Mikrobiologische Diversität im Pansen eines Wiederkäuers

Verfasser: Olmo Sonzogni, olmosonzogni@hotmail.com , Paolo Galli, s9891443@access.unizh.ch
Betreuer: Kurt Hanselmann, hanselma@botinst.unizh.ch

Einleitung

Das Experiment zeigt die enorme Diversität der Mikroorganismen im Pansensaft einer Kuh, und es illustriert einige Auswikrungen der mikrobiellen Stoffwechselaktivität unter den anoxischen Bedingungen im Wiederkäuermagen.

Vorgehen

Der Pansensaft wurde aus einer eigens dafür präparierten Kuh am Tierspital gewonnen. Das Tier ist auf der dorsalen Flanke fistuliert und die Oeffnung ist mit einem Verschluss versehen, wodurch es möglich ist, dem Vormagen jederzeit Flüssigkeit zu entnehmen. Abbbildung 1 zeigt die Lage des Pansens beim Rind, Abbildung 2 die Anatomie des Verdauungssystems eines Wiederkäuers.
250 ml Pansensaft wurden aus dem untersten Teil des Pansens (Abb. 3) in ein Auffangefäss abgesogen und in eine sterile Flasche abgefüllt. Um möglichst allen Sauerstoff auszuschliessen, wurde die Falsche bis auf eine Luftblase von ca. 2 ml vollständig gefüllt. Die weitere Verarbeitung geschah im Labor. Die Flasche mit dem Pansensaft wurde im Wasserbad bei 39°C aufbewahrt. Im Labor wurde der Pansensaft direkt mikroskopiert und mit Hilfe von Farbindikatoren wurden Veränderungen im Redoxpotential und im pH verfolgt.

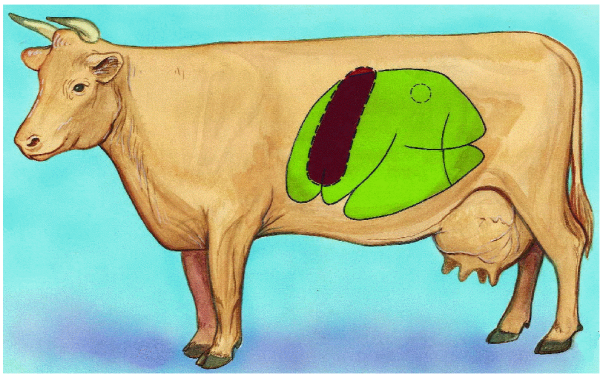


Abb 1: Position des Pansens (grün) und der Milz (braun) in der Kuh
http://hermes.ucd.ie/~vetanat/images/115.gif Bild 115 aus der Serie http://hermes.ucd.ie/~vetanat/images/image.html von Pat McCarthy Department of Veterinary Anatomy, University College Dublin

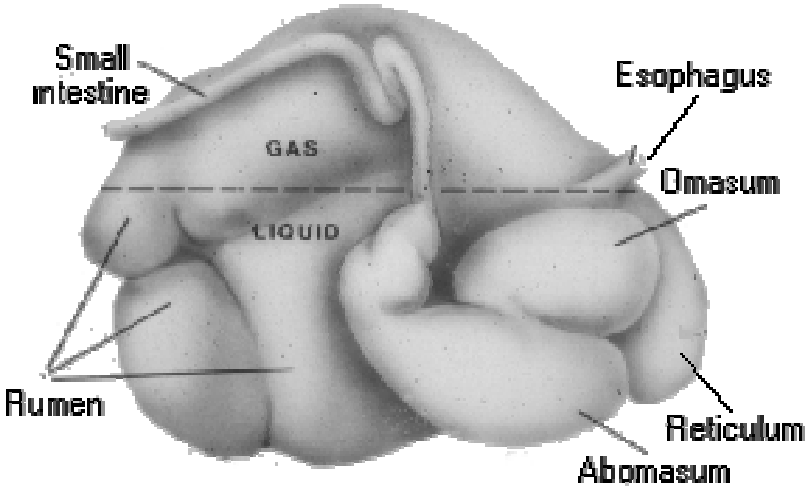


Abb. 2: Teile des Verdauungssystems eines Wiederkäuers. Ref.:Colorado State University
http://arbl.cvmbs.colostate.edu/hbooks/pathphys/digestion/herbivores/rumen_anat.html

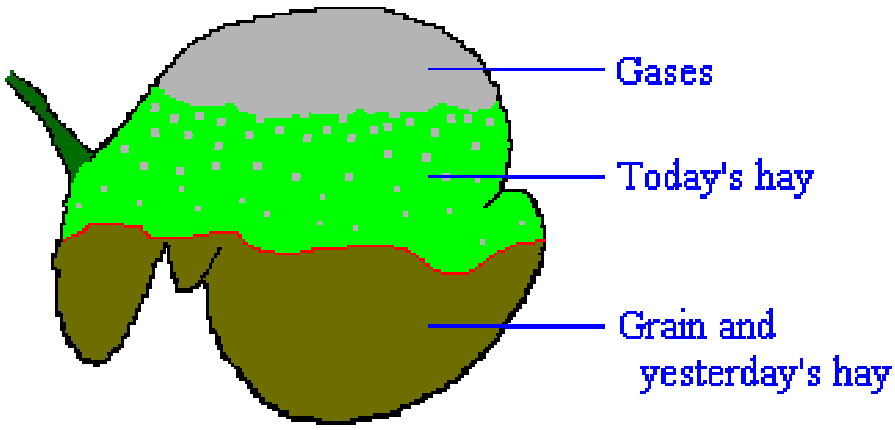


Abb. 3: Schichtung der Nahrungsteile im Pansen eines Wiederkäuers. (aus: http://arbl.cvmbs.colostate.edu/hbooks/pathphys/digestion/herbivores/rumination.html Colorado State University

Ergebnisse

Der Pansensaft ist eine grün-braune, stark trübe Flüssigkeit, die nach gegärtem Gras riecht. Die *in situ* Temperatur im Pansen ist ungefähr 39°C, und wir haben im Labor im Wasserbad die gleichen Bedingungen gehalten.

Mikroskopische Untersuchungen: In einem Tropfen Pansensaft auf einem Objektträger fallen bei geringer Vergrösserung die zahlreichen, z.T. vakuolisierten Protozoen, meist Ciliaten und einige Flagellaten, auf, welche sich durch Strudeln Nahrungspartikel und Bakterien als Nahrung zuführen. Die 100- bis 1000-fach kleineren Bakterien sind mit dem Oelimmersionsphasenkontrastobjektiv gut sichtbar. Auffallend ist der unerwartet vielfältige Reichtum an verschiedenen Bakterienformen (Beispiel Abb.4).

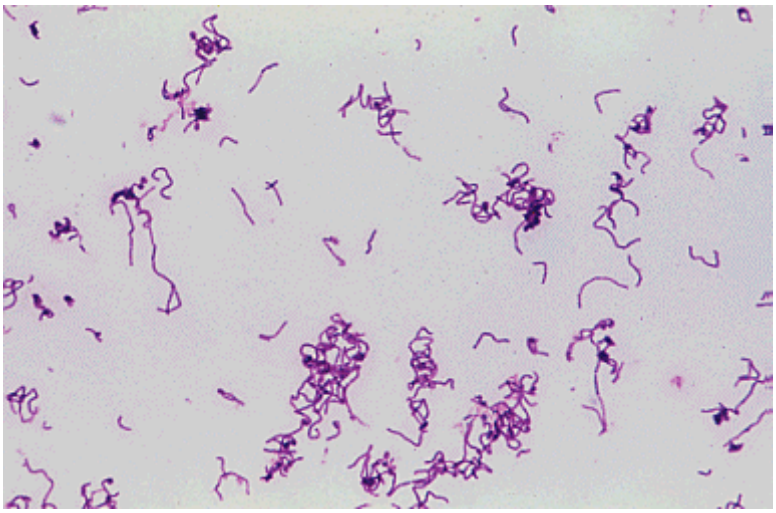


Abb. 4: *Lactobacillus sp.,* Bakterium, das Laktose und Hexosen via die Glykolyse zu Pyruvat fermentiert, dieses als Elektronenakzeptor verwendet und daraus Laktat mach Aus:
http://www.geocities.com/CapeCanaveral/3504/gallery.htr
Neal R. Chamberlain, Kirksville College of Osteopathic Medicine, Department of Microbiology/Immunology, Kirksville, MO 63501
http://medic.med.uth.tmc.edu/path/00001446.htm

Veränderungen des pH: Mit Hilfe des Indikators Bromthymolblau haben wir das pH *in situ* und nach Inkubation mit Glukosezusatz überprüft. Der Indikator schlägt im Intervall von pH 7.2 bis 6.6 von blau nach grün um; für pH-Werte kleiner als 6 wird er gelb. Ein paar Tropfen Pansensaft werden mit einem Tropfen Indikatorlösung in einer weissen Keramiktüpfelplatte gemischt. Am Anfang des Experimentes war der pH-Wert ungefähr 6.7 (blaugrün); im Verlaufe der Inkubationszeit hat er nach grüngelb umgeschlagen. Im Ansatz mit Glukose ist die Gelbfärbung schon nach wenigen Minuten erfolgt.

Veränderung des Redoxpotentials: Das Redoxpotential wurde mit Hilfe von drei Indikatoren (Phenosafranin, Resazurin, Methylenblau) geprüft. Zu jedem Ansatz wurde die vorgeschriebene Menge

Indikator zugegeben, wodurch der Pansensaft eine gut sichtbare Farbe annahm (rot bei Phenosafranin, violett bei Resazurin, blau bei Methylenblau). Die Indikatoren wechseln ihre Farbe bei verschiedenen Redoxpotentialen: Phenosafranin von rot nach farblos in der verwendeten Konzentration bei ca. –400 mV, Resazurin von violett via rosa nach farblos bei ca. –70 mV und Methylenblau von blau nach farblos bei ca. +100 mV. Im Experiment entfärbte sich Methylenblau sowohl mit nativem Pansensaft als mit Glucose gefüttertem Pansensaft innerhalb von 10 bis 15 Sekunden. Die Entfärbung von Resazurin geschah innerhalb von 40 bis 60 Sekunden im Glukose gefütterten Pansensaft und nach 120 Sekunden im nicht gefütterten Ansatz. Phenosafranin wurde auch innerhalb einer halben Stunde nur schwach entfärbt. Als Kontrollen dienten einerseits auf 100°C erhitzter Pansensaft in welchem bei keinem der Ansätze eine Farbänderung eintrat und der Zutritt von Luftsauerstoff im kleinen Gasraum in jedem Röhrchen, welcher bewirkte, dass sich der Redoxindikator im obersten Millimeter innerhalb weniger Minuten wieder in die oxidierte Form zurückverfärbte. Damit kann nachgewiesen werden, dass die verwendeten Farbstoffe richtig funktionieren und, dass die Pansenmikrobiota in der Lage ist, die oxidierte Form der Farbstoffe jederzeit wieder zu reduzieren. Zum Schluss wurden der Probe, die Phenosafranin enthielt, zuerst einige Kristalle Vitamin C (Ascorbinsäure, schwaches Reduktionsmittel) zugegeben, was nur eine geringe Farbveränderung bewirkte, anschliessend einige Dithionitkristalle (Natriumhypodisulfit $Na_2O_4S_2$, starkes Reduktionsmittel), womit auch Phenosafranin entfärbt wurde. Bei Luftzutritt konnte die Farbe des oxidierten Zustandes wieder zurückerhalten werden.

Diskussion

Der Pansen von Wiederkäuern ist ein **mikrobielles Oekosystem**, in welchem prokaryotische und eukaryotische Mikroorganismen unter Bedingungen, die ihnen der Wiederkäuerwirt zur Verfügung stellt in physiologischer Wechselwirkung koexistieren. Die Pansenmikrobiota machen dem Wirt Pflanzenpolymere zugänglich, die er selbst nicht verwerten kann, weil ihm die hydrolytischen Enzyme zu deren Spaltung fehlen. Solche Enzyme sind: Endo-1,4-beta-Glukanase, Cellobiohydrolyase und beta-Glukosidase für die Spaltung von Cellulose, Esterasen und Hydrolasen für den Abbau von Pectin und L-Arabinase, D-Galactanase, D-Mannase, D-Xylanase, beta-Xylosidase, beta-Glukosidase und alpha-L-Arabinofuranosidase für die Spaltung von Hemicellulose.

Die **prokaryotischen Mikroorganismen**, die sich im Pansen etablieren können (Anaerobier, fakultative Aerobier) sind solche, die sich am besten an die vom Wirt offerierten Bedingungen angepasst haben (praktisch sauerstofflos, niedriges E_h, stark fasrige Nahrung, v.a. Kohlenhydratpolymere als Substrate, pH gepuffert um 6.9, konstante Temperatur von ca. 39°C, hohe CO_2 und CH_4 Gehalte in der Gasphase). Die Microbiota der Bakterien und Archäen kann grundsätzlich in 11 Stoffwechselgruppen eingeteilt werden. Es sind dies cellulolytische, hemicellulolytische, pektinolytische, amylolytische, proteolytische, lipidolytische, ureolytische, saccharolytische und andere Zucker verbrauchende, acidotrophe, ammoniogene und methanogene Arten. Gut sichtbar im Mikroskop bei hoher Auflösung sind vielfältige Formen: kugelige, stäbchenförmige, sichelförmige, spiralige, bogenförmige, kettenbildende und aggregierende.

Die **Pansenprotozoen** verdauen einerseits partikuläre Pflanzennahrung, andererseits Prokaryoten. Im Mikroskop sind die grossen *Isotricha spp*., *Entodinium spp.* und *Diplodinium spp.* auffälliger als die weniger als halbsogrossen *Dasytrichia spp*. Viele der Protozoen enthalten Bakterien und andere Partikel in den Nahrungsvakuolen, aber auch intrazelluläre Speicherstoffablagerungen.

Hauptsächliche **Endprodukte der Fermentationen** sind Acetat, Propionat, Butyrat, Laktat, Formiat, Kohlendioxid, Wasserstoff und Methan. Die Fermentationen sind vielfach mit der Bildung von Protonen gekoppelt, was beim Ausbleiben der Pufferung, v.a. bei Experimenten ausserhlab des Wirtes, zur pH-Absenkung führen kann.

Mit Ausnahme des Methans, das ausschliesslich durch Archäen gebildet wird, können sowohl die Prokaryoten als auch die Protozoen Pflanzenpolymere, Kohlenhydratoligomere und Zucker fermentieren.

Im Pansen ist das **Redoxpotential** meist tiefer als –250 mV, was aus der Reduktion der Redoxfarbstoffe einigermassen gefolgert werden kann. Dies bedeutet, dass zwischen den Organismen ein aktiver Austausch von „Redoxkraft" (= Elektronen) geschehen muss. Die dabei ausgetauschten Elektronen stammen von den zu oxidierenden Substraten und enden in reduzierten Endprodukten (organische Säuren, H_2, CH_4). Die Kommentare zur Aufgabe 3 (siehe Kursanleitung) erläutern diesen Sachverhalt an einem Beispiel.

Kommentare zu Aufgabe 3: Diese Aufgabe bildet die Grundlage für die bioenergetischen Simulationen, die in Experiment 18 durchgeführt werden. Die Lösung wird hier kurz dargestellt.

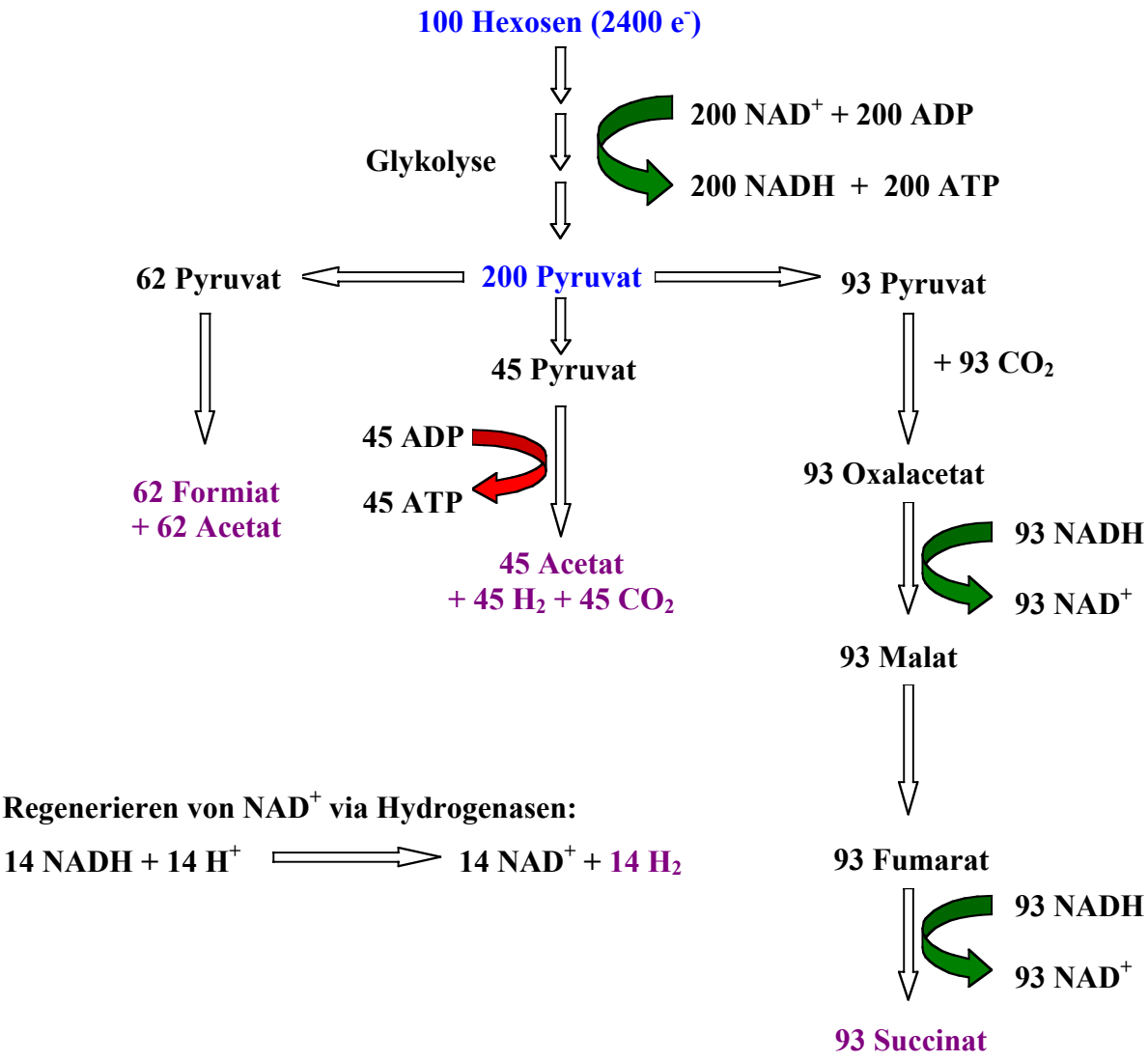
Syntrophismus bei der Fermentation

a) *Ruminococcus flavefaciens* ist ein Cellulose abbauendes Bakterium, welches in axenischer Reinkultur Glukose zu Acetat, Formiat und Succinat fermentiert. Diese Produkte erschienen in einem Experiment im molaren Verhältnis107:62:93 und es wurden keine anderen organischen Metaboliten festgestellt. In der Gasphase konnten Wasserstoff und Kohlendioxid gemessen werden. Die Aufgabe besteht darin, den Verlauf der Fermentation von *Ruminococcus flavefaciens* in Einzelkultur zu rekonstruieren.

Lösung (siehe Abb. 5):

1. Ausgehend von den Produkten Acetat, Succinat und Formiat, und unter Zuhilfenahme bekannter Stoffwechselwege (Carboxylierung von Pyruvat zu Oxalacetat durch Pyruvat Carboxylase, Decarboxylierung von Pyruvat zu Acetyl~CoA durch Pyruvate-Ferredoxin Oxidoreduktase und der formiatotrophen Spaltung von Pyruvat durch Pyruvate-Formiat Lyase), kann rückwärts die Menge Pyruvat bestimmt werden, die zum festgestellten Verhältnis der Produkte führt.
2. Unter der Annahme, dass Pyruvat aus der Glykolyse hervorgegangen sei, lässt sich die Menge Hexose eruieren, die abgebaut werden muss.
3. Die Kontrolle muss zeigen, dass die Abbaustöchiometrie bezüglich der Massen, der Ladungen und der Elektronen ausgeglichen ist. (Bei diesen, auf den Katabolismus beschränkten Betrachtungen, wird vernachlässigt, dass ein Teil des Substrats in die Biomasse der sich vermehrenden Bakterien assimiliert worden ist)
4. Da nicht alle Elektronen in den organischen Produkten wieder gefunden werden können, wird angenommen, dass ein Teil des NADH über Hydrogenasen oxidiert wird, wobei H_2 freigesetzt wird.
5. Abbildung 5 zeigt den möglichen Verlauf der Fermentation von *Ruminococcus flavefaciens*, der die in der Aufgabenstellung vorgegebenen Bedingungen erfüllt.

Abb. 5: Fermentation von Hexose ($C_6H_{12}O_6$) durch *Ruminococcus flavefaciens* in axenischer Reinkultur



$$100\ C_6H_{12}O_6 + 48\ CO_2 + 14\ H_2O \Rightarrow 107\ CH_3COO^- + 62\ HCOO^- + 93\ {}^-OOC(CH_2)_2COO^- + 59\ H_2 + 355\ H$$

Elektronenbilanz: Hexose wird in verschiedene Produkte gespalten, die gesamte Anzahl Elektronen muss erhalten bleiben.

Hexose2400 e^-	(Elektronendonator)
Formiat	124 e^-
Acetat	856 e^-
Succinat	1302 e^-
H_2	118 e^-

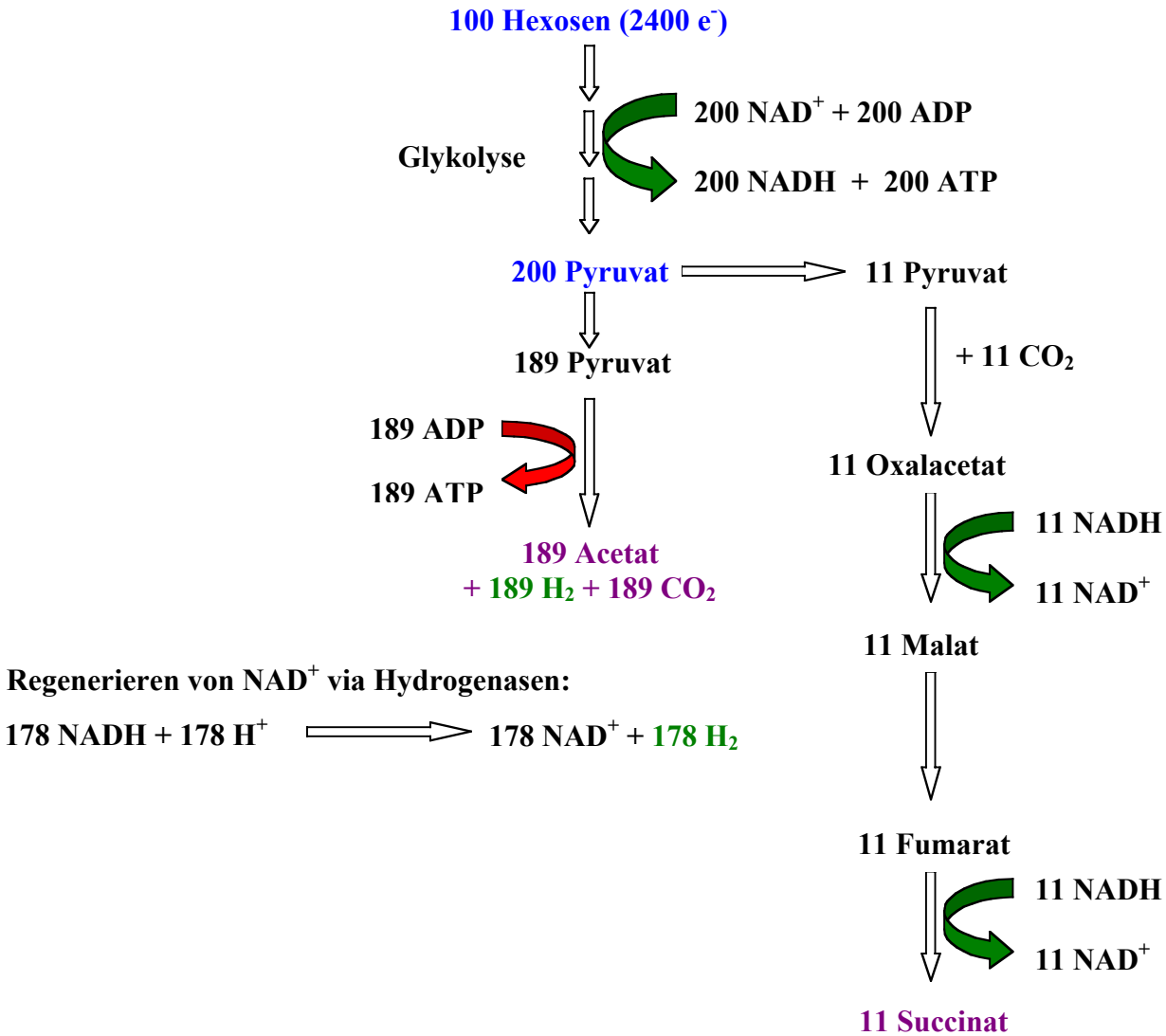
Die vielfältigen Interaktionen zwischen dem Wirt und den Mikroorganismen des Pansens sind enorm komplex und in ihrer Gesamtheit experimentell kaum erfassbar. Man ist deshalb auf Modellexperimente angewiesen, die aber meist nur kleine Ausschnitte der biologischen Komplexität darzustellen vermögen. In Aufgabe b wird die Interaktion zwischen *Ruminococcus flavefaciens* in Cokultur mit *Methanobrevibacter ruminantium* untersucht (Aufgabenstellung siehe Kursanleitung zu Experiment 1, Aufgabe 3b).

b) Wenn *Methanobrevibacter ruminantium*, ein hydrogenotrophes und formiatotrophes Methanarchä (BBOM* Tab. 14.5. und Fig 14.7a), und *Ruminococcus flavefaciens* in mutualistischer „Zweierkultur" wachsen gelassen werden, so verschiebt sich das Produktespektrum. Succinat und Acetat werden im molaren Verhältnis 11:189 produziert. Die Gasphase enthält CH_4 und CO_2 aber kein H_2. Die Aufgabe besteht darin, den Katabolismus der prokaryotischen Zweiergemeinschaft zu rekonstruieren.

Lösung (siehe Abb. 6)

Es gibt mehrere Möglichkeiten, um die beobachteten Produktezusammensetzung zu erklären, weil nur Endprodukte und keine Zwischenprodukte gemessen wurden. Eine davon ist in Abbildung 6 dargestellt. Wenn *Ruminococcus flavefaciens* und *Methanobrevibacter ruminantium* in Cokultur wachsen, so werden weniger Elektronen über organische Produkte dafür mehr über H_2 und schlussendlich CH_4 „entsorgt".

Abb. 6 *Ruminococcus flavefaciens* in Cokultur mit *Methanobrevibacter ruminantium*



$100\ C_6H_{12}O_6 \Longrightarrow 189\ CH_3COO^- + 11\ {}^-OOC(CH_2)_2COO^- + 91.75\ CH_4 + 211\ H^+ + 86.25\ CO_2 + 5.5\ H_2O$

Anhang

Bücher:
* BBOM: Madigan, Martinko und Parker; Brock Biology of Microorganisms; Ninth Edition

Links:

- Images of the exterior and the interior of calf rumens (Penn. State): http://www.das.psu.edu/dcn/calfmgt/rumen/index.html
- Anaerobic zoosporic fungi of the rumen: http://www.towson.edu/~wubah/Research/Rumen_fungi/rumen_fungi.html
- Rumen physiology and rumination (Colorado State): http://arbl.cvmbs.colostate.edu/hbooks/pathphys/digestion/herbivores/rumination.html
- The microbe zoo (MSU): http://commtechlab.msu.edu/sites/dlc-me/zoo/zacmain.html
- Digestive anatomy in ruminants (Colorado State) http://arbl.cvmbs.colostate.edu/hbooks/pathphys/digestion/herbivores/rumen_anat.html
- Location of the rumen and the spleen http://hermes.ucd.ie/~vetanat/images/115.gif
- *Lacotbacillus sp.* under the microscope http://medic.med.uth.tmc.edu/path/00001446.htm
- Pansen Forschungan der Universität Hohenheim http://www.uni-hohenheim.de/i3ve/00216810/00410641.htm

Kursanleitung:
http://www.microeco.unizh.ch/uni/kurs/bio3_02/pdf/01rumen01.pdf