

# Mikrobiologische Diversität im Pansen eines Wiederkäuers und biothermodynamische Modellversuche

VerfasserInnen: Cornelia Bühlmann  
Sabine Vögeli  
Sabine Muff  
David Stucki

Betreuer: Kurt Hanselmann

## 1. Einleitung

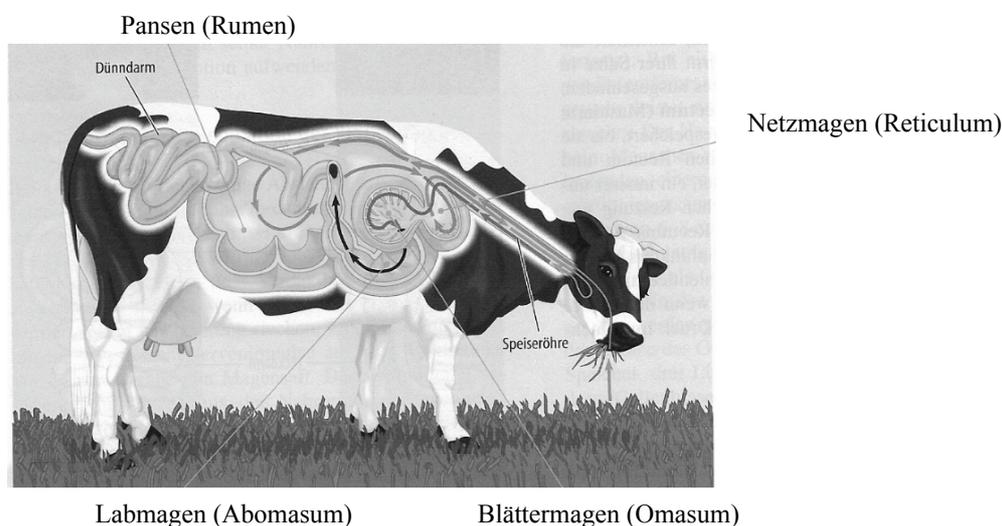
Diese Experimente zeigen die enorme Vielfalt von Mikroorganismen im Pansen einer Kuh (Wiederkäuer). Durch einzelne Versuche wird die Stoffwechselaktivität dieser Mikroorganismen untersucht. Im zweiten Teil werden die thermodynamischen Aspekte betrachtet, sowie deren Zusammenhänge mit dem Stoffwechsel von Mikroorganismen.

## 2. Verdauung bei Wiederkäuern durch Mikroorganismen

Herbivore Tiere stehen einer besonderen Herausforderung gegenüber. Durch ihre Nahrung nehmen die Tiere pflanzliche Stoffe auf, die sie selber nicht abbauen können. Sie können keine Enzyme produzieren, welche z.B. die Cellulose spalten können. Dieses Problem wird durch die Symbiose mit Mikroorganismen gelöst. Diese Mikroorganismen verfügen über die nötigen Enzyme, um Cellulose, Stärke, Pektin und Hemicellulose zu einfachen Zuckern und anderen Verbindungen abzubauen, die von ihren Wirten resorbiert werden können. Diese Mikroorganismen sind somit in der Lage, die pflanzlichen Polysaccharide abzubauen.

Der Magen eines Wiederkäuers gliedert sich in vier Kammern. Wegen der Tätigkeit der Mikroorganismen, ist die von einem Wiederkäuer endgültig verwertete Nahrung wesentlich nährstoffreicher als das Gras, welches das Tier ursprünglich abgeweidet hat. Viele Nährstoffe werden durch die Verdauung der Überproduktion an Symbionten gewonnen.

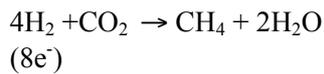
Abb. 1 : Verdauung bei Wiederkäuern (Campbell/Reece: Biologie; Spektrum Akademischer Verlag; 2003)



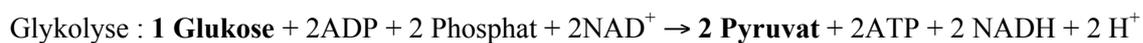
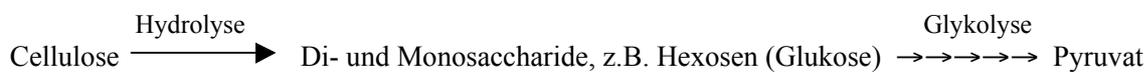
Die Nahrung (z.B. Gras), die eine Kuh aufnimmt, gelangt als erstes in den Pansen. Durchmischtes mit dem Pansensaft findet die Fermentation statt. Die Mikroorganismen verdauen die cellulosehaltige Kost, Pflanzenpolysaccharide werden abgebaut. Die von den Mikroorganismen gebildeten Stoffwechselprodukte werden auf verschiedene Arten weiterverarbeitet oder ausgeschieden. Die leichtflüchtigen Fettsäuren gelangen ins Blut, Gase werden ausgestossen und Wasserstoff und Kohlendioxid werden in Methan umgewandelt (Methanogenese) und gelangen so in die Atmosphäre.

### Methanogenese:

(Anaerobe Methanbildung durch Oxidation von Wasserstoff)



### Celluloseabbau:



In der Glykolyse wird Energie durch die Oxidation von Glukose zu Pyruvat freigesetzt. Pro Abbau eines Glukosemoleküls in 2 Pyruvatmoleküle werden 4 Elektronen freigesetzt, die auf NAD<sup>+</sup> übertragen werden.

Welche Mikroorganismen bewohnen den Pansen?

Mit dem Phasenkontrast- und dem Fluoreszenz-Mikroskop haben wir verschiedene Ciliaten, Bakterien und Archäen gesehen. Gewisse Methanarchäen in oder auf Ciliaten sind durch ihre Eigenfluoreszenz gut sichtbar. Diese Archäen nehmen die Elektronen auf, die bei der Glykolyse entstehen (→Methanogenese).

### **3. Aktivität der Mikroorganismen im Pansen**

Beschreibung des Experiments:

Von einer fistulierten Kuh des Tierspitals wurde Pansensaft abgesaugt. Mit diesem Pansensaft wurde gezeigt, dass Redoxreaktionen ablaufen. Anhand dieser Elektronenverschiebungen wurde die Aktivität der Mikroorganismen untersucht.

Es wurden drei Proben hergestellt

- 1) Pansensaft + Wasser → Wasserbad (39°C)
- 2) Pansensaft + Glukoselösung → Wasserbad (39°C)
- 3) Pansensaft + Glukoselösung → siedendes Wasser → Wasserbad (39°C)

Das Redoxpotential wurde mit Hilfe von drei Indikatoren (Methylenblau +10mV, Resazurin -45mV, Phenosafranin -270 mV) untersucht. Da diese drei Indikatoren verschiedene Redoxpotentiale aufweisen, dauerte die Entfärbung des Pansensafts nach Zugabe des Indikators verschieden lange. Erwartet wurde mit abnehmendem Potential eine längere Dauer bis zur vollständigen Entfärbung.

Ergebnisse:

Tab: Zeit für Entfärbung der Indikatoren bei verschiedener Behandlung der Pansenmikroorganismen

|                     | Probe 1      | Probe 2      | Probe 3                    |
|---------------------|--------------|--------------|----------------------------|
| Methylenblau (blau) | 55 sec       | 20 sec       | keine Reaktion beobachtbar |
| Resazurin (rosa)    | 2 min 10 sec | 45 sec       | keine Reaktion beobachtbar |
| Phenosafrin (rot)   | dauert lange | dauert lange | keine Reaktion beobachtbar |

In der Probe 3 wurden die Mikroorganismen durch die Hitze abgetötet, weshalb diese Probe keine Reaktion zeigte. Es finden keine Redoxreaktionen statt und deshalb auch keine Farbänderungen der Indikatoren.

Mit Methylenblau fand die Farbänderung wie erwartet am schnellsten statt.

Die Proben mit zusätzlicher Glukoselösung reagierte schneller als diejenigen, denen man zum Volumenausgleich nur Wasser zugab. Wenn die Glukose abgebaut wird, werden die Elektronen auf die Indikatoren übertragen (sonst auf  $\text{NAD}^+$ ,  $\text{NADP}^+$ , ...).

In der Probe 1 (keine zusätzliche Glukose zugegeben) musste aus der Cellulose zuerst Glukose hergestellt werden (Hydrolyse), weshalb es länger dauerte bis die Farbänderung eintrat.

Da das Röhrchen nicht vollständig gefüllt wurde, hatte es immer auch noch Sauerstoff darin. Deshalb konnte es eine Rückfärbung (= Oxidation des Redoxindikators) geben.

#### 4. Wie man aus biothermodynamischen Betrachtungen mikrobielle Lebensweisen verstehen kann (Exp. 18)

Einleitung:

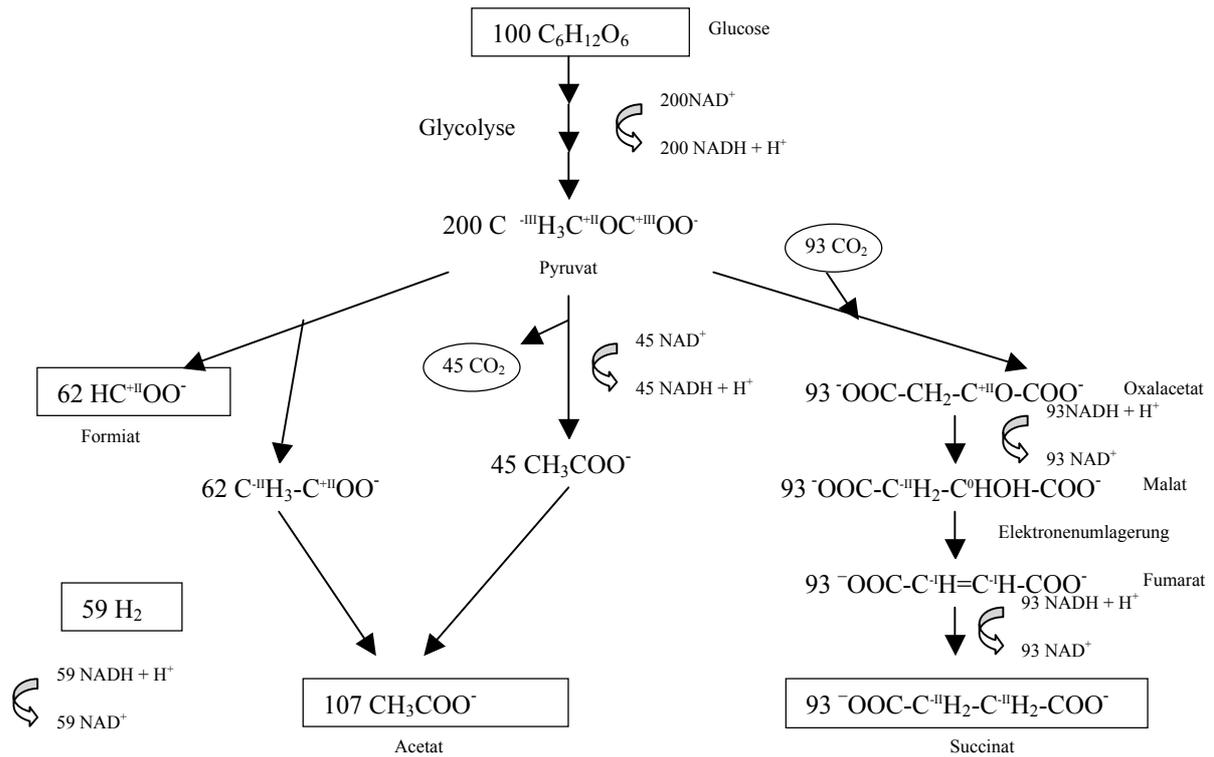
Wie wir gesehen haben, finden im Pansen eine Menge Reaktionen statt. Mikroorganismen nützen diese Reaktionen zur Energiegewinnung und zum Stoffwechsel. Für die thermodynamische Betrachtung dieser Reaktionen steht uns ein Programm zur Verfügung welches uns die fermentativen Glucoseabbauprozesse veranschaulicht. Wir können damit feststellen unter welchen Bedingungen eine Reaktion für die Energiegewinnung genutzt werden kann. Dies ist dann der Fall, wenn die Reaktion exotherm abläuft. Allerdings gibt uns die Thermodynamik keine Angaben über die Geschwindigkeit einer Reaktion.

Vorgehen:

Wir haben die Fermentation von Glucose in *Ruminococcus flavefaciens* untersucht. Sie läuft über das Zwischenprodukt Pyruvat ab und hat folgende Reaktionsgleichung:



Um diese Gleichung besser zu verstehen, haben wir sie in ihre einzelnen Schritte gespalten und die Elektronenbilanz unter die Lupe genommen. Folgendes Schema hat sich dabei ergeben:



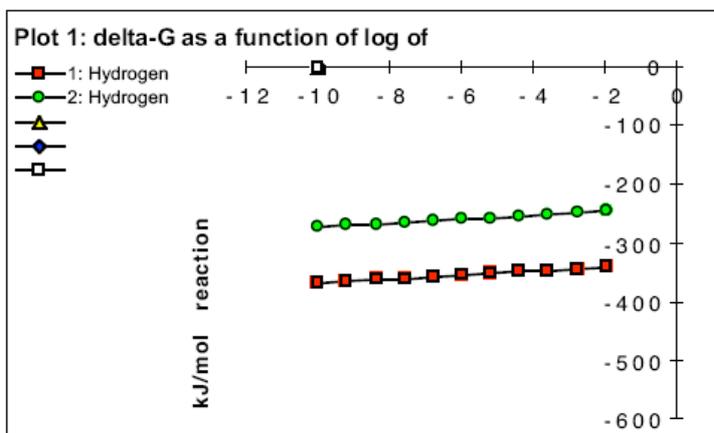
Mit Hilfe der folgenden Formel lassen sich nun Aussagen über die freie Enthalpie  $\Delta G_r$  machen:

$$\Delta G_r = \Delta G_r^\circ + RT \ln Q$$

Stehen nun die Edukte in grossem Überschuss zur Verfügung, oder aber die Produkte sind nur in geringer Konzentration vorhanden, so kann die Reaktion exergonisch sein auch wenn sie unter Normalbedingungen endergonisch ist. Zur Untersuchung dieses  $\Delta G_r$ 's wurde das schon erwähnte Computerprogramm „Thermodyn“ eingesetzt.

Ergebnisse:

Als erstes wurde die Fermentation von Glucose in der Batch- Kultur dargestellt:

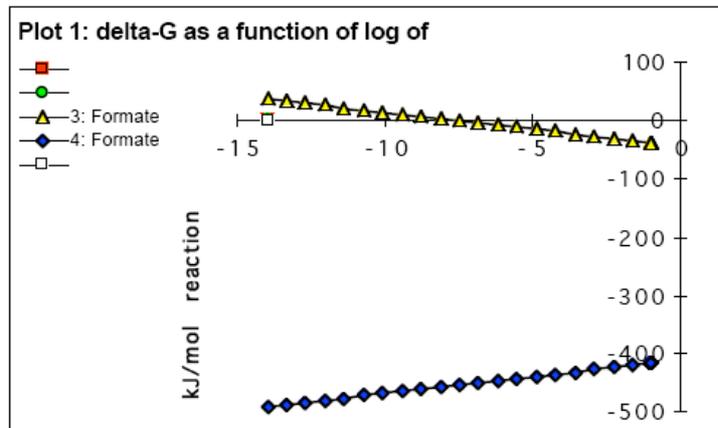


Rot: Beginn der Reaktion

Grün: Ende der Reaktion

Die x-Achse ist logarithmisch dargestellt und zeigt die  $H_2$ -Konzentrationen an, die zu  $\Delta G_r$  auf der y-Achse gehören. Anhand dieser zwei Kurven erkennt man, dass die Reaktion sowohl am Anfang wie auch am Ende der Batch-Kultur exergon ist. Daraus kann man schliessen, dass das Wachstum von *R. flavefaciens* nicht durch Energiemangel aufgehalten wird.

Als zweites wurde die Fermentation von Glucose durch *R. flavefaciens* mit der Produktion von Methan aus Formiat durch *Methanobrevibacter ruminantium* verglichen.



Gelb: Methanogenese von Formiat

Blau: Glucosefermentation

Aus dieser Graphik lässt sich ablesen, dass die Fermentation von Glucose über den ganzen Bereich exergonisch ist, mit steigender Konzentration von Formiat jedoch weniger wird. Die Methanproduktion wird erst bei dem Schnittpunkt mit der x-Achse exergon. Es gibt also bei diesem Beispiel einen Bereich, bei dem die Konzentration von Formiat so hoch ist, dass es von *M. ruminantium* als Substrat verwendet werden kann. Die Formiatkonzentration steigt dann nicht weiter an und *R. flavefaciens* kann fortlaufend Energie aus der Fermentation gewinnen. Es lässt sich anhand dieses Beispiels zeigen, dass Mikroorganismen voneinander profitieren können.