

der gnotobiotische Status der Versuchstiere für mindestens vier Monate aufrecht erhalten werden konnte. Zudem wurde mittels serologischer Methoden die Abwesenheit von Ratten-spezifischen Viren, Bakterien und Protozoen gemäß der FELASA-Richtlinien nachgewiesen (KRAFT *et al.*, 1994).

### 3.6.2. Monoassoziationen mit H<sub>2</sub>-produzierenden Organismen

Die Assoziation gnotobiotischer Ratten mit H<sub>2</sub>-bildenden Bakterien wurde mit *Clostridium perfringens* V, *Escherichia coli* B5, *Eubacterium hadrum* 271 und *Dorea longicatena* sp. nov. 111-35 angestrebt. Trotz wiederholter Versuche gelang weder mit *E. hadrum* 271 noch mit *D. longicatena* sp. nov. 111-35 eine Monoassoziation, während sich sowohl *C. perfringens* V als auch *E. coli* B5 stabil im Darm keimfreier Ratten ansiedeln ließen (3.7.3.). Die monoassoziierten Ratten schieden Wasserstoff aus, der mit dem entwickelten Meßsystem gemessen werden konnte, ohne den mikrobiologischen Status des Versuchstieres zu verändern. Dies ermöglichte die wiederholte Messung eines Tieres unter Einfluß verschiedener Diäten bzw. Testsubstanzen (s. u.) sowie definierter und kontrollierter sukzessiver Diassoziationen mit H<sub>2</sub>-verbrauchenden Organismen (3.6.3.).

Die H<sub>2</sub>-Ausscheidung von monoassoziierten Tieren wurde durch die eingesetzten Testsubstanzen, die verwendeten Diäten und die angesiedelten Organismen in charakteristischer Weise beeinflusst. Hierzu stellt eine Übersichtstabelle (Tab. 3.9) ausgewählte Ergebnisse der durchgeführten Monoassoziationen zusammen. In dieser Tabelle ist die von monoassoziierten Ratten insgesamt ausgeschiedene Menge H<sub>2</sub> dargestellt. Anhand der nach 23 h akkumulierten H<sub>2</sub>-Mengen wurden Gruppen, die sich in ihrer bakteriellen Besiedlung oder ihrer Diät unterschieden, hinsichtlich statistisch signifikanter Unterschiede untersucht. Die entsprechenden Ergebnisse werden im folgenden genannt, wobei hier nochmals auf ihre beschränkte Aussagefähigkeit (s. 2.25.) hingewiesen werden soll. In Tabelle 3.9 sind außerdem einzelne Raten der H<sub>2</sub>-Ausscheidung dargestellt. Die Unterscheidung der Ausscheidungsraten der ersten und der letzten Stunde der Meßperiode dient vor allem der Beurteilung der Frage, ob die H<sub>2</sub>-Ausscheidung am Ende der Meßperiode auf ihre Ausgangsrate zurückkehrt oder nicht.

**Tabelle 3.9** Ausgeschiedene H<sub>2</sub>-Gesamtmengen und H<sub>2</sub>-Bildungsraten monoassoziierter Ratten, denen Lactulose oder Wasser intragastral verabreicht wurde. Die Testsubstanz erhielten die Tiere jeweils kurz bevor sie in ein geschlossenes, gasdichtes Meßsystem verbracht wurden, in dem die sich während 23 h akkumulierende H<sub>2</sub>-Konzentration mittels einer elektrochemischen Meßzelle kontinuierlich erfaßt wurde und in dem den Ratten nur Trinkwasser aber keine Futterquelle zur Verfügung stand. Die dargestellten Meßwerte sind Medianwerte mehrerer mikrobiologisch und diätetisch gleichartig behandelter Tiere.

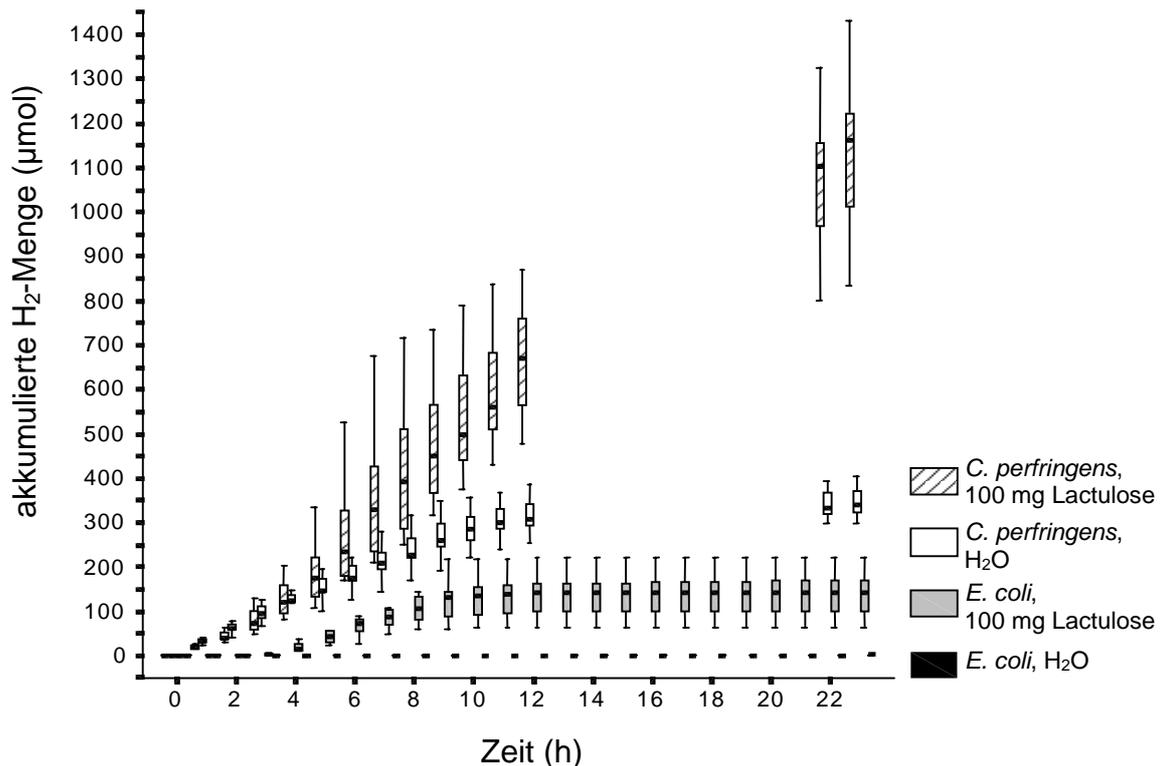
Besiedlung	Diät	verabreichte Testsubstanz	gesamte nach 23 h ausgeschiedene mediane H <sub>2</sub> -Menge (µmol) (Minimum/Maximum)	maximale Rate der medianen H <sub>2</sub> -Ausscheidung (µmol/h) (Minimum/Maximum)	Zeitpunkt maximaler H <sub>2</sub> -Ausscheidung (h)	mediane H <sub>2</sub> -Ausscheidungsrate (µmol/h) der ersten Stunde (t = 0-1 h) (Minimum/Maximum)	mediane H <sub>2</sub> -Ausscheidungsrate (µmol/h) der letzten Stunde (t = 22-23 h) (Minimum/Maximum)	Anzahl der Tiere	Versuchstiergruppe	
<i>Clostridium perfringens</i>	chemisch definierte Basisdiät	H <sub>2</sub> O	339,6 (298,9/403,9)	33,0 (25,4/44,9)	3	32,2 (23,3/42,3)	3,2 (1,7/4,6)	7	1	
		25 mg Lactulose*	467,8 (360,3/519,1)*	48,1 (32,6/74,1)*	7	28,2 (23,3/44,0)*	22,7 (15,7/27,1)*	7	1	
		50 mg Lactulose*	603,8 (476,7/772,7)*	65,2 (31,3/98,6)*	8	34,7 (25,8/40,2)*	43,2 (31,8/71,1)*	7	1	
	chemisch definierte Basisdiät	100 mg Lactulose	1162,6 (834,1/1432,7)	89,3 (40,2/151,6)	7	23,3 (16,1/26,7)	52,1 (33,9/95,3)	7	1	
		H <sub>2</sub> O	1,7 (1,3/5,1)	0,4 (0,0/0,9)	1	0,4 (0,0/0,9)	0,0 (0,0/0,4)	7	2	
		100 mg Lactulose	142,7 (62,6/220,6)	25,4 (4,2/95,7)	6	0,4 (0,0/0,9)	0,0 (0,0/2,5)	7	2	
	<i>Escherichia coli</i>	Altromin fortified®	200 mg Lactulose	408,7 (274,8/536,9)	54,2 (10,6/123,6)	7	0,3 (0,0/1,7)	0,1 (0,0/0,6)	7	2
			H <sub>2</sub> O	94,0 (58,0/208,3)	26,7 (6,8/44,0)	2	19,9 (5,9/42,8)	0,0 (0,0/0,4)	7	2
			100 mg Lactulose	173,2 (107,1/313,3)	41,9 (11,9/69,0)	6	15,7 (5,1/34,7)	0,0 (0,0/1,7)	7	2
		200 mg Lactulose	631,1 (341,5/788,6)	155,8 (45,7/237,1)	5	18,6 (2,1/38,1)	0,0 (0,0/1,3)	7	2	
			H <sub>2</sub> O	80,0 (66,4/87,2)	17,8 (16,5/24,6)	2	10,2 (6,8/23,7)	0,0 (0,0/0,3)	5	3
			200 mg Lactulose	648,2 (621,9/711,9)	157,5 (42,3/299,3)	6	13,9 (3,4/27,5)	0,0 (0,0/0,2)	5	3
200 mg Lactulose	H <sub>2</sub> O	84,0 (58,0/208,3)	20,9 (6,8/44,0)	2	14,8 (5,9/42,8)	0,0 (0,0/0,4)	12	2+3		
	200 mg Lactulose	623,6 (341,5/788,6)	114,9 (42,3/299,3)	5	17,4 (2,1/38,1)	0,0 (0,0/1,3)	12	2+3		

\* nur 12 h gemessen

Im folgenden werden einige charakteristische Ergebnisse bzw. die markanten Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen dargestellt, wobei sich alle Aussagen in der Regel auf Medianwerte der Gasausscheidung beziehen. Keimfreie Ratten schieden  $0,9 \mu\text{mol H}_2/23 \text{ h}$  aus. Die gefütterte Diät und die Verabreichung verschiedener Mengen Lactulose beeinflussten diese  $\text{H}_2$ -Ausscheidung nicht ( $p < 0,01$ ). Gruppen von Versuchstieren, die mit *C. perfringens* monoassoziiert worden waren und mit Ausnahme der Testperiode *ad libitum* Zugang zu der chemisch definierten Basisdiät hatten, schieden abhängig von der applizierten Testsubstanz immer mehr  $\text{H}_2$  aus als Gruppen von Tieren, die mit *E. coli* monoassoziiert worden waren. In Abbildung 3.9 ist die mediane  $\text{H}_2$ -Ausscheidung von Tieren dargestellt, die entweder mit *C. perfringens* oder mit *E. coli* monoassoziiert worden waren und Wasser oder 100 mg Lactulose zu Beginn der Testperiode erhielten. Festzuhalten ist, daß mit *E. coli* monoassoziierte Tiere nach intragastraler Verabreichung von Wasser über einen Zeitraum von 23 Stunden nur  $1,7 \mu\text{mol H}_2$  ausschieden, während mit *C. perfringens* monoassoziierte Ratten  $339,6 \mu\text{mol H}_2$  abgaben. Diese, im folgenden als basal bezeichnete,  $\text{H}_2$ -Ausscheidung ist auf Komponenten der Basisdiät zurückzuführen, die die Versuchstiere vor Beginn der Testperiode zu sich genommen hatten und die sich somit im Darm befanden. Die Differenz zwischen den unterschiedlich assoziierten Gruppen ist auf die Unterschiede in den Fermentationsfähigkeiten zwischen den beiden Organismen zurückzuführen, die auch in den *in vitro*-Versuchen mit wachsenden Zellen gezeigt worden waren (3.4.). Zusammenfassend läßt sich schließen, daß *C. perfringens* in der Lage ist, aus Komponenten der Basisdiät und endogenen Substraten  $\text{H}_2$  zu bilden, die von *E. coli* nicht zur  $\text{H}_2$ -Produktion genutzt werden.

Da die  $\text{H}_2$ -Bildung verschiedener Bakterienspezies von den angebotenen Substraten abhängig ist, hatte auch die angebotene Diät einen Einfluß auf die  $\text{H}_2$ -Ausscheidung monoassoziiierter Ratten. Allerdings war der augenscheinliche Unterschied zwischen den verschiedenen Diäten im Wilcoxon-Test nicht signifikant ( $p > 0,05$ ). Wurde als basale Diät Altromin fortified<sup>®</sup> statt der chemisch definierten Diät verwendet, so bildeten mit *E. coli* monoassoziierte Ratten nach Applikation von 1 ml Wasser  $84,0 \mu\text{mol H}_2$  in 23 Stunden. Die Differenz zur basalen  $\text{H}_2$ -Ausscheidung mit der chemisch definierten Diät ist bei gleichbleibenden Versuchsbedingungen und identischen Versuchstieren auf den Wechsel der Diät zurückzuführen. Allerdings war die Zellzahl von *E. coli* mit Altromin fortified<sup>®</sup> auch höher als mit der chemisch

definierten Basisdiät (3.7.3.). Die tendenziell unterschiedliche H<sub>2</sub>-Ausscheidung bei den beiden Diäten blieb unabhängig von der jeweils applizierten Lactulosemenge bestehen (Tab. 3.9). So schieden mit *E. coli* monoassoziierte Ratten nach intragastraler Verabreichung von 100 bzw. 200 mg Lactulose bei chemisch definierter Basisdiät 142,7 bzw. 408,7 µmol H<sub>2</sub> aus, während sie bei Altromin fortified® als basaler Diät 173,2 bzw. 623,6 µmol H<sub>2</sub> abgaben. Die Unterschiede zwischen den verschiedenen Mengen an Lactulose waren immer statistisch signifikant (p<0,02).



**Abbildung 3.9** H<sub>2</sub>-Ausscheidung von Versuchstiergruppen (n=7), die mit *C. perfringens* oder *E. coli* monoassoziiert worden waren und denen zu Beginn der Testperiode Wasser oder 100 mg Lactulose (292,1 µmol) intragastral verabreicht worden war. Außerhalb der Meßperioden erhielten diese Tiere die chemisch definierte Basisdiät. Dargestellt ist die jeweils zur vollen Stunde nach Meßbeginn, akkumulierte H<sub>2</sub>-Ausscheidung als Box-and-Whisker-Plot mit Kennzeichnung von Minimum, 25%-Quartile, Median, 75%-Quartile und Maximum. Erst bei den Versuchen mit Tieren, die mit *E. coli* monoassoziiert worden waren, konnte die H<sub>2</sub>-Ausscheidung mit dem Auer®-Meßgerät kontinuierlich aufgezeichnet werden.

Wurden Inulin (Raftiline®) und D-Sorbitol als Testsubstanzen (500 mg) eingesetzt, war die H<sub>2</sub>-Ausscheidung der mit *C. perfringens* monoassoziierten Tiere nicht von derjenigen zu unterscheiden, die auf die Applikation von Wasser folgte. Dies läßt den Schluß zu, daß *C. perfringens* wie *in vitro* (3.4.5.) auch *in vivo* weder Inulin noch D-Sorbitol zur Bildung von H<sub>2</sub> nutzte. Bei Versuchen mit Tieren, die mit *E. coli* monoassoziiert worden waren, wurden Fructooligosaccharide (Raftilose®) in Mengen

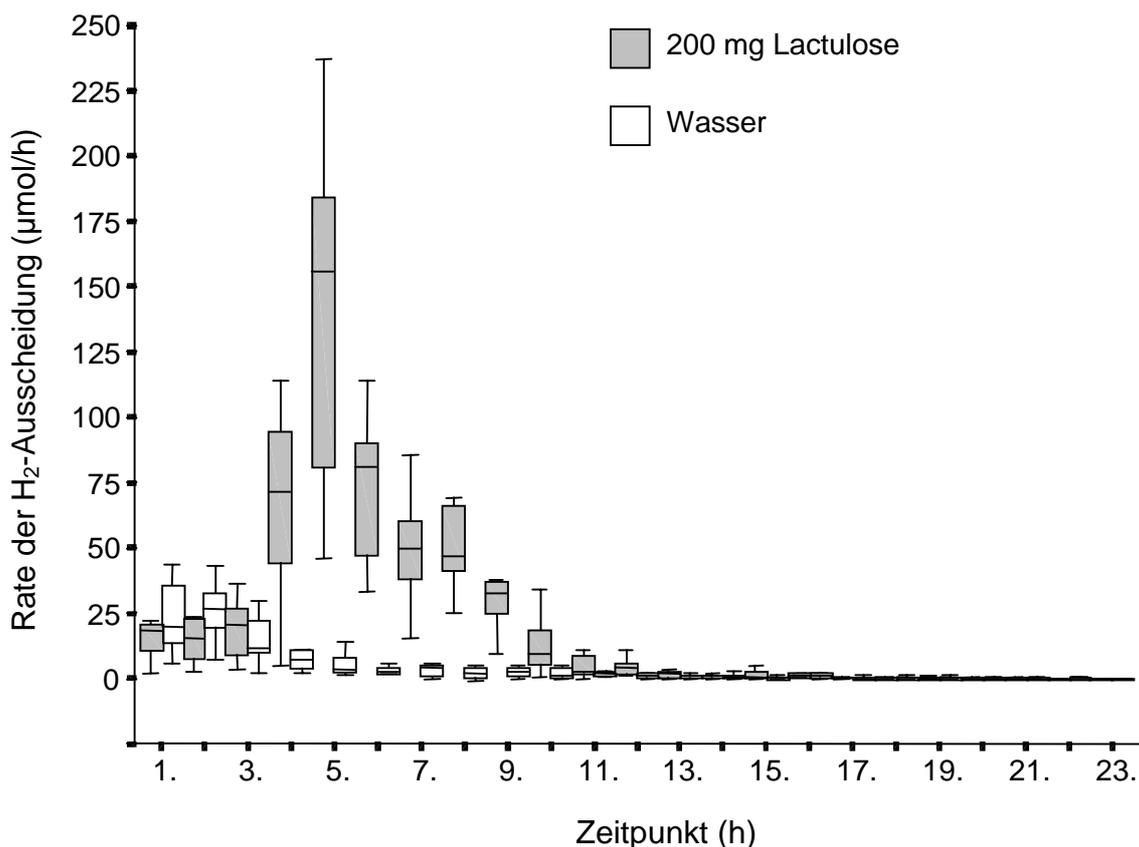
von 100, 200 und 400 mg als Testsubstanz eingesetzt; diese führten im Vergleich zur Kontrolle mit Wasser zu keiner zusätzlichen H<sub>2</sub>-Ausscheidung.

Nach der Darstellung des Einflusses von Diät, Testsubstanz und mikrobieller Besiedlung auf die H<sub>2</sub>-Exkretion von monoassoziierten Ratten wird im folgenden der zeitliche Verlauf der H<sub>2</sub>-Abgabe beschrieben. Wie aus Abbildung 3.9 ersichtlich ist, erreichte die akkumulierte H<sub>2</sub>-Menge in der Tierkammer bei Ratten, die Lactulose erhielten und mit *E. coli* monoassoziiert waren, innerhalb von 12 Stunden nach Beginn der Testperiode ein gleichbleibendes Niveau. Daraus folgt, daß ab diesem Zeitpunkt von den Ratten kein weiterer Wasserstoff ausgeschieden wurde. Dieses Charakteristikum war unabhängig von der verwendeten basalen Diät, aber abhängig von der eingesetzten Menge Lactulose. Während die ausgeschiedene H<sub>2</sub>-Menge nach Applikation von 200 mg Lactulose nach etwa 12 h nicht weiter anstieg, war dies bei Verabreichung von 100 mg nach etwa 10 Stunden der Fall. Im Gegensatz dazu war die H<sub>2</sub>-Ausscheidung von Ratten, die 100 mg Lactulose erhielten und mit *C. perfringens* monoassoziiert waren, sogar nach 23 Stunden noch nicht beendet. Nach Applikation von Wasser erreichte die ausgeschiedene Menge H<sub>2</sub> ein Maximum innerhalb von 23 h. Anhand der geringen H<sub>2</sub>-Ausscheidungsrate der letzten Stunde (3,2 µmol/h) läßt sich ersehen, daß sich die akkumulierte H<sub>2</sub>-Menge kaum noch veränderte (Tab. 3.9).

Die Rate der H<sub>2</sub>-Exkretion pro Stunde nach Applikation von Lactulose erreichte bei Tieren, die mit *C. perfringens* monoassoziiert worden waren, in der siebten bis achten Stunde ihr Maximum. Hingegen schieden Ratten, die mit *E. coli* monoassoziiert worden waren, in der fünften bis siebten Stunde H<sub>2</sub> mit maximaler Rate aus (Tab. 3.9). In Abbildung 3.10 wird repräsentativ die Veränderung der mittleren H<sub>2</sub>-Ausscheidungsrate dargestellt. Wie bei den in dieser Abbildung dokumentierten Raten, wiesen die berechneten Raten aller Versuchsgruppen eine große Variationsbreite auf (Tab. 3.9). Dies ist auf die interindividuellen Schwankungen der einzelnen Versuchstiere (s. u.) in Bezug auf den Zeitpunkt der maximalen Ausscheidung und die Größe der Rate selbst zurückzuführen.

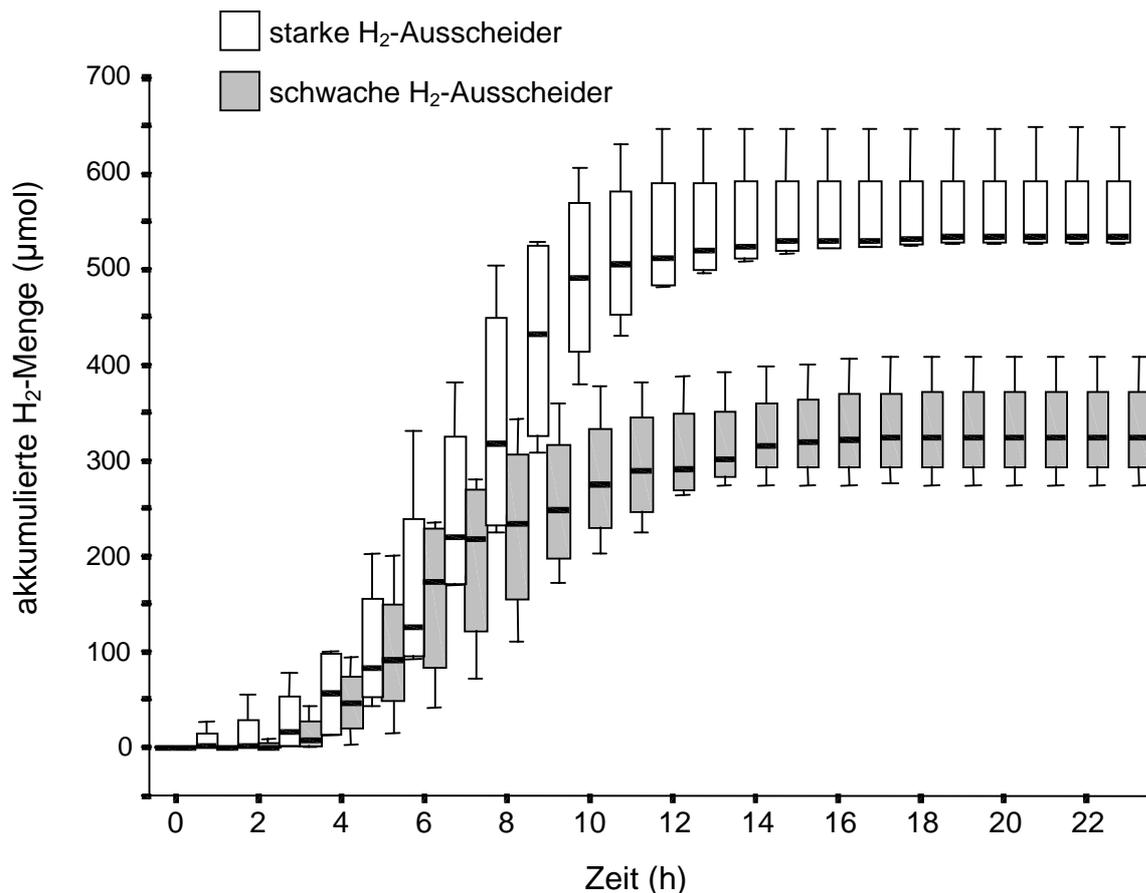
Unabhängig von basaler Diät oder Art der zur Monoassoziation verwendeten Spezies fiel nach Applikation von Wasser die Rate der H<sub>2</sub>-Ausscheidung langsam aber kontinuierlich bis zum Ende der Testperiode ab (Tab. 3.9). Die Rate war bei allen Tieren abhängig von der mikrobiellen Besiedlung, der basalen Diät und der eingesetzten Menge an Lactulose. Unter der Voraussetzung gleicher Mengen

applizierter Testsubstanz betrachtet, war die maximale  $H_2$ -Ausscheidungsrate von Tieren, die mit *C. perfringens* assoziiert worden waren, immer höher als bei Tieren, die mit *E. coli* assoziiert worden waren. Bei Versuchsgruppen, die die chemisch definierte Diät als Basis erhielten, betrug nach Verabreichung von Wasser bzw. 100 mg Lactulose die maximale Rate der  $H_2$ -Abgabe 33,0 bzw. 89,3  $\mu\text{mol/h}$  bei Ratten, die mit *C. perfringens* monoassoziiert worden waren. Versuchstiere unter der identischen Diät und nach Verabreichung der gleichen Konzentration an Lactulose, die aber mit *E. coli* monoassoziiert worden waren, schieden nur 0,4 bzw. 25,4  $\mu\text{mol H}_2/\text{h}$  aus. Bei Ratten, die mit *E. coli* monoassoziiert worden waren und Altromin fortified<sup>®</sup> als basale Diät erhielten, wurden nach Applikation von Wasser, 100 oder 200 mg Lactulose maximale  $H_2$ -Ausscheidungsrate von 20,9, 41,9 bzw. 155,8  $\mu\text{mol H}_2/\text{h}$  gemessen.



**Abbildung 3.10** Mediane Rate der  $H_2$ -Ausscheidung ( $\mu\text{mol/h}$ ) von gnotobiotischen Ratten ( $n=7$ ), die mit *E. coli* monoassoziiert worden waren und Wasser oder 200 mg Lactulose verabreicht bekamen. Die basale Diät war Altromin fortified<sup>®</sup>. Dargestellt ist die  $H_2$ -Ausscheidungsrate als Box-and-Whisker-Plot mit Kennzeichnung von Minimum, 25%-Quartile, Median, 75%-Quartile und Maximum.

Große Streuung der Beobachtungswerte konnten nicht nur bei der maximalen  $H_2$ -Ausscheidungsrate sondern auch bei der Gesamtmenge an ausgeschiedenem  $H_2$  nachgewiesen werden. Für den letztgenannten Parameter war die Variationsbreite der Meßwerte, wie aus Tabelle 3.9 ersichtlich ist, mit bis zu 159,9% des gemessenen Wertes z. T. bedeutend. Daß hierfür auch interindividuelle Unterschiede der  $H_2$ -Ausscheidung zumindest mitverantwortlich sind, soll Abbildung 3.11 verdeutlichen.



**Abbildung 3.11**  $H_2$ -Ausscheidung von Ratten ( $n=12$ ), die mit *E. coli* monoassoziiert worden waren, Altromin fortified<sup>®</sup> als basale Diät erhielten und denen 200 mg Lactulose intragastral verabreicht wurde. Die Versuchsgruppe wurde in zwei Gruppen aufgeteilt, die tendenziell wenig  $H_2$  ( $n=5$ ) bzw. viel  $H_2$  ( $n=7$ ) ausschieden. Dargestellt ist die akkumulierte  $H_2$ -Ausscheidung als Box-and-Whisker-Plot mit Kennzeichnung von Minimum, 25%-Quartile, Median, 75%-Quartile und Maximum.

Tiere, die mit *E. coli* monoassoziiert worden waren, wurden in zwei Gruppen unterteilt, die in ihrer  $H_2$ -Ausscheidung deutlich über bzw. unter dem berechneten Median der gesamten Gruppe lagen. Die beiden Untergruppen lagen dicht an der minimalen und maximalen  $H_2$ -Ausscheidung und verursachten somit die große Variationsbreite der Gesamtgruppe. Diese Zweiteilung trat tendenziell unabhängig von der Menge der

applizierten Testsubstanz bei allen mit *E. coli* monoassoziierten Ratten auf. Die verabreichte Lactulosemenge beeinflusste nur den absoluten Wert der ausgeschiedenen H<sub>2</sub>-Menge nicht aber die Existenz von zwei Gruppen, die sich in der Höhe ihrer H<sub>2</sub>-Ausscheidung unterschieden. Der unterschiedlichen H<sub>2</sub>-Ausscheidung konnten keine signifikanten Unterschiede der Bakterienzahl in Faeces zugeordnet werden. Somit muß es Unterschiede in der Physiologie oder Verhalten der einzelnen Ratten geben, die die Unterschiede in der H<sub>2</sub>-Ausscheidung bedingen. Die mediane H<sub>2</sub>-Ausscheidung aller gebildeten Gruppen einschließlich ihrer Variationsbreite findet sich in Tabelle 3.9.

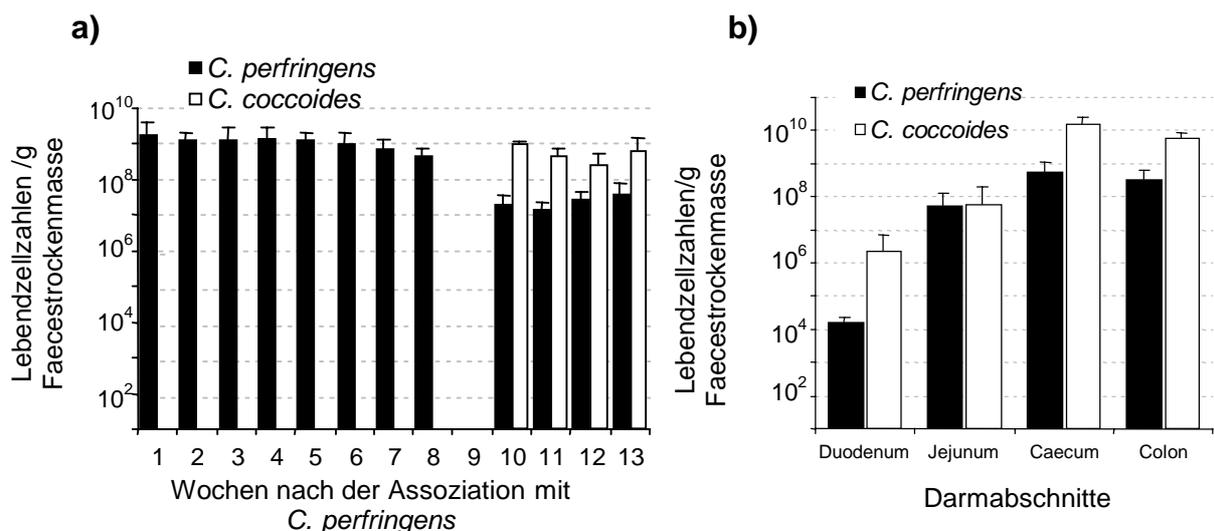
### 3.6.3. Diassoziaton mit H<sub>2</sub>-bildenden und H<sub>2</sub>-oxidierenden Organismen

Zur Untersuchung des H<sub>2</sub>-Transfers zwischen Bakterienpopulationen *in vivo* wurden Versuche mit drei unterschiedlichen Diassoziatonen durchgeführt. Dabei handelte es sich um Diassoziatonen von Ratten mit *C. perfringens* V und *C. coccooides*, mit *E. coli* B5 und *Methanobrevibacter* RT-1 sowie mit *E. coli* B5 und *Desulfovibrio* sp. (DSM 7057). Es wurde festgestellt, daß sich weder Ratten die mit *C. perfringens* noch Ratten, die mit *E. coli* monoassoziiert worden waren, mit dem methanogenen Isolat (3.1.2.) aus dem humanen Intestinaltrakt diassoziieren ließen. Deswegen wurde das aus Ratten isolierte Archaeon *Methanobrevibacter* RT-1 eingesetzt. Eine ebenfalls angestrebte Untersuchung der *in vitro* beobachteten Interaktion von *Dorea longicatena* sp. nov. mit *C. coccooides* (3.4.6.) im gnotobiotischen Rattenmodell wurde nicht durchgeführt, da sich die Tiere nicht mit *Dorea longicatena* sp. nov. monoassoziiieren ließen.

#### 3.6.3.1. Diassoziaton mit *C. perfringens* und *C. coccooides*

Mit *C. perfringens* und *C. coccooides* diassozierte Ratten schieden nach Applikation von Wasser oder 100 mg Lactulose nur noch 204,9 µmol H<sub>2</sub> bzw. 268,4 µmol H<sub>2</sub> aus (Tab. 3.10), während bei Monoassoziation mit *C. perfringens* noch 339,6 bzw. 1162,6 µmol H<sub>2</sub> ausgeschieden worden waren. Die H<sub>2</sub>-Ausscheidung verlief mit einer maximalen Ausscheidungsrate von 11,9 bzw. 18,6 µmol/h im Falle der

Verabreichung von Wasser bzw. 100 mg Lactulose nahezu linear. Im Vergleich zu der  $H_2$ -Exkretion von den mit *C. perfringens* monoassoziierten Ratten reduzierte sich die  $H_2$ -Ausscheidung somit signifikant ( $p < 0,02$ ) um 39,7% bzw. 76,9% und liegt damit auch nach Lactulosegabe noch unterhalb der basalen  $H_2$ -Ausscheidung monoassoziierten Tiere. Gleichzeitig mit der Diassoziierung mit *C. coccoides* fiel die Lebendzellzahl von *C. perfringens* von vormals mittleren  $2 \times 10^9$  auf durchschnittlich  $2,8 \times 10^7$  Zellen pro g Faecesrockenmasse (Abb. 3.12 a). Die mittlere Lebendzellzahl von *C. coccoides* in den Faeces diassoziierter Ratten betrug  $6,1 \times 10^8$  Zellen pro g Trockenmasse, so daß die Zellzahl von *C. perfringens* nur noch einen Anteil von 4,4% an der Gesamtzellzahl darstellte. Ein ähnliches Bild lieferte auch die prozentuale Verteilung von *C. perfringens* und *C. coccoides* in den Darmgehalten diassoziierter Tiere, bei denen die Lebendzellzahlen pro g Trockenmasse des Darminhaltes für *C. coccoides* mit Ausnahme des Jejunums um eine bis zwei Zehnerpotenzen oberhalb derjenigen von *C. perfringens* lag (Abb. 3.12 b).



**Abbildung 3.12** Lebendzellzahlen pro g Trockenmasse von *C. perfringens* und *C. coccoides* in Faeces (a) und Darminhalten (b) diassoziierter Tiere. Die Diassoziierung mit *C. coccoides* erfolgte neun Wochen nach der Assoziation mit *C. perfringens*. Die Zellzahlen wurden als Mittelwert ( $\pm$ SD) aus drei unterschiedlichen Verdünnungsstufen einer Verdünnungsreihe der Probe bestimmt, die für die Zellzahlen von *C. perfringens* auf SPS-Agar und für *C. coccoides* auf HA-Agar ausplattiert wurden.

Mit *in vitro*-Experimenten mit  $NaH^{14}CO_3$  (s. 2.14.) und Caecuminhalt von derart diassozierten Ratten wurde kein markiertes Acetat nachgewiesen. Hingegen fand sich 96,7% der eingesetzten Radioaktivität als  $Ba^{14}CO_3$  wieder. Daraus folgt, daß *C. coccoides* in Caecuminhalt Acetat nicht durch reduktive Acetogenese aus  $H_2$  und  $CO_2$  bildete.

**Tabelle 3.10** Ausgeschiedene H<sub>2</sub>-Gesamt mengen und H<sub>2</sub>-Bildungsraten diassoziierter Ratten, denen Lactulose oder Wasser intragastral verabreicht wurde. Die Testsubstanz erhielten die Tiere jeweils kurz bevor sie in ein geschlossenes, gasdichtes Meßsystem verbracht wurden, in dem die sich während 23 h akkumulierende H<sub>2</sub>-Konzentration mittels einer elektrochemischen Meßzelle kontinuierlich erfaßt wurde. Die angezeigten Meßwerte sind Medianwerte mehrerer mikrobiologisch und diätetisch gleichartig behandelter Tiere bzw. deren Untergruppen (Unterteilung der Rattengruppe, die mit *E. coli* und *Methanobrevibacter* RT-1 diassoziert waren, in Tiere, die Methan ausschieden oder nicht ausschieden).

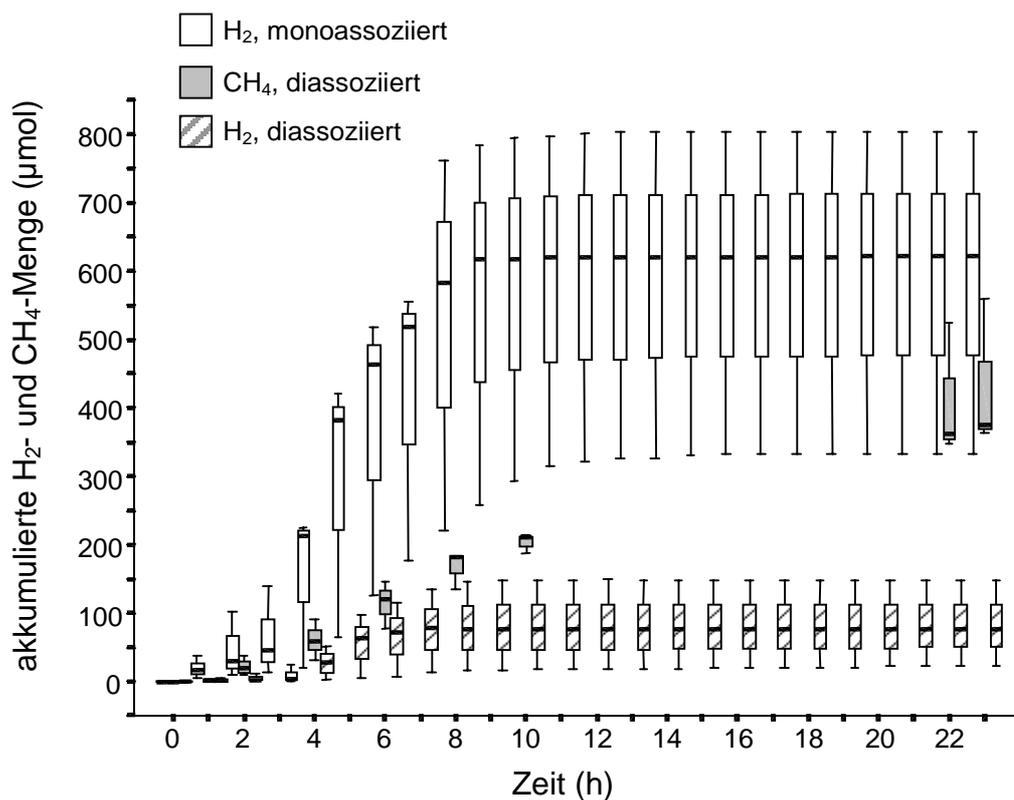
Besiedlung	Diät	verabreichte Testsubstanz	Methanstatus der Tiere	gemessene Gase	gesamte nach 23 h ausgeschiedene mediane H <sub>2</sub> - bzw. CH <sub>4</sub> -Menge (µmol) (Minimum/Maximum)	maximale Rate der medianen H <sub>2</sub> - bzw. CH <sub>4</sub> -Ausscheidung (µmol/h) (Minimum/Maximum)	Zeitpunkt maximaler H <sub>2</sub> - bzw. CH <sub>4</sub> -Ausscheidung (h)	mediane H <sub>2</sub> - bzw. CH <sub>4</sub> -Ausscheidungsrate (µmol/h) der ersten Stunde (t = 0-1 h) (Minimum/Maximum)	mediane H <sub>2</sub> - bzw. CH <sub>4</sub> -Ausscheidungsrate (µmol/h) der letzten Stunde (t = 22-23 h) (Minimum/Maximum)	Anzahl der Tiere	Versuchstiergruppe
<i>C. perfringens</i> + <i>C. coccooides</i>	chemisch definierte Basisdiät	100 mg Lactulose	-	H <sub>2</sub>	204,9 (176,9/271,4)	11,9 (8,0/19,5)	12	9,7 (8,5/11,4)	8,9 (6,7/10,8)	7	1
			-	H <sub>2</sub>	268,4 (144,8/412,8)	18,6 (7,2/25,8)	12	11,0 (6,4/13,6)	9,4 (5,9/11,2)	7	1
<i>E. coli</i> + <i>Methanobrevibacter</i> RT-1	Altromin® fortified	H <sub>2</sub> O	-	H <sub>2</sub>	44,0 (14,8/60,5)	8,9 (3,8/14,8)	1	8,9 (3,8/14,8)	0,0 (0,0/0,0)	7	2
		H <sub>2</sub> O	-	CH <sub>4</sub>	0,1 (0,0/10,6)	0,1 (0,0/0,9)	10	0,0 (0,0/0,0)	0,1 (0,0/0,8)	7	2
		100 mg Lactulose	+	H <sub>2</sub>	35,6 (34,7/94,1)	8,7 (5,3/10,2)	6	1,2 (0,9/5,1)	0,0 (0,0/0,0)	3	2
		100 mg Lactulose	+	CH <sub>4</sub>	97,3 (22,0/292,4)	8,1 (0,5/13,3)	6	0,1 (0,0/0,3)	1,4 (0,0/17,1)	3	2
		100 mg Lactulose	-	H <sub>2</sub>	127,1 (38,1/170,4)	30,5 (2,0/48,0)	4	3,7 (2,5/5,4)	0,0 (0,0/0,0)	4	2
		100 mg Lactulose	-	CH <sub>4</sub>	3,6 (3,5/5,1)	0,5 (0,2/1,0)	8	0,0 (0,0/0,1)	0,3 (0,0/0,5)	4	2
		200 mg Lactulose	+	H <sub>2</sub>	77,5 (23,5/148,9)	22,8 (0,8/26,2)	4	1,7 (0,9/4,2)	0,0 (0,0/0,1)	3	2
		200 mg Lactulose	+	CH <sub>4</sub>	376,25 (362,7/559,2)	28,9 (18,7/31,3)	8	1,1 (0,0/3,6)	14,3 (14,2/35,6)	3	2
		200 mg Lactulose	-	H <sub>2</sub>	141,8 (34,9/198,9)	17,6 (5,5/42,7)	5	0,2 (0,0/37,8)	0,0 (0,0/0,2)	4	2
		200 mg Lactulose	-	CH <sub>4</sub>	3,8 (3,4/5,6)	0,4 (0,3/0,7)	8	0,1 (0,0/0,1)	0,2 (0,0/0,4)	4	2

### 3.6.3.2. Diassoziation mit *E. coli* und *Methanobrevibacter* RT-1

Die Lebendzellzahlen von *E. coli* in Faeces von Ratten, die mit *E. coli* assoziiert waren, wurden durch Diassoziation mit *Methanobrevibacter* RT-1 nicht beeinflusst. Allerdings bewirkte der Wechsel der Versuchsdät eine Variation in der Lebendzellzahlen von *E. coli* in Faeces assoziierter Ratten. Während mit Altromin fortified® als Futter im Mittel der betreffenden Versuchsperiode gleichbleibende Lebendzellzahlen ( $\pm$  SD) für *E. coli* von  $4,55 (\pm 1,61) \times 10^{10}$  pro g Faecetrockenmasse ermittelt wurden, sank diese Zahl nach Gabe der chemisch definierten Diät auf  $0,92 (\pm 0,37) \times 10^{10}$  (3.7.3.). Da die Versuchstiere zum Tötungszeitpunkt Altromin fortified® erhielten, wurde die Lebendzellzahlen von *E. coli* in den einzelnen Darmabschnitten nur für diese Diät ermittelt. In Duodenum, Jejunum, Caecum und Colon wurden für *E. coli* Lebendzellzahlen ( $\pm$ SD) von  $4,37 (\pm 1,01) \times 10^8$ ,  $1,06 (\pm 1,54) \times 10^{10}$ ,  $8,41 (\pm 5,45) \times 10^{10}$  und  $4,77 (\pm 3,71) \times 10^{10}$  pro g Trockenmasse des Darminhaltes ermittelt. Für *Methanobrevibacter* RT-1 wurden die Lebendzellzahlen anhand der Methanbildung in Inkubationen seriell verdünnter Faeces-Suspensionen der diassozierten Tiere bestimmt. Sie betrug, unabhängig von der Fähigkeit der Versuchstiere, Methan auszuscheiden (CH<sub>4</sub>- & CH<sub>4</sub>+ Tiere), im Mittel  $10^3$ - $10^4$  Zellen pro g Faecetrockenmasse. In Duodenum-Inhalten konnten keine Methanogenen nachgewiesen werden, während im Jejunum, Caecum und Colon durchschnittlich  $10^{2,3}$ ,  $10^{3,7}$  und  $10^{3,9}$  methanogene Zellen pro g Faecetrockenmasse nachgewiesen wurden.

Methan-ausscheidende Ratten, die mit *E. coli* und *Methanobrevibacter* RT-1 diassoziert worden waren, schieden nach Verabreichung von 200 mg Lactulose innerhalb von 23 h  $77,5 \mu\text{mol H}_2$  und  $376,3 \mu\text{mol Methan}$  aus (Abb. 3.13). Diese Kopplung von Methanausscheidung und der im Vergleich zu mit *E. coli* monoassozierten Tieren reduzierten H<sub>2</sub>-Ausscheidung trat allerdings nur bei drei von sieben diassozierten Versuchstieren auf. Die anderen vier Ratten wiesen mit  $141,8 \mu\text{mol H}_2$  nach Applikation von 200 mg Lactulose zwar ebenfalls eine geringere Gesamtmenge ausgeschiedenen Wasserstoffs auf, gaben aber keine nachweisbaren Mengen an Methan ab (Tab. 3.10). Derselbe Zusammenhang wurde nach der intragastralen Verabreichung von 100 mg Lactulose festgestellt, die die Zugehörigkeit zu der CH<sub>4</sub>-negativen Gruppe (CH<sub>4</sub>-) oder CH<sub>4</sub>-positiven Gruppe (CH<sub>4</sub>+) nicht beeinflusste. Während die Methan-ausscheidenden Ratten in 23 h

mittlere 35,6  $\mu\text{mol H}_2$  und 97,3  $\mu\text{mol Methan}$  abgaben, schieden die anderen vier Tiere kein Methan aus und gaben 127,1  $\mu\text{mol H}_2$  ab. Aufgrund der geringen Tierzahlen in diesen Untergruppen konnte der Wilcoxon-Test nicht durchgeführt werden. Allerdings änderten sich auch im Vergleich zwischen monoassoziierten und allen diassozierten Tieren die  $\text{H}_2$ - und die  $\text{CH}_4$ -Ausscheidung signifikant ( $p < 0,05$ ).



**Abbildung 3.13**  $\text{H}_2$ - und  $\text{CH}_4$ -Ausscheidung Methan-ausscheidender Ratten ( $n = 3$ ), die mit *E. coli* und *Methanobrevibacter* RT-1 diassoziert worden waren und denen 200 mg in Wasser gelöste Lactulose mit einer Schlundsonde verabreicht wurde. Zum Vergleich wurde die  $\text{H}_2$ -Ausscheidung derselben Ratten aufgetragen, die nur mit *E. coli* monoassoziiert worden waren und ebenfalls 200 mg Lactulose erhielten. Die Basisdiät war Altromin fortified®. Dargestellt ist die akkumulierte  $\text{H}_2$ - und  $\text{CH}_4$ -Ausscheidung als Box-and-Whisker-Plot mit Kennzeichnung von Minimum, 25%-Quartile, Median, 75%-Quartile und Maximum.

Neben dieser deutlichen Reduktion ( $p < 0,02$ ) der Gesamtmenge des durch diassozierte Tiere in 23 h ausgeschiedenen Wasserstoffs im Vergleich zu monoassoziierten Tieren verminderten sich auch die maximalen Raten der  $\text{H}_2$ -Ausscheidung (Tab. 3.10) unabhängig davon, ob die Tiere Methan ausschieden oder nicht. So betrug die maximale mediane  $\text{H}_2$ -Exkretionsrate bei Methan-ausscheidenden Ratten nach Gabe von 200 mg Lactulose nur 22,8  $\mu\text{mol H}_2/\text{h}$ , während mit *E. coli* monoassoziierte Ratten unter gleichen Bedingungen 155,8  $\mu\text{mol H}_2/\text{h}$  abgaben.  $\text{CH}_4$ -negative, diassozierte Ratten schieden maximal 17,6  $\mu\text{mol H}_2/\text{h}$

aus. Außerdem trat die maximale H<sub>2</sub>-Ausscheidung bei Diassoziierung ein bis zwei Stunden früher auf als bei monoassozierten Tieren (Tab. 3.10). Konnten bei monoassozierten Tieren noch Ratten mit niedriger und starker H<sub>2</sub>-Ausscheidung unterschieden werden, ist dies nach Diassoziierung mit *Methanobrevibacter* RT-1 nicht mehr möglich. Die drei diassozierten Ratten, die Methan ausschieden, fanden sich als monoassozierte Ratten sowohl in der Gruppe mit niedriger als auch in derjenigen mit hoher H<sub>2</sub>-Ausscheidung.

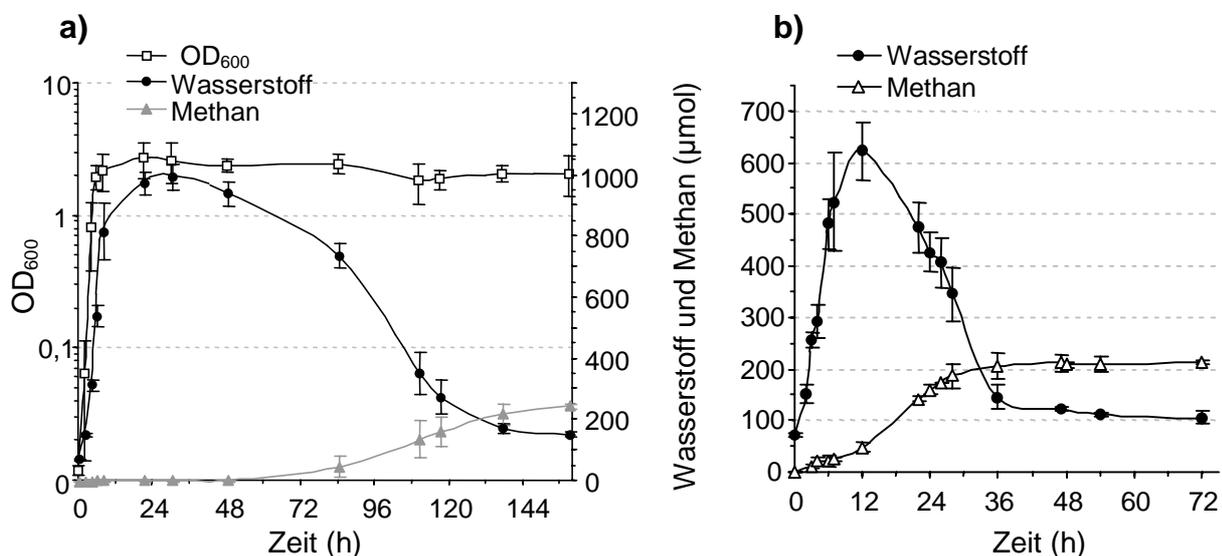
In Inkubationen von Darminhalt oder Faeces dieser diassozierten Versuchstiere *in vitro* in Balchmedium 1 unter N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> wurde Methan gebildet, unabhängig davon ob die Ratte, von der das Inokulum stammte, Methan ausschied oder nicht (Tab. 3.11). Der im Zuge dieser Inkubation von *E. coli* gebildete Wasserstoff war zu Versuchsende fast vollständig verbraucht worden.

**Tabelle 3.11** Inkubationen von Darminhalt oder Faeces gnotobiotischer Ratten, die mit *E. coli* und *Methanobrevibacter* RT-1 diassoziert waren, in Balchmedium 1 unter einer N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>-Gasphase bei 37 °C und 140 U/min. Dabei errechnete sich die mindestens umgesetzte H<sub>2</sub>-Menge aus der Differenz von maximaler H<sub>2</sub>-Konzentration und der H<sub>2</sub>-Konzentration am Ende der Inkubation.

Gasphase (v/v)	Lactulose (mM)	Herkunft des Inokulums	maximal gebildetes Methan (µmol) (± SD)	maximale H <sub>2</sub> -Konzentration (%) (± SD)	H <sub>2</sub> -Konzentration am Ende der Inkubation (%) (± SD)	mindestens umgesetzte H <sub>2</sub> -Menge (µmol) (± SD)	mindestens umgesetzte H <sub>2</sub> (µmol)/Methan (µmol)
N <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> (80/20)	0	Colon	169,79 (7,18)	4,2 (0,45)	1,80 (0,06)	130,14 (27,96)	0,77
N <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> (80/20)	0	Caecum	163,26 (6,82)	4,95 (0,35)	1,40 (0,30)	208,76 (32,54)	1,28
N <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> (80/20)	20	Colon	218,17 (21,33)	11,98 (1,49)	2,43 (0,22)	482,83 (82,6)	2,21
N <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> (80/20)	20	Caecum	223,39 (26,53)	10,6 (1,35)	2,13 (0,45)	426,00 (58,6)	1,91
N <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> (80/20)	20	Faeces	246,63 (9,06)	19,88 (0,74)	3,08 (0,13)	842,64 (63,85)	3,42

Bei diesen Versuchen begann die Methanbildung in Inkubationen von Darminhalt bevor die maximale H<sub>2</sub>-Konzentration im Kulturgefäß erreicht wurde. Hingegen setzte in Versuchen mit Faeces als Inokulum die Methanbildung erst nach Erreichen des

H<sub>2</sub>-Maximums ein (Abb. 3.14). Dies beeinflusste auch den Quotienten aus dem mindestens umgesetzten H<sub>2</sub> und dem gebildeten Methan (Tab. 3.11), da in Mischkulturen aus H<sub>2</sub>-Produzenten und H<sub>2</sub>-Oxidierern nur die Netto-H<sub>2</sub>-Konzentration gemessen werden kann. Dieser Quotient erreicht sein theoretisches Maximum von 4 nur, wenn H<sub>2</sub>-Produktion und Methanbildung zeitlich vollständig nacheinander erfolgen. Je stärker sich H<sub>2</sub>-Bildung und CH<sub>4</sub>-Bildung zeitlich überschneiden, desto kleiner wird der Quotient. Im Vergleich der Inkubationen ohne bzw. mit Lactulosesupplementation wurden ähnliche Mengen Methan gebildet, während die meßbare maximale Netto-H<sub>2</sub>-Konzentration sich je nach Beginn der Methanbildung zwischen den verschiedenen Quellen der Inokula unterschied.



**Abbildung 3.14** Inkubation von Faeces (a) bzw. Darminhalt (b) gnotobiotischer Ratten, die mit *E. coli* und *Methanobrevibacter* RT-1 diassoziiert waren, in Balchmedium 1 unter einer N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>-Gasphase bei 37 °C und 140 U/min.

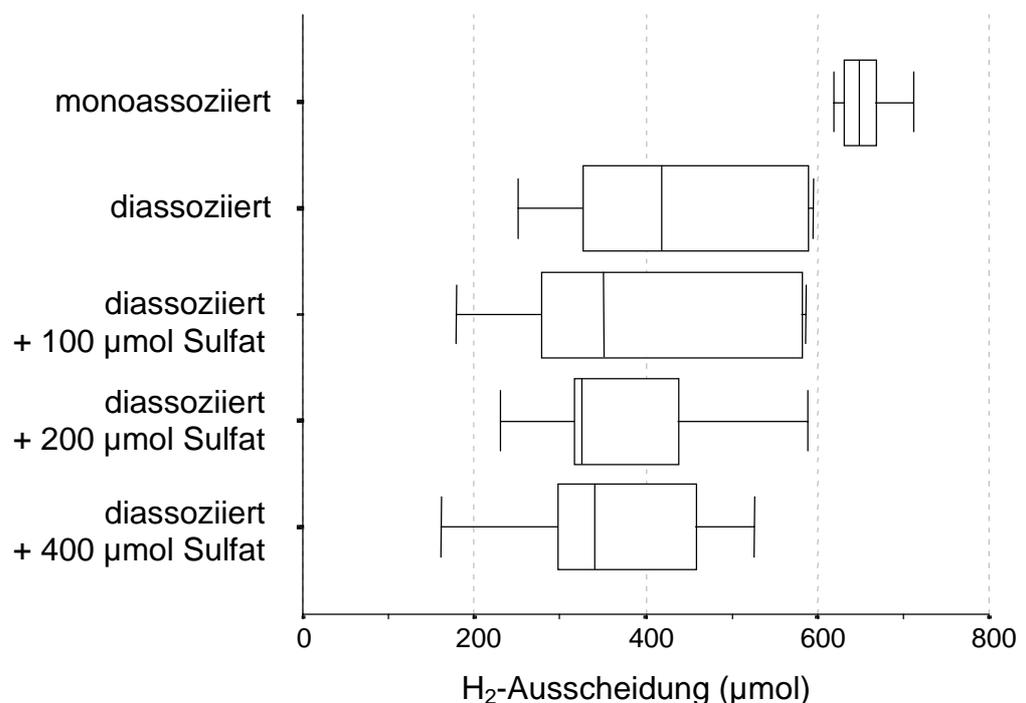
In einer zweiten mit *E. coli* B5 monoassoziierten Versuchsgruppe (Gruppe 4, n=7) konnte kein Tier mit *Methanobrevibacter* RT-1 besiedelt werden, so daß die geplanten Versuche zum Einfluß der Besiedlungsreihenfolge und zur Untersuchung von Faktoren, die die Dominanz einer H<sub>2</sub>-oxidierenden Population beeinflussen, nicht durchgeführt werden konnten.

**Tabelle 3.12** Ausgeschiedene H<sub>2</sub>-Gesamt mengen und H<sub>2</sub>-Bildungsraten mono- und diassoziierter Ratten, denen Lactulose oder Wasser intragastral verabreicht wurde. Dabei hatten Tiere, denen 100, 200 bzw. 400 µmol Sulfat zu Beginn der Meßperiode verabreicht wurde, außerhalb der Meßperiode Zugang zu Trinkwasser, das 1,7, 3,3 bzw. 6,7 mM Sulfat enthielt. Die Testsubstanz erhielten die Tiere ebenfalls kurz bevor sie in ein geschlossenes, gasdichtes Meßsystem verbracht wurden, in dem die während 23 h akkumulierende H<sub>2</sub>-Konzentration mittels einer elektrochemischen Meßzelle kontinuierlich erfaßt wurde und in dem den Ratten nur Trinkwasser aber keine Futterquelle zur Verfügung stand. Die angezeigten Meßwerte sind Medianwerte mehrerer mikrobiologisch und diätetisch gleichartig behandelter Tiere.

Bestellung	Diät	verabreichte Testsubstanz	gesamte nach 23 h ausgeschiedene mediane H <sub>2</sub> -Menge (µmol) (Minimum/Maximum)	maximale Rate der medianen H <sub>2</sub> - Ausscheidung (µmol/h) (Minimum/Maximum)	Zeitpunkt maximaler H <sub>2</sub> -Ausscheidung (h)	mediane H <sub>2</sub> -Ausscheidungsrate (µmol/h) der ersten Stunde (t = 0-1 h) (Minimum/Maximum)	mediane H <sub>2</sub> -Ausscheidungsrate (µmol/h) der letzten Stunde (t = 22-23 h) (Minimum/Maximum)	Anzahl der Tiere	Versuchstiergruppe
<i>E. coli</i>	Altromin fortified®	200 mg Lactulose	648,2 (621,9/711,9)	157,5 (42,3/299,3)	6	13,9 (3,4/27,5)	0,0 (0,0/0,2)	5	3
<i>E. coli</i> + <i>Desulfovibrio</i> sp.	Altromin fortified®	200 mg Lactulose ohne Sulfat	417,4 (251,1/594,9)	123,0 (36,6/141,7)	5	8,5 (0,9/16,8)	0,0 (0,0/0,1)	5	3
		200 mg Lactulose + 100 µmol Sulfat	350,9 (178,8/586,8)	81,6 (9,3/169,9)	5	4,8 (2,3/12,7)	0,0 (0,0/1,0)	5	3
		200 mg Lactulose + 200 µmol Sulfat	326,0 (230,8/588,1)	121,3 (21,1/172,9)	4	8,5 (2,1/9,3)	0,0 (0,0/0,0)	5	3
		200 mg Lactulose + 400 µmol Sulfat	340,4 (161,3/526,7)	80,8 (21,1/199,1)	5	6,8 (1,3/12,3)	0,0 (0,0/0,1)	5	3

### 3.6.3.3. Diassoziation mit *E. coli* und *Desulfovibrio* sp. (DSM 7057)

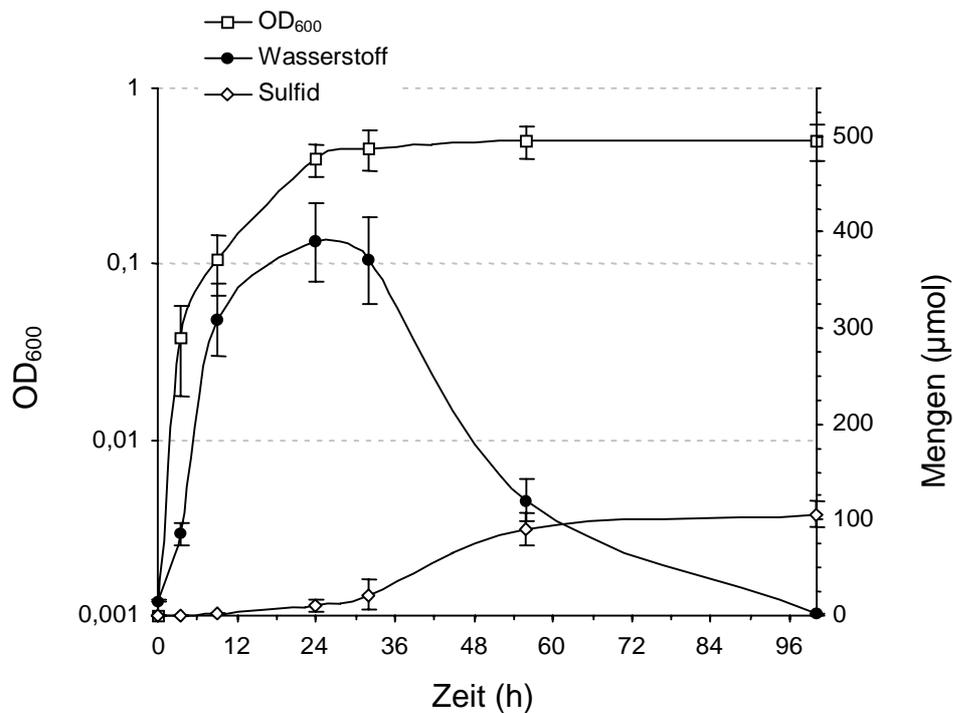
Mit *E. coli* monoassoziierte Tiere aus der Versuchsgruppe, die mit *Desulfovibrio* sp. (DSM 7057) diassoziert wurden, wiesen über die gesamte Versuchsperiode gleichbleibend hohe Lebendzellzahlen von *E. coli* von durchschnittlich  $4,17 (\pm 1,20) \times 10^{10}$  Zellen pro g Faecesrockenmasse (TM) auf (3.7.3.). Diese Zellzahlen wurden durch die Diassoziation mit *Desulfovibrio* sp. nicht beeinflusst, welche in allen Tieren erfolgreich durchgeführt werden konnte und zu Lebendzellzahlen von *Desulfovibrio* sp. von  $1,29 (\pm 0,51) \times 10^9$  Zellen pro g TM führte. Weder die Erhöhung der Sulfatkonzentration im Trinkwasser der Versuchstiere noch die Applikation unterschiedlicher Mengen an Sulfat zusammen mit Lactulose zu Beginn der Meßperiode hatten im Friedman-Test einen signifikanten Einfluß ( $p > 0,05$ ) auf die Lebendzellzahl von *Desulfovibrio* sp. (DSM 7057) in Faeces oder auf die  $H_2$ -Ausscheidung der diassozierten Tiere (Tab. 3.12). Auch im Wilcoxon-Test ließen sich zwischen Ratten, die mit *E. coli* und *Desulfovibrio* sp. (DSM 7057) diassoziert worden waren und unterschiedliche Mengen Sulfat erhielten, keine statistisch signifikanten Unterschiede ( $p > 0,3$ ) feststellen.



**Abbildung 3.15** Nach 23 h akkumulierte  $H_2$ -Ausscheidung von Ratten, die mit *E. coli* monoassoziiert oder mit *E. coli* und *Desulfovibrio* sp. (DSM 7057) diassoziert worden waren. Alle Gruppen erhielten zu Beginn der Meßperiode 200 mg Lactulose. Die diassozierten Tiere erhielten gemeinsam mit der Lactulose verschiedene Mengen Sulfat (0-400  $\mu$ mol). Dabei hatten Tiere, denen 100, 200 bzw. 400  $\mu$ mol Sulfat zu Beginn der Meßperiode verabreicht wurde, außerhalb der Meßperiode Zugang zu Trinkwasser, das 1,7, 3,3 bzw. 6,7 mM Sulfat enthielt.

Ebenso wie mit *E. coli* und *Methanobrevibacter* RT-1 assoziierte Ratten schieden auch Ratten, die mit *E. coli* und *Desulfovibrio* sp. diassoziert waren, weniger  $H_2$  aus als Ratten, die mit *E. coli* monoassoziert waren (Abb. 3.15). Mit  $417,4 \mu\text{mol } H_2$  in 23 h nach 200 mg Lactuloseaufnahme war die Differenz jedoch nicht so stark wie bei Diassoziationen mit *Methanobrevibacter* RT-1. Trotzdem war der Unterschied sowohl im Wilcoxon- als auch im Friedman-Test statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ).

Bei *in vitro*-Inkubationen von Darminhalten oder Faeces dieser Versuchstiere in sulfathaltigem Balchmedium unter  $N_2/CO_2$  wurden bis zu  $106 \mu\text{mol}$  Sulfid gebildet. Im Zuge solcher Faecesinkubationen im Balchmedium 1 ohne zusätzliche Kohlenstoffquelle wurde der von *E. coli* gebildete Wasserstoff bis zum Versuchsende vollständig verbraucht (Abb. 3.16).



**Abbildung 3.16** Durchschnittliche  $H_2$ - und Sulfidmengen bei Inkubation von 1 g Faeces von Tieren, die mit *E. coli* und *Desulfovibrio* sp. assoziiert waren, in Balchmedium 1, das 12 mM Sulfat und 8,6 mM Lactat enthielt. Die dargestellten Werte repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  SD ( $n=4$ ).

Weiterhin erreichten Zellen in sulfathaltigem Balchmedium 1, das mit Lactulose supplementiert wurde, die höchste  $OD_{600}$ , bildeten aber am wenigsten Sulfid (Tab. 3.13). Wurden hingegen Faeces in Kulturgefäßen unter einer  $N_2/CO_2/H_2$  (69/17/14, v/v/v) inkubiert, entstanden  $140,89 \mu\text{mol}$  Sulfid. Diese Sulfidbildung setzte allerdings

im Gegensatz zu Inkubationen mit Lactulosesupplementation erst nach dem Erreichen der maximalen H<sub>2</sub>-Konzentration im Kulturgefäß ein.

**Tabelle 3.13** Wachstum und gebildete Sulfidmengen als Mittelwerte aus Inkubationen von Faeces gnotobiotischer Ratten (n=5), die mit *E. coli* und *Desulfovibrio* sp. (DSM 7057) diassoziert worden waren. Die Inkubation bei 37 °C und 140 U/min erfolgte in Balchmedium 1, das 12 mM Sulfat und 8,6 mM Lactat enthielt. Dabei errechnete sich die mindestens umgesetzte H<sub>2</sub>-Menge aus der Differenz von maximaler H<sub>2</sub>-Konzentration und der H<sub>2</sub>-Konzentration am Ende der Inkubation.

Gasphase (Mischungsverhältnis)	Lactulose (mM)	maximale OD <sub>600</sub> (± SD)	maximal gebildetes Sulfid (µmol) (± SD)	maximale H <sub>2</sub> - Konzentration (%) (± SD)	H <sub>2</sub> -Konzentration am Ende der Inkubation (%) (± SD)	mindestens umgesetzte H <sub>2</sub> -Menge (µmol) (± SD)	mindestens umgesetztes H <sub>2</sub> (µmol)/Sulfid (µmol)
N <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> (80/20)	0	0,51 (0,11)	105,91 (15,46)	7,41 (0,82)	0,02 (0,01)	389,34 (41,52)	3,68
N <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> (80/20)	10	1,82 (0,09)	82,39 (7,16)	8,57 (0,41)	4,67 (0,79)	216,25 (33,15)	2,62
N <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> /H <sub>2</sub> (69/17/14)	0	0,67 (0,05)	140,89 (23,46)	17,89 (0,79)	7,09 (0,33)	559,91 (64,41)	3,97

In Faeces von mono- und diassozierten Ratten fanden sich durchschnittlich 7,6 mM Sulfid. Weder die Besiedlung der Ratten mit *Desulfovibrio* sp. noch die Menge des oral verabreichten Sulfates führte zu einer Änderung dieser Konzentration in Faeces, der während der gesamten 23-stündigen Meßperiode von jedem Tier gesammelt wurde. In diesen Faeces betrug die durchschnittliche Sulfidkonzentration 8,2 (±1,6) µmol/g TM bei Ratten, die mit *E. coli* monoassoziert worden waren. Ratten, die zusätzlich noch mit *Desulfovibrio* sp. (DSM 7057) assoziiert worden waren, wiesen nach Applikation von 100, 200 und 400 µmol Sulfat Sulfidkonzentrationen von 6,1 (±1,1), 5,9 (±2,0) bzw. 7,1 (±1,6) µmol/g TM auf. Somit ließ sich die dissimilatorische Sulfatreduktion, die die beobachtete Verminderung der H<sub>2</sub>-Ausscheidung diassoziierter Ratten verursachen könnte, nicht durch eine entsprechend erhöhte Sulfidkonzentration in Faeces bestätigen. Ursachen hierfür werden in Abschnitt 4.2.3. diskutiert.

### 3.6.4. Sektion der Versuchstiere

Bei der Sektion der gnotobiotischen Ratten wurde als augenfälligste anatomische Veränderung gegenüber konventionellen Ratten eine Caecomegalie beobachtet. Diese war unabhängig von der Art der Assoziation und makroskopisch nicht von der keimfreier Ratten zu unterscheiden. Weiterhin enthielt das Caecum bei einigen Ratten, die mit *C. perfringens* monoassoziiert waren und in der Meßperiode 500 mg Lactulose erhielten, viel Gas, und die Gefäße auf der Caecumwand waren z. T. deutlich mit Blut gefüllt.

### 3.7. Untersuchungen mittels Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung

Zwei Stämme von *Dorea longicatena* sp. nov. waren aus Faeces-Verdünnungen von  $10^{-8}$  bzw.  $10^{-9}$  isoliert worden (3.1.). Außerdem deuteten die *in vitro*-Experimente (3.4.) an, daß *Dorea longicatena* sp. nov. im Darm eine Rolle beim Transfer von Formiat und Wasserstoff spielt. Deswegen sollte die zahlenmäßige Bedeutung von *Dorea longicatena* sp. nov. in den Faeces von Probanden untersucht werden, wozu die spezifische Nachweismöglichkeit einzelner Spezies mittels Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) genutzt wurde.

Außerdem wurden die Gesamtzellzahlen in Faecesproben der verschiedenen Tierversuche mit FISH ermittelt. Diese Gesamtzellzahlen wurden mit den Zellzahlen, die als Kolonie bildenden Einheiten ermittelt wurden, verglichen (3.7.3.).

#### 3.7.1. Design und Validierung einer spezifischen Oligonukleotidsonden zum Nachweis von *Dorea longicatena* sp. nov.

Zum Nachweis von *Dorea longicatena* sp. nov. wurde mittels des Software Pakets ARB eine Oligonukleotidsonde entwickelt, die entsprechend dem von der Oligonukleotid Probe Database (OPD, ALM et al., 1996) vorgeschlagenen Nomenklatur mit S-S-D.lon-0633-a-A-18 bezeichnet wurde. Die Sonde bindet an eine hypervariable Region der 16S rRNA von *D. longicatena* sp. nov. ab Position 663, ist 18 Nukleotide lang und wurde mit den EMBL-, ARB- und RDP-Datenbanken auf ihre

Spezifität geprüft. Die Sonden- und deren Zielsequenz sowie die entsprechenden Sequenzen verschiedener verwandter Spezies von *D. longicatena* sp. nov. sind in Tabelle 3.14 dargestellt. Ein rDNA-Klon (SUAU et al., 1999) von einem bislang unbeschriebenen und nicht kultivierten Bakterium wird theoretisch ebenfalls mit der Sonde erfaßt. Die 16S rRNA-Gensequenz dieses Klons (GenBank-Nr. AF1322771) ist mit derjenigen Sequenz von *Dorea longicatena* sp. nov. identisch.

**Tabelle 3.14** Vergleich der Sondensequenz von S-S-D.lon-0633-a-A-18 mit der Zielregion der 16S rRNA von *Dorea longicatena* sp. nov. und den entsprechenden Sequenzen verschiedener phylogenetisch verwandter Spezies (nach ARB). Bei letzteren sind die Nukleotide dargestellt, die von der Zielregion von *D. longicatena* sp. nov. abweichen. Die Punkte kennzeichnen Positionen, an denen die Basen identisch sind.

<b>Sondensequenz (S-S-D.lon-0633-a-A-18)</b>	<b>3´ CGTAAACCTTGACGACTC 5´</b>
Zielsequenz ( <i>Dorea longicatena</i> sp. nov.)	5´ GCAUUUGGAACUGCUGAG 3´
rDNA-Klon (AF1322771)	5´ ..... 3´
<i>Eubacterium hallii</i>	5´ .....A.....NNN. 3´
<i>Halomonas marina</i>	5´ ....C.....Ug. 3´
<i>Moorella thermoacetica</i>	5´ .....A.....C.g. 3´
<i>Moorella thermoautotrophica</i>	5´ .....A.....C.g. 3´

N, nicht identifizierte Base

g, mit hoher Wahrscheinlichkeit Guanin

Die Sonde S-S-D.lon-0633-a-A-18 wurde mittels FISH mit über 100 Referenzstämmen (Stammsammlung der Abteilung Gastrointestinale Mikrobiologie, Deutsches Institut für Ernährungsforschung, s. 7.3.) auf ihre Spezifität hin überprüft. Der überwiegende Teil der genutzten Stämme wurde aus dem Gastrointestinaltrakt isoliert. Als Positivkontrollen diente der Nachweis mit einer universellen Sonde (Eub338, AMANN et al., 1990) sowie bei *D. longicatena* sp. nov. mit der Sonde S-S-D.lon-0633-a-A-18. Unter Standardbedingungen betrug die Hybridisierungstemperatur der FISH für beide eingesetzte Sonden 46°C, wobei dem Hybridisierungspuffer kein Formamid zugesetzt wurde.

Dabei hybridisierte die Sonde S-S-D.lon-0633-a-A-18 nur mit den beiden neu isolierten Stämmen *D. longicatena* 111-35 und *D. longicatena* 111-13A. Alle weiteren getesteten 108 Referenzstämme (s. 7.3.) der Stammsammlung, einschließlich der nah verwandten *E. formicigenerans* (*D. formicigenerans*, 3.2.2.), *E. hadrum*, *Eubacterium ventriosum* sowie *Clostridium nexile* und *Clostridium oroticum*, lieferten kein Fluoreszenzsignal. Diese Ergebnisse bestätigen somit die Spezifität der Sonde S-S-D.lon-0633-a-A-18 bei der FISH für den Zielorganismus *D. longicatena* sp. nov..

### 3.7.2. Nachweis von *Dorea longicatena* sp. nov. in humanen Faeces

Um die Verbreitung und die Zellzahl von *Dorea longicatena* sp. nov. in der humanen Gastrointestinalflora zu bestimmen, wurde mittels FISH das Vorkommen dieser Spezies in 11 gesunden Probanden beiderlei Geschlechts im Alter von 24 bis 55 Jahren untersucht. Keiner der Probanden hatte während der sechs Monate vor der Probenentnahme Antibiotika eingenommen. Für die Untersuchungen wurden frische Faeces gesammelt, fixiert und mit der Sonde S-S-D.lon-0633-a-A-18 hybridisiert. Mit der Sonde S-S-D.lon-0633-a-A-18 konnten in allen untersuchten Faecesproben zellgebundene Fluoreszenzsignale und anhand dessen Zellzahlen von  $1,8 \times 10^8$  -  $4,26 \times 10^9$  Zellen/g Faecetrockenmasse (TM) mit einem mittleren Wert von  $1,55 \times 10^9$  Zellen/g TM ermittelt werden. Die Zellzahlen der Gesamflora wurden mit dem Sondengemisch Eub-mix (KLEESSEN et al., 1999) mit durchschnittlich  $2,41 \times 10^{11}$  Zellen/g TM bestimmt. Die mit der Sonde S-S-D.lon-0633-a-A-18 ermittelten Zellzahlen bildeten somit einen prozentualen Anteil von durchschnittlich 0,58% an der Gesamflora. Die absolut ermittelten Zellzahlen wie auch die prozentualen Anteile wiesen allerdings eine große interindividuelle Heterogenität auf (Tab. 3.16).

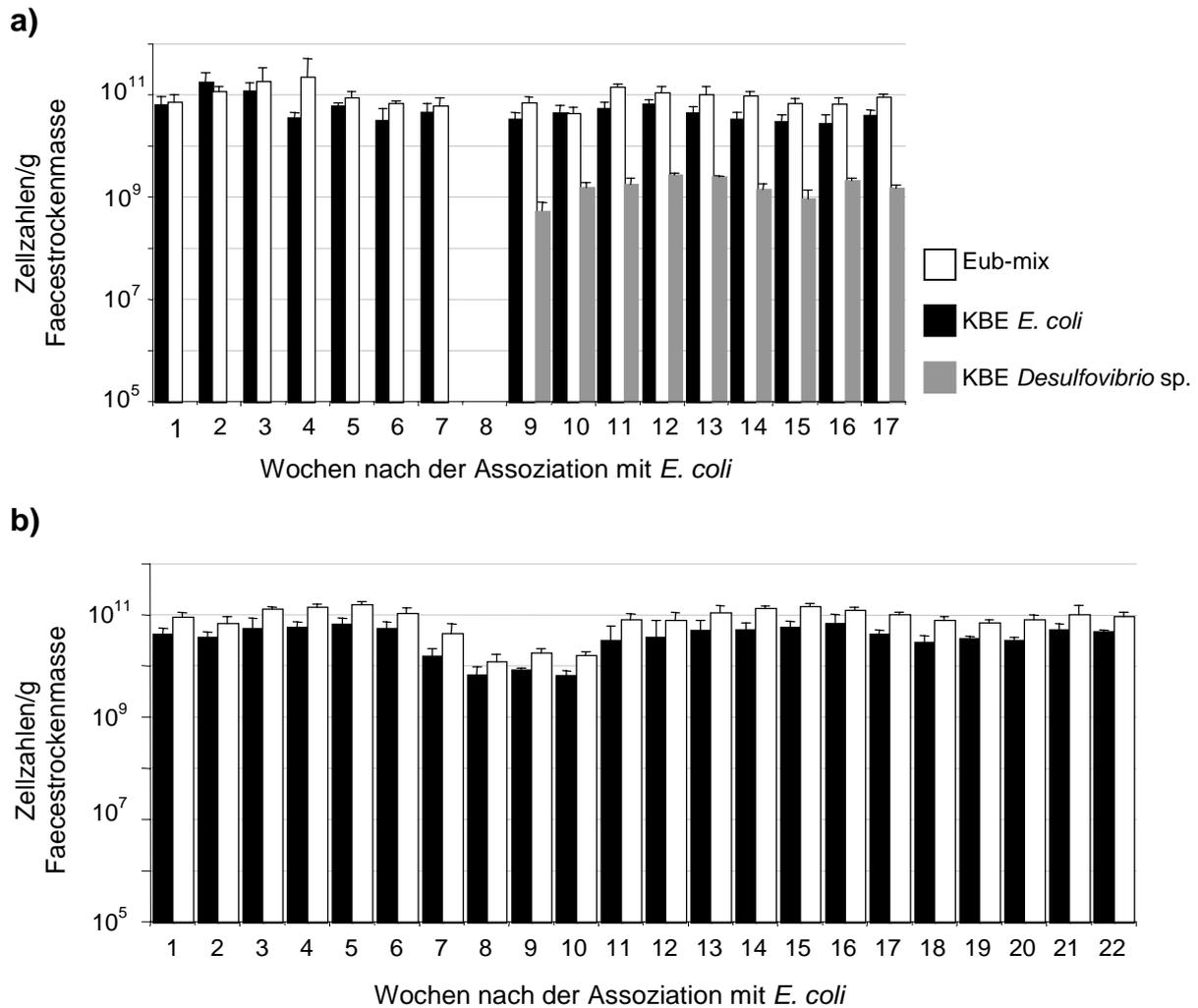
**Tabelle 3.16** Mit der Sonde S-S-D.lon-0633-a-A-18 und dem Sondengemisch Eub-mix ermittelte Zellzahlen in Faecesproben von 11 gesunden Probanden

Probanden	durchschnittliche Zellzahl ( $\pm$ SD)* / g Faecesrockenmasse		prozentualer Anteil
	Gesamtzellzahl ( $\times 10^{11}$ ) mit Eub-mix	Zellzahl ( $\times 10^9$ ) mit S-S-D.lon-0633-a-A-18	
1	2,03 (0,34)	0,69 (0,13)	0,35
2	2,69 (0,41)	3,21 (0,64)	1,23
3	2,71 (0,23)	4,26 (0,85)	1,54
4	1,54 (0,11)	0,18 (0,04)	0,12
5	2,38 (0,22)	0,20 (0,10)	0,08
6	3,63 (0,29)	2,42 (0,42)	0,66
7	1,45 (0,17)	0,21 (0,06)	0,14
8	1,19 (0,21)	1,03 (0,32)	0,84
9	1,71 (0,25)	0,31 (0,04)	0,18
10	4,77 (0,56)	2,94 (0,86)	0,61
11	3,87 (0,86)	1,55 (0,92)	0,40

\* arithmetische Mittelwerte und Standardabweichung (SD) beruhend auf vier Zählungen einer Probe

### 3.7.3. Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung mit Faeces gnotobiotischer Ratten

Die Gesamtzellzahlen in Faeces gnotobiotischer Ratten, die mit *E. coli* assoziiert worden waren, wurden neben der Ermittlung der Kolonie-bildenden Einheiten auch mit FISH bestimmt (Abb. 3.17). Zu diesem Zweck wurde die Oligonukleotidsonden-Mischung Eub-mix eingesetzt, mit der die Gesamtzellzahl in Faeces bestimmt wurde. Im Mittel aller Bestimmungen wurden dabei 51,9 ( $\pm 10,4$ )% der mit FISH ermittelten Gesamtzellzahlen auch als KBE ermittelt.



**Abbildung 3.17** Zellzahlen pro g Faecesrockenmasse von Ratten, die mit *E. coli* und *Desulfovibrio* sp. (DSM 7057) **(a)** bzw. mit *E. coli* und *Methanobrevibacter* RT-1 **(b)** assoziiert wurden. Die Diassoziations der Versuchstiergruppe 3 mit *Desulfovibrio* sp. erfolgte 8 Wochen nach der Assoziation mit *E. coli*. Die Diassoziations der Versuchstiergruppe 2 mit *Methanobrevibacter* RT-1 erfolgte 14 Wochen nach der Assoziation mit *E. coli*. Die Fütterung der Ratten erfolgte mit Altromin fortified® mit Ausnahme von Versuchstiergruppe 2, die von der 7-10. Woche die chemisch definierte Basisdiät erhielten. Die KBE wurden für *E. coli* auf WCA-Agar und für *Desulfovibrio* sp. auf Agar des Mediums C als Mittelwert ( $\pm$ SD) aus drei verschiedenen Verdünnungsstufen einer Probe ermittelt. Die Gesamtzellzahl wurde durch FISH mit der Sondenmischung Eub-mix gezählt.