

3. Experimente und Ergebnisse

3.1. Isolierung von am H₂-Metabolismus beteiligten Organismen aus dem humanen Gastrointestinaltrakt

Mittels unterschiedlicher Isolierungsstrategien wurden insgesamt 94 Organismen aus humanen Faeces isoliert, von denen einige durch H₂-Bildung bzw. H₂-Nutzung am intestinalen Wasserstoffmetabolismus beteiligt sind. Ausgewählte Stämme wurden phänotypisch und genotypisch eingehender charakterisiert.

3.1.1. Isolierung von H₂-bildenden Organismen

Die Herkunft, Morphologie und die maximal produzierte H₂-Konzentration aller Isolate, die mit den Strategien A-C gewonnen wurden, sind in Tabelle 7.1 im Anhang dargestellt. Aufgrund dessen wird im folgenden nur ein grober Überblick über die isolierten Organismen gegeben, wobei die Isolate, die mehr als 0,5 µmol H₂/ml WCA-Medium bildeten, charakterisiert wurden.

Da für die Anreicherung von Organismen, die molekularen Wasserstoff produzieren, keine selektiven Methoden zur Verfügung stehen, wurde zunächst mit dem komplexen WCA-Medium in Isolierungsstrategie A eine reichhaltige Nährstoffquelle ausgewählt. Sie sollte sicherstellen, daß möglichst viele der kultivierbaren intestinalen Bakterien aus Faeces erfaßt werden. Mit Isolierungsstrategie A wurden aus den Faeces-Verdünnungen 10⁻⁵ bis 10⁻¹⁰ insgesamt 61 Organismen isoliert, von denen zwölf bei Inkubation in WCA-Medium mindestens 1 µmol H₂/ml WCA-Medium bildeten. Im einzelnen wurden mit Isolierungsstrategie A aus den Faeces-Verdünnungen 10⁻⁶ bis 10⁻⁹ auf WCA-Agar 27 Organismen isoliert, die unterschiedliche Mengen an H₂ bildeten. Sechs dieser Organismen (A, D, F, I, R, V) wurden bis zur Identifizierung charakterisiert (3.2.1.), da sie mehr als 1 µmol H₂/ml WCA-Medium bildeten. Mit Isolierungsstrategie A wurden außerdem auf modifiziertem WCA-Agar mit Stärke- bzw. Lactose-Zusatz aus den Faeces-Verdünnungen 10⁻⁶ bis 10⁻⁹ 17 Organismen isoliert. Mit Ausnahme von einem Organismus (Isolat 14) produzierten diese jedoch kein bzw. kaum H₂. Es handelte

sich hierbei überwiegend um Gram-positive Organismen. Zusätzlich konnten nach Isolierungsstrategie A, wenn dem modifizierten WCA-Agar Lactulose zugesetzt worden war, sieben Organismen isoliert werden. Von diesen Organismen wurde ein Isolat (27 bzw. 271), das aus einer Faeces-Verdünnung von 10^{-8} stammte, aufgrund starker H_2 -Bildung ($> 8 \mu\text{mol } H_2/\text{ml WCA-Medium}$) eingehender untersucht. Der Einsatz von BIC3-Agar mit Lactulose (25 mM) als Kohlenstoffquelle führte mit Isolierungsstrategie A zur Isolierung von zehn Organismen, von denen zwei Organismen (Isolate B5, B8) in der Lage waren, H_2 in hohen Konzentrationen ($> 15\%$ H_2 in 8ml Gasphase der Kulturröhrchen) auszuscheiden.

Bei der Inkubation von Faeces-Verdünnungen in WCA-Medium mit 2-Bromoethansulfonsäure und Natriummolybdat (Isolierungsstrategie B) wurde aus der 10^{-7} -Verdünnung ein Organismus (107-38) isoliert, der starke H_2 -Bildung ($> 8 \mu\text{mol } H_2/\text{ml WCA-Medium}$) aufwies. Aus den Verdünnungsstufen 10^{-8} und 10^{-9} wurden die Stämme 111-13A bzw. 111-35 isoliert, die nach phänotypischer und genotypischer Charakterisierung als Mitglieder einer neuen Gattung (s. 3.2.) klassifiziert werden konnten. Außerdem wurden aus anderen Verdünnungsstufen weitere 18 Organismen isoliert, die bis auf drei Organismen identifiziert wurden. Letztere wurden wegen geringer Wasserstoffbildung, oder weil sie bereits bekannt waren, nicht weiter charakterisiert (Tab. 7.1).

Mit Isolierungsstrategie C wurden zwölf Organismen isoliert, von denen zwei (AI7, AI9) verstärkt H_2 ($> 4 \mu\text{mol } H_2/\text{ml WCA-Medium}$) bildeten. Diese Organismen wurden nicht vollständig charakterisiert. Tabelle 7.1 und 7.2 gibt Auskunft über die mit diesen Organismen durchgeführten Untersuchungen und deren Ergebnisse.

3.1.2. Isolierung von methanogenen Archaea

Mit Zusatz von Cephalothin und Clindamycin zum modifizierten Balchmedium 1 wurden aus der Faeces-Verdünnungsstufe 10^{-5} nach vier Reihenverdünnungen Reinkulturen von methanogenen Archaea isoliert. Es handelte sich dabei um sehr kurze, unbewegliche, Gram-positive, dicke Stäbchen, die in Flüssigkultur lange Ketten bildeten und grüne Faktor₄₂₀-Fluoreszenz aufwiesen. Diese Organismen waren in Stamm-Medium ohne H_2 in der Gasphase (N_2/CO_2 , 80/20, v/v) nicht zu kultivieren. Sie reduzierten CO_2 zu CH_4 und nutzten dabei H_2 und Formiat als Elektronendonator.

Hauptquelle des Zellstickstoffs war NH_4^+ . Weiterhin benötigten diese Organismen Acetat als Kohlenstoffquelle. Aufgrund ihrer phänotypischen und biochemischen Eigenschaften wurden sie als Stämme der Gattung *Methanobrevibacter* klassifiziert. Gestützt wird diese Einordnung durch das Färbeverhalten nach Gram und durch die morphologischen Unterschiede zu *Methanosarcina* und *Methanobacterium*. Zusätzlich unterscheidet sich *Methanobrevibacter* durch die für das Wachstum nutzbaren Energiequellen von *Methanosarcina* (MILLER, 1989), und *Methanobrevibacter smithii* ist zudem mit einem Anteil von 99% die häufigste methanogene Spezies im Darm (MILLER et al., 1982; WEAVER et al., 1986).

Im Gegensatz zum Einsatz von Cephalothin und Clindamycin führte der Zusatz aller weiteren antimikrobiell wirksamen Stoffe nicht zur Isolierung von Methan bildenden Reinkulturen. Die in modifiziertem Balchmedium 1 mit H_2/CO_2 angereicherten Mischkulturen nutzten alle H_2 zur Bildung von Methan. Diese Kulturen bestanden aber neben den aufgrund ihres Phänotyps als methanogene Archaea charakterisierten Spezies aus mindestens einer nicht Methan-bildenden zusätzlichen Spezies. Hierbei handelte es sich einerseits um sehr lange Stäbchen, die in mehr als 16 h alten Kulturen apikale Verdickungen aufwiesen. In den Mischkulturen fand sich häufig auch *Enterococcus faecium*. Letztere Spezies wiesen keine Fluoreszenz auf.

3.1.3. Isolierung von Sulfat-reduzierenden Bakterien

Mit H_2/CO_2 als einziger Energiequelle ließen sich aus Faeces-Verdünnungen (10^{-1} bis 10^{-3}) Sulfat-reduzierende Mischkulturen anreichern. Die Sulfatreduktion wurde anhand der schwarzen Präzipitate im Kulturmedium und mittels des Bleiacetat-Testes nachgewiesen. Die Mischkulturen bestanden aus mindestens zwei verschiedenen Organismen. Zum einen konnten mittellange Stäbchen mit endständigen Zelleinschlüssen, die die Zelle leicht auftrieben, isoliert werden. Diese Spezies lagen häufig in Paaren vor. Beobachtet wurden weiterhin kurze coccoide Stäbchen in Ketten. Allerdings ließen sich die Organismen dieser Mischkultur durch Verdünnung und anschließende Inkubation in Kulturmedium nicht voneinander trennen. Anhand des Erscheinungsbilds im Phasenkontrast konnte abgeschätzt werden, daß beide Organismen in einer ähnlichen Populationsdichte vorlagen. Auf Agarplatten mit Stamm-Medium wuchsen mittellange Stäbchen als große (\varnothing 4

mm), unregelmäßige, zentral gelbliche und erhabene, peripher weißliche und flache, glatte Kolonien. Die sehr kurzen Stäbchen bildeten hingegen runde, weiße, glatte, konvexe Kolonien mit einem Durchmesser von 1-2 mm. Bei Überführung von Zellen aus diesen Kolonietypen in Kulturmedium konnte keine Sulfatreduktion mehr nachgewiesen werden.

3.2. Charakterisierung und Identifizierung von H₂-Produzenten

Isolate, die in der vorliegenden Arbeit weiter verwendet worden sind, werden im folgenden kurz in ihrem Phänotyp beschrieben. Die Ergebnisse der Charakterisierung werden durch die Daten in den Tabellen 7.1 bis 7.4 (Anhang) vervollständigt. Weiterhin erfolgte bei ausgewählten Isolaten eine genotypische Charakterisierung auf der Grundlage der Sequenz ihrer 16S rRNA-Gene.

3.2.1. Phänotypische Charakterisierung und Identifizierung

Mittels Vitek[®]-System wurden 28 Isolate bis zur Speziesebene identifiziert. In der Tabelle 7.1 im Anhang werden diese Vitek[®]-Ergebnisse dargestellt. Im einzelnen handelte es sich dabei um Arten der Gattungen *Bacteroides*, *Clostridium*, *Bifidobacterium*, *Escherichia*, *Klebsiella* und *Enterococcus* (Tab. 7.1). Es wurden die Isolate V und B5 aufgrund ihrer starken H₂-Bildung in den durchgeführten Tierversuchen verwendet und deswegen ausführlich charakterisiert. Weiterhin wurde mit den Isolaten 271 und 111-13A sowie 111-35 gearbeitet, die ebenfalls aufgrund ihrer Wasserstoffbildung von Interesse für die vorliegende Arbeit waren.

Isolat V wurde aufgrund seiner phänotypischen Charakteristika als *Clostridium perfringens* identifiziert (Tab. 7.2, Anhang). Eine Toxintypisierung, die freundlicherweise Dr. B. Köhler am Staatlichen Veterinär- und Lebensmitteluntersuchungsamt Potsdam durchführte, klassifizierte Isolat V als *Clostridium perfringens* Typ A-Stamm mit Bildung von α -Toxin, θ -Toxin und Hyaluronidase. Weiterhin konnten mittels des Vitek[®]-Systems mehrere Isolate (B5, B8, II7, II12, II21 und II23) als *Escherichia coli* identifiziert werden. Mit Strategie B wurde Isolat

107-38 gewonnen, das anhand der Fermentationsmuster der GNI-Karte des Vitek®-Systems als *Klebsiella pneumoniae* identifiziert wurde.

Isolat 271 wurde im Gegensatz zu *Clostridium perfringens* mit Lactulose als hauptsächlicher Kohlenstoffquelle isoliert. Mittels der Ergebnisse der Untersuchungen mit dem Vitek- und API-System war keine sichere Identifizierung möglich. Erst die 16S rRNA Gensequenzierung erlaubte eine eindeutige Identifizierung (3.2.2.). Bei Isolat 271 handelt es sich um ein Gram-positives, unbewegliches, strikt anaerobes Stäbchen, welches Katalase- und Oxidase-negativ war und kein Indol bildete. Isolat 271 bildete keine Sporen und maß anhand von Licht- und rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen übereinstimmend $0,6-1,0 \times 3,0-9,0 \mu\text{m}$. Die langen Stäbchen bildeten im Kulturmedium Paare und kurze Ketten. Auf Columbia-Blut-Agar und WCA-Agar bildeten sie runde, opak-weiße, konvexe, glatte Kolonien mit einem Durchmesser von 2-3 mm.

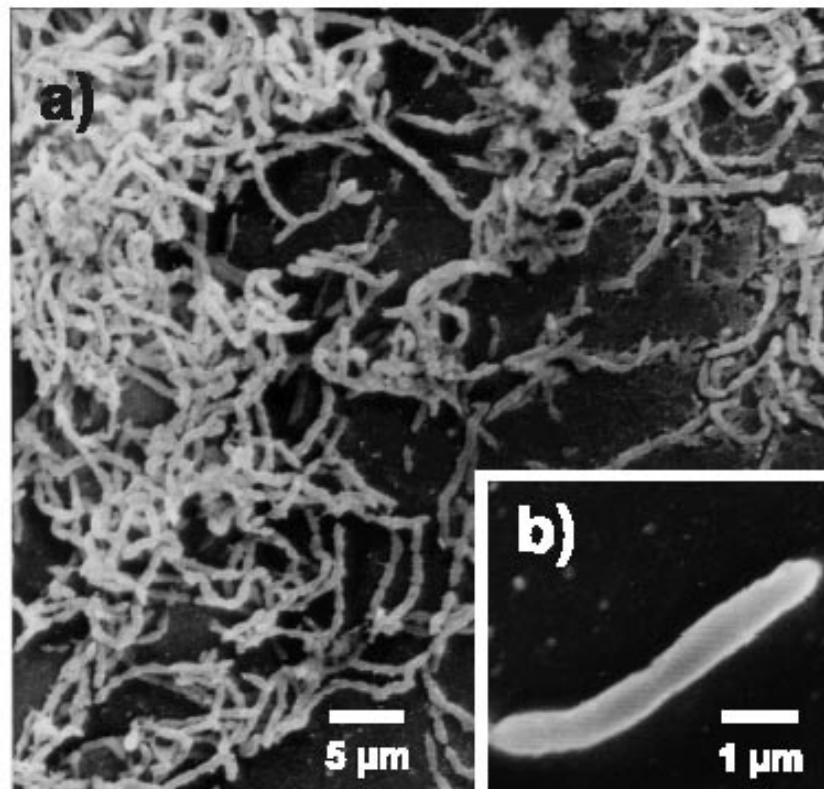


Abbildung 3.1 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von Stamm 111-35 in 2000-facher Vergrößerung (a) und 10000-facher Vergrößerung (b). Die Zellen wurden in HA-Medium mit 10 mM Glucose und Pepton (0,5 g/l) für 12 h bei 37°C inkubiert.

Die Isolate 111-13A und 111-35 wiesen identische phänotypische Charakteristika auf und wurden auch mittels der genotypischen Untersuchungen als Organismen einer Art klassifiziert (3.2.2.). Sie bildeten auf WCA-Agar weiß-opake, runde, glatte, glänzende, konvexe und klebrige Kolonien mit einem Durchmesser von 1-3 mm. Kolonien auf Columbia-Blut-Agar waren tendenziell kleiner und verursachten keine Hämolyse. Diese Isolate reagierten Katalase-, Oxidase- und Indol-negativ. Die einzelnen Zellen waren $0,5-0,6 \times 2,0-4,3 \mu\text{m}$ groß und bildeten in Flüssigmedium typische lange Ketten von bis zu 200 Zellen (Abb. 3.1). Sie waren Gram-positiv, obligat anaerob, unbeweglich und nicht sporenbildend. Kulturen in Stamm-Medium bildeten ein haarknäuelartiges Sediment mit wenig oder keiner Trübung des Mediums. In mit 0,15% Agar supplementiertem Stamm-Medium wiesen die Kulturen Trübung mit einzelnen dichten wolligen Flocken auf. Die beiden Isolate fermentierten eine Vielzahl von Substraten. Die erreichte OD_{600} und die gebildete H_2 -Konzentration einiger fermentierter Kohlenstoffquellen durch diese Kulturen sind in Tabelle 3.1 dargestellt.

Tabelle 3.1 Maximale OD und H_2 -Konzentration, die die Stämme 111-13A und 111-35 bei Inkubation in HA-Medium erreichten. Das HA-Medium enthielt die Substrate in den angegebenen Konzentrationen sowie Pepton (2 g/l).

Substrat (Konzentration)	Stamm 111-13A		Stamm 111-35	
	maximale OD_{600}	maximale H_2 -Konzentration (%)	maximale OD_{600}	maximale H_2 -Konzentration (%)
L-Arabinose (20 mM)	1,67	2,6	1,45	2,3
D-Fructose (20 mM)	1,14	3,1	1,35	2,8
FOS (0,5%)	0,76	1,3	0,82	1,2
D-Galactose (20 mM)	1,44	3,3	1,56	3,5
D-Glucosamin (20 mM)	0,86	2,7	1,02	2,5
D-Glucose (20 mM)	1,36	3,8	1,68	4,1
Inositol (20 mM)	1,1	1,8	0,9	1,9
Inulin (0,5%)	0,36	0,3	0,41	0,4
D-Lactose (10 mM)	1,37	3,7	1,28	3,5
Lactulose (20 mM)	0,65	0,9	0,71	1,3
D-Maltose (20 mM)	1,75	3,9	1,63	4,4
D-Salicin (10 mM)	0,50	1,1	0,36	0,8
D-Sorbitol (20 mM)	0,72	1,82	1,15	1,7
Saccharose (20 mM)	0,98	4,1	1,32	3,7
D-Xylose (20 mM)	0,36	0,9	0,52	1,0

Zusätzlich wurden Aeskulin, Amygdalin, Arbutin und β -Gentiobiose durch beide Stämme umgesetzt. Eine vollständige Darstellung der Fermentationsfähigkeiten beider Stämme findet sich im Anhang (Tab. 7.2 & 7.4). Weiterhin waren die Stämme 111-13A und 111-35 nicht in der Lage, Nitrat zu reduzieren, Gelatine zu verflüssigen oder Milch zu peptonisieren. Tabelle 4.1 (Abschnitt 4.1.1.1.) stellt Charakteristika zusammen, die nützlich sind, um diese beiden Stämme von den phylogenetisch näherer verwandten Spezies (3.2.2.) und anderen Eubakterien zu differenzieren.

Außerdem wurden für die Stämme 111-13A und 111-35 mittels des API ZYM-Testes semiquantitative Enzymprofile erstellt (Tab. 3.2), die mit Ausnahme der *N*-Acetyl- β -Glucosaminidaseaktivität einander glichen. Es wurde für beide Stämme keine Aktivität von Chymotrypsin, Cystin-Arylamidase, α -Fucosidase, β -Glucuronidase, Leucin-Arylamidase, Lipase (C14), α -Mannosidase, Alkalischer Phosphatase, Trypsin oder Valin-Arylamidase nachgewiesen.

Tabelle 3.2: Enzymprofile der Stämme 111-13A und 111-35 mittels API-ZYM-System nach Inkubation einer dichten Zellsuspension beider Stämme für 4 h bei 37 °C.

Enzyme	Mittelwerte (n=4) der Aktivitätsnummer* (\pm SD)	
	Stamm 111-13A	Stamm 111-35
C ₄ -Esterase	1,0 (0,0)	1,0 (0,0)
C ₈ -Esterase-Lipase	1,0 (0,0)	1,0 (0,0)
Saure Phosphatase	2,7 (0,5)	3,0 (0,8)
Naphthol-Phosphohydrolase	2,0 (0,0)	2,0 (0,0)
α -Galactosidase	-	-
β -Galactosidase	2,0 (0,8)	2,0 (0,8)
α -Glucosidase	1,0 (0,8)	1,0 (0,8)
β -Glucosidase	4,3 (0,5)	4,7 (0,5)
<i>N</i> -Acetyl- β -Glucosaminidase	1,3 (0,9)	-

* Aktivitätsnummer als Maß der hydrolysierten Substratmenge: 1 = 5 nmol; 2 = 10 nmol; 3 = 20 nmol; 4 = 30 nmol und 5 > 40 nmol Substrat hydrolysiert

Für die Isolate AI7 und AI9 führte die phänotypische Charakterisierung zu keiner Identifizierung. Die Gram-positiven, mittellangen, Indol-bildenden Stäbchen von Isolat AI7 bildeten auf WCA-Agar kleine (\varnothing 1 mm), runde, glatte, glänzende, konvexe, weiße Kolonien. Die ebenfalls Gram-positiven, mittellangen Stäbchen von Isolat AI9

bildeten kein Indol und auf WCA-Agar große (\varnothing 4-6 mm), unregelmäßige, glatte, erhabene, leicht metallisch-glänzende, weiße Kolonien.

3.2.2. Genotypische Charakterisierung und Identifizierung

Die genotypischen Identifizierungen von Isolat 271, 111-13A und 111-35 wurde anhand ihrer 16S rRNA-Gensequenzen durchgeführt. Sie erlaubten die eindeutige Identifizierung von Isolat 271 als *Eubacterium hadrum*. Die Isolate 111-13A und 111-35 wiesen in der 16S rDNA-Sequenzanalyse, die mit mehr als 1400 Basenpaaren fast das gesamte 16S rRNA-Gen erfaßte (Position 30 bis 1521, *Escherichia coli*-Nummerierung) zueinander identische Sequenzen auf. Vergleiche mit den Sequenzen aus den Datenbanken von GenBank und RDP (Ribosomal Database Project) zeigten, daß die Isolate bislang unbekannt waren. Sie sind eng verwandt (>99% Sequenzhomologie) mit einem rDNA Klon, der von einem bisher nicht kultivierten Bakterium aus einer Faecesprobe stammte (SUAU et al., 1999). Die phylogenetische Einordnung (Abb. 3.2), die mittels der „Neighbour joining“-Methode vorgenommen wurde, zeigte, daß die Isolate zur *Clostridium coccooides*-Gruppe (Subcluster XIVa, COLLINS et al., 1994) gehören. Mit einer 6%igen Sequenzdivergenz ist *Eubacterium formicigenerans* die phylogenetisch nächste beschriebene Spezies. Aufgrund der Sequenzunterschiede zu den nächsten verwandten Spezies und durch die beschriebenen biochemischen Stoffwechselfparameter (Tab. 7.2 & 7.4) waren die Isolate 111-13A und 111-35 eindeutig von *E. formicigenerans* und allen anderen Arten der *Clostridium coccooides*-Gruppe unterscheidbar. Nach FOX et al. (1992) und STACKEBRANDT & GOEBEL (1994) ist eine Art als neu anzusehen, wenn sie eine 16S rRNA-Sequenzhomologie von weniger als 97% zu bekannten Arten aufweist. Auf der Grundlage dieser Sequenzdaten und der phänotypischen Charakteristika stellen die Isolate eine bislang unbekannte Art da, zu der auch der von SUAU et al. (1999) isolierte Klon gehört. Diese bilden gemeinsam mit *E. formicigenerans* einen phylogenetisch deutlich abgegrenzten Zweig des Stammbaums (Abb. 3.2). Daher wird empfohlen, für diese beiden Stämme 111-13A und 111-35 die neue Gattung *Dorea* gen. nov. mit der Art *D. longicatena* sp. nov. zu bilden.

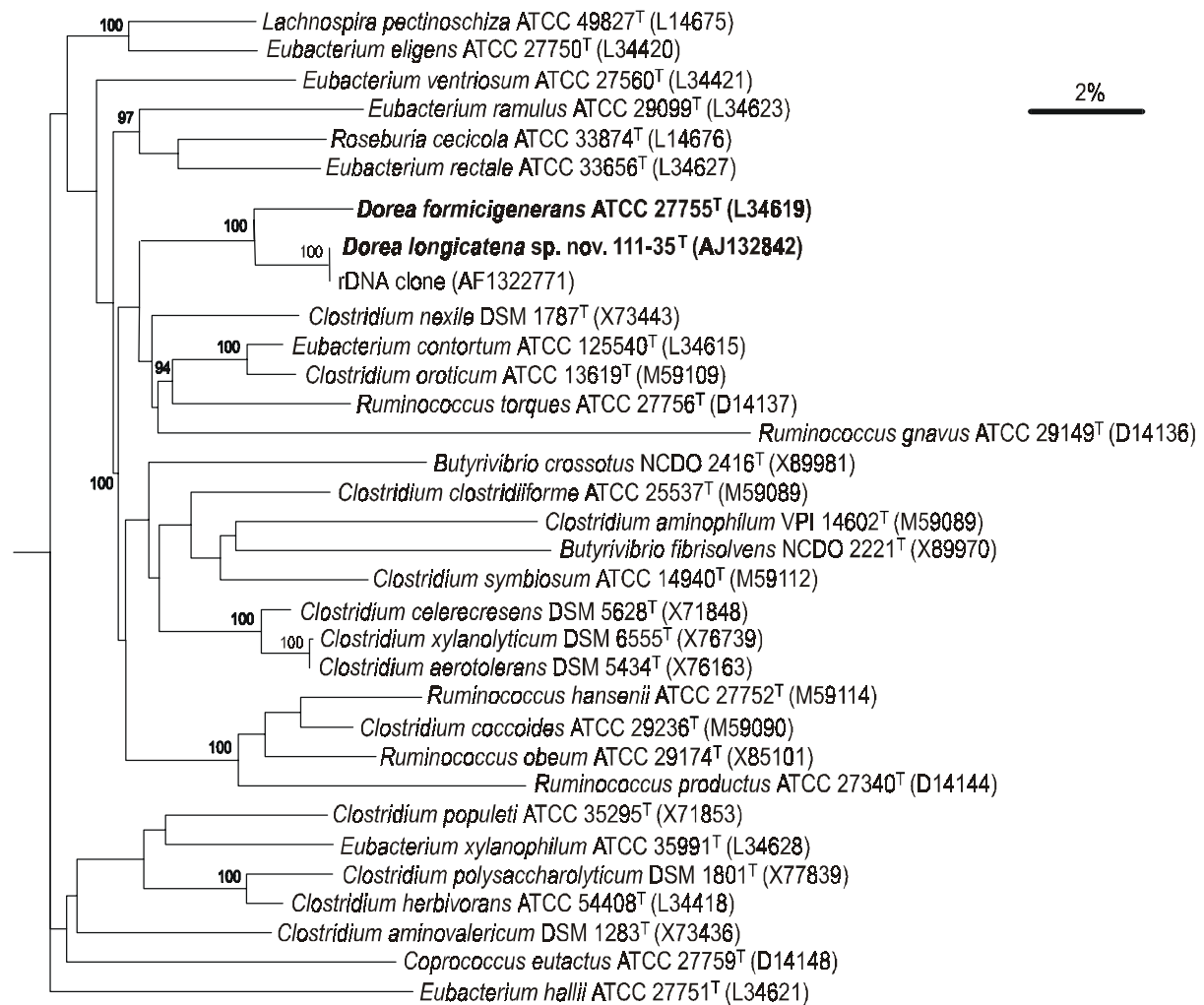


Abbildung 3.2 Stammbaum zur phylogenetischen Einordnung von *D. longicatena* gen. nov., sp. nov. und verwandter Arten. Der Baum wurde konstruiert mittels der „Neighbour joining“-Methode und basiert auf dem Vergleich von etwa 1400 Basenpaaren der 16S rDNA. Bootstrap-Werte, ausgedrückt als prozentualer Anteil von 500 Replicons, sind an den Verzweigungspunkten angegeben. Der Maßstab entspricht einer 2%igen Sequenzdivergenz.

Weiterhin sollte im Zuge dieser Einordnung *E. formicigenerans* als Typspezies dieser Gattung mit der Bezeichnung *Dorea formicigenerans* comb. nov. reklassifiziert werden. Diese Einordnung basiert auch auf der Einsicht, daß die Gattung *Eubacterium* phylogenetisch eine sehr heterogene Gruppe bildet (TANNER et al., 1981) und nach zunehmender Meinung auf die Gattung *Eubacterium sensu stricto* mit der Typspezies *Eubacterium limosum* beschränkt werden sollte (WILLEMS & COLLINS, 1996; KAGEYAMA et al., 1999). Die Stämme 111-13A und 111-35 sind mit etwa 20%iger Sequenzdivergenz sowohl phylogenetisch weit entfernt von *E. limosum* und seinen nächsten Verwandten als auch zudem inkompatibel mit der Definition der Gattung *Eubacterium sensu stricto*, da sie als hauptsächliche Fermentationsprodukte weder Butyrat noch Lactat bilden (3.4. & 3.5.). Die neu isolierten Stämme 111-13A und 111-35 bilden hingegen mit *E. formicigenerans* ein

statistisch signifikantes Subcluster (Bootstrap-Wert 100%) innerhalb der *Clostridium coccoides*-Gruppe. Somit ist die Bildung einer neuen Gattung *Dorea* gerechtfertigt.

Die DNA-DNA-Hybridisierung von 111-13A und 111-35 untereinander und mit der Art *Ruminococcus stercoraris* Stamm CIII, einer neu isolierten Art aus einer humanen Faecesprobe (SIMMERING, 2000, persönliche Mitteilung), sowie *Bacteroides thetaiotaomicron* zeigte die große Homologie zwischen den beiden Isolaten (>96%) jedoch keine nachweisbare Homologie zu den beiden eingesetzten Kontrollstämmen. Der G+C-Gehalt der DNA der Isolate 111-13A und 111-35 wurde anhand von HPLC-Analysen mit 43,8 bzw. 45,6% ermittelt.

3.3. Nachweis der Hydrogenaseaktivität

Hydrogenaseaktivität im zellfreien Extrakt (s. 2.16.) konnte bis auf den Stamm AI7 in allen untersuchten Isolaten nachgewiesen werden. Eine Hydrogenaseaktivität in der Membranfraktion ließ sich hingegen nur für *C. perfringens* V zeigen. Die spezifischen Aktivitäten sind in Tabelle 3.3 zusammengefaßt.

Tabelle 3.3 Hydrogenaseaktivitäten in zellfreien Extrakten und Membran-Präparationen einiger isolierter Stämme. Dazu wurden 1-2 µl Probe in eine H₂-begaste Küvette gegeben, die mit 0,8 ml anaeroben KP-Puffer (50 mM) und 2 µl Benzylviologen (0,5 M) gefüllt war. Die Messung erfolgte bei 578 nm.

Bakterienspezies	Präparation	Spezifische Aktivität (U/mg Protein)
<i>Dorea longicatena</i> sp. nov. 111-35	Rohextrakt	1,5
	Membran	n. n.
<i>Clostridium perfringens</i> V	Rohextrakt	11,6
	Membran	4,8
<i>Eubacterium hadrum</i> 271	Rohextrakt	3,5
	Membran	n. n.
<i>Escherichia coli</i> B5	Rohextrakt	0,5
	Membran	n. n.
AI7	Rohextrakt	n. n.
	Membran	n. n.

n. n., nicht nachweisbar

3.4. Fermentationsexperimente mit wachsenden Zellen

Die Messung von Fermentationsprodukten wurde zur Charakterisierung der Isolate und zum Vergleich mit den *in vivo*-Daten durchgeführt. Bei den eingesetzten Spezies handelte es sich um *Eubacterium hadrum*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium coccooides*, *Dorea longicatena* sp. nov. 111-35, *Dorea longicatena* sp. nov. 111-13A und *Methanobrevibacter* RT-1. Weiterhin wurden definierte Mischkulturen aus H₂-bildenden Organismen und H₂-nutzenden Organismen hergestellt, um den H₂-Transfer *in vitro* zu demonstrieren. In Kokultur wurden die jeweiligen Kombinationen aus *C. perfringens* mit *C. coccooides*, *D. longicatena* sp. nov. 111-35 mit *C. coccooides* und *E. coli* mit *Methanobrevibacter* RT-1 untersucht.

3.4.1. Wachstum von *Eubacterium hadrum* 271 in WCA-Medium

Der Vergleich der Fermentationsprodukte von wachsenden Zellen von *E. hadrum* 271 in WCA-Medium unter einer N₂- bzw. einer N₂/CO₂-Atmosphäre ergab keine Unterschiede. Unter beiden Bedingungen wurden pro mol Glucose, die im WCA-Medium enthalten war, 0,45 mol Acetat, 1,1 mol Butyrat und 1,7 mol H₂ gebildet (Abb. 3.3). Berücksichtigt man jedoch, daß bei wachsenden Zellen zusätzlich die gebildete Zellsubstanz (KRUMHOLZ & BRYANT; 1986) und bei der Fermentation entstehendes CO₂ in die Kohlenstoffbilanz eingeht, müssen aus dem WCA-Medium weitere Kohlenstoffquellen neben Glucose umgesetzt worden sein. Neben Pyruvat zählen dazu auch einige Aminosäuren (besonders Serin, Phenylalanin), deren Konzentration im Laufe der Inkubation abnahm und die somit höchstwahrscheinlich durch *E. hadrum* 271 genutzt wurden. Die Konzentration aller 15 untersuchten Aminosäuren (Alanin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Glycin, Histidin, Isoleucin, Leucin, Lysin, Methionin, Phenylalanin, Serin, Threonin, Tyrosin, Valin) mit Ausnahme von Arginin verringerte sich bis zum Ende der Inkubation um jeweils 0,4-1,7 mM.

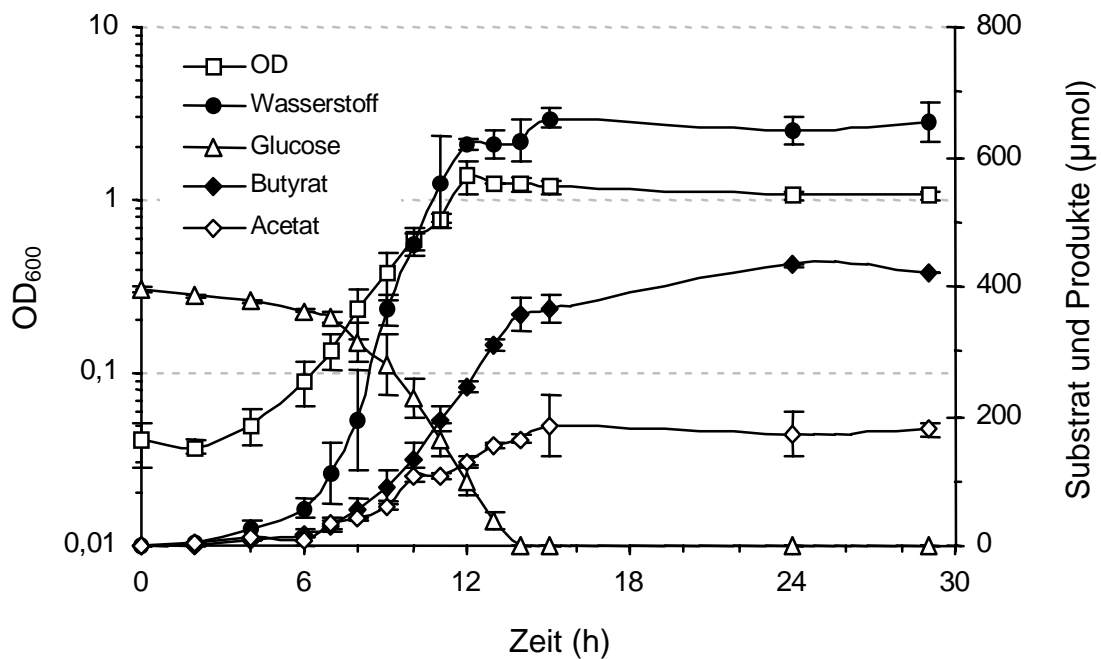


Abbildung. 3.3 Wachstum und Bildung von Fermentationsprodukten durch *Eubacterium hadrum* 271 in 50 ml WCA-Medium mit einer N_2/CO_2 -Atmosphäre bei 37 °C. Die dargestellten Werte repräsentieren Mittelwerte \pm SD (n=4).

3.4.2. Wachstum von *Clostridium perfringens* V in WCA-Medium

Ebenso wie *E. hadrum* 271 konnte für *C. perfringens* V in WCA-Medium unter N_2/CO_2 auch unter Einbeziehung der gebildeten Zellsubstanz (KRUMHOLZ & BRYANT, 1986) keine ausgeglichene Kohlenstoffbilanz erhalten werden. *C. perfringens* V bildete pro mol im Medium enthaltener Glucose 1,3 mol Acetat, 0,5 mol Butyrat, 2,2 mol H_2 und unter der Maßgabe einer ausgeglichenen Redoxbilanz kalkulierte 1,6 mol CO_2 (Abb. 3.4). Allerdings offenbarte die Analyse der Konzentrationen der einzelnen Aminosäuren (s. o.) im Medium mit Ausnahme von Arginin und Serin keinen Verbrauch von Aminosäuren. Bis auf die genannten Ausnahmen stieg die Konzentration der Aminosäuren im Medium durch die proteolytische Aktivität von *C. perfringens* V an.

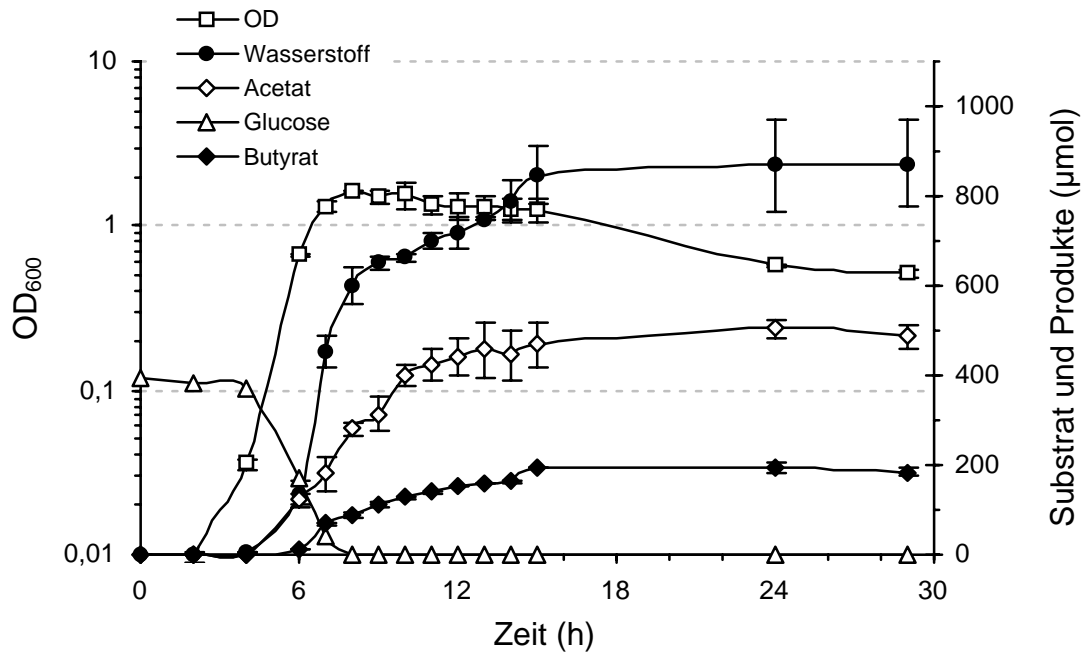


Abbildung 3.4 Wachstum und Bildung von Fermentationsprodukten von *Clostridium perfringens* V in WCA-Medium unter einer Atmosphäre von N_2/CO_2 . Die dargestellten Werte repräsentieren Mittelwerte \pm SD (n=4).

3.4.3. Wachstum von *C. perfringens* V und *E. hadrum* 271 in Tryptonmedien

Da aus den vorangegangenen Untersuchungen deutlich wurde, daß *C. perfringens* V und *E. hadrum* 271 bei Wachstum in WCA-Medium neben Glucose weitere C-Quellen nutzten, wurde ein Medium hergestellt, das von den möglichen Kohlenstoffquellen des kommerziell erhältlichen WCA-Mediums nur noch Trypton enthielt, ansonsten aber dem WCA-Medium entsprach. Dieser Versuchsansatz war notwendig geworden, da sowohl *C. perfringens* V als auch *E. hadrum* 271 nicht in BIC3-Minimalmedium mit nur einer Kohlenstoff- und Energiequelle zu kultivieren waren. Indem die Tryptonkonzentration im Medium zwischen 2 g/l und 12 g/l variiert wurde, und zudem Varianten mit und ohne Glucose (1 g/l) hergestellt wurden, konnten sowohl die minimalen Wachstumsansprüche von *C. perfringens* V und *E. hadrum* 271 ermittelt werden, als auch die von wachsenden Zellen pro mol Glucose gebildete Menge H_2 festgestellt werden (Tab. 3.4). Dabei blieb die erreichbare OD_{600} sowohl für *C. perfringens* V als auch für *E. hadrum* 271 deutlich unterhalb der OD_{600} in WCA-Medium und wurde sehr viel langsamer erreicht als in WCA-Medium (> 50 h). Erst mit mindestens 8 g/l Trypton wuchsen *C. perfringens* V

und *E. hadrum* 271 und bildeten H₂. In der tabellarischen Übersicht (Tab. 3.4) wird deutlich, daß Glucose die hauptsächliche Quelle von Wachstum und H₂-Bildung in Trypton-Medium mit 8 bzw. 12 g Trypton pro Liter Medium war. Rechnerisch ergibt sich die Bildung von 1,2 mol H₂ pro mol fermentierter Glucose durch *E. hadrum* 271. Für *C. perfringens* V ließ sich keine sichere Bilanz aufstellen, da auch in den Tryptonmedien ohne Glucose noch H₂ gebildet wurde, sofern die Kulturen wuchsen. Folglich fermentierte *C. perfringens* V neben der Glucose weitere Kohlenstoffquellen aus Trypton, während *E. hadrum* 271 aus Trypton keine H₂ mehr bildete. In weiteren Versuchen konnte für *C. perfringens* V mit dem HA-Medium ein Minimalmedium gefunden werden, in dem der gesamte Wasserstoff aus der Fermentation des zugesetzten Substrates stammte und keine weiteren Kohlenstoffquellen genutzt wurden.

Tabelle 3.4 Wachstum und H₂-Bildung durch *Clostridium perfringens* V und *Eubacterium hadrum* 271 in Varianten eines Trypton-haltigen Mediums auf Basis des WCA-Mediums mit einer N₂/CO₂-Atmosphäre. Das Tryptonmedium enthielt pro Liter 5 g NaCl, 0,5 mg Vitamin K₃, 5 mg Hämin, 1 mg Resazurin und die in der Tabelle angegebenen Mengen Trypton und Glucose.

Tryptonmedien		<i>Clostridium perfringens</i> V		<i>Eubacterium hadrum</i> 271	
Trypton (g/l)	Glucose (g/l)	maximal gebildeter H ₂ (µmol/ml Medium)	maximale OD ₆₀₀	maximal gebildeter H ₂ (µmol/ml Medium)	maximale OD ₆₀₀
0	0	-	-	-	-
0	1	-	-	-	-
2	0	-	-	-	-
2	1	-	-	-	-
4	0	0,08	0,01	-	-
4	1	0,09	0,02	-	-
8	0	0,10	0,02	0,39	0,02
8	1	9,97	0,17	7,03	0,55
12	0	4,58	0,20	0,85	0,04
12	1	17,66	0,21	7,55	0,60

-, H₂ nicht detektiert bzw. kein Wachstum

3.4.4. Substratverwertung durch *Clostridium perfringens* V und *Escherichia coli* B5

Für die geplanten Tierversuche wurden Lactulose, Inulin und Sorbitol als Testsubstanzen ausgewählt, die bei oraler Applikation den Dickdarm erreichen und dort als Substrat der bakteriellen H₂-Bildung dienen können (CUMMINGS & MACFARLANE, 1991). Ihre Umsetzung durch *Clostridium perfringens* V wurde zuvor *in vitro* untersucht. Dazu wurde *C. perfringens* V in Tryptonmedium mit 14 g Trypton pro Liter Medium, das keine Glucose enthielt, gemeinsam mit den zu untersuchenden Substanzen inkubiert. Aus Tabelle 3.5 ist ersichtlich, daß *C. perfringens* V Lactulose, nicht aber Inulin und Sorbitol, fermentierte. Daraufhin wurde Lactulose für die durchzuführenden Tierversuche als Supplement zur Fütterung ausgewählt.

Auch für *E. coli* B5 wurde die Umsetzung von verschiedenen Testsubstanzen untersucht, da dieser Stamm ebenfalls in den Tierexperimenten verwendet werden sollte. Zusätzlich zu Lactulose und Inulin (Raftiline[®] HP, Orafti) wurden Fructooligosaccharide (FOS, Raftilose[®] P95, Orafti) als Substrat eingesetzt. Im Gegensatz zu den Fermentationen mit *C. perfringens* V wurde allerdings BIC3 als Basismedium verwendet. Auch *E. coli* B5 verwertete kein Inulin, nutzte *in vitro* aber FOS und Lactulose. Deswegen wurden in den Tierversuchen mit Ratten, die mit *E. coli* B5 assoziiert wurden, Lactulose und FOS eingesetzt. Die Verwertung weiterer Substrate durch *C. perfringens* V wurde mittels des API 50 CHL-Systems untersucht und ist in Tabelle 7.4 im Anhang dargestellt.

Tabelle 3.5 Fermentation von verschiedenen Substraten durch *Clostridium perfringens* V und *Escherichia coli* B5 in Tryptonmedium bzw. BIC3-Medium

Substrate			<i>Clostridium perfringens</i> V		<i>Escherichia coli</i> B5	
	mg	µmol	OD ₆₀₀	H ₂ (µmol)	OD ₆₀₀	H ₂ (µmol)
ohne	-	-	0,42	61,9	0,11	23
Glucose	180	1000	n. d.	n. d.	1,6	275
FOS	200	n. d.	n. d.	n. d.	0,8	230
Inulin	200	n. d.	0,46	74,4	0,14	20
Lactulose	171	500	1,12	820,8	1,4	280
Sorbitol	91	500	0,43	89,5	n. d.	n. d.

n. d., nicht durchgeführt

Die Generationszeiten, die *E. coli* B5 bei Wachstum mit Glucose oder FOS als alleiniger Kohlenstoff- und Energiequelle erreichte, sind mit 1,75 bzw. 1,86 h sehr ähnlich. Die Fermentation von Lactulose führte hingegen zu Generationszeiten von 4,17 h. Die Fermentationsbilanz läßt sich für wachsende Zellen nach KRUMHOLZ & BRYANT (1986) durch Einbeziehung des Zellkohlenstoffes (BARKER, 1936) berechnen, wenn angenommen wird, daß 50% der Zelle aus Protein bestehen und die Zellzusammensetzung $C_{4,86}H_{8,85}O_{2,41}N$ plus 7,4% Asche beträgt (LYND et al., 1982). Demnach wurden durch *E. coli* 100 mol Lactulose (\pm SD) zu 11,5 (\pm 1,2) mol Formiat, 119,0 (\pm 7,9) mol Ethanol, 65,3 (\pm 7,9) mol Acetat, 33,9 (\pm 5,4) mol Succinat, 97,0 (\pm 9,8) mol Lactat und 56,0 (\pm 9,6) mol H_2 fermentiert. Außerdem ließ sich die Bildung von 125,8 mol CO_2 berechnen, die notwendig sind, um eine ausgeglichene Redoxbilanz zu erreichen. Gemeinsam mit dem Zellproteintrag von 2,3 (\pm 0,02) g/mol Lactulose ergab sich eine Wiederfindungsrate für Kohlenstoff von 79,2%. Mit Glucose als Substrat erreichte *E. coli* B5 mit 3,74 (\pm 0,04) g Protein/mol Glucose einen höheren Zellertrag. Außerdem wurde pro mol Hexose wesentlich mehr Lactat und Formiat aber weniger Acetat und Succinat gebildet. Insgesamt wurden 100 mol Glucose zu 10,2 (\pm 4,0) mol Formiat, 56,6 (\pm 6,3) mol Ethanol, 22,5 (\pm 3,3) mol Acetat, 8,8 (\pm 0,1) mol Succinat, 91,6 (\pm 2,9) mol Lactat und 27,5 (\pm 0,6) H_2 fermentiert. Gemeinsam mit der errechneten Bildung von 60,4 mol CO_2 ergab sich eine Kohlenstoffwiederfindung von 94,5%. In diesen Fermentationen wurde durch *E. coli* unabhängig von der Kohlenstoffquelle zunächst Formiat gebildet, dessen Konzentration im Medium ab der späten logarithmischen Wachstumsphase abnahm, während die H_2 -Konzentration in der Gasphase gleichzeitig zunahm.

3.4.5. Kokultivierung von *Clostridium coccooides* mit *Clostridium perfringens* V bzw. mit *Dorea longicatena* 111-35

Da das acetogene *C. coccooides* in den Tierversuchen als H_2 -nutzende Spezies eingesetzt werden sollte, wurden Kokulturen mit *C. coccooides* und H_2 -bildenden Spezies *in vitro* untersucht. Für das Experiment wurde HA-Medium verwendet, da *C. perfringens* in WCA-Medium *C. coccooides* überwuchs und *C. coccooides* sich schon nach 8 h Inkubation im Phasenkontrastbild nicht mehr nachweisen ließ. Außerdem nutzte eine Reinkultur von *C. coccooides* in WCA-Medium nicht den

angebotenen Wasserstoff, um Acetat zu bilden, sondern wuchs auf Glucose. In HA-Medium ließen sich sowohl *C. perfringens* V als auch *D. longicatena* 111-35 mit *C. coccoides* kokultivieren. Die Bilanzen der entsprechenden Reinkulturen und Kokulturen sind in Tabelle 3.6 dargestellt. Ein H_2 -Transfer ließ sich in Kokulturen von *C. perfringens* V und *C. coccoides* nur beobachten (Abb. 3.6), wenn das Medium mit Formiat supplementiert worden war. *C. coccoides* benötigt Formiat zum Wachstum (KAMLAGE et al., 1997). Hingegen fand in der Kokultur von *D. longicatena* 111-35 mit *C. coccoides* offenbar ein Transfer von Wasserstoff und Formiat statt, so daß Formiat nicht supplementiert werden mußte (Abb. 3.5).

Zur Kokultivierung von *D. longicatena* 111-35 mit *C. coccoides* wurde L-Arabinose als Substrat für *D. longicatena* 111-35 eingesetzt, da *C. coccoides* L-Arabinose nur sehr langsam und unvollständig umsetzt (KAMLAGE et al., 1997). Dies wurde in Vorversuchen überprüft, so daß davon ausgegangen werden konnte, daß nur *D. longicatena* 111-35 die L-Arabinose umsetzte. Die Fermentation von L-Arabinose durch *C. coccoides* würde zudem neben Acetat auch zu Succinat und D-Lactat als Endprodukten führen, die beide in den Versuchen nicht beobachtet wurden.

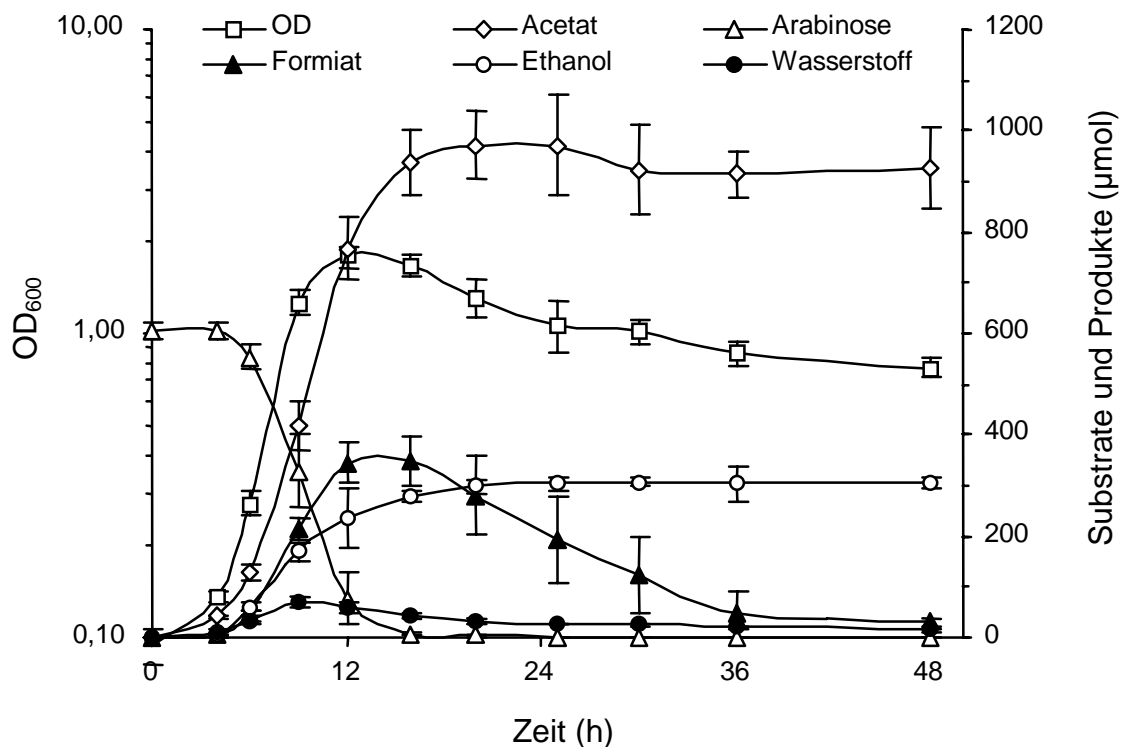


Abbildung 3.5 Wachstum und Fermentationsprodukte einer Kokultur von *D. longicatena* 111-35 und *C. coccoides* in 50 ml HA-Medium mit 10 mM L-Arabinose unter einer N_2/CO_2 -Atmosphäre. Das HA-Medium enthielt Pepton in einer Endkonzentration von 0,5 g/l. Die dargestellten Werte repräsentieren Mittelwerte \pm SD (n=4).

In Tabelle 3.6 sind die Ergebnisse der Kokulturen mit *C. coccooides* zusammengefaßt. Dabei wurde wiederum nach KRUMHOLZ & BRYANT (1986) der Zellkohlenstoff aus dem gemessenen Zellprotein errechnet (s. o.).

Tabelle 3.6 Fermentationsbilanzen für die Rein- und Kokulturen von *C. coccooides*, *C. perfringens* V und *D. longicatena* 111-35 in HA-Medium, das Pepton in einer Endkonzentration von 0,5 g/l enthielt. Als Substrat dienten 10 mM L-Arabinose, 5 mM Lactulose oder 25% Wasserstoff in einer N₂/CO₂-Gasphase. Die Kulturen wurden bei 37 °C und 140 U/min geschüttelt.

	Spezies				
	<i>D. longicatena</i> 111-35	<i>D. longicatena</i> 111-35 + <i>C. coccooides</i>	<i>C. coccooides</i>	<i>C. perfringens</i> V + <i>C. coccooides</i>	<i>C. perfringens</i> V
Gasphase	N ₂ /CO ₂	N ₂ /CO ₂	N ₂ /H ₂ /CO ₂	N ₂ /CO ₂	N ₂ /CO ₂
Elektronendonator	Arabinose	Arabinose	H ₂	Lactulose	Lactulose
<u>mol / 100 mol Elektronendonator:</u>					
<u>verbraucht:</u>					
Formiat	-	-	68,3 [†]	308,6 [†]	-
H ₂	-	-	100 [†]	-	-
CO ₂ [*]	-	-	15,9	-	-
<u>gebildet[#]:</u>					
Acetat	98	148	39	342,1	58,3
Butyrat	-	-	-	4,9	83,3
Formiat	71	3,7	-	-	-
Ethanol	64	49,9	-	-	-
Propionat	-	-	-	-	1,3
Lactat	-	-	-	-	-
H ₂	40	2,3	-	8,6	356,7
CO ₂ [*]	48,5	49,2	-	163,5	262,3
Proteinерtrag (g/mol genutztem Elektronendonator)	14,50	14,76	0,63	16,58	16,04
Kohlenstoffwiederfindung (%)	109,9	111,9	98,0	65,3	64,7
Generationszeit (h)	0,91	0,86	9,4	2,1	5,6

* CO₂ unter der Prämisse einer ausgeglichenen Redoxbilanz errechnet

Produktmengen sind Nettomengen am Ende der Fermentation

† Substanzen wurden zu Beginn der Fermentation zugesetzt

Aus Tabelle 3.6 ergeben sich die Fermentationsbilanzen (in µmol) der Reinkulturen von *D. longicatena* 111-35 (I.) und *C. coccooides* (II.). Dazu wurde die Stoffwechselbilanz von *C. coccooides* (II.) auf H₂-Konzentrationen berechnet, die von

Reinkulturen von *D. longicatena* 111-35 gebildet wurden, um einen Vergleich des umgesetzten Wasserstoffes zu erleichtern. Die experimentell ermittelte Bilanz der Kokultur von *C. coccooides* mit *D. longicatena* weist Gleichung III. (μmol) aus:

- I. $100 \text{ Arabinose} \rightarrow 98 \text{ Acetat} + 71 \text{ Formiat} + 40 \text{ H}_2 + 64 \text{ Ethanol} + 48,5 \text{ CO}_2 + 1450 \mu\text{g Protein}$
- II. $27,3 \text{ Formiat} + 40 \text{ H}_2 + 6,35 \text{ CO}_2 \rightarrow 15,6 \text{ Acetat} + 25,2 \mu\text{g Protein}$
- III. $100 \text{ Arabinose} \rightarrow 148 \text{ Acetat} + 3,7 \text{ Formiat} + 49,9 \text{ Ethanol} + 49,2 \text{ CO}_2 + 1475,6 \mu\text{g Protein}$

Im Vergleich zur Reinkultur bildete *D. longicatena* 111-35 in Kokultur weniger Ethanol. Außerdem entstand in Kokultur mehr Acetat aber weniger Formiat, und die Kokultur wies eine kürze Generationszeit auf als die jeweiligen Reinkulturen. Für *C. coccooides* ist die Beschleunigung der Generationszeit besonders augenfällig. Aus Abbildung 3.5 wird ersichtlich, daß Formiat und H_2 in der frühen Wachstumsphasen netto gebildet und in der späten Wachstumsphase netto genutzt wurden.

Für Reinkulturen von *C. coccooides* wurde in Vorversuchen zunächst gezeigt, daß durch wiederholten Transfer in formiathaltiges Medium unter H_2/CO_2 *C. coccooides* erst nach 15 h begann, vorhandene Lactulose zu verwerten. Dies liegt an der erst spät einsetzenden Induktion der entsprechenden Enzyme durch *C. coccooides* (KAMLAGE, 1998, persönliche Mitteilung). Deswegen konnte angenommen werden, daß *C. perfringens* die gesamte Lactulose umsetzte. Aus Tabelle 3.6 ergeben sich analog zur ersten Kokultur die Fermentationsbilanzen der Reinkulturen von *C. perfringens* (IV.) und *C. coccooides* (V.). Hier orientiert sich die Fermentationsbilanz von *C. coccooides* im Gegensatz zu Gleichung II. an der Formiatmenge, die dem Medium des Kokulturansatzes zugegeben wurde und von *C. coccooides* auch vollständig umgesetzt wurde (Tab. 3.6). Die experimentell gemessene Bilanz der Kokultur (in μmol) stellt Gleichung VI. dar.

- IV. $100 \text{ Lactulose} \rightarrow 58,3 \text{ Acetat} + 83,3 \text{ Butyrat} + 356,7 \text{ H}_2 + 1,3 \text{ Propionat} + 262,3 \text{ CO}_2 + 1604 \mu\text{g Protein}$
- V. $308,6 \text{ Formiat} + 452,2 \text{ H}_2 + 71,8 \text{ CO}_2 \rightarrow 176,3 \text{ Acetat} + 284,7 \mu\text{g Protein}$
- VI. $100 \text{ Lactulose} + 308,6 \text{ Formiat} \rightarrow 342,1 \text{ Acetat} + 4,9 \text{ Butyrat} - 8,6 \text{ H}_2 + 163,5 \text{ CO}_2 + 1658 \mu\text{g Protein}$

Durch die Kokultur wurde wesentlich mehr Acetat gebildet als durch die Reinkultur von *C. perfringens*, während weniger Butyrat und H_2 in der Nettobilanz auftauchten. Außerdem wurde kein Propionat gebildet. Die Generationszeit in der Kokultur lag deutlich unterhalb derjenigen der entsprechenden Reinkulturen. In Abbildung 3.6 sind Wachstum und Stoffwechsellleistung der Kokultur von *C. coccoides* und *C. perfringens* dargestellt.

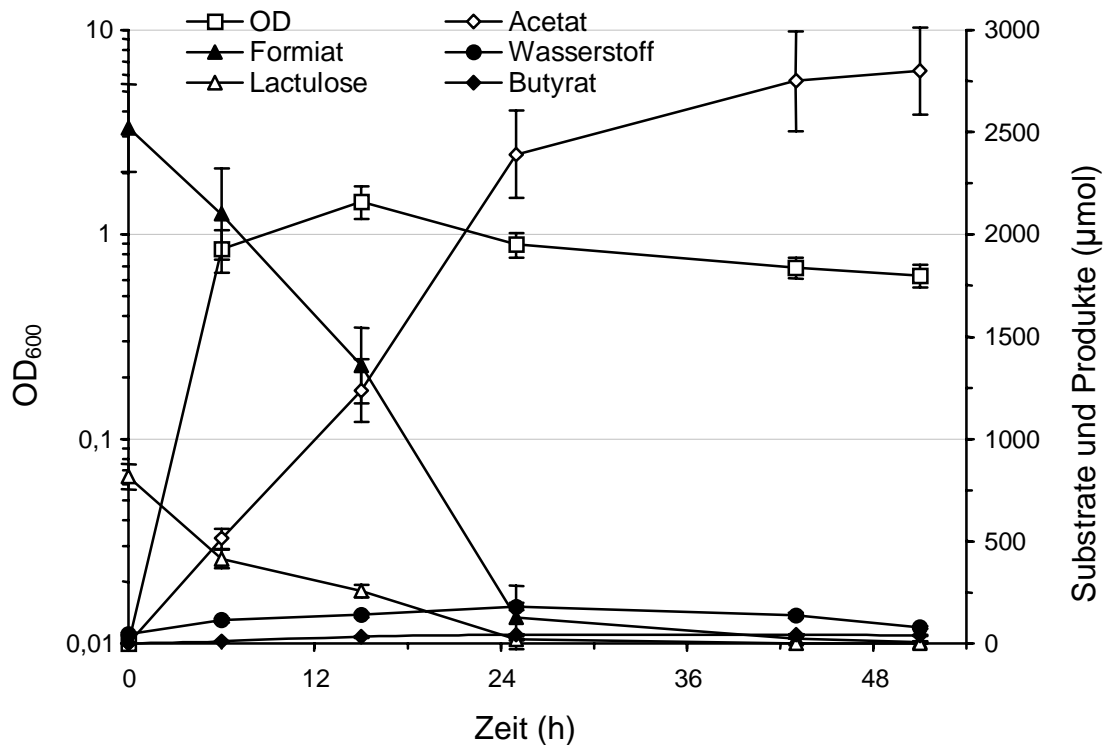


Abbildung 3.6 Wachstum und Fermentationsprodukte der Kokultur von *C. perfringens* V und *C. coccoides* unter einer N_2/CO_2 -Atmosphäre in 50 ml HA-Medium mit 60 mM Formiat. Das HA-Medium enthielt außerdem Pepton (0,5 g/l) und wurde bei 37 °C und 140 U/min inkubiert. Die dargestellten Werte repräsentieren Mittelwerte \pm SD (n=4).

Wenn *C. coccoides* einer wachsenden Kultur von *C. perfringens* erst zugefügt wurde, wenn diese die maximale H_2 -Konzentration in der Gasphase erreicht hatte, ergaben sich wiederum andere Fermentationsbilanzen. Solche Kokulturen bildeten mehr Butyrat und H_2 jedoch weniger Acetat als Kokulturen, die gleichzeitig mit *C. coccoides* und *C. perfringens* inokuliert worden waren. Die Kohlenstoffwiederfindung betrug dann 66,7% und die vollständige Bilanz (in µmol) lautete:

100 Lactulose + 312,4 Formiat \rightarrow 253,5 Acetat + 42,3 Butyrat + 56,3 H₂ + 0,4 Propionat + 226,9 CO₂ + 1380 μ g Protein

3.4.6. Kokultur von *Escherichia coli* B5 und *Methanobrevibacter* RT-1

In Balchmedium 1 ließen sich *E. coli* B5 und *Methanobrevibacter* RT-1 in einer definierten Mischkultur kultivieren. *Methanobrevibacter* RT-1 setzte in Kokultur den von *E. coli* B5 gebildeten Wasserstoff vollständig um. Das im Medium vorhandene Formiat sowie das von *E. coli* B5 zunächst produzierte Formiat wurden nicht ganz vollständig umgesetzt (Abb. 3.7).

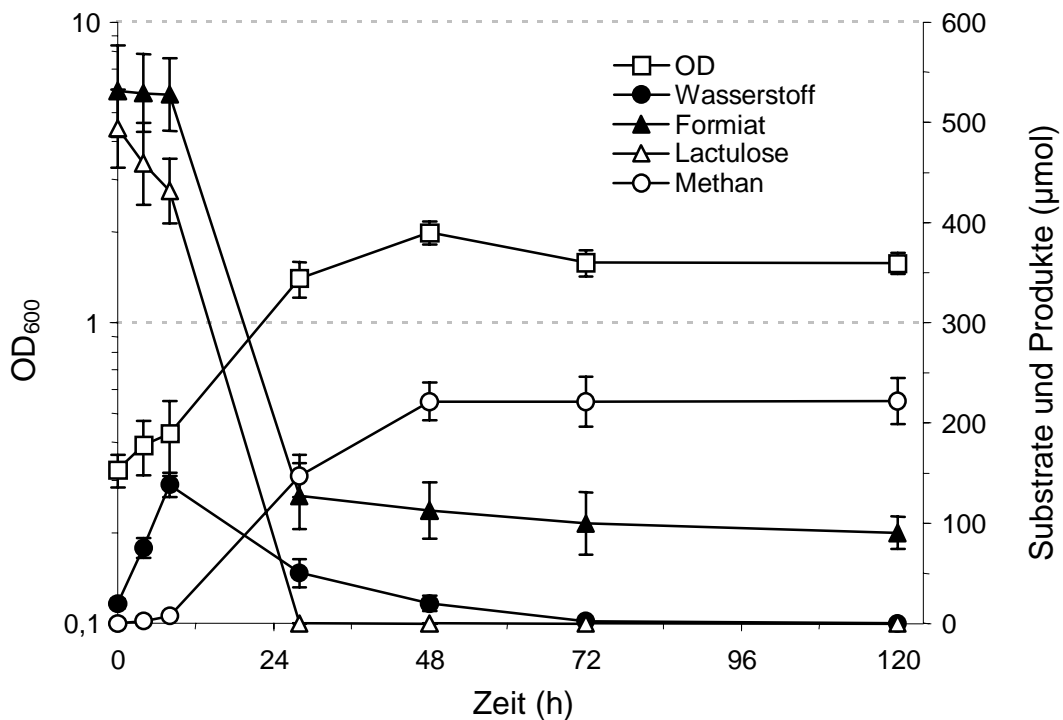


Abbildung 3.7 Wachstum und Fermentationsprodukte der Kokultur von *E. coli* und *Methanobrevibacter* RT-1 mit 22 mM Lactulose unter einer N₂/CO₂-Atmosphäre in Balchmedium 1. *Methanobrevibacter* RT-1 und *E. coli* wurden zeitgleich inokuliert. Die dargestellten Werte repräsentieren Mittelwerte \pm SD (n=4).

Dabei machte es hinsichtlich der gebildeten Produkte im Gegensatz zu den Kokulturen von *C. coccoides* mit *C. perfringens* fast keinen Unterschied, ob *Methanobrevibacter* RT-1 gemeinsam mit *E. coli* zu Beginn der Inkubation inokuliert wurde oder erst inokuliert wurde, wenn die Lactulosemenge im Kulturgefäß nach 28 h schon fast verbraucht worden war (Tab. 3.7).

Tabelle 3.7 Fermentationsbilanzen für die Rein- und Kokulturen von *E. coli* und *Methanobrevibacter* RT-1 in Balchmedium 1 mit den angegebenen Gasphasen N₂/CO₂ (80/20, v/v) bzw. N₂/H₂/CO₂ (64/20/16, v/v/v).

	Spezies			
	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> + <i>Methanobrevibacter</i> RT-1 (gleichzeitig inokuliert)	<i>E. coli</i> + <i>Methanobrevibacter</i> RT-1 (M. RT-1 erst nach 28 h inokuliert)	<i>Methanobrevibacter</i> RT-1
Gasphase	N ₂ /CO ₂	N ₂ /CO ₂	N ₂ /CO ₂	N ₂ /H ₂ /CO ₂
Elektronendonator	Lactulose	Lactulose	Lactulose	H ₂
mol/100 mol Elektronendonator:				
<u>verbraucht:</u>				
Formiat	88,4 [†]	89,2 [†]	89,9 [†]	44,1 [†]
H ₂	-	-	-	100 [†]
CO ₂	-	-	-	-
<u>gebildet[#]:</u>				
Acetat	128	101,4	128,1	-
Butyrat	-	-	-	-
Formiat	-	-	-	-
Ethanol	136,6	164,3	166,3	-
Succinat	58,9	52,7	49,4	-
Lactat	25,4	15,8	15,7	-
H ₂	121,5	-	-	-
CH ₄	-	44,8	44,7	34,5
CO ₂ [*]	212,1	227,4	233,7	6,54
Proteinерtrag (g/mol genutztem Elektronendonator)	15,04	12,57	18,42	0,26
Kohlenstoffwiederfindung (%) [§]	90,5	89,7	97,8	97,6

* CO₂ unter der Prämisse einer ausgeglichenen Redoxbilanz errechnet

Produktmengen sind Nettomengen am Ende der Fermentation

† Substanzen wurden zu Beginn der Fermentation zugesetzt

§ Kohlenstoffwiederfindung berechnet nach KRUMHOLZ & BRYANT (1986)

Während *E. coli* B5 bei zeitgleicher Inokulation mit *Methanobrevibacter* RT-1 die Lactulose innerhalb von 28 h verbrauchte, benötigte *E. coli* B5 ohne *Methanobrevibacter* RT-1 hierfür 48 h (Abb. 3.8). Auch die Umsetzung von Formiat verlief in Kokulturen, die erst 28 h nach *E. coli* B5 mit *Methanobrevibacter* RT-1 inokuliert worden waren, langsamer. In dieser Kokultur erreichte der H₂-Partialdruck durch die zunächst fehlende Methanbildung zudem einen höheren Maximalwert. Kleinere Abweichungen zwischen den zu unterschiedlichen Zeitpunkten inokulierten Kokulturen ergaben sich in den produzierten Acetatmengen. Dabei sollte allerdings

beachtet werden, daß die Kohlenstoffwiederfindungsrate um 8% niedriger lag. (Tab. 3.7).

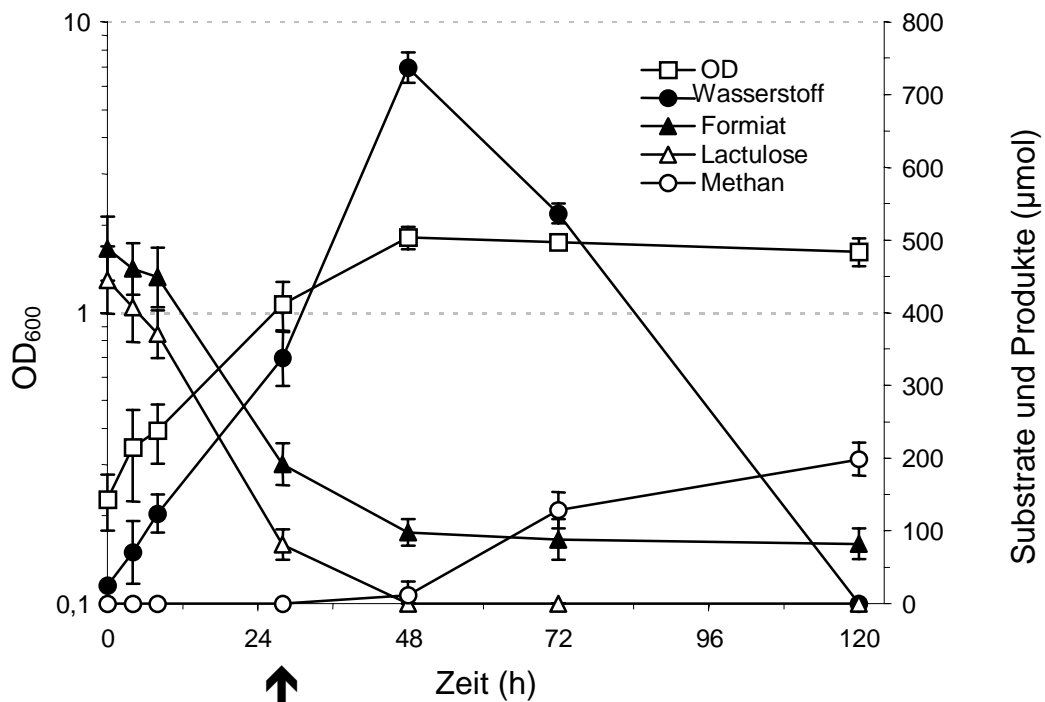


Abbildung 3.8 Wachstum und Fermentationsprodukte der Kokultur von *E. coli* und *Methanobrevibacter* RT-1 mit 20 mM Lactulose unter einer N₂/CO₂-Atmosphäre in Balchmedium 1. *Methanobrevibacter* RT-1 wurde der *E. coli*-Kultur nach 28 h zugefügt (↑). Die dargestellten Werte repräsentieren Mittelwerte ± SD (n=4).

3.4.7. Zusammenhang von Netto-H₂-Bildung und Zellzahl in Faeces

In anaeroben Faeces-Verdünnungen in Medium mit Inhibitoren der Methanogenese und der bakteriellen Sulfatreduktion (BES, Natriummolybdat) wurde die Fähigkeit zur H₂-Bildung *in vitro* mit der Zellzahl H₂-produzierender Bakterienpopulationen in Faeces korreliert. Dabei trat H₂-Bildung in allen Verdünnungen auf, die auch bakterielles Wachstum aufwiesen (Tab. 3.8). In Fermentationen mit Faeces der Verdünnungsstufe 10⁻⁷ wurde nach 24 h mit durchschnittlich 3,59 μmol H₂/ml supplementiertem WCA-Medium die stärkste H₂-Bildung beobachtet. Auch in den Verdünnungsstufen 10⁻¹, 10⁻⁵ und 10⁻⁶ wurde eine überdurchschnittliche H₂-Bildung im Vergleich zu den anderen Verdünnungen beobachtet. Allerdings wiesen diese Kulturen ebenso wie die Inkubation der 10⁻⁷-Verdünnung auch die stärkste Standardabweichung zwischen den vier Parallelansätzen auf. In diesem

Zusammenhang soll darauf hingewiesen werden, daß mit Homoacetogenese und Nitratreduktion noch weitere Wege der H₂-Nutzung möglich sind, die im Ansatz nicht inhibiert wurden und somit das Ergebnis beeinflussen können.

Tabelle 3.8 H₂-Bildung durch Inkubationen von Faeces-Verdünnungen in WCA-Medium supplementiert mit 20 mM BES und 20 mM Natrium-Molybdat. Dargestellt sind die Mittelwerte aus vier Parallelansätzen.

	inkubierte Faeces-Verdünnungsstufe										
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	10 ⁻¹⁰	10 ⁻¹¹
µmol H ₂ /ml Medium (± SD)	1,51 (0,59)	0,68 (0,31)	0,77 (0,16)	0,79 (0,19)	1,66 (0,57)	1,26 (0,30)	3,59 (1,78)	0,90 (0,11)	0,57 (0,25)	0,97 (0,24)	0,75 (0,29)

3.5. Fermentationsexperimente mit ruhenden Zellen

Im Zuge der Charakterisierung der neu isolierten Spezies *Dorea longicatena* sp. nov. wurden Experimente mit ruhenden Zellen zur Fermentation von Glucose unter einer N₂- bzw. einer N₂/CO₂-Atmosphäre durchgeführt. In Experimenten mit N₂/CO₂ betrug die Kohlenstoffwiederfindung 96,4%. Unter N₂ wurden jedoch nur 78,9% des eingesetzten Kohlenstoffs wiedergefunden. *D. longicatena* sp. nov. bildete aus Glucose annähernd äquimolare Mengen von Ethanol und Wasserstoff unabhängig von der Zusammensetzung der Gasphase. Unter N₂/CO₂ wurde 1 mol Glucose (±SD) zu 1,01 (±0,09) mol Ethanol, 1,70 (±0,02) mol Formiat, 0,71 (±0,05) mol Acetat, 0,95 (±0,04) mol H₂ und 0,64 (±0,01) mol CO₂ fermentiert. In Experimenten mit einer N₂-Atmosphäre wurde im Vergleich zu einer N₂/CO₂-Atmosphäre und in Anbetracht der geringeren Kohlenstoffwiederfindung im Verhältnis der einzelnen Endprodukte untereinander wesentlich weniger Formiat gebildet. Im einzelnen wurden aus 1 mol Glucose 0,82 (±0,03) mol Ethanol, 1,09 (±0,18) mol Formiat, 0,59 (±0,05) mol Acetat, 1,05 (±0,13) mol H₂ und 0,82 (±0,12) mol CO₂ gebildet.

3.6. Experimente im gnotobiotischen Rattenmodell

Neben den Untersuchungen *in vitro* wurde der H₂-Metabolismus auch *in vivo* im gnotobiotischen Rattenmodell untersucht. Bei diesen Experimenten wurden H₂-produzierende und H₂-oxidierende Spezies in einem neu entwickelten Versuchssystem eingesetzt.

3.6.1. Überprüfung des Versuchsaufbaus

Vor Beginn der Tierversuche wurde die Fähigkeit des Versuchssystems getestet, definierte Konzentrationen an H₂ aufrechtzuerhalten. Zu diesem Zweck wurden bekannte Mengen an H₂ über die Probenentnahmestelle ins System injiziert und die H₂-Konzentration über 48-96 h verfolgt. Während dieser Testphase konnte keine Änderung der H₂-Konzentration im System beobachtet werden, was die Gasdichtigkeit des Systems belegte. Auch während der Versuche mit keimfreien sowie assoziierten Ratten wurde niemals ein Abfall der Wasserstoffkonzentration innerhalb von 24 h beobachtet, was ebenfalls für die verlustfreie Akkumulation von H₂ im System spricht.

Weiterhin wurde in Anwesenheit eines Versuchstieres die Funktion des Lebenserhaltungssystems durch Messung der O₂-Konzentration, der Luftfeuchtigkeit und der Umgebungstemperatur geprüft. Die freundlicherweise durch Dr. Frenz (DIfE, Potsdam-Rehbrücke) mittels NMR (Nuclear Magnetic Resonanz) ermittelte O₂-Konzentration im System bewegte sich zu den Analysezeitpunkten (5, 10, 15, 20 und 25 h) zwischen 17 und 19,5%. Die Luftfeuchtigkeit im System betrug 40-55% bei konstanten Temperaturen von 22 ± 2 °C in der Tierkammer.

Die gleichmäßige Verteilung des Gasvolumens innerhalb des Systems wurde anhand der Geschwindigkeit, mit der sich eine injizierte H₂-Menge im System verteilte, beurteilt. Je nach injizierter H₂-Menge war eine homogene Verteilung, gemessen an der gleichbleibenden H₂-Konzentration im System, nach spätestens 10 min erreicht.

Durch regelmäßige mikrobiologische Kontrollen wurde sichergestellt, daß der definierte mikrobielle Status der Versuchstiere nicht durch systemimmanente Konstruktionsdetails des Versuchsaufbaus beeinflusst wurde. Es wurde gezeigt, daß