlösung hergestellt und nach Autoklavieren in einer

Anaerobierbox (MK 3, dw scientific, Shipley, Großbritannien, N₂/CO₂/H₂, 80/10/10, v/v/v) in am Vortag eingeschleuste Petrischalen gegossen.

Neben den nachfolgend aufgeführten Nährmedien wurden Columbia-Blut-Agar (bioMérieux, Nürtingen), Wilkins-Chalgren-Anaerobier-Medium (WCA-Medium, Oxoid, Wesel), MRS-Agar (Oxoid, Wesel) und CHL-Medium (bioMérieux, Nürtingen) als Fertignährmedien eingesetzt. Dem kommerziell erhältlichen WCA-Medium wurden 0,5 g L-Cysteinhydrochlorid und 1 mg Resazurin pro Liter Medium vor dem Autoklavieren zugesetzt.

Balchmedium 1 (modifiziert nach BALCH et al., 1979)

Minerallösung 1 (s. u.)	50 ml
Minerallösung 2 (s. u.)	50 ml
Spurenelementlösung B (s. u.)	10 ml
Vitaminlösung nach Wolin (s. u.)	10 ml
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	2 mg
NaHCO ₃	5 g
Natriumacetat	2,5 g
Natriumformiat	2,5 g
Hefeextrakt	2 g
Bacto-Trypton (Difco, Detroit, USA)	2 g
L-Cysteinhydrochlorid	0,5 g
Na ₂ S x 9 H ₂ O	0,5 g
Resazurin	1 mg
Pansensaft	55 ml
NH ₄ Cl	1 g
H ₂ O _{dest}	ad 1000 ml
	pH 7,0

Erst kurz vor der Inokulation wurde der autoklavierte Pansensaft zugegeben. Dieser stammte von einer klinisch gesunden Kuh und wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Laiblin (FU Berlin) zur Verfügung gestellt.

Minerallösung 1

K_2HPO_4	6 g
H_2O_{dest}	ad 1000 ml

Minerallösung 2

KH_2PO_4	6 g
$(NH_4)_2SO_4$	6 g
NaCl	12 g
$MgSO_4 \times 7 H_2O$	2,6 g
$CaCl_2 \times 2 H_2O$	0,16 g
H_2O_{dest}	ad 1000 ml

Spurenelementlösung B

Nitrilotriessigsäure	1,5 g
$MgSO_4 \times 7 H_2O$	3 g
$MnSO_4 \times 2 H_2O$	0,5 g
NaCl	1 g
$FeSO_4 \times 7 H_2O$	0,1 g
$CoCl_2$	0,1 g
$CaCl_2 \times 2 H_2O$	0,1 g
$ZnSO_4$	0,1 g
$CuSO_4 \times 5 H_2O$	10 mg
$AlK(SO_4)_2$	10 mg
H_3BO_3	10 mg
$Na_2MoO_4 \times 2 H_2O$	10 mg
H_2O_{dest}	ad 1000 ml
	pH 7,0

Die Nitrilotriessigsäure wurde vor Zugabe in 3 ml 3%iger KOH gelöst.

Vitaminlösung nach WOLIN et al. (1964)

Biotin	2 mg
Folsäure	2 mg
Pyridoxin-HCl	10 mg
Thiamin-HCl	5 mg
Riboflavin	5 mg
Nikotinsäure	5 mg
Pantothensäure (Ca ²⁺ -Salz)	5 mg
Vitamin B ₁₂	10 µg
p-Aminobenzoensäure	5 mg
α-Liponsäure	1 mg
H ₂ O _{bidest}	ad 1000 ml

Die Vitaminlösung wurde 5fach konzentriert hergestellt, steril filtriert, steril begast und im Dunkeln bei 4°C gelagert.

Medium B78 (modifiziert nach BADZIONG, 1978)

(NH ₄) ₂ SO ₄	5,3 g
Natriumacetat	2 g
KH ₂ PO ₄	0,5 g
NaCl	1 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,2 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,1 g
Vitaminlösung nach WOLIN (s. o.)	10 ml
Resazurin	1 mg
H ₂ O _{dest}	ad 933,5 ml

Dieses Medium wurde mit H₂/CO₂ begast und autoklaviert. Dann wurden 10 ml Spurenelementlösung 78 (s. u.), 50 ml sterile und begaste 8%ige (w/v) Na₂CO₃ - Lösung, 5,5 ml 25%ige Salzsäure und 1 ml anaerobe, steril filtrierte 0,5 M Na₂S₂O₄ - Lösung dem Medium zugefügt. Letztere wurde immer erst kurz vor der Inokulation

hergestellt und zugegeben. Kurz vor der Inokulation wurde die Vitaminlösung zugegeben.

Spurenelementlösung 78 (SL78, modifiziert nach BADZIONG, 1978)

FeCl ₂ x 4 H ₂ O	300 mg
CuCl ₂	20 mg
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	100 mg
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	170 mg
ZnCl ₂	100 mg
H ₃ BO ₃	10 mg
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	10 mg
H ₂ O _{dest}	ad 1000 ml

Stamm-Medium (modifiziert nach KAMLAGE et al., 1999)

Fleischpepton, tryptisch verdaut	9 g
Proteosepepton	1 g
Fleischextrakt	3 g
Hefeextrakt	4 g
Glucose	6 g
Na ₂ HPO ₄	2 g
NaCl	3 g
Tween 80	0,5 ml
Cystin	0,25 g
L-Cysteinhydrochlorid	0,25 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,1 g
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	5 mg
MnSO ₄ x 2 H ₂ O	3,4 mg
Hämin	1 mg
H ₂ O _{dest}	ad 1000 ml
	pH 7,0

HA-Medium (nach KAMLAGE et al., 1997)

K_2HPO_4	0,348 g
KH_2PO_4	0,227 g
NH_4Cl	0,5 g
NaCl	1,16 g
$MgSO_4 \times 7 H_2O$	1 g
$CaCl_2$	50 mg
Spurenelementlösung SL10 (s. u.)	3 ml
Vitaminlösung nach Wolin (s. o.)	20 ml
Resazurin	1 mg
Casaminosäure	0,2 g
Pepton aus Casein	0,2 g
Hefeextrakt	0,4 g
Vitamin K_1 (0,5%ig in Ethanol, w/v)	0,5 ml
L-Cysteinhydrochlorid	0,6 g
$NaHCO_3$	4 g
H_2O_{dest}	ad 1000 ml
	pH 7,0

Spurenelementlösung SL10 (WIDDEL et al., 1983)

25%ige HCl	10 ml
$FeCl_2 \times 4 H_2O$	1,5 g
$ZnCl_2$	70 mg
$MnCl_2 \times 4 H_2O$	100 mg
H_3BO_3	6 mg
$CoCl_2 \times 6 H_2O$	190 mg
$CuCl_2 \times 2 H_2O$	2 mg
$NiCl_2 \times 6 H_2O$	24 mg
$Na_2MoO_4 \times 2 H_2O$	36 mg
H_2O_{bidest}	ad 1000 ml

FeCl₂ wurde zunächst in HCl gelöst, dann wurde H₂O_{dest} zugegeben und die anderen Salze gelöst. Die Lösung wurde 20fach konzentriert angesetzt und bei 4°C gelagert.

Bicarbonatgepuffertes Medium BIC3 (modifiziert nach MÖLLER et al., 1984)

Na ₂ HCO ₃	4 g
K ₂ HPO ₄	0,348 g
KH ₂ PO ₄	0,227 g
NH ₄ Cl	0,5 g
NaCl	2,25 g
MgSO ₄ × 7 H ₂ O	0,5 g
CaCl ₂ × 2 H ₂ O	70 mg
FeSO ₄ × 7 H ₂ O	5 mg
Casiton	3,5 mg
Hefeextrakt	3,5 mg
Hämin	2,5 mg
Na ₂ SeO ₃	0,15 mg
Resazurin	1 mg
Spurenelementlösung SL10 (s. o.)	3 ml
Vitaminlösung nach Wolin (s. o.)	20 ml
L-Cysteinhydrochlorid	0,5 g
H ₂ O _{dest}	ad 1000 ml
	pH 7,0

Modifiziertes WCA-Medium

Caseinpepton	10 g
Proteosepepton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
L-Arginin	1 g
Natriumpyruvat	1 g
Vitamin K ₃	0,5 mg
Hämin	5 mg
Resazurin	1 mg
H ₂ O _{dest}	ad 1000 ml
	pH 7,0

Zur Isolierung und Charakterisierung H₂-bildender Organismen wurden diesem modifizierten WCA-Medium nach dem Autoklavieren aus sterilen Stammlösungen noch folgende Substrate in Endkonzentrationen von 1 g/l zugesetzt: Lactose, Lactulose, Saccharose, Mannose und Stärke.

Medium C nach WIDDEL & BAK (1992)

Natriumlactat	12 g
Na ₂ SO ₄	4,5 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	60 mg
Natriumcitrat	0,3 g
NH ₄ Cl	1 g
KH ₂ PO ₄	0,5 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	2 g
Hefeextrakt	1 g
Resazurin	1 mg
Agar	10 g
H ₂ O _{dest}	ad 990 ml
	pH 7,2

Diese Lösung wurde mit N₂ begast und sterilisiert. Nach dem Abkühlen auf 50°C wurden 0,08 ml Eisensulfatlösung (s. u.) sowie 10 ml Reduktionslösung (s. u.) steril und anaerob zugegeben. Der pH-Wert wurde unter sterilen und anaeroben Bedingungen eingestellt.

Eisensulfatlösung nach WIDDEL & BAK(1992)

FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0,5 g
H ₂ O _{dest}	ad 10 ml

Das Eisensulfat wurde in 1 ml 1 M H₂SO₄ gelöst und die fertige Lösung mit N₂ begast und autoklaviert.

Reduktionslösung nach WIDDEL & BAK(1992)

Natriumthioglycolat	0,1 g
Ascorbinsäure	0,1 g
H ₂ O _{dest}	ad 10 ml

Die Lösung wurde mit N₂ begast und autoklaviert.

Perfringens-Selektivagar (SPS) nach ANGELOTTI et al. (1962)

Pepton aus Casein	15 g
Hefeextrakt	10 g
Eisen-(III)-citrat	0,5 g
Na ₂ S x 9 H ₂ O	0,5 g
Polymyxin-B-Sulfat	10 mg
Sulfadiazin-Natrium	0,12 g
Agar	13,9 g
H ₂ O _{dest}	ad 1000 ml
	pH 7,0

2.3. Anzuchtbedingungen

Die Anzucht anaerober und fakultativ anaerober Bakterien erfolgte nach den Techniken von HUNGATE (1969) und BRYANT (1972), die von MILLER & WOLIN (1974) sowie von BALCH et al. (1979) besonders im Hinblick auf die Kultivierung methanogener Archaea weiter modifiziert wurden. Die Medien wurden 1-5%ig (v/v) mit Bakterienkulturen beimpft und 1-7 Tage bei 37°C inkubiert. Bei der Anzucht hydrogenotropher Organismen wurden die Kulturgefäße in der Regel nur zu maximal 15% (v/v) mit Medium befüllt und mit einem Überdruck von bis zu 10^5 Pa mit H₂/CO₂ (80/20, v/v) begast. Um den Kontakt des Gases mit den Organismen zu begünstigen, wurden die Kulturgefäße bei 37°C auf einem Rotationsschüttler (Certomat[®] U, Braun, Melsungen) bei 140 U/min geschüttelt. Falls notwendig, wurde verbrauchtes Gas über eine sterile, mit Watte gefüllte Kanüle ergänzt.

Auf Nähragar anzuzüchtende Bakterienkulturen wurden in der Anaerobierbox (s. 2.2.) auf Agarplatten ausgestrichen. Die Inkubation erfolgte bei 37°C in Anaerobieröpfen (Merck, Darmstadt oder Oxoid, Wesel). In diesen Gefäßen sicherte eine Reagenzienmischung (Anaerocult[®]A, Merck, Darmstadt) ein anaerobes Milieu, wobei die Abwesenheit von O₂ mittels Redoxindikatorstäbchen (Anaerotest[®], Merck, Darmstadt) kontrolliert wurde.

2.4. Stammhaltung

Alle verwendeten Bakterienstämme wurden als Kryokulturen in Microbank-Röhrchen (Mast Diagnostica, Reinfeld) bei -80°C gelagert. Dazu wurden die Zellen von dicht bewachsenen Columbia-Blut-Agar- oder WCA-Agar-Platten abgenommen und nach dem vom Hersteller beschriebenen Protokoll anaerob behandelt. Zur Reaktivierung der Zellen wurden mit Bakterien beladene Microbank-Perlen maximal drei Tage in 10 ml Stamm-Medium, 10 ml WCA-Medium oder auf festen Medien bei 37°C anaerob inkubiert. Flüssigkulturen wurden bei 4°C aufbewahrt und spätestens alle zwei Wochen überimpft. Die Stammhaltung von hydrogenotrophen Organismen erfolgte in Balchmedium 1, das zur Kultivierung von Sulfat-reduzierenden Bakterien mit 1 g/l Lactat supplementiert wurde. Alle anderen Organismen wurden in Stamm-Medium kultiviert.

2.5. Reinheitskontrollen

Reinheitskontrollen erfolgten routinemäßig durch Gram-Färbung und lichtmikroskopische Untersuchung der lebenden Kulturen im Phasenkontrast. Gelegentlich erfolgten Vereinzlungsausstriche auf festen Medien sowie die anschließende Charakterisierung der Organismen mit dem Vitek[®]-System (2.10.1.).

2.6. Messung des Bakterienwachstums

Die Entwicklung der Zellzahl wurde durch Messung der optischen Dichte (OD) mit einem Beckmann-DU[®]640-Spectrophotometer (Beckmann-Instruments GmbH, München) bei einer Wellenlänge von 600 nm in 1 cm-Plastikküvetten verfolgt, wobei H₂O_{dest} als Leerwert genutzt wurde. Bei Überschreitung einer OD₆₀₀ von 0,3 wurde mit H₂O_{dest} verdünnt.

Alternativ dazu wurden die Zellzahlen mit einer Thoma-Kammer für Bakterien ermittelt, wobei folgende Gleichung zu Grunde gelegt wurde:

$$Z = M \times 10^7/4$$

Z = Zellzahl (Zellen × ml⁻¹)

M = Mittelwert der Auszählungen von vier Großquadraten (Fläche eines Großquadrates = 40 μm²)

10⁷/4 = Kammerfaktor (ml⁻¹)

2.7. Aerobe und anaerobe Ernte von Zellen

Bei einem Kulturvolumen von 1-2 ml erfolgte die Zellernte mit einer Tisch-Zentrifuge (Centrifuge 5415C, Eppendorf, Hamburg). Größere Kulturvolumina wurden in einer Biofuge 28 RS (Heraeus Christ, Osterode) oder in einer J2MI-Zentrifuge (Beckmann-Instruments GmbH, München) zentrifugiert. Falls nicht anders angegeben, wurde das Zellpellet bei -80°C eingefroren.

Für die anaerobe Zellernte wurden die Kulturen in einer Anaerobierbox unter einer Gasphase aus $N_2/CO_2/H_2$ (80/10/10, v/v/v) in am Tag zuvor eingeschleuste Zentrifugenbecher gefüllt. Die Zentrifugation erfolgte ebenso wie bei der aeroben Zellernte, nur daß die Zellen in der Anaerobierbox in anaerobem 50 mM KP-Puffer (s. u.) mit 5 mM DTT resuspendiert und gewaschen wurden. Nach dem Waschen wurden die Zellen erneut zentrifugiert und in demselben Puffer aufgenommen.

50 mM KP-Puffer:

1 M K_2HPO_4	30,75 ml
1 M KH_2PO_4	19,25 ml
Resazurin	1 mg
H_2O_{dest}	ad 1000 ml
	pH 7,0

2.8. Genomische DNA

Die genomische DNA wurde zur Bestimmung des G+C-Gehaltes (2.10.6.) und für die DNA-DNA-Hybridisierung (2.10.7.) verwendet.

2.8.1. Isolierung von genomischer DNA aus Bakterienzellen

Für die Isolierung von genomischer DNA wurden jeweils 50 ml-Kulturen eingesetzt. Die Anzucht der Organismen erfolgte wie unter 2.3. beschrieben. Nach der aeroben Zellernte (s. 2.7.) wurde das Zellpellet in 5 ml einer 25%igen (w/v) wäßrigen Saccharoselösung aufgenommen und 30 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation ($4000 \times g$, 15 min, $4^\circ C$) wurde die DNA aus den Zellen mittels des InViSorbTM Genomic DNA Kit III (InViTek, Berlin) präpariert. Die Isolierungsmethode beruht auf dem Prinzip, zelluläre Proteine durch das chaotrope Salz Guanidinthiocyanat auszufällen und die freigesetzte DNA an ein Trägermaterial zu binden. Da dieses Verhalten spezifisch für Nukleinsäuren ist, können Salze, Proteine und andere Zellbestandteile ausgewaschen werden. Die DNA wurde nach dem Protokoll IV des Herstellers isoliert mit Ausnahme der Isolierung von DNA der

Stämme 111-35 und 111-13A, bei denen der Frier/Tau-Zyklus im Wechsel zwischen flüssigem Stickstoff (-180°C) und einem 100°C heißen Wasserbad durchgeführt wurde. Es wurde eine DNase-freie RNase nach SAMBROOK et al. (1989) hergestellt und verwendet. Die isolierte DNA wurde in 1%igen (w/v) TAE-Agarosegelen analysiert (s. 2.8.2.).

2.8.2. Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Zur Analyse der Reinheit der isolierten DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese (SAMBROOK et al., 1989) wurden 1%ige (w/v) Agarose-Gele verwendet. Die Agarose wurde in 1 × TAE-Puffer (s. u.) durch Erwärmen in der Mikrowelle gelöst und nach Abkühlen auf 60°C auf vorbereitete Gelträger (Biometra, Göttingen) gegossen. Je fünf Mikroliter der DNA-Proben wurden mit 1 µl Probenpuffer (s. u.) gemischt und auf das Gel aufgetragen. Als Größenstandard wurde der 1kb-Marker (GibcoBRL, Karlsruhe) verwendet. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 80 V und einer Stromstärke von etwa 50 mA durchgeführt. Anschließend wurde das Gel für mindestens 20 min in einer Ethidiumbromid-Lösung (2 µg/ml H₂O_{dest}) gefärbt. Nach Waschen des Gels mit Leitungswasser wurde die DNA auf einem UV-Tisch sichtbar gemacht und dokumentiert.

50 × TAE-Puffer	Tris-Base	242 g
	Eisessig	57,1 ml
	EDTA	37,2 g
	H ₂ O _{dest}	ad 1000 ml
		pH 8,5
Probenpuffer	Bromphenolblau	0,1 % (w/v)
	EDTA	0,1 M
	Tris	10 mM
	Glycerin	50 % (v/v)
		pH 8,0

Der Probenpuffer wurde bei 4°C im Dunkeln gelagert.

2.8.3. Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von doppelsträngiger DNA

Die Konzentration von doppelsträngiger DNA (dsDNA) in wässriger Lösung wurden photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt (SAMBROOK, et al., 1989). Die Erhöhung der Extinktion um eins entspricht dabei 50 µg dsDNA/ml. Daraus ergibt sich für die Konzentrationsbestimmung folgende Formel:

$$\text{DNA-Konzentration (}\mu\text{g/ml)} = E_{260} / 0,02 \times V_f$$

E_{260} = Extinktion bei $\lambda = 260$ nm

V_f = Verdünnungsfaktor der eingesetzten Nukleinsäurelösung

Die Reinheit von DNA wurde über den Quotienten von E_{260}/E_{280} beurteilt, wobei E_{280} die Absorption der jeweiligen Lösung bei $\lambda = 280$ nm darstellt und Verunreinigungen mit Proteinen anzeigt. E_{260}/E_{280} sollte für DNA zwischen 1,8 und 1,9 liegen. Außerdem wurde die Quantität und Qualität der DNA durch Betrachtung der Proben im jeweiligen Agarosegele (s. 2.8.2.) abgeschätzt.

2.9. Anreicherung am intestinalen H₂-Metabolismus beteiligter Bakterien aus Humanfaeces

Mittels verschiedener Isolierungsstrategien wurden Bakterienstämme aus humanen Faeces isoliert, die durch H₂-Bildung bzw. H₂-Nutzung am intestinalen Wasserstoffmetabolismus beteiligt sind. Die isolierten Stämme wurden phänotypisch charakterisiert und anhand dieser Parameter sowie im Falle einiger Isolate auch anhand genotypischer Parameter identifiziert.

2.9.1. Anreicherung H₂-produzierender Bakterien

Bei der Isolierung von H₂-produzierenden Bakterien lag der Schwerpunkt auf Organismen, die möglichst viel H₂ pro mol Substrat bzw. pro ml Medium produzierten. Die starke H₂-Bildung war erwünscht, um im geplanten anschließenden

Einsatz dieser Organismen im gnotobiotischen Rattenmodell eventuellen technisch bedingten Limitierungen durch die Detektionsschwelle vorzubeugen. Außerdem sollte ein hoher H_2 -Partialdruck im Darm der Versuchstiere ermöglicht werden, um somit auch ein großes Substratangebot für die H_2 nutzenden Population zu schaffen. Dazu wurde zunächst mit dem WCA-Medium ein reichhaltiges Medium ausgewählt, das vielfach zur Ermittlung der Gesamtzellzahl der Anaerobier aus Faeces genutzt wird (DORÉ et al., 1995) und somit möglichst vielen Bakterienspezies das Wachstum erlauben sollte. Denn erst nach der Vereinzelnung von Reinkulturen konnte die H_2 -Bildungsfähigkeit bestimmt werden und starke H_2 -Produzenten ausgewählt werden, da kein Medium zur Verfügung steht, das H_2 -Bildner selektiert. Zusätzlich wurden Medien eingesetzt, die andere Substrate enthielten als diejenigen des WCA-Mediums. Dabei wurden auch Substrate ausgewählt, von denen bekannt ist, daß diese auch *in vivo* in der Lage sind, das Colon zu erreichen und somit von Bakterien metabolisiert werden können.

2.9.1.1. Isolierung in Medien mit verschiedenen Substraten (Strategie A)

Frische humane Faeces eines gesunden Freiwilligen, der in den vorausgegangenen sechs Monaten keine Antibiotika erhalten hatte und sich mit einer westlichen Diät ernährte, wurden in einer Anaerobierbox (2.2.) im Verhältnis 1:10 (w/v) in Sörensen-Puffer (s. u.) suspendiert und gründlich gemischt. Es erfolgte eine Verdünnung der Faeces-Suspension im gleichen Puffer in 10er Schritten von 10^{-1} bis 10^{-12} . 100 μ l-Aliquots aus den 10^{-2} bis 10^{-12} verdünnten Faeces-Suspensionen wurden auf WCA-, modifiziertem WCA-Agar oder BIC3-Agar ausplattiert. Die modifizierten WCA-Agarplatten (2.2.) enthielten Lactose, Lactulose oder Stärke als zusätzliche Kohlenstoffquelle, während der BIC3-Agar 25 mM Lactulose als Kohlenstoffquelle enthielt. Nach anaerober Inkubation bei 37°C für 12 - 48 h wurden von Einzelkolonien der Verdünnungsstufen 10^{-5} bis 10^{-12} wiederholt Vereinzelnungsausstriche auf WCA- bzw. BIC3-Agar durchgeführt, bis Reinkulturen vorlagen. Anschließend wurde die H_2 -Bildung durch diese isolierten Organismen quantitativ in WCA- bzw. BIC3-Medium untersucht. Dazu wurden die Reinkulturen in diese Medien inokuliert, Gasproben in bestimmten Zeitabständen aus dem Fermentationsansatz entnommen und gaschromatographisch (2.19.2.) auf die Produktion von H_2 getestet.

H₂-produzierende Kulturen wurden erneut auf WCA-Agar vereinzelt und nochmals auf die Produktion von H₂ hin getestet.

Sörensen-Puffer:	KH ₂ PO ₄	13,5 g
	Na ₂ HPO ₄ × 2 H ₂ O	18 g
	Agarwasser (2,5%; w/v)	80 ml
	Thioglycolsäure	2,4 ml
	H ₂ O _{dest}	ad 1000 ml

2.9.1.2. Isolierung in Medium mit Inhibitoren der H₂-Oxidation (Strategie B)

Wie in Strategie A (2.9.1.1.) wurden Faeces anaerob suspendiert, gemischt und verdünnt, doch erfolgte die Suspendierung und Verdünnung in WCA-Medium, das in allen Verdünnungsstufen mit 20 mM 2-Bromoethansulfonsäure (BES) und 20 mM Natriummolybdat supplementiert worden war. Außerdem enthielt das WCA-Medium für diesen Isolierungsansatz 348 mg K₂HPO₄ und 227 mg KH₂PO₄, um die pH-Pufferung zu verbessern. Je Verdünnungsstufe wurden 5 ml bei 37°C für 12 - 48 h in Röhrchen mit einer Gasphase von N₂/CO₂ inkubiert. Die H₂-Bildung in den unterschiedlichen Verdünnungsstufen wurde wiederum gaschromatographisch verfolgt. Die Verdünnungsstufen 10⁻⁷ bis 10⁻⁹ wurden aufgrund von hohen H₂-Konzentrationen in der Gasphase des Röhrchens bzw. wegen auffälliger Morphologie einiger Zellen im Kulturmedium für weitere Isolierungsschritte herangezogen. Dazu wurden Aliquots wiederum im beschriebenen Medium in 10er Schritten von 10⁻¹ bis 10⁻⁸ verdünnt und für 12 h bei 37°C inkubiert. Die Vereinzlung und gaschromatographische Prüfung der H₂-Bildung erfolgte wiederum wie nach Strategie A. Jedoch wurden WCA-Medium und -Agar eingesetzt, die wie oben beschrieben supplementiert waren.

2.9.1.3. Isolierung aus Sulfat-reduzierenden Mischkulturen (Strategie C)

Bei der Anreicherung von Sulfat-reduzierenden Bakterien (2.9.3.) aus Faeces-Verdünnungen in T98-Medium traten Mischkulturen auf, aus denen ebenfalls H₂-

bildende Organismen isoliert wurden. Das T98-Medium entsprach dem B78-Medium mit Ausnahme der Konzentration des enthaltenden Natriumacetats, die auf 0,7 mM reduziert wurde. Aliquots aus den Mischkulturen wurden in Stamm-Medium inkubiert und Organismen durch anschließende Vereinzelausstriche auf WCA-Agar isoliert. Die abschließende gaschromatographische Untersuchung der H₂-Bildung verlief wie für Strategie A beschrieben.

2.9.2. Anreicherung Methan-bildender Archaea

Zur Isolierung von Methan-bildenden Archaea wurden H₂/CO₂-begaste Serumflaschen (148 ml) mit 9 ml Balchmedium 1 gefüllt und zur Reihenverdünnung einer frischen Faecesprobe in 10-er Schritten von 10⁻¹ bis 10⁻¹² genutzt. Die humane Faecesprobe stammte von demselben Freiwilligen, wie bei den Isolierungsstrategien A-C. Dessen Ausatemluft war zuvor positiv auf die Abatmung von Methan hin getestet worden. Nach der Inokulation mit Faeces wurden die Serumflaschen steril mit 2 × 10⁵ Pa H₂/CO₂ begast (MILLER et al., 1982). Die Kulturen wurden auf einer Universalschüttelmaschine (Certomat[®] U, B. Braun Biotech, Melsungen) bei 140 U/min inkubiert, und die Methanbildung wurde in regelmäßigen Abständen gaschromatographisch verfolgt. Die höchste Verdünnungsstufe, bei der noch Methan nachgewiesen werden konnte, wurde für weitere Anreicherungsstufen genutzt. Außerdem wurden nach DODDEMA & VOGELS (1978) die Zellen der Methanogenen mittels Fluoreszenz des endogenen Coenzym F₄₂₀ mikroskopisch mit einer Anregungswellenlänge von 450-490 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm beobachtet. Das Desazaflavin F₄₂₀ findet sich nur in Methanogenen, wo es als H₂-Überträger dient (BLAUT et al., 1992). Eine Kultur galt als rein, wenn sie F₄₂₀-Fluoreszenz und eine einheitliche Morphologie aufwies sowie in Stamm-Medium unter N₂/CO₂ kein Wachstum zeigte.

Um die methanogenen Archaea selektiv anreichern zu können, wurde der Fermentationsansatz mit bestimmten Antibiotika nach PECHER & BÖCK (1981) supplementiert. Diese Zusätze sind in der Tabelle 2.1 aufgelistet. Dabei wurden folgende Wirkstoffkombinationen in den angegebenen Konzentrationen eingesetzt:

- a) Rifampicin mit Ampicillin und Erythromycin
- b) Ampicillin mit Vancomycin und Kanamycin
- c) Rifampicin mit Erythromycin, Vancomycin und Polymyxin B
- d) Cephalothin und Clindamycin (MILLER & WOLIN, 1982)

Als alleinige Wirkkomponente wurden Nystatin, Metronidazol, Tetracyclin oder Ofloxacin dem Medium zugesetzt, mit dem Ziel Mischkulturen in Reinkulturen zu überführen. Teilweise wurde dem Medium auch Natriummolybdat zugesetzt (20 mM), um die Sulfatreduktion zu inhibieren (TAYLOR & OREMLAND, 1979).

Tabelle 2.1 Die zur Selektion methanogener Archaea eingesetzten Medienzusätze (nach PECHER & BÖCK, 1981).

Substanz	Angriffsort und Wirkart	eingesetzte Menge
Vancomycin	Zellwand	36-300 µg/ml
Ampicillin	Zellwand, bakterizid	6-500 µg/ml
Metronidazol	bildet DNA-Addukte	15-30 µg/ml
Ofloxacin	Gyrasehemmer	10-15 µg/ml
Kanamycin	30S-Untereinheit, bakterizid	36-60 µg/ml
Polymyxin B	bildet Membranporen, bakterizid	22 µg/ml
Rifampicin	RNA-Polymerase, bakterizid	6-36 µg/ml
Nystatin	inhibiert <i>Fungi</i>	14 U/ml
Cephalothin	Zellwand, bakterizid	6,7 µg/ml
Clindamycin	50S-Untereinheit, bakteriostatisch	1,7 µg/ml
Erythromycin	50S-Untereinheit	6-36 µg/ml

2.9.3. Anreicherung Sulfat-reduzierender Bakterien

Zur Isolierung von H₂-nutzenden Sulfat-reduzierenden Bakterien wurden mit einer frischen humanen Faecesprobe dekadische Verdünnungsreihen sowohl in B78-Medium als auch in dem daraus hergeleiteten T98-Medium hergestellt. Als Kulturgefäße dienten 148 ml-Serumflaschen, die mit H₂/CO₂ begast worden waren und bis zu 10 Tage bei 37°C und 140 U/min geschüttelt wurden.

In einem weiteren Ansatz wurden Rollröhrchen aus B78-Medium mit 10 g/l Agar in Kulturröhrchen unter einer H₂/CO₂-Gasphase hergestellt, indem der noch flüssige 46-48°C warme B78-Agar mit verdünnten Faeces-Suspensionen inokuliert wurde. Wie oben beschrieben wurden wiederum Verdünnungsreihen hergestellt, durch sofortiges Drehen in eiskaltem Wasser wurde das Medium verfestigt und anschließend inkubiert. Kulturen, die H₂ nutzten, daher schwarze FeS-Präzipitate erzeugten und im Bleiacetat-Test (LATSCHA & KLEIN, 1990) positiv reagierten, wurden zur weiteren Anreicherung genutzt. Das Prinzip des Bleiacetat-Testes beruht auf der Bildung von Bleisulfid, wodurch in 0,5 M Bleiacetatlösung getränktes Filterpapier in der Anwesenheit von Sulfidionen schwarz verfärbt wird.

2.10. Charakterisierung und Identifizierung der Isolate

Gram-Reaktion, Katalase-Aktivität, β-Hämolyse, Indol-Reaktion, Oxidase-Aktivität, Sporenbildung und Beweglichkeit wurde mit den klassischen mikrobiologischen Methoden (SÜßMUTH et al., 1998) bestimmt.

2.10.1. Phänotypische Charakterisierung mit dem Vitek[®]-System

Das Vitek[®]-System (bioMérieux, Nürtingen) ermittelt automatisiert phänotypische Parameter von bakteriellen Isolaten. Anhand dieser Testresultate werden diese Reinkulturen bis auf Speziesebene identifiziert, sofern die entsprechenden Vergleichsparameter in der Datenbank vorhanden sind. Die positiv und negativ getesteten Ergebnisse werden in einen Code umgewandelt, durch den das untersuchte Isolat mit mathematisch ermittelter Wahrscheinlichkeit als eine bestimmte Spezies identifiziert wird. Zur Durchführung des Tests wurden entsprechend den Herstellerangaben die zu untersuchenden Reinkulturen auf festen Nährmedien anaerob oder aerob angezüchtet. Anschließend wurden die Kulturen unter Verwendung von Identifizierungskarten für Anaerobier (ANI), für Gram-positive und Gram-negative Bakterien (GPI, GNI) sowie für eine Gruppe sog. Nicht-Fermentierer (NFC) auf die Verwertung verschiedenster Kohlenstoffquellen und anderer Stoffwechselreaktionen getestet.

2.10.2. Phänotypische Charakterisierung mit dem API 50 CHL-Testsystem

Mit dem API 50 CHL-Testsystem (bioMérieux, Nürtingen) wurden Reinkulturen, die aus Faecesproben isoliert worden waren, auf ihre Fähigkeit zur Fermentation von 49 verschiedenen Kohlenhydrate bzw. ihren Derivaten (Heteroside, Polyalkohole und Uronsäuren) untersucht. Bei diesem Test werden positive Fermentationsfähigkeiten durch Farbumschlag des Indikators Bromkresolpurpur angezeigt. Der Farbumschlag wird durch die Ansäuerung des Mediums bei Umsetzung eines Substrates hervorgerufen. Abweichend zu den Herstellerangaben erfolgte die Anzucht der Reinkulturen nicht ausschließlich auf MRS-Agar. So wurden Isolate, die nicht auf MRS-Agar kultivierbar waren, auf WCA-Agar angezogen. Die Stämme 111-35 und 111-13A wurden in 90 ml HA-Medium mit 10 mM Arabinose und 15 g/l Pepton kultiviert. Die Zellen wurden anaerob geerntet und dabei zweimal in 10 ml 50 mM KP-Puffer (2.7.) gewaschen. Das resultierende Pellet wurde anaerob in 2 ml KP-Puffer und 10 ml CHL-Medium aufgenommen. Diese Suspension wurde gleichmäßig auf die 50 API Microröhrchen des API 50 CHL-Systems verteilt. Zusätzlich zu der in der Arbeitsanleitung geforderten Überschichtung mit Paraffinöl erfolgte neben der Testvorbereitung auch die Inkubation strikt anaerober Mikroorganismen ausschließlich in der Anaerobierbox bei 37°C. Nach jeweils 8, 24 und 48 h wurden die Farbreaktionen abgelesen.

2.10.3. Charakterisierung mit dem API ZYM-Testsystem

Das API ZYM-Testsystem (bioMérieux, Nürtingen) dient dem semiquantitativen Nachweis von 19 enzymatischen Aktivitäten und wurde für die Stämme 111-13A und 111-35 verwendet. Dazu wurden entsprechend den Herstellerangaben Zellen von der Agaroberfläche abgenommen, in 0,9% Kochsalzlösung suspendiert und auf eine definierte Zelldichte gebracht. Diese Suspension wurde verwendet, um die Mikroröhrchen des Testsystems zu beimpfen. Nach vierstündiger Inkubation bei 37°C ließ sich die Reaktion ablesen und entsprechend den Herstellerangaben bewerten.

2.10.4. Fermentation von Kohlenhydraten

Zusätzlich zur Identifizierung im Vitek[®]-System bzw. mittels des API 50 CHL-Systems wurden Fermentationsversuche mit einigen isolierten Spezies durchgeführt. Dazu wurde HA-Medium mit den zu testenden Substraten supplementiert. Die Zugabe der Kohlenstoffquelle erfolgte aus anaeroben, sterilen Stammlösungen, die je nach Stabilität durch Autoklavieren oder Sterilfiltrieren hergestellt worden waren.

Getestet wurden folgende Kohlenhydrate: *N*-Acetyl-glucosamin, Amygdalin, L-Arabinose, D-Arabinose, Cellobiose, Fructooligosaccharide (Raftilose[®] P95, Orafti, Tienen, Belgien), Fructose, Galactose, D-Glucosamin, Glucose, Glycogen, Inositol, Inulin (Raftiline[®] HP, Orafti, Tienen, Belgien), Lactose, Lactulose, Maltose, Mannitol, Mannose, Melezitose, Melibiose, Raffinose, Rhamnose, Ribose, Saccharose, Salicin, Sorbitol, Stärke, Trehalose und D-Xylose. Die Endkonzentration lag je nach Kohlenstoffquelle bei 10 oder 20 mM bzw. bei den Polysacchariden bei 0,1%.

Die Medien wurden mit den zu untersuchenden Reinkulturen unter anoxischen Bedingungen inokuliert und bei 37°C inkubiert. Ein relativer Anstieg der OD₆₀₀, ein damit einhergehender Abfall des pH-Werts sowie die Bildung von H₂ im Vergleich zu Kontrollansätzen ohne Kohlenhydratzusatz wurde als Anzeichen von Wachstum sowie Fermentation der Kohlenstoffquelle gewertet.

2.10.5. Identifizierung der Isolate durch 16S rDNA-Sequenzanalyse

Für einige isolierte Stämme wurde die 16S rDNA (entsprechend den Positionen 30 bis 1521 des *E. coli* 16S rRNA-Gens) mittels PCR unter Benutzung von Primern für konservierte Bereich der DNA amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden entsprechend der Anleitung des Herstellers gereinigt ('Prep-A-Gene kit', Biorad, Hercules, USA) und direkt sequenziert (Taq dye-Deoxy terminator cycle sequencing kit, Applied Biosystems, Foster City, USA), wobei ein automatischer DNA-Sequenzierer (model 373, Applied Biosystems) benutzt wurde. Die phylogenetische Einordnung der Neuisolate erfolgte über die EMBL- und GenBank-Datenbanken unter Verwendung des Programms FASTA (DEVEREUX et al. 1984). Die Sequenzierung wurde im Labor von M.D. Collins (Reading, Großbritannien) durchgeführt.

2.10.6. Bestimmung des G+C-Gehaltes von genomischer DNA

Die Basenkomposition der DNA ausgewählter Neuisolate wurde mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC, Gynkotek, München) nach der Methode von MESBAH (1989) bestimmt, welche leicht modifiziert wurde (KAMLAGE, 1997). 10-25 µg der isolierten DNA wurden durch Zugabe von 0,5 Teilen einer 7,5 M Ammoniumacetat-Lösung und 2 Teilen eiskalten 95%igem Ethanol präzipitiert. Nach Zentrifugation ($4000 \times g$, 10 min, 4°C) wurde das Pellet in 80%igem Ethanol (v/v in H_2O_{dest}) gewaschen, bei 37°C getrocknet und in 5 µl TE-Puffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA) sowie 20 µl sterilem destilliertem Wasser gelöst. Anschließend erfolgte die Denaturierung der DNA in kochendem Wasser für 2 min, gefolgt von sofortiger Abkühlung in einem Eisbad. Durch Zugabe von 50 µl P1-Puffer (30 mM Natriumacetat, pH 5,3; 2 mM $ZnCl_2$; 1 U P1-Nuklease) wurde während einer Inkubation bei 37°C für 2 h einzelsträngige DNA in ihre Nukleotide zerlegt. Diese Nukleotide wurden durch Inkubation bei 37°C für 6 h in Anwesenheit von 10 µl Alkalischer Phosphatase (Roche, Mannheim), die zuvor mit 0,1 M Glycin-HCl (pH 10,4) auf 0,1 U/µl verdünnt worden war, dephosphoryliert.

Nach Zentrifugation ($4000 \times g$, 5 min, RT) wurde die Basenkomposition mittels HPLC bestimmt. Das HPLC-System war mit einem Diodenarraydetektor UVD 320, einem Entgaser ERC-5535, einer Pumpe Modell 480, einem Autosampler GINA 160, einem Kolonnenthermostaten STH 585 und einer C_{18} -Reverse Phase-Säule (RP18, Bischoff, Leonberg, 250 x 4,6 mm, 5 µm Partikelgröße) ausgestattet. Die Absorption der Nukleotide wurde bei 254 nm gemessen. Die Flußgeschwindigkeit betrug 0,8 ml/min bei einer Temperatur von 37°C. Die mobile Phase bestand aus 20 mM Triethylaminphosphat-Puffer (pH 5,1), der 8% (v/v) Methanol enthielt.

Die einzelnen Nukleotide wurden anhand ihrer Retentionszeit sowie der UV-Spektren identifiziert und im Vergleich zu einem DNA-Standard (Lambda DNA, 49,85 mol% G+C, Sigma, Deisenhofen) quantifiziert. Der G+C-Gehalt ergab sich mittels folgender Rechnung:

$$\text{mol\% G+C} = (G / (G + T)) \times 100$$

2.10.7. DNA-DNA-Hybridisierung

Die DNA-DNA-Hybridisierung wurde nach der Methode von JOHNSON (1994) durchgeführt. Dazu wurde genomische DNA in eiskaltem TE-Puffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0) auf 0,4 mg/ml verdünnt und mit einem Ultraschallprozessor (UP 200s, Dr. Hielscher) in etwa 200-600 bp große Fragmente zerlegt. Ein Teil der DNA wurde mittels eines DIG-Oligonukleotid-Tailing Kits (Roche, Mannheim) mit Digoxigenin (DIG) markiert. Die nicht markierte DNA wurde in verschiedenen Stufen auf eine Endkonzentration von 0,04 mg/ml mit TE-Puffer verdünnt. Je 1 µl der verschiedenen Verdünnungsstufen wurde mit 0,1 x Standard Saline Citrat-Puffer (SSC, s. u.) auf 50 µl aufgefüllt und bei 100°C im Wasserbad für 15 min denaturiert. Diese DNA-Lösungen wurden anschließend mittels eines Micro-Sample Filtrations-Minifold-Apparates (Schleicher & Schüll) unter Vakuum (etwa 10⁴ Pa, 15 min) auf eine positiv geladene Nylonmembran transferiert. Nach Lufttrocknung der Membran wurde die DNA auf der Membran immobilisiert (UV-Stratalinker, Stratagene, La Jotta, USA) und anschließend für 90 min in 10 ml Prähybridisierungslösung (s. u.) inkubiert.

Die Hybridisierung der immobilisierten DNA mit der denaturierten, DIG-markierten DNA erfolgte durch Inkubation bei 55°C über Nacht in 1 ml Hybridisierungslösung (s. u.). Nicht gebundene Sonde wurde durch zweimaliges Waschen mit Waschpuffer (30 min, 57°C) entfernt.

Prähybridisierungspuffer:	20 × SSC (s. u.)	28,1 ml
	Blocking-Reagenz (10%, w/v, Boehringer, Mannheim)	22,5 ml
	<i>N</i> -Laurylsarkosin (10%, w/v)	1125 µl
	SDS (10%, w/v)	225 µl
	H ₂ O _{dest}	ad 1000 ml

Hybridisierungslösung:	5 M NaCl	180 µl
	Blocking-Reagenz (10%, w/v)	400 µl
	N-Laurylsarkosin (10%, w/v)	10 µl
	SDS (10%, w/v)	1 µl
	1 M Tris/HCl, pH 7,5	20 µl
	DIG-markierte DNA	1 µl
	H ₂ O _{dest}	ad 1000 ml
Waschpuffer:	SDS (10%, w/v)	50 µl
	1 M Tris/HCl, pH 7,5	1 ml
	H ₂ O _{dest}	ad 50 ml
20 × SSC-Puffer:	NaCl	3 M
	Trinatrium-Citrat	0,3 M
		pH 7,0

Nach der Hybridisierung erfolgte eine Behandlung der Membran gemäß folgendem Protokoll:

- 1 min Maleinsäurepuffer (0,15 M NaCl, 0,1 M Maleinsäure, pH 7,5)
- 30 min Blocking-Lösung (1%, w/v, Blockingreagenz in Maleinsäurepuffer)
- 20 min Antikörperlösung (Anti-DIG-AP, Fab fragments, 0,75 U/µl, in Blocking-Lösung, 100 µl/l)
- 2 × 15 min Waschlösung (Tween 80 in Maleinsäurepuffer, 30 ml/l)
- 5 min Detektionslösung (0,1 M Tris/HCl, 0,1 M NaCl, 50 mM Mg₂Cl, pH 9,5)

Der Nachweis der DNA-DNA-Hybride erfolgte nach Herstellerangaben mit einem DIG-Lumineszenz-Detektionskit. Die DNA-DNA-Hybride wurden mittels eines Image Analysers (Fujifilm LAS-1000, Raytest, Straubenhardt) quantifiziert.

2.10.8. Rasterelektronenmikroskopie

Die Anfertigung der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen erfolgte nach GRUND et al. (1995) mit Unterstützung von Frau Eckert-Funke (FU Berlin). Sie wurden mit einem digitalen Rasterelektronenmikroskop DSM 950 (Zeiss, Hamburg) im Raster (SEM/20 kV)-Verfahren mit 74 μ A und in einem Abstand von 14 mm aufgenommen. Um eine deutliche Abbildung zu erreichen, wurden die Bakterien, sofern möglich, in einem Mineralmedium (bevorzugt HA-Medium) angezogen. Um die Bakteriendichte des Präparates zu erhöhen, wurden jeweils 2 ml Kultur zentrifugiert (4000 \times g, 10 min, 4°C), das erhaltene Pellet in 50 mM KP-Puffer (2.7.) gewaschen und durch Aufnahme in 250 μ l des gleichen Puffers konzentriert. Zur Sedimentation wurden 20-50 μ l der ausgewählten Bakterienkultur wiederholt auf Deckgläschen aufgetropft. Die sedimentierten Bakterien wurden mit 2,5% Glutaraldehyd in 1,65% $K_2Cr_2O_7$ für 1,5 h bei 4°C in einer feuchten Kammer fixiert. Anschließend wurde die Probe vorsichtig mit H_2O_{dest} gespült. Es folgte die Dehydrierung in einer ansteigenden Ethanolreihe (30%, 50%, 70%, 85%, 96%, v/v in H_2O_{dest}) für jeweils 2 x 15 min. Aus dem 96%igen Ethanol wurden die Proben für zwei Stunden direkt in 1,1,1,3,3,3-Hexamethyldisilazane (HMDS, Roth) umgebettet und danach 5 min unter dem Abzug getrocknet. Die Deckgläschen wurden mit beidseitig klebenden, Graphit-enthaltenden Polycarbonatfolien (Plano, Marburg) auf den Proben Tellern befestigt und mit einer Gold-Palladium-Schicht bei 40 mA für 110 Sekunden bedampft (SC 501 Emscope, Philips, Hamburg).

2.11. Fermentationsversuche mit wachsenden Zellen

Mit Ausnahme von WCA- und Stamm-Medium wurden die Kulturgefäße für die Fermentationsversuche mit wachsenden Zellen erst nach Begasung und Sterilisation mit dem entsprechenden Medium befüllt. In den Fermentationsversuchen mit Reinkulturen wurden verschiedenste Medien eingesetzt, denen folgende Substrate zugesetzt worden waren: L-Arabinose, Fructooligosaccharide (FOS, Raftilose[®] P95, Orafti), Glucose, Inulin (Raftiline[®] HP, Orafti), Lactulose oder Sorbitol. Die befüllten Röhren wurden mit Bakterienzellen einer exponentiell wachsenden Vorkultur beimpft (1% Inokulum, v/v). Die Proben wurden bei 37°C und 140 U/min auf einem

Schüttler (B. Braun Biotech, Melsungen) inkubiert. Während der Inkubation wurde die Entwicklung der H_2 -Konzentration, des pH-Wertes und das Wachstum mittels Messung der OD_{600} verfolgt. Mit einer N_2 gespülten Spritze wurden zu definierten Zeitpunkten Aliquots (1,0 - 2,0 ml) für die Analysen entnommen. Erfolgt die Analysen nicht sofort, so wurden die Proben bis zur weiteren Verwendung bei $-80^\circ C$ gelagert. Als Kontrollen dienten Ansätze ohne Substrat.

2.12. Fermentationsversuche mit Suspensionen von Faeces und Darminhalt

Fermentationsversuche mit Faeces oder Darminhalt wurden mit Proben durchgeführt, die von gnotobiotischen Ratten stammten (2.24.7.). Sie dienten im wesentlichen dem Nachweis von methanogener oder Sulfat-reduzierender Aktivität in diesem Material. Dazu wurden modifiziert nach MACZULAK et al. (1989) sterile, begaste Serumflaschen (148 ml), die mit Balchmedium 1 gefüllt waren, in eine Anaerobierbox (MK 3, dw scientific, Shipley, Großbritannien) überführt. Dort wurde das Medium 10%ig (w/v) mit Faeces bzw. Darminhalt inokuliert. Die Inkubation und Probennahme erfolgte wie unter 2.11. beschrieben. Als Kontrollen dienten Ansätze mit einer autoklavierter Faeces-Suspension ($121^\circ C$, 20 min).

Weiterhin wurden Faeces-Verdünnungen, wie in 2.9.1.2. dargestellt, in WCA-Medium mit BES, einem Inhibitor der Methylcoenzym M-Methylreduktase (SMITH, 1983) und Natriummolybdat, das die Adenosintriphosphat-Sulfurylase inaktiviert (TAYLOR & OREMLAND, 1979), inkubiert. Dadurch sollten zwei Möglichkeiten der H_2 -Nutzung, die Methanogenese und die dissimilatorischen Sulfatreduktion, verhindert werden, um *in vitro* die Faecesverdünnungsstufe mit der größten H_2 -Bildung ermitteln zu können.

2.13. Fermentationsversuche mit ruhenden Zellen

Für Versuche mit ruhenden Zellen wurden die Bakterien anaerob in 1000 ml-Serumflaschen (2.2.) über Nacht in ST-Medium angezogen. Die Zellernte erfolgte in der späten logarithmischen Wachstumsphase (2.7.). Die Versuche wurden in 148 ml-Serumflaschen unter den jeweils angegebenen Gasphasen durchgeführt.

Versuchspuffer, Substrate aus konzentrierten Stammlösungen und Zellen wurden mit Plastikspritzen oder Hamiltonspritzen (Hamilton, Bonaduz, Schweiz) zugegeben. Die Versuchsansätze (15 ml Endvolumen) wurden bei 37°C in einem Schüttelwasserbad (100 U/min, GFL 1092, Burgwedel) inkubiert. Als Versuchspuffer dienten 50 mM KP-Puffer (pH 7,0) unter N₂ oder N₂/CO₂ (80/20, v/v) mit 1 mg Resazurin/l Puffer. Als Reduktionsmittel wurde 5 mM DTT verwendet. Die Fermentation wurde mit Zugabe des Substrates gestartet. Proben von je 1 ml wurden zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen und 10 min zentrifugiert (15000 × g, 4°C) und anschließend die Überstände bis zur Bestimmung der Substrat- und Produktkonzentration (2.17. und 2.19.) bei -80°C eingefroren.

2.14. Markierung von Acetat mit NaH¹⁴CO₃

Caecuminhalt von Tieren, die mit acetogenen Bakterien diassoziiert worden waren (2.24.3.), wurde in Serumflaschen (148 ml Volumen) mit je 9 ml KP-Puffer (2.7.) und 2 µCi NaH¹⁴CO₃ unter einer Gasphase von N₂/CO₂ (80/20, v/v) bzw. H₂/CO₂ (80/20, v/v) inkubiert. Die spezifische Radioaktivität von NaH¹⁴CO₃ betrug 60 mCi/mmol. Der KP-Puffer wurde autoklaviert und 10%ig inokuliert. Unmittelbar nach der Inokulation wurde von jeder Suspension ein Aliquot (1 ml) zur Bestimmung der Anfangswerte genommen, und die Serumflaschen wurden anschließend bei 37°C bis zur Beendigung des Wachstums geschüttelt (200 U/min). Kulturen unter N₂/CO₂ (80/20) wurden bei Normaldruck inkubiert, wohingegen Kulturen unter H₂/CO₂ (80/20) einem Überdruck von 10⁵ Pa ausgesetzt waren.

2.14.1. Trennung von ¹⁴C-Acetat und ¹⁴CO₂

In den Suspensionen mit Caecuminhalt und NaH¹⁴CO₃ wurden die Produkte ¹⁴C-Acetat und ¹⁴CO₂ bestimmt. Das Prinzip dieser Methode beruht nach KAMLAGE (1994) auf einer Alkalisierung der Probe im noch gasdicht verschlossenen Kulturgefäß auf pH 11-12. Hierdurch kommt es zur Absorption von ¹⁴CO₂. Eine solche Alkalisierung wurde durch Zugabe von 33 ml Stop-Mix (0,2 M NaOH, 0,1 M Na-Acetat, 0,4 M Na₂CO₃) erreicht. Anschließend wurde die Probe zentrifugiert (5000 × g, 5 min, RT) und 0,3 ml des Überstandes mit 0,6 ml 0,15 M Ba(OH)₂

versetzt. Hierbei wurde $^{14}\text{CO}_3^{2-}$ als $\text{Ba}^{14}\text{CO}_3$ ausgefällt und konnte nach Zentrifugation ($10000 \times g$, 5 min, RT) im Pellet wiedergefunden werden. Der Überstand der Fällung enthielt ^{14}C -Acetat. Das Pellet wurde in 1 ml 0,1 M BaCl_2 suspendiert, gewaschen, nochmals zentrifugiert ($10000 \times g$, 5 min, RT) und abschließend in 0,2 ml 0,1 M BaCl_2 suspendiert. Die Effektivität der Methode wurde kontrolliert, indem Standards von ^{14}C -Acetat und $^{14}\text{CO}_2$ zusammen und getrennt nach dieser Methode behandelt wurden. Die einzelnen Substanzen wurden mit 94 - 98% Wiederfindungsrate in den entsprechenden Fraktionen gefunden. Die Proben wurden in 5 ml-Szintillationsgefäßen mit 1 ml Szintillationsflüssigkeit (Opti-Fluor, Canberra-Packard, Groningen, Niederlande) gut gemischt, und die Radioaktivität in einem Szintillationszähler (Beckmann LS 6000 LL, München) bestimmt. Ein ^{14}C -Standard wurde dazu vom Hersteller zur Verfügung gestellt.

2.15. Präparation von zellfreien Extrakten und Membranen

Für die Bestimmung der Hydrogenaseaktivität wurden subzelluläre Extrakte anaerob hergestellt. Die Präparation erfolgte bei 0 - 4°C. Für die Herstellung zellfreier Extrakte wurde anaerober KP-Puffer (50 mM, pH 7,0) mit 5 mM DTT und 1 mg Resazurin/l Puffer verwendet. Die anaerob geernteten und gewaschenen Zellen (2.7.) wurden in 1 ml Puffer/g Zellfeuchtgewicht resuspendiert, mit 20 µg DNase I versetzt und zweimal bei 130 MPa in einer vorgekühlten Frenchpresszelle (SLM Aminco, Urbana, USA) aufgeschlossen. Die Frenchpresse wurde in der Anaerobierbox gefüllt und das Lysat unter N_2 aufgefangen. Ganze Zellen und Zelltrümmer wurden anschließend durch Zentrifugation (15 min, $10000 \times g$, 4°C) entfernt. Bei der Membranpräparation schloß sich eine Zentrifugation des zellfreien Extraktes (90 min, $120\,000 \times g$, 4°C) in einer L7-65 Ultrazentrifuge (Beckmann, Palo Alto, Californien, USA) an. Der Überstand dieser Zentrifugation stellte die cytoplasmatische Fraktion dar, und die Membranen sedimentierten als gelatinöses Pellet. Sie wurden in 50 mM KP-Puffer (pH 7,0, 5 mM DTT, 1 mg Resazurin/l) suspendiert und erneut zentrifugiert (45 min, $120\,000 \times g$, 4°C). Dieser Waschschrift wurde so oft wiederholt, bis der Überstand farblos war. Im allgemeinen war dies nach zweimaligem Waschen der Fall. Die resultierenden Membranen wurden in 50 mM KP-Puffer (s. o.) aufgenommen, sofort verwendet oder bei -80°C gelagert.

2.16. Messung der Hydrogenaseaktivität

Die Hydrogenaseaktivität von zellfreien Extrakten und Membranen wurde anaerob unter H_2 mit Benzylviologen als Elektronenakzeptor gemessen. Der Testansatz in einer Küvette bestand aus 0,8 ml 50 mM KP-Puffer (pH 7,0; 5 mM DTT; 1 mg Resazurin/l Puffer) und 2 μ l Benzylviologen. Dieser anaerobe Enzymtest wurde in mit Gummistopfen verschlossenen 1,6-ml-Glasküvetten mit 1 cm Schichtdicke durchgeführt. Vor dem Test wurden die Küvetten für etwa 10 min mit H_2 durchgast und der anaerobe Puffer mit einer Plastikspritze zugefügt. 2 μ l Benzylviologen und nach Aufnahme der Grundlinie bei 578 nm auch 1-2 μ l zellfreier Extrakt bzw. Membranpräparat wurden mit Hamiltonspritzen (Hamilton, Bonaduz, Schweiz) zugefügt. Die Messungen erfolgten an einem Cary-Photometer (Cary 1E, Varian, Darmstadt) bei 578 nm. Die spezifische Enzymaktivität wurde aus dem linearen Bereich der Kinetik und der Proteinkonzentration nach folgender Beziehung berechnet:

$$\text{spezifische Aktivität (U)} = \frac{V \times \Delta E/\text{min}}{\varepsilon \times v \times d \times (\text{mg Protein/ml})}$$

U = Unit (1 U = 1 μ mol Substrat/min)

$\Delta E/\text{min}$ = Extinktionsänderung pro Minute

d = Schichtdicke der Küvette (1 cm)

ε = molarer Extinktionskoeffizient ($\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

V = Gesamtvolumen

v = Probevolumen

Als Extinktionskoeffizient für Benzylviologen (reduziert) wurde nach HEDDERICH et al. (1989) $\varepsilon_{578} = 8,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ verwendet. Dabei wurde berücksichtigt, daß es sich hierbei um einen Einelektronenüberträger handelt. Als Kontrolle wurden Tests unter N_2 durchgeführt und mit 1 ml H_2 gestartet.

2.17. Enzymatische Bestimmung von Substraten und Produkten

Die enzymatischen Bestimmungen von L-Arabinose, Ethanol, Formiat, Glucose, D-Lactat, L-Lactat, Lactulose, Sorbitol und Succinat erfolgten in Anlehnung an BERGMAYER (1984). Die Messungen wurden mit einem Photometer DU-640 (Beckman, München) durchgeführt.

2.17.1. Acetat

Die Acetatkonzentration wurde nach der Methode von DORN et al. (1978) bestimmt. In dieser Reaktion werden pro mol Acetat 2 mol NADH über folgende enzymatische Kopplung oxidiert:

(1) *Acetyl-CoA-Synthetase*: $\text{Acetat} + \text{ATP} + \text{CoA-SH} \rightarrow \text{Acetyl-CoA} + \text{AMP} + \text{PP}_i$

(2) *Myokinase*: $\text{ATP} + \text{AMP} \rightarrow 2 \text{ADP}$

(3) *Pyruvat-Kinase*: $2 \text{PEP} + 2 \text{ADP} \rightarrow 2 \text{Pyruvat} + 2 \text{ATP}$

(4) *Lactat-Dehydrogenase*: $2 \text{Pyruvat} + 2 \text{NADH} \rightarrow 2 \text{Lactat} + 2 \text{NAD}^+$

Der enzymatische Test setzte sich zusammen aus:

410 µl	Puffer:	100 mM Triethanolamin-HCl (TEA), pH 7,0
40 µl	Lösung 1:	1,5 mg/ml CoA-SH 1,2 mg/ml ATP 2,5 mg/ml NADH
25 µl	Lösung 2:	7,5 mg/ml KCl 7,4 mg/ml $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ 4,1 mg/ml PEP
10 µl	Enzymmix:	0,2 mg/ml <i>L-Lactat-Dehydrogenase</i> 0,2 mg/ml <i>Pyruvat-Kinase</i> 0,2 mg/ml <i>Myokinase</i> in 3,2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 6,8
5 µl	Probe, Standard oder $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$	(maximal 5 mM Acetat)

Lösung 1 wurde stets frisch angesetzt. Alle anderen Lösungen waren bei 4°C mehrere Wochen stabil. Vor der Messung wurden Puffer, Lösung 1, Lösung 2 und der Enzymmix in den entsprechenden Verhältnissen gemischt. Nach Zugabe der Proben wurde die Blindreaktion abgewartet, bevor die Extinktion E_1 bei 365 nm gegen Luft gemessen wurde. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 μl *Acetyl-CoA-Synthetase* (5 mg Lyophilisat/ml) in 0,1 M Triethanolamin-HCl (TEA), pH 8,0, gestartet. Nach 20 - 30 min Inkubation bei RT wurde E_2 bestimmt. Zur Berechnung der Acetatkonzentration in der Probe wurde folgende Formel verwendet:

$$c_{\text{Acetat}} \text{ (mM)} = \frac{(\Delta E_{\text{Probe}} - \Delta E_{\text{Leerwert}}) \times V}{\epsilon \times d \times v \times 2}$$

V = Testvolumen (500 μl)

ϵ = 3,4 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$

d = 1 cm

v = Probenvolumen (5 μl)

2.17.2. L-Arabinose

Reaktionsprinzip (β -D-Galactose-Dehydrogenase):



Bei einem pH von 8,6 im Enzym-Assay wird das Arabinolacton spontan zu L-Arabinonsäure hydrolysiert und die Reaktion läuft vollständig und irreversibel ab.

Der Testansatz in einer Küvette bestand aus:

830 μl Tris -Puffer (0,1 mM, pH 8,6)

100 μl NAD^+ -Lösung (5 mM)

50 μl Probe, Standard (2 mM) oder $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$

Der Inhalt wurde gründlich gemischt und E_1 bei 365 nm gemessen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 μl β -D-Galactose-Dehydrogenase (5 U/mg, Boehringer, Mannheim) gestartet. Nach wiederholter Mischung und Inkubation (RT, 45 min) wurde E_2 gemessen. Die Berechnung erfolgte nach folgender Formel:

$$C_{\text{Arabinose}} \text{ (mM)} = \frac{(\Delta E_{\text{Probe}} - \Delta E_{\text{Leerwert}}) \times V}{\varepsilon \times d \times v}$$

$$\Delta E_{\text{Probe}} = E_2 \text{ (Probe)} - E_1 \text{ (Probe)}$$

$$\Delta E_{\text{Leerwert}} = E_2 \text{ (H}_2\text{O}_{\text{bidest}}) - E_1 \text{ (H}_2\text{O}_{\text{bidest}})$$

V = Testvolumen (1000 μl)

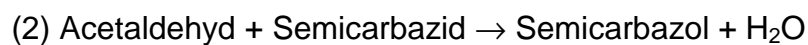
ε = molarer Extinktionskoeffizient : 3,4 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ für 365 nm

v = Probenvolumen (50 μl)

d = Schichtdicke (1 cm)

2.17.3. Ethanol

Reaktionsprinzip (*Alkohol-Dehydrogenase*):



Der Testansatz in einer Küvette bestand aus:

900 μl E-Puffer: 75 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$

75 mM Semicarbazid

21 mM Glycin

pH 9,0

50 μl NAD^+ - Na_2 -Lösung (13 mM)

50 μl Probe, $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ oder Standard (2 mM)

Die Küvetten wurden mit Parafilm verschlossen und E_1 bei 365 nm gemessen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 μl *Alkohol-Dehydrogenase* (8800 U/ml, Boehringer, Mannheim) gestartet. Es folgte eine 20-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Anschließend wurde E_2 bei 365 nm gemessen. Die Berechnung der Ethanolkonzentration erfolgte unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Werte für Testvolumen und Probenvolumen nach derselben Formel, die auch zur Berechnung der L-Arabinosekonzentration verwandt wurde (2.17.2.).

2.17.4. Formiat

Reaktionsprinzip (*Formiat-Dehydrogenase*): $\text{Formiat} + \text{NAD}^+ \rightarrow \text{CO}_2 + \text{NADH} + \text{H}^+$

Da die Umsetzung nicht quantitativ erfolgt, wurde die Formiatkonzentration über eine Eichgerade bestimmt. Der Testansatz in einer Küvette bestand aus:

- 25 μl Probe, $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ oder Standard
- 167 μl NAD^+ - Na_2 -Lösung (42 mM)
- 333 μl Kaliumphosphatpuffer (0,15 M, pH 7,5)
- 467 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$

Der Inhalt wurde gemischt und E_1 bei 365 nm gemessen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 17 μl *Formiat-Dehydrogenase* (20 U/ml, Sigma, Deisenhofen) gestartet. Es folgte eine 40-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Anschließend wurde E_2 gemessen. Die Berechnung erfolgte aus $\Delta E_{\text{Probe}} - \Delta E_{\text{Leerwert}}$. Dabei war $\Delta E = E_2 - E_1$. Beim Leerwert wurde das Probenvolumen durch $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ ersetzt.

2.17.5. Glucose

Reaktionsprinzip:

(1) *Hexokinase*: $\text{Glucose} + \text{ATP} \rightarrow \text{Glucose-6-phosphat} + \text{ADP}$

(2) *Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase*: $\text{Glucose-6-phosphat} + \text{NADP}^+ \rightarrow$
 $\text{Gluconat-6-phosphat} + \text{NADPH} + \text{H}^+$

Der Testansatz in einer Küvette bestand aus:

- 750 μl Testlösung (s. u.)
- 25 μl Probe, Standard (2 mM) oder $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$

Der Inhalt wurde gemischt und E_1 bei 365 nm gemessen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 7,5 μl Enzymlösung (Boehringer, Mannheim) gestartet. Die Enzymlösung enthielt 100 U/ml *Hexokinase*, 180 U/ml *Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase* und 0,1 M MgSO_4 in einer 50%igen wässrigen Glycerollösung. Es folgte eine 20-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Anschließend wurde E_2 gemessen. Die

Berechnung der Glucosekonzentration erfolgte unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Volumina V (782,5 μl) und v (25 μl) nach derselben Formel, die auch zur Berechnung der L-Arabinosekonzentration verwandt wurde (2.17.2.).

Die Testlösung setzte sich zusammen aus:

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	483 mg	(70 mM)
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	49,3 mg	(4 mM)
$\text{ATP-Na}_2\text{H}_2 \times 3 \text{H}_2\text{O}$	48,4 mg	(1,6 mM)
NADP-Na_2	63 mg	(1,6 mM)

Die Substanzen wurden in 40 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ gelöst, der pH-Wert wurde mit NaOH (1 N) auf 7,7 eingestellt und mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ auf 50 ml aufgefüllt.

2.17.6. D-Lactat und L-Lactat

Reaktionsprinzip: Lactat wird durch NAD^+ in Anwesenheit von *Lactat-Dehydrogenase* zu Pyruvat oxidiert. Das Gleichgewicht dieser Reaktion liegt jedoch stark auf der Seite vom Lactat. Um das Lactat vollständig umzusetzen, wird das gebildete Pyruvat im Alkalischen (pH 9,0) mit Hydrazin zu einem Semicarbazin umgesetzt.

Der Testansatz in einer Küvette bestand aus:

- 960 μl Puffer (0,5 M Glycin, 0,4 M Hydrazinsulfat, pH 9,0)
- 20 μl NAD^+ - Na_2 -Lösung (139,5 mM)
- 10 μl Probe, $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ oder Standard (2,5 mM)

Der Inhalt wurde gemischt und E_1 bei 365 nm gemessen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 μl *L-Lactat-Dehydrogenase* (2750 U/ml, Boehringer, Mannheim) oder 10 μl *D-Lactat-Dehydrogenase* (1500 U/ml, Boehringer, Mannheim) gestartet. Es folgte eine 30-minütige Inkubation bei 37°C. Anschließend wurde E_2 gemessen. Die Berechnung der Lactatkonzentration erfolgte unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Volumina V (1000 μl) und v (10 μl) nach derselben Formel, die auch zur Berechnung der L-Arabinosekonzentration verwandt wurde (2.17.2.).

2.17.7. Lactulose

Reaktionsprinzip:

- (1) *β -Galactosidase*: $\text{Lactulose} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{D-Galactose} + \text{D-Fructose}$
- (2) *Hexokinase*: $\text{D-Fructose} + \text{ATP} \rightarrow \text{Fructose-6-phosphat} + \text{ADP}$
- (3) *Phosphoglucose-Isomerase*: $\text{Fructose-6-phosphat} \rightarrow \text{Glucose-6-phosphat}$
- (4) *Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase*: $\text{Glucose-6-phosphat} + \text{NADP}^+ \rightarrow$
Gluconat-6-phosphat + NADPH + H⁺

Der Testansatz in einer Küvette bestand aus:

67 μl Citrat-Lösung (pH 6,6):	10,5 g Zitronensäure
	4,4 g NaOH
	ad 500 ml H ₂ O _{dest}
17 μl <i>β-Galactosidase</i> (59 U / ml)	
33 μl Probe, H ₂ O _{bidest} oder Standard	

Nach der Mischung und Inkubation für 2 h bei 37°C wurde dem Ansatz folgende Lösung zugesetzt:

333 μl Lösung 1:	70 mM NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O
	4 mM MgSO ₄ x 7 H ₂ O
	1,6 mM ATP-Na ₂ H ₂ x 3 H ₂ O
	1,6 mM NADP-Na ₂
633 μl H ₂ O _{bidest}	

E₁ bei 365 nm wurde nach Durchmischung des Ansatzes gemessen. Nach Zugabe von 7 μl Enzymmischung (286 U *Hexokinase*/ml; 143 U *Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase*/ml, Boehringer), Mischung des Ansatzes und Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur wurde E₂ bei 365 nm gemessen. Nach Zugabe von 7 μl *Phosphoglucose-Isomerase* (700 U/ml, Boehringer), Mischung und Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur wurde E₃ gemessen. Die Berechnung von $\Delta E = \Delta E_{\text{Probe}} - \Delta E_{\text{Leerwert}}$ erfolgte durch Ermittlung von ΔE_{Probe} und $\Delta E_{\text{Leerwert}}$ nach folgendem

Prinzip: ΔE_{Probe} bzw. $\Delta E_{\text{Leerwert}} = \Delta E_3 - (\Delta E_2 - \Delta E_1)$. Die Konzentration von Lactulose in den Proben wurde anhand einer Eichgerade ermittelt.

2.17.8. D-Sorbitol

Reaktionsprinzip (*Sorbitol-Dehydrogenase*):



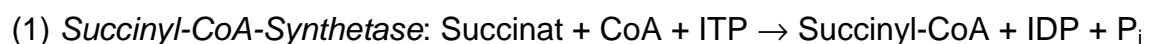
Nur im alkalischen Bereich liegt das Reaktionsgleichgewicht auf der Seite der Fructose. Der Testansatz in einer Küvette bestand aus:

- 667 μl Glycin-Puffer (0,1 M, pH 9,5)
- 33 μl $\beta\text{-NAD}^+$ -Lösung (27 mM)
- 333 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$
- 30 μl Probe, $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ oder Standard (max. 2,5 mM)

E_1 wurde bei 365 nm bestimmt, sobald die Extinktion konstant blieb. Durch die Zugabe von 7 μl *Sorbitol-Dehydrogenase* (240 U/ml) wurde die Reaktion gestartet. Nach Inkubation bei 37°C für 30 min wurde E_2 gemessen. Die Berechnung der Sorbitolkonzentration erfolgte unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Volumina V (1070 μl) und v (30 μl) nach derselben Formel (2.17.2.), die auch zur Berechnung der L-Arabinosekonzentration verwandt wurde.

2.17.9. Succinat

Reaktionsprinzip:



Der Testansatz in einer Küvette bestand aus:

250 μl Glycylglycinpuffer (300 mM Glycylglycin, 40 mM MgSO_4 , pH 8,4)

25 μl NADH (9 mM)

25 μl Coenzym-Mix: 30 mg Coenzym A (Sigma, Deisenhofen)

30 mg Inosintri-phosphat (Sigma, Deisenhofen)

30 mg Phosphoenolpyruvat (Biomol, Hamburg)

ad 3 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$

12,5 μl Enzym-Mix: *Pyruvat-Kinase*

(600 U/ml, Boehringer, Mannheim)

Lactat-Dehydrogenase

(550 U/min, Boehringer, Mannheim)

100 μl Probe, Standard (2 mM Succinat) oder $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$

375 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$

Der Küvetteninhalt wurde gemischt und die Extinktion E_1 bei 365 nm bestimmt. Durch Zugabe von 5 μl *Succinyl-CoA-Synthetase* 48 U/ml (Boehringer, Mannheim) wurde die Reaktion gestartet. Die Proben wurden 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde E_2 gemessen. Die Berechnung der Succinatkonzentration erfolgte unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Volumina V (787,5 μl), v (100 μl) und folgender Modifikation nach derselben Formel, die auch zur Berechnung der L-Arabinosekonzentration verwandt wurde (2.17.2.):

$$\Delta E = \Delta E_{\text{Probe}} - \Delta E_{\text{Leerwert}}$$

$$\Delta E_{\text{Probe}} = E_1 (\text{Probe}) - E_2 (\text{Probe})$$

$$\Delta E_{\text{Leerwert}} = E_1 (\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}) - E_2 (\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}})$$

2.18. Sulfidbestimmung

Die Sulfidkonzentrationen im Kulturmedium bzw. in Faecesproben wurde nach CLINE (1969) bestimmt. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der initialen Oxidation von *N,N*-Dimethyl-*p*-phenylendiammonium-dichlorid-Monomeren (DMPD), die unter Abspaltung eines Amins ein Diamer bilden, das über ein Stickstoffatom verbunden ist (BUDD & BEWICK, 1952). In dieses Diamer wird der Sulfidschwefel in

Form einer Sulfidbindung zwischen den Monomeren eingebaut, woraus die Bildung eines Phenoxazins resultiert. Diese Verbindung wird letztendlich zu Methylenblau umgewandelt, welches photometrisch bei 550 nm erfaßt werden kann.

Testreagenz: DMPD	1 g
FeCl ₃ × 6 H ₂ O	1,5 g
20%ige Salzsäure	ad 50 ml

Der Testansatz bestand aus 1 ml Probe bzw. Standard und 80 µl Testreagenz und wurde nach gründlicher Mischung 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor die Extinktion bei 550 nm gemessen wurde. Die gesamte Probenaufarbeitung wurde in einer Anaerobierbox durchgeführt. Die Berechnung der Sulfidkonzentration erfolgte anhand einer Eichgeraden.

2.19. Gaschromatographie (GC)

2.19.1. Bestimmung kurzkettiger Fettsäuren

Die bei der bakteriellen Fermentation gebildeten kurzkettigen Fettsäuren Essig-, Propion-, Butter-, Valerian- und Isovaleriansäure wurden gaschromatographisch nachgewiesen. Die Messung erfolgte in einem HP 5890 series II Gaschromatographen (Hewlett-Packard, Waldbronn) ausgestattet mit einer Carbowax-Säule (HP-20M, Carbowax 20M, 25 m x 32 mm x 0,3 µm Filmdicke, Hewlett-Packard, Waldbronn) und einem Flammenionisationsdetektor (FID). Als Trägergas diente Helium mit einer Flußrate von 1 ml/min. Die Temperatur des Injektors und des Detektors betrug 200°C. Der Split war auf 1:10 eingestellt. Es wurde folgendes Temperaturprogramm verwendet.

Zeit [min]	Temperatur [°C]	Rate
0	75	
1	75	
2,25	100	20°C/min
12,25	150	5°C/min
15,25	150	

Zur Bestimmung der Konzentration der kurzkettigen Fettsäuren aus Kulturmedium wurde dieses wie bei der Zellernte beschrieben (2.7.) zentrifugiert. Faecesproben wurden vor der Analyse 1:5 mit H₂O_{dest} verdünnt und anschließend zentrifugiert (19800 × g, 10 min, RT). Zu 200 µl-Aliquots der jeweiligen Überstände wurden folgende Reagenzien hinzugefügt:

- 23,6 µl 12 mM Isobuttersäure (Interner Standard)
- 280 µl 0,36 M HClO₄
- 270 µl 1 M NaOH

Diese Mischung wurde bei -80°C eingefroren und lyophilisiert (Alpha 2-4, Christ, Osterode). Das Lyophilisat wurde anschließend in 400 µl Aceton und 100 µl 5 M Ameisensäure aufgenommen. Nach Zentrifugation (4000 x g, 5 min, RT) wurde der Überstand für die GC eingesetzt. Das Injektionsvolumen betrug jeweils 1 µl. Die Identifizierung und Quantifizierung erfolgte über die Retentionszeit und den Vergleich mit externen und internen Standards (WSFA-2, Supleco, USA).

2.19.2. Bestimmung von Wasserstoff

Wasserstoff wurde mittels eines HP 6890 series II Gaschromatographen (Hewlett-Packard, Waldbronn) mit einer Molekularsieb-Säule (HP-19091P-MS4-Molekularsieb-5A-Kapillarsäule, 30 m x 0,32 mm x 12 µm Filmdicke, Hewlett-Packard, Waldbronn) und einem Wärmeleitfähigkeitsdetektor (WLD) gemessen. N₂ wurde als Trägergas mit einem Fluß von 1 ml/min verwendet. Die Temperatur des Säulenofens betrug 40°C, die des Detektors 205°C. Der Split war auf 1:10 eingestellt, und das Injektionsvolumen betrug bei niedrigen Wasserstoffkonzentrationen (<3%, v/v)

500 µl. Für höhere Wasserstoffkonzentrationen wurde das Injektionsvolumen auf 100 µl reduziert. Dieses wurde mittels einer Spritze direkt aus dem Gasraum der Kulturröhrchen entnommen. Die Identifizierung und Quantifizierung erfolgte über externe Standards. Die Retentionszeit betrug 2,5 min. Für beide Injektionsvolumina wurden entsprechende Eichgeraden angelegt und periodisch überprüft. Bei Überdruck in den Kulturröhrchen wurde das Volumen des gebildeten Gases mittels einer leichtgängigen Spritze, die durch das Septum durchgestochen wurde, bestimmt und bei der Berechnung des gebildeten Wasserstoffes berücksichtigt.

2.19.3. Bestimmung von Methan

Die Bestimmung von Methan erfolgte an dem GC, der auch für die Detektion von Wasserstoff eingesetzt wurde (2.19.2.). Dieser ist neben dem WLD auch mit einem Flammenionisationsdetektor (FID) ausgerüstet. Als stationäre Phase diente in diesem Fall eine Phenylmethylsiloxan-Kapillarsäule (HP-19091J-433 Kapillarsäule, 5% Phenylmethylsiloxan, 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm Filmdicke; Hewlett-Packard, Waldbronn). Als Trägergas wurde N₂ mit einem Fluß von 7,2 ml/min verwendet. Die Temperatur des Säulenofens lag bei 40°C, die des Detektors bei 250°C. Die Flußgeschwindigkeit am Detektor betrug für H₂ 42 ml/min, für Druckluft 280 ml/min und für Stickstoff 5 ml/min. Der Split war auf 1:10 eingestellt und das Injektionsvolumen betrug 0,5 ml. Das Gas wurde direkt aus dem Gasraum der Kulturgefäße entnommen. Die Identifizierung und Quantifizierung erfolgte über externe Standards und die Retentionszeit betrug 3,34 min.

2.20. Bestimmung von Aminosäuren

Die Bestimmung der Konzentration von 18 Aminosäuren im Kulturüberstand erfolgte nach PETZKE et al. (1992) am Aminosäure-Analysator LC3000 (Biotronik, Maintal). Die Aminosäuren wurden bei einer gleichmäßigen Flußgeschwindigkeit von 0,2 ml/min über einen Kationenaustauscher (BTC 2410, 4 µm; 125 mm x 4 mm) durch gezielte Erhöhung des pH-Wertes, der Ionenstärke (Li⁺) und der Temperatur getrennt (Tab. 2.2). Anschließend erfolgte die chemische Umsetzung der getrennten

Aminosäuren mit Ninhydrin bei 130°C. Diese Derivate wurden photometrisch detektiert sowie über externe Standards (physiologischer Berson-Kalibrierungsstandard, Eppendorf & Biotronik, Hamburg) identifiziert und quantifiziert.

Tabelle 2.2 Temperaturprogramm und pH-Werterhöhung zur Trennung von Aminosäuren mittels des Aminosäure-Analysators LC3000

Zeit (min)	Temperatur (°C)	pH
14	33	2,85
17	33	2,85
28,5	34	3,30
6	36	4,25
10	40	4,25
5,5	46	4,25
10	50	8,00
13	54	8,00
16	60	10,30
5	70	10,30

2.21. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte mit dem BioRad[®]-Proteinassay (BioRad[®], München). Der Assay beruht auf dem Prinzip der Proteinbestimmung nach BRADFORD (1976), bei dem verschiedene Proteinkonzentrationen durch Bindung an einen Farbstoff zu proportionalen Farbveränderungen führen. Das eingesetzte Coomassie-Brilliantblau G-250 hat in seiner an Protein gebundenen Form ein Absorptionsmaximum bei 595 nm. Als Standard wurde Ovalbumin (1 mg/ml, Grade V, Sigma, Deisenhofen) verwendet. Die Proteinbestimmung wurde nach den Herstellerangaben durchgeführt und ermöglichte die Konzentrationsbestimmung im linearen Bereich einer Ovalbumin-Eichgerade von 1-25 µg Protein/ml (Microassay) bzw. 0,2-1,4 mg/ml (Standardassay).

2.22. Entwicklung und Validierung von Oligonukleotidsonden

Für die Entwicklung einer spezifischen Sonde für ausgewählte Bakterienstämme wurde das Software-Paket ARB benutzt (STRUNK & LUDWIG, 1996). Die Sondensequenz wurde so gewählt, daß ihr GC-Gehalt mindestens 50% betrug. Die Sondensequenz wurde auf ihre theoretische Spezifität mit den Datenbanken vom European Molecular Biology Laboratory (EMBL) und des Ribosomal Database Projects (RDP, MAIDAK et al., 1999) verglichen. Weiterhin wurde die Spezifität der Sonde für die Stämme durch *in situ*-Hybridisierung (3.7.1.) validiert. Die Bezeichnung der Spezies-spezifischen Sonde erfolgte nach dem von der Oligonucleotide Probe Database (OPD; ALM et al., 1996) vorgeschlagenen Modus. Die Sonden wurden von der Firma Interactiva (Ulm) bezogen und waren am 5'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff Indocarbocyanin (Cy3) markiert, dessen Emissionsmaximum im orange-roten Bereich (565 nm) liegt.

2.23. Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH)

Zum Nachweis von Bakterien in Faeces und in Mischkulturen mittels *in situ*-Hybridisierung wurden Oligonukleotidsonden (Interaktiva, Ulm), welche in Tabelle 2.3 aufgelistet sind und ebenfalls mit Cy3 markiert waren (2.22.), eingesetzt.

Tabelle 2.3 Liste der für die FISH eingesetzten Oligonukleotidsonden

Sondenname	Sequenz (5'-3')	Referenz
Eub338	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	AMANN et al. (1990)
Eub927	ACCGCTTGTGCGGGCCC	GIOVANNONI et al. (1988)
Eub785	CTACCAGGGTATCTAATCC	LEE et al. (1993)
Eub1055	CACGAGCTGACGACAGCCAT	LEE et al. (1993)
Eub1088	GCTCGTTGCGGGACTTAACC	LEE et al. (1993)

Die in Tabelle 2.3 aufgelisteten 5 Oligonukleotidsonden wurden nach KLEESSEN et al. (1999) für den Einsatz in Faeces in äquimolaren Mengen gemischt. Diese Mischung wird im Folgenden als Eub-mix bezeichnet.

2.23.1. Zellfixierung von Reinkulturen

Die für die FISH eingesetzten Zellen wurden fixiert, um die ribosomale RNA für die Oligonukleotidsonden zugänglich zu machen und um gleichzeitig die Zellmorphologie zu erhalten. Hierbei wurden zwei Methoden angewandt, die sich nach der Gram-Reaktion der zu fixierenden Zellen richteten. Die Gram-positiven Zellen wurden mit Ethanol und die Gram-negativen mit Formaldehyd und Ethanol fixiert.

Auf Columbia-Blut- oder Stammedium-Agar angezüchtete Bakterien wurden in 2 ml PBS-Puffer (s. u.) bis zu einer Zelldichte von etwa 9×10^8 Zellen/ml suspendiert. Nach Zentrifugation ($4000 \times g$, 3 min, 4°C) wurde das Zellpellet in 1 ml PBS-Puffer gewaschen und in 300 μl PBS-Puffer aufgenommen.

Ethanolfixierung nach ROLLER et al. (1994)

Für die Ethanolfixierung wurden zu den in 300 μl PBS-Puffer aufgenommenen Zellen 300 μl 96%iges (v/v) Ethanol, das bei -20°C gelagert wurde, gegeben und diese Suspension für mindestens 24 h bei -20°C eingefroren.

Formaldehydfixierung nach AMANN et al. (1990)

Zu den in 300 μl PBS-Puffer aufgenommenen Zellen (s. o.) wurden 900 μl eines Paraformaldehyd-Puffers (s. u.) gegeben und mindestens 4 h bei 4°C inkubiert. Nach der folgenden Zentrifugation ($4000 \times g$, 3 min, 4°C) wurde das Pellet in 1 ml PBS-Puffer resuspendiert und erneut zentrifugiert. Abschließend wurde das Pellet in 300 μl PBS-Puffer resuspendiert, mit 300 μl eiskaltem, 96%igem (v/v) Ethanol vermischt und für mindestens 24 h bei -20°C eingefroren.

PBS-Puffer:	NaCl	8 g
	Na_2HPO_4	1,44 g
	NaH_2PO_4	0,24 g
	H_2O	ad 1000 ml
		pH 7,4

Herstellung des Paraformaldehyd-Puffers

In 30 ml auf 60°C erwärmtem $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ wurden 2 g Paraformaldehyd unter Zusatz von 2 N NaOH gelöst. Anschließend erfolgte die Zugabe von 16,6 ml dreifach konzentriertem PBS-Puffer. Der pH-Wert wurde auf 7,2 eingestellt und die Lösung auf 50 ml mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ aufgefüllt, sterilfiltriert und bei 4°C für maximal 24 h gelagert.

2.23.2. Fixierung von Faeces

Aliquots (mindestens 50 mg) von frischen Faeces wurden im Verhältnis 1:10 (w/v) in PBS-Puffer aufgenommen und für die Ethanolfixierung mit 1 Volumenanteil eiskaltem absolutem Ethanol vermischt oder für die Paraformaldehydfixierung mit 3 Volumenanteilen Paraformaldehyd-Puffer vermischt. Das weitere Verfahren ist unter 2.23.1. beschrieben.

2.23.3. Silanisierung von Objektträgern für die *in situ*-Hybridisierung

Für die *in situ*-Hybridisierung (2.23.4.) wurden Objektträger der Firma Marienfeld (Bad Mergentheim) verwendet. Diese waren mit Teflon oder schwarzem Epoxidharz beschichtet und hatten 8 Aussparungen mit einem Durchmesser von je 6 mm. Die Objektträger wurden nach MADDIX et al. (1987) vor Gebrauch mit 3-Aminopropyltriethoxysilan (APES) behandelt. Diese Silanisierung führt zu einer verbesserten Haftung der Zellen an der Objektträgeroberfläche. Hierfür wurden die Objektträger über Nacht bei Raumtemperatur in 70% (v/v) Ethanol gelagert, 1 h bei 60°C in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ gewaschen, kurz mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ abgespült und über Nacht bei 60°C getrocknet. Anschließend wurden die Objektträger für 7 s in 2% APES (v/v, in Methanol), für 5 min in 96%iges Methanol und für 5 min in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ getaucht. Nach dem Trocknen bei 37°C wurden die so silanierten Objektträger staubfrei gelagert.

2.23.4. Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung auf Objektträgern

Jeweils ein Aliquot der Suspensionen fixierter Zellen (2.23.1. und 2.23.2.) wurden auf eine Aussparung des silanisierten Objektträgers (2.23.3.) getropft. Bei Reinkulturen wurden hierfür 3 µl der Zellsuspension mit 10 µl 1 x PBS-Puffer (2.23.1.) vermischt, bei Faeces-Suspensionen wurden direkt 10 µl der Suspension aufgetragen. Der Objektträger wurde für 15 min bei 46°C getrocknet und anschließend für jeweils 3 min in einer aufsteigenden Ethanolreihe (60%, 80%, 96%, v/v) dehydratisiert. Nach Lufttrocknung wurden auf die Bereiche mit den fixierten Zellen 10 µl Hybridisierungspuffer (s. u.) und 1 - 2 µl der jeweiligen, mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Oligonukleotidsonde gegeben. Der Objektträger wurde über Nacht bei der sondenspezifischen Temperatur im Hybridisierungssofen in einer feuchten Kammer inkubiert. Zum Entfernen nicht gebundener Sonden wurde der Objektträger kurz mit 2 ml des vorgewärmten Waschpuffers (s. u.) abgespült und anschließend für 20 min bei einer Temperatur, die um 2°C höher lag als die Hybridisierungstemperatur, mit Waschpuffer gewaschen. Um das Ausbleichen der Fluoreszenz („bleaching“) zu verzögern, wurde der gewaschene Objektträger kurz mit H₂O_{bidest} gespült und für 10 min bei RT in der SlowFade[®] Antifade-Lösung (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) nach den Angaben des Herstellers inkubiert. Die mit den Sonden markierten Bakterienzellen wurden fluoreszenzmikroskopisch betrachtet (2.23.5.).

Falls notwendig wurde zur Verbesserung der Fluoreszenzintensität die Permeabilität der Zellwände nach Dehydratisierung in der Ethanolreihe durch den Einsatz von Lysozym erhöht (KENZAKA et al., 1998). Dabei wurden 15 µl einer Lysozymlösung (0,5 mg Lysozym/ml in 100 mM Tris/HCl, 50 mM EDTA; pH 8,2) pro Aussparung aufgetragen und 7 min bei 4°C inkubiert. Nach der Enzymbehandlung wurden die Objektträger mit H₂O_{bidest} abgespült und erneut in der o. g. Ethanolreihe dehydratisiert.

Um die Stringenz der Hybridisierung zu erhöhen, wurde wie im folgenden dargestellt dem Hybridisierungspuffer Formamid in unterschiedlichen Konzentrationen (X₁, s. u.) zugesetzt, und gleichzeitig wurde im Waschpuffer die Konzentration (X₂, s. u.) an NaCl erniedrigt.

Hybridisierungspuffer	Formamid	X_1 (0-55) % (v/v)
	5 M NaCl	180 ml
	1M Tris/HCl, pH 7,4	20 ml
	SDS (10%, w/v)	1 ml
	H ₂ O _{dest}	ad 1000 ml
Waschpuffer	5 M NaCl	X_2 (2-180) ml
	1M Tris/HCl, pH 7,4	20 ml
	SDS (10%, w/v)	1 ml
	H ₂ O _{dest}	ad 1000 ml

Verhältnis von Formamid- und NaCl-Konzentrationen (X_1 , X_2):

% Formamid im Hybridisierungspuffer	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55
ml NaCl (5 M) im Waschpuffer	180	126	90	63,6	43	29,8	20,4	14	9,2	6	3,6	2

Ab einer 20%igen Formamidkonzentration wurden zum Waschpuffer noch 10 ml einer 0,5 M EDTA-Lösung hinzugefügt.

2.23.5. Fluoreszenzmikroskopie

Für die Quantifizierung von Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie wurde ein Optiphot-2 Mikroskop (Nikon, Düsseldorf) oder ein Axioplan 2 Mikroskop (Zeiss, Jena), ausgestattet mit verschiedenen Filterblöcken für die Fluoreszenzmikroskopie, eingesetzt. Die Auszählung erfolgte bei 1000facher Gesamtvergrößerung mit Hilfe eines Zählokulars (10 × 10 Teilfelder). Zur statistischen Absicherung der Zählergebnisse wurden jeweils zweimal 25 Zählquadrate für je zwei Verdünnungen einer Zellsuspension ausgezählt. Die so ermittelten Zellzahlen aus Faeces wurden stets auf das Trockengewicht des eingesetzten Materials bezogen.

Zur Dokumentation von fluoreszenz-markierten Bakterien wurde entweder die fotografische Einheit (Nikon FX-35DX) des Optiphot-2 oder die Kamera (SensiCam[®],

PCO, Kelheim) des Axioplan-2 (Zeiss, Jena) genutzt, welches ebenfalls mit einer Reihe von Fluoreszenzfiltern ausgestattet war. Diese Bilder wurden anschließend mit dem Software-Paket KS400 (Zeiss, Jena) bearbeitet. Für die Berechnung der Zellzahl ergab sich folgende Formel:

$$Gz = Zz \times F_V \times F_{Vol} \times F_M$$

Gz = Gesamtzellzahl (ml^{-1})

Zz = Zellzahl pro Zählfeld

F_V = Verdünnungsfaktor der eingesetzten Probe

F_{Vol} = Volumenfaktor (ml^{-1} ; beschreibt das pro Milliliter Probe auf den Objektträger aufgetragene Probevolumen)

F_M = Mikroskopfaktor

Der Mikroskopfaktor (F_M), definiert sich als die Fläche der gesamten Aussparung ($28,27 \text{ mm}^2$) auf dem Objektträger, dividiert durch die im Mikroskop sichtbare Feldfläche. Während die Gesamtfläche konstant blieb, variierte die Fläche der 25 Felder optisch bedingt durch das eingesetzte Mikroskop. Für das Zeiss Axioplan betrug die Fläche eines Feldes $0,0056 \text{ mm}^2$ und für das Optiphot-2 $0,0064 \text{ mm}^2$.

2.24. *In vivo*- Studien mit gnotobiotischen Ratten

In einem gnotobiotischen Rattenmodell wurde die intestinale H_2 -Produktion und H_2 -Nutzung durch verschiedene mikrobielle Populationen untersucht.

2.24.1. Durchführung gnotobiotischer Tierhaltung

Die Grundlagen der gnotobiotischer Tierhaltung sind bei COATES & GUSTAFSSON (1984) beschrieben. Im folgenden werden in Kürze nur die prinzipielle Funktion und die speziellen technisch-konstruktiven Daten der verwendeten gnotobiotischen Einrichtung beschrieben. Gnotobiotische Ratten werden nach ihrer keimfreien Gewinnung durch Hysterektomie, Hysterotomie oder Geburt von ebenfalls

gnotobiotischen Eltern mittels keimfreier Technik kontinuierlich unter Isolatorbedingungen aufgezogen und gehalten. Ihr mikrobiologischer Status ist somit jederzeit exakt definiert. Primär keimfreie Tiere lassen sich kontrolliert mit definierten Mikroorganismen einer oder mehrerer Arten in Kontakt bringen. Sie werden folglich als mono-, di- bzw. polyassoziierte Tiere bezeichnet. Auf diese Art und Weise kann man unter anderem den Einfluß bestimmter Mikroorganismen auf den Metabolismus einer Substanz im Versuchstier unter mikrobiologisch definierten Bedingungen untersuchen.

Die Isolatoren (Metall & Plastik, Radolfzell) bestanden aus einer auf einem Metallgerüst befestigten dichten Kunststoffhülle. Diese Hülle hatte zwei Zugänge, über die sterile Luft zu- bzw. abgeführt wurde. Im Isolator selber herrschte ein Überdruck, so daß auch im Falle von Beschädigungen das Eindringen von Außenluft und das Auftreten von Kontaminationen erschwert war. Weiterhin befand sich im Boden ein Tauchtank, der mit einer 5%igen Chloramin-Lösung (w/v in H_2O_{dest}) gefüllt war und durch den Material steril eingeschleust werden konnte. Außerdem gab es eine Schleuse für größere Gegenstände, durch die unter Vernebelung von Peressigsäurelösung (1%, v/v in H_2O) Material in den Isolator gebracht werden konnte. Die Arbeiten im Isolator erfolgten über zwei Handschuhanschlüsse. Sterile Materialien, die eingeschleust wurden, waren je nach Größe doppelt in sterilisierte Plastikfolie (sterliclin[®], VP Papier, Potsdam) eingeschweißt und wurden zuvor durch Autoklavieren oder γ -Strahlung (Futter und Holzspäne bzw. Metall mit Strahlendosen von 25 bzw. 50 kGy) sterilisiert. Diese Folien wurden nach Einweichen in einer 3%igen Peressigsäurelösung in der Schleuse entfernt.

2.24.2. Tiere und Haltung

Grundsätzlich wurde darauf geachtet, daß entsprechend den Richtlinien der Gesellschaft für Versuchstierkunde-Society for Laboratory Animal Science (GV-SOLAS, 1985) und Empfehlungen von ÖBRINK & REHBINDER (2000) alle Faktoren der Haltung und Versorgung der Versuchstiere, sofern sie nicht Gegenstand der experimentellen Einflußnahme waren, konstant gehalten wurden. Für die Tierversuche wurden Ratten des Inzuchtstammes AVN/lpcv/Wistar/Rehbrücke unter gnotobiotischen Bedingungen in Überdruckisolatoren aufgezogen und gehalten. Die

Haltung während der Aufzucht erfolgte bei einer Temperatur von 22 (± 2) °C und einer Luftfeuchtigkeit von 55 (± 5)% in Käfigen des Makrolon Typ III, dessen Boden mit bestrahltem (25 kGy), feinen Holzspänen bedeckt war. Die Tiere unterlagen einem zwölfstündigen Licht/Dunkelzyklus (7:00/19:00 Uhr) und hatten *ad libitum* Zugang zu bestrahltem Standardfutter (Altromin fortified[®] Typ 1314, Altromin, Lage, Deutschland) und autoklaviertem destilliertem Wasser. Die Keimfreiheit bzw. der definierte mikrobiologische Status der Versuchstiere wurde durch regelmäßige Kontrollen überwacht. Frische Proben aus dem Enddarm der Tiere wurden entnommen und dienten zur Inokulation von Stamm-Medium und zur Anfertigung von nach Gram gefärbten Ausstrichen. Zusätzlich wurde die Abwesenheit von Ratten-spezifischen Viren, Bakterien und Protozoen durch serologische Methoden nach Maßgabe der FELASA-Richtlinien (KRAFT et al., 1994) überwacht.

Für die Tierversuchsgruppen wurden von den aufgezogenen Ratten jeweils 5-7 keimfreie Weibchen im Alter von 8 Wochen mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von 209 (± 7) g ausgewählt. Diese Tiere wurden mit Ausnahme der Experimente, in denen Ratten mit einer H₂-produzierenden Spezies und einer acetogenen Spezies diassoziert wurden, paarweise in Makrolon Typ III-Käfigen gehalten. Anstelle von Holzspänen enthielten diese Käfige einen Laufboden aus Edelstahl. Die mit einer H₂-produzierenden Spezies sowie einer acetogenen Spezies zu assoziierenden Ratten wurden einzeln in Stoffwechselkäfigen (STT 200, Ebeco, Castrop-Rauxel) gehalten. Diese Käfige wiesen ebenfalls einen Laufboden aus einem Edstahlgitter auf. Die Versuchstiere wurden mit Altromin fortified[®] (Typ 1314) oder einer chemisch definierten Basisdiät (2.24.4., WALZEM & CLIFFORD, 1988) gefüttert (*ad libitum*) und hatten *ad libitum*-Zugang zu Wasser.

2.24.3. Versuchsdesign

Die für die Experimente eingesetzten Ratten wurden einer Vielzahl verschiedener, sukzessiver Veränderungen unterzogen, die sowohl die Diät als auch den mikrobiologischen Status der Tiere betrafen. Hinsichtlich ihres mikrobiologischen Status wurden aus 19 keimfreien, weiblichen Ratten drei Gruppen (1-3) gebildet, die sukzessive mono- und diassoziert wurden (Abb. 2.1.).

(1)	7 keimfreie Ratten	+ H ₂ -Produzent	+ acetogener Organismus
(2)	7 keimfreie Ratten	+ H ₂ -Produzent	+ methanogener Organismus
(3)	5 keimfreie Ratten	+ H ₂ -Produzent	+ sulfatreduzierender Organismus

Abbildung 2.1 Schema der Gruppeneinteilung der gnotobiotischen Ratten und Assoziationsabfolge der Bakterienpopulation, die für die vorliegende Arbeit ausgewählt wurde.

Die Bakterienstämme zur Mono- und Diassoziaton wurden im Laufe dieser Arbeit isoliert bzw. von einer Stammsammlung zur Verfügung gestellt (2.1.). Neben den schematisch dargestellten Mono- und Diassoziatonen wurden Monoassoziatonen mit weiteren Gruppen keimfreier Ratten und H₂-produzierenden Stämmen, die im Zuge der vorliegenden Arbeit isoliert worden waren, angestrebt. Bei allen diesen gnotobiotischen Rattengruppen wurde die H₂-Ausscheidung in Abhängigkeit von der Versuchsdät (2.24.4.), der bakteriellen Besiedlung und unterschiedlicher mit einer Schlundsonde applizierter Testsubstanzen in einem speziell entwickelten Versuchssystem (2.24.6.) gemessen. Bei den Testsubstanzen handelte es sich um unterschiedliche Mengen an Lactulose, D-Sorbitol, Fructooligosacchariden (Raftilose[®], Orafti, Belgien) oder Inulin (Raftiline[®], Orafti, Belgien). Ratten, die mit Sulfat-reduzierenden Bakterien assoziiert wurden, erhielten gemeinsam mit der Testsubstanz 100, 200 oder 400 µmol Sulfat und hatten außerhalb der Meßperiode Zugang zu Trinkwasser, das 1,7, 3,3 bzw. 6,7 mM Sulfat enthielt.

2.24.4. Futterzusammensetzung

Als Versuchsdäten wurden zwei Däten eingesetzt. Die sogenannte Standarddät für Ratten bestand aus nativen Rohstoffen (Altromin fortified[®], Altromin), die nach Herstellerangaben die von der GV-SOLAS festgelegten Toleranzgrenzen deutlich unterschritten. Die zweite eingesetzte Dät wurde als Basisdät (BD) bezeichnet und bestand aus synthetischen, chemisch definierten Rohstoffen. Letztere Dät lehnte

sich der Diät von WALZEM & CLIFFORD (1988) an und wurde selbst hergestellt. Die Zusammensetzung beider Diäten findet sich im Anhang (Abschnitt 7.2.).

2.24.5. Assoziation der Ratten und Lebendzellzahlbestimmung in Faeces

Zur Assoziation der gnotobiotischen Ratten mit den gewünschten Mikroorganismen, wurden diese in mit entsprechendem Medium gefüllten Kulturröhrchen angezogen. Um eine Kontamination des Isolators zu vermeiden, wurden die Röhrchen zuvor dreifach in Tüten aus Sterilisierfolie eingeschweißt und durch Autoklavieren sterilisiert. Unter einer Sterilbank wurden diese Röhrchen dann unter sterilen Bedingungen inokuliert. Hierzu wurde die äußerste Folie entfernt und das Medium durch die beiden verbleibenden Folienschichten beimpft. Die Einstichstelle in der nun äußeren Folie wurde zum Schutz vor Kontamination sofort verschweißt. Die Röhrchen wurden anschließend bei 37°C inkubiert. Vor dem Einbringen der bakteriellen Kultur in den Isolator, wurden die Röhrchen samt Verpackung in 1% Peressigsäure (v/v in H₂O_{dest}) eingeweicht. Nach 5 min wurden die Folien entfernt und die Kulturröhrchen noch weitere 10 min in Peressigsäure belassen. Nach dieser Behandlung wurden sie durch den Chloramintank in den Isolator überführt. Die Kulturen wurden an drei aufeinanderfolgenden Tagen mittels Magenschlundsonde (1 ml je Tier) bzw. bei Aerobiern durch Benetzung der Futterpellets den Ratten verabreicht.

Zur Lebendzellzahlbestimmung wurden die frisch aus dem Enddarm ausmassierten Faeces der Versuchstiere innerhalb von 15 min in eine Anaerobierbox überführt und dort mit Ausnahme der methanogenen Archaea umgehend in Sörensenpuffer dekadisch bis 10⁻¹⁰ verdünnt (2.9.1.1.). Ein Aliquot dieser Verdünnungsstufen wurden zur Bestimmung der Kolonie-bildenden Einheiten (KBE) auf geeignete Agarplatten aufgebracht. Anschließend wurden sie bei 37°C anaerob inkubiert. Die KBE/g Faecesfeuchtgewicht wurden als Mittelwert dreier Verdünnungsstufen bestimmt und nach Ermittlung des Faecetrockengewichts entsprechend korrigiert. Zur Bestimmung der Lebendzellzahl von Methanogenen wurden die Faeces in Balchmedium 1 in verschlossenen 148 ml-Serumflaschen verdünnt. Diese wurden bei 37°C und 140 U/min anaerob inkubiert, nachdem sie steril mit 2×10^5 Pa H₂/CO₂ begast worden waren. In diesen sogenannten

"Verdünnungen-bis-zur-Auslöschung" (LEADBETTER & BREZNAK, 1996) wurden die Lebendzellzahlen der Methanogenen durch die höchste Verdünnungsstufe, die noch Methanbildung aufwies, bestimmt.

2.24.6. Versuchssystem zur Messung der H₂-Ausscheidung von Ratten

Im Zuge dieser Arbeit wurde ein neu entwickeltes System (Abb. 2.2) genutzt, welches es erlaubte, die H₂-Ausscheidung gnotobiotischer Ratten zu messen, ohne deren definierten mikrobiologischen Status zu beeinflussen. Dieses System wurde im Laufe dieser Arbeit anhand der H₂-Ausscheidung von keimfreien und assoziierten Ratten getestet, verbessert und validiert. Das entwickelte System bestand aus einem Isolator, der eine gasdichte Tierkammer für das zu untersuchende Versuchstier enthielt, und einem im folgenden als Lebenserhaltungssystem bezeichneten Kombination aus Einzelementen, die sich außerhalb des Isolators im konventionellen Bereich befanden. Die Tierkammer im Isolator und die Einzelemente des Lebenserhaltungssystems standen über ein System aus gasdichten Stahlrohren und Schläuchen in Verbindung.

Im Detail bestand das Versuchssystem aus folgenden Komponenten: Die Tierkammer setzte sich aus einem nach oben offenen Quader aus 12 mm dickem Plexiglas mit den inneren Abmessungen von 27,5 × 20,1 × 19 cm, einem Plexiglas-Deckel (6 mm dick) und einer Gummidichtung, die sich zwischen Deckel und Quader befand, zusammen. An Deckel und Quader befanden sich verstellbare Spannvorrichtungen, die einen dichten Verschluss der Tierkammer ermöglichten. Der Deckel wurde durch durchgehende, gasdichte Swadgelok-Anschlüsse für Zu- und Abluft durchbohrt, die den Gasraum der Tierkammer mit den anderen Komponenten des Systems verbanden. Diese Verbindung wurde durch Iso-Versinic-Viton-Schläuche (Innendurchmesser 4,0 mm, Außendurchmesser 6,0 mm, Ochs, Bovenden) und hochwertige Stahlrohre (Innendurchmesser 4,0 mm, Außendurchmesser 6,0 mm) hergestellt. Die Stahlrohre durchquerten einen durchbohrten Stopfen in der Isolatorhülle, um den gnotobiotischen Bereich mit dem konventionellen Bereich zu verbinden. An diesem Übergang passierte die Zu- und Abluft der Tierkammer autoklavierte Sterilfilter (Midisart 2000, Sartorius, Göttingen). In der Tierkammer befand sich während der Meßperioden eine gnotobiotische Ratte

in einem Makrolon Typ II-Käfig, der einen Edelstahl-Laufboden besaß. Eine 150 ml fassende Trinkflasche auf dem Käfigdach sorgte für die Wasserversorgung des Versuchstieres. Durch den transparenten Bau von Tierkammer und Makrolonkäfig ließ sich das Tier während der Meßperioden beobachten. Zusätzlich enthielt die Tierkammer ein Thermometer zur Kontrolle der Temperatur.

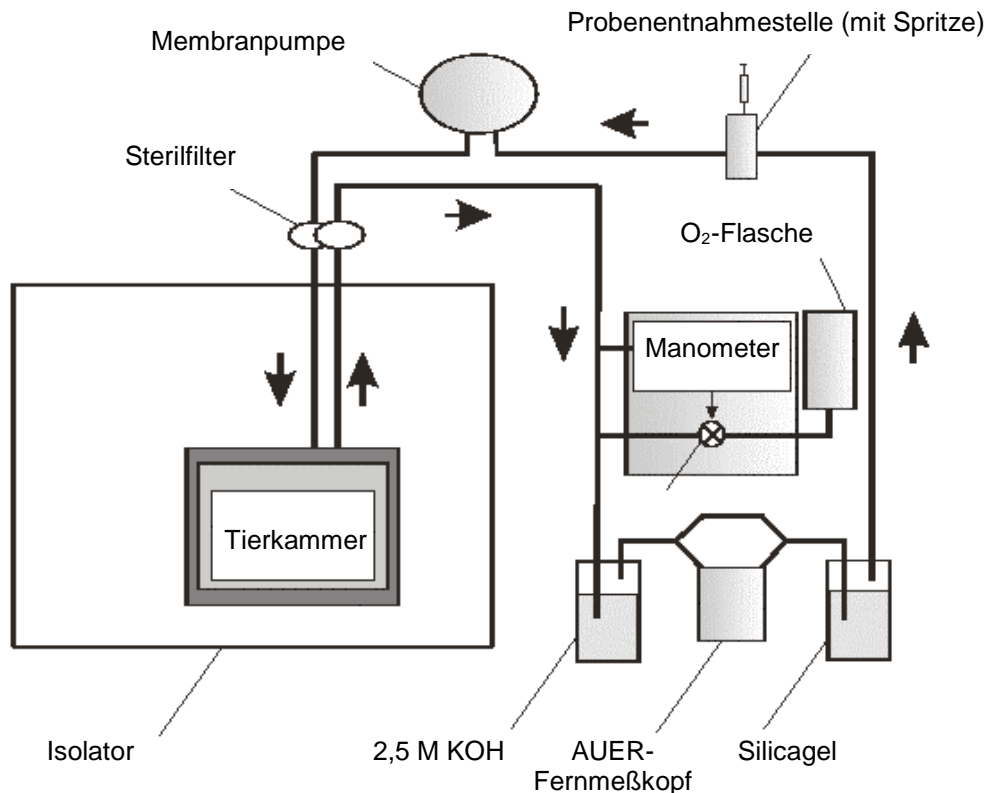


Abbildung 2.2 Schema des entwickelten Meßsystems aus Tierkammer, Isolator und Lebenserhaltungssystem zur Messung der H₂-Ausscheidung von gnotobiotischen Ratten

Das Lebenserhaltungssystem ist eine Modifikation des von GUMBANN et al. (1971) entwickelten Systems. Im folgenden sollen die Unterschiede kurz beschrieben werden. Eine gasdichte und justierbare Membranpumpe (Typ R 409.1-150 G, Sera, Immenhausen) sorgte für eine adäquate Zirkulation der Gases im System. Die Luft wurde durch eine Gaswaschflasche (500 ml, Schraubverschluß, Schott, Mainz) geleitet, die mit 400 ml einer regelmäßig ausgetauschten 2,5 M Kaliumhydroxidlösung (Merck) gefüllt war und zur Absorption des Kohlendioxids diente. Der Gasfluß passierte eine zweite Gaswaschflasche, die zur Absorption von Luftfeuchtigkeit zu 80% mit Silicagel gefüllt war. Das System war außerdem mit einem mit Siliconöl gefüllten Manometer verbunden, das einen Druckabfall im System hervorgerufen durch den Gasverbrauch von O₂ durch die Ratte und die kontinuierliche Absorption von CO₂ mittels zweier Lichtschranken detektieren konnte.

Daraufhin öffnete sich ein Ventil, das bis zum Druckausgleich O₂ (Grade 5.0, Linde, Berlin) ins System einleitete. Über eine Probenentnahmestelle konnten Aliquots aus dem Gasraum des Systems mittels einer Spritze, die durch einen Drei-Wege-Hahn verschließbar war, entnommen werden. Für solche Plastikspritzen zeigten HADERSTORFER et al. (1989) und BJØRNEKLETT & JENSSEN (1980), daß sich die H₂-Konzentration der Gasprobe in den ersten 12 h einer Lagerung nicht nennenswert verändert. Zudem wurden in der vorliegenden Arbeit die Gasproben sofort gemessen, so daß kein nennenswerter H₂-Verlust auftrat. Weiterhin wurde bei einigen Versuchen ein Auer-Meßgerät (DF-9500 H₂, Auer, Deutschland) parallel in den Gasfluß eingeschaltet, um die H₂-Konzentration kontinuierlich zu bestimmen.

Die H₂-Akkumulation in diesem System wurde mit elektrochemischen Zellen oder mittels gaschromatographischer Analysen bestimmt. Die H₂-Konzentration einer 20 ml-Gasprobe konnte in einem Bereich von 0-250 ppm H₂ mit einem GMI Atemgasmonitor (GMI Medical Ltd., Renfrew, Scotland, UK) bestimmt werden, der eine H₂-sensitive elektrochemische Zelle enthielt. Die Sensitivität dieser Methode wird mit 2 ppm angegeben. Der Atemgasmonitor wurde regelmäßig mit einem 96,8 ppm H₂-Standard (Stimotron, Wendelstein) geeicht und mit Raumluft auf Null gesetzt. H₂-Konzentrationen oberhalb von 250 ppm und CH₄-Konzentrationen wurden gaschromatographisch gemessen (2.19.2. und 2.19.3.). In einem H₂-Konzentrationsbereich von 0-1000 ppm wurde in einigen Versuchen ein Auer-Meßgerät, das eine H₂-sensitive elektrochemische Zelle enthielt, zur Bestimmung des H₂-Anteils eingesetzt. Durch seine parallele Anordnung zum Gasfluß konnte mit dieser Meßzelle die H₂-Konzentration im System kontinuierlich verfolgt und in Kombination mit einem Schreiber (REC-102, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) ununterbrochen aufgezeichnet werden.

2.24.7. Tötung und Sektion der Tiere

Die Tötung erfolgte durch Dekapitation mittels Guillotine bei Ratten, die mit acetogenen Bakterien assoziiert worden waren oder durch CO₂-Asphyxie bei allen anderen Versuchstieren. Die Tötung der Tiere erfolgte nacheinander jeweils unterbrochen von der unmittelbaren Sektion zur Entnahme einzelner Darmabschnitte. Dazu wurde der Darm an den Übergängen von Magen/Duodenum,

Duodenum/Jejunum, Jejunum/Caecum, Caecum/Colon und Colon/Rektum ligiert, entnommen und innerhalb von 15 min auf Eis in eine Anaerobierbox verbracht, wo die weitere Aufarbeitung der Darminhalte erfolgte.

2.25. Statistische Auswertung der Tierversuche

Die statistischen Berechnungen wurden mit dem Programm SPSS[®] (Version 8.0, SPSS, Chicago, USA) durchgeführt. Dabei wurde zum Vergleich mehrerer abhängiger Beobachtungen der Friedman-Test eingesetzt. Zum Vergleich gepaarter Stichproben wurde der nichtparametrische Wilcoxon-Test durchgeführt. Die geringen Tierzahlen in den einzelnen Versuchsgruppen und die bekannten statistischen Probleme von verschiedenen Paarvergleichen innerhalb der betrachteten Untergruppen (GUGGENMOOS-HOLZMANN & WERNECKE, 1996) beeinflussen die Aussagefähigkeit der berechneten Signifikanzniveaus.

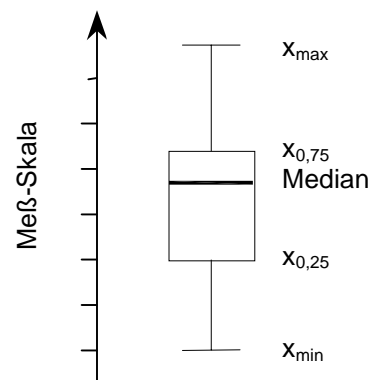


Abbildung 2.3 Schema eines Box-and-Whisker-Plot zur Veranschaulichung der Lage, Streuung und Schiefe einer Meßwert-Reihe (modifiziert nach LORENZ, 1992)

Zur Darstellung der H_2 - und CH_4 -Ausscheidung gnotobiotischer Ratten wurde der Box-and-Whisker-Plot gewählt (Abb. 2.3). Er ermöglicht eine gute Veranschaulichung der Quartile sowie der Variationsbreite und Schiefe der Verteilung einer Datenreihe. Dabei kennzeichnet der Median diejenige Merkmalsausprägung, oberhalb und unterhalb welcher gleichviel Beobachtungen liegen. Das 1. Quartil ($x_{0,25}$) beschreibt den Beobachtungswert, für den 25% der Beobachtung $\leq x_{0,25}$ sind, während das 3. Quartil ($x_{0,75}$) denjenigen Wert kennzeichnet, für den 25% der Beobachtungen $\geq x_{0,75}$ sind. Die Variationsbreite wird durch den Abstand zwischen dem kleinsten (x_{min}) und dem größten Beobachtungswert (x_{max}) beschrieben (LORENZ, 1992).

2.26. Bezugsquellen

Die verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel stammten, sofern nicht anders vermerkt von den Firmen Merck (Darmstadt) oder Fluka (Deisenhofen) und hatten den Reinheitsgrad „p. a.“ („pro analysis“). Weitere Chemikalien, Biochemikalien, Enzyme und Gase wurden von folgenden Firmen bezogen:

Biomol Feinchemikalien GmbH, Mannheim:

Agarose, Glycerin, Tris, Tris/HCl, NAD⁺, NADH

Boehringer Mannheim, Mannheim:

Lysozym, Blocking-Reagenz, Antikörperkonjugat (Anti-DIG-AP, Fab fragments), Rnase, alle Enzyme sofern nicht anders vermerkt

New England Nuclear, Dreieich:

1-¹⁴C-Acetat, NaH¹⁴CO₃

Carl Roth GmbH, Karlsruhe:

Methanol

Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen:

SDS, Hämin, EDTA, APES, Benzylviologen, Formiat-Dehydrogenase, alle Antibiotika sofern nicht anders vermerkt