

Aus der Abteilung Gastrointestinale Mikrobiologie  
des Deutschen Institutes für Ernährungsforschung  
und aus dem Institut für Tierschutz, Tierverhalten und Labortierkunde des  
Fachbereiches Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

**Intestinaler H<sub>2</sub>-Metabolismus:  
*In vitro*-Experimente und  
Etablierung eines gnotobiotischen Rattenmodells**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
**David Taras**  
Tierarzt aus Pretoria

Berlin 2001

Journal-Nr.: 2491

Gedruckt mit Genehmigung  
des Fachbereiches Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. M. F. G. Schmidt

Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. N.-C. Jühr

Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. M. Blaut

Tag der Promotion: 16.7.2001

## Meinen Eltern in Dankbarkeit

I guess one of the great agonies of life is that we are constantly trying to finish that which is unfinishable. [...] The dream may not be fulfilled, but it's just good that you have a desire to bring it into reality.

Martin Luther King, Jr.



**INHALT**

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>VII</b>
<b>1. EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
1.1. Die gastrointestinale Mikroflora.....	1
1.2. H <sub>2</sub> -Bildung durch intestinale Bakterien.....	2
1.3. H <sub>2</sub> -Transfer in unterschiedlichen bakteriellen Lebensräumen.....	5
1.4. Pathologische Bedeutung von intestinalem Gas mit besonderer Berücksichtigung von Wasserstoff .....	9
1.5. Ziel der Arbeit .....	11
<b>2. MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>12</b>
2.1. Organismen .....	12
2.2. Nährmedien.....	12
2.3. Anzuchtbedingungen.....	21
2.4. Stammhaltung.....	21
2.5. Reinheitskontrollen .....	22
2.6. Messung des Bakterienwachstums .....	22
2.7. Aerobe und anaerobe Ernte von Zellen.....	22
2.8. Genomische DNA .....	23
2.8.1. Isolierung von genomischer DNA aus Bakterienzellen.....	23
2.8.2. Agarose-Gelelektrophorese von DNA .....	24
2.8.3. Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von doppelsträngiger DNA..	25

<b>2.9. Anreicherung am intestinalen H<sub>2</sub>-Metabolismus beteiligter Bakterien</b>	
<b>aus Humanfaeces</b> .....	<b>25</b>
2.9.1. Anreicherung H <sub>2</sub> -produzierender Bakterien.....	25
2.9.1.1. Isolierung in Medien mit verschiedenen Substraten (Strategie A) .....	26
2.9.1.2. Isolierung in Medium mit Inhibitoren der H <sub>2</sub> -Oxidation (Strategie B)....	27
2.9.1.3. Isolierung aus Sulfat-reduzierenden Mischkulturen (Strategie C).....	27
2.9.2. Anreicherung Methan-bildender Archaea.....	28
2.9.3. Anreicherung Sulfat-reduzierender Bakterien .....	29
<b>2.10. Charakterisierung und Identifizierung der Isolate</b> .....	<b>30</b>
2.10.1. Phänotypische Charakterisierung mit dem Vitek <sup>®</sup> -System.....	30
2.10.2. Phänotypische Charakterisierung mit dem API 50 CHL-Testsystem .....	31
2.10.3. Charakterisierung mit dem API ZYM-Testsystem .....	31
2.10.4. Fermentation von Kohlenhydraten .....	32
2.10.5. Identifizierung der Isolate durch 16S rDNA-Sequenzanalyse.....	32
2.10.6. Bestimmung des G+C-Gehaltes von genomischer DNA.....	33
2.10.7. DNA-DNA-Hybridisierung.....	34
2.10.8. Rasterelektronenmikroskopie.....	36
<b>2.11. Fermentationsversuche mit wachsenden Zellen</b> .....	<b>36</b>
<b>2.12. Fermentationsversuche mit Suspensionen von Faeces</b>	
<b>und Darminhalt</b> .....	<b>37</b>
<b>2.13. Fermentationsversuche mit ruhenden Zellen</b> .....	<b>37</b>
<b>2.14. Markierung von Acetat mit NaH<sup>14</sup>CO<sub>3</sub></b> .....	<b>38</b>
2.14.1. Trennung von <sup>14</sup> C-Acetat und <sup>14</sup> CO <sub>2</sub> .....	38
<b>2.15. Präparation von zellfreien Extrakten und Membranen</b> .....	<b>39</b>
<b>2.16. Messung der Hydrogenaseaktivität</b> .....	<b>40</b>
<b>2.17. Enzymatische Bestimmung von Substraten und Produkten</b> .....	<b>41</b>
2.17.1. Acetat.....	41
2.17.2. L-Arabinose.....	42
2.17.3. Ethanol.....	43

2.17.4. Formiat.....	44
2.17.5. Glucose.....	44
2.17.6. D-Lactat und L-Lactat.....	45
2.17.7. Lactulose.....	46
2.17.8. D-Sorbitol.....	47
2.17.9. Succinat.....	47
<b>2.18. Sulfidbestimmung.....</b>	<b>48</b>
<b>2.19. Gaschromatographie (GC).....</b>	<b>49</b>
2.19.1. Bestimmung kurzkettiger Fettsäuren.....	49
2.19.2. Bestimmung von Wasserstoff.....	50
2.19.3. Bestimmung von Methan.....	51
<b>2.20. Bestimmung von Aminosäuren.....</b>	<b>51</b>
<b>2.21. Proteinbestimmung.....</b>	<b>52</b>
<b>2.22. Entwicklung und Validierung von Oligonukleotidsonden.....</b>	<b>53</b>
<b>2.23. Fluoreszenz-<i>in situ</i>-Hybridisierung (FISH).....</b>	<b>53</b>
2.23.1. Zellfixierung von Reinkulturen.....	54
2.23.2. Fixierung von Faeces.....	55
2.23.3. Silanisierung von Objektträgern für die <i>in situ</i> -Hybridisierung.....	55
2.23.4. Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung auf Objektträgern.....	56
2.23.5. Fluoreszenzmikroskopie.....	57
<b>2.24. <i>In vivo</i>- Studien mit gnotobiotischen Ratten.....</b>	<b>58</b>
2.24.1. Durchführung gnotobiotischer Tierhaltung.....	58
2.24.2. Tiere und Haltung.....	59
2.24.3. Versuchsdesign.....	60
2.24.4. Futterzusammensetzung.....	61
2.24.5. Assoziation der Ratten und Lebendzellzahlbestimmung in Faeces.....	62
2.24.6. Versuchssystem zur Messung der H <sub>2</sub> -Ausscheidung von Ratten.....	63
2.24.7. Tötung und Sektion der Tiere.....	65
<b>2.25. Statistische Auswertung der Tierversuche.....</b>	<b>66</b>

<b>2.26. Bezugsquellen .....</b>	<b>67</b>
<b>3. EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE.....</b>	<b>68</b>
<b>3.1. Isolierung von am H<sub>2</sub>-Metabolismus beteiligten Organismen aus dem humanen Gastrointestinaltrakt.....</b>	<b>68</b>
3.1.1. Isolierung von H <sub>2</sub> -bildenden Organismen.....	68
3.1.2. Isolierung von methanogenen Archaea.....	69
3.1.3. Isolierung von Sulfat-reduzierenden Bakterien.....	70
<b>3.2. Charakterisierung und Identifizierung von H<sub>2</sub>-Produzenten.....</b>	<b>71</b>
3.2.1. Phänotypische Charakterisierung und Identifizierung .....	71
3.2.2. Genotypische Charakterisierung und Identifizierung.....	75
<b>3.3. Nachweis der Hydrogenaseaktivität.....</b>	<b>77</b>
<b>3.4. Fermentationsexperimente mit wachsenden Zellen .....</b>	<b>78</b>
3.4.1. Wachstum von <i>Eubacterium hadrum</i> 271 in WCA-Medium .....	78
3.4.2. Wachstum von <i>Clostridium perfringens</i> V in WCA-Medium .....	79
3.4.3. Wachstum von <i>C. perfringens</i> V und <i>E. hadrum</i> 271 in Tryptonmedien..	80
3.4.4. Substratverwertung durch <i>Clostridium perfringens</i> V und <i>Escherichia coli</i> B5.....	82
3.4.5. Kokultivierung von <i>Clostridium coccooides</i> mit <i>Clostridium perfringens</i> V bzw. mit <i>Dorea longicatena</i> 111-35.....	83
3.4.6. Kokultur von <i>Escherichia coli</i> B5 und <i>Methanobrevibacter</i> RT-1.....	88
3.4.7. Zusammenhang von Netto-H <sub>2</sub> -Bildung und Zellzahl in Faeces .....	90
<b>3.5. Fermentationsexperimente mit ruhenden Zellen.....</b>	<b>91</b>
<b>3.6. Experimente im gnotobiotischen Rattenmodell .....</b>	<b>92</b>
3.6.1. Überprüfung des Versuchsaufbaus.....	92
3.6.2. Monoassoziationen mit H <sub>2</sub> -produzierenden Organismen .....	93
3.6.3. Diassoziati on mit H <sub>2</sub> -bildenden und H <sub>2</sub> -oxidierenden Organismen .....	100
3.6.3.1. Diassoziati on mit <i>C. perfringens</i> und <i>C. coccooides</i> .....	100
3.6.3.2. Diassoziati on mit <i>E. coli</i> und <i>Methanobrevibacter</i> RT-1 .....	103



3.6.3.3. Diassoziation mit <i>E. coli</i> und <i>Desulfovibrio</i> sp. (DSM 7057) .....	108
3.6.4. Sektion der Versuchstiere .....	111
<b>3.7. Untersuchungen mittels Fluoreszenz-<i>in situ</i>-Hybridisierung.....</b>	<b>111</b>
3.7.1. Design und Validierung einer spezifischen Oligonukleotidsonden zum Nachweis von <i>Dorea longicatena</i> sp. nov. ....	111
3.7.2. Nachweis von <i>Dorea longicatena</i> sp. nov. in humanen Faeces .....	113
3.7.3. Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung mit Faeces gnotobiotischer Ratten.	114
<b>4. DISKUSSION.....</b>	<b>116</b>
<b>4.1. H<sub>2</sub>-bildende Bakterien im Intestinaltrakt.....</b>	<b>116</b>
4.1.1. Häufigkeit von H <sub>2</sub> -bildenden Bakterien im Darm .....	117
4.1.1.1. Klassifizierung und Häufigkeit von <i>Dorea longicatena</i> .....	119
4.1.2. H <sub>2</sub> -Bildung durch die isolierten Mikroorganismen <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> ....	124
<b>4.2. H<sub>2</sub>-Transfer zwischen verschiedenen Populationsgruppen .....</b>	<b>129</b>
4.2.1. H <sub>2</sub> -Transfer zwischen H <sub>2</sub> -bildenden Bakterien und acetogenen Bakterien .....	130
4.2.2. H <sub>2</sub> -Transfer zwischen H <sub>2</sub> -bildenden Bakterien und methanogenen Archaea .....	135
4.2.3. H <sub>2</sub> -Transfer zwischen H <sub>2</sub> -bildenden Bakterien und Sulfat-reduzierenden Bakterien.....	143
<b>4.3. Beurteilung des verwendeten Tiermodells und der Versuchsanordnung.....</b>	<b>146</b>
4.3.1. Prinzipielle Eignung gnotobiotischer Ratten zur Untersuchung mikrobieller Wechselwirkungen im Darm .....	146
4.3.2. Wertung des verwendeten Meßsystems im Vergleich zu anderen Versuchsanordnungen .....	148
<b>4.4. Ausblick .....</b>	<b>150</b>

---

<b>5. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>151</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>153</b>
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>156</b>
<b>7. ANHANG .....</b>	<b>182</b>
<b>7.1. Phänotypische Merkmale der Isolate aus humanen Faeces .....</b>	<b>182</b>
<b>7.2. Zusammensetzung der verwendeten Diäten.....</b>	<b>191</b>
<b>7.3. Bakterienstämme für die Validierung der Oligonukleotidsonde .....</b>	<b>193</b>

## Abkürzungen

A	Ampere
Abb.	Abbildung
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym-A
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
ANI	Anaerobier Identifikationskarte
APES	3-Aminopropyltriethoxysilan
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	base pairs (Basenpaare)
bzw.	beziehungsweise
c	centi ( $10^{-2}$ )
°C	Grad Celsius
C-Bilanz	Kohlenstoffbilanz
CHL	Peptonmedium für den API 50 CHL-Test
Ci	Curie (1 nCi = 37 Bq)
cm	Zentimeter
CoA-SH	Coenzym A, reduzierte Form
d	optische Schichtdicke
DH	Dehydrogenase
DNA	desoxy ribonucleic acid (Desoxyribonucleinsäure)
DNase	Desoxyribonuklease
ds	doppelsträngig
DSM/DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
E	Extinktion
$\varepsilon$	Extinktionskoeffizient
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	et alii (und andere)
FAD	Flavinadenindinukleotid
Fd <sub>ox</sub>	Ferredoxin, oxidierte Form
Fd <sub>red</sub>	Ferredoxin, reduzierte Form
FID	Flammenionisationsdetektor
FISH	Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung

---

$\Delta G^\circ$	Freie Enthalpie unter Standardbedingungen bei pH 7,0 & 25°C
G	Guanin
g	Gramm
$\times g$	$\times$ fache Erdbeschleunigung
GC	Gaschromatographie
G+C	Guanin- und Cytosin-Gehalt der DNA
GNI	Gram-negative Identifikationskarte
GPI	Gram-positive Identifikationskarte
Gy	Gray, 1 Gy = 1 J/kg
h	hora (Stunde)
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	zweimal destilliertes Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	destilliertes Wasser
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie)
ITP	Inosintri-phosphat
K	Kelvin
k	kilo (10 <sup>3</sup> )
KGW	Körpergewicht
KP-Puffer	Kaliumphosphatpuffer
kV	Kilovolt
l	Liter
$\lambda$	Wellenlänge
M	molar
m	milli (10 <sup>-3</sup> )
$\mu$	mikro (10 <sup>-6</sup> )
min	Minute
MRS	Medium nach DE MAN, ROGOSA und SHARPE (1960)
NAD(P) <sup>+</sup>	Nicotinamidadenindinukleotid(phosphat), oxidiert
NAD(P)H	Nicotinamidadenindinukleotid(phosphat), reduziert
n. b.	nicht bestimmt
NFC	Non-Fermenter-Card
NMR	nuclear magnetic resonance
n. n.	nicht nachweisbar
OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei 600 nm

OTU	Operational Taxonomic Unit
Pa	Pascal
PEP	Phosphoenolpyruvat
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen- konzentration
P <sub>i</sub>	Phosphat, anorganisch
ppm	parts per million (Teile pro Millionen)
R	allgemeine Gaskonstante (8,314 J K <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup> )
RNase	Ribonuklease
rRNA	ribosomal ribonucleic acid (ribosomale Ribonucleinsäure)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
s.	siehe
s. o.	siehe oben
s. u.	siehe unten
SD	Standardabweichung
SDS	sodium dodecyl sulfat, Natriumdodecylsulfat
T	Temperatur
Tab.	Tabelle
TM	Trockenmasse
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (Enzymeinheit) (1 U = 1 µmol Substrat/min)
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
WCA	Wilkins-Chalgren-Anaerobe
WLD	Wärmeleitfähigkeitsdetektor
w/v	Gewicht pro Volumen
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil
∅	Durchmesser



## Danksagungen

Herrn Prof. Dr. Michael Blaut danke ich für die Überlassung des Themas und für meine ausdauernde und unermüdliche Betreuung, bei der ich viel zu lernen hatte.

Ebenso herzlich zu Dank verpflichtet bin ich Prof. Dr. Juhr für die Bereitschaft diese Arbeit am Fachbereich Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin zu vertreten sowie dafür, daß ich seine Unterstützung hatte, wenn sie nötig war.

Für die tatkräftige und zuweilen auch nächtliche Hilfe danke ich besonders Herrn Dr. Ludger Hartmann. Für die vielfältigen und wertvollen Ratschläge sowie die Überlassung von *C. coccoides* danke ich Frau Dr. Beate Kamlage.

Allen kritisch Redigierenden nicht zuletzt Dr. Annett Braune danke ich für ihre sicherlich oft schwierige, verantwortungsvolle Durchsicht, Korrektur, Rundung, Verbesserung und besonders Kürzung des Manuskripts.

Frau Dr. Arndt vom Institut für Biometrie und Informationsverarbeitung der Freien Universität Berlin danke ich für die gründliche Beratung in statistischen Fragen sowie Frau Eckert-Funke vom Institut für Veterinär-Pathologie der Freien Universität Berlin für ihre Hilfsbereitschaft bei der Anfertigung diverser REM-Aufnahmen.

Nahezu unbeschreiblicher Dank gilt den „Pragern“. Besonders zu schätzen wußte ich die lautstarke Atmosphäre, gezielte Motivationen sowie ehrliche und rüchhaltlose Kritik der „Altdoktoranden“ Dr. Rainer Simmering und Dr. Heiko Schneider. Dr. Andreas Schwiertz danke ich für die eindrucksvolle Demonstration schnellen und effektiven Arbeitens sowie der Tierärztin Lydia Scharek für den kollegialen Rückhalt und die fachliche Unterstützung in diesem Team.

Besonderer Dank gilt auch Katharina („Fachkraft“) Methling für die vielen, oft nicht enden wollenden Fachgespräche sowie vielfältige, tatkräftige Unterstützung. Auch den anderen „Jungdoktoranden“ Claudia Herles, Lilian Schoefer und Katrin Lehmann sei gedankt, daß sie jetzt den Staffelstab in dem unermüdlichen Streben nach Wissen übernehmen.

Vor allem gilt mein Dank allen bisher nicht erwähnten Mitarbeiterinnen der Abteilung Gastrointestinaler Mikrobiologie für ihre rückhaltlose Hilfsbereitschaft und freundlichen Belehrungen bei allen meinen Fehlern: Christel Göner, Bärbel Gruhl (Das große 1 x 1 der GC), Bettina Junker, Dr. Brigitta Kleeßen (alles was man zum FISHen wissen muß), Gwenaelle Le Blay, Dr. Jutta Noack, Bärbel Scharfenberg, Regine Schindler, Stephanie I & II, Sabine Schmidt (danke für die Wochendhilfe) und Sabine Zimmermann.

Für die nicht zu ersetzende Erfahrung und Hilfe im Umgang mit und in der Versorgung von gnotobiotischen Ratten danke ich herzlichst Renate Herzog, Ute Lehmann, Ines Grüner und Susanne (noch) Dietrich.

Nicht genug danken kann ich meiner Familie, meinen Freunden und natürlich Susanne Schnitt, die jede zeitliche Vernachlässigung durch räumliche und geistige Abwesenheit meinerseits geduldig und gutmütig ertragen haben.



## Lebenslauf

Name: David Taras

Geburtsdatum: 02.09.1969

Geburtsort: Pretoria (Südafrika)

1976-1982 Grundschule in Berlin-Tiergarten

1982-1989 Gymnasium in Berlin-Tiergarten

Mai 1989 Abitur

1989-1990 Praktikant am Bundesgesundheitsamt (heute BgVV)  
und am Robert-Koch-Institut

1990-1996 Studium der Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin

1993-1995 Tutor am Institut für Mikrobiologie und Tierhygiene des  
Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

August 1996 Abschluß des Staatsexamens

Januar 1998 Approbation als Tierarzt

1996-2000 Dissertation am Deutschen Institut für Ernährungsforschung,  
Abteilung Gastrointestinale Mikrobiologie in Bergholz-  
Rehbrücke

## Selbständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit selbständig und nur auf der Grundlage der angegebenen Hilfsmittel und Hilfen verfaßt zu haben.