

## 5. Zusammenfassung

- 1) Aus humanen Faeces wurden 94 Organismen, die am intestinalen H<sub>2</sub>-Metabolismus beteiligt sind, isoliert und charakterisiert. Als H<sub>2</sub>-Produzenten wurden bekannte Arten der Gattungen *Bacteroides*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Eubacterium* und *Klebsiella* sowie zwei Bakterienstämme einer bislang unbekanntes Art identifiziert. Außerdem wurde als Vertreter der H<sub>2</sub>-oxidierenden Darmflora eine Art der Gattung *Methanobrevibacter* isoliert.
- 2) Anhand ihrer phänotypischen und genotypischen Charakteristika wird vorgeschlagen, für die beiden unbekanntes Stämme die neu zu schaffende Gattung *Dorea* gen. nov. mit der Art *Dorea longicatena* sp. nov. zu schaffen. Mittels einer gegen die 16S rRNA gerichteten Oligonukleotidsonde wurde *D. longicatena* sp. nov. in Faeces aller untersuchten Individuen nachgewiesen. Die Zellzahlen betragen durchschnittlich  $1,55 \times 10^9$  Zellen/g Trockenmasse und stellten mit durchschnittlich 0,58% einen z. T. bedeutenden Anteil an der Gesamtflora dar.
- 3) In Faecesinkubationen wurde in Verdünnungen von  $10^{-7}$  am meisten H<sub>2</sub> gebildet. Aus dieser Verdünnungsstufe wurden mit *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli* und *Klebsiella pneumoniae* auch diejenigen Bakterien isoliert, die in *in vitro*-Untersuchungen aller Isolate neben *Eubacterium hadrum* die stärkste H<sub>2</sub>-Bildung (> 6 µmol H<sub>2</sub>/ml Medium) aufwiesen. Dabei war *E. hadrum* die einzige Spezies, die in Faeces in Zellzahlen >  $10^9$ /g Faecetrockenmasse vorkam und mehr als 8 µmol H<sub>2</sub>/ml Medium produzierte. *Bacteroides* spp. und *Bifidobacterium* spp. kamen zwar in höheren Zellzahlen vor, bildeten aber sehr wenig H<sub>2</sub> (< 2 µmol/ml Medium).
- 4) Durch Fermentationsversuche wurde die H<sub>2</sub>-Bildung durch *C. perfringens*, *E. coli* und *E. hadrum* eingehend untersucht. In weiteren *in vitro*-Experimenten mit definierten Kokulturen aus H<sub>2</sub>-produzierenden und H<sub>2</sub>-oxidierenden Bakterien wurde die Übertragung von H<sub>2</sub> zwischen den verschiedenen Spezies sowie die damit einhergehende Beeinflussung ihrer Fermentationsbilanzen demonstriert.

Gleichzeitig wurde die Rolle von Formiat für den H<sub>2</sub>-Transfer zwischen dem acetogenen *Clostridium coccooides* und H<sub>2</sub>-produzierenden Spezies wie *C. perfringens* bzw. *D. longicatena* sp. nov. verdeutlicht. Weiterhin wurde *in vitro* gezeigt, daß *E. coli* in Kokulturen den für das Wachstum und die CH<sub>4</sub>-Produktion von *Methanobrevibacter* RT-1 benötigten Wasserstoff zur Verfügung stellen kann.

- 5) Für die *in vivo*-Untersuchung des intestinalen H<sub>2</sub>-Metabolismus wurde ein neu entwickeltes gnotobiotisches Rattenmodell eingesetzt und durch mehrere Experimente als zuverlässig und genau arbeitendes System etabliert. Mit diesem Modell konnte die H<sub>2</sub>-Ausscheidung gnotobiotischer Ratten erstmals über 24 h gemessen und gleichzeitig der definierte mikrobiologische Status dieser Ratten aufrechterhalten werden. Die von monoassoziierten Tieren ausgeschiedene H<sub>2</sub>-Menge war von der verabreichten Testsubstanz, der Diät und den im Intestinaltrakt angesiedelten Mikroorganismen abhängig. So wurde von Ratten, die mit *C. perfringens* monoassoziiert worden waren, abhängig von der Menge der Testsubstanz immer mehr H<sub>2</sub> ausgeschieden als durch Ratten, die mit *E. coli* monoassoziiert worden waren. Auch die Verwendung von einem Rattenstandardfutter resultierte in einer höheren H<sub>2</sub>-Bildung als der Einsatz einer chemisch definierten Diät.
- 6) Ratten, die mit H<sub>2</sub>-produzierenden Bakterien (*C. perfringens* oder *E. coli*) und H<sub>2</sub>-nutzenden Bakterien (Acetogene, Methanogene oder Sulfatreduzenten) diassoziert worden waren, schieden immer weniger H<sub>2</sub> aus als Ratten, die mit H<sub>2</sub>-Produzenten monoassoziiert worden waren. Bei Ratten, die mit *C. perfringens* und dem acetogenen *C. coccooides* diassoziert worden waren, war diese Verminderung allerdings nicht auf reduktive Acetogenese sondern auf die Fähigkeit von *C. coccooides* zu mixotrophem Wachstum zurückzuführen.
- 7) Drei von sieben Ratten, die mit *E. coli* und *Methanobrevibacter* RT-1 diassoziert worden waren, schieden Methan aus, was auf einen H<sub>2</sub>-Transfer zwischen diesen beiden Bakterienspezies hinweist.

- 8) Auch bei Ratten, die mit *E. coli* und *Desulfovibrio* sp. (DSM 7057) diassoziert worden waren, verminderte sich die H<sub>2</sub>-Ausscheidung im Vergleich zu monoassozierten Tieren. Diese Verminderung war geringer als bei Ratten, die mit *Methanobrevibacter* RT-1 assoziiert worden waren, und war unabhängig von der Sulfatkonzentration im Trinkwasser der Tiere oder der zu Beginn der Meßperiode verabreichten Sulfatmenge. In Faecesinkubationen dieser Tiere wurde eine H<sub>2</sub>-Übertragung von *E. coli* zu *Desulfovibrio* sp. (DSM 7057) sowie eine stöchiometrische Sulfidbildung nachgewiesen.
- 9) Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß das verwendete gnotobiotische Rattenmodell in Kombination mit entsprechenden Untersuchungen *in vitro* geeignet ist, den intestinalen H<sub>2</sub>-Metabolismus zu studieren.

## Summary

### Intestinal hydrogen metabolism :

#### *In vitro* experiments and establishment of a gnotobiotic rat model

- 1) Ninety four microorganisms participating in intestinal hydrogen metabolism were isolated from human faeces and were characterised. Several known species of the genera *Bacteroides*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Eubacterium* and *Klebsiella* as well as two hitherto unknown strains were identified as hydrogen producing bacteria. One isolate representing the hydrogen oxidising gut flora was identified as a species of the genus *Methanobrevibacter*.
- 2) Based on phenotypic and phylogenetic considerations it is proposed that the two unknown strains be classified in a new genus *Dorea* as *Dorea longicatena* sp. nov.. Experiments with a specific 16S rRNA directed oligonucleotide indicate that *D. longicatena* sp. nov. is present in all human volunteers studied so far at average cell counts of  $1,55 \times 10^9$  per gram of dry weight faeces. They form with 0,58% of the total cell count a considerable proportion of the total flora.

- 3) In incubations of faeces hydrogen production was highest in dilutions of  $10^{-7}$ . *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* were isolated from equally diluted faeces and exhibited the strongest hydrogen production ( $> 6 \mu\text{mol H}_2/\text{ml}$  medium) of all isolates studied. *Eubacterium hadrum* was the only species which was found in cell counts of  $> 10^9$  per gram dry weight of faeces and which produced more than  $8 \mu\text{mol H}_2/\text{ml}$  medium. Higher cell counts were detected for *Bacteroides* spp. and *Bifidobacterium* spp., respectively, but they produced only  $< 2 \mu\text{mol H}_2/\text{ml}$  medium.
- 4) The hydrogen production of *C. perfringens*, *E. coli* and *E. hadrum* was investigated in fermentation experiments in more detail. The transfer of hydrogen between hydrogen producing and hydrogen oxidising bacteria and the following shift in fermentation balance was demonstrated in further *in vitro* experiments with defined cocultures. Simultaneously, the role of formate in hydrogen transfer between the acetogenic *Clostridium coccooides* and hydrogen producing bacteria such as *C. perfringens* and *D. longicatena* sp. nov., respectively, is described. Furthermore, it was shown *in vitro* that the hydrogen production through *E. coli* enabled *Methanobrevibacter* RT-1 to grow and to produce methane in coculture.
- 5) A newly developed rat model was used to study the intestinal hydrogen metabolism *in vivo* and was established as a reliable and accurate working system through a series of experiments. This model opened for the first time the possibility to quantify the hydrogen excretion of gnotobiotic rats over a period of 24 h and maintain at the same time their defined microbiological status. The amount of hydrogen excreted by the monoassociated rats depended on the test substance, the diet and the species used for colonisation. Rats associated with *C. perfringens* excreted always more hydrogen than rats associated with *E. coli* when the same amount of test substance was fed. Similarly, the standard rat diet resulted in more hydrogen formation than the chemically defined diet.
- 6) Rats associated simultaneously with a hydrogen producing bacterial species (*C. perfringens* or *E. coli*) and a hydrogen utilising species (acetogenic, methanogenic or sulphate reducing bacteria) excreted less hydrogen than rats associated with the hydrogen producing bacteria only. In rats associated

simultaneously with *C. perfringens* and the acetogenic *C. coccooides*, this decrease was not the result of reductive acetogenesis but due *C. coccooides*' ability to grow mixotrophically.

- 7) Rats associated simultaneously with *E. coli* and *Methanobrevibacter* RT-1 formed methane indicating hydrogen transfer between the two species, although methane excretion was observed in only three out of seven animals.
- 8) Rats associated simultaneously with *E. coli* and *Desulfovibrio* sp. (DSM 7057) excreted also less hydrogen than monoassociated rats. This decrease was smaller than the one of the rats associated with *Methanobrevibacter* RT-1. The hydrogen excretion was independent of the concentration of sulphate in drinking water or the amount of sulphate administered at the beginning of each experimental period. Hydrogen transfer between *E. coli* and *Desulfovibrio* sp. (DSM 7057) and a stoichiometric sulphide production was demonstrated in incubations of faeces from these animals.
- 9) The results of these experiments show that the used gnotobiotic rat model in combination with appropriate investigations *in vitro* is useful to study the intestinal hydrogen metabolism.