

Mikrobiologische Vielfalt im Pansen eines Wiederkäuers

Verfasser:Michael Walser, michaelwalser@swissonline.chDaniel Widmer, dewidi@bluewin.chPhilipp Schönenberger, pschoenenberger@web.deBetreuer: Kurt Hanselmann, hanselma@botinst.unizh.ch

Inhalt

INHALT	1
EINLEITUNG	1
VORGEHEN	1
ERGEBNISSE	3
<u>Mikroskopische Untersuchungen</u>	3
<u>Redoxbeobachtungen</u>	4
DISKUSSION	4
ANHANG	5

Einleitung

In diesem Experiment wird die Vielfalt der anaeroben Mikroorganismen im Pansen einer Kuh (Wiederkäuer) illustriert und unter dem Phasenkontrastmikroskop bzw. dem Epifluoreszenzmikroskop beobachtet. Ausserdem werden mit kurzen Experimenten einige Auswirkungen der mikrobiellen Stoffwechselaktivität unter den anoxischen Bedingungen im Pansensaft dargestellt.

Vorgehen

Im Tierspital wurden einer fistulierten Kuh (Abb. 1&2) mittels Schlauch und Vakuum 250ml Pansensaft abgesaugt und in eine sterile Flasche abgefüllt. Da die Mikroorganismen keinen Sauerstoff zum Leben brauchen, wurde die Flasche fast vollständig gefüllt. Auf dem Rückweg wurde die Flasche unter den Arm geklemmt, um so die Temperatur des Pansens möglichst aufrecht zu erhalten.

Im Labor des Tierspitals wurde der Pansensaft im Phasenkontrastmikroskop und im Fluoreszenzmikroskop untersucht, und danach bei einer konstanten Temperatur von 39°C in einem Wasserbad warmgehalten. Durch Farbindikatoren (Resazurin, Methylenblau, Phenosafranin) konnten Veränderungen im Redoxpotential festgestellt werden.



Abb. 1 Absaugen des Pansensaftes aus der fistulierten Kuh „Galone“



Abb. 2 Abfüllen des Pansensaftes

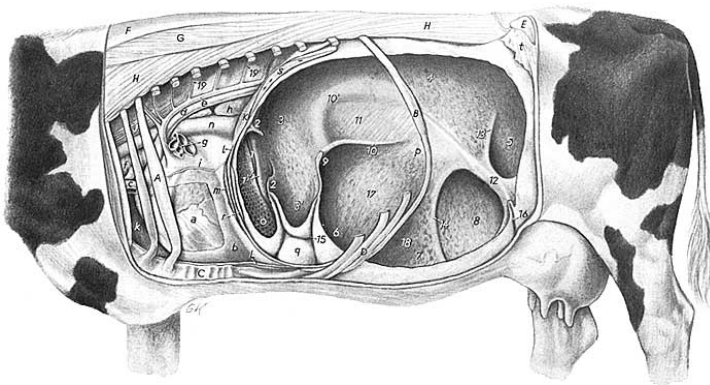


Abb. 3 The bovine abdomen is filled with a huge ruminant stomach, which impedes trunk flexion and extension during locomotion.

<http://vanat.cvm.umn.edu/run/plate7.html>

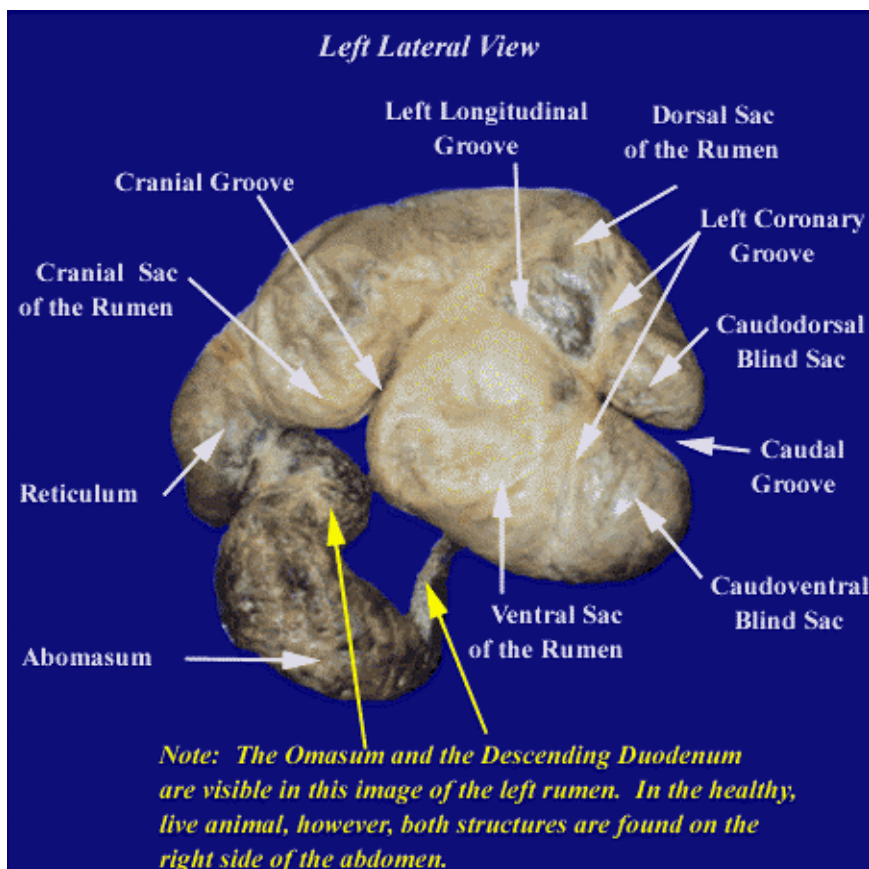


Abb. 4 Left Lateral View of the Ruminant Stomach

<http://caltest.nbc.upenn.edu/grossanat/topics/abdom-3/Rumin-3/3r-gi-1a.htm>

The figure is taken from the University of the Pennsylvania School of Veterinary Medicine's website by A Pfenninger. The site contains a number of additional explanations and instructive figures about the digestive system on ruminants

Ergebnisse

Mikroskopische Untersuchungen

Im Phasenkontrastmikroskop erkennt man im Pansensaft zahlreiche vakuolisierte Protozoen, meist Ciliaten und einige Flagellaten, welche sich durch Strudeln Nahrungspartikel und Bakterien als Nahrung zuführen. Besonders interessant ist der Reichtum an verschiedenen Prokaryotenformen. Bei UV-Licht werden Methanarchäen durch ihre Autofluoreszenz besonders gut sichtbar.

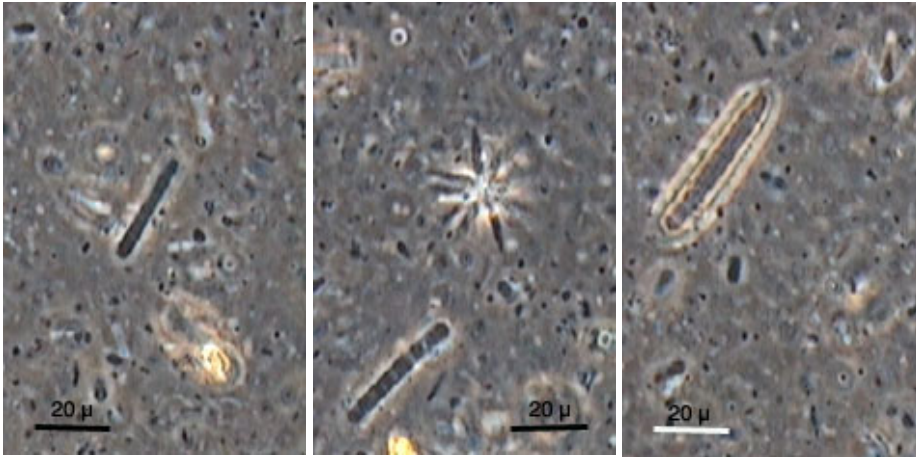


Abb. 5-7 Prokaryoten im Phasenkontrast

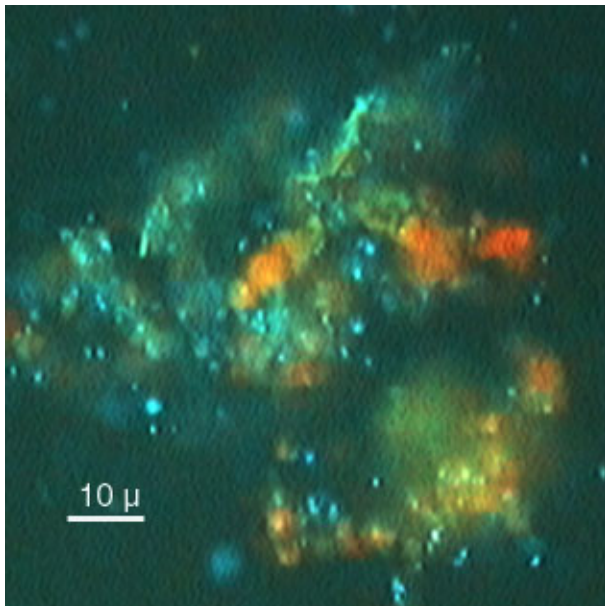


Abb. 8 Autofluoreszenz von methanogenen Archäen (blau) nach Anregung mit violettem Licht

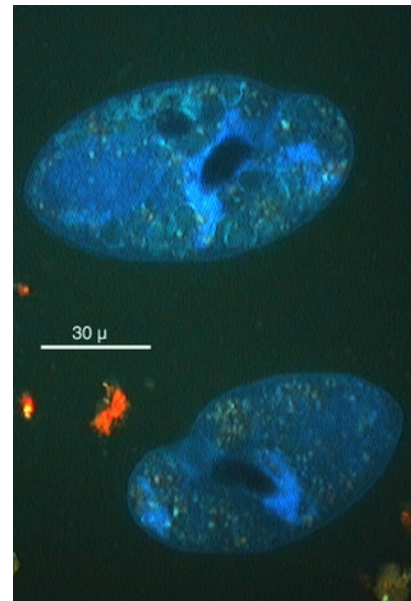


Abb. 9 Symbiose von Methanarchäen (blau) und Ciliaten

Redoxbeobachtungen

Das Redoxpotential wurde mit Hilfe von drei Indikatoren (Phenosafranin, Resazurin und Methylenblau) geprüft. Zu jedem Ansatz wurde die angegebene Menge des Indikators gegeben, wobei wir die Farbänderung beobachteten.

Tabelle 1. Zeit für Entfärbung des Indikators (Reduktion) in Sekunden			
	Methylenblau (blau)	Resazurin (rosa)	Phenosafranin (rot)
+ 1ml Glucose, bei 39° inkubiert	11	15	Sofort aber nur schwach*
+ 1ml dest. Wasser, bei 39° inkubiert	49	27	Sofort aber nur schwach*
+1ml Glucose, Mikroorganismen inaktiviert in siedendem Wasser für 5 min.	Keine Entfärbung	Keine Entfärbung	Keine Entfärbung
* Eine vollständige Entfärbung von Phenosafranin ist im Verlaufe der Versuchsdauer nicht eingetreten			

Der auf 100° erhitzte Pansensaft zeigte keine Reaktion, er diente als Kontrolle. Beim Resazurin wurde am Ende des Versuches an der Flüssigkeitsoberfläche roter Farbstoff (Resorufin) wieder sichtbar. Dies geschah aufgrund einer Oxidation des Farbstoffes, was sowohl die Funktionstüchtigkeit des Farbstoffes wie auch die vorherige Reduktion (Entfärbung) durch die Mikroorganismen bewies.

Im Pansensaft herrscht ein Redoxpotential von –350 mV bis –400 mV. Es besteht ein obligates anoxisches Milieu, in welchem pflanzliche Polysaccharide (Stärke, Cellulose etc.) und andere pflanzliche Polymere in verschiedene Fettsäuren abgebaut werden.

Die verschiedenen Indikatoren verlieren ihre Farbe bei unterschiedlichen Redoxpotentialen. Resazurin bei –45 mV und damit schon viel früher als Phenosafranin das erst bei –270 mV mehrheitlich in reduzierter Form vorliegt (seine Farbe verliert). Das Mittelpunktspotential von Methylenblau liegt bei + 10 mV, daher die sehr rasche Reaktion.

Diskussion

Eine Kuh hat 4 Mägen (Pansen, Netzmagen, Blättermagen, Labmagen) mit insgesamt 110 bis 230 Liter Fassungsvermögen. Daran schließen sich der Dünndarm und der Dickdarm mit einer Länge von 35 bis 60 Metern an. Im Darm findet der größte Teil der Nährstoffaufspaltung statt. Der Pansen ist der größte der 4 Mägen. Im Pansen wird die geschluckte Nahrung mit Hilfe von Mikroorganismen zum Teil fermentativ abgebaut. Dabei entstehen Fettsäuren, die von der Kuh resorbiert werden. Im Pansen der Kuh herrschen Bedingungen wie in einer anoxischen Fermentationskammer und sie beinhaltet ein hoch komplexes mikrobielles Ökosystem. Zu den Mikroorganismen im Pansen zählen: anaerobe Bakterien und Archäen, anaerobe Protozoen (v.a. Ciliaten) und auch anaerobe Pilze. All die verschiedenen Mikroorganismen funktionieren optimal zusammen bei einem pH von 6.5 – 6.9 und einer Temp. von 39° C. Auch die Protozoen hydrolysieren Kohlenhydratpolymere und sie verdauen Prokaryoten. Die Polymere werden zuerst in Disaccharide und Monosaccharide zerlegt und anschliessend zu kurzkettigen flüchtigen Fettsäuren wie Formiat, Acetat, Propionat und Butyrat fermentiert. Methanogene Archäen wandeln entstehende Stoffe wie H₂, CO₂, und Anteile von Formiat und Acetat etc. in Methan (CH₄) um, das die Kuh durch den Schlund und den Darm verlässt. Solche Produkte entstehen bei der Fermentation durch den Austausch von Elektronen. Die Substrate werden oxidiert und führen zu reduzierten Produkten wie z.B.: Methan und VFA.

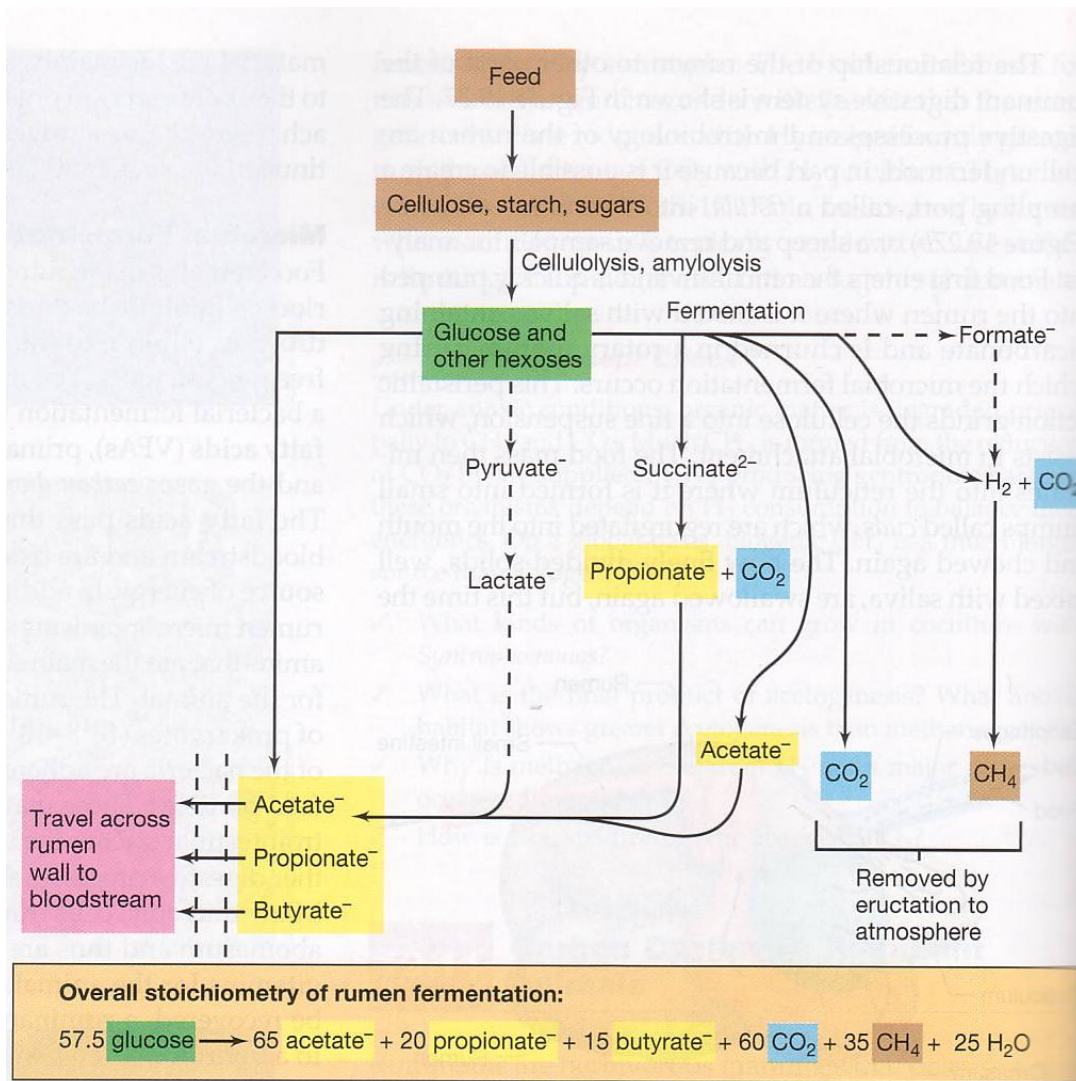


Abb. 10 Biochemische Reaktionen im Pansen.
(Brock ; Biology of microorganisms, 10th Edition)

Anhang

Kursanleitungen: http://www.microeco.unizh.ch/uni/kurs/bio3_04/docs/ex-summary.html

Bücher: Brock biology of microorganisms 10th Edition.

Bilder Mikroskop: während des Kurses aufgenommen