

4. Diskussion

4.1. H₂-bildende Bakterien im Intestinaltrakt

Im menschlichen und tierischen Darm ist bisher weitgehend unklar, welche H₂-Partialdrücke erreicht werden, wie sich H₂ axial und radial verteilt, und ob die verschiedenen H₂-nutzenden Populationen im selben Kompartiment koexistieren, oder jede Gruppe in verschiedenen Darmabschnitten lokalisiert ist. Weiterhin sind quantitative Aussagen zur H₂-Bildung durch Bakterien bisher auf einzelne Arten beschränkt geblieben und nur *in vitro* ermittelt worden. Das BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY (1984-1989) als umfangreiches mikrobiologisches Standardwerk macht hierzu nur qualitative Aussagen über die Größenordnung der H₂-Bildung der beschriebenen Spezies. MOORE & HOLDEMAN (1974) isolierten aus Faeces von 20 klinisch gesunden Probanden 1147 Isolate, von denen viele H₂ produzierten. Allerdings gaben auch diese Autoren die H₂-Bildung nur als relative Maßzahl an. Sie konnten H₂-Bildung bei Spezies der Gattungen *Eubacterium*, *Coprococcus*, *Ruminococcus*, *Peptostreptococcus*, *Bacteroides*, *Fusobacterium* und *Clostridium* nachweisen. Gemeinsam mit den Untersuchungen von HOLDEMAN et al. (1976) und FINEGOLD et al. (1983) ist die vorgenannte Veröffentlichung die gründlichste Studie des individuellen Anteils einzelner Spezies an der mikrobiellen Gesamtzellzahl in humanen Faeces sowie ihrer Verteilung in verschiedenen Populationen. Deswegen sollen diese Untersuchungen im folgenden als Vergleichsgrundlage herangezogen werden.

Grundsätzlich ist der Beitrag einer Bakterienpopulation zum H₂-Pool im Darm abhängig von der Fähigkeit H₂ zu bilden, der metabolischen Aktivität der betrachteten Spezies, und der Zellzahl, die diese Population im Darm aufweist. In der vorliegenden Arbeit konnte in Inkubationen von Faecesverdünnungen gezeigt werden, daß die erreichte H₂-Konzentration in Verdünnungen von 10⁻⁷ am größten war. Dies stimmte mit der Verdünnungsstufe überein, aus der mit *E. coli*, *K. pneumoniae* und *C. perfringens* auch diejenigen Bakterien isoliert wurden, die eine starke H₂-Bildung aufwiesen. Dies ist möglicherweise ein Indiz dafür, daß Spezies, die im Darm nicht zu den numerisch häufigsten Arten zählen, durch ihre starke H₂-Produktion einen großen Beitrag zur intestinalen H₂-Konzentration leisten.

4.1.1. Häufigkeit von H₂-bildenden Bakterien im Darm

In der vorliegenden Arbeit wurden mehr als 90 Organismen aus Faeces isoliert. H₂-Bildung fand sich in Spezies der Gattungen *Bacteroides*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Escherichia*, *Klebsiella* und der neu postulierten Gattung *Dorea*. Die numerische Häufigkeit der isolierten Spezies soll im folgenden diskutiert werden.

Die hier isolierten *Bacteroides* spp. aus Faeces-Verdünnungen von 10⁻⁷ bis 10⁻⁹ entsprechen Zellzahlen von maximal 10⁹ bis 10¹⁰ Zellen/g Faecetrockenmasse. In der genannten Häufigkeit fanden sich diese Spezies auch bei MOORE & HOLDEMAN (1974) und FINEGOLD et al. (1983), wobei *Bacteroides vulgatus* sowie *Bacteroides thetaiotaomicron* in ihren Untersuchungen zu den sechs häufigsten Arten in Faeces gehörten. *Eubacterium hadrum* wurde hingegen in den Untersuchungen von FINEGOLD et al. (1983) aus insgesamt 141 Faecesproben niemals isoliert. Diese Art wurde erstmals durch HOLDEMAN et al. (1976) beschrieben. In Faeces konnten HOLDEMAN et al. (1976) *E. hadrum* mit durchschnittlichen Zellzahlen (\pm SD) von $5,96 (\pm 0,32) \times 10^8$ /g Faecetrockenmasse (TM) und damit einem 0,23%igen ($\pm 0,12$) Anteil an der Gesamtzellzahl nachweisen. In den mittels Oligonukleotidsonden durchgeführten Untersuchungen von SCHWIERTZ et al. (2000) wurde *E. hadrum* in allen zwölf untersuchten Testpersonen in durchschnittlichen Zellzahlen und in Häufigkeiten in den von HOLDEMAN et al. (1976) berichteten Größenordnungen nachgewiesen. In der vorliegenden Arbeit wurde *E. hadrum* allerdings aus einer Faeces-Verdünnung von 10⁻⁸ entsprechend einer Zellzahl von 10⁹ Zellen/g TM isoliert. Dies stimmt mit den Ergebnissen von SCHWIERTZ (2000) überein, der mittels Oligonukleotidsonden in Faeces derselben Person Zellzahlen von $1,26 \times 10^9$ /g TM feststellte. Bei MOORE et al. (1976) findet sich die erste umfassende Beschreibung von *E. hadrum*. Zum Großteil stimmen die dort beschriebenen Charakteristika mit dem in der vorliegenden Arbeit isoliertem *E. hadrum*-Stamm überein. Vergrünende Hämolyse konnte allerdings ebensowenig wie die Bildung von Propionat, Lactat oder Formiat beobachtet werden. Letztere Endprodukte wurden nach Angabe der Autoren aber auch nicht bei allen Stämmen festgestellt. Außerdem ist zu beachten, daß MOORE et al. (1976) diese Endprodukte nicht in dem in dieser Arbeit verwendeten WCA-Medium bestimmten. Weiterhin berichteten MOORE et al. (1976) von einer Fermentation von Amygdalin, Cellobiose,

Lactose und Salicin durch einige der *E. hadrum*-Stämme, die mit *E. hadrum* 271 nicht beobachtet werden konnte.

Neben *E. hadrum* ist auch *C. perfringens* ein häufig aus humanen Faecesproben isoliertes Bakterium (FINEGOLD et al., 1983; RAFIL et al., 1990). Auch AKAMA & OTANI (1970) fanden *C. perfringens* als zahlenmäßig wichtigen Vertreter der Faecesflora einer Gruppe japanischer Patienten. BENNO et al. (1992) berichteten, daß sich *C. perfringens* auch bei Hunden häufig in Darminhalten nachweisen läßt, und ihre Zellzahl mit dem Alter der Hunde sogar noch zunimmt. Letzteres belegen auch STRINGER et al. (1985) für humane Faeces. Nach MITSUOKA (1992) lag *C. perfringens* in Faeces von 45,2% der untersuchten Probanden mit Zellzahlen von 10^3 bis 10^6 Zellen/g TM vor, wobei diese Zellzahlen mit dem Alter der Testpersonen zunahmten. In Untersuchungen von FINEGOLD et al. (1983) variierte die Zellzahl von *C. perfringens* von $6,3 \times 10^3$ /g TM bis $3,2 \times 10^{12}$ /g TM zwischen einzelnen gesunden Personen und Patientengruppen. Die Variation zwischen verschiedenen Patientengruppen konnte hingegen von DRASAR et al. (1976), der *C. perfringens* als üblichen Vertreter in vielen verschiedenen Populationsgruppen einschließlich Japanern und Amerikanern nachweisen konnte, nicht bestätigt werden. FINEGOLD et al. (1983) stellten weiterhin für *C. perfringens* eine gruppenspezifische Variation zwischen Vegetariern und Personen mit einer japanischen Diät fest. So wurde *C. perfringens* in dieser Untersuchung nicht bei strikten Vegetariern und bei nur 7% der sich überwiegend vegetarisch ernährenden Personen gefunden. Hingegen wiesen 73% der Patienten mit japanischer Diät Zellzahlen von durchschnittlich $3,9 \times 10^7$ /g Faecestrockenmasse auf. Somit steht die vorliegende Arbeit mit der Isolierung von *C. perfringens* aus einer Faecesverdünnungsstufe von 10^{-7} und von einer gesunden Person, die sich nicht ausschließlich vegetarisch ernährte, nicht im Widerspruch zu den Daten von FINEGOLD et al. (1983).

E. coli wurde durch FINEGOLD et al. (1983) bei 92,9% der untersuchten 141 Patienten in Zellzahlen von durchschnittlich $4,0 \times 10^8$ /g TM nachgewiesen, wobei die Zellzahlen von $7,3 \times 10^3$ bis $2,0 \times 10^{12}$ Zellen/g TM variierten. In Untersuchungen von HOLDEMAN et al. (1976) fand sich *E. coli* in ähnlicher Zellzahl und bildete 0,1% der Gesamtzellzahl von Bakterien in Faeces. Somit liegen die Zellzahlen von *E. coli*, der in der vorliegenden Arbeit aus Verdünnungsstufen von 10^{-6} bis 10^{-8} isoliert wurde, ebenfalls in den von anderen Autoren berichteten Größenordnungen.

GERHARDT & IGLEWSKI (1976) wiesen allerdings *E. coli* bei einigen gesunden Personen nicht oder nur in Zellzahlen von weniger als 10^3 /g TM nach. RAUTIO et al. (1999) fanden *E. coli* in Faecesinkubationen von Personen mit Lactosemaldigestion besonders häufig, wenn eine hohe H_2 -Konzentration in der Gasphase der entsprechenden Kultur gemessen worden war.

Die Zellzahlen von *Klebsiella pneumoniae* variierten in den Untersuchungen von FINEGOLD et al. (1983) in ähnlichen Grenzen wie die von *E. coli*; *K. pneumoniae* findet sich aber nur in 19,9% aller Patienten mit durchschnittlichen Zellzahlen von $5,0 \times 10^7$ /g Faecetrockenmasse. In Faeces vollständig oder überwiegend vegetarisch ernährter Personen kommt *K. pneumoniae* hingegen sogar zu 44,5% vor. Somit kann *K. pneumoniae* als weitverbreitetes Bakterium in Faeces angesehen werden. Der Organismus wurde auch in der vorliegenden Arbeit in Zellzahlen von etwa 10^7 bis 10^8 /g Faecetrockenmasse nachgewiesen.

Abschließend betrachtet, wurden in der vorliegenden Arbeit H_2 -bildende Bakterien in Zellzahlen isoliert, die in Übereinstimmung mit den Berichten anderer Autoren stehen. Eine Ausnahme bildete die Isolierung von *Dorea longicatena* sp. nov., die bislang unbekannt war, so daß keine vergleichbaren Literaturdaten zur Verfügung standen. Diese neue Art soll im folgenden gesondert diskutiert werden.

4.1.1.1. Klassifizierung und Häufigkeit von *Dorea longicatena*

Im Zuge dieser Arbeit war es möglich die Spezies *Dorea longicatena* sp. nov. erstmals zu isolieren und zu beschreiben. Jedoch erfaßten SUAU et al. (1999) sie mittels einer 16S rRNA-Gensequenz, die sie mit PCR aus Faeces amplifizierten. Diese war mit der 16S rRNA-Sequenz von *D. longicatena* nahezu identisch (>99%), jedoch bislang ebenso unbekannt wie 24 weitere OTUs (Operational Taxonomic Units; entsprechen bei SUAU et al. molekularen Spezies), aus der *Clostridium coccooides*-Gruppe (rRNA subcluster XIVa, COLLINS et al., 1994). SUAU et al. (1999) präsentierten zudem einen Stammbaum, der einige dieser Klone in unmittelbarer Nachbarschaft zu der hier neu beschriebenen Gattung *Dorea* anordnet. Weiterhin zeigen Arbeiten der letzten Jahre, daß die Einordnung bekannter und neu isolierter Spezies bzw. Sequenzen ständig aktualisiert werden

muß (SUAU et al., 1999; WHITFORD et al., 1998; WILSON & BLITCHINGTON, 1996; ZOETENDAL et al., 1998). Solche Umgruppierungen fanden in den letzten Jahren verstärkt in der Gattung *Eubacterium* statt (CHEESEMAN et al., 1996; KAGEYAMA et al., 1999; POCO et al., 1996a; POCO et al., 1996b; UEMATSU et al., 1993; WADE et al., 1999; ZINDEL et al., 1988). Sie trugen damit unter anderem dem Konsens Rechnung, daß die phylogenetisch heterogene Gattung *Eubacterium* (MAIDAK et al., 1999; COLLINS et al., 1994) auf die Gattung *Eubacterium sensu stricto* mit der Typspezies *Eubacterium limosum* und seine phylogenetisch nächsten Verwandten beschränkt werden sollte (RAINEY & JANSSEN, 1995). Deswegen ist es nur folgerichtig, *D. longicatena* trotz phänotypischer Übereinstimmungen mit Spezies der Gattung *Eubacterium* nicht dieser Gattung zuzuordnen. Diese Forderung wird unterstützt durch die zunehmende Verwendung der rRNA-Gene zur taxonomischen Gruppierung und Umgruppierung, die die weniger stabilen Phänotypen als Klassifizierungsgrundlage abgelöst haben (VAUGHEN et al., 2000; WOESE, 1987). Trotzdem bleibt die phänotypische Abgrenzung von *Dorea longicatena* von den Arten der Gattung *Eubacterium*, die der *Clostridium coccoides*-Gruppe (Subcluster XIVa, COLLINS et al., 1994) zugeordnet werden, wichtig, weil diese Arten nur über wenige solcher Parameter zu differenzieren sind (Tab. 4.1) und im täglichen Laboralltag die phänotypische Charakterisierung noch weit verbreitet ist.

Außerdem beschrieben HOLDEMAN et al. (1976) sowie MOORE & HOLDEMAN (1974) viele taxonomisch nicht klassifizierte Stämme der Gattung *Eubacterium*, die sich aber anhand ihrer Fermentationsfähigkeiten von *D. longicatena* eindeutig unterscheiden ließen. Keiner dieser Stämme kam im humanen Intestinaltrakt so häufig vor, wie dies für *Dorea longicatena* sp. nov. mittels FISH gezeigt werden konnte. Mit der ermittelten Häufigkeit von durchschnittlich 0,58% in Faeces befände sich *D. longicatena* nach den vorgenannten Autoren unter den 30 häufigsten Arten im Intestinaltrakt. Von den *Eubacterium* spp. wurde nur für *E. aerofaciens*, *E. eligens*, *E. rectale* und *E. bifforme* ein durchschnittlich höherer Anteil an der Gesamtzellzahl nachgewiesen (HOLDEMAN et al., 1976; MOORE & HOLDEMAN, 1974; FINEGOLD et al., 1983). *Eubacterium formicigenerans* lag in ähnlicher Zellzahl wie *D. longicatena* vor.

Tabelle 4.1 Vergleich ausgewählter Charakteristika von *D. longicatena* sp. nov. 111-13A und 111-35 mit anderen nicht Butyrat-produzierenden Spezies der Gattung *Eubacterium*.

-, negativ; +, positiv, v, variabel; -v, meist negativ; w, schwach; nb, nicht berichtet.

	<i>Dorea longicatena</i> sp. nov.	<i>Eubacterium formicigenerans</i> ^b	<i>Eubacterium fissicatena</i>	<i>Eubacterium contortum</i>	<i>Eubacterium hadrum</i>	<i>Eubacterium aerofaciens</i> ^c	<i>Eubacterium lentum</i> ^d	<i>Eubacterium eligens</i>
Charakteristika ^a								
Beweglichkeit	-	-	-v	-	-	-	-	+
Nutzung von:								
Amygdalin	+	-	-	-v	-	-	-	-
Arabinose	+	v	-v	+	-v	-	-	-
Aeskulin	+	-	-	-v	-	-v	-	-
Inulin	w	-	-	-	nb	-	-	nb
Mannose	-	-v	w	v	+	+	-	-v
Rhamnose	-	-	+	v	-	-	-	-
Sorbitol	+	-	-	-	-v	-	-	-
Trehalose	-	-	-	-v	-	-v	-	-
Raffinose	w	-	-	w-	-	-	-	-
Melibiose	-	-	-	+	-	-	-	-
Inositol	+	-	+	nb	nb	-	-	-
Maltose	+	+	+	+	-v	+	-	-v
Glucose	+	+	+	+	+	+	-	-

^a Die Charakteristika von *Dorea longicatena* sp. nov. wurden in dieser Arbeit durch Kultivierung in HA-Medium, supplementiert mit den entsprechenden Substraten, untersucht. Die Daten für die nicht Butyrat-bildenden Arten der Gattung *Eubacterium* stammen aus MOORE & HOLDEMAN-MOORE (1986).

^b Die Umgruppierung von *E. formicigenerans* zu *Dorea formicigenerans* comb. nov. wird in dieser Arbeit vorgeschlagen.

^c KAGEYAMA et al. (1999) schlugen den Transfer von *Eubacterium aerofaciens* zur Gattung *Collinsella* gen. nov. mit der Bezeichnung *Collinsella aerofaciens* gen. nov., comb. nov. vor.

^d WADE et al. (1999) schlugen den Transfer von *Eubacterium lentum* zu *Eggerthella* gen. nov. mit der Bezeichnung *Eggerthella lenta* gen. nov., comb. nov. vor.

E. formicigenerans wird hier als Typspezies der Gattung *Dorea* vorgeschlagen (*D. formicigenerans* comb. nov.). Aufgrund der nahen Verwandtschaft der zu dieser Gattung gehörenden Spezies untereinander und zu einigen anderen *Eubacterium* spp. der *Clostridium coccooides*-Gruppe (*Clostridium* subcluster XIVa, COLLINS et al., 1994) erscheint es sinnvoll, die Häufigkeit von *Dorea longicatena* sp. nov. in Faecesproben mit diesen Spezies zu vergleichen. In Studien von FINEGOLD et al.

(1983) wurde *D. formicigenerans* comb. nov. nur in der Gruppe, die sich mit einer Diät westlichen Typs ernährte und nur in 3% der untersuchten Individuen nachgewiesen. In den anderen Gruppen mit Vegetariern, den japanisch ernährten Personen oder den Patienten mit Colonneoplasien wurde diese Spezies nicht nachgewiesen. Insgesamt fanden sich alle von FINEGOLD et al. (1983) untersuchten einzelnen Spezies der Gattung *Eubacterium* bei weniger als 48,9% aller untersuchten Personen. Auch in den anderen angesprochenen Studien, die mit klassischen mikrobiologischen Methoden die Zellzahl ermittelten, wurden nur wenige Bakterien-spezies in allen untersuchten Personen nachgewiesen. Hingegen wurde *Dorea longicatena* in Faeces aller 11 in dieser Arbeit untersuchten Probanden nachgewiesen. Ebenso wurde in Untersuchungen von SIMMERING (1999) und SCHWIERTZ (2000) für einige *Eubacterium* spp. gezeigt, daß ihr mittels klassischer Methoden ermitteltes Vorkommen in der menschlichen Population unterschätzt worden war. So konnte *Eubacterium ramulus* im Gegensatz zu vorhergehenden Arbeiten von FINEGOLD et al. (1983) und HOLDEMAN et al. (1976) in allen untersuchten Probanden nachgewiesen werden (SIMMERING et al., 1999). SCHWIERTZ et al. (2000) zeigten, daß die nachgewiesene Zellzahlen von *E. hadrum* in Faecesproben verschiedener Probanden mittels Oligonukleotidsonden stets höher war als die mit klassischen Methoden ermittelten Zahlen. Die Nachteile des klassischen Nachweises von Mikroorganismen, nämlich die Abhängigkeit von der Kultivierbarkeit der jeweiligen Organismen bzw. von der Selektivität der eingesetzten Medien, zeigten bereits WELLING et al. (1997) und KLEESSEN et al. (1999) auf. Zudem wiesen LANGENDIJK et al. (1995) und DORÉ et al. (1998) darauf hin, daß durch Kultivierung der Bakterien die Gesamtzellzahlen unterschätzt werden und deswegen der relative Anteil der untersuchten Population an der Gesamtfloora überschätzt wurde. Außerdem sollte bei Vergleichen von Ergebnissen zur Häufigkeit einzelner Arten in Faeces, die einerseits mit klassischen Methoden und andererseits mittels Oligonukleotidsonden erzielt wurden, auch bedacht werden, daß die Anzahl der Probanden in den Untersuchungen von HOLDEMAN et al. (1976) und FINEGOLD et al. (1983) größer und damit zum Teil diverser war als in der vorliegenden Arbeit. Beachtet werden sollte ferner, daß FINEGOLD et al. (1983) durchschnittlich $3,2 \times 10^9$ Zellen/g Faecetrockenmasse in 58,2% der Probanden fanden, die der Gattung *Eubacterium* zugeordnet wurden, sich aber keiner bekannten Art dieser Gattung zuordnen ließen.

Die Häufigkeit von *Dorea longicatena* sp. nov. wurde in dieser Arbeit mit gegen die 16S rRNA gerichteten Oligonukleotidsonden in Faeces von elf Personen untersucht. Seit der Entwicklung von Sonden wurde die mikrobielle Diversität im Gastrointestinaltrakt hauptsächlich durch Gruppen-spezifische Sonden beschrieben. In den letzten Jahren wurden verstärkt Spezies-spezifische Oligonukleotidsonden entwickelt (GUMERLOCK et al., 1991; SCHWIERTZ et al., 2000; SIMMERING et al., 1999; YAMAMOTO et al., 1992; WANG et al., 1996). Die hier vorgestellte Spezies-spezifische Sonde zum Nachweis von *D. longicatena* eröffnet nun zum einen die Möglichkeit, die Verteilung und Häufigkeit dieser Spezies in Faeces verschiedener Personen und anderer Spezies zu studieren. Zum anderen könnte eine *in vivo*-Untersuchung der in dieser Arbeit beschriebenen Fähigkeiten von *Dorea longicatena* beim Transfer von H₂ und Formiat zu anderen Bakterienpopulationen durch Ermittlung der Lokalisation der beteiligten Arten *in situ* unterstützt werden. Solche sinnvollen Verknüpfungen der Untersuchung von bakterieller Aktivitäten im Intestinaltrakt und Häufigkeit der beteiligten Spezies *in vivo* wurde kürzlich für die diätetische Beeinflussbarkeit der Zellzahlen von *Eubacterium ramulus* demonstriert (SIMMERING, 1999).

Die interindividuelle Variabilität der Zellzahlen von *Dorea longicatena* in den in dieser Arbeit untersuchten Faecesproben wurde bezüglich *E. ramulus* von SIMMERING et al. (1999) und für weitere *Eubacterium* spp. von SCHWIERTZ et al. (2000) ebenfalls festgestellt. Daß die Zusammensetzung der Intestinalflora Veränderungen unterliegt bzw. die Häufigkeit einzelner Spezies beeinflussbar ist, wurde schon in früheren Arbeiten beschrieben und mit Ernährung (SIMMERING, 1999; DUNNE et al., 1999), Streß (HOLDEMAN et al., 1976), Krankheit (MOORE & MOORE, 1995), genetischer Prägung (MOORE & MOORE, 1995) oder Alterungsprozessen (MITSUOKA, 1992) in Zusammenhang gebracht. Der Einfluß der Diät auf die Zellzahl wurde in dieser Arbeit bei diassozierten Ratten beim Wechsel von synthetischer Diät auf die Standarddiät beobachtet, womit ein Anstieg der Gesamtzellzahl einherging.

Die Problematik des *in situ*-Nachweises stellte SCHWIERTZ (2000) dar. Für ihn war die mangelnde Sensitivität die größte Limitierung der Anwendung der FISH zum Nachweis von Bakterien in Faeces. Dieses Problem stellte sich für die hier untersuchten Proben mit der Sonde S-S-D.lon-0633-a-A-18 nicht, da in allen Faecesproben *D. longicatena* sp. nov. nachgewiesen werden konnte. Allerdings fanden sich

in zwei der untersuchten Faecesproben nur sehr geringe Zellzahlen dieser Spezies. Diese lagen nahe an der Nachweisgrenze der Methode, die bei etwa 10^7 Zellen/g Faecetrockenmasse liegt (SCHWIERTZ et al., 2000). Weiterhin stellt sich für alle bisher entwickelten Sonden die Frage der Spezifität, da sie immer auf der Grundlage der bisher bestimmten 16S rRNA-Sequenzen (MAIDAK et al., 1999; STRUNK & LUDWIG, 1996) entwickelt werden und nur die begrenzte Anzahl der bisher kultivierten Spezies zur Überprüfung der Spezifität zur Verfügung stehen. Deswegen kann eine Hybridisierung entwickelter Sonden mit bisher nicht beschriebenen Organismen nie ausgeschlossen werden. Deshalb empfiehlt es sich, die Spezifität der entwickelten Sonde regelmäßig anhand der vorhandenen Datenbanken zu überprüfen.

4.1.2. H₂-Bildung durch die isolierten Mikroorganismen *in vitro* und *in vivo*

Bislang wurden hauptsächlich *in vitro*-Untersuchungen zur bakteriellen Wasserstoffbildung durchgeführt. Die bakterielle H₂-Bildung *in vitro* wurde 1875 von POPOFF (zitiert nach ZAJIC et al., 1978) erstmals beobachtet. HARDEN (1901) identifizierte die mikrobielle Spaltung von Formiat zu CO₂ und H₂ als Quelle der Wasserstoffbildung durch *E. coli*. Die maximale H₂-Menge, die durch *E. coli* produziert wird, beträgt 1 mol pro mol Glucose (ZAJIC et al., 1978). Für Clostridien wurden bis zu 4 mol H₂ berichtet, die unter anaeroben Bedingungen pro mol Hexose gebildet werden können (THAUER et al., 1977). Diese Menge ist das theoretische Äquivalent zu 33% der brennbaren Energie der fermentierten organischen Substanz. Nach MCKAY et al. (1982), die 32 H₂-bildende Stämme aus humanen Faeces isolierten, war die H₂-Produktion bei Spezies der Gattung *Clostridium* am größten, bei *Bacteroides* spp. am geringsten und lag bei anaeroben Kokken im mittleren Bereich. In einem Komplexmedium bildeten *C. perfringens*-Stämme in der Untersuchung von MCKAY et al. (1982) 15,3-17,6 µmol H₂/ml Medium. Dies stimmt mit den von dem *C. perfringens*-Isolat in dieser Arbeit gebildeten 15,5 µmol H₂/ml WCA-Medium überein. Auch die Wasserstoffbildung durch *Bacteroides fragilis*, *B. ovatus* und *B. thetaiotaomicron*, die MCKAY et al. mit max. 1,4; 0,09 und 0,5 µmol H₂/ml Medium angeben, ist mit den in der vorliegenden Arbeit gemessenen Werten (0,2-2,1 µmol H₂/ml WCA-Medium) in guter Übereinstimmung.

DE VOS et al. (1983) untersuchten die H_2 -Bildung aus Glucose und Formiat durch 18 Stämme der *Enterobacteriaceae*, die zu 12 verschiedenen Spezies gehörten. Bis auf *Serratia marcescens* und *Enterobacter agglomerans* bildeten alle Stämme H_2 . Mit maximal 1,04 mol H_2 /mol Glucose bildete *Klebsiella oxytoca* die größte Menge H_2 . Die anderen Stämme bildeten 0,52-0,85 mol H_2 /mol Glucose. Das H_2 /Glucose-Verhältnis lag für *E. coli* und *K. pneumoniae* bei 0,76 bzw. 0,75, wobei die Glucoseumsetzung nur bis zum Ende der exponentiellen Wachstumsphase verfolgt wurde. In der vorliegenden Arbeit berechnete Quotienten für *E. coli* B5 lagen mit 0,28 deutlich unterhalb der berichteten Werte, aber waren vergleichbar mit den von KARUBE et al. (1976) berichteten 0,46 mol H_2 /mol Glucose. Allerdings verwendeten DE VOS et al. (1983) speziell konstruierte Kulturgefäße, so daß die Versuchsbedingungen nicht direkt mit denen dieser Arbeit vergleichbar sind. Aus Lactulose (β -D-Galactopyranosyl-D-fructose) bildete *E. coli* B5 in der vorliegenden Arbeit sogar nur 0,14 mol H_2 /mol Hexose. Schon von STEPHENSON & STICKLAND (1932) wurde berichtet, daß Fructose durch *E. coli* zwar in gleichem Ausmaß und mit gleicher Geschwindigkeit zu H_2 fermentiert wurde wie Glucose, daß Galactose aber sehr viel schlechter umgesetzt wurde. Dies mag auch in der vorliegenden Arbeit das H_2 /Hexose-Verhältnis beeinflußt haben. Die Wasserstoffbildung unter den Versuchsbedingungen der vorliegenden Arbeit wurde zudem durch den H_2 -Partialdruck beeinträchtigt, der die Reoxidation von NADH durch Bildung von H_2 inhibiert, sobald er einen kritischen Wert überschreitet (JUNGERMANN et al., 1973). Dies zeigten ZENG et al. (1993) auch für *Klebsiella pneumoniae* auf. Letztere konnten die Bilanz der Reduktionsäquivalente zugunsten der Energiegewinnung und des Wachstums regulieren, indem Einfluß auf die reversible Bildung von H_2 aus NADH ausgeübt wurde. NADH als zusätzliche Quelle von H_2 wurde auch für Clostridien beschrieben (PAPOUTSAKIS, 1984; JUNGERMANN et al., 1973).

Für *E. coli* ist neben der Pyruvat : Ferredoxin-Oxidoreduktase noch eine Pyruvat : Flavodoxin-Oxidoreduktase beschrieben, die NAD^+ ebenso reduzieren kann wie Ferredoxin (BLASCHKOWSKI et al., 1982). Gemeinsam mit den anderen Enzymen, die die Umwandlung von Pyruvat zu Acetyl-CoA katalysieren, wird so eine sehr flexible Regulation des Energiemetabolismus ermöglicht (KERSCHER & OESTERHELT, 1982). Aufgrund dieser vielfältigen Regulationsmöglichkeiten hängt die beobachtete Wasserstoffbildung von den im einzelnen angewandten Versuchsbedingungen ab und ist deshalb nur eingeschränkt untereinander und mit den Er-

gebnissen dieser Arbeit vergleichbar. Weiterhin wird die H₂-Produktion durch *E. coli* von der Anwesenheit von Eisensalzen im Medium, der Konzentration von Ammonium (ZAJIC et al., 1978) und Nitrat (WHITE & SINCLAIR, 1971) beeinflusst. Diese Faktoren waren bei den Experimenten der vorliegenden Arbeit zwar konstant, wurden aber nicht kontrolliert, so daß keine Aussage über ihren Einfluß gemacht werden kann.

In der vorliegenden Arbeit konnten Ergebnisse von UMBREIT (1951) bestätigt werden, der gezeigt hatte, daß *E. coli* Formiat in der frühen Wachstumsphase im Medium akkumuliert und die H₂-Bildung erst anschließend einsetzt. UMBREIT (1951) konnte zeigen, daß dies von der Formiat-Hydrogen-Lyase abhängt, die erst in der späten Wachstumsphase exprimiert wird. Nach DE VOS et al. (1983) setzt *E. coli* 70% des Formiats äquimolar zu H₂ um. In der vorliegenden Arbeit wurde in Rein-kulturen von *E. coli* Formiat bis zum Ende der Inkubation ebenfalls nicht vollständig aber äquimolar zu H₂ umgesetzt.

Die in dieser Arbeit gemessene Hydrogenaseaktivität wurde durch viele Faktoren beeinflusst. GLICK et al. (1979) demonstrierten, daß die spezifische Hydrogenaseaktivität sehr stark durch die Zusammensetzung des zellfreien Extraktes beeinflusst wird. Zellfreier Extrakt von *Desulfovibrio desulfuricans*, der nur die periplasmatischen Proteine dieses Organismus enthält, weist spezifische Hydrogenaseaktivitäten von 6,2 U/mg Protein auf, während zellfreier Extrakt von *Clostridium pasteurianum*, der die gesamten löslichen Proteine dieses Organismus enthält, nur 0,62 U/mg Protein aufweist. Solange also die Zusammensetzung des zellfreien Extraktes nicht bekannt ist, läßt sich die Hydrogenaseaktivität verschiedener Spezies nicht vergleichen. In Untersuchungen von SHEN et al. (1996) wurde die Hydrogenaseaktivität durch Veränderungen der Zusammensetzung des Anzuchtmediums verdoppelt bis verfünffacht. KRASNA (1980) zeigte zudem, daß die Hydrogenaseaktivität von *E. coli* aktivierbar ist. Sie ist maximal, wenn Hydrogenasen für das Wachstum notwendig sind. Dagegen ist die Aktivität fünfmal geringer unter Bedingungen, unter denen die Nutzung von H₂ nicht essentiell für das Wachstum ist. Unter letzteren Bedingungen beträgt die Hydrogenaseaktivität von Zellen, die in Komplexmedium angezogen wurden, 0,37 U/mg Protein. Diese Zahlen liegen in etwa in der auch in dieser Arbeit gemessenen Größenordnung der Hydrogenaseaktivität von *E. coli*, das hier ebenfalls in Komplexmedium angezchtet worden war.

Für *C. perfringens* wurde von KARUBE et al. (1976) die Produktion von 0,04-0,18 mol H₂/mol Glucose in 18 h berichtet, was bei weitem unter den in dieser Arbeit gemessenen Werten von 1,78 mol H₂/mol Hexose liegt, die bei der Fermentation von Lactulose in HA-Medium gebildet wurden. Über eine vergleichbare H₂-Produktion berichteten HEYNDRICKX et al. (1986) für *Clostridium butyricum* mit 2,3 mol H₂/mol Glucose. Daß *Clostridium* spp., wie in dieser Arbeit für *C. perfringens* gezeigt, neben Kohlenhydraten noch weitere Substrate nutzt, wurde schon durch andere Arbeiten gezeigt (ANDREESEN et al., 1989; BARKER, 1961; BARKER, 1981; CLIFTON, 1942; WOODS & CLIFTON, 1937). So ermöglicht die Fermentation von Proteinen und Aminosäuren (besonders desaminierte Aminosäuren und Purine) Wachstum, bei dem unter anderem H₂ gebildet wird (BARKER, 1981; NAGASE & MATSUO, 1982). CUNIN et al. (1986) erläuterten, daß *Clostridium* spp. Arginin über eine Arginindesaminase zu Ornithin umsetzen können. Ornithin kann weiter zu Glutamat umgesetzt werden (STALON & MERCENIER, 1984). Serin kann durch viele Spezies der Gattung *Clostridium* fermentiert werden (BARKER, 1961). CARTER & SAGERS (1972) demonstrierten die Desaminierung von Serin zu Pyruvat. In der vorliegenden Arbeit konnte die Umsetzung von Arginin und Serin durch *C. perfringens* ebenfalls beobachtet werden. ALLISON & MACFARLANE (1989) legten dar, daß *C. perfringens* durch Decarboxylierung von Aminosäuren Amine bilden kann. Entgegen den Ergebnissen in der vorliegenden Arbeit können *E. coli* und *C. perfringens* nach Untersuchungen von MITSUOKA (1992) keine Fructooligosaccharose verwerten. In der vorliegenden Arbeit konnte außerdem gezeigt werden, daß die Fermentationsbilanz von *C. perfringens* vom eingesetzten Medium abhing. Nach HEYNDRICKX et al. (1987) und GOTTSCHALK & MORRIS (1981) hat besonders der pH-Wert einen Einfluß auf die Fermentationsbilanz. Nach ANDREESEN et al. (1989) wird die Fermentation zudem nicht immer im Hinblick auf einen hohen ATP-Ertrag optimiert. Vielmehr beeinflussen neben dem pH-Wert auch noch die Fermentationsraten und inhibitorische Effekte der gebildeten Endprodukte die Umsetzung.

Die H₂-Bildung durch *E. hadrum* konnte in der vorliegenden Arbeit quantifiziert und hinsichtlich des Substratspektrums charakterisiert werden. Ansonsten finden sich in der Literatur keine quantitativen Aussagen zur H₂-Bildung durch *E. hadrum*, dessen Fermentationsbilanz in dieser Arbeit erstmals dargestellt wurde. Die von MOORE & HOLDEMAN-MOORE (1986) verwandte Charakterisierung der H₂-

Bildung durch *E. hadrum* durch die einheitslose Ziffer "4", entspricht der in ihrem Kennzeichnungssystem maximal möglichen H₂-Bildung. Weitere Berichte über die H₂-Bildung durch andere *Eubacterium* spp. sind selten. Aus dem Intestinaltrakt von Ziegen isolierte TAYLOR (1972) *Eubacterium fissicatena* und quantifizierte dessen H₂-Bildung. Im Vergleich zu den weiteren in der vorliegenden Arbeit isolierten H₂-Bildnern gehört *E. hadrum* in die Gruppe der starken H₂-Produzenten. Im Gegensatz zu *C. perfringens*, *E. coli* und *K. pneumoniae* liegt *E. hadrum* aber in Faeces in höheren Zellzahlen vor, so daß sein Beitrag zur intestinalen H₂-Bildung einen größeren Anteil ausmachen könnte. Zumal in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, daß weitere Isolate wie z. B. *Bacteroides* spp., die im Darm häufiger sind, wesentlich weniger H₂ bildeten.

Im Gegensatz zu den vielfältigen *in vitro*-Untersuchungen zur bakteriellen H₂-Bildung fehlen *in vivo*-Untersuchungen unter mikrobiologisch genau definierten Bedingungen fast völlig. Nur in einem Meßsystem von SCHULZE et al. (1995) wurden unter nur kurzfristig garantierten gnotobiotischen Bedingungen *in vivo*-Experimente zur H₂-Ausscheidung an monoassoziierten Ratten durchgeführt. In diesem Meßsystem schieden Ratten, die mit *Bacteroides fragilis* monoassoziiert waren und 2750 µmol Lactose appliziert bekamen, 70 µmol H₂ innerhalb von 22 h aus. Der Verlauf der H₂-Ausscheidung mit seinem rapiden Anstieg kurz nach der Applikation ist mit dem in dieser Arbeit beobachteten Verlauf der H₂-Akkumulation vergleichbar. Auch in Untersuchungen am Menschen, deren Darmflora aber nicht charakterisiert wurde, konnte ein starker Anstieg der H₂-Abatmung 2-3 h nach der Verabreichung von Lactulose beobachtet werden (BARTLETT et al., 1980). Der starke Anstieg der H₂-Ausscheidungsrate erfolgte bei monoassoziierten Tieren, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, erst drei bis vier Stunden nach der Applikation. Diese Divergenz mag in der unterschiedlichen bakteriellen Besiedlungsdichte und der Verteilung der H₂-bildenden Populationen im Darmtrakt der Versuchstiere begründet sein, da diese Faktoren den Beginn der Fermentation und der damit einhergehenden H₂-Bildung beeinflussen. Entsprechende Beobachtungen zur bakteriellen Besiedlung werden von SCHULZE et al. (1995) nicht berichtet. Außerdem verwendeten diese Autoren andere Testsubstanzen (Lactose, Glucose), die durch die unterschiedlichen Bakterienspezies verschieden schnell fermentiert werden bzw. nicht vollständig den Dickdarm erreichen. Lactulose, die unverdaut das Colon erreicht, wurde von BJØRNEKLETT & JENSSEN (1982) in Humanstudien verwendet, um die

H₂-Ausscheidung zu beeinflussen. Ihre Probanden erhielten peroral 33 g Lactulose. Ein durchschnittliches Körpergewicht (KGW) von 75 kg angenommen, entsprach dies pro kg KGW in etwa der Applikation von 100 mg Lactulose, die die gnotobiotischen Ratten in der vorliegenden Arbeit erhielten. Ebenso wie bei den vor genannten Autoren wurde auch hier die H₂-Ausscheidung durch die Lactuloseverabreichung gesteigert. BOND & LEVITT (1972) sowie CHRISTL et al. (1992a) steigerten mit zunehmenden Mengen an Lactulose die H₂-Abatmung bzw. die Abatmung von H₂-Äquivalenten wie CH₄ dosisabhängig. Eine Dosis-Wirkungsbeziehung der H₂-Ausscheidung konnte auch in den Tierexperimenten der vorliegenden Arbeit beobachtet werden. Außerdem zeigten diese Autoren, daß die H₂-Abatmungsrate nach etwa 2-3 h ihr Maximum erreichte und nach 5-10 h wieder auf ihr Ausgangsniveau zurückkehrt. Dies ist vergleichbar mit den in dieser Arbeit gemessenen Zeitrahmen, auch wenn die absoluten H₂-Werte sich aufgrund der anders zusammengesetzten Darmflora und der Beschränkung auf die Abatmung nicht mit den durchgeführten Tierversuchen vergleichen lassen. SCHULZE et al. (1995) stellten weiterhin eine minimale Akkumulation von durchschnittlich 1,2 µmol H₂ in 24 h in ihrem Meßsystem fest, wenn dieses keimfreie Ratten enthielt. Eine ähnliche Ansammlung von H₂ war in dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Meßsystem zu beobachten. Keimfreie Tiere sollten weder H₂ bilden noch ausscheiden (LEVITT & INGELFINGER, 1968). Auch sind aus der Literatur keine weiteren Quellen von H₂ bekannt, die zu einer Akkumulation von H₂ in diesem Meßsystem geführt haben können. Spekuliert werden kann, daß der kommerziell erhältliche O₂ geringste Mengen H₂ enthielt, die mit der kontinuierlichen O₂-Zufuhr ins System gelangten.

4.2. H₂-Transfer zwischen verschiedenen Populationsgruppen

In den hier dargestellten *in vivo*-Untersuchungen zum H₂-Transfer war der Schlüsselschritt die Ansiedlung der zu studierenden Bakterienpopulationen. Es zeigte sich, daß sowohl die Assoziation mit H₂-bildenden als auch mit H₂-oxidierenden Populationen von bislang nicht näher untersuchten Faktoren abhängt und somit nicht vorhergesagt werden konnte, ob die Besiedlung erfolgreich verlaufen würde. Über die beteiligten Faktoren kann bisher nur spekuliert werden. In dieser Arbeit ließen sich keimfreie Ratten weder mit *E. hadrum* noch mit *D. longicatena* oder mit der

Methanobrevibacter sp. aus humanen Faeces assoziieren. Hingegen konnten Ratten mit anderen Organismen mono- und diassoziert werden. Im folgenden sollen diese *in vivo*-Experimente in Zusammenhang mit den entsprechenden Reinkultur- und Kokultur-Versuchen sowie Literaturdaten diskutiert werden.

Schon 1973 untersuchten MILLER & WOLIN den H₂-Transfer *in vitro*. Sie zeigten, daß zellfreie Extrakte von *Ruminococcus albus* pro mol Pyruvat ca. ein mol H₂ bilden. Hingegen bilden wachsende Zellen nur 0,59 mol H₂/mol Glucose, da bei steigendem H₂-Partialdruck überwiegend die Ethanolbildung der Reoxidation von NADH dient. Hingegen entsteht in Mischkulturen mit H₂-oxidierenden Organismen, die einen niedrigen H₂-Partialdruck in den Kulturgefäßen erzeugten, vermehrt H₂ und Acetat aber weniger Ethanol. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte mit unterschiedlichen Kokulturen (s. u.) *in vitro* für die beteiligten intestinalen Bakterien erstmals ein H₂- sowie ein Formiat-Transfer gezeigt werden. Dabei wurde die thermodynamisch vorteilhafte verringerte Bildung von reduzierten organischen Produkten aus Pyruvat zugunsten einer verstärkten H₂-Bildung beobachtet. Im Prinzip ist die H₂-Bildung direkt proportional zu dem Reduktionsniveau der Energiequelle und umgekehrt proportional zu der Gesamtmenge reduzierter Endprodukte, die im Medium akkumulieren. Dabei ist die Hydrogenaseaktivität der entscheidende Faktor, der den Elektronenfluß in die verfügbaren Stoffwechselwege steuert (THAUER et al., 1977).

Anders als von KLEESSEN et al. (1999) für die Zellzahlen von *Bacteroides thetaiotaomicron* in Faeces monoassoziierter Ratten berichtet, wurden die Zellzahlen von *E. coli* in Faeces assoziierter Ratten in dieser Arbeit durch Ermittlung der KBE/g Faecetrockenmasse im Vergleich zu der Zellzahlbestimmung mit FISH immer unterschätzt. Von ROZAK & COLWELL (1987) wurde vermutet, daß die Differenz durch Bakterien erklärt werden kann, die zwar lebensfähig aber nicht mehr kultivierbar sind.

4.2.1. H₂-Transfer zwischen H₂-bildenden Bakterien und acetogenen Bakterien

Von KAMLAGE et al. (1997) wurde erstmals beschrieben, daß *C. coccooides* inkubiert mit Formiat in der Gegenwart von 2-7% H₂ in der Gasphase beide Substrate zu Acetat kometabolisiert. In der vorliegenden Arbeit wurde mit der Kokultur von

C. coccooides und *D. longicatena* gezeigt, daß diese beiden Substrate durch *D. longicatena* gebildet und dann auf *C. coccooides* übertragen werden können. Gezeigt werden konnte außerdem, daß der H₂ in diesem Transfer auch von *C. perfringens* stammen kann, wenn ausreichend Formiat im Medium vorhanden ist. In dieser Arbeit wurde zudem gezeigt, daß *C. perfringens in vitro* Lactulose im Unterschied zu den *in vivo*-Experimenten (s. u.) vollständig und schneller fermentierte als *C. coccooides*. Den H₂- oder Formiat-Transfer zwischen zwei Spezies konnten *in vitro* schon ZINDEL et al. (1988) für das syntrophe Wachstum von dem H₂- und Formiat-bildenden *Eubacterium acidaminophilum* gemeinsam mit Sulfat-reduzierenden Bakterien, Acetogenen oder methanogenen Archaea zeigen. BLEICHER & WINTER (1994) sowie SCHINK (1997) legten dar, daß die meisten Bakterien, die am Elektronentransfer zwischen Spezies beteiligt sind, Formiat und H₂ simultan nutzen können bzw. gegeneinander austauschen können.

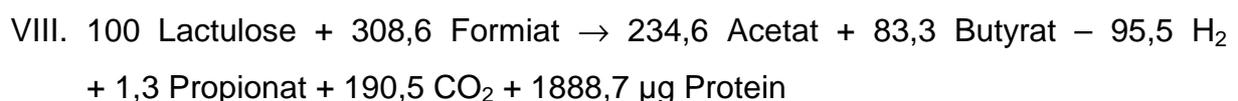
Theoretisch kann zu den Versuchen mit Kokulturen von *D. longicatena* und *C. coccooides* sowie von *C. perfringens* mit *C. coccooides* angenommen werden, daß die Addition der stöchiometrischen Bilanzen der Reinkulturen der Bilanz der Kokultur entsprechen müßte. Diese theoretischen Überlegungen basieren auf der Annahme, daß sich die Relationen der einzelnen Produkte der Organismen in Kokultur zueinander verhalten wie in Reinkultur. Unter dieser Annahme ergibt sich folgende Summe (Gleichung VII.) aus den Bilanzen der Reinkulturen von *C. coccooides* und *D. longicatena*.

VII. 100 Arabinose → 113,6 Acetat + 43,7 Formiat + 64 Ethanol + 42,15 CO₂
+ 1475,2 µg Protein

Diese Bilanz läßt sich mit der experimentell ermittelten Bilanz (Gleichung III., Abschnitt 3.4.6.) der Kokultur vergleichen. Im Vergleich der kalkulierten Werte mit den experimentell ermittelten Daten der Kokultur von *C. coccooides* und *D. longicatena* 111-35 fällt auf, daß netto neben der fast vollständigen Nutzung von H₂ kaum Formiat entstand. Außerdem wurde weniger Ethanol und mehr Acetat gebildet als berechnet wurde. Somit läßt sich vermuten, daß diese Differenz der H₂- und Formiatmenge in der Kokultur ebenfalls durch *C. coccooides* zu Acetat umgesetzt wurde. Dabei ist die gemessene Bilanz der Umsetzung von H₂ und Formiat zu Acetat durch *C. coccooides* bis hin zum in der Zellsubstanz fixierten Kohlenstoff sehr ähnlich

zu den Werten von KERBY & ZEIKUS (1987). Diese dokumentierten die simultane *in vitro*-Nutzung von H_2/CO_2 und Formiat durch das acetogene *Butyribacterium methylotrophicum*. Wie in den Untersuchungen der letztgenannten Autoren wurde durch *C. coccooides* in der vorliegenden Arbeit nahezu 1 Acetat pro $0,25 \times$ (Formiat + H_2) gebildet. Unter der Annahme, daß *C. coccooides* auch in Kokultur 1,75 Formiat + $2,56 H_2 + 0,41 CO_2$ zu 1 Acetat umsetzte, müßten durch *D. longicatena* 111-35 in den Kokulturen mit $98,7 \mu\text{mol } H_2$ mindestens $27,7 \mu\text{mol } H_2$ mehr gebildet worden sein, als dieser Stamm in Reinkultur produzierte. Prinzipiell bestand für *C. coccooides* demnach die Möglichkeit, $38,5 \mu\text{mol}$ Acetat aus den umgesetzten $67,3 \mu\text{mol}$ Formiat zu bilden. Dies würde nicht nur die Energiegewinnung und das Wachstum von *C. coccooides* unterstützen, sondern sollte auch für *D. longicatena* 111-35 energetisch günstig sein. So könnte *D. longicatena* NADH über die in Kokultur gesteigerte H_2 -Bildung reoxidieren, anstatt Acetyl-CoA zu Ethanol reduzieren zu müssen. Die verringerte Ethanolbildung in Kokultur im Vergleich zur Reinkultur scheint dies zu bestätigen. Wenn davon ausgegangen wird, daß statt Ethanol Acetat aus Acetyl-CoA gebildet wurde, bildet die rechnerische Summe der beiden Spezies nach dem soeben dargestellten Gedankenmodell $150,6 \mu\text{mol}$ Acetat, was in guter Übereinstimmung mit den experimentell beobachteten Werten von $148 \mu\text{mol}$ Acetat steht.

Analog zu den soeben angestellten Berechnungen läßt sich auch für Kokulturen von *C. perfringens* V und *C. coccooides* eine Verschiebung der Stoffwechselwege der Reduktionsäquivalente in Zellen von *C. perfringens* erwarten. In den Kokulturen wurde die vollständigen Umsetzung des eingesetzten Formiats beobachtet, wozu *C. coccooides* nach der Bilanz der Reinkultur theoretisch $452,2 \mu\text{mol } H_2$ benötigen würde. Das sind $95,5 \mu\text{mol } H_2$ mehr als *C. perfringens* in Reinkulturen aus Lactulose bildete, wie auch aus der theoretischen Summe (Gleichung VIII. in μmol) der Stöchiometrien der Reinkulturen hervorgeht:



Diese Menge an Wasserstoff kann *C. perfringens* bei geringem H_2 -Partialdruck aus NADH bilden, das somit nicht über die Butyratbildung reoxidiert werden muß. Bereits mehrere Autoren berichteten, daß durch hohen H_2 -Partialdruck sowohl das

Wachstum von *Clostridium* spp. gehemmt als auch die gesamte Fermentation zugunsten reduzierter Produkte bei gleichzeitig verminderter Acetatbildung verschoben wurde (CARDON & BARKER, 1947; CHUNG, 1976; THAUER et al., 1977). Deswegen bietet der Transfer von H₂ in Kokultur auch für *C. perfringens* V die Möglichkeit, die Butyratbildung zugunsten der energetisch günstigeren Acetatbildung zu reduzieren. Berücksichtigt man die veränderten Stoffwechselwege von *C. perfringens* in Kokulturen, so ergab sich mit insgesamt 330 µmol Acetat aus der berechneten Kombination der beiden Spezies ein Wert, der sich dem experimentell ermittelten Wert (Gleichung VI., Abschnitt 3.4.6.) von 342,1 µmol Acetat annähert. Die verstärkte Acetatbildung bei gleichzeitiger Verringerung reduzierter Metaboliten der Fermentation zeigten ebenfalls MORVAN et al. (1996b) für einen cellulolytischen Mikroorganismus aus dem Pansen, der *in vitro* in Kokultur mit einem H₂-oxidierenden acetogenen Bakterium wuchs.

Allerdings ergibt sich für die angestellten Überlegungen ein gewisser Unsicherheitsfaktor durch die geringe Wiederfindungsrate der eingesetzten C-Quelle in den Kokulturen von *C. coccooides* und *C. perfringens*. Dies kann zum Teil dadurch erklärt werden, daß mit wachsenden Zellen gearbeitet wurde und der Zellkohlenstoff aus dem bestimmten Protein nach LYND et al. (1982) errechnet wurde. Da die Kohlenstoffbilanz auch für Kulturen von *C. perfringens* nicht ausgeglichen war, sind auch hier möglicherweise nicht alle Endprodukte erfaßt worden.

PRINS und LANKHORST (1977) zeigten an Nagern, daß die Umsetzung von H₂ und CO₂ zu Acetat durch bestimmte Populationsgruppen auch *in vivo* bedeutsam ist. Neben *C. coccooides* wurden weitere H₂-nutzende acetogene Bakterien aus dem menschlichen und tierischen Intestinaltrakt isoliert (BARKER & HAAS, 1944; BERNALIER et al., 1996b; BERNALIER et al., 1996c; BREZNAK et al., 1988; BREZNAK & SWITZER, 1986; BREZNAK, 1994; GENTHNER et al., 1981; GREENING & LEEDLE, 1989; LEWIS & RETTGER, 1940; SHARAK-GENTHER & BRYANT, 1982; RIEU-LESME et al., 1995; WOLIN & MILLER, 1993). Dabei bilden die phylogenetisch nächsten Verwandten von *C. coccooides* mit Ausnahme von *Ruminococcus obeum* eine phylogenetische Subgruppe, die durch die Fähigkeit gekennzeichnet ist, Acetat aus H₂ und CO₂ zu bilden. In diese Subgruppe gehört auch der von BERNALIER et al. (1996c) isolierte *Ruminococcus hydrogenotrophicus*, der ebenso wie *C. coccooides* in der Lage ist, sowohl autotroph mit H₂ und CO₂ zu wachsen als auch heterotroph mit verschiedensten Kohlenstoffquellen. Diese

Autoren werteten diese Fähigkeit zum mixotrophen Wachstum ebenso wie LECLERC et al. (1997) als ökologischen Vorteil in der Konkurrenz zu methanogenen Archaea im Colon, da letztere nur eine sehr begrenzte Anzahl von Substraten nutzen können (MILLER & WOLIN, 1986). Durch die höheren Energieausbeuten aus der Nutzung der organischen Substrate (DIEKERT, 1990) wachsen die beschriebenen acetogenen Arten heterotroph schneller und erreichen höhere optische Dichten als bei ausschließlich autotrophen Wachstum. Dies gilt auch für das mixotrophe Wachstum von *C. coccooides* (KAMLAGE et al., 1997) und andere acetogene Bakterien (BREZNAK & SWITZER BLUM, 1991; WOLIN & MILLER, 1993). Aufgrund dessen und weil eventuell nicht genügend Formiat im Darm vorlag, nutzte *C. coccooides* im Darm diassoziierter Ratten bevorzugt die organischen Energiequellen, so daß keine reduktive Acetogenese festgestellt werden konnte. Die Fermentation der angebotenen Lactulose durch *C. coccooides* war *in vivo* sogar so effektiv, daß *C. perfringens* nahezu verdrängt wurde. Ein weiterer Faktor, der über die reduktive Acetogenese im Intestinaltrakt entscheidet, ist die H₂-Konzentration. LECLERC et al. (1997) demonstrierten *in vitro* an verschiedenen acetogenen Bakterien, daß der minimale Schwellenwert der H₂-Aufnahme je nach Spezies bei 1100-3680 ppm liegt. Ähnliche Werte gaben LÖFFLER et al. (1999) an. In den *in vivo*-Untersuchungen der vorliegenden Arbeit bildeten Ratten, die mit *C. perfringens* monoassoziiert waren, nach Applikation von 100 mg Lactulose maximal etwa 3000 ppm H₂ in 23 h. Unter der Annahme, daß der H₂-Schwellenwert für *C. coccooides* in ähnlichen Größenordnungen liegt wie die von LECLERC et al. (1997) berichteten, ist es demnach fraglich, ob im Intestinaltrakt der Versuchstiere in den ersten 12 h nach Lactuloseapplikation ein ausreichender H₂-Partialdruck vorlag, um die reduktive Acetogenese zu ermöglichen. Weiterhin beobachteten TERADA et al. (1993) in Untersuchungen der Zellzahl verschiedener Spezies in humanen Faeces eine Verringerung der Zellzahlen von *C. perfringens* in Perioden, in denen die Probanden Lactulose aufnahmen. Dies schien allerdings kein direkter Effekt der Lactulose zu sein. In der vorliegenden Arbeit wurde keine Beeinflussung der Zellzahl von *C. perfringens* durch die Applikation von unterschiedlichen Mengen Lactulose an Ratten festgestellt.

Die Schlüsselrolle, die Formiat für die H₂-Nutzung durch wachsende Zellen von *C. coccooides* zukommt, wurde in dieser Arbeit durch die Ergebnisse der *in vivo*- und *in vitro*-Versuche demonstriert. SCHMITT-WAGNER & BRUNE (1999) sahen in

Formiat, das im Termitendarm Konzentrationen von mehr als 2 mM erreichte, ebenfalls einen möglichen Kandidaten für den Transfer von Reduktionsäquivalenten zwischen den Populationen in verschiedenen Darmabschnitten.

4.2.2. H₂-Transfer zwischen H₂-bildenden Bakterien und methanogenen Archaea

In dieser Arbeit konnte *in vitro* an Kokulturen von *E. coli* und *Methanobrevibacter* RT-1 ein H₂-Transfer demonstriert werden, der im Vergleich zur *E. coli*-Reinkultur zur Verringerung der Lactatbildung bei allerdings gleichzeitiger verstärkter Ethanolbildung führte. Im Gegensatz zu Arbeiten von CHUNG (1976) konnte keine vermehrte Acetatbildung in den Kokulturen nachgewiesen werden. Zudem zeigte CHUNG (1976) an einer Kokultur von *Clostridium cellobioparum* und dem H₂-nutzenden *Methanobacterium ruminantium*, daß *C. cellobioparum* in Kokultur eine höhere Zelldichte und größere Zellerträge erreicht sowie mehr H₂ pro mol Substrat bildet als in Reinkultur. Diese Verschiebung zu stärker oxidierten Produkten und die damit verbundene erhöhte Energiegewinnung durch den organotrophen Partner einer syntrophen Kokultur stellten auch IANNOTTI et al. (1973) dar.

In den Kokultur-Versuchen der vorliegenden Arbeit betrug das molare Verhältnis von Acetat zu Methan 2:1. ZINDEL et al. (1988) dokumentieren dasselbe Verhältnis für Kokulturen von *Eubacterium acidaminophilum* mit *Methanospirillum hungatei*. Reinkulturen von *E. coli* in Balchmedium 1 wiesen in der vorliegenden Arbeit einige Abweichungen in der Fermentationsbilanz im Vergleich zu den von PAPOUTSAKIS & MEYER (1985) publizierten Bilanzen auf. Die Autoren setzten allerdings Glucose als Substrat ein, und das Medium enthielt kein zusätzliches Formiat. Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten *Methanobrevibacter* spp. entsprachen in ihren phänotypischen Merkmalen und in ihrem Wachstumsverhalten in Balchmedium 1 vorhergehenden Berichten (MILLER & WOLIN, 1982; MILLER et al., 1982). Die wachsenden Zellen von *Methanobrevibacter* RT-1 bildeten aus 2,9 mol H₂ und 1,3 mol Formiat 1 mol Methan, was der theoretischen Stöchiometrie der Umsetzung von H₂ und Formiat zu Methan nahezu entsprach (3 mol H₂ + 1 mol Formiat → 1 mol Methan, BLAUT et al., 1992).

Auch in dem weiterentwickelten *in vivo*-Modell dieser Arbeit konnte der H₂-Transfer zwischen *E. coli* und *Methanobrevibacter* RT-1 demonstriert werden. Dabei wurde um so mehr Methan ausgeschieden, je höher die verabreichte Lactulosemenge und damit die im Darm mikrobiell gebildete H₂-Menge war. Diesen Zusammenhang demonstrierten CZERKAWSKI et al. 1972 *in vitro*, indem sie zeigten, daß sich die CH₄-Bildungsrate sowie die H₂-Aufnahme aus der Gasphase durch Methanogene der H₂-Konzentration in der Gasphase proportional ist. Diese Beziehung gilt allerdings erst, wenn die H₂-Konzentration einen bestimmten Schwellenwert überschreitet. Wie von LECLERC et al. (1997) berichtet wurde, liegt der Schwellenwert der H₂-Aufnahme für *Methanobrevibacter smithii*, einem phylogenetisch engen Verwandten von *Methanobrevibacter* RT-1 (LIN & MILLER, 1998; MILLER et al., 1986), mit etwa 116 ppm um das zehnfache unterhalb der Schwellenwerte von untersuchten acetogenen Bakterien. Ähnliche Konzentrationen wiesen CORD-RUWISCH et al. (1988) und LOVLEY (1985) *in vitro* nach. Trotz dieses geringen Schwellenwertes wird H₂ im humanen Darm im Gegensatz zum Pansen, in dem H₂ nur noch 0,05% (v/v) der Pansengase ausmacht (ZAJIC et al., 1978), niemals vollständig umgesetzt (WOLIN & MILLER, 1983). Auch in der vorliegenden Arbeit gaben Methan-ausscheidende Ratten weiterhin geringe Mengen Wasserstoff ab. An konventionellen Ratten, denen ins abgebundene Colon H₂ eingebracht wurde, demonstrierten LEVITT et al. (1974), daß H₂ sehr effektiv aber nicht vollständig genutzt wird. So waren nach 24 h noch 8% der eingesetzten H₂-Menge nachweisbar. Methan-ausscheidende Ratten gaben in Experimenten der vorliegenden Arbeit nach Applikation von 100 bzw. 200 mg Lactulose noch 23,3% bzw. 13,9% der H₂-Menge ab, die monoassoziierte Tiere nach dieser Applikation abgegeben hatten. ROBINSON & TIEDJE (1982) vermuten, daß aufgrund der geringen Löslichkeit von H₂ der Transfer über die Gas-Flüssigkeits-Phasengrenze der limitierende Schritt des H₂-Transfers zwischen syntrophen Spezies sein könnte. Sie konnten nachweisen, daß dieser Faktor in dichten anaeroben Fermentern, deren physikalische Charakteristika mit menschlichen Darminhalten vergleichbar sind, wichtig ist. Diese Autoren halten es für möglich, daß die H₂-Nutzung in einem Ökosystem deswegen nicht zum vollständigen Verbrauch von vorhandenem H₂ führt.

Weiterhin konnte für den Pansen gezeigt werden, daß die Methanogenese zu einer verminderten Bildung von Lactat und Ethanol sowie zu einer gleichzeitigen Erhöhung der Acetatbildung führte. Dies wurde ermöglicht durch die verstärkte

Reoxidation von NADH über die H₂-Produktion statt über Reduktionsprodukte des Pyruvat. *In vitro* wurde dies unter anderem durch LATHAM & WOLIN (1977) mit Kokulturen von *Ruminococcus flavefaciens* und *Methanobacterium ruminantium* belegt. WOLIN & MILLER (1983) bezweifelten, daß bei Methan-ausscheidenden Individuen ein solche Verschiebung der Fermentationsprodukte beobachtet werden kann, da die Menge gebildeten Methans bzw. genutzten H₂ wahrscheinlich zu klein ist, um erfaßt werden zu können. Auch unterschied sich die SCFA-Konzentration und die Konzentration von Lactat und Ethanol in Faeces von Methan-ausscheidenden und nicht Methan-ausscheidenden Individuen nicht signifikant (WRONG et al., 1981). In der vorliegenden Arbeit konnte unabhängig von der Methanausscheidung ebenfalls kein signifikanter Unterschied in der Konzentration von kurzkettigen Fettsäuren in Faeces von Ratten festgestellt werden, die mit Methanogenen besiedelt waren.

Wie in Abschnitt 3.6.3.2. dargestellt, schieden nicht alle diassoziierten Ratten Methan aus, obwohl alle Ratten vergleichbare Zellzahlen von Methanogenen in Darminhalt und Faeces aufwiesen. Eine Hypothese zur Ursache der interindividuellen Variabilität der Methanausscheidung stellten WOLIN & MILLER (1983) auf. Sie vermuteten, daß die interindividuelle Variabilität der Methanausscheidung beim Menschen auf Unterschiede in deren basaler H₂-Ausscheidung zurückzuführen sei. So soll es nur zur Methanausscheidung kommen, wenn die H₂-Produktion aus endogenen Substraten einen bestimmten Schwellenwert überschreitet, während sich Personen, die kein Methan ausscheiden durch geringe H₂-Bildung aus endogenen Substraten auszeichnen würden. Diese Hypothese stützten die Autoren durch die Beobachtung, daß diätetisch zugeführte Substrate sowohl in CH₄-positiven Individuen als auch in nicht-methanogenen Individuen zu einer gesteigerten H₂-Ausscheidung führten, ohne allerdings die Methanausscheidung entsprechend zu steigern (BOND et al., 1971; TADESSE & EASTWOOD, 1978; TADESSE et al., 1980). Sie spekulierten, daß es oberhalb einer bestimmten H₂-Bildungsrate wegen zu langsamer Ausscheidung über Abatmung und Flatus zur Akkumulation von H₂ kommt, was die Ansiedlung von Methanogenen begünstigt. Hingegen legten JENSEN & JØRGENSEN (1994) für zwei verschieden gefütterte Gruppen von Schweinen dar, daß die Gruppe mit dem höheren Faseranteil in der Diät auch mehr Methan ausscheidet. Außerdem konnte die Methanausscheidung durch Gabe von

einzelnen oralen Dosen von Polysacchariden (MCKAY et al., 1982) bzw. Lactulose (PITT et al., 1980) signifikant gesteigert werden.

FLORIN & JABBAR (1994) sowie XU et al. (1990) führen mit der Inhibition der Methanogenese durch Gallensäuren einen weiteren möglichen Grund für geringe Methanausscheidung in einigen Individuen an. Allerdings wiesen in dem in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Tierversuch sowohl Methan-ausscheidende als auch nicht-Methan-ausscheidende Ratten der Gruppe 2, gleich hohe Zellzahlen von Methanogenen in Darminhalt und Faeces auf. MILLER et al. (1982) konnten zudem zeigen, daß *Methanobrevibacter smithii* sowohl in Gegenwart von Galle als auch von Faecesextrakten CH₄-negativer Personen wächst (MILLER & WOLIN, 1982). FLORIN & JABBAR (1994) wiesen hingegen *in vitro* mit Faeces eine dosisabhängige Inhibition der Methanogenese sowie der methanogenen Zellzahl ab 0,05% Gallensäuren im Medium nach. Sie argumentierten, daß die kürzeren Colontransitzeiten in CH₄-negativen Individuen sowie die geringere Methanbildung im Caecum als in Faeces und das Fehlen von Methanogenese in Crohn-Patienten, bei denen mehr als 0,5 g Gallensäuren/Tag ins Colon gelangen, mit ihrer Hypothese konform gehen. Allerdings werden Gallensäuren im Colon von gesunden Individuen schnell metabolisiert. Die vorgenannten Autoren gingen aber davon aus, daß die bakterielle Metabolisierung von Gallensäuren durch eine hohe Fettaufnahmen verzögert werden könnte. Dies stützten sie durch die Beobachtung, daß Fettsucht und Methanabatmung invers korreliert sind (HAINES et al., 1984).

JENSEN und JØRGENSEN (1994) wiesen darauf hin, daß die mikrobielle Aktivität nicht eng mit der Zellzahl korreliert sein muß. Deswegen sollte auch diskutiert werden, warum Ratten, deren Darm und Faeces vergleichbare Zellzahlen aktiver Methanogener enthielten, sich trotzdem in ihrer Methanausscheidung unterschieden. Vorab soll allerdings darauf hingewiesen werden, daß MILLER & WOLIN (1982) und MAZULAK et al. (1989) vermuteten, daß Methanogene in so geringen Zellzahlen im Darm vorliegen können, daß produziertes Methan in der Ausatemluft nicht nachweisbar ist. Diese Problematik sollte allerdings in der vorliegenden Arbeit durch die Erfassung der gesamten Gasausscheidung in Ausatemluft und Flatus die Methanmessung nicht beeinflußt haben.

MACFARLANE & GIBSON (1994) weisen darauf hin, daß auch eine räumliche Trennung von H₂-produzierenden und H₂-oxidierenden Populationen im Intestinaltrakt den H₂-Transfer und damit auch die Methanausscheidung behindern könnte.

CONRAD et al. (1985) beobachteten in diesem Zusammenhang, daß in einem Fermenter 90% des H₂-Transfers zwischen Spezies innerhalb von bakteriellen Aggregaten oder Mikronischen stattfindet, in denen verschiedene Populationen eng miteinander assoziiert sind. Für die Experimente mit Ratten, die mit *E. coli* und *Methanobrevibacter* RT-1 assoziiert waren, könnte dies bedeuten, daß H₂ außerhalb solcher Konglomerate nur zu einem Bruchteil genutzt werden konnte. In der vorliegenden Arbeit konnten Aggregate aus *E. coli* und *Methanobrevibacter* RT-1 weder *in vitro* noch *in vivo* beobachtet werden. Weiterhin konnte eine räumliche Trennung von *E. coli* und *Methanobrevibacter* RT-1 in einzelne Darmabschnitte nicht beobachtet werden. MAZULAK et al. (1989) demonstrierten, daß *Methanobrevibacter* spp. im Caecum sowie im proximalen und distalen Colon einer Wistar-Ratte mit 45%, 21% und 34% der methanogenen Zellzahl relativ gleichmäßig verteilt sind. Eine ähnliche Verteilung der Zellzahlen von *Methanobrevibacter* RT-1 in Caecum und Colon fand sich auch in der vorliegenden Arbeit. Dies steht allerdings im Gegensatz zu der Ansicht von GRIMBLE (1989) und FLOURIÉ et al. (1990), daß die Methanogenese im distalen Darmabschnitt beheimatet sei und von der proximal stattfindenden H₂-Produktion räumlich getrennt sei.

Neben der axialen Trennung von H₂-Produktion und -Nutzung im Darm wird auch eine radiale Trennung dieser Prozesse diskutiert. So findet sich die methanogene Population xylotropher Termiten (Holz-fressende Termiten) fast ausschließlich in der mikrooxygenen Peripherie des Termitendarms (LEADBETTER & BREZNAK, 1996; LEADBETTER et al., 1998), wo sie direkt am Darmepithel als hauptsächlicher H₂-Nutzer einen steilen H₂-Gradienten erzeugten. Die Autoren wiesen bei von ihnen isolierten *Methanobrevibacter*-Stämmen Katalaseaktivität nach. Diese Beobachtung ist im Zusammenhang mit der in dieser Arbeit beobachteten Verminderung der H₂-Ausscheidung ohne gleichzeitige Methanausscheidung durch Ratten, die mit *E. coli* und *Methanobrevibacter* RT-1 diassoziert waren, interessant. Allerdings ist der Kenntnisstand über die räumliche Verteilung von methanogenen Archaea im humanen Darm sowie über die Besiedlung der Oberfläche des Darmepithels noch sehr begrenzt (SAVAGE, 1983; MACFARLANE & MACFARLANE, 1997). MAZULAK et al. (1989) berichteten, daß nur 0,05% der methanogenen Population des Caecums einer Wistar-Ratte dem Darmepithel anhaftet. In der vorliegenden Arbeit wurde die Assoziation von *Methanobrevibacter* RT-1 mit dem Darmepithel nicht untersucht sondern lediglich im Darminhalt nachgewiesen.

Von verschiedenen Autoren wurden zudem Wege aufgezeigt, die Methanogenen H_2 -Nutzung ohne Methanbildung gestatten würden. Dazu berichten LEADBETTER & BREZNAK (1996), daß methanogene Stämme *in vitro* in der Lage waren, in einer Zone des Mediums zu wachsen, in der auch eine Netto- O_2 -Nutzung beobachtet wurde. Sie hatten keine biochemische Erklärung für diese O_2 -Nutzung und vermuteten, daß ihre Stämme einen Mediumbestandteil rereduzierten, der zuvor von O_2 oxidiert wurde und durch die Reduktion wiederholt zu eben diesem Vorgang in die Lage versetzt wurde. Es sind weitere Methanogene bekannt, die eine Toleranz gegenüber O_2 aufweisen (ZEIKUS & HENNING, 1975), und es wurde gezeigt, daß die Sensitivität von Methanogenen gegenüber Sauerstoff in weiten Grenzen variiert (KATO et al., 1993; KIENER & LEISINGER, 1983; ZINDER, 1993). Weiterhin wurden mit *Desulfovibrio* spp. weitere Anaerobier untersucht, die eine starke O_2 -Toleranz aufwiesen (CYPIONKA et al., 1985) und z. T. sogar O_2 mit H_2 reduzieren konnten (DANNENBERG et al., 1992; KUHNIGK et al., 1996; SASS et al., 1998). Ob *Methanobrevibacter* RT-1 allerdings H_2 zur Reduktion von Komponenten des Darminhaltes einsetzen könnte bzw. wieviel O_2 im humanen Colon vorliegt, der reduziert werden könnte, ist nicht bekannt. JENSEN & JØRGENSEN (1994) dokumentierten in allen Segmenten des Gastrointestinaltraktes von Schweinen mit Ausnahme des Magens O_2 -Konzentrationen von weniger als 1% in der Gasphase, während HILLMAN et al. (1994) bei Schweinedärmen hohe (20-50%) Konzentrationen von O_2 in Darminhalt aller Segmente feststellen konnten. Weiterhin demonstrierten SCHMITT-WAGNER & BRUNE (1999) die aerobe Natur der H_2 -nutzenden Aktivitäten im sogenannten gemischten Segment von Termitendärmen. Dabei blieben die Ausscheidungsraten von Methan unbeeinflusst durch die Anwesenheit von Sauerstoff. Diese Untersuchungen erfolgten allerdings unter mikrobiologisch undefinierten Bedingungen und die Autoren schlußfolgerten, daß der Sauerstoffeinfluß auf die H_2 -Nutzung ein indirekter sei, der über eine veränderte Fermentation durch die übrige mikrobielle Population ausgeübt wurde.

SCHMITT-WAGNER & BRUNE (1999) demonstrierten zudem, daß die Methanogenese durch Formiatzufuhr stärker stimuliert wurde als durch Erhöhung der H_2 -Konzentration. Wie für die Acetogenese einiger Arten (s. o.) scheint ein Formiat-Transfer also auch für einige methanogene Spezies notwendig bzw. zumindest förderlich zu sein. Ob die durch *E. coli* gebildete Formiatkonzentration im

Darm gnotobiotischer Ratten ausreichend für die Methanogenese war, konnte aus den erhobenen Daten nicht geschlußfolgert werden.

LEADBETTER & BREZNAK (1996) spekulierten weiterhin über die Möglichkeit, daß methanogene Stämme eventuell *in situ* für die Acetogenese aus H_2/CO_2 verantwortlich sein könnten, da viele Methanogene Schlüsselenzyme des Acetyl-CoA-Weges zur Assimilation von CO_2 besitzen, und einige Stämme von *Methanosarcina* sogar geringe Mengen Acetat ausscheiden. Auch diese bisher nicht untersuchte Hypothese könnte eine reduzierte H_2 -Ausscheidung durch diassozierte Ratten erklären, die kein Methan ausschieden. Allerdings waren in Faeces dieser diassozierten Ratten keine gegenüber monoassozierten Ratten erhöhten Acetatkonzentrationen nachweisbar.

Neben der Beobachtung, daß vier von sieben diassozierten Ratten trotz Besiedlung mit *Methanobrevibacter* RT-1, kein Methan ausschieden, wurde festgestellt, daß sich eine vierte Versuchstiergruppe überhaupt nicht mit *Methanobrevibacter* RT-1 besiedeln ließ. Mehrere Faktoren, die die Ansiedlung von *Methanobrevibacter* RT-1 beeinflußt haben könnten, sind zu diskutieren. Neben dem intestinalen H_2 -Partialdruck, der Transitzeit und der eventuell vorliegenden Anpassung bestimmter methanogener Arten bzw. Stämme an bestimmte Tierarten bzw. Rassen (LAJOIE et al., 1988; LEVITT et al., 1974; MACZULAK et al., 1989; PRINS & LANKHORST, 1977; RODKEY et al., 1972; TANNOCK, 1994) spielt das Redoxpotential im Darm eine Rolle für die Überlebensfähigkeit von methanogenen Archaea. JUHR & GRUBER (1971) stellten im Caecum von keimfreien Wistar-Ratten ein Redoxpotential von + 100 mV fest, das auch durch Polyassoziation mit verschiedenen aeroben und fakultativ anaeroben Bacillus-Arten nur auf – 100 bis –120 mV gesenkt werden konnte. Nach Berichten von HUNGATE (1969) ist für das Wachstum von methanogenen Archaea aber ein Redoxpotential von mindestens –330 mV notwendig. Dieses wurde in den Versuchen von JUHR & GRUBER (1971) nur durch Konventionalisierung der Ratten erreicht (Redoxpotential: –330 bis –370 mV). Somit hat das Redoxpotential im Darm monoassoziierter Ratten eventuell dazu beigetragen, daß *Methanobrevibacter* RT-1 sich bei vielen Tieren nicht ansiedeln ließ und bei erfolgreich diassozierten Tieren die Zellzahl von *Methanobrevibacter* RT-1 in Faeces und Darm gering blieb.

Zusätzlich beeinflußt die intestinale Verweildauer von Darminhalt die Ansiedlung von Mikroorganismen im Darm. FRETER et al. (1983) zeigten, daß *E. coli* in

monoassoziierten Mäusen eine konstante Wachstumsrate von $2,0 \text{ h}^{-1}$ aufweist. Für konventionelle Mäuse wurde eine Ausscheidungsrate für Darminhalt von $0,23 \text{ h}^{-1}$ berechnet. Letzteres entspricht bei Mäusen einer Halbwertszeit für Darminhalt von ca. 3 h, was somit gute Kolonisationsbedingungen für Organismen mit Verdopplungszeiten unter 3 h schafft. Lange Transitzeiten wurden auch für Menschen, Schweine und Nager beschrieben (LUCKEY, 1980; GIBBONS & KAPSIMALIS, 1967). MACFARLANE & CUMMINGS (1991) bestimmten im menschlichen Colon sogar Transitzeiten von 25-67 h. Solche langen Transitzeiten ermöglichen auch langsam wachsenden Bakterienpopulationen wie autotroph auf H_2/CO_2 wachsenden Acetogenen, deren Verdopplungszeit *in vitro* bei 20-30 h liegen (LECLERC et al., 1997), ein Überleben im Darm. Hingegen kann eine Besiedlung des Darms mit Organismen, deren Verdopplungszeit größer ist als die Transitzeit, nur über die Adhäsion an das Epithel erfolgen (TANNOCK, 1994; MACFARLANE & MACFARLANE, 1997). Eine bisher kaum belegte Hypothese postuliert für die Ansiedlung von methanogenen Archaea sogar entsprechende epitheliale Rezeptoren, die deren Persistenz im Darm trotz langsamer Verdopplungszeiten begünstigen würde (HACKSTEIN, 1997). Diese Hypothese bietet eine Möglichkeit, die unterschiedliche Besiedlung der verschiedenen Ratten mit *Methanobrevibacter* RT-1 in dieser Arbeit zu erklären. Da es sich bei den verwendeten Tieren weder um genetisch identische Ratten noch um einen Inzuchtstamm handelte, spielen variable Oberflächenstrukturen des Darmepithels möglicherweise eine Rolle bei der individuell unterschiedlichen Ansiedlung von Methanogenen. MILLER et al. (1986) isolierten aus verschiedenen Rattenstämmen auch verschiedene Stämme von methanogenen Archaea, so daß eventuell Wirtsfaktoren die Ansiedlung bestimmter Stämme beeinflussen. Für TANNOCK (1994) spielen autogene Faktoren eine Hauptrolle bei der Besiedlung des Darmtraktes. Nach LEVITT et al. (1981) und BOND et al. (1971) handelt es sich aber bei den Faktoren, die beim Menschen über die Ansiedlung von Methanogenen entscheiden, eher um Umwelteinflüsse in der frühen Kindheit als um erbliche Faktoren. Sie schlossen dies aus Untersuchungen, in denen genetisch nicht verwandte Personen, die aber unter sehr ähnlichen Umweltbedingungen lebten, immer den gleichen CH_4 -produzierenden Status hatten.

4.2.3. H₂-Transfer zwischen H₂-bildenden Bakterien und Sulfat-reduzierenden Bakterien

In der vorliegenden Arbeit wurden gnotobiotische Ratten mit *E. coli* und *Desulfovibrio* sp. (DSM 7057) diassoziert. Diese diassozierten Ratten schieden weniger H₂ aus als Ratten, die nur mit *E. coli* assoziiert worden waren. In der dissimilatorischen Sulfatreduktion wird Sulfat als respiratorischer Elektronenakzeptor verwendet: $8 \text{ H}^+ + 8 \text{ e}^- + \text{SO}_4^{2-} \rightarrow \text{S}^{2-} + 4 \text{ H}_2\text{O}$. Dabei werden 4 mol H₂ zur Reduktion von 1 mol Sulfat genutzt, was an die energieproduzierende Phosphorylierung von ADP gekoppelt ist. Dies ist für *Desulfovibrio* spp. und *Desulfotomaculum* spp. möglich, wenn geeignete Kohlenstoffquellen wie Lactat, Ethanol und Pyruvat zur Verfügung stehen und zu Acetat oxidiert werden können. Dabei dient die für *Desulfovibrio* spp. charakteristische H₂-Ferricytochrom c₃ Oxidoreduktase je nach Bedingungen sowohl der H₂-Nutzung als auch der H₂-Bildung. Die Umformung von Ethanol zu Acetat und H₂ in Reinkulturen von *Desulfovibrio* spp. ist allerdings thermodynamisch nicht möglich, solange der H₂-Partialdruck nicht deutlich geringer ist als unter Standardbedingungen (BRYANT et al., 1977; THAUER et al., 1977). Bei hohen Sulfatkonzentrationen ist hingegen die dissimilatorische Sulfatreduktion thermodynamisch günstiger als die H₂-Produktion (THAUER et al., 1977).

In vitro konnte gezeigt werden, daß mit Sulfat als Elektronenakzeptor die Wachstumsrate und der Ertrag mit Ethanol, Lactat oder Pyruvat höher sind, als wenn Protonen als Elektronenakzeptoren dienen, und z. B. Methanogene den entstandenen H₂ nutzen. Die Anwesenheit von Sulfat eliminiert die H₂-Produktion durch *Desulfovibrio* spp., die dann den Wasserstoff, der durch andere Mikroorganismen gebildet wird, zur Sulfatreduktion nutzen können (BRYANT et al., 1977). Vermutet wurde, daß Acetat in Gegenwart von Sulfat in anaeroben Mischkulturen komplett zu CO₂ oxidiert wird (WIDDEL & PFENNIG, 1977).

In *in vivo*-Untersuchungen dokumentierten CHRISTL et al. (1992b) den Einfluß hoher diätetischer Sulfatmengen auf die Sulfat-reduzierenden Bakterien. In humanen Interventionsstudien mit Probanden, die täglich 15 mmol Natriumsulfat erhielten, konnten sie eine Zunahme der Zahl Sulfat-reduzierender Bakterien in Faeces feststellen. Bei einem Körpergewicht (KGW) von 75 kg entsprach diese Dosis einer täglichen Aufnahme von 200 µmol Natriumsulfat/kg KGW. Obwohl Ratten, die in der vorliegenden Arbeit mit *E. coli* und *Desulfovibrio* sp. (DSM 7057) diassoziert waren,

pro kg KGW bis zu 1,6 mmol Natriumsulfat erhielten, wurde keine Beeinflussung der Zellzahlen von *Desulfovibrio* sp. beobachtet. Dieser Unterschied in der Wirkung von Sulfat auf die Zellzahl Sulfat-reduzierender Bakterien beruht möglicherweise auf der Verabreichungsform. Während die Probanden bei CHRISTL et al. (1992b) drei mal täglich je 5 mmol in Gelatine kapseln verpacktes Natriumsulfat aufnahmen, erhielten die diassozierten Ratten die gesamte gelöste Sulfatmenge vor Beginn der Meßperiode intragastral verabreicht. Deswegen könnte die Sulfatmenge, die bei CHRISTL et al. das Colon erreichte, größer gewesen sein als in der vorliegenden Arbeit. Allerdings konnte von FLORIN et al. (1991) am Menschen gezeigt werden, daß von aufgenommenen 16,6 mmol Sulfat/Tag etwa 12 mmol das Colon erreichen. Diese verabreichte Menge lag weit unter derjenigen, die die Ratten erhielten. Deswegen sollte man annehmen, daß auch bei Ratten Sulfat in ausreichenden Mengen in den Dickdarm gelangte, um eine dissimilatorische Sulfatreduktion zu unterstützen.

Außerdem wurde in der vorliegenden Arbeit dargelegt, daß trotz der berichteten reduzierten H₂-Ausscheidung diassoziierter Ratten die Sulfidkonzentration in Faeces assoziierter Ratten unabhängig von der Besiedlung und der Höhe des zugeführten Sulfates war. Inwieweit somit eine dissimilatorische Sulfatreduktion stattgefunden hat, ist zu diskutieren. POCHART et al. (1992) dokumentierten an zwei Gruppen in einer Humanstudie, daß die dissimilatorische Sulfatreduktion im Darm nicht mit einer erhöhten Sulfidkonzentration in Faeces korreliert sein muß. Beide Gruppen beherbergten vergleichbare Zahlen an Sulfat-reduzierenden Bakterien, aber eine Gruppe nutzte intestinalen H₂ zur Methanogenese, während die zweite Gruppe kein Methan ausschied. Trotzdem traten keine signifikanten Unterschiede in der Sulfid- und Sulfatkonzentration in Faeces beider Gruppen auf. GIBSON et al. (1990) zeigten zwar, daß Individuen, die Sulfat-reduzierende Bakterien beherbergten (SRB-positiv), durchschnittlich höhere Sulfidkonzentrationen in Faeces aufwiesen als Personen, bei denen keine Sulfatreduzenten nachweisbar waren (SRB-negativ). Allerdings unterschied sich die Sulfidkonzentration in Faeces bei mehr als 30% der untersuchten SRB-positiven Probanden nicht von derjenigen der SRB negativen Probanden.

Weiterhin besteht die Möglichkeit, daß die zusätzliche Sulfidbildung so gering war, daß sie in Faeces nicht feststellbar war. Nach Applikation von 200 mg Lactulose und unterschiedlichen Mengen Sulfat verringerte sich die H₂-Ausscheidung diassoziierter Ratten um etwa 200 µmol H₂ im Vergleich zu monoassozierten Tieren.

Somit können etwa 50 μmol Sulfid gebildet worden sein, da 4 mol H_2 zur Reduktion von 1 mol Sulfat zu 1 mol Sulfid notwendig sind (THAUER et al., 1977). Bei einer täglichen Faecesausscheidung von etwa 10-20 g würde dies eine maximale Anhebung der Sulfidkonzentration um 2,5-5 $\mu\text{mol/g}$ Faecesfeuchtmasse zur Folge haben. Eine solche zusätzliche Sulfidmenge wäre mit der eingesetzten Methode der Sulfidbestimmung erfaßt worden, so daß eine verstärkte Sulfatreduktion im Darm diassoziierter Tiere feststellbar gewesen sein sollte. STROCCHI et al. (1992) zeigten mit einer modifizierten Methode allerdings auch, daß die Sulfidkonzentration in Faeces mit der Methode nach CLINE (1969) unterschätzt wird. Im Gegensatz zu vorhergehenden Berichten finden erstere 1,6 ($\pm 0,9$) μmol Sulfid/g TM. Dies entspricht etwa der zehnfachen Menge an Sulfid im Vergleich zu den Werten, die mit der nicht modifizierten Methode ermittelt wurden (GIBSON et al., 1988c). Die von STROCCHI et al. berichtete Methode wurde allerdings nur unzulänglich dokumentiert, so daß sie in dieser Arbeit nicht mit reproduzierbaren Ergebnissen nachvollzogen werden konnte.

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, daß in Faeces-Inkubationen von Ratten, die mit Sulfat-reduzierenden Bakterien assoziiert waren, Sulfid gebildet und gleichzeitig H_2 verbraucht wurde. Somit ist zu schließen, daß die im Rattendarm angesiedelte *Desulfovibrio* sp. zur H_2 -abhängigen Reduktion von Sulfat befähigt waren. Dies wurde auch beobachtet, wenn den Kulturgefäßen keine Lactulose als Substrat der H_2 -Bildung zugesetzt wurde. Die Stimulierung der dissimilatorischen Sulfatreduktion in Faecesinkubationen durch die Zufuhr von Sulfat zeigten unter anderen auch STROCCHI et al. (1993b) und GIBSON et al. (1993a) in stationären Kulturen bzw. GIBSON et al. (1988b) in einem dreiphasigen, kontinuierlichem Kultursystem, wobei Sulfat in Form von Mucin zugeführt wurde. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, daß *in vivo* neben der dissimilatorischen Sulfatreduktion noch weitere Weg der Energiegewinnung durch *Desulfovibrio* sp. (DSM 7057) beschritten wurden. WILLIS et al. (1997) berichteten über zwei Stämmen von *Desulfovibrio desulfuricans*, die aus humanen Faeces isoliert wurden und in der Lage waren auch fermentativ zu wachsen. Daß einige Spezies von *Desulfovibrio* in Abwesenheit von Sulfat auch fermentativ wachsen können, legte schon POSTGATE (1984) dar. Darüber hinaus wiesen WIDDEL (1988) sowie GIBSON et al. (1993b) darauf hin, daß die bisher charakterisierten Lactat-nutzenden *Desulfovibrio* spp. gewöhnlich sowohl H_2 als auch Lactat als Elektronendonator der Sulfatreduktion nutzen können.

Wie in der vorliegenden Arbeit dargestellt wurde, bildete der in den Tierexperimenten verwendete *E. coli*-Stamm *in vitro* 25 mol Lactat pro 100 mol Lactulose. Diese Menge standen somit auch *Desulfovibrio* sp. (DSM 7057) im Rattendarm als Substrat zur Verfügung.

Das verwendete Tiermodell bot keine Möglichkeit, den H₂-Partialdruck im Darm zu ermitteln. Für den exergonen Prozeß der Sulfatreduktion mit H₂ ist bekannt, daß die Änderung der Freien Energie deutlich reduziert wird, wenn der H₂-Partialdruck unter 10⁵ Pa sinkt. Mit abnehmendem H₂-Partialdruck wird diese Reaktion thermodynamisch ungünstiger, kann aber selbst bei einem H₂-Partialdruck um die 10 Pa, die in natürlichen Habitaten häufig zu finden sind, immer noch ablaufen (CONRAD et al., 1986). Wie schon für die anderen durchgeführten Diassoziationsexperimente mit gnotobiotischen Ratten angemerkt, läßt sich der Einfluß des intestinalen H₂-Partialdruckes kaum abschätzen. Nichtsdestotrotz sollte seine Bedeutung bei der Interpretation der Ergebnisse nicht unbeachtet bleiben.

4.3. Beurteilung des verwendeten Tiermodells und der Versuchsanordnung

In diesem Abschnitt soll auf grundsätzliche Fragen der Eignung der gnotobiotischer Ratten als Modell des besiedelten Säugetierdarms eingegangen werden. Außerdem soll das neu entwickelte Versuchssystem zur Messung der H₂-Ausscheidung gnotobiotischer Ratten mit den bisherigen Versuchsanordnungen verglichen werden.

4.3.1. Prinzipielle Eignung gnotobiotischer Ratten zur Untersuchung mikrobieller Wechselwirkungen im Darm

In Übersichtsartikeln von SYED et al. (1970) sowie BERG (1996) wurde dargestellt, daß die Besiedlung keimfreier Tiere zwar viele aber selten alle Abnormitäten keimfreier Tiere normalisiert. Nach JUHR (1972) war der augenfälligste anatomische Unterschied zwischen keimfreien und konventionellen Ratten, die Caecomegalie, die erstere ausbilden und die sich auch bei den in dieser Arbeit eingesetzten Tieren zeigte. Derselbe Autor beschrieb, daß diese Caecomegalie nicht durch die Mono-

assoziation mit unterschiedlichen Spezies wie *E. coli* oder *Clostridium* spp. aufgehoben werden kann. Dies wurde ebenfalls in den hier dargestellten Versuchen bestätigt. FRETER (1983) schlußfolgerte aus den beschriebenen Unterschieden zwischen konventionellen und gnotobiotischen Tieren, daß Interaktionen zwischen Bakterien im Darm gnotobiotischer Tiere nicht *a priori* als wirklichkeitsgetreue, d. h. identische Darstellung dieser Interaktion in konventionellen Tieren gelten können. Zum Beispiel zeigten FRETER & ABRAMS (1972), daß zwei *E. coli*-Stämme, die in diassozierten Mäusen interagieren, dies in gnotobiotischen Mäusen nicht tun, wenn diese eine komplexere Flora beherbergen. Die vielfältigen Mechanismen, mit denen sich Bakterien eventuell gegenseitig inhibieren, faßt SAVAGE (1977) zusammen: pH-Änderung, Redoxpotential-Verschiebung, Produktion von Hemmstoffen, Substratkonkurrenz, Konkurrenz um Anheftungsstellen und Beeinflussung der lokalen Immunität. Dabei soll nach FRETER (1983) die Konkurrenz um Substrate und Energiequellen sowie die Fähigkeit zur Anhaftung an das Darmepithel der wesentliche Mechanismus sein, der die Zusammensetzung der Darmflora reguliert. Daraus folgt, daß die Populationsgröße jeder einzelnen Spezies durch die Konzentration dieser limitierenden Substrate und die Effizienz der einzelnen konkurrierenden Spezies, diese umzusetzen, kontrolliert werden. Somit finden sich im gnotobiotischen Rattenmodell sicherlich nicht die identischen Verhältnisse wie in konventionellen Tieren. Trotzdem reduziert nur ein gnotobiotisches Tiermodell die komplexen natürlichen Bedingungen auf einen zumindest theoretisch meßbaren und kontrollierbaren Umfang. Weiterhin finden sich im Gegensatz zu *in vitro*-Experimenten nur im gnotobiotischen Tier die morphologischen, physiologischen, biochemischen und immunologischen Wechselwirkungen zwischen intestinalen Mikroorganismen und Wirt (BERG, 1996). Somit spiegelt das Rattenmodell sehr viel eher die natürliche Situation im Darm wieder als ein *in vitro*-Modell.

Neben dem Unterschieden zwischen gnotobiotischem und konventionellem Status wird die Übertragbarkeit von Versuchsergebnissen auch von Speziesunterschieden beeinflusst. CARMAN et al. (1993) betonen, daß sich einige anatomische und physiologische Unterschiede zwischen Ratten und Menschen finden, die die Übertragbarkeit von Versuchsergebnissen beeinflussen könnten. LEVITT et al. (1981) zeigten zudem in einem mathematischen Modell, daß die Anordnung der Gefäße im Dünndarmepithel einen Einfluß auf die Diffusion von Darmgasen ins Blut haben kann. Diese Anordnung unterscheidet sich nun bei vielen Spezies, so daß die

humane Morphologie eher der von Katzen und Hunden gleicht als der von Ratten. Für die Absorption von Gasen aus dem Dickdarm gibt es hingegen keine Untersuchungen an einzelnen Spezies. Dies hat allerdings für die Situation von in dieser Arbeit durchgeführten Tierversuchen nur eine geringe Bedeutung, da die gesamte Ausscheidung von H_2 und CH_4 durch Flatus und Abatmung gemessen wurde. Die Art der Diffusion beeinflusst in dem vorgestellten Modell nur den Partialdruck der Gase, die Verweildauer der Gase an einer untersuchten Lokalisation und die Menge der Gase, die in weiter distal gelegene Darmabschnitte transportiert wird. Der Vergleich vom gnotobiotischen Rattenmodell und der Situation im humanen Intestinaltrakt wird also möglicherweise in allen Fällen beeinflusst, in denen davon ausgegangen werden muß, daß in einem proximal gelegenen Darmabschnitt H_2 gebildet wird, der erst weiter distal von H_2 -oxidierenden Populationen genutzt wird. Die Zellzahlen der unterschiedlichen bakteriellen Populationen im Darm diassoziierter Ratten liefern allerdings keinen Grund für die Annahme einer solchen räumlichen Trennung von H_2 -Bildung und H_2 -Nutzung in dem vorgestellten Tiermodell.

Zusammenfassend ergibt sich also die Notwendigkeit, die komplexen Beziehungen der intestinalen Darmflora einerseits zu vereinfachen und andererseits über die begrenzten Möglichkeiten von *in vitro*-Experimenten hinauszugehen. Denn nur im gnotobiotischen Modell können komplexere Faktoren der Wechselwirkungen zwischen Wirt und intestinalen Bakterien überhaupt untersucht werden, sowie Beziehungen zwischen unterschiedlichen bakteriellen Spezies unter definierten Bedingungen *in vivo* analysiert werden.

4.3.2. Wertung des verwendeten Meßsystems im Vergleich zu anderen Versuchsanordnungen

Schon früh wurden Experimente mit Ratten durchgeführt, in denen nach analer Ligatur und Tötung der Tiere Gas direkt aus dem Intestinaltrakt entnommen wurde (HEDIN & ADACHI, 1962; VENKATARAMAN & JAYA, 1975). Wie in allen Versuchen mit konventionellen Tieren wiesen diese Experimente im Gegensatz zu Versuchen mit gnotobiotischen Tieren den Nachteil einer nur unzureichend definierten intestinalen Mikroflora auf. Dies beeinträchtigt die Aussagefähigkeit der Experimente, da sowohl H_2 -produzierende als auch H_2 -oxidierende Mikroflora nicht bestimmt

wurden und somit unsicher war, welche Populationsgruppen an der beobachteten Netto-H₂-Ausscheidung beteiligt waren. Weiterhin ist unklar welche Wirkung die Analligatur (z. B. über die Partialdrücke) oder die Tötung auf die Zusammensetzung der Gase im Darm hatten. OSTRANDER et al. (1982) umgingen letztere Schwierigkeiten, indem sie anästhesierte Ratten in Gas-Sammelkammern verbrachten. Weitere Autoren nutzten ebenfalls geschlossene Systeme zur Messung der H₂-Konzentration nach Applikation von Gas oder Lactulose in den Darm von Ratten (BOND et al., 1971; BOND & LEVITT, 1972; LEVITT & LEVITT, 1973; LEVITT et al., 1974). Diese Systeme waren aber nicht geeignet, das Überleben der Ratten über einen längeren Zeitraum zu gewährleisten. Hingegen entwickelten GUMBMAN et al. (1971) ein geschlossenes System, das mit einem Lebenserhaltungssystem versehen war und später modifiziert wurde (WAGNER et al., 1976; FLEMING, 1980; REDDY et al., 1980; PHILLIPS et al., 1988). GUMBMAN et al. (1971) beobachteten Unterschiede in der H₂-Ausscheidung sowohl zwischen einzelnen Ratten als auch zwischen wiederholten Messungen derselben Ratte. Es wurde festgestellt, daß Experimente mit diesen Systemen nur schlecht reproduzierbar sind, weil sie durch die Variation der bakteriellen Darmbesiedlung beeinflusst werden (FLEMING, 1980; PHILLIPS et al., 1988; CHRISTL et al., 1995). Um diese Beeinträchtigung zu vermeiden, nutzten SCHULZE et al. (1995) ein Rattenmodell, was die Messung der H₂-Ausscheidung von gnotobiotischen Ratten erlaubte. Allerdings konnte dieses System den gnotobiotischen Status der Versuchstiere nicht sicherstellen, da die Tiere zur H₂-Messung aus dem Isolator entfernt werden mußten. Deswegen war es mit dieser Versuchsanordnung auch nicht möglich, die H₂-Ausscheidung eines gnotobiotischen Tieres mehrmals zu messen, um z. B. den Einfluß verschiedener Diäten oder unterschiedlicher bakterieller Darmbesiedlung zu untersuchen. Aus diesen Gründen wurde in dieser Arbeit ein weitergehendes System genutzt, das die wiederholte Messung der H₂-Ausscheidung gnotobiotischer Ratten ermöglichte, ohne ihren definierten mikrobiologischen Status zu gefährden. Dies wurde erreicht durch die räumliche Trennung von gnotobiotischem Tier sowie seiner umgebenden, „gnotobiotischen“ Atmosphäre innerhalb des Isolators und der Analyse der H₂-Konzentration dieses Gasraumes im konventionellen Bereich.

Zusätzlich zu den Vorteilen, die eine definierte intestinale Mikroflora für die Untersuchung des H₂-Metabolismus bedeutete, erlaubte der Einsatz einer chemisch definierten, synthetischen Diät, die Substrate aus denen H₂ produziert wird, exakter

zu bestimmen. So war die gesamte H₂-Ausscheidung von Ratten, die mit *E. coli* monoassoziiert worden waren und eine chemisch definierte Basisdiät erhielten, auf die applizierte Lactulose zurückzuführen. Dies ermöglichte zum Beispiel den Vergleich der pro mol Hexose gebildeten mol H₂ zwischen *in vitro*-Untersuchungen und *in vivo*-Experimenten in der vorliegenden Arbeit.

4.4. Ausblick

Bisher durchgeführte Studien zum H₂-Metabolismus von Mensch und Tier (JENSEN & JØRGENSEN, 1994; RAUTIO et al., 1999) haben gezeigt, daß die Komplexität der mikrobiellen Darmflora die detaillierte und quantitative Untersuchung von H₂-Produktion und H₂-Oxidation verhindert. Das hier vorgestellte Tiermodell und Meßsystem ist aufgrund der definierten intestinalen Mikroflora, dem Einsatz von chemisch definierten Diäten und der verlustfreien H₂-Messung geeignet, stöchiometrische Untersuchungen zu H₂-Produktion und H₂-Oxidation intestinaler Bakterienpopulationen durchzuführen. Diese Untersuchungen der H₂-Ausscheidung von Versuchstieren können auf andere bakterielle Spezies, verschiedene diätetische Einflüsse und nach Anpassung des Systems sogar auf weitere Arten von gnotobiotischen Tieren ausgedehnt werden. Weiterhin bietet das gnotobiotische Rattenmodell die Möglichkeit die Wechselwirkung zwischen Wirt und Bakterien im Kontext des H₂-Metabolismus zu studieren, indem die Untersuchungen mit weiteren Methoden wie z. B. immunologischen und zellbiologischen Methoden kombiniert werden.

Als nächster Schritt sollten zunächst Polyassoziationen mit H₂-produzierenden und mehreren H₂-oxidierenden Populationsgruppen durchgeführt werden, um zu klären ob genetische Faktoren, diätetische Faktoren oder die Besiedlungsreihenfolge einen Einfluß auf die Dominanz oder Koexistenz mehrerer H₂-nutzenden bakterieller Populationen im Darm hat. Dabei ist besondere Sorgfalt der Auswahl von geeigneten Mikroorganismen zu widmen, die sich stabil im Darm der gnotobiotischer Ratten ansiedeln lassen.