



universität
wien

MASTERARBEIT

Titel der Masterarbeit

Charakterisierung der mikrobiellen Flora des Pansen-
epithels beim Rind in Abhängigkeit von unterschiedlicher
Fütterung

Verfasser

Abdoulla Zangana BSc

angestrebter akademischer Grad

Master of Science (MSc)

Wien, Januar 2012

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 066 830

Studienrichtung lt. Studienblatt: Masterstudium Molekulare Mikrobiologie und Immunbiologie

Betreuer: Univ.-Prof. Dr. Angela Witte

***Willst du die Sonne erreichen,
musst du zuerst ihre Strahlung überwinden.***

Hafiz Ibrahim arabischer Dichter

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS.....	1
1 EINLEITUNG	4
1.1 Ernährung der Wiederkäuer.....	4
1.2 Bakterielle Umsetzung der Nährstoffe im Pansen.....	6
1.3 Der ruminale Stickstoffkreislauf	9
1.4 Wechselwirkung zwischen den Futtermitteln und den Mikroorganismen des Pansens	11
1.5 Archaea und Bakterien im Pansen und ihre Funktionen	12
1.5.1 Archaea	12
1.5.2 Bakterien	12
1.6 Die Rolle der Protozoen im Pansen.....	19
1.7 Ruminale Produktion von Nährstoffen – Implikationen.....	19
1.8 Ziele der Arbeit	20
2 MATERIAL UND METHODEN.....	21
2.1 Chemikalien.....	21
2.2 Nährmedien, Puffer, Lösungen.....	22
2.3 Geräte und Material	23
2.4 Verwendete Primer	23
2.5 Verwendete Proben	24
2.6 Stammhaltung.....	25
2.7 Methoden.....	26
2.7.1 DNS-Isolierung für grampositive Bakterien	26
2.7.2 16S-rDNS-PCR	27
2.7.3 DNS-Messung am Fluorimeter.....	28
2.7.4 Klonierung von PCR-Produkten.....	28
2.7.5 E. coli-Plasmid Miniprep.....	30
2.7.6 Screening-PCR von Klonen ohne Miniprep	31
2.7.7 Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP).....	32
2.7.8 DNS-Messung am Photometer	32
2.7.9 Verwendete Software.....	33
2.7.10 Sequenzierung und Sequenzanalyse von 16S-rRNS-Klonen.....	33
3 ERGEBNIS UND ANALYSE.....	36

3.1 Isolierung, Amplifizierung, Klonierung sowie Sequenzierung der 16S-rDNS	36
3.2 Analyse der Sequenzen.....	37
3.3 Dänisches Rind.....	39
3.4 Österreichisches Rind.....	44
3.5 Analyse der 16S-rRNS-Sequenzen.....	46
3.5.1 Firmicutes.....	46
3.5.1.1 Butyrivibrio	47
3.5.1.2 Christensenella.....	48
3.5.1.3 Lachnospiraceae	48
3.5.1.4 Clostridium.....	48
3.5.1.5 Eubacterium.....	48
3.5.1.6 Howardella	50
3.5.1.7 Ruminococcus	51
3.5.2 Bacteroidetes.....	51
3.5.2.1 Prevotella.....	51
3.5.3 Proteobacteria	52
3.5.3.1 Desulfobulbus	52
3.5.4 TM7.....	53
3.5.5 Spirochaetes	54
3.5.5.1 Spirochaeta.....	54
3.5.6 Synergistetes	54
3.5.7 Chloroflexi.....	54
4 DISKUSSION.....	55
4.1. Phylogenetische Zuordnung der nachgewiesenen Sequenzen an Hand der 16S-rRNS.....	55
4.1.1 Butyrivibrio	56
4.1.2 Eubacterium	57
4.1.3 Christensenella.....	58
4.1.4 Clostridium	59
4.1.5 Lachnospiraceae	59
4.1.6 Howardella	60
4.1.7 Ruminococcus.....	60
4.1.8 Desulfobulbus	61
4.1.9 Prevotella	62
4.1.10 TM7 Phylum.....	63

4.1.11 Synergistetes Phylum	64
4.1.12 Spirochaeta	64
4.2 Zusammenfassung der phylogenetischen Zuordnungen an Hand der untersuchten Proben..	65
4.3 Auswirkungen der unterschiedlichen Fütterung auf die Bakteriengemeinschaft des Pansenepithels dargestellt an der Probe von einem dänischen Rind	66
4.4 Unterschiedliche Probengewinnung aus dem Pansenepithel eines österreichischen Rinds ..	70
4.5 Vergleich der Klone aus Proben von einem dänischen und einem österreichischen Rind.....	71
4.6 Relevanz der vorliegenden Arbeit	72
5 ZUSAMMENFASSUNG.....	75
6 SUMMARY	76
7 ABKÜRZUNGEN	78
8 LITERATURVERZEICHNIS	80
8.1 Fachzeitschriften.....	80
8.2 Bücher	87
8.3 Websites.....	87
DANKSAGUNG.....	88
LEBENS LAUF	89

1 Einleitung

1.1 Ernährung der Wiederkäuer

Die Verdauung der Wiederkäuer ist besonders dafür eingerichtet, pflanzliche Nahrung wie Gras effizient zu nutzen, die hauptsächlich aus Polysacchariden besteht. Nahezu die gesamte Graströckemasse besteht aus Hemicellulose und Cellulose (Lengeler et al. 1999). Durch die Fibrolyse, die im Pansen abläuft, erschließen die Wiederkäuer, die einen bedeutenden Anteil an den global domestizierten Tierarten haben, die Cellulose der pflanzlichen Zellwände und somit den mit Hilfe der Sonnenenergie erschlossenen Kohlenstoff für die menschliche Ernährung, der somit zur wichtigsten Energiequelle wird. Die Zellulose spielt also eine essenzielle Rolle in der Ernährung der Wiederkäuer, da sie zum Einen ökonomisch und zum Anderen von hohem physiologischem Wert ist (Koike et al. 2010). Der Pansen ist das für die Wiederkäuer typische und wichtigste Organ, das seine Verdauungsfunktion nicht ohne die Symbiose mit den dort angesiedelten Mikroben erfüllen kann. Die von ihnen gebildete Biomasse ist gewaltig: $10^{10} - 10^{11}$ Bakterien, $10^4 - 10^5$ Protozoen und $10^2 - 10^4$ Pilze, jeweils pro Gramm Panseninhalt, wobei keine einzelne Art mehr als 3% dieser Biomasse ausmacht (Lengeler et al. 1999). Die zuerst relativ rasch aufgenommene Nahrung wird im Pansen durch Muskelbewegung gemischt, gelöste Anteile werden gleich weiter befördert, während faserhaltige Anteile im Netzmagen zu Klumpen geformt und wieder hoch gewürgt werden. Sie werden erneut gekaut und intensiv mit Speichel durchmischt. Dieser Vorgang kann mehrere Male wiederholt werden, bis die Zellulose mittels des ruminalen Abbaus durch die Mikroorganismen für eine effiziente Nutzung ausreichend aufgeschlossen ist (Lengeler et al. 1999). In der folgenden schematischen Darstellung (Abbildung 1) soll dieser Prozess verdeutlicht werden.

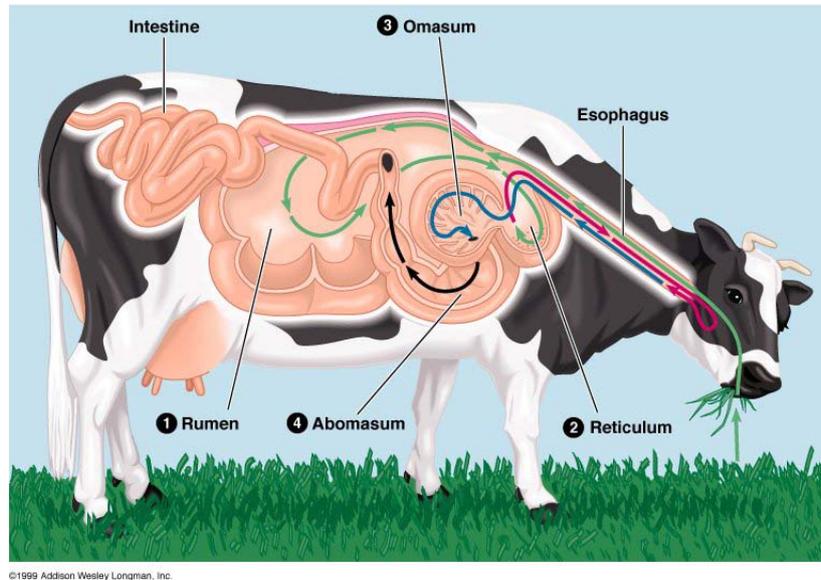


Abbildung 1. Aufbau des Verdauungstrakts beim Rind
www.mun.ca/biology/scarr/Ruminant_Digestion.htm.

Dadurch, dass die im Pansen angesiedelten, mit dem Wirtorganismus symbiotisch agierenden Mikroorganismen nach dem Wiederkäuen in den dem Pansen nachgelagerten Labmagen weiter befördert und dort im stark sauren Milieu verdaut werden, verfügen die Wiederkäuer über eine Proteinquelle, die es ihnen erlaubt, sich von Protein armen Gräsern und anderen pflanzlichen Substanzen zu ernähren (Lengeler et al. 1999). Diese bestehen zu 50% aus Hemicellulose, zu rund 40% aus Cellulose, zu 2-3% aus Lignin und in ganz geringen Anteilen aus Proteinen und Lipiden. Die Erschließung der Proteine bzw. ihrer Bausteine erfolgt also erst durch die Mikroorganismen des Pansens, ohne die die Wiederkäuer zur Nutzung dieser Nahrungsquelle nicht befähigt wären (Lengeler et al. 1999). Bakterienarten mit der Fähigkeit, unter anoxischen Bedingungen Cellulose zu hydrolysieren, sind z.B. *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* oder *Ruminococcus flavefaciens* (Kong et al. 2010 [1]; Attwood et al. 1996). In den ärmeren Ländern stellen die Wiederkäuer in den kleinen Dorfgemeinschaften und für die bäuerlichen Kleinbetriebe häufig die einzige Einnahmequelle und Nahrungsressource dar. Die eingesetzten Mittel sind gering, denn das Grünfutter ist nahezu immer und allorts verfügbar. Auch in der hoch entwickelten Landwirtschaft und Viehzucht ist es häufig noch die Hauptnahrungsquelle, wenn Ersatznahrung wie aus Getreide zwar möglich, doch ineffizient und teuer wäre (Krause et al. 2003).

Die Energiegewinnung aus der Cellulose der Pflanzen beginnt im Pansen und beruht auf einer Symbiose zwischen dem Wiederkäuer und den in diesem komplexen, strikt anaeroben Ökosystem angesiedelten Mikroorganismen, durch die die eigentliche Aufschließung der Cellulose und anderer Nah-

rungsbestandteile über die Hydrolyse und die Fermentation erfolgt. Am Ende dieses Prozesses stehen kurzkettige Fett- und teilzerlegte Aminosäuren, die der Wiederkäuer im nachgelagerten Verdauungstrakt weiter bearbeiten und schließlich absorbieren kann (Kong et al. 2010 [1]; Kong et al. 2010 [2]; Krause et al. 2003; Reilly et al. 2002; Ozutsumi et al. 2005). Diese Endprodukte dienen den unterschiedlichen Mikroorganismen zum Aufbau ihrer spezifischen Aminosäuren, wodurch diese die Energie für die vollständige Aminosäuresynthese einsparen können (Lengeler et al. 1999). Diese Transformation erfolgt durch eine komplexe mikrobielle Gemeinschaft, zu der Pilze, Protozoen, Bakterien, Archaea und auch Viren gehören. Wissenschaftlichen Schätzungen zu Folge sollen im Pansen mehr als 7400 Bakterienarten angesiedelt sein (Kim et al. 2011), wobei deren Zusammensetzung nach der Rasse, dem Standort, dem Alter, dem Gesundheitszustand, der Ernährung des Wirtorganismus, der Verwendung pharmazeutischer Zusatzstoffe sowie sogar nach der Jahreszeit differiert (Kong et al. 2010 [2]; Tajima et al. 1999; Edwards et al. 2004; Chen et al. 2011). Die Zusammensetzung der ruminalen mikrobiellen Gemeinschaft wird innerhalb der ersten Lebensmonate eines Wiederkäuers fixiert. Sie wird ihm durch Lecken an der Mutter inokuliert. Dementsprechend kann sich die ruminale Mikroflora in jungen Wiederkäuern, die getrennt von erwachsenen Tieren aufgezogen werden, nur verzögert oder mit Defiziten entwickeln (Lengeler et al. 1999).

1.2 Bakterielle Umsetzung der Nährstoffe im Pansen

Eine weitere wichtige Komponente in der Ernährung der Wiederkäuer ist die ausreichende Zufuhr von Proteinen, die von der Stickstoffverfügbarkeit abhängig ist. Diese werden zu Peptiden und Aminosäuren abgebaut sowie gegebenenfalls zu Ammoniak deaminiert und in die mikrobielle Biomasse integriert (Bach et al. 2005; Reilly et al. 2002). Die Voraussetzung dafür ist ausreichend Energie in Form von Kohlenhydraten. Wenn das verfügbare Futter ein Missverhältnis zwischen den Kohlenhydraten und dem Stickstoff zu Gunsten des Stickstoffs aufweist, kann dieser nur großenteils und nicht vollständig zur mikrobiellen Proteinsynthese herangezogen werden (Reilly et al. 2002).

Die ruminalen Endprodukte sind Stickstoff, Ammoniak, nicht abgebaute Proteine (aus der Nahrung oder endogen) und mikrobielle Proteine. Wird über die Futtermittel mehr ruminal abbaubares Protein zugeführt als vom Metabolismus der Wiederkäuer benötigt, wird dieses zu Ammoniak abgebaut, als solches absorbiert, in der Leber in Harnstoff umgewandelt und über den Urin ausgeschieden, womit es für den Organismus verloren ist. Der Verlust kann unter den typischen Bedingungen der Milchviehfütterung über eine Effizienzstrategie im ruminalen Stickstoffhaushalt gering gehalten wer-

den. Diese beruht entweder auf einer Verminderung des Proteinabbaus im Pansen und/oder einer Steigerung der Stickstoffnutzung durch die dort lebenden Mikroorganismen (Bach et al. 2005). Die mikrobielle Proteinsynthese des Pansens liefert für die weiteren Prozesse im Darm das meiste Protein, dessen Menge vom Nahrungsangebot und der Nutzungseffizienz seitens der ruminalen Bakterien abhängt. Eine essenzielle Rolle nimmt dabei der Stickstoffmetabolismus ein, der in zwei unterscheidbaren Phasen abläuft: dem Proteinabbau, der den Bakterien als Stickstoffquelle dient, und der mikrobiellen Proteinsynthese. In der ersten Phase heften sich Bakterien an die Nahrungspartikel an und entfalten ihre Aktivitäten. Da die Bindungen selbst innerhalb eines Proteins sehr unterschiedlich sind, agieren die Bakterien beim Abbau in Symbiose mit anderen Mikroorganismen und produzieren über ihre Proteasen Peptide und Aminosäuren, wobei das Ausmaß des Proteinabbaus von den proteolytischen Qualitäten der beteiligten Mikroflora des Pansens und der Art der Peptidbindungen abhängt. Die so entstandenen Peptide werden mittels Peptidasen zu Aminosäuren abgebaut und bei Vorhandensein von Energie in Form von Kohlenhydraten zu Proteinen synthetisiert oder transaminiert. Bei unzureichender Energiezufuhr werden die Aminosäuren weiter zu flüchtigen Fettsäuren, Kohlendioxid und Ammoniak fermentiert. Einige Bakterien sind nicht in der Lage, die im Übermaß absorbierten Aminosäuren aus dem Cytoplasma abzuführen und müssen sie daher als Ammoniak ausscheiden (Bach et al. 2005). Gegen diese Akkumulation von Peptiden und Aminosäuren nach Futtergaben schützen sich die Bakterien, wie Forscher beobachten konnten, über eine Steuerung der proteolytischen Aktivität. Andere Ergebnisse zeigten, dass die Peptidolyse- und die Deaminationsrate bei der Kontrolle des Proteinabbaus eine wichtige Rolle spielen. In Bioreaktoren bei typischer Milchviehfütterung gehaltene Dauerkulturen ließen erkennen, dass die Konzentrationen von Peptiden, Aminosäuren und Ammoniak über acht Stunden nach der Nahrungszufuhr im gleichen Bereich blieben, wobei eine eintretende Akkumulation von Stickstoff aus Aminosäuren nach zwei bis vier Stunden ab Fütterung wieder abgebaut war, was gleichfalls nahelegt, dass die Beschränkung des Proteinabbaus im Pansen über die Aufnahme von Aminosäuren erfolgt (Bach et al. 2005). Folglich kann der Proteinabbau nicht nur über eine Abstufung der Proteolyse, sondern auch über Veränderungen bei der Peptidolyse und der Deamination gesteuert werden. So verringerte Monensin den Stickstoffgehalt über eine Inhibition der Ammoniak hyperproduzierenden Bakterien, einer kleinen Gruppe Pansen bewohnender Mikroorganismen, die für die Produktion des größten Ammoniakanteils verantwortlich sind. Auch die Inhibition einer anderen Gruppe Ammoniak produzierender Bakterien wie *Prevotella ruminantium* und *Prevotella bryantii* führte zu einer Reduktion der Ammoniakkonzentration in mit ruminalen Mikroorganismen besiedelten Fermentern (Bach et al. 2005). Diese Fermenter weisen eine geringe Population von Protozoen auf, die dagegen beim Proteinabbau unter *in-vivo*-Bedingungen eine größere Rolle spielen. Die Bedeutung der Protozoen liegt in ihrer Fähigkeit, Kohlenhydrate, Proteine

und Mikroorganismen aufzunehmen, sowie in der Regulierung des bakteriellen Stickstoffumsatzes. Da die Protozoen ihren Stickstoff nicht aus Ammoniak gewinnen können, nehmen sie Proteine aus der Pansenflüssigkeit auf, entziehen dieser damit Stickstoff und geben für die Bakterien lösliche Proteine wieder an die Pansenflüssigkeit ab (Bach et al. 2005). Weitere Faktoren bei der Beeinflussung des mikrobiellen Proteinabbaus sind der Proteintypus, die Wechselwirkungen mit anderen Nährstoffen und dem Panseninhalt sowie die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft, die wiederum von der zugeführten Nahrung, der Pсандurchsatzrate und dem ruminalen pH-Wert abhängt. Die Kohlenhydrate dienen den Mikroorganismen nicht nur als Energiequelle sondern zusammen mit Ammoniak auch als Gerüstelemente für die Proteinsynthese. Diese erfolgt über die Peptidbindung und ist dabei abhängig von der Art und der Menge rasch verfügbarer Energie, deren nutzbarste Form Zucker und Stärke gegenüber Cellulose und anderen darstellen (Bach et al. 2005). Mehrere *in-vitro*- und *in-vivo*-Studien ergaben, dass eine ansteigende Zufuhr leicht zu fermentierender Kohlenhydrate auf Grund der dadurch verbesserten Aufnahmefähigkeit den Stickstoffgehalt aus Ammoniak reduziert (Bach et al. 2005).

Funktionell werden die Ruminalbakterien entsprechend ihrer bevorzugten Energiequelle unterschieden. Die cellulolytischen Bakterien bauen zur Energieversorgung Cellulose ab, wachsen langsam und nutzen Ammoniak als Stickstoffquelle (Bach et al. 2005).

Trotz der Präsenz der für den Abbau spezifisch erforderlichen Mikroorganismen kann Weidefutter den Pansen in großer Menge unverdaut passieren, wenn beispielsweise das Futter von minderer Qualität ist. Denn zur Verdauung von Zellwänden agieren die fibrolytischen Bakterien nicht isoliert sondern in Interaktion mit anderen Mikroorganismen (Kong et al. 2010 [1]). Die mikrobielle Population des Pansens ist von ausschlaggebender Bedeutung für die Gesundheit und die Produktivität der Wiederkäuer (Callaway et al. 2010). Obwohl die Forschung das Wissen über die Mikrobiologie des Pansens beträchtlich erweitern konnte, ist bezüglich der Struktur und der Funktion der mikrobiellen Pansengemeinschaft – vielleicht mit Ausnahme der fibrolytischen Bakterienstämme, die einen großen Einfluss auf die Leistung der betreffenden Tiere haben – noch vieles unbekannt (Kong et al. 2010 [1]; Fernando et al. 2010). Bei den meisten Mikroorganismen des Pansens ist es noch nicht gelungen, sie *in vitro* zu kultivieren. Entweder werden die Kulturbedingungen ihren spezifischen Umweltansprüchen nicht gerecht, oder sie befinden sich in einem Stadium, das eine künstliche Vermehrung nicht zulässt, oder es sind noch keine geeigneten Methoden dafür gefunden worden (Deng et al. 2008).

Die amylolytischen Bakterien sind zur Energiegewinnung auf unstrukturierte Kohlenhydrate (z.B. Fruktane) angewiesen, sie wachsen schnell und nutzen sowohl Ammoniak als auch Peptide und Aminosäuren als Stickstoffquellen (Bach et al. 2005). Ein verstärktes Wachstum kann beobachtet werden, wenn Aminosäuren und/oder Peptide zusätzlich angeboten und diese in das mikrobielle Protein integriert werden und/oder wenn Kohlenstoffgerüste aus der Deamination verfügbar sind und diese für den Aufbau neuer mikrobieller Aminosäuren genutzt werden (Bach et al. 2005).

Die proteolytische Aktivität ruminaler Bakterien hängt von der Art und der Zusammensetzung des Futters ab. In einer Untersuchung konnte diese Funktion für die Gattungen *Prevotella*, *Ruminobacter*, *Selenomonas*, *Butyrivibrio* und *Streptococcus* nachgewiesen werden. Später konnte diese Funktion auch bei Spezies der Genera *Peptostreptococcus* und *Clostridium* belegt werden, wobei diese bei der Fermentation von Peptiden und Aminosäuren eine wichtige Rolle spielen. In einer noch späteren Arbeit wurden Spezies aus dem Genus *Streptococcus* und auch solche aus dem Genus *Eubacterium* als proteolytisch bestätigt (Attwood et al. 1996).

In der folgenden Tabelle 1 sollen einige ruminale Bakterien in einer funktionellen Einteilung beispielhaft angeführt werden.

Tabelle 1. Aufstellung ausgewählter Ruminalbakterien nach Funktion und Abbauprodukt (Madigan et al. 2009).

Funktion	Spezies	Gärungsprodukte
Cellulolytisch	<i>Fibrobacter succinogenes</i>	Succinat, Acetat, Formiat
	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	Acetat, Formiat, Lactat, Butyrat, Wasserstoff, Kohlendioxid
	<i>Ruminococcus albus</i>	Acetat, Formiat, Wasserstoff, Kohlendioxid
	<i>Clostridium lochheadii</i>	Acetat, Formiat, Butyrat, Wasserstoff, Kohlendioxid
Amylolytisch	<i>Prevotella ruminicola</i>	Formiat, Acetat, Succinat
	<i>Ruminobacter amylophilus</i>	Formiat, Acetat, Succinat
	<i>Selenomonas ruminantium</i>	Acetat, Propionat, Lactat
	<i>Succinomonas amyolytica</i>	Acetat, Propionat, Succinat
	<i>Streptococcus bovis</i>	Lactat
Lactolytisch	<i>Selenomonas lactilytica</i>	Acetat, Succinat
	<i>Megasphaera elsdenii</i>	Acetat, Propionat, Butyrat, Valerat, Capronat, Wasserstoff, Kohlendioxid
Succinolytisch	<i>Schwartzia succinovorans</i>	Propionat, Kohlendioxid
Pektinolytisch	<i>Lachnospira multiparus</i>	Acetat, Formiat, Lactat, Wasserstoff, Kohlendioxid

1.3 Der ruminale Stickstoffkreislauf

Die Stickstoffzufuhr ist für die Wiederkäuer von eminenter Bedeutung, zumal ihre Nahrung relativ arm an gebundenem Stickstoff ist. Die Wiederkäuer absorbieren einen Teil des Ammoniaks, der aus der Fermentation von über die Nahrung aufgenommenem Protein entsteht. Da der Gehalt an freien

Aminosäuren im Pansen niedrig ist, spielt dieser Teil des Ammoniaks eine eminente Rolle beim Aufbau der mikrobiellen Proteine und wird auch für die Synthese der Proteine des Wirtorganismus verwendet (Røjen et al. 2010; Reynolds et al. 2008; Reilly et al. 2002; Lengeler et al. 1999). Der andere Teil, der über den Blutkreislauf der Leber zugeführt wird, wird in Harnstoff umgewandelt bzw. zu Glutamin synthetisiert (Reynolds et al. 2008). Sinkt der Stickstoffgehalt in der zugeführten Nahrung, wird das Defizit mittels Resorption in den Nieren und Beförderung über die Blutbahn und das Pansenepithel kompensiert (urohepatischer Kreislauf) (Reynolds et al. 2008; Lengeler et al. 1999). Dabei spielen Transporterproteine eine unterstützende Rolle, und der Grad ihrer Expression könnte Aufschluss über die Veränderung der Harnstoffpermeabilität des Pansenepithels bei einer veränderten Stickstoffzufuhr über die Ernährung geben (Røjen et al. 2010). Der ruminale Verdauungsmechanismus hängt eng mit der Proteinzerlegung und einer effizienten Nutzung des Stickstoffs zusammen. Denn dieser wird bei der Aufschließung der Aminosäuren in den Vormägen in den Blutkreislauf abgesetzt, und die Resorption von Purinbasen aus dem Duodenum zieht in Verbindung mit der mikrobiellen Gärung ebenfalls einen Stickstoffverlust nach sich. Der effektive Stickstoffverlust ergibt sich aus der Differenz im Puringehalt zwischen der über die Nahrung zugeführten Menge und jener des ruminalen Ausflusses (Røjen et al. 2010).

Der Pansen der Wiederkäuer ist in der Lage, einen Mangel an Stickstoff und Harnstoff mittels Resorption aus dem Blutkreislauf auszugleichen. Untersuchungen an Nutztieren ergaben, dass diese Fähigkeit in der Weise genutzt werden kann, dass die Menge des über die Futtermittel zugeführten Stickstoffs mit der rezyklierbaren abgeglichen wird. Daraus resultierte ein verbessertes Verhältnis zwischen der Resorptions- und der Extraktionsrate des Harnstoffs (Røjen et al. 2010). Aus einer anderen Untersuchung an wiederkäuenden Nutztieren geht hervor, dass der Harnstofftransport durch das Darmepithel nicht rein über die Massenwirkung gesteuert wird, sondern auch über das Verhältnis zwischen arterieller Harnstoffkonzentration und Harnstoffextraktionsrate: Letztere nimmt ab, wenn erstere steigt. Als Erklärung dafür erschienen im Ergebnis zwei Hypothesen plausibel: 1) Der Transport mittels Massenwirkung in Verbindung mit einer Verringerung der Harnstoffdurchlässigkeit des Darmepithels bei erhöhter Stickstoffzufuhr wird über die Expression und Aktivität bestimmter, noch nicht identifizierter Proteine gesteuert, die den Harnstoff durch das Darmepithel transportieren. 2) Die Intervention dieser Proteine mit ihrer fixen Transportkapazität könnte auch die feste Harnstoff-Diffusionskapazität im Epithelbereich unabhängig von der nachgeführten Harnstoffmenge und dem über die Nahrung verfügbaren Stickstoffgehalt erklären (Kristensen et al. 2010).

1.4 Wechselwirkung zwischen den Futtermitteln und den Mikroorganismen des Pansens

In der heutigen intensiven Viehhaltung finden die komplexen Prozesse der Wechselwirkung von Proteinen aus Nahrung und Energie sowie der Auswirkungen auf die Fermentation im Pansen und die Leistungsfähigkeit des Milchviehs nicht immer die gebührende Beachtung. Wenn Proteine, die in den Geweben als Aminosäuren zur Glukonbildung oder von ruminal lokalisierten Mikroorganismen zur Energiegewinnung herangezogen werden, ein übermäßiger Bestandteil der Futtermittel sind, fällt die Produktionseffizienz jäh ab, und eine bedeutende Menge davon geht in der Gestalt von Fäkalien, Urin und gasförmigem Stickstoff an die Umwelt verloren (Agle et al. 2009). Die Überfütterung der Milchkühe mit Proteinen kann auch seinen Tribut im Energiebereich fordern und sich möglicher Weise sogar auf die Reproduktionsleistung negativ auswirken. Trotz der weitreichenden und gravierenden Folgen dieser komplexen Beziehungen besteht in der intensiven Milchkuhhaltung bei der Fütterung nach wie vor eine Tendenz zum Proteinexzess, und diverse Defizite im aktuellen Fütterungssystem haben die Problematik noch verschärft (Agle et al. 2009). Im Ergebnis kann der je landwirtschaftlicher Produktionseinheit gemessene Stickstoffüberschuss (über Futtermittel eingeführter Stickstoff vermindert um den über Milch, Fleisch und Dung abgeführten Stickstoff) bedeutend sein und die Umweltbelastung durch die Gesamtheit der Operationen und Prozesse der Viehhaltung erschweren (Agle et al. 2009).

Wenn in der Nutztierhaltung Pflanzenfresser unmittelbar von Grünfutter auf eine überwiegende Getreidenahrung umgestellt werden, konnte in Untersuchungen eine Verminderung des Pansen-pH-Werts in Folge der Milchproduktion festgestellt werden, was zu Verdauungsstörungen und schließlich einer herabgesetzten Leistung der betroffenen Tiere führen kann (Fernando et al. 2010; Kong et al. 2010 [2]). Das durch die Getreidenahrung induzierte saure Milieu begünstigt die Vermehrung bestimmter Bakterienstämme wie des pathogenen *Fusobacterium necrophorum* (Sadet-Bourgeteau et al. 2010). In Reaktion auf das veränderte Nahrungsangebot stellt sich die Zusammensetzung der ruminalen Mikrobiota von der Dominanz cellulolytischer auf jene amylolytischer Bakterien um (Madigan et al. 2009). Um der Säuerung und den damit verknüpften Phänomenen abzuhelpen, wurden Fütterungsprogramme entwickelt, mit deren Hilfe Milch produzierende Nutztiere von der Grünfütterung allmählich auf die hoch konzentrierte Getreideernährung umgestellt werden, indem in Schritten der Getreideanteil angehoben und der Faseranteil im selben Ausmaß abgesenkt wird. In dieser Adaptionsphase laufen im Pansenmilieu Veränderungen ab, die für die lokale mikrobielle Ge-

meinschaft eine gewisse Periode der Anpassung an die neuen Bedingungen erfordern, damit am Ende die angebotene Nahrung wieder auf eine möglichst effiziente Weise genutzt werden kann (Fernando et al. 2010; Kong et al. 2010 [2]). Eine abrupte Umstellung von einer cellulosereichen auf eine stärkereiche Ernährung würde eine enorme Vermehrung der entsprechenden Bakterien wie *Streptococcus bovis* auslösen, was über die gesteigerte Bildung von Milchsäure als Fermentationsprodukt zu einer Übersäuerung des Pansens und unter Umständen zum Tod des Wirttiers führen kann. Bei einer langsamen Umstellung tritt keine Störung der ruminalen Prozesse ein, da *Streptococcus bovis* nicht angesprochen wird und nur flüchtige Carbonsäuren gebildet werden (Madigan et al. 2009).

1.5 Archaea und Bakterien im Pansen und ihre Funktionen

1.5.1 Archaea

Für den ruminalen Stoffwechsel von großer Bedeutung sind innerhalb der Archaea die strikt anaerob lebenden Methanogenen. Sie sind dafür verantwortlich, dass die Wiederkäuer durch Aufstoßen 6% der aufgenommenen Energie ungenutzt an die Umwelt verlieren und damit einen viel diskutierten Beitrag zum Klimawandel leisten (Whitford et al. 2001; Johnson et al. 1995). Einige Gattungen der methanogenen Archaea wie *Methanobrevibacter*, *Methanomicrobium*, *Methanobacterium* und *Methanosarcina* sind in großer Anzahl im Pansen zu finden (Whitford et al. 2001). Häufig sind die methanogenen Archaea in Symbiosen mit Protozoen anzutreffen. Beim Abbau komplexer Polysaccharide, in dessen Verlauf unter anderem flüchtige Fettsäuren, CO₂, NH₄ und H₂ entstehen, stellen die Methanogenen Methan her (Pitta et al. 2010).

1.5.2 Bakterien

Die Bakterienarten des Pansens produzieren über die zugeführten Nährstoffe flüchtige Fettsäuren, Proteine und Vitamine (Chen et al. 2011). Eine Einteilung der Bakterien des Pansens kann an Hand ihrer Lokalisation vorgenommen werden, abhängig davon, ob sie in der Pansenflüssigkeit oder auf dem Epithel oder mit den Nahrungspartikeln verbunden leben. Die meisten bisher durchgeführten Untersuchungen konzentrierten sich auf die an den festen Partikeln anhaftenden oder in der Pansenflüssigkeit vorkommenden Bakterien (Chen et al. 2011). Sie ergaben auch, dass die ruminale Bakteriengemeinschaft sensibel auf Veränderungen in der Ernährung, durch das Alter, im Gesundheitszustand

des Wirts sowie auf eingesetzte Antibiotika reagieren und nach der geographischen Zuordnung und sogar der Jahreszeit variieren kann (Chen et al. 2011).

Bakterien der Flüssigphase des Pansens

Eine Untersuchung über die Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaft des Pansens bei der variierten Fütterung mit Alfalfa und Triticale ergab für die Flüssigphase, dass die Genera *Succiniclasticum*, *Anaerovorax*, *Succinivibrio* sowie *Anaeroplasma* bei beiden Ernährungsvarianten nachzuweisen waren, die Genera *Hallella*, *Oribacterium*, *Clostridium*, *Mitsuokella*, *Bulleidia* sowie *Sutterella* nur bei der Fütterung mit Alfalfa auftraten und die Genera *Rikenella*, *Moryella*, *Acetivibrio*, *Levilinea* sowie *TM7* nur bei der Fütterung mit Triticale vorkamen (Kong et al. 2010 [2]).

In einer anderen Untersuchung, die vor der Umstellung auf ein Futtermittel aus Destillierrückständen und anderen Bestandteilen erfolgte, wurden in der Flüssigphase des Pansens und in Kotproben von NutZRindern zahlreiche Genera nachgewiesen, die in der Rangfolge ihres Auftretens angeführt seien: *Prevotella*, *Succinivibrio*, *Megasphaera*, *Butyrivibrio*, *Ruminobacter*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Oscilspira*, *Cytophaga*, *Enterococcus*, *Roseburia*, *Eubacterium*, *Holdemania*, *Porphyromonas*, *Acidaminococcus*, *Selenomonas*, *Spirochaeta*, *Ruminococcus*, *Acinetobacter*, *Acetanaerobacterium*, *Alistipes*, *Desulfovibrio*, *Akkermansia*. Nach der Umstellung ist eine Veränderung in der Zusammensetzung des Mikrobioms sowie in der Häufigkeit der auftretenden Genera der ruminalen Flüssigphase festzustellen (Callaway et al. 2010).

An den Nahrungspartikeln anhaftende Pansenbakterien

Bezüglich der mit den Nahrungspartikeln verhafteten Bakterien konnten in der weiter oben schon angeführten Untersuchung (Kong et al. 2010 [2]) die Genera *Prevotella*, *Butyrivibrio*, *Pseudobutyrvibrio*, *Ruminococcus*, *Xylanibacter*, *Hallella*, *Succiniclasticum*, *Fibrobacter* *Levilinea* sowie Genera der Familie *Lachnospiraceae* wie *Lachnobacterium* bei beiden Fütterungsvarianten ermittelt werden, nur bei der Fütterung mit Alfalfa traten die Genera *Hallella*, *Oribacterium*, *Clostridium*, *Mitsuokella*, *Bulleidia* sowie *Sutterella* auf, und die Genera *Tannerella*, *Papillibacter*, *Sporobacter*, *Succinimonas*, *Ruminobacter*, *Hallella*, *Papillibacter*, *Bulleidia*, *Anaerovorax*, *Succinivibrio*, *Succiniclasticum*, *Levilinea* sowie *TM7* fanden sich bei der Fütterung mit Triticale (Kong et al. 2010 [2]). Wie Pflanzenmaterial im Pansen von Wiederkäuern durch Bakterien besiedelt wird, zeigt die folgende Abbildung 2.

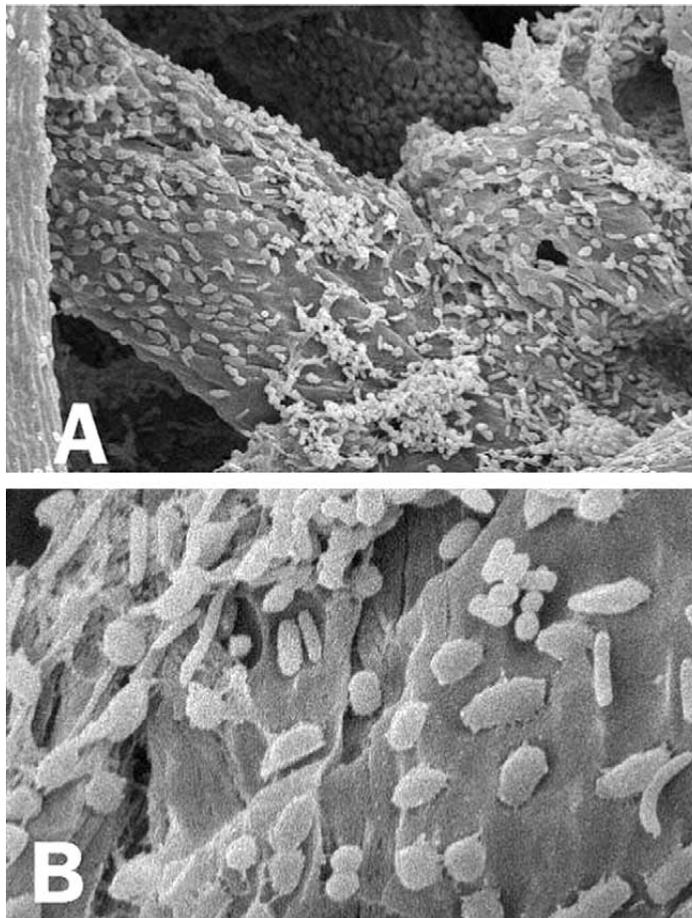


Abbildung 2. Rasterelektronenmikroskopisches Bild der Besiedlung von Pflanzenmaterial durch diverse Bakterien. **A)** Anhaftung an eine pflanzliche Zellwand; **B)** Anhaftung der Bakterienzellen mittels Protuberanzen (Bindungsfaktoren) an der Pflanzenoberfläche (Krause et al. 2003).

An das Pansenepithel gebundene Bakterien

Forschungen zeigten auf, dass die an das Epithel gebundenen Bakterien, die nur 1% bis 2% der gesamten Bakterienmasse des Pansens ausmachen (Chen et al. 2011), stärker an die Verdauungsprozesse des Wirtorganismus gebunden sind als die das Lumen bewohnenden Stämme. Erstere sind auch als epimurale Bakteriengemeinschaft (BEC) bekannt. Viele von ihnen sind fakultativ anaerob und spielen bei der Fermentation der Nährstoffe eine geringe Rolle. Dagegen sind sie stark an der Hydrolyse des Harnstoffs aus dem Blutkreislauf in die Pansenwand und der anschließend dort ablaufenden Ureolyse beteiligt (Kong et al. 2010 [2]; McCowan et al. 1980; Sadet et al. 2007; Chen et al. 2011, Wallace et al. 1979). Außerdem hat die epimurale Bakteriengemeinschaft wichtige Funktionen inne wie die Absonderung von Sauerstoff, die Säuberung der Pansenwand, die Wiederherstellung von Gewebe, die Produktion eines schützenden Biofilms (Sadet-Bourgeteau et al. 2010; Sadet et al. 2007; Chen et al. 2011) sowie die Expression von Urease (Sadet-Bourgeteau et al. 2010). Unterschiedliche Mikromilieus bieten dort hoch spezialisierten Gemeinschaften die jeweils erforderlichen Lebensbedingungen (McAllister et al. 1994). Die dem Pansenepithel anhaftenden Bakterien könnten auch an den Wechselwirkungen zwischen den anderen ruminalen Mikroorganismen und dem Wirtorganismus beteiligt sein und für das Pansengewebe, das verschiedenen Fermentationsprozessen ausgesetzt ist, als eine Art von Barriere fungieren (Sadet et al. 2007; Chen et al. 2011).

Wenn die Ernährung von Wiederkäuern auf einen höheren Getreidgehalt umgestellt wird, kann im Pansenepithel *Fusobacterium necrophorum* verstärkt auftreten, das opportunistisch pathogen und acidogen wirkt. Die Auswirkungen dieses Phänomens sind noch ausreichend erforscht (Sadet-Bourgeteau et al. 2010). Wie dicht die Bakterien das Epithel des Rinderpansens besiedeln, zeigt eine Untersuchung auf, der zu Folge beim Schaf $4,4 \cdot 10^7 - 2,2 \cdot 10^8$ und beim Rind (mit Heu gefütterte Färsen) $7,3 \cdot 10^9 - 2,0 \cdot 10^{10}$ Bakterien je g nassen Pansengewebes nachzuweisen sind (Chen et al. 2011). Die Besiedlung des Pansenepithels ist in der folgenden Abbildung 3a schematisch dargestellt. In Abbildung 3b sind die Anhaftung von Bakterien an ein Cellulosestück und dessen Verdauung in einer Vergrößerung mittels TEM dargestellt.

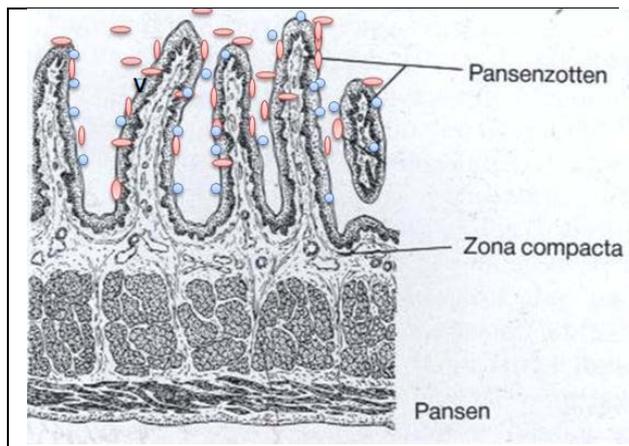


Abbildung 3a. Histologischer Aufbau eines Rinderpensens (Liebich 1999). Beschreibung des Querschnitts: mehrschichtiges Epithel (Epithelium stratificatum squamosum), Zona compacta, Tunica muscularis. Schematische Darstellung der Anlagerung von Bakterien (Stäbchenbakterien: rot; Kokken: blau): Modifizierung durch den Autor.

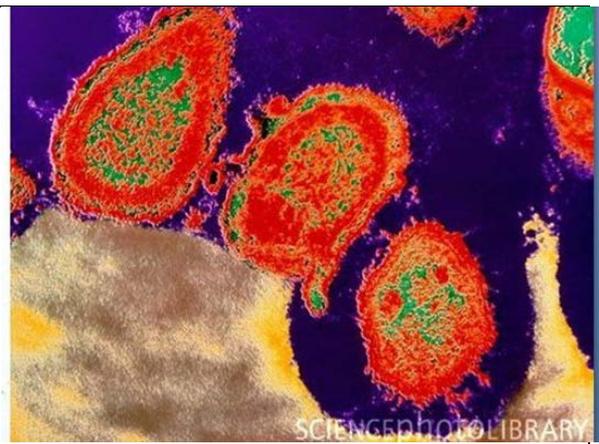


Abbildung 3b. Aufnahme mittels Transmission Electron Micrograph (TEM). Pansenbakterien (rot-grün dargestellt) haften an einem Cellulosestück an und verdauen es. Die Einbuchtung in der rechten Bildhälfte zeigt den Fortschritt dieser Verdauung (<http://www.sciencephoto.com/media/11329/enlarge>).

Die Erkenntnisse über die epitheliale Bakteriengemeinschaft des Rumens sind immer noch rudimentär, weil sie zum größten Teil auf der phänotypischen Beschreibung beruhen (Sadet et al. 2007). Wie schon ausgeführt, konnte die Biodiversität dieses Subökosystems mit den bisher entwickelten Methoden nicht ausreichend dargestellt werden, da sie nicht kultivierbare Bakterien und genotypisch nah verwandte Spezies unberücksichtigt ließen. Dies änderte sich, als auf der Molekularbiologie beruhende Methoden entwickelt wurden. Durch PCR-Klonierung und DNS-Sequenzierung sowie den Aufbau von Metagenomdatenbanken wurde dieses Defizit teilweise ausgeglichen. Mittels dieser Methoden wurde der Einfluss der Umweltbedingungen auf die vorherrschenden Mikrobiota immer offensichtlicher. Es zeigte sich, dass insbesondere die Ernährung der Wiederkäuer einen bedeutenden Einfluss auf die mikrobielle Lebensgemeinschaft hat. Zum Beispiel konnte nachgewiesen werden, dass eine Umstellung der Futtermittel die Fermentation beeinflusst, veränderte Abläufe auf der physikalisch-chemischen Ebene hervorruft und schließlich die Begünstigung bestimmter Typen von Mikroorganismen nach sich zieht (Sadet et al. 2007; Chen et al. 2011; Li et al. 2011). Es ist zwar bei einer Umstellung der Ernährung die ruminale Besiedlung insgesamt Veränderungen unterworfen, doch wiesen Untersuchungen nach, dass dies auf das Mikrobiom des Epithels in einem geringeren Ausmaß zutrifft als auf die Mikrobiota der flüssigen und der festen Phase. Dies könnte daran liegen, dass die Epithelbakterien andere metabolische Funktionen und Substratanforderungen haben als die auf den direkten Kontakt mit der Nahrung angewiesenen Bakterien des Lumens (Sadet-Bourgeteau et al. 2010).

Die Anpassungsfähigkeit der ruminalen Bakterien an Veränderungen im Nahrungsangebot wird von einer anderen Arbeit bestätigt, der zu Folge die Fütterung entweder mit Wiesenheu oder mit Getreidekonzentrat erfolgte. Es wurde gezeigt, dass der Aufbau der ruminalen Gemeinschaft völlig unterschiedlich und einer ständigen dynamischen Veränderung unterworfen ist. Bei der Fütterung mit Wiesenheu dominierten Genera des Phylums *Firmicutes*, während bei der Fütterung mit Getreidekonzentrat Genera des Phylums *Bacteroidetes* überwogen (Fernando et al. 2010).

Die unterschiedliche Fütterung entweder von Silage oder von Heu ergab in einer Untersuchung, dass Spezies der Phyla *Bacteroidetes*, *Firmicutes* und *Proteobacteria* zwar in beiden ruminalen Gemeinschaften vertreten waren, jedoch bei der Silagefütterung häufiger auftraten als bei der Heufütterung. Die Zugabe von Flachssamen verringerte ihre Häufigkeit bei der Silagefütterung, ergab aber keine nennenswerte Veränderung bei der Heufütterung (Kong et al. 2010 [1]).

Aus einer vorausgehenden Untersuchung an Rindern auf einer Raigras-Klee-Weide wurden proteolytisch aktive Ruminalbakterien zahlenmäßig erfasst und im Ergebnis vier Gruppen zugeordnet: *Butyrivibrio fibrisolvens* war häufiger bei der Zugabe von Kohlehydraten sowohl beim angepassten als auch beim niedrigen Stickstoffgehalt. *Prevotella bryantii* überwog bei der Zugabe einer niedrigen Stickstoffdosis in Verbindung mit Kohlenhydraten. *Eubacterium sp.* war bei der Futterzugabe von Kohlehydraten weniger häufig vertreten, ohne Unterscheidung zwischen angepasstem und niedrigem Stickstoffgehalt. *Streptococcus sp.* waren beim Futter mit einem geringen Stickstoffgehalt in Verbindung mit Kohlehydraten weniger häufig vertreten (Reilly et al. 2002).

Die folgenden Abbildungen zeigen verschiedene Formen der bakteriellen Kolonisierung des Pansenepithels sowie einzelner Epithelzellen. In Abbildung 4 ist der Besiedlung des Dorsalsacks eines Pansenepithels mit Kokken dargestellt, während Abbildung 5 die Besiedlung eines Bereichs des Pansenepithels mit Stäbchenbakterien zeigt.

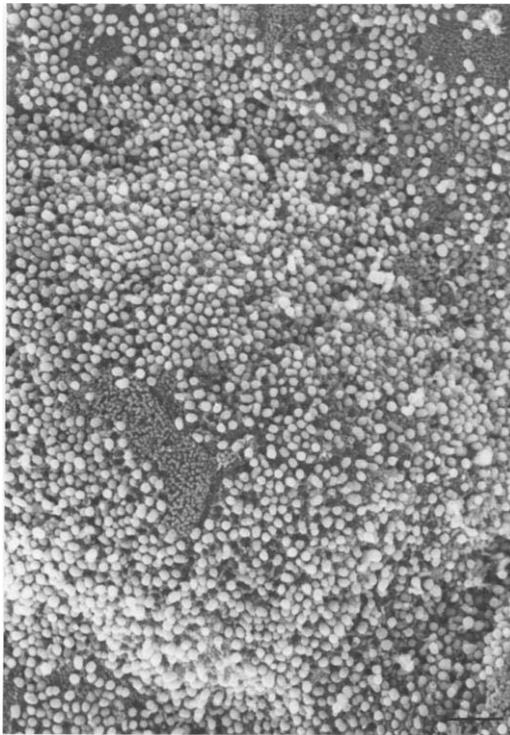


Abbildung 4. Abbildung der Besiedlung des Dorsalsacks eines Pansenepithels mit Kokken im Rasterelektronenmikroskop (McCowan et al. 1980).

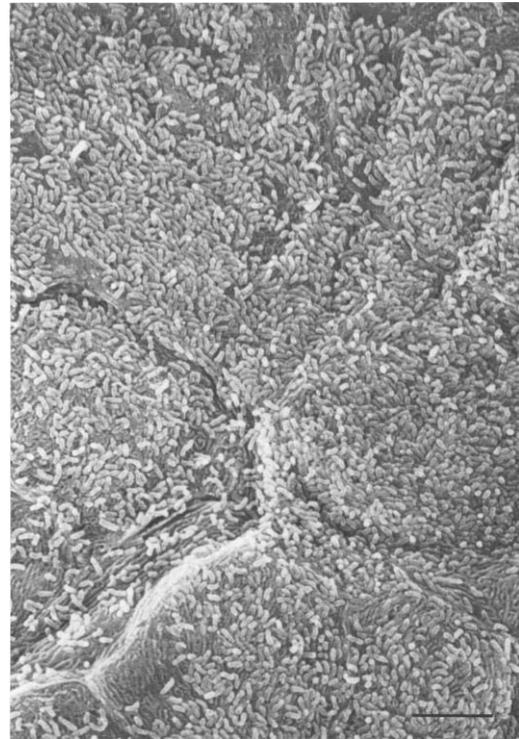


Abbildung 5. Abbildung der Besiedlung anderer Teile desselben Pansenepithels mit gekrümmte Stäbchen bildenden Bakterien im Rasterelektronenmikroskop (McCowan et al. 1980).

1.6 Die Rolle der Protozoen im Pansen

Die Anwesenheit und Mitwirkung der Protozoen ist für die ruminalen Prozesse von großer Bedeutung. Sie machen bis zu 50% der ruminalen mikrobiellen Biomasse aus und bilden, so ergaben Untersuchungen, einen wesentlichen Anteil an der Produktion von Ammoniak und flüchtigen Fettsäuren. Schon lange ist bekannt, dass Protozoen wichtige Räuber von Bakterien und anderen Mikroorganismen sind und dass sie in die Bakterienkonzentration des Pansens regulatorisch eingreifen (Ozutsumi et al. 2005; Madigan et al. 2009; Lengeler et al. 1999). Eine Veränderung im Bestand oder der Zusammensetzung der Protozoen wirkt sich auf die Bakteriengemeinschaft im Pansen aus. So bewirkt ihre Entfernung eine Überhandnahme der Bakterien und eine Abnahme der Methanogenen. Wenn im Gegenteil Protozoen inokuliert werden, nimmt der Bestand an cellulolytischen und amylolytischen Bakterien markant ab (Ozutsumi et al. 2005). Allerdings erhebt sich die Frage, ob Untersuchungen nach Methoden, die auf kultivierbaren Mikroorganismen beruhen, die tatsächliche mikrobielle Zusammensetzung des Pansens widerspiegeln. Häufig auftretende Protozoen des Pansens sind *Entodinium spp.*, *Dasytricha sp.*, *Polyplastron sp.* (Ozutsumi et al. 2005). Einige von ihnen sind zur Hydrolyse von Cellulose und Stärke befähigt (Madigan et al. 2009; Lengeler et al. 1999).

1.7 Ruminale Produktion von Nährstoffen – Implikationen

Die Nährstoffproduktion durch die mikrobielle Gärung im Pansen erfolgt über die dort angesiedelten Mikroorganismen und hängt wesentlich von der Nahrungszusammensetzung, dem Alter, der eventuellen Gabe von Antibiotika sowie der Gesundheit der Wirtorganismen, d.h. konkret der wiederkäuenden Nutztiere ab. Die anaeroben Symbionten, die diese Flora bilden, stehen in Interaktion und spielen bei der Leistungsfähigkeit des Wirtorganismus eine große Rolle. Diese Interaktion als komplexer Prozess bedeutet aber nicht nur ein Miteinander sondern auch ein Gegeneinander, wodurch neben Verbindungen wie flüchtigen kurzkettigen Fettsäuren, Aminosäuren und Proteinen auch Kohlendioxid und Wasserstoff entstehen (Zhou et al. 2009; Deng et al. 2008). Archaea nutzen den hohen Wasserstoffgehalt im Pansen, um aus diversen Kohlenstoffverbindungen unter Anderem Methan zu erzeugen. Sie sind so nicht nur für einen Anteil von 13% bis 19% an den weltweiten Treibhausgasen verantwortlich, sondern reduzieren auch den Energiegewinn aus der dem Nutztier zugeführten Nahrung (Zhou et al. 2009; Whitford et al. 2001; Pitta et al. 2010). Mit dem Ziel einer Eindämmung dieses Energieabflusses versuchte die Forschung Parameter zur Verbesserung der Pansenfunktionen zu fin-

den, wie die Erhöhung der Umsetzung von Stickstoff in Proteine, dessen verminderte Ausscheidung oder die Emissionsreduktion bei Methan mittels der Einflussnahme auf das Mikrobiom des Pansens über die Zusammensetzung der Nahrung. Diese Bemühungen waren nicht besonders erfolgreich, da bei den Manipulationen auf die Erhaltung der Pansenfunktionen in ihrer Gesamtheit geachtet werden musste (Kim et al. 2011).

1.8 Ziele der Arbeit

Im Verlauf der Evolution hat sich eine enge Symbiose zwischen den Wiederkäuern und den Mikroorganismen – Bakterien, Archaea, Protozoen und Pilze – herausgebildet, die in enormer Anzahl und Vielfalt den Pansen besiedeln und nicht nur zum Wirtorganismus sondern auch untereinander in enger Wechselwirkung und Abhängigkeit stehen. Trotz großer Fortschritte im Verständnis der ruminalen Prozesse und der Interaktionen bleibt noch viel Forschungsarbeit zu leisten, vor allem angesichts der Tatsachen, dass die Erkenntnisse vorwiegend auf Studien zu kultivierbaren Spezies beruhen und sich die große Mehrheit aller Bakterien noch nicht unter Laborbedingungen kultivieren lässt.

Das Ziel dieser Arbeit galt der Charakterisierung der mikrobiellen Gemeinschaft des Pansenepithels von Rindern. Im dazu gesetzten Rahmen konnte in zwei Proben – die eine von einem dänischen Rind und die andere von einem österreichischen Rind – zahlreiche Bakterien ermittelt werden. Die Probe vom dänischen Rind enthielt Sequenzen aus zwei Entnahmen nach zwei Fütterungsvarianten mit einem höheren bzw. einem niedrigeren Stickstoffgehalt. Die Probe vom österreichischen Rind spiegelt zwei Entnahmevarianten von ruminalem Epithelgewebe durch Abschneiden bzw. Abbürsten wider. Die Auswertung dieser Proben soll in die phylogenetische Zuordnung der ermittelten Sequenzen münden und Aufschluss darüber geben, in welcher Weise die ruminale Gemeinschaft auf eine unterschiedliche Zusammensetzung des Futtermittels reagiert. Zur Ermittlung der Sequenzen aus den beiden Proben wurde der rRNS-Ansatz angewandt, bei dem die 16S-rRNS-Gene der Bakterien amplifiziert und in der Folge kloniert, sequenziert und analysiert wurden. Diese Untersuchung soll schließlich zu Erkenntnissen beitragen, auf deren Grundlage über eine exakt abgestimmte Zusammensetzung der Futtermittel für Wiederkäuer einerseits eine optimale Umsetzung der zugeführten Nährstoffe in Produkte für die menschliche Ernährung und andererseits über deren effiziente Nutzung eine Schädigung der Umwelt – z.B. in Form von freigesetztem Methan – möglichst gering gehalten wird.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Tabelle 2. Verwendete Chemikalien.

Chemikalien	Hersteller
Eisessig	Merck – Deutschland
Tris-HCl	Sigma Aldrich – Deutschland
EDTA	Sigma Aldrich – Deutschland
RNase A	Qiagen – Deutschland
H ₂ O _{bidest}	
NaOH	Merck – Deutschland
SDS	AppliChem – Deutschland
Kaliumacetat	Merck – Deutschland
2-Propanol: (Isopropanol)	Sigma Aldrich – Deutschland
Farbstoff 33258 (= Bisbenzimid) 1mg/ml 10mg H33258 10ml ddH ₂ O	Hoechst – Deutschland
Ethanol 70%	Merck – Deutschland
Calf Thymus DNS 100ng/μl dd H ₂ O	Sigma Aldrich – Österreich
TaKaRa Ex Taq™ HS (hot start) 5 units/μl	TaKaRa – Japan
Ex Taq Puffer 10x	TaKaRa – Japan
dNTP Mix 2,5mM	TaKaRa – Japan
DEPC behandeltes Wasser	Fermentas – Deutschland
DNeasy Blood & Tissue Kit	Qiagen – Deutschland
Proteinase K	Qiagen – Deutschland
dNTP-Mix	Thermo – United Kingdom
SYBR Safe DNS Gel Stain	Invitrogen – USA
Ethidiumbromid	Sigma Aldrich – Deutschland
MgCl ₂ 50mM Endkonzentration: 2mM	Invitrogen – USA
dNTP 50mM Endkonzentration:1mM (0,25mM)	Invitrogen – USA
Taq Platinum 5U/μl Endkonzentration:0,025U	Invitrogen – USA
Puffer 10x	Invitrogen – USA
Restriktionsenzym (Msp1, "Fast Digest")	Fermentas – Deutschland
Fast digest Green Buffer 10x	Fermentas – Deutschland
StrataClone Cloning Buffer	Agilent Technologies – USA
StrataClone Vector pSC-A-amp/kan	Agilent Technologies – USA
StrataClone SoloPack competent cells	Agilent Technologies – USA
Agarose	Sigma Aldrich – Deutschland

2.2 Nährmedien, Puffer, Lösungen

Tabelle 3. Verwendete Lösungen, Nährmedien und Puffer.

Farbstofflösung (=Bisbenzimid)	
H 33258 1µg/ml	Hoechst – Deutschland
0,2M NaCl	Merck – Deutschland
10 mM Tris-Cl	Sigma Aldrich – Deutschland
1 mM EDTA	Sigma Aldrich – Deutschland
TNE-Puffer 10x	Sigma Aldrich – Deutschland
Tris 100mM	Sigma Aldrich – Deutschland
EDTA 10mM	Sigma Aldrich – Deutschland
NaCl 2M	Merck – Deutschland
LB Agar (je 1l)	
NaCl 0,17M	Merck – Deutschland
Trypton 1% (w/v)	Becton Dickinson & Comp. – USA
Hefeextrakt 0,5% (w/v)	Merck – Deutschland
Agar Agar 2% (w/v)	Merck – Deutschland
Ampicillin filtersterilisiert 10mg/ml	Roche – Deutschland
LB Medium flüssig (je 1l)	
NaCl 0,17 M	Merck – Deutschland
Trypton 1% (w/v)	Becton Dickinson & Comp. – USA
Hefeextrakt 0,5% (w/v)	Merck – Deutschland
2% X-Gal (w/v)	
5-bromo-4-chloro-3-inodlyl-β-D-galactopyrano-side (X-Gal)	AppliChem – Deutschland
Dimethylformamid (DMF)	Sigma Aldrich – Deutschland
Kaliumacetat 5M	Merck – Deutschland
NaOH 2N	Merck – Deutschland
SDS 10%	AppliChem – Deutschland
Slow Loading Buffer (SLB)	
Auftragspuffer (33% Glycerin, 0,07% Bromphenolblau)	
Bromphenolblau 0,051mM	Merck – Deutschland
Glycerin 16 ml	Merck – Deutschland
ddH ₂ O 35 ml	

2.3 Geräte und Material

Tabelle 4. Verwendete Geräte und Materialien.

Eppendorf Thermomixer Compact – Nr. 5350 31435	Eppendorf AG – Deutschland
Biometra TB2 Thermoblock	Whatman Biometra GmbH – Deutschland
Eppendorf Zentrifuge – Nr. 5424	Eppendorf AG – Deutschland
Eppendorf Zentrifuge – Nr. 5410R	Eppendorf AG – Deutschland
Vortexer Janke & Kunkel Typ VF2 – Nr. 662735	IKA Labortechnik – Deutschland
diverse Pipetten	VWR International – Österreich
Eppendorf-Röhrchen 0,5ml; 1,5ml; 2,0ml	Eppendorf AG – Deutschland
Eppendorf-Pipetten 10µl; 100µl; 20µl; 1000µl	Eppendorf AG – Deutschland
Greiner-Röhrchen 50ml	Greiner Bio-One GmbH – Deutschland
Wasserbadschüttler GFL – Nr. 1092	Gesellschaft für Labortechnik mbH – Deutschland
Autoklav	Certoclav Sterilizer GmbH – Österreich
Diode Array Spectrophotometer – Nr. 8452A	Hewlett Packard Company – USA
Gel Doc 2000 Elektrophoresegerät	Bio-Rad – Deutschland
Power Supply Power Pack 3000 und 1000	Bio-Rad – Deutschland
Mikrowellengerät	(haushaltsübliches Exemplar)
Hoefer DyNa Quant 200 Fluorimeter	Pharmacia Biotech – USA

2.4 Verwendete Primer

Tabelle 5. Primer für die 16S-rRNS-Gen-Amplifizierung.

Primer	Sequenz (5'-3')	Ta [°C] ³	Spezifität	Referenz
616V ¹	AGA GTT TGA TYM TGG CTC	52	Bakterien	(Juretschko et al. 1998)
1492R ²	GGY TAC CTT GTT ACG ACT T		Bakterien und Archaea	(Lane 1991)
21V ¹	TTC CGG TTG ATC CYG CCG GA	56	Archaea	(DeLong 1992)

1 V = Vorwärtsprimer 2 R = Rückwärtsprimer 3 optimale Annealing-Temperatur des Primers

Tabelle 6. Primer für die Screening-PCR zur Insertkontrolle nach der Klonierung.

Primer	Sequenz (5'-3')	Ta [°C] ³	Referenz
M13V ¹	GTA AAA CGA CGG CCA G	60	StrataClone PCR Cloning Kit
M13R ²	CAG GAA ACA GCT ATG AC		

1 V = Vorwärtsprimer 2 R = Rückwärtsprimer 3 optimale Annealing-Temperatur des Primers

2.5 Verwendete Proben

Um festzustellen, ob sich ein unterschiedlicher Stickstoffgehalt auf die Zusammensetzung der ruminalen Gemeinschaft auswirken, wurde im Rahmen einer Untersuchung an der Universität Aarhus (Dänemark) das Futter für die zur Untersuchung verwendeten Rinder in der ersten Phase hoch („high“: 17,1%) und in der zweiten Phase niedrig („low“: 12,9%) mit Stickstoff angereichert. In der Folge erhielten neun Holsteinrinder, die sich in der zweiten Stillperiode befanden, diese unterschiedlichen Futtermittel in einem Cross-over-Design. Innerhalb jeder Phase wurden die Proben am 14. Tag nach der Verabreichung zwischen 11.00 und 12.00 Uhr durch eine bioptische Entnahme von ungefähr 20 Zotten der Pansenwand entnommen. Fünf Zotten wurden in jeweils ein 2ml-Röhrchen übertragen, in flüssigem Stickstoff Schock gefroren und bei -80°C gelagert. Fünf weitere Zotten wurden in eine RNS-Stabilisierungslösung in jeweils ein 2ml-Röhrchen gegeben, über Nacht bei 4°C aufbewahrt und gleichfalls bei -80°C gelagert. Zwischen den beiden Probenentnahmen wurde eine Transformationsphase von einem knappen Monat eingeräumt, um dem betroffenen Mikrobiom ausreichend Zeit für die Adaption an die geänderten Umweltbedingungen (Ernährung) zu gewähren (Røjen et al. 2010). Die Probe wurde schließlich eingefroren zur Analyse für die vorliegende Arbeit zugesandt. In der folgenden Tabelle 7 ist die Zusammensetzung der beiden Varianten des Futtermittels dargestellt.

Tabelle 7. Zusammensetzung der „High“- bzw. „Low“-Futtermittel-Variante (Kristensen et al., 2010).

Bestandteil	Anteil in „Low“-Variante (in g/kg Trockenmasse)	Anteil in „High“-Variante (in g/kg Trockenmasse)
Getreide-Silage	299	299
Gras-Klee-Silage	250	250
Gerste gewalzt	298	298
Sojamehl oder -hülle	---	120
Sojahüllen	96	---
Zuckerrohrmelasse	24	---
Mineral-Vitamin-Mischung	10	10
Palmöl-Fettsäuren Destillat	10	10
NaHCO ₃	5,0	5,0
Ca(H ₂ PO ₄) ₂	3,0	0,5
CaCO ₃	2,5	5,0
Na ₂ SO ₄	2,0	2,0
Chrom-III-oxid	1,0	1,0
Nährstoffe		
Trockenmasse (DM)	420	427
Rohasche (CA)	67	71
Rohprotein (CP)	129	171
Rohfett (CL)	39	38
Neutrale Detergenzfaser (NDF)	282	245

Zum Vergleich wurden zwei Proben von einem österreichischen Rind genommen, wobei dieses ein anderes Futter erhielt als das dänische Rind und zudem bei den beiden Rindern unterschiedliche Me-

thoden zur Gewinnung der Proben angewandt wurden. Beim österreichischen Rind wurde nicht das Futtermittel variiert, sondern wurden bei der Entnahme der Pansenprobe zwei Varianten gewählt. Mit einer sterilen Schere wurden einige mg Pansenepithel klein geschnitten und in zwei 1,5ml-Röhrchen gegeben. Ein Röhrchen diente zur Isolierung von DNS mit einem Protokoll für gramnegative Bakterien, während ein zweites Röhrchen für die DNS-Isolierung mit einem Protokoll für grampositive Bakterien vorbereitet wurde. Zudem wurde eine weitere Probe mit abgebürsteten Zotten vorbereitet. Diese wurden in einen PBS-Puffer in einem 1,5ml-Röhrchen gegeben und einmal gevortext. Der Rest – PBS und die Proben – wurde 10min lang bei 11000rpm zentrifugiert. Die Abläufe der Probengewinnung sind in Tabelle 8 schematisch dargestellt.

Tabelle 8. Auflistung der Probennahme.

Protokoll	Rind	Sequenz	Periode	Probe-Nr. nach N-%	Datum Probennahme	Datum Biopsie
F642_2U	1114	2	1	8074 (High)	30-04-2009	29-04-2009
F642_2U	1114	2	2	8073 (Low)	25-05-2009	24-05-2009
1 B	Ref.	---	---	---	12-07-2010	
1 Z	Ref.	---	---	---	12-07-2010	

* Zum österreichischen Rind (Ref.) liegen keine Daten vor.

2.6 Stammhaltung

Im Hinblick auf eine zuverlässige Aufbewahrung der Klone wurden diese auf Kryoröhrchen (VWR International) angelegt: Von jedem Klon wird dabei mit einer sterilen Öse ein Abstrich genommen, und dieser wird in Kryoröhrchen mit flüssigem Nährmedium und Perlen aufgelöst. Die Flüssigkeit wird anschließend abgesaugt, und die Klone bleiben an der porösen Oberfläche der Perlen haften. Die Kryoröhrchen werden anschließend bei -80°C gelagert.

2.7 Methoden

2.7.1 DNS-Isolierung für grampositive Bakterien

Wie in DNeasy Blood & Tissue Kit beschrieben, wird nach der Zentrifugierung der Überstand dekantiert. Inzwischen ist ein enzymatischer Lysispuffer hergestellt worden: Dazu werden 40µl Lysozym + 160µl Tris (10mM; pH 8) gemischt, wobei die Lysozym-Endkonzentration 100mg/ml betragen soll. Das Sediment wird anschließend in 180µl enzymatischem Lysispuffer resuspendiert und bei 37°C für mindestens 30min inkubiert. Danach werden 25µl Proteinase K und 200µl AL-Puffer ohne Ethanol dazu gegeben, und das Gemisch wird gevortext. Anschließend wird bei 56°C für 30min inkubiert, es werden der Probe 200µl Ethanol (96-100%) zugefügt, und das Ganze wird gründlich gevortext. Die Mischung wird einschließlich dem Sediment in die Minispin-Säule in einem 2ml-Sammelröhrchen gegeben. Bei 8000rpm wird 1min zentrifugiert. Danach werden der Durchfluss und das Sammelröhrchen verworfen. Die Minispin-Säule wird in neues 2ml-Sammelröhrchen gegeben, es werden 500µl AW1-Puffer dazugeben, und es wird für 1min bei 8000rpm zentrifugiert. Der Durchfluss und das Sammelröhrchen sind zu entsorgen. Die Minispin-Säule wird in ein neues 2ml-Sammelröhrchen gegeben, es werden 500µl AW2-Puffer dazu gegeben, für 3min bei 14000rpm zentrifugiert, um die Membran zu trocknen. Der Durchfluss und das Sammelröhrchen sind wiederum zu entsorgen. Wichtig ist bei diesem Vorgang, dass die Membran der Minispin-Säule vollständig getrocknet wird, denn der Restethanol könnte sonst mit den folgenden Reaktionen interferieren. Durch das Zentrifugieren ist dagegen sicher gestellt, dass kein Restethanol auf die nachfolgende Auswaschung übertragen wird. Die Minispin-Säule wird in ein frisches 1,5ml- oder 2ml-Mikrozentrifugen-Röhrchen gestellt, und 200µl AE-Puffer werden direkt auf die Membran pipettiert. Bei Raumtemperatur wird für 1min inkubiert und 1min bei 8000rpm zur Auswaschung zentrifugiert.

2.7.2 16S-rDNS-PCR

Das Template (DNS) wird in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß vorbereitet.

Tabelle 9. Herstellung des Mastermix.

Reagenzien	1x
TakaRa Ex Taq	0,25µl
dNTPs Mix	4,00µl
10x Ex Taq Puffer	5,00µl
Vorwärtsprimer	0,50µl
Rückwärtsprimer	0,50µl
dH ₂ O (Apotheke)	38,75µl

Alle Chemikalien bis auf Taq und die Proben werden gemischt. Bevor den Proben je 1µl des Templates (DNS) beigegeben wird, werden die Proben gevortext. Es müssen jedes Mal 1µl bzw. – je nach der Probe – 0,5µl der Proben verwendet werden. Daraufhin werden die Proben in den Thermocycler gestellt, und es wird das entsprechende Programm eingegeben.

Tabelle 10. 16S-rDNS-PCR-Programm.

Programm			Zyklen
Denaturierung	98 °C	10s	1x
Denaturierung	98 °C	10s	25x
Anlagerung	50 °C	30s	
Verlängerung	72 °C	90s	
Endverlängerung	72 °C	7min	1x

Gelelektrophorese

Je 8µl des PCR-Produkts werden mit 2µl SLB gemischt und in die Geltaschen pipettiert. Die Gelelektrophorese wird mit folgenden Parametern durchgeführt: -> 120 Volt -> Zeit: 30min. Die zugehörigen Bilder kann man auf dem angeschlossenen Computer mit dem Programm Quantity One betrachten. Das fertige Gel wird in das Bio-Rad-Gel-Doc-Gerät gegeben, das gleichfalls an einen Computer angeschlossen ist. Unter weißem Licht („Epi White“) kann die Wanne ausgerichtet werden, danach wird das weiße Licht durch ein ultraviolettes ersetzt, damit sich die Banden darstellen.

2.7.3 DNS-Messung am Fluorimeter

Die Funktion des Fluorimeters (Hoefer DyNa Quant 200; Pharmacia Biotech USA) beruht darauf, dass durch die Anlagerung des spezifischen Farbstoffs (Bisbenzimid H 33258; Hoechst) an die Lösung eines DNS-Doppelstrangs diese ihr Emissionsspektrum verändert. Wenn man dann das Emissionsspektrum einer gelösten DNS-Probe mit unbekannter Konzentration mit jenem einer DNS-Probe in Lösung und mit bekannter Konzentration („Standard“) jeweils nach der Beigabe des Farbstoffs vergleicht, kann man die DNS-Konzentration der unbekanntes DNS-Probe errechnen. Diese Ermittlungsmethode ist zuverlässiger als andere, weil sie auf DNS-Verunreinigungen weniger empfindlich reagiert.

Es werden zwei Röhrchen vorbereitet: eines mit Ethanol 70% zum Spülen der Küvette, eines mit ddH₂O zum Nachspülen der Küvette. Die Messlösung wird aus 10xTNE (pH 7,4) hergestellt, davon werden 5ml entnommen und mit 45ml ddH₂O durch Schütteln gemischt. Diese nun fertige Messlösung wird in ein frisches 50ml-Greiner-Röhrchen gegeben. Aus der Messbox werden 5µl Farbstoff entnommen und zu 50ml TNE 1x dazu gegeben. Die Küvette wird zuerst mit ungefähr 1ml Ethanol 70% ausgespült. Danach wird das Ethanol 70% aufgesaugt. Die Küvette wird mit ddH₂O ausgespült, und ddH₂O wird danach aufgesaugt. 2ml der Messlösung werden in der Folge in die Küvette pipetiert. Es werden 2µl des Standards (Calf Thymus DNS) dazu gegeben und mit der Pipettenspitze vermischt. Nach der Durchführung wird die Messlösung mit dem Standard aus der Küvette mit einer 1000µl-Pipette entfernt, und es werden 2ml der Farbstoff-Messlösung in die Küvette gegeben. 2µl der Probe werden anschließend zugegeben und mit der Pipettenspitze vermischt. Das Gerät zeigt dann den Konzentrationswert in ng/ml an.

2.7.4 Klonierung von PCR-Produkten

Vorbereitung des PCR-Produkts

Das DNS-Insert wird vorbereitet, indem eine Taq-DNS-Polymerase oder eine für PCR-Klonungsanwendungen geeignete Enzymmischung benutzt wird. Anzumerken ist dabei, dass eine Taq-DNS-Polymerase erforderlich ist, die die 3'-Adenin-Überhänge am PCR-Produkt produziert. Die PCR-Reaktion wird danach auf einem Agarosegel aliquot analysiert, um das Vorhandensein eines PCR-Produkts in der erwarteten Größe zu überprüfen. Wenn das zu klonierende PCR-Produkt <3kb ist, soll eine 1:10-Verdünnung der PCR-Reaktion in dH₂O vorbereitet werden.

Ligation des Inserts

Wie in StrataClone PCR Coning Kit beschrieben, wird die Ligationsreaktion vorbereitet, indem die folgenden Komponenten in genau dieser Reihenfolge kombiniert werden: 3µl StrataClone Klonungspuffer, 2µl PCR-Produkt (5-50ng; typischer Weise eine 1:10-Verdünnung einer PCR-Reaktion), 1µl StrataClone Vector psC-A-amp/kan Ampicillin. Durch wiederholtes Pipettieren erzielt man eine sanfte Durchmischung, worauf die Ligationsreaktion bei Raumtemperatur 5min inkubiert wird. Wenn die Inkubation abgeschlossen ist, wird die Reaktion auf Eis gelegt.

Transformation der kompetenten Zellen

Ein Röhrchen mit kompetenten StrataClone-SoloPack-Zellen wird für jede Ligationsreaktion angeeist. 1µl der Mischung aus dem Ligationsansatz wird danach in das Röhrchen mit den angeeisten kompetenten Zellen gegeben. Die Durchmischung soll durch vorsichtiges Umrühren (ohne auf und ab zu pipettieren) gemixt werden, indem die Pipettenspitze leicht gedreht wird. Die Transformationsmischung wird in der Folge auf Eis gelegt und für 20min inkubiert. Während der Inkubation soll das LB-Medium im Wasserbad auf 42°C vorgewärmt werden. Die Transformationsmischung wird danach bei 42°C für 45sec mit Hitzeschock im Wasserbad behandelt und gleich danach für 2min auf Eis inkubiert. Danach werden 250µl vorgewärmtes LB-Medium zur Mischung dazu gegeben. Die kompetenten Zellen werden für mindestens 1h bei 37°C geschüttelt. Zur besseren Durchlüftung wird dabei das Röhrchen mit den Zellen waagrecht auf den Schüttler gelegt. Während der Wachstumsperiode werden die LB-Ampicillin-Platten für den blau-weißen Kolonienachweis vorbereitet, indem man auf jeder Platte 40µl 2%-X-gal verteilt, wobei die blauen Kolonien die Plasmide ohne das Insert und die weißen Kolonien die Plasmide mit dem Insert darstellen, wobei letztere für die nachfolgende Sequenzierung verwendet werden. Anschließend werden 10µl (10µl und 40µl MQ Wasser oder LB-Medium) bzw. 100µl der Transformationsmischung auf den Nachweisplatten ausgespatelt. Die Platten werden abschließend bei 37°C über Nacht inkubiert.

Analyse der Transformanten

Mit jeweils einem sterilen Zahnstocher wird bei Feuer eine weiße Kolonie von der Platte abgepickt und auf eine neue LB-Platte in einem vorgefertigten Raster in jedem der ungefähr 20 nummerierten Quadranten ein Abstrich angefertigt. Der Zahnstocher wird nach dem Ausstreichen in jeweils ein Röhrchen mit 5ml flüssigem LB mit 5µl Ampicillin gegeben. Die Platten werden anschließend bei 37°C über Nacht inkubiert. Die Röhrchen mit dem flüssigen LB und dem Ampicillin stellt man danach auf den Schüttler und lässt bei 37°C im Brutschrank über Nacht inkubieren.

2.7.5 *E. coli*-Plasmid Miniprep

Tabelle 11. Lösungen.

Puffer P1		NaOH/SDS - Lösung		Kaliumacetat/Acetat - Lösung	
Tris-HCl pH 8,0	50mM	H ₂ O _{bidest}	8ml	5M Kaliumacetat	6ml
EDTA	10mM	2N NaOH	1ml	H ₂ O _{bidest}	2,85ml
RNase A	100µg/ml	10% SDS	1ml	Eisessig	1,15ml

4ml einer in LB-Medium gewachsenen Übernachtskultur werden 1min zentrifugiert (14000rpm, RT), der Überstand wird verworfen. Das Zentrifugat wird in 100µl P1-Puffer vollständig resuspendiert und 5min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nun wird zur Zellyse 200µl NaOH/SDS-Lösung zugegeben und das Ganze durch Schwenken gemischt. Die Suspension wird 5min auf Eis gestellt und während dieser Zeit nochmals gemischt. Zum Fällen der Proteine erfolgt die Zugabe von 150µl Kaliumacetat/Acetat-Lösung. Die Probe wird kräftig gemischt und nochmals 5min auf Eis gestellt. Nachdem 1min (14000rpm, RT) zentrifugiert worden ist, werden 450µl des Überstands in ein frisches Eppendorf-Reagenzglas (ERG) überführt. Darauf wird 1 Volumen Isopropanol gegeben und die DNS 10min bei Raumtemperatur gefällt. Nach 1min Zentrifugieren (14000rpm, RT) wird der Überstand abpipettiert, und es werden 500µl eiskaltes 70% Ethanol zur Waschung zugegeben. Anschließend wird wieder 1min zentrifugiert (14000rpm, RT). Der Überstand wird entfernt und das Sediment kurz getrocknet. Die Plasmid-DNS wird in 25-50µl MQ gelöst und bei -20°C gelagert.

Tabelle 12. Ansatz für das PCR-Screening (Invitrogen Taq-DNS-Polymerase).

Chemikalien	für 1 Probe
10x PCR-Puffer minus Mg	5µl
10mM dNTP Mix	1µl
50mM MgCl ₂	1,5µl
Primer M13F	1µl
Primer M13R	1µl
Platinum Taq-DNS-Polymerase	0,2µl
mit MQ H ₂ O	39,3µl
aufzufüllen auf	49µl

Tabelle 13. Programm für das PCR-Screening vom *E. coli*-Plasmid Miniprep.

		Zyklen
94 °C	3min	1x
94 °C	20sec	30x
60 °C	30sec	
72 °C	90sec	
72 °C	7min	1x

Verwendet wird dabei 1µl Template (Plasmid).

In alle Mini-Eppendorf-Röhrchen wird zu je 49µl der oben beschriebenen Mischung 1µl Template (Plasmid) dazu gegeben. Die Amplifikation wird mit den in Tabelle 12 beschriebenen Parametern durchgeführt. Den Mastermix füllt man in ein Miniröhrchen, das in den Thermocycler gestellt wird, und startet das PCR-Programm. Darauf wird das 1%-Agarosegel an ein Gelelektrophorese-Gerät bei 120V für 30min angeschlossen. Das PCR-Produkt wird für RFLP am nächsten Tag bei -20°C über Nacht gelagert.

2.7.6 Screening-PCR von Klonen ohne Miniprep

Tabelle 14. Ansatz für das PCR-Screening vom *E. coli*-Plasmid ohne Miniprep.

	für 25µl
Reagenzien	1x
MgCl ₂	1µl
Puffer	2,5µl
dNTP	1,25µl
M13-Primer F	0,5µl
M13-Primer R	0,5µl
Taq	0,125µl
MQ	19,125µl
Template	Gepickte Kolonie

Tabelle 15. Konzentration der Chemikalien.

Konzentration	Menge	Endkonzentration
Primer Stocks	10pmol/µl	0,2pmol/µl
MgCl ₂	50mM	2mM
dNTP	20mM	1mM (jew. 0,25mM)
Taq Platinum	5U/µl	0,025U
Puffer	10x	1x

Tabelle 16. Programm für das PCR-Screening vom *E. coli*-Plasmid ohne Miniprep.

Programm			Zyklen
Denaturatierung	95°C	10min	30
Denaturatierung	94°C	40s	
Anlagerung	60°C	40s	
Verlängerung	72°C	90s	
Endverlängerung	72°C	7min	
Aufbewahrungstemperatur	4°C		

2.7.7 Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP)

Nach dem PCR-Screening liefert RFLP einen ersten Überblick der erzielten Klone. Dazu werden diese mit Hilfe von Restriktionsendonucleasen an bestimmten Stellen in DNS-Fragmente geschnitten, die durch die Gelelektrophorese als Banden mit ihren jeweils typischen Patterns und Längen dargestellt werden. Diese Methode ermöglicht eine rasche Einordnung vor der Sequenzierung.

Tabelle 17. Ansatz für den RFLP.

Chemikalien	für 1 Probe
MQ H ₂ O	17µl
10x Fast Digest Green Buffer	2µl
Fast Digest Enzym	1µl
DNS (PCR-Produkt)	10µl

Für RFLP wurde auch das Enzym Msp1 mit der Restriktionsstelle C↓CGG verwendet.

Aus dem Mastermix werden 20µl in ein Mini-Eppendorf-Röhrchen pipettiert und jeweils 10µl der DNS (PCR-Produkt) dazu gegeben. Die Mischung wird für 15min bei 37°C auf den Heizblock gestellt. Danach werden 10µl mit den Markern (1kb und 100bp) direkt auf ein 2%-iges Agarosegel aufgetragen. Das Ganze wird für 1,5h an das Gel-Elektrophorese-Gerät bei 90V angeschlossen.

2.7.8 DNS-Messung am Photometer

Diese Messung wird mit Hilfe eines Diode Array Spectrophotometer (Hewlett Packard) nach dem entsprechenden Standard Operation Process (SOP) durchgeführt, wie er am Institut für Milchhygiene der Veterinärmedizinischen Universität Wien anzuwenden ist. Sie erfolgt bei „Absorption bei 260nm und 280nm“ im Ratiomessmodus. Dazu muss eine Halbmikroquarzküvette verwendet werden.

Messung mit ddH₂O als Blank

Das Messergebnis sollte ein A_{260}/A_{280} -Verhältnis von 1,65-1,8 aufweisen, damit man die DNS verwenden kann. Fällt die DNS-Konzentration zu hoch oder zu niedrig aus, befindet sich die Rate außerhalb dieses Bereichs. Die Messungen sind in einer Verdünnung von ca. 1:10 oder 1:20 oder 1:50 durchzuführen.

Berechnungsgrundlage

Wenn das Verhältnis im Bereich 1,65-1,8 liegt, kann man annehmen, dass die DNS rein ist und bei einer optischen Dichte (OD) von 1 eine Konzentration von 50 μ g/ml aufweist.

2.7.9 Verwendete Software

Tabelle 18. Zur Durchführung dieser Arbeit verwendete Programme.

Programme	Adressen	Referenzen
BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)	www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST	(Altschul et al. 1990)
RDP (Ribosomal Database Project)	www.rdp.cme.msu.edu	(Cole et al. 2003)
Pintail (Programm für Chimärenprüfung)	www.bioinformatics-toolkit.org/Pintail	(Ashelford et al. 2005)
DNA Baser Sequence Assembler	www.DNAbaser.com/help/manual.html	DNA Baser Sequence Assembler v3.x (2011) Heracle BioSoft SRL
mothur (Nutzer gestütztes, Plattform unabhängiges Open-Source-Programm für Analyse, Vergleich und Beschreibung von Mikrobengemeinschaften)	www.mothur.org	(Schloss et al. 2009)
FinchTV Version 1.4.0 (Programm zur Darstellung von Chromatogrammen aus der DNS-Sequenzierung)	www.geospiza.com/finchtv	Geospiza, Inc. Seattle, WA 98119

2.7.10 Sequenzierung und Sequenzanalyse von 16S-rRNS-Klonen

Die Sequenzierung wurde von LGC Genomics GmbH (Deutschland) nach der klassischen Methode der Sanger-Sequenzierung durchgeführt. Die Schnellanalyse der Sequenzen erfolgte mittels BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Damit können Nukleotid- oder Proteinsequenzen mit gespeicherten Referenzdaten aus GenBank verglichen die Ähnlichkeit zu Sequenzen in GenBank ermittelt werden. Daraus lassen sich Übereinstimmungen nach Funktion und Evolution ableiten sowie Zuordnungen zu Genera und Familien vornehmen (siehe Tabellen 19 und 20).

Das Ribosomal Database Project (RDP) gleicht rRNS-Gensequenzen von Bakterien und Archaea ab und analysiert sie. Es liefert durch den Abgleich von Sekundärstrukturen eine höhere Qualität bei der Erfassung der von den Nutzern eingegebenen Daten. Mit speziellen Werkzeugen können die Daten automatisiert und beschleunigt abgearbeitet und analysiert werden. Taxonomische Unstimmigkeiten werden erkannt und Korrekturen angeboten (Cole et al. 2009). Die taxonomische Einordnung der zu dieser Untersuchung ermittelten Sequenzen wurde mit diesem Programm durchgeführt.

Mothur, eine offene, Plattform unabhängige, auf 16S-rRNS-Gen-Sequenzen basierende Software, dient zum Vergleich und zur Beschreibung von Gemeinschaften von Mikroorganismen. Sie baut auf früheren Werkzeugen auf und bestimmt Gensequenzen, indem sie sie abgleicht und klassiert, genealogische Distanzen errechnet und OTUs zuweist. Dieses Softwarepaket ist für rasche Analysen selbst umfangreicher Datenbestände geeignet.

Das Programm DNA Baser Assembler kann sowohl manuell als auch automatisch DNS-Sequenzen analysieren, Teilsequenzen zusammenfügen und abgleichen (www.DNAbaser.com). Zu den Proben für die vorliegende Untersuchung wurden die erstellten Sequenzen sowohl im Vorwärts- als auch im Rückwärtslauf vervollständigt und abgeglichen. Zudem spürte es auch Stellen von geringer Qualität auf und korrigierte sie durch das Einfügen von so genannten Ambiguities in die DNS-Sequenz.

FinchTV (Finch Trace Viewer) ist ein Plattform unabhängiges Graphikprogramm zur Darstellung von Chromatogrammen, den Rohdaten der Sanger-Sequenzierung. An den eingegebenen Sequenzen erkennt es durch die Amplifikation entstandene Unregelmäßigkeiten und fehlerhafte Wiedergaben, die graphisch dargestellt und bis zu einem gewissen Grad manuell behoben werden können (www.geospiza.com/finchtv/help/pages/A-Introduction/01-About.html). Mit Hilfe dieser Software wurden die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Sequenzen auf ihre Vollständigkeit und Fehlerfreiheit geprüft.

Mit Hilfe von Pintail können Anomalien in 16S-rRNS-Sequenzen ermittelt werden. Dazu wird die Evolutionsdistanz zwischen der eingegebenen und einer Referenzsequenz über die ganze Länge des 16S-rRNS-Gens errechnet. Bei Chimären lässt sich dadurch der Prozentsatz der nicht übereinstimmenden Basenpaare ermitteln (www.bioinformatics-toolkit.org/Pintail).

Um Kandidaten neuer Spezies gegenüber phylogenetisch nahe stehenden Spezies abzugrenzen, beziehen sich die meisten phylogenetischen Analysen auf die Sequenzähnlichkeit von 16S-rRNS-Genen

und einen Grenzwert für die DNS-Reassoziationswert von 70%. Es konnte nachgewiesen werden, dass bei einer 16S-rRNS-Sequenzähnlichkeit von <98,5% der DNS-Reassoziationswert <70% liegt. Dennoch wurde der übernommene Ähnlichkeitswert von 97% in Anlehnung an die dazu referierte Literatur noch eine Zeit lang beibehalten. Zudem ergab eine kritische Analyse früher erzielter Reassoziationswerte von >70% entsprechende Ähnlichkeitswerte bei den 16S-rRNS-Gensequenzen von $\leq 99\%$. Um nun die Zahl der entsprechenden Experimente zu reduzieren und die Genauigkeit bei der taxonomischen Zuordnung zu erhöhen, wurde vorgeschlagen, diese Untersuchungen erst bei einer Sequenzähnlichkeit im Bereich von 98,7-99 % durchzuführen (Stackebrandt et al. 2006). Diese Festlegung bedeutet, dass Sequenzen mit einem Ähnlichkeitswert von $\geq 99\%$ mit sehr großer Wahrscheinlichkeit zur selben Spezies gehören.

3 Ergebnis und Analyse

3.1 Isolierung, Amplifizierung, Klonierung sowie Sequenzierung der 16S-rDNS

Die eine Probe für die vorliegende Arbeit stammt von einem dänischen Rind, wobei das Futter in einer ersten Phase mit einer höheren Stickstoffdosis und in einer zweiten Phase mit einer niedrigeren Stickstoffdosis behandelt wurde. Zum Vergleich der mikrobiellen Flora wurden zusätzlich Proben von einem österreichischen Rind genommen. Nach der Aufbereitung der Proben und der DNS-Isolierung wurden mittels universeller Primer die 16S-rRNS-Gene der in den Proben enthaltenen Bakterien amplifiziert und anschließend kloniert und sequenziert. In keiner der beiden Proben konnten mit PCR Archaea nachgewiesen werden. Nach der Aussonderung der Chimären und Sequenzen minderer Qualität wurden zum dänischen Rind 86 sequenzierte Klone zur Erstellung einer Similarity-Matrix in Mothur herangezogen. Die Sequenzen, die mehr als 99% 16S-rRNS-Ähnlichkeit zueinander haben, wurden in einer OTU zusammengefasst, woraus sich für das dänische Rind insgesamt 75 OTUs ergeben (Tabelle 19), die sich in 49 Klone für die Futtermittelvariante „high“ und in 37 Klone für die Futtermittelvariante „low“ unterteilen lassen. Beim österreichischen Rind wurden nach der Entfernung der Chimären und der Sequenzen mit schlechter Qualität 31 Klone zur Erstellung der Similarity-Matrix in Mothur verwendet und wiederum die Klone mit mindestens 99% 16S-rRNS-Ähnlichkeit in jeweils einer OTU zusammengefasst. Daraus ergaben sich für das österreichische Rind insgesamt 26 OTUs. Damit die Sequenzen ausgewertet werden konnten, mussten sie eine Länge >1350bp aufweisen. Die dieser Vorgabe entsprechenden Sequenzen wurden mittels BLAST sowie mittels RDP im Schnellverfahren analysiert (Cole et al. 2009). Mit BLAST wurde eine erste taxonomische Erfassung der untersuchten Sequenzen (Altschul et al. 1990) durchgeführt. Bei der Chimärenüberprüfung mittels Pintail wurden die Sequenzen ermittelt und beseitigt, die im Zug der PCR-Amplifikation nicht von einer einzigen DNS-Vorlage, sondern in Folge von Störungen oder Fehlern von zwei oder mehreren DNS-Vorlagen erstellt wurden, somit Chimären waren. Die Chimärenbildung tritt relativ häufig auf – bis zu 9% aller 16S rDNs Sequenzen in GenBank sind höchstwahrscheinlich Chimären (Ashelford, 2005 und Ashelford, 2006).

3.2 Analyse der Sequenzen

Von den Proben vom dänischen Rind wurden, wie schon erwähnt, insgesamt 86 Klone analysiert, die in 75 OTUs zusammengefasst wurden. Davon wiesen acht OTUs zwei oder mehr Sequenzen und 67 je eine auf. 69% der Klone konnten dem Phylum *Firmicutes*, 10% dem Phylum *Proteobacteria*, 9% dem Phylum *Bacteroidetes*, 6% dem Phylum *TM7*, 3% dem Phylum *Synergistetes* sowie jeweils 1% den Phyla *Spirochaetes* und *Chloroflexi* zugeordnet werden. Ein Klon konnte nicht klassifiziert werden (1%). Aus der Probe vom österreichischen Rind konnten insgesamt 31 Klone analysiert werden. Von den 26 OTUs wiesen vier zwei oder mehr Sequenzen und 22 je eine auf. Nach der phylogenetischen Analyse wurden dem Phylum *Firmicutes* 68%, dem Phylum *Bacteroidetes* 20%, dem Phylum *Proteobacteria* 6%, dem Phylum *Spirochaetes* 6% zugeordnet. In Abbildung 6 sind diese Zuordnungen zu den einzelnen Phyla bezüglich des dänischen und des österreichischen Rinds vergleichend dargestellt.

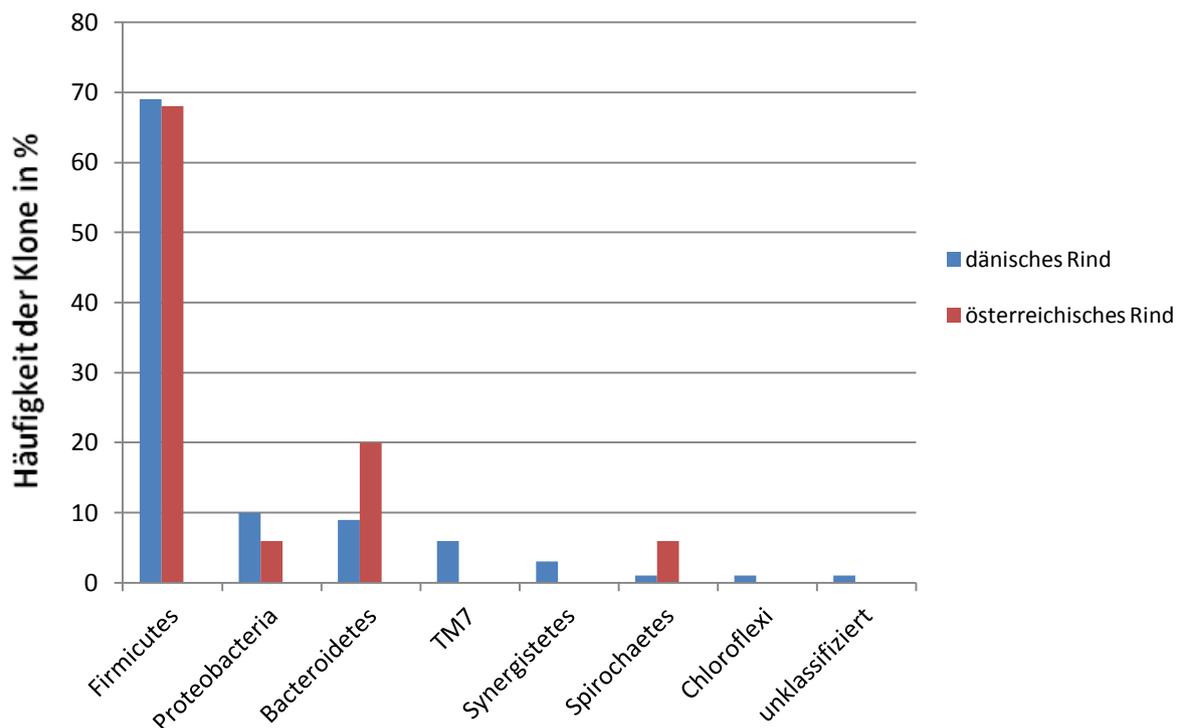


Abbildung 6. Phylumzugehörigkeit der Klone: dänisches versus österreichisches Rind.

Die folgende Abbildung 7 bringt einen Vergleich innerhalb der aus der Probe vom dänischen Rind ermittelten Klone in den beiden Futtermittelvarianten „high“ (49 Klone) und „low“ (37 Klone) und ordnet diese nach ihrer Häufigkeit sowie dem Stickstoffgehalt den entsprechenden Phyla zu. Beim Vergleich der Klone auf der Phylumebene innerhalb des dänischen Rinds fallen keine signifikanten

Unterschiede auf – bei der Futtermittelvariante „high“ ist der Anteil von *Bacteroidetes* höher, bei der Futtermittelvariante „low“ der Anteil der *TM7* zugeordneten Klone.

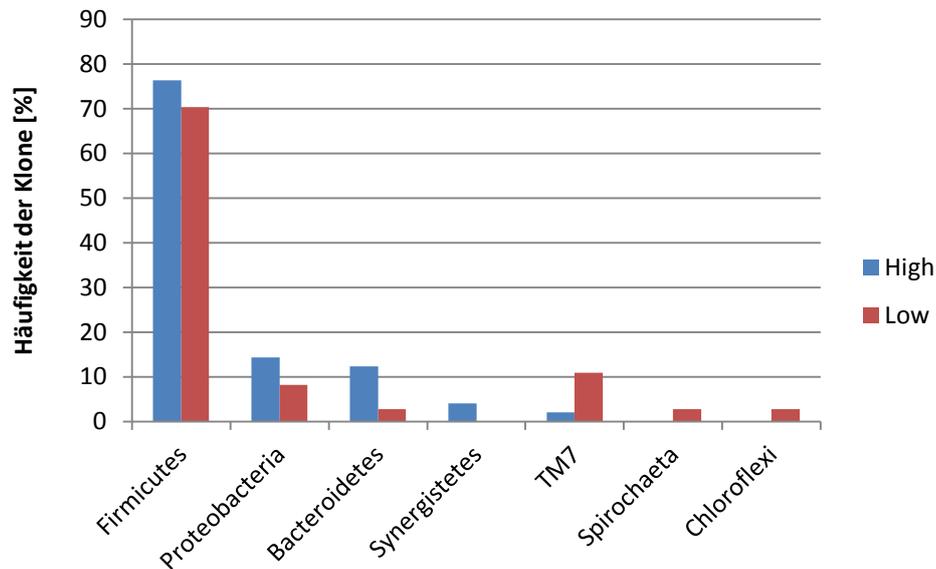


Abbildung 7. Phylumzugehörigkeit der Klone. Ihre Zuordnung innerhalb des dänischen Rindes nach der Fütterung mit entweder stickstoffreichem („High“) oder stickstoffarmem („Low“) Futtermittel.

In der folgenden Abbildung 8 zum dänischen Rind sind die unterschiedlichen Werte der beiden Futtermittelvarianten „high“ (49 Klone) und „low“ (37 Klone) in Bezug auf die nachgewiesenen Genera im Vergleich dargestellt.

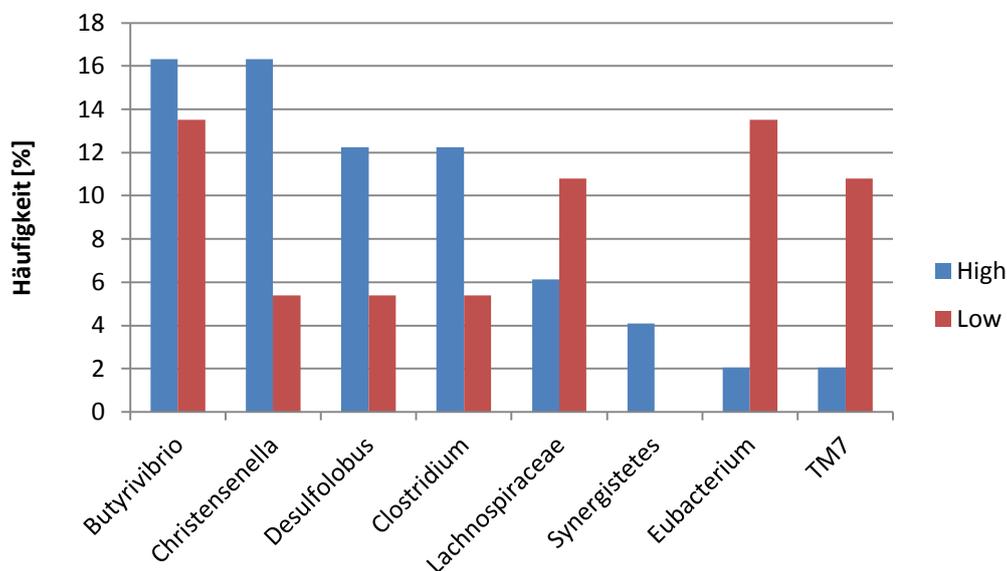


Abbildung 8. Verteilung der einzelnen Genera im dänischen Rind nach der Fütterung mit entweder stickstoffreichem („High“) oder stickstoffarmem („Low“) Futtermittel.

3.3 Dänisches Rind

Tabelle 19. Klassifizierung der Sequenzen zum dänischen Rind in OTUs basierend auf einem 16S-rRNS-Sequenzunterschied von $\leq 1\%$. Darstellung der zugehörigen Klone, der Phylum-Zugehörigkeit, der nächst verwandten Isolate und Klone sowie Beschreibung von Habitat und Funktion.

OTU	Klon-Nr.	Phylum	Nächstverwandte 16S rRNS-Sequenz (Isolat) (GenBank-Accession-Nr.) 16S-Ähnlichkeit in %	Nächstverwandtes unkultiviertes Bakterium (Klon) (GenBank-Accession-Nr.) 16S-Ähnlichkeit in %	Habitat	Physiologie des nächstverwandten kultivierten Bakteriums
1	70H, 81L, 94H, 134H	Proteo-bacteria	<i>Desulfobulbus propionicus</i> DSM 2032 (CP002364.1) 93%	Unkultiviertes Pansenbakterium L406RT-5-B08 (GU304430.1) 99%	Klon; Pansenepithel (Bos taurus)	Isolat: Reduktion von Schwefel zu Sulfat und Sulfid
2	72H, 76H, 134L	Firmicutes	<i>Butyrivibrio hungatei</i> Su6 (AY178635.1) 91%	Unkultiviertes Pansenbakterium L206RT-4-E01 (GU303299.1) 96%	Klon; Pansenepithel (Bos taurus)	Isolat: Abbau von Pektinen und Fasern; Synthese von Xylanase, Amylase und Cellodextrinase; Biohydrogenese von ungesättigten zu gesättigten Fettsäuren
3	75L, 83L	Firmicutes	<i>Eubacterium infirmum</i> F0142 (HM596276.1) 89%	Unkultiviertes Bakterium 1103200824956 (EU842499.1) 93%	Klon: Pansenflüssigkeit (Rind)	Isolat: Abbau von Cellulose
4	84H, 129H	Synergi-stetes	<i>Synergistetes bacterium</i> SGP1 (GQ149247.2) 93%	Unkultiviertes Pansenbakterium L206RT-5-H05 (GU303429.1) 99%	Klon: Pansenepithel (Bos taurus). Isolat: Subgingivale Plaque (Mensch)	Isolat: Abbau von Dihydropyridon und Aminosäuren
5	97L, 98L	Firmicutes	<i>Butyrivibrio hungatei</i> Su6 (AY178635.1) 92%	Unkultiviertes Pansenbakterium L406RT-6-H02 (GU304583.1) 94%	Klon; Pansenepithel (Bos taurus)	Isolat Biohydrogenese ungesättigter Fettsäuren zu Stearinsäure; Abbau von Pektinen
6	100L, 148H	TM7		Unkultiviertes Bakterium 1103200823112 (EU842427.1) 98%	Klon: Pansenflüssigkeit (Rind);	
7	117H, 132H	Firmicutes	<i>Clostridium lactatifermentans</i> G17 (NR_025651.1) 86%	Unkultiviertes Bakterium hoa31_73A10.F (EU748174.1) 93%	Isolat: Faser adhärentes Mikrobiom (Rinderpansen); Klon: Hühnerdarm	Isolat: Nutzung von Xylose, Pyruvat, Alanin, Serin, Cystein und Threonin; Fermentation von Lactat und Glucose zu Acetat, Propionat, Butyrat und Isovalerat
8	151H, 155H	Firmicutes	<i>Christensenella minuta</i> (AB490809.1) 89%	Unkultiviertes Pansenbakterium L206RT-4-E10 (GU303307.1) 99%	Klon: Pansen (Bos taurus) Isolat: Faeces (Mensch)	Isolat: Saccharolyse; Hydrolyse von Aesculin, Gelatin und Nitrat; Reduktion und Produktion von Indol
9	73H	Firmicutes	<i>Christensenella minuta</i> (AB490809.1) 88%	Unkultiviertes Pansenbakterium YRC99 16S Ribosomal-RNS-Gen Teilsequenz (EU259475.1) 95%	Klon: Pansenflüssigkeit (Bos grunniens, Yak); Isolat: Faeces (Mensch)	Isolat: Saccharolyse; Hydrolyse von Aesculin, Gelatin und Nitrat; Reduktion und Produktion von Indol
10	73L	Firmicutes	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> M55 (AY699273.1) 92%	Unkultiviertes Pansenbakterium L206RT-4-E01 (GU303299.1) 94%	Klon Verdauungstrakt (Wildtiere, Gayale, Sumpfbüffel, Holsteinrind), Pansenepithel (Bos taurus)	Isolat Abbau von Cellulose
11	74H	Firmicutes	<i>Lachnospiraceae bacterium</i> 19gly4 (AF550610.1) 94%	Unkultiviertes Bakterium 1103200821339 (EU842386.1) 96%	Klon: Pansenflüssigkeit (Rind)	Isolat: Pektinolyse; Produktion von Acetat, Methanol, Ethanol, Lactat, Format, CO ₂ und H ₂
12	74L	Firmicutes	<i>Papillibacter cinnamivorans</i> CIN1 (NR_025025.1) 93%	Unkultiviertes Bakterium 1101352040674 (EU842994.1) 99%	Klon: Pansenflüssigkeit (Rind)	Isolat Abbau von Cinnamat; Produktion von Benzozat, Acetat, CH ₄ und CO ₂

13	75H	<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridium aminophilum</i> 52R-1b (DQ278862.1) 87%	Unkultiviertes Pansenbakterium L406RT-4-D01 (GU304365.1) 95%	Klon; Pansenepithel (Bos taurus). Isolat: Rind	Isolat: Fermentation von Aminosäuren
14	77H	<i>Firmicutes</i>	<i>Lachnospiraceae bacterium</i> 19gly4 (AF550610.1) 94%	Unkultiviertes Bakterium XJC23 (GU174073.1) 99%	Klon: Pansenflüssigkeit (Rind)	Isolat: Pektinolyse; Produktion von Acetat, Methanol, Ethanol, Lactat, Format, CO ₂ und H ₂
15	78L	(Unklassifizierbar)		Unkultiviertes Bakterium MS4-13 (GQ354904.1) 93%	Wasserquelle	
16	79H	<i>Firmicutes</i>	<i>Christensenella minuta</i> (AB490809.1) 89%	Unkultiviertes Pansenbakterium L206RT-5-F10 (GU303411.1) 92%	Klon: Pansenepithel; Isolat Faeces (Mensch)	Isolat: Saccharolyse; Hydrolyse von Aesculin, Gelatin; Reduktion von Nitrat; Produktion von Indol
17	79L	<i>Spirochaetes</i>	<i>Spirochaeta sp.</i> BHI80-158 (AJ431240.1) 95%	<i>Spirochaeta sp.</i> BHI80-158 16S rRNA-Gen BHI80-158 (AJ431240.1) 95%	Isolat: Anaerobes methanogenes Mikrobiom; Anlage zur Klärschlammbehandlung	Isolat: Nutzung von Carbohydraten; eingeschränkte Hydrolyse
18	80H	<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridium aminophilum</i> 152R-1b (DQ278862.1) 95%	Unkultiviertes Bakterium L406RT-4-D01 (GU304365.1) 92%	Klon; Pansenepithel (Bos taurus); Isolat: Rind	Isolat: Umwandlung von Methylether-Bindungen; Abbau von Cellulose; Demethylierung von methoxyliertem Lignin
19	80L	<i>Firmicutes</i>	<i>Lachnospiraceae bacterium</i> 19gly4 (AF550610.1) 94%	Unkultiviertes Bakterium XJC23 (GU174073.1) 99%	Klon: Pansen	Isolat Fermentation von Glycolat
20	82H	<i>Firmicutes</i>	<i>Holdemania filiformis</i> J1-31B-1 (NR_029335.1) 89%	Unkultiviertes Pansenbakterium L7B_E1 (EU381654.1) 96%	Klon: Pansenflüssigkeit (fistulierte Holsteinfärsen); Faeces (Mensch)	Isolat: In geringem Umfang Fermentation von Glucose zu Essig-, Milch- und Bernsteinsäure
21	82L	<i>Firmicutes</i>	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> M55 (AY699273.1) 93%	Unkultiviertes Bakterium 1101352057860 (EU844798.1) 93%	Klon: Faser und Flüssigkeit adhärentes Mikrobiom (Rinderpansen); Isolat: Verdauungstrakt (Kamel)	Isolat Abbau von Cellulose
22	84L	<i>Firmicutes</i>	<i>Lachnospiraceae bacterium</i> DJF_VP52 (EU728778.1) 89%	Unkultiviertes Pansenbakterium L206RT-4-E04 (GU303301.1) 97%	Klon: Pansenepithel (Bos taurus) ; Isolat: Darm (Schwein)	Isolat: Fermentation von Glycolat
23	85H	<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridium clostridioforme</i> 136069/2010 (HM008264.1) 93%	Unkultiviertes Pansenbakterium L406RT-4-D01 (GU304365.1) 95%	Klon Pansenepithel (Bos taurus).	Isolat: Fermentation von Lactose zu Säuren
24	86H	<i>Firmicutes</i>	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> M55 (AY699273.1) 93%	Unkultiviertes Pansenbakterium YRC53 (EU259429.1) 93%	Klon: Pansenflüssigkeit (Bos grunniens, Yak); Isolat: Verdauungstrakt (Kamel)	Isolat: Abbau von Cellulose
25	87L	<i>Chloroflexi</i>	<i>Levilinea saccharolytica</i> (AB109439.1) 89%	Unkultiviertes Pansenbakterium P5_E06 (EU381832.1) 96%	Klon: Pansenpartikel (fistulierte Holsteinfärsen)	Isolat: Fermentation von Glucose, Fructose, Xylose, Ribose, Sucrose, Raffinose, Trypton, Pyruvat und Pektin
26	88H	<i>Firmicutes</i>	<i>Butyrivibrio proteoclasticus</i> B316 (CP001811.1) 94%	Unkultiviertes Pansenbakterium L206RT-4-E01 (GU303299.1) 95%	Klon: Pansenepithel (Bos taurus)	Isolat: Abbau von Pflanzenfasern (Polysaccharide)
27	89L	<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridium thermocellum</i> DSM 1313 (CP002416.1) 87%	Unkultiviertes Bakterium 1103200827440 (EU843347.1) 95%	Klon: Pansenflüssigkeit (Rind)	Klon u. Isolat: Fermentation von Cellulose, β -Glucanen, H ₂ , Ethanol, CO ₂ , Acetat, Format und Lactat
28	90H	<i>Proteobacteria</i>	<i>Suttonella ornithocola</i> (NR_042279.1) 91%	<i>Suttonella ornithocola</i> B6/99/2 (NR_042279.1) 91%	Isolat: Verstopfte Lungen (Kohlmeise)	Isolat: Säureproduktion aus Kohlenhydraten
29	93H	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Alistipes shahii</i> JCM 16773 (AB554233.1) 89%	Unkultiviertes Pansenbakterium L102RC-4-H09 (HQ399832.1) 99%	Klon: Panseninhalt (Bos taurus)	Isolat: Fermentation von Glucose zu Bernsteinsäure

30	96H	Firmicutes	<i>Christensenella minuta</i> (AB490809.1) 89%	Unkultiviertes Pansenbakterium BRC38 (EF436324.1) 97%	Klon: Pansenflüssigkeit (Bubalus bubalis, Holsteinrind)	Isolat: Saccharolyse; Hydrolyse von Aesculin, Gelatin; Reduktion von Nitrat zu Indol; Fermentation von Glucose zu Essig- und Buttersäure
31	97H	Firmicutes	<i>Coprococcus catus</i> GD/7 (EU266552.1) 93%	Unkultiviertes Pansenbakterium L406RC-3-B03 (GU303681.1) 92%	Klon: Panseninhalt (Bos taurus); Isolat: Darm und Faeces (Mensch)	Isolat: Produktion von Urease
32	98H	Bacteroidetes	<i>Bacteroidetes bacterium</i> 274 F0058 (FJ577256.2) 83%	Unkultiviertes Pansenbakterium L102RC-6-A08 (HQ399914.1) 91%	Klon: Pansen (Bos taurus)	Isolat: Abbau von Xylan
33	99H	Firmicutes	<i>Eubacterium infirmum</i> F0142 (HM596276.1) 91%	Unkultiviertes Bakterium 1103200830278 (EU842776.1) 99%	Klon: Pansenflüssigkeit; Isolat: Zahntaschen (Mensch)	Klon u. Isolat: Abbau von Cellulose
34	100H	Firmicutes	<i>Bacillus sp.</i> IST-38 (FM877978.1) 87%	Unkultiviertes Pansenbakterium GRC101 (DQ673566.1) 99%	Klon: Pansenflüssigkeit (Bos frontalis);	Isolat: Oxidation und Reduktion von Eisen
35	101H	Firmicutes	<i>Clostridium orbiscindens</i> 3 (GU968163.1) 89%	Unkultiviertes Pansenbakterium L206RT-3-D09 (GU303208.1) 93%	Klon: Pansenepithel (Bos taurus)	Isolat: Cellulolyse
36	103L	Firmicutes	<i>Holdemania filiformis</i> J1-31B-1 (NR_029335.1) 86%	Unkultiviertes Pansenbakterium L7A_F06 EU381600.1 91%	Klon: Pansenflüssigkeit (fistulierte Holsteinfärsen)	Isolat: Fermentation von Glucose zu Essig- und Milchsäure sowie in geringerem Umfang Bernsteinsäure
37	106H	Firmicutes	<i>Howardella ureilytica</i> GPC 589 (DQ925472.1) 91%	Unkultiviertes Pansenbakterium L102RT-5-F02 (HQ400327.1) 96%	Klon: Pansengewebe (Bos taurus)	Isolat: Hydrolyse von Harnstoff
38	107H	Firmicutes	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> H17c (EF427364.1) 91%	Unkultiviertes Pansenbakterium L206RT-4-E01 (GU303299.1) 96%	Klon: Pansenepithel	Isolat: Produktion von Xylanase; Abbau von Hemicellulose; Proteolyse
39	107L	Firmicutes	<i>Clostridium orbiscindens</i> AIP165.06 (EU541436.1) 87%	Unkultiviertes Pansenbakterium (AB185647.1) 98%	Klon: Faser und Flüssigkeit adhärentes Mikrobiom (Rinderpansen); Isolat: Faeces (Mensch)	Isolat: Spaltung von C ₃ - und C ₄ -Bindung zu Flavonoiden (zB Anticarcinogenes Quercetin)
40	108L	Firmicutes	<i>Ruminococcus albus</i> 8 (AY445594.1) 85%	Unkultiviertes Pansenbakterium L206RT-3-A02 (GU303168.1) 92%	Klon: Pansenepithel (Bos taurus)	Isolat: Abbau und Nutzung von Cellulose als Kohlenhydratquelle
41	111H	Proteobacteria	<i>Desulfobulbus propionicus</i> DSM 2032 (CP002364.1) 93%	Unkultiviertes Pansenbakterium L406RT-5-B08 (GU304430.1) 96%	Klon: Pansenepithel (Bos taurus); Isolat: subgingivale Plaque; Dung (Schwein)	Isolat: Reduktion von Schwefel
42	111L	Firmicutes	<i>Lachnospiraceae bacterium</i> DJF_VP52 (EU728778.1) 89%	Unkultiviertes Pansenbakterium L206RT-4-E04 (GU303301.1) 99%	Klon: Pansenepithel (Bos taurus); Isolat: Dung (Schwein)	Isolat: Fermentation von Glycolat
43	113L	Proteobacteria	<i>Eikenella corrodens</i> : JCM 12952 (AB525415.1) 94%	Unkultiviertes Pansenbakterium L102RT-1-D08 (HQ400023.1) 99%	Klon: Pansengewebe (Bos taurus); Isolat: subgingivale Plaque (Mensch)	Isolat: Fermentation von Glucose zu Bernsteinsäure
44	116L	Firmicutes	<i>Oscillibacter valericigenes</i> (NR_041340.1) 91%	Unkultiviertes Bakterium NED5B7 (EF445220.1) 97%	Klon: Pansen (Rind); Isolat: Verdauungstrakt (japanische Süßwassermuschel)	Isolat: Fermentation von D-Glucose und 5-Zucker (Arabinose, Ribose, D-Xylose) zu Valeriansäure
45	117L	TM7		Unkultiviertes Bakterium 1103200823112 (EU842427.1) 98%	Klon: Pansenflüssigkeit (Rind)	
46	118L	Bacteroidetes	<i>Bacteroidaceae bacterium</i> DJF_B220 (EU728720.1) 84%	Unkultiviertes Bakterium 1101352050150 (EU843998.1) 99%	Klon: Faser und Flüssigkeit adhärentes Mikrobiom (Rinderpansen); Isolat: Darm (Schwein)	Klon: Produktion von Glykosidhydrolase; Isolat: Cellulolyse

47	120H	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Prevotella loescheii</i> (AB547688.1) 88%	Unkultiviertes Pansenbakterium U29-G02 (AB185800.1) 99%	Klon: Pansen; Isolat: Mundhöhle	Isolat: Fermentation von Cellobiose zu Essigsäure
48	121H	<i>Proteobacteria</i>	<i>Desulfobulbus propionicus</i> DSM 2032 (CP002364.1) 88%	Unkultiviertes Pansenbakterium L406RT-5-B08 (GU304430.1) 90%	Klon: Pansenepithel (Bos taurus)	Isolat: Reduktion von Schwefel
49	121L	<i>Firmicutes</i>	<i>Succiniclasticum ruminis</i> DSM 9236 (NR_026205.1) 95%	Unkultiviertes Bakterium F23-A11 (AB185514.1) 97%	Klon: Pansen (Rind)	Isolat: Fermentation von Succinat zu Propionat
50	122H	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroidetes bacterium</i> PPf50E2 (AY548787.1) 84%	Unkultiviertes Bakterium NED5A5 (EF445218.1) 92%	Klon: Pansen (Rind)	Isolat: Zerlegung von verschmutztem Schilf
51	122L	<i>TM7</i>		Unkultiviertes Bakterium 1103200823112 (EU842427.1) 99%	Klon: Pansenflüssigkeit (Rind)	
52	123H	<i>Firmicutes</i>	<i>Christensenella minuta</i> (AB490809.1) 87%	Unkultiviertes Pansenbakterium BRC38 (EF436324.1) 97%	Klon: Pansenflüssigkeit (Bubalus bubalis)	Isolat: Saccharolyse; Hydrolyse von Aesculin, Gelatin; Reduktion von Nitrat zu Indol; Fermentation von Glucose zu Essig- und Buttersäure
53	124H	<i>Proteobacteria</i>	<i>Desulfobulbus sp.</i> (GU398184.1) 94%	Unkultiviertes Pansenbakterium L406RT-3-F10 (GU304306.1) 99%	Klon: Pansenepithel (Bos taurus); Isolat: Mundhöhle (Mensch)	Isolat: Reduktion von Schwefel
54	126H	<i>Firmicutes</i>	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> H17c (EF427364.1) 92%	Unkultiviertes Pansenbakterium L206RT-2-C07 (GU303114.1) 95%	Klon: Pansenepithel (Bos taurus)	Isolat: Produktion von Xylanase; Abbau von Hemicellulose; Proteolyse
55	128H	<i>Firmicutes</i>	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> H17c (EF427364.1) 91%	Unkultiviertes Pansenbakterium L206RT-2-C07 (GU303114.1) 97%	Klon: Pansenepithel (Bos taurus)	Isolat: Produktion von Xylanase; Abbau von Hemicellulose; Proteolyse
56	130H	<i>Firmicutes</i>	<i>Christensenella minuta</i> (AB490809.1) 89%	Unkultiviertes Pansenbakterium L206RT-4-E10 (GU303307.1) 98%	Klon: Pansenepithel (Bos taurus)	Isolat: Saccharolyse; Hydrolyse von Aesculin und Gelatin; Reduktion von Nitrat zu Indol; Fermentation von Glucose zu Essig- und Buttersäure
57	131L	<i>TM7</i>		Unkultiviertes Bakterium 1103200823112 (EU842427.1) 97%	Klon: Pansenflüssigkeit (Rind)	
58	132L	<i>Firmicutes</i>	<i>Eubacterium fissicatena</i> DSM:3598 (GU985201.1) 88%	Unkultiviertes Bakterium 1103200825034 (EU842518.1) 97%	Klon: Pansenflüssigkeit (Rind)	Klon: Nutzung von Kohlenhydraten
59	135H	<i>Firmicutes</i>	<i>Howardella ureilytica</i> GPC 589 (DQ925472.1) 93%	Unkultiviertes Pansenbakterium L206RT-1-F05 (GU303065.1) 99%	Klon: Pansenepithel (Bos taurus); Isolat: Pansen (Schaf)	Isolat: Hydrolyse von Harnstoff
60	136H	<i>Firmicutes</i>	<i>Acetivibrio sp.</i> 6-13 (AB596889.1) 89%	Unkultiviertes Pansenbakterium L3B_A06 (EU381674.1) 95%	Klon: Pansenflüssigkeit (fistulierte Holsteinfärse)	Isolat: Fermentation von cellulosehaltigen Substraten
61	139H	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacteroides capillosus</i> ATCC 29799 (NR_025670.1) 93%	Unkultiviertes Pansenbakterium L406RT-3-F01 (GU304299.1) 95%	Klon: Pansenepithel (Bos taurus)	Isolat: Fermentation von Glucose, Cellobiose, Fructose, Galactose, Lactose, Maltose, Mannose, Sucrose und Stärke; Hydrolyse von Aesculin; Produktion von Essig- und Bernsteinsäure
62	140H	<i>Firmicutes</i>	<i>Lachnospiraceae bacterium</i> DJF_VP52 (EU728778.1) 90%	Unkultiviertes Pansenbakterium L206RT-4-E04 (GU303301.1) 99%	Klon: Pansenepithel (Bos taurus)	Isolat: Biohydrogenese vielfach ungesättigter zu gesättigten Fettsäuren
63	145H	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Tannerella forsythensis</i> HG3 (AB053941.1) 83%	Unkultiviertes Bakterium ALP18 (GQ402124.1) 97%	Klon: Vormagen (Alpaca); Isolat: Zahntaschen (Mensch)	Isolat: Produktion von Essig-, Butter-, Isovaleran-, Propion- und Phenyllessigsäure sowie in geringeren Mengen von Isobutan- und Bernsteinsäure
64	145L	<i>Firmicutes</i>	<i>Christensenella minuta</i> (AB490809.1) 87%	Unkultiviertes Pansenbakterium L206RT-4-E10 (GU303307.1) 99%	Klon: Pansenepithel (Bos taurus); Isolat: Faeces (Mensch)	Isolat: Saccharolyse; Hydrolyse von Aesculin, Gelatin; Reduktion von Nitrat zu Indol; Fermentation von Glucose zu Essig- und Buttersäure

65	146L	<i>Proteobacteria</i>	<i>Desulfohalobium propionicum</i> DSM 2032 (CP002364.1) 93%	Unkultiviertes Bakterium 1103200823644 (EU844167.1) 99%	Klon: Faser und Flüssigkeit adhärentes Mikrobiom (Rinderpansen); Isolat: Mundhöhle (Mensch)	Klon: Produktion von Glykosidhydrolase. Isolat: Reduktion von Schwefel
66	147H	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroidaceae bacterium</i> DJF_B220 (EU728720.1) 84%	Unkultiviertes Pansenbakterium L102RT-1-E12 (HQ400038.1) 94%	Klon: Pansengewebe (Bos taurus); Isolat: Darm (Schwein)	Isolat: Cellulolyse
67	148L	<i>Firmicutes</i>	<i>Christensenella minuta</i> (AB490809.1) 87%	Unkultiviertes Pansenbakterium L206RT-4-E10 (GU303307.1) 98%	Klon: Pansenepithel (Bos taurus)	Isolat: Saccharolyse; Hydrolyse von Aesculin und Gelatin; Reduktion von Nitrat zu Indol; Fermentation von Glucose zu Essig- und Buttersäure
68	150L	<i>Firmicutes</i>	<i>Eubacterium ruminantium</i> GA195 (NR_024661.1) 94%	Unkultiviertes Pansenbakterium L3A_B12 (EU381470.1) 99%	Klon: Pansenflüssigkeit (fistulierte Holsteinfärsen)	Isolat: Fermentation von Glucose, Cellobiose und Fructose; Produktion von Milch-, Ameisen-, Essig- und Buttersäure
69	151L	<i>Firmicutes</i>	<i>Mogibacterium neglectum</i> P9a-h (NR_027203.1) 92%	Unkultiviertes Pansenbakterium L102RT-5-D08 (HQ400312.1) 98%	Klon: Pansengewebe (Bos taurus); Isolat: Vormagen (Alpaca)	Isolat: Abbau pflanzlicher Fasern
70	152H	<i>Firmicutes</i>	<i>Butyrivibrio hungatei</i> OV109 (DQ518911.1) 91%	Unkultiviertes Bakterium GRANT63 (AY858397.2) 96%	Klon: Pansen (Grant-Gazelle)	Isolat: Biohydrogenese von ungesättigten Fettsäuren zu Stearinsäure; Produktion von Butyrat
71	152L	<i>Firmicutes</i>	<i>Lachnospiraceae bacterium</i> DJF_VP52 (EU728778.1) 91%	Unkultiviertes Bakterium 1101352040488 (EU842936.1) 99%	Klon: Faser und Flüssigkeit adhärentes Mikrobiom (Rinderpansen)	Klon: Produktion von Glykosidhydrolase; Isolat: Biohydrogenese vielfach ungesättigter zu gesättigten Fettsäuren; acetogen
72	155L	<i>Firmicutes</i>	<i>Ruminococcus sp.</i> (FP929052.1) 95%	Unkultiviertes Pansenbakterium P5_C11 (EU381956.1) 99%	Klon: Pansenpartikel (fistulierte Holsteinfärsen); Isolat: Darm (Mensch)	Isolat: Abbau und Nutzung von Cellulose als Kohlenhydratquelle
73	156H	<i>Firmicutes</i>	<i>Christensenella minuta</i> (AB490809.1) 88%	Unkultiviertes Pansenbakterium BRC38 (EF436324.1) 97%	Klon: Pansenflüssigkeit (Bubalus bubalis)	Isolat: Saccharolyse; Hydrolyse von Aesculin, Gelatin; Reduktion von Nitrat zu Indol; Fermentation von Glucose zu Essig- und Buttersäure
74	156L	<i>Firmicutes</i>	<i>Anaerovorax odorimutans</i> (AJ251215.1) 89%	Unkultiviertes Bakterium 1103200828308 (EU844356.1) 95%	Klon: Faser und Flüssigkeit adhärentes Mikrobiom (Rinderpansen)	Isolat: Fermentation von Putrescin zu Acetat, Butyrat, Wasserstoff und Ammoniak
75	157L	<i>Firmicutes</i>	<i>Eubacterium infirmum</i> F0142 (HM596276.1) 90%	Unkultiviertes Bakterium 1101352040506 (EU842942.1) 98%	Klon: Faser und Flüssigkeit adhärentes Mikrobiom (Rinderpansen)	Isolat: Abbau von Cellulose

H = Futtermittelvariante "high" (Stickstoffgehalt: 17,1%)

L = Futtermittelvariante "low" (Stickstoffgehalt: 12,9%)

3.4 Österreichisches Rind

Tabelle 20. Klassifizierung der Sequenzen zum österreichischen Rind in OTUs basierend auf einem 16S-rRNS-Sequenzunterschied von $\leq 1\%$. Darstellung der zugehörigen Klone, der Phylum-Zugehörigkeit, der nächst verwandten Isolate und Klone sowie Beschreibung von Habitat und Funktion.

OTU	Klon-Nr.	Phylum	Nächstverwandte 16S rRNS-Sequenz (Isolat) (GenBank-Accession-Nr.) 16S-Ähnlichkeit in %	Nächstverwandtes unkultiviertes Bakterium (Klon) (GenBank-Accession-Nr.) 16S-Ähnlichkeit in %	Habitat	Physiologie des nächstverwandten kultivierten Bakteriums
1	B7, B42	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Prevotella baroniae</i> JCM 13447 (AB547671.1) 89%	Unkultiviertes Pansenbakterium L206RC-2-C02 (GU302625.1) 99%	Klon: Panseninhalt (Bos taurus)	Isolat: Abbau von Pyruvatferredoxin; Saccharolyse; Produktion von Oxidoreductase
2	B10, B25	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Porphyromonadaceae bacterium</i> C941 (JF803519.1) 89%	Unkultiviertes Pansenbakterium L206RC-1-F04 (GU302578.1) 96%	Klon: Panseninhalt (Bos taurus)	Isolat: Fermentation von Glucose zu Butter- und Isobutansäure; Produktion von Essig- und Bernsteinsäure
3	B50, B58, Z23	<i>Firmicutes</i>	<i>Eubacterium infirmum</i> F0142 (HM596276.1) 92%	Unkultiviertes Bakterium 1101352057998 (EU844838.1) 99%	Klon: Faser und Flüssigkeit adhärentes Mikrobiom (Rinderpansen)	Isolat: Abbau von Cellulose
4	Z32, Z51	<i>Firmicutes</i>	<i>Eubacterium infirmum</i> F0142 (HM596276.1) 91%	Unkultiviertes Bakterium 1103200830278 (EU842776.1) 98%	Klon: Pansenflüssigkeit (Rind)	Isolat: Abbau von Cellulose
5	B28	<i>Firmicutes</i>	<i>Eubacterium sp</i> F1 (EU281854.1) 88%	Unkultiviertes Pansenbakterium L406RT-1-A07 (GU304085.1) 99%	Klon: Pansenepithel (Bos Taurus)	Isolat: Abbau von Cellulose
6	B29	<i>Proteobacteria</i>	<i>Desulfobulbus propionicus</i> DSM 2032 (CP002364.1) 94%	Unkultiviertes Bakterium 1103200823644 (EU844167.1) 99%	Klon: Faser und Flüssigkeit adhärentes Mikrobiom (Rinderpansen)	Isolat: Reduktion von Schwefel
7	B36	<i>Spirochaetes</i>	<i>Treponema refringens</i> CIP 51.64 (AF426101.1) 94%	<i>Treponema refringens</i> CIP 51.64 (AF426101.1) 94%	Isolat: Pansen	Isolat: Fermentation löslicher Kohlenhydrate, von CO ₂ und Ethanol; Fermentation von Glucose und Stärke zu Essig-, Milch- und Bernsteinsäure.
8	B37	<i>Firmicutes</i>	<i>Howardella ureilytica</i> GPC 589 (DQ925472.1) 91%	Unkultiviertes Pansenbakterium L102RT-5-F02 (HQ400327.1) 94%	Klon: Pansengewebe (Bos taurus)	Isolat: Hydrolyse von Harnstoff
9	B56	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Prevotella baroniae</i> JCM 13447 (AB547671.1) 88%	Unkultiviertes Pansenbakterium L206RC-2-C02 (GU302625.1) 98%	Klon: Panseninhalt (Bos taurus)	Isolat: Abbau von Pyruvatferredoxin; Saccharolyse; Produktion von Oxidoreductase
10	B62	<i>Firmicutes</i>	<i>Eubacterium infirmum</i> F0142 (HM596276.1) 91%	Unkultiviertes Bakterium Thompsons56 (EU381474.1) 93%	Klon: Pansenflüssigkeit (fistulierte Holsteinfärsen)	Isolat: Abbau von Cellulose
11	Z22	<i>Firmicutes</i>	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> H17c (EF427364.1) 90%	Unkultiviertes Pansenbakterium L206RT-4-E01 (GU303299.1) 96%	Klon: Pansenepithel (Bos taurus)	Isolat: Produktion von Xylanase; Abbau von Hemicellulose und Proteolyse
12	Z28	<i>Firmicutes</i>	<i>Butyrivibrio hungatei</i> Su6 (AY178635.1) 90%	Unkultiviertes Bakterium GRANT63 (AY858397.2) 95%	Klon: Pansen (Grant-Gazelle)	Isolat: Biohydrogenese ungesättigter Fettsäuren zu Stearinsäure; Abbau von Pektinen
13	Z29	<i>Firmicutes</i>	<i>Howardella ureilytica</i> GPC 589 (DQ925472.1) 91%	Unkultiviertes Pansenbakterium L102RT-5-F02 (HQ400327.1) 97%	Klon: Pansengewebe (Bos taurus)	Isolat: Hydrolyse von Harnstoff

14	Z31	Firmicutes	<i>Syntrophococcus sucromutans</i> S195 (NR_036869.1) 92%	Unkultiviertes Bakterium 1103200821117 (EU842324.1) 94%	Klon: Pansenflüssigkeit (Rind)	Isolat: Umwandlung von Methylether-Bindungen; Abbau von Cellulose; Demethylierung von methoxyliertem Lignin
15	Z33	Firmicutes	<i>Bacteroides capillosus</i> ATCC 29799 (NR_025670.1) 91%	Unkultiviertes Bakterium 1103200827141 (EU842683.1) 93%	Klon: Pansenflüssigkeit (Rind)	Isolat: Fermentation von Glucose, Cellobiose, Fructose, Galactose, Lactose, Maltose, Mannose, Stärke und Sucrose; Hydrolyse von Aesculin; Pro- duktion von Essig- und Bernsteinsäure
16	Z35	Firmicutes	<i>Eubacterium infirmum</i> F0142 (HM596276.1) 91%	Unkultiviertes Bakterium 1103200830278 (EU842776.1) 99%	Klon: Pansenflüssigkeit (Rind)	Isolat: Abbau von Cellulose
17	Z36	Firmicutes	<i>Butyrivibrio hungatei</i> Su6 (AY178635.1) 91%	Unkultiviertes Pansenbakterium L206RT-4-E01 (GU303299.1) 96%	Klon: Pansenepithel (Bos tau- rus)	Isolat: Biohydrogenese ungesättigter Fettsäuren zu Stearinsäure; Abbau von Pektinen
18	Z38	Firmicutes	<i>Eubacterium sp.</i> F1 (EU281854.1) 88%	Unkultiviertes Pansenbakterium L406RT-1-A07 (GU304085.1) 98%	Klon: Pansenepithel (Bos tau- rus)	Isolat: Abbau von Cellulose
19	Z39	Spiro- chaetes	<i>Spirochaeta sp.</i> BHI80-158 (AJ431240.1) 90%	<i>Spirochaeta sp.</i> BHI80-158 (AJ431240.1) 90%	Isolat: Anaerobes methanoge- nes Mikrobiom (Klärschlamm- behandlungsanlage)	Isolat: Nutzung von Kohlenhydraten; einge- schränkte Hydrolyse
20	Z40	Bactero- idetes	<i>Prevotella sp.</i> F0295 (FJ1717335.2) 89%	Unkultiviertes Pansenbakterium L206RC-2-C02 (GU302625.1) 98%	Klon: Panseninhalt (Bos tau- rus)	Isolat: Abbau von Stärke und Polysacchariden; Beitrag zum Abbau von Proteinen und zur Auf- nahme von Peptiden
21	Z44	Firmicutes	<i>Eubacterium infirmum</i> F0142 (HM596276.1) 90%	Unkultiviertes Bakterium 1103200830278 (EU842776.1) 97%	Klon: Pansenflüssigkeit (Rind)	Isolat: Abbau von Cellulose
22	Z45	Firmicutes	<i>Butyrivibrio hungatei</i> Su6 (AY178635.1) 91%	Unkultiviertes Bakterium GRANT63 (AY858397.2) 96%	Klon: Pansen (Grant-Gazelle)	Isolat: Biohydrogenese ungesättigter Fettsäuren zu Stearinsäure; Abbau von Pektinen
23	Z53	Firmicutes	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> M55 (AY699273.1) 92%	Unkultiviertes Pansenbakterium YRC53 (EU259429.1) 92%	Klon: Pansenflüssigkeit (Bos grunniens, Yak); Isolat: Verdrauungstrakt (Kamel)	Isolat: Abbau von Cellulose
24	Z54	Firmicutes	<i>Eubacterium infirmum</i> F0142 (HM596276.1) 91%	Unkultiviertes Pansenbakterium L406RT-1-B08 (GU304095.1) 97%	Klon: Pansenepithel (Bos tau- rus)	Isolat: Abbau von Cellulose
25	Z55	Proteo- bacteria	<i>Geobacter pickeringii</i> G13 (NR_043576.1) 87%	Unkultiviertes Pansenbakterium U28- G05 (AB185724.1) 95%	Klon: Pansen (Rind); Isolat: Kaolinschicht	Isolat: Reduktion von III-Eisen
26	Z64	Firmicutes	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> L8 (AY699274.1) 89%	Unkultiviertes Pansenbakterium L206RT-2-C07 (GU303114.1) 96%	Klon: Pansenepithel (Bos tau- rus)	Isolat: Cellulolyse

B = Gewinnungsvariante „Pansenzotten abgebürstet“ Z = Gewinnungsvariante “Pansenzotten abgeschnitten“

3.5 Analyse der 16S-rRNS-Sequenzen

Die oben bestimmten Phyla sind in Bezug auf die ermittelten Sequenzen in unterschiedlicher Häufigkeit vertreten. Es soll in der Folge an Hand der oben stehenden Tabellen analysiert werden, welchen Einfluss beim dänischen Rind die unterschiedliche Zusammensetzung des Futtermittels bezüglich des Stickstoffgehalts („high“: Stickstoffgehalt 17,1%; „low“: Stickstoffgehalt 12,9%) bzw. beim österreichischen Rind die Art der Gewinnung der Pansenprobe („Zotten abgebürstet“; „Zotten abgeschnitten“) auf die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften hatte. Bei der nachfolgenden Unterteilung sind die OTUs in ihrer Zugehörigkeit zum jeweiligen Phylum angeführt. Dabei wurde besonders auf die OTUs mit mehr als einem Klon eingegangen. Für eine weitere Information sei auf die Tabellen 19 und 20 verwiesen. Um eine genauere Einordnung zu ermöglichen, wurden für die häufigsten OTUs, für die es nah verwandte kultivierte Referenzorganismen gibt, phylogenetische Stammbäume berechnet. In den weiter unten eingeführten Abbildungen 9 bis 12 sind OTUs mit mehreren Klonen aus der Probe vom dänischen und österreichischen Rind in ihrem genealogischen Zusammenhang dargestellt.

3.5.1 *Firmicutes*

Die Analyse beider Sequenzgruppen ergab ein deutliches Übergewicht zu Gunsten des Phylums *Firmicutes*: 68% Anteil sowohl beim dänischen als auch beim österreichischen Rind.

Aus der Probe vom dänischen Rind waren unter den OTUs mit mehreren Klonen fünf (2, 3, 5, 7, 8) diesem Phylum zuzuordnen, wobei sechs Klone unter der Futtermittelvariante „high“ und fünf unter der Futtermittelvariante „low“ zu finden waren. Unter den OTUs mit jeweils einem Klon gehörten 48 diesem Phylum an, wobei 28 unter der Futtermittelvariante „high“ und 20 unter der Futtermittelvariante „low“ zu finden waren.

Auch innerhalb der vom österreichischen Rind gewonnenen Sequenzen war das Phylum *Firmicutes* am häufigsten vertreten. Von den OTUs mit mehreren Klonen waren zwei (3, 4) diesem Phylum zuzuordnen. Davon stammten zwei Klone aus der Gewinnungsvariante „Zotten abgebürstet“ und drei aus der Gewinnungsvariante „Zotten abgeschnitten“. Von den 16 OTUs mit jeweils einem Klon waren

13 Klone der Gewinnungsvariante „Zotten abgeschnitten“ und drei Klone der Gewinnungsvariante „Zotten abgebürstet“ zuzurechnen.

3.5.1.1 *Butyrivibrio*

Das in beiden Proben der vorliegenden Untersuchung am häufigsten vorkommende Genus ist *Butyrivibrio* (insgesamt 19 Klone). In der Probe vom dänischen Rind tritt *Butyrivibrio* mit insgesamt dreizehn Klonen auf, wobei drei bzw. zwei Klone auf zwei OTUs (2, 5) und acht Klone auf jeweils eine OTU verteilt sind (Tabelle 19). Die Häufigkeit beträgt demnach 15,1%. In der Probe vom österreichischen Rind wurden zu *Butyrivibrio* sechs OTUs ermittelt, von denen jede nur einen Klon aufweist (Tabelle 20). Die Häufigkeit innerhalb der Klone beträgt 19,4%.

Für die OTUs 2 und 5 aus dem dänischen Rind wurde zusätzlich eine Einordnung mittels phylogenetischer Analysen durchgeführt, die in Abbildung 9 zeigt, dass beide OTUs in die Gattung *Butyrivibrio* fallen. Wie schon durch die Sequenzähnlichkeiten angedeutet, sind die erhaltenen Sequenzen am nächsten mit Klonen aus dem Pansen verwandt.

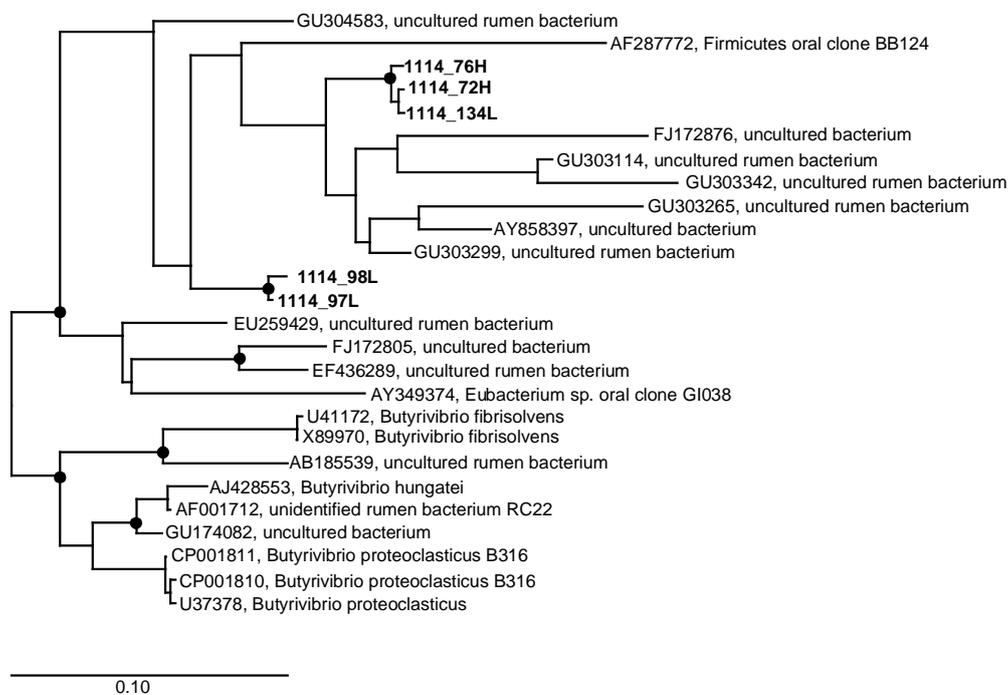


Abbildung 9. Phylogenetischer Stammbaum der drei Klone von OTU 2 und der zwei Klone von OTU 5 vom dänischen Rind und anderer verwandter Vertreter von *Firmicutes* basierend auf 16S-rRNS-Gen-

Sequenzen. Der Stammbaum wurde mit dem RaxML (Maximum-Likelihood-Baumberechnungsverfahren) mit Hilfe der Software MEGA 5 erstellt. Die schwarzen Punkte zeigen die Verzweigungen, die durch mehr als 90% Maximum-Parsimony-Bootstrap-Support (1000 Wiederholungen) unterstützt werden. Der Maßstab zeigt 10% evolutionäre Distanz. Die GenBank-Accession-Nummern sind angegeben.

3.5.1.2 *Christensenella*

Das Genus *Christensenella* kommt nur in der Probe vom dänischen Rind vor, wo es mit zehn Klonen vertreten ist. Zwei Klone gehören zu einer OTU (8) und die anderen acht OTUs zu jeweils einer OTU (Tabelle 19). Die Häufigkeit innerhalb der untersuchten Sequenzen beträgt 11,6%.

3.5.1.3 *Lachnospiraceae*

Angehörige der Familie *Lachnospiraceae* scheinen nur in der Probe vom dänischen Rind auf. Insgesamt konnten dabei sieben Klone – verteilt auf sieben OTUs – ermittelt werden (Tabelle 19). Ihre Häufigkeit bezüglich der Gesamtheit der analysierten Klone beträgt 8,1%.

3.5.1.4 *Clostridium*

Das Genus *Clostridium* ist in dieser Untersuchung in der Probe vom dänischen Rind mit acht Klonen vertreten, wobei zwei Klone unter eine OTU (7) und sechs Klone unter jeweils eine OTU fallen (Tabelle 19). Daraus ergibt sich eine Häufigkeit von 9,3%.

3.5.1.5 *Eubacterium*

Insgesamt gehören 17 Klone zur Gattung *Eubacterium*. In der Probe vom dänischen Rind ist *Eubacterium* mit sechs Klonen vertreten, wobei zwei Klone in eine OTU (3) und die anderen vier Klone in je-

weils eine OTU (Tabelle 19) fallen. Daraus ergibt sich eine Häufigkeit von 7%. In der Probe vom österreichischen Rind ist *Eubacterium* mit elf Klonen das am häufigsten ermittelte Genus, wobei drei bzw. zwei Klone zu zwei OTUs (3, 4) und die anderen Klone zu jeweils einer OTU gehören (Tabelle 20). Daraus ergibt sich eine Häufigkeit von 35.5%.

Für die OTUs 3 und 4 vom österreichischen Rind sowie für die OTU 3 aus dem dänischen Rind wurden zusätzlich Einordnungen mittels phylogenetischer Analysen durchgeführt, die zeigen, dass alle drei OTUs in die Gattung *Eubacterium* fallen. Wie schon durch die Sequenzähnlichkeiten angedeutet, sind die erhaltenen Sequenzen am nächsten mit Klonen aus dem Pansen verwandt. Diese beiden Analysen sind in den Abbildungen 10 und 11 wiedergegeben.

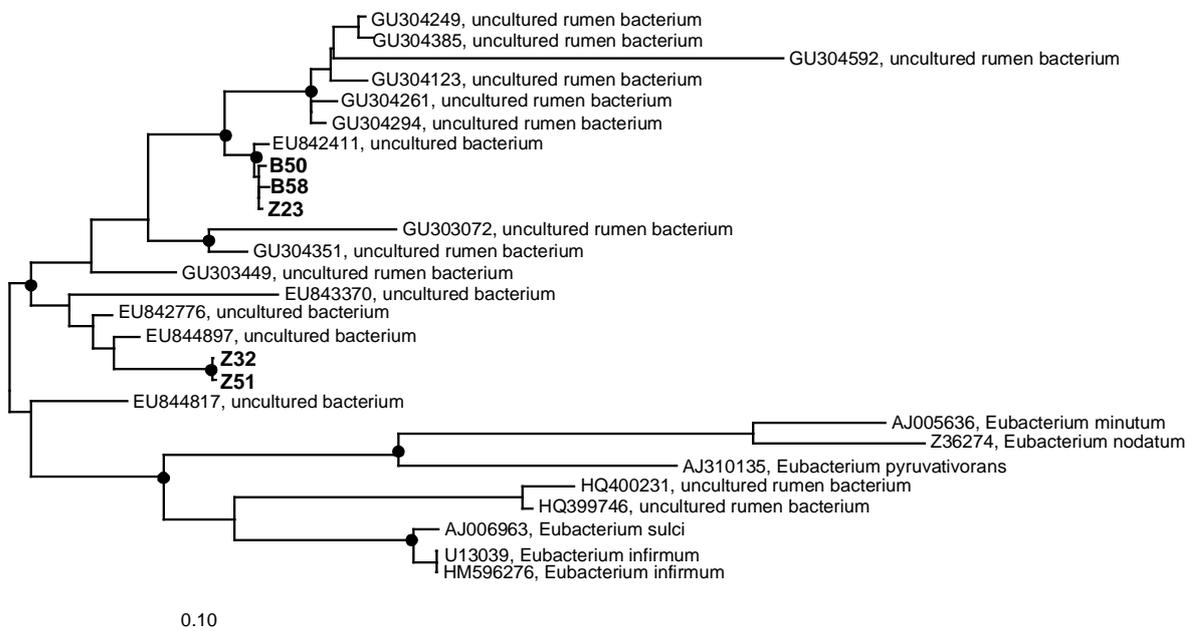


Abbildung 10. Phylogenetischer Stammbaum der drei Klone von OTU 3 und der 2 Klone von OTU 4 vom österreichischen Rind und anderer verwandter Vertreter von *Firmicutes* basierend auf 16S-rRNS-Gen-Sequenzen. Der Stammbaum wurde mit dem RaxML (Maximum-Likelihood-Baumberechnungsverfahren) mit Hilfe der Software MEGA 5 erstellt. Die schwarzen Punkte zeigen die Verzweigungen, die durch mehr als 90% Maximum-Parsimony-Bootstrap-Support (1000 Wiederholungen) unterstützt werden. Der Maßstab zeigt 10% evolutionäre Distanz. Die GenBank-Accession-Nummern sind angegeben.

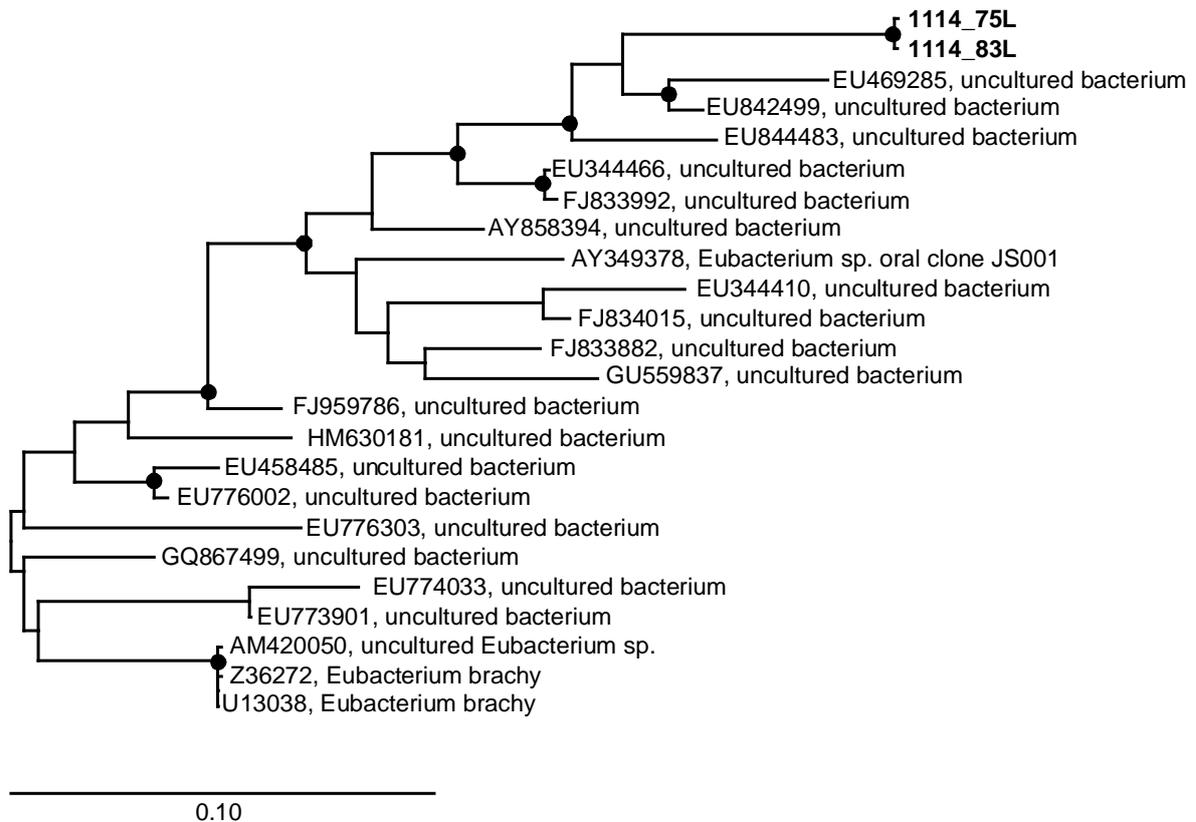


Abbildung 11. Phylogenetischer Stammbaum der zwei Klone von OTU 3 vom dänischen Rind und anderer verwandter Vertreter von *Firmicutes* basierend auf 16S-rRNS-Gen-Sequenzen. Der Stammbaum wurde mit dem RaxML (Maximum-Likelihood-Baumberechnungsverfahren) mit Hilfe der Software MEGA 5 erstellt. Die schwarzen Punkte zeigen die Verzweigungen, die durch mehr als 90% Maximum-Parsimony-Bootstrap-Support (1000 Wiederholungen) unterstützt werden. Der Maßstab zeigt 10% evolutionäre Distanz. Die GenBank-Accession-Nummern sind angegeben.

3.5.1.6 *Howardella*

Insgesamt ist diese Gattung mit vier Klonen in den Proben vertreten. In der Probe vom dänischen Rind ist das Genus *Howardella* aus dem Phylum *Firmicutes* mit einer Häufigkeit von 2,3% vertreten. Ihm sind zwei Klone in zwei OTUs zugeordnet (Tabelle 19). In der Probe vom österreichischen Rind findet sich das Genus *Howardella* gleichfalls mit zwei Klonen unter jeweils einer OTU (Tabelle 20). Ihre Häufigkeit beträgt 6,5%.

3.5.1.7 Ruminococcus

Das Genus *Ruminococcus* aus dem Phylum *Firmicutes* ist in der Probe vom dänischen Rind mit zwei Klonen in jeweils einer OTU vertreten (Tabelle 19), was einer Häufigkeit von 2,3% entspricht.

3.5.2 Bacteroidetes

Die Klone, die zu diesem Phylum gehören, sind in der Probe vom dänischen Rind mit einem Anteil von 9% am drittstärksten vertreten und in der Probe vom österreichischen Rind mit 20% an zweiter Stelle.

In der Probe vom dänischen Rind findet sich unter den OTUs mit mehreren Klonen keine, die diesem Phylum zuzuordnen wäre. Bezüglich der acht OTUs mit jeweils einem Klon gehören bei der Futtermittelvariante „high“ sieben OTUs bzw. Klone diesem Phylum an, und bei der Futtermittelvariante „low“ ist es eines.

In der Probe vom österreichischen Rind sind zwei OTUs mit mehreren Klonen diesem Phylum zuzuordnen (1, 2), wobei alle vier Klone der Gewinnungsvariante „Zotten abgebürstet“ entstammen. Von den zwei OTUs mit jeweils einem Klon stammt einer von der Gewinnungsvariante „Zotten abgebürstet“ und einer von der Gewinnungsvariante „Zotten abgeschnitten“.

3.5.2.1 Prevotella

Dieses Genus ist in den Proben mit insgesamt fünf Klonen vertreten. Unter den aus dem dänischen Rind ermittelten Sequenzen ist das Genus *Prevotella* mit einem Klon und einer OTU vertreten (Tabelle 19), was eine Häufigkeit von 1.2% bedeutet. In der Probe vom österreichischen Rind wurden zum Genus *Prevotella* vier Klone ermittelt, von denen zwei in einer OTU (1) zusammengefasst sind und die zwei anderen zu jeweils einer OTU gehören (Tabelle 20). Daraus lässt sich eine Häufigkeit von 12,9% ableiten.

3.5.3 *Proteobacteria*

Dieses Phylum liegt in der Probe vom dänischen Rind mit 13% an zweiter Stelle und ist in der Probe vom österreichischen Rind mit einem Anteil von 6% am dritthäufigsten vertreten.

In der Probe vom dänischen Rind ist nur die OTU 1 mit ihren vier Klonen diesem Phylum zuzuordnen. Davon gehören drei Klone zur Futtermittelvariante „high“ und eines zur Futtermittelvariante „low“. Unter den zwei OTUs mit jeweils einem Klon entstammt eine der Futtermittelvariante „high“ und eine der Futtermittelvariante „low“.

Unter den Sequenzen aus der Probe vom österreichischen Rind findet sich keine OTU mit mehreren Klonen. Zwei OTUs mit jeweils einem Klon sind diesem Phylum zuzuordnen, wobei jeder Gewinnungsvariante – „Zotten abgebürstet“ bzw. „Zotten abgeschnitten“ – jeweils ein Klon entstammt.

3.5.3.1 *Desulfobulbus*

Insgesamt gehören neun Klone zum Genus *Desulfobulbus*. In der Probe vom dänischen Rind ist *Desulfobulbus* mit acht Klonen vertreten, wobei vier Klone in einer OTU (1) vereint sind. Die phylogenetische Einordnung der OTU 4 ist in der folgenden Abbildung 12 dargestellt. Die anderen Klone gehören jeweils einer OTU zu (Tabelle 19). Dies ergibt eine Häufigkeit von 9,3%. In der Probe vom österreichischen Rind ist das Genus mit einem einfachen Klon und somit einer OTU vertreten (Tabelle 20), womit sich für die relative Häufigkeit ein Wert von 3,2% ergibt.

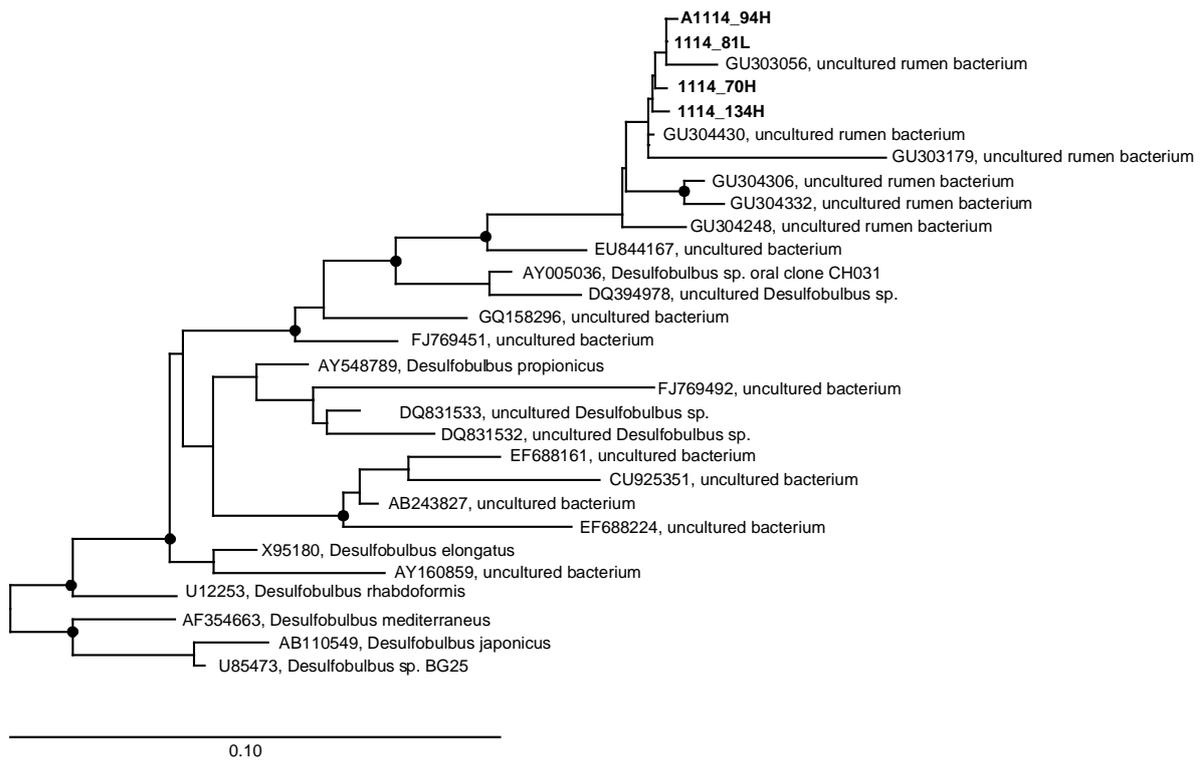


Abbildung 12. Phylogenetischer Stammbaum der vier Klone von OTU 1 vom dänischen Rind und anderer verwandter *Deltaproteobakterien* basierend auf 16S-rRNS-Gen-Sequenzen. Der Stammbaum wurde mit dem RaxML (Maximum-Likelihood-Baumberechnungsverfahren) mit Hilfe der Software MEGA 5 erstellt. Die schwarzen Punkte zeigen die Verzweigungen, die durch mehr als 90% Maximum-Parsimony-Bootstrap-Support (1000 Wiederholungen) unterstützt werden. Der Maßstab zeigt 10% evolutionäre Distanz. Die GenBank-Accession-Nummern sind angegeben.

3.5.4 TM7

Dieses Phylum ist noch weitgehend unerforscht, da es bislang keine kultivierten Vertreter gibt. Folglich konnte in den Analyseergebnissen eine Zuordnung nur auf der Ebene des Phylums vorgenommen werden. OTUs von *TM7* fanden sich lediglich in der Probe vom dänischen Rind (Tabelle 19), und zwar mit einer Häufigkeit von 6%. *TM7* weist in der untersuchten Probe eine OTU (6) mit mehreren Klonen auf, von denen eines der Futtermittelvariante „high“ und eines der Futtermittelvariante „low“ zuzuordnen ist. Unter den drei OTUs mit einem Klon sind alle der Futtermittelvariante „low“ zuzuordnen.

3.5.5 *Spirochaetes*

Von diesem Phylum war beim dänischen Rind eine OTU mit einem Klon nachzuweisen, was eine Häufigkeit von 1% bedeutet. Dieser Klon ist der Futtermittelvariante „low“ zuzuordnen (Tabelle 19).

Beim österreichischen Rind war das Phylum mit zwei OTUs mit je einem Klon vertreten, wodurch sich eine Häufigkeit von 6% ergibt. Jeweils eine OTU bzw. deren Klon entstammten der Gewinnungsvariante „Zotten abgebürstet“ bzw. der Gewinnungsvariante „Zotten abgeschnitten“ (Tabelle 20).

3.5.5.1 *Spirochaeta*

Dieses Genus ist in den untersuchten Proben mit insgesamt zwei Klonen vertreten. In der Probe vom dänischen Rind ist das *Spirochaeta* mit einem einzigen Klon in einer OTU vertreten (Tabelle 19). Daraus ergibt sich eine Häufigkeit von 1,2%. In der Probe vom österreichischen Rind weist dieses Genus mit seinem einzigen Klon unter einer OTU (Tabelle 20) eine Häufigkeit von 3,2% auf.

3.5.6 *Synergistetes*

Das Phylum *Synergistetes* ist in der Probe vom dänischen Rind mit zwei Klonen in einer OTU (4) vertreten (Tabelle 19). Dies ergibt eine Häufigkeit von 2,3%.

3.5.7 *Chloroflexi*

Nur beim dänischen Rind konnte eine OTU mit einem Klon diesem Phylum zugeordnet werden, was einer Häufigkeit von 1% entspricht. Dieser Klon ist der Futtermittelvariante „low“ zuzuordnen (Tabelle 19).

4 Diskussion

Wie in der vorliegenden Arbeit bereits ausgeführt, werden die Pansenbakterien den wissenschaftlichen Quellen zu Folge an Hand ihrer Lokalisierung in drei Gruppen eingeteilt: die in der Pansenflüssigkeit vorkommenden Organismen und jene, die sich an die Nahrungspartikel anheften, sowie die Organismen der so genannten epimuralen Gemeinschaft, die mit dem Pansenepithel verbunden sind (Chen et al. 2011). Bisher wurden die wissenschaftlichen Arbeiten im Wesentlichen den beiden ersten Gruppen gewidmet. Neueste Erkenntnisse legen jedoch nahe, dass die Bakterien der epimuralen Gemeinschaft, die zwar nur 1% bis 2% der ruminalen Bakteriengemeinschaft ausmachen, an diversen ruminalen Prozessen wie der Hydrolyse des Harnstoffs oder der Interaktion mit dem Wirtorganismus wesentlich beteiligt sind (Chen et al. 2011).

Vor diesem Hintergrund fokussiert die vorliegende Arbeit auf die am Pansenepithel anhaftenden Bakterien. In einem ersten Schritt sollen sie identifiziert und in der Folge soll darauf eingegangen werden, welchen Einfluss die Modifikation des Futtermittels nach dem Stickstoffgehalt auf die Zusammensetzung der epimuralen Bakteriengemeinschaft hat. Die nach der oben beschriebenen Methodik ermittelten Sequenzen wurden mittels BLAST, RDP und Mothur analysiert, und die Ergebnisse konnten in zwei Tabellen (19 bzw. 20) zusammengefasst werden. An Hand der Ergebnisse lässt sich erkennen, dass die große Mehrheit der erhaltenen Sequenzen höchste Ähnlichkeiten zu anderen Sequenzen aus dem Pansen hat.

4.1. Phylogenetische Zuordnung der nachgewiesenen Sequenzen an Hand der 16S-rRNS

In diesem Abschnitt sollen die erhaltenen Sequenzen aus den beiden Proben vom dänischen und vom österreichischen Rind kurz beschrieben werden. Einige Genera scheinen zwar sowohl in der Probe vom dänischen als auch in jener vom österreichischen Rind auf, unterscheiden sich jedoch auf Grund diverser, an anderen Stellen dieser Arbeit angeführter Faktoren.

Zur Abgrenzung neuer Kandidaten gegenüber phylogenetisch nahe stehenden Spezies wurde an Hand der Sequenzähnlichkeit von 16S-rRNS-Genen ein Grenzwert von 99% festgelegt (Stackebrandt et al. 2006). Somit bedeuten ein Ähnlichkeitswert von $\geq 99\%$ mit sehr großer Wahrscheinlichkeit die

Zugehörigkeit zur selben Spezies und ein Ähnlichkeitswert von <99% die Zugehörigkeit zu verschiedenen Spezies oder gegebenenfalls zu verschiedenen Familien, Ordnungen usw.

Basierend auf einer OTU-Einteilung auf Grund von 16S-Ähnlichkeiten von mehr als 99% sind bei den Proben von dänischen Rind acht OTUs mit jeweils zwei oder mehr Klonen vertreten (Tabelle 19). Bei der Probe von österreichischem Rind haben vier OTUs jeweils zwei oder mehr Klone (Tabelle 20). Näherungsweise kann angenommen werden, dass diese OTUs auch in der Umweltprobe am häufigsten sind. In Folge verschiedener systematischer Fehler sind aber auf der Grundlage der Genbanken nur begrenzt quantitative Aussagen über die Häufigkeit einzelner Organismen in der untersuchten Probe möglich. Fehlerquellen können z.B. das Vorhandensein mehrerer rRNS-Operons im selben Organismus, eine unterschiedlich effiziente Primerbindung in der PCR oder unterschiedliche Klonierungseffizienzen sein (Röling, Head 2005). Es empfiehlt sich daher, eine weitere Methode wie z.B. quantitative PCR oder Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) zur Quantifizierung der OTUs in der untersuchten Probe anzuwenden.

Häufigkeit der Klone und Verteilung auf der Phylumbene

Die Vertreter des Phylums *Firmicutes* sind die mit Abstand häufigsten Klone in den beiden hier untersuchten Proben gefolgt von *Bacteroidetes* und *Proteobacteria* (Abbildung 6). Vertreter der Phyla *TM7*, *Synergistetes* und *Spirochaetes* wurden nur zu einem relativ geringen Anteil detektiert. Diese Verteilung der Zugehörigkeiten der Klone zu den einzelnen Phyla entspricht im Großen und Ganzen den publizierten Daten zur Verteilung von Klonen sowohl im Pansenlumen als auch im Pansenepithel (Kim et al. 2011; Chen et al. 2011, Li et al. 2011; Sadet-Bourgeau et al. 2010).

4.1.1 *Butyrivibrio*

Das in beiden Proben der vorliegenden Untersuchung am häufigsten vorkommende Genus ist *Butyrivibrio* (insgesamt 19 Klone in den Proben von beiden Rindern), das zum Phylum *Firmicutes* gehört. Die 16S-Ähnlichkeit zu kultivierten Isolaten aus dem Genus *Butyrivibrio* lag zwischen 89% und 94%; die höchste 16S-Ähnlichkeit zu Klonen aus GenBank lag zwischen 92% und 97% (Tabellen 19 und 20). Auf Grund dieser 16S-Ähnlichkeiten kann angenommen werden, dass es sich bei den hier erhaltenen Klonen zumindest um neue Arten innerhalb der Gattung *Butyrivibrio* handelt.

Die Vertreter dieses Genus bauen Pektin ab und zerlegen Pektinpolysaccharide, ohne sie zu nutzen. Bei der Verdauung von Sommerfutterpflanzen wie der Zichorie stellt der Pektinabbau durch u.A. *Butyrivibrio* einen bedeutenden ersten Schritt des Stoffwechsels im Pansen dar (Sun et al. 2008). Eine Studie bestätigt die dominante Rolle von *Butyrivibrio* bei der Biohydrogenierung von Fettsäuren (Maia et al. 2007). Eine Reihe von *Butyrivibrio*-Isolaten tragen zum Faserabbau im Pansen bei und synthetisieren Xylanase, Amylase und Cellodextrinase, doch nur wenige von ihnen bilden Endoglucanase (Kopečný et al. 2003). *Butyrivibrio spp.* sind die am weitesten verbreiteten kultivierbaren Pansenbakterien (Flint 1997). Im Pansen von Rindern, denen Alfalfa oder Triticale gefüttert wurde, fanden sich in den Populationen aller drei Fraktionen – Flüssigkeit, lose mit den Partikeln verbunden, fest mit den Partikeln verbunden – Bakterien des Genus *Butyrivibrio* (Kong et al. 2010 [2]). *B. fibrisolvens* hat als Habitat vorwiegend den Pansen von Rindern und Schafen und bildet Butyrat, Butyratkinase, Stearinsäure, Lipase (Paillard et al. 2007). *B. hungatei* gedeiht zwar auf gereinigtem Pektin, aber nicht auf Xylan oder Cellulose (Sun et al. 2008). *B. hungatei* produziert Galactosidase, Arabinosidase, Phenylalanine, Arylamidase und Leucin-Arylamidase und fermentiert Glucose zu Butyrat, Wasserstoff, Ethanol, Kohlendioxid und Format (Kopečný et al. 2003).

4.1.2 *Eubacterium*

Mit der zweitgrößten Häufigkeit in den Proben von beiden Rindern ist innerhalb des Phylums *Firmicutes* das Genus *Eubacterium* mit insgesamt 17 Klonen vertreten. Die 16S-Ähnlichkeit zu kultivierten Isolaten aus dem Genus *Eubacterium* lag zwischen 88% und 94%; die höchste 16S-Ähnlichkeit zu Klonen aus GenBank lag zwischen 93% und 99% (Tabellen 19 und 20). Auf Grund dieser 16S-Ähnlichkeiten kann angenommen werden, dass es sich bei den erhaltenen Klonen mit einer 99%-Ähnlichkeit um die gleiche Art oder zumindest um neue Arten innerhalb der Gattung *Eubacterium* handelt.

Die Angehörigen des Genus *Eubacterium* aus dem Phylum *Firmicutes* sind strikt anaerob, treten einzeln auf und bilden geringe Mengen von Essig- und Buttersäure (Cheeseman et al. 1996). Die bevorzugten Habitate dieser fibrolytischen Bakterien sind der Rinderpansen und die subgingivale Plaque. Im Vormagen von Alpacas treten *Eubacterium*-Kolonien als eine dominante Population auf, im Pansen von Schafen konnten sie nicht nachgewiesen werden (Pei et al. 2010). Vertreter des Genus *Eubacterium* sind in der Lage, über die Demethylierung am Lignan-Metabolismus mitzuwirken (Jin et al. 2007). *E. cellulosolvans* konnte im Pansen in hoher Anzahl nachgewiesen werden. Es spielt dort eine bedeutende Rolle in der Cellulolyse, fermentiert jedoch auch lösliche Kohlenhydrate (Dehority 2003).

Es produziert Cellulasen und Hemicellulasen, die Polysaccharide aus pflanzlichen Zellwänden hydrolysieren (Luís et al. 2011). *E. limosum* demethoxyliert u.A. Benzinkondensate und produziert daraus Methanol, Acetat und Wasserstoff (Voordouw et al. 1996). *E. pyruvatorans* wurde aus dem Pansen eines Schafs gewonnen, das mit einer Mischung aus Gras bzw. Heu und Konzentrat ernährt wurde. Es gilt als ein Ammoniak hyperproduzierendes Ruminalkbakterium und nutzt als Substrate Pyruvat, Lactat, Crotonat oder Trypticase, wobei die Präsenz von Acetat, Propionat und Butyrat förderlich ist. Aminosäuren können auch als einzige Energiequelle genutzt werden, wobei in Folge der geringen Effizienz der Beitrag zur Stickstoffrückgewinnung gering ist. Die ökologische Nische dieser Spezies scheint die Beseitigung von Aminosäuren, Lactat und anderer Metaboliten zu sein (Wallace et al. 2003; Wallace et al. 2004).

4.1.3 *Christensenella*

Das Genus *Christensenella*, das ebenfalls zum Phylum *Firmicutes* gehört, kommt nur in der Probe vom dänischen Rind vor und ist dort mit insgesamt zehn Klonen vertreten. Die 16S-Ähnlichkeit zu kultivierten Isolaten aus dem Genus *Christensenella* lag zwischen 87% und 89%; die höchste 16S-Ähnlichkeit zu Klonen aus GenBank lag zwischen 92% und 99% (Tabelle 19). Auf Grund dieser 16S-Ähnlichkeiten kann angenommen werden, dass es sich bei den erhaltenen Klonen mit einer 99%-Ähnlichkeit um die gleiche Art oder zumindest um neue Arten innerhalb der Gattung *Christensenella* handelt.

Christensenella-Bakterien wurden erstmals aus dem menschlichen Kot isoliert. Sie sind strikt anaerob, betreiben Saccharolyse, hydrolysieren Aesculin sowie Gelatine, reduzieren Nitrat und produzieren Indol. Als Endprodukte ihrer Fermentation von Glucose und einigen anderen Zuckern stehen Essig- und Buttersäure sowie flüchtige Fettsäuren (Morotomi et al. 2011). Die Spezies *C. minuta* reagiert negativ unter Anderem auf Urease, hydrolysiert Aesculin und Gelatin, reduziert Nitrat und produziert Indol. Als Endprodukte ihrer Glucosefermentation sind Essig- und in geringerer Menge Buttersäure anzuführen (Morotomi et al. 2011). Ein Nachweis von *Christensenella* in Fraktionen des Rummens konnte in den herangezogenen veröffentlichten Studien nicht gefunden werden.

4.1.4 *Clostridium*

Das Genus *Clostridium*, das ebenfalls zum Phylum *Firmicutes* gehört, kommt nur in der Probe vom dänischen Rind vor und ist dort mit insgesamt acht Klonen vertreten. Die 16S-Ähnlichkeit zu kultivierten Isolaten aus dem Genus *Clostridium* lag zwischen 86% und 95%; die höchste 16S-Ähnlichkeit zu Klonen aus GenBank lag zwischen 92% und 98% (Tabelle 19). Auf Grund dieser 16S-Ähnlichkeiten kann angenommen werden, dass es sich bei den hier erhaltenen Klonen zumindest um neue Arten innerhalb der Gattung *Clostridium* handelt.

Spezies des Genus *Clostridium* finden sich hauptsächlich in Verdauungstrakten wie dem Pansen, wo sie innerhalb der mikrobiellen Gemeinschaft vielfältige Aufgaben wie die Fermentation von Lactose und Glucose in Acetat übernehmen (Finegold et al. 2005). *C. clostridioforme* wird gelegentlich auch in der subgingivalen Mikroflora von AIDS-Patienten und in der Vaginalflora gesunder Frauen sowie von Frauen mit bakterieller Vaginosis gefunden (Finegold et al. 2005). *C. orbiscindens*, aus menschlichen Kotproben isoliert, baut Flavonoide wie Quercetin und Flavone wie Luteolin und Apigenin ab und wandelt Taxifolin, Eriodictyol, Phloretin und Naringetin um (Kutschera et al. 2011; Schoefer et al. 2003; Dehority 2003). *C. thermocellum* ist strikt anaerob und weist eine der höchsten Wachstumsraten auf Cellulose auf, die es zu H₂, Ethanol, CO₂, Acetat, Format und Lactat fermentiert (Rydzak et al. 2011). Weiters ist es in den Pyruvat-Katabolismus involviert (Rydzak et al. 2011).

4.1.5 *Lachnospiraceae*

Die Vertreter der Familie *Lachnospiraceae*, die gleichfalls zum Phylum *Firmicutes* gehört, konnte nur in der Probe vom dänischen Rind nachgewiesen werden und sind dort mit insgesamt zehn Klonen vertreten. Die 16S-Ähnlichkeit zu kultivierten Isolaten aus der Familie *Lachnospiraceae* lag zwischen 89% und 94%; die höchste 16S-Ähnlichkeit zu Klonen aus GenBank lag zwischen 96% und 99% (Tabelle 19). Auf Grund dieser 16S-Ähnlichkeiten kann angenommen werden, dass es sich bei den erhaltenen Klonen mit einer 99%-Ähnlichkeit um die gleiche Art oder zumindest um neue Arten innerhalb der Familie *Lachnospiraceae* handelt.

Untersuchungen zeigen, dass Vertreter *Lachnospiraceae* zu den dominanten Ruminalbakterien zählen (Kim et al. 2011). Spezies dieser Familie fanden sich laut einer Untersuchung am Pansenepithel

ausgewählter Rinder, die auf eine Ernährung aus Getreidekonzentrat umgestellt wurden, nur wenn im Futter Heu zu einem bestimmten Prozentsatz enthalten war und der ergänzende Prozentanteil aus Getreide bestand (Chen et al. 2011). *Lachnospiraceae*-Bakterien aus dieser Familie sind neben dem Rinderpansen auch im Verdauungstrakt anderer Tiere anzutreffen, wo sie Pektin, Phenolbestandteile sowie Quercetin abbauen (Leng et al. 2010).

4.1.6 *Howardella*

Das Genus *Howardella*, das zum Phylum *Firmicutes* gehört, konnte in den Proben von beiden Rindern nachgewiesen werden und ist mit insgesamt vier Klonen vertreten. Die 16S-Ähnlichkeit zu kultivierten Isolaten aus dem Genus *Howardella* lag zwischen 91% und 93%; die höchste 16S-Ähnlichkeit zu Klonen aus GenBank lag zwischen 94% und 99% (Tabellen 19 und 20). Auf Grund dieser 16S-Ähnlichkeiten kann angenommen werden, dass es sich bei den erhaltenen Klonen mit einer 99%-Ähnlichkeit um die gleiche Art oder zumindest um neue Arten innerhalb der Gattung *Howardella* handelt.

Bakterien dieses Genus wurden generell aus dem Verdauungstrakt und speziell aus dem Pansen von Schafen und Rindern isoliert bzw. nachgewiesen. Ein strikt anaerobes Milieu ist für ihr Wachstum erforderlich, das durch Acetat gefördert wird. Durch die Hydrolyse von Hanstoff, bei der die Präsenz von cytosolischer Urease obligatorisch ist, produziert *H. ureilytica* ATP (Cook et al. 2007; Li et al. 2011).

4.1.7 *Ruminococcus*

Zum Phylum *Firmicutes* gehört auch das Genus *Ruminococcus*, das nur in der Probe vom dänischen Rind nachgewiesen werden konnte. Es ist mit insgesamt zwei Klonen vertreten. Die 16S-Ähnlichkeit zu kultivierten Isolaten aus dem Genus *Ruminococcus* lag zwischen 85% und 95%; die höchste 16S-Ähnlichkeit zu Klonen aus GenBank lag zwischen 92% und 99% (Tabelle 19). Auf Grund dieser 16S-Ähnlichkeiten kann angenommen werden, dass es sich bei den erhaltenen Klonen mit einer 99%-Ähnlichkeit um die gleiche Art oder zumindest um neue Arten innerhalb der Gattung *Ruminococcus* handelt.

Die Bakterien dieses Genus – z.B. *R. flavefaciens* – fermentieren in unterschiedlicher Ausprägung Cellulose, Cellobiose, Glucose und andere Kohlenhydrate, wobei als wesentliche Endprodukte Ethanol, Bernstein-, Ameisen- und Milchsäure sowie H₂ entstehen (Dehority 2003). *R. albus* und *R. flavefaciens* gehören zu den bedeutendsten fibrolytischen Bakterien im Pansen (Krause et al. 2003). *Ruminococcus*-Bakterien wurden aus fest oder lose mit Nahrungspartikeln verbundenen Pansenpopulationen oder aus der Pansenflüssigkeit von Rindern mit Alfalfa- oder Triticalefütterung isoliert (Kong et al. 2010 [2]). Laut einer Untersuchung waren die fibrolytischen Ruminalbakterien mit dem effizientesten Faserabbau mit der Faser des Bermudagrasses assoziiert, wovon sich *Ruminococcus* durch seine Assoziation mit der Weizenfaser ausnahm (Pitta et al. 2010). *R. albus* ist strikt anaerob und baut, um Kohlenhydrate zu gewinnen, Cellulose ab (Devillard et al. 2004).

4.1.8 Desulfobulbus

Das Genus *Desulfobulbus* gehört zum Phylum *Proteobacteria*. Es konnte sowohl in den Proben vom dänischen als auch in der Probe vom österreichischen Rind nachgewiesen werden. Insgesamt ist es mit neun Klonen vertreten. Die 16S-Ähnlichkeit zu kultivierten Isolaten aus dem Genus *Desulfobulbus* lag zwischen 88% und 94%; die höchste 16S-Ähnlichkeit zu Klonen aus GenBank lag zwischen 90% und 99% (Tabellen 19 und 20). Auf Grund dieser 16S-Ähnlichkeiten kann angenommen werden, dass es sich bei den erhaltenen Klonen mit einer 99%-Ähnlichkeit um die gleiche Art oder zumindest um neue Arten innerhalb der Gattung *Desulfobulbus* handelt.

Vertreter des Genus *Desulfobulbus* wurden in einer Untersuchung über Bakterien des Pansenepithels im Zusammenhang mit der Umstellung von Rindern auf die Ernährung mit Getreide nachgewiesen (Chen et al. 2011). Spezies der Familie *Desulfobulbaceae* aus dem Phylum *Proteobacteria* (Klasse: *Deltaproteobacteria*) können ein breites Spektrum von Substraten nutzen und haben unterschiedliche Fermentationsprozesse entwickelt, mit denen sie im strikt anaeroben Milieu Sulfat zu Schwefelwasserstoff reduzieren können (Pagani et al. 2011). Isolate der neu beschriebenen Spezies *D. mediterraneus*, aus Sedimenten des Süßwassers oder des Salzwassers des Küstenbereichs aber auch der Tiefsee gewonnen, sind in der Lage, Substrate wie Propionat, Lactat, Succinat und Primäralkohol sowie Mono- und Disaccharide zur Reduzierung von Schwefelverbindungen zu nutzen, um daraus im Wesentlichen Acetat und Kohlendioxid zu erzeugen (Sass et al. 2002). *Desulfobulbus* spp. wandeln gemeinsam mit anderen Mikroorganismen organische Substanz hauptsächlich in Methan und Kohlendioxid sowie Propionat in Acetat und Hydrogensulfid um (Harmsen et al. 1996). *D. propioni-*

cus kommt in aquatischen Sedimenten vor und kann auch unter Sauerstoff existieren. Es ist in eine Reihe von Fermentationsprozessen involviert (Pagani et al. 2011).

4.1.9 *Prevotella*

Das Genus *Prevotella* gehört zum Phylum *Bacteroidetes*. Sequenzen dieser Gattung finden sich sowohl in der Probe vom österreichischen als auch in den Proben vom dänischen Rind. Insgesamt ist es mit fünf Klonen vertreten. Die 16S-Ähnlichkeit zu kultivierten Isolaten aus dem Genus *Prevotella* lag zwischen 88% und 89%; die höchste 16S-Ähnlichkeit zu Klonen aus GenBank lag zwischen 98% und 99% (Tabellen 19 und 20). Auf Grund dieser 16S-Ähnlichkeiten kann angenommen werden, dass es sich bei den erhaltenen Klonen mit einer 99%-Ähnlichkeit um die gleiche Art oder zumindest um neue Arten innerhalb der Gattung *Prevotella* handelt.

Bacteroides spp. und *Prevotella spp.*, zwei Genera aus dem Phylum *Bacteroidetes*, gehören zu den häufigsten, aus Stuhlproben von Menschen und aus dem Pansen von Rindern isolierten und nachgewiesenen Organismen (Dodd et al. 2011; Li et al. 2011; Kim et al. 2011; Huws et al. 2010; Flint 1997). *Prevotella spp.* produzieren Essig- und Bernsteinsäure sowie in geringeren Mengen Isovaleran- und Isobutansäure. Die Spezies des Genus *Prevotella* fermentieren unter Anderem Cellobiose, Fructose, Glucose, Lactose und Sucrose (Downes et al. 2005; Alauzet et al. 2010; Dehority 2003). Bei *Butyrivibrio spp.* und *Prevotella spp.*, vielfach kultivierbaren Pansenbakterien, ist auffällig, dass die genetische Divergenz der Isolate aus demselben Wirtorganismus sehr groß sein kann (Flint 1997). Das Genus *Prevotella* ist zwar cellulolytisch nicht hoch aktiv, doch produziert es eine Reihe von Xylanasen (Krause et al. 2003). Zu ihm gehören leicht saccharolytische, auf Galle empfindliche Organismen, die sich beim Menschen in den Floren der Mundhöhle, des Darms und des Urogenitalbereichs finden und an diversen Infektionen wie der Bakteriämie beteiligt sein können. *Prevotella sp.* baut Stärke und Polysaccharide aus pflanzlichen Zellwänden ab und ist auch am Proteinabbau, an der Peptidaufnahme sowie an diversen Fermentationsprozessen im Pansen wesentlich beteiligt, wozu es eine Reihe höchst unterschiedlicher, extrazellulär aktiver Proteasen wie Amylase und Xylanase produziert. Einzelne Aminosäuren oder kurze Peptide als Stickstoffquelle zu nutzen sind sie nicht in der Lage, während dies bei langen Oligopeptiden sehr wohl der Fall ist (Leng et al. 2010; Griswold et al. 1999; Wen et al. 1997). *P. loescheii* produziert Essigsäure aus Cellobiose und fermentiert Xylan (Moncla et al. 1991; Wu et al. 1992).

4.1.10 *TM7* Phylum

Da es noch keine kultivierten Vertreter des *TM7*-Phylums gibt (siehe unten), kann eine Einteilung nach Gattungen oder Familien nicht vorgenommen werden. Sequenzen dieses Phylums konnten nur in der Probe vom dänischen Rind nachgewiesen werden. Insgesamt ist *TM7* mit vier Klonen vertreten. Die höchste 16S-Ähnlichkeit zu Klonen aus GenBank lag zwischen 97% und 99% (Tabelle 19).

Sequenzdaten legen nahe, dass Vertreter des Phylums *TM7* in der Umwelt weit verbreitet sind. Sie wurden in chemisch und geographisch unterschiedlichsten Habitaten gefunden: in Böden (Wurzelbereich, Torfmoos), im Wasser (Grund-, Süß-, Meerwasser, Tiefseesedimente, aktivierte Klärschlämme, heiße Quellen), in Lebewesen (Entzündungen im Bereich des Zahnfleisches und der Mundschleimhäute von Menschen, im Kot von Mäusen, in Eingeweiden von Termiten) (Hugenholtz et al. 2001; Kühbacher et al. 2008). Viele *TM7*-Bakterien spielen in ihren Habitaten – z.B. landwirtschaftlich belasteten Böden – eine ökologisch essenzielle Rolle, u.A. durch den Abbau von Benzol- und Toluolverbindungen (Xie et al. 2010). Sie kommen ebenso in Abwasseraufbereitungsanlagen, in hydrothermalen Sedimenten oder in Sammelbecken für chlorierte Lösemittel vor (Luo et al. 2009). In einer Studie zu Mikrobiomen des Pansens konnten zwar Sequenzen von unkultivierten Bakterien aus weniger häufig auftretenden Phyla wie *TM7* in geringer Anzahl nachgewiesen werden, doch bleibe noch zu untersuchen, ob *TM7* ständig den Pansen bewohnende Mikroorganismen sind und dort eine wesentliche Funktion innehaben (Kim et al. 2011). Andere Forschungsergebnisse weisen *TM7*-Populationen in Rinderpansen bei einer Fütterung mit Alfalfa und Triticale nach, die allerdings im Vergleich zu den Populationsgrößen anderer Bakterien nicht bedeutend waren (Kong et al. 2010 [2]). Die ermittelten 16S-rRNS-Gensequenzen der untersuchten Exemplare unterschieden sich deutlich voneinander (Xie et al. 2010). Zu Spezies aus diesem Phylum konnten stabile Kulturen weder gefunden noch angelegt werden, sodass sowohl ihre metabolischen Fähigkeiten wie auch ihre Funktionalität im Zusammenwirken mit anderen Mikroorganismen noch weitgehend unerforscht sind (Xie et al. 2010; Kühbacher et al. 2008; Hugenholtz et al. 2001). Untersuchungen an Protein hydrolysierenden *TM7*-Organismen ergaben, dass sie sich als Epiflora an die Filamente diverser anderer Mikroorganismen heften und mit diesen symbiotisch organische Partikel einfangen und hydrolysieren (Xia et al. 2007).

4.1.11 *Synergistetes* Phylum

Nur in der Probe vom dänischen Rind fanden sich Vertreter dieses Phylums. Es ist dort mit zwei Klonen vertreten. Die 16S-Ähnlichkeit zu einem kultivierten Isolat lag bei 93%; die 16S-Ähnlichkeit zu einem Klon aus GenBank lag bei 99% (Tabelle 19). Auf Grund dieser 16S-Ähnlichkeiten kann angenommen werden, dass es sich bei dem erhaltenen Klon mit einer 99%-Ähnlichkeit um die gleiche Art oder zumindest um eine neue Art handelt.

Die Bakterien des Phylums *Synergistetes* fermentieren zumeist Aminosäuren, nur wenige können auch Kohlenhydrate nutzen. Sie finden sich in mikrobiellen Gemeinschaften im Verdauungstrakt diverser Tiere und sind als opportunistisch pathogene Keime genauso in das Krankheitsgeschehen des Zahnhalteapparats involviert. Ihr Stoffwechsel und ihre Rolle in anaeroben Ökosystemen sind noch weitgehend unbekannt (Webster et al. 2011; Hugenholtz et al. 2009; Godon et al. 2005). Trotz der Vielfalt ihrer Habitate ist die physiologische Ähnlichkeit der Vertreter von *Synergistetes* bezüglich ihrer Angewiesenheit auf Aminosäuren als Substrate auffällig (Hugenholtz et al. 2009). In einer unveröffentlichten Studie waren fast alle Sequenzen (95,5%) der aus dem Panseneithel gewonnenen Isolate der Familie *Synergistaceae* zuzuschreiben, ohne dass eine weitere Klassifizierung erfolgen hätte können (Kim et al. 2011). Eine darunter vorkommende Spezies – *S. jonesii* – ist in der Lage, giftiges Pyridinediol aus Leguminosenblättern abzubauen (Kim et al. 2011; McSweeney et al. 1993). *S. jonesii* wurde aus dem Ziegenpansen isoliert und zerlegt Dihydroxypyridon-Komponenten sowie Aminosäuren (Jumas-Bilak 2009). Es ist in der Lage, toxische Aminosäuren pflanzlichen Ursprungs zu nutzen, z.B. Mimosin von der Tamarinde (Godon et al. 2005; Li et al. 2011).

4.1.12 *Spirochaeta*

Je ein Vertreter dieses Genus aus dem Phylum *Spirochaetes* wurde in der Probe vom dänischen und vom österreichischen Rind nachgewiesen. Insgesamt ist es also mit zwei Klonen vertreten. Die 16S-Ähnlichkeit zu kultivierten Isolaten aus dem Genus *Spirochaeta* lag bei 90% und 95%; die 16S-Ähnlichkeit zu Klonen aus GenBank lag ebenfalls bei 90% und 95% (Tabellen 19 und 20). Auf Grund dieser 16S-Ähnlichkeiten kann angenommen werden, dass es sich bei den hier erhaltenen Klonen zumindest um neue Arten innerhalb der Gattung *Spirochaeta* handelt.

Untersuchungen von Panseneithelien aus Schafen und Rindern ergaben, dass das Phylum *Spirochaetes* neben anderen Phyla zu einem geringen Anteil vorkommt (Chen et al. 2011; Kim et al. 2011).

Spirochaetes-Bakterien konnten auch aus dem Darm von Termiten isoliert werden (Godon et al. 2005).

4.2 Zusammenfassung der phylogenetischen Zuordnungen an Hand der untersuchten Proben

Die vorliegende Untersuchung basiert auf Sequenzen aus zwei Pansenproben von einem dänischen Rind und einer Pansenprobe von einem österreichischen Rind. Die Wiederkäuer unterscheiden sich im Standort, dem Futter, der Rasse und anderen Merkmalen. Die Proben bieten in einer Momentaufnahme Einblick in zwei ruminale Mikrobiome, und die vorliegende Studie versucht die vorgefundenen Sequenzen Genera, Familien und Phyla zuzuordnen. Alle in diesem Zusammenhang gewonnenen Klone haben eine deutlich höhere 16S-Ähnlichkeit zu Klonen aus GenBank als zu beschriebenen Arten. In allen Fällen ist die jeweilige Ähnlichkeit zu kultivierten Bakterien nicht ausreichend (<99%), um eine eindeutige Zuordnung zu referenzierten kultivierten Spezies vorzunehmen, sodass die Zuordnung nur auf einer höheren Ebene (meistens der Gattung) erfolgen kann.

Generell lag die 16S-Ähnlichkeit der hier aus allen Proben erhaltenen Klone zu den nächstverwandten Sequenzen aus GenBank zwischen 90 und 99% (Tabellen 19 und 20), die Ähnlichkeit zu kultivierten und beschriebenen Bakterien zwischen 84 und 95% (Tabellen 19 und 20). Aus diesen Ähnlichkeiten kann man schlussfolgern, dass zumindest alle Klone mit weniger als 99% 16S-Ähnlichkeit zu ihrer nächstverwandten Sequenz in GenBank höchstwahrscheinlich neue Arten innerhalb der jeweiligen Gattungen repräsentieren. Zudem hat ein großer Teil der Klone (69%) weniger als 99% 16S-Ähnlichkeit zur jeweils nächstverwandten Sequenz in GenBank (Abbildung 13) und ein beträchtlicher Teil davon wiederum weniger als 95% 16S-Ähnlichkeit. Dies lässt auf eine hohe Diversität der Bakterien des Pansenepithels – vor allem im Vergleich zu kultivierten Organismen – schließen. Auch gibt der Vergleich mittels der 16S-rRNS-Gene nur begrenzt Aufschluss über die spezifischen physiologischen Fähigkeiten der erhaltenen Klone.

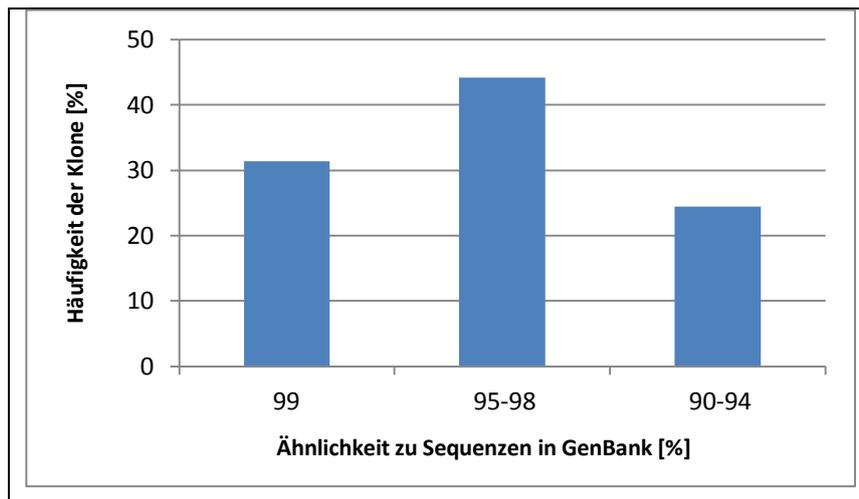


Abbildung 13. Ähnlichkeit der ermittelten Klone zu Sequenzen aus der Datenbank und ihre relative Häufigkeit (beide in %).

4.3 Auswirkungen der unterschiedlichen Fütterung auf die Bakteriengemeinschaft des Pansenepithels dargestellt an der Probe von einem dänischen Rind

Die Auswertung der Sequenzen aus der Probe vom dänischen Rind (Tabelle 19) lässt Unterschiede in der Verteilung der erhobenen OTUs nach dem Stickstoffgehalt des Futtermittels („high“ bzw. „low“) erkennen. Insgesamt wurden daraus nicht sehr viele Sequenzen analysiert, sodass das Ergebnis nur begrenzt gültige Schlüsse zulässt (siehe unten). Aus den OTUs mit mehreren Klonen (insgesamt acht) ist zu erkennen, dass die Klone zweier OTUs (3, *Eubacterium*; 5, *Butyrivibrio*) nur mit der Futtermittelvariante „low“ und andere (4, *Synergistetes spp.*; 7, *Clostridium*; 8, *Christensenella*) nur mit der Futtermittelvariante „high“ in Verbindung zu bringen sind. Die Klone der übrigen OTUs (1, *Desulfobulbus*; 2, *Butyrivibrio*; 6, *TM7*) fanden sich sowohl in der Futtermittelvariante „high“ als auch in der Futtermittelvariante „low“. Aus diesem Ergebnis kann geschlossen werden, dass die OTUs 3 und 5 als Kandidaten für eine Anpassung an ein Futtermittel mit einem geringen Stickstoffgehalt und die OTUs 4, 7 und 8 als Kandidaten für eine Anpassung an ein Futtermittel mit einem höheren Stickstoffgehalt betrachtet werden können.

Auch bei einer Analyse der Häufigkeit einzelner Genera in den unterschiedlichen Ernährungen lassen sich einige Kandidaten erkennen, die möglicherweise in Folge der verschiedenen Fütterung unterschiedlich häufig auftreten (Abbildung 8). Vertreter der Gattungen *Desulfobulbus*, *Clostridium* und

Christensenella sind in der Genbank häufiger mit hohem Stickstoffanteil in der Fütterung zu finden – Vertreter der Gattung *Eubacterium* und der Familie *Lachnospiraceae* sowie des Phylums *TM7* scheinen dagegen in der Genbank mit niedrigem Stickstoffanteil in der Fütterung häufiger zu sein. Es ist allerdings festzuhalten, dass – wie bereits oben erwähnt (4.1) – die hier erzielten Ergebnisse nicht quantitativ sind und daher weitere Analysen zur Bestätigung erfordern.

Futtermittel mit unterschiedlichen Stickstoffdosen wirken sich auf die Zusammensetzung der ruminalen Bakteriengemeinschaft in der Form aus, dass einige Bakterien eher auf einen höheren und andere eher auf einen niedrigeren Stickstoffgehalt eingestellt sind. Dass einige Bakterien der ruminalen Gemeinschaft sowohl bei der höheren als auch bei der niedrigen Stickstoffdosis vertreten sind, zeigt auf, dass sie von diesem Unterschied nicht beeinflusst zu werden scheinen. In analoger Weise lassen sich einige OTUs (1, 2, 6) nicht eindeutig einer bestimmten Futtermitteldosierung zuordnen.

Die den OTUs zugeordneten Referenzen mit einem höheren Ähnlichkeitswert sind zumeist unkultivierte Klone, woraus abgeleitet werden kann, dass im Hinblick auf eine wissenschaftliche Erfassung dieser Klone neue Kultivierungsmethoden zu entwickeln sowie zum Nachweis spezifische Untersuchungen durchzuführen sind.

In Tabelle 19 finden sich zu den Referenzen der einzelnen Kandidaten-OTUs weitere Angaben bezüglich der Physiologie und der Habitate. Es gilt zu beachten, dass die tatsächliche Biodiversität der Mikrobiota im Pansen des dänischen Rinds weitaus höher ist, als die in dieser Arbeit ermittelte Anzahl an OTUs wiedergibt. Dies gilt nach der Fütterung sowohl mit stickstoffreichem als auch stickstoffarmem Futtermittel. Um die Diversität der analysierten Proben abzuschätzen, wurden verschiedene statistische Verfahren angewandt. Die Rarefaction-Analyse in Abbildung 14 zeigt deutlich, dass weitaus mehr Klone sequenziert werden müssen, um die in der untersuchten Probe vorhandene Biodiversität besser zu erfassen. Dass der Verlauf der Rarefaction-Kurve beinahe linear ist, zeigt auf, dass nahezu mit jedem sequenzierten Klon eine neue OTU hinzukommt.

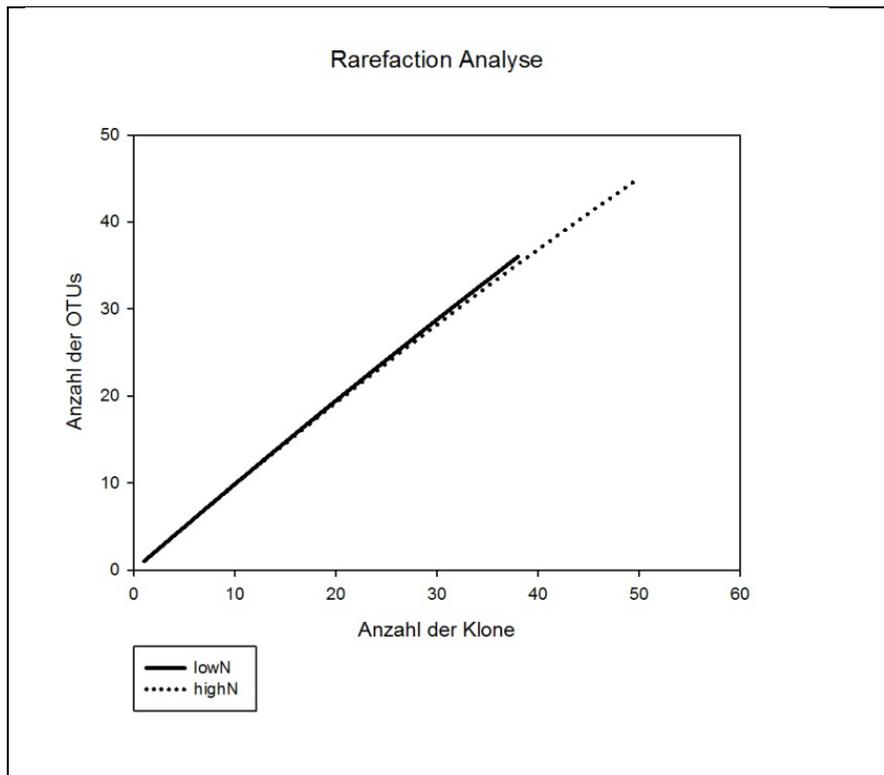


Abbildung 14. Rarefaction-Analyse zur Abschätzung der Biodiversität beim dänischen Rind basierend auf einer OTU-Einteilung auf der Grundlage einer 16S-rRNS-Sequenzähnlichkeit von mehr als 99%.

Generell zeigt eine Abflachung der Steigung von Rarefaction-Kurven an, dass ausreichend Klone sequenziert worden sind. Die kombinierten Biodiversitätsindices („species richness“) auf der Grundlage des Chao-Estimators und des ACE-Estimators lassen klar erkennen, dass die zu erwartende Gesamtzahl der OTUs weitaus höher ist, wie in Tabelle 21 dargestellt wird.

Tabelle 21. Kombinierte Biodiversitätsindices auf der Grundlage des Chao- und des ACE-Estimators beruhend auf einer OTU-Einteilung nach 1% 16S rRNS Differenz.

Gruppe	Anzahl der erhaltenen Arten	Chao	ACE
highN	45	175 (97-373)	225(76-1009)
lowN	36	223(100-582)	342(53-5472)

Diese Werte sind etwas niedriger als Vergleichswerte aus der Literatur (Li et al. 2011), allerdings ist zu vermerken, dass in der angegebenen Studie deutlich mehr Klone sequenziert wurden als in dieser Arbeit. Die Genauigkeit der Abschätzung von Biodiversitätsindices ist umso größer, je mehr Sequenzen analysiert werden. In Folge der geringen Anzahl an sequenzierten Klonen für das österreichische Rind wurde eine Abschätzung der Biodiversitätsindices nur für die Proben vom dänischen Rind durchgeführt.

Zur Ernährung mit einem Futtermittelgemisch aus Grünfutter und Konzentrat wurde erhoben, dass sich bei der Variante „high“ (55% Alfalfasilage, Gerstesilage, Alfalfaheu; 45% Konzentrat) der Stickstoffanteil bei den Bakterien des Pansenlumens verringerte. Die Besiedlung der Nahrungspartikel durch lose bzw. fest verbundene Bakterien erhöhte sich bei der Variante „high“ gegenüber der Variante „low“ (35% Alfalfasilage, Gerstesilage, Alfalfaheu; 65% Konzentrat). Bei allen Bakterien des Lumens, seien sie den Nahrungspartikeln lose oder fest adhärirt, wurden bedeutende Unterschiede im Aminosäureaufbau festgestellt. Weniger als 20% der Bakterien waren mit der Pansenflüssigkeit und mehr als 70% mit den festen Bestandteilen verbunden. Die Besiedlung der beiden ruminalen Fraktionen war bei Tieren, die die Futtermittelvariante „high“ erhielten, höher als bei jenen, die mit der Futtermittelvariante „low“ ernährt wurden (Yang WZ et al. 2001).

Zur Auswirkung unterschiedlicher Stickstoffkonzentrationen im Futtermittel auf das Wachstum der Mikroorganismen des Pansens wurde festgestellt, dass nicht nur für ein maximales Bakterienwachstum Stickstoff in einer anderen Form als Ammoniak erforderlich ist und dass für den Faserabbau Stickstoff nicht nur aus Proteinen sondern minimal auch aus Peptiden oder Aminosäuren benötigt wird (Griswold et al. 1996).

Eine Untersuchung ergab, dass sich der Ersatz durch Futterblöcke auf die ruminale Fermentation und das mikrobielle Wachstum in der Form auswirkte, dass die durchschnittlichen pH-Werte, der Gehalt an flüchtigen Fettsäuren, die Stickstoffkonzentration sowie das Acetat-Propionat-Verhältnis in den Pansen von Ziegen im Gegensatz zum mikrobiellen Stickstofffluss und zur Effizienz nicht beeinträchtigt wurden. Die ökonomische Attraktivität resultiert aus der lokalen Verfügbarkeit alternativer Nahrungsquellen wie Nebenprodukte aus der Agrarwirtschaft, der Knappheit von Getreide für die tierische Ernährung sowie einer gesteigerten Kosteneffizienz (Molina-Alcaide et al. 2009).

Die Verschiebung von Futtertypen und Mischungsverhältnissen (Grünfutter:Konzentrat; von 70:30 zu 30:70) erwies bei Ziegen eine Verbesserung der Verdaulichkeit von Nährstoffen, der ruminalen Fermentation und des mikrobiellen Wachstums, einen geringeren Energieverlust über die Ausscheidung, eine erhöhte Stickstoffkonzentration, aber auch einen verminderten Faserabbau vermutlich in Folge einer Wachstumsbehinderung cellulolytischer Bakterien nach dem Abfall des pH-Werts auf unter 6,2 (Cantalapiedra-Hijar et al. 2009).

Eine Untersuchung zu den Effekten unterschiedlicher Gehalte von Stickstoff aus anderen Quellen als Proteinen auf die tierische Leistung, die Verdaulichkeit der Futtermittel, die ruminale Fermentation und die Proteinsynthese ergab auf der Grundlage von Futtermitteln aus 70% Mais- bzw. Sorghum- bzw. Grassilage und 30% Konzentrat mit zwei unterschiedlichen Gehalten an Rohprotein (CP), dass Harnstoff in Folge der leichten Verfügbarkeit und der geringen Kosten als partieller oder vollständiger Ersatz für Stickstoff aus anderen Quellen als Proteinen einen Anstieg der ruminalen Rohproteinverdauung sowie keine Einschränkung der mikrobiellen Effizienz bewirkt. Ein Übermaß an Stickstoff aus anderen Quellen als Proteinen verbessert dagegen die tierische Leistung nicht und erhöht nur die Belastung der Umwelt mit Ammoniak (Chizzotti et al. 2008).

Die Ammoniakabsorption in den Darm wird über den Gehalt der Nahrung an Proteinen sowie den sich daraus ergebenden Energieverbrauch durch den mikrobiellen Anabolismus geregelt. Essenziell ist dabei der ruminale Stickstofftransport im Bereich des Darmepithels. Harnstoff aus diesem Puffer kann dabei eine asynchrone Versorgung mit Energie und Stickstoff sicher stellen. Ein reduzierter Proteingehalt der Futtermittel kann sich so auf den Proteinanteil der Milch- und Fleischprodukte auswirken (Reynolds et al. 2008).

An Hand von zwei Grünfutter-Konzentrat-Varianten sollen in einer Untersuchung die Auswirkungen der Nahrungszusammensetzung auf den Aufbau der bakteriellen Gemeinschaft, die mikrobielle Besiedlung der Nahrungspartikel und deren ruminale Verteilung sowie den Abfluss in den Darm ermittelt werden. Die Futtermittelvarianten unterschieden sich in ihrem Mischungsverhältnis: „low“ 35:65 und „high“ 55:45. Aus dem Ergebnis wurden eine Abnahme des Stickstoffgehalts, bedeutende Unterschiede in der Zusammensetzung der Aminosäuren sowie partiell eine Zunahme der bakteriellen Besiedlung und eine höhere Bakteriendichte abgeleitet. Die Untersuchung bestätigt die unterschiedliche Zusammensetzung der Flora der Pansenflüssigkeit und jener der Nahrungspartikel und eröffnet Manipulationsmöglichkeiten über die Futtermittel (Yang WZ et al. 2001).

4.4 Unterschiedliche Probengewinnung aus dem Pansenepithel eines österreichischen Rinds

Zur Ermittlung von Sequenzen aus der Probe von einem Rind aus Österreich wurde auf zwei Arten vorgegangen: In der einen Gewinnungsvariante wurden die Pansenzotten abgebürstet („B“), und in

der anderen Gewinnungsvariante wurde ein Stück davon abgeschnitten („Z“). In einer ersten Hypothese kann angenommen werden, dass in der einen Probe überwiegend lose mit dem Pansenepithel verhaftete Bakterien zu finden sein werden, während die andere Probe einen umfassenderen Querschnitt der Bakterienbesiedlung der ausgewählten Pansenregion bieten wird. Insgesamt muss das Ergebnis zu dieser Probe dahingehend relativiert werden, dass nur eine geringe Anzahl von Klonen sequenziert und die Entnahme an einer spezifischen Stelle des Pansens mit einem möglicherweise spezifischen Mikrobiom erfolgte. Eine größere Bandbreite an ruminalen Epithelstellen für die Probenentnahme sowie eine größere Anzahl an untersuchten Sequenzen würden weiter reichende Rückschlüsse auf die Zusammensetzung der Pansenepithelpopulation erlauben. Schließlich ist noch anzumerken, dass in Folge der beiden unterschiedlichen Gewinnungsvarianten von ein und derselben Epithelstelle kombinierte Schlussfolgerungen bezüglich der Bakterienpopulation an der spezifischen Stelle nicht möglich sind. In der folgenden Tabelle 22 finden sich die OTUs vom österreichischen Rind, die über mehrere Klone verfügen, nach der Art der Probengewinnung aufgestellt.

Tabelle 22. OTUs mit mehreren Klonen in der Probe vom österreichischen Rind nach der Art der Gewinnung.

OTU (1% Differenz)	„B“	„Z“
1	B7, B42	
2	B10, B25	
3	B50, B58	Z23
4		Z32, Z51

“B” = Gewinnungsvariante „Zotten abgebürstet“; “Z” = Gewinnungsvariante „Zotten abgeschnitten“

Es wurde nur eine OTU (3, *Eubacterium*) gefunden, die in beiden Proben vorkam. Daher können auf Grund der unterschiedlichen Probennahme keine Rückschlüsse auf die Zusammensetzung der Bakterien des Pansenepithels gezogen werden. Mögliche Gründe hierfür sind oben angeführt.

4.5 Vergleich der Klone aus Proben von einem dänischen und einem österreichischen Rind

Um zu analysieren, in wieweit es Gemeinsamkeiten zwischen den Klonen der Proben vom dänischen und vom österreichischem Rind gibt, wurde mit Hilfe von Mothur eine Similarity-Matrix erstellt und damit die Klone aus allen Proben in OTUs eingeteilt. Wenn man 1% 16S-rRNS-Unterschied als Grenzwert für die Einteilung in OTUs wählt, ergibt sich nur eine OTU, die in beiden Proben vorkommt: die Klone 99H und Z35 (*Eubacterium*, *Firmicutes*). Wenn man einen Grenzwert von 3% 16S-rRNS-

Unterschied für die Einteilung in OTUs wählt, ergeben sich erwartungsgemäß mehr gemeinsame, allerdings auch diversere OTUs (Tabelle 23). Die Gemeinsamkeiten der mikrobiellen Flora in den untersuchten Proben sind hauptsächlich auf der Ebene der Genera und nicht auf jener der Spezies zu finden. Dies legt nahe, dass diverse Unterscheidungsfaktoren wie Individuen, geographische Lage, Futter oder Rasse einen großen Einfluss auf die Zusammensetzung der mikrobiellen Flora des Pansenepithels haben.

In der folgenden Tabelle 23 wurde die Berechnungsgrundlage mit Hilfe der Similarity-Matrix nach „≥97%-Ähnlichkeit“ durchgeführt, woraus sich mehrere OTUs mit gemeinsamen Klonen ergeben.

Tabelle 23. Klone, die den beiden Proben (österreichisches bzw. dänisches Rind) nach ≤3% Unterschied gemeinsam sind.

OTU (3% Differenz)	Klone
3	79L, Z39
4	82L, 86H, Z53
6	107H, Z22, Z36
9	146L, B29

“L” = Futtermittelvariante Stickstoffgehalt nieder; “H” = Futtermittelvariante Stickstoffgehalt hoch
 “B” = Gewinnungsvariante „Zotten abgebürstet”; “Z” = Gewinnungsvariante „Zotten abgeschnitten“

4.6 Relevanz der vorliegenden Arbeit

Mit dieser Arbeit verbinde ich das Anliegen, einen Beitrag zu den Erkenntnissen zu leisten, mit deren Hilfe bei der Haltung von Wiederkäuern mittels einer angepassten Zusammensetzung der Futtermittel zum Einen hochwertige Nahrungsmittel möglichst effizient erzeugt werden können und zum Anderen erreicht wird, dass überschüssige Energie nicht als Treibhausgas in die Umwelt gelangt.

Im Resultat zeigt diese Untersuchung die Unterschiedlichkeit von Bakterienpopulationen des Pansenepithels in Abhängigkeit von Faktoren wie Futtermittel und Standort. Aus den Begrenzungen, die dieser Studie gesetzt sind, lassen sich Notwendigkeiten wie die Sequenzierung einer größeren Anzahl von Klonen im Rahmen weiterer Forschungen ableiten, um die vorhandene Diversität der mikrobiellen Flora des Pansenepithels besser zu erfassen. In weiterer Folge könnte man damit auch der Bedeutung dieses komplexen Ökosystems für die Nahrungsmittelproduktion sowie dessen Wechselwirkungen mit der lokalen Umwelt und – im größeren Zusammenhang – mit der Atmosphäre besser gerecht werden. Somit könnte der Erwerb weiterer Informationen über den Aufbau und die Wirkungsweise des Pansens wichtige Hinweise für die Effizienzsteigerung bei der Verdauung von Fasern, bei der Nutztierhaltung, bei der Qualitätsverbesserung in der Produktion tierischer Nahrungsmittel

und sogar bei der Erzeugung von Ethanol und anderer hochwertiger Produkte aus Biomasse liefern (Kong et al. 2010 [1]; Kong et al. 2010 [2]).

Es besteht die Herausforderung, ein Gleichgewicht zwischen den berechtigten Bedenken angesichts der ökologischen Auswirkungen der aktuellen Nutztierhaltung und den Anforderungen aus einem steigenden Bedarf an hochwertigen tierischen Nahrungsmitteln wie Fleisch und Milch sowie den daraus abgeleiteten Produkten zu finden. Denn wenn der Vorrat an ruminal abbaubarem Protein die von den proteolytischen Mikroorganismen benötigte Menge übersteigt, wird dieses zu Stickstoff abgebaut, absorbiert, in der Leber in Harnstoff umgewandelt und schließlich als Urin an die Umwelt abgegeben. Als geeignetes Instrument zur Vermeidung von Stickstoffverlusten bietet sich in diesem Zusammenhang der manipulative Eingriff in den Proteinabbau sowie in die Stickstoffnutzung an (Bach et al. 2005). Dabei ist allerdings die Reduktion der Proteinkonzentration in den Futtermitteln aus ökologischen Beweggründen im Hinblick auf die Bedeutung der Proteinsynthese durch die ruminalen Mikroorganismen als erster Stufe der Produktion von Milch und Fleisch kritisch zu betrachten (Reynolds et al. 2008). Auch das Verständnis der ruminalen Methanogenese und der darin involvierten Archaea ist essenziell sowohl für eine Eindämmung der Emission von Treibhausgasen als auch für eine Leistungssteigerung in der Nutztierhaltung in Verbindung mit einer Reduktion der über die Futtermittel zugeführten Energie. Bei diesbezüglichen Forschungsaktivitäten darf die Rolle der Archaea, Bakterien, Protozoen und Pilze nicht außer Acht gelassen werden, die mit ihren Produkten zur Methanogenese beitragen (Zhou et al. 2010). Über die Methanogenese könnte auch wertvolle elektrische Energie erzeugt werden, was allerdings weitere Erkenntnisse über die darin involvierten Mikroorganismen voraussetzt (Garcia et al. 2011).

Die in dieser Untersuchung ermittelten 16S-rRNS-Sequenzen weisen sowohl beim dänischen als auch beim österreichischen Rind in vielen Fällen eine höhere Ähnlichkeit mit einem noch nicht kultivierten Referenzklon als zu kultivierten Bakterien auf. Daraus lässt sich ableiten, dass im Fokus anschließender Forschungsarbeiten die Anwendung anderer Methoden für die Kultivierung bisher unkultivierbarer Spezies stehen könnte. Neue Spezies könnten auch nach der Trennung über Single-Cell-Ansätze – z.B. Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) evtl. in Kombination mit Fluoreszenz-*in-Situ*-Hybridisierung (FISH), Laser Micro Dissection (LMD) oder Dilution to Extinction – einem Kultivierungsversuch z.B. mittels Gel Microdroplet Cultivation (GMDC) oder einer Diffusionskammer zugeführt werden. Eine weitere Möglichkeit, mehr über die Funktion der Bakterien des Pansenepithels beim Rind zu erfahren, wäre der Einsatz von kultivierungsunabhängigen Methoden wie die Erstellung von Genbanken mit Funktionsgenen, die Metagenomik, FISH/MAR oder Stable Isotope Probing.

5 Zusammenfassung

Die Entwicklung der Rinder wie aller Wiederkäuer verlief in einer engen Symbiose mit einer enormen Vielfalt von Mikroorganismen, mit deren Hilfe ihr Stoffwechsel eine unglaubliche Leistung vollbringt: die Umwandlung cellulosereicher Nahrungsmittel in eine breite Palette von Substanzen für die Erhaltung des eigenen Körpers und die Produktion von Milch. Den Pansen bewohnen höchst unterschiedliche anaerobe Mikroorganismen wie Bakterien, Archaea, Protozoen und Pilze, deren Lebensfunktionen miteinander verschränkt und die zugleich dem Wirtorganismus von essenziellem Nutzen sind.

Obwohl in den Erkenntnissen über den Pansen große Fortschritte erzielt und Methoden der molekularen Mikrobiologie angewandt worden sind, bleibt zur Beziehung zwischen Wirt und Mikroorganismen noch vieles zu erforschen. Es herrscht eine weitgehende Übereinstimmung darin, dass die kultivierten ruminalen Spezies und ihre Funktionen z.B. im Celluloseabbau und in der Methanogenese ausführlich beschrieben und analysiert sind, während die überwiegende Mehrheit der Bakterien und Archaea noch nicht unter Laborbedingungen gezüchtet werden können. Des Weiteren hat sich die Forschung bisher hauptsächlich auf die mit den Nahrungspartikeln verhafteten oder in der Pansenflüssigkeit lebenden Bakterien konzentriert. Die Bakterien des Pansenepithels stellen dagegen ein bislang wenig untersuchtes Mikrobiom dar, obwohl sie ein wichtiges Bindeglied zwischen dem Pansenlumen und dem Rind darstellen. Zu Symbiose und Wechselwirkungen zwischen dem Lumen und dem Epithelgewebe sowie deren Rolle bei der Absorption der Nährstoffe sind die Erkenntnisse noch nicht sehr umfangreich. So wird vermutet, dass diesen Mikroorganismen bei der Umwandlung von Ammoniak aus dem Pansenlumen in Harnstoff und dessen Resorption eine tragende Funktion zukommt.

Das Hauptanliegen dieser Arbeit war die Identifizierung von Bakterien und Archaea, deren Biofilm das Pansenepithel bedeckt. Zu ihrem Nachweis wurden mittels des rRNS-Ansatzes die 16S-rRNS-Gene der vorgefundenen Mikroorganismen amplifiziert, kloniert, sequenziert, analysiert und schließlich phylogenetisch eingeordnet. Im Konkreten wurden die Sequenzen von jeweils einer Probe von einem dänischen (86 Klone insgesamt) und einem österreichischen Rind (31 Klone insgesamt) in das Mothur-Programm eingegeben und in 75 bzw. 26 OTUs eingeteilt. Es wurden keine Archaea, nur Bakterien ermittelt. Die Klone konnten den Phyla *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Spirochaetes*, *TM7*, *Synergistetes* und *Chloroflexi* zugewiesen werden, wobei die ersteren drei die häufigsten waren. Die Abweichungen bei der phylogenetischen Zuordnung und den referenzierten Klonen könnten von den Unterschieden in der Rasse, dem Standort, der Ernährung usw. herrühren. Hinzuweisen

ist auch darauf, dass beim dänischen Rind das Futter mit zwei unterschiedlichen Stickstoffdosen behandelt wurde, wobei zwischen den beiden Verabreichungen eine Adaptionsphase eingehalten wurde. Hier konnten zwei OTUs sowie mehrere Genera identifiziert werden, die möglicherweise in Anpassung an eine unterschiedliche Fütterung häufiger bzw. weniger häufig in den untersuchten Proben vorkommen. Aus dem Umstand, dass das Ergebnis dieser Arbeit auf einer relativ geringen Anzahl untersuchter Sequenzen beruht, lässt sich die Notwendigkeit weiter gehender Untersuchungen mit einer größeren Anzahl von Sequenzen oder mit anderen Methoden ableiten, um die Bakterien des Pansenepithels besser charakterisieren zu können.

6 Summary

Dairy cows like all ruminants have evolved through a close symbiotic relationship with a huge variety of microbes, which confer to the ruminants essential metabolic features including the capability to convert cellulose rich feedstuff into a wide range of compounds used for body maintenance and milk production. The rumen is inhabited by most different types of anaerobic microorganisms like bacteria, archaea, protozoa, and fungi having their functions interlinked in an intimate dependence and fulfilling essential functions directly affecting the host's performance.

Although an enormous progress has been realized applying methods of molecular microbiology in rumen studies, the knowledge of the microbe-host relationship is far from being complete. There is a general agreement that the rumen biota is extensively described and analysed regarding the cultivable species involved in processes like cellulose degradation and methanogenesis, whereas the vast majority of bacteria and archaea is repellent to cultivability under laboratory conditions. Furthermore research has mainly concentrated on the ruminal bacteria attached to the food particles or inhabiting the liquid fraction. The bacteria adhering to the epithelial papillae have so far constituted a greatly underestimated category of ruminal microbes. Their role in the symbiotic interactions between the lumen and the host's ruminal tissues like the contribution to the nutrient absorption is yet poorly understood. More specifically these microbes might be essential in the processes converting luminal ammonia into urea and those of ureal resorption.

The major aim of this thesis was to identify bacteria and archaea colonizing the biofilm onto the ruminal epithelium. For the detection of the microbes the so-called rRNA approach was applied: the 16S rRNA genes of the microbes present in the samples were amplified, cloned, sequenced, analysed,

and phylogenetically classified. Purposing a result as exact as possible, two samples were taken from a Danish dairy cow (86 clones totally) and an Austrian dairy cow (31 clones totally), respectively, and submitted to the mothur programme and assigned to 75 and 26 OTUs, respectively again. Among the clones detected, there were no archaea, only bacteria. The genera detected belonged to the phyla *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Spirochaetes*, *TM7*, *Synergistetes*, and *Chloroflexi*, the former three hosting the majority of the OTUs. The divergence in the assignments to the phyla and the referential clones may result from differences of bovine race, geography, alimentation etc. and, regarding the Danish cow, from the food being treated with two distinctive nitrogen doses minding an interval for adaptation. The study revealed two OTUs and various genera which maybe as a result of an adaptation to food modifications were more or less frequently identified in the different samples. As the result of this research is marked by the relatively reduced number of sequences examined, it has to be stated that more research involving a greater number of sequences or different methods has to be realized for a more accurate determination of the bacteria of the ruminal epithelium.

7 Abkürzungen

AE-Buffer	Elution-Puffer
AL Buffer	Lysis-Puffer
ARB	arbor ("Baum"; Software-Paket)
ATP	Adenosin-Tri-Phosphat
AW Buffer	Wash-Puffer
B	Zotten abgebürstet
BEC	epimurale Bakteriengemeinschaft (Bacterial Epimural Community)
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
Bp	Basenpaare
CA	Rohasche (Crude Ash)
CL	Rohfett (Crude Lipid)
CP	Rohprotein (Crude Protein)
DEPC	Di-Ethyl-Pyrocarbonat
DM	Trockenmasse (Dry Matter)
DMF	Dimethylformamid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid-Triphosphat
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylen-di-amin-tetra-Essigsäure
ERG	Eppendorf-Reaktionsgefäß
et al.	und andere (et alii)
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FinchTV	Finch Trace Viewer
FISH	Fluorescence in Situ Hybridization
GMDC	Gel Microdroplet Cultivation
H	High (höherer Stickstoffgehalt)
HS	Hot Start
Kb	Kilobasen
L	Low (niedrigerer Stickstoffgehalt)
LB Medium	Luria-Bertani-Medium
LMD	Laser Micro Dissection
NDF	Neutrale Detergenzfaser (Neutral-Detergent Fibre)

OD	optische Dichte
OTU	Operative taxonomische Einheit (Operational Taxonomic Unit)
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (Phosphate Buffered Saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
RaxML	Maximum-Likelihood-Baumberechnungsverfahren
RDP	Ribosomal Database Project
RFLP	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
rRNS	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natrium Dodecyl-Sulfat (Sodium Dodecyl Sulfate)
SLB	Slow Loading Buffer
SOP	Standard Operation Process
Taq	Thermostabile DNA-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TNE	Tris NaCl EDTA (Puffer)
w/v	Gewicht pro Volumen (weight per volume)
X-Gal	5-brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid
Z	Zotten abgeschnitten
16S rDNS	16S-Gen der rDNS
16S rRNS	16S-Untereinheit der rRNS von Prokaryoten

8 Literaturverzeichnis

8.1 Fachzeitschriften

Agle M, Hristov AN, Zaman S, Schneider C, Ndegwa P, Vaddella VK. The Effects of Ruminally Degraded Protein on Rumen Fermentation and Ammonia Losses from Manure in Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*. 2009;93:1625–1637.

Alauzet C, Mory F, Teyssier F, Hallage H, Carlier JP, Grollier G, Lozniewski A. Metronidazole Resistance in *Prevotella* spp. and Description of a New nim Gene in *Prevotella baroniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2010;60–64.

Altschul SF, Gish W, Miller WW, Myers EW, Lipman DJ. Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology*. 1990;215(3):403-410.

Ashelford KE, Chuzhanova NA, Fry JC, Jones AJ, Weightman AJ. At Least One in Twenty 16S rRNA Sequence Records Currently Held in Public Repositories Is Estimated to Contain Substantial Anomalies. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005;12:7724-7736.

Attwood GT, Reilly K, Patel BKC. *Clostridium proteoclasticum* sp. nov., a Novel Proteolytic Bacterium from the Bovine Rumen. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1996;46(3):753-758.

Bach A, Calsamiglia S, Stern MD. Nitrogen Metabolism in the Rumen. *Journal of Dairy Science*. 2005;88(E.Suppl.):E9–E21.

Brulc JM, Antonopoulos DA, Miller ME, Wilson MK, Yannarell AC, Dinsdale EA, Edwards RE, Frank ED, Emerson JB, Wacklin P, Coutinho PM, Henrissat B, Nelson KE, White BA. Gene-Centric Metagenomics of the Fiber-Adherent Bovine Rumen Microbiome Reveals Forage Specific Glycoside Hydrolases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009;106(6):1948-1953.

Callaway TR, Dowd SE, Edrington TS, Anderson RC, Krueger N, Bauer NN, Kononoff PJ, Nisbet DJ. Evaluation of Bacterial Diversity in the Rumen and Feces of Cattle Fed Different Levels of Dried Distillers Grains plus Solubles Using Bacterial Tag-Encoded FLX Amplicon Pyrosequencing. *Journal of Animal Science*. 2010;88:3977-3983.

Cantalapiedra-Hijar G, Yanez-Ruiz GDR, Martin-García AI, Molina-Alcaide E. Effects of Forage:Concentrate Ratio and Forage Type on Apparent Digestibility, Ruminal Fermentation, and Microbial Growth in Goats. *Journal of Animal Science*. 2009;87:622–631.

Cheeseman SL, Hiom SL, Weightman AJ, Wade WG. Phylogeny of Oral Asaccharolytic Eubacterium Species Determined by 16S Ribosomal DNA Sequence Comparison and Proposal of *Eubacterium infimum* sp. nov. and *Eubacterium tardum* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1996;957-959.

Chen Y, Penner GB, Li M, Oba M, Guan LL. The Epithelial Tissue Associated Bacterial Diversity Changes in the Rumen of Beef Cattle During Dietary Transition to High Grain Diets. *Applied and Environmental Microbiology* (online). 2011;Jun.24. 10.1128/AEM.00375-11.

- Chizzotti FHM, Pereira OG, Tedeschi LO, Valadares Filho SC, Chizzotti ML, Leão MI, Pereira DH. Effects of Dietary Nonprotein Nitrogen on Performance, Digestibility, Ruminal Characteristics, and Microbial Efficiency in Crossbred Steers. *Journal of Animal Science*. 2008;86:1173–1181.
- Cole JR, Chai B, Marsh TL, Farris RJ, Wang Q, Kulam SA, S. Chandra S, McGarrell DM, Schmidt TM, Garrity GM, Tiedje JM. The Ribosomal Database Project (RDP-II): Previewing a New Autoaligner That Allows Regular Updates and the New Prokaryotic Taxonomy. *Nucleic Acids Research*. 2003;31(1):442–443.
- Cole JR, Wang Q, Cardenas E, Fish EJ, Chai B, Farris RJ, Kulam-Syed-Mohideen AS, McGarrell DM, Marsh T, Garrity GM, Tiedje JM. The Ribosomal Database Project: Improved Alignments and New Tools for rRNA Analysis. *Nucleic Acids Research*. 2009;37:D141–D145.
- Cook AC, Riley PW, Murdoch H, Evans PN, McDonald IR. *Howardella ureilytica* gen. nov., sp. nov., a Grampositive, Coccoid-Shaped Bacterium from a Sheep Rumen. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2007;57:2940–2945.
- DeLong EF. Archaea in coastal marine environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1992;89:5685–5689.
- Deng W, Xi D, Mao H, Wanapat M. The Use of Molecular Techniques Based on Ribosomal RNA and DNA for Rumen Microbial Ecosystem Studies: a Review. *Molecular Biology Reports*. 2008;35:265–274.
- Devillard E, Goodheart DB, Karnati SKR, Bayer EA, Lamed R, Miron J, Nelson KE, Morrison M. Ruminococcus albus Mutants Defective in Cellulose Degradation Are Deficient in Two Processive Endocellulases, Cel48A and Cel9B, Both of Which Possess a Novel Modular Architecture. *Journal of Bacteriology*. 2004; Jan:136–145.
- Dodd D, Mackie RI, Cann IKO. Xylan Degradation, a Metabolic Property Shared by Rumen and Human Colonic Bacteroidetes. *Molecular Microbiology*. 2011;79(2):292–304.
- Downes J, Sutcliffe I, Tanner ACR, Wade WG. *Prevotella marshii* sp. nov. and *Prevotella baroniae* sp. nov., Isolated From the Human Oral Cavity. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2005;55:1551–1555.
- Edwards JE, McEwan NR, Travis AJ, Wallace RJ. 16S rDNA Library-Based Analysis of Ruminal Bacterial Diversity. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2004;86:263–281,.
- Fernando SC, Purvis II HT, Najjar FZ, Sukharnikov LO, Krehbiel CR, Nagaraja TG, Roe BA, DeSilva U. Rumen Microbial Population Dynamics During Adaptation to a High-Grain Diet. *Applied and Environmental Microbiology*. 2010;Nov:7482–7490.
- Finegold SM, Song Y, Liu C, Hecht DW, Summanen P, Könönen E, Allen SD. Clostridium clostridioforme: a Mixture of Three Clinically Important Species. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2005;24:319–324.
- Flint, HJ. The Rumen Microbial Ecosystem. Some Recent Developments. *Trends in Microbiology*. 1997;483(5Dec).

- Garcia SL, Jangid K, Whitman WB, Das KC. Transition of Microbial Communities During the Adaption to Anaerobic Digestion of Carrot Waste. *Bioresource Technology*. 2011;102:7249-7256.
- Godon JJ, Morinière J, Moletta M, Gaillac M, Bru V, Delgènes JP. Rarity Associated With Specific Ecological Niches in the Bacterial World: the 'Synergistes' Example. *Environmental Microbiology*. 2005;7(2): 213–224.
- Griswold KE, Hoover WH, Miller TK, Thayne WV. Effect of Form of Nitrogen on Growth of Ruminant Microbes in Continuous Culture. *Journal of Animal Science*. 1996;74:483–491.
- Griswold KE, White BA, Mackie RI. Diversity of Extracellular Proteolytic Activities Among *Prevotella* Species from the Rumen. *Current Microbiology*. 1999;39:187–194.
- Harmsen HJM, Akkermans ADL, Stams AJM, de Vos WM. Population Dynamics of Propionate-Oxidizing Bacteria under Methanogenic and Sulfidogenic Conditions in Anaerobic Granular Sludge. *Applied and Environmental Microbiology*. 1996;June:2163–2168.
- Hugenholtz P, Tyson GW, Webb RI, Wagner AM, Backall LL. Investigation of Candidate Division TM7, a Recently Recognized Major Lineage of the Domain Bacteria with No Known Pure-Culture Representatives. *Applied and Environmental Microbiology*. 2001;Jan:411–419.
- Hugenholtz P, Hooper SD, Kyrpides NC. Genomics Update Focus: Synergistetes. *Environmental Microbiology*. 2009;11(6):1327–1329.
- Huws SA, Lee MRF, Mützel SM, Scott MB, Wallace RJ, Scollan ND. Forage Type Fish Oil Cause Shifts in Rumen Bacterial Diversity. *FEMS Microbiology Ecology*. 2010;73:396–407.
- Jin JS, Zhao YF, Nakamura N, Akao T, Kakiuchi N, Hattori M. Isolation and Characterization of a Human Intestinal Bacterium, *Eubacterium* sp. ARC-2, Capable of Demethylating Arctigenin, in the Essential Metabolic Process to Enterolactone. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 2007;30(5):904-911.
- Johnson KA, Johnson DE. Methane Emissions from Cattle. *Journal of Animal Science*. 1995;73:2483-2492.
- Jumas-Bilak E, Roudière L, Marchandin H. Description of 'Synergistetes' phyl. nov. and Emended Description of the Phylum 'Deferribacteres' and of the Family Syntrophomonadaceae, Phylum 'Firmicutes'. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2009;59:1028–1035.
- Juretschko S, Timmermann G, Schmid M, Schleifer KH, Pommering-Röser A, Koops HP, Wagner M. Combined Molecular and Conventional Analyses of Nitrifying Bacterium Diversity in Activated Sludge: Nitrosococcus and Nitrospira-Like Bacteria as Dominant Populations. *Applied and Environmental Microbiology*. 1998;64(8):3042-3051.
- Kenters N, Henderson G, Jeyanathan J, Kittelmann S, Janssen PH. Isolation of Previously Uncultured Rumen Bacteria by Dilution to Extinction Using a New Liquid Culture Medium. *Journal of Microbiological Methods*. 2011;84(1):52-60.
- Kim M, Morrison M, Yu Z. Status of the Phylogenetic Diversity Census of Ruminant Microbiomes. *FEMS Microbiology Ecology*. 2011;76:49–63.

Koike S, Handa Y, Goto H, Sakai K, Miyagawa E, Matsui H, Ito S, Kobayashi Y. Molecular Monitoring and Isolation of Previously Uncultured Bacterial Strains from the Sheep Rumen. *Applied and Environmental Microbiology*. 2010; 76(6):1887–1894.

Kong Y, He M, McAlister T, Seviour R, Forster R. Quantitative Fluorescence In Situ Hybridization of Microbial Communities in the Rumens of Cattle Fed Different Diets. *Applied and Environmental Microbiology*. 2010; 76(20):6933–6938. [1]

Kong Y, Ronald Teather R, Forster R. Composition, Spatial Distribution, and Diversity of the Bacterial Communities in the Rumen of Cows Fed Different Forages. *FEMS Microbiology Ecology*. 2010;74:612–622. [2]

Kopečný J, Zorec M, Mrázek J, Kobayashi Y, Marinšek-Logar R. *Butyrivibrio hungatei* sp. nov. and *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* sp. nov., Butyrate-Producing Bacteria from the Rumen. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2003;53:201–209.

Krause DO, Denman SE, Mackie RI, Morrison M, Rae AL, Attwood GT, McSweeney CS. Opportunities to Improve Fiber Degradation in the Rumen: Microbiology, Ecology, and Genomics. *FEMS Microbiology Reviews*. 2003;27:663-693.

Kristensen NB, Storm AC, Larsen M. Effect of Dietary Nitrogen Content and Intravenous Urea Infusion on Ruminal and Portal-Drained Visceral Extraction of Arterial Urea in Lactating Holstein Cows. *Journal of Dairy Science*. 2010;93:2670–2683.

Kühbacher T, Rehman A, Lepage P, Hellmig S, Fölsch UR, Schreiber S, Ott SJ. Intestinal TM7 Bacterial Phylogenies in Active Inflammatory Bowel Disease. *Journal of Medical Microbiology*. 2008;57:1569–1576.

Kutschera M, Engst W, Blaut M, Braune A. Isolation of Catechin-Converting Human Intestinal Bacteria. *Journal of Applied Microbiology*. 2011;111(1):165-175.

Leng J, Xie L, Zhu R, Yang S, Gou X, Li S, Mao H. Dominant Bacterial Communities in the Rumen of Gayals (*Bos frontalis*), Yaks (*Bos grunniens*) and Yunnan Yellow Cattle (*Bos taurus*) Revealed by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Molecular Biology Reports* (online). 2010;Dec.08.

Li M, Zhou M, Adamowicz E, Basarab JA, Guan LL. Characterization of Bovine Ruminal Epithelial Bacterial Communities Using 16S rRNA Sequencing, PCR-DGGE, and qRT-PCR Analysis. *Veterinary Microbiology*. 2011;Aug.10.

Luís AS, Alves VD, Romão MJ, Prates JAM, Fontesa CMGA, Najmudina S. Overproduction, Purification, Crystallization and Preliminary X-Ray Characterization of a Novel Carbohydrate-Binding Module of Endoglucanase Cel5A from *Eubacterium cellulosolvens*. *Structural Biology and Crystallization Communications*. 2011;67(4):491-493.

Luo C, Xie S, Sun W, Li X, Cupples AM. Identification of a Novel Toluene-Degrading Bacterium from the Candidate Phylum TM7, as Determined by DNA Stable Isotope Probing. *Applied and Environmental Microbiology*. 2009;Jul:4644–4647.

Maia MRG, Chaudhary LC, Figueres L, Wallace RJ. Metabolism of Polyunsaturated Fatty Acids and Their Toxicity to the Microflora of the Rumen. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2007;91:303–314.

McAllister TA, Bae HD, Jones GA, Cheng KJ. Microbial Attachment and Feed Digestion in the Rumen. *Journal of Animal Science*. 1994;72:3004-3018.

McCowan RP, Cheng KJ, Costerton JW. Adherent Bacterial Populations on the Bovine Rumen Wall: Distribution Patterns of Adherent Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 1980;Jan:233-241.

McSweeney CS, Mackie RI, Odenyo AA, Stahl DA. Development of an Oligonucleotide Probe Targeting 16S rRNA and Its Application for Detection and Quantitation of the Ruminant Bacterium *Synergistes jonesii* in a Mixed-Population Chemostat. *Applied and Environmental Microbiology*. 1993;May:1607-1612.

Molina-Alcaide E, Pascual MR, Cantalapiedra-Hijar G, Morales-Garcia EY, Martín-García AI. Effects of Concentrate Replacement by Feed Blocks on Ruminant Fermentation and Microbial Growth in Goats and Single-Flow Continuous-Culture Fermenters. *Journal of Animal Science*. 2009; 87(Dec):1321-1333.

Moncla BJ, Braham P, Rabe LK, Hillier SL. Rapid Presumptive Identification of Black-Pigmented Gram-Negative Anaerobic Bacteria by Using 4-Methylumbelliferone Derivatives. *Journal of Clinical Microbiology*. 1991;Sept:1955-1958.

Monteils V, Cauquil L, Combes S, Godon JJ, Gidenne T. Potential Core Species and Satellite Species in the Bacterial Community within the Rabbit Caecum. *FEMS Microbiology Ecology*. 2008;66(3):620-629.

Morotomi M, Nagai F, Watanabe Y. *Christensenella minuta* gen. nov., sp. nov., Isolated from Human Faeces That Forms a Distinct Branch in the Order Clostridiales, and Proposal of Christensenellaceae fam. nov. *IJSEM International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2011;10.1099/ijse.0.026989-0.

Nelson KE, Zinder SH, Hance I, Burr P, Odongo D, Wasawo D, Odenyo A, Bishop R. Phylogenetic Analysis of the Microbial Populations in the Wild Herbivore Gastrointestinal Tract: Insights into an Unexplored Niche. *Environmental Microbiology*. 2003;5(11):1212-1220.

Ozutsumi Y, Tajima K, Takenaka A, Itabashi H. The Effect of Protozoa on the Composition of Rumen Bacteria in Cattle Using 16S rRNA Gene Clone Libraries. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 2005;69(3):499-506.

Pagani I, Lapidus A, Nolan M, Lucas S, Hammon N, Deshpande S, Cheng JF, Chertkov O, Davenport K, Tapia R, Cliff Han, Goodwin L, Pitluck S, Liolios K, Mavromatis K, Ivanova N, Mikhailova N, Pati A, Chen A, Palaniappan K, Land M, Hauser L, Chang YJ, Jeffries CD, Detter JC, Brambilla E, Kannan KP, Ngatchou Djao OD, Rohde M, Pukall R, Spring S, Göker M, Sikorski J, Woyke T, Bristow J, Eisen JA, Markowitz V, Hugenholtz P, Kyrpides NC, Klenk HP. Complete Genome Sequence of *Desulfobulbus propionicus* type strain (1pr3T). *Standards in Genomic Sciences*. 2011;4:100-110.

Paillard D, McKai N, Chaudhary LC, Walker ND, Pizette F, Koppova I, McEwan NR, Kopečný J, Vercoe PE, Louis P, R. Wallace J. Relation Between Phylogenetic Position, Lipid Metabolism and Butyrate Production by Different *Butyrivibrio*-Like Bacteria from the Rumen. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2007;91:417-422.

- Pei CX, Liu Q, Dong CS, Li HQ, Jiang JB, Gao WJ. Diversity and Abundance of the Bacterial 16S rRNA Gene Sequences in Forestomach of Alpacas (*Lama pacos*) and Sheep (*Ovis aries*). *Anaerobe*. 2010;16:426-432.
- Pitta DW, William Pinchak E, Dowd SE, Osterstock J, Gontcharova V, Youn E, Dorton K, Yoon I, Min BR, Fulford JD, Wickersham TA, Malinowski DP. Rumen Bacterial Diversity Dynamics Associated With Changing From Bermudagrass Hay to Grazed Winter Wheat Diets. *Microbiology Ecology*. 2010;59:511–522.
- Reilly K, Carruthers VR, Attwood GT. Design and Use of 16S Ribosomal DNA-Directed Primers in Competitive PCRs to Enumerate Proteolytic Bacteria in Rumen. *Microbiology Ecology*. 2002;43:259-270.
- Reynolds CK, Kristensen NB. Nitrogen Recycling Through the Gut and the Nitrogen Economy of Ruminants: An Asynchronous Symbiosis. *Journal of Animal Science*. 2008;86(E.Suppl.):E293–E305.
- Røjen B, Poulsen BS, Theil P, Fenton RA, Kristensen N. Urea Transport in Rumen Epithelium of Lactating Cows. Short Communication: Effects of Dietary Nitrogen Concentration on mRNA Expression and Protein Abundance of UT-B and Aquaporins in Ruminal Papillae from Lactating Holstein Cows. *Journal of Dairy Science*. 2010;1 – 17.
- Rydzak T, Levin DB, Cicek N, Sparling R. End-Product Induced Metabolic Shifts in *Clostridium Thermocellum* ATCC 27405. *Applied Microbiology Biotechnology* (online): 2011;Aug.12.
- Sadet S, Martin C, Meunier B, Morgavi DP. PCR-DGGE Analysis Reveals a Distinct Diversity in the Bacterial Population Attached to the Rumen Epithelium. *Animal & Animal Consortium 2007*. 2007;1(7):939–944.
- Sadet-Bourgeteau S, Martin C, Morgavi DP. Bacterial Diversity Dynamics in Rumen Epithelium of Wethers Fed Forage and Mixed Concentrate Forage Diets. *Veterinary Microbiology*. 2010;146:98–104.
- Sass A, Rütters H, Cypionka H, Sass H. *Desulfobulbus mediterraneus* sp. nov., a Sulfate-Reducing Bacterium Growing on Mono- and Disaccharides. *Archive of Microbiology*. 2002;177:468–474.
- Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Marin Hartmann M, Hollister EB, Lesniewski RA, Oakley BB, Parks DH, Robinson CJ, Sahl JW, Stres B, Thallinger GG, van Horn DJ, Weber CF. Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology*. 2009;75:7537-7541.
- Schoefer L, Mohan R, Schwiertz A, Braune A, Blaut M. Anaerobic Degradation of Flavonoids by *Clostridium orbiscindens*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2003;Oct:5849–5854.
- Sun XZ, Joblin KN, Andrew IG, Hoskin SO, Harris PJ. Degradation of Forage Chicory by Ruminal Fibrolytic Bacteria. *Journal of Applied Microbiology*. 2008;105:1286-1297.
- Tajima K, Aminov RI, Nagamine T, Ogata K, Nakamura M, Matsui H, Benno Y. Rumen Bacterial Diversity as Determined by Sequence Analysis of 16S rDNA Libraries. *FEMS Microbiology Ecology*. 1999;29:159-169.
- Wallace RJ, Cheng KJ, Dinsdale D, Ørskov ER. An Independent Microbial Flora of the Epithelium and Its Role in the Ecomicrobiology of the Rumen. *Nature*. 1979;297:424-246.

- Wallace RJ, McKain N, McEwan NR, Miyagawa E, Chaudhary LC, King TP, Walker ND, Apajalahti JHA, Newbold CJ. *Eubacterium pyruvativorans* sp. nov., a Novel Non-Saccharolytic Anaerobe from the Rumen that Ferments Pyruvate and Amino-Acids, Forms Caproate and Utilizes Acetate and Propionate. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2003;53:965–970.
- Wallace RJ, Chaudhary LC, Miyagawa E, McKain N, Walker ND. Metabolic Properties of *Eubacterium pyruvativorans*, a Ruminal ‘Hyper-Ammonia Producing’ Anaerobe with Metabolic Properties Analogous to Those of *Clostridium kluyveri*. *Microbiology*. 2004;150:2921–2930.
- Webster G, Sass H, Cragg BA, Gorra R, Knab NJ, Green CJ, Mathes F, Fry JC, Andrew Weightman J, Parkes RJ. Enrichment and Cultivation of Prokaryotes Associated With the Sulphate-Methane Transition Zone of Diffusion-Controlled Sediments of Aarhus Bay, Denmark, Under Heterotrophic Conditions. *FEMS Microbiology Ecology*. 2011;77:248–263.
- Wen Z, Morrison M. Glutamate Dehydrogenase Activity Profiles for Type Strains of Ruminal *Prevotella* spp. *Applied and Environmental Microbiology*. 1997;Aug:3314–3317.
- Whitford MF, Teather RM, Forster RJ. Phylogenetic Analysis of Methanogens from the Bovine Rumen. *BMC BioMed Central Microbiology*. 2001;1:5.
- Wu CC, J. L. Johnson, Moore WEC, Moore LVH. Emended Descriptions of *Prevotella denticola*, *Prevotella loescheii*, *Prevotella veroralis*, and *Prevotella melaninogenica*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1992;Oct:536-541.
- Xie S, Sun W, Luo C, Cupples AM. Novel Aerobic Benzene Degrading Microorganisms Identified in Three Soils by Stable Isotope Probing. *Springer Science+Business Media B.V. Biodegradation* 2011;22:71–81 (10.1007/s10532-010-9377-5)
- Yang LY, Chen J, Cheng XL, Xi DM, Yang SL, Deng WD, Mao HM. Phylogenetic Analysis of 16S rRNA Gene Sequences Reveals Rumen Bacterial Diversity in Yaks (*Bos grunniens*). *Molecular Biology Reports*. 2010;37(1):553-562.
- Yang S, Ma SS, Chen J, Mao H, He Y, Xi D, Yang L, He T, Deng W. Bacterial Diversity in the Rumen of Gayals (*Bos frontalis*), Swamp Buffaloes (*Bubalus bubalis*) and Holstein Cow as Revealed by Cloned 16S rRNA Gene Sequences. *Molecular Biology Reports*. 2010;37(4):2063-2073.
- Yang WZ, Beauchemin KA, Rode LM. Effect of Dietary Factors on Distribution and Chemical Composition of Liquid- or Solid-Associated Bacterial Populations in the Rumen of Dairy Cows. *Journal of Animal Science*. 2001;79:2736–2746.
- Zhou M, Hernandez-Sanabria E, Guan LL. Assessment of the Microbial Ecology of Ruminal Methanogens in Cattle with Different Feed Efficiencies. *Applied and Environmental Microbiology*. 2009;Oct:6524–6533.
- Zhou M, Hernandez-Sanabria E, Guan LL. Characterization of Variation in Rumen Methanogenic Communities under Different Dietary and Host Feed Efficiency Conditions, as Determined by PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis. *Applied and Environmental Microbiology*. 2010;June:3776–3786.

8.2 Bücher

Lane DJ. Nucleic acid techniques in bacterial systematic. John Wiley & Sons, Inc. New York 1991.

Lengeler JW, Drews G, Schlegel HG (Hrsg.): Biology of the Prokaryotes. Thieme Stuttgart New York 1999.

Madigan MT, Martinko JM. Brock Mikrobiologie. Pearson Education München Boston 2006. 11. aktualisierte Auflage 2009. Aus dem Amerikanischen von Th. Lazar und F. Thomm-Reitz.

Dehority, BA. Rumen Microbiology. Nottingham University Press Nottingham 2003.

Liebich HG. Funktionelle Histologie der Haussäugetiere. Schattauer Verlag für Medizin und Naturwissenschaften Stuttgart 3. Auflage 1999.

Röling WFM, Head IM. Prokaryotic Systematics: PCR and Sequence Analysis of Amplified 16S rRNA Genes. In: Osborn AM, Smith CJ (Hg.). Molecular Microbial Ecology. Taylor and Francis Oxford 2005.

8.3 Websites

www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST

www.rdp.cme.msu.edu

www.bioinformatics-toolkit.org/Pintail

wwwDNAbaser.com/help/manual.html

www.aem.asm.org/cgi/content/full/75/23/7537

www.geospiza.com/finchtv

www.mun.ca/biology/scarr/Ruminant_Digestion.htm

<http://www.bioinformatics-toolkit.org/Help/Topics/chimera.html>

<http://www.sciencephoto.com/media/11329/enlarge>

Danksagung

Univ.-Prof. Dr. Martin Wagner
für die Möglichkeit, diese Arbeit an seinem Institut zu erstellen, sowie für seine Unterstützung und seine Ratschläge.

Univ.-Prof. Dr. Qendrim Zebeli
für die Bereitstellung von Probenmaterial des Tierernährungsexperiments der Universität Aarhus, seine Ideen und hilfreichen Vorschläge zur Erstellung dieser Masterarbeit.

Univ.-Prof. Dr. Angela Witte
für ihre Bereitschaft, meine Arbeit zu begutachten.

Dr. Stephan Schmitz-Esser
für die geduldige und gewissenhafte Betreuung sowie für die Zeit, die er mir dafür zur Verfügung gestellt hat, auch für die Erstellung der Stammbaum-Abbildungen sowie der OTUs und der Similarity-Matrix mittels Mothur.

Univ.-Ass. Dr. Dagmar Schoder
dafür, dass sie mir für die Arbeit die Infrastruktur zur Verfügung stellte und mir immer unterstützend zur Seite stand.

Frederik Schulz MSc
für seine nützlichen und hilfreichen Ratschläge.

Mag. Anneliese Müller
für ihre nützlichen und hilfreichen Ratschläge.

An meine KollegInnen des Instituts für Milchhygiene und Milchtechnologie.

Josef Magerl
für das Lektorat.

Tara Lak, meiner Frau,
für ihre Geduld und Unterstützung.

Meiner Mutter
für ihre Liebe und ihre großen Opfer, mit denen sie meinen Lebensweg ermöglicht hat.

Lebenslauf

Abdoulla Zangana BSc

Gerasdorfer Straße 55/82/8 – 1210 Wien – Österreich

Tel.: +43 6991 9428711 – eMail: abdoulla.zangana@vu-wien.ac.at

Persönliche Daten

Geburtsdatum: 01.06.1967
Geburtsort: Kirkuk (Irak)
Nationalität: Österreich
Familienstand: verheiratet

Ausbildungen

2009 /10 – 2011 /12	Masterstudium Molekulare Mikrobiologie: Master of Science (MSc)	Universität Wien Wien – Österreich
1996 /10 – 1999 /10	Ausbildung: Diplomierter medizinisch-technischer Analytiker	Akademie für Medizinisch-technischen Laboratoriumsdienst Wien – Österreich
1983 – 1988	Studium der Mikrobiologie: Bachelor of Science (BSc)	Salahaddin-Universität Erbil – Irak
1980 – 1983	Gymnasium	Kirkuk – Irak
1977 – 1980	Mittelschule	Kirkuk – Irak

Berufliche Erfahrungen

2000 /09 – laufend	Abteilung Mikobiologie: Laborleiter	Institut für Milchhygiene, Milchtechnologie und Lebensmittelwissenschaft Veterinärmedizinische Universität Wien – Österreich
--------------------	--	--

2000 /07 – 2000 /08	Medizinisch-technischer Analytiker	Labor für Medizinisch-Chemische Diagnostik Wien – Österreich
2000 /03 – 2000 / 06	Medizinisch-technischer Analytiker	Klinische Abteilung für Transfusionsmedizin Allgemeines Krankenhaus der Stadt Wien
1999 /07 – 1999 /12	Administrator	Euromarketing AG Wien – Österreich
1992 – 1995	Tätigkeiten in unterschiedlichen Branchen	Euromarketing, MA 44, Gastronomie Wien – Österreich
1995	Vorstudienlehrgang	Universität Wien Wien – Österreich
1995	Externistenprüfung (Nostrifikation Reifeprüfung)	Oberstufenrealgymnasium Wien – Österreich
1991 /11	Einreise nach Österreich	

Fortbildungen

2004 /06	Hygienekontrolle und mikrobiolog. Probenahme Lebensmittelbereich. Seminar Mikrobiologie	Merck Wien – Österreich
2008 /09	Lebensmittelmykologie. Laborkurs	VWR Wien – Österreich

Besondere Kenntnisse

Sprachkenntnisse	Kurdisch (Muttersprache), Deutsch (Bildungs- und Umgangssprache), Englisch, Arabisch, Türkisch
EDV-Kenntnisse	MS Windows (Word, PowerPoint, Excel)
Sonstiges	Führerschein B

Publikationen

Schoder D, Melzner D, Schmalwieser A, Zangana A, Winter P, Wagner M. Important Vectors for *Listeria monocytogenes* Transmission at Farm Dairies Manufacturing Fresh Sheep and Goat Cheese from Raw Milk. *Journal of Food Protection*. 2011 Vol.74, No.6, 2011, SS. 919-924.

Schoder D, Zangana A, Wagner M. (2010): Sheep and Goat Raw Milk Consumption: a Hygienic Matter of Concern? *Archiv für Lebensmittelhygiene*. 61, SS. 229–234.

Schoder D, Zangana A, Paulsen P, Winter P, Baumgartner W, Wagner M. (2008): Ovine *Listeria monocytogenes* Mastitis – the Impact of Farm Management, Milking and Cheese Manufacturing Practices as Risk Factor for Human Listeriosis. *Milchwissenschaft*.

Schoder D, Zangana A, Gutser K, Lema B. (2007): Antimicrobial Susceptibility Patterns of *Staphylococcus aureus* Isolated from Milk and Milk Products in Tanzania, East Africa. *Milchkonferenz*. Wien, Österreich. 17.09.-18.09.2007. S. 120.

Schoder D, Melzner D, Schmalwieser A, Zangana A, Winter P, Wagner M. (2006): Zur Ökologie von *Listeria monocytogenes* in Milchbetrieben mit Direktvermarktung. 30. Jahrestagung der Österreichischen Gesellschaft für Hygiene, Mikrobiologie und Präventivmedizin. Linz, Österreich. 30.05.-01.06.2006.

Schoder D, Melzner D, Zangana A, Schmalwieser A, Winter P, Wagner M. (2006): Wiederfindungsrate von *Listeria monocytogenes* in Milchschaaf- und Milchziegenbetrieben mit Direktvermarktung. 46. Arbeitstagung des Arbeitsgebiets Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft. Garmisch-Partenkirchen, Deutschland. 27.09.-30.09.2005. SS. 168-172.

Stessl B, Zangana A, Luf W, Wagner M, Schoder D. (2006): Validierung von festen chromogenen Nährmedien zum Nachweis von *L. monocytogenes*. 46. Arbeitstagung des Arbeitsgebiets Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft. Garmisch-Partenkirchen, Deutschland, 27.09.-30.09.2005. SS. 106-111.

Wagner M, Melzner D, Bago Z, Winter P, Egerbacher M, Schilcher F, Zangana A, Schoder D. (2005): Outbreak of Clinical Listeriosis in Sheep: Evaluation from Possible Contamination Routes from Feed to Raw Produce and Humans. *Journal of Veterinary Medicine. Series B* 52, SS. 278-283.

Schoder D, Zangana A, Gutser K, Maichin A, Lema B, Luf W. (2005): Identification and Typing of *Staphylococcus aureus* Isolated along the Milkchain in Tanzania, East Africa. COST Action 920 Meeting. Graz, Austria. 11.09.-13.09.2005.

Wagner M, Melzner D, Bado Z, Winter P, Egerbacher M, Schilcher F, Zangana A, Schoder D. (2005): A Contamination Chain from Feed and Raw Produce to Human Specimens during and after an Outbreak of Clinical Listeriosis in Sheep. *Journal of Veterinary Medicine Series*. 52 6, SS. 1-16.

Schoder D, Winter P, Zangana A, Baumgartner W, Seleim RS, Wagner M. (2004): Zur Bedeutung von oviner *Listeria monocytogenes*-Mastitis für die Lebensmittelsicherheit. 44. Arbeitstagung des Arbeitsgebiets Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft. Garmisch-Partenkirchen, Deutschland, 29.09-02.10.2003. SS. 255-260.

Schoder D, Zangana A, Wagner M, Luf W. (2004): Wiederfindungsrate von *Listeria monocytogenes* im Käse und Produktionsumfeld eines österreichischen Bergkäseproduzenten: Erfahrungswerte aus 14 Jahren Listerien-Monitoring. 29. Jahrestagung der Österreichischen Gesellschaft für Hygiene, Mikrobiologie und Präventivmedizin, Bad Ischl, Österreich. 24.05.-27.05.2004. S. 29.

Schoder D, Winter P, Kareem (Zangana) A, Baumgartner W, Seleim RS, Wagner M. (2003): *Listeria monocytogenes* in Schaffrischkäse aus Rohmilch. Der ubiquitäre Umweltkeim in einer bisher unterschätzten Rolle als subklinischer Mastitiserreger. Milchkonferenz der Deutsche Gesellschaft für Milchwissenschaft. Osnabrück, Deutschland. 18.08.-19.09.2003. S. H1.

Schoder D, Winter P, Kareem (Zangana) A, Baumgartner W, Wagner M. (2003): A Case of Sporadic Ovine Mastitis Caused by *Listeria monocytogenes* and Its Effect on Contamination of Raw Milk and Raw-Milk Cheeses Produced in the on-Farm Dairy. *Journal of Dairy Research*. 70, SS. 395-401.

Schoder D, Winter P, Kareem (Zangana) A, Baumgartner W, Wagner M. (2002): Sporadic Ovine Mastitis: Consequences on Processing of Contaminated Raw Milk at the Dairy Farm Level. 28. Jahrestagung der Österreichischen Gesellschaft für Hygiene, Mikrobiologie und Präventivmedizin. Meran, Italien. 07.05.-10.05.2002, P34.

Schoder D, Winter P, Kareem (Zangana) A, Baumgartner W, Wagner M. (2002): Excretion Study of *L. monocytogenes* in a Subclinical Case of Ovine Mastitis. 18th International ICFMH Symposium. Lillehammer, Norwegen. 18.08.-23.08.2002. S. 230.

Schoder D, Winter P, Kareem (Zangana) A, Baumgartner W, Wagner M. (2002): Sporadic Ovine Mastitis Caused by *Listeria monocytogenes*. Consequences on Processing of Contaminated Raw Milk at the Dairy Farm Level. XXII World Buiatric Congress. Hannover, Deutschland, 18.08.-23.08.2002. S. 149.