

Aus dem Institut für Tierphysiologie und Tierernährung
der Georg-August-Universität zu Göttingen

**In-vitro-Untersuchungen
zur reduktiven Acetogenese
im Pansen**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Agrarwissenschaften
der Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt von

Claudius da Costa Gomez

geboren in Rindern

Göttingen, im Januar 1999

Gefördert durch die DFG im Graduiertenkolleg „Landwirtschaft und Umwelt“
am Forschungs- und Studienzentrums Landwirtschaft und Umwelt
des Fachbereichs Agrarwissenschaften

D7

Referent:	Prof. Dr. sc. agr. Hj. Abel
Korreferent:	Prof. Dr. rer. nat. U. Eberhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	28. Januar 1999

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Herrn Professor Dr. Hj. Abel danke ich für die Überlassung des Themas, das mir entgegengebrachte Vertrauen und seine stetige Diskussionsbereitschaft, die mich sowohl fachlich als auch persönlich bereicherte.

Herrn Professor Dr. U. Eberhardt danke ich für die Übernahme des Korreferates und die in allen Phasen der Arbeit gewährte sehr konkrete fachliche Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Irmgard Immig, die mich während der gesamten Doktorandenzeit wissenschaftlich begleitete und in vielen Diskussionen durch konstruktive Anregungen zum Fortgang dieser Arbeit beigetragen hat.

Frau Ingrid Gründel vom Institut für Angewandte Nutztierwissenschaften der Humboldt-Universität Berlin danke ich für ihre zuverlässige und freundliche Einsatzbereitschaft bei der Durchführung der batch-culture-Inkubationen.

Für die sehr engagierte Zusammenarbeit bei der Planung sowie für die Durchführung der ^{13}C -NMR-Messungen danke ich Frau Dr. Stephanie Grond und Herrn R. Machinek vom Institut für Organische Chemie der GEORG-AUGUST-UNIVERSITÄT Göttingen. Ihre uneigennützigere Bereitschaft zur interdisziplinären Zusammenarbeit hat sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Rolf Jeromin danke ich für die geduldige Einführung in die praktische Laborarbeit, das sehr gute Teamwork am RUSITEC und die vielen interessanten Gespräche in der Mittagspause.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für Tierphysiologie und Tierernährung danke ich für die freundliche Kooperation, die dazu beigetragen hat, daß ich mich im Institut immer wohlgeföhlt habe.

Allen Mitdoktoranden und Freunden danke ich für ihren Zuspruch und die Anteilnahme an den kleinen und großen Problemen des Doktorandenalltags sowie für die fröhlichen gemeinsamen Stunden.

Frau Dr. Bettina Rother danke ich für die liebevolle und geduldige Unterstützung vor allem in der letzten Phase dieser Arbeit.

Meinen Eltern danke ich für Ihr Verständnis, ihr Vertrauen und ihre Unterstützung, ohne die es mir nicht möglich gewesen wäre, diese Arbeit anzufertigen.

Für das gewährte Stipendium danke ich der STIFTUNG FÜR ERNÄHRUNGSWISSENSCHAFTEN Göttingen.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Fragestellung	2
3	Material und Methoden	
3.1	Versuchsplan	6
3.2	in-vitro-Methoden	
3.2.1	Fütterung der Spendertiere	10
3.2.2	Pansensaftentnahme	11
3.2.3	Defaunierung des Pansensaftes	11
3.2.4	Gewinnung der Bakteriensuspension	12
3.2.5	batch-culture-Methode	12
3.2.6	Pansensimulationstechnik (RUSITEC)	15
3.3	Analytische Methoden	
3.3.1	Messung von pH-Wert und Redoxpotential	18
3.3.2	Bestimmung der Protozoenzahl	19
3.3.3	Messung der Fermentationsgase	19
3.3.4	Messung der flüchtigen Fettsäuren	22
3.3.5	Berechnung der Wasserstoffwiederfindung	25
3.3.6	¹³ C-Kernresonanzspektroskopie (NMR)	27
3.4	Statistische Auswertung	27
4	Versuchsergebnisse	
4.1	batch-culture-Untersuchungen mit nicht defauniertem Pansensaft	29
4.1.1	Einfluß der Ration des Spendertieres	29
4.1.2	Einfluß der Nüchterungsdauer des Spendertieres	30
4.1.3	Einfluß des in-vitro-Substrates	31
4.1.4	Einfluß der Wechselwirkungen zwischen den Faktoren Ration, Nüchterungsdauer und in-vitro-Substrat	32
4.2	batch-culture-Untersuchungen mit defauniertem Pansensaft	35
4.2.1	Einfluß der Ration des Spendertieres	36
4.2.2	Einfluß der Nüchterungsdauer des Spendertieres	36
4.2.3	Einfluß des in-vitro-Substrates	37
4.2.4	Einfluß der Wechselwirkungen zwischen den Faktoren Ration, Nüchterungsdauer und in-vitro-Substrat	38
4.3	Zusammenfassung der Ergebnisse aus den batch-culture-Untersuchungen	41
4.4	in-vitro-Untersuchungen zum Nachweis der reduktiven Acetogenese mit Hilfe von ¹³C-CO₂	43
4.4.1	Nachweis der reduktiven Acetogenese durch Mikroben des Schweinedarms	43
4.4.2	Untersuchungen zum Nachweis einer reduktiven Acetogenese im Pansensaft	45
4.4.3	Untersuchungen zum Nachweis einer reduktiven Acetogenese durch pansenstämmige Mikroorganismen aus dem RUSITEC-System	46

5	Diskussion	
5.1	Versuchsplan und Versuchskritik	51
5.2	Auswahl des verwendeten Defaunierungsverfahrens	51
5.3	Auswahl der verwendeten in-vitro-Methoden	52
5.4	Nachweis der reduktiven Acetogenese mittels ^{13}C -NMR	54
5.5	Einfluß der untersuchten Faktoren auf die Fermentation	55
5.5.1	Protozoen	55
5.5.2	Verfügbarkeit von Kohlenhydraten	59
5.5.3	Substanzen endogenen und mikrobiellen Ursprungs	64
6	Schlußfolgerungen	70
7	Zusammenfassung	71
8	Summary	73
9	Literaturverzeichnis	75
10	Anhang	81

1 Einleitung

Die Wiederkäuer produzieren weltweit schätzungsweise 80 Mio. t Methan pro Jahr, davon verursachen die Hauswiederkäuer ca. 73 Mio. t und tragen damit zu rund 20 % zum jährlich anthropogen verursachten Methan in unserer Atmosphäre bei (CRUTZEN ET AL. 1986, MOSS 1993). Die hohe Wirksamkeit dieses Treibhausgases hat in den letzten Jahren die ruminale Methanogenese, bei der von Pansenbakterien aus Wasserstoff und Kohlendioxid Methan gebildet wird, wieder verstärkt in die wissenschaftliche Diskussion gebracht.

Da mit dem Methan ein Anteil von 2 bis 12 % der mit dem Futter aufgenommenen Energie ungenutzt wieder abgegeben wird, ist es für die Tierernährungswissenschaften schon lange ein wichtiges Ziel, die ruminale Methanogenese zu senken (JOHNSON und JOHNSON 1995). Aus diesem Grund gibt es eine Vielzahl von Arbeiten, in denen die verschiedenen Einflußfaktoren der Methanentstehung im Pansen untersucht werden (CZERKAWSKI und BRECKENRIDGE 1972, MARTY und DEMEYER 1973, AGUILERA und PRIETO 1991, VAN NEVEL und DEMEYER 1992, BLÜMMEL and ØRSKOV 1993, GARCIA-LOPEZ ET AL. 1996, JOUANY 1994, VAN NEVEL und DEMEYER 1996, MACHMÜLLER ET AL. 1998). Dabei werden unterschiedliche Strategien zur Senkung der Methanogenese verfolgt. Entweder wird die Methanbildung mit direkt auf methanogene Bakterien wirkende Substanzen reduziert oder aber die Rationszusammensetzung wird dahingehend variiert, daß pro Einheit fermentierter Substanz weniger Methan entsteht. Der Einsatz der die Methanbildung hemmenden Substanzen führt, insofern überhaupt in vivo eine nachhaltige Wirkung erzielt werden kann (VAN NEVEL und DEMEYER 1996), zum Anstieg der Wasserstoffkonzentration und damit zu einer ungünstigen Verschiebung der Fermentationsprodukte (MILLER 1995). Die Änderung der Rationszusammensetzung zur Reduzierung der Methanbildung wird durch einen Anstieg leichtverdaulicher Futteranteile erreicht (MOSS 1994 a). Damit steigen allerdings die Anforderungen an die Fütterung, und die Fähigkeit der Wiederkäuer, hochwertige Nahrungsmittel (Fleisch und Milch) aus pflanzlichen Gerüstsubstanzen und Nicht-Protein-Stickstoff zu produzieren, verliert an Bedeutung.

In der vorliegenden Arbeit steht die reduktive Acetogenese im Mittelpunkt des Interesses. Dieser mikrobielle Stoffwechselweg liefert aus Kohlendioxid und Wasserstoff nicht - wie im Pansen – Methan, sondern Acetat, das vom Wiederkäuer effizient genutzt werden könnte. Vor 10 Jahren wurden im Pansen erstmalig Organismen, die zur reduktiven Acetogenese befähigt sind, nachgewiesen (GREENING und LEEDLE 1989). Es ist allerdings bislang ungeklärt unter welchen Bedingungen, dieser Stoffwechselweg von den Mikroorganismen im Pansen auch tatsächlich beschreitbar wird. Die vorliegende Arbeit soll hierzu einen Beitrag leisten.

2 Fragestellung

Der Abbau gering verdaulicher Nahrungsbestandteile im Intestinaltrakt von Mensch und Tier erfolgt durch die hochgradig spezialisierte Mikroorganismengemeinschaft in diesem anaeroben Ökosystem (NOLLET und VERSTRAETE 1996). Endprodukte der Fermentation sind, neben den vom Wirt genutzten flüchtigen Fettsäuren (SCFA), Wasserstoff und Kohlendioxid (GIBSON ET AL. 1993 a, WOLIN und MILLER 1993, DEMEYER ET AL. 1996). Die SCFA werden zum überwiegenden Teil vom Wirt direkt aus dem Lumen resorbiert, während der Wasserstoff entweder von sulfatreduzierenden, methanogenen oder aber von reduktiv acetogenen Bakterien genutzt wird (DORÉ ET AL. 1995, NOLLET und VERSTRAETE 1996). Die Nutzung des metabolischen Wasserstoffs ist für die Aufrechterhaltung des mikrobiellen Systems wichtig, da bei einem zu hohen Wasserstoffpartialdruck die Re-Oxidation des bei der Glycolyse reduzierten Koenzyms NADH beeinträchtigt (GIBSON ET AL. 1993 a, GOTTSCHALK 1986) und das Fermentationsmuster in Richtung vermehrter Ethanol- und Lactatbildung verschoben wird (MILLER 1995).

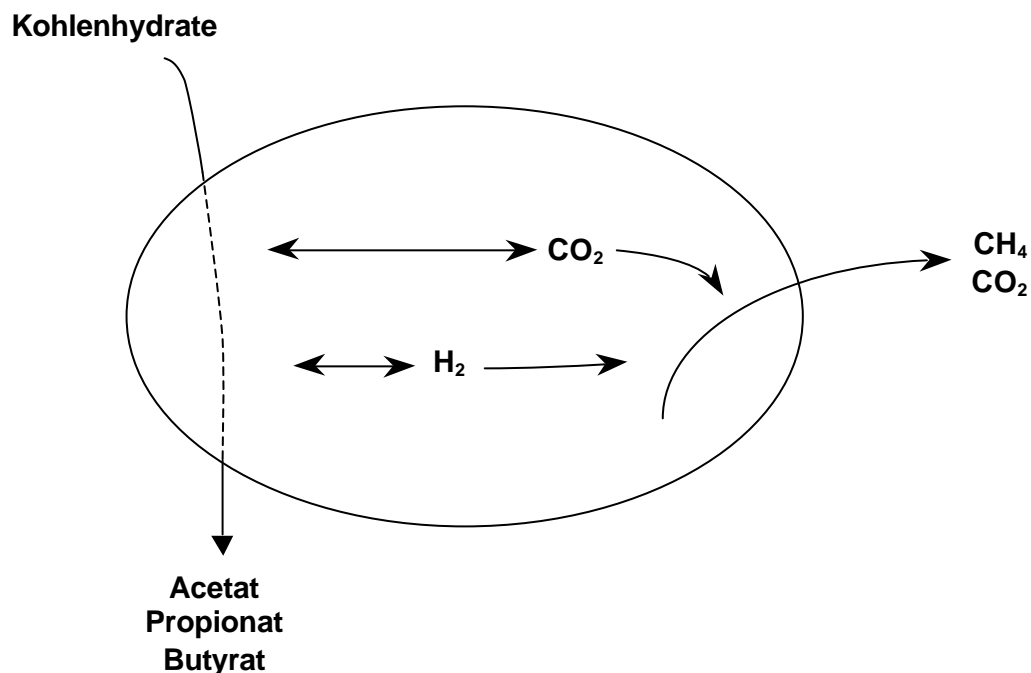


Abb. 1: Schematische Darstellung der Fermentationsvorgänge im Pansen.

Dickdarm und Pansen unterscheiden sich hinsichtlich der mikrobiellen Strategien des Wasserstoffverbrauchs. Im Pansen dominiert die Methanogenese (Abb. 1), bei der Wasserstoff nach der Reaktionsgleichung $\text{H}_2 + \text{CO}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{CH}_4$ für die Reduktion von Kohlendioxid zu Methan verbraucht wird (JOHNSON und JOHNSON 1995, DEMEYER ET AL. 1996). Demgegenüber wird im Dickdarm der Wasserstoff vor allem durch sulfatreduzierende bzw. reduktiv acetogene Mikroorganismen gebunden (DE GRAEVE

ET AL. 1994, IMMIG 1996). Das im Pansen gebildete Methan wird beim Ructus in die Atmosphäre abgegeben (GÜRTLER 1989). Das hat für das Tier einen Energieverlust (JOHNSON und JOHNSON 1995) und für die Erdatmosphäre eine zusätzliche Umweltbelastung zur Folge (MOSS 1993). Als Alternative zur ruminalen Methanogenese kann die Sulfatreduktion als mögliche Wasserstoffsенke ausgeschlossen werden, da im Pansen nur geringe Sulfatmengen vorliegen und die Endprodukte dieser Reduktion eine toxische Wirkung auf andere Mikroben sowie das Wirtstier haben (MORVAN ET AL. 1996). Dagegen wird, seitdem GREENING und LEEDLE (1989) mit dem Bakterium *Acetitomaculum ruminis* erstmals reduktiv acetogene Organismen im Pansen nachgewiesen haben, die reduktive Acetogenese als mögliche Alternative zur Methanogenese im Pansen diskutiert (STEVANI ET AL. 1991, RIEU-LESME ET AL. 1996, DEMEYER ET AL. 1996, IMMIG 1996, IMMIG 1998, LE VAN ET AL. 1998). Die bisher aus dem Pansen isolierten, reduktiv acetogenen Bakterien sind obligat anaerob, mesophil, Gram-positiv und zeigen bei pH 6,5 bis 7,2 optimales Wachstum (DURAND und BERNALIER 1993, RIEU-LEME ET AL. 1996).

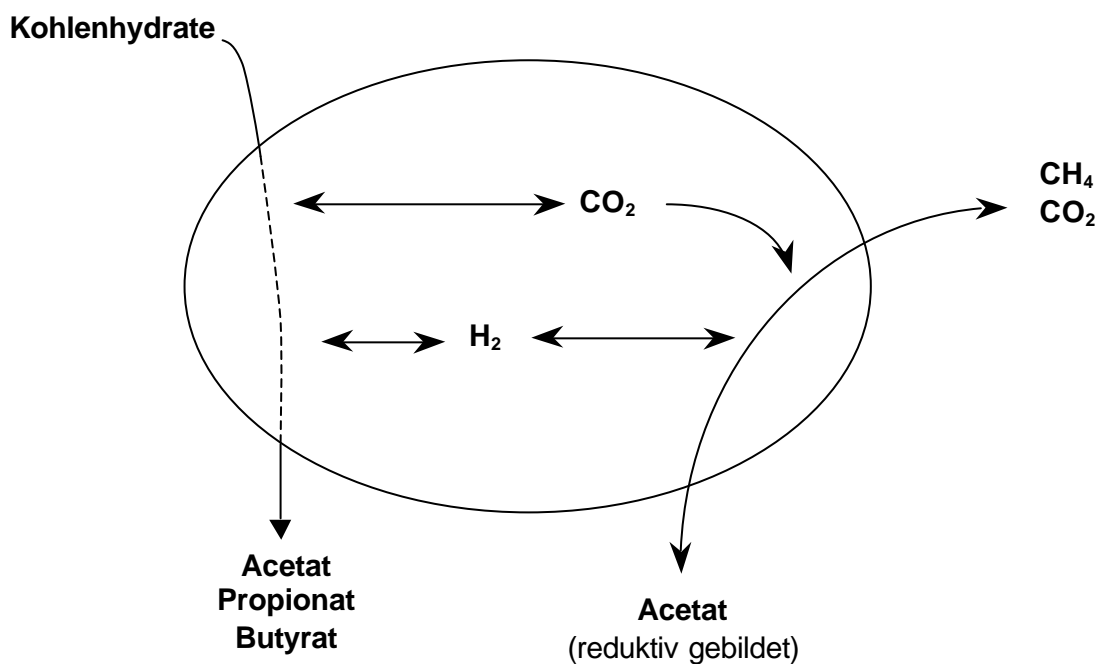


Abb. 2: Schematische Darstellung der Fermentationsprozesse im Pansen unter Einbeziehung einer autotrophen reduktiven Acetogenese.

Bei der reduktiven Acetogenese wird Kohlendioxid durch den metabolischen Wasserstoff nach der Reaktionsgleichung $2 \text{CO}_2 + 4 \text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_3\text{COOH} + 2 \text{H}_2\text{O}$ zu Acetat reduziert. Es können zwei Synthesewege unterschieden werden: 1) der autotrophe, bei dem die acetogenen Organismen ausschließlich Kohlendioxid und Wasserstoff zu Acetat synthetisieren und 2) der heterotrophe, bei dem aus einem Hexoseäquivalent zwei Mol Acetat oxidativ und ein Mol Acetat aus Kohlendioxid

sowie intermediär anfallenden Reduktionsäquivalenten gebildet werden (DE GRAEVE ET AL. 1994). Im Pansen würde sich durch die autotrophe Nutzung des metabolischen Wasserstoffs als Reduktionsäquivalent eine zusätzliche Acetatquelle erschließen (Abb.2), die sowohl die energetische Effizienz der Fermentation verbessern, als auch die Methanemissionen der Wiederkäuer reduzieren könnte (DE GRAEVE ET AL. 1994, MACKIE UND BRYANT 1994).

Diese Form der Kohlendioxidreduktion mit dem Ergebnis der Acetatbildung wurde bisher im Verdauungstrakt von Termiten (BREZNACK und KANE 1990) im Dickdarm des Menschen (LAJOIE ET AL. 1988, WOLIN und MILLER 1993, KAMLAGE ET AL. 1997, LECLERC ET AL. 1997) im Dickdarm von Schweinen (DE GRAEVE ET AL. 1994) und Kaninchen (PIATTONI ET AL. 1996) und im Pansen von neugeborenen Lämmern (MORVAN ET AL. 1994, RIEU-LESME ET AL. 1996) nachgewiesen. Im Pansen adulter Tiere sind zwar auch reduktiv acetogene Bakterien vorhanden, in vivo oxidieren sie jedoch Formiat, Glucose und Cellobiose zu Acetat (GREENING und LEEDLE 1989, GIBSON ET AL. 1990).

Da im Vergleich zu reduktiv acetogenen Organismen die methanogenen Bakterien des Pansens eine höhere Affinität zu Wasserstoff besitzen (BREZNACK und KANE 1990, LE VAN ET AL. 1998), wurde durch den Einsatz der die Methanbildung hemmenden BES (Bromethansulfonsäure) versucht, die reduktive Acetogenese im Pansen zu initiieren. In Untersuchungen von NOLLET ET AL. (1997) konnte bei gleichzeitigem Einsatz von BES und dem Zusatz von *Peptostreptococcus productus*, einem zur reduktiven Acetogenese befähigten Organismus, die reduktive Acetogenese in vitro stimuliert werden. Da die methanogenen Organismen sich in-vivo an BES adaptieren (IMMIG 1996), wurde in einem anderen Ansatz die Hemmung der Methanogenese mit Metaboliten des *Lactobacillus plantarum* 80 überprüft. Auch bei dieser, die methanogenen Bakterien hemmenden Substanz, zeigte sich nach einigen Erfolgen bei in-vitro-Untersuchungen in-vivo nur eine kurzzeitige Wirkung (NOLLET ET AL. 1998).

Ausgehend von den grundsätzlichen Unterschieden der mikrobiellen Umsetzungen in Dickdarm und Pansen sollten in der vorliegenden Arbeit die Faktoren untersucht werden, die das reduktiv acetogene Potential im Pansen stimulieren können. Dazu wurden zunächst auf Grundlage der wesentlichen Unterschiede zwischen den Habitaten drei Hypothesen formuliert.

Die reduktive Acetogenese wird im Pansen gefördert, wenn ...

1. ... *Protozoen fehlen,*
2. ... *weniger leicht abbaubare Kohlenhydrate vorhanden sind,*
3. ... *Substanzen endogenen oder mikrobiellen Ursprungs anwesend sind.*

Im Pansen wird die Methanogenese über den Interspezies-Wasserstoff-Transfer durch symbiontische Assoziation der methanogenen Bakterien mit entodiniomorphen Protozoen gefördert (KRUMHOLZ ET AL. 1983). Im Gegensatz zum Pansen werden die in den Dickdarm gelangenden Kohlenhydrate durch Bakteriengemeinschaften ohne Beteiligung von Protozoen abgebaut (DEMEYER und DE GRAEVE 1991). Als wichtigste Gründe für das Fehlen der Protozoen im Dickdarm gelten die geringere Kohlenhydratverfügbarkeit (LENG 1988) und die kürzere Verweildauer der Digesta in diesem Habitat (GROVUM und WILLIAMS 1977). Der Einfluß von Protozoen wurde in der vorliegenden Arbeit mit nicht defauniertem und defauniertem Pansensaft als Inokulum untersucht.

Im Pansen sind im Vergleich zum Dickdarm mehr leicht abbaubare Kohlenhydrate verfügbar (HOOVER 1978). Diese Kohlenhydrate dienen den reduktiv acetogenen Organismen im Pansen als Substrat (GREENING und LEEDLE 1989), während die ausschließlich autotroph methanogenen Bakterien den metabolischen Wasserstoff nutzen. Eine Verringerung der leicht verfügbaren Kohlenhydrate im Pansen könnte eine mikrobielle Gemeinschaft fördern, in der der metabolische Wasserstoff von reduktiv acetogenen und methanogenen Organismen genutzt und damit die Konkurrenz um das Substrat verschärft wird (IMMIG 1996). Der Einfluß einer geringeren Verfügbarkeit leicht abbaubarer Kohlenhydrate wurde in der vorliegenden Arbeit mit unterschiedlichen Inokulumherkünften und in-vitro-Substraten in batch-culture-Versuchen untersucht.

In den Dickdarm gelangen endogene Substanzen in Form von Proteinen, Muzinen, Epithelzellen oder Gallensalzen. Darüber hinaus nimmt der Dickdarm Mikroorganismen, Restfraktionen von Mikroorganismen und mikrobielle Stoffwechselprodukte aus dem praecaecalen Darmabschnitt auf. In in-vitro-Inkubationen stellten DEMEYER ET AL. (1996) keine Wirkung von Muzinen und freien Aminosäuren auf die reduktive Acetogenese im Pansen fest. In batch-culture-Inkubationen untersuchte IMMIG (1998) die Wirkung von Gallensalzen. Es ergab sich zwar eine sehr effektive Hemmung der Methanogenese, eine reduktive Acetogenese konnte jedoch auch hier nicht nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit wurden die Einflüsse eines aus der Langzeit-Pansensimulationstechnik RUSITEC stammenden Inokulums ohne und mit Gallensalzzugabe sowie autoklavierter Dickdarminhalt als in-vitro-Substrat untersucht.

3 Material und Methoden

3.1. Versuchsplan

Die Entscheidung über die Annahme oder Ablehnung der drei Arbeitshypothesen:

Die reduktive Acetogenese wird gefördert, wenn ...

- I. ... Protozoen fehlen,*
- II. ... weniger leicht abbaubare Kohlenhydrate vorhanden sind oder*
- III. ... Substanzen endogenen oder mikrobiellen Ursprungs anwesend sind,*

sollte anhand von Ergebnissen aus in-vitro-Untersuchungen mit Pansensaft in der batch-culture getroffen werden. Dazu wurden als unabhängige Faktoren die Anwesenheit von Protozoen (1), die Ration (2) sowie die Nüchterungsdauer des Spendertieres (3) und das Substrat in den Inkubationsgefäßen (4) im Hinblick auf die Hypothesen gezielt variiert. Als abhängige Parameter für die in-vitro-Fermentation galten bei allen Versuchsanstellungen die kurzkettigen flüchtigen Fettsäuren (SCFA) sowie die Fermentationsgase Methan (CH₄) und Kohlendioxid (CO₂). Bei einigen in-vitro-Untersuchungen wurde außerdem die Wasserstoffwiederfindungsrate errechnet, sowie die Protozoenzahl und die ¹³C-Anreicherung in der Essigsäure bestimmt. Die Zuordnung der Arbeitshypothesen zu den Faktoren und deren Faktorstufen kann Übersicht 1 entnommen werden.

Übersicht 1: Zuordnung der Arbeitshypothesen zu den unabhängigen Faktoren und deren Faktorstufen.

Hypothese	Faktor	Faktorstufe
(I) Protozoen	(1) Protozoen	nicht defaunierter Pansensaft
		defaunierter Pansensaft
(II) Kohlenhydrate	(2) Ration des Spendertieres	Heu-Krafftfutter
		Stroh-Harnstoff
	(3) Nüchterungsdauer des Spendertieres	16 Stunden
		24 Stunden
	(4) in-vitro-Substrat	Heu
		Stroh
(III) Endogene Substanzen	(4) in-vitro-Substrat	autoklavierter Blinddarminhalt

Aus den vier Faktoren mit ihren insgesamt 9 Faktorstufen, wurde ein balanciertes, orthogonales Versuchsdesign entworfen, welches es ermöglichte, alle Faktoren miteinander zu vergleichen (Übersicht 2).

Übersicht 2: Versuchsdesign für in-vitro-Untersuchungen mit insgesamt 9 Faktorstufen der Faktoren Protozoen, Ration sowie Nüchterungsdauer des Spendertieres und in-vitro-Substrat. Jede Zahl steht für eine der 24 Faktorkombinationen.

Pansensaft nicht defauniert				
in-vitro-Substrat		Heu	Stroh	Blinddarminhalt
Ration Heu und Kraftfutter	16 Stunden Nüchterung	1	2	3
	24 Stunden Nüchterung	4	5	6
Ration Stroh und Harnstoff	16 Stunden Nüchterung	7	8	9
	24 Stunden Nüchterung	10	11	12
Pansensaft defauniert				
in-vitro-Substrat		Heu	Stroh	Blinddarminhalt
Ration Heu und Kraftfutter	16 Stunden Nüchterung	13	14	15
	24 Stunden Nüchterung	16	17	18
Ration Stroh und Harnstoff	16 Stunden Nüchterung	19	20	21
	24 Stunden Nüchterung	22	23	24

Jede der 24 in Übersicht 2 dargestellten, möglichen Faktorkombinationen wurde insgesamt 9 mal wiederholt. Dabei wurden pro batch-culture-Inkubation die Faktorkombinationen mit gleicher Ration und Nüchterungsdauer aber unterschiedlichem in-vitro-Substrat, einerseits nicht defauniert und andererseits defauniert, in dreifacher Wiederholung in einem Ansatz integriert. Eine solche Inkubation entsprach in Übersicht 2 beispielsweise den Faktorkombinationen 1, 2, 3, 13, 14 und 15, die in einem Ansatz jeweils in drei Wiederholungen vorlagen. Damit waren pro Inkubation bzw. pro Ansatz 18 Gefäße zu inkubieren. Jede dieser Inkubationen oder Ansätze wurde wiederum dreimal wiederholt und damit ergaben sich in 12 batch-culture-Ansätzen insgesamt 216 zu inkubierende Gefäße.

Anhand der Ergebnisse aus diesem Versuch wurde entschieden, welche Versuchsansätze Anzeichen für das Vorkommen von reduktiver Acetogenese aufwiesen und somit den Einsatz von $^{13}\text{C-CO}_2$ als Marker sinnvoll erscheinen ließen.

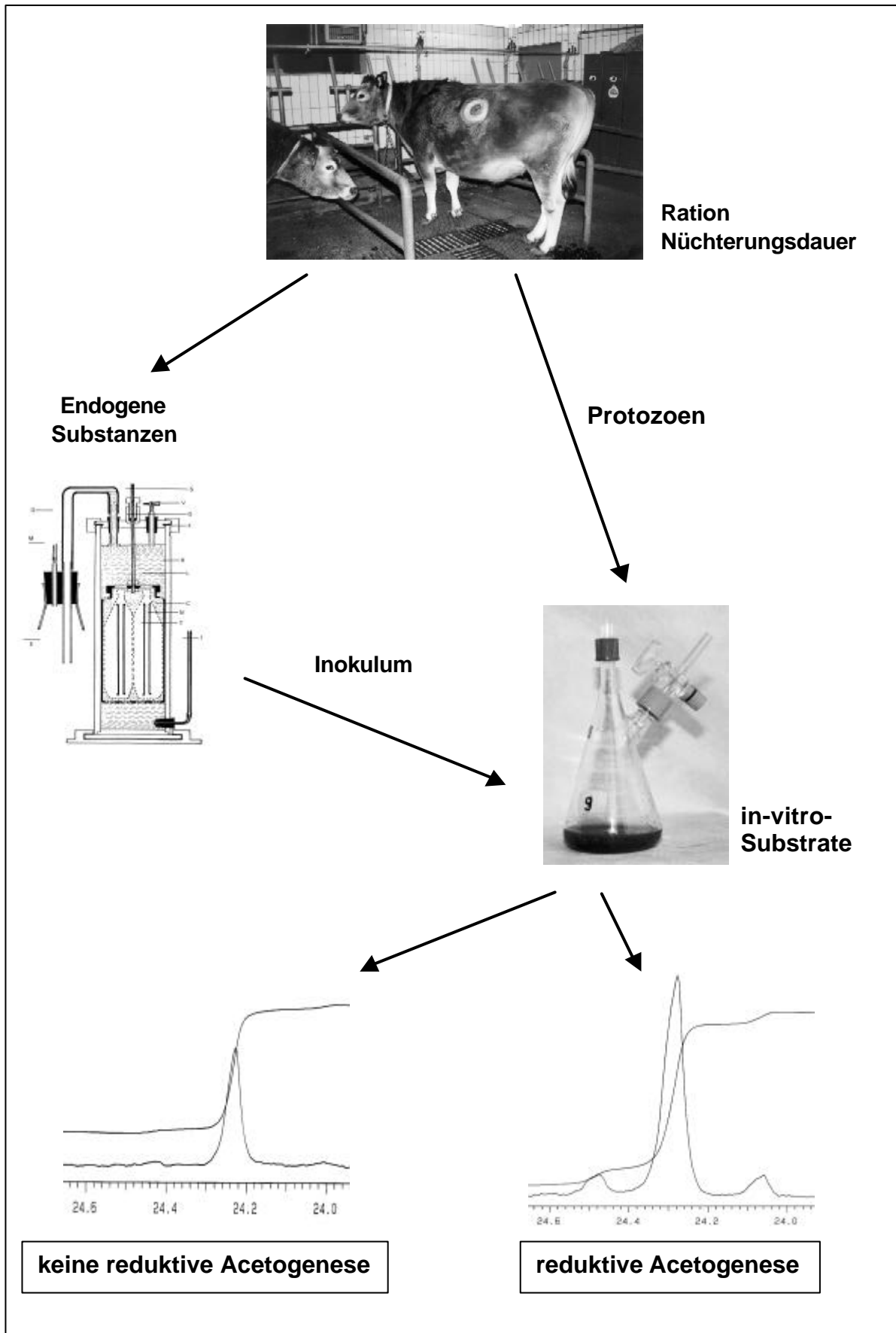
Aufgrund von Hinweisen aus der Literatur (IMMIG 1998) und eigenen Untersuchungen zum Einsatz von Gallensalzen als eine die Methanbildung im Pansen hemmende Substanz wurde ein zusätzlicher Versuch mit der Langzeit-in-vitro-Methode RUSITEC (CZERKAWSKI und BRECKENRIDGE 1977) zur Entwicklung der Biozönose von Pansenbakterien unter Einfluß von Gallensalzen durchgeführt. Dieser Faktor, der der Hypothese "Endogene Substanzen" (III) zuzuordnen ist, wurde mit in den Versuchsplan für den $^{13}\text{C-CO}_2$ -Einsatz aufgenommen.

Übersicht 3: Übersicht über die mit $^{13}\text{C-CO}_2$ -Marker durchgeführten Versuche sowie deren Behandlungen und Zuordnung zu den unabhängigen Faktoren.

Ansatz	Inokulum	n	in-vitro-Substrat	Gasatmosphäre	Faktor
1	Bakteriensuspension aus Schweinedarm	2	-	80 % Ar + 20 % $^{13}\text{C-CO}_2$	Kontrolle
	Bakteriensuspension aus Schweinedarm	3	-	80 % H_2 + 20 % $^{13}\text{C-CO}_2$	Einfluß der H_2 -Konzentration
2	nicht defaunierter Pansensaft	3	Heu	80 % H_2 + 20 % $^{13}\text{C-CO}_2$	Kontrolle
	nicht defaunierter Pansensaft	3	Blinddarm-inhalt	80 % H_2 + 20 % $^{13}\text{C-CO}_2$	in-vitro-Substrat
	defaunierter Pansensaft	3	Heu	80 % H_2 + 20 % $^{13}\text{C-CO}_2$	Protozoen
3	RUSITEC, ohne Gallensalz	3	Heu	80 % H_2 + 20 % $^{13}\text{C-CO}_2$	Kontrolle
	RUSITEC, vorbehandelt mit Gallensalz 0,4 %	3	Heu	80 % H_2 + 20 % $^{13}\text{C-CO}_2$	Gallensalz
	RUSITEC, vorbehandelt mit Gallensalz 0,6 %	3	Heu	80 % H_2 + 20 % $^{13}\text{C-CO}_2$	Gallensalz

Insgesamt wurden drei batch-culture-Ansätze unter Verwendung von $^{13}\text{C-CO}_2$ -Marker durchgeführt. Der Versuchsansatz 1 diente als Positivkontrolle der $^{13}\text{C-NMR}$ -Methode und wurde mit einem Inokulum aus dem Schweinedarm mit und ohne Wasserstoff in der Gasatmosphäre der Inkubationsgefäße durchgeführt (DE GRAEVE ET AL. 1994). Mit den zwei Begasungsstufen sollte überprüft werden, ob die mit einer

Übersicht 4: Versuchsplan für in-vitro-Untersuchungen zum Nachweis der reduktiven Acetogenese



erhöhten Wasserstoffkonzentration einhergehende Anregung der reduktiven Acetogenese mit Hilfe der ^{13}C -NMR quantifiziert werden kann. Der Ansatz 2 beinhaltete die Faktorvariation Protozoen (nicht defaunierter und defaunierter Pansensaft) sowie in-vitro-Substrat (Heu und Blinddarminhalt). Der Ansatz 3 ergab sich aus dem Faktor Gallensalz und umfaßte die Varianten Inokulum im RUSITEC-System ohne, mit 0,4 % und mit 0,6 % Gallensalzkonzentration. Ein Überblick über die mit ^{13}C -CO₂-Marker durchgeführten Versuche ist in Übersicht 3 wiedergegeben. Der gesamte Versuchsablauf ist in Übersicht 4 zusammenfassend dargestellt.

3.2 in-vitro-Methoden

3.2.1 Fütterung der Spendertiere

Als Spendertiere für den Pansensaft standen eine 7 jährige Holstein-Friesian (HF) Kuh und drei 6 jährige Jersey-Ochsen zur Verfügung. Alle Tiere hatten eine permanente weitlumige Pansenfistel und ein Gewicht von ca. 600 kg. Der Pansensaft der trockenstehenden Kuh wurde für die dreifaktoriell angelegten batch-culture-Versuche verwendet, während die Ochsen als Spendertiere für alle weiteren Untersuchungen eingesetzt wurden.

Tab. 1: Ration 1 und 2 für die HF-Kuh

Ration (1) Heu-Krafftutter	
Heu	1,2 kg FS/Tag
Stroh	2,0 kg FS/Tag
Krafftutter	4,5 kg FS/Tag
Ration (2) Stroh-Harnstoff	
Stroh	10,0 kg FS/Tag
Harnstoff	105 g/Tag

Für den Faktor Ration des Spendertieres wurde die Kuh mit einer Heu-Krafftutter- bzw. einer Stroh-Harnstoff-Ration gefüttert (Tab. 1). Die Menge des in der Ration Stroh-Harnstoff eingesetzten Harnstoffs ergab sich aus der Differenz zwischen Erhaltungsbedarf der Kuh an XP (475 g XP / Tag) abzüglich des mit dem Stroh zugeführten verdaulichen XP (175 g XP / Tag). Die zum Erhaltungsbedarf fehlende Menge an Rohprotein (300 g XP) wurde durch den im Harnstoff enthaltenen Stickstoff ersetzt ($300 \cdot 2.2 / 6,25 = 105$). Die Umstellungen des Spendertieres auf

die jeweilige Ration erfolgte mindestens eine Woche vor Beginn des Versuchszeitraumes. Der Wechsel von der Heu-Kraftfutter- auf die Stroh-Harnstoff-Ration erfolgte über eine siebentägige Anfütterungsphase, in der, ausgehend von einer Anfangsration aus 8kg Heu, 2 kg Stroh und 15 g Harnstoff, der Stroh-Harnstoff-Anteil schrittweise auf die tatsächliche Ration eingestellt wurde. Die entsprechende Harnstoffmenge wurde vor jeder Fütterung in 3 l Wasser gelöst und die Lösung mit einer Gießkanne über das Stroh gegossen.

Die für die weiteren Untersuchungen verwendeten drei Jersey-Ochsen wurden mindestens eine Woche vor der Pansensaftentnahme mit einer Ration aus 7 kg Heu und 500 g Konzentratfutter (6,4 MJ NEL, 20 % XP, Fa. HEMO, Scheden) pro Tag gefüttert.

3.2.2 Pansensaftentnahme

Die Pansensaftentnahme erfolgte immer vor der Morgenfütterung, d.h. entweder 16 Stunden oder bei längerer Nüchternungsdauer 24 Stunden nach der letzten Futteraufnahme.

Der Pansensaft wurde mit Hilfe einer 35 cm langen, starren Metallsonde, an deren vorderen Ende auf einer Länge von 5 cm 3 mm große Löcher gebohrt waren, aus dem ventralen Pansensack entnommen. Dazu wurde das zweite Ende des Rohres über einen Schlauch mit einer Saugflasche, in der über einen Druckball ein leichter Unterdruck erzeugt wurde, verbunden. Zur weitgehendsten Eliminierung von Sauerstoff aus dem System wurde das Auffanggefäß vor der Pansensaftentnahme 10 Minuten lang entweder mit N₂ oder mit CO₂ begast, wodurch anaerobe Bedingungen geschaffen werden konnten.

3.2.3 Defaunierung des Pansensaftes

Zur Defaunierung des Pansensaftes diente das Detergens Synperonic (VEIRA ET AL. 1983, KREUZER und KIRCHGEßNER 1986). Die sonst für industrielle Zwecke verwendete Substanz (Wirkstoff: Natrium-lauryl-diethoxy-Sulfat, Fa. Deutsche ICI, Frankfurt a. M., D) wurde in einer Konzentration von 0,25 % (v/v) direkt zum Inokulum gegeben. Die anschließende lichtmikroskopische Überprüfung ergab, daß schon wenige Minuten nach der Behandlung keine Protozoen mehr im Pansensaft zu erkennen waren. Die Inkubation des defaunierten Pansensaftes erfolgte kurz nach Zugabe des Detergens und immer zeitgleich mit der Inkubation des nicht defaunierten Inokulums.

3.2.4 Gewinnung der Bakteriensuspension

Die Gewinnung der Bakteriensuspension wurde nach DE GRAEVE ET AL. (1994) durchgeführt. Hierzu wurde direkt nach der Schlachtung von fünf Schweinen der komplette Blinddarm (Caecum) und die erste Hälfte des Grimmdarms (Colon) entnommen, abgebunden und in verschlossenen Eimern ins Labor transportiert. Dann wurden unter N₂-Begasung die jeweiligen Caecum- und Colonabschnitte entleert und getrennt nach Darmabschnitten in zwei Eimern vereint.

Während der Probenaufbereitung wurden alle Gefäße mit Stickstoff begast. Von dem Blinddarminhalt wurden 200 ml und vom Colon 800 ml entnommen und in einem großen Glasgefäß mit 1500 ml harnstofffreiem Phosphatpuffer (s. batch-culture-Methode) gemischt. Die dickflüssige Masse wurde mit einem Magnetrührer und durch Einleitung von N₂ 10 Minuten homogenisiert. Mit Hilfe einer Gaze (Nylon, ca. 1 mm Maschenweite) wurden anschließend die groben Bestandteile abgetrennt und dabei die Flüssigkeit in Zentrifugengefäße (Kunststoff, 200 ml) überführt.

Um gröbere Bestandteile zu entfernen, wurde die Suspension zunächst 5 Minuten bei 4 °C und 500 g zentrifugiert (Minifuge RF, Fa. Heraeus Sepatech, D). Anschließend wurden die Bakterien in einer Ultrazentrifuge (Sorvall RC-5C Refrigerated Superspeed Zentrifuge, Fa. Du Pont Instruments) bei 4 °C und 27000 g 20 Minuten lang abgetrennt. Der Überstand wurde verworfen, das Bakterienpellet mit 100 ml Phosphatpuffer (Na₂HPO₄ und NaH₂PO₄ je 50 mmol/l und NaHCO₃ 75 mmol/l) im Zentrifugenbecher aufgenommen und mit Hilfe eines Glasstabes von der Gefäßwand abgelöst. Die Suspension wurde in einem Meßzylinder (100 ml) mit einer passenden Glaspistill homogenisiert und dann erneut bei 4 °C und 27000 g 20 Minuten zentrifugiert. Insgesamt wurden die Bakterien dreimal mit Puffer aufgenommen und gereinigt. Der Überstand aus dem letzten Spülvorgang wurde verworfen, das verbliebene Pellet gewogen und mit der 3 fachen Menge (w/v) eines mit 98 % NaH¹³CO₃ angereicherten Phosphatpuffers (Molarität s. o.) versetzt. Die Mischung wurde anschließend, wie bereits beschrieben, homogenisiert und 10 ml dieser Suspension dienten als Inokulum für die Inkubationsgefäße.

3.2.5 batch-culture-Methode

Das Prinzip der hier verwendeten batch-culture-Methode beruht auf der Inkubation eines Substrates mit Pansensaft und einem mit CO₂ gesättigten Puffer. Die sich während der Inkubation bildenden Endprodukte, Gas und SCFA, reichern sich im Inkubationsgefäß (Abb. 3) an und können am Ende der Inkubationszeit quantitativ bestimmt werden. Damit ist die batch-culture ein geschlossenes, nicht kontinuierliches in-vitro-Verfahren (statische Kultur) zur Untersuchung der fermentativen Umsetzungen pansenstämmiger Mikroorganismen.

Bei dem in dieser Untersuchung verwendeten System wurden Pansensaft und Puffer im Verhältnis 1 : 5 mit dem Substrat in einem 200 ml Erlenmeyerkolben, mit Septum und Glashahn, gemischt und bei 39 °C im Schüttelwasserbad 24 h inkubiert. Die Fermentation wurde mit 10 N H₂SO₄ gestoppt und anschließend konnten die Parameter der Fermentation gemessen werden (VAN NEVEL und DEMEYER 1992).

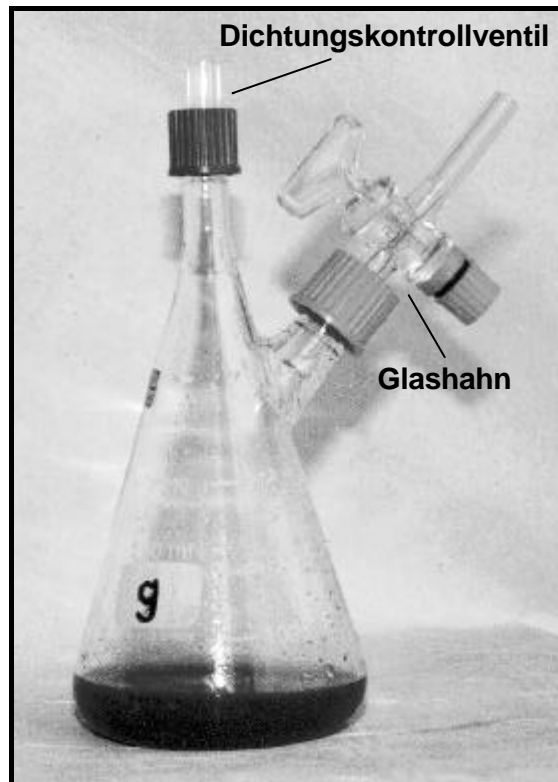


Abb. 3: Inkubationsgefäß für batch-culture.

Die in dieser Arbeit vorgestellten batch-culture-Untersuchungen umfaßten die folgenden Arbeitsschritte:

1. 10 % igen Burroughs-Puffer herstellen (BURROUGHS ET AL. 1950): zu 100 ml Lösung 1 10 ml Lösung 2 geben und diese Mischung mit H₂O auf 1000 ml auffüllen. Lösung 1 und 2 haben folgende Zusammensetzung:

Lösung 1:

Na ₂ HPO ₄ * 12 H ₂ O	26,25 g
NaHCO ₃	26,25 g
KCl	3,75 g
NaCl	3,75 g
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	1,13 g

ad 1000 ml H₂O

Lösung 2:

CaCl ₂ * 6 H ₂ O	3,8 g
FeSO ₄ * 7 H ₂ O	0,8 g
MnSO ₄ * H ₂ O	0,3 g
ZnSO ₄ * 7 H ₂ O	0,4 g
CuSO ₄ * 5 H ₂ O	0,2 g
CoCl ₂ * 6 H ₂ O	0,1 g

ad 1000 ml H₂O

Dem Puffer zur Sicherstellung der von den Mikroorganismen zur mikrobiellen Proteinsynthese benötigten Stickstoffmengen 1,4 g NH₄HCO₃ / l Puffer zusetzen. Zur weitgehenden Eliminierung des Sauerstoffs aus der Pufferlösung Puffer unter Vakuum 15 Minuten kalt sieden und anschließend 90 Minuten mit CO₂ begasen.

2. Substrat in Inkubationsgefäße einwiegen: je nach Versuchsansatz entweder 500 mg Heu, 500 mg Stroh oder 500 mg autoklavierten Blinddarminhalt. Alle in-vitro-Substrate zuvor lufttrocken mahlen (Siebgröße 1 mm; Zusammensetzung der in-vitro-Substrate siehe Tab. 2).
3. Inkubationsgefäße ins Wasserbad (39°C) stellen und kontinuierlich über Begasungsrechen mit CO₂ begasen.
4. In jedes Inkubationsgefäß 40 ml Burroughs-Puffer pipettieren.
5. Pansensaft entnehmen und 10 ml unter CO₂-Begasung in jedes Inkubationsgefäß einpipettieren.
6. Inkubationsgefäße verschließen, 6 mal abwechselnd evakuieren und mit CO₂ begasen.
7. Nach letzter Begasung eventuellen CO₂-Überdruck ablassen und Inkubationsgefäße mit Glashahn schließen. Bei Ansätzen mit einer Mischung in der Gasatmosphäre die den Evakuierungsstufen entsprechende Gasmenge des 1. Gases mit Kolbenprober entnehmen und anschließend gleiche Menge des 2. Gases zugeben.
8. Wassersäule in Dichtungskontrollventilen der Septen herstellen, Deckel des Wasserbades schließen und Schüttelvorrichtung des Wasserbades in Gang setzen (ca. eine Bewegung pro Sekunde).
9. Pansensaft zur pH-Messung und Bestimmung der flüchtigen Fettsäuren (SCFA) im Inokulum entnehmen und entsprechend aufbereiten.
10. Nach 24 Stunden Fermentation durch Injektion von 1 ml 10 N H₂SO₄ stoppen.

Tab. 2: Inhaltsstoffe der verwendeten in-vitro-Substrate.

in-vitro-Substrat	% FM		% TM								
	TM	XA	XL	XP	XF	NDF	ADF	Lignin	Cellulose	Hemicell.	org. Rest
Stroh	95,50	4,62	0,98	1,72	47,53	80,58	53,35	7,56	45,79	27,23	12,10
Heu	95,65	7,15	1,52	10,03	30,17	58,66	34,26	3,16	31,10	24,40	22,64
Blinddarminhalt	87,86	18,55	6,95	17,44	16,37	46,05	21,52	5,71	15,81	24,53	11,01

Nach Ende der Inkubationen konnten die Proben mit einer verschließbaren, gasdichten 1 ml Spritze (Nr. 050033, Fa. Alltech, Unterhaching) durch das Septum an der oberen Öffnung des Inkubationsgefäßes für die Gasanalysen entnommen werden. Nach Abschluß der Gasanalyse wurde das Gefäß geöffnet und der flüssige Inhalt zur Messung der SCFA verwendet.

Der Einsatz von ^{13}C - CO_2 als Marker erfolgte gleichzeitig sowohl über ^{13}C - CO_2 in der Gasphase als auch durch zu 98 % mit ^{13}C angereichertem $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ (Fa. Deutero, Kastellaun) im Puffer.

Das ^{13}C - CO_2 in der Gasphase wurde durch Austreiben von $^{13}\text{CO}_2$ aus $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ erhalten. Dazu wurden 250 mg $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ in 10 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ gelöst und in einen mit einem Dreiwegehahn versehenen 100 ml Kolbenprober blasenfrei aufgezogen. Eine Öffnung des Dreiwegehahns war mit einem Septum (Nr. Z12433-8, Fa. Aldrich, Steinheim) versehen, durch das mit Hilfe einer 5 ml Einwegspritze mit Kanüle 1 ml 10 N H_2SO_4 in den Kolbenprober injiziert wurde. Auf diese Weise wurde das $^{13}\text{CO}_2$ nahezu vollständig aus der Lösung ausgetrieben und konnte dann, wie oben beschrieben, aus dem Kolbenprober in die Inkubationsgefäße überführt werden.

Als Puffer wurde bei den batch-culture-Ansätzen mit ^{13}C - CO_2 -Markierung ein von DE GRAEVE ET AL. (1994) beschriebener Phosphatpuffer verwendet. Dieser Puffer enthielt 50 mmol/l Na_2HPO_4 , die gleiche Konzentration NaH_2PO_4 , 3,75 mmol/l Harnstoff und 75 mmol/l $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$. Wie oben beschrieben, wurde der Puffer kalt gesiedet und mit N_2 begast. Der pH-Wert des Puffer lag bei 6,9.

3.2.6 Pansensimulationstechnik (RUSITEC)

Das RUSITEC-System wurde von CZERKAWSKI und BRECKENRIDGE (1977) als eine semi-kontinuierliche, offene Langzeit-in-vitro-Methode zur Simulation des mikrobiellen Stoffwechsels pansenstämmiger Mikroorganismen entwickelt (CZERKAWSKI 1986, CHENG und MCALLISTER 1997). Das System ermöglicht die Untersuchung auch extremer Fütterungssituationen, ohne dabei das Wirtstier zu belasten. Das Kernstück der Apparatur sind die Fermenter, die kontinuierlich mit Puffer versorgt werden. Ein Überlauf ermöglicht die getrennte Sammlung von Gas und flüssigem Fermenterinhalt. Jeder der insgesamt 6 Fermenter wird einmal täglich geöffnet, um in Nylonbeuteln abgefülltes Substrat hineinzugeben und das bereits fermentierte Substrat entnehmen zu können.

Das für den hier vorgestellten Versuch verwendete Simulationssystem ist in Abbildung 4 schematisch dargestellt, die technischen Daten des Geräts können der Legende entnommen werden.

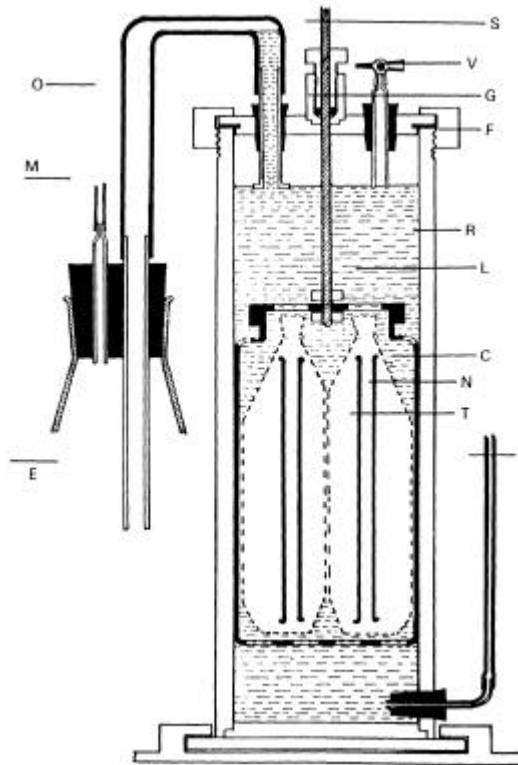


Abb. 4: Schematischer Aufbau eines RUSITEC-Fermenters (CZERKAWSKI und BRECKENRIDGE 1977)

- C perforierter Innenbehälter
- E Überlaufgefäß, Volumen 750 ml
- F Schraubverschluß des Fermenters
- G geschraubte Dichtung (gasdicht)
- I Pufferzulaufschlauch, verbunden mit Walzenpumpe (Typ IPS-8, Fa. ISMATEC, Zürich, CH), eingestellte Förderleistung 700 ml / Tag
- L Gemisch aus Pansenflüssigkeit und Puffer
- M Verbindungsschlauch zu Gassammelbeutel TECOBAG mit Zapfhahn, Volumen 5 l (Fa. Tesseraux, Bürstadt)
- N Kunststoffrohr zur Aufrichtung der Nylonbeutel (hier nicht verwendet)
- O gasdichter Überlaufschlauch
- R Fermenter, Plexiglas mit Schraubdeckel und Gummidichtung, Volumen 1080 ml
- S Hubstange (8 Hübe à 7 cm pro Minute)
- T Nylonbeutel (40 µm Maschenweite) mit Substrat
- V Dreiwege-Probeentnahmehahn

Der in dieser Arbeit vorgestellte RUSITEC-Versuch wurde nach folgendem täglichem Ablauf durchgeführt:

1. Tag:

- (1) 85 g festen Panseninhalt in Nylonbeutel einwiegen (Maschenweite 100 μm).
- (2) 690 ml Pansensaft in Fermenter füllen.
- (3) Beutel mit festem Panseninhalt und Beutel mit Substrat (8 g Heu, 4 g Gerste, 0,15 g Mineralfutter) in perforierten Innenbehälter des Fermenters geben (Maschenweite 40 μm).
- (4) Innenbehälter in den Fermenter einführen.
- (5) Fermenter mit vorbereitetem Burroughs-Puffer auffüllen und verschließen.
- (6) Im Fermenter befindliches Gas durch fünfmaliges kräftiges Herabdrücken des Innenbehälters entfernen.
- (7) Fermenter in das auf 39°C vorgeheizte Wasserbad stellen und Führungsstange des Innenbehälters an der Hubstange des RUSITEC-Apparatur festklemmen.
- (8) Pufferschlauch an Walzenpumpe und Überlaufschlauch an Überlaufflasche anschließen, in der sich 2 ml einer HgCl_2 Lösung (1,15 g HgCl_2 / 100 ml H_2O) zum Stoppen der Fermentation befinden.
- (9) Durch Probeentnahme des Fermenters System 2 Minuten mit Stickstoff spülen.
- (10) Nach Beendigung der Begasung Gassammelbeutel anschließen.
- (11) Vorgehen für Fermenter 2 und 3 wiederholen.
- (12) Aus jedem Fermenter am Probeentnahmehahn mit Hilfe einer 25 ml Einwegspritze Probe (10 ml) des flüssigen Fermenterinhalt zur Bestimmung des pH-Wertes, des Redoxpotentials und der Protozoenzahl entnehmen.

2. Tag:

- (1) Aus jedem der 3 Fermenter Probe (10 ml) zur pH-, Redoxpotential- und Protozoenzählung entnehmen.
- (2) Gasbeutel verschließen und vom Überlaufgefäß abnehmen.

- (3) Ersten Fermenter aus Wasserbad nehmen und öffnen. Beutel mit festem Panseninhalt aus Innenbehälter entnehmen und durch einen zweiten mit Substrat (8 g Heu, 4 g Gerste, 0,15 g Mineralfutter) gefüllten Beutel ersetzen (Maschenweite 40 µm).
- (4) Entnommener Beutel mit 60 ml vorgewärmtem Puffer im Plastikbeutel gleichmäßig spülen und anschließend auswringen, Spülflüssigkeit in den Fermenter geben, Beutelinhalt verwerfen.
- (5) Fermenter wieder verschließen und das in ihm befindliche Gas durch fünfmaliges kräftiges Herabdrücken des Innenbehälters entfernen.
- (6) Überlaufgefäß leeren, Flüssigkeitsmenge bestimmen und Probe zur Messung der SCFA entnehmen.
- (7) - (12) wie Schritt 7 bis 12 von Tag 1.

An allen weiteren Versuchstagen wurde so vorgegangen wie an Tag 2. Nach vier Tagen Vorlaufzeit, die das System benötigt, um sich auf steady-state-Bedingungen einzustellen, wurde Fermenter 1 weiter so behandelt wie zuvor. Den Fermentern 2 und 3 wurden ab dem 5. Tag über den Puffer 0,432 g (0,4 %) bzw. 0,648 g (0,6 %) Gallensalz (Nr. B-8756, Sigma Bile Salts) pro Tag zugeführt. Diese Menge ergibt sich aus der Überlegung, daß Galle zu ca. 10 % aus Gallensalzen besteht (KOLB 1989). ($1080 \text{ ml} * 0,004 * 0,10 = 0,432 \text{ g}$). Am siebten Versuchstag wurde aus jedem der drei Fermenter Inokulum für einen sich anschließenden batch-culture-Versuch entnommen und das RUSITEC System anschließend gestoppt.

3.3 Analytische Methoden

3.3.1 Messung von pH-Wert und Redoxpotential

Der **pH-Wert** des Pansensaftes und der flüssigen Phasen aus den in-vitro-Untersuchungen wurden mit einem pH-Meter (CG 811, Fa. Schott, Hofheim) mit pH-Einstabmeßkette gemessen. Die Meßapparatur wurde täglich mit Standardpufferlösungen auf pH 4 und pH 7 geeicht.

Das **Redoxpotential** bei den RUSITEC-Untersuchungen wurde mit einer Einstabmeßkette (PT-4805, Fa. Ingold) und einem daran angeschlossenen pH-Meter (CG 837, Fa. Schott, Hofheim) ermittelt. Die Eichung der Elektrode erfolgte täglich mit einer Redox-Pufferlösung (Nr. 209881250, Fa. Mettler Toledo, Steinbach, D).

3.3.2 Bestimmung der Protozoenzahl

Die Zählung der Protozoen erfolgte in Anlehnung an HARMeyer (1965). Es wurde 1 ml Probe aus dem RUSITEC-System bzw. dem Pansen mit 1 ml Protozoenlösung (Herstellung: 0,6 g Methylgrün, 8 g NaCl und 100 ml Formaldehyd (35 %ig) mit H₂O_{dest.} auf 1000 ml auffüllen) gemischt und bis zur Zählung in Dunkelheit gelagert. Die Zählung erfolgte mit einem Zeiss Lichtmikroskop bei einer 160 fachen Vergrößerung unter Verwendung eines Okulars mit Zählquadrat in einer modifizierten McMaster-Zählkammer (WETZEL 1951). Diese Zählkammer besitzt drei voneinander getrennte Kammern mit Seitenlängen von 20 mm * 18 mm. Vor der ersten Zählung wurde mit Hilfe eines Objektmikrometers die Seitenlänge des Zählquadrates bestimmt. Zusammen mit der Tiefe der Zählkammer konnte mit diesen Maßen das Volumen eines Zählquadrates errechnet werden (Gleichung 1):

(1)

Seitenlänge des Zählquadrates:	0,40	mm
<u>Tiefe der Zählkammer:</u>	<u>0,98</u>	<u>mm</u>
Volumen des Zählquadrates:	0,1568	mm ³

Um die Zahl der in einem Quadrat ausgezählten Protozoen auf einen Milliliter zu beziehen, mußte die Protozoenzahl demnach mit dem Faktor 6377,55 (= 1000 / 0,1568) multipliziert werden. Für die Bestimmung der Protozoenzahl einer Probe wurden die drei Kammern der Zählkammer möglichst blasenfrei mit Probenflüssigkeit gefüllt und mit je einem Deckgläschen abgedeckt. Anschließend wurden in jeder Kammer 40 Quadrate ausgezählt, wobei darauf geachtet wurde, die Quadrate möglichst gleichmäßig in der gesamten Kammer auszuwählen. Die Berechnung der Protozoen pro Milliliter Probe erfolgte nach Gleichung 2:

(2)

$$\text{Protozoen/ml Probe} = \frac{\text{Gesamtzahl der gezählten Protozoen} * \text{Faktor} * \text{Verdünnung}}{\text{Anzahl der gezählten Quadrate}}$$

3.3.3 Messung der Fermentationsgase

Die Bestimmung des **Gasvolumens** erfolgte bei den RUSITEC-Untersuchungen mit Hilfe eines 2000 ml Polyethylen-Meßzylinders, an dessen Unterseite eine Öffnung mit einem Dreiwegehahn angebracht worden war. Um das Gas quantitativ zu gewinnen, wurde dieser Hahn über einen Schlauch mit dem Gassammelbeutel verbunden. Nachdem der Meßzylinder durch Untertauchen in einer Wanne zunächst vollständig mit Wasser gefüllt worden war, konnte das Gas durch langsames Herausziehen des mit der Unterseite nach oben gehaltenen Zylinders durch den

Saugdruck des Wassers aus dem Beutel abgesaugt werden. Das Volumen des abgesaugten Gases wurde dann direkt an der Skala des Meßzylinders abgelesen. Die Errechnung dieser Gasvolumina in Mol erhält man durch Umformung der allgemeinen Gasgleichung ($p \cdot v = n \cdot R \cdot T$) (Gleichung 3):

(3)

$$n = \frac{p \cdot v}{R \cdot T} \left[\frac{\text{Pa} \cdot \text{m}^3}{\text{°K}} \right]$$

wobei

n = Molanzahl

p = Luftdruck in Pascal (Pa)

v = Gasvolumen in m³

R = universelle Gaskonstante 8,3143 J * K⁻¹ * mol⁻¹

T = Temperatur in Kelvin (°K)

In der batch-culture konnte das Gasvolumen durch Subtraktion des Flüssigkeitsvolumens vom Gefäßvolumen ermittelt werden. Dem Druckunterschied zwischen Gefäßinneren und der Atmosphäre wurde durch Verwendung einer verschließbaren Gasspritze (Nr. 050033, Fa. Alltech, Unterhaching) zur Probenentnahme Rechnung getragen.

Die **Gaszusammensetzung** wurde gaschromatographisch unter den folgenden Bedingungen bestimmt (Tab.3):

Tab. 3: Chromatographiebedingungen zur Bestimmung der Gaszusammensetzung des Fermentationsgases.

Gerät	Shimadzu GC 8A (Shimadzu Europa, Duisburg, D)
Detektor	Wärmeleitfähigkeitsdetektor (TCD)
Injektortemperatur	80 °C
Säulenofentemperatur	40 °C, isotherm
Detektortemperatur	80 °C
Detektorstrom	80 mA
Säule	Porapak Q (80 / 100) 3 m * 4 mm
Trärgas	Argon 40 ml / min (Einstellung: 180 kPa)
Probenmenge	1 ml, manuelle Injektion
Integrator	Schimadzu CR-1B

Die Signale des Wärmeleitfähigkeitsdetektors wurden durch einen Integrator (Shimadzu C-R 1B) in Form von Chromatogrammen aufgezeichnet. Die Flächen unter den Peaks wurden durch das Gerät berechnet und in der dimensionslosen Einheit Area ausgegeben.

Eine Eichung des Geräts erfolgte jeden Morgen nach Inbetriebnahme. Hierzu wurde dreimal 1 ml eines speziell hergestellten Eichgasgemisches (Messer Griesheim, Kassel, D) der Zusammensetzung

Kohlendioxid	65%
Methan	30%
Stickstoff	4%
Sauerstoff	1%

verwendet. Um die Stabilität des Systems zu überprüfen, wurde die Eichung am Ende jeder Meßreihe wiederholt.

Im Rahmen der Methodvalidierung wurden folgende Variationskoeffizienten ermittelt: Methan: 1,53 %, Kohlendioxid 1,41 % und Stickstoff 1,94 %. Die Linearität der Messung wurde anhand von Eichgeraden überprüft, die in Abbildung 5 dargestellt sind.

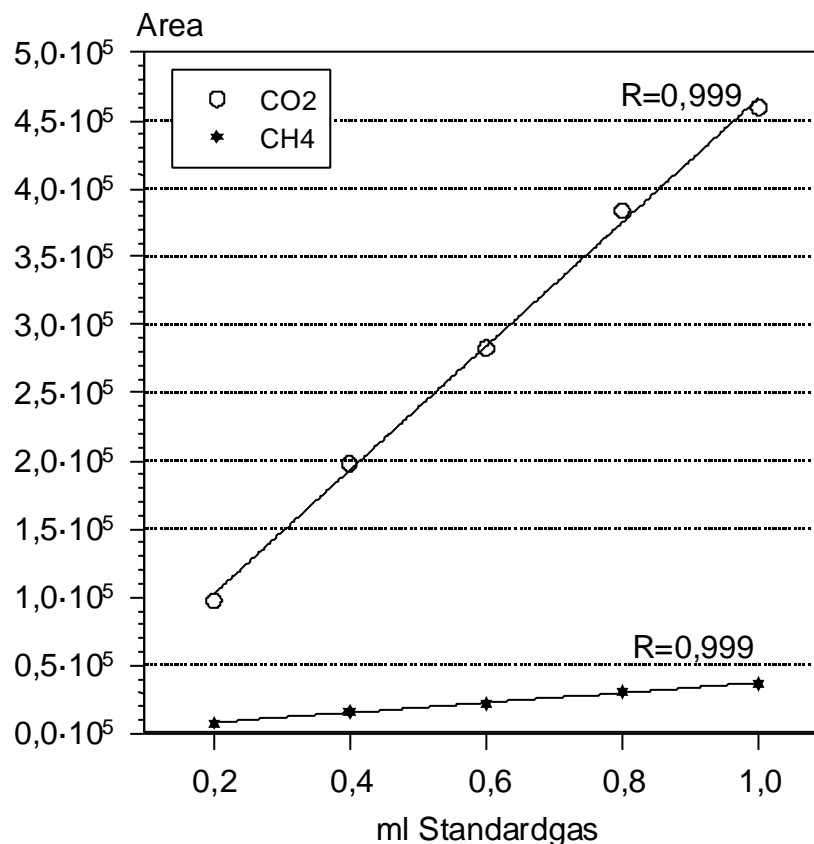


Abb. 5: Darstellung der Linearitätsüberprüfung der Gasanalysen nach GOTTWALD (1995)

3.3.4 Messung der flüchtigen Fettsäuren

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen der kurzkettigen flüchtigen Fettsäuren (SCFA) wurden zwei Verfahren angewandt. Die beiden Verfahren unterscheiden sich hinsichtlich der gaschromatographischen Bedingungen (Tab. 4 und 5) und der Tatsache, daß die Auswertung der Chromatogramme bei Verfahren 1 nach der Methode des externen Standards und bei Verfahren 2 nach der Methode des internen Standards durchgeführt wurde. Das Verfahren 1 wurde für die Untersuchungen in Versuchsstufe 1 und das Verfahren 2 für diejenigen der Versuchsstufe 2 verwandt.

Tab. 4: Chromatographiebedingungen zur Bestimmung der kurzkettigen flüchtigen Fettsäuren (SCFA) nach Verfahren 1.

Gerät	Shimadzu GC 14B (Shimadzu Europa, Duisburg, D)
Detektor	Flammenionisationsdetektor (FID)
Injektortemperatur	260 °C
Säulenofentemperatur	Temperaturprogramm 5 min 5 °C, Heizrate 8 °C / min, Endtemperatur 190 °C, 1 min
Detektortemperatur	280 °C
Säule	Kapillarsäule
Säulenfüllung	Permabond, FFAP-DF-0,25, 25 m * 0,25 mm ID
Trägergas	Stickstoff 5.0, 1,5 kg / cm ²
Probenmenge	1 µl, manuelle Injektion, 10 µl Hamilton Spritze
Integrator	Shimadzu

Die Berechnung der Konzentrationen der einzelnen flüchtigen Fettsäuren erfolgte dabei durch den Vergleich der Peakflächen der Standardsubstanzen mit den Peakflächen der Probe. Die Zusammensetzung des Standardgemisches kann Tabelle 6 entnommen werden kann. Bei Verfahren 2 wurden die Konzentrationsberechnungen durch den Korrekturfaktor der Methode des internen Standards erweitert. Dabei wurde zu Beginn einer jeden Meßreihe in den drei Kalibrierungsanalysen des Standardgemischs nach folgender Gleichung (4) ein Korrekturfaktor errechnet (ISTD=interner Standard):

(4)

$$\text{Korrekturfaktor} = \frac{\text{Area ISTD} * \text{mol Substanz}}{\text{Area Subst.} * \text{mol ISTD.}}$$

Tab. 5: Chromatographiebedingungen zur Bestimmung der kurzkettigen flüchtigen Fettsäuren (Verfahren 2).

Gerät	Shimadzu GC 14B (Shimadzu Europa, Duisburg, D)
Detektor	Flammenionisationsdetektor (FID)
Injektortemperatur	200 °C
Säulenofentemperatur	120 °C, isotherm
Detektortemperatur	200 °C
Synthetische Luft	50 kPa
Säule	Gepackte Glassäule, 2,1m, Shimadzu (221-143668-21)
Säulenfüllung	10 % Carbowax 20 MTPA SP1000 mit 1 % H ₃ PO ₄ auf Chromosorb WAW, 80 / 100
Trägergas	Wasserstoff 5,0, 100 ml / min (Einstellung: 100 kPa) Das Trägergas wurde gleichzeitig als Brenngas für den FID verwendet!
Probenmenge	1 µl
Probenaufbereitung	5 ml zentrifugierte Probe + 250 µl Ameisensäure (mit 4% 2 Methylvaleriansäure) + 750 µl Metaphosphorsäure
Integrator	Merk D-2000 (Fa. Merk, Darmstadt, D)

Tab. 6: Berechnungsgrundlage zur Herstellung eines SCFA Standardgemischs.

Säure	mmol / 250 ml Standard	µmol / ml Standard	g / mol	Gehalt (%)	g / ml	µl / 250 ml Standard
Essigsäure	7,50	30,000	60,05	99,5	1,050	430
Propionsäure	5,00	20,000	74,08	99,0	0,990	378
iso Buttersäure	0,25	1,000	88,11	98,0	0,947	24
n-Buttersäure	2,50	10,000	88,11	99,0	0,958	232
iso-Valeriansäure	0,50	2,000	102,13	98,0	0,925	56
n-Valeriansäure	0,75	3,000	102,13	99,0	0,938	82
2-Methylvaleriansäure	3,89	15,557	116,16	98,0	0,922	500

Die tatsächliche Menge an Substanz (Subst.) in der Probe konnte dann mit den Daten aus den Analysen nach Gleichung 5 berechnet werden (KAISER 1965, MERK 1987).

(5)

$$\text{Subst. in der Probe} = \frac{\text{Korrekturfaktor} \cdot \text{Area Substanz}}{\text{Area ISTD}}$$

Dabei steht *Area* für die Peakfläche, *Substanz* für die zu berechnende Probensubstanz (z.B. Essigsäure) und *ISTD* für den internen Standard (2- Methylvaleriansäure).

Die Zuverlässigkeit der Messung wurde anhand einer Überprüfung der Linearität (Abb. 6) und durch die Bestimmung der Variationskoeffizienten (Tab. 7) ermittelt. In Abbildung 6 wird eine Meßungenauigkeit bei Verdünnungsstufe 8/ 12 deutlich, die durch ein undichtiges Septum erklärt werden konnte. Trotz dieses Meßfehlers war der Korrelationskoeffizient bei allen untersuchten Komponenten größer 0,997. Die Linearität der Messung wurde damit als hinreichend gut angenommen.

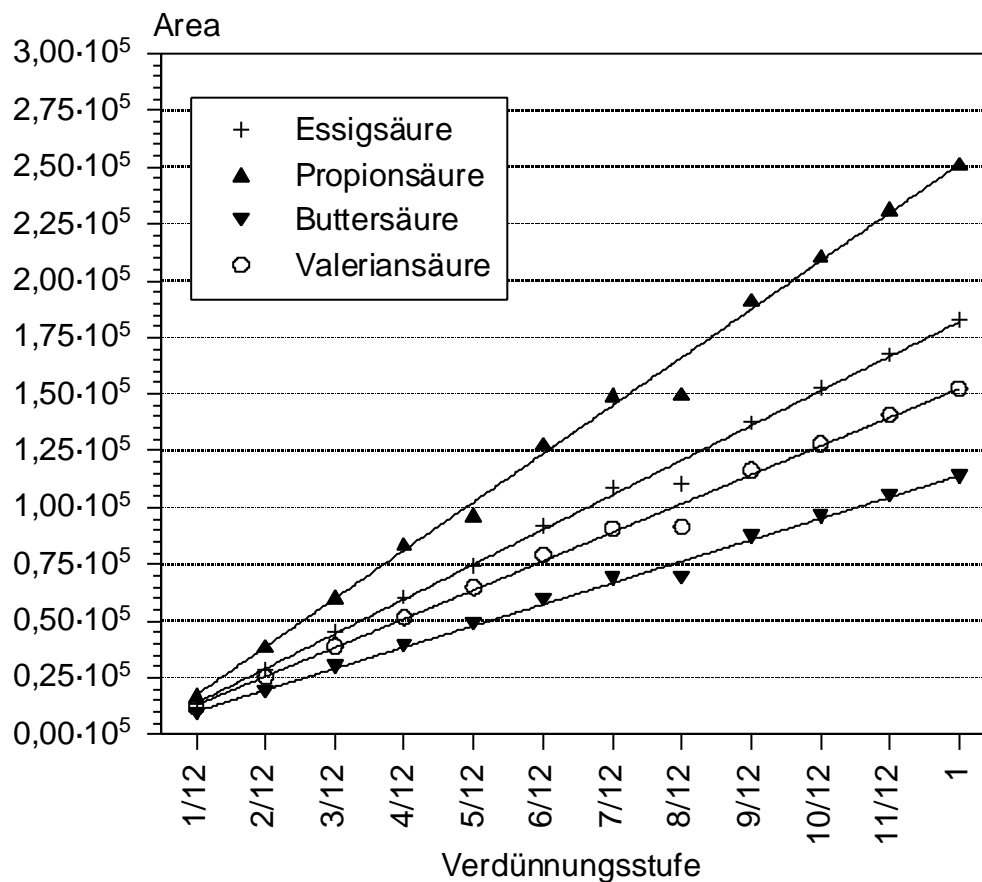


Abb. 6: Darstellung der Linearitätsüberprüfung nach GOTTWALD (1995)

Tab. 7: Variationskoeffizienten wiederholter Messungen, bestimmt nach GOTTWALD (1995).

Säure	Variationskoeffizienten
	%
Essigsäure	1,3
Propionsäure	2,5
Buttersäure	4,9
Valeriansäure	3,15

3.3.5. Berechnung der Wasserstoffwiederfindung

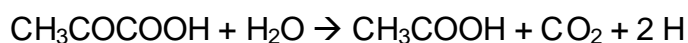
In der vorliegenden Arbeit diene eine besonders niedrige Rate der in Prozent angegebenen Wasserstoffwiederfindung als indirekter Nachweis für die reduktive Acetogenese. Bei der Berechnung der Wasserstoffwiederfindung oder auch Wasserstoffbilanz (WOLIN 1960) geht man davon aus, daß die in den anaeroben Oxidationsprozessen freigesetzten Elektronen zusammen mit Wasserstoffprotonen übertragen werden. Dabei stellt ein Molekül H₂ zwei mit je einem Elektron reduzierte Wasserstoffprotonen dar. Da durch den bei der Fermentation der Kohlenhydrate gebildeten Wasserstoff die Fermentation im Pansen gehemmt wird, muß der Wasserstoffpartialdruck durch die Bildung der reduzierten Endprodukte Methan, Propionsäure und Buttersäure niedrig gehalten werden. Stellt man die Menge des bei der Kohlenhydratfermentation freigesetzten Wasserstoffs der Menge des verbrauchten Wasserstoffs gegenüber, so erhält man die Rate der Wasserstoffwiederfindung (WOLIN 1960, DEMEYER und DE GRAEVE 1991):

Die molaren Mengen des aus einem Mol Glucose freigesetzten H₂ können den folgenden Reaktionsgleichungen (6) entnommen werden:

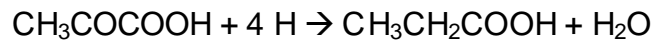
Bei der Fermentation von einem Mol Glucose (C₆H₁₂O₆) zu 2 Mol Pyruvat (CH₃COCOOH) werden 2 H pro mol Pyruvat freigesetzt:



Beim weiteren Abbau von 1 Mol Pyruvat zu 1 Mol Essigsäure (CH₃COOH) werden 2 H Wasserstoff produziert. Im Ganzen sind damit 4 H pro Mol Essigsäure freigesetzt worden:



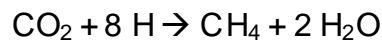
Durch die Umsetzung von 1 Mol Pyruvat zu 1 Mol Propionsäure ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$) werden 2 H verbraucht und 2 H reduzieren ein Mol Sauerstoff zu Wasser. Durch den Abbau von $\frac{1}{2}$ Mol Glucose zu 1 Mol Pyruvat waren vorher aber auch 2 H entstanden:



1 Mol Buttersäure ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$) werden aus 2 Mol Essigsäure gebildet. Dabei werden 1 Mol Sauerstoff mit 2 H zu Wasser reduziert. Bei der vorhergehenden Essigsäureentstehung wurden jedoch pro Mol Buttersäure 8 H freigesetzt.



Bei der Entstehung von Methan (CH_4) werden 4 H im Methan und 4 weitere Wasserstoffatome in Form von Wasser gebunden:



Wenn die molaren Mengen der entstandenen Fermentationsprodukte Essigsäure (E), Propionsäure (P), Buttersäure (B) und Methan (M) vorliegen, können damit die unter normalen Bedingungen entstandenen bzw. verbrauchten Wasserstoffmengen bestimmt werden.

Der freigesetzte Wasserstoff ($H_p = H_{\text{produced}}$) kann dabei nach Gleichung 7,

$$H_p = 2 * E + P + 4 * B \quad (7)$$

der verbrauchte Wasserstoff ($H_u = H_{\text{used}}$) nach Gleichung 8

$$H_u = 2 * P + 2 * B + 4 * M \quad (8)$$

berechnet werden.

Aus dem Quotienten (Gleichung 9)

$$\frac{H_u * 100}{H_p} = \text{Wasserstoffwiederfindung \%} \quad (9)$$

wird dann die Wasserstoffwiederfindung in Prozent bestimmt. Werte im Bereich von 80 – 98 % sind dabei als normal anzusehen. Wasserstoffwiederfindungsraten von weniger als 80 % geben dagegen einen Hinweis auf alternative Wasserstoffsenken.

3.3.6 ¹³C-Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Mit Hilfe der ¹³C-NMR (Nuclear Mass Resonance) Spektroskopie kann die ¹³C-CO₂-Anreicherung einzelner Substanzen in einer Probe gemessen werden. Darüber hinaus ist es möglich, die Position des markierten Kohlenstoffs in den einzelnen Molekülen zu bestimmen. Vor allem diese Möglichkeit war für die Anwendung der ¹³C-NMR Spektroskopie in der vorliegenden Arbeit ausschlaggebend.

Um mit Hilfe der NMR Spektroskopie die ¹³C-CO₂-Anreicherung zu messen, ist eine Konzentration von mindestens 10 µg ¹³C in der Probe notwendig. Da diese Menge in den unbehandelten batch-culture-Proben nicht erreicht wurden, mußten die Proben aufkonzentriert werden. Dazu wurde die Flüssigkeit der Inkubationsgefäße zunächst mit 5 N NaOH auf einen pH-Wert von ca. 9,5 gebracht, um die Fettsäuren in Salze zu überführen. Die stark alkalische Flüssigkeit wurde 10 Minuten bei 5500 g zentrifugiert, bevor der Überstand im Rotationsverdampfer (Typ SB, Fa. Büchi, Flawi, Schweiz) eingeeengt wurde.

Von den so behandelten Proben wurden 390 µl in NMR-Röhrchen überführt und mit D₂O auf 500 µl aufgefüllt. Als interner Standard wurden 50 µl Dioxan zugegeben. Die ¹³C-NMR Spektren wurden im Institut für Organische Chemie der Georg-August-Universität Göttingen an einem Spektrometer (Varian I 500, 125,7 MHz) bei einer Temperatur von 30 °C und einer Meßdauer von 9 Stunden analysiert. Die chemische Verschiebung wird in σ-Werten relativ zu Tetramethylsilan angegeben (HESSE ET AL. 1987).

3.4 **Statistische Auswertung**

Das Datenmaterial aus dem balancierten vierfaktoriellen batch-culture-Versuch wurde zunächst mit Hilfe des Statistikprogramms STATISTICA (Version 5.1, Fa. StatSoft Tulsa, OK, USA / Hamburg) auf Normalverteilung und Varianzhomogenität überprüft. Dabei zeigte sich, daß die Ursprungsdaten weder normalverteilt waren, noch die Bedingungen der Varianzhomogenität erfüllten. Um diese beiden Grundvoraussetzungen für eine Varianzanalyse zu schaffen, wurde in STATISTICA mit einer Box-Cox-Transformations-Prozedur die Quadratwurzel als geeignete Transformation für das vorliegende Datenmaterial ermittelt (NETER ET AL. 1996). Die transformierten Daten erfüllten bei erneuter Prüfung auf Normalverteilung und Varianzhomogenität die erforderlichen Bedingungen. Im Anschluß an die statistischen Berechnungen wurden die ermittelten Mittelwerte durch Quadrieren wieder zurücktransformiert. Diese Vorgehensweise führte dazu, daß die in der Arbeit angegebenen Mittelwerte nicht dem arithmetischen Mittel der Originaldaten entsprechen (Anhang 15 und 16).

Da sich der Versuchstag signifikant auf die untersuchten Parameter auswirkte, wurde dieser als zufälliger Effekt in das Varianzmodell aufgenommen. Es ergab sich somit ein gemischtes Varianzmodell mit den festen Effekten aus Ration (RAT), Nüchterungsdauer (NUE) und in-vitro-Substrat (SUB) sowie dem zufälligen Effekt Versuchstag (TAG). Dieses Modell galt sowohl für die Versuchsreihe mit Protozoen als auch für die ohne Protozoen. Die Modellschätzungen wurden mit der Prozedur MIXED des SAS Systems (Version 6.12) durchgeführt. Nach LITTELL ET AL. (1996) ist diese Prozedur bei gemischten Modellen der Prozedur PROC GLM vorzuziehen.

Die Signifikanz einzelner Effekte wurde mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,5 \%$ überprüft. Zur Einhaltung der tatsächlichen Irrtumswahrscheinlichkeit auf dem vorbestimmten Niveau wurden Multiple Mittelwertsvergleiche auf der Grundlage des Tukey-Kramer-Verfahrens durchgeführt.

Ergebnisse, die in Experimenten mit $^{13}\text{C-CO}_2$ -Marker ermittelt wurden, konnten aufgrund des geringen Stichprobenumfangs nicht auf Normalverteilung untersucht werden. Die Auswertung der Versuche erfolgte nach dem folgenden allgemeinen Varianzmodell (Gleichung 10):

$$Y_{ij} = \mu + \text{FAKTOR } 1_i + e_{ij} \quad (10)$$

wobei

Y_{ij}	= Beobachtungswert des Merkmals
μ	= Gesamtmittel
FAKTOR 1_i	= Effekt von Faktor 1
e_{ij}	= Restvarianz
ij	= Indizes für die jeweiligen Faktorstufen

Die Bezeichnung Faktor 1 steht hier als Variable für unterschiedliche Faktoren in den einzelnen Versuchen. Die Auswertung dieser einfaktoriellen Versuche wurde mit dem Statistikprogramm Statview (Statview Vers. 4.55, Abacus Concepts, Berkeley, Canada) vorgenommen. Dabei wurde zunächst im Rahmen der Varianzanalyse (ANOVA) zur Prüfung der Nullhypothese (H_0) ein F-Test durchgeführt. Das Kriterium für die Ablehnung von H_0 war $p < 0,05$. Bei abgelehnter H_0 wurde mit dem Grenzdifferenzen-Test nach Fischer (Fischers PLSD) geprüft, ob die Mittelwertsunterschiede zwischen den Faktorstufen signifikant waren. Die Grenze für die Signifikanz wurde dabei auf $p < 0,05$ festgelegt.

4 Versuchsergebnisse

4.1 batch-culture-Untersuchungen mit nicht defauniertem Pansensaft

Haupt- sowie Wechselwirkungen der Faktoren Ration, Nüchterungsdauer und in-vitro-Substrat auf die Parameter SCFA, Methan, Wasserstoffwiederfindungsrate und Methan/ SCFA-Verhältnis sind in Übersicht 5 dargestellt. In den nachfolgenden Abschnitten werden diese Effekte anhand der Versuchsergebnisse vorgestellt. Auf die Darstellung der Dreifachwechselwirkungen wurde hier verzichtet, da diese keine entscheidenden Informationen für die in der vorliegenden Arbeit zu beantwortenden Fragen lieferten. Die nach den Faktoren Ration, Nüchterungsdauer und in-vitro-Substrat aufgegliederten Versuchsergebnisse können dem Anhang entnommen werden.

Übersicht 5: Überblick über Haupt- und Wechselwirkungen der unabhängigen Faktoren auf die erhobenen Parameter bei nicht defauniertem Pansensaft, F-Test, * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), n.s. = nicht signifikant.

	n	SCFA	Acetat	Propionat	Butyrat	CH ₄	H _u /H _p	CH ₄ /SCFA
Ration (RAT)	54	**	**	**	**	**	**	**
Nüchterungsdauer (NUE)	54	**	**	**	n.s.	**	**	**
in-vitro-Substrat (SUB)	54	**	**	**	**	**	**	**
RAT * NUE	27	**	**	**	**	**	**	**
RAT * SUB	27	*	n.s.	**	n.s.	**	**	**
NUE * SUB	27	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*	n.s.	n.s.

4.1.1 Einfluß der Ration des Spendertieres

Die Fütterung des Spendertieres hatte auf alle gemessenen Parameter einen signifikanten Einfluß. Abbildung 7 zeigt Ergebnisse der batch-culture-Ansätze mit Pansensaft des mit Heu-Krafftutter- bzw. Stroh-Harnstoff gefütterten Spendertieres, gemittelt über die Faktoren Nüchterungsdauer und Substrat. Die Stroh-Harnstoff-Ration führte im Vergleich zur Heu-Krafftutter-Ration zu einer deutlichen Senkung der SCFA- sowie der Methanproduktion. Die Methanmenge verringerte sich dabei stärker als die SCFA-Summe. Dies zeigte sich auch in dem von 0,16 auf 0,13 signifikant verringerten Methan/ SCFA-Verhältnis (Anhang 1).

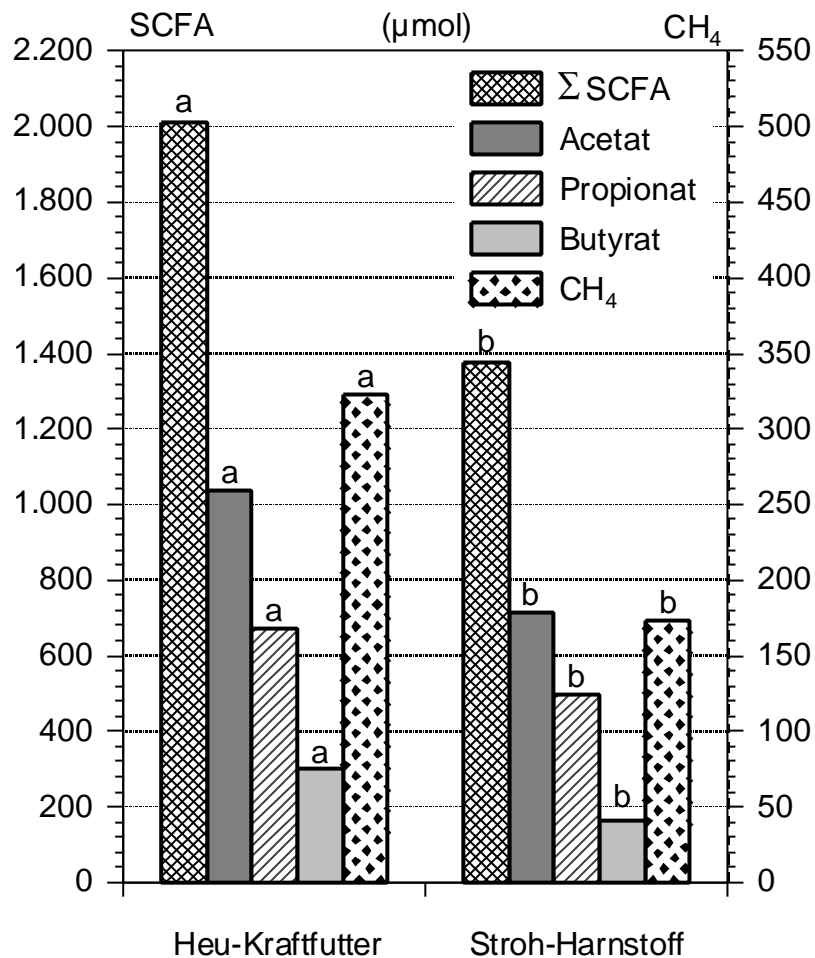


Abb. 7: Einfluß der Ration des Spendertieres auf die Bildung von SCFA und Methan in der batch-culture (n = 54). Unterschiedliche Buchstaben an Säulen mit gleichem Muster kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten, Tukey-Kramer mit $p < 0,05$.

4.1.2 Einfluß der Nüchternungsdauer des Spendertieres

Eine um 8 Stunden verlängerte Nüchternungsdauer des Spendertieres vor der Pansensaftentnahme führte, mit Ausnahme des Butyrats, zu einer signifikanten Verringerung der SCFA- sowie der Methanmengen (Abb. 8). Dabei verschob sich das Methan/ SCFA-Verhältnis signifikant von 0,15 auf 0,13. Demzufolge hatte die Nüchternungsdauer einen geringeren Einfluß auf die Fermentation als die Ration des Spendertieres (Anhang 1).

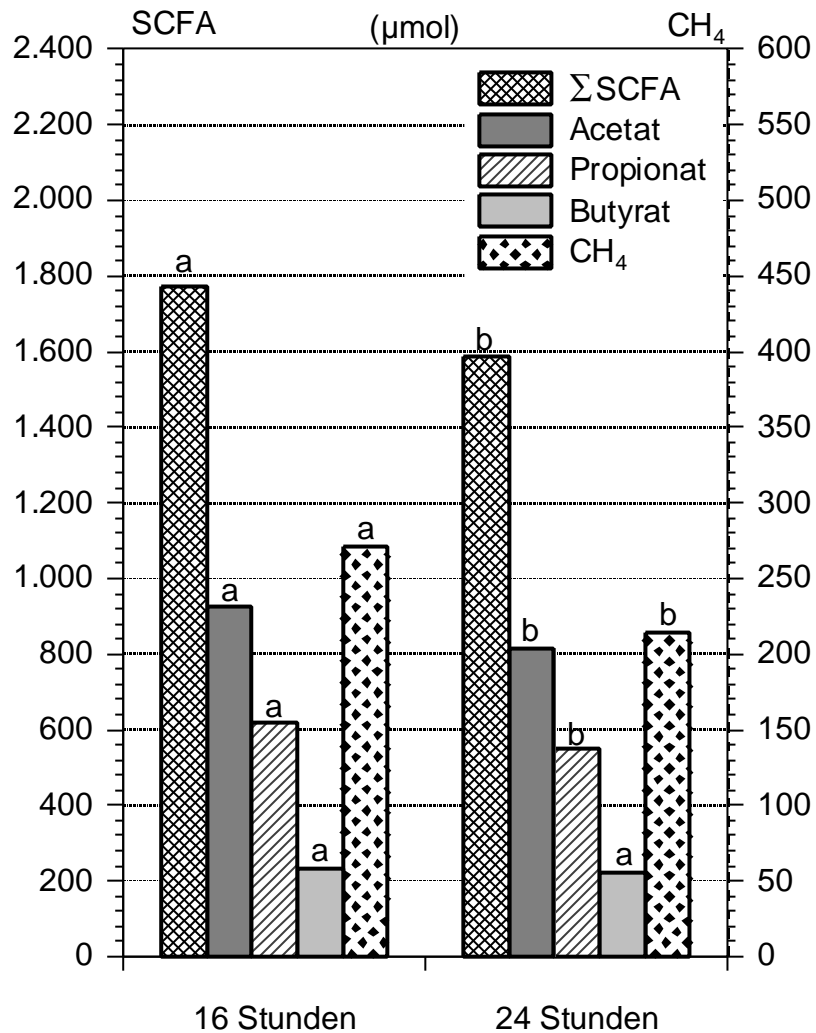


Abb. 8: Einfluß der Nüchterungsdauer des Spendertieres vor der Pansensaftentnahme auf die Bildung von SCFA und Methan in der batch-culture (n = 54). Unterschiedliche Buchstaben an Säulen mit gleichem Muster kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten, Tukey-Kramer mit $p < 0,05$.

4.1.3 Einfluß des in-vitro-Substrates

In Abbildung 9 sind die Mengen der einzelnen Fermentationsprodukte in Abhängigkeit der eingesetzten in-vitro-Substrate, gemittelt über Fraktion und Nüchterungsdauer, dargestellt. Es zeigte sich, mit Ausnahme des Butyrats, ein deutlich signifikanter Abfall der entstandenen Fermentationsprodukte von Heu über Stroh zu Blinddarminhalt. Besonders bemerkenswert war das signifikant niedrigere Methan/ SCFA-Verhältnis bei der Verwendung des in-vitro-Substrates Blinddarminhalt mit einem Wert von 0,09 (Anhang 1).

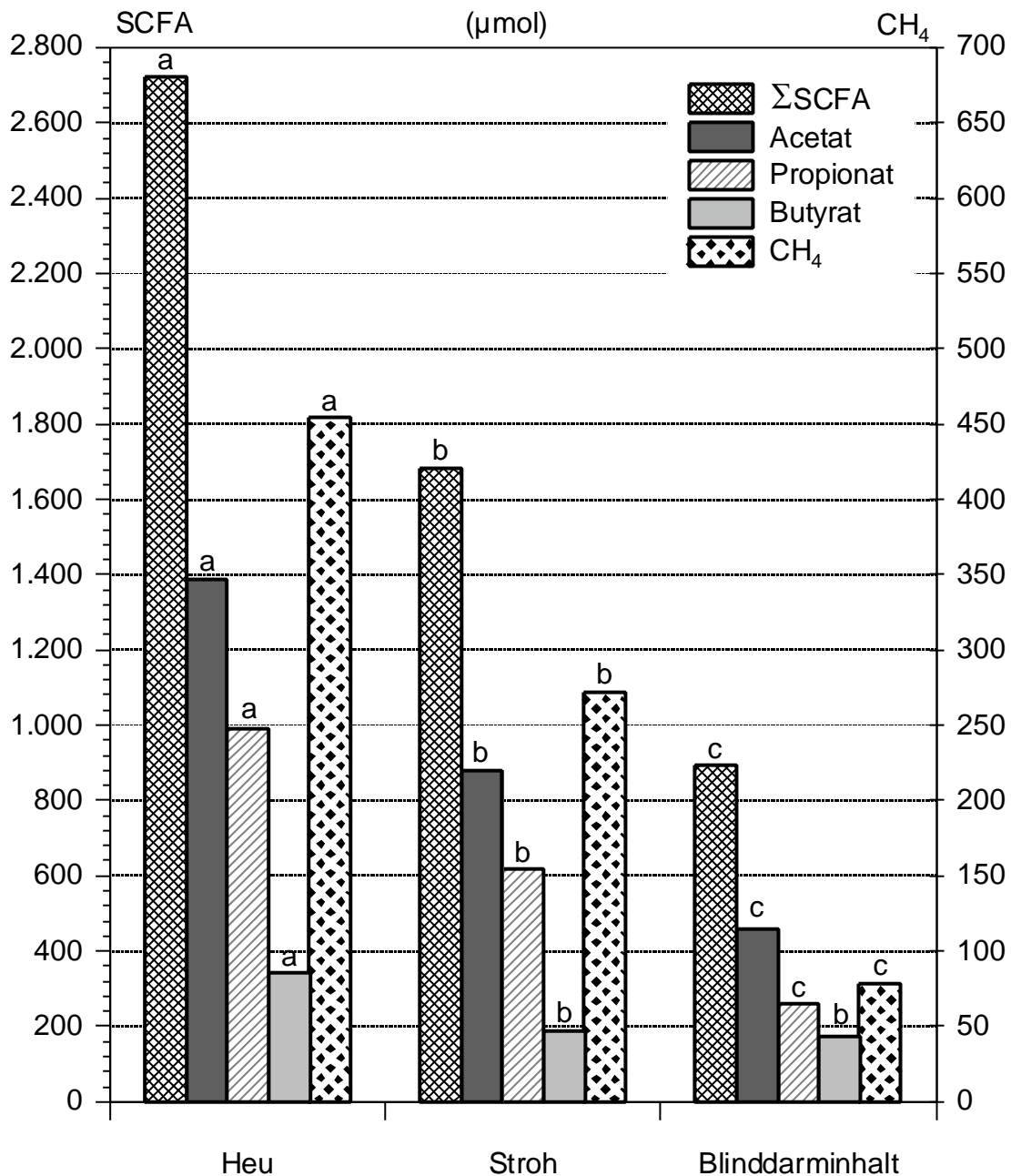


Abb. 9: Einfluß des in-vitro-Substrates auf die Bildung von SCFA und Methan in der batch-culture (n = 54). Unterschiedliche Buchstaben an Säulen mit gleichem Muster kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten, Tukey-Kramer mit $p < 0,05$.

4.1.4 Einfluß der Wechselwirkungen zwischen den Faktoren Ration, Nüchterungsdauer und in-vitro-Substrat

Tabelle 8 zeigt den Einfluß von Ration und Nüchterungsdauer des Spendertieres auf die Fermentationsparameter. Bei der Heu-Krafftutter-Ration führte die Verlängerung der Nüchterungsdauer vor der Pansensaftentnahme zu keiner Veränderung der SCFA-Produktion. Die Methanmenge stieg bei einer Nüchterungsdauer von

24 Stunden signifikant von 306 auf 340 μmol an. Die Stroh-Harnstoff-Ration bewirkte gegenüber der krafftutterreichen Ration dagegen eine signifikante Senkung aller gemessenen Parameter. Dabei stieg der Anteil des Propionats an der SCFA-Summe leicht an (von 34 auf 37 %), während der Butyratanteil geringfügig sank (von 15 auf 12 %).

Bei der Stroh-Harnstoff-Ration führte die Verlängerung der Nüchterungsdauer vor der Pansensaftentnahme zu einer signifikanten Senkung der SCFA-Summe. Die Methanmenge sank um mehr als die Hälfte, von 238 auf 117 $\mu\text{mol/Tag}$, so daß sich das Methan/ SCFA-Verhältnis von 0,15 auf 0,10 verringerte. Bei der Stroh-Harnstoff-Ration hatte somit die verlängerte Nüchterungsdauer eine stärker senkende Wirkung auf die Methanproduktion als auf die SCFA-Summe. Dieser Effekt konnte bei der Heu-Krafftutter-Ration nicht nachgewiesen werden.

Tab. 8: Einfluß von Ration und Nüchterungsdauer auf die Bildung von SCFA und Methan in der batch-culture (n = 27). Unterschiedliche Buchstaben in gleichen Spalten bezeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten, Tukey-Kramer mit $p < 0,05$.

Pansensaft nicht defauniert										
Ration	Nüchterungsdauer	SCFA	Acetat		Propionat		Butyrat		CH ₄	CH ₄ /SCFA
		μmol	μmol	%	μmol	%	μmol	%	μmol	
Heu-Krafftutter	16 Stunden	1964 ^a	1022 ^a	52	664 ^a	34	277 ^a	14	306 ^b	0,16 ^a
	24 Stunden	2065 ^a	1051 ^a	51	683 ^a	33	325 ^a	16	340 ^a	0,17 ^a
Stroh-Harnstoff	16 Stunden	1609 ^b	831 ^b	52	571 ^b	36	194 ^b	12	238 ^c	0,15 ^a
	24 Stunden	1190 ^c	605 ^c	51	432 ^c	37	140 ^c	12	117 ^d	0,10 ^b

Der Einfluß des in-vitro-Substrates bei der Heu-Krafftutter- sowie der Stroh-Harnstoff-Ration ist in Tabelle 9 aufgezeigt. Bei beiden Rationen gingen die Mengen an Fermentationsprodukten aus den in-vitro-Substraten von Heu über Stroh zu Blinddarminhalt deutlich zurück. Die prozentualen Anteile der einzelnen Fettsäuren an der SCFA-Summe zeigen, daß beim in-vitro-Substrat Blinddarminhalt der Propionatanteil geringer und der Butyratanteil höher war (Anhang 1). Durch die Umstellung auf die Stroh-Harnstoff-Ration wurde das Methan/SCFA-Verhältnis bei den in-vitro-Substraten Heu und Blinddarminhalt signifikant niedriger. Die in-vitro-Substrate Heu und Stroh hatten jedoch keinen Einfluß auf diesen Parameter.

Tab. 9: Einfluß von Ration und in-vitro-Substrat auf die Bildung von SCFA und Methan in der batch-culture (n = 27). Unterschiedliche Buchstaben in gleichen Spalten kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten, Tukey-Kramer mit $p < 0,05$.

Pansensaft nicht defauniert										
Ration	in-vitro-Substrat	SCFA	Acetat		Propionat		Butyrat		CH ₄	CH ₄ /SCFA
		µmol	µmol	%	µmol	%	µmol	%	µmol	
Heu-Krafftutter	Heu	3062 ^a	1601 ^a	52	1017 ^a	33	444 ^a	14	592 ^a	0,19 ^a
	Stroh	1982 ^c	1029 ^c	51	709 ^b	36	244 ^b	12	327 ^b	0,16 ^{ab}
	Blinddarminhalt	1208 ^e	599 ^e	50	374 ^d	31	235 ^b	19	132 ^d	0,11 ^c
Stroh-Harnstoff	Heu	2412 ^b	1189 ^b	49	969 ^a	40	254 ^b	11	335 ^b	0,14 ^b
	Stroh	1411 ^d	744 ^d	53	530 ^c	38	137 ^c	10	222 ^c	0,16 ^{ab}
	Blinddarminhalt	625 ^f	338 ^f	54	165 ^e	26	121 ^c	19	39 ^e	0,06 ^d

Tab. 10: Einfluß von Nüchterungsdauer und in-vitro-Substrat auf die Bildung von SCFA und Methan in der batch-culture (n = 27). Unterschiedliche Buchstaben in gleichen Spalten kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten, Tukey-Kramer mit $p < 0,05$.

Pansensaft nicht defauniert										
Nüchterungsdauer	in-vitro-Substrat	SCFA	Acetat		Propionat		Butyrat		CH ₄	CH ₄ /SCFA
		µmol	µmol	%	µmol	%	µmol	%	µmol	
16 Stunden	Heu	2816 ^a	1468 ^a	52	1015 ^a	36	333 ^a	12	506 ^a	0,18 ^a
	Stroh	1808 ^b	936 ^c	52	665 ^b	37	207 ^b	11	304 ^c	0,17 ^a
	Blinddarminhalt	955 ^d	496 ^e	52	284 ^c	30	175 ^b	18	90 ^e	0,09 ^c
24 Stunden	Heu	2631 ^a	1308 ^b	50	971 ^a	37	352 ^a	13	405 ^b	0,15 ^a
	Stroh	1554 ^c	828 ^d	53	559 ^b	36	167 ^b	11	241 ^d	0,15 ^a
	Blinddarminhalt	831 ^d	423 ^f	51	236 ^c	28	172 ^b	21	68 ^f	0,08 ^d

Die Wechselwirkungen zwischen Nüchterungsdauer und Substrat gehen aus Tabelle 10 hervor. Es konnten für das in-vitro-Substrat Heu bei der SCFA-Summe sowie bei den Propionat- und Butyratmengen keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Die prozentualen Anteile der einzelnen SCFA wurden durch die Nüchterungsdauer ebenfalls kaum beeinflusst. Das Methan/ SCFA-Verhältnis wurde nur durch das in-vitro-Substrat Blinddarminhalt signifikant erniedrigt. Die verlängerte Nüchterungsdauer senkte das Verhältnis beim in-vitro-Substrat Blinddarminhalt auf 0,08. Signifikante Wechselwirkung zwischen den Faktoren Nüchterungsdauer und in-vitro-Substrat wurden nur für den Parameter Methan nachgewiesen (Übersicht 5).

4.2 batch-culture-Untersuchungen mit defauniertem Pansensaft

Haupt- sowie Wechselwirkungen der Faktoren Ration, Nüchterungsdauer und in-vitro-Substrat auf die Parameter SCFA, Methan, Wasserstoffwiederfindungsrate und Methan/ SCFA-Verhältnis sind in Übersicht 6 dargestellt. In den nachfolgenden Abschnitten werden diese Effekte anhand der Versuchsergebnisse vorgestellt. Auf die Darstellung der Dreifachwechselwirkungen wurde hier verzichtet, da diese keine entscheidenden Informationen für die in der vorliegenden Arbeit zu beantwortenden Fragen lieferten. Die nach den Faktoren Ration, Nüchterungsdauer und in-vitro-Substrat aufgegliederten Versuchsergebnisse können dem Anhang entnommen werden.

Übersicht 6: Überblick über die Haupt- und Wechselwirkungen der unabhängigen Faktoren auf die erhobenen Parameter bei defauniertem Pansensaft, F-Test, * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), n.s. = nicht signifikant, n.n. = nicht nachweisbar.

	n	SCFA	Acetat	Propionat	Butyrat	CH ₄	H _u /H _p	CH ₄ /SCFA
Ration (RAT)	54	**	n.s.	**	**	n.n.	**	-
Nüchterungsdauer (NUE)	54	**	**	**	n.s.	n.n.	**	-
In-vitro-Substrat (SUB)	54	**	**	**	**	n.n.	**	-
RAT·NUE	27	**	**	**	n.s.	n.n.	n.s.	-
RAT·SUB	27	**	**	**	*	n.n.	n.s.	-
NUE·SUB	27	n.s.	n.s.	n.s.	**	n.n.	n.s.	-

Die Defaunierung führte zu einer insgesamt sehr viel geringeren SCFA-Produktion. Dabei verschob sich das Acetat / Propionat-Verhältnis zugunsten des Propionats. Bei keiner der Inkubationen konnte Methan nachgewiesen werden. Daher wurde in den folgenden Abbildungen und Tabellen auf die Darstellung des Methans verzichtet.

4.2.1 Einfluß der Ration des Spendertieres

Die Fütterungsumstellung des Spendertieres von der Heu-Krafftutter- auf die Stroh-Harnstoff-Ration führte zu einem signifikanten Rückgang der SCFA-Summe. Dabei blieb die Menge des Acetats nahezu gleich, während die Propionat- und Butyratmengen signifikant um 116 bzw. 18 μmol sanken (Anhang 2). Das Verhältnis Acetat zu Propionat wurde durch die Rationsumstellung niedriger (Abb. 10).

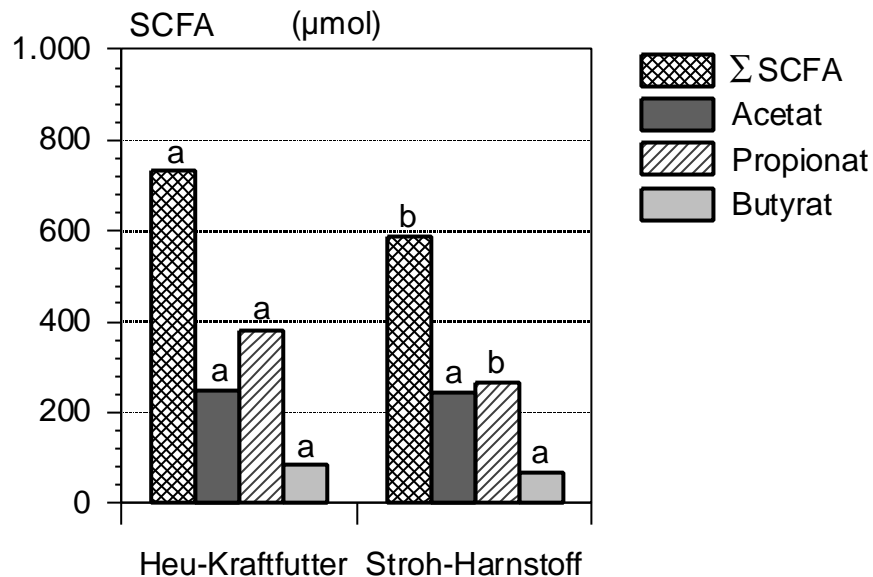


Abb. 10: Einfluß der Ration des Spendertieres auf die Bildung von SCFA in der batch-culture unter Verwendung von defauniertem Pansensaft. ($n = 54$). Unterschiedliche Buchstaben an Säulen mit gleichem Muster kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten, Tukey-Kramer mit $p < 0,05$.

4.2.2 Einfluß der Nüchterungsdauer des Spendertieres

Abbildung 11 gibt die Änderung der SCFA-Produktion bei unterschiedlicher Nüchterungsdauer des Spendertieres wieder. Die geringere SCFA-Summe bei einer Nüchterungsdauer von 24 Stunden ist auf die signifikante Reduzierung der Propionatmenge zurückzuführen. Die Veränderungen der Acetat- und Butyratmengen waren dagegen nicht signifikant. Sowohl die SCFA-Summe als auch deren Muster ist denen des Faktors Ration auf den beiden Faktorstufen der Nüchterungsdauer sehr ähnlich.

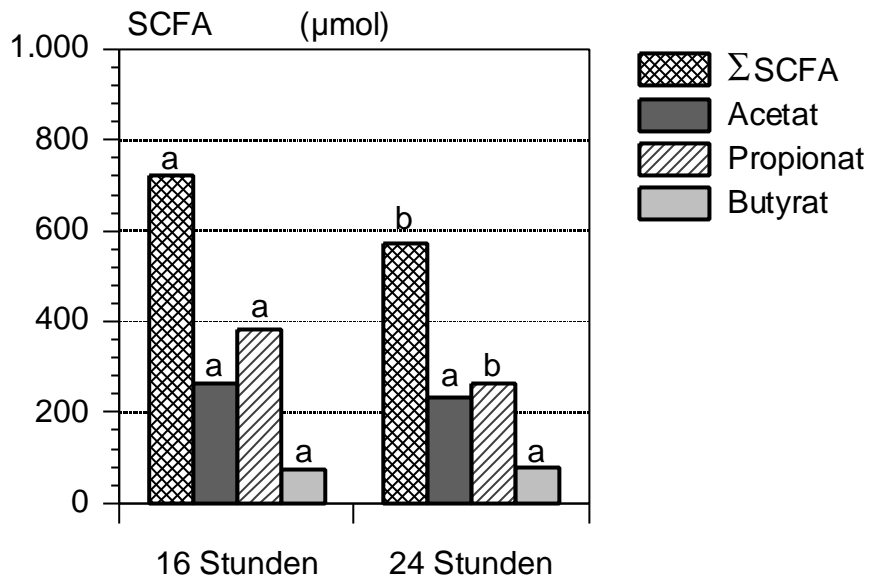


Abb. 11: Einfluß der Nüchterungsdauer des Spendertieres auf die Bildung von SCFA in der batch-culture unter Verwendung von defauniertem Pansensaft (n= 54). Unterschiedliche Buchstaben an Säulen mit gleichem Muster kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten, Tukey-Kramer mit $p < 0,05$.

4.2.3 Einfluß des in vitro-Substrates

Alle drei in-vitro-Substrate hatten einen deutlichen Einfluß auf das Fettsäuremuster in der batch-culture (Abb. 12). Die SCFA-Summe war beim in-vitro-Substrat Heu am höchsten, fiel zum Blinddarminhalt auf die Hälfte ab und erreichte beim Stroh das niedrigste Niveau. Das Fettsäuremuster war bei den in-vitro-Substraten Heu und Stroh durch deutlich höhere Propionat- als Acetatmengen gekennzeichnet.

Beim Blinddarminhalt lag der Propionatanteil im Vergleich zum Acetatanteil um ein Drittel niedriger. Bezüglich des Butyratanteiles waren die Unterschiede zwischen den in-vitro-Substraten Heu und Blinddarminhalt statistisch nicht abzusichern. Demgegenüber wurde beim in-vitro-Substrat Stroh nur etwa ein Drittel der bei den anderen beiden in-vitro-Substraten gebildeten Butyratmengen synthetisiert.

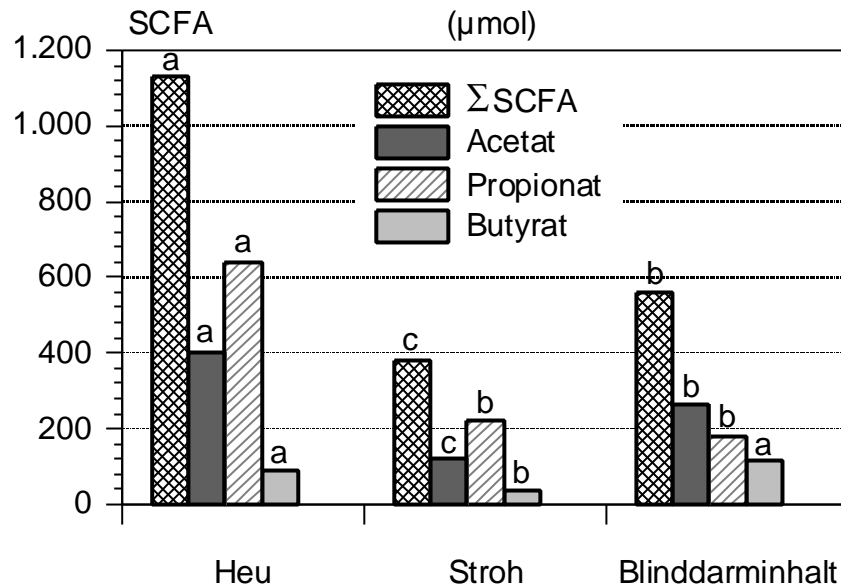


Abb. 12: Einfluß des in-vitro-Substrates auf die Bildung von SCFA in der batch-culture unter Verwendung von defauniertem Pansensaft (n = 54). Unterschiedliche Buchstaben an Säulen mit gleichem Muster kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten, Tukey-Kramer mit $p < 0,05$.

4.2.4 Einfluß der Wechselwirkungen zwischen den Faktoren Ration, Nüchterungsdauer und in vitro-Substrat

Tabelle 11 zeigt den Einfluß von Ration sowie Nüchterungsdauer des Spendertieres auf die Fermentationsparameter. Eine signifikante Änderung der SCFA-Summe und ihrer Zusammensetzung war, mit Ausnahme des Butyratanteils, nur nach verlängerter Nüchterungsdauer bei der Stroh-Harnstoff-Ration festzustellen.

Der schon bei der Betrachtung der Hauptwirkungen deutlich werdende Trend zu einem niedriger werdenden Verhältnis von Acetat zu Propionat bei Rationsumstellung von Heu-Krafftutter auf Stroh-Harnstoff bzw. bei längerer Nüchterungsdauer bestätigte sich auch bei der Aufgliederung nach Faktorenstufen. Die Kombination Stroh-Harnstoff-Ration * 24 Stunden Nüchterungsdauer führte sogar dazu, daß das Verhältnis Acetat zu Propionat größer 1 wurde.

Betrachtet man den Faktor Ration des Spendertieres in Kombination mit dem Faktor in-vitro-Substrat (Tab. 12) wird deutlich, daß sich die SCFA-Summe bei der Stroh-Harnstoff-Ration auf einem insgesamt niedrigeren Niveau bewegte und beim in-vitro-Substrat Stroh wiederum am niedrigsten war.

Tab. 11: Einfluß von Ration sowie Nüchterungsdauer auf die Bildung von SCFA in der batch-culture (n = 27). Unterschiedliche Buchstaben in gleichen Spalten kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten, Tukey-Kramer mit $p < 0,05$.

Ration	Nüchterungs- dauer	Pansensaft defauniert						
		SCFA	Acetat		Propionat		Butyrat	
		µmol	µmol	%	µmol	%	µmol	%
Heu- Krafftfutter	16 Stunden	759 ^a	252 ^a	33	419 ^a	55	89 ^a	12
	24 Stunden	678 ^a	250 ^a	37	344 ^b	51	84 ^a	12
Stroh- Harnstoff	16 Stunden	687 ^a	272 ^a	40	352 ^{ab}	51	63 ^a	9
	24 Stunden	480 ^d	216 ^d	45	191 ^d	40	73 ^a	15

Tab. 12: Einfluß von Ration und in-vitro-Substrat auf die Bildung von SCFA in der batch-culture (n = 18). Unterschiedliche Buchstaben in gleichen Spalten kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten, Tukey-Kramer mit $p < 0,05$.

Ration	in-vitro-Substrat	Pansensaft defauniert						
		SCFA	Acetat		Propionat		Butyrat	
		µmol	µmol	%	µmol	%	µmol	%
Heu- Krafftfutter	Heu	1322 ^a	454 ^a	34	782 ^a	59	86 ^a	7
	Stroh	386 ^d	103 ^e	27	236 ^c	61	47 ^b	12
	Blinddarminhalt	627 ^c	257 ^c	41	231 ^c	37	139 ^a	22
Stroh- Harnstoff	Heu	955 ^b	349 ^b	37	513 ^b	54	93 ^a	10
	Stroh	374 ^d	137 ^d	37	209 ^c	56	28 ^b	8
	Blinddarminhalt	503 ^c	269 ^c	54	139 ^d	28	95 ^a	19

Der Anteil des Acetats an der SCFA-Summe wurde bei allen in-vitro-Substraten durch die Stroh-Harnstoff-Ration erhöht. Zudem führte das in-vitro-Substrat Blinddarminhalt bei beiden Rationen zu einem Anstieg des prozentualen Acetatanteils. Die Propionatanteile lagen, wie auch beim Acetat, für die in-vitro-Substrate Heu und Stroh mit 59 und 61 % (Heu-Krafftutter) bzw. 54 und 56 % (Stroh-Harnstoff) bei beiden Rationen nahe beieinander. Das in-vitro-Substrat Blinddarminhalt führte sowohl bei der Heu-Krafftutter- als auch bei der Stroh-Harnstoff-Ration mit 37 bzw. 28 % zu einem sehr viel geringeren Propionatanteil an der SCFA-Summe. Die Butyratanteile variierten insgesamt zwischen 7 und 22 %. Auffällig war, daß der Butyratanteil beim in-vitro-Substrat Blinddarminhalt mit ca. 20 % für beide Rationen am höchsten war.

Tabelle 13 gibt die gemessenen molaren und prozentualen SCFA-Mengen in Abhängigkeit der Faktorvariation Nüchterungsdauer und in-vitro-Substrat wieder. Die absoluten Mengen der Fettsäuren sind größenordnungsmäßig mit denen aus Tabelle 12 vergleichbar. Noch deutlicher wird die Ähnlichkeit des Einflusses der Faktoren Ration und Nüchterungsdauer, wenn die prozentualen Anteile der einzelnen Fettsäuren an der SCFA-Summe zwischen den beiden Tabellen verglichen werden. Signifikante Wechselwirkungen traten nur beim Butyrat auf (Übersicht 6).

Tab. 13: Einfluß von Nüchterungsdauer und in-vitro-Substrat auf die Bildung von SCFA in der batch-culture (n = 18). Unterschiedliche Buchstaben in gleichen Spalten kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten, Tukey-Kramer mit $p < 0,05$.

Nüchterungs- dauer	in-vitro-Substrat	Pansensaft defauniert						
		SCFA	Acetat		Propionat		Butyrat	
		µmol	µmol	%	µmol	%	µmol	%
16 Stunden	Heu	1248 ^a	426 ^a	34	749 ^a	60	73 ^a	6
	Stroh	446 ^d	134 ^c	30	273 ^c	61	39 ^b	9
	Blinddarminhalt	618 ^c	267 ^b	43	223 ^c	36	128 ^a	21
24 Stunden	Heu	1024 ^b	375 ^a	37	541 ^b	53	108 ^a	10
	Stroh	317 ^e	106 ^c	33	176 ^{cd}	56	35 ^b	11
	Blinddarminhalt	508 ^{cd}	259 ^b	51	145 ^d	29	104 ^a	20

4.3 Zusammenfassung der Ergebnisse aus den batch-culture-Versuchen

In den Abschnitten 4.1 und 4.2 wurden die Ergebnisse aus den in der batch-culture gemessenen Parametern Acetat, Propionat, Butyrat sowie Methan vorgestellt. Aus diesen Parametern wurden die Kenngrößen SCFA-Summe und Methan/SCFA-Verhältnis errechnet.

Zur Beurteilung, ob die variierten Faktoren möglicherweise zu einer Initiierung der reduktiven Acetogenese geführt haben und somit mit Hilfe einer ^{13}C -CO₂-Markierung weiter untersucht werden sollten, wurden drei Kriterien herangezogen: 1. die Reduktion der Methanmenge, 2. das Methan / SCFA-Verhältnis und 3. die Wasserstoffwiederfindungsrate.

Die absolute Methanmenge wurde am deutlichsten durch die Defaunierung reduziert; nach der Defaunierung konnte in den Inkubationen kein Methan mehr nachgewiesen werden. Das Methan / SCFA-Verhältnis wurde am effektivsten durch die Faktorkombination Stroh-Harnstoff-Ration bei 24 Stunden Nüchternungsdauer gesenkt.

Die Wasserstoffwiederfindung ist für die je 12 Faktorkombinationen mit nicht defauniertem und defauniertem Pansensaft in Abbildung 13 dargestellt. Für die Ansätze mit nicht defauniertem Pansensaft konnte nur bei den Faktorkombinationen mit dem in-vitro-Substrat Blinddarminhalt ein signifikanter Einfluß auf die Wasserstoffwiederfindung festgestellt werden. Für die Ansätze, bei denen das Spendertier mit der Heu-Krafftutter-Ration gefüttert wurde, lag die Wasserstoffwiederfindung für die Varianten mit dem in-vitro-Substrat Blinddarminhalt bei 70 % und für die Stroh-Harnstoff-Ration mit demselben in-vitro-Substrat bei nur 61 % (16 Stunden Nüchternungsdauer) bzw. 50 % (24 Stunden Nüchternungsdauer).

Auch bei den Ansätzen mit defauniertem Pansensaft bestätigte sich die signifikante Wirkung des in-vitro-Substrates Blinddarminhalt auf die Wasserstoffwiederfindung (Abb.13). Bei einem insgesamt etwas niedrigeren Niveau der Wasserstoffwiederfindung zeigten sich außerdem beim defaunierten im Vergleich zum nicht defaunierten Pansensaft signifikant niedrigere Wasserstoffwiederfindungsraten für die Faktorkombinationen Stroh-Harnstoff-Ration, 24 Stunden Nüchternungsdauer und in-vitro-Substrat Heu bzw. Stroh sowie in der Heu-Krafftutter-Ration beim in-vitro-Substrat Blinddarminhalt.

Aufgrund der Ergebnisse aus den batch-culture-Untersuchungen deutete nach den o.g. Kriterien vor allem die Defaunierung des verwendeten Pansensaftes und das Substrat Blinddarminhalt auf eine Initiierung der reduktiven Acetogenese hin. Daher wurden diese Faktoren in den Versuchsplan zum direkten Nachweis der reduktiven Acetogenese mit ^{13}C -CO₂-Marker aufgenommen.

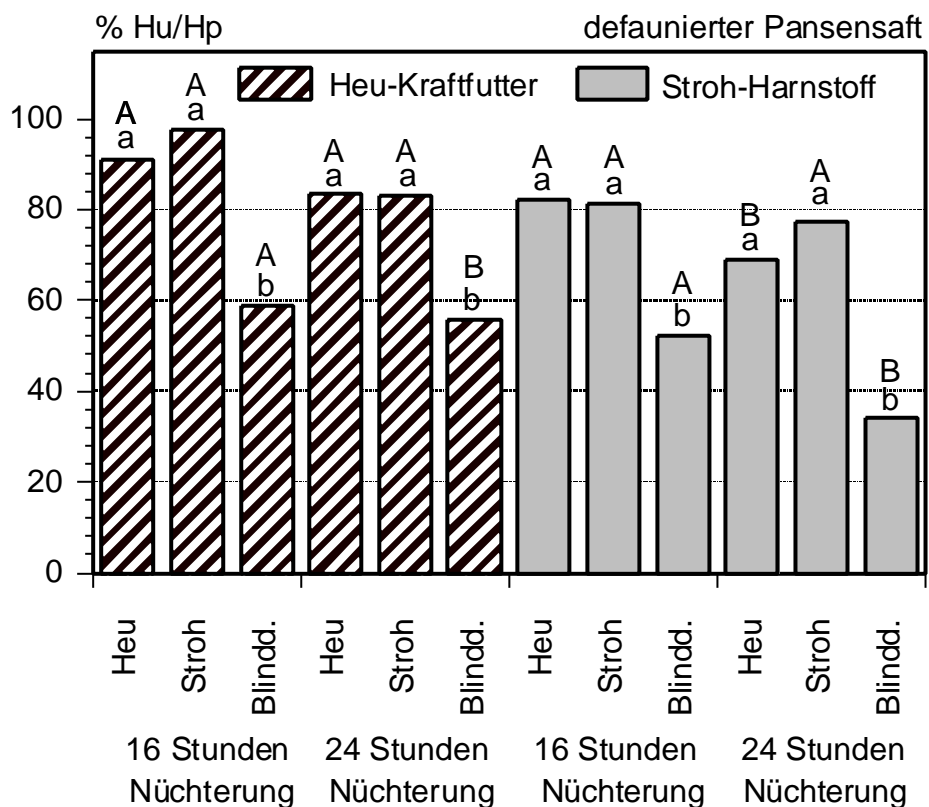
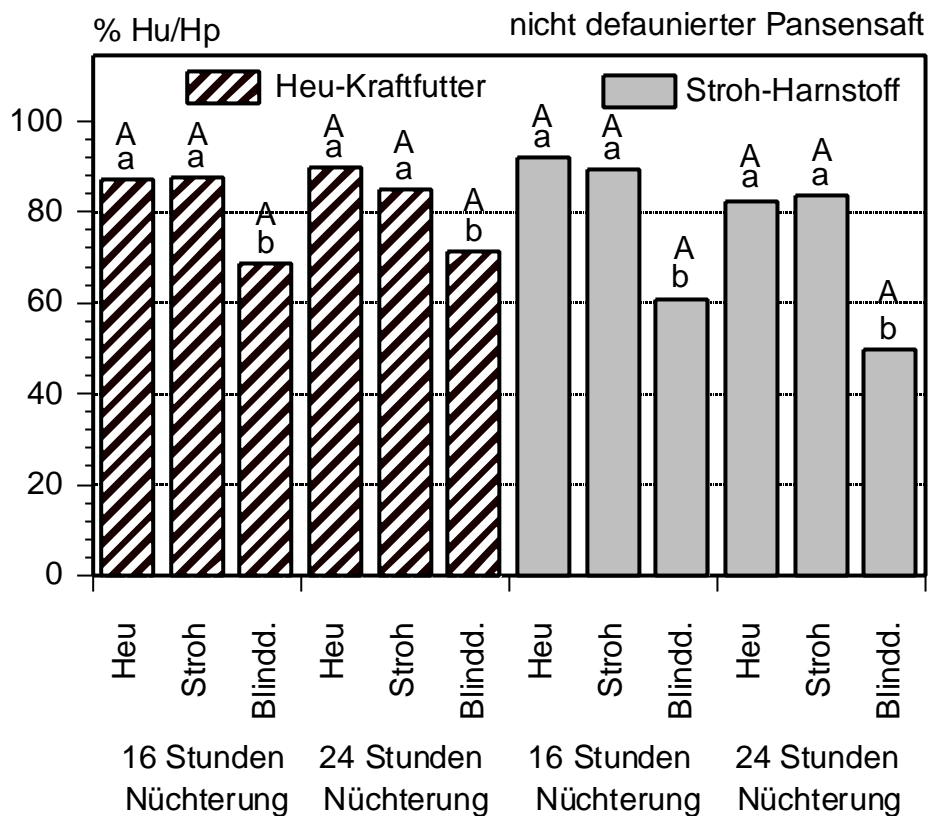


Abb. 13: Wasserstoffwiederfindungsraten der Inkubationen mit nicht defauniertem (A) und defauniertem Pansensaft (B) (n = 9). Unterschiedliche Kleinbuchstaben an Säulen mit gleichem Muster kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten, Großbuchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen nicht defauniertem und defauniertem Pansensaft, Tukey-Kramer mit $p < 0,05$.

4.4 in-vitro-Untersuchungen zum Nachweis der reduktiven Acetogenese mit Hilfe von $^{13}\text{C-CO}_2$

Der Einsatz der ^{13}C -Kernresonanzspektroskopie wurde bereits von DE GRAEVE ET AL. (1994) zum Nachweis der reduktiven Acetogenese im Blind- und Dickdarm des Schweins beschrieben. Um für den direkten Nachweis der reduktiven Acetogenese eine Positivkontrolle zur Verfügung zu haben, wurde vor Beginn der $^{13}\text{C-CO}_2$ -Untersuchungen mit Panseninokulum eine Versuchsreihe mit Bakterien aus dem Blind- und Dickdarm des Schweins durchgeführt. Nachdem dabei reduktive Acetogenese direkt nachgewiesen werden konnte, wurde in nachfolgenden Untersuchungen mit der gleichen Versuchsanstellung der Effekt der Defaunierung des Panseninokulums, der Einsatz von Blinddarminhalt als in-vitro-Substrat sowie die Entwicklung der mikrobiellen Biozönose in der Pansensimulationstechnik RUSITEC in Gegenwart von Gallensalzen auf das Vorkommen von reduktiver Acetogenese überprüft.

4.4.1 Nachweis der reduktiven Acetogenese durch Mikroben des Schweinedarms

Der Einfluß unterschiedlicher Begasungen mit Argon und Wasserstoff einer aus dem Blind- und Dickdarm des Schweins durch Differentialzentrifugation gewonnenen Bakteriensuspension auf die Synthese von SCFA und Methan ist in Abbildung 14 dargestellt.

Die Begasung mit 80 % Wasserstoff und 20 % $^{13}\text{C-CO}_2$ ließ die SCFA-Summe gegenüber der Begasung mit 80 % Argon und 20 % $^{13}\text{C-CO}_2$ signifikant ansteigen, der Effekt auf die einzelnen Säuren konnte jedoch nur beim Butyrat als signifikant abgesichert werden. Wesentlich eindeutiger war der 30%ige Anstieg der Methanmenge durch die Wasserstoffbegasung.

Abbildung 15 zeigt, daß in beiden Begasungsvarianten Acetatmoleküle mit einfacher und doppelter Markierung gefunden wurden. Die Begasung mit Wasserstoff bewirkte eine signifikante Steigerung der an der Methylgruppe markierten ($^{13}\text{CH}_3\text{-COOH}$) sowie des doppeltmarkierten Acetats ($^{13}\text{CH}_3\text{-}^{13}\text{COOH}$) (vgl. Abb. 21, Anhang 14: Spektrum 1 und 2). Aufgrund des geringen Probenumfangs ($n=2$ bei Argon- und $n=3$ bei Wasserstoffbegasung) konnte die infolge der Wasserstoffbegasung gesteigerte Menge des an der Carboxylgruppe ($\text{CH}_3\text{-}^{13}\text{COOH}$) markierten Acetats statistisch nicht abgesichert werden.

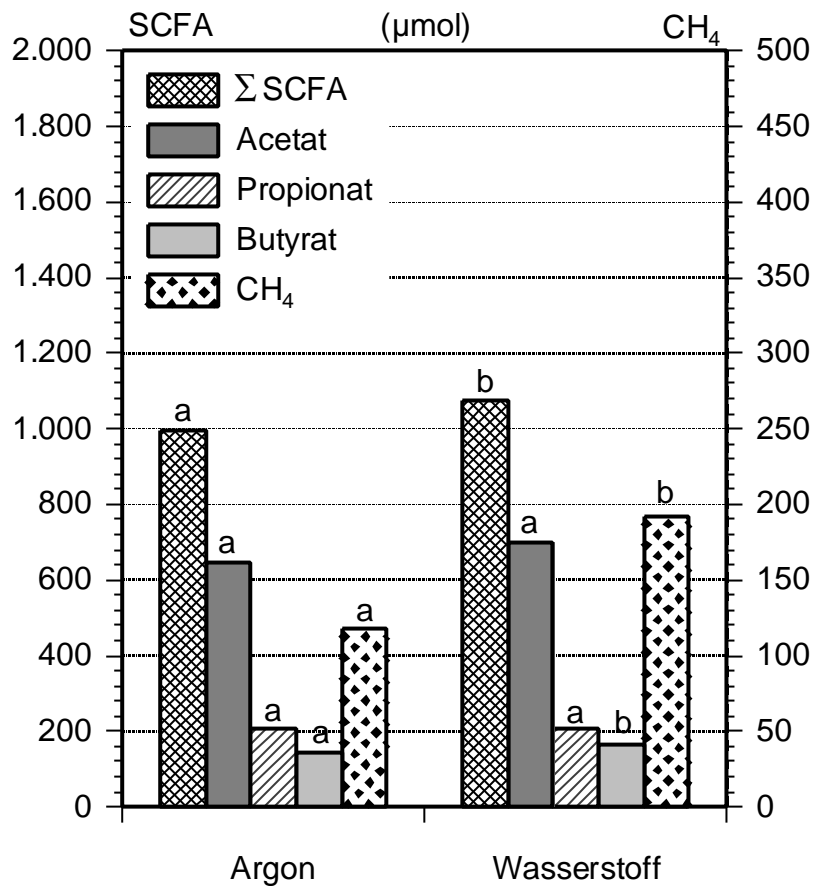


Abb. 14: Einfluß der Begasung mit 80 % Argon (n = 2) bzw. 80 % Wasserstoff (n = 3) in der Gasatmosphäre einer batch-culture-Inkubation mit Bakterien aus dem Schweinedarm. Unterschiedliche Buchstaben an Säulen mit gleichem Muster kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten, Fischers PLSD mit $p < 0,05$.

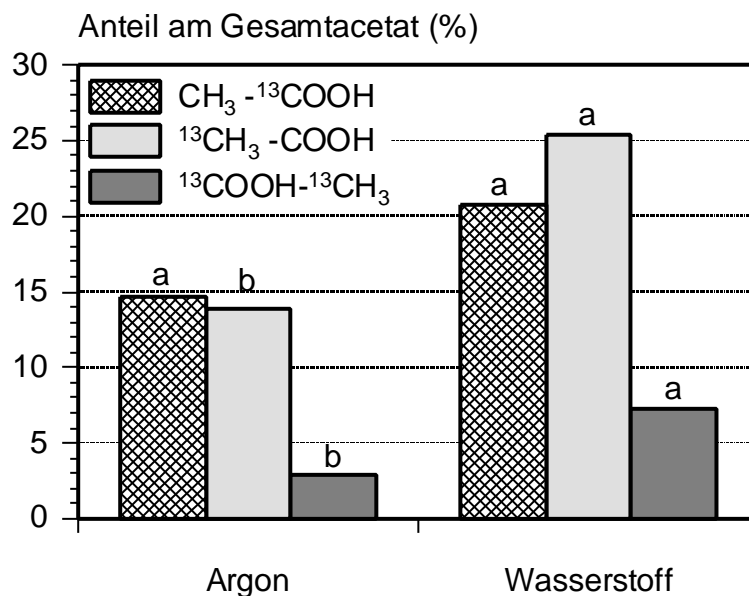


Abb. 15: Einfluß der Begasung mit 80 % Argon (n = 2) und 80 % Wasserstoff (n = 3) in der Gasatmosphäre der batch-culture Inkubation mit Bakterien aus dem Schweinedarm auf die Entstehung von ¹³C-CO₂-markiertem Acetat. Unterschiedliche Buchstaben an Säulen mit gleichem Muster kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten, Fischers PLSD mit $p < 0,05$.

4.4.2 Untersuchungen zum Nachweis einer reduktiven Acetogenese im Pansensaft

Die aufgrund der Ergebnisse aus den vorangegangenen Untersuchungen unter Einsatz des $^{13}\text{C}\text{-CO}_2$ -Markers wiederholten Inkubationen umfaßten den Einsatz vom in-vitro-Substrat Blinddarminhalt ($n = 3$) sowie die Defaunierung des Pansensaftes ($n=3$). Als Kontrolle wurden außerdem Inkubationen mit nicht defauniertem Pansensaft und dem in-vitro-Substrat Heu ($n=3$) durchgeführt. Alle Inkubationen erfolgten mit 80 % Wasserstoff und 20 % $^{13}\text{CO}_2$ in der Gasatmosphäre, um das reduktiv acetogene Potential zu fördern. In Abbildung 16 fallen die durch die Wasserstoffbegasung hervorgerufenen sehr hohen Methanmengen auf, diese waren nur bei der defaunierten Inkubation signifikant niedriger als bei der Kontrolle mit dem in-vitro-Substrat Heu. Aufgrund des geringen Probenumfangs ließen sich die Unterschiede an SCFA nur in einigen Fällen signifikant absichern. Auffallend war das nach wie vor niedrige Acetat / Propionat-Verhältnis beim Ansatz ohne Protozoen.

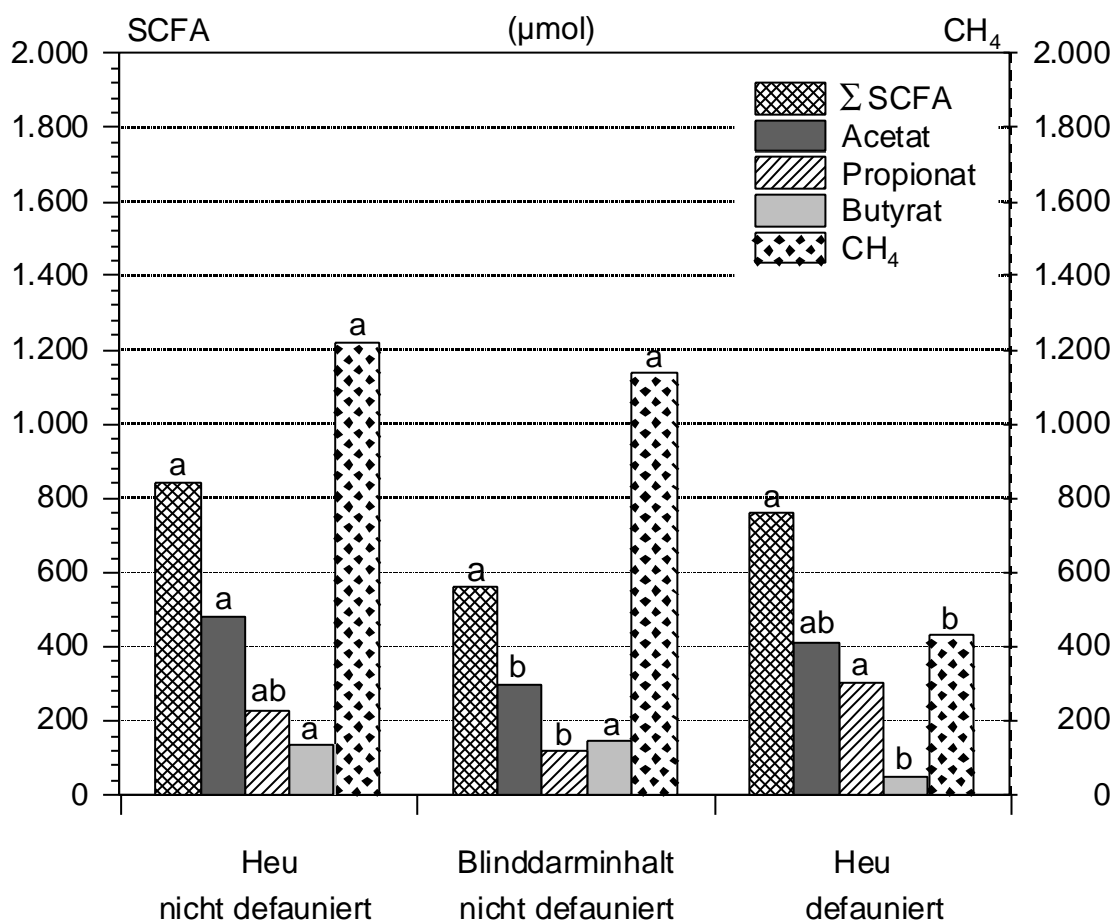


Abb. 16: Einfluß der in-vitro-Substrate Heu und Blinddarminhalt sowie der Defaunierung auf die Entstehung von SCFA und Methan in der batch-culture ($n = 3$). Unterschiedliche Buchstaben an Säulen mit gleichem Muster kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten, Fischers PLSD mit $p < 0,05$.

Die Untersuchungen der Fermentationsprodukte auf das Vorkommen von doppelmarkiertem Acetat ergaben, daß bei keiner der 9 Inkubationen Acetat reduktiv gebildet wurde (vgl. Anhang 14, Spektren 3, 4 und 5).

4.4.3 Untersuchungen zum Nachweis einer reduktiven Acetogenese durch pansenstämmige Mikroorganismen aus dem RUSITEC-System

Aufgrund der in der Literatur beschriebenen (IMMIG 1998) und in eigenen RUSITEC Untersuchungen (Anhang 9) bestätigten stark antimethanogenen Wirkung von Gallensalzen wurden auch im Rahmen dieser Arbeit Untersuchungen zum direkten Nachweis der reduktiven Acetogenese unter dem Einfluß von Gallensalzen durchgeführt. Dazu wurde Pansensaft in drei Fermentern des RUSITEC-Systems inkubiert und ab dem vierten Tag in Fermenter zwei und drei 0,4 bzw. 0,6 % (w/v) Gallensalz infundiert, Fermenter eins blieb als Kontrolle unbehandelt.

Der Einfluß der Gallensalzinfusion auf die Methanogenese ist in Abbildung 17 wiedergegeben. Trotz der methodisch bedingten stark variierenden täglich gebildeten Methanmengen zeigte sich am 5. und 6. Tag, das entspricht dem 2. und 3. Tag der Gallensalzinfusion, eine deutliche Hemmung der Methanogenese. Aufgrund einer Undichtigkeit in dem RUSITEC-System konnte am 5. Tag in dem Fermenter mit der 0,6 %igen Gallensalzinfusion die Gasmenge nicht bestimmt werden.

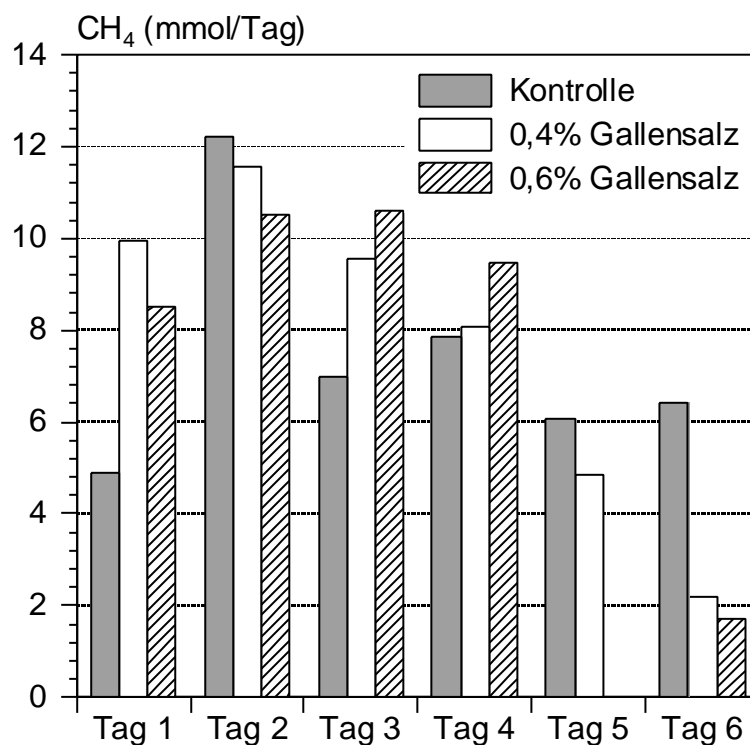


Abb. 17: Einfluß der Infusion von 0,4 % und 0,6 % Gallensalz (w/v) auf die Methanogenese in dem RUSITEC-System.

Aus Abbildung 18 geht der Einfluß der gleichen Behandlung auf die Protozoenzahl hervor. Hier zeigt sich am 2. und 3. Tag eine Stabilisierung bei einer Anzahl von rund 17000 Protozoen / ml. Nach der Gallensalzzugabe konnten in den behandelten Fermentern am 6. Tag keine Protozoen mehr nachgewiesen werden.

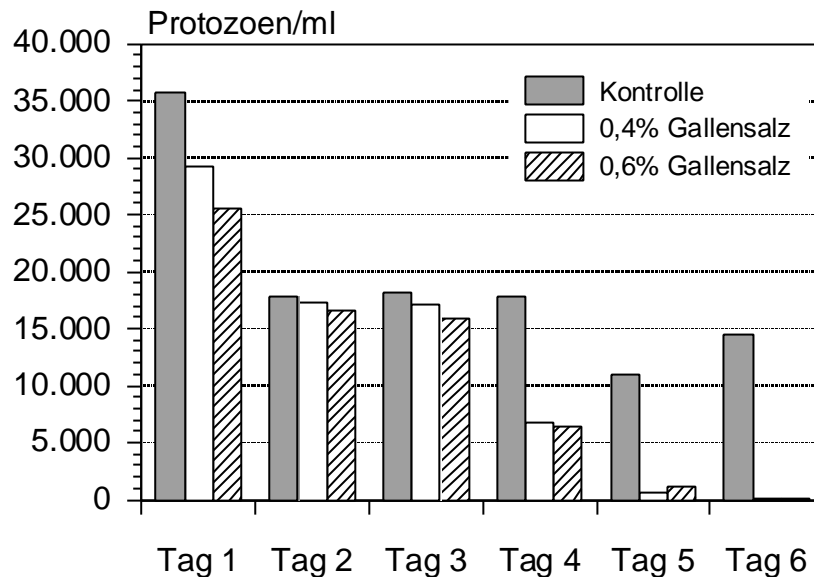


Abb. 18: Einfluß der Infusion von 0,4 und 0,6 % Gallensalz (w/v) auf die in der Fermentationsflüssigkeit des RUSITEC-Systems vorhandenen Protozoen.

Die Zugabe von Gallensalzen in die Fermenter des RUSITEC-Systems hatte auch eine Wirkung auf die synthetisierten flüchtigen Fettsäuren. In Abbildung 19 sind die Mengen an Butyrat, Propionat und Acetat in Abhängigkeit von Inkubationstag und Behandlung dargestellt. Sowohl bei der Kontrolle als auch bei den ab dem 4. Tag mit Gallensalz infundierten Fermentern zeigt sich ein Abwärtstrend. Dieser wurde aber erst am 6. Tag steiler als bei der Kontrolle. Berechnet man das Methan/ SCFA-Verhältnis, so erhält man für den 6. Tag Werte von 0,17 für die Kontrolle und 0,07 bzw. 0,05 für die Fermenter mit den Gallensalzkonzentration 0,4 bzw. 0,6%.

Nachdem das Inokulum 6 Tage in dem RUSITEC-System auf die beschriebene Weise inkubiert worden war, wurden aus der flüssigen Phase des entsprechenden Fermenters 10 ml entnommen, um diese dann unter Einsatz von ^{13}C -CO₂-Marker in der batch-culture zu untersuchen. Die während der sich anschließenden Inkubations synthetisierten Mengen an SCFA und Methan sind in Abbildung 20 dargestellt. Es fällt auf, daß die Methanmenge, bedingt durch den hohen Anteil von

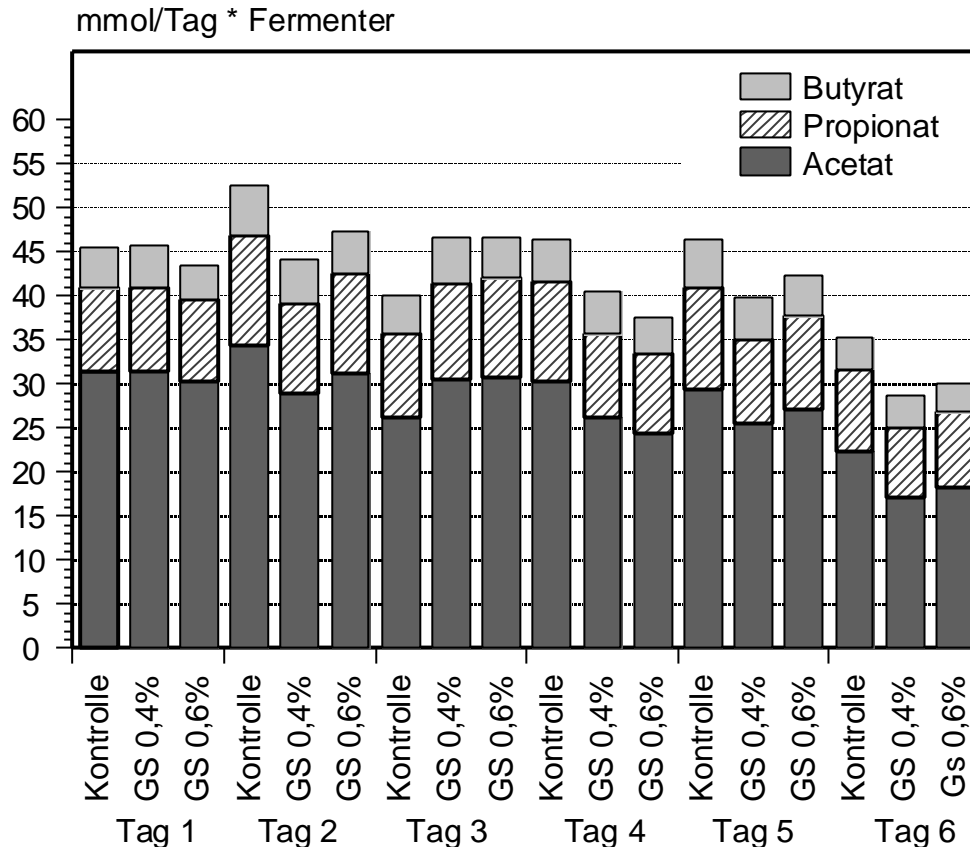


Abb. 19: Mengen der in des RUSITEC-Systems pro Tag und Fermenter entstandenen SCFA. Jede Säule stellt das Ergebnis eines Fermenters dar. Die Behandlungen beinhalteten Gallensalzinfusionen von 0,4 % (GS 0,4 %) bzw. 0,6 % (GS 0,6 %) ab dem 4. Tag sowie einen Kontrollfermenter ohne Gallensalz (Kontrolle).

Wasserstoff in der Gasatmosphäre, bei der Kontrolle sehr hoch war, während bei den mit Gallensalz behandelten Inkubationen vergleichsweise geringe Mengen vorlagen. Die SCFA-Summe nahm mit dem Einsatz von Gallensalz um 349 (0,4 % Gallensalz) bzw. 485 μmol (0,6 % Gallensalz) signifikant ab. Am Fettsäuremuster war der von der Kontrolle über die 0,4 zur 0,6 %igen Gallensalzkonzentration sinkende Acetatanteil (50, 39 bzw. 22 %) sowie der in der gleichen Reihenfolge von 27 über 38 zu 54 % ansteigende Butyratanteil an der SCFA-Summe auffallend (Anhang 13). Wie bei den Inkubationen mit defauniertem Pansensaft, war auch bei diesen Inkubationen ein mit zunehmender Gallensalzkonzentration niedriger werdendes Verhältnis von Acetat zu Propionat zu erkennen.

Abbildung 21 zeigt die ^{13}C -NMR Spektren A) einer batch-culture-Probe mit Heu als in-vitro-Substrat, B) eines Natriumacetatstandards sowie C) einer batch-culture-Probe mit Inokulum aus dem RUSITEC-System ohne Gallensalzzugabe. In jedem der drei Spektren sind die Banden des an der Methylgruppe ($\text{COOH-}^{13}\text{CH}_3$) und an

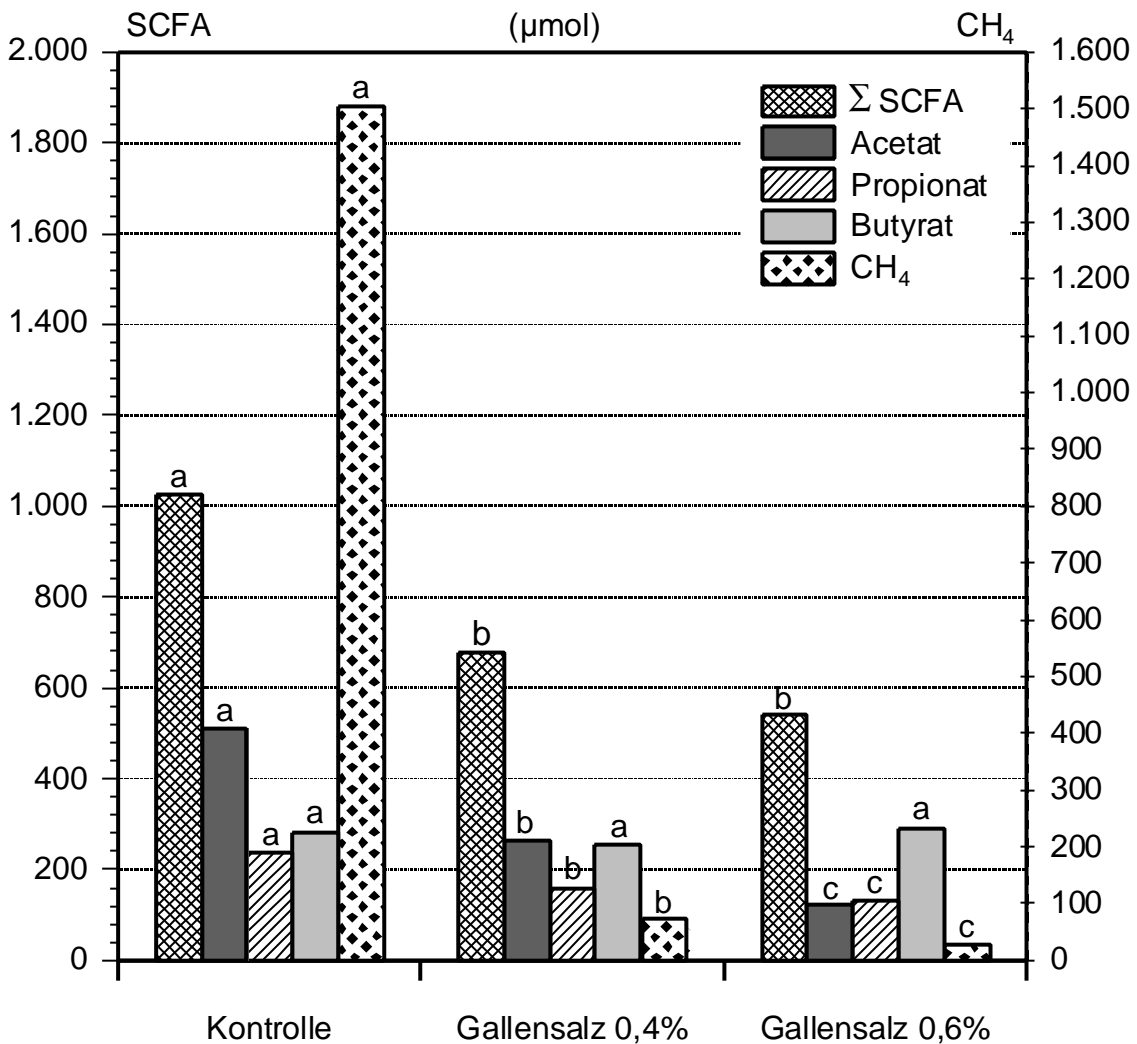


Abb. 20: Einfluß der Entwicklung der Biozönose im RUSITEC auf die Fermentationsprodukte einer 24 stündigen Inkubation in der batch-culture (n = 3). Unterschiedliche Buchstaben an Säulen mit gleichem Muster kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten, Fischers PLSD mit $p < 0,05$.

der Carboxylgruppe ($^{13}\text{COOH-CH}_3$) ^{13}C -markierten Acetats durch Pfeile gekennzeichnet. Die Lage dieser Banden konnte anhand der natürlichen $^{13}\text{C-CO}_2$ -Anreicherung (1,11 %) des Natriumacetats überprüft werden. Bei der Probe mit Doppelmarkierung sind in dem Detailausschnitt neben der $\text{COOH-}^{13}\text{CH}_3$ Bande, deren sogenannten Dubletten markiert ($^{13}\text{COOH-}^{13}\text{CH}_3$), die den Nachweis für die reduktive Acetogenese liefern.

Die Untersuchungen des Pansensaftes mittels $^{13}\text{C-NMR}$ ergaben, daß sowohl in der Kontrolle ohne Gallensalz (Anhang 14: Spektrum 6, 7, und 8) als auch im Ansatz mit 0,4 % Gallensalz doppelmarkiertes Acetat nachgewiesen werden konnte (Anhang 14: Spektrum 9, 10, und 11), während im Ansatz mit 0,6 % Gallensalz kein doppelmarkiertes Acetat vorlag (Anhang 14: Spektrum 12).

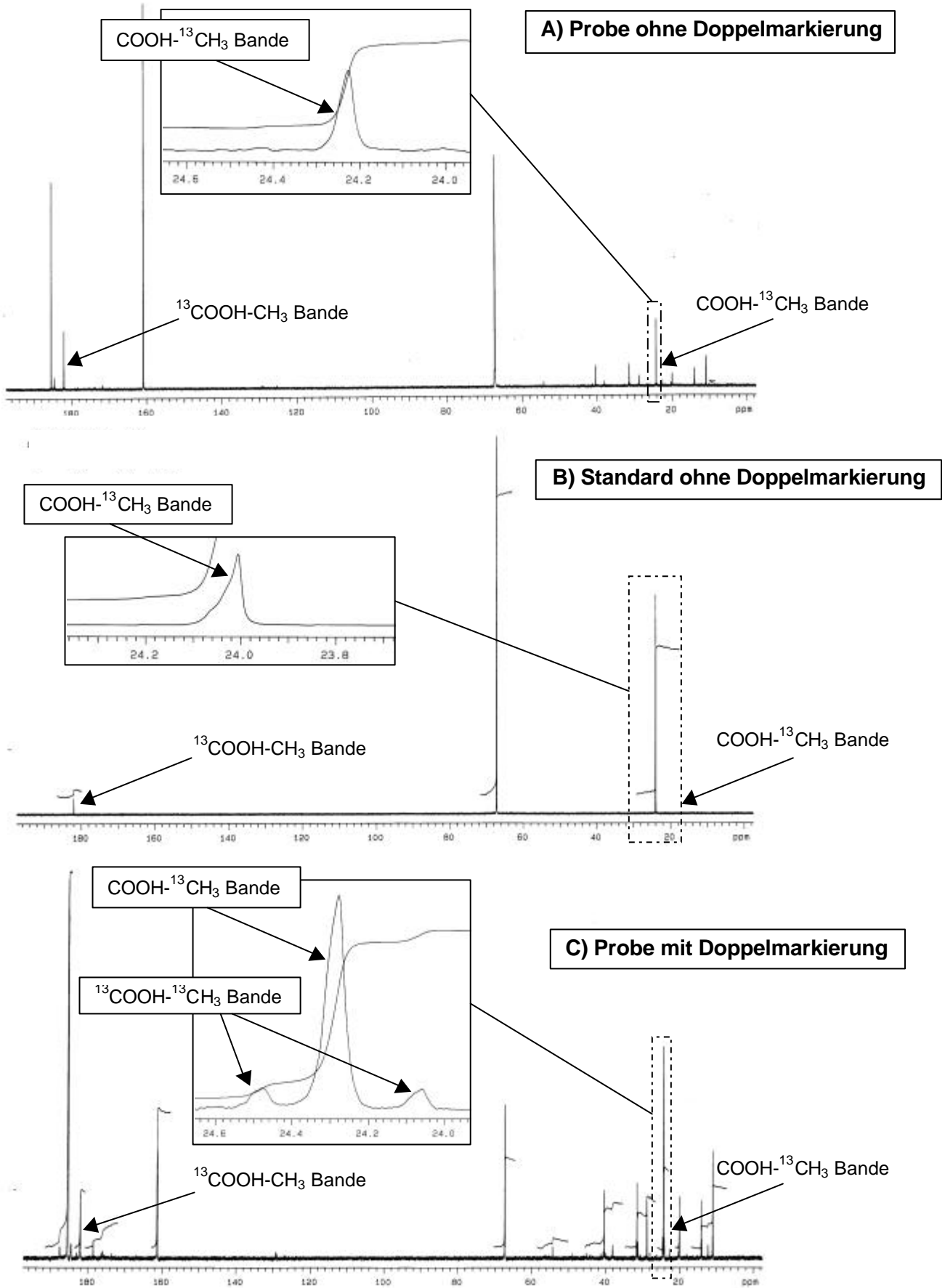


Abb. 21: ^{13}C -NMR Spektren ohne (A, B) und mit (C) doppelmarkiertem Acetat

5 Diskussion

5.1 Versuchsplan und Versuchskritik

Der Versuchsplan wurde mit dem Ziel aufgestellt, die drei Arbeitshypothesen:

Die reduktive Acetogenese wird gefördert, wenn ...

1. ... Protozoen fehlen,
2. ... weniger leicht abbaubare Kohlenhydrate vorhanden oder
3. ... Substanzen endogenen oder mikrobiellen Ursprungs anwesend sind,

zu überprüfen.

In der Versuchsstufe 1 wurden in einem balancierten, vierfaktoriellen Versuch die Faktoren Protozoen, Ration sowie Nüchterungsdauer des Spendertieres und in-vitro-Substrat anhand der Parameter SCFA, Methan, Methan / SCFA-Verhältnis und der Wasserstoffwiederfindung geprüft. Dieses balancierte Versuchsdesign erlaubte die Aufspaltung des Gesamtversuches in nach Faktorstufen getrennte Teilversuche. Da der Einfluß des Faktors Protozoen in den vorliegenden Untersuchungen sehr groß war, wurde in Versuchsstufe 1 der Versuch für die Auswertung und Diskussion in die Teilversuche "nicht defauniert" und "defauniert" gegliedert. Auf die Interpretation der Dreifachwechselwirkungen wurde im Rahmen dieser Arbeit verzichtet, da sich aus den entsprechenden Faktorkombinationen keine für die Versuchsfragen relevanten Erkenntnisse ergaben. Das orthogonale Versuchsdesign ermöglichte, alle Faktoren miteinander zu kombinieren und somit jede Faktorkombination zu testen. Grundsätzlich ist aber die Kombination von mehr als 2 Faktoren nicht sinnvoll, da es schwierig ist, Drei- und Vierfachwechselwirkungen zu interpretieren. In der vorliegenden Untersuchung konnten trotz der in Versuchsstufe 1 beobachteten Wechselwirkungen für das Vorkommen der reduktiven Acetogenese als relevant erachteten Faktoren identifiziert werden.

In Versuchsstufe 2 erfolgte der direkte Nachweis der reduktiven Acetogenese mit Hilfe der ¹³C-NMR-Methode. Aufgrund der methodenbedingten langen Meßzeiten und des hohen analytischen Aufwandes konnte nur eine begrenzte Anzahl von Proben gemessen werden.

5.2 Auswahl des verwendeten Defaunierungsverfahrens

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Defaunierungsverfahren benötigt, das es ermöglicht, nicht defaunierten und defaunierten Pansensaft der gleichen Herkunft für parallele Inkubationen zu verwenden. Da für die Versuchsstufe 1 nur eine

pansenfistulierte Kuh zur Verfügung stand, schied ein Verfahren bei dem zwei Tiere defauniert werden und anschließend eines der beiden wieder mit einer definierten Protozoenpopulation inokuliert wird (DEMEYER und VAN NEVEL 1979, COLEMAN 1985, JOUANY und MARTIN 1997) aus. Da der Versuchsplan zur besseren Vergleichbarkeit eine gleichzeitige Inkubation des nicht defaunierten und defaunierten Pansensaftes vorsah, kam ein Verfahren, daß eine Defaunierung des Spendertieres und eine anschließende Refaunierung in zeitlicher Abfolge impliziert, ebenfalls nicht in Frage. Somit standen noch Zentrifugation, Filtration oder Gefrieren des Pansensaftes sowie der Einsatz einer Detergentienlösung als mögliche Defaunierungsverfahren (LEINMÜLLER und MENKE 1986) zur Auswahl.

Die Zentrifugation erwies sich als ungeeignet, da mit diesem Verfahren neben den Protozoen auch alle Substratpartikel mit anhaftenden Bakterien aus dem Pansensaft entfernt wurden. Bei der Filtration des Pansensaftes treten nach LEINMÜLLER und MENKE (1986) Probleme mit verstopften Filtern auf. Außerdem wird vermutet, daß ebenfalls ein großer Teil der festen Partikel des Pansensaftes mit abfiltriert wird. Vor Beginn der eigenen Untersuchungen wurde die Defaunierung durch Einfrieren des Pansensaftes bei -20°C und -80°C erprobt. Nach dem Gefrieren war zwar keine Protozoenmobilität mehr zu erkennen, dennoch konnte lichtmikroskopisch keine äußerliche Beschädigung der Protozoenzellen festgestellt werden. Inkubationen mit dem so behandelten Pansensaft zeigten kaum eine Einschränkung der Methanproduktion, somit waren die Anzeichen für eine erfolgreiche Defaunierung des Pansensaftes insgesamt nicht hinreichend.

Als viertes Verfahren zur *in vitro* Defaunierung bot sich der Einsatz einer Detergentienlösung an. Dazu wurde ein von mehreren Autoren (BIRD ET AL. 1979, VEIRA ET AL. 1983, KREUZER und KIRCHGEßNER 1986) beschriebenes Verfahren, bei dem das oberflächenaktive Detergens Natrium-lauryl-diethoxy-Sulfat, das in Deutschland unter dem Namen Synperonic (Deutsche ICI, Frankfurt a.M., D.) vertrieben wird, als Wirkstoff zur Protozoeneliminierung eingesetzt. In eigenen Versuchen zeigte sich die Wirkung des Präparates schon nach wenigen Minuten durch ein vollständiges Verschwinden der Protozoen. Damit wurde die gleichzeitige Inkubation von nicht-defauniertem und defauniertem Pansensaft möglich.

5.3 Auswahl der verwendeten in-vitro-Methoden

In-vitro-Methoden bieten die Möglichkeit, die mikrobiellen Umsetzungen im Pansen unter kontrollierten Laborbedingungen zu untersuchen (CZERKAWSKI 1986). In der vorliegenden Arbeit war außerdem die Absicht, extreme, nicht mehr physiologische Bedingungen zu simulieren, für den Einsatz der in-vitro-Systeme ausschlaggebend.

Für die zu beantwortenden Fragestellungen wurden die nicht kontinuierliche batch-culture sowie das kontinuierliche RUSITEC-System (Pansensimulationstechnik) verwendet.

In der Versuchsstufe 1 wurde der Einfluß der 4 Faktoren Protozoen, Ration sowie Nüchterungsdauer des Spendertieres und in-vitro-Substrat mit der batch-culture-Methode (MARTY und DEMEYER 1973, VAN NEVEL und DEMEYER 1992, IMMIG 1998) untersucht. Diese Methode erlaubte den Einsatz unterschiedlicher Gasatmosphären in den Inkubationsgefäßen und die Prüfung einer hohen Probenanzahl (216 Proben).

Die Nachteile der Methode liegen in der Tatsache begründet, daß die Einflüsse des Spendertieres und der Pansensaftentnahme direkt in das System übernommen werden. Dadurch können die in der vorliegenden Untersuchung als Tageseffekt bezeichneten Phänomene auftreten, die hier zwar durch die Wahl des statistischen Auswertungsverfahrens berücksichtigt wurden, idealerweise aber so gering wie möglich gehalten werden sollten.

Für die Überprüfung des Einflusses der Gallensalze auf die Pansenfermentation wurde das kontinuierliche in-vitro-System RUSITEC (Pansensimulationstechnik) gewählt (CZERKAWSKI und BRECKENRIDGE 1977). Mit diesem Langzeit-in-vitro-System konnte die Wirkung der Gallensalze auf die mikrobielle Biozönose untersucht werden.

Ein besonders hervorzuhebender Unterschied zur batch-culture ist die im RUSITEC-System berücksichtigte, von CZERKAWSKI (1986) beschriebene Kompartimentierung des Pansens. Danach teilen sich die Lebensräume der Mikroorganismen (MO) im Pansen in 4 Kompartimente:

Kompartiment 1 : MO in der flüssigen Phase.

Kompartiment 2 : MO in der flüssigen Phase in der direkten Umgebung von festem Panseninhalt.

Kompartiment 3 : MO, die fest an den Partikeln im Pansen anhaften.

Kompartiment 4 : MO, die in der direkten Umgebung der Pansenwand leben.

Das RUSITEC-System beinhaltet die Kompartimente 1, 2 und 3, während das Kompartiment 4 naturgemäß nur am Tier selbst untersucht werden kann. Das Kompartiment 2 entspricht den Mikroorganismen, die sich in der flüssigen Phase innerhalb des Nylonbeutels befinden. Bei den hier vorgestellten kombinierten Untersuchungen aus RUSITEC-System und batch-culture wurde das für die batch-culture benötigte Inokulum aus der flüssigen Phase des RUSITEC-Systems (Kompartiment 1 und 2) verwendet.

Da der ^{13}C - CO_2 -Marker nur in geringen Mengen (15 g) zur Verfügung stand, wurde es für den direkten Nachweis der reduktiven Acetogenese beim Einsatz von Gallensalzen notwendig, die RUSITEC-Langzeitinkubation mit der batch-culture zu kombinieren. So wurde nach einer 7 tägigen Entwicklung der Biozönose im RUSITEC pro Inkubationsgefäß 10 ml Inokulum entnommen und mit dem ^{13}C - CO_2 -Marker inkubiert.

5.4 Nachweis der reduktiven Acetogenese mittels ^{13}C -NMR

Die ^{13}C -Kernresonanzspektroskopie (NMR) hat in den letzten 25 Jahren für die Untersuchung von metabolischen Umsetzungen aerober und anaerober Organismen an Bedeutung gewonnen. Besonders die noch wenig erforschten Fermentationen, an denen einfache organische Verbindungen beteiligt sind, lassen sich mit Hilfe der ^{13}C -NMR ohne präparative Isolierungsschritte analysieren. Darüber hinaus wird die praktische Durchführung von Experimenten mit Kohlenstoffmarkern dadurch erleichtert, daß für die NMR-Analytik keine Radioisotope notwendig sind (GRIVET ET AL. 1992).

Der Nachweis der autotroph-reduktiven Acetogenese kann nur eindeutig erbracht werden, wenn gezeigt werden kann, daß beide Kohlenstoffatome des Acetatmoleküls aus dem ^{13}C -markierten Kohlendioxidpool stammen. Eine einfache ^{13}C -Markierung des Acetats deutet auf den heterotrophen Entstehungsweg hin, da dabei auch Kohlenstoff aus der organischen Ausgangssubstanz (z.B. Hexose) verbraucht wird (DE GRAEVE ET AL. 1994). Die ^{13}C -NMR konnte eine eindeutige Lokalisierung des markierten Kohlenstoffs innerhalb des Acetatmoleküls liefern und wurde deshalb für die im Rahmen dieser Arbeit vorgenommenen ^{13}C -Analysen verwendet.

Vor Beginn der Untersuchungen zum direkten Nachweis der reduktiven Acetogenese durch Pansenmikroorganismen mit Hilfe der ^{13}C -NMR wurde zunächst eine Bakteriensuspension aus dem Schweinedarm als Positivkontrolle der Nachweismethode untersucht (DE GRAEVE ET AL. 1994).

Die Gewinnung dieser Bakteriensuspension und die Inkubationen erfolgten nach Angaben von DE GRAEVE ET AL. (1994). Um die reduktive Acetogenese nicht durch andere Synthesewege zu überlagern, wurde im Gegensatz zu den Arbeiten von DE GRAEVE ET AL. (1994) auf die Zugabe eines Kohlenhydratsubstrates verzichtet. Die Begasung erfolgte bei zwei Inkubationen mit 80 % Argon und 20 % ^{13}C - CO_2 als Kontrollvariante und bei drei Inkubationen mit 80 % Wasserstoff und 20 % ^{13}C - CO_2 . Die Wasserstoffbegasung sollte die reduktive Acetogenese stimulieren und damit die Möglichkeit bieten, unterschiedliche Mengen an reduktiv gebildetem Acetat zu quantifizieren. Die Anwesenheit von Wasserstoff in der Gasatmosphäre hatte auf die

Summe der flüchtigen Fettsäuren und speziell auf die Butyratmenge eine signifikant steigernde Wirkung (Abb. 14, Anhang 6). Die Acetatproduktion stieg zwar um 55 µmol, dieser Anstieg war jedoch nicht signifikant. Dagegen konnte die wasserstoffbedingte Erhöhung der Methanmenge von 74 auf 192 µmol statistisch abgesichert werden. DE GRAEVE ET AL. (1994) fanden bei gleicher Behandlung einen wesentlich deutlicheren Zuwachs der Methanmenge von 111 auf 1180 µmol. Bei ihren Inkubationen wurden, im Gegensatz zu den vorliegenden Ergebnissen, die Mengen an flüchtigen Fettsäuren durch die Wasserstoffbegasung um ca. 50 % gesenkt. Eine Erklärung für diese Unterschiede könnte das in der eigenen Arbeit fehlende Kohlenhydratsubstrat sein.

Die in Abbildung 15 und Anhang 7 dargestellten Ergebnisse belegen, daß in der vorliegenden Arbeit die reduktive Acetogenese mit der ¹³C-NMR qualitativ nachgewiesen werden konnte. Darüber hinaus deutete sich an, daß grundsätzlich auch quantitative Aussagen gemacht werden könnten, die vorhandene Anzahl von Kalibrierungsmessungen jedoch nicht zu einer gesicherten Aussage ausreichen.

5.5 Einfluß der untersuchten Faktoren auf die Fermentation

In den folgenden Abschnitten werden die Wirkungen der unabhängigen Faktoren Protozoen, Ration, Nüchterungsdauer, in-vitro-Substrat sowie Substanzen endogenen und mikrobiellen Ursprungs diskutiert. Die Faktoren sind je nach Zuordnung zu den drei Arbeitshypothesen (Übersicht 1) in den entsprechenden Kapiteln zusammengefaßt. Die mikrobielle Reaktion wird anhand der Fermentationsparameter SCFA, Methan, Methan/SCFA-Verhältnis und der Wasserstoffwiederfindungsrate charakterisiert. Insofern Untersuchungen mit ¹³C-CO₂-Marker vorliegen, finden auch diese Ergebnisse in den entsprechenden Kapiteln Berücksichtigung.

5.5.1 Protozoen

Der Einfluß der Protozoen wurde durch Inkubationen mit nicht defauniertem und defauniertem Pansensaft vergleichend untersucht. Protozoen gelten als für das Wirtstier nicht essentiell (HUNGATE 1966). Dennoch wurden in der Vergangenheit viele in-vivo- und in-vitro-Untersuchungen mit defauniertem Panseninhalt durchführt, um durch Vergleich mit nicht defauniertem Panseninhalt die Bedeutung der Protozoen zu untersuchen. Dabei wurden zunächst widersprüchliche Ergebnisse erzielt. LEINMÜLLER und MENKE (1986) begründen diese mit verschiedenen Futterrationen für die jeweils untersuchten Tiere. So kann infolge einer Defaunierung bei einem niedrigen Proteinniveau und hohem Energiegehalt in der Ration eine Steigerung der Tierleistung erzielt werden. Dies wird auf eine effizientere mikrobielle

Proteinsynthese, eine erhöhte Passagerate und damit gesteigerte Proteinanflutung am Dünndarm erklärt. DEMEYER (1981) stellte infolge einer Defaunierung bei einer protein- und cellulosereichen Ration eine verminderte Wachstumsleistung fest. Als Begründung für diese Ergebnisse wird eine abnehmende Verdaulichkeit der organischen Substanz bei nicht limitierender Proteinzufuhr genannt.

Die Wirkung der Defaunierung zeigte sich in den eigenen Untersuchungen bei allen gemessenen Parametern. In keinem der Ansätze mit defauniertem Pansensaft konnte Methan nachgewiesen werden. Über die Reduzierung der Methanogenese durch Entfernung der Protozoen aus dem Pansen wird in der Literatur übereinstimmend berichtet (EADIE und GILL 1971, WHITELAW ET AL. 1984, MATHIEU ET AL. 1996, WILLIAMS und COLEMAN 1997). Da die Ciliaten zu den bedeutendsten Wasserstoffproduzenten im Pansen gehören (USHIDA ET AL. 1997), kann die Reduzierung des entstehenden Methans bei einer Defaunierung mit der Unterdrückung des Interspezies-Wasserstoff-Transfers (ZINDER 1993; WILLIAMS und COLEMAN 1997; SHARP ET AL. 1998) zwischen Ciliaten und methanogenen Bakterien erklärt werden. Die besonders drastische Hemmung der Methanogenese in den vorliegenden Untersuchungen beruht möglicherweise auf der erst kurz vor der Inkubation erfolgten Defaunierung des Pansensaftes. Dadurch konnte sich die mikrobielle Biozönose in ihrer Populationsgröße und -zusammensetzung nicht an die protozoenfreie Situation anpassen. Solche Anpassungsprozesse wurden von BIRD ET AL. (1979) und USHIDA ET AL. (1997) beschrieben. Zudem vermuten VEIRA ET AL. (1983), daß das auch in den vorliegenden Untersuchungen zur Defaunierung eingesetzte Synperonic weitere, jedoch nicht näher beschriebene Nebenwirkungen auf die Biozönose ausübt. Diese werden in der Literatur jedoch nicht näher beschrieben.

Der Einfluß der Defaunierung auf die SCFA-Summe ging, gemittelt über die Faktoren Ration, Nüchterungsdauer und in-vitro-Substrat, mit einer Senkung um mindestens 50 % gegenüber der nicht defaunierten Variante sehr deutlich zurück. Der Acetatanteil sank infolge der Defaunierung des im Mittel von 51 auf 38 %. Dabei traten beim in-vitro-Substrat Blinddarminhalt die geringsten Effekte auf, der Anteil des Acetats fiel dort von 51 auf 47 % der SCFA-Summe. Gleichzeitig stieg infolge der Defaunierung der Propionatanteil im Mittel von 34 % auf 49 % deutlich an. Auch hier war der Einfluß des Blinddarminhaltes als in-vitro-Substrat mit einem Anstieg des Propionatanteils von 29 auf 32 % relativ gering. Diese Verschiebung des SCFA-Musters läßt sich durch die nur in Bakterien, nicht aber in Protozoen, stattfindende Propionatsynthese (DEMEYER und VAN NEVEL 1979) erklären. Beim Butyrat zeigten sich mit 15 % in der nicht defaunierten und 12 % in der defaunierten Variante weniger deutliche Unterschiede (Anhang 1 und 2).

Die Umstellung von der Heu-Krafftutter- auf die Stroh-Harnstoff-Ration sowie die verlängerte Nüchterungsdauer senkten beim defaunierten Pansensaft die Propionatbildung signifikant. Beiden Faktoränderungen ist die geringer werdende Verfügbarkeit an Nährstoffen gemeinsam, die anscheinend einen limitierenden Einfluß auf die propionatbildenden Organismen hatte, während die anderen Organismen vermutlich Bestandteile des Inokulums verwerteten. Solche Bestandteile könnten z.B. Reste von abgestorbenen Protozoen sein, die für alle Behandlungen in gleichem Maße zur Verfügung standen.

Betrachtet man die Änderung der SCFA-Summe und deren Zusammensetzung bei den in-vitro-Substraten Heu, Stroh und Blinddarminhalt (Abb. 12; Anhang 2) so sind zwischen diesen Faktorstufen deutliche Unterschiede zu erkennen. Dabei zeigt der Vergleich der in-vitro-Substrate Heu und Stroh eine Senkung der SCFA-Summe von 1130 auf 378 μmol . Das SCFA-Muster blieb dabei nahezu unverändert. Diese Senkung der Fermentationsintensität läßt sich durch den geringeren Nährstoffgehalt und die schlechtere Verfügbarkeit der Nährstoffe im in-vitro-Substrat Stroh erklären. Das Niveau der SCFA-Summe beim in-vitro-Substrat Blinddarminhalt lag mit 561 μmol zwischen denen der in-vitro-Substrate Heu und Stroh. Die Zusammensetzung hat sich mit 47 % Acetat, 32 % Propionat und 21 % Butyrat gegenüber den anderen in-vitro-Substraten zugunsten des Acetats verschoben. Dieser Effekt des Blinddarminhaltes liegt vermutlich in dessen Inhaltsstoffen begründet, von denen einige eventuell als Wasserstoffsenken fungieren können. Hierauf wird in dem Kapitel Einfluß von Substanzen endogenen und mikrobiellen Ursprungs ausführlicher eingegangen.

Die in Tabelle 11 wiedergegebenen Ergebnisse, aufgetrennt nach Ration und Nüchterungsdauer, zeigen, daß durch die verlängerte Nüchterungsdauer in der Stroh-Harnstoff-Ration alle Parameter, das Butyrat ausgenommen, signifikant gesenkt wurden. Bei der Heu-Krafftutter-Ration konnten, mit Ausnahme des Propionats, keine signifikanten Wirkungen der Nüchterungsdauer festgestellt werden. Dieses Ergebnis unterstützt die These, daß die Propionatbildner eher auf die veränderten Bedingungen reagieren und somit vielleicht stärker von dem zur Verfügung stehenden Substrat abhängig sind als die Butyrat- und Acetatbildner. Außerdem scheint die Stroh-Harnstoff-Ration für die Mikroorganismen bei einer längeren Nüchterungsdauer nicht genügend Stickstoffreserven zur Verfügung zu stellen.

Die Kombination der Faktoren Ration und in-vitro-Substrat, wie sie in Tabelle 12 wiedergegeben ist, unterstreicht wiederum den Effekt des in-vitro-Substrates Blinddarminhalt als acetatförderndes und propionathemmendes Substrat. Diese Beobachtung bestätigt sich auch in Tabelle 13, in der die Faktoren

Nüchterungsdauer und in-vitro-Substrat wiedergeben sind. Die weiter oben gemachte Aussage, daß hier vermutlich endogene Substanzen des Blinddarminhalts auf die SCFA-Zusammensetzung einwirkten, wird dadurch noch einmal bestätigt. Die Ursache für den mit Blinddarminhalt als in-vitro-Substrat im nährstoffärmeren Habitat (Stroh-Harnstoff-Ration, 24 Stunden Nüchterungsdauer) sinkenden Propionat- und steigenden Acetatanteil konnte nicht geklärt werden.

Das in-vitro-Substrat Stroh führt bei allen nach in-vitro-Substrat aufgegliederten Betrachtungen zu den niedrigsten SCFA-Mengen, wobei das in-vitro-Substrat Heu offensichtlich am meisten fermentierbare Nährstoffe enthält (Tab. 12). Vergleicht man die Reihenfolge in der entstandenen SCFA-Summe von Heu mit der größten SCFA-Menge über Blinddarminhalt zu Stroh mit den Ergebnissen der Inkubationen mit nicht defauniertem Pansensaft, fällt auf, daß hier die Reihenfolge zwischen Stroh und Blinddarminhalt vertauscht ist. Ein Erklärungsansatz für dieses Phänomen könnte sein, daß der Blinddarminhalt für die im defaunierten Habitat veränderte Mikrobenpopulation essentielle Nährstoffe liefert, die das Stroh als in-vitro-Substrat nicht enthält.

Für die Beurteilung der Versuchsergebnisse, ob reduktive Acetogenese stattgefunden hat, wurde auch die Rate der Wasserstoffwiederfindung herangezogen. Dabei wurden im Vergleich zu den Untersuchungen mit nicht defauniertem Pansensaft signifikant niedrigere Wasserstoffwiederfindungsraten in den Varianten Heu-Krafftutter-Ration, 24 Stunden Nüchterungsdauer und in-vitro-Substrat Blinddarminhalt sowie Stroh-Harnstoff-Ration, 24 Stunden Nüchterungsdauer, in-vitro-Substrat Heu bzw. Blinddarminhalt gefunden (Abb.13, Anhang 5). Diese Ergebnisse bestätigen die Bedeutung des in-vitro-Substrates Blinddarminhalt in seiner potentiellen Wirkung auf die reduktive Acetogenese. Außerdem scheint die Nüchterungsdauer besonders in Verbindung mit der Stroh-Harnstoff-Ration einen Einfluß auf diesen Faktor zu haben.

Aufgrund der absoluten Hemmung der Methanbildung durch die Defaunierung wurde der Faktor Protozoen in Versuchsstufe 2 mit $^{13}\text{C-CO}_2$ -Marker auf das Vorkommen von reduktiver Acetogenese untersucht. Die Ergebnisse dieser Inkubationen sind in Abbildung 16 und Anhang 8 wiedergegeben. Hier fällt das gegenüber den Ergebnissen aus Versuchsstufe 1 insgesamt sehr viel geringere Niveau der SCFA-Summe sowie die sehr viel geringere Wirkung der Defaunierung auf. Ein Grund für das niedrigere SCFA-Niveau könnte der durch die Wasserstoffbegasung (80 % Wasserstoff, 20 % Argon in der Gasatmosphäre) sehr hohe Wasserstoffpartialdruck mit einer negativen Rückkopplung auf die Fermentation (WOLIN ET AL. 1997) sein. Weiterhin geht aus Abbildung 16 hervor, daß bei diesen Inkubationen im Gegensatz zu den Inkubationen in Versuchsstufe 1, Methan entstanden ist. Auch dies könnte mit

dem hohen Wasserstoffpartialdruck erklärt werden. Dennoch ist die Wirkung der Defaunierung auf die Methanogenese mit einer Senkung um 64 % gegenüber der nicht defaunierten Variante eindeutig.

Die Untersuchungen der Fermentationsprodukte auf doppeltmarkiertes Acetat erbrachten bei keiner der drei Inkubationen ein positives Ergebnis. Demzufolge wurde die reduktive Acetogenese mit der Defaunierung nicht initiiert.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß durch die Defaunierung in Versuchsstufe 1 die Methanogenese vollständig unterbunden wurde. Die sich in Versuchsstufe 2 anschließende Untersuchung der Fermentationsprodukte auf doppeltmarkiertes Acetat erbrachte keine Hinweise auf das Vorkommen von reduktiver Acetogenese. Hieraus läßt sich schließen, daß die Protozoen nicht ausschlaggebend für diesen Stoffwechselweg sind.

5.5.2 Verfügbarkeit von Kohlenhydraten

Der Einfluß der Verfügbarkeit von Kohlenhydraten wurde unter besonderer Berücksichtigung durch die drei Faktoren Ration sowie Nüchterungsdauer des Spendertieres und in-vitro-Substrat überprüft. Als Ration des Spendertieres diente einerseits die Heu-Krafftutter-, andererseits die Stroh-Harnstoff-Ration. Die Umstellung der Fütterung mindestens eine Woche vor der Inkubation berücksichtigte mögliche Anpassungsprozesse der mikrobiellen Biozönose im Pansen an diese kohlenhydratarme Versorgung. Der Faktor Nüchterungsdauer wurde in den Stufen 16 bzw. 24 Stunden variiert. Dabei sollten durch die längere Nüchterungsdauer Veränderungen der mikrobiellen Population während der Nüchterungszeit erfaßt werden (LEEDLE und GREENING 1988, DEHORITY und ORPIN 1997). Durch die Verwendung der drei in-vitro-Substrate Heu, Stroh und Blinddarminhalt sollten ebenfalls unterschiedliche Niveaus der Kohlenhydratversorgung im Pansen simuliert werden. Die Ergebnisse aus den Untersuchungen mit Blinddarminhalt werden vorrangig im folgenden Kapitel 5.5.3 zum Einfluß von Substanzen endogenen und mikrobiellen Ursprungs diskutiert.

Die Ration des Spendertieres hatte, gemittelt über Nüchterungsdauer und in-vitro-Substrat, auf alle gemessenen Parameter einen signifikanten Einfluß. Dabei verringerte sich mit dem Wechsel von der Heu-Krafftutter-Ration auf die Stroh-Harnstoff-Ration die Summe der entstandenen SCFA von 2010 μmol um knapp ein Drittel auf 1378 μmol (Abb. 7 und Anhang 1). Diese Senkung läßt sich vermutlich durch zwei Faktoren erklären. Zum einen ist davon auszugehen, daß der Gehalt an im Inokulum befindlichen verfügbaren Kohlenhydraten bei der Heu-Krafftutter-Ration höher ist als bei der Stroh-Harnstoff-Ration und zum anderen ist wahrscheinlich auch

die Dichte der aktiven Mikroorganismen im Inokulum bei der Heu-Kraftfutter-Ration größer (FAICHNEY ET AL. 1997). Der Gehalt an verfügbaren Kohlenhydraten sowie die im Inokulum befindliche Mikrobenmasse wurden im Rahmen dieser Untersuchungen jedoch nicht bestimmt. Der Einfluß der Ration auf die Mikrobienzusammensetzung im Inokulum und deren Auswirkung wurde von GEIBLER (1995) untersucht. Dabei wurde ein sinkendes cellulolytisches Spaltungsvermögen der Pansenflora bei Fütterung von minderwertigem Heu im Vergleich zu Heu besserer Qualität festgestellt. Die hier vorgestellten Daten bestätigen die Ergebnisse von GEIBLER (1995), wenn der Effekt der Stroh-Harnstoff-Ration mit der Wirkung von minderwertigem Heu als vergleichbar angesehen wird. FAICHNEY ET AL. (1997) untersuchten die Fütterung von Schafen mit und ohne Konzentratzulage. Dabei wurde festgestellt, daß bei der Ration mit Konzentrat mehr stärkeverbrauchende Mikroorganismen aus den Kompartimenten 1 und 2 sowie bei einer reinen Heuration vor allem "transit"-Mikroorganismen aus dem Kompartiment 3 in der flüssigen Phase des Pansensaftes anzutreffen sind. Für die vorliegende Untersuchung könnte dies bedeuten, daß durch die Entnahme von nur flüssigem Panseninhalt bei der Heu-Kraftfutter-Ration vermehrt stärkeverbrauchende Mikroorganismen und bei der Stroh-Harnstoff-Ration vermehrt "transit"-Mikroorganismen entnommen wurden.

Für die weitere Beurteilung der Ergebnisse ist die Zusammensetzung der SCFA-Summe von Bedeutung. Die prozentualen Anteile von Acetat, Propionat und Butyrat an der SCFA-Summe beliefen sich bei der Heu-Kraftfutter-Ration auf 52, 34 bzw. 15 % und bei der Stroh-Harnstoff-Ration auf 52, 36 bzw. 12 % (Abb. 7, Anhang 1). Diese nur geringfügigen Veränderungen in der SCFA-Zusammensetzung deuten darauf hin, daß keine wesentlichen Verschiebungen in der Biozönose stattgefunden haben.

Zudem ist das Methan / SCFA-Verhältnis für die Beurteilung des reduktiv acetogenen Potentials von Bedeutung. Hier ist bei der Umstellung von der Heu-Kraftfutter- auf die Stroh-Harnstoff-Ration eine signifikante Senkung dieses Verhältnisses von 0,16 auf 0,13 festzustellen (Anhang 1). In der Literatur wird im allgemeinen davon ausgegangen, daß die pro fermentierter organischer Substanz entstehenden Methanmengen mit abnehmender Verdaulichkeit des Substrates steigen (MCALLISTER ET AL. 1996, VAN KESSEL und RUSSEL 1996). MOSS ET AL. (1994 a) wiesen dagegen bei niedrigem Fütterungsniveau mit einem abnehmenden Konzentratanteil in der Ration sinkende Methanmengen pro scheinbar verdauter organischer Substanz nach. Eine mögliche Ursache für diesen Effekt wird von MOSS ET AL. (1994 a) nicht genannt. Auch KURIHARA ET AL. (1997) berichten von Untersuchungen an Ziegen, die auf dem Energieniveau des Erhaltungsbedarfs gefüttert wurden und keine veränderte Methanproduktion bei unterschiedlichen

Konzentratanteilen in der Ration zeigten. Da das pansensaftspendende Tier in den eigenen Untersuchungen ebenfalls auf dem Niveau des Erhaltungsbedarfs gefüttert wurde, würden die Ergebnisse von MOSS ET AL. (1994 a) und KURIHARA ET AL. (1997) durch die eigenen bestätigt, wenn man davon ausgeht, daß die Summe der SCFA ein Parameter für die fermentierte organische Substanz ist.

Der zweite Faktor, der hier unter Verfügbarkeit der Kohlenhydrate zusammengefaßt wird, ist die Nüchterungsdauer des Spendertieres. Die in Abbildung 8 und Anhang 1 wiedergegebenen Daten zeigen, daß, abgesehen vom Butyrat, alle gemessenen Parameter infolge der verlängerten Nüchterungsdauer vor der Pansensaftentnahme signifikant gesenkt wurden. Die Abnahme der SCFA-Summe könnte durch eine nach 24 Stunden Nüchterungsdauer verminderte Bakterienpopulation erklärt werden (DEHORITY und ORPIN 1997). Außerdem kann davon ausgegangen werden, daß durch die um 8 Stunden verlängerte Nüchterungsdauer die im Inokulum enthaltene Menge an fermentierbaren Nährstoffen vermindert wurde. Wie GEIBLER (1995) feststellte, werden in den letzten 8 Stunden einer insgesamt 24 stündigen Fermentationsphase 38 % der insgesamt entstandenen SCFA gebildet.

Die prozentualen Anteile der einzelnen Fettsäuren an den SCFA-Summe blieben in den vorliegenden Untersuchungen in Abhängigkeit von der Nüchterungsdauer nahezu unverändert (Anhang 1). Dagegen sank die Methanmenge von 271 auf 214 μmol und bewirkte damit ein von 0,15 auf 0,13 signifikant verringertes Methan/SCFA-Verhältnis. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß nach der längeren Nüchterungsdauer weniger Methan freigesetzt wurde, da auf dem Niveau des Erhaltungsbedarfs gefüttert wurde (MOSS ET AL. 1994 a, KURIHARA ET AL. 1997). Die Senkung der SCFA-Summe durch die verlängerte Nüchterungsdauer lag mit 10,5 % im Vergleich zur Rationsumstellung (31 %) wesentlich niedriger (Anhang 1).

Die in-vitro-Substrate Heu und Stroh beeinflussten sowohl die SCFA-Summe als auch die Methanmenge signifikant (Abb. 9 und Anhang 1). Die Verminderung der SCFA-Summe von 2722 auf 1683 μmol im Vergleich der in-vitro-Substrate Heu und Stroh war sehr viel deutlicher als bei Umstellung von der Heu-Krafftutter- auf die Stroh-Harnstoff-Ration. Die Zusammensetzung der SCFA-Summe wurde durch die in-vitro-Substrate Heu und Stroh allerdings nicht wesentlich beeinflusst. Die absolute Methanmenge wurde beim Vergleich der in-vitro-Substrate Heu und Stroh um 40 % gesenkt, trug damit aber nicht signifikant zu einer Änderung des Methan/SCFA-Verhältnisses bei. Im Vergleich zum in-vitro-Substrat Heu reduzierte somit das in-vitro-Substrat Stroh mit seinem relativ hohen Anteil schwer löslicher Kohlenhydrate die mikrobiellen Umsetzungsprozesse erheblich. Die verminderte Fermentation führte jedoch innerhalb der 24 stündigen Inkubationsdauer nicht zu Verschiebungen innerhalb der mikrobiellen Populationen.

Die in Tabelle 8 wiedergegebenen Einflüsse der Kombination Ration und Nüchterungsdauer zeigen, daß die Nüchterungsdauer bei der Heu-Kraftfutter-Ration keinen Einfluß auf die Menge und Zusammensetzung der SCFA hatte. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß eine um 8 Stunden verlängerte Nüchterungsdauer bei der Fütterung einer Ration mit leichter verfügbaren Nährstoffen nicht ausreicht, um die Menge der im Inokulum mitgelieferten Nährstoffe entscheidend zu verringern bzw. die mikrobielle Zusammensetzung des Inokulums deutlich zu verändern. Eine Ausnahme könnten die methanogenen Organismen sein, da durch die verlängerte Nüchterungsdauer eine von 306 auf 340 μmol signifikant erhöhte Methanmenge festgestellt wurde. Betrachtet man jedoch das Methan/ SCFA-Verhältnis, sind hier keine signifikanten Unterschiede festzustellen. Damit erscheint insgesamt die verlängerte Nüchterungsdauer bei der Heu-Kraftfutter-Ration keine bzw. nur eine sehr geringe Wirkung auf die betrachteten Parameter gehabt zu haben.

Demgegenüber wurden bei der Stroh-Harnstoff-Ration alle gemessenen Parameter durch den Übergang zu einer Nüchterungsdauer von 24 Stunden signifikant vermindert. Die SCFA-Zusammensetzung veränderte sich dabei nicht. Infolge der verlängerten Nüchterungsdauer wurde die entstandene Methanmenge allerdings von 238 um mehr als die Hälfte auf 117 μmol reduziert. Diese drastische Änderung spiegelte sich auch in dem von 0,15 auf 0,10 signifikant gesenkten Methan/ SCFA-Verhältnis wieder.

Diese Ergebnisse belegen die Wechselwirkungen zwischen Ration und Nüchterungsdauer. Als Ursache für diesen Effekt wird vermutet, daß die Aktivität der mikrobiellen Biomasse durch die geringere Nährstoffverfügbarkeit aus der Stroh-Harnstoff-Ration stark eingeschränkt wurde und mit der zusätzlichen Nüchterungsdauer die Verfügbarkeit von Nährstoffen aus dem Inokulum noch einmal limitiert wurde. Die ebenfalls signifikant verminderte Methanogenese könnte mit einer verringerten Population an methanogenen Bakterien (LEEDLE und GREENING 1988) im Inokulum zusammenhängen.

Die kombinierte Wirkung von Ration des Spendertieres und in-vitro-Substrat sind in Tabelle 9 wiedergegeben. Der Einsatz des in-vitro-Substrates Stroh führte gegenüber dem in-vitro-Substrat Heu zu einem signifikanten Rückgang der produzierten SCFA-Summe von 3062 auf 1982 μmol . Auch die einzelnen Fettsäuren nahmen annähernd proportional zur SCFA-Summe ab, so daß man nicht von einer grundlegenden Verschiebung des Fettsäuremusters sprechen kann. Dagegen war der Rückgang der entstandenen Methanmenge mit über 45 % überproportional stärker als die Reduzierung der SCFA-Summe (35 %). Dieser Unterschied spiegelt sich auch in einem höheren Methan/ SCFA-Verhältnis wieder, konnte statistisch aber nicht abgesichert werden. Damit scheint das weniger leicht verfügbare in-vitro-

Substrat Stroh zu einer allgemeinen Senkung der mikrobiellen Aktivität zu führen, ohne dabei jedoch deutliche Verschiebungen der Zusammensetzung der mikrobiellen Biozönose im Pansen hervorzurufen.

Bei der Stroh-Harnstoff-Ration zeigte sich durch die Änderung des in-vitro-Substrates von Heu auf Stroh eine Senkung der SCFA-Summe um 42 %, wobei auch hier keine grundlegende Änderung des Fettsäuremusters zu erkennen war. Die Wirkung der in-vitro-Substrate zeigte sich bei der Methanmenge mit einem Rückgang um 34 % beim Übergang von Heu auf Stroh. Im Methan/SCFA-Verhältnis war dieser Rückgang jedoch nicht signifikant. Zwischen den Faktoren Ration und in-vitro-Substrat traten damit keine für die Versuchsfrage relevanten Wechselwirkungen auf.

Die Nüchterungsdauer des Spendertieres hatte eine sehr viel geringere Wirkung auf die Fermentationsparameter als die Ration. Dies zeigte sich am deutlichsten darin, daß die SCFA-Summen für das in-vitro-Substrat Heu bei veränderter Nüchterungsdauer nicht signifikant voneinander abwichen (Tab.10). Bei der kürzeren Nüchterungsdauer ging die SCFA-Summe mit dem Wechsel des in-vitro-Substrates von Heu zu Stroh um 1008 μmol (36 %) zurück, ohne daß sich dabei das SCFA-Muster um mehr als 1 % änderte. Die Methanmenge ging mit 40 % von 506 auf 304 μmol zurück, wodurch sich das Methan/SCFA-Verhältnis jedoch nicht signifikant änderte. Wie schon weiter oben bei dem Einfluß der Faktoren Ration und in-vitro-Substrat abgeleitet, kann diese Änderung durch die geringere Verfügbarkeit der Nährstoffe aus dem in-vitro-Substrat Stroh erklärt werden.

Bei einer um 8 Stunden verlängerten Nüchterungsdauer nahm die SCFA-Summe nach dem Übergang vom in-vitro-Substrat Heu zu Stroh um 41 % ab. Gleichzeitig stieg der Anteil des Acetats um 3 Prozentpunkte auf 53 % an, während der Butyratanteil von 13 auf 11 % abnahm (Tab.10). Die Methanmenge sank von 405 auf 241 μmol , wodurch sich das Methan/SCFA-Verhältnis jedoch nicht änderte. Daher kann auch hier davon ausgegangen werden, daß die aufgetretenen Verschiebungen durch die veränderte Verfügbarkeit der Nährstoffe verursacht wurden. Diese Ergebnisse belegen, daß zwischen den Faktoren Nüchterung und in-vitro-Substrat keine signifikanten Wechselwirkungen aufgetreten sind.

Für die Beurteilung, ob eine Faktorstufe bzw. eine Kombination verschiedener Faktorstufen für die weitere Untersuchungen mit der ^{13}C -NMR in Frage kamen, waren die Reduzierung der Methanmenge, das Methan/SCFA-Verhältnis und die Rate der Wasserstoffwiederfindung ausschlaggebend. Die Reduzierung der absoluten Methanmenge sowie das Methan/SCFA-Verhältnis war in keiner der betrachteten Kombinationen besonders gravierend. Auch die

Wasserstoffwiederfindung (Abb. 13) war in keiner der Faktorkombinationen so stark abgesenkt, daß sich auf eine Initiierung der reduktiven Acetogenese schließen ließe.

Zusammenfassend ist hinsichtlich der Kohlenhydratverfügbarkeit festzuhalten, daß auch ein vermindertes Angebot leicht abbaubarer Kohlenhydrate die reduktive Acetogenese bei Pansenmikroorganismen nicht zu initiieren vermag.

5.5.3 Substanzen endogenen und mikrobiellen Ursprungs

Der Einfluß von Substanzen endogenen und mikrobiellen Ursprungs wurde durch den Einsatz des in-vitro-Substrates Blinddarminhalt untersucht. Dabei wurde davon ausgegangen, daß dieses zuvor autoklavierte in-vitro-Substrat keine lebenden Bakterien oder aktive Enzyme, aber Substanzen endogenen und mikrobiellen Ursprungs aus dem Blinddarm des Schweins enthielt. In Versuchsstufe 2 wurde zusätzlich die Wirkung von Gallensalzen in einem kombinierten RUSITEC -batch-culture-Versuch überprüft. Im folgenden werden zunächst die Ergebnisse aus den Inkubationen mit Blinddarminhalt und anschließend diejenigen der Inkubationen mit Gallensalz diskutiert. Da die Inkubationen mit defauniertem Pansensaft eine entscheidende Änderung der Fermentationsprozesse zur Folge hatten, sind die Wirkungen des in-vitro-Substrates Blinddarminhalt im defaunierten Habitat im Kapitel Protozoen diskutiert worden.

Bei allen Inkubationen mit Blinddarminhalt als in-vitro-Substrat trat gegenüber den entsprechenden Inkubationen des in-vitro-Substrates Heu eine signifikante Senkung der SCFA-Summe auf (Abb. 9, Tabelle 9 und 10, Anhang 2). Im Vergleich der Rationen beliefen sich die SCFA-Summen auf 1208 (Heu-Krafftfutter) bzw. 625 μmol (Stroh-Harnstoff) und lagen damit um 61 bzw. 74 % unter den entsprechenden Inkubationen des in-vitro-Substrates Heu (Tab. 9). Die prozentualen Anteile des Acetats variierten dabei zwischen 50 und 54 %, die des Propionats zwischen 31 und 26 %, während die des Butyrats konstant blieben. Auch der Faktor Nüchterungsdauer beeinflusste die SCFA-Zusammensetzung nur geringfügig (Tab. 10).

Die niedrigen Werte der gemessenen Parameter, die in allen Faktorkombinationen signifikant größer waren als in den vergleichbaren Inkubationen mit der Stroh-Harnstoff-Ration, können nicht allein durch den geringeren Anteil an leicht löslichen Kohlenhydraten in diesem Substrat erklärt werden. Geht man davon aus, daß leicht verfügbare Kohlenhydrate bei den in-vitro-Substraten Stroh und Blinddarminhalt in gleichen Anteilen in der Fraktion organischer Rest enthalten war, sind hier mit 12 % der TS beim Stroh und 11 % beim Blinddarminhalt keine wesentlichen Unterschiede zu erkennen (Tab. 2).

Im Vergleich der in-vitro-Substrate sind beim Blinddarminhalt bemerkenswerte Unterschiede in den Fraktionen Cellulose, Rohprotein, Asche und Rohfett festzustellen. Der Anteil der Cellulose lag mit 16 % der TS um nahezu die Hälfte niedriger als bei dem verwendeten Heu (31 % der TS). Bei einer angenommenen Verdaulichkeit der Cellulose von 50 %, würde diese weniger zur Verfügung stehende verdauliche Cellulose einer Menge von 33 mg entsprechen und damit nicht die drastische Senkung der SCFA-Summe erklären können.

Auch der im in-vitro-Substrat Blinddarminhalt enthaltene hohe Rohproteinanteil bewirkt in der mikrobiellen ruminalen Fermentation vermutlich keine deutliche Senkung der SCFA-Produktion. Der Abbau der Rohproteinfraktion führt im Pansen zur Bildung von Aminosäuren und Ammonium, die von den Mikroorganismen zur Proteinsynthese verwendet werden können. Überschüsse von nicht abgebautem Protein fließen unter in-vivo-Bedingungen in den Pansen ab, von den Mikroben nicht verwendete Aminosäuren und Ammonium werden postuminal resorbiert (GÜRTLER 1989). In der batch-culture ist zwar keine Abgabe bzw. Absorption möglich, da aber auch in-vivo starke rationsbedingte Variationen der Ammoniumgehalte auftreten können (GÜRTLER 1989), wird hier davon ausgegangen, daß der vergleichsweise hohe Proteingehalt keine wesentlichen Auswirkungen auf die untersuchten Parameter hatte.

Die Aschefraktion besteht aus Mengen- und Spurenelementen sowie Sand und Ton (KIRCHGESSNER 1987). Es wird angenommen, daß auch der hohe Aschegehalt im in-vitro-Substrat Blinddarminhalt nicht zu den vorliegenden Effekten geführt hat.

Eine weitere auffallende Eigenschaft des in-vitro-Substrates Blinddarminhalt ist der mit 6,95 % der TS vergleichsweise hohe Rohfettgehalt. Die Wirkung von Fetten als Bestandteil von Wiederkäuerrationen wird seit vielen Jahren in der Literatur intensiv diskutiert (CZERKAWSKI ET AL. 1966, PALMQUIST und JENKINS 1980, COENEN 1988, BRINKMANN 1991, IMMIG 1990, JOUANY 1994, VAN NEVEL und DEMEYER 1996, DONG ET AL. 1997, MACHMÜLLER ET AL. 1998).

Für die hier zu beantwortende Fragestellung ist zunächst die antimikrobielle Wirkung der Fette von Interesse. Bei allen Faktorkombinationen mit dem in-vitro-Substrat Blinddarminhalt wurden ähnliche SCFA-Muster (Acetat 50 %, Propionat 30 % und Butyrat 20 %) festgestellt. Verglichen mit den Inkubationen der in-vitro-Substrate Heu und Stroh fällt auf, daß in den Inkubationen mit Blinddarminhalt als in-vitro-Substrat der Propionatanteil niedriger und der Butyratanteil höher war. Dagegen gab es in den Acetatanteilen keine wesentlichen Unterschiede zwischen den drei in-vitro-Substraten. Für das Methan/SCFA-Verhältnis wurden beim in-vitro-Substrat Blinddarminhalt immer signifikant niedrigere Werte gefunden als bei Heu und Stroh.

Beim Blinddarminhalt traten zudem signifikante Wechselwirkungen auf, da sowohl bei der Ration als auch bei der Nüchterungsdauer das jeweils nährstoffärmere Habitat zu einem signifikant niedrigeren Methan/ SCFA-Verhältnis führte (Tab. 9 und 10).

Die Wirkung von Fetten auf das SCFA-Muster wird von NAGARAJA ET AL. (1997) mit einer Senkung des Acetatanteils bei gleichzeitiger Erhöhung des Propionatanteils an der SCFA-Summe beschrieben. Diese Beobachtung konnte in der vorliegenden Untersuchung nicht gemacht werden. Auch die von einigen Autoren beschriebene Abnahme des Butyrats (DEMEYER ET AL. 1969, HATCH ET AL. 1972, JENKINS 1987) wurde hier nicht bestätigt. Damit scheint der Fettanteil in der Ration nicht für eine Verschiebung der SCFA bildenden Populationen verantwortlich gewesen zu sein.

NAGARAJA ET AL. (1997) beschreiben als weitere Wirkungen einer fettreichen Fütterung die Defaunierung des Habitats sowie die Toxizität einiger Fette für methanogene Bakterien. Die mit diesen beiden Effekten einhergehende Unterdrückung der Methanogenese führt in der Regel zu einer Wasserstoffanreicherung im Habitat und damit zu einer erhöhten Propionatbildung (JOUANY 1994). Da in keiner der Inkubationen mit Blinddarminhalt als in-vitro-Substrat eine gesteigerte Propionatbildung auftrat, wird vermutet, daß mit dem Einsatz des in-vitro-Substrates Blinddarminhalt keine direkte Hemmung der Methanogenese einherging.

Eine Erklärung für die sehr deutliche Hemmung der Methanbildung beim Einsatz des Blinddarminhalts könnte die Existenz eines mit diesem in-vitro-Substrat eingebrachten Wasserstoffakzeptors sein. Dabei könnte es sich um ungesättigte Fettsäuren handeln, die durch Biohydrogenierung (HARFOOT und HAZLEWOOD 1997) den entstehenden Wasserstoff aufnehmen. Die Frage, ob dies in den vorliegenden Untersuchungen der Fall ist oder andere Inhaltsstoffe des in-vitro-Substrates Blinddarminhalt mögliche Wasserstoffsinken darstellen, wurde im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen nicht untersucht.

Aufgrund seiner in allen Faktorkombinationen gegenüber den anderen in-vitro-Substraten eindeutig senkenden Wirkung auf die Wasserstoffwiederfindung (Abb. 13) sowie der ebenso deutlichen Wirkung auf das Methan/ SCFA-Verhältnis, wurde das in-vitro-Substrat Blinddarminhalt mit in den Versuchsplan für die Versuchsstufe 2 aufgenommen.

Die bei den Inkubationen mit ^{13}C -CO₂-Marker und Wasserstoffbegasung gemessenen Konzentrationen an SCFA und Methan sind in Abbildung 16 dargestellt. Das in-vitro-Substrat Blinddarminhalt führte gegenüber der Inkubation mit dem in-vitro-Substrat Heu zu einer insgesamt niedrigeren SCFA-Produktion und zu niedrigeren Acetat- und Propionatanteilen sowie höheren Butyratanteilen. Die im

Vergleich zur Versuchsstufe 1 (Anhang 3 und 8) lassen sich mit der Wasserstoffbegasung in Versuchsstufe 2 erklären. Die in Versuchsstufe 2 sehr viel höhere Methanproduktion belegt, daß der Blinddarminhalt keine toxische Wirkung auf die methanogenen Organismen hat.

Die Analyse auf doppelt ^{13}C -markiertes Acetat erbrachte bei keiner der in Abbildung 16 dargestellten Inkubationen ein positives Ergebnis. Deshalb wird davon ausgegangen, daß keine der im Blinddarminhalt enthaltenen Substanzen endogenen und mikrobiellen Ursprungs zur Initiierung der reduktiven Acetogenese geführt hat.

Als zusätzlicher Faktor wurde in der Versuchsstufe 2 die Wirkung von Gallensalzen auf ihr Potential zur Induzierung der reduktiven Acetogenese untersucht. FLORIN und WOODS (1995) wiesen in in-vitro-Untersuchungen mit menschlichen Faeces eine gallensalzinduzierte Hemmung der Methanogenese von bis zu 56 % nach. In batch-culture-Untersuchungen mit Pansensaft beobachtete IMMIG (1998) durch den Zusatz von 0,5, 1, 1,5 und 2 % (v/v) Galle vom Schwein eine Senkung der Methanproduktion von bis zu 80 %. Dabei trat eine signifikante Senkung der Methanogenese erst ab einer Konzentration von 1 % Gallensalz in der Fermentationsflüssigkeit auf. Auch die Wasserstoffwiederfindungsrate war in diesen Untersuchungen nur bei der 1%igen Gallensalzkonzentration signifikant gesenkt. Gleichzeitig wurde in allen Inkubationen mit Gallensalzen die Acetatmenge drastisch vermindert. In einer weiteren Untersuchung wurde der gesamte Wasserstoff aus der Gasatmosphäre, unabhängig von der Gallensalzkonzentration, in Methan umgewandelt. Aus diesen Ergebnissen schloß IMMIG (1998), daß bei Zusatz von Gallensalzen keine reduktive Acetogenese stattgefunden hat.

Gallensalze werden kontinuierlich in der Leber synthetisiert, in der Gallenblase gespeichert und dann schubweise in den Dünndarm abgegeben (GÜRTLER 1989). Dort sind sie aufgrund ihrer sowohl hydrophilen als auch hydrophoben Molekülteile entscheidend an der Mizellenbildung beteiligt (YOUNG ET AL. 1996). Die polaren und unpolaren Eigenschaften sowie die schlechte Wasserlöslichkeit der Gallensalzmoleküle ähneln sehr den physikalischen Eigenschaften der langkettigen Fettsäuren. Der Effekt von langkettigen freien Fettsäuren auf die Pansenfermentation zeigt sich vor allem in der Toxizität für methanogene und Gram-positive Bakterien sowie Protozoen. Dadurch wird die Methanogenese und die cellulolytische Aktivität der Pansenfermentation deutlich gesenkt. Diese Veränderungen zeigen sich in einer verringerten Acetat-, Butyrat- und Methanproduktion sowie in einem gesteigerten Propionatanteil an der SCFA-Summe (NAGARAJA ET AL. 1997, IMMIG 1998). Daraus kann gefolgert werden, daß Gallensalz zwar nicht die reduktive Acetogenese initiieren, aber im Dickdarm ein die Methanogenese hemmender Faktor ist.

In der eigenen Untersuchung begannen die Gallensalzinfusionen am vierten Tag des RUSITEC-Verfahrens und zeigten zuerst eine deutliche Wirkung auf die Protozoenzahl, die bei den beiden mit Gallensalz behandelten Fermentern bereits am ersten Infusionstag von rund 17000 auf 6500 Protozoen/ml (Abb. 18, Anhang 10) zurückging. Am 6. Tag des RUSITEC-Ansatzes waren dann in den beiden behandelten Fermentern keine Protozoen mehr nachzuweisen. Auch die Methanogenese ging an diesen Tagen erkennbar zurück (Abb. 17 und Anhang 11).

Die Effekte des aus dem RUSITEC-System entnommenen Inokulums in der batch-culture sind in Abbildung 20 aufgezeigt. Die in der Kontrolle sehr hohe Methankonzentration kann durch den Wasserstoffanteil von 80 % in der Gasatmosphäre erklärt werden. In den beiden mit Gallensalz behandelten Inkubationen wurden bei gleicher Wasserstoffkonzentration nur noch 73 (0,4 % Gallensalz) und 26 μmol Methan (0,6 % Gallensalz) gemessen. Dieses Ergebnis unterstützt die These, daß die methanogenen Organismen durch die Wirkung der Gallensalze gehemmt wurden. Auch die SCFA-Summe wurde durch die Gallensalzbehandlung gesenkt. Das SCFA-Muster war bei den batch-culture-Inkubationen im Gegensatz zu der Inkubation im RUSITEC-System deutlich verändert. Auffallend war der mit der Gallensalzinfusion von 27 (Kontrolle) über 38 (0,4 % Gallensalz) auf 54 % (0,6 % Gallensalz) angestiegene Butyratanteil. Während der Propionatanteil mit 23 und 24 % gleich blieb, fiel der Acetatanteil an der SCFA-Summe von 50 % bei der Kontrolle auf 39 % bei 0,4 % Gallensalz und 22 % bei 0,6 % Gallensalz ab (Abb. 20, Anhang 13). Die durch die Gallensalzinfusion sinkende Acetatmenge in der batch-culture kann durch die protozoeneliminierende Wirkung des Gallensalzes erklärt werden, da Protozoen kein Propionat aber Acetat produzieren (DEMEYER und VAN NEVEL 1979). Für den sehr hohen Anteil an Butyrat konnte keine Erklärung gefunden werden.

Mit Hilfe der ^{13}C -NMR-Analyse der Fermentationsflüssigkeit wurde sowohl in der Kontrollinkubation (Abb. 21, (C) Probe mit Doppelmarkierung) als auch in einer Inkubation mit 0,4 % Gallensalz doppeltmarkiertes Acetat nachgewiesen, während in der Inkubation mit 0,6 % Gallensalz kein doppeltmarkiertes Acetat gefunden wurde. Damit wird ausgeschlossen, daß Gallensalz in höherer Konzentration für die Initiierung der reduktiven Acetogenese verantwortlich war.

Dieses Ergebnis legt den Schluß nahe, daß die Inkubation des Pansensaftes in dem Langzeit-in-vitro-System RUSITEC zu einer Förderung des reduktiv acetogenen Potentials führte. Die fördernde Wirkung kann darauf beruht haben, daß aus der flüssigen Phase des RUSITEC-Systems vor allem Mikroben aus den Kompartimenten 1 und 2 entnommen wurden.

Aus Abbildung 20 geht hervor, daß in beiden Inkubationen, bei denen die reduktive Acetogenese nachgewiesen wurde, gleichzeitig auch Methan gebildet wurde. Dieses Ergebnis entspricht nicht unbedingt den in der Literatur wiedergegebenen Vermutungen, nach denen die reduktiv acetogenen Organismen eine wesentlich niedrigere Affinität für Wasserstoff als methanogene Organismen haben (MORVAN ET AL. 1994).

Zusammenfassend kann über den Einfluß von Substanzen endogenen und mikrobiellen Ursprungs auf die Pansenfermentation festgehalten werden, daß sowohl beim in-vitro-Substrat Blinddarminhalt als auch bei der Zugabe von Gallensalzen eine deutliche die Methanbildung hemmende Wirkung festgestellt wurde. Beim autoklavierten Blinddarminhalt dürfte dieser hemmende Effekt auf eine durch dieses in-vitro-Substrat bereitgestellte Wasserstoffsенke zurückzuführen sein. Die Gallensalze hatten dagegen eine eindeutig toxische Wirkung auf die Protozoen und anscheinend auch auf methanogene Organismen. Weder die mit Blinddarminhalt zugeführten Substanzen endogenen und mikrobiellen Ursprungs noch der Zusatz von Gallensalzen haben jedoch zu einer Initiierung der reduktiven Acetogenese geführt. Die in Versuchsstufe 2 beim Einsatz der Gallensalze gewählte Kombination der Langzeit-in-vitro-Methode RUSITEC mit anschließender batch-culture-Inkubation führte jedoch zur Bildung von doppelt ^{13}C -markiertem Acetat. Unter diesen verschärft selektiven Bedingungen ließ sich demnach die reduktive Acetogenese eindeutig nachweisen.

6 **Schlußfolgerungen**

Die vorliegenden Untersuchungen haben gezeigt, daß durch eine Inkubation von Pansensaft aus dem Langzeit-in-vitro-System RUSITEC in der batch-culture die reduktive Acetogenese initiiert werden kann.

Nun muß der Frage nachgegangen werden, welche der folgenden Einflußfaktoren des RUSITEC-Systems das reduktiv acetogene Potential im Pansen fördern:

- Aufgrund einer fehlenden semipermeablen Pansenwand findet keine dynamische Absorption von Fermentationsprodukten statt und es fehlt die ökologische Nische der an der Pansenwand assoziiert lebenden Mikroben (Kompartiment 4).
- Die Zahl der Protozoen ist im RUSITEC-System relativ niedrig, da die relativ hohe Durchflußrate des Puffers zu einem Hinausspülen der Protozoen führt.
- Die Entnahme des Inokulums für die Inkubation erfolgte aus den Kompartimenten 1 und 2, dadurch wurden die fest an den Futterpartikeln anhaftenden Mikroorganismen vermutlich kaum berücksichtigt.

Da in den kombinierten RUSITEC - batch-culture Untersuchungen die Mikroorganismen aus der flüssigen Phase des Pansensaftes (Kompartimente 1 und 2) besonders unterstützt wurden, sollte in nachfolgenden Untersuchungen zunächst die Bedeutung dieser Kompartimente für die Initiierung der reduktiven Acetogenese genauer untersucht werden.

6 **Schlußfolgerungen**

Die vorliegenden Untersuchungen haben gezeigt, daß durch eine Inkubation von Pansensaft aus dem Langzeit-in-vitro-System RUSITEC in der batch-culture die reduktive Acetogenese initiiert werden kann.

Nun muß der Frage nachgegangen werden, welche der folgenden Einflußfaktoren des RUSITEC-Systems das reduktiv acetogene Potential im Pansen fördern:

- Aufgrund einer fehlenden semipermeablen Pansenwand findet keine dynamische Absorption von Fermentationsprodukten statt und es fehlt die ökologische Nische der an der Pansenwand assoziiert lebenden Mikroben (Kompartiment 4).
- Die Zahl der Protozoen ist im RUSITEC-System relativ niedrig, da die relativ hohe Durchflußrate des Puffers zu einem Hinausspülen der Protozoen führt.
- Die Entnahme des Inokulums für die Inkubation erfolgte aus den Kompartimenten 1 und 2, dadurch wurden die fest an den Futterpartikeln anhaftenden Mikroorganismen vermutlich kaum berücksichtigt.

Da in den kombinierten RUSITEC - batch-culture Untersuchungen die Mikroorganismen aus der flüssigen Phase des Pansensaftes (Kompartimente 1 und 2) besonders unterstützt wurden, sollte in nachfolgenden Untersuchungen zunächst die Bedeutung dieser Kompartimente für die Initiierung der reduktiven Acetogenese genauer untersucht werden.

7 Zusammenfassung

Der mikrobielle Syntheseweg, in dem aus Kohlendioxid und Wasserstoff Acetat gebildet wird, nennt sich reduktive Acetogenese und tritt im Dickdarm von Mensch, Schwein und Kaninchen auf. Seitdem reduktiv acetogene Bakterien auch im Pansen nachgewiesen worden sind, wird die reduktive Acetogenese als mögliche Alternative zur ruminalen Methanogenese diskutiert. Im Pansen bilden acetogene Bakterien Acetat jedoch nicht durch Reduktion von Kohlendioxid mit Wasserstoff sondern durch Oxidation von leicht löslichen Substraten.

Ausgehend von den Unterschieden zwischen den mikrobiellen Habitaten Dickdarm und Pansen wurde in der vorliegenden Arbeit in zwei Versuchsstufen untersucht, welche Faktoren die reduktive Acetogenese im Pansen initiieren können. In Versuchsstufe 1 wurde der Einfluß der Faktoren Anwesenheit von Protozoen, Ration sowie Nüchterungsdauer des Spendertieres und in-vitro-Substrat mit der in-vitro-Methode batch-culture überprüft. Die Ergebnisse aus diesem Versuch wurden anschließend anhand der Kriterien Hemmung der Methanbildung, Höhe des Methan / SCFA (flüchtige Fettsäuren)-Verhältnisses und Wasserstoffwiederfindungsrate hinsichtlich ihres Potentials zur Initiierung der reduktiven Acetogenese bewertet.

Basierend auf dieser Bewertung wurden in Versuchsstufe 2 die Effekte der Defaunierung, der endogenen Substanzen in autoklaviertem Blinddarminhalt mit der batch-culture und der Einfluß von einer 0,4 bzw. einer 0,6 %igen Gallensalzkonzentration mit dem RUSITEC-System untersucht. Dazu wurde ein Verfahren unter Verwendung der ^{13}C -Kernresonanzspektroskopie (NMR) zum direkten Nachweis der reduktiven Acetogenese eingesetzt.

Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigen, daß die Methanbildung durch Eliminierung der Protozoen im Pansensaft vollständig gehemmt wurde und es zu einer deutlichen Verschiebung des Acetat / Propionat-Verhältnisses zugunsten des Propionats kam. Das ^{13}C -CO₂-Markerverfahren im defaunierten Pansensaft gab jedoch keine Hinweise auf das Vorkommen von reduktiver Acetogenese.

Der Einfluß der Faktoren Ration sowie Nüchterungsdauer des Spendertieres und in-vitro-Substrat Heu bzw. Stroh deutete bei keinem der gemessenen Fermentationsparameter auf eine mögliche Initiierung der reduktiven Acetogenese hin.

Sowohl das in-vitro-Substrat autoklavierter Blinddarminhalt als auch die Gallensalzzugabe führten zu einer deutlichen Hemmung der Methanogenese. Dabei wurde beim Einsatz des in-vitro-Substrates Blinddarminhalt eine deutlich erniedrigte Wasserstoffwiederfindungsrate beobachtet. Die Untersuchungen mit ^{13}C -CO₂-Marker zeigten jedoch, daß die Verwendung von autoklaviertem Blinddarminhalt die

reduktive Acetogenese nicht initiieren konnte. In der Pansenflüssigkeit, die zur Überprüfung des Langzeiteffektes von Gallensalzen 7 Tage im RUSITEC-System inkubiert worden war, konnte reduktive Acetogenese im Fermenter ohne Gallensalzzugabe (Kontrolle) und in dem mit niedriger Gallensalzkonzentration nachgewiesen werden, nicht aber im Fermenter mit hoher Gallensalzkonzentration.

In der vorliegenden Arbeit werden die Einflüsse aller variierten Faktoren auf die Fermentationsparameter flüchtige Fettsäuren (SCFA), Methan, Methan/ SCFA und Wasserstoffwiederfindungsrate diskutiert. Die Tatsache, daß reduktive Acetogenese bei keiner bzw. geringer, nicht aber bei hoher Gallensalzzugabe auftrat, führte zu der Schlußfolgerung, daß der Einsatz von Gallensalzen nicht zu einer Initiierung der reduktiven Acetogenese im Pansen führt. Dagegen scheint die reduktive Acetogenese vielmehr durch Adaptation der mikrobiellen Biozönose des Pansens an das RUSITEC-System gefördert zu werden.

8 Summary

The microbial pathway forming acetate from carbon dioxide and hydrogen is called reductive acetogenesis. This pathway occurs in the human colon as well as in the caecum of pigs and rabbits. Reductive acetogenesis is discussed as an alternative pathway to ruminal methanogenesis since reductive acetogene bacteria have been detected in the rumen. In the rumen acetogene bacteria form acetate by oxidation of easily soluble substances instead of the reduction of carbon dioxide with hydrogen.

Starting with the difference between the microbial habitats of the caecum and rumen, the aim of the presented study was to investigate which factors may contribute to an initiation of reductive acetogenesis in two experimental steps. In the first step the influence of the factors presence of protozoa, diet, starving time of the donor animal and in-vitro-substrate were tested by means of the in-vitro-method batch culture. The results of these experiments were evaluated regarding their potential to initiate reductive acetogenesis by the criteria inhibition of methanogenesis, methane / SCFA (short chain fatty acids) ratio level and hydrogen recovery.

Based on this evaluation, in the second step the effects of defaunation and endogenous substances of a sterilised caecum content were tested in batch culture. The influence of 0.4 and 0.6 % bile salt concentrations were screened in the RUSITEC-System. A procedure using the ^{13}C -nuclear-mass-resonance spectroscopy (NMR) was employed to prove the presence of reductive acetogenesis directly.

The results show that by eliminating the protozoa in the rumen the methanogenesis has been inhibited completely and the acetate / propionate ratio has been altered clearly in favour of the propionate. The ^{13}C - CO_2 marker procedure in the defaunted rumen liquid, did not reveal any indication of the occurrence of reductive acetogenesis.

The influence of the factors diet, starving time of the donor animal and the in-vitro-substrates hay and straw respectively did not point to a possible initiation of reductive acetogenesis by any of the measured fermentation parameters.

The in-vitro-substrate sterilised caecum content and the addition of bile salts led to a significant inhibition of methanogenesis. Using the in-vitro-substrate sterilised caecum content, there was a reduced hydrogen recovery. The analysis with ^{13}C - CO_2 -marker showed that the use of sterilised caecum content could not initiate the reductive analysis. In the rumen liquid, which was incubated in the RUSITEC-System for 7 days to examine the long term effect of bile salts, reductive acetogenesis could be detected in the control fermenter without bile salts and in the one with 0.4 % bile salt, but not in the fermenters with high bile salt concentration.

In the presented work the influences of all varied factors on the fermentation parameters SCFA, methane, methane /SCFA ratio and hydrogen recovery are discussed. As reductive acetogenesis occurred in the fermenters without or with low bile salt content but not in the ones with high bile salt concentration it can be concluded that the addition of bile salts did not lead to the initiation of reductive acetogenesis in the rumen. However it seems that reductive acetogenesis is promoted by the adaptation of ruminal microbes to the RUSITEC-System.

Abkürzungen

Σ SCFA	Summe der kurzkettigen flüchtigen Fettsäuren
*	signifikant bei $p < 0,05$
**	signifikant bei $p < 0,01$
°C	Grad Celsius
^{13}C	Kohlenstoff der Atommasse 13 u
ADF	saure Detergentienfaser
C	Kohlenstoff
$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	Glucose
CaCl	Calciumchlorid
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$	Buttersäure
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$	Propionsäure
$\text{CH}_3\text{COCO}\text{OH}$	Pyruvat
CH_3COOH	Essigsäure
$\text{CH}_4 / \text{SCFA}$	Verhältnis von Methan zu kurzkettigen flüchtigen Fettsäuren
CH_4	Methan
CO_2	Kohlendioxid
CoCl_2	Cobaltchlorid
CuSO_4	Kupfersulfat
D_2O	schweres Wasser
FeSO_4	Eisensulfat
FS	Frischsubstanz
H_0	Nullhypothese
H_2	Wasserstoff
$\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$	destilliertes Wasser
H_2SO_4	Schwefelsäure
H_3PO_4	Phosphorsäure
HgCl	Quecksilberchlorid
H_p / H_u	Wasserstoffwiederfindungsrate
H_p	produzierter Wasserstoff
H_u	verbrauchter Wasserstoff
KCl	Kaliumchlorid
MgSO_4	Magnesiumsulfat
MJ	Mega-Joule
MnSO_4	Mangansulfat
N	Normalität
n	Stichprobenumfang

Abkürzungen

n.n.	nicht nachweisbar
n.s.	nicht signifikant
N ₂	Stickstoff
Na ₂ HPO ₄	Di-Natrium-Hydrogen-Phosphat
NaCl	Natriumchlorid
NADH	reduzierte Form von Nicotinamid-Adenindinucleotid
NaH ₂ PO ₄	Natrium-Di-Hydrogen-Phosphat
NaHCO ₃	Natrium-Hydrogen-Carbonat
NaOH	Natriumhydroxid
NDF	neutrale Detergentienfaser
NEL	Nettoenergie-Laktation
NH ₄ HCO ₃	Ammonium-Hydrogen-Carbonat
NMR	Kernresonanzspektroskopie
NUE	Nüchterungsdauer des Spendertieres
p	Wahrscheinlichkeit
PRO	Protozoen
RAT	Ration des Spendertieres
RUSITEC	Pansensimulationstechnik
SCFA	kurzkettige flüchtige Fettsäuren
SUB	in-vitro-Substrat
TAG	Versuchstag
TM	Trockenmasse
v/v	Mischungsverhältnis pro Volumeneinheit
w/v	Mischungsverhältnis Gewicht pro Volumen
Wdh	Wiederholung
XA	Rohasche
XF	Rohfaser
XL	Rohfett
XP	Rohprotein
ZnSO ₄	Zinksulfat

9 Literaturverzeichnis

- AGUILERA, J.F. und PRIETO, C. (1991): Methane production in goats given diets based on lucerne hay and barley. *Arch. Anim. Nutr.*, Berlin **41**, 77 - 82.
- BIRD, S.H., HILL, M.K. und LENG, R.A. (1979): The effects of defaunation of the rumen on the growth of lambs on low-protein-high-energy diets. *Br. J. Nutr.* **42**, 81 - 87.
- BLÜMMEL, M. und ØRSKOV, E.R. (1993): Comparison of in vitro gas production and nylon bag degradability of roughages in predicting feed intake in cattle. *Anim. Feed Sci. Technol.* **40**, 109 - 119.
- BREZNACK, J.A. und KANE, M.D. (1990): Microbial H₂/CO₂ acetogenesis in animal guts: Nature and nutritional significance. *FEMS Microbiol. Rev.* **87**, 309 - 314.
- BRINKMANN, J. (1991): Verdauungsphysiologie in vitro und in vivo - Untersuchungen zum Einfluß von freien, veresterten und verseiften Palmfettsäuren. Dissertation, Georg-August-Universität Göttingen.
- BURROUGHS, W.N., FRANK, A., GERLAUGH, P. und BETHKE, R.M. (1950): Preliminary observations upon factors influencing cellulose degestion by rumen microorganisms. *J. Nutr.* **40**, 9 - 24.
- CHENG, K.-J. und McALLISTER, T.A. (1997): Compartmentation in the rumen. In: Hobson, P.N. und Stewart, C.S.: *The rumen microbial ecosystem*. Blackie Academic & Professional, London, Weinheim, New York, Tokio, Melbourne, Madras.
- COENEN, G. (1988): In vitro-Untersuchungen mit dem RUSITEC-System zum Einfluß unterschiedlicher Fett-Stärke-Kombinationen auf verschiedene Fermentationsparameter von Pansenmikroben. Dissertation, Georg-August-Universität Göttingen.
- COLEMAN, F.S. (1985): The cellulase content of 15 species of entodiniomorphid protozoa, mixed bacteria and plant debris isolated from the ovine rumen. *J. agric. Sci., Camb.* **104**, 349 - 360.
- CRUTZEN, P.J., ASELMANN, I. und SEILER, W. (1986): Methane production of domestic animals, wild ruminants, other herbivorous fauna and humans. *Tellus* **38** B, 271 - 274.
- CZERKAWSKI, J.W. (1986): *An introduction to rumen studies*. Pergamon Press, Oxford, New York, Toronto, Sydney, Frankfurt.
- CZERKAWSKI, J.W. und BRECKENRIDGE, G. (1972): Fermentation of various glycolytic intermediates and other compounds by rumen micro-organisms, with particular reference to methane production. *Br. J. Nutr.* **27**, 131 - 146.
- CZERKAWSKI, J.W. und BRECKENRIDGE, G. (1977): Design and development of a long-term rumen simultation technique (Rusitec). *Br. J. Nutr.* **38**, 371 - 384.
- CZERKAWSKI, J.W., BLAXTER, K.L. und WAINMANN, F.W. (1966): The metabolism of oleic, linoleic and linolenic acids by sheep with reference to their effects on methane production. *Br. J. Nutr.* **20**, 349 - 362.
- DE GRAEVE, K.G., GRIVET, J.P., DURAND, M., BEAUMATIN, P., CORDELET, C., HANNEQUART, G. und DEMEYER, D.I. (1994): Competition between reductive acetogenesis and methanogenesis in the pig large-intestinal flora. *J. Appl. Bacteriol.* **76**, 55 - 61.
- DEHORITY, B.A. und ORPIN, C.G. (1997): Development of, and natural fluctuations in, rumen microbial populations. In: Hobson, P.N. und Stewart, C.S.: *The rumen microbial ecosystem*. Blackie Academic & Professional, London, Weinheim, New York, Tokio, Melbourne, Madras.

- DEMEYER, D.I. (1981): Rumen microbes and digestion of plant cell walls. *Agric. Environment* **6**, 295 - 337.
- DEMEYER, D.I. und DE GRAEVE, K. (1991): Differences in stoichiometry between rumen and hindgut fermentation. *Adv. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* **22**, 50 - 61.
- DEMEYER, D.I. und VAN NEVEL, C.J. (1979): Effect of defaunation on the metabolism of rumen micro-organisms. *Br. J. Nutr.* **42**, 515 - 524.
- DEMEYER, D.I., FIEDLER, D. und DE GRAEVE, K.G. (1996): Attempted induction of reductive acetogenesis into the rumen fermentation in vitro. *Reprod. Nutr. Dev.* **36**, 233 - 240.
- DONG, Y., BAE, H.D., McALLISTER, T.A., MATHISON, G.W. und CHENG, K.J. (1997): Lipid-induced depression of methane production and digestibility in the artificial rumen system (Rusitec). *Can. J. Anim. Sci.* **77**, 269 - 278.
- DORÉ, J., MORVAN, B., RIEU-LESME, F., GÖDEREL, I., GOUET, P. und POCHART, P. (1995): Most probable number enumeration of H₂-utilizing acetogenic bacteria from the digestive tract of animals and man. *FEMS Microbiol. Lett.* **130**, 7 - 12.
- DURAND, M. und BERNALIER, A. (1993): Reductive acetogenesis in animal and human gut. In: Rombeau, J.H., Cummings, J.L. und Sakata, T.: *Physiological and clinical aspects of short chain fatty acid metabolism*. Cambridge University Press.
- EADIE, J.M. und Gill, J.C. (1971): The effect of the absence of rumen ciliate protozoa on growing lambs fed on a roughage-concentrate diet. *Br. J. Nutr.* **26**, 155 - 167.
- FAICHNEY, G.J., PONCET, C., LASSALAS, B., JOUANY, J.P., MILLET, L., DORÉ, J. und BROWNLEE, A.G. (1997): Effect of concentrates in a hay diet on the contribution of anaerobic fungi, protozoa and bacteria to nitrogen in rumen and duodenal digesta in sheep. *Anim. Feed Sci. Technol.* **64**, 193 - 213.
- FLORIN, T.H.J. und WOODS, H.J. (1995): Inhibition of methanogenesis by human bile. *Gut* **37**, 418 - 421.
- GARCIA-LOPEZ, P.M., KUNG JR., L. und ODOM, J.M. (1996): In vitro inhibition of microbial methane production by 9,10-Anthraquinone. *J. Anim. Sci.* **74**, 2276 - 2284.
- GEIBLER, A. (1995): Radiometrisches in vitro-Verfahren zur Messung des Celluloseabbaues durch die Pansenmikroflora mit *Acetobacter*-Cellulose als Testsubstrat. Dissertation, Cuvillier, Göttingen.
- GIBSON, G.G., CUMMINGS, J.H., MACFARLANE, G.T., ALLISON, C., SEGAL, I., VORSTER, H.H. und WALKER, A.R.P. (1990): Alternative pathways for hydrogen disposal during fermentation in the human colon. *Gut* **31**, 679 - 683.
- GIBSON, G.R., MACFARLANE, G.T. und CUMMINGS, J.H. (1993): Sulphate reducing bacteria and hydrogen metabolism in the human large intestine. *Gut* **34**, 437 - 439.
- GOTTSCHALK, G. (1986): *Bacterial metabolism*. Springer, New York, Berlin.
- GOTTWALD, W. (1995): *GC für Anwender*. VCH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokio.
- GREENING, R.C. und LEEDLE, J.A.Z. (1989): Enrichment and isolation of *Acetitomaculum ruminis*, gen. nov., sp. nov.: acetogenic bacteria from the bovine rumen. *Arch. Microbiol.* **151**, 399 - 406.
- GRIVET, J.P., DURAND, M. und THOLOZAN, J.L. (1992): ¹³C-NMR studies of bacterial fermentations. *Biochimie* **74**, 897 - 901.
- GROVUM, W.L. und WILLIAMS, V.J. (1977): Rate of passage of digesta in sheep. Effects of level of food intake on mathematical predictions of the kinetics of digesta in the reticulo-rumen and intestines. *Br. J. Nutr.* **38**, 435 - 436.

- GÜRTLER, H. (1989): Die Physiologie der Verdauung und Resorption. In: Gürtler, H., Ketz, H.-A., Kolb, E., Schröder, L. und Seidel, H.: Lehrbuch der Physiologie der Haustiere. VEB Gustav Fischer, Jena.
- HARFOOT, C.G. und HAZLEWOOD, G.P. (1997): Lipid metabolism in the rumen. In: Hobson, P.N. und Stewart, C.S.: The rumen microbial ecosystem. Blackie Academic & Professional, London, Weinheim, New York, Tokio, Melbourne, Madras.
- HARMEYER, J. (1965): Zur Methodik experimenteller Untersuchungen an Pansenprotozoen. Zbl. Vet. Med. (A) **12**, 841 - 880.
- HATCH, CF., PERRY, T.W., MOHLER, M.T. und BEESON, W.M. (1972): Effect of added fat with graded levels of calcium to urea-containing rations for beef cattle. J. Anim. Sci. **34**, 483 - 487.
- HESSE, M., MEIER, H. und ZEEH, B. (1987): Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie. Georg Thieme, Stuttgart.
- HOOVER, W.H. (1978): Digestion and absorption in the hindgut of ruminants. J. Anim. Sci. **46**, 1789 - 1799.
- HUNGATE, R.E. (1966): The rumen and its microbes. Academic Press, New York und London.
- IMMIG, I. (1990): Einfluß von Fetten auf die Fermentation und die Motorik im Pansen von Schafen. Dissertation, Georg-August-Universität Göttingen.
- IMMIG, I. (1996): The rumen and hindgut as source of ruminant methanogenesis. Environmental Monitoring and Assessment **42**, 57 - 72.
- IMMIG, I. (1998): The effect of porcine bile acids on methane production by rumen contents in vitro. Arch. Anim. Nutr. **51**, 21 - 26.
- JENKINS, TC. (1987): Effekt of fats and fatty acid combinations in ruminal fermentation in semi-continuous in vitro cultures. J. Anim. Sci. **64**, 1526 - 1532.
- JOHNSON, K.A. und JOHNSON, D.E. (1995): Methane emissions from cattle. J. Anim. Sci. **73**, 2483 - 2492.
- JOUANY, J.P. (1994): Manipulation of microbial activity in the rumen. Arch. Anim. Nutr. **46**, 133 - 153.
- JOUANY, J.P. und MARTIN, C. (1997): Effect of protozoa in plant cell wall and starch digestion in the rumen. In: Onodera, R., Itabashi, H., Ushida, K., Yano, H. und Sasaki, Y.: Rumen microbes and digestive physiology in ruminants. Japan Sci. Soc. Press, Tokio/S. Karger, Basel.
- KAISER, R. (1965): Chromatographie in der Gasphase. Bibliographisches Institut, Mannheim.
- KAMLAGE, B., GRUHL, B. und BLAUT, M. (1997): Isolation and characterization of two new homoacetogenic hydrogen-utilizing bacteria from the human intestinal tract that are closely related to *Clostridium coccooides*. Appl. Environ. Microbiol. **63**, 1732 - 1738.
- KIRCHGEßNER, M. (1987): Tierernährung. DLG, Frankfurt (Main).
- KOLB, E. (1989): Die Physiologie der Ernährung. In: Gürtler, H., Ketz, H.-A., Kolb, E., Schröder, L. und Seidel, H.: Lehrbuch der Physiologie der Haustiere. VEB Gustav Fischer, Jena.
- KREUZER, M. und KIRCHGEßNER, M. (1986): Die Bedeutung der Protozoen im Pansen von Hammeln für Verdaulichkeit, N-Bilanz und N-Fractionen in Kot und Harn bei unterschiedlichen Gehalten und Arten von Stärke in der Ration. J. Anim. Physiol. a. Anim. Nutr. **56**, 217 - 231.

- KRUMHOLZ, L.R., FORSBERG, C.W. und VERA, D.M. (1983): Association of methanogenic bacteria with rumen protozoa. *Can. J. Microbiol.* **29**, 676 - 680.
- KURIHARA, M., SHIBATA, M., NISHIDA, T., PURNOMOADI, A. und TERADA, F. (1997): Methane production and its dietary manipulation in ruminants. In: Onodera, R., Itabashi, H., Ushida, K., Yano, H. und Sasaki, Y.: Rumen microbes and digestive physiology in ruminants. Japan Sci. Soc. Press, Tokio/S. Karger, Basel.
- LAJOIE, S.F., BANK, S., MILLER, T.L. und WOLIN, M.J. (1988): Acetate production from hydrogen and (¹³C) carbon dioxide by the microflora of human feces. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 2723 - 2727.
- LE VAN, T.D., ROBINSON, J.A., RALPH, J., GREENING, R.C., SMOLENSKI, W.J., LEEDLE, J.A.Z. und SCHAEFER, D.M. (1998): Assessment of reductive acetogenesis with indigenous ruminal bacterium populations and *Acetivomaculum ruminis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 3429 - 3436.
- LECLERC, M., BERNALIER, A., DONADILLE, G. und LELAIT, M. (1997): H₂/CO₂ metabolism in acetogenic bacteria isolated from the human colon. *Anaerobe* **3**, 307 - 315.
- LEEDLE, J.A.Z. und GREENING, R.C. (1988): Postprandial changes in methanogenic and acidogenic bacteria in the rumens of steers fed high - or low - forage diets once daily. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 502 - 506.
- LEINMÜLLER, E. und MENKE, K.H. (1986): Wirkung einer Defaunierung des Panseninhalts. *Übers. Tierernährg.* **14**, 75 - 100.
- LENG, R.A. (1988): Dynamics of protozoa in the rumen. In: Nolan, J.V., Leng, R. A. und Demeyer, D. I.: The roles of protozoa and fungi in ruminant digestion. *Pernambul Books, Armidale, Australia*, 51 - 58.
- LITTEL, R.C., MLLIKEN, G.A., STROUP, W.W. und WOLFINGER, R.D. (1996): SAS system for mixed models. SAS Institute Inc., Cary.
- MACHMÜLLER, A., OSSOWSKI, D.A., WANNER, M. und KREUZER, M. (1998): Potential of various fatty feeds to reduce methane release from rumen fermentation in vitro (RUSITEC). *Anim. Feed Sci. Technol.* **71**, 117 - 130.
- MACKIE, R.I. und BRYANT, M.P. (1994): Acetogenesis and the rumen: Syntrophic relationships. In: Drake, H.L.: *Acetogenesis*, Chapman & Hall, New York, 331 - 364.
- MARTY, R.J. und DEMEYER, D.I. (1973): The effect of inhibitors of methane production on fermentation pattern and stoichiometry in vitro using rumen contents from sheep given molasses. *Br. J. Nutr.* **30**, 369 - 376.
- MATHIEU, F., JOUANY, J.P., SÉNAUD, J., BOHATIER, J., BERTIN, G. und MERCIER, M. (1996): The effect of *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae* on fermentations in the rumen of faunated and defaunated sheep; protozoal and probiotic interactions. *Reprod. Nutr. Dev.* **36**, 271 - 287.
- MCALLISTER, T.A., OKINE, E.K., MATHISON, G.W. und CHENG, K-J. (1996): Dietary, environmental and microbiological aspects of methane production in ruminants. *Can. J. Anim. Sci.* **76**, 231 - 243.
- MERCK (1987): *Handbuch Chromato Integrator D 2000*. Fa. Merck, Darmstadt.
- MILLER, T.L. (1995): Ecology of methane production and hydrogen sinks in the rumen. In: *Ruminant Physiology: Digestion, Metabolism, Growth and Reproduction: Proceedings of the VIII International Symposium on ruminant physiology*. Ferdinand Enke, Stuttgart.

- MORVAN, B., DORÉ, J., RIEU-LESME, F., FOUCAT, L., FONTY, G. und GOUET, P. (1994): Establishment of hydrogen-utilizing bacteria in the rumen of the newborn lamb. *FEMS Microbiol. Lett.* **117**, 249 - 256.
- MORVAN, B., RIEU-LESME, F., FONTY, G. und GOUET, P. (1996): In vitro interactions between rumen H₂-producing cellulolytic microorganisms and H₂-utilizing acetogenic and sulfate-reducing bacteria. *Anaerobe* **2**, 175 - 180.
- MOSS, A.R. (1993): Methane – Global warming and production by animals, Chalcombe Publications, Kingston, Canterbury, Kent, GB.
- MOSS, A.R. (1994 a): Methane production by ruminants - Literature review of I. Dietary manipulation to reduce methane production and II. Laboratory procedures for estimating methane potential of diets. *Nutrition abstracts and reviews (Series B)* **64**, 785 - 806.
- MOSS, A.R., GIVENS, D.I. und GARNSWORTHY, P.C. (1994): The effect of alkali treatment of cereal straws on digestibility and methane production by sheep. *Anim. Feed Sci. Technol.* **49**, 254 - 259
- NAGARAJA, T.G., NEWBOLD, C.J., VAN NEVEL, C.J. und DEMEYER, D.I. (1997): Manipulation of ruminal fermentation. In: Hobson, P.N. und Stewart, C.S.: The rumen microbial ecosystem. Blackie Academic & Professional, London, Weinheim, New York, Tokio, Melbourne, Madras.
- NETER, J., KUTNER, M.H., NACHTSHEIM, C.J. und WASSERMANN, W. (1996): Applied linear statistical models. Irwin, Chicago.
- NOLLET, L. und VERSTRAETE, W. (1996): Gastro-enteric methane versus sulphate and volatile fatty acid production. *Environmental Monitoring and Assessment* **42**, 113 – 131.
- NOLLET, L., DEMEYER, D.I. und VERSTRAETE, W. (1997): Effect of 2-bromoethanesulfonic acid and *Peptostreptococcus productus* ATCC 35244 addition on stimulation of reductive acetogenesis in the ruminal ecosystem by selective inhibition of methanogenesis. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 194 - 200.
- NOLLET, L., MBANZAMHIGO, L., DEMEYER, D.I. und VERSTRAETE, W. (1998): Effect of the addition of *Peptostreptococcus productus* ATCC 35244 on reductive acetogenesis in the ruminal ecosystem after inhibition of methanogenesis by cell-free supernatant of *Lactobacillus plantarum* 80. *Anim. Feed Sci. Technol.* **71**, 49 - 66.
- PALMQUIST, D.L. und JENKINS, T.C. (1980): Fat in lactation rations. *J. Dairy Sci.* **63**, 1 - 14.
- PIATTONI, F., DEMEYER, D.I. und MAERTENS, L. (1996): In vitro study of the age dependent caecal fermentation pattern and methanogenesis in young rabbits. *Reprod. Nutr. Dev.* **36**, 253-261.
- RIEU-LESME, F., MORVAN, B., COLLINS, M.D., FONTY, G. und WILLEMS, A. (1996): A new H₂/CO₂-using acetogenic bacterium from the rumen: Description of *Ruminococcus schinkii* sp. nov.. *FEMS Microbiol. Lett.* **140**, 281 - 286.
- SHARP, R., ZIEMER, C.J., STERN, M.D. und STAHL, D.A. (1998): Taxon-specific associations between protozoal and methanogen populations in the rumen and a model rumen system. *FEMS Microbiol. Ecology* **26**, 71 - 78.
- STEVANI, J., DURAND, M., DE GRAEVE, K., DEMEYER, D.I. und GRIVET, J.P. (1991): Degradative abilities and metabolisms of rumen and hindgut microbial ecosystems. In: Sakata, T. und Snipes, R. L. : Hindgut '91. Senshu University Press, Tokio, 123 - 135.

- USHIDA, K., TOKURA, M., TAKENAKA, A. und ITABASHI, H. (1997): Ciliate protozoa and ruminal methanogenesis. In: Onodera, R., Itabashi, H., Ushida, K., Yano, H. und Sasaki, Y.: Rumen microbes and digestive physiology in ruminants. Japan Sci. Soc. Press, Tokio / S. Karger, Basel.
- VAN KESSEL, J.A.S. und RUSSELL, J.B. (1996): The effect of pH on ruminal methanogenesis. *FEMS Microbiol. Ecology* **20**, 205 - 210.
- VAN NEVEL, C.J. und DEMEYER, D.I. (1992): Influence of antibiotics and a deaminase inhibitor on volatile fatty acids and methane production from detergent washed hay and soluble starch by rumen microbes in vitro. *Anim. Feed Sci. Technol.* **37**, 21 - 31.
- VAN NEVEL, C.J. und DEMEYER, D.I. (1996): Effect of pH on biohydrogenation of polyunsaturated fatty acids and their Ca-salts by rumen microorganisms. *Arch. Anim. Nutr.* **49**, 151 - 157.
- VEIRA, D.M., VAN, M. und JUI, P.Y. (1983): Rumen ciliate protozoa: Effects on digestion in the stomach of sheep. *J. Dairy Sci.* **66**, 1015 - 1022.
- WETZEL, R. (1951): Verbesserte McMaster-Zählkammer zum Auszählen von Wurmeiern. *Tierärztl. Umsch.* **6**, 209 - 210.
- WHITELAW, F.G., EADIE, J.M., BRUCE, L.A. und SHAND, W.J. (1984): Methane formation in faunated and ciliate-free cattle and its relationship with rumen volatile fatty acid proportions. *Br. J. Nutr.* **52**, 261 - 275.
- WILLIAMS, A.G. und COLEMAN, G.S. (1997): The rumen protozoa. In: Hobson, P.N. und Stewart, C.S.: *The rumen microbial ecosystem*. Blackie Academic & Professional, London, Weinheim, New York, Tokio, Melbourne, Madras.
- WOLIN, M.J. (1960): A theoretical rumen fermentation balance. *J. Dairy Sci.* **40**, 1452 - 1459.
- WOLIN, M.J. und MILLER, T.L. (1993): Bacterial strains from Human Feces that reduce CO₂ to acetic acid. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 3551 - 3556.
- WOLIN, M.J., MILLER, T.L. und STEWART, C.S. (1997): Microbe-microbe interactions. In: Hobson, P.N. und Stewart, C.S.: *The rumen microbial ecosystem*. Blackie Academic & Professional, London, Weinheim, New York, Tokio, Melbourne, Madras.
- YOUNG, J.A., COOK, D.I. LINGARD, J.M., VAN LENNEP, E.W. und WEGMAN, E. (1996): Funktion des Magen-Darm-Trakts. In: Klinke, R. und Silbernagel, S.: *Lehrbuch der Physiologie*. Georg Thieme, Stuttgart und New York.

Verzeichnis der Abbildungen, Tabellen, Übersichten und des Anhangs

Abbildungen

Nr:	Titel	Seite
1	Schematische Darstellung der Fermentationsvorgänge im Pansen.	2
2	Schematische Darstellung der Fermentationsprozesse im Pansen unter Einbeziehung einer autotrophen reduktiven Acetogenese.	3
3	Inkubationsgefäß für batch-culture.	13
4	Schematischer Aufbau eines RUSITEC-Fermenters (CZERKAWSKI und BRECKENRIDGE 1977).	16
5	Darstellung der Linearitätsüberprüfung der Gasanalysen nach GOTTWALD (1995).	21
6	Darstellung der Linearitätsüberprüfung nach GOTTWALD (1995).	24
7	Einfluß der Ration des Spendertieres auf die Bildung von SCFA und Methan in der batch-culture (n = 54).	30
8	Einfluß der Nüchterungsdauer des Spendertieres vor der Pansensaftentnahme auf die Bildung von SCFA und Methan in der batch-culture (n = 54).	31
9	Einfluß des in-vitro-Substrates auf die Bildung von SCFA und Methan in der batch-culture (n = 54).	32
10	Einfluß der Ration des Spendertieres auf die Bildung von SCFA in der batch-culture unter Verwendung von defauniertem Pansensaft (n = 54).	36
11	Einfluß der Nüchterungsdauer des Spendertieres auf die Bildung von SCFA in der batch-culture unter Verwendung von defauniertem Pansensaft (n = 54).	37
12	Einfluß des in-vitro-Substrates auf die Bildung von SCFA in der batch-culture unter Verwendung von defauniertem Pansensaft (n = 54).	38
13	Wasserstoffwiederfindungsraten der Inkubationen mit nicht defauniertem (A) und defauniertem Pansensaft (B) (n = 9).	42
14	Einfluß der Begasung mit 80 % Argon (n = 2) bzw. 80 % Wasserstoff (n = 3) in der Gasatmosphäre einer batch-culture-Inkubation mit Bakterien aus dem Schweinedarm.	44
15	Einfluß der Begasung mit Argon (n = 2) und Wasserstoff (n = 3) in der Gasatmosphäre der batch-culture Inkubation mit Bakterien aus dem Schweinedarm auf die Entstehung von ¹³ C-CO ₂ -markiertem Acetat.	44
16	Einfluß der in-vitro-Substrate Heu und Blinddarminhalt sowie der Defaunierung auf die Entstehung von SCFA und Methan in der batch-culture (n = 3).	45
17	Einfluß der Infusion von 0,4 % und 0,6 % Gallensalz (w/v) auf die Methanogenese in dem RUSITEC-System.	46

Abbildungen

Nr:	Titel	Seite
18	Einfluß der Infusion von 0,4 und 0,6 % Gallensalz (w/v) auf die in der Fermentationsflüssigkeit des RUSITEC-Systems vorhandenen Protozoen.	47
19	Mengen der in dem RUSITEC-Systems pro Tag und Fermenter entstandenen SCFA.	48
20	Einfluß der Entwicklung der Biozönose im RUSITEC-System auf die Fermentationsprodukte einer 24 stündigen Inkubation in der batch-culture (n = 3).	49
21	¹³ C-NMR Spektren ohne (A, B) und mit (C) doppeltmarkiertem Acetat.	50

Tabellen

Nr:	Titel	Seite
1	Ration 1 und 2 für die HF-Kuh.	10
2	Inhaltsstoffe der verwendeten in-vitro-Substrate.	14
3	Chromatographiebedingungen zur Bestimmung der Gaszusammensetzung des Fermentationsgases.	20
4	Chromatographiebedingungen zur Bestimmung der kurzkettigen flüchtigen Fettsäuren (SCFA) nach Verfahren 1.	22
5	Chromatographiebedingungen zur Bestimmung der kurzkettigen flüchtigen Fettsäuren (Verfahren 2).	23
6	Berechnungsgrundlage zur Herstellung eines SCFA Standardgemischs.	23
7	Variationskoeffizienten wiederholter Messungen, bestimmt nach GOTTWALD (1995).	25
8	Einfluß von Ration und Nüchterungsdauer auf die Bildung von SCFA und Methan in der batch-culture (n = 27).	33
9	Einfluß von Ration und in-vitro-Substrat auf die Bildung von SCFA und Methan in der batch-culture (n = 27).	34
10	Einfluß von Nüchterungsdauer und in-vitro-Substrat auf die Bildung von SCFA und Methan in der batch-culture (n = 27).	34
11	Einfluß von Ration sowie Nüchterungsdauer auf die Bildung von SCFA in der batch-culture (n = 27).	39
12	Einfluß von Ration und in-vitro-Substrat auf die Bildung von SCFA in der batch-culture (n = 18).	39
13	Einfluß von Nüchterungsdauer und in-vitro-Substrat auf die Bildung von SCFA in der batch-culture (n = 18).	40

Übersichten

Nr:	Titel	Seite
1	Zuordnung der Arbeitshypothesen zu den unabhängigen Faktoren und deren Faktorstufen.	6
2	Versuchsdesign für in-vitro-Untersuchungen mit insgesamt 9 Faktorstufen der Faktoren Protozoen, Ration sowie Nüchterungsdauer des Spendertieres und in-vitro-Substrat.	7
3	Übersicht über die mit ^{13}C -CO ₂ -Marker durchgeführten Versuche sowie deren Behandlungen und Zuordnung zu den unabhängigen Faktoren.	8
4	Versuchsplan für in-vitro-Untersuchungen zum Nachweis der reduktiven Acetogenese	9
5	Überblick über Haupt- und Wechselwirkungen der unabhängigen Faktoren auf die erhobenen Parameter bei nicht defauniertem Pansensaft.	29
6	Überblick über die Haupt- und Wechselwirkungen der unabhängigen Faktoren auf die erhobenen Parameter bei defauniertem Pansensaft.	35

Anhang

Nr:	Titel	Seite
1	Einfluß von Ration, Nüchterungsdauer und in-vitro-Substrat auf SCFA, Methan, Wasserstoffwiederfindungsrate (H_u/H_p) und Methan/SCFA-Verhältnis im nicht defaunierten Pansensaft (Ration und Nüchterungsdauer $n = 54$, in-vitro-Substrat $n = 36$).	81
2	Einfluß von Ration, Nüchterungsdauer und in-vitro-Substrat auf SCFA und Wasserstoffwiederfindungsrate (H_u/H_p) im defaunierten Pansensaft (Ration und Nüchterungsdauer $n = 54$, in-vitro-Substrat $n = 36$).	81
3	Einfluß von Ration, Nüchterungsdauer und in-vitro-Substrat auf SCFA, Methan und Methan/SCFA-Verhältnis im nicht defauniertem Pansensaft ($n = 9$).	82
4	Einfluß von Ration, Nüchterungsdauer und in-vitro-Substrat auf SCFA im defauniertem Pansensaft ($n = 9$).	83
5	Wasserstoffwiederfindungsraten (H_u/H_p) aller 24 möglichen Faktorkombinationen ($n = 9$).	84
6	Einfluß der Begasung mit 80 % Argon bzw. 80 % Wasserstoff in der Gasatmosphäre einer batch-culture-Inkubation mit Bakterien aus dem Schweinedarm auf SCFA und Methan ($n = 2$ bei Argon, $n = 3$ bei Wasserstoff).	84
7	Anteile einfach und doppelt ^{13}C -CO ₂ -markierter Essigsäure in mit Argon bzw. Wasserstoff begasteten Inkubationsgefäßen.	84

Anhang

Nr:	Titel	Seite
8	Einfluß der in-vitro-Substrate Heu und Blinddarminhalt sowie der Defaunierung des Inokulums mit Synperonic auf SCFA und Methan (n = 3).	85
9	Einfluß unterschiedlicher Gallensalzkonzentrationen auf SCFA, Methan und Methan / SCFA-Verhältnis in den einzelnen Fermentern des RUSITEC-Systems.	85
10	Einfluß unterschiedlicher Gallensalzkonzentrationen auf die Protozoenzahl im RUSITEC-System.	85
11	Einfluß unterschiedlicher Gallensalzkonzentrationen auf SCFA, Methan, Wasserstoff-wiederfindungsrate (Hu/Hp) und Methan / SCFA-Verhältnis im RUSITEC-System.	86
12	Einfluß unterschiedlicher Gallensalzkonzentrationen auf SCFA und deren prozentuale Zusammensetzung im RUSITEC-System.	87
13	Einfluß unterschiedlicher Gallensalzkonzentrationen im RUSITEC-System auf SCFA und Methan in der batch-culture.	87
14	¹³ C-NMR Spektren von Kohlenstoffatomen des Acetats einiger in-vitro-Inkubationen.	88
15:	Originaldaten der batch-culture-Untersuchungen mit nicht defauniertem Pansensaft.	91
16	Originaldaten der batch-culture-Untersuchungen mit defauniertem Pansensaft.	96
17	Codierung zu Anhang 15 und 16.	97

10 Anhang

Anhang 1: Einfluß von Ration, Nüchterungsdauer und in-vitro-Substrat auf SCFA, Methan, Wasserstoffwiederfindungsrate (H_u/H_p) und Methan/SCFA-Verhältnis im nicht defaunierten Pansensaft (Ration und Nüchterungsdauer n = 54, in-vitro-Substrat n = 36).

nicht defaunierter Pansensaft	SCFA µmol	Acetat		Propionat		Butyrat		CH ₄ µmol	H _u /H _p %	CH ₄ /SCFA
		µmol	%	µmol	%	µmol	%			
Ration										
Heu-Krafftutter	2010	1036	52	674	34	301	15	323	81	0,16
Stroh-Harnstoff	1378	713	52	499	36	166	12	173	75	0,13
Nüchterungsdauer										
16 Stunden	1774	924	52	617	35	234	13	271	80	0,15
24 Stunden	1586	813	51	550	35	223	14	214	76	0,13
in-vitro-Substrat										
Heu	2722	1387	50	993	36	342	24	454	88	0,17
Stroh	1683	880	52	616	36	186	21	272	87	0,16
Blinddarminhalt	891	459	51	259	29	173	37	78	62	0,09
Mittel	1721	887	51	601	34	232	19	255	78	0,14

Anhang 2: Einfluß von Ration, Nüchterungsdauer und in-vitro-Substrat auf SCFA und Wasserstoffwiederfindungsrate (H_u/H_p) im defaunierten Pansensaft (Ration und Nüchterungsdauer n = 54, in-vitro-Substrat n = 36).

defaunierter Pansensaft	SCFA µmol	Acetat		Propionat		Butyrat		H _u /H _p %
		µmol	%	µmol	%	µmol	%	
Ration								
Heu	718	251	35	381	53	86	12	77
Stroh	576	243	42	265	46	68	12	65
Nüchterungsdauer								
16 Stunden	722	262	36	384	53	76	10	76
24 Stunden	573	233	41	262	46	78	14	66
in-vitro-Substrat								
Heu	1130	400	35	640	57	89	8	81
Stroh	378	120	32	222	59	37	10	85
Blinddarminhalt	561	264	47	182	32	116	21	50
Mittel	665	253	38	334	49	79	12	71

Anhang 3: Einfluß von Ration, Nüchterungsdauer und in-vitro-Substrat auf SCFA, Methan und Methan / SCFA-Verhältnis im nicht defauniertem Pansensaft (n = 9).

nicht defaunierter Pansensaft										
Ration Heu-Krafftutter										
Nüchterungs- dauer	in-vitro-Substrat	SCFA	Acetat		Propionat		Butyrat		CH ₄	CH ₄ /SCFA
		µmol	µmol	%	µmol	%	µmol	%	µmol	
16 Stunden	Heu	2944	1582	54	970	33	392	13	561	0,19
	Stroh	1949	996	51	726	37	227	12	311	0,16
	Blinddarminhalt	1201	605	50	369	31	227	19	125	0,10
24 Stunden	Heu	3185	1621	51	1065	33	499	16	623	0,20
	Stroh	2017	1063	53	692	34	262	13	344	0,17
	Blinddarminhalt	1215	594	49	379	31	242	20	139	0,11
Ration Stroh-Harnstoff										
Nüchterungs- dauer	in-vitro-Substrat	SCFA	Acetat		Propionat		Butyrat		CH ₄	CH ₄ /SCFA
		µmol	µmol	%	µmol	%	µmol	%	µmol	
16 Stunden	Heu	2699	1359	50	1061	39	278	10	454	0,17
	Stroh	1671	878	53	606	36	187	11	297	0,18
	Blinddarminhalt	739	398	54	210	28	130	18	61	0,08
24 Stunden	Heu	2141	1029	48	882	41	230	11	234	0,11
	Stroh	1194	611	52	459	38	113	9	158	0,13
	Blinddarminhalt	502	282	56	126	25	94	19	22	0,04

Anhang 4: Einfluß von Ration, Nüchterungsdauer und in-vitro-Substrat auf SCFA im defauniertem Pansensaft (n = 9).

defaunierter Pansensaft								
Ration Heu-Krafftfutter								
Nüchterungs- dauer	in-vitro-Substrat	SCFA µmol	Acetat		Propionat		Butyrat	
			µmol	%	µmol	%	µmol	%
16 Stunden	Heu	1419	459	32	858	60	102	7
	Stroh	434	105	24	282	65	46	11
	Blinddarminhalt	616	253	41	234	38	130	21
24 Stunden	Heu	1229	448	36	710	58	71	6
	Stroh	341	101	30	193	57	47	14
	Blinddarminhalt	639	262	41	229	36	147	23
Ration Stroh-Harnstoff								
Nüchterungs- dauer	in-vitro-Substrat	SCFA µmol	Acetat		Propionat		Butyrat	
			µmol	%	µmol	%	µmol	%
16 Stunden	Heu	1089	393	36	647	59	49	4
	Stroh	460	165	36	264	57	32	7
	Blinddarminhalt	622	283	45	213	34	126	20
24 Stunden	Heu	854	308	36	394	46	152	18
	Stroh	297	112	38	160	54	25	8
	Blinddarminhalt	403	225	63	80	20	68	17

Anhang 5: Wasserstoffwiederfindungsraten (H_u/H_p) aller 24 möglichen Faktorkombinationen ($n = 9$). Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den in-vitro-Substraten bei gleicher Ration und Nüchterungsdauer, Tukey-Kramer-Test, $p < 0,05$.

Ration Heu-Krafftfutter			
Nüchterungsdauer	in-vitro-Substrat	H_u/H_p (%)	
		nicht defauniert	Defauniert
16 Stunden	Heu	87 ^a	91 ^a
	Stroh	88 ^a	98 ^a
	Blinddarminhalt	69 ^b	59 ^b
24 Stunden	Heu	90 ^a	83 ^a
	Stroh	85 ^a	83 ^a
	Blinddarminhalt	72 ^b	56 ^b
Ration Stroh-Harnstoff			
Nüchterungsdauer	in-vitro-Substrat	H_u/H_p (%)	
		nicht defauniert	Defauniert
16 Stunden	Heu	92 ^a	82 ^a
	Stroh	89 ^a	81 ^a
	Blinddarminhalt	61 ^b	52 ^b
24 Stunden	Heu	83 ^a	69 ^a
	Stroh	84 ^a	77 ^a
	Blinddarminhalt	50 ^b	34 ^b

Anhang 6: Einfluß der Begasung mit 80 % Argon bzw. 80 % Wasserstoff in der Gasatmosphäre einer batch-culture-Inkubation mit Bakterien aus dem Schweinedarm auf SCFA und Methan ($n = 2$ bei Argon, $n = 3$ bei Wasserstoff).

Begasung	µmol				
	SCFA	Acetat	Propionat	Butyrat	CH ₄
Argon	997,18	646,450	207,200	143,530	117,828
Wasserstoff	1072,50	701,333	208,267	162,927	192,253

Anhang 7: Anteile einfach und doppelt ¹³C-CO₂-markierter Essigsäure in mit Argon bzw. Wasserstoff begasteten Inkubationsgefäßen.

Begasung	% an Gesamtacetat		
	CH ₃ + ¹³ COOH	¹³ CH ₃ + COOH	¹³ COOH + ¹³ CH ₃
Argon	15,89	14,53	2,96
Argon	13,32	13,22	2,79
H ₂	23,26	26,92	8,42
H ₂	17,91	22,55	6,74
H ₂	21,07	26,78	6,47

Anhang 8: Einfluß der in-vitro-Substrate Heu und Blinddarminhalt sowie der Defaunierung des Inokulums mit Synperonic auf SCFA und Methan (n = 3).

in-vitro-Substrat	µmol				
	SCFA	Acetat	Propionat	Butyrat	CH ₄
Heu	841,67	478,76	226,98	135,93	1221,75
Blinddarminhalt	560,13	296,18	118,50	145,45	1136,47
Synperonic	763,41	413,23	302,65	47,53	430,01

Anhang 9: Einfluß unterschiedlicher Gallensalzkonzentrationen auf SCFA, Methan und Methan / SCFA-Verhältnis in den einzelnen Fermentern des RUSITEC.

Fermenter	µmol					
	F 1	F 2	F 3	F 4	F 5	F 6
Gallensalz (%) (w/v)	0,00	0,25	0,50	1,00	1,50	2,00
SCFA	28,27	24,95	21,45	16,89	15,94	12,87
Acetat	15,40	13,30	11,73	9,05	8,29	6,61
Propionat	6,31	5,50	5,95	6,37	6,49	5,33
Butyrat	3,06	3,12	2,61	1,40	1,11	0,89
CH ₄	3,50	3,03	1,16	0,07	0,05	0,04
CH ₄ / SCFA	0,12	0,12	0,05	0,00	0,00	0,00

Anhang 10: Einfluß unterschiedlicher Gallensalzkonzentrationen auf die Protozoenzahl im RUSITEC.

Tag	Protozoen / ml Fermenterflüssigkeit		
	Kontrolle	0,4 % Gallensalz	0,6 % Gallensalz
1	35714	29337	25510
2	17857	17219	16582
3	18160	17114	15937
4	17857	6803	6378
5	11054	638	1063
6	14541	38	38

Anhang 11: Einfluß unterschiedlicher Gallensalzkonzentrationen auf SCFA, Methan, Wasserstoffwiederfindungsrate (H_u/H_p) und Methan/SCFA-Verhältnis im RUSITEC.

Tag	Gallensalz- konzentration	mmol					%	H_u/H_p	CH ₄ /SCFA
		SCFA	Acetat	Propionat	Butyrat	CH ₄			
1	Kontrolle	45,53	31,34	9,50	4,69	4,89	53	0,11	
	kein Gallensalz	45,78	31,41	9,57	4,80	9,94	75	0,22	
	kein Gallensalz	43,37	30,18	9,32	3,87	8,53	71	0,20	
2	Kontrolle	52,58	34,45	12,34	5,79	12,2	81	0,23	
	kein Gallensalz	44,11	28,85	10,37	4,89	11,58	88	0,26	
	kein Gallensalz	47,21	31,23	11,23	4,75	10,52	80	0,22	
3	Kontrolle	40,06	26,23	9,43	4,40	7	70	0,17	
	kein Gallensalz	46,59	30,53	10,85	5,21	9,55	76	0,20	
	kein Gallensalz	46,67	30,78	11,19	4,70	10,6	81	0,23	
4	Kontrolle	46,46	30,33	11,34	4,79	7,86	70	0,17	
	Gallensalz 0,4 %	40,41	26,18	9,44	4,79	8,06	75	0,20	
	Gallensalz 0,6 %	37,44	24,42	9,02	4,00	9,46	86	0,25	
5	Kontrolle	46,45	29,28	11,73	5,44	6,05	64	0,13	
	Gallensalz 0,4 %	39,75	25,60	9,45	4,70	4,85	60	0,12	
	Gallensalz 0,6 %	42,36	27,02	10,64	4,70	0	37	0,00	
6	Kontrolle	35,36	22,40	9,33	3,63	6,41	75	0,18	
	Gallensalz 0,4 %	28,61	17,17	7,89	3,55	2,18	56	0,08	
	Gallensalz 0,6 %	30,08	18,29	8,49	3,30	1,72	52	0,06	

Anhang 12: Einfluß unterschiedlicher Gallensalzkonzentrationen auf SCFA und deren prozentuale Zusammensetzung im RUSITEC.

Tag	Gallensalz- konzentration	µmol SCFA	% an SCFA		
			Acetat	Propionat	Butyrat
1	Kontrolle	45,53	69	21	10
	kein Gallensalz	45,78	69	21	10
	kein Gallensalz	43,37	70	21	9
2	Kontrolle	52,58	66	23	11
	kein Gallensalz	44,11	65	24	11
	kein Gallensalz	47,21	66	24	10
3	Kontrolle	40,06	65	24	11
	kein Gallensalz	46,59	66	23	11
	kein Gallensalz	46,67	66	24	10
4	Kontrolle	46,46	65	24	10
	Gallensalz 0,4%	40,41	65	23	12
	Gallensalz 0,6%	37,44	65	24	11
5	Kontrolle	46,45	63	25	12
	Gallensalz 0,4%	39,75	64	24	12
	Gallensalz 0,6%	42,36	64	25	11
6	Kontrolle	35,36	63	26	10
	Gallensalz 0,4%	28,61	60	28	12
	Gallensalz 0,6%	30,08	61	28	11

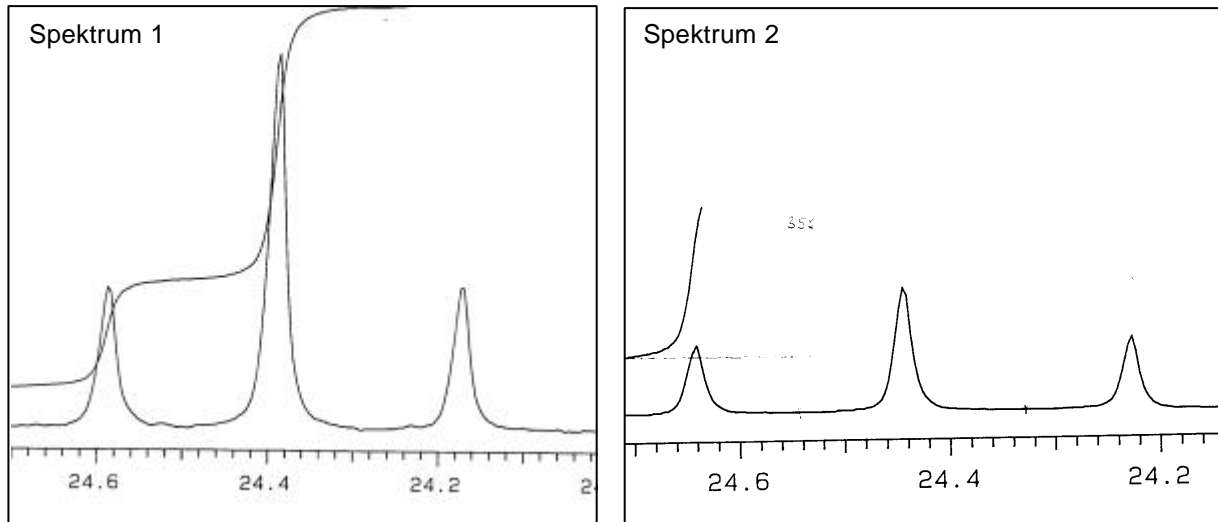
Anhang 13: Einfluß unterschiedlicher Gallensalzkonzentrationen im RUSITEC auf SCFA und Methan in der batch-culture.

Gallensalz- konzentration	SCFA µmol	Acetat		Propionat		Butyrat		CH ₄ µmol
		µmol	%	µmol	%	µmol	%	
Kontrolle	1025	509	50	236	23	280	27	1503
Gallensalz 0,4 %	676	264	39	158	23	254	38	73
Gallensalz 0,6 %	540	120	22	130	24	290	54	26

Anhang 14: ^{13}C -NMR Spektren von Kohlenstoffatomen des Acetats einiger in-vitro Inkubationen.

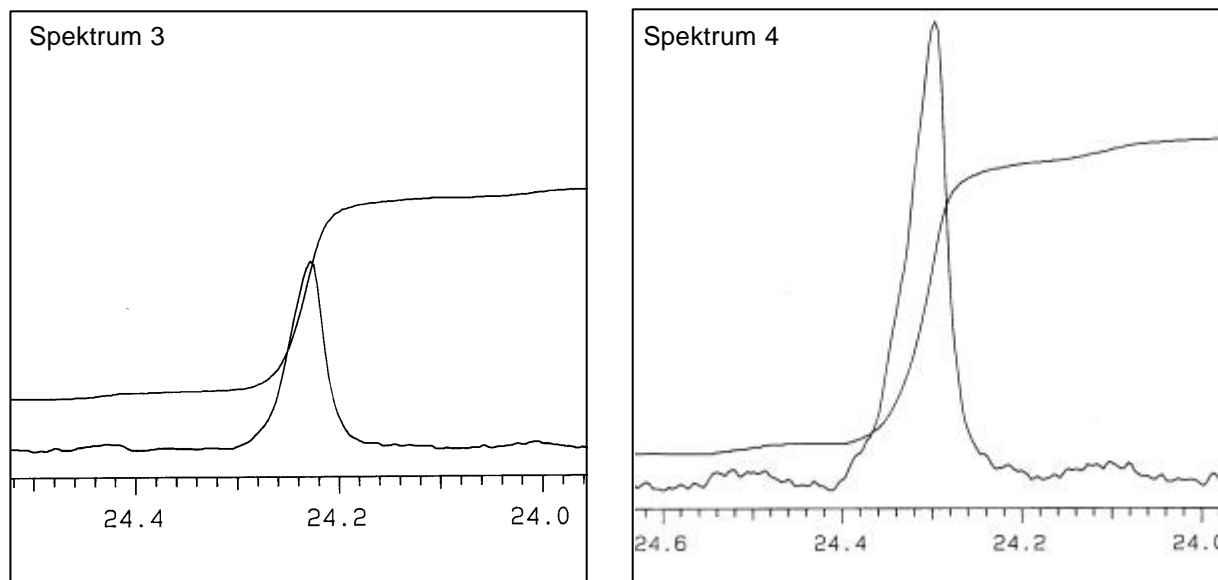
Spektrum 1: ^{13}C -Banden der Methylgruppe des Acetats aus einer Inkubation mit Bakteriensuspension aus dem Schweinedarm ohne Wasserstoffbegasung, $16 \cdot 10^4$ fache Vergrößerung.

Spektrum 2: ^{13}C -Banden der Methylgruppe des Acetats aus einer Inkubation mit Bakteriensuspension aus dem Schweinedarm mit Wasserstoffbegasung, $8 \cdot 10^4$ fache Vergrößerung



Spektrum 3: ^{13}C -Banden der Methylgruppe des Acetats aus einer Inkubation mit Pansensaft einer batch-culture Inkubation mit dem in-vitro-Substrat Heu, $16 \cdot 10^4$ fache Vergrößerung.

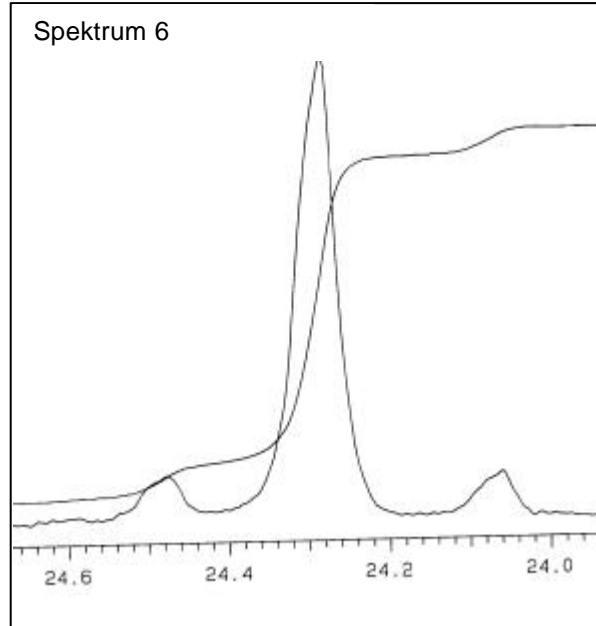
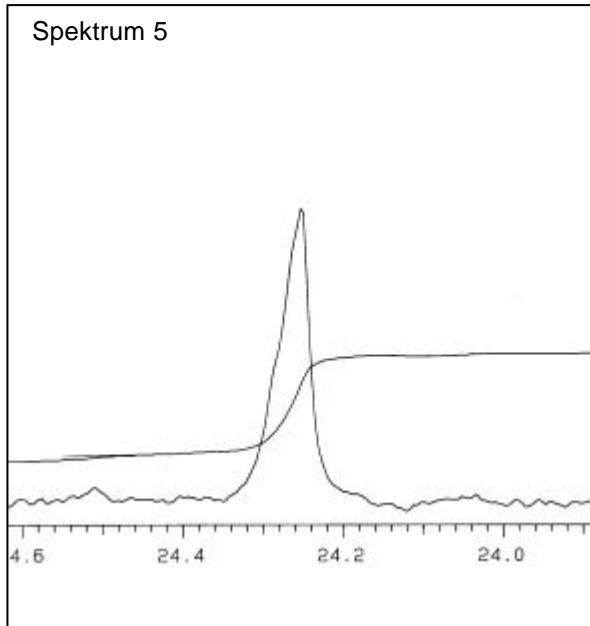
Spektrum 4: ^{13}C -Banden der Methylgruppe des Acetats aus einer Inkubation mit Pansensaft einer batch-culture Inkubation mit dem in-vitro-Substrat Blinddarminhalt, $32 \cdot 10^4$ fache Vergrößerung.



Anhang 14: ^{13}C -NMR Spektren von Kohlenstoffatomen des Acetats einiger in-vitro Inkubationen (Fortsetzung 1).

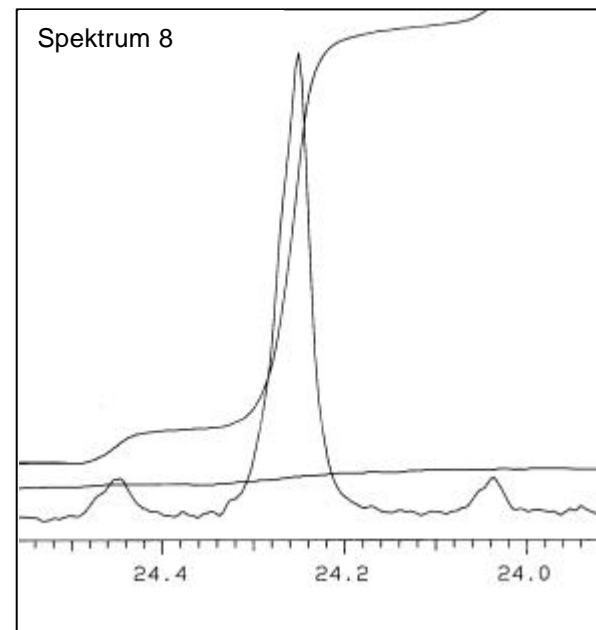
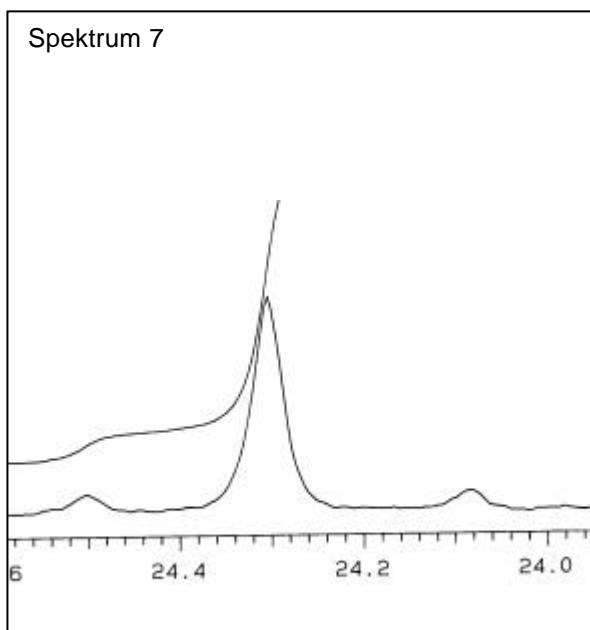
Spektrum 5: ^{13}C -Banden der Methylgruppe des Acetats aus einer Inkubation mit Pansensaft einer batch-culture Inkubation mit defauniertem Pansensaft, $64 \cdot 10^4$ fache Vergrößerung.

Spektrum 6: ^{13}C -Banden der Methylgruppe des Acetats aus einer Inkubation mit Pansensaft einer batch-culture Inkubation mit im RUSITEC-System vorinkubiertem Pansensaft (1. Wdh.), $64 \cdot 10^4$ fache Vergrößerung



Spektrum 7: ^{13}C -Banden der Methylgruppe des Acetats aus einer Inkubation mit Pansensaft einer batch-culture Inkubation mit im RUSITEC-System vorinkubiertem Pansensaft (2. Wdh.), $16 \cdot 10^4$ fache Vergrößerung.

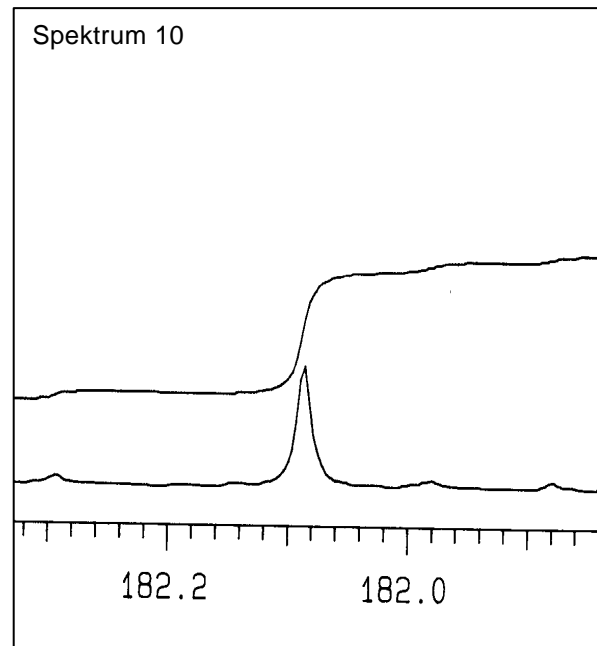
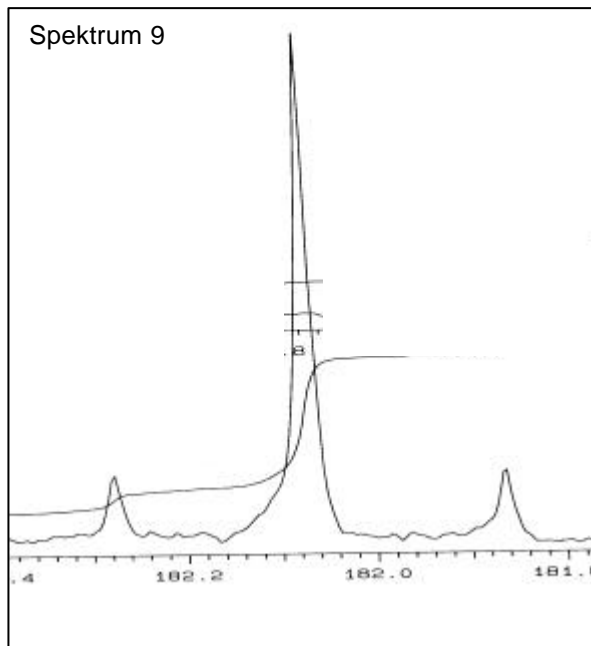
Spektrum 8: ^{13}C -Banden der Methylgruppe des Acetats aus einer Inkubation mit Pansensaft einer batch-culture Inkubation mit im RUSITEC-System vorinkubiertem Pansensaft (3. Wdh.), $32 \cdot 10^4$ fache Vergrößerung.



Anhang 14: ^{13}C -NMR Spektren von Kohlenstoffatomen des Acetats einiger in-vitro Inkubationen (Fortsetzung 2).

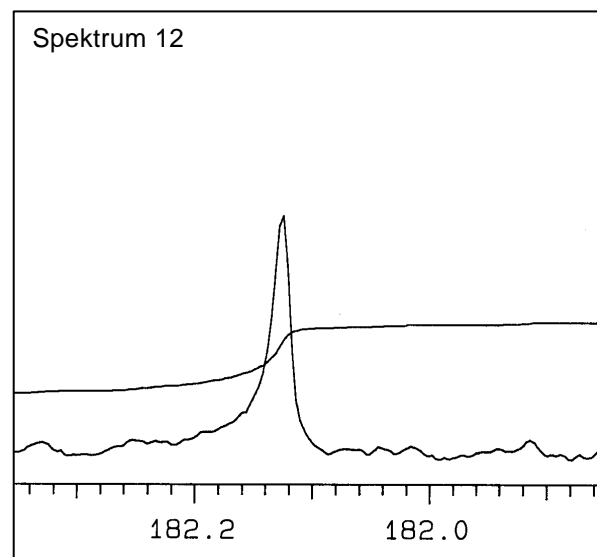
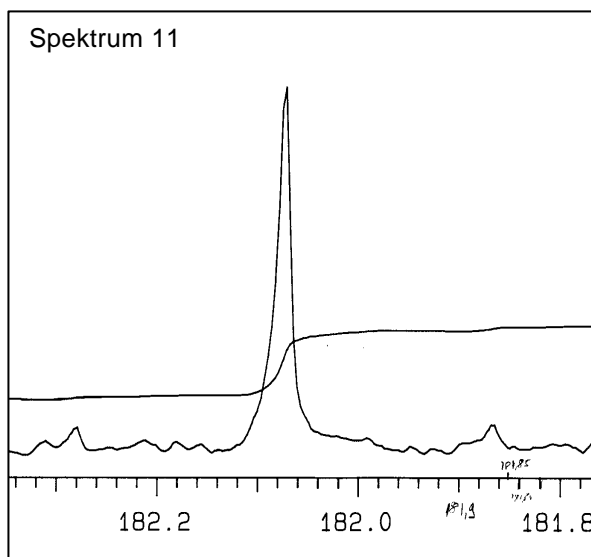
Spektrum 9: ^{13}C -Banden der Carboxylgruppe des Acetats aus einer Inkubation mit Pansensaft aus einer batch-culture Inkubation mit im RUSITEC-System bei 0,4 % Gallensalzkonzentration vorinkubiertem Pansensaft (1. Wdh.), $32 \cdot 10^4$ fache Vergrößerung.

Spektrum 10: ^{13}C -Banden der Carboxylgruppe des Acetats aus einer Inkubation mit Pansensaft aus einer batch-culture Inkubation mit im RUSITEC-System bei 0,4 % Gallensalzkonzentration vorinkubiertem Pansensaft (2. Wdh.), $16 \cdot 10^4$ fache Vergrößerung.



Spektrum 11: ^{13}C -Banden der Carboxylgruppe des Acetats aus einer Inkubation mit Pansensaft aus einer batch-culture Inkubation mit im RUSITEC-System bei 0,4 % Gallensalzkonzentration vorinkubiertem Pansensaft (3. Wdh.), $64 \cdot 10^4$ fache Vergrößerung.

Spektrum 12: ^{13}C -Banden der Carboxylgruppe des Acetats aus einer Inkubation mit Pansensaft aus einer batch-culture Inkubation mit im RUSITEC-System bei 0,6 % Gallensalzkonzentration vorinkubiertem Pansensaft, $64 \cdot 10^4$ fache Vergrößerung.



Anhang 15: Originaldaten der batch-culture-Untersuchungen mit nicht defauniertem Pansensaft. (Kodierung siehe Anhang 17)

Nr.	RAT	NUE	PRO	SUB	TAG	Wdh	SCFA μmol	Acetat μmol	Propionat μmol	Butyrat μmol	CH ₄ μmol	H ₂ /H _P %
1	1	1	1	1	1	1	2812	1385	1157	270	475	95
2	1	1	1	1	1	2	2624	1306	1086	232	499	100
3	1	1	1	1	1	3	2792	1355	1169	269	476	97
19	1	1	1	1	2	1	2462	1357	875	231	484	92
20	1	1	1	1	2	2	2540	1360	920	260	479	91
21	1	1	1	1	2	3	2507	1313	928	266	421	88
37	1	1	1	1	3	1	2783	1417	1066	300	427	87
38	1	1	1	1	3	2	2868	1440	1114	315	413	86
39	1	1	1	1	3	3	2947	1305	1267	375	414	92
7	1	1	1	3	1	1	799	423	245	131	72	65
8	1	1	1	3	1	2	721	408	198	115	68	61
9	1	1	1	3	1	3	806	422	251	132	70	65
25	1	1	1	3	2	1	629	407	131	91	61	53
26	1	1	1	3	2	2	508	356	83	68	72	57
27	1	1	1	3	2	3	404	305	50	49	51	49
43	1	1	1	3	3	1	991	403	368	220	41	65
44	1	1	1	3	3	2	1029	443	372	214	59	67
45	1	1	1	3	3	3	1000	429	355	216	56	66
4	1	1	1	2	1	1	1414	933	296	185	298	74
5	1	1	1	2	1	2	1646	846	644	156	322	98
6	1	1	1	2	1	3	1679	850	665	164	328	98
22	1	1	1	2	2	1	1509	858	502	149	301	89
23	1	1	1	2	2	2	1514	821	523	169	313	93
24	1	1	1	2	2	3	1297	769	425	103	258	88
40	1	1	1	2	3	1	2058	941	847	269	281	88
41	1	1	1	2	3	2	2000	910	828	263	289	90
42	1	1	1	2	3	3	2113	983	863	267	288	88
55	1	2	1	1	1	1	2077	961	890	226	223	86
56	1	2	1	1	1	2	1805	903	798	104	162	80
57	1	2	1	1	1	3	2228	1100	911	217	179	77
73	1	2	1	1	2	1	2123	1023	854	246	228	81
74	1	2	1	1	2	2	2087	998	841	248	221	81
75	1	2	1	1	2	3	2219	1051	904	264	234	81
91	1	2	1	1	3	1	2169	1085	849	235	308	86
92	1	2	1	1	3	2	2288	1096	923	269	315	87
93	1	2	1	1	3	3	2322	1055	972	295	255	84
61	1	2	1	3	1	1	489	227	133	129	29	58

Anhang 15: Originaldaten der batch-culture-Untersuchungen mit nicht defauniertem Pansensaft (Fortsetzung 1).

Nr.	RAT	NUE	PRO	SUB	TAG	Wdh	SCFA μmol	Acetat μmol	Propionat μmol	Butyrat μmol	CH ₄ μmol	H _U /H _P %
62	1	2	1	3	1	2	674	339	179	156	19	51
63	1	2	1	3	1	3	513	285	121	107	20	48
79	1	2	1	3	2	1	432	290	75	67	23	41
80	1	2	1	3	2	2	512	305	111	96	20	46
81	1	2	1	3	2	3	585	345	134	106	14	44
97	1	2	1	3	3	1	541	273	140	128	23	53
98	1	2	1	3	3	2	504	271	122	111	27	52
99	1	2	1	3	3	3	478	216	131	131	23	57
58	1	2	1	2	1	1	1338	680	546	112	148	81
59	1	2	1	2	1	2	1195	605	483	107	152	85
60	1	2	1	2	1	3	1380	637	596	147	181	90
76	1	2	1	2	2	1	1067	594	404	69	148	82
77	1	2	1	2	2	2	1061	596	402	63	152	84
78	1	2	1	2	2	3	981	568	360	53	148	83
94	1	2	1	2	3	1	1158	631	432	95	161	82
95	1	2	1	2	3	2	1319	661	522	136	174	85
96	1	2	1	2	3	3	1123	628	412	83	156	81
109	2	1	1	1	1	1	2714	1532	866	316	513	85
110	2	1	1	1	1	2	2709	1565	853	291	491	83
111	2	1	1	1	1	3	2662	1499	852	311	496	85
127	2	1	1	1	2	1	3117	1663	1016	438	540	83
128	2	1	1	1	2	2	2832	1594	894	344	536	85
129	2	1	1	1	2	3	2450	1514	714	222	542	87
145	2	1	1	1	3	1	3339	1591	1187	561	659	94
146	2	1	1	1	3	2	3547	1674	1266	607	646	90
147	2	1	1	1	3	3	3290	1607	1152	531	642	92
115	2	1	1	3	1	1	1304	671	377	256	128	65
116	2	1	1	3	1	2	1197	650	336	211	131	65
117	2	1	1	3	1	3	1233	672	344	217	125	64
133	2	1	1	3	2	1	1292	585	424	283	118	69
134	2	1	1	3	2	2	1117	595	339	183	120	67
135	2	1	1	3	2	3	1132	607	339	186	122	67
151	2	1	1	3	3	1	1180	565	390	225	126	74
152	2	1	1	3	3	2	1177	539	389	249	124	75
153	2	1	1	3	3	3	1199	565	391	243	132	72
112	2	1	1	2	1	1	1840	1002	660	178	298	82
113	2	1	1	2	1	2	2047	1132	720	195	309	85

Anhang 15: Originaldaten der batch-culture-Untersuchungen mit nicht defauniertem Pansensaft (Fortsetzung 2).

Nr.	RAT	NUE	PRO	SUB	TAG	Wdh	SCFA μmol	Acetat μmol	Propionat μmol	Butyrat μmol	CH ₄ μmol	H ₂ /H _P %
114	2	1	1	2	1	3	1825	1034	637	154	310	93
160	2	1	1	2	2	1	2035	1016	779	240	278	84
161	2	1	1	2	2	2	1729	979	605	145	288	84
162	2	1	1	2	2	3	1922	887	754	281	297	89
148	2	1	1	2	3	1	1981	902	786	293	385	100
149	2	1	1	2	3	2	2142	1007	821	314	369	92
150	2	1	1	2	3	3	2087	1011	791	285	274	83
163	2	2	1	1	1	1	2416	1348	721	347	632	97
164	2	2	1	1	1	2	2624	1457	785	382	668	96
165	2	2	1	1	1	3	2730	1499	821	410	649	93
181	2	2	1	1	2	1	3414	1638	1195	581	600	88
182	2	2	1	1	2	2	3514	1660	1220	634	588	86
183	2	2	1	1	2	3	4120	1840	1478	802	632	85
199	2	2	1	1	3	1	3520	1819	1212	489	599	85
200	2	2	1	1	3	2	3400	1746	1181	473	627	89
201	2	2	1	1	3	3	3157	1618	1095	444	616	91
169	2	2	1	3	1	1	1099	603	306	190	150	70
170	2	2	1	3	1	2	1051	566	297	188	155	73
171	2	2	1	3	1	3	981	537	269	175	140	71
187	2	2	1	3	2	1	1686	708	574	404	131	69
188	2	2	1	3	2	2	1463	666	486	311	119	68
189	2	2	1	3	2	3	1357	589	457	311	125	71
205	2	2	1	3	3	1	1207	599	381	227	142	72
206	2	2	1	3	3	2	1100	552	342	206	144	74
207	2	2	1	3	3	3	1098	534	351	213	148	76
166	2	2	1	2	1	1	1657	947	515	195	411	96
167	2	2	1	2	1	2	1753	975	558	220	416	95
168	2	2	1	2	1	3	1823	1001	581	241	295	80
184	2	2	1	2	2	1	2033	1001	732	300	310	84
185	2	2	1	2	2	2	2223	1058	805	360	282	79
186	2	2	1	2	2	3	2362	1224	810	328	296	76
202	2	2	1	2	3	1	2186	1151	781	254	366	84
203	2	2	1	2	3	2	2089	1119	736	234	369	86
204	2	2	1	2	3	3	2099	1108	747	244	368	88

Anhang 16: Originaldaten der batch-culture-Untersuchungen mit defauniertem Pansensaft.
(Kodierung siehe Anhang 17)

Nr.	RAT	NUE	PRO	SUB	TAG	Wdh	SCFA μmol	Acetat μmol	Propionat μmol	Butyrat μmol	CH ₄ μmol	H ₂ /H _P %
10	1	1	2	1	1	1	1166	433	673	60	0	84
11	1	1	2	1	1	2	1199	438	703	59	0	85
12	1	1	2	1	1	3	1052	404	612	35	0	84
28	1	1	2	1	2	1	985	409	543	33	0	79
29	1	1	2	1	2	2	943	338	557	49	0	86
30	1	1	2	1	2	3	826	371	452	2	0	78
46	1	1	2	1	3	1	802	340	670	62	0	70
47	1	1	2	1	3	2	1112	349	816	93	0	88
48	1	1	2	1	3	3	1381	469	847	96	0	85
16	1	1	2	3	1	1	595	267	228	100	0	57
17	1	1	2	3	1	2	633	298	235	99	0	55
18	1	1	2	3	1	3	703	340	255	108	0	53
34	1	1	2	3	2	1	431	275	100	56	0	37
35	1	1	2	3	2	2	449	245	67	137	0	37
36	1	1	2	3	2	3	586	264	180	142	0	50
52	1	1	2	3	3	1	824	294	358	172	0	65
53	1	1	2	3	3	2	688	266	246	175	0	57
54	1	1	2	3	3	3	827	301	351	174	0	64
13	1	1	2	2	1	1	386	165	223	2	0	83
14	1	1	2	2	1	2	356	196	177	10	0	64
15	1	1	2	2	1	3	486	171	291	23	0	87
31	1	1	2	2	2	1	338	113	202	23	0	87
32	1	1	2	2	2	2	327	130	185	12	0	81
33	1	1	2	2	2	3	490	215	238	36	0	68
49	1	1	2	2	3	1	734	221	428	86	0	85
50	1	1	2	2	3	2	574	121	380	73	0	99
51	1	1	2	2	3	3	561	171	304	86	0	79
64	1	2	2	1	1	1	809	299	392	118	0	72
65	1	2	2	1	1	2	786	323	368	95	0	68
66	1	2	2	1	1	3	842	336	388	118	0	67
82	1	2	2	1	2	1	1008	336	460	212	0	70
83	1	2	2	1	2	2	958	309	431	218	0	70
84	1	2	2	1	2	3	935	316	449	170	0	72
100	1	2	2	1	3	1	757	277	340	140	0	68
101	1	2	2	1	3	2	814	286	376	152	0	69
102	1	2	2	1	3	3	814	295	355	164	0	66

Anhang 16: Originaldaten der batch-culture-Untersuchungen mit defauniertem Pansensaft
(Fortsetzung 1)

Nr.	RAT	NUE	PRO	SUB	TAG	Wdh	SCFA μmol	Acetat μmol	Propionat μmol	Butyrat μmol	CH ₄ μmol	H ₂ /H _P %
70	1	2	2	3	1	1	393	243	85	65	0	36
71	1	2	2	3	1	2	433	262	99	72	0	38
72	1	2	2	3	1	3	503	279	126	98	0	42
88	1	2	2	3	2	1	473	318	87	68	0	31
89	1	2	2	3	2	2	424	298	64	62	0	28
90	1	2	2	3	2	3	388	242	73	73	0	34
106	1	2	2	3	3	1	507	288	124	95	0	41
107	1	2	2	3	3	2	251	166	42	43	0	31
108	1	2	2	3	3	3	307	218	44	45	0	27
67	1	2	2	2	1	1	305	105	174	26	0	84
68	1	2	2	2	1	2	380	122	219	39	0	85
69	1	2	2	2	1	3	374	113	225	36	0	88
85	1	2	2	2	2	1	236	96	126	13	0	77
86	1	2	2	2	2	2	227	98	105	24	0	67
87	1	2	2	2	2	3	215	99	102	14	0	66
103	1	2	2	2	3	1	346	149	171	26	0	71
104	1	2	2	2	3	2	302	113	168	21	0	81
105	1	2	2	2	3	3	327	115	178	34	0	79
118	2	1	2	1	1	1	1626	517	948	161	0	85
119	2	1	2	1	1	2	1401	445	850	106	0	89
120	2	1	2	1	1	3	1303	428	795	80	0	89
136	2	1	2	1	2	1	1319	483	759	77	0	84
137	2	1	2	1	2	2	1447	455	891	101	0	91
138	2	1	2	1	2	3	1206	474	689	43	0	82
154	2	1	2	1	3	1	1457	460	899	98	0	104
155	2	1	2	1	3	2	1593	440	1000	153	0	103
156	2	1	2	1	3	3	1474	433	913	128	0	95
124	2	1	2	3	1	1	781	325	281	175	0	56
125	2	1	2	3	1	2	736	343	256	137	0	53
126	2	1	2	3	1	3	698	348	235	115	0	52
142	2	1	2	3	2	1	540	216	196	128	0	57
143	2	1	2	3	2	2	545	201	204	140	0	59
144	2	1	2	3	2	3	318	169	113	36	0	51
160	2	1	2	3	3	1	760	232	317	211	0	70
161	2	1	2	3	3	2	611	206	269	136	0	71
162	2	1	2	3	3	3	671	269	267	135	0	61
121	2	1	2	2	1	1	442	139	279	24	0	93

Anhang 16: Originaldaten der batch-culture-Untersuchungen mit defauniertem Pansensaft
(Fortsetzung 2)

Nr.	RAT	NUE	PRO	SUB	TAG	Wdh	SCFA μmol	Acetat μmol	Propionat μmol	Butyrat μmol	CH ₄ μmol	H ₂ /H _P %
122	2	1	2	2	1	2	486	128	304	54	0	92
123	2	1	2	2	1	3	586	188	334	64	0	84
139	2	1	2	2	2	1	463	138	283	42	0	89
140	2	1	2	2	2	2	397	121	254	22	0	95
141	2	1	2	2	2	3	390	64	268	58	0	106
157	2	1	2	2	3	1	381	82	259	40	0	105
158	2	1	2	2	3	2	354	38	265	51	0	120
159	2	1	2	2	3	3	470	93	300	77	0	97
172	2	2	2	1	1	1	1071	406	583	82	5	79
173	2	2	2	1	1	2	1108	432	596	80	3	77
174	2	2	2	1	1	3	1012	386	556	70	0	78
190	2	2	2	1	2	1	1397	472	838	87	0	88
191	2	2	2	1	2	2	1339	454	814	71	0	89
192	2	2	2	1	2	3	1394	474	836	84	3	88
208	2	2	2	1	3	1	1178	444	688	46	41	85
209	2	2	2	1	3	2	1496	544	856	96	58	83
210	2	2	2	1	3	3	1130	429	663	38	0	84
178	2	2	2	3	1	1	594	282	188	124	2	51
179	2	2	2	3	1	2	612	278	200	134	2	53
180	2	2	2	3	1	3	530	258	169	103	8	53
196	2	2	2	3	2	1	613	225	242	146	0	61
197	2	2	2	3	2	2	784	299	294	191	0	59
198	2	2	2	3	2	3	937	246	394	297	5	62
214	2	2	2	3	3	1	475	210	167	98	0	55
215	2	2	2	3	3	2	700	309	241	150	0	54
216	2	2	2	3	3	3	590	261	206	123	4	55
175	2	2	2	2	1	1	328	110	162	56	0	72
176	2	2	2	2	1	2	316	113	155	48	1	72
177	2	2	2	2	1	3	250	81	130	39	4	78
193	2	2	2	2	2	1	477	116	280	81	0	87
194	2	2	2	2	2	2	372	93	232	47	0	92
195	2	2	2	2	2	3	423	104	251	68	0	89
211	2	2	2	2	3	1	377	127	205	45	0	78
212	2	2	2	2	3	2	245	68	160	17	0	98
213	2	2	2	2	3	3	328	104	189	35	0	83

Anhang 17: Codierung zu Anhang 15 und 16.

Ration	RAT	Heu-Krafftutter	1
		Stroh-Harnstoff	2
Nüchterungsdauer	NUE	16 Stunden	1
		24 Stunden	2
Protozoen	PRO	nicht defauniert	1
		defauniert	2
in-vitro-Substratqualität	SUB	Heu	1
		Stroh	2
		Dickdarminhalt	3
Tag	TAG	1	1
		2	2
		3	3
Wiederholung	Wdh	1	1
		2	2
		3	3