Mikrobiologische Diversität im Pansen eines Wiederkäuers und biothermodynamische Modellversuche mit Thermodyn©

Verfasser: Martina Mettler, martina.mettler@access.unizh.ch
Simon Zeller, simon_zeller@hotmail.com
Andrea Wampfler, a_wampfler@gmx.ch

Betreuer: Kurt Hanselmann, hanselma@botinst.unizh.ch

1. Einleitung:

1.1 Schwerpunkte

Dieser Versuch soll die Vielfalt der Mikroorganismen, welche den Pansen einer Kuh als Ökosystem nutzen, aufzeigen. Zudem werden mit kurzen Experimenten die Stoffwechselaktivitäten dieser Organismen untersucht.
Mit dem Excelprogramm Thermodyn© können Modelle erstellt werden, die mikrobielle Interaktionen von Pansenbakterien aufzeigen.

1.2 Verdauung bei Wiederkäuern mit Hilfe von Mikroorganismen

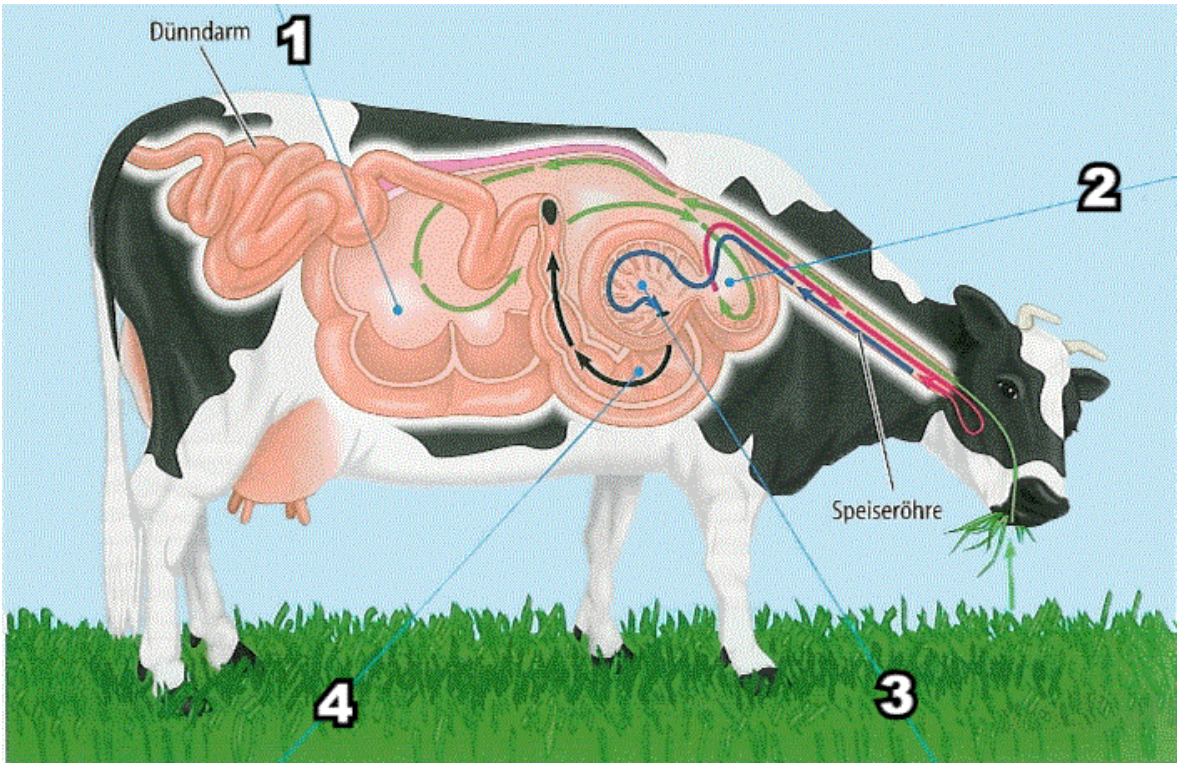


Abb. 1: Verdauung bei Wiederkäuern

Legende zur Abb. 1:
1. Pansensack, hier findet die Fermentierung durch Mikroorganismen statt
2. Netzmagen, Nahrungsbrei wird von hier aus die Speiseröhre hochgewürgt
3. Blättermagen, hierhin gelangt die Nahrung nach dem Wiederkäuen, Wasserentzug
4. Labmagen, hier werden Nahrung und Mikroorganismen von Enzymen verdaut

Nimmt eine Kuh Nahrung auf, so gelangt sie zuerst in den Pansen (Abb1). In diesem geräumigen, bis zu 250 l fassenden Vormagen, werden die faserigen Pflanzenteile mit der Pansenflüssigkeit, die viele Mikroorganismen beinhaltet, durchmischt. Eine Vielzahl von anaeroben Bakterien, Archäen, Ciliaten und anderen Protozoen helfen der Kuh, Pflanzenpolysaccharide (Zellulose, Pektine...) abzubauen. Die Kuh

selbst wäre dazu nicht in der Lage und ist deshalb auf die Enzyme ihrer Endosymbionten angewiesen. Die Mikroorganismen scheiden, neben den von der Kuh verwertbaren Produkten, wie kurzkettige Fettsäuren, Aminosäuren, etc., auch grosse Mengen von „Abfallstoffen" wie CO_2, H_2 und CH_4 aus. Diese müssen entweder ausgeschieden oder weiterverwendet werden, damit sie sich nicht im Pansen ansammeln. Gas werden ausgerülpt. Wie alle Wiederkäuer würgt die Kuh den Panseninhalt von Zeit zu Zeit hoch und schluckt nach langem Kauen erneut. Der Nahrungsbrei gelangt so zusammen mit den Mikroorganismen in den Magen wo alles verdaut wird.

1.3 Biothermodynamik von Mikroorganismen

Eine Reaktion kann nur ablaufen, wenn sie exergonisch ist. Die Grösse, die dies beschreibt, ist die Gibbs freie Reaktionsenthalpie oder ΔGr, die bei einer exergonischen Reaktion kleiner null ist. ΔGr ist nach der Gleichung $\Delta Gr = \Delta Gr^0 + R*T*\ln Q$ abhängig von der Reaktionstemparatur und Q, einer Reaktionsgrösse, die abhängig ist von den Aktivitäten aller Reaktionspartner sowie deren stöchiometrischen Koeffizienten. Kennen wir also eine im Pansen ablaufende Reaktion und die Grenzbedingungen, so können wir die maximale freie Energie errechnen. Wir können bei gegebenen Bedingungen die maximal oder minimal notwendige Konzentration eines der Reaktionspartner bestimmen.

Beispiele von bakteriellen Reaktionen die im Pansen von Wiederkäuern stattfinden:

1. Anaerober **Glucoseabbau** von *Ruminococcus flavefaciens*

$$100\ C_6H_{12}O_6 + 48\ HCO_3^- \longrightarrow 107\ CH_3COO^-\ (\text{Acetat}) + 62\ HCOO^-\ (\text{Formiat}) + 93\ {}^-OOC(CH_2)_2COO^-\ (\text{Succinat}) + 59\ H_2 + 307\ H^+ + 34\ H_2O$$

2. Anaerobe **Methanbildung** durch Oxidierung von Wasserstoff von *Methanobrevibacter ruminantium*

$$4H_2 + CO_2 \longrightarrow CH_4 + 2H_2O$$

3. Anaerobe **Wasserstoffbildung** durch Oxidierung von Ethanol

$$EtOH + H_2O \longrightarrow CH_3COO^- + H^+ + 2H_2$$

---

2. Vorgehen

2.1 Probeentnahme

Zuerst musste die Probe mit Mikroorganismen aus ihrem natürlichen Ökosystem gewonnen werden. Dazu stellte uns das Tierspital die Kuh Galone zu Verfügung. Wie wir auf Abb. 2 sehen, besitzt dieses Tier eine Öffnung in der dorsalen Flanke, welche normalerweise durch einen Schraub-verschluss verschlossen ist. Mit einem langen Rohr, welches mit einer Vakuumpumpe gekoppelt ist, konnte so der Saft aus dem untersten Teil des Pansens in ein Auffanggefäß gesogen werden. (Abb. 3 und 4) Der Dunkelgrüne Saft wurde in eine kleine Flasche umgefüllt und in den Mikroskopierraum gebracht. Dabei musste eine Abkühlung verhindert werden, da die Mikroorganismen an die 39°C im Pansen gewöhnt sind.

Abb. 2 Fistel in der dorsalen Flanke der Kuh

Abb. 3 und 4 Probeentnahme mit dem Saugrohr

2.2 Mikroskopieren

Mit dem ebenfalls dem Tierspital gehörenden Phasenkontrast- und Epifluoreszenzmikroskop wurde die mikrobielle Zusammensetzung des Pansensafts untersucht. Dabei konnte bis zu 1000–fach vergrössert werden. Im Fluoreszenzmodus wurde violettes Anregungslicht verwendet. Dadurch wurden jene Organismen und Nahrungspartikel mit entsprechender Eigenfluoreszenz sichtbar.

2.3 Redox- und pH Untersuchungen

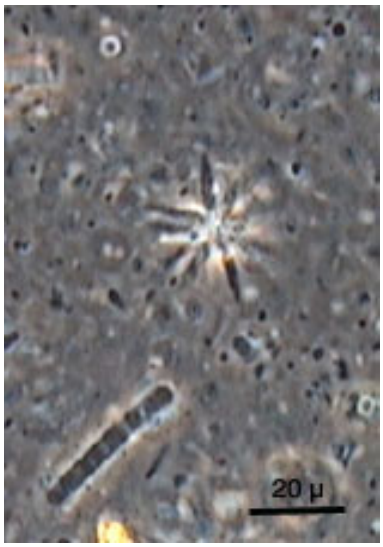
Der Pansensaft wurde mittels farbigen Redoxindikatoren auf seine Aktivität hin untersucht. Durch Kochen der Probe oder Zugabe von Glucose konnten Vergleiche zur natürlichen Aktivität der Organismen gemacht werden. Mit Hilfe des pH Indikators Bromthymolblau (Umschlag bei Säurezugabe: Blau–Grün–Gelb; pKa 7.2) konnte der Einfluss des mikrobiellen Stoffwechsels auf den pH untersucht werden. Die Anleitungen zu den Experimenten befinden sich in den Kursunterlagen unter
http://www.microeco.unizh.ch/uni/kurs/bio3_04/pdf/01rumen02.pdf

2.4 Arbeiten mit Thermodyn

Dieses Programm kann man von der microeco Webseite unter
http://www.microeco.unizh.ch/therm/thermodyn.html kostenlos herunterladen. Es ermöglicht uns verschiedenste Umweltbedingungen für Mikroorganismen zu simulieren. Voraussetzungen sind bekannte stöchiometrische Reaktionsgleichungen sowie die Substrat und Produktkonzentrationen. Die genaue Anleitung zum Programm kann den Kursunterlagen entnommen werden
http://www.microeco.unizh.ch/uni/kurs/bio3_04/pdf/18thermod02.pdf

3. Ergebnisse

3.1 Betrachtungen unter dem Mikroskop:



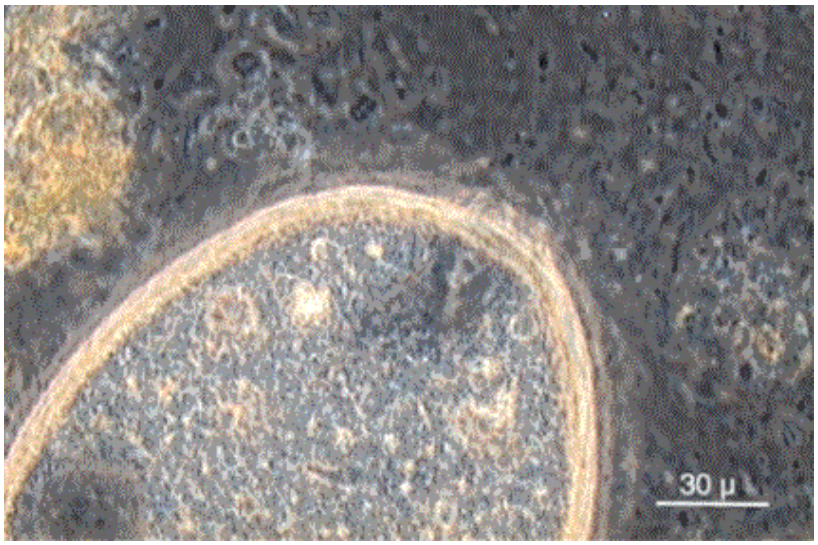
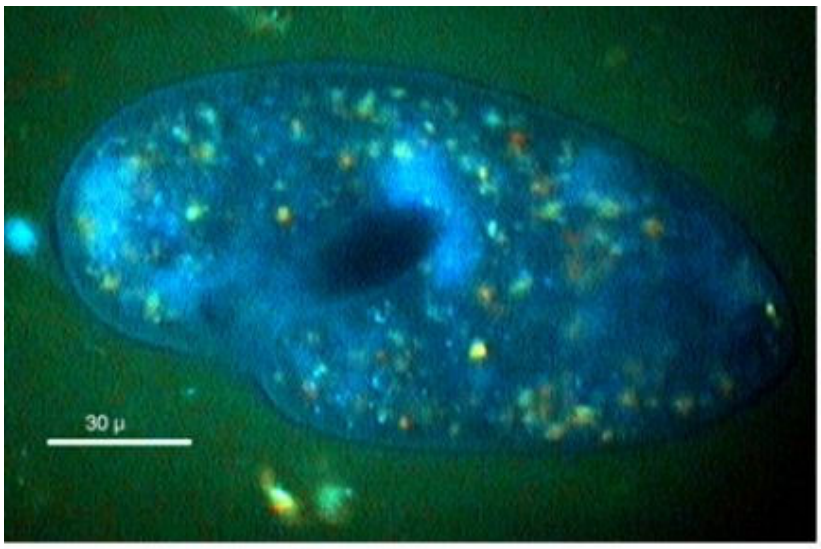


Abb 5 und 6
Der Pansensaft besteht praktisch vollständig aus Mikroorganismen. Gut sichtbar sind kleine, stäbchenförmige oder runde Bakterien, die teilweise Kolonien oder Aggregate bilden und grössere Protozoen wie zB. Cilliaten



In Abb. 7 und 8 sehen wir Methanbakterien, welche durch violettes Licht zu blauer Eigenfluoreszenz angeregt werden. Abb. 7 zeigt eine fadenartige Kolonie von Methanarchäen und Abb. 8 autofluoreszierende methanogene Prokaryoten innerhalb eines Cilliaten.

3.2 Redox Experimente

	Nr. 1 Pansensaft, bei 39° inkubiert	**Nr. 2** Saft mit zusätzlich 1ml Glucose, 39°	**Nr. 3** Saft mit zusätzlich 1ml Glucose, und erhitzten auf 100°
Methylenblau (Blau)	31 sec	3sec	Kein Farbverlust
Resazurin (Rosa)	1min 4 sec	17sec	Kein Farbverlust
Phenosafranin (Rot)	+10 min	+10 min	Kein Farbverlust

Tabelle 1: Reduktionszeit (Entfärbung) der Redoxindikatoren bei unterschiedlicher Behandlung der Mikroorganismen

Bei Methylenblau, welches ein Redoxpotential um + 50 mV besitzt, stellte sich am schnellsten eine Entfärbung ein. Die Mittelpunktspotentiale von Resazurin (-45mV) und Phenosafranin (-270mV) liegen weniger weit vom Potential im Pansen (-350 - 400mV) weg.
Das dadurch kleinere Redoxgefälle zu den Elektronendonatoren bewirkt langsamere Entfärbungs-reaktionen.

Nach einiger Zeit konnte am oberen Rand der Reagenzgläser eine Umkehr des Farbwechsels beobachtet werden.

3.3 pH Experiment

Zu den oben schon benutzten drei unterschiedlich behandelten Pansensaft Proben wurde der pH Indikator Bromthymolblau gegeben. Dieser ist bei pH 7.2 blau, bei etwa 6.6 gelb und bei pH's unter 6.0 gelb.

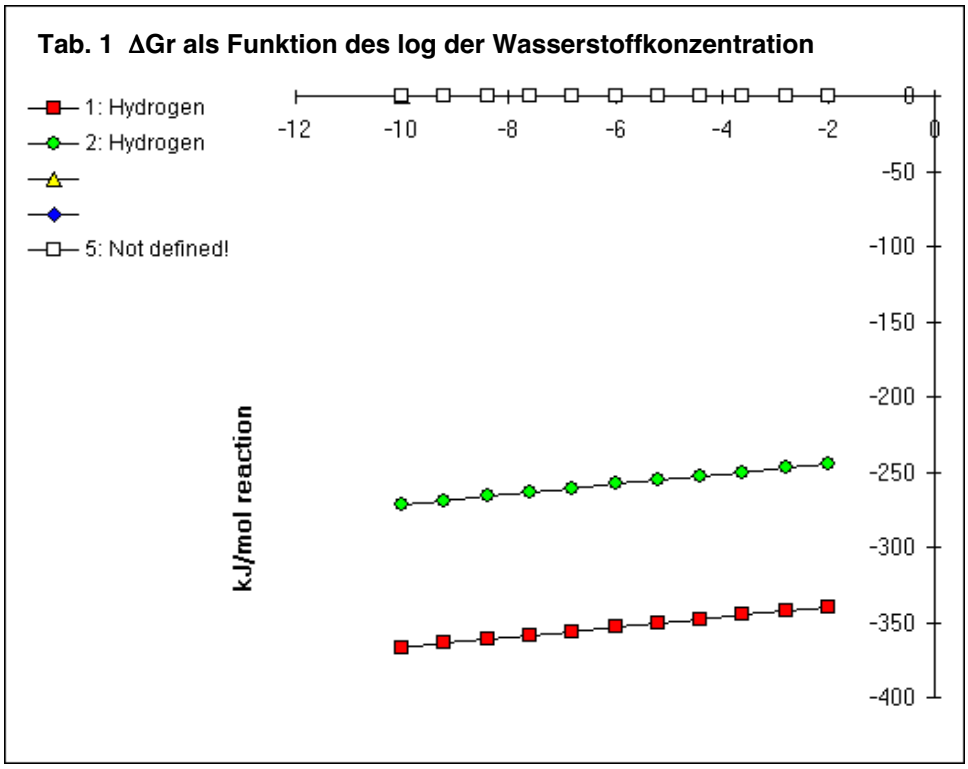
Probe Nr. 1: (keine Behandlung) Langsame Farbänderung von blau nach grün
Probe Nr. 2 (Glucose): Rasche Farbänderung von blau nach grün
Probe Nr. 3 (Glucose und Erhitzten): Keine Farbänderung
Durch Farbvergleich mit einer Indikatorentabelle konnte bei den Proben 1 und 2 ein pH von etwa 6.8 nachgewiesen werden.

Nach einiger Zeit wandelte sich die Farbe vom Gemisch der Proben 1 und 2, von der Oberfläche her, zurück nach blau.

3.4 Thermodyn© Modelle

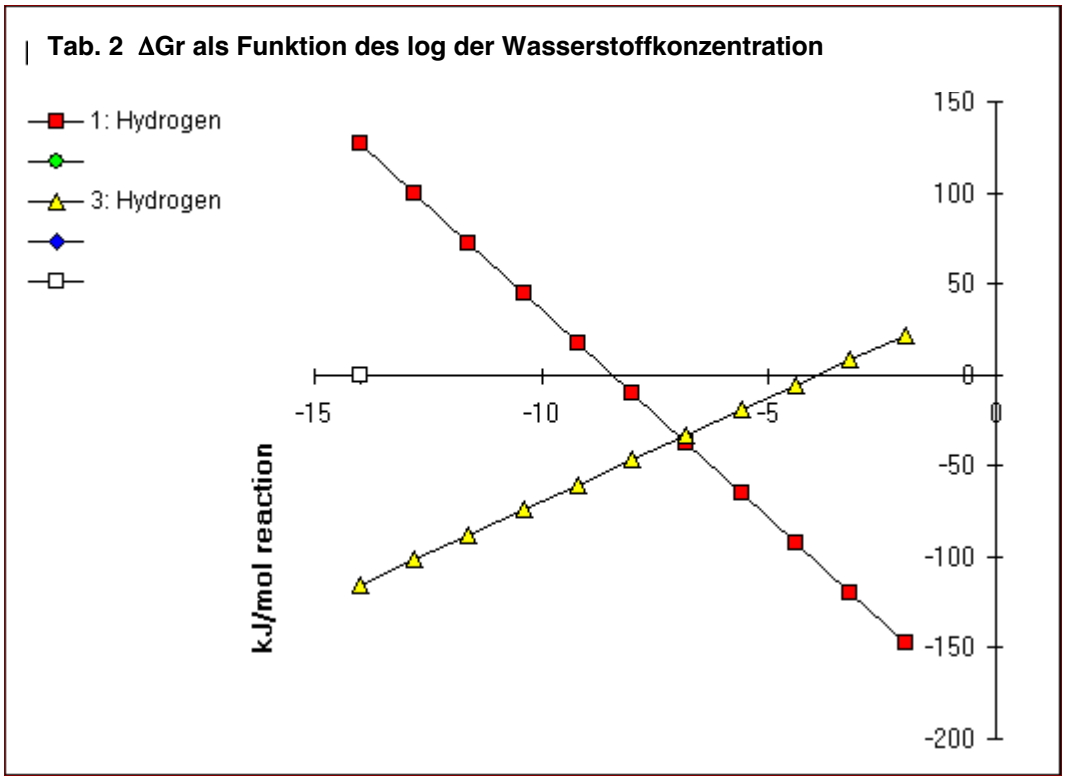
Einfluss der Wasserstoffkonzentration im Pansen auf den anaeroben Abbau von Glucose:

Tab. 1 ΔGr als Funktion des log der Wasserstoffkonzentration



Interaktion von wasserstoffabbauenden und wasserstoffbildenden Mikroorganismen :

Tab. 2 ΔGr als Funktion des log der Wasserstoffkonzentration



4. Diskussion

4.1 Stoffwechsel der Mikroorganismen

Unter dem Mikroskop wurde die Dichte und Vielfalt der Bakterien, Archäen und Ciliata im Pansensaft sichtbar. Die Bakterien und Archäen werden von der Kuh vorwiegend zur Verdauung der pflanzlichen Polysaccharide gehalten, da sie, wie alle Vertebraten, die dazu benötigten glykolytischen Enzyme nicht selber herstellen können. Die Ciliaten ernähren sich von den Bakterien, verdauen diese und sorgen für ein gutes Gleichgewicht der Mikrobebpopulationen. Wenn die Kuh die Nahrung aus dem Pansen wieder hochwürgt, ist diese nicht nur vorverdaut, sondern auch angereichert mit den Pansenmikroben. Die Kuh nimmt so zur Pflanzennahrung zusätzlich mikrobielle Proteine und Vitamine auf.

Unter dem Mikroskop wurden die autofluoreszierenden Methanarchäen gut sichtbar. Die Eigenfluoreszenz ist auf den Faktor 420, einem bei der Methanbildung beteiligten Coenzym, zurückzuführen. Methan ist eines der bedeutenden Treibhausgase und wird von der Kuh ausgeschieden. Die Methanarchäen sind sehr wichtig für das Ökosystem Pansen. Durch den oxidativen Stoffwechsel anderer Bakterien werden viele Elektronen freigesetzt, welche durch die Methanarchäen abgefangen werden. Ohne diesen Mechanismus könnte bei Sauerstoffzutritt Knallgas entstehen.

Im Redox-Experiment zeigten wir, dass die Bakterien tatsächlich in ihrem Stoffwechsel Elektronen umverteilen, also Redox-Reaktionen durchführen. Dazu benutzten wir drei Proben. Die Probe mit den gekochten, toten Bakterien zeigte wie erwartet keine Reaktion. Die bei den anderen beiden Proben beobachteten Reaktionen sind auf Aktivitäten der Mikroorganismen zurückzuführen. Eine Probe wurde mit Glucose gefüttert und zeigte eine sehr deutliche, schnelle Reaktion. Im Glucoseabbau werden Elektronen auf den zugegebenen Farbstoff übertragen, welche ansonsten von NAD+ und NADP+ oder H+ abgefangen würden. In der letzten Probe findet ebenfalls eine deutliche Reaktion statt, allerdings eine langsamere. Diese Organismen wurden nicht gefüttert, hatten nur das bereits im Pansensaft vorhandene Substrat, also Polysaccharide, zur Verfügung, welche sie zuerst hydrolysieren mussten. Der begrenzende Faktor war hier die enzymatische Substratspaltung.
Die an der Oberfläche stattfindende Rückfärbung beruht auf einer O_2 abhängigen Reoxidierung des Farbstoffes. Diese Beobachtung bestätigt, dass die Farbänderung tatsächlich auf der Reduktion des Farbstoffes und nicht auf einer anderen chemischen Reaktion beruht.

Die Bakterien und Protozoen bauen die pflanzlichen Polysaccharide zu Glucose um und ab und fermentieren diese zu verschiedenen kurzkettigen Fettsäuren, Kohlendioxid und Methan. Die Fettsäuren und das als Kohlensäure gelöste CO_2 bewirken den leicht sauren pH-Wert von 6.8. Die kurzen Fettsäuren mit pK-Werten zwischen 3.5 und 5 liegen unter den Bedingungen im Pansen vorwiegend in deprotonierter Form vor und können sich als Anionen nicht verflüchtigen. Die Kohlensäure dagegen hat einen pK-Wert von 6.4, kann protoniert vorliegen und sich verflüchtigen, was den durch die Farbänderung von Bromthymolblau von grün nach blau angezeigten, leicht steigenden pH-Wert erklärt.

4.2 Erläuterungen zu den Thermodyn© Modellen

Die beiden mittels Thermodyn© erstellten Tabellen zeigen ΔGr als eine Funktion der logarithmisch dargestellten Wasserstoffkonzentration. Die freie Energie ΔGr ist definiert durch:

$$\Delta Gr = \Delta Gr^{o} + R\,T\,\ln Q, \quad \text{wobei } Q = \frac{\prod [\text{Produkte}]^{z}}{\prod [\text{Edukte}]^{z}} \qquad (z: \text{stöchiometrische Faktoren})$$

Die Gaskonstante (R) und die Temperatur in Kelvin (T) werden als konstant angenommen. Nehmen die algebraischen Produkte der Produktkonzentration und Eduktkonzentration gleiche Werte an, ist $\ln Q = 0$, und $\Delta Gr = \Delta Gr^{o}$. Somit findet keine Reaktion statt, da sie sich im Gleichgewicht befindet. Je höher die Konzentration der Edukte, desto höher steigt der Wert von ΔGr, desto exergonischer ist die Reaktion und desto freiwilliger läuft sie ab und desto mehr freie Energie steht den Organsimen zur Verfügung.

Tabelle 1:
Anhand der beiden Graphen wird die Energiebilanz des anaeroben Glucoseabbaus durch *R. flavefaciens* (siehe 1.3) am Anfang (Rot) und Ende (Grün) der Reaktion in einer Batch Kultur verglichen. Die Reaktion ist auch nach veränderten Bedingungen immer noch stark exergon.
Der Energiegewinn wird auch durch eine Konzentrationsänderung des Wasserstoffs beeinflusst. Wird dieser von wasserstoffabbauenden Mikroorganismen aus dem System entfernt, wird die Reaktion in Richtung der Produkte beschleunigt.

Tabelle 2:
Wasserstoffabbauende (rot) und wasserstoffbildende (gelb) Mikroorganismen interagieren und profitieren gegenseitig voneinander. Die Wasserstoffkonzentration pendelt sich dort ein, wo der *gemeinsame* „Profit" optimiert ist, also im Schnittpunkt der Graphen. Die Koordinaten dieses Schnittpunktes lauten (-6.8; -32.9). Somit müsste die Wasserstoffkonzentration im Pansen einen idealen Wert von $10^{-6.8}$ mol/l erreichen, was einem maximalen Energiegewinn von 32.9 kJ/mol H_2 entspricht.

Bei den betrachteten Reaktionen fällt auf, dass ΔGr auch bei veränderten Substrat- oder Produktkonzentrationen meist negativ, die Reaktion also exergonisch bleibt. Die verschiedenen Mikroorganismen interagieren untereinander und gehen synergistische Symbiosen ein. So baut z.B. *M. ruminantium* Wasserstoff und Formiat ab, was den Glucoseabbau von *R. flavefaciens* begünstigt, da Q und somit auch ΔGr grösser (negativer) wird. Gewisse Produkte wie Formiat, Acetat und Succinat werden ins Blut des Wiederkäuers aufgenommen, wodurch Q und ΔGr ebenfalls grösser (ΔGr negativer) werden.
Die riesige Zahl von Mikroorganismen, die den Pansen von Wiederkäuern bewohnen, demonstrieren im kleinen Rahmen eindrücklich, wie komplexe Ökosysteme in der Natur funktionieren.

5. Quellenverzeichnis

Abbildungen:

Abbildung 1:
Campbell/Reece: Biologie. Heidelberg; Berlin: Spektrum Akademischer Verlag, 2003

Alle weiteren Abbildungen sind Aufnahmen, die während des Mikrobiologiekurses erstell wurden.

Literatur:

Brock: Biology of Microorganisms. 10th ed. Upper Saddle River: Rearson Education Inc, 2003

Praktikumsanleitungen:
http://www.microeco.unizh.ch/uni/kurs/bio3_04/start/framepg1-css-b.html