

**Reduziert der Zusatz von Fumarsäure
die ruminale Methanproduktion durch
Beeinflussung der Populationsstruktur
der mikrobiellen Gemeinschaft?**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

**Doktorin der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.**

genehmigte Dissertation
von

Dipl.-Biol. Susanne Becker
geboren am 28.05.1981 in Gehrden

2012

Referent: Prof. Dr. G. Breves
Korreferent: Prof. Dr. S. Steinlechner
Drittprüfer: Prof. Dr. H.-J. Jacobsen
Tag der Promotion: 13.3.2012

Dieses Projekt wurde mit Mitteln der H. Wilhelm Schaumann Stiftung gefördert.

Für Nico

ZUSAMMENFASSUNG

Reduziert der Zusatz von Fumarsäure die ruminale Methanproduktion durch Beeinflussung der Populationsstruktur der mikrobiellen Gemeinschaft?

Das Treibhausgas Methan (CH_4) trägt erheblich zum anthropogenen Treibhauseffekt und damit zum Klimawandel bei. CH_4 entsteht u.a. als Endprodukt bei der mikrobiellen Fermentation im Pansen und bedeutet für den Wiederkäuer einen Energieverlust von bis zu 12%. Vielfach wurde bisher der Zusatz von Fumarsäure (FS) zur Reduktion der ruminale Methanogenese untersucht und diskutiert. Die bakterielle Fermentation von FS im Pansen führt zu einer gesteigerten Propionat-Produktion. Genau wie für diese Reaktion wird auch für die Methanogenese der *Archaea* H_2 benötigt. Durch die Zugabe von FS kann H_2 in Richtung der Propionat-Bildung umgeleitet werden. Infolge dessen ist weniger H_2 für die Methanogenese verfügbar, und die CH_4 -Produktion sinkt. Zum ersten Mal wurde in dieser Studie die *rumen simulation technique* (RUSITEC) zur Untersuchung des Einflusses von FS *in vitro* auf die ruminale mikrobielle Fermentation, insbesondere die CH_4 -Produktion, und auf die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft (*Archaea* und *Bacteria*) mit Hilfe der SSCP-Analyse (*single strand conformation polymorphism analysis*) angewendet. Die Fermenter des RUSITEC-Systems wurden mit Panseninhalt vom Rind angeimpft. Als Substrat dienten 11 g einer Silage-Krafftuttermischung (2:1). Es wurden drei Versuche mit Grassilage und ein Versuch mit Maissilage als Grundfutter mit jeweils 12 Fermentern über einen Zeitraum von 14 Tagen durchgeführt. Die FS wurde den Fermentern über die RUSITEC-Pufferlösung in zwei Dosierungen zugeführt: $3,38 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ FS, $6,76 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ FS. Die Kontroll-Fermenter erhielten keine FS. Jeweils vier Fermenter wurden gleich behandelt ($n=4$).

Die Zugabe von $6,76 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ FS führte in allen Versuchen zu einer signifikant erhöhten Produktionsrate der gesamten SCFA ($p<0,01$). Diese Erhöhung wurde hauptsächlich von einer signifikant gesteigerten Propionat-Produktion ($p<0,01$) getragen. Zudem wurde eine erhöhte Acetat-Produktion beobachtet, die in zwei Versuchen mit Grassilage signifikant war ($p<0,05$). Dieses Ergebnis bestätigte die bakterielle Nutzung von FS und deren Fermentation zu Propionat und Acetat. Die gesamte Gasproduktion wurde nicht durch die Zugabe von FS beeinflusst. Sowohl

die festgestellte numerische Reduktion der absoluten CH₄-Produktion als auch die signifikante Reduktion des CH₄-Anteils ($p < 0,05$) am Fermentationsgas durch die Zugabe von 6,76 mmol·d⁻¹ FS geben einen Hinweis auf die Beeinflussung der Methanogenese durch FS. Eine Veränderung der Zusammensetzung der Gemeinschaft der *Archaea* und *Bacteria* mit der SSCP-Analyse infolge der Zugabe von FS konnte nicht nachgewiesen werden.

Die Aufrechterhaltung einer funktionierenden, stabilen mikrobiellen Population mit ihren fermentativen Eigenschaften im RUSITEC-System ist gelungen. Es konnte gezeigt werden, dass die drei identisch aufgebauten RUSITEC-Versuche mit Grassilage als Grundfutter reproduzierbar waren, da die analysierten Parameter in der gleichen physiologischen Weise auf die Zugabe von FS reagiert haben. Aus der gesteigerten Propionat-Produktion, der numerischen CH₄-Reduktion und der unbeeinflussten Populationsstruktur der *Archaea* lässt sich schlussfolgern, dass die Zugabe von FS in dieser Untersuchung nicht zu einer limitierten Verfügbarkeit von Reduktionsäquivalenten, wie H₂, geführt haben kann. Ein Grund könnte die Tatsache sein, dass während der erhöhten Acetat-Bildung aus FS H₂ freigesetzt wurde. Dies ist eine ungünstige Voraussetzung für die Reduktion der CH₄-Produktion, da das Ziel hierbei die Senkung der H₂-Konzentration und -Verfügbarkeit für die Methanogenese ist. Darüber hinaus ist es wahrscheinlich, dass die Konkurrenzfähigkeit um den H₂ aufgrund von Anpassungsmechanismen des Stoffwechsels der *Archaea* und *Bacteria* sichergestellt worden ist.

Die Ergebnisse vorangegangener Untersuchungen zur Reduktion der CH₄-Produktion durch die Zugabe von FS konnten in dieser Studie nicht bestätigt werden. Durch Übertragung der Ergebnisse auf In-vivo-Bedingungen kann insgesamt geschlussfolgert werden, dass der Einsatz von FS als Futterzusatz zur CH₄-Reduktion *in vivo* nicht geeignet scheint.

Schlagwörter: Methan, Fumarsäure, mikrobielle Gemeinschaft

ABSTRACT**Does fumaric acid reduce ruminal methane production by influencing the population structure of the microbial community?**

The greenhouse gas methane (CH₄) contributes substantially to global climate changes. It is produced as an end-product of microbial fermentation in the rumen and implies a loss of energy for the ruminant itself of about 12%. As a potential approach to decrease ruminal methanogenesis, the application of fumaric acid (FA) as a feed additive is discussed. FA acts as an alternative H₂ acceptor diverting H₂ from methanogenesis of *Archaea* towards propionate formation of *Bacteria*. In this study, for the first time the rumen simulation technique (RUSITEC) was applied to investigate potential effects of FA *in vitro* under controlled conditions on ruminal microbial metabolism, with special regard to CH₄ production, and on the composition of the microbial community (*Archaea* and *Bacteria*) by means of single strand conformation polymorphism analysis (SSCP). Therefore, fermentation vessels of the RUSITEC system were inoculated with rumen contents of cattle. A mixture of 11 g served as substrate (2:1 silage/concentrate). Three experimental trials were carried out with grass silage and one trial with maize silage with 12 fermenters each. Treatments were 3.38 mmol·d⁻¹ and 6.76 mmol·d⁻¹ FA dissolved in buffer solution. The controls did not receive FA. Four fermentation vessels were equally treated (n=4).

In all four trials the application of 6.76 mmol·d⁻¹ FA resulted in significantly higher production rates of total SCFA (p<0.01) mediated by significant increases in propionate production (p<0.01). As well, acetate production increased in all trials, being significant in two trials with grass silage (p<0.05). Thus, propionate and acetate as bacterial fermentation products of FA could be confirmed. Total gas production was not affected by addition of high dosage of FA. Although not being significant, the observed numerical reduction of absolute CH₄ production and the significant decrease in relative CH₄ proportion (p<0.05) of fermentation gas by high dosage of FA indicated an influence of FA on methanogenesis. Changes of population structure of *Archaea* and *Bacteria* community by means of SSCP analysis of 16S rDNA gene segments could not be verified in response to FA.

Firstly, RUSITEC experiments were able to simulate ruminal metabolism *in vitro* creating a stable microbial population. Secondly, the three identical experimental trials with grass silage responded in the same physiological manner on the addition of FA, thus demonstrating the reproducibility of the system. Thirdly, from the increase in propionate production, the numerical reduction in CH₄ production and the unaffected population structure of *Archaea*, it can be concluded that in this study the availability of reduction equivalents like H₂ were not limited as previously reported for the addition of FA. One reason might be the fact that during increased acetate production of FA H₂ was released. This is a quite disadvantageous pathway if the objective is to reduce H₂ and thereby CH₄ production. Moreover, special metabolic adaptation mechanisms of *Archaea* and *Bacteria* might have occurred to become competitive for H₂.

In summary, data from previous studies on significant absolute reduction of CH₄ production by addition of FA could not be confirmed in this study. Extrapolating the results of the present investigation on *in vivo* conditions do not support or justify the application of FA as CH₄ reducing feed additive.

Key words: methane, fumaric acid, microbial community

INHALTSVERZEICHNIS

Zusammenfassung.....	1
Abstract.....	3
Abkürzungsverzeichnis.....	9
Abbildungsverzeichnis.....	12
Tabellenverzeichnis.....	15
1 Einleitung.....	17
1.1 Das Treibhausgas Methan und der Klimawandel.....	17
1.2 Mikrobielle Fermentation in den Vormägen der Wiederkäuer.....	19
1.3 Die Senkung der ruminalen CH ₄ -Produktion durch Fumarsäure.....	21
1.4 Fragestellungen.....	25
1.5 Ziele der Arbeit.....	25
2 Material und Methoden.....	26
2.1 Die Rumen-Simulationstechnik (RUSITEC).....	26
2.2 Versuchsdesign der RUSITEC-Versuche.....	29
2.2.1 Vorbereitungen und Versuchsbeginn.....	30
2.2.2 Tägliche Bedienung der RUSITEC-Anlage.....	32
2.2.3 Analytische Methoden.....	35
2.3 Single-strand-conformation-polymorphism-(SSCP)-Analyse.....	42
2.3.1 Isolation der genomischen DNA (gDNA).....	43
2.3.2 Photometrische Quantifizierung der gDNA und der PCR-Produkte.....	44
2.3.3 Agarose-Gelelektrophorese.....	44
2.3.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	45
2.3.5 Aufreinigung von PCR-Produkten und photometrische Quantifizierung.....	47
2.3.6 Einzelstrangverdau.....	48
2.3.7 Aufreinigung der ssDNA.....	48

2.3.8	Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	48
2.3.9	Silbernitratfärbung.....	49
2.3.10	Analyse des Bandenmusters und statistische Auswertung.....	49
2.4	Identifikation einzelner Banden aus dem SSCP-Gel.....	51
2.4.1	Crush & Soak-Methode (SAMBROOK & RUSSEL 2001).....	51
2.4.2	Reamplifikations-PCR.....	51
2.4.3	Klonierung.....	52
2.4.4	Plasmid-Präparation.....	55
2.4.5	Anlegen von Glycerol-Stocks.....	55
2.4.6	Sequenzierung.....	55
3	Ergebnisse.....	57
3.1	Fumarsäure und Grassilage.....	57
3.1.1	RUSITEC-Versuche.....	57
3.1.2	Ergebnisse der SSCP-Analyse.....	88
3.2	Fumarsäure und Maissilage.....	96
3.2.1	RUSITEC-Versuch.....	96
3.2.2	Ergebnisse der SSCP-Analyse.....	114
3.3	H ₂ -Bilanz.....	121
4	Diskussion.....	123
4.1	Beurteilung der Rumen-Simulationstechnik als Untersuchungsmethode	123
4.1.1	pH-Werte.....	123
4.1.2	Redoxpotentiale.....	123
4.1.3	SCFA.....	124
4.1.4	Fermentationsgas.....	125
4.1.5	Ammoniak-Konzentration und mikrobielle Proteinsynthese.....	125
4.1.6	Verdaulichkeiten der Rohnährstoffe.....	126
4.1.7	<i>Protozoa</i>	127
4.1.8	Populationsstruktur der mikrobiellen Gemeinschaft.....	127

4.1.9	Abschließende Beurteilung.....	128
4.2	Reproduzierbarkeit der Versuche mit Fumarsäure und Grassilage.....	129
4.2.1	pH-Werte.....	129
4.2.2	Redoxpotentiale.....	129
4.2.3	SCFA.....	129
4.2.4	Acetat-Propionat-Verhältnis.....	131
4.2.5	Fermentationsgas.....	131
4.2.6	Ammoniak-Konzentration und mikrobielle Proteinsynthese.....	132
4.2.7	Verdaulichkeiten der Rohnährstoffe.....	134
4.2.8	<i>Protozoa</i>	134
4.2.9	Populationsstruktur der mikrobiellen Gemeinschaft.....	134
4.2.10	Abschließende Beurteilung.....	137
4.3	Einfluss von Fumarsäure.....	138
4.3.1	Einfluss von Fumarsäure auf den mikrobiellen Stoffwechsel.....	138
4.3.2	Einfluss von Fumarsäure auf die Populationsstruktur der mikrobiellen Gemeinschaft.....	147
4.3.3	Zusammenfassung des Wirkungsmechanismus von Fumarsäure....	149
4.4	Sicherstellung der Versorgung mit H ₂	151
4.4.1	Anpassungen der FS-reduzierenden <i>Bacteria</i> und Propionat- Produktion.....	151
4.4.2	Anpassungen der methanogenen <i>Archaea</i> und CH ₄ -Produktion.....	151
4.4.3	Freisetzung von H ₂ aus Acetat-Produktion.....	154
4.5	Einsatz von Fumarsäure in der Praxis?.....	156
4.6	Schlussfolgerungen.....	157
5	Literaturverzeichnis.....	159
6	Anhang.....	174
6.1	Lösungen und Puffer.....	174
6.2	Chemikalien.....	178

Inhaltsverzeichnis

6.3	Rohdaten der RUSITEC-Versuche.....	181
6.4	Sequenzen der Klone.....	205
7	Lebenslauf.....	210
8	Danksagung.....	212
9	Erklärung.....	213

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
A	Base Adenin
Abb.	Abbildung
ADF	<i>Acid detergent fibre</i> (Saure Detergenzienfaser)
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i> (Varianzanalyse)
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Aq. bidest.	<i>Aqua bidestillata</i> (Zweifach destilliertes Wasser)
Aq. dest.	<i>Aqua destillata</i> (Destilliertes Wasser)
bp	Basenpaare
C	Base Cytosin
C2	Acetat
C3	Propionat
C4	Butyrat
C5	Valerat
ca.	circa
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
d	Tag
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
DNase	Desoxyribonuklease
dsDNA	<i>Double-stranded DNA</i> (doppelsträngige DNA)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
FS	Fumarsäure
fw	<i>forward</i>
G	Base Guanin
<i>g</i>	Vielfaches der Erdbeschleunigung
gDNA	Genomische DNA
h	Stunden
iC4	Isobutyrat
iC5	Isovalerat
IPCC	<i>Intergovernmental Panel on Climate Change</i>
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid
Kb	Kilobasen
KF	Kraftfutter
LAM	<i>Liquid associated microorganisms</i>
M	molar
min	Minuten
Mio.	Millionen

Abkürzungsverzeichnis

Mrd.	Milliarden
n	Stichprobenumfang
n.s.	nicht signifikant
NDF	<i>Neutral detergent fibre</i> (Neutrale Detergenzienfaser)
N _{LAM}	Assimilierter Stickstoff der LAM
NPN	Nicht-Protein-Stickstoffhaltige-Verbindungen
N _{SAM}	Assimilierter Stickstoff der SAM
OS	Organische Substanz
OS _{SAM}	Organische Substanz der SAM
p.a.	<i>pro analysi</i>
PAA	Polyacrylamid
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
p _{MC}	Monte Carlo p-Wert
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>rotations per minute</i>
RT	Raumtemperatur
RUSITEC	<i>Rumen simulation technique</i> (Rumen-Simulations-technik)
<i>rv</i>	<i>reverse</i>
SAM	<i>Solid associated microorganisms</i>
SCFA	<i>Short chain fatty acids</i> (kurzkettige Fettsäuren)
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
sec	Sekunden
SEM	<i>standard error of the mean</i>
SSCP	<i>single strand conformation polymorphism</i>
ssDNA	<i>Single-stranded DNA</i> (Einzelsträngige DNA)
t	Tonne
T	Base Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TEN	Tris-EDTA-NaCl
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TS	Trockensubstanz
U	Unit
u.N.	Unter der Nachweisgrenze
ü.N.	Über Nacht
V	Volt

vs.	<i>versus</i>
V1	Versuch 1
V2	Versuch 2
V3	Versuch 3
V4	Versuch 4
X-Gal	5-Bromo-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid
XP	Rohprotein

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1.1: Universeller phylogenetischer Baum mit den drei Domänen.....	19
Abb. 1.2: Übersicht über mögliche Stoffwechselwege zur Bildung von SCFA	22
Abb. 1.3: Theorie zur Konkurrenz von <i>Archaea</i> und <i>Bacteria</i> um den vorhandenen H_2	23
Abb. 2.1: RUSITEC-Anlage mit sechs Fermentationsgefäßen.	28
Abb. 2.2: Überblick über das Versuchsdesign der RUSITEC-Versuche.....	30
Abb. 2.3: Schema zur Probenentnahme	34
Abb. 2.4: Formel zur Berechnung des von den LAM assimilierten Stickstoffs.....	38
Abb. 2.5: Formel zur Berechnung des von den SAM assimilierten Stickstoffs.	39
Abb. 2.6: Formel zur Berechnung der organischen Substanz (OS) der SAM.....	40
Abb. 2.7: Formel zur Berechnung der Anzahl der <i>Protozoa</i> pro Milliliter Fermenterflüssigkeit (<i>P</i>)..	40
Abb. 2.8: pGEM [®] -T Vector Karte und Referenzpunkte der Sequenz.....	53
Abb. 3.1: pH-Werte der Versuche (V1, V2, V3).....	58
Abb. 3.2: Redoxpotentiale der Versuche (V1, V2, V3).....	59
Abb. 3.3: Produktion der gesamten SCFA der Versuche (V1, V2, V3).....	60
Abb. 3.4: Acetat-Produktion der Versuche (V1, V2, V3)	61
Abb. 3.5: Propionat-Produktion der Versuche (V1, V2, V3).....	62
Abb. 3.6: Butyrat-Produktion der Versuche (V1, V2, V3).....	63
Abb. 3.7: Isovalerat-Produktion der Versuche (V1, V2, V3).....	64
Abb. 3.8: Valerat-Produktion der Versuche (V1, V2, V3)	65
Abb. 3.9: Molare Anteile der SCFA in der Pansenflüssigkeit.	66
Abb. 3.10: Molare Acetat-Anteile der Versuche (V1, V2, V3).	68
Abb. 3.11: Molare Propionat-Anteile der Versuche (V1, V2, V3)	69
Abb. 3.12: Molare Butyrat-Anteile der Versuche (V1, V2, V3)	70
Abb. 3.13: Molare Isovalerat-Anteile der Versuche (V1, V2, V3).....	71
Abb. 3.14: Molare Valerat-Anteile der Versuche (V1, V2, V3)	72
Abb. 3.15: Acetat-Propionat-Verhältnisse der Versuche (V1, V2, V3).....	73
Abb. 3.16: Produktion des gesamten Fermentationsgases der Versuche (V1, V2, V3)	74
Abb. 3.17: CH_4 -Produktion der Versuche (V1, V2, V3)	75
Abb. 3.18: CH_4 -Anteile am Fermentationsgas der Versuche (V1, V2, V3)	76
Abb. 3.19: CO_2 -Produktion der Versuche (V1, V2, V3).....	77
Abb. 3.20: CO_2 -Anteile am Fermentationsgas der Versuche (V1, V2, V3)	78
Abb. 3.21: Mittlere CH_4 - und CO_2 -Produktionen der Versuche (V1, V2, V3).....	79
Abb. 3.22: Ammoniak-Konzentrationen der Versuche (V1, V2, V3)	80
Abb. 3.23: Gesamte synthetisierte Proteinmengen in V1, V2 und V3	81
Abb. 3.24: Von den LAM gebildetes Protein in V1, V2 und V3.	82
Abb. 3.25: Von den SAM gebildetes Protein in V1, V2 und V3.....	82
Abb. 3.26: Effizienzen der mikrobiellen Proteinsynthese (EMP) in V1, V2 und V3.....	83

Abb. 3.27: Verdaulichkeiten der OS in V1, V2 und V3.....	84
Abb. 3.28: Verdaulichkeiten des XP in V1, V2 und V3	85
Abb. 3.29: Verdaulichkeiten der NDF in V1, V2 und V3	86
Abb. 3.30: Verdaulichkeiten der ADF in V1, V2 und V3.....	86
Abb. 3.31: Anzahlen der <i>Protozoa</i> in V1, V2 und V3	87
Abb. 3.32: Agarose-Gelbilder der <i>nested PCR</i> der <i>Bacteria</i> und <i>Archaea</i> in V1-V3	88
Abb. 3.33: <i>Bacteria</i> -Profile der LAM an Tag 1 und Tag 14 mit Dendrogrammen in V1-V3.	90
Abb. 3.34: <i>Bacteria</i> -Profil der SAM an Tag 14 mit Dendrogramm für V1-V3.....	91
Abb. 3.35: <i>Archaea</i> -Profile der LAM an Tag 1 und Tag 14 mit Dendrogrammen für V1-V3	94
Abb. 3.36: <i>Archaea</i> -Profil der SAM an Tag 14 und Dendrogramm für V1-V3	95
Abb. 3.37: pH-Werte in V4	96
Abb. 3.38: Redoxpotentiale in V4.....	97
Abb. 3.39: Gesamte SCFA-Produktion in V4	97
Abb. 3.40: Acetat-Produktion in V4	98
Abb. 3.41: Propionat-Produktion in V4.....	98
Abb. 3.42: Butyrat-Produktion in V4.....	99
Abb. 3.43: Isovalerat-Produktion in V4.....	99
Abb. 3.44: Valerat-Produktion in V4.....	100
Abb. 3.45: Molare Anteile der SCFA in der Pansenflüssigkeit in V4.....	101
Abb. 3.46: Molare Acetat-Anteile in V4	102
Abb. 3.47: Molare Propionat-Anteile in V4	103
Abb. 3.48: Molare Butyrat-Anteile in V4	103
Abb. 3.49: Molare Isovalerat-Anteile in V4.....	104
Abb. 3.50: Molare Valerat-Anteile in V4	104
Abb. 3.51: Acetat-Propionat-Verhältnisse in V4.....	105
Abb. 3.52: Produktion des gesamten Fermentationsgas in V4.....	106
Abb. 3.53: CH ₄ -Produktion in V4.....	107
Abb. 3.54: CH ₄ -Anteile am Fermentationsgas in V4	107
Abb. 3.55: CO ₂ -Produktion in V4.....	108
Abb. 3.56: CO ₂ -Anteile am Fermentationsgas in V4.....	108
Abb. 3.57: Mittlere CH ₄ - und CO ₂ -Produktion über die gesamte Versuchsphase in V4	109
Abb. 3.58: Ammoniak-Konzentrationen in V4	110
Abb. 3.59: Gesamtes gebildetes Protein in V4.. ..	110
Abb. 3.60: Gebildetes Protein durch die LAM bzw. SAM in V4	111
Abb. 3.61: Effizienzen der mikrobiellen Proteinsynthese (EMP) in V4	111
Abb. 3.62: Verdaulichkeiten der organischen Substanz (OS) bzw. des Rohproteins (XP) in V4..	112
Abb. 3.63: Verdaulichkeiten der neutralen (NDF) und sauren Detergenzienfasern (ADF) in V4. .	112
Abb. 3.64: Anzahlen der <i>Protozoa</i> in V4.....	113
Abb. 3.65: Agarose-Gelbilder der <i>nested PCR</i> der <i>Bacteria</i> und der <i>Archaea</i> in V4.....	114
Abb. 3.66: <i>Bacteria</i> -Profile der LAM an Tag 1 und Tag 14 mit Dendrogrammen in V4.....	116
Abb. 3.67: <i>Bacteria</i> -Profil der SAM an Tag 14 mit Dendrogramm in V4.....	117

Abbildungsverzeichnis

Abb. 3.68: <i>Archaea</i> -Profile der LAM an Tag 1 und Tag 14 mit Dendrogrammen in V4.....	119
Abb. 3.69: <i>Archaea</i> -Profil der SAM an Tag 14 mit Dendrogramm in V4.....	120
Abb. 3.70: H ₂ -Bilanz für die Zugabe von 6,76 mmol·d ⁻¹ FS für V1, V2, V3 und V4.....	121
Abb. 4.1: Umsetzung Stickstoffhaltiger Verbindungen im RUSITEC-System.....	133
Abb. 4.2: Vereinfachtes Schema zum ruminalen Fumarsäure-Metabolismus	140
Abb. 4.3: Reaktionsweg zur Reduktion von FS bzw. Fumarat.....	148

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 2.1: Übersicht über die anteilige Zusammensetzung der Kraftfuttermittel.....	29
Tab. 2.2: Ergebnisse der Weender Rohnährstoff-Analyse des Futters	29
Tab. 2.3: Zusammensetzung der Beutel-Einwaagen in den vier RUSITEC-Versuchen.....	32
Tab. 2.4: Bedingungen für die Gaschromatographie.	36
Tab. 2.5: Primer für 16S rRNA-Genabschnitte.....	45
Tab. 2.6: Reaktionsansatz für die PCR mit den gruppenspezifischen Primerpaaren.....	46
Tab. 2.7: Temperaturprofil der PCR mit den gruppenspezifischen Primerpaaren.....	46
Tab. 2.8: Reaktionsansatz für die <i>nested</i> PCR.....	47
Tab. 2.9: Temperaturprofil der <i>nested</i> PCR.....	47
Tab. 2.10: Reaktionsansatz für den Einzelstrangverdau.	48
Tab. 2.11: Zusammensetzung eines 0,625x PAA-Gels.	49
Tab. 2.12: Reaktionsansatz der Reamplifikations-PCR.....	52
Tab. 2.13: Reaktionsansatz für die Ligation.....	53
Tab. 3.1: Ergebnisse der two-way ANOVA für die pH-Werte von V1-V3.....	58
Tab. 3.2: Ergebnisse der two-way ANOVA für die Redoxpotentiale von V1-V3.....	59
Tab. 3.3: Ergebnisse der two-way ANOVA für die SCFA-Produktion in V1-V3.....	60
Tab. 3.4: Ergebnisse der two-way ANOVA für die Acetat-Produktion in V1-V3.	61
Tab. 3.5: Ergebnisse der two-way ANOVA für die Propionat-Produktion von V1-V3.....	62
Tab. 3.6: Ergebnisse der two-way ANOVA für die Butyrat-Produktion von V1-V3.....	63
Tab. 3.7: Ergebnisse der two-way ANOVA für die Isovalerat-Produktion von V1-V3.....	64
Tab. 3.8: Ergebnisse der two-way ANOVA für die Valerat-Produktion von V1-V3.	65
Tab. 3.9: Ergebnisse der two-way ANOVA für die molaren Acetat-Anteile von V1-V3	68
Tab. 3.10: Ergebnisse der two-way ANOVA für die molaren Propionat-Anteile von V1-V3	69
Tab. 3.11: Ergebnisse der two-way ANOVA für die molaren Butyrat-Anteile von V1-V3	70
Tab. 3.12: Ergebnisse der two-way ANOVA für die molaren Isovalerat-Anteile von V1-V3.....	71
Tab. 3.13: Ergebnisse der two-way ANOVA für die molaren Valerat-Anteile von V1-V3	72
Tab. 3.14: Ergebnisse der two-way ANOVA für die Acetat-Propionat-Verhältnisse von V1-V3.	73
Tab. 3.15: Ergebnisse der two-way ANOVA für die Produktion des Fermentationsgas von V1-V3.....	74
Tab. 3.16: Ergebnisse der two-way ANOVA für die CH ₄ -Produktion von V1-V3.....	75
Tab. 3.17: Ergebnisse der two-way ANOVA für die CH ₄ -Anteile von V1-V3.	76
Tab. 3.18: Ergebnisse der two-way ANOVA für die CO ₂ -Produktion von V1-V3.....	77
Tab. 3.19: Ergebnisse der two-way ANOVA für die CO ₂ -Anteile von V1-V3.....	78
Tab. 3.20: Ergebnisse der two-way ANOVA für die Ammoniak-Konzentrationen von V1-V3	80
Tab. 3.21: Ergebnisse der two-way ANOVA für die Anzahlen der <i>Protozoa</i> in V1-V3	87
Tab. 3.22: Sequenzierte Klone aus entsprechender Bande und Ergebnisse des Sequenzvergleichs mit der Datenbank des <i>Ribosomal Database Projects</i> (RDP).	92
Tab. 3.23: H ₂ -Bilanz im RUSITEC-System aller Versuche (V1, V2, V3, V4)	121

Tabellenverzeichnis

Tab. 6.1: Lösungen und Puffer.....	174
Tab. 6.2: Chemikalien.....	178
Tab. 6.3: pH-Werte in V1-V4.	181
Tab. 6.4: Redoxpotential [mV] in V1-V4.	182
Tab. 6.5: Überläufe [ml] in V1-V4.	183
Tab. 6.6: Produktion der gesamten SCFA [mmol·d ⁻¹] in V1-V4.	184
Tab. 6.7: Produktion des Acetats [mmol·d ⁻¹] in V1-V4.	185
Tab. 6.8: Produktion des Propionats [mmol·d ⁻¹] in V1-V4.	186
Tab. 6.9: Produktion des Butyrats [mmol·d ⁻¹] in V1-V4.	187
Tab. 6.10: Produktion des Isovalerats [mmol·d ⁻¹] in V1-V4.	188
Tab. 6.11: Produktion des Valerats [mmol·d ⁻¹] in V1-V4.	189
Tab. 6.12: Konzentration der SCFA [mmol·l ⁻¹] in der Pansenflüssigkeit in V1-4.....	189
Tab. 6.13: Molare SCFA-Anteile [%] in der Pansenflüssigkeit in V1-4	189
Tab. 6.14: Molare Anteile des Acetats [%] in V1-V4.	190
Tab. 6.15: Molare Anteile des Propionats [%] in V1-V4.	191
Tab. 6.16: Molare Anteile des Butyrats [%] in V1-V4.	192
Tab. 6.17: Molare Anteile des Isovalerats [%] in V1-V4.....	193
Tab. 6.18: Molare Anteile des Valerats [%] in V1-V4.	194
Tab. 6.19: Acetat-Propionat-Verhältnisse in V1-V4	195
Tab. 6.20: Ammoniak-Konzentrationen [mmol·l ⁻¹] in V1-V4.	196
Tab. 6.21: Gasproduktion [ml·d ⁻¹] in V1-V4	197
Tab. 6.22: CH ₄ -Produktion [ml·d ⁻¹] in V1-V4.....	198
Tab. 6.23: CO ₂ -Produktion [ml·d ⁻¹] in V1-V4.	199
Tab. 6.24: CH ₄ -Anteil [%] in V1-V4.....	200
Tab. 6.25: CO ₂ -Anteil [%] in V1-V4.	201
Tab. 6.26: Luftdruck [hPa] in V1-V4.	202
Tab. 6.27: Temperatur [°C] in V1-V4.....	203
Tab. 6.28: Mikrobielle Proteinsynthese [mg·d ⁻¹] in V1-4.....	203
Tab. 6.29: Effizienzen der mikrobiellen Proteinsynthese [g Protein·(kg abgebauter OS) ⁻¹] in V1-4.....	204
Tab. 6.30: Verdaulichkeiten [%] der organischen Substanz (OS), des Rohproteins (XP), der sauren (ADF) und neutralen Detergenzienfasern (NDF) in V1-4.	204
Tab. 6.31: <i>Protozoa</i> -Zahlen [10 ³ ·ml ⁻¹] in der Nativ-Probe und an Tag 1, 7,14 der V1-4.....	204

1 EINLEITUNG

1.1 Das Treibhausgas Methan und der Klimawandel

Seit Beginn der Industrialisierung Mitte des 18. Jahrhunderts sind die globalen, atmosphärischen Konzentrationen von Kohlendioxid (CO₂), Methan (CH₄) und Distickstoffoxid (N₂O) deutlich gegenüber den vorindustriellen Werten, welche über viele Jahrtausende relativ konstant waren, angestiegen (IPCC 2001; IPCC 2007; STEINFELD *et al.* 2006). So nahm die Konzentration von CO₂ um etwa 30%, die von CH₄ um ca. 150% und die von N₂O um etwa 17% zu (LATIF 2006). Als Gründe sind der starke Anstieg der Verbrennung fossiler Energieträger, die Ausweitung der industriellen Produktion, Änderungen bei der Landnutzung sowie die Ausweitung der Viehwirtschaft zu nennen (LATIF 2006).

Die besondere Eigenschaft der o.g. Gase in der Atmosphäre besteht darin, dass sie die von der Sonne einfallende, energiereiche kurzwellige Strahlung nahezu ungehindert passieren lassen, aber im Gegenzug die von der erwärmten Erde ausgehende langwellige Strahlung teilweise absorbieren und sie wiederum in Richtung Erde emittieren (IPCC 2001; IPCC 2007; LATIF 2006). Diese vermehrte Einstrahlung führt zu einer Erwärmung der Erdoberfläche und auch der unteren Atmosphäre (LATIF 2006). Vereinfacht dargestellt handelt es sich hierbei um den sogenannten Treibhauseffekt, der eine natürliche Eigenschaft der Erdatmosphäre ist. Die beteiligten Gase nennt man Treibhausgase (LATIF 2006). Ohne den Treibhauseffekt läge die durchschnittliche Oberflächentemperatur der Erde bei etwa -18°C im Gegensatz zu den tatsächlichen +15°C (LATIF 2006; RAHMSTORF & SCHELLNHUBER 2007).

Eine erhöhte Konzentration von Treibhausgasen in der Atmosphäre durch anthropogenen Einfluss führt durch Verstärkung des Treibhauseffektes zu einer zusätzlichen Erhöhung der Temperatur der Erdoberfläche und der unteren Atmosphäre (LATIF 2006). Dass die globale Erwärmung und damit der Wandel des Klimas nicht theoretisch ist, sondern sich derzeit vollzieht, äußert sich im 20. Jahrhundert nicht nur durch den Anstieg der Globaltemperatur der Erde um 0,6°C ± 0,2°C (IPCC 2001; LATIF 2006), sondern auch durch die Gletscherschmelze um

etwa 50% und den Anstieg des Meeresspiegels um 10-20 cm (IPCC 2001; LATIF 2006; STEINFELD *et al.* 2006). Der Klimawandel hat weitreichende Auswirkungen auf die Umwelt. Es wird angenommen, dass es durch die erhöhten Meerestemperaturen zunehmend zum Auftreten von Wetterextremen wie tropischen Wirbelstürme und Überschwemmungen oder anderenorts zu Trockenzeiten kommen wird (RAHMSTORF & SCHELLNHUBER 2007). Dies kann derzeit schon beobachtet werden. Veränderungen dieser klimatischen Bedingungen verschiedenster Ökosysteme können zum Aussterben bestimmter Tier- und Pflanzenarten führen (RAHMSTORF & SCHELLNHUBER 2007; STEINFELD *et al.* 2006) und damit die Biodiversität der Erde dramatisch beeinflussen (RAHMSTORF & SCHELLNHUBER 2007).

Obwohl dem Treibhausgas CO₂ als Ursache für die globale Erwärmung oft die größte Aufmerksamkeit geschenkt wird, dürfen weder N₂O noch CH₄ außer Acht gelassen werden. Denn das Treibhauspotential von N₂O und CH₄ beträgt 296 bzw. 23 (IPCC 2001). Das bedeutet, dass die Fähigkeit dieser Gase zur Verringerung der Leitfähigkeit der Atmosphäre für Wärmestrahlung über eine Zeitspanne von 100 Jahren gesehen 296 bzw. 23 mal so hoch ist wie die des CO₂. Die erhöhten N₂O- und CH₄-Konzentrationen in der Atmosphäre tragen daher erheblich zum anthropogenen Treibhauseffekt bei. Während N₂O bei Umsetzungen von tierischen stickstoffhaltigen Exkrementen entsteht (FLACHOWSKY & LEBZIEN 2007; IPCC 2001), wird CH₄ bei der mikrobiellen Fermentation im tierischen Verdauungstrakt gebildet, vor allem im Vormagensystem der Wiederkäuer (BEIJER 1952; HUNGATE 1966).

Schätzungen des Zwischenstaatlichen Ausschuss für Klimaänderungen (IPCC) zufolge sind mehr als die Hälfte der CH₄-Emissionen anthropogenen Ursprungs (IPCC 2001). Dies entspricht ca. 320 Mio. t pro Jahr (VAN AARDENNE *et al.* 2001). Die wichtigste Quelle anthropogener CH₄-Emissionen stellen Nutztiere dar (STEINFELD *et al.* 2006). Aus der Wiederkäuerhaltung stammen etwa 11-17% der globalen CH₄-Emissionen (BEAUCHEMIN *et al.* 2009), was absolut eine jährlich produzierte Menge von etwa 80 Mio. t bedeutet (JOUANY 1994; MOSS *et al.* 2000; STEINFELD *et al.* 2006).

Durch den weiteren Anstieg der Erdbevölkerung auf ca. 9 Mrd. bis zum Jahre 2050 wird es zu einem erhöhten Bedarf an Fleisch- und Milchprodukten kommen

(STEINFELD *et al.* 2006). Um die Erzeugung von Lebensmitteln tierischer Herkunft auch ökologisch vertretbar zu machen, ist es von großer Relevanz, Maßnahmen zur Reduktion der CH₄-Emissionen der Wiederkäuer zu ergreifen.

1.2 Mikrobielle Fermentation in den Vormägen der Wiederkäuer

Zum Vormagensystem der Wiederkäuer zählen der Netzmagen, der Pansen und der Blättermagen. Der Pansen ist im adulten Tier der Größte der drei Vormägen (HOFMAN 1988). Die Vormägen beherbergen eine Gemeinschaft von Mikroorganismen, die sich aus Vertretern der Domänen *Archaea* (früher als Archaeobakterien bezeichnet), *Bacteria* und *Eukarya* zusammensetzt und sich durch eine hohe Diversität und Dichte der mikrobiellen Population auszeichnet (Abb. 1.1) (CZERKAWSKI 1986; STEWART & BRYANT 1988). Die ruminalen *Bacteria* umfassen zahlreiche obligat und fakultativ anaerobe Spezies (BRYANT 1959; HUNGATE *et al.* 1964). Die *Archaea* sind mit methanogenen Spezies der Ordnungen Methanobacteriales, Methanococcales, Methanomicrobiales, Methanosarcinales (SHARP *et al.* 1998; SKILLMAN *et al.* 2004; SOLIVA *et al.* 2004; WRIGHT *et al.* 2006), und die *Eukarya* mit *Fungi* und *Protozoa* (Flagellaten, Ciliaten) vertreten (HUNGATE *et al.* 1964; LUND 1974; WILLIAMS 1986).

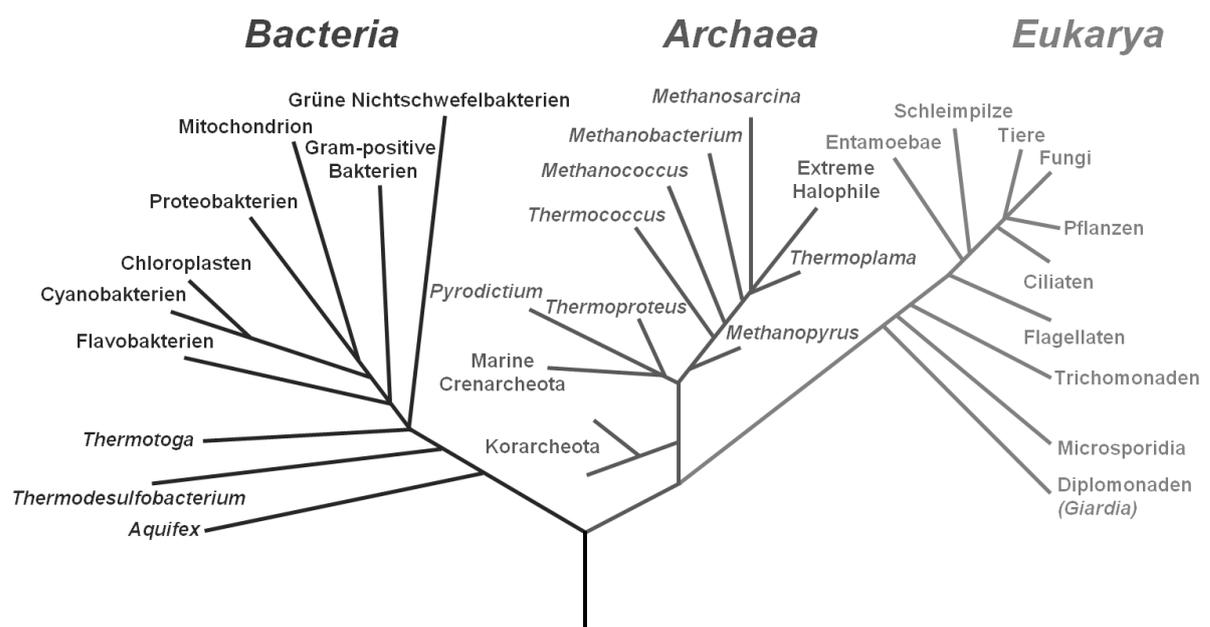


Abb. 1.1: Universeller phylogenetischer Baum mit den drei Domänen *Bacteria*, *Archaea* und *Eukarya* basierend auf dem Vergleich von 16S oder 18S rRNA-Genen (modifiziert nach MADIGAN *et al.* 2000).

Die Vormägen übernehmen die Funktion einer Fermentationskammer. Der Wiederkäuer ermöglicht durch eine Konstanthaltung der optimalen Milieubedingungen für die mikrobiellen Enzyme (u.a. pH-Wert, Redoxpotential, Temperatur) den Abbau der überwiegend strukturreichen pflanzlichen Nahrung. Die dabei entstehende Energie dient der Erhaltung und dem Wachstum der mikrobiellen Population einerseits. Andererseits stehen dem Wiederkäuer als Energiequelle die Endprodukte der mikrobiellen Stoffwechselprozesse zur Verfügung. Die Beziehung zwischen Wirtstier und Mikroorganismen stellt daher eine Symbiose dar (BREVES & LEONHARD-MAREK 2010; YOKOYAMA & JOHNSON 1988). Beim mikrobiellen Abbau von Futterproteinen und Nicht-Protein-Stickstoffhaltigen Verbindungen (NPN-Verbindungen, z.B. Urea) entsteht Ammoniak (BELASCO 1954; McDONALD 1948). Ammoniak wird für die Neusynthese von hochwertigem mikrobiellem Protein verwendet (BELASCO 1954; BREVES & LEONHARD-MAREK 2010), welches die eigentliche Proteinquelle für den Wiederkäuer darstellt (HUNGATE 1966). Im mikrobiellen Kohlenhydratstoffwechsel werden kurzkettige Fettsäuren (SCFA) gebildet (CZERKAWSKI 1986; HUNGATE 1966). Die Kohlenhydrate werden zunächst im Embden-Meyerhof-Weg und im Pentose-Phosphat-Weg zu Pyruvat abgebaut. Pyruvat ist das zentrale Intermediärprodukt des mikrobiellen Kohlenhydratstoffwechsels. Ausgehend vom Pyruvat können dann die SCFA Acetat, Propionat und Butyrat auf verschiedenen Stoffwechselwegen gebildet werden (Abb. 1.2) (BREVES & LEONHARD-MAREK 2010; HUNGATE 1966). Im Pansen werden außerdem die SCFA Valerat und Isovalerat in geringen Mengen produziert. Während Valerat sowohl beim Kohlenhydrat- als auch beim Proteinabbau entsteht (EL-SHAZLY 1952; NAGARAJA *et al.* 1997; SUTTON 1969), ist für Isovalerat als Produkt nur der Abbau aus Proteinen bekannt (EL-SHAZLY 1952).

Als weitere Endprodukte der mikrobiellen Fermentation akkumulieren CO₂ und CH₄ zunächst im dorsalen Pansensack (CZERKAWSKI 1986) und werden durch die Motorik des Pansens und schließlich über den Ruktus abgegeben (CZERKAWSKI 1986; KASKE 2010; RUCKEBUSCH 1988). Analysen des während der Fermentation gebildeten Gases ergaben einen CH₄-Anteil von etwa 27% und einen CO₂-Anteil von etwa 65% (MCARTHUR & MILTIMORE 1961). Für den Wiederkäuer bedeutet dabei die CH₄-Abgabe einen Energieverlust von bis zu 12% (BEIJER 1952; JOHNSON & JOHNSON 1995; JOUANY 1994).

1.3 Die Senkung der ruminalen CH₄-Produktion durch Fumarsäure

In vorangegangenen Untersuchungen konnten bereits erste Erkenntnisse über Ernährungsstrategien zur Reduzierung der CH₄-Produktion beim Wiederkäuer gewonnen werden (BROUDISCOU *et al.* 2000; CARULLA *et al.* 2005; GRAINGER *et al.* 2008; HESS *et al.* 2003; HINDRICHSEN *et al.* 2005; MCGINN *et al.* 2004). Zum einen hat sich herausgestellt, dass die Fütterung von Maissilage anstatt Grassilage zur Absenkung der CH₄-Emissionen *in vivo* führen kann (BEAUCHEMIN *et al.* 2008; HINDRICHSEN *et al.* 2006). Zum anderen konnten In-vitro-Untersuchungen zeigen, dass Fumarsäure (FS) oder Fumarat, deren Natriumsalz, als Futterzusatz die Produktion von CH₄ reduzieren (ASANUMA *et al.* 1999; CARRO & RANILLA 2003; LÓPEZ *et al.* 1999; NEWBOLD *et al.* 2005). NEWBOLD *et al.* (2005) konnten in einer Vergleichsstudie *in vitro* zeigen, dass durch Zugabe von FS die CH₄-Produktion effektiver reduziert wird als durch Fumarat. Da die Domäne der *Archaea* für die CH₄-Bildung (Methanogenese) im Pansen verantwortlich ist, müsste ein Zusammenhang zwischen der FS und den *Archaea* bestehen.

Bei FS handelt es sich um eine organische ungesättigte Dicarbonsäure. Aufgrund eines pK_{s1}- und pK_{s2}-Werts von 3,0 und 4,5 ist sie als starke Säure zu bezeichnen (LATSCHA & KLEIN 1997). Das bei der vollständigen Dissoziation entstehende Anion nennt man Fumarat. FS liegt bei einem pH-Wert von 4,5 daher zu 50% als FS und zu 50% als Fumarat vor. Steigt der pH-Wert, ist das Säuren-Basen-Gleichgewicht nach der Henderson-Hasselbalch-Gleichung in Richtung des Fumarats verlagert.

FS bzw. die dissoziierte Form Fumarat stellen im Kohlenhydratstoffwechsel einiger ruminaler *Bacteria* ein Zwischenprodukt im Methylmalonyl-CoA-Weg dar (Abb. 1.2). FS bzw. Fumarat wird dabei unter Aufnahme von Wasserstoff (H₂) zu Succinat und über weitere Reaktionsschritte zu Propionat reduziert (CASTILLO *et al.* 2004; GOTTSCHALK 1986). Katalysiert wird die Reduktion von dem Enzym Fumarat-Reduktase (ASANUMA & HINO 2000). Durch die Expression dieses Enzyms sind einige ruminalen *Bacteria* ebenfalls in der Lage, FS/Fumarat direkt als Substrat für die Energiegewinnung zu nutzen (ASANUMA & HINO 2000; ASANUMA *et al.* 1999).

Einleitung

Die methanogenen *Archaea* gewinnen als autotrophe Mikroorganismen Energie durch die Methanogenese (MADIGAN *et al.* 2000):



Hauptsächlich werden dafür H_2 und CO_2 als Substrate genutzt (MILLER 1995; Moss *et al.* 2000). Es handelt sich also sowohl bei der Methanogenese als auch bei der Reduktion von FS und Fumarat um Reaktionen, für die H_2 benötigt wird.

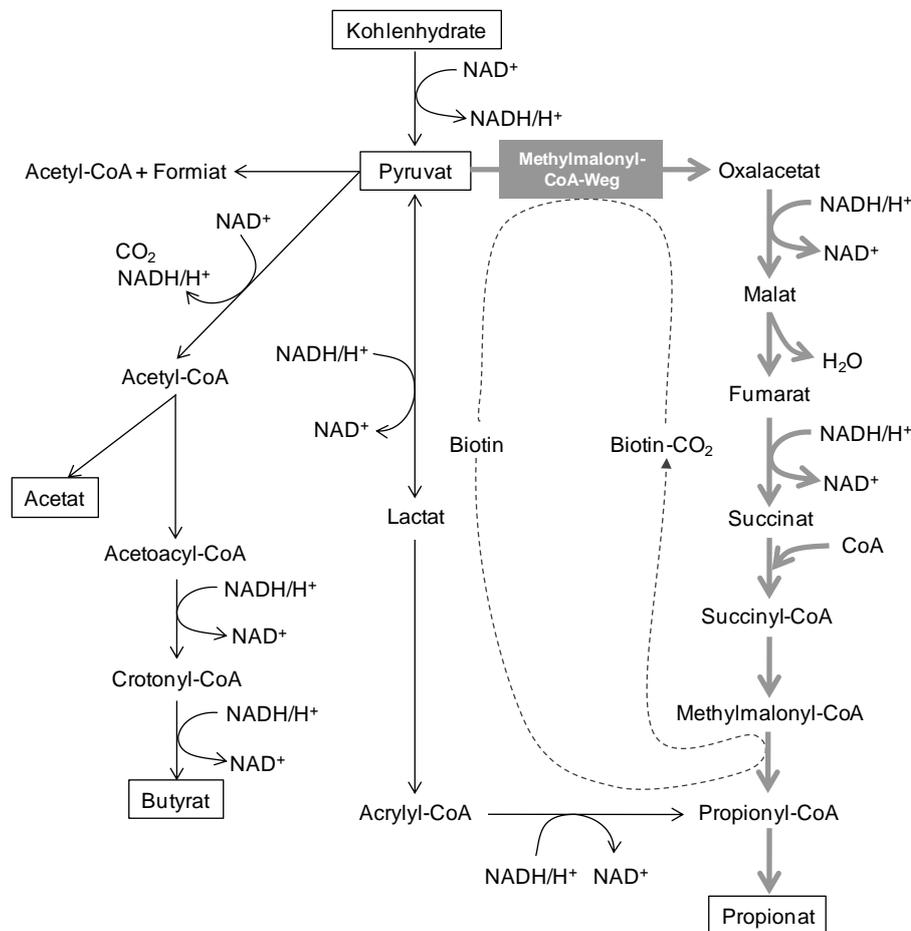


Abb. 1.2: Übersicht über mögliche Stoffwechselwege zur Bildung von SCFA durch ruminale *Bacteria* mit detailliert beschriebenem Methylmalonyl-CoA-Weg (modifiziert nach BREVES & LEONHARD-MAREK 2010; MOSS *et al.* 2000).

Die Ergebnisse zur ruminalen CH_4 -Reduktion aus In-vivo- und In-vitro-Untersuchungen deuten alle daraufhin, dass die Verbindung zwischen der Zugabe von FS/Fumarat und der Reduktion der CH_4 -Produktion der H_2 als Reduktionsäquivalent sein muss (ASANUMA *et al.* 1999; BAYARU *et al.* 2001; GIRALDO *et al.* 2007; LÓPEZ *et al.* 1999; NEWBOLD *et al.* 2005). Publiziert wurde dazu die folgende

Erklärung (ASANUMA *et al.* 1999; BAYARU *et al.* 2001; GIRALDO *et al.* 2007; LÓPEZ *et al.* 1999; NEWBOLD *et al.* 2005). Bei Zugabe von FS/Fumarat entsprechend der Reaktionen im Methylmalonyl-CoA-Weg scheint mehr H_2 für die Reduktion zu Succinat durch die *Bacteria* benötigt worden zu sein. Infolge dessen müsste den *Archaea* weniger H_2 für die Methanogenese zur Verfügung gestanden haben, was letztlich eine Reduktion der CH_4 -Produktion bewirkt hat (Abb. 1.3). Zudem kam es in Folge der Reduktion von FS/Fumarat zu einer gesteigerten Bildung von Propionat, was für die bakterielle Nutzung von FS/Fumarat als Substrat spricht (ASANUMA *et al.* 1999; BAYARU *et al.* 2001; GIRALDO *et al.* 2007; LÓPEZ *et al.* 1999; NEWBOLD *et al.* 2005). Propionat könnte nun wiederum dem Wiederkäuer der Energiegewinnung für die Gluconeogenese zur Verfügung stehen.

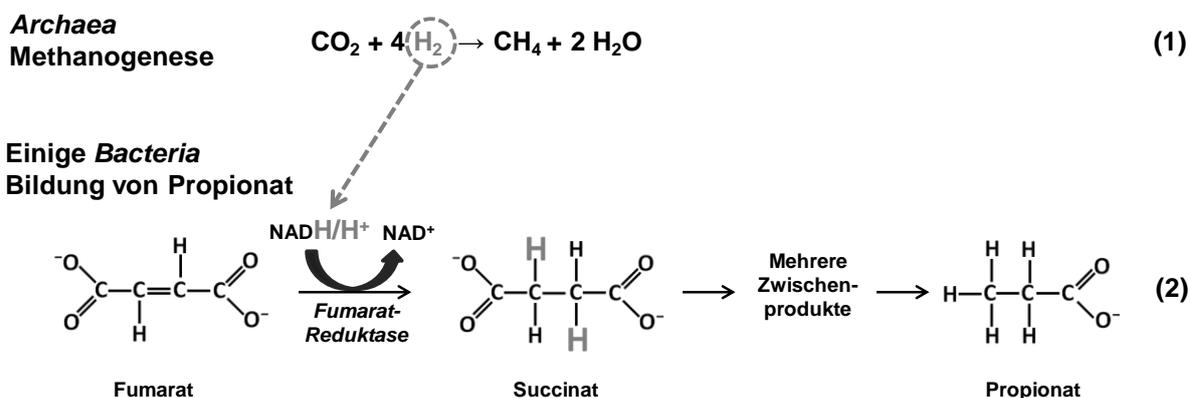


Abb. 1.3: Theorie zur Konkurrenz von *Archaea* und *Bacteria* um den vorhandenen H_2 .

FS bzw. Fumarat würde damit einen alternativen, kompetitiven Weg zur Methanogenese (Moss *et al.* 2000) für die Aufrechterhaltung eines niedrigen H_2 -Partialdruckes im Pansen darstellen, welcher für das Ablaufen der mikrobiellen Fermentation essentiell ist.

Zu den bisher untersuchten Parametern in vorangegangenen Studien zum Einfluss von FS/Fumarat auf die CH_4 -Produktion gehörten neben dem mikrobiellen Stoffwechsel (SCFA- und Ammoniak-Konzentration, etc.) auch die Bestimmung der Mikrobendichte mittels Zählkammern (LÓPEZ *et al.* 1999; NEWBOLD *et al.* 2005). Während LÓPEZ *et al.* (1999) zumindest zeigen konnten, dass die Quantität der *Archaea* durch FS nicht beeinflusst wurde, ist dennoch ein Einfluss auf die Qualität der *Archaea* nicht auszuschließen. Bisher ist unklar, welche Bedeutung die

Umleitung des H_2 von der Methanogenese in Richtung der Reduktion von FS/Fumarat für die Diversität der *Archaea*-Population hat.

An Reinkulturen von *Methanobacterium thermoautotrophicum* durchgeführte Untersuchungen belegten, dass zumindest bei dieser *Archaea*-Spezies durch ein reduziertes Angebot von H_2 nicht nur die Methanogenese- sondern auch die Wachstumsrate abgenommen hat (MORGAN *et al.* 1997; SCHÖNHEIT *et al.* 1980). Da die Methanogenese der Energiegewinnung dient und die Triebkraft dieser Reaktion im Allgemeinen H_2 ist (MADIGAN *et al.* 2000), sollte demzufolge bei geringer Verfügbarkeit weniger Energie für das Wachstum der *Archaea* bereitgestellt werden. In Bodenproben und angereicherten *Archaea*-Kulturen konnte außerdem gezeigt werden, dass nicht nur die Struktur der gesamten mikrobiellen Gemeinschaft von der Substratverfügbarkeit abhängt, sondern insbesondere die Zusammensetzung der methanogenen Gemeinschaft der *Archaea* von der H_2 -Konzentration bestimmt wurde (HANSEL *et al.* 2008; LEIBO *et al.* 2006). Die Diversität der Gemeinschaft stieg mit sinkender H_2 -Konzentration (LEIBO *et al.* 2006).

In Anbetracht dieser Ergebnisse ist es wahrscheinlich, dass auch in der vorliegenden Untersuchung eine Anpassung der mikrobiellen Gemeinschaft, insbesondere der methanogenen *Archaea*, als Antwort auf die Zugabe von FS erfolgt. Einerseits könnte als Anpassung des mikrobiellen Stoffwechsels an die veränderten Milieubedingungen die Reduktion der CH_4 -Produktion eintreten, ohne dass die strukturelle Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft beeinflusst wird. Andererseits könnte FS sich verändernd auf die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft auswirken. Einige Bakterienarten könnten von FS als Substrat profitieren, wohingegen z.B. die *Archaea* aufgrund weniger verfügbaren H_2 , weniger Energie durch die Methanogenese gewinnen und deswegen in der Wachstumsrate benachteiligt sein könnten. Demzufolge müsste eine Populationsverschiebung auftreten. Diesbezüglich wurden bisher noch keine molekularbiologischen qualitativen Untersuchungsmethoden angestellt, können jedoch zur Aufklärung beitragen.

1.4 Fragestellungen

Die Fragestellungen dieser Dissertation lauten daher:

1. Reduziert die Zugabe von Fumarsäure (FS) die ruminale CH₄-Produktion?
2. Bewirkt die Zugabe von Fumarsäure (FS) Veränderungen in der Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft?

1.5 Ziele der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zunächst, den Einfluss von zwei Dosierungen von FS in Kombination mit Gras- bzw. Maissilage als Grundfutter auf den mikrobiellen Stoffwechsel im Pansen des Wiederkäuers mit Hilfe der Rumen-Simulationstechnik (*rumen simulation technique*; RUSITEC) *in vitro* zu untersuchen. Der entscheidende Vorteil dieser Simulationstechnik liegt gegenüber In-vivo-Ansätzen darin, dass durch die isolierte Betrachtungsweise ohne Einwirkung des Wirtstieres das gemessene biochemische Profil direktere Rückschlüsse auf den mikrobiellen Stoffwechsel zulässt. Als biochemische Parameter für den mikrobiellen Stoffwechsel sollten die Produktionsraten der SCFA Acetat, Propionat, Butyrat, Isovalerat und Valerat, sowie die Konzentrationen von Ammoniak und insbesondere die Produktion von CH₄ analysiert werden. Als weitere Untersuchungsparameter sollten die mikrobielle Proteinsynthese, die Verdaulichkeit und die Quantität der *Protozoa* dienen, welche mit den methanogenen *Archaea* assoziiert sein können (VOGELS *et al.* 1980; VOGELS & STUMM 1980).

Im zweiten Schritt sollte die Struktur der mikrobiellen Gemeinschaft der *Archaea* und der *Bacteria* unter Einfluss von FS erstmals mit der Single-strand-conformation-polymorphism-(SSCP)-Analyse auf molekularbiologischer Ebene untersucht werden, um Veränderungen mikrobieller Populationen sichtbar zu machen.

2 MATERIAL UND METHODEN

Die Zusammensetzung aller verwendeter Lösungen und Puffer, sowie die Bezugsquellen der Chemikalien sind im Anhang (Kapitel 6) aufgeführt.

2.1 Die Rumen-Simulationstechnik (RUSITEC)

Die Rumen-Simulationstechnik wurde von Czerkowski und Breckenridge entwickelt und 1977 erstmals beschrieben. Es handelt sich dabei um eine semi-kontinuierliche Inkubationsmethode zur langzeitigen In-vitro-Untersuchung des mikrobiellen Stoffwechsels im Pansen von Wiederkäuern (z.B. unter Einfluss von unterschiedlichem Futter bzw. Substrat).

Der Aufbau des RUSITEC-Systems wurde so entwickelt, dass eine bestmögliche Simulation der *in vivo* existierenden ruminalen Kompartimente gewährleistet ist, welche aufgrund der Dichte der vorkommenden Mikroorganismen unterschieden werden (CZERKAWSKI 1986; CZERKAWSKI 1988). Die Abb. 2.1 zeigt eine RUSITEC-Anlage mit sechs identischen Fermentationsgefäßen (kurz: Fermenter; **A**; V=750 ml; Plexiglas[®], Röhm GmbH, D-64293 Darmstadt). *In vivo* stellt die Pansenflüssigkeit mit den flüssigkeitsassoziierten Mikroorganismen (*liquid associated microorganisms*, LAM) das erste Kompartiment dar. Im RUSITEC-System war dieses Kompartiment durch die Flüssigkeit repräsentiert, welche sich in den Fermentern befunden hat. Neben den LAM liegen auch Mikroorganismen vor, die an die Futterpartikel gebunden sind (*solid associated microorganisms*, SAM). Das zweite Kompartiment umfasst nun diejenigen SAM, die eine lockere Bindung mit den Futterpartikeln eingehen. Aus diesem Grund können sie leicht daraus ausgewaschen werden. Im dritten Kompartiment liegen die SAM fest assoziiert mit den Futterpartikeln vor. Die Simulation dieser zwei weiteren Kompartimente wurde durch den Einbau eines kleineren Innengefäß realisiert (**B**), in dem sich zwei mit dem Untersuchungssubstrat (feste Phase) gefüllte Nylonbeutel (16 cm x 7 cm; 150 µm Porenweite, Linker KG, D-34127 Kassel) befunden haben. Während das zweite Kompartiment dabei in unmittelbarer Nähe um die Nylonbeutel im Innengefäß lokalisiert war, wurde das dritte Kompartiment durch das Substrat in den Nylonbeuteln repräsentiert. Das Innengefäß war an Boden und Deckel perforiert. Die dadurch erreichte Umspülung der Nylonbeutel

mit der Fermenterflüssigkeit gewährleistete das Auswaschen der Fermentationsprodukte und den Austausch der mikrobiellen Populationen zwischen den Kompartimenten. Verbessert wurde die Durchmischung durch eine gleichmäßige Auf- und Abwärtsbewegung (sechs Hübe pro min) des Innengefäßes in dem Fermenter mit Hilfe eines Elektromotors (**L**). Das Pansenepithel, das vierte ruminale Kompartiment, zeichnet sich aufgrund der guten Versorgung mit sauerstoffreichem Blut durch die Assoziation mit fakultativ anaeroben Mikroorganismen aus, die etwa 1% der gesamten mikrobiellen Population ausmachen (CZERKAWSKI 1986). Dieses Kompartiment kann im RUSITEC-System wegen der aus Plexiglas gefertigten Fermenter nicht simuliert werden.

Neben der Kompartimentierung gibt es weitere wichtige Faktoren für die erfolgreiche Durchführung einer Simulation des Pansenstoffwechsels. Dazu gehören eine mit In-vivo-Bedingungen vergleichbare selektive Retention der Futterpartikel, eine konstante Temperierung der Fermenter bei einer Temperatur von 39°C, eine Stabilisierung des pH-Wertes im physiologischen Bereich zwischen 5,5-7,0 und der Abtransport der Fermentationsprodukte (CZERKAWSKI 1986). Die selektive Retention der Futterpartikel, die *in vivo* bei 18-72 h liegt (KASKE 2010), wurde in dieser Studie durch eine Verweilzeit der Nylonbeutel im Fermenter auf 48 h festgelegt (CZERKAWSKI & BRECKENRIDGE 1977). Die Fermenter wurden in einem Wasserbad (**J**) unter Verwendung eines Thermostats (**K**; Thermomixer[®] B, Braun Melsungen AG, D-34209 Melsungen) konstant bei 39°C temperiert. Pro Tag wurden zur Stabilisierung des pH-Wertes kontinuierlich 750 ml einer dem Wiederkäuer-Speichel nachempfundenen Pufferlösung über einen Tygonschlauch (**E**; 4,0 mm x 7,2 mm, Omnilab GmbH & Co. KG, D-30989 Gehrden) zugeführt. Das bedeutete einen Flüssigkeitsturnover von einmal pro Tag (GARCIA-GONZALEZ *et al.* 2010; KOCH *et al.* 2006; OEZTUERK *et al.* 2005). Die Pufferlösung wurde aus einem Puffergefäß (**C**) mittels einer 6-Kanal-Schlauchpumpe (**D**; Typ B1, Ole Dich, Hvidovre, Dänemark) durch eine am Grund des Fermenters vorhandene Öffnung in das Innere gepumpt. Am Deckel des Fermenters befand sich eine weitere Öffnung. Diese enthielt ein Glasrohr mit einem gasdichten Butylschlauch (**F**; 8,0 mm x 12,0 mm, YMC Europe GmbH, D-46539 Dinslaken) über den der Fermenter mit dem Überlaufgefäß (**G**; Erlenmeyerkolben, 1000 ml) verbunden war. Hier wurde die überschüssige Flüssigkeit mit den darin gelösten Fermentationsprodukten gesammelt und auf Eis in einer Styropor-Box (**I**) gekühlt.

Material und Methoden

Das während der Fermentation gebildete Gas wurde separat in einem speziellen Gasbeutel (H; Plastigas, Linde AG, D-80331 München) aufgefangen. Dieser war mit dem Überlaufgefäß über einen weiteren Butylschlauch verbunden.

Die im RUSITEC-System nicht simulierbare Wiederkau-Tätigkeit wurde durch eine Zerkleinerung des im Nylonbeutel enthaltenen Substrats vor Versuchsbeginn ersetzt.

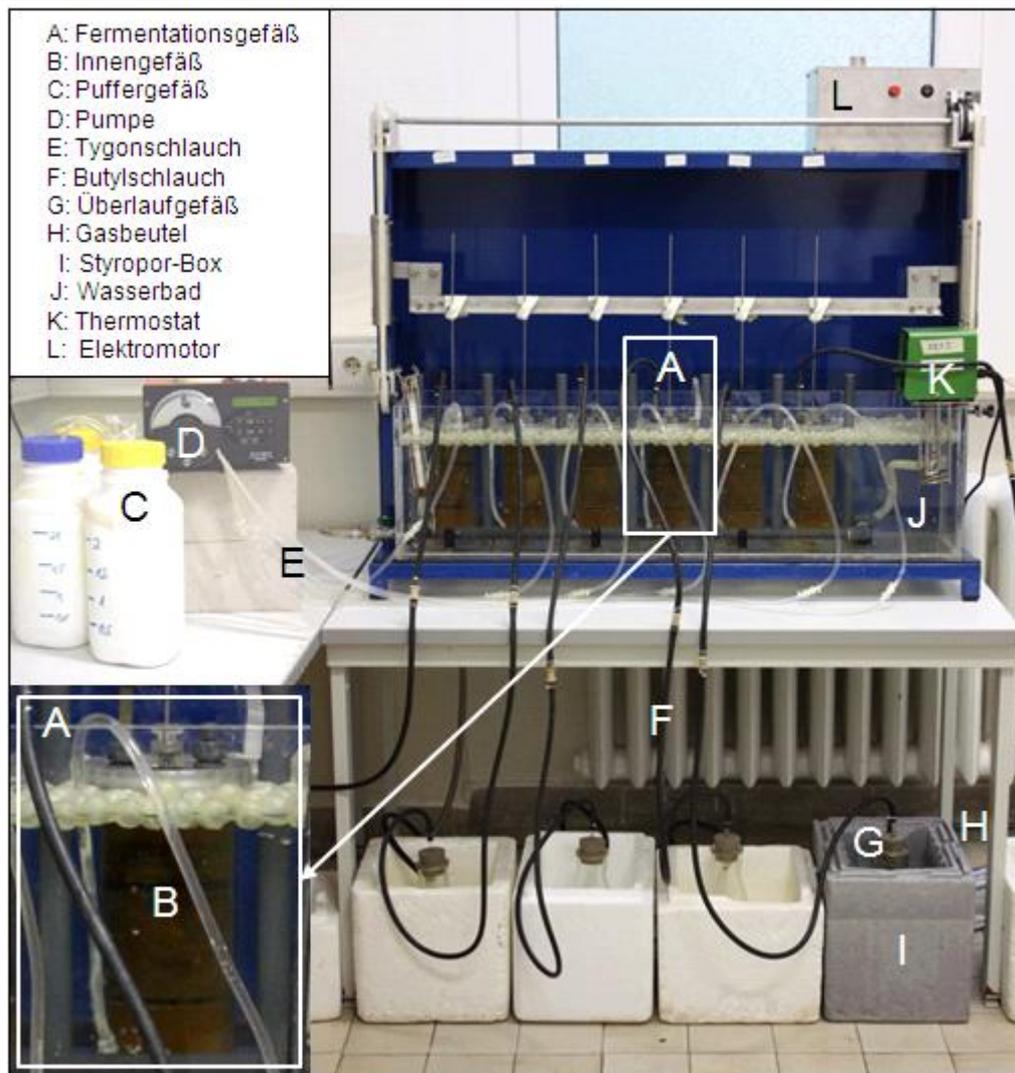


Abb. 2.1: RUSITEC-Anlage mit sechs Fermentationsgefäßen.

2.2 Versuchsdesign der RUSITEC-Versuche

In dieser Studie wurden pro Versuch zwei RUSITEC-Anlagen mit insgesamt zwölf identischen Fermentern verwendet (Abb. 2.1). Insgesamt wurden vier Versuche durchgeführt, davon drei mit einer Kombination aus Grassilage und einer Kraffttermischung (V1, V2, V3) und ein Versuch mit Maissilage und einer Kraffttermischung (V4) als Substrat (Abb. 2.2). Die Kraffttermischung (KF) war in allen Versuchen identisch. Die Mischung des Kraffttermittels erfolgte aus zwei getrennt vorliegenden Kraffttermitteln, die erst für die Verwendung im RUSITEC-System zusammengefügt wurden. Die Bestandteile der Kraffttermittel sind in Tab. 2.1 zusammengefasst.

Tab. 2.1: Übersicht über die anteilige Zusammensetzung der Kraffttermittel.

Bestandteile	Krafftter 1	Krafftter 2
Rapsextraktionsschrot	–	33,34%
Trockenschnitzel	39,50%	61,89%
Weizen	25,00%	4,77%
Kohlensaurer Kalk	8,75%	–
Harnstoff (Urea)	8,00%	–
Mineralfutter	18,75%	–

Sowohl die Gras- und Maissilage als auch das verwendete Krafftter wurden freundlicherweise von den Kooperationspartnern im Institut für Tierernährung des Friedrich-Loeffler-Instituts in Braunschweig bereitgestellt. Die Silagen wurden für die Untersuchung auf eine Partikellänge von 1 cm zerkleinert. Die Weender Roh Nährstoff-Analyse des Untersuchungsfutters (Silage + KF) wurde freundlicherweise im Institut für Tierernährung der Universität Hohenheim (Stuttgart) durchgeführt (Tab. 2.2).

Tab. 2.2: Ergebnisse der Weender Roh Nährstoff-Analyse des Futters (Universität Hohenheim, Stuttgart; TS: Trockensubstanz, XA: Rohasche, XP: Rohprotein, NDF/ADF: Neutrale/Saure Detergenzienfaser).

Roh Nährstoffe	Grassilage + KF	Maissilage + KF
TS [g/kg]	910,9	936,6
XA [g/kg TS]	99,2	36,1
XP [g/kg TS]	155,1	72,5
NDF [g/kg TS]	439,7	370,3
ADF [g/kg TS]	284,5	225,8

Es gab zwei Behandlungen mit Fumarsäure (FS) und eine Kontrolle ohne FS, wobei jeweils vier Fermenter gleich behandelt wurden ($n=4$). Die Zuordnung der Fermenter A-L zu der Behandlung mit FS bzw. zur Kontrolle erfolgte nach dem Zufallsprinzip. Die FS wurde den Fermentern im RUSITEC-Puffer gelöst in den Dosierungen $3,38 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ und $6,76 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ zugeführt. Die FS-Menge orientierte sich dabei an den Dosierungen der parallel durchgeführten In-vivo-Untersuchung in Braunschweig. Jeder Versuch wurde in eine siebentägige Äquilibrationsphase, die der Anpassung der Mikroorganismen an die In-vitro-Bedingungen im RUSITEC-System diente, und eine achttägige Versuchsphase, in der die Erfassung der Parameter des mikrobiellen Pansenstoffwechsels erfolgte, unterteilt.

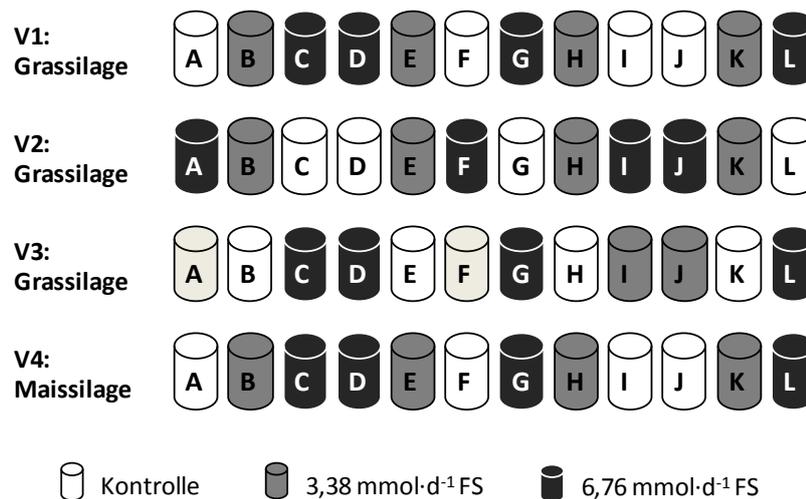


Abb. 2.2: Überblick über das Versuchsdesign der RUSITEC-Versuche mit $n=4$ Fermentern für die Kontrolle und die Fumarsäure-Behandlungen (FS). Die Versuche 1, 3 und 3 (V1, V2, V3) wurden mit Grassilage und Versuch 4 (V4) mit Maissilage als Grundfutter durchgeführt.

2.2.1 Vorbereitungen und Versuchsbeginn

Vor Inbetriebnahme der RUSITEC-Anlagen wurden die Fermenter inklusive der Butylschläuche zur Desinfektion 24 h in 3,7%-iger Formaldehyd-Lösung (Tab. 6.1 im Anhang) eingelegt. Nach gründlichem Auswaschen des Formaldehyds mit Aq. dest. wurden die Einzelteile im Trockenschrank (Modell 600, Memmert GmbH & Co. KG, D-8540 Schwabach) bei 65°C üN getrocknet. Im Anschluss wurden die Einzelteile zusammengebaut und in die Anlagen eingesetzt. Für jeden RUSITEC-Versuch wurden neue Tygenschläuche verwendet. Bereits einen Tag vor

Versuchsbeginn wurden die Wasserbäder mit Aq. dest. befüllt und auf 39°C erwärmt.

Die Nylonbeutel wurden nach dem Autoklavieren für 25 min bei 103°C und 0,4 bar (Varioklav, Dampfsterilisator Typ 500, H+P Labortechnik GmbH, D-85764 Oberschleißheim) ebenfalls im Trockenschrank üN bei 65°C getrocknet. Anschließend wurde in die Nylonbeutel 11 g des gefriergetrockneten zu untersuchenden Substrats, wie in Tab. 2.3 beschrieben, eingewogen. Die Beutel wurden mit Kabelbindern verschlossen. Bis zur Verwendung wurden die abgewogenen Nylonbeutel im Exsikkator aufbewahrt.

Zu Versuchsbeginn wurden sowohl fester als auch flüssiger Panseninhalt aus einem ausgewachsenen weiblichen Rind (Rasse: Hinterwälder) über eine Pansenfistel entnommen. Der flüssige Panseninhalt wurde mittels Filtration durch quadratisch zugeschnittenen doppeltragigen Verbandmull (Gazin[®], 80 cm x 5 m, Lohmann & Rauscher International GmbH & Co. KG, D-56579 Rengsdorf) aus dem festen Panseninhalt gewonnen. Es wurden der pH-Wert und das Redoxpotential in der Flüssigkeit bestimmt. Des Weiteren wurden aus der Flüssigkeit Proben zur Bestimmung der Konzentration der kurzkettigen Fettsäuren (SCFA) und der Anzahl der *Protozoa* entnommen.

Für die Inokulation wurde zunächst pro Fermenter 70 g fester Panseninhalt in einen Nylonbeutel eingewogen. Dieser wurde zusammen mit einem weiteren, substratgefüllten Nylonbeutel in das Innengefäß verbracht und in dem Fermenter platziert. Anschließend wurde 750 ml flüssiger Panseninhalt hineingegossen. Während der gesamten Dauer wurde der flüssige Panseninhalt bei 39°C temperiert. Die verschlossenen Fermenter wurden im Wasserbad fixiert und mit den Tygon- bzw. Butylschläuchen verbunden. Die frisch hergestellten RUSITEC-Pufferlösungen mit der entsprechenden Konzentration an gelöster FS (Tab. 6.1) wurden in die Puffergefäße gefüllt. Zum Starten der Anlage wurden der Elektromotor und die Schlauchpumpe eingeschaltet. Das Begasen der Überlaufgefäße mit Stickstoff erfolgte letztlich, um die verbleibende Luft aus dem System zu verdrängen.

Tab. 2.3: Zusammensetzung der Beutel-Einwaagen in den vier RUSITEC-Versuchen.

Bestandteile	V1, V2, V3	V4
Grassilage	7,33 g	-
Maissilage	-	7,33 g
Kraftfutter 1	0,52 g	0,52 g
Kraftfutter 2	3,14 g	3,14 g
Summe	11 g	11 g

2.2.1.1 Herstellung der RUSITEC-Pufferlösungen

Es wurden täglich drei Pufferlösungen hergestellt, die sich nur in der Konzentration der enthaltenen FS unterschieden (Tab. 6.1). Aufgrund der schlechten Löslichkeit der FS in Wasser musste für die Herstellung eines Puffervolumens von 5 l die abgewogene FS in 4 ml Ethanol (99,8%) vorgelöst werden. Zusätzlich wurde nach Zugabe von ca. 1 l Aq. dest. die FS unter Rühren in einem Ultraschallbad (Transsonic T/700, Elma[®] GmbH & Co. KG, D-78224 Singen) gelöst. Dem Kontroll-Puffer wurde die gleiche Menge Ethanol hinzugefügt. Alle drei Pufferlösungen enthielten 0,08% Ethanol. Durch die Perfusion der Fermenter mit täglich 750 ml der RUSITEC-Puffer ergaben sich die FS-Dosierungen von 3,38 mmol·d⁻¹ und 6,76 mmol·d⁻¹.

2.2.2 Tägliche Bedienung der RUSITEC-Anlage

2.2.2.1 Äquilibrierungsphase

Zur Überwachung der Stabilität des Systems und der anaeroben Bedingungen wurden zunächst täglich der pH-Wert und das Redoxpotential in der flüssigen Phase jedes Fermenters bestimmt. Es erfolgte ebenfalls eine Bestimmung des Volumens der über 24 h gesammelten Flüssigkeit in den Überlaufgefäßen mit Hilfe eines 1000 ml Messzylinders. Nach einer Inkubationszeit von 24 h nach der Inokulation wurde der mit frischem, festem Panseninhalt gefüllte Nylonbeutel gegen einen mit substratgefüllten Beutel ausgetauscht. Ab diesem Zeitpunkt wurden die Nylonbeutel alternierend im 24 h-Intervall gegen substratgefüllte Beutel ersetzt, woraus sich für jeden Beutel eine Verweilzeit von 48 h im Fermenter ergab. Die Nylonbeutel wurden nach der Entnahme zweimal für jeweils zwei Minuten in 40 ml vorgewärmter (39°C) RUSITEC-Pufferlösung in einem Polyethylen-Beutel (15 cm x 30 cm) ausgequetscht, um die partikelassoziierten

Mikroorganismen abzulösen. Anschließend wurden diese mit der Flüssigkeit zurück in die Fermenter gegeben.

An Tag 1 der Äquilibrierungsphase wurden außerdem 9 ml (V1-3) bzw. 30 ml (V4) der Fermenterflüssigkeit für die SSCP-Analyse der flüssigkeitsassoziierten Mikroorganismen (*liquid associated microorganisms*, LAM) entnommen und auf Eis gelagert. Für die Quantifizierung der *Protozoa* wurde 1 ml Fermenterflüssigkeit mit einer Pipette entnommen, und zur Fixierung im Verhältnis 1:1 mit Methylgrün-Lösung (Tab. 6.1) gemischt. Bis zur Zählung wurden die Proben in Dunkelheit gelagert.

Die Versorgung der Fermenter mit der entsprechenden Variante der frisch hergestellten RUSITEC-Pufferlösung wurde sichergestellt. Zur Aufrechterhaltung anaerober Verhältnisse im RUSITEC-System musste der Sauerstoff, der bei jedem Öffnen in die Fermenter gelangt war, wieder verdrängt werden (CZERKAWSKI 1986). Zu diesem Zweck wurden die Überlaufgefäße abschließend mit Stickstoff begast.

2.2.2.2 Versuchsphase

Während der Versuchsphase erfolgte, wie bereits in der Äquilibrierungsphase beschrieben, die tägliche Bestimmung des pH-Werts, des Redoxpotentials, des Flüssigkeits-Volumens in den Überlaufgefäßen, sowie der Wechsel der Nylonbeutel. Für die Analyse der Verdaulichkeit der organischen Substanz (OS), des Rohproteins (XP) und der sauren und neutralen Detergenzienfasern (ADF und NDF) wurden die Nylonbeutel nach der Entnahme aus den Fermentern bei 65°C im Trockenschrank üN getrocknet. Anschließend wurden die über die Tage 7-13 gesammelten Futterreste jedes Fermenters vereinigt und danach für die Weender Rohnährstoff-Analyse aufbereitet (Kapitel 2.2.3.6).

Es wurden 7 ml bzw. 3 ml der Überlaufflüssigkeit für die Bestimmung der Konzentrationen der SCFA und des Ammoniaks entnommen, und in luftdicht verschlossenen Glasfläschchen bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren. Das über 24 h im Gasbeutel gesammelte Gas wurde mit Hilfe eines Trommelgaszählers (Ritter Apparatebau GmbH & Co. KG, D-44892 Bochum) quantifiziert. Für die spätere Analyse des Gases auf seine Bestandteile wurden Proben in evakuierte Blutentnahme-Röhrchen (Typ VF-109SP, Venosafe, Terumo,

D-65760 Eschborn) mittels einer Kanüle (Sterican Gr.12, Ø 0,70 mm x 30 mm, Braun Melsungen AG, D-34209 Melsungen) abgefüllt. Für die spätere Normierung des Gasvolumens wurden außerdem täglich die Raumtemperatur und der Luftdruck notiert.

Aus der Fermenterflüssigkeit wurden für die Gewinnung der LAM für die Bestimmung der mikrobiellen Proteinsynthese täglich 20 ml entnommen und bei -20°C eingefroren. Am Ende des RUSITEC-Versuchs wurden die für jeden Fermenter gesammelten Proben über die gesamte Versuchsphase vereinigt und danach wie in Kapitel 2.2.3.5 beschrieben aufbereitet.

Für die Tage 7 und 14 erfolgte die Probenentnahme zur Quantifizierung der *Protozoa* wie im Abschnitt Äquilibrierungsphase beschrieben. An Tag 14 wurden zudem 9 ml (V1-3) bzw. 30 ml (V4) aus jedem Fermenter für die SSCP-Analyse der LAM entnommen und anschließend auf Eis gelagert.

Die zwei Beutel an Tag 14 dienten der Gewinnung der an die Futterpartikel gebundenen Mikroorganismen (*solid associated microorganisms*, SAM) zum einen für eine SSCP-Analyse und zum anderen genau wie die LAM für die Bestimmung der mikrobiellen Proteinsynthese (Kapitel 2.2.3.5).

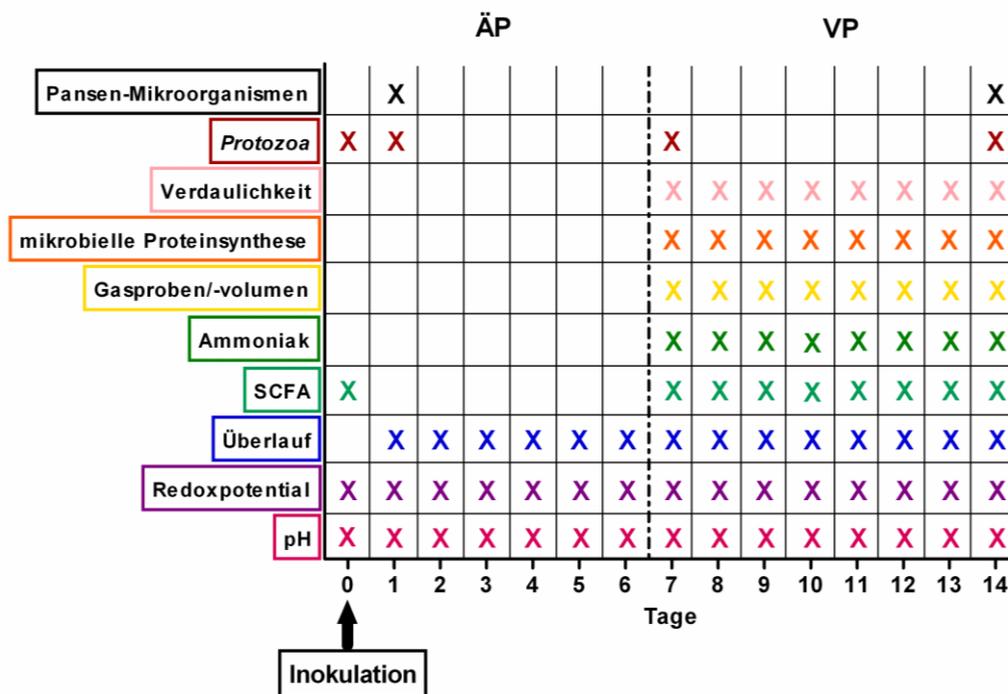


Abb. 2.3: Schema zur Probenentnahme während Äquilibrierungsphase (ÄP) und Versuchsphase (VP) eines RUSITEC-Versuches (Inokulation = Starttag des Versuches).

2.2.3 Analytische Methoden

2.2.3.1 pH-Wert und Redoxpotential

Die Bestimmungen des pH-Wertes und des Redoxpotentials erfolgten täglich vor dem Beutelwechsel in der flüssigen Phase jedes Fermenters. Der pH-Wert wurde über 30 s mit einem pH-Meter (Digital-pH-Meter 646, Knick GmbH & Co. KG, D-14163 Berlin) und einer pH-Elektrode (InLab[®] Routine, Mettler-Toledo GmbH, D-35353 Gießen) gemessen. Täglich wurde dafür vor der ersten Messung das pH-Meter für den pH-Wert von 4,01 und 7,00 (pH-Pufferlösungen, Mettler-Toledo GmbH, D-35353 Gießen) kalibriert. Im Anschluss wurde das Redoxpotential [mV] über 60 s mit Hilfe eines pH-Meters (Digital-pH-Meter 646, Knick GmbH & Co. KG, D-14163 Berlin) und einer Redox-Elektrode (InLab[®] 501 bzw. InLab[®] Redox Pro, Mettler-Toledo GmbH, D-35353 Gießen) erfasst.

2.2.3.2 Bestimmung der Konzentration der SCFA

Die Konzentrationen der SCFA Acetat, Propionat, Butyrat, Isovalerat und Valerat wurden gaschromatographisch (Gaschromatograph 5890 Series II, Hewlett Packard, D-71034 Böblingen) bestimmt. Dafür wurden die tiefgefrorenen Proben aus der Überlaufflüssigkeit (Kapitel 2.2.2) bei 4°C üN im Kühlschrank aufgetaut. Die Proben wurden 20 min bei 4°C und 40.000 g zentrifugiert (Rotor SM24, Sorvall[®] RC-5C, Sorvall Instruments, Du Pont Company, Wilmington, USA). Vom Überstand wurde 1 ml abgenommen, mit 100 µl 98%-iger Ameisensäure versetzt und vermischt. Nach einer Inkubationszeit von 10 min folgte ein zehninütiger Zentrifugationsschritt bei 4.000 g (Minifuge 2, Heraeus-Christ GmbH, D-38835 Osterode). Vom Überstand wurde 1 ml in luftdicht verschließbare Rollrand-Ampullen (Agilent Technologies GmbH & Co. KG, D-76337 Waldbronn) überführt.

Für die Gaschromatographie wurde eine von Hand gestopfte Trennsäule aus Glas (Länge: 1,8 m; Ø innen: 2 mm) verwendet. Als Trennmaterial diente Chromosorb WAW 80/100 mesh, mit 20% Neopentyl-Glycol-Succinat (NPGS) und 2% ortho-Phosphorsäure (Analyt-MTC Messtechnik GmbH, D-79379 Müllheim). Der Tab. 2.4 sind die Bedingungen der gaschromatographischen Analyse zu entnehmen. Nach jeder zehnten Probe wurde ein externer Standard (Merck KGaA, D-64271 Darmstadt) gemessen, wodurch eine Berechnung der Konzentrationen der einzelnen SCFA [mmol·l⁻¹] in der Überlaufflüssigkeit möglich

war. Die Produktionsraten [$\text{mmol}\cdot\text{d}^{-1}$] für Acetat, Propionat, Butyrat, Isovalerat und Valerat wurden mit Hilfe der über 24 h gesammelten Überlaufvolumina [$\text{ml}\cdot\text{d}^{-1}$] ermittelt. Zusätzlich wurden die molaren Anteile der einzelnen SCFA an der gesamten Menge der SCFA berechnet.

Tab. 2.4: Bedingungen für die Gaschromatographie.

Konditionierung	24 h bei 240°C
Ofentemperatur	130°C
Injektionsblock	225°C
FID	250°C
Trägergas (N₂)	25 ml/min
Wasserstoff	30 ml/min
Synthetische Luft	420 ml/min
Injektionsvolumen	1 μl
Wiederholungen	2 Einspritzungen
Analysenlaufzeit	ca. 9 min

2.2.3.3 Bestimmung der Ammoniak-Konzentration

Die Bestimmung der Ammoniak-Konzentration in der Überlaufflüssigkeit und in der RUSITEC-Pufferlösung wurde photometrisch mit der Harnstoff/Ammoniak-Test-Combination (Roche Diagnostics, D-68305 Mannheim) durchgeführt. Dieser Nachweis beruht auf der Berthelot-Reaktion. Ammoniak bildet dabei in Anwesenheit von Hypochlorit und Phenol einen blauen Farbstoffkomplex, dessen Absorption im Photometer (DU 640, Beckman Coulter GmbH, D-47807 Krefeld) bei einer Wellenlänge von 546 nm messbar ist.

2.2.3.4 Bestimmung der Anteile des CO₂ und des CH₄ in den Gasproben

Die täglich genommenen Gasproben wurden freundlicherweise im Institut für Siedlungswasserwirtschaft und Abfalltechnik (ISAH) der Leibniz Universität Hannover auf die Anteile des CO₂ und CH₄ gaschromatographisch (GC 2014, Shimadzu Europa GmbH, D-47269 Duisburg) unter Verwendung eines Wärmeleitfähigkeitsdetektors TCD analysiert. Verwendet wurde eine mit Porapak Q (Sigma-Aldrich GmbH, D-89555 Steinheim) gefüllte Glassäule (Länge: 2,1 m, \varnothing innen: 3 mm, \varnothing außen: 5 mm). Als Trägergas diente Helium. Unter Zuhilfenahme des gemessenen Gasvolumens konnten die täglichen Produktionsraten für CO₂ und CH₄ [$\text{ml}\cdot\text{d}^{-1}$] für Normalbedingungen (0°C, 1013 hPa) berechnet werden.

2.2.3.5 Bestimmung der mikrobiellen Proteinsynthese

Der natürlich vorkommende Stickstoff besteht hauptsächlich aus dem Isotop ^{14}N . Das ebenfalls stabile Isotop ^{15}N macht nur einen Anteil von 0,3663% aus. Zur Bestimmung der mikrobiellen Proteinsynthese wurde das Isotop ^{15}N als Tracersubstanz für die Markierung der Mikroben eingesetzt, indem mit der Pufferlösung ein höherer ^{15}N -Anteil als natürlich verfügbar zugeführt wurde. Dies wurde durch die Zugabe von $0,7 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NH}_4\text{Cl}$ (Tab. 6.1) mit einem ^{15}N -Anteil von 10 Atom% realisiert. Nach der Aufbereitung der Proben wurde der erreichte ^{15}N -Anteil in den Futterresten, in der Fermenterflüssigkeit und in den sog. Referenzmikroben der LAM und SAM gemessen.

Aufbereitung der Proben

Zur Ablösung der SAM von den Futterpartikeln wurde Methylcellulose eingesetzt (MINATO *et al.* 1966). Die letzten zwei Nylonbeutel an Tag 14 wurden zunächst in 150 ml vorgewärmter Methylcellulose-Lösung (Tab. 6.1) bei 39°C für 45 min inkubiert. Nach der Zugabe von 200 ml 4°C kalter Methylcellulose-Lösung schloss sich eine vierstündige Inkubation der Beutel bei 4°C an. Die Beutel wurden gut ausgequetscht und der Inhalt verworfen. Von der grünlich verfärbten Methylcellulose-Lösung, die die abgelösten SAM enthielt, wurden 9 ml (V1-3) bzw. 30 ml (V4) für die SSCP-Analyse (Kapitel 2.2.3.8) abgenommen. Die Differentialzentrifugation (BRANDT & ROHR 1981) erfolgte anschließend zur Isolierung der Referenzmikroben für die restliche Lösung der SAM und für die über die Versuchsphase vereinigten Proben der LAM. Alle Zentrifugationsschritte wurden bei 4°C durchgeführt.

Nach der ersten Zentrifugation bei 2.000 g für 5 min (Rotor SS34, Sorvall[®] RC-5C, Sorvall Instruments, Du Pont Company, Wilmington, USA) wurde der Überstand bei -20°C üN eingefroren. Dieser wurde danach im Kühlschrank aufgetaut und einer zweiten Zentrifugation bei 2.000 g für 5 min unterzogen. Wiederum wurde der Überstand abgenommen, in eine neues Zentrifugen-Röhrchen überführt und das Pellet verworfen. Es folgte eine Zentrifugation bei 27.500 g für 15 min. Anschließend wurde der komplette Überstand der LAM-Proben für die spätere Analyse des ^{15}N -Anteils in der Fermenterflüssigkeit abgenommen. Die von Futterpartikeln reine Mikrobenmasse der SAM und LAM bildete nun das Pellet, welches mit 10 ml 0,9%-iger NaCl-Lösung gewaschen und bei 27.500 g für 15 min

zentrifugiert wurde. Nach erneutem Waschen des Pellets wurde die letzte Zentrifugation wiederholt, der Überstand verworfen, das Pellet in neue Probengefäße überführt, gewogen und bei -20°C eingefroren. Für die Bestimmung der ^{15}N -Anreicherung im Massenspektrometer musste nicht nur die Mikrobenmasse, sondern auch 60 ml des abgenommenen Überstandes der zentrifugierten Fermenterflüssigkeit gefriergetrocknet (Institut für Tierernährung, Friedrich-Loeffler-Institut, Braunschweig) und danach mit einem Glasstab staubfein zerrieben werden.

Die ^{15}N -Anreicherung in den Futterresten, der Fermenterflüssigkeit und der Referenzmikroben (SAM, LAM) wurde mit einem Massenspektrometer (TracerMAT, Thermo Fisher Scientific GmbH, D-63303 Dreieich) nach Veraschung in einem Elementaranalysator (EA 1108, Fisons Instruments GmbH, D-55252 Mainz-Kastel) im Institut für Tierernährung der Universität Hohenheim in Stuttgart gemessen. Auch der tatsächliche ^{15}N -Anteil in dem verwendeten angereicherten NH_4Cl wurde verifiziert, und lag bei 11,2 Atom% statt 10 Atom%.

Berechnung der mikrobiellen Proteinsynthese

Basierend auf den Ergebnissen von BOGUHN *et al.* (2006) wurde in dieser Studie ebenfalls NH_4Cl mit einem ^{15}N -Anteil von 10 Atom% ($0,7 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) appliziert. Daher konnte davon ausgegangen werden, dass in dieser Untersuchung ebenfalls nach sieben Tagen ein Plateau zur Anreicherung der Referenzmikroben mit ^{15}N erreicht wurde. Der täglich von den LAM assimilierte Stickstoff (N_{LAM}) wurde mit der Formel in Abb. 2.4 berechnet.

$$N_{\text{LAM}} = \frac{{}^{15}\text{N}_{\text{in}} - {}^{15}\text{N}_{\text{out}}}{{}^{15}\text{N}_{\text{Plateau}}} \quad [\text{mg} \cdot \text{d}^{-1}]$$

- ${}^{15}\text{N}_{\text{in}}$: ^{15}N -Menge, die in die Fermentationsgefäße mit dem Puffer (errechnet auf der Basis der täglich infundierten Pufferlösung und des analysierten ^{15}N -Gehalts in NH_4Cl) und dem Substrat (ausgehend von einem natürlichen Anteil von 0,3663% des Isotops ^{15}N am gesamten N) gelangt.
- ${}^{15}\text{N}_{\text{out}}$: ^{15}N -Menge in der Fermenterflüssigkeit und den entnommenen Futterresten (ausgenommen des ^{15}N der Referenzmikroben; $\mu\text{g} \cdot \text{d}^{-1}$).
- ${}^{15}\text{N}_{\text{Plateau}}$: ^{15}N -Anteil am gesamten N der isolierten LAM-Referenzmikroben zwischen Tag 7 und Tag 14 [$\mu\text{g } ^{15}\text{N} \cdot (\text{mg N})^{-1}$].

Abb. 2.4: Formel zur Berechnung des von den LAM assimilierten Stickstoffs.

Zur Ermittlung des täglich assimilierten Stickstoffs durch die SAM (N_{SAM}) wurde der Rechenweg in Abb. 2.5 gewählt. Die synthetisierten Mengen des mikrobiellen Proteins von LAM bzw. SAM wurden durch Multiplikation von N_{LAM} bzw. N_{SAM} mit 6,25 unter der Annahme eines Protein-Stickstoffgehalts von 16% berechnet. Das insgesamt synthetisierte Mikrobenprotein ergibt sich aus der Summe des LAM- und SAM-Proteins.

$$N_{SAM} = \frac{({}^{15}N_{FR} - {}^{15}N_{nat}) \cdot N_{FR}}{({}^{15}N_{SAM} - {}^{15}N_{nat})} \quad [\text{mg} \cdot \text{d}^{-1}]$$

${}^{15}N_{FR}$: bestimmter ${}^{15}\text{N}$ -Anteil in den Futterresten [%].

${}^{15}N_{nat}$: natürlicher ${}^{15}\text{N}$ -Anteil von 0,3663%.

N_{FR} : N-Menge in den Futterresten [$\text{g} \cdot \text{d}^{-1}$].

${}^{15}N_{SAM}$: bestimmter ${}^{15}\text{N}$ -Anteil in den SAM-Referenzmikroben [%].

Abb. 2.5: Formel zur Berechnung des von den SAM assimilierten Stickstoffs.

Effizienz der mikrobiellen Proteinsynthese

Aus der Division des gesamten synthetisierten Proteins [$\text{mg} \cdot \text{d}^{-1}$] durch die fermentierte OS [$\text{mg} \cdot \text{d}^{-1}$] wurde die Effizienz der mikrobiellen Proteinsynthese (EMP) errechnet. Sie gibt die gesamte Menge des mikrobiell synthetisierten Proteins pro kg abgebauter OS (Kapitel 2.2.3.6) an.

2.2.3.6 Bestimmung der Verdaulichkeiten der Rohnährstoffe

Die Weender Rohnährstoff-Analyse des Futters (Tab. 2.2) und der Futterreste wurde im Institut für Tierernährung der Universität Hohenheim durchgeführt. Es wurden der Gehalt der Rohasche (XA), der organischen Substanz (OS), des Rohproteins (XP), der neutralen (NDF) und der sauren Detergenzienfaser (ADF) untersucht (VDLUFA 2006). Die Verdaulichkeiten der Futterreste nach 48 h Inkubation im Fermenter konnte anhand der Ergebnisse der Analyse unter Verwendung eines Standards (unverdautes Futter) berechnet werden. Weil die SAM, genau wie die Futterreste mit denen sie assoziiert sind, einen organischen Anteil besitzen, ergibt sich ein zu niedriger Wert für die Verdaulichkeit der OS. Die tatsächliche OS der Futterreste wurde daher bestimmt, indem die Differenz der

analysierten OS und der OS der SAM (OS_{SAM}) gebildet wurde (BOGUHN *et al.* 2006). Die OS_{SAM} wurde mit der Formel in Abb. 2.6 berechnet. Es wurde ebenfalls eine Korrektur der Verdaulichkeit des XP vorgenommen.

$$OS_{SAM} = \left(\frac{N_{SAM}}{N} \cdot 100 \right) \cdot 0,93 - \left(\frac{N_{SAM}}{N} \cdot 100 \right) \cdot 0,93 \cdot 0,12 \quad [\text{mg} \cdot \text{d}^{-1}]$$

N_{SAM} : N-Menge, die täglich von den SAM gebildet wurde [$\text{mg} \cdot \text{d}^{-1}$].

N : gemessener N-Anteil in den SAM [%]

0,93: bestimmter Anteil der TS in den SAM.

0,12: bestimmter Anteil der XA in den SAM.

Abb. 2.6: Formel zur Berechnung der organischen Substanz (OS) der SAM.

2.2.3.7 Quantifizierung der *Protozoa*

Die in Methylgrün-Lösung fixierten *Protozoa* wurden zuerst gut gemischt und 1:3 mit Aq. dest. verdünnt. Insgesamt ergab sich daher eine Verdünnung der Originalprobe von 1:6. Die Proben wurden anschließend unter einem Lichtmikroskop (BH-2, Olympus Europa Holding GmbH, D-20097 Hamburg) bei 160-facher Vergrößerung mit Hilfe einer McMaster Zählkammer mit drei Zählfeldern (Maße eines Zählfeldes: 2,0 cm x 1,8 cm x 0,15 cm, Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, D-97922 Lauda Königshofen) unter Verwendung eines Okulars mit Netzmikrometer quantifiziert. Mit Hilfe eines Objektmikrometers wurde vor der ersten Zählung die Seitenlänge des Quadrats des Netzmikrometers von 0,05 cm ermittelt. Das Volumen der ausgezählten 40 Quadrate betrug daher 0,015 ml. Die Zahl der *Protozoa* pro Milliliter in der Fermenterflüssigkeit ergibt sich aus der Formel in Abb. 2.7.

$$P = VF \cdot P_{40} \cdot \frac{1}{0,015} \quad [\text{Anzahl} \cdot \text{ml}^{-1}]$$

VF : Verdünnungsfaktor.

P_{40} : Anzahl *Protozoa* in 40 Quadraten.

Abb. 2.7: Formel zur Berechnung der Anzahl der *Protozoa* pro Milliliter Fermenterflüssigkeit (P).

2.2.3.8 Aufbereitung der LAM und SAM für die SSCP-Analyse

Die Proben der Mikroorganismen für die SSCP-Analyse wurden unmittelbar nach der Entnahme aufbereitet. Dabei wurden für die LAM und SAM identische Protokolle verwendet. Im Gegensatz zu V4 (Maissilage) erfolgte für V1, V2 und V3 (Grassilage) eine Vereinigung der Proben, die aus mit gleicher FS-Konzentration behandelten Fermentern (n=4) stammten. Die Aufbereitung der Proben erfolgte durch eine einmalige Zentrifugation (Rotor SS34, Sorvall[®] RC-5C, Sorvall Instruments, Du Pont Company, Wilmington, USA) für 20 min und mit 27.255 g bei 4°C, um auch die *Archaea* in die Analyse mit einbeziehen zu können, welche *Protozoa*-assoziiert vorliegen (STUMM *et al.* 1982; VOGELS *et al.* 1980). Das Pellet wurde dann in 4 ml 0,9%-iger NaCl-Lösung resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension portionsweise in flüssigen Stickstoff getropft und die entstandenen Kugeln bei -80°C bis zur DNA-Isolation gelagert.

2.2.3.9 Statistische Auswertung der RUSITEC-Versuche

Die biochemischen Ergebnisse aus den RUSITEC-Versuchen wurden mit dem Programm GraphPad Prism[®] 4.0 für Windows statistisch ausgewertet. Für die Überprüfung auf einen Behandlungseffekt durch FS wurde zunächst eine two-way ANOVA für jeden Versuch mit den Behandlungen über die gesamte Versuchsphase durchgeführt. Im Abschnitt Fumarsäure und Grassilage (Kapitel 3.1) wurde dann basierend auf den Mittelwerten von vier Fermentern ($\bar{x} \pm \text{SEM}$, n=4) eine Graphik für drei ausgewählte Tage der Versuchsphase (Tag 7, 10, 14) der drei identischen Versuche (V1, V2, V3) erstellt. Für V1, V2 und V3 wurde der Einfluss des Faktors Versuch innerhalb der Kontrollen bzw. der FS-Behandlungen für die gesamte Versuchsphase ebenfalls mit Hilfe einer two-way ANOVA ermittelt. Die Graphiken für den Versuch mit Fumarsäure und Maissilage (Kapitel 3.2) umfassten die Werte der gesamten Versuchsphase.

Die Ergebnisse zur mikrobiellen Proteinsynthese und zur Verdaulichkeit wurden in V1, V2, V3 und V4 auf einen Behandlungseffekt durch FS mit der one-way ANOVA untersucht.

Post Hoc wurde stets der Bonferroni-Test angewendet. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgesetzt.

2.3 Single-strand-conformation-polymorphism-(SSCP)-Analyse

Ursprünglich wurde die SSCP-Analyse in der Humanmedizin für die Mutationsforschung entwickelt, da damit Punktmutationen detektiert werden können (ORITA *et al.* 1989). Dabei werden, ähnlich einem *DNA fingerprint*, DNA-Bandenmuster der Struktur einer mikrobiellen Population erzeugt. Mittlerweile findet die Methode auch in anderen Bereichen Anwendung, darunter die Diversitätsanalyse mikrobieller Populationen (HUBY-CHILTON *et al.* 2001; KOCH *et al.* 2006; SCHMALENBERGER & TEBBE 2003). Die SSCP-Analyse diente in dieser Studie der molekularbiologischen Untersuchung der mikrobiellen Gemeinschaften der Domänen *Archaea* und *Bacteria*. Sie wurde für die 16S rRNA-Gene der Mikroorganismen in den Fermentern durchgeführt. 16S rRNA-Gene kodieren die ribosomale RNA der 16S-Untereinheit und werden als evolutionäre Chronometer bezeichnet, da Unterschiede in den Nucleotid-Sequenzen verschiedener Spezies Aufschluss über deren evolutionäre Distanz und somit über deren phylogenetische Beziehung geben (MADIGAN *et al.* 2000). Die molekularbiologische Untersuchung der Nucleotid-Sequenzen von 16S rRNA-Genabschnitten liefert damit wichtige Informationen über die Diversität mikrobieller Gemeinschaften. Da es hierzu keiner Kultivierung der Mikroorganismen bedarf, stellt die SSCP-Analyse insbesondere für die Untersuchung der unter anaeroben Bedingungen lebenden komplexen mikrobiellen Gemeinschaft im Pansen oder den Fermentern der RUSITEC-Anlage eine wertvolle Methode dar.

Zunächst wird die genomische DNA (gDNA) der Mikroorganismen extrahiert. Dann werden zwei aufeinanderfolgende Polymerase-Kettenreaktionen (*polymerase chain reaction*, PCR) durchgeführt, in der 16S rRNA-Genabschnitte der gDNA amplifiziert werden. Die erste PCR dient der Selektion der zu untersuchenden Mikroorganismen-Gruppe. Dafür werden gruppenspezifische Primer verwendet, die an streng konservierten Regionen innerhalb der 16S rRNA-Gene binden, aber einen Abschnitt überspannen, der sich durch eine hohe Diversität zwischen den Taxa auszeichnet (DOHRMANN & TEBBE 2004). Prokaryotische 16S rRNA-Gene besitzen neun dieser variablen Regionen (V1 bis V9) (NEEFS *et al.* 1993). Im zweiten Schritt schließt sich eine *nested* PCR an, bei der das PCR-Produkt der ersten PCR als *template* (Matrize) verwendet wird. Das zweite Primerpaar liegt daher zwischen dem ersten. Es entstehen dabei stets gleichlange Fragmente (408 bp) der 16S rRNA-Gene aller in der Probe vorliegenden Mikroorganismen.

Die Funktion dieser PCR ist dabei das Anhängen von Phosphat an das 5'Ende der Amplifikate, was durch die Verwendung eines phosphorylierten reversen Primers realisiert wird. Das phosphorylierte 5'Ende wird dann von einer Exonuclease erkannt, die den entsprechenden Strang selektiv verdaut. Die nun einzelsträngige DNA (*single strand DNA*, ssDNA) bildet aufgrund von intramolekularen Wechselwirkungen spezifische Sekundärstrukturen aus, die von der Nucleotid-Sequenz des Fragments (Primärstruktur) abhängen. Anschließend erfolgt die Auftrennung der einzelsträngigen DNA-Fragmente in einem nicht denaturierenden Polyacrylamid-Gel, wobei das Wanderverhalten der Fragmente von der ausgebildeten Sekundärstruktur, dem Einzelstrang-Konformationspolymorphismus (*single strand conformation polymorphism*), abhängt, und nicht von der Größe des Fragments (DOHRMANN & TEBBE 2004). Das Resultat sind SSCP-Profile, die die Struktur einer mikrobiellen Gemeinschaft als genetischen „Fingerabdruck“ zeigen. Die verschiedenen Banden repräsentieren nicht nur verschiedene Mikroorganismen-Arten. Da 16S rRNA-Gene auch intraspezifische Unterschiede in der Nucleotid-Sequenz aufweisen können (CILIA *et al.* 1996), können diese auch zur Entstehung verschiedener Banden im SSCP-Gel führen und Informationen zur intraspezifischen Diversität liefern. Wichtig ist, dass es sich hierbei um eine rein qualitative Untersuchung handelt, die nur Aussagen über die Präsenz einer Mikroorganismen-Art zulässt, nicht aber über deren quantitatives Auftreten.

2.3.1 Isolation der genomischen DNA (gDNA)

Es wurden 120-500 µl der aufbereiteten Mikroorganismen (Kapitel 2.2.3.8) nach langsamen Auftauen für 5 min bei 13.000 g und 4°C (Megafuge 1.0 R, Heraeus Instruments GmbH, D-63450 Hanau) zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurden 30-70 mg des Mikroorganismen-Pellets zur Isolation der gDNA eingesetzt. Dazu wurde das Pellet in 600 µl 1x TEN (Tris-EDTA-NaCl; Tab. 6.1) resuspendiert und die Probe in 2 ml Schraubgefäße überführt, welche 0,5 g Zirconia/Silica-Kügelchen (*beads*: 0,1 mm, Roth GmbH & Co. KG, D-76185 Karlsruhe) enthielten. Der Zellaufschluss erfolgte in zwei Schritten mechanisch mittels *bead beating* im Ribolyser Cell Disrupter (Hybaid GmbH, D-69111 Heidelberg). Die gewählten Parameter waren 40 s bei 6,0 m·s⁻¹ und 40 s bei 4,5 m·s⁻¹. Zwischen beiden Schritten wurden die Proben 1 min auf Eis gekühlt. Nach dem Abzentrifugieren der Kügelchen bei 13.000 g und 4°C für 15 min, wurde

der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es wurden 50 µl Lysozym-Lösung (100 mg·ml⁻¹) und 10 µl RNase A zugegeben. Im Folgenden wurden die Proben 30 min im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Nach der Zugabe von 15 µl 50°C warmer SDS-Lösung (20%) und 10 µl Proteinase K-Lösung (20 mg·ml⁻¹), folgte im Anschluss ein weiterer Inkubationsschritt im Wasserbad bei gleicher Temperatur für 1 h. 125 µl NaCl-Lösung (4 M) und 50 µl CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromid; 50°C warm) wurden hinzugefügt, die Proben gemischt und 10 min bei 65°C im Wasserbad erhitzt. Zur Fällung der denaturierten Proteine wurden die Proben mit 780 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) versetzt, durch Invertieren vorsichtig vermischt und bei 13.000 g und 4°C für 5 min zentrifugiert. Es kam zur Bildung von zwei Phasen, wobei sich die präzipitierten Proteine in der Interphase gesammelt haben und die DNA in der oberen wässrigen Phase gelöst vorlag. Die obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und einem weiteren Reinigungsschritt mit 780 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) unterzogen. Nach wiederholter Zentrifugation (13.000 g, 4°C, 10 min) wurde erneut die obere Phase abgenommen. Die DNA wurde dann mit 500 µl Isopropanol (100%) gefällt. Im Anschluss wurden die Proben bei 13.000 g und 4°C für 30 min zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde nach Verwerfen des Überstandes mit 950 µl Ethanol (80%) gewaschen und bei 13.000 g und 4°C für 5 min zentrifugiert. Nach Abpipettieren des Überstandes wurde das DNA-Pellet bis zum Resuspendieren in 15 µl TE-Puffer (tris-EDTA) bei Raumtemperatur (RT) getrocknet.

2.3.2 Photometrische Quantifizierung der gDNA und der PCR-Produkte

Die isolierte gDNA sowie die PCR-Produkte der 1. PCR wurden in Quarzküvetten mit einem minimalen Füllvolumen von 70 µl (Hellma GmbH & Co. KG, D-79371 Mülheim) quantifiziert (BioPhotometer, Eppendorf AG, D-22339 Hamburg). Dazu wurde eine Verdünnung der Original-Probe mit DNase-freiem H₂O erstellt (1:72). Die DNA der Original-Probe wurde für den Einsatz in der PCR auf eine Konzentration von 25 ng·µl⁻¹ mit DNase-freiem H₂O verdünnt.

2.3.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Qualität der gDNA sowie der späteren PCR-Produkte wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese in einem 0,8%-igem bzw. 1%-igem Agarose-Gel (Tab. 6.1) bei

80 V für 1,5 h überprüft. Das Gel wurde mit einer Mischung aus 2 µl des zum Marker zugehörigen Ladepuffers und 3 µl Probe beladen. Für die gDNA dienten 3 µl MassRuler™ DNA Ladder Mix und 3 µl λ-Hind III als Marker. Für die PCR-Produkte wurde der GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder und der 100 bp DNA Ladder verwendet. Das Agarose-Gel wurde in einer Ethidiumbromid-Lösung (Tab. 6.1) zum Anfärben der aufgetrennten DNA 10 min geschwenkt (Belly Dancer®, Stovall Life Science Inc., Greensboro, NC, USA) und danach 10 min mit Aq. dest. entfärbt. Unter Bestrahlung mit UV-Licht (Biometra Ti 1, Biometra GmbH, D-37079 Göttingen) wurden die Banden sichtbar gemacht. Die Detektion der Emission erfolgte mit Hilfe des BioDocII™ (Biometra GmbH, D-37079 Göttingen). Die Ergebnisse wurden photographisch festgehalten.

2.3.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion diente der selektiven Amplifizierung zu untersuchender Genabschnitte mit Hilfe von sequenzspezifischen Primern. Die Tab. 2.5 zeigt die Primer, die zur Vervielfältigung der 16S rRNA-Genabschnitte in dieser Studie verwendet wurden (BOGUHN *et al.* 2010; GROßKOPF *et al.* 1998; LANE 1991; SCHWIEGER & TEBBE 1998; STAHL & AMANN 1991; WEISBURG *et al.* 1991).

Tab. 2.5: Primer für 16S rRNA-Genabschnitte (AT = Annealingtemperatur; K=G/T; M=A/C; Y=C/T). Die mit -Ph gekennzeichneten Primer dienten als *reverse* Primer in der *nested* PCR, diejenigen ohne Phosphorylierung wurden für die Reamplifikations-PCR verwendet.

Name des Primers	Position	Domäne	Sequenz (5'-3')	AT [°C]	Produktgröße (V-Region)
Gruppenspezifische Primer					
F27 <i>fw</i> ¹	8-27	<i>Bacteria</i>	AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG	50	1506 bp (V1-V9)
R1492 <i>rv</i> ²	1492-1513	<i>Bacteria</i>	TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T	50	
A109f <i>fw</i> ³	109-125	<i>Archaea</i>	ACK GCT CAG TAA CAC GT	52	826 bp (V2-V5)
A934b <i>rv</i> ⁴	915-934	<i>Archaea</i>	GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT	52	
Primer für <i>nested</i> PCR (-Ph) und Reamplifikations-PCR					
Com1 <i>fw</i> ⁵	519-536	<i>Bacteria</i>	CAG CAG CCG CGG TAA TAC	50	408 bp (V4-V5)
Com2-Ph <i>rv</i> ⁵ oder Com2 <i>rv</i> ⁵	907-926	<i>Bacteria</i>	CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT	50	
Com1m <i>fw</i> ⁶	519-536	<i>Archaea</i>	CAG CMG CCG CGG TAA YAC	56	408 bp (V4-V5)
Com2m-Ph <i>rv</i> oder Com2m	907-926	<i>Archaea</i>	CCG CCA ATT CCT TTA AGT TT	56	

⁶ BOGUHN *et al.* 2010; ³ GROßKOPF *et al.* 1998; ¹ LANE 1991; ⁵ SCHWIEGER & TEBBE 1998; ² WEISBURG *et al.* 1991; ⁴ STAHL & AMANN 1991)

Die Tabelle zeigt für jedes Primerpaar, welche variablen Regionen (V-Region) des 16S rRNA-Gens überspannt werden. Die Primer wurden von der Firma Biomers.net GmbH (D-89077 Ulm) bezogen.

Die erste PCR wurde mit spezifischen Primerpaaren für die Domäne der *Bacteria* (F27 *fw*/R1492 *rv*) bzw. *Archaea* (A109f *fw*/A934b *rv*) durchgeführt. Der Reaktionsansatz ist in Tab. 2.6 beschrieben. Für jede Probe wurde ein Dreifach-Ansatz gewählt. Die verdünnte gDNA ($25 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$) wurde als *template* verwendet. Die gewählten Einstellungen im Thermocycler (Eppendorf AG, D-22339 Hamburg) für diese PCR sind der Tab. 2.7 zu entnehmen.

Tab. 2.6: Reaktionsansatz für die PCR mit den gruppenspezifischen Primerpaaren für die *Bacteria* (F27 *fw*/R1492 *rv*) und die *Archaea* (A109f *fw*/A934b *rv*).

Bestandteile	Volumen
DNase-freies H ₂ O	20,375 μl
10x PCR Puffer	2,5 μl
dNTPs (je 10 mmol $\cdot\mu\text{l}^{-1}$)	0,5 μl
<i>fw</i> Primer (50 pmol $\cdot\mu\text{l}^{-1}$)	0,25 μl
<i>rv</i> Primer (50 pmol $\cdot\mu\text{l}^{-1}$)	0,25 μl
HotStarTaq DNA Polymerase (5 U $\cdot\mu\text{l}^{-1}$)	0,125 μl
gDNA (25 ng $\cdot\mu\text{l}^{-1}$)	1 μl
Gesamtvolumen	25 μl

Tab. 2.7: Temperaturprofil der PCR mit den gruppenspezifischen Primerpaaren.

Schritt	Temperatur	Dauer [min]	Zyklen
Aufheizen des Deckels	105°C	-	30x
Initiale Denaturierung	95°C	15:00	
Denaturierung	94°C	1:00	
Annealing	s. Tab. 2.5	1:00	
Elongation	72°C	1:10	
Finale Elongation	72°C	5:00	

Die Überprüfung der PCR-Produkte auf ihre korrekte Größe erfolgte in einem 1%-igem Agarose-Gel. Die Quantität der PCR-Produkte wurde photometrisch bestimmt (Kapitel 2.3.2). In einer sich anschließenden *nested* PCR wurden die PCR-Produkte der 1. PCR als *template* in einer Konzentration von $25 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ eingesetzt (Tab. 2.8). Auch hier wurde für jede Probe ein dreifacher Ansatz gewählt. Es wurden phosphorylierte Primer verwendet (erkennbar in Tab. 2.5 an dem Zusatz -Ph). Das Temperaturprofil für die *nested* PCR ist der Tab. 2.9 zu

entnehmen. In allen Negativkontrollen der PCR wurde das *template* durch DNase-freies H₂O ersetzt. Die dreifachen Ansätze der PCR-Produkte wurden nach der *nested* PCR zu einem Gesamtvolumen von 150 µl vereinigt und in einem 1%-igem Agarose-Gel überprüft.

Tab. 2.8: Reaktionsansatz für die *nested* PCR.

Bestandteile	Volumen
DNase-freies H ₂ O	41,75 µl
10x PCR Puffer	5,0 µl
dNTPs (je 10 mmol·µl ⁻¹)	1,0 µl
<i>fw</i> Primer (50 pmol·µl ⁻¹)	0,5 µl
<i>rv</i> Primer (50 pmol·µl ⁻¹)	0,5 µl
HotStarTaq DNA Polymerase (5 U·µl ⁻¹)	0,25 µl
PCR-Produkt aus 1. PCR (25 ng·µl ⁻¹)	1 µl
Gesamtvolumen	50 µl

Tab. 2.9: Temperaturprofil der *nested* PCR.

Schritt	Temperatur	Dauer [min]	Zyklen
Aufheizen des Deckels	105°C	-	
Initiale Denaturierung	95°C	15:00	
Denaturierung	94°C	0:45	25x
Annealing	s. Tab. 2.5	0:45	
Elongation	72°C	1:00	
Finale Elongation	72°C	5:00	

2.3.5 Aufreinigung von PCR-Produkten und photometrische Quantifizierung

Die Aufreinigung der PCR-Produkte der *nested* PCR wurde nach dem *microcentrifuge protocol* des QIAquick PCR Purification Kits (Qiagen GmbH, D-40724 Hilden) durchgeführt. Aufgrund des Probenvolumens von 150 µl musste nach Zugabe von 750 µl PB-Puffer der erste Zentrifugationsschritt zweimal erfolgen. Eluiert wurden die Proben in 50 µl EB-Puffer. Die aufgereinigten Proben wurden abweichend vom obigen Protokoll photometrisch quantifiziert. Es wurde die DNA-Konzentration der gesamten Probe unter Verwendung von Einmal-Küvetten (UVette[®], Eppendorf AG, D-22339 Hamburg) bestimmt. Basierend auf den Ergebnissen wurde im Anschluss eine Verdünnung der Proben auf eine Konzentration von 38 ng·µl⁻¹ in einem Gesamtvolumen von 26 µl (d.h. insgesamt ca. 1000 ng DNA) erstellt.

2.3.6 Einzelstrangverdau

Der Reaktionsansatz für den Einzelstrangverdau der doppelsträngigen DNA (dsDNA) ist in Tab. 2.10 dargestellt. Die Proben wurden gut vermischt und dann 45 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert.

Tab. 2.10: Reaktionsansatz für den Einzelstrangverdau.

Bestandteile	Volumen
DNase-freies H ₂ O	9,5 µl
10x λ-Exonuclease-Puffer	4,0 µl
λ-Exonuclease (5000 U·ml ⁻¹)	0,5 µl
dsDNA	26,0 µl
Gesamtvolumen	40 µl

2.3.7 Aufreinigung der ssDNA

Die Aufreinigung der ssDNA wurde nach dem *microcentrifuge protocol* des MinElute PCR Purification Kits (Qiagen GmbH, D-40724 Hilden) durchgeführt. Nach der einminütigen Inkubation bei RT, wurde die ssDNA in 10 µl EB-Puffer eluiert. Die aufgereinigte ssDNA stand nun für die Polyacrylamid-Gelelektrophorese bereit.

2.3.8 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Polyacrylamid-(PAA)-Gelelektrophorese wurde unter Verwendung des DCode™ Universal Mutation Detection Systems (BioRad GmbH, D-80939 München) durchgeführt. Als Vorbereitung für jede Elektrophorese wurden zunächst zwei Polyacrylamid-Gele (0,75 mm Spacer → 0,75 mm dünn) gegossen. Ein Gel wurde vertikal zwischen zwei Glasplatten (kleine Trägerplatte: 20 cm x 20 cm, große Platte: 20 cm x 22,4 cm) gegossen, die zuvor mit unterschiedlichen Lösungen beschichtet wurden. Die Bind Silane Lösung (Tab. 6.1), die auf die Trägerplatte aufgetragen wurde, verbessert die Hafteigenschaft des Gels an dieser Platte, wohingegen die PlusOne Repel Silane Lösung die Ablösung des Gels von der großen Platte erleichtert. Die Zusammensetzung des PAA-Gels ist in Tab. 2.11 aufgeführt.

Nach der Polymerisation für 2 h wurden die Gele in das DCode™ Universal Mutation Detection System eingebaut. Vor dem Beladen der Geltaschen wurden 10 µl der Probe mit 8 µl SSCP-Ladepuffer (Tab. 6.1) versetzt und die Proben

danach zuerst 2 min bei 95°C im Wasserbad denaturiert und 3 min auf Eis gelagert. Zu beiden Seiten der Proben wurde 7 µl eines Speziestandard (Tab. 6.1) aufgetragen. Dieser wurde freundlicherweise von Dr. M. Witzig (Universität Hohenheim) zur Verfügung gestellt. Als Laufpuffer wurde 1x TBE (Tris-Borat-EDTA) verwendet. Die Elektrophorese wurde für 22,5 h bei einer Spannung von 300 V und 20°C durchgeführt.

Tab. 2.11: Zusammensetzung eines 0,625x PAA-Gels.

Bestandteile	Volumen
MDE [®] -Gel Solution	7,8 ml
10x TBE	2,5 ml
Aq. bidest.	14,7 ml
TEMED	10 µl
40% APS	25 µl

2.3.9 Silbernitratfärbung

Zum Zweck der Visualisierung der DNA-Banden wurden die PAA-Gele nach der Elektrophorese mit Silbernitrat angefärbt. Zunächst wurde das Gel auf der Trägerplatte nach Entfernen der großen Glasplatte 30 min in 10%-iger Essigsäure auf einem Schüttler bei 52 rpm (Typ 3017, GFL GmbH, D-30938 Burgwedel) inkubiert. Nach dem dreimaligen Auswaschen der Essigsäure mit Aq. bidest. für jeweils 5 min, wurde das Gel 30 min mit 500 ml Silbernitrat-Lösung (Tab. 6.1) im Dunkeln auf dem Schüttler gefärbt. Vor der Zugabe von 600 ml Entwicklerlösung (Tab. 6.1) wurde das Gel ca. 1 min mit Aq. bidest. gespült. Der Entwicklungsschritt bestand anschließend aus zwei Phasen. Bei Erreichen der gewünschten Bandenintensität wurde das Gel 5 min in 10%-iger Essigsäure fixiert und anschließend mit Aq. bidest. gespült. Über Nacht wurden die SSCP-Gele unter dem Abzug getrocknet. Zur Auswertung wurden sie mit Hilfe eines Durchlichtscanners (ScanMaker i800, Mikrotek, D-47877 Willich) digitalisiert.

2.3.10 Analyse des Bandenmusters und statistische Auswertung

Unter Verwendung der Software GelComparII (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgien) konnten die Bandenmuster verglichen und auf Homologien untersucht werden. Zunächst wurde mit dem „rolling disk“-Mechanismus eine Subtraktion des Hintergrundes vorgenommen. Anschließend wurde eine Clusteranalyse der densitometrischen Kurven der Spuren mit dem Pearson

product-moment Korrelations-Koeffizienten durchgeführt. Das Ergebnis wurde in Form eines Dendrogramms dargestellt, indem die *Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages* (UPGMA) angewendet wurde. Die Bandenmuster der Spuren werden dabei aufgrund des Grads ihrer Ähnlichkeiten [%] verglichen und gruppiert (Clusterbildung).

Die statistische Auswertung der SSCP-Profile wurde basierend auf der Ähnlichkeitsmatrix der Clusteranalyse vorgenommen. Es wurde der Permutationstest zur Identifizierung von Behandlungseffekten und Zeiteffekten angewendet (V1-3: n=3; V4: n=4). Verwendet wurde dafür das Programm Permanova (ANDERSON 2001; ANDERSON & ROBINSON 2003). Da für diese Untersuchung meistens nur drei Beobachtungen pro Behandlung vorlagen, wäre für $p < 0,1$ eine zu hohe Anzahl an Permutationen notwendig gewesen (ANDERSON 2005). Daher wurde als Alternative eine Monte-Carlo-Simulation nach ANDERSON & ROBINSON (2003) durchgeführt, mit der signifikantere Monte Carlo p-Werte (p_{MC}) generiert wurden. Das Signifikanzniveau wurde auf $p_{MC} < 0,05$ festgesetzt. Nach der Ermittlung eines Behandlungseffektes wurde ein paarweiser Vergleich (*pair-wise a posteriori comparison*) der einzelnen Behandlungen durchgeführt.

2.4 Identifikation einzelner Banden aus dem SSCP-Gel

Um Informationen über die phylogenetische Zuordnung der Nucleotid-Sequenzen bzw. der Mikroorganismen zu gewinnen, die sich hinter einer Bande verbergen, oder diejenigen Mikroorganismen zu charakterisieren, die für Veränderungen in der Population verantwortlich sind, wurden die entsprechenden Banden aus dem SSCP-Gel mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten. Das SSCP-Gel wurde hierfür auf einem Leuchttisch (White Light 2000, BioRad GmbH, D-80939 München) ausgeleuchtet. Die ausgeschnittene Bande wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

2.4.1 Crush & Soak-Methode (SAMBROOK & RUSSEL 2001)

Zu der aus dem SSCP-Gel ausgeschnittenen Bande wurde 50 µl 37°C warmer Crush & Soak-Puffer (Tab. 6.1) gegeben. Nachdem das Gelstück weicher geworden war, wurde es mit der Pipettenspitze in mehrere Stücke zerteilt. Die Inkubation erfolgte bei 37°C für 3 h bei ca. 600 rpm in einem Thermomixer (Thermomixer comfort, Eppendorf AG, D-22339 Hamburg). Von der überstehenden Flüssigkeit wurden 40 µl in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Hierzu wurde zum Fällern der gelösten DNA 80 µl 96%-iges Ethanol gegeben. Nach dem Invertieren wurde der Fällungsschritt ün bei -20°C durchgeführt. Die anschließende Zentrifugation fand bei 4°C für 15 min und 13.000 g statt. Nach der Abnahme des Überstands wurde das DNA-Pellet 20 min bei 37°C getrocknet und in 12 µl DNase-freiem H₂O resuspendiert. Die Konzentration der ssDNA wurde photometrisch bestimmt (Kapitel 2.3.2). Die Proben wurden für den Einsatz in der nachfolgenden Reamplifikations-PCR auf eine Konzentration von 25 ng·µl⁻¹ mit DNase-freiem H₂O verdünnt.

2.4.2 Reamplifikations-PCR

Vor der Klonierung musste die ssDNA, die die ausgeschnittene Bande gebildet hatte, reamplifiziert werden, so dass genügend dsDNA zur Verfügung stand. Dafür wurden die Primer der *nested* PCR der entsprechenden Mikroorganismen-Gruppe verwendet, wobei die *reverse* Primer jedoch keinen Phosphat-Rest aufwiesen (Tab. 2.5). Dieser hätte sich bei der Ligationsreaktion störend auswirken können. Der Reaktionsansatz für die PCR ist Tab. 2.12 zu entnehmen. Für jede Probe wurde ein doppelter Ansatz verwendet. Die Parameter für den Thermocycler

entsprachen denjenigen der *nested* PCR (Tab. 2.9). Nach der Überprüfung der Größe der PCR-Produkte in einem 1%-igen Agarose-Gel (Kapitel 2.3.3), wurden die PCR-Produkte unter Verwendung des MinElute PCR Purification Kits aufgereinigt und in 10 μl DNase-freiem H_2O eluiert (Kapitel 2.3.7). Eine anschließende photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration (Kapitel 2.3.2) sollte sicherstellen, dass für die Ligation genügend PCR-Produkt eingesetzt wird.

Tab. 2.12: Reaktionsansatz der Reamplifikations-PCR.

Bestandteile	Volumen
DNase-freies H_2O	40,75 μl
10x PCR Puffer	5,0 μl
dNTPs (je 10 $\text{mmol}\cdot\mu\text{l}^{-1}$)	1,0 μl
<i>fw</i> Primer (50 $\text{pmol}\cdot\mu\text{l}^{-1}$)	0,5 μl
<i>rv</i> Primer (50 $\text{pmol}\cdot\mu\text{l}^{-1}$)	0,5 μl
HotStarTaq DNA Polymerase (5 $\text{U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$)	0,25 μl
PCR-Produkt aus 1. PCR (25 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$)	2 μl
Gesamtvolumen	50 μl

2.4.3 Klonierung

Da sich hinter einer ausgeschnittenen Bande aus dem SSCP-Gel durchaus mehr als eine Nucleotid-Sequenz oder Mikroorganismen-Spezies verbergen kann (SCHMALENBERGER & TEBBE 2003), war es notwendig, vor der erfolgreichen Sequenzierung der reamplifizierten 16S rRNA-Genabschnitte eine Vereinzelung bzw. Selektion der Fragmente vorzunehmen. Dies wurde durch eine Klonierung erzielt. Dabei wird zunächst genau ein DNA-Fragment in ein Plasmid (Vector) eingefügt (Ligation). Im Anschluss daran wird genau ein Vector in eine kompetente (zur Aufnahme bereite) bakterielle Zelle verbracht (Transformation). Diese Zellen werden dann vermehrt und stellen durch ihre genetische Identität zur Original-Zelle Klone dieser dar. Man erhält eine Vielzahl identischer 16S rRNA-Genabschnitte, die im Vector der bakteriellen Zelle vorliegen, und hat auf diese Weise eine Vereinzelung/Selektion der Fragmente erreicht.

2.4.3.1 Ligation

Mit dem pGEM[®]-T Vector System II (Promega Corporation, Madison WI, USA) wurde das reamplifizierte PCR-Produkt in den pGEM[®]-T Vector ligiert (Abb. 2.8).

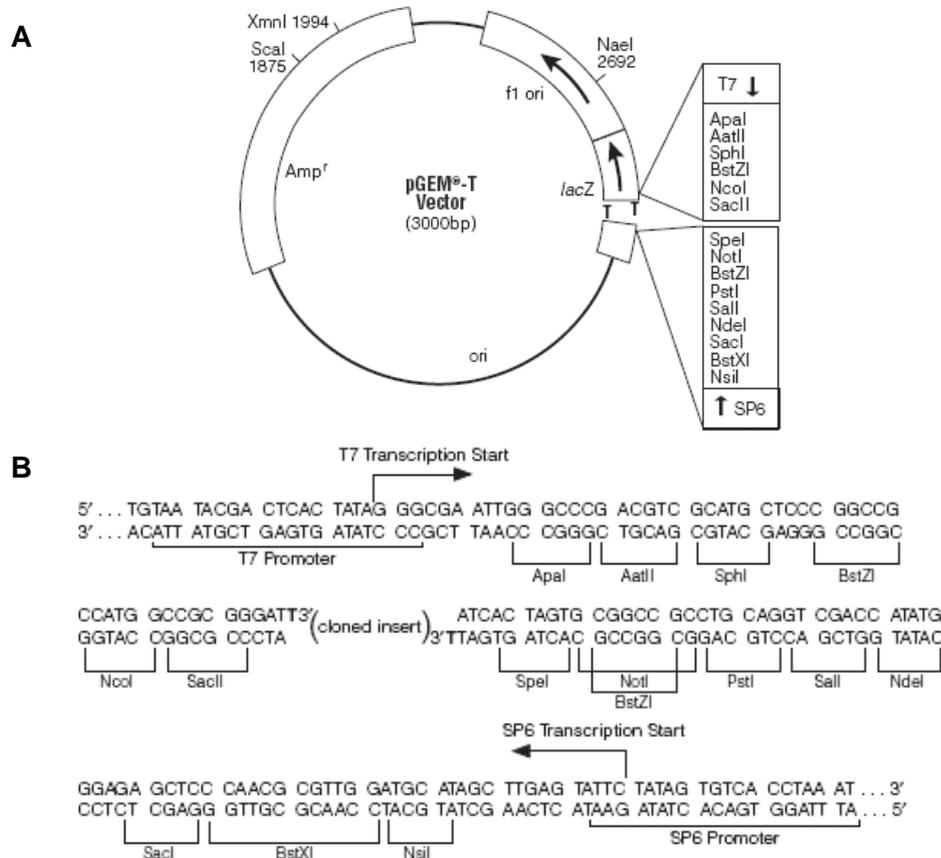


Abb. 2.8: pGEM[®]-T Vector Karte und Referenzpunkte der Sequenz (A); Der Promotor und die multiple Klonierungssequenz des pGEM[®]-T Vectors (B; beides: Technical Manual, Promega Corporation).

Vor dem Ansetzen der Ligrationsreaktion entsprechend der Tab. 2.13 wurde der Vector kurz anzentrifugiert und der 2x Rapid Ligation Puffer gut gemischt (VF2, Janke & Kunkel, IKA[®]-Labortechnik, D-79219 Staufen). Nach dem Vermischen des Reaktionsansatzes erfolgte eine Inkubation üN bei 4°C.

Tab. 2.13: Reaktionsansatz für die Ligation.

Bestandteile	Volumen
2x Rapid Ligation Puffer	5,0 µl
pGEM [®] -T Vector (50 ng)	1,0 µl
T4 DNA Ligase (3 Weiss U·µl ⁻¹)	1,0 µl
PCR-Produkt (aufgereinigt)	1,0 µl
DNase-freies H ₂ O	2,0 µl
Gesamtvolumen	10 µl

2.4.3.2 Transformation

Alle Arbeiten mit bakteriellen Zellen erfolgten unter der Sterilbank (HERASafe, Heraeus Instruments GmbH, D-63450 Hanau). Nach der kurzen Anzentrifugation des Ligationsansatzes wurden 1,7 μl in ein neues Reaktionsgefäß auf Eis überführt. 30 μl der langsam auf Eis aufgetauten kompetenten Zellen (*Escherichia coli* JM 109; Promega Corporation, Madison WI, USA) wurden nach kurzem Vermischen zum Ligationsansatz pipettiert. Der Transformationsansatz wurde danach 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde ein Hitzeschock für 45 s bei 42°C im Wasserbad durchgeführt, und der Ansatz erneut für 2 min auf Eis gelagert. Zum Hochschütteln der transformierten Zellen für 90 min bei 37°C und 150 rpm im Brutschrank (Typ 3031, GFL GmbH, D-30938 Burgwedel) wurden 570 μl SOC-Medium zugegeben. Es wurden Platten mit LB-Agar (Tab. 6.1) gegossen, welcher 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Ampicillin enthielt. Da der pGEM[®]-T Vector einen Selektionsmarker für Ampicillin trägt, werden auf den Agar-Platten nur *Bacteria* wachsen, die erfolgreich mit dem Vector transformiert wurden. Vor dem Ausplattieren von 100 μl der transformierten Zellen wurden 60 μl der IPTG-Lösung (Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid) und 40 μl der X-Gal-Lösung (5-Bromo-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid) für die Blau-weiß-Selektion pro Platte ausgebracht. Die Platten wurden üN im Brutschrank (Heraeus Instruments GmbH, D-63450 Hanau) bei 37°C inkubiert.

Nach dem Prinzip der Blau-weiß-Selektion wird eine erfolgreiche Ligation des gewünschten PCR-Produkts in den Vector durch eine weiße Färbung der *Bacteria*-Kolonie angezeigt, wohingegen blaue Kolonien als negativ zu beurteilen sind. Das zugegebene X-Gal wird durch das Enzym β -Galactosidase hydrolysiert, wobei eine Blaufärbung auftritt. Ist das Gen für β -Galactosidase unterbrochen, so kommt es nicht zur Synthese, und die Kolonien erscheinen weiß. Am nächsten Morgen wurden daher pro Platte acht weiße Kolonien mit der Pipettenspitze gepickt, auf Agar-Platten ausgestrichen und üN bei 37°C inkubiert. Drei der acht Kolonien wurden außerdem in 50 μl Lysispuffer (Tab. 6.1) gelöst und die Klone für den Aufschluss der bakteriellen Zellwand und der Gewinnung der DNA bei 95°C für 15 min im Wasserbad denaturiert. Nach der Zugabe von 450 μl DNase-freiem H₂O wurden die Proben homogenisiert und die Zelltrümmer bei 8.000 g und 4°C abzentrifugiert. Aus dem Überstand wurde 1 μl entnommen und die darin gelöste DNA als *template* für eine nachfolgende PCR eingesetzt, die der *nested* PCR in

Kapitel 2.3.4 entsprach. Auf diese Weise konnte das zuvor in den Vector eingefügte PCR-Produkt (das sog. Insert) vervielfältigt werden.

Vor der Identifizierung der Mikroorganismen-Spezies, die im SSCP-Gel die Bande hervorgerufen hatte, wurde eine weitere SSCP-Analyse durchgeführt. In dieser wurde die Laufhöhe der isolierten Insert-DNA der ausgewählten Klon mit der Original-Probe, aus der die Bande ausgeschnitten wurde, im Gel verglichen. Dafür wurden die bereits oben beschriebenen Schritte für die isolierte Insert-DNA durchgeführt (ab Kapitel 2.3.5). Für die nachfolgende Plasmid-Präparation wurde dann derjenige Klon verwendet, der sich im SSCP-Gel auf einer Höhe mit der ausgeschnittenen Bande befand.

2.4.4 Plasmid-Präparation

Zunächst wurden die Klone erneut von der Original-Agar-Platte gepickt, in 5 ml LB-Medium (+ 10 µl Ampicillin-Lösung) gelöst und üN bei 37°C und 150 rpm im Brutschrank hochgezüchtet. Zur Isolation der Plasmide aus 3 ml der angezüchteten Zellen wurde das PureYield Plasmid Miniprep System (Promega Corporation, Madison WI, USA) verwendet. Eluiert wurden die Plasmide einer Probe in 30 µl DNase-freiem H₂O. Die Konzentration der DNA wurde photometrisch bestimmt.

2.4.5 Anlegen von Glycerol-Stocks

Parallel zur Plasmid-Präparation wurden 600 µl der angezüchteten Zellen bei RT und 317 g für 5 min zentrifugiert und die Überstände verworfen. Das Pellet wurde anschließend in 300 µl 15%-iger Glycerol-Lösung resuspendiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Gelagert wurden die Kulturen bei -80°C.

2.4.6 Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde durch die Firma GATC Biotech AG (D-78467 Konstanz) direkt vom Plasmid durchgeführt. Dabei macht man sich den Aufbau des Vectors zu Nutze. Das Insert wird zu beiden Seiten von je einem RNA Polymerase Promotor (SP6 oder T7) flankiert, deren Nucleotid-Sequenzen bekannt sind. Die Primer für die Sequenzierung sind daher komplementär zu diesen Regionen und werden SP6 und T7 genannt. Zur Identifizierung der Spezies wurden die

erhaltenen Nucleotid-Sequenzen mit der Datenbank des Ribosomal Database Project (RDP) verglichen (LARSEN *et al.* 1993).

3 ERGEBNISSE

Der Einfluss von Fumarsäure (FS) auf den mikrobiellen Stoffwechsel sowie auf die Struktur der mikrobiellen Gemeinschaft wurde in den RUSITEC-Fermentern sowohl in Verbindung mit Gras- als auch mit Maissilage als Grundfutter untersucht. Aufgrund dessen werden die Ergebnisse im Folgenden separat voneinander beschrieben.

3.1 Fumarsäure und Grassilage

Der Einfluss von FS in Kombination mit Grassilage wurde in drei identisch aufgebauten RUSITEC-Versuchen (V1, V2, V3) getestet. Die Anzahl von drei Versuchen wurde gewählt, um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse bewerten zu können.

3.1.1 RUSITEC-Versuche

3.1.1.1 pH-Werte

Insgesamt lagen die pH-Werte mit 6,6 bis 6,8 für alle Behandlungen und für alle Versuche innerhalb des Bereichs, der für den physiologischen pH-Wert im Pansen bekannt ist. In allen drei Versuchen konnte ein signifikanter Einfluss von FS auf den pH-Wert festgestellt werden (Tab. 3.1, Abb. 3.1). Die Zugabe von FS bewirkte eine Absenkung des pH-Werts gegenüber der Kontrolle. Für die Versuche 1 (V1) und 3 (V3) wurde zudem ein Zeiteffekt festgestellt.

Die Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Versuche zeigte, dass keine signifikanten Unterschiede zwischen den pH-Werten der drei Versuche innerhalb der Behandlung mit $3,38 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ FS für die gesamte Versuchsphase auftraten (Abb. 3.1). Es ergab sich ein Einfluss des Faktors Versuch ($p < 0,05$; V2 vs. V3) auf die pH-Werte der Kontrollen. Die pH-Werte der mit $6,76 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ FS behandelten Fermenter in V3 waren signifikant verschieden von denen in V1 und V2.

Ergebnisse

Tab. 3.1: Ergebnisse der two-way ANOVA für die pH-Werte von V1, V2 und V3 für die gesamte Versuchsphase ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; n=4). Behandlung: V1, V2, V3: Kontrolle vs. 3,38 mmol·d⁻¹ FS, Kontrolle vs. 6,76 mmol·d⁻¹ FS, 3,38 mmol·d⁻¹ FS vs. 6,76 mmol·d⁻¹ FS.

Varianzursache	V1	V2	V3
Behandlung	p<0,001	p<0,001	p<0,001
Zeit	p<0,05	n.s.	p<0,05
Behandlung x Zeit	n.s.	n.s.	n.s.

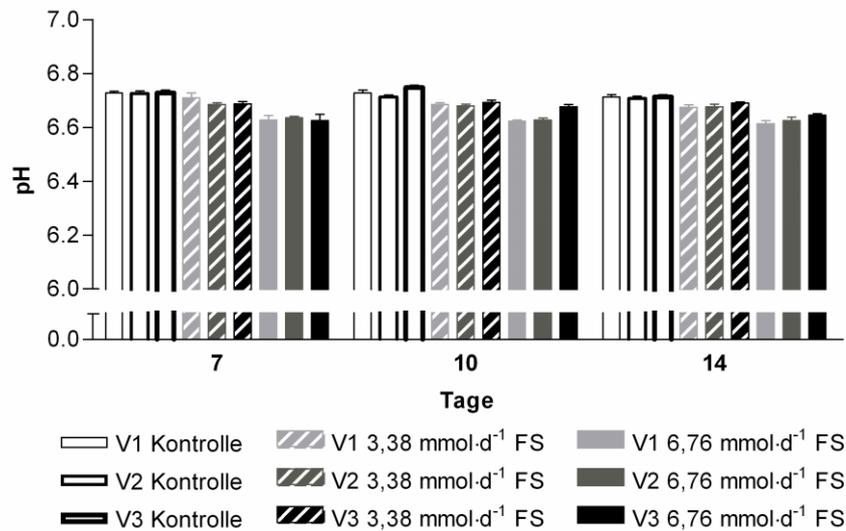


Abb. 3.1: pH-Werte der Versuche (V1, V2, V3) für die Kontrollen und Fumarsäure-Behandlungen (FS) ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; n=4). Ergebnisse der two-way ANOVA für die gesamte Versuchsphase: Kontrolle: Versuch p<0,05 (V2 vs. V3), Zeit n.s.; 3,38 mmol·d⁻¹ FS: Versuch n.s., Zeit n.s.; 6,76 mmol·d⁻¹ FS: Versuch p<0,01 (V1 vs. V3, V2 vs. V3), Zeit n.s., Versuch x Zeit p<0,05.

3.1.1.2 Redoxpotentiale

Die Redoxpotentiale nahmen Werte von -170 mV bis -300 mV an (Abb. 3.2). Die Zugabe von FS hatte keinen Einfluss auf das Redoxpotential der drei Versuche (Tab. 3.2). Ein Zeiteffekt war bei den Versuchen unterschiedlich stark ausgeprägt.

Der Faktor Versuch hatte einen signifikanten Einfluss auf das Redoxpotential (Abb. 3.2). Es traten Unterschiede im Redoxpotential zwischen allen Versuchen innerhalb der Kontrollen und der Zugabe von 3,38 mmol·d⁻¹ FS auf ($p < 0,001$: V1 vs. V2, V1 vs. V3, V2 vs. V3). Außerdem unterschied sich V3 bei der Zugabe von 6,76 mmol·d⁻¹ FS von V1 und V2 ($p < 0,001$).

Tab. 3.2: Ergebnisse der two-way ANOVA für die Redoxpotentiale von V1, V2 und V3 für die gesamte Versuchsphase ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; $n=4$).

Varianzursache	V1	V2	V3
Behandlung	n.s.	n.s.	n.s.
Zeit	$p < 0,05$	$p < 0,001$	$p < 0,001$
Behandlung x Zeit	n.s.	n.s.	n.s.

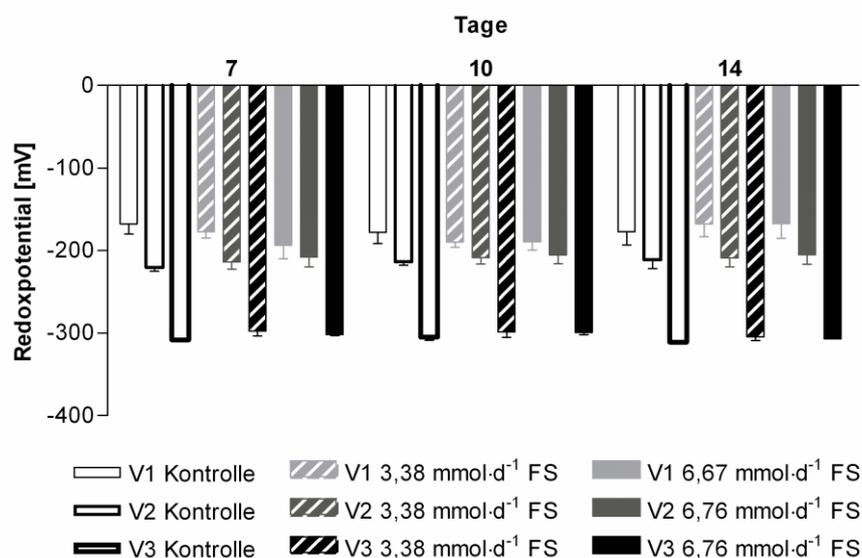


Abb. 3.2: Redoxpotentiale der Versuche (V1, V2, V3) für die Kontrollen und Fumarsäure-Behandlungen (FS) ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; $n=4$). Ergebnisse der two-way ANOVA für die gesamte Versuchsphase: Kontrolle: Versuch $p < 0,001$ (V1 vs. V2, V1 vs. V3, V2 vs. V3), Zeit n.s., Versuch x Zeit $p < 0,01$; 3,38 mmol·d⁻¹ FS: Versuch $p < 0,001$ (V1 vs. V2, V1 vs. V3, V2 vs. V3), Zeit n.s., Versuch x Zeit $p < 0,05$; 6,76 mmol·d⁻¹ FS: Versuch $p < 0,001$ (V1 vs. V3, V2 vs. V3), Zeit n.s..

3.1.1.3 Produktion der SCFA

Insgesamt wurden pro Tag in den Kontroll-Fermentern 35-40 mmol, in den mit 3,38 mmol·d⁻¹ FS behandelten 37-42 mmol und in den mit 6,76 mmol·d⁻¹ FS versorgten Fermentern 40-47 mmol SCFA produziert (Abb. 3.3). In allen Versuchen bewirkte die Zugabe von 6,76 mmol·d⁻¹ FS eine signifikant gesteigerte Produktion der SCFA (Tab. 3.3). In V2 und V3 hatte die Zeit einen signifikanten Einfluss auf die SCFA-Produktion.

Die Behandlungen führten bei den drei Versuchen zu denselben Ergebnissen. Es konnte keine Beeinflussung der SCFA-Produktion durch den Faktor Versuch festgestellt werden (Abb. 3.3).

Tab. 3.3: Ergebnisse der two-way ANOVA für die SCFA-Produktion in V1, V2 und V3 für die gesamte Versuchsphase ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; n=4). Behandlung: V1, V2, V3: Kontrolle vs. 6,76 mmol·d⁻¹ FS; V1, V3: 3,38 mmol·d⁻¹ FS vs. 6,76 mmol·d⁻¹ FS.

Varianzursache	V1	V2	V3
Behandlung	p<0,001	p<0,01	p<0,01
Zeit	n.s.	p<0,01	p<0,05
Behandlung x Zeit	n.s.	n.s.	n.s.

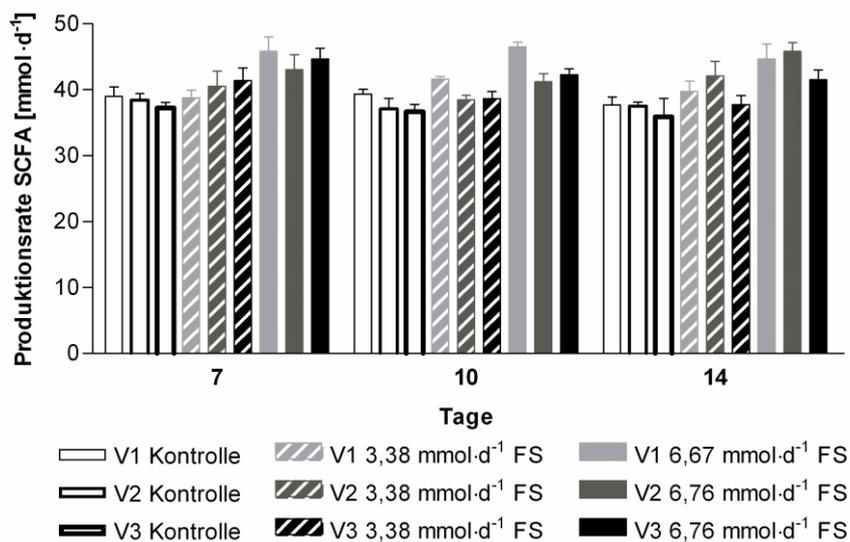


Abb. 3.3: Produktion der gesamten SCFA der Versuche (V1, V2, V3) für die Kontrollen und Fumarsäure-Behandlungen (FS) ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; n=4). Ergebnisse der two-way ANOVA für die gesamte Versuchsphase: Kontrolle: Versuch n.s., Zeit n.s.; 3,38 mmol·d⁻¹ FS: Versuch n.s., Zeit n.s., Versuch x Zeit p<0,05; 6,76 mmol·d⁻¹ FS: Versuch n.s., Zeit n.s., Versuch x Zeit p<0,05.

Acetat-Produktion

Die tägliche Acetat-Produktion belief sich auf Werte zwischen 19-24 mmol (Abb. 3.4). Eine Behandlung mit 6,76 mmol·d⁻¹ FS führte nur für V1 und V3 zu einer signifikant erhöhten Produktion gegenüber der Kontrolle (Tab. 3.4). In V2 konnte eine Beeinflussung der Acetat-Produktion durch FS nicht statistisch abgesichert werden. Für V1 und V2 wurde außerdem ein Zeiteffekt verzeichnet.

Innerhalb beider FS-Behandlungen und der Kontrollen kam es zu versuchsbedingten Unterschieden in der Acetat-Produktion (Abb. 3.4). Während V3 signifikant niedrigere Produktionsraten als V1 und V2 in den Kontroll-Fermentern aufwies, zeigte sich in V1 eine signifikant höhere Produktion innerhalb der mit 6,76 mmol·d⁻¹ FS behandelten Fermenter gegenüber V2 und V3. Bei den mit 3,38 mmol·d⁻¹ FS behandelten Fermentern unterschied sich V2 von beiden anderen Versuchen signifikant.

Tab. 3.4: Ergebnisse der two-way ANOVA für die Acetat-Produktion in V1, V2 und V3 für die gesamte Versuchsphase ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; n=4). Behandlung: V1: 3,38 mmol·d⁻¹ FS vs. 6,76 mmol·d⁻¹ FS; V1, V3: Kontrolle vs. 6,76 mmol·d⁻¹ FS.

Varianzursache	V1	V2	V3
Behandlung	p<0,01	n.s.	p<0,05
Zeit	p<0,01	p<0,001	n.s.
Behandlung x Zeit	n.s.	n.s.	n.s.

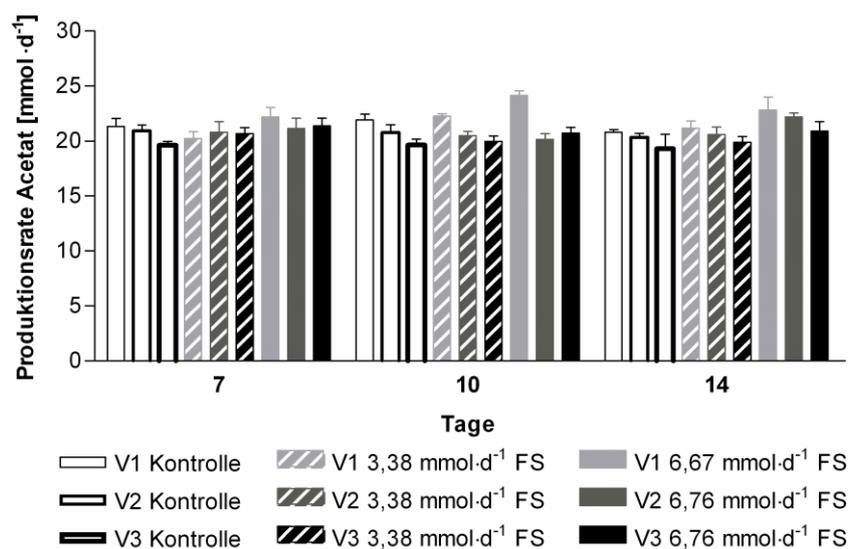


Abb. 3.4: Acetat-Produktion der Versuche (V1, V2, V3) für die Kontrollen und Fumarsäure-Behandlungen (FS) ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; n=4). Ergebnisse der two-way ANOVA für die gesamte Versuchsphase: Kontrolle: Versuch p<0,001 (V1 vs. V3, V2 vs. V3), Zeit n.s.; 3,38 mmol·d⁻¹ FS: Versuch p<0,05 (V1 vs. V2, V2 vs. V3), Zeit n.s., Versuch x Zeit p<0,001; 6,76 mmol·d⁻¹ FS: Versuch p<0,05 (V1 vs. V2, V1 vs. V3), Zeit n.s., Versuch x Zeit p<0,05.

Propionat-Produktion

Die Propionat-Produktion lag bei den Kontrollen täglich bei etwa 9 mmol und wurde bei allen drei Versuchen durch Zugabe von 6,76 mmol·d⁻¹ FS signifikant auf Werte von etwa 15 mmol pro Tag gesteigert (Tab. 3.5, Abb. 3.5). Ein signifikanter Einfluss der Zeit wurde für V2 beobachtet (p<0,001).

Innerhalb der Behandlung mit 3,38 mmol·d⁻¹ FS wurde eine signifikante Steigerung der Propionat-Produktion von V2 gegenüber V1 und V3 beobachtet (Abb. 3.5; p<0,05). Weder innerhalb der Kontrollen noch in der hohen FS-Dosierung (6,76 mmol·d⁻¹) zeigten sich versuchsbedingte Unterschiede. Die Behandlung hat daher bei den drei Versuchen eine signifikant gesteigerte Propionat-Produktion durch FS-Zugabe bewirkt.

Tab. 3.5: Ergebnisse der two-way ANOVA für die Propionat-Produktion von V1, V2 und V3 für die gesamte Versuchsphase ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; n=4). Behandlung: V2, V3: Kontrolle vs. 3,38 mmol·d⁻¹ FS; V1, V2, V3: Kontrolle vs. 6,76 mmol·d⁻¹ FS, 3,38 mmol·d⁻¹ FS vs. 6,76 mmol·d⁻¹ FS.

Varianzursache	V1	V2	V3
Behandlung	p<0,001	p<0,01	p<0,001
Zeit	n.s.	p<0,001	n.s.
Behandlung x Zeit	n.s.	n.s.	n.s.

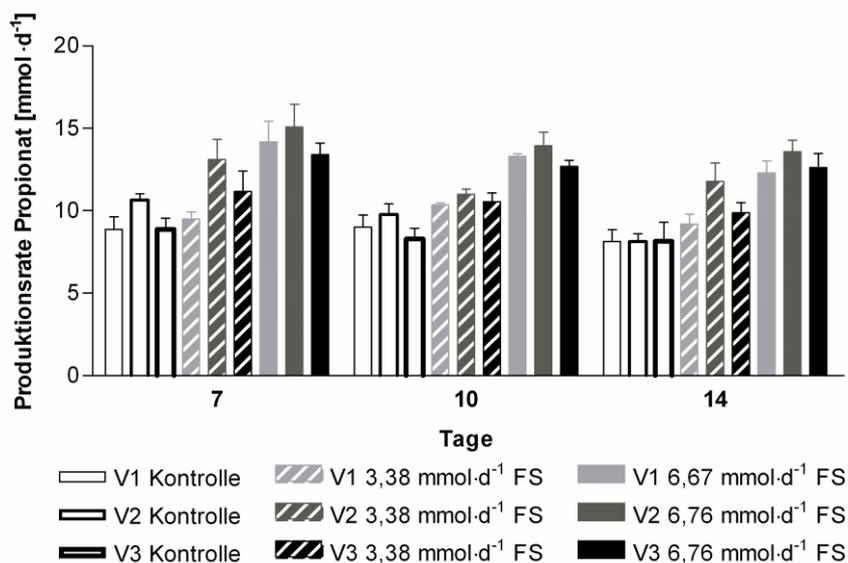


Abb. 3.5: Propionat-Produktion der Versuche (V1, V2, V3) für die Kontrollen und Fumarsäure-Behandlungen (FS) ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; n=4). Ergebnisse der two-way ANOVA für die gesamte Versuchsphase: Kontrolle: Versuch n.s., Zeit p<0,001; 3,38 mmol·d⁻¹ FS: Versuch p<0,05 (V1 vs. V2, V2 vs. V3), Zeit p<0,05, Versuch x Zeit p<0,05; 6,76 mmol·d⁻¹ FS: Versuch n.s., Zeit p<0,05.

Butyrat-Produktion

Für Butyrat wurden tägliche Produktionsraten von 3 mmol ermittelt (Abb. 3.6). Es konnten weder bei V1, V2 noch bei V3 Behandlungseffekte durch FS nachgewiesen werden (Tab. 3.6). Die statistische Auswertung ergab einen Einfluss des Faktors Zeit für V2 und V3.

Beim Vergleich von V1, V2 und V3 bezüglich der Behandlungen wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchen detektiert (Abb. 3.6).

Tab. 3.6: Ergebnisse der two-way ANOVA für die Butyrat-Produktion von V1, V2 und V3 für die gesamte Versuchsphase ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; n=4).

Varianzursache	V1	V2	V3
Behandlung	n.s.	n.s.	n.s.
Zeit	n.s.	p<0,001	p<0,05
Behandlung x Zeit	n.s.	n.s.	n.s.

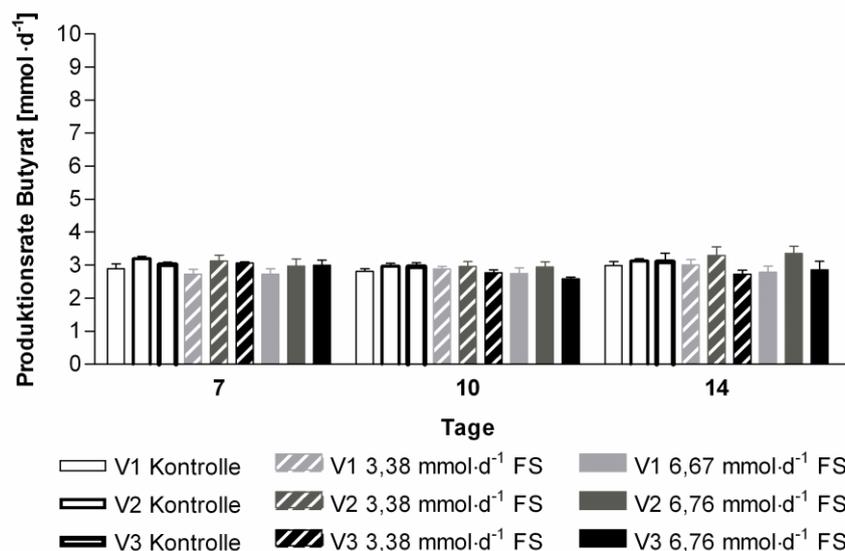


Abb. 3.6: Butyrat-Produktion der Versuche (V1, V2, V3) für die Kontrollen und Fumarsäure-Behandlungen (FS) ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; n=4). Ergebnisse der two-way ANOVA für die gesamte Versuchsphase: Kontrolle: Versuch n.s., Zeit n.s.; 3,38 mmol·d⁻¹ FS: Versuch n.s., Zeit n.s.; 6,76 mmol·d⁻¹ FS: Versuch n.s., Zeit n.s..

Isovalerat-Produktion

Für die tägliche Produktion des Isovalerats wurden Werte von 6 mmol erreicht (Abb. 3.7). Ein FS-Effekt trat nur für V1 auf (Tab. 3.7). Die Zugabe von FS führte hier zu einer signifikant gesteigerten Produktion (p<0,05). Für alle drei Versuche wurde unabhängig voneinander ein signifikanter Einfluss der Zeit auf die Isovalerat-Produktion ermittelt (p<0,001). Dieser Effekt ist in Abb. 3.7 zumindest

für V2 und V3 deutlich zu erkennen. In V2 kam es im Gegensatz zu V3 zu einer zeitlichen Zunahme der Isovalerat-Produktion von etwa 2 mmol an Tag 7 auf etwa 5 mmol an Tag 14.

Es ergaben sich versuchsbedingte Unterschiede innerhalb der Kontrollen und der FS-Behandlungen (Abb. 3.7; $p < 0,001$). Die varianzanalytische Auswertung der Kontrollen und der Behandlung mit $3,38 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ FS zeigte signifikant erniedrigte Produktionsraten für Isovalerat in V2 verglichen mit V1 und V3. Für die Behandlung mit $6,76 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ FS waren alle Versuche signifikant voneinander verschieden ($p < 0,001$).

Tab. 3.7: Ergebnisse der two-way ANOVA für die Isovalerat-Produktion von V1, V2 und V3 für die gesamte Versuchsphase ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; $n=4$). Behandlung: V1: Kontrolle vs. $3,38 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ FS, Kontrolle vs. $6,76 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ FS.

Varianzursache	V1	V2	V3
Behandlung	$p < 0,05$	n.s.	n.s.
Zeit	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$
Behandlung x Zeit	n.s.	n.s.	n.s.

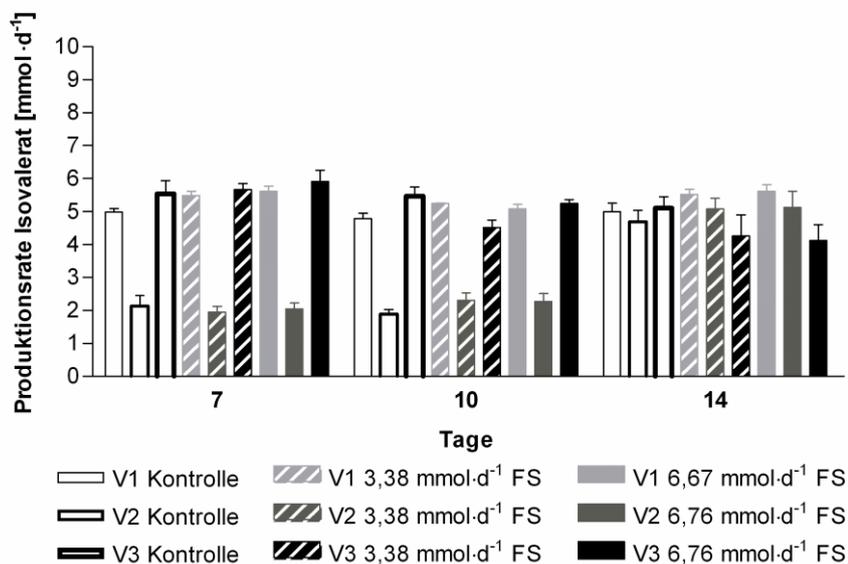


Abb. 3.7: Isovalerat-Produktion der Versuche (V1, V2, V3) für die Kontrollen und Fumarsäure-Behandlungen (FS) ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; $n=4$). Ergebnisse der two-way ANOVA für die gesamte Versuchsphase: Kontrolle: Versuch $p < 0,001$ (V1 vs. V2, V2 vs. V3), Zeit $p < 0,001$, Versuch x Zeit $p < 0,001$; $3,38 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ FS: Versuch $p < 0,001$ (V1 vs. V2, V2 vs. V3), Zeit $p < 0,001$, Versuch x Zeit $p < 0,001$; $6,76 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ FS: Versuch $p < 0,001$ (V1 vs. V2, V1 vs. V3, V2 vs. V3), Zeit $p < 0,001$, Versuch x Zeit $p < 0,001$.

Valerat-Produktion

Die Produktionsraten für Valerat betragen in V1 und V3 etwa 1 mmol pro Tag, wobei durch Zugabe von FS keine signifikanten Unterschiede zu den Kontrollfermentern auftraten (Abb. 3.8, Tab. 3.8). In V2 lagen die täglichen Produktionsraten bei allen Behandlungen mit Werten von 1-2 mmol insgesamt signifikant höher als bei V1 und V3 (Abb. 3.8; $p < 0,001$). Die Zugabe von $6,76 \text{ mmol} \cdot \text{d}^{-1}$ FS in V2 bewirkte eine signifikante Erhöhung der Valerat-Produktion ($p < 0,05$). Ein zeitlicher Einfluss wurde für V2 und V3 festgestellt.

Zwischen V1 und V3 konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Kontrollen und der FS-Behandlungen festgestellt werden (Abb. 3.8).

Tab. 3.8: Ergebnisse der two-way ANOVA für die Valerat-Produktion von V1, V2 und V3 für die gesamte Versuchsphase ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; $n=4$). Behandlung: V2: Kontrolle vs. $6,76 \text{ mmol} \cdot \text{d}^{-1}$ FS.

Varianzursache	V1	V2	V3
Behandlung	n.s.	$p < 0,05$	n.s.
Zeit	n.s.	$p < 0,001$	$p < 0,05$
Behandlung x Zeit	n.s.	n.s.	n.s.

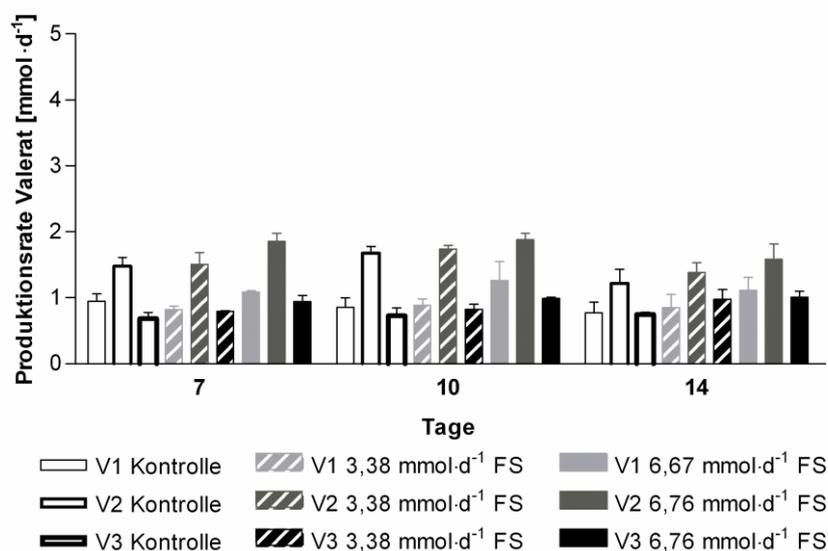


Abb. 3.8: Valerat-Produktion der Versuche (V1, V2, V3) für die Kontrollen und Fumarsäure-Behandlungen (FS) ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; $n=4$). Ergebnisse der two-way ANOVA für die gesamte Versuchsphase: Kontrolle: Versuch $p < 0,001$ (V1 vs. V2, V2 vs. V3), Zeit n.s.; $3,38 \text{ mmol} \cdot \text{d}^{-1}$ FS: Faktor Versuch $p < 0,001$ (V1 vs. V2, V2 vs. V3), Zeit n.s., Versuch x Zeit $p < 0,001$; $6,76 \text{ mmol} \cdot \text{d}^{-1}$ FS: Versuch $p < 0,001$ (V1 vs. V2, V2 vs. V3), Zeit n.s..

3.1.1.4 Molare Anteile der SCFA im Inokulum

Für die bessere Vergleichbarkeit zwischen den Versuchen wurden aus den SCFA-Konzentrationen (Tab. 6.12) der für die Inokulation verwendeten Pansenflüssigkeit an den Starttagen der Versuche die molaren Anteile errechnet (Abb. 3.9).

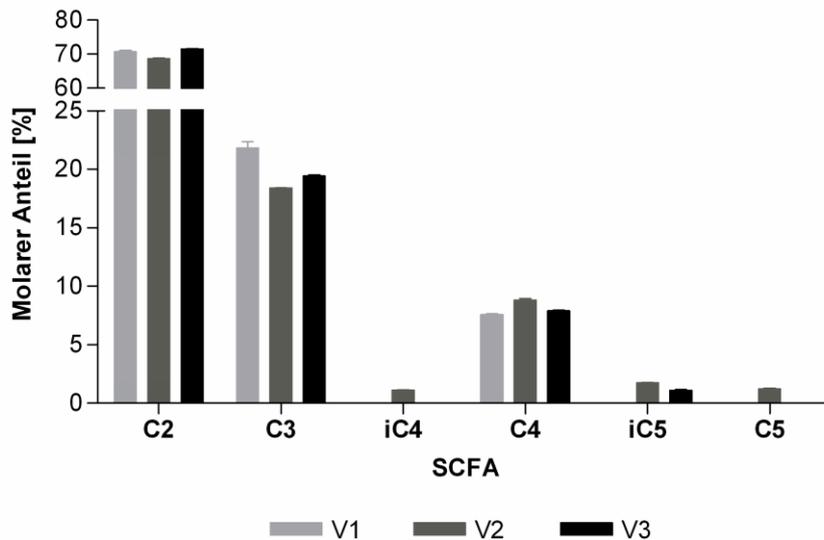


Abb. 3.9: Molare Anteile der SCFA in der Pansenflüssigkeit, die für die Inokulation der Versuche (V1, V2, V3) aus demselben Rind entnommen wurde ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; $n=3$; C2=Acetat, C3=Propionat; iC4=Isobutyrat; C4=Butyrat; iC5=Isovalerat; C5=Valerat). Ergebnisse der one-way ANOVA: C2: $p<0,01$ (V1 vs. V2; V2 vs. V3); C3: $p<0,01$ (V1 vs. V2; V1 vs. V3); iC4: $p<0,001$ (V1 vs. V2; V2 vs. V3); C4: $p<0,001$ (V1 vs. V2; V2 vs. V3); iC5: $p<0,001$ (V1 vs. V2; V1 vs. V3; V2 vs. V3); C5: $p<0,001$ (V1 vs. V2; V2 vs. V3); Werte fehlender Säulen lagen unter der Nachweisgrenze ($<0,3 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$).

Die Konzentrationen des Acetats (C2) lagen bei $50\text{-}60 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (Tab. 6.12). Dies entsprach molaren Acetat-Anteilen von bis zu 70%, wobei im Vergleich mit V1 und V3 der molare Acetat-Anteil in V2 mit 68% signifikant am niedrigsten ausfiel ($p<0,01$). Die Konzentrationen des Propionats (C3) lagen bei $14,0\text{-}16,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (Tab. 6.12). Während sich V2 und V3 im molaren Propionat-Anteil mit 18-19% nicht signifikant voneinander unterschieden, war der Propionat-Anteil mit 22% in V1 signifikant höher ($p<0,01$). In V1 und V3 konnte kein Isobutyrat (iC4) nachgewiesen werden. Die Isobutyrat-Konzentration lag in V2 bei $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (Tab. 6.30), dies entsprach einem molaren Isobutyrat-Anteil von etwa 1%. Die Konzentrationen des Butyrats (C4) lagen bei $5,7\text{-}7,7 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (Tab. 6.12). Daraus ergaben sich molare Butyrat-Anteile von 7-8%. Es traten dabei signifikante Unterschiede zwischen allen Versuchen auf ($p<0,001$). Die Konzentrationen des Isovalerats (iC5) konnten mit $0,8\text{-}1,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (Tab. 6.12) nur für V2 und V3

bestimmt werden. In V1 lag die Isovalerat-Konzentration unter der Nachweisgrenze ($<0,3 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$). Der molare Isovalerat-Anteil lag in V2 bei 2% und in V3 bei 1%. Alle Versuche unterschieden sich signifikant voneinander ($p<0,001$). Valerat (C5) konnte mit einer Konzentration von $1,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (Tab. 6.12) nur in V2 nachgewiesen werden. Dies entsprach einem molaren Anteil von etwa 1%.

3.1.1.5 Molare Anteile der SCFA in den Fermentern

Molare Acetat-Anteile

Die molaren Acetat-Anteile an der Gesamtproduktion der SCFA lagen bei V1, V2 und V3 bei 48-56%. Die Zugabe von FS führte bei den drei Versuchen zu signifikanten Abnahmen der molaren Acetat-Anteile (Tab. 3.9, Abb. 3.10). Während die Zeit ebenfalls einen signifikanten Einfluss bei allen Versuchen hatte ($p < 0,001$), konnte eine Interaktion von Behandlung und Zeit nur für V2 und V3 festgestellt werden ($p < 0,05$).

Es traten keine signifikanten versuchsbedingten Unterschiede innerhalb der Kontrollen oder FS-Behandlungen auf (Abb. 3.10).

Tab. 3.9: Ergebnisse der two-way ANOVA für die molaren Acetat-Anteile von V1, V2 und V3 für die gesamte Versuchsphase ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; $n=4$). Behandlung: V2: Kontrolle vs. $3,38 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ FS; V1, V2, V3: Kontrolle vs. $6,76 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ FS; V1, V2: $3,38 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ FS vs. $6,76 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ FS.

Varianzursache	V1	V2	V3
Behandlung	$p < 0,01$	$p < 0,001$	$p < 0,05$
Zeit	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$
Behandlung x Zeit	n.s.	$p < 0,05$	$p < 0,05$

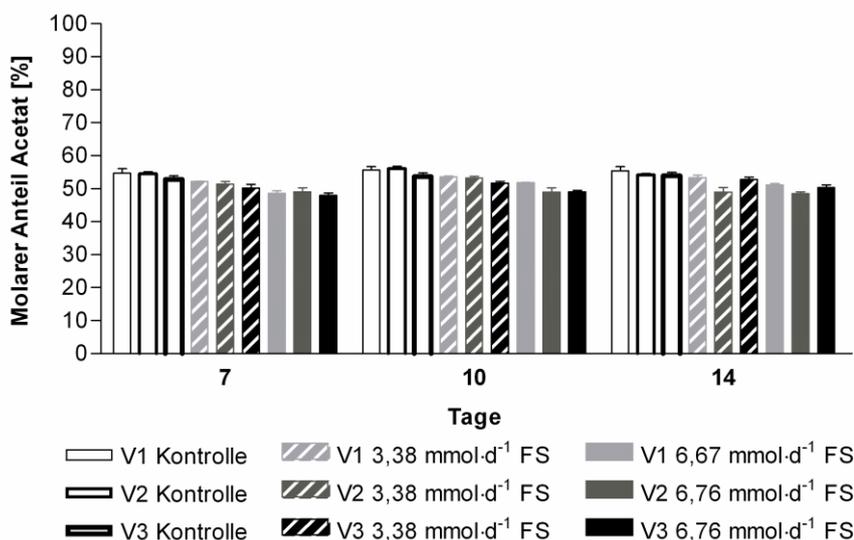


Abb. 3.10: Molare Acetat-Anteile der Versuche (V1, V2, V3) für die Kontrollen und Fumarsäure-Behandlungen (FS) ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; $n=4$). Ergebnisse der two-way ANOVA für die gesamte Versuchsphase: Kontrolle: Versuch n.s., Zeit n.s.; $3,38 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ FS: Versuch n.s., Zeit $p < 0,001$; Versuch x Zeit $p < 0,001$; $6,76 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ FS: Versuch n.s., Zeit $p < 0,05$, Versuch x Zeit $p < 0,05$.

Molare Propionat-Anteile

Die molaren Propionat-Anteile an der Gesamtproduktion der SCFA variierten in den Kontrollen zwischen 21% und 28%. Die Zugabe von $6,76 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ FS bewirkte eine signifikante Erhöhung der molaren Propionat-Anteile auf Werte von 34% (Abb. 3.11, Tab. 3.10). In V1 und V2 wurde zudem ein signifikanter Einfluss der Zeit festgestellt ($p < 0,001$).

Während sich innerhalb der Kontrollen keine signifikanten versuchsbedingten Unterschiede ergaben, wurden diese innerhalb der Behandlung mit $3,38 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ FS nachgewiesen (Abb. 3.11; $p < 0,01$). Innerhalb der Behandlung mit $6,76 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ FS wurde in V2 eine signifikante Erhöhung des molaren Propionat-Anteils gegenüber V1 und V3 ermittelt (Abb. 3.11; $p < 0,01$).

Tab. 3.10: Ergebnisse der two-way ANOVA für die molaren Propionat-Anteile von V1, V2 und V3 für die gesamte Versuchsphase ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; $n=4$). Behandlung: V2, V3: Kontrolle vs. $3,38 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ FS; V1, V2, V3: Kontrolle vs. $6,76 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ FS, $3,38 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ FS vs. $6,76 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ FS.

Varianzursache	V1	V2	V3
Behandlung	$p < 0,01$	$p < 0,001$	$p < 0,01$
Zeit	$p < 0,001$	$p < 0,001$	n.s.
Behandlung x Zeit	n.s.	n.s.	n.s.

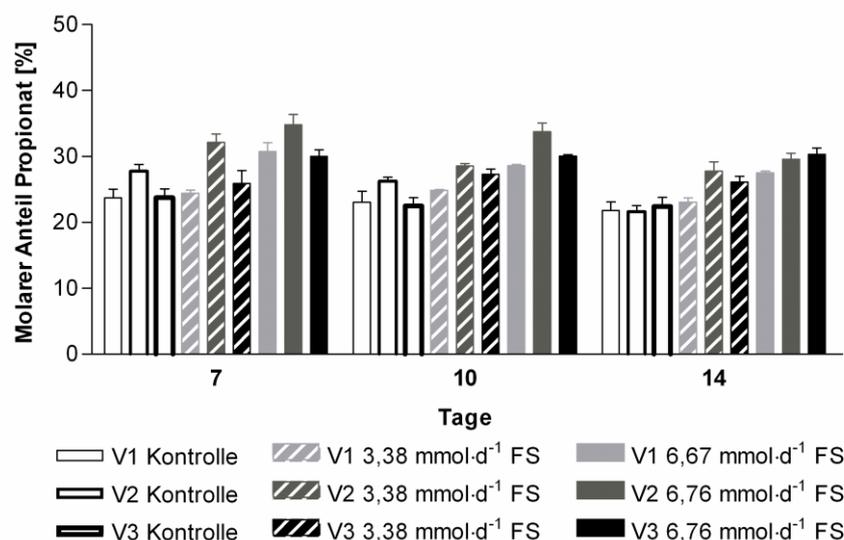


Abb. 3.11: Molare Propionat-Anteile der Versuche (V1, V2, V3) für die Kontrollen und Fumarsäure-Behandlungen (FS) ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; $n=4$). Ergebnisse der two-way ANOVA für die gesamte Versuchsphase: Kontrolle: Versuch n.s., Zeit $p < 0,001$, Versuch x Zeit $p < 0,01$; $3,38 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ FS: Versuch $p < 0,01$ (V1 vs. V2, V1 vs. V3, V2 vs. V3), Zeit $p < 0,001$, Versuch x Zeit $p < 0,01$; $6,76 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ FS: Versuch $p < 0,01$ (V1 vs. V2, V2 vs. V3), Zeit $p < 0,001$, Versuch x Zeit $p < 0,01$.

Molare Butyrat-Anteile

Insgesamt beliefen sich die Werte für die molaren Butyrat-Anteile an der Gesamtproduktion der SCFA auf 6-8% (Abb. 3.12). Die molaren Anteile des Butyrats wurden in V1 und V3 durch die Zugabe von $6,76 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ FS signifikant reduziert (Tab. 3.11; $p < 0,01$). In V3 trat dieser Effekt auch durch die Zugabe von $3,38 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ FS auf. Für alle Versuche lag ein signifikanter Zeiteffekt vor.

Es kam zu keinen signifikanten Unterschieden innerhalb einer Behandlung durch den Faktor Versuch (Abb. 3.12).

Tab. 3.11: Ergebnisse der two-way ANOVA für die molaren Butyrat-Anteile von V1, V2 und V3 für die gesamte Versuchsphase ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; $n=4$). Behandlung: V3: Kontrolle vs. $3,38 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ FS; V1, V3: Kontrolle vs. $6,76 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ FS; V1: $3,38 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ FS vs. $6,76 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ FS.

Varianzursache	V1	V2	V3
Behandlung	$p < 0,01$	n.s.	$p < 0,01$
Zeit	$p < 0,01$	$p < 0,05$	$p < 0,001$
Behandlung x Zeit	n.s.	n.s.	n.s.

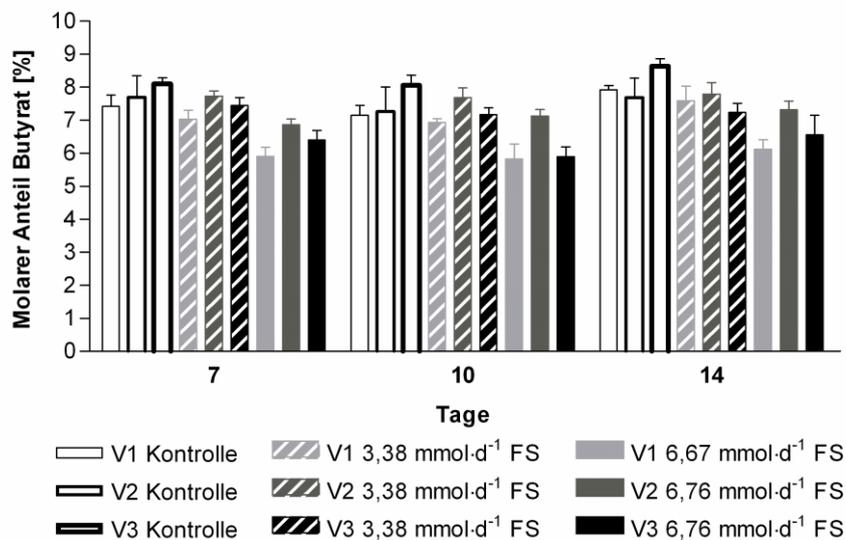


Abb. 3.12: Molare Butyrat-Anteile der Versuche (V1, V2, V3) für die Kontrollen und Fumarsäure-Behandlungen (FS) ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; $n=4$). Ergebnisse der two-way ANOVA für die gesamte Versuchsphase: Kontrolle: Versuch n.s., Zeit $p < 0,001$; $3,38 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ FS: Versuch n.s., Zeit n.s.; $6,76 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ FS: Versuch n.s., Zeit $p < 0,01$.

Molare Isovalerat-Anteile

Die molaren Isovalerat-Anteile an der Gesamtproduktion der SCFA lagen zwischen 4% und 14% (Abb. 3.13). Die Behandlung mit $6,76 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ FS führte zu einer signifikanten Senkung des molaren Isovalerat-Anteils in V1 gegenüber der Behandlung mit $3,38 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ FS ($p < 0,01$), aber nicht gegenüber der Kontrolle (Tab. 3.12, Abb. 3.13). In V1 und V2 trat außerdem ein signifikanter Zeiteffekt auf.

In V2 wurde ein signifikant niedrigerer molarer Isovalerat-Anteil als in V1 und V3 detektiert (Abb. 3.13; $p < 0,001$). In Abb. 3.13 ist dies deutlich an den Tagen 7 und 10 zu erkennen. Bei den Kontrollen und den FS-Behandlungen unterschieden sich V1 und V3 nicht signifikant voneinander.

Tab. 3.12: Ergebnisse der two-way ANOVA für die molaren Isovalerat-Anteile von V1, V2 und V3 für die gesamte Versuchsphase ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; $n=4$). Behandlung: V1: $3,38 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ FS vs. $6,76 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ FS.

Varianzursache	V1	V2	V3
Behandlung	$p < 0,01$	n.s.	n.s.
Zeit	$p < 0,01$	$p < 0,001$	n.s.
Behandlung x Zeit	n.s.	n.s.	n.s.

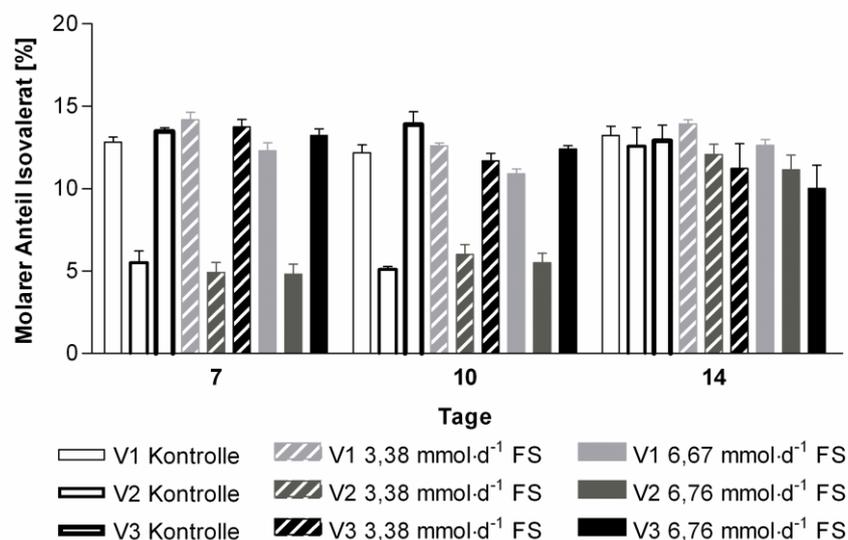


Abb. 3.13: Molare Isovalerat-Anteile der Versuche (V1, V2, V3) für die Kontrollen und Fumarsäure-Behandlungen (FS) ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; $n=4$). Ergebnisse der two-way ANOVA für die gesamte Versuchsphase: Kontrolle: Versuch $p < 0,001$ (V1 vs. V2, V2 vs. V3), Zeit $p < 0,001$; Versuch x Zeit $p < 0,001$; $3,38 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ FS: Versuch $p < 0,001$ (V1 vs. V2, V2 vs. V3), Zeit $p < 0,001$; Versuch x Zeit $p < 0,001$; $6,76 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ FS: Versuch $p < 0,001$ (V1 vs. V2, V2 vs. V3), Zeit $p < 0,001$, Versuch x Zeit $p < 0,001$.

Molare Valerat-Anteile

Die molaren Valerat-Anteile an der Gesamtproduktion der SCFA lagen im Bereich von 2-5%, wobei es zu keinem Behandlungseffekt durch FS kam (Tab. 3.13, Abb. 3.14). In V2 und V3 äußerte sich ein signifikanter Einfluss der Zeit.

Insgesamt wurden in V2 die signifikant höchsten Werte für die molaren Valerat-Anteile in den Kontroll-Fermentern und in den mit FS behandelten Fermentern ermittelt (Abb. 3.14; $p < 0,001$).

Tab. 3.13: Ergebnisse der two-way ANOVA für die molaren Valerat-Anteile von V1, V2 und V3 für die gesamte Versuchsphase ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; $n=4$).

Varianzursache	V1	V2	V3
Behandlung	n.s.	n.s.	n.s.
Zeit	n.s.	$p < 0,001$	$p < 0,01$
Behandlung x Zeit	n.s.	n.s.	n.s.

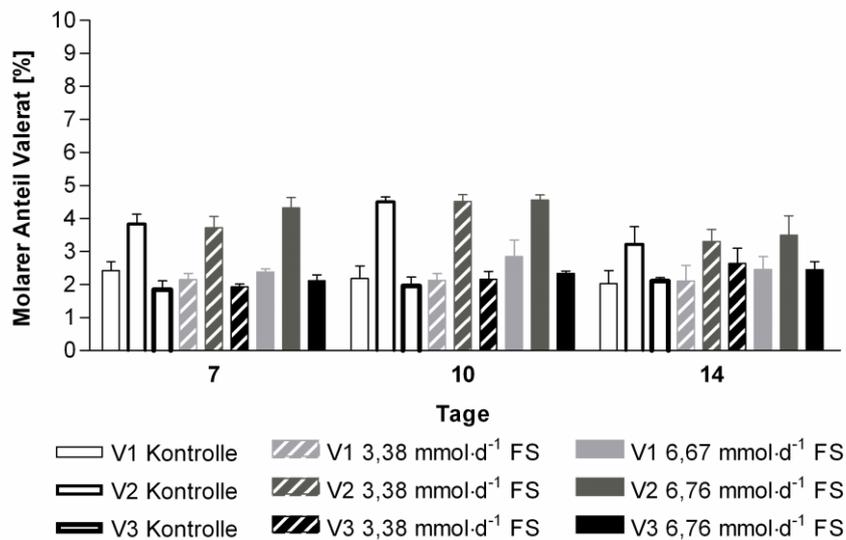


Abb. 3.14: Molare Valerat-Anteile der Versuche (V1, V2, V3) für die Kontrollen und Fumarsäure-Behandlungen (FS) ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; $n=4$). Ergebnisse der two-way ANOVA für die gesamte Versuchsphase: Kontrolle: Versuch $p < 0,001$ (V1 vs. V2, V2 vs. V3), Zeit n.s.; 3,38 mmol·d⁻¹ FS: Versuch $p < 0,001$ (V1 vs. V2, V2 vs. V3), Zeit n.s.; Versuch x Zeit $p < 0,001$; 6,76 mmol·d⁻¹ FS: Versuch $p < 0,001$ (V1 vs. V2, V2 vs. V3), Zeit n.s., Versuch x Zeit $p < 0,05$.

3.1.1.6 Acetat-Propionat-Verhältnisse

Für das Verhältnis von Acetat zu Propionat wurde ein signifikanter Behandlungseinfluss durch $6,76 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ FS in allen drei Versuchen ermittelt (Tab. 3.14). Das Acetat-Propionat-Verhältnis sank in V1 von durchschnittlich 2,5 auf 1,8, in V2 von 2,1 auf 1,4 und in V3 von 2,4 auf 1,6 (Abb. 3.15). Die Zeit spielte zudem in V1 und V2 eine signifikante Rolle (Tab. 3.14; $p < 0,01$).

Die Kontrollen zeigten keine signifikanten versuchsbedingten Unterschiede für das Verhältnis von Acetat zu Propionat (Abb. 3.15). In den mit $3,38 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ FS behandelten Fermentern wies V1 signifikant höhere Werte für das Acetat-Propionat-Verhältnis auf als V2 und V3 ($p < 0,01$). Bei der Behandlung mit $6,76 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ FS war dies nur verglichen mit V2 der Fall ($p < 0,01$).

Tab. 3.14: Ergebnisse der two-way ANOVA für die Acetat-Propionat-Verhältnisse von V1, V2 und V3 für die gesamte Versuchsphase ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; $n=4$). Behandlung: V2, V3: Kontrolle vs. $3,38 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ FS; V1, V2, V3: Kontrolle vs. $6,76 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ FS; V1, V2: $3,38 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ FS vs. $6,76 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ FS.

Varianzursache	V1	V2	V3
Behandlung	$p < 0,01$	$p < 0,001$	$p < 0,001$
Zeit	$p < 0,001$	$p < 0,001$	n.s.
Behandlung x Zeit	n.s.	$p < 0,01$	n.s.

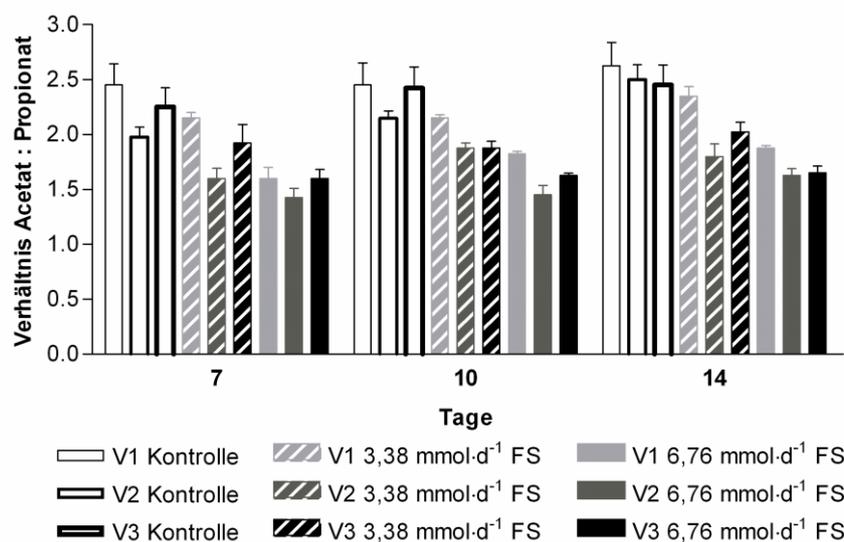


Abb. 3.15: Acetat-Propionat-Verhältnisse der Versuche (V1, V2, V3) für die Kontrollen und Fumarsäure-Behandlungen (FS) ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; $n=4$). Ergebnisse der two-way ANOVA für die gesamte Versuchsphase: Kontrolle: Versuch n.s.; Zeit $p < 0,001$; $3,38 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ FS: Versuch $p < 0,01$ (V1 vs. V2, V1 vs. V3), Zeit $p < 0,001$; $6,76 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ FS: Versuch $p < 0,01$ (V1 vs. V2), Zeit $p < 0,001$.

3.1.1.7 Fermentationsgas

Für die Produktion des gesamten Fermentationsgases wurden Werte zwischen 360 ml und 450 ml pro Tag erreicht (Abb. 3.16). Ein Einfluss von FS konnte statistisch nicht abgesichert werden (Tab. 3.15). In V2 führte die Zeit zu einem Anstieg der Produktion ($p < 0,01$).

Die Produktion des Fermentationsgases schwankte zwischen den Versuchen (Abb. 3.16). Innerhalb der Kontrollen und der Behandlung mit $3,38 \text{ mmol} \cdot \text{d}^{-1}$ FS zeigte V1 dabei die signifikant höchste Produktion ($p < 0,001$). Innerhalb der FS-Dosis von $6,76 \text{ mmol} \cdot \text{d}^{-1}$ unterschieden sich V1 und V2 nicht signifikant. In V3 wurde gegenüber V1 und V2 die niedrigste Gasmenge produziert ($p < 0,001$).

Tab. 3.15: Ergebnisse der two-way ANOVA für die Produktion des Fermentationsgas von V1, V2 und V3 für die gesamte Versuchsphase ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; $n=4$).

Varianzursache	V1	V2	V3
Behandlung	n.s.	n.s.	n.s.
Zeit	n.s.	$p < 0,01$	n.s.
Behandlung x Zeit	n.s.	n.s.	n.s.

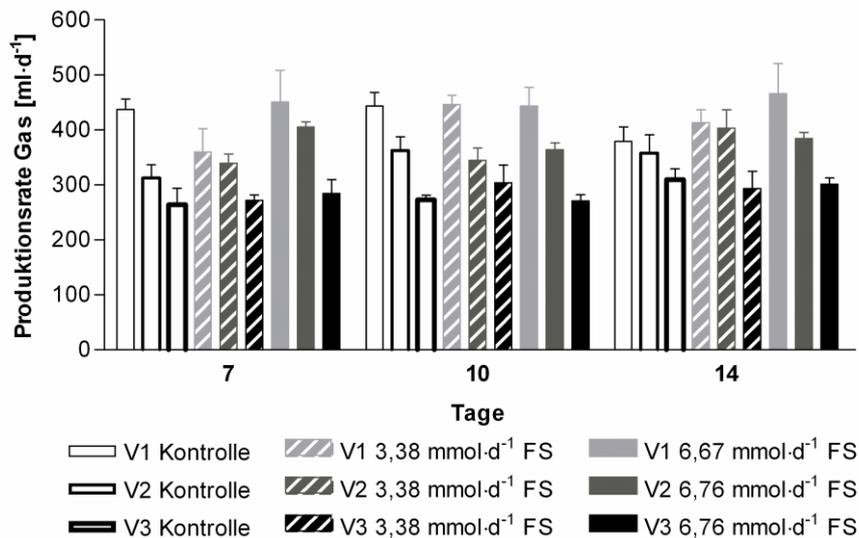


Abb. 3.16: Produktion des gesamten Fermentationsgases der Versuche (V1, V2, V3) für die Kontrollen und Fumarsäure-Behandlungen (FS) ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; $n=4$). Ergebnisse der two-way ANOVA für die gesamte Versuchsphase: Kontrolle: Versuch $p < 0,001$ (V1 vs. V2, V1 vs. V3, V2 vs. V3), Zeit n.s.; $3,38 \text{ mmol} \cdot \text{d}^{-1}$ FS: Versuch $p < 0,001$ (V1 vs. V2, V1 vs. V3, V2 vs. V3), Zeit n.s.; $6,76 \text{ mmol} \cdot \text{d}^{-1}$ FS: Versuch $p < 0,001$ (V1 vs. V3, V2 vs. V3), Zeit n.s..

CH₄-Produktion

Die CH₄-Produktion betrug täglich zwischen 83 ml und 140 ml (Abb. 3.17). Ein Behandlungseffekt durch FS konnte bei keinem der Versuche statistisch abgesichert werden (Tab. 3.16). Durch die varianzanalytische Auswertung konnte ein signifikanter Einfluss der Zeit auf V2 und V3 belegt werden.

Sowohl bei den Kontroll- als auch bei den mit 3,38 mmol·d⁻¹ FS behandelten Fermentern zeigten sich in V3 signifikante Unterschiede in der CH₄-Produktion im Vergleich zu V1 und V2 (Abb. 3.17). Es wurden die niedrigsten Werte erreicht. Für die mit 6,76 mmol·d⁻¹ FS behandelten Fermenter lag dieser signifikante Unterschied nur zwischen V1 und V3 vor ($p < 0,05$).

Tab. 3.16: Ergebnisse der two-way ANOVA für die CH₄-Produktion von V1, V2 und V3 für die gesamte Versuchsphase ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; n=4).

Varianzursache	V1	V2	V3
Behandlung	n.s.	n.s.	n.s.
Zeit	n.s.	$p < 0,001$	$p < 0,05$
Behandlung x Zeit	n.s.	n.s.	n.s.

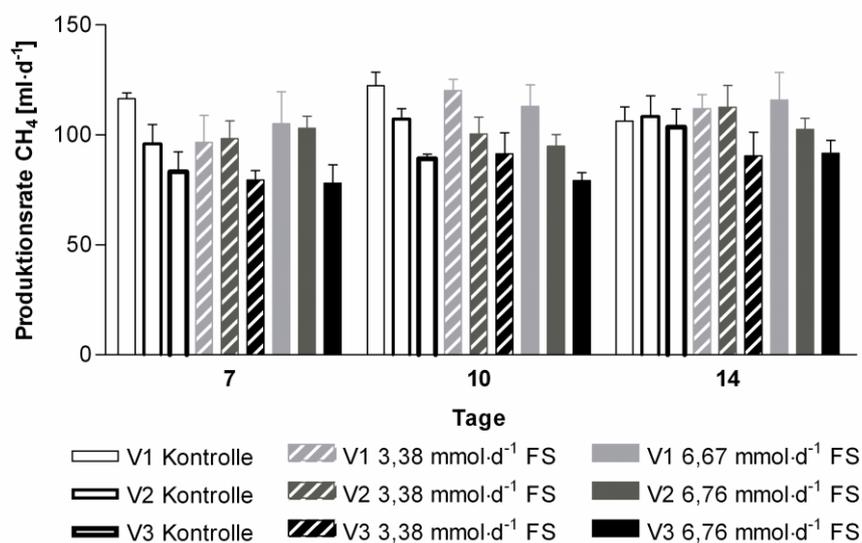


Abb. 3.17: CH₄-Produktion der Versuche (V1, V2, V3) für die Kontrollen und Fumarsäure-Behandlungen (FS) ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; n=4). Ergebnisse der two-way ANOVA für die gesamte Versuchsphase: Kontrolle: Versuch $p < 0,001$ (V1 vs. V3, V2 vs. V3), Zeit $p < 0,05$, Versuch x Zeit $p < 0,05$; 3,38 mmol·d⁻¹ FS: Versuch $p < 0,05$ (V1 vs. V3, V2 vs. V3), Zeit n.s.; 6,76 mmol·d⁻¹ FS: Versuch $p < 0,001$ (V1 vs. V3), Zeit n.s..

CH₄-Anteil

Für die Anteile des CH₄ am gesamten Fermentationsgas wurden Werte zwischen 24% und 33% gemessen (Abb. 3.18). Die Zugabe von 6,76 mmol·d⁻¹ FS bewirkte in allen Versuchen eine signifikante Reduktion der CH₄-Anteile (Tab. 3.17). Diese Reduktion betrug in V1 etwa 2,5%, in V2 und V3 etwa 3,7%. Die Zeit beeinflusste die CH₄-Anteile ebenfalls bei allen Versuchen signifikant.

Bei allen Behandlungen kam es zu versuchsbedingten Variationen im CH₄-Anteil (Abb. 3.18). Innerhalb der Kontrollen und der FS-Dosis von 6,76 mmol·d⁻¹ wurden zwischen den Versuchen signifikante Unterschiede festgestellt, wobei die niedrigsten CH₄-Anteile in V1 und die höchsten in V3 erreicht wurden (p<0,01). Innerhalb der Behandlung mit 3,38 mmol·d⁻¹ FS wies V3 den höchsten CH₄-Anteil auf (p<0,001).

Tab. 3.17: Ergebnisse der two-way ANOVA für die CH₄-Anteile von V1, V2, V3 für die gesamte Versuchsphase ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; n=4). Behandlung: V3: Kontrolle vs. 3,38 mmol·d⁻¹ FS; V1, V2, V3: Kontrolle vs. 6,76 mmol·d⁻¹ FS; V1, V2: 3,38 mmol·d⁻¹ FS vs. 6,76 mmol·d⁻¹ FS.

Varianzursache	V1	V2	V3
Behandlung	p<0,05	p<0,001	p<0,001
Zeit	p<0,001	p<0,01	p<0,001
Behandlung x Zeit	p<0,05	n.s.	n.s.

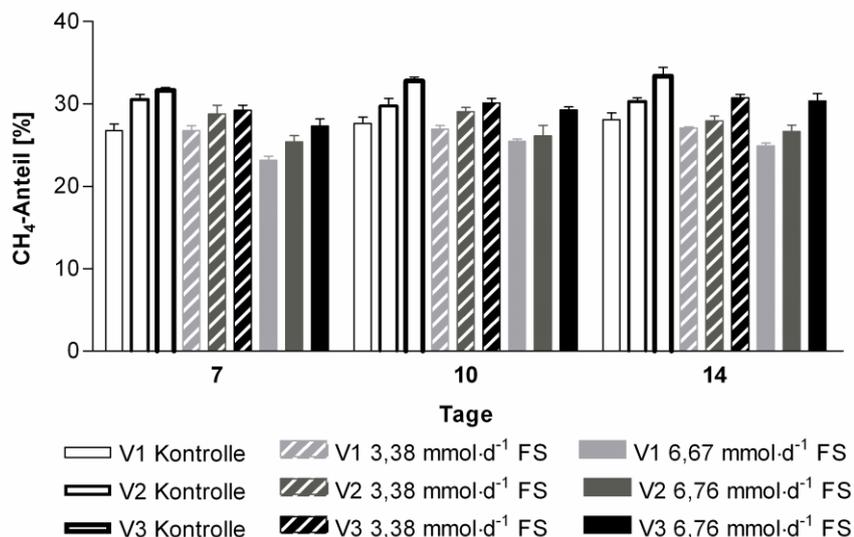


Abb. 3.18: CH₄-Anteile am Fermentationsgas der Versuche (V1, V2, V3) für die Kontrollen und Fumarsäure-Behandlungen (FS) ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; n=4). Ergebnisse der two-way ANOVA für die gesamte Versuchsphase: Kontrolle: Versuch p<0,01 (V1 vs. V2, V1 vs. V3, V2 vs. V3), Zeit n.s., Versuch x Zeit p<0,05; 3,38 mmol·d⁻¹ FS: Versuch p<0,01 (V1 vs. V3, V2 vs. V3), Zeit n.s., Versuch x Zeit p<0,05; 6,76 mmol·d⁻¹ FS: Versuch p<0,001 (V1 vs. V2, V1 vs. V3, V2 vs. V3), Zeit p<0,01, Versuch x Zeit p<0,01.

CO₂-Produktion

Die Werte für die tägliche CO₂-Produktion lagen zwischen 182 ml und 364 ml (Abb. 3.19). Es konnten keine signifikanten Behandlungseffekte für die Versuche nachgewiesen werden (Tab. 3.18). Ein signifikanter zeitlicher Einfluss wurde für V2 beobachtet ($p < 0,05$).

Während signifikante versuchsbedingte Unterschiede in der CO₂-Produktion bei den Kontrollen und der FS-Dosis von 3,38 mmol·d⁻¹ zwischen allen Versuchen gezeigt werden konnten, unterschied sich für die FS-Dosis von 6,76 mmol·d⁻¹ nur V3 von V1 und V2 signifikant (Abb. 3.19; $p < 0,001$). In V1 wurde die signifikant höchste Produktion für CO₂ nachgewiesen und in V3 die geringste.

Tab. 3.18: Ergebnisse der two-way ANOVA für die CO₂-Produktion von V1, V2 und V3 für die gesamte Versuchsphase ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; n=4).

Varianzursache	V1	V2	V3
Behandlung	n.s.	n.s.	n.s.
Zeit	n.s.	$p < 0,05$	n.s.
Behandlung x Zeit	n.s.	n.s.	n.s.

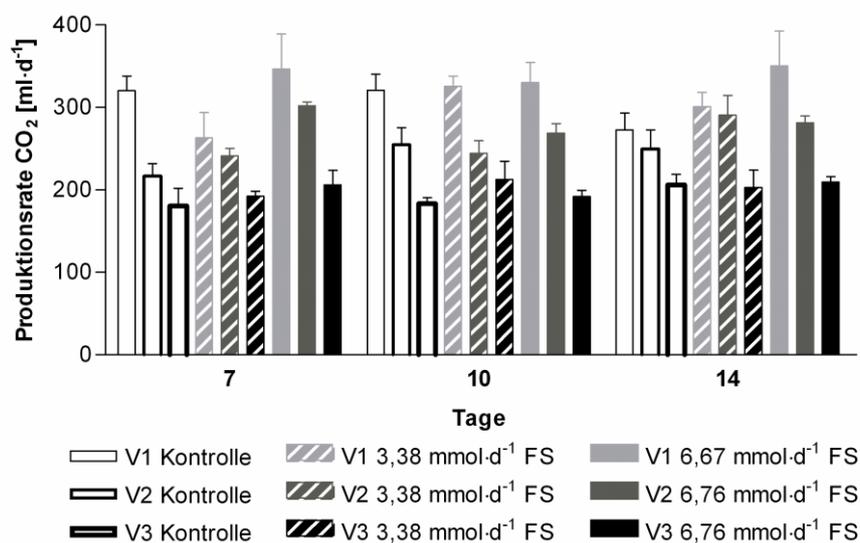


Abb. 3.19: CO₂-Produktion der Versuche (V1, V2, V3) für die Kontrollen und Fumarsäure-Behandlungen (FS) ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; n=4). Ergebnisse der two-way ANOVA für die gesamte Versuchsphase: Kontrolle: Versuch $p < 0,001$ (V1 vs. V2, V1 vs. V3, V2 vs. V3), Zeit n.s.; 3,38 mmol·d⁻¹ FS: Versuch $p < 0,001$ (V1 vs. V2, V1 vs. V3, V2 vs. V3), Zeit n.s.; 6,76 mmol·d⁻¹ FS: Versuch $p < 0,001$ (V1 vs. V3, V2 vs. V3), Zeit n.s..

CO₂-Anteile

Für die CO₂-Anteile am gesamten Fermentationsgas wurden Werte zwischen 66% und 76% gemessen (Abb. 3.20). Dabei kam es durch FS-Zugabe zu einer signifikanten Erhöhung der CO₂-Anteile in allen Versuchen (Tab. 3.19). Zudem wurde ein signifikanter Einfluss des Faktors Zeit festgestellt.

Wie für den CH₄-Anteil wurden auch für den CO₂-Anteil innerhalb der Kontrollen ($p < 0,01$) und der FS-Dosis von 6,76 mmol·d⁻¹ ($p < 0,001$) versuchsbedingte Unterschiede nachgewiesen (Abb. 3.20). Diese äußerten sich in einer signifikanten Reduktion des CO₂-Anteils von V1 über V2 bis V3. Die mit 3,38 mmol·d⁻¹ FS behandelten Fermentern zeigten in V3 eine signifikante Erhöhung des CO₂-Anteils im Vergleich zu V1 und V2 ($p < 0,01$).

Tab. 3.19: Ergebnisse der two-way ANOVA für die CO₂-Anteile von V1, V2 und V3 für die gesamte Versuchsphase ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; n=4). Behandlung: V3: Kontrolle vs. 3,38 mmol·d⁻¹ FS; V1, V2, V3: Kontrolle vs. 6,76 mmol·d⁻¹ FS; V1, V2: 3,38 mmol·d⁻¹ FS vs. 6,76 mmol·d⁻¹ FS.

Varianzursache	V1	V2	V3
Behandlung	p<0,05	p<0,001	p<0,001
Zeit	p<0,001	p<0,01	p<0,001
Behandlung x Zeit	p<0,05	n.s.	n.s.

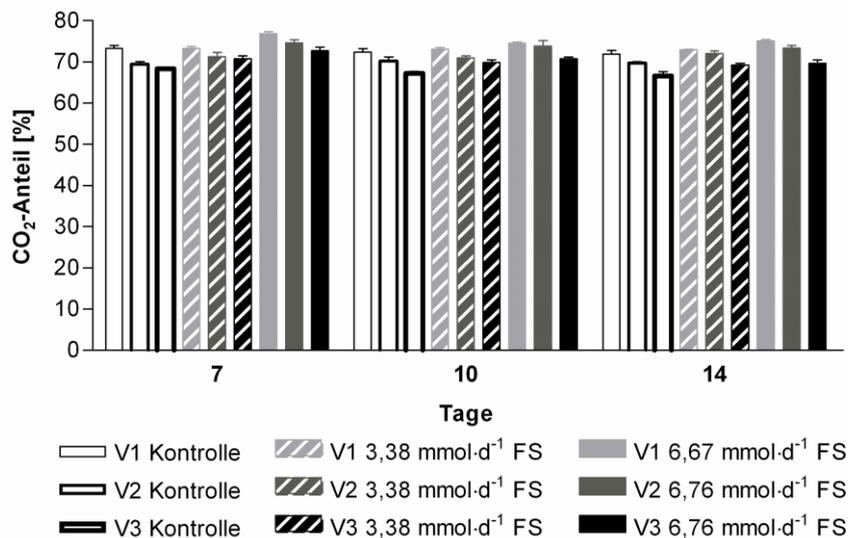


Abb. 3.20: CO₂-Anteile am Fermentationsgas der Versuche (V1, V2, V3) für die Kontrollen und Fumarsäure-Behandlungen (FS) ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; n=4). Ergebnisse der two-way ANOVA für die gesamte Versuchsphase: Kontrolle: Versuch p<0,01 (V1 vs. V2, V1 vs. V3, V2 vs. V3), Zeit n.s., Versuch x Zeit p<0,05; 3,38 mmol·d⁻¹ FS: Versuch p<0,01 (V1 vs. V3, V2 vs. V3), Zeit n.s., Versuch x Zeit p<0,05; 6,76 mmol·d⁻¹ FS: Versuch p<0,001 (V1 vs. V2, V1 vs. V3, V2 vs. V3), Zeit p<0,01, Versuch x Zeit p<0,01.

Mittlere CH₄- und CO₂-Produktion

Zusammenfassend sind in Abb. 3.21 die Ergebnisse der über die gesamte Versuchsphase gemittelten Produktionsraten von CH₄ und CO₂ dargestellt. Es konnte eine leichte numerische Reduktion der CH₄-Produktion durch die FS-Behandlung in allen Versuchen beobachtet werden, die jedoch nicht statistisch signifikant war. Die numerische Reduktion betrug durch Zugabe von 6,76 mmol·d⁻¹ FS in V1 pro Tag etwa 8 ml, in V2 9 ml und in V3 7 ml.

Bei der CO₂-Produktion wurde ein signifikanter Behandlungseffekt durch die Zugabe von 6,76 mmol·d⁻¹ FS festgestellt. Die Erhöhung betrug durch Zugabe von 6,76 mmol·d⁻¹ FS in V1 pro Tag etwa 27 ml, in V2 25 ml und in V3 17 ml.

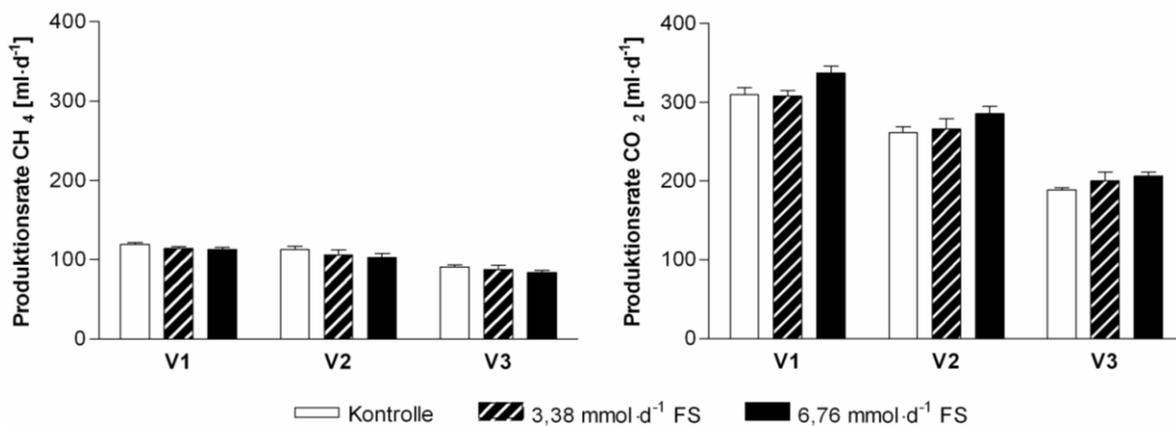


Abb. 3.21: Mittlere CH₄- und CO₂-Produktionen der Versuche (V1, V2, V3) über die gesamte Versuchsphase für die Kontrollen und Fumarsäure-Behandlungen (FS) ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; n=4). Ergebnisse der two-way ANOVA: CH₄-Produktion: Behandlung n.s.; Versuch p<0,001 (V1 vs. V3; V2 vs. V3); CO₂-Produktion: Behandlung p<0,01; Versuch p<0,001 (V1 vs. V2; V1 vs. V3; V2 vs. V3).

3.1.1.8 Ammoniak-Konzentrationen

In den Fermentationsansätzen wurden Ammoniak-Konzentrationen von 10-14 mmol·l⁻¹ bestimmt (Abb. 3.22). Die Zugabe von FS beeinflusste die Werte bei keinem der Versuche signifikant (Tab. 3.20). Allerdings zeigte sich ein signifikanter Effekt des Faktors Zeit in V1 und V3 (p<0,01), und eine Interaktion der Faktoren Behandlung und Zeit in V2 (p<0,05).

Während sich ein Versuchseffekt bei den Kontrollen und der Behandlung mit 3,38 mmol·d⁻¹ FS nur zwischen V1 und V3 äußerte, wobei es zu einer signifikanten Erhöhung der Ammoniak-Konzentrationen in V3 kam (p<0,05), unterschied sich innerhalb der Behandlung mit 6,76 mmol·d⁻¹ FS V1 von V2 und V3 (Abb. 3.22; p<0,01).

Tab. 3.20: Ergebnisse der two-way ANOVA für die Ammoniak-Konzentrationen von V1, V2, V3 für die gesamte Versuchsphase ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; n=4).

Varianzursache	V1	V2	V3
Behandlung	n.s.	n.s.	n.s.
Zeit	p<0,01	n.s.	p<0,01
Behandlung x Zeit	n.s.	p<0,05	n.s.

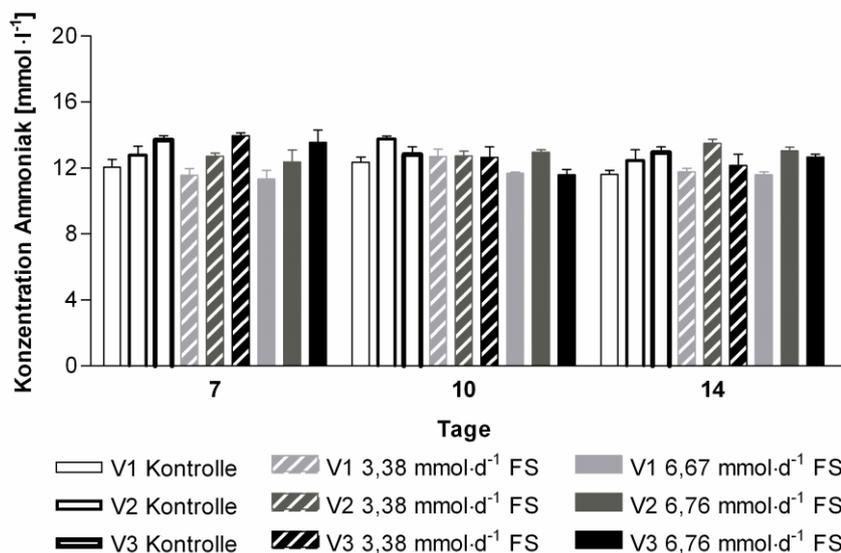


Abb. 3.22: Ammoniak-Konzentrationen der Versuche (V1, V2, V3) für die Kontrollen und Fumarsäure-Behandlungen (FS) ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; n=4). Ergebnisse der two-way ANOVA für die gesamte Versuchsphase: Kontrolle: Versuch p<0,01 (V1 vs. V3), Zeit n.s.; 3,38 mmol·d⁻¹ FS: Versuch p<0,05 (V1 vs. V3), Zeit n.s., Versuch x Zeit p<0,05; 6,76 mmol·d⁻¹ FS: Versuch p<0,01 (V1 vs. V2, V1 vs. V3), Zeit n.s., Versuch x Zeit p<0,01.

3.1.1.9 Mikrobielle Proteinsynthese

In V1 wurde mit Werten von insgesamt 900 mg pro Tag die höchste Menge an mikrobiellem Protein gebildet (Abb. 3.23). Für keinen der Versuche ließ sich ein Behandlungseffekt durch FS nachweisen. Demgegenüber standen signifikante Effekte, die durch den Faktor Versuch bedingt waren ($p < 0,001$). In V1 wurde die signifikant höchste Proteinmenge gebildet. Innerhalb der Kontrolle unterschieden sich V2 und V3 signifikant voneinander. Für die beiden FS-Behandlungen ergaben sich signifikante Unterschiede von V2 und V3 verglichen mit V1.

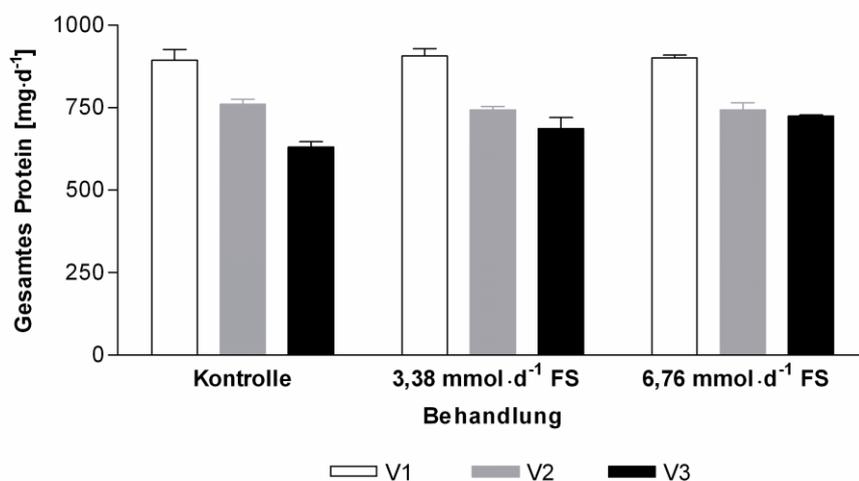


Abb. 3.23: Gesamte synthetisierte Proteinmengen in V1, V2 und V3 für die Kontrollen und Fumarsäure-Behandlungen (FS) ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; $n=4$). Ergebnisse der two-way ANOVA: Behandlung n.s.; Versuch $p < 0,001$ (Kontrolle: V1 vs. V2, V1 vs. V3, V2 vs. V3; 3,38 mmol·d⁻¹ FS: V1 vs. V2, V1 vs. V3; 6,76 mmol·d⁻¹ FS: V1 vs. V2, V1 vs. V3).

Mikrobielle Proteinsynthese der LAM

Die Proteinsynthese durch die LAM war in keinem Versuch durch die Zugabe von FS beeinflusst (Abb. 3.24). Wie für das gesamte mikrobielle Protein wurde auch für die Proteinsynthese durch die LAM mit 750 mg pro Tag die signifikant höchsten Werte in V1 erreicht ($p < 0,001$). In den Kontroll-Fermentern war die Proteinsynthese in V2 signifikant geringer als in V1 ($p < 0,001$). V3 wies die geringste mikrobielle Proteinsynthese der drei Versuche in den Kontroll-Fermentern auf ($p < 0,001$). Während sich bei den Behandlungen mit FS kein Unterschied zwischen V2 und V3 in der mikrobiellen Proteinsynthese zeigte, konnte demgegenüber ein signifikanter Unterschied für V2 und V3 verglichen mit V1 nachgewiesen werden ($p < 0,001$).

Mikrobielle Proteinsynthese der SAM

Die Proteinsynthese der SAM wurde nicht signifikant durch die Behandlung mit FS beeinflusst (Abb. 3.25). Die Menge des synthetisierten Proteins lag bei 128-145 mg pro Tag. In V2 wurde sowohl in den Kontroll-Fermentern als auch in den mit FS behandelten signifikant mehr mikrobielles Protein synthetisiert als in V1 und V3 ($p < 0,01$).

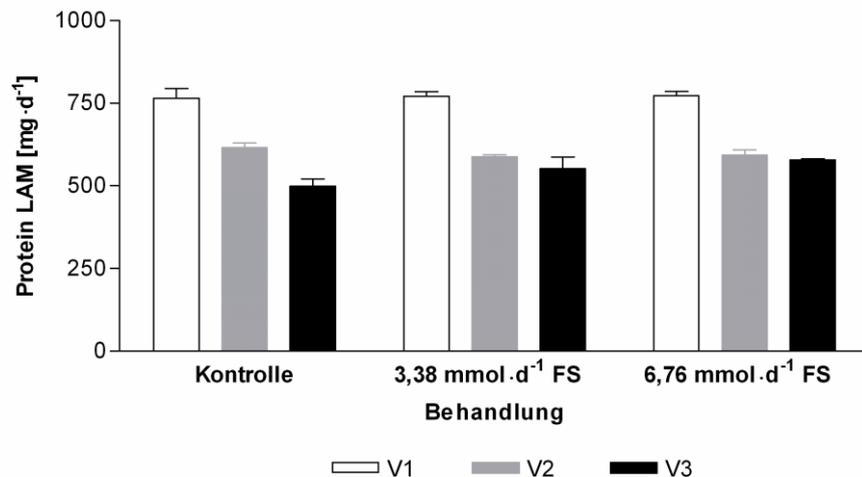


Abb. 3.24: Von den LAM gebildetes Protein in V1, V2 und V3 für die Kontrollen und Fumarsäure-Behandlungen (FS) ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; $n=4$). Ergebnisse der two-way ANOVA: Behandlung n.s.; Versuch $p < 0,001$ (Kontrolle: V1 vs. V2, V1 vs. V3, V2 vs. V3; 3,38 mmol·d⁻¹ FS: V1 vs. V2, V1 vs. V3; 6,76 mmol·d⁻¹ FS: V1 vs. V2, V1 vs. V3).

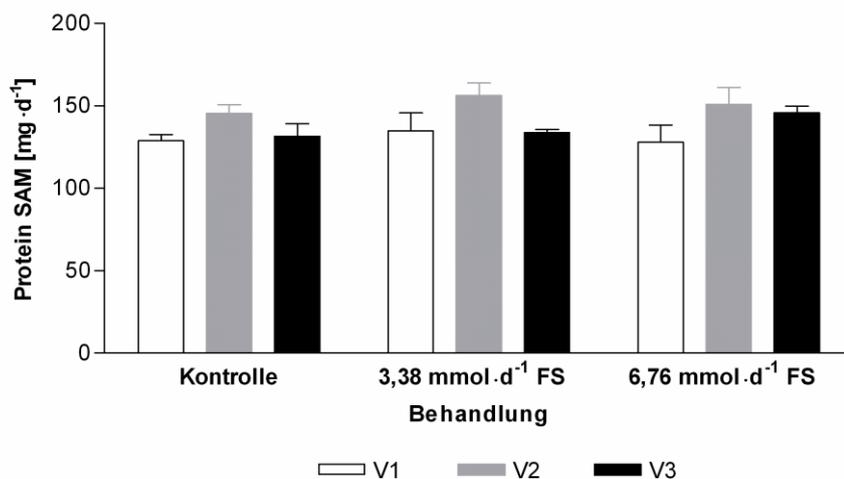


Abb. 3.25: Von den SAM gebildetes Protein in V1, V2 und V3 für die Kontrollen und Fumarsäure-Behandlungen (FS) ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; $n=4$). Ergebnisse der two-way ANOVA: Behandlung n.s., Versuch: $p < 0,01$ (V1 vs. V2, V2 vs. V3).

Effizienzen der mikrobiellen Proteinsynthese

In V1 lagen die Effizienzen der mikrobiellen Proteinsynthese (EMP) mit Werten um $170 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ abgebauter OS bei allen Behandlungen signifikant am höchsten (Abb. 3.26; $p < 0,001$). Innerhalb der Kontrollen unterschied sich außerdem V3 von V1 und V2 signifikant ($p < 0,001$). Ein signifikanter Behandlungseffekt durch $6,76 \text{ mmol} \cdot \text{d}^{-1}$ FS ergab sich nur in V3 ($p < 0,05$). Die Zugabe von $6,76 \text{ mmol} \cdot \text{d}^{-1}$ FS bewirkte hier eine Steigerung der EMP gegenüber der Kontrolle.

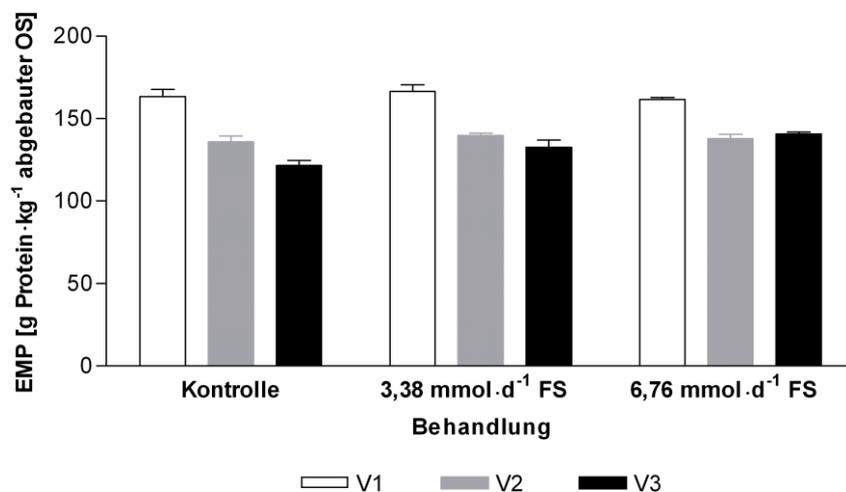


Abb. 3.26: Effizienzen der mikrobiellen Proteinsynthese (EMP) in V1, V2 und V3 für die Kontrollen und Fumarsäure-Behandlungen (FS) ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; $n=4$). Ergebnisse der two-way ANOVA: Behandlung $p < 0,05$ (V3: Kontrolle vs. $6,76 \text{ mmol} \cdot \text{d}^{-1}$ FS); Versuch $p < 0,001$ (Kontrolle: V1 vs. V2, V1 vs. V3, V2 vs. V3; $3,38 \text{ mmol} \cdot \text{d}^{-1}$ FS: V1 vs. V2, V2 vs. V3; $6,76 \text{ mmol} \cdot \text{d}^{-1}$ FS: V1 vs. V2, V1 vs. V3); Behandlung x Versuch $p < 0,05$.

3.1.1.10 Verdaulichkeiten der Rohnährstoffe

Verdaulichkeiten der organischen Substanz (OS)

Die Verdaulichkeiten der OS lagen bei 60%. Ein signifikanter Einfluss von FS war nicht nachweisbar (Abb. 3.27). Der Faktor Versuch führte zu einer signifikanten Senkung der Verdaulichkeiten zwischen den Kontrollen von V3 und V2 und bei Zugabe von $6,76 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ FS zwischen V3 und V1 ($p < 0,001$).

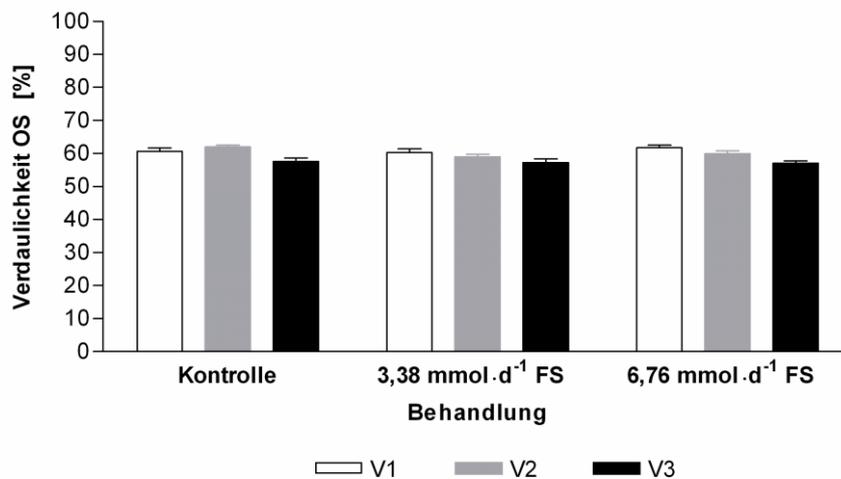


Abb. 3.27: Verdaulichkeiten der OS in V1, V2 und V3 für die Kontrollen und Fumarsäure-Behandlungen (FS) ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; $n=4$). Ergebnisse der two-way ANOVA: Behandlung n.s.; Versuch $p < 0,001$ (Kontrolle: V2 vs. V3; $6,76 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ FS: V1 vs. V3).

Verdaulichkeiten des Rohproteins (XP)

Die XP-Verdaulichkeiten erreichten Werte von 70% und wurden nicht signifikant durch die FS-Behandlung beeinflusst (Abb. 3.28). Eine signifikant geringere Verdaulichkeit konnte für V3 verglichen mit V1 und V2 innerhalb der Kontrollen und der Behandlung mit $6,76 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ FS gezeigt werden ($p < 0,001$).

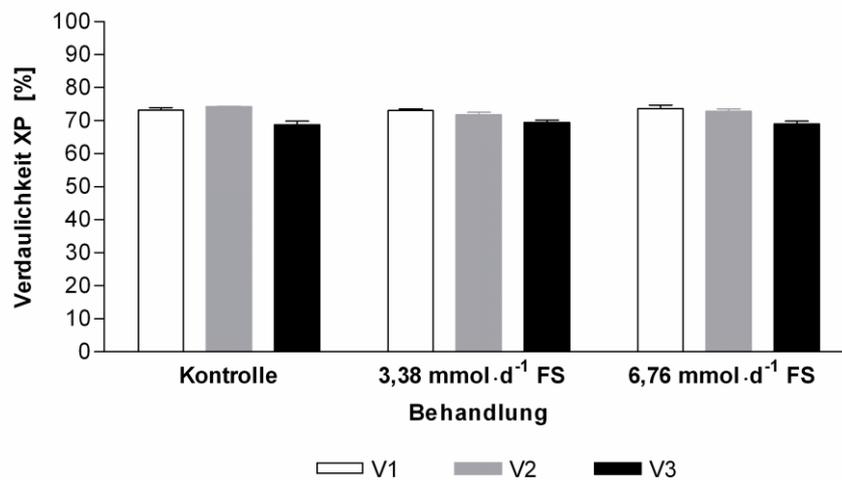


Abb. 3.28: Verdaulichkeiten des XP in V1, V2 und V3 für die Kontrollen und Fumarsäure-Behandlungen (FS) ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; $n=4$). Ergebnisse der two-way ANOVA: Behandlung n.s.; Versuch $p < 0,001$ (Kontrolle: V1 vs. V3, V2 vs. V3; $3,38 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ FS: V1 vs. V3; $6,76 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ FS: V1 vs. V3, V2 vs. V3).

Verdaulichkeiten der neutralen Detergenzienfasern (NDF)

Die Bestimmung der Verdaulichkeiten der NDF führte zu Werten von 40% (Abb. 3.29). Es wurden weder signifikante Effekte durch die Behandlung mit FS noch durch den Faktor Versuch detektiert.

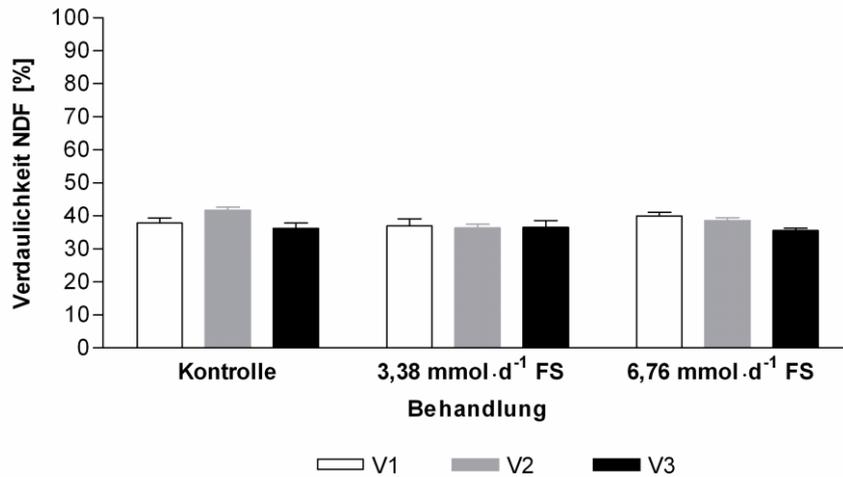


Abb. 3.29: Verdaulichkeiten der NDF in V1, V2 und V3 für die Kontrollen und Fumarsäure-Behandlungen (FS) ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; n=4). Ergebnisse der two-way ANOVA: Behandlung n.s.; Versuch n.s..

Verdaulichkeiten der sauren Detergenzienfasern (ADF)

Die Verdaulichkeiten der ADF nahmen Werte von 30% bis 35% an (Abb. 3.30). Auch hier führte weder der Faktor Behandlung noch der Faktor Versuch zu signifikanten Unterschieden in den Verdaulichkeiten der ADF.

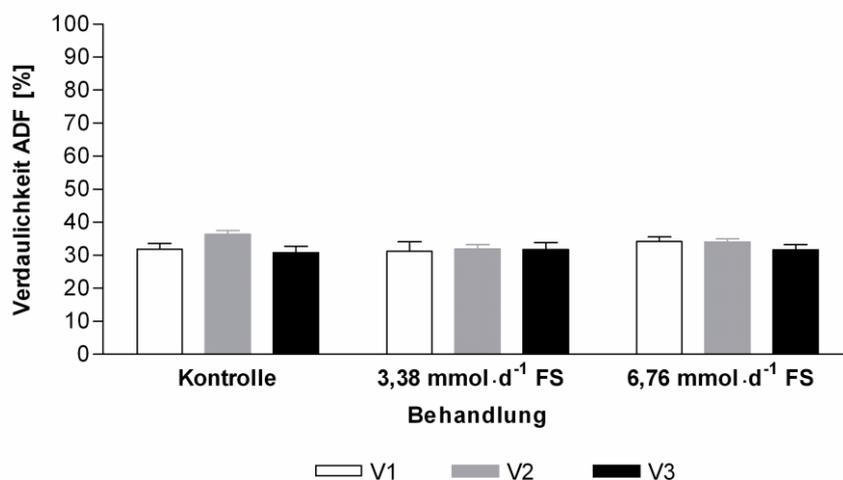


Abb. 3.30: Verdaulichkeiten der ADF in V1, V2 und V3 für die Kontrollen und Fumarsäure-Behandlungen (FS) ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; n=4). Ergebnisse der two-way ANOVA: Behandlung n.s., Versuch: n.s.

3.1.1.11 Protozoa

Nach bereits einem Versuchstag nahm die Anzahl der *Protozoa* in den Kontroll-Fermentern im Vergleich zur Pansenflüssigkeit (native Probe) signifikant ab (Abb. 3.31; t-test, $\bar{x} \pm \text{SEM}$; $n=3$; $p<0,001$). FS beeinflusste in keinem Versuch die Anzahl der *Protozoa* (Tab. 3.21). In allen Versuchen kam es als Funktion der Zeit zu einer signifikanten Verringerung der Zahl der *Protozoa* ($p<0,001$).

Die Pansenflüssigkeit, die für die Inokulation von V1 verwendet wurde, enthielt die signifikant geringste Anzahl an *Protozoa* (Abb. 3.31; $p<0,05$). Die *Protozoa*-Zahl in V1 wies bei allen Behandlungen signifikante Unterschiede zu V2 und V3 auf. An Tag 1 war deutlich zu erkennen, dass in V2 und V3 mit 70.000 pro ml bis 80.000 pro ml die meisten *Protozoa* vorhanden waren.

Tab. 3.21: Ergebnisse der two-way ANOVA für die Anzahlen der *Protozoa* in V1, V2 und V3 für Tag 1, 7 und 14 ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; $n=4$).

Varianzursache	V1	V2	V3
Behandlung	n.s.	n.s.	n.s.
Zeit	$p<0,001$	$p<0,001$	$p<0,001$
Behandlung x Zeit	$p<0,05$	n.s.	n.s.

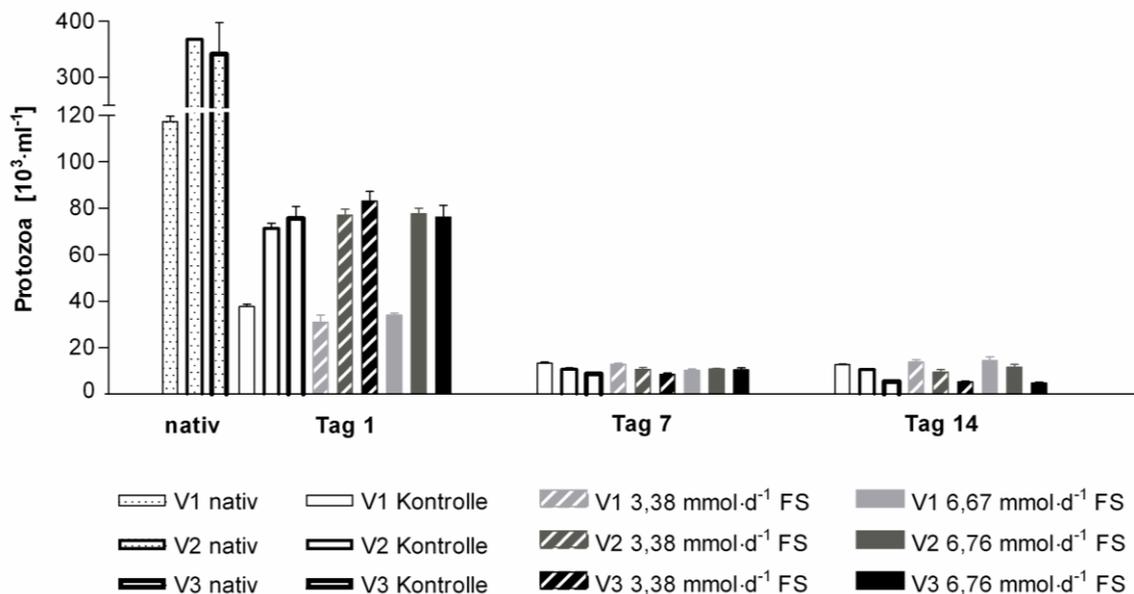


Abb. 3.31: Anzahlen der *Protozoa* in V1, V2 und V3 für die nativen Proben ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; $n=3$), die Kontrollen und Fumarsäure-Behandlungen (FS) ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; $n=4$). Ergebnisse der one-way ANOVA der nativen Proben: $p<0,05$ (V1 vs. V2, V1 vs. V3). Ergebnisse der two-way ANOVA: Kontrolle: Versuch $p<0,001$ (V1 vs. V2, V1 vs. V3), Zeit $p<0,001$, Versuch x Zeit $p<0,001$; 3,38 $\text{mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ FS: Versuch $p<0,001$ (V1 vs. V2, V1 vs. V3), Zeit $p<0,001$, Versuch x Zeit $p<0,001$; 6,76 $\text{mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ FS: Versuch $p<0,001$ (V1 vs. V2, V1 vs. V3), Zeit $p<0,001$, Versuch x Zeit $p<0,001$.

3.1.2 Ergebnisse der SSCP-Analyse

Die SSCP-Analyse diente der Untersuchung des Einfluss der FS auf die mikrobielle Gemeinschaft anhand von 16S rRNA-Genabschnitten. Zunächst wurde dafür die gDNA isoliert. Die Agarose-Gelbilder der sich anschließenden *nested* PCR (Abb. 3.32) zeigen für die an Tag 1 und Tag 14 gewonnenen Proben aus V1, V2 und V3, dass für die *Bacteria* (Abb. 3.32 A) und für die *Archaea* (Abb. 3.32 B) ein PCR-Produkt in der erwarteten Größe von 408 bp aus der gDNA amplifiziert werden konnte.

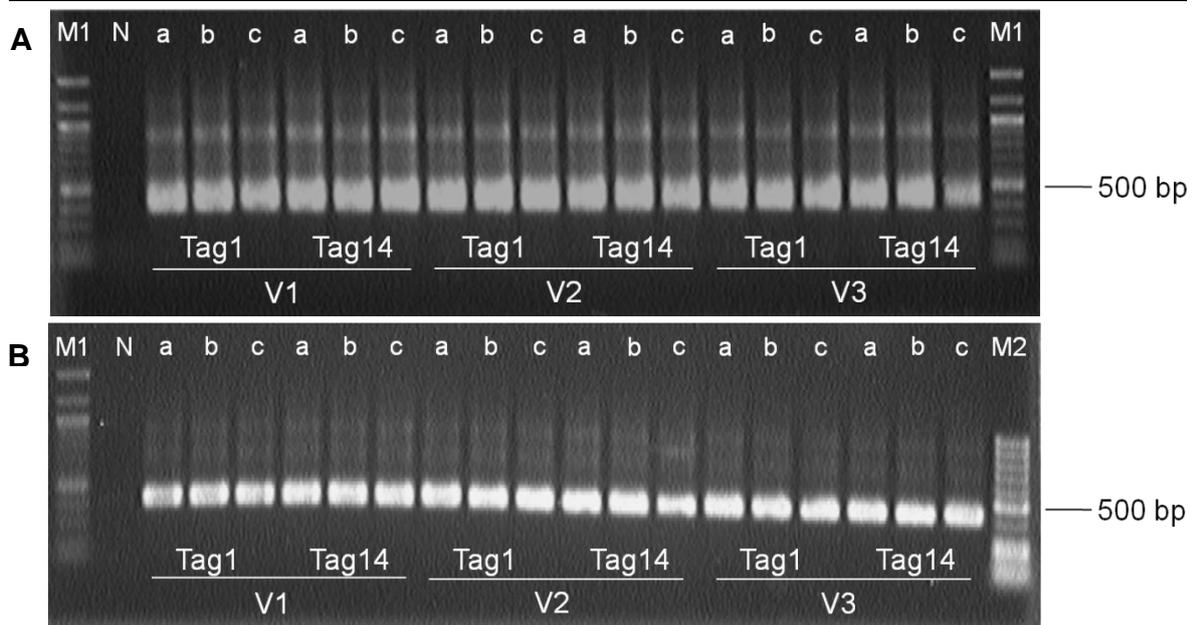


Abb. 3.32: Agarose-Gelbilder der *nested* PCR der *Bacteria* (A) und *Archaea* (B) für Tag 1 und Tag 14 der drei Versuche V1, V2, V3 (a=Kontrolle, b=3,38 mmol·d⁻¹ FS, c=6,76 mmol·d⁻¹ FS; M1=100 bp DNA Ladder; M2=GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder; N=Negativ-Kontrolle).

3.1.2.1 SSCP-Profile der *Bacteria*

LAM

Das SSCP-Profil der LAM für die *Bacteria* an Tag 1 und das Dendrogramm zur Clusteranalyse sind in Abb. 3.33 A dargestellt. Das SSCP-Profil weist in den Spuren von V1 verglichen mit V2 und V3 für jede Behandlung eine intensive, klar abgegrenzte Bande auf. Die Banden Nr.1-3 wurden durch Ausschneiden und Sequenzieren charakterisiert. Das Dendrogramm zeigt, dass alle Spuren zueinander eine minimale Ähnlichkeit von 95,3% aufweisen. Deutlich ist die Clusterbildung der zu einem Versuch gehörenden Behandlungen. Die statistische Auswertung ergab keinen signifikanten Einfluss des Faktors Behandlung auf das Profil der *Bacteria* an Tag 1 der Untersuchung ($p_{MC}=0,08$).

Das SSCP-Profil der LAM für die *Bacteria* an Tag 14 zeigt für V2 und V3 in den Spuren, die aus mit FS behandelten Fermentern stammen, jeweils eine Bande, die in der entsprechenden Kontrolle nicht auftritt (Abb. 3.33 B; Banden Nr.7-10). Demgegenüber ist diese Bande, wenn auch schwach ausgeprägt, in allen Spuren von V1 vorhanden (Abb. 3.33 B; Banden Nr.4-6). Zur Identifizierung der sich dahinter verbergenden Spezies wurden auch diese Banden ausgeschnitten, die DNA extrahiert und nach der Klonierung sequenziert.

Es konnte durch die Auswertung des Profils mit Hilfe der Clusteranalyse festgestellt werden, dass die Bandenmuster der mit FS behandelten Fermenter eines Versuchs zueinander ähnlicher sind als zur entsprechenden Kontrolle. Diese Unterschiede waren jedoch nicht signifikant ($p_{MC}=0,9$). Der statistische Vergleich der *Bacteria*-Profile von Tag 1 und Tag 14 ergab einen signifikanten Einfluss des Faktors Zeit ($p_{MC}<0,05$). Die Diversität der *Bacteria* erfuhr eine zeitabhängige Veränderung während der RUSITEC-Versuche.

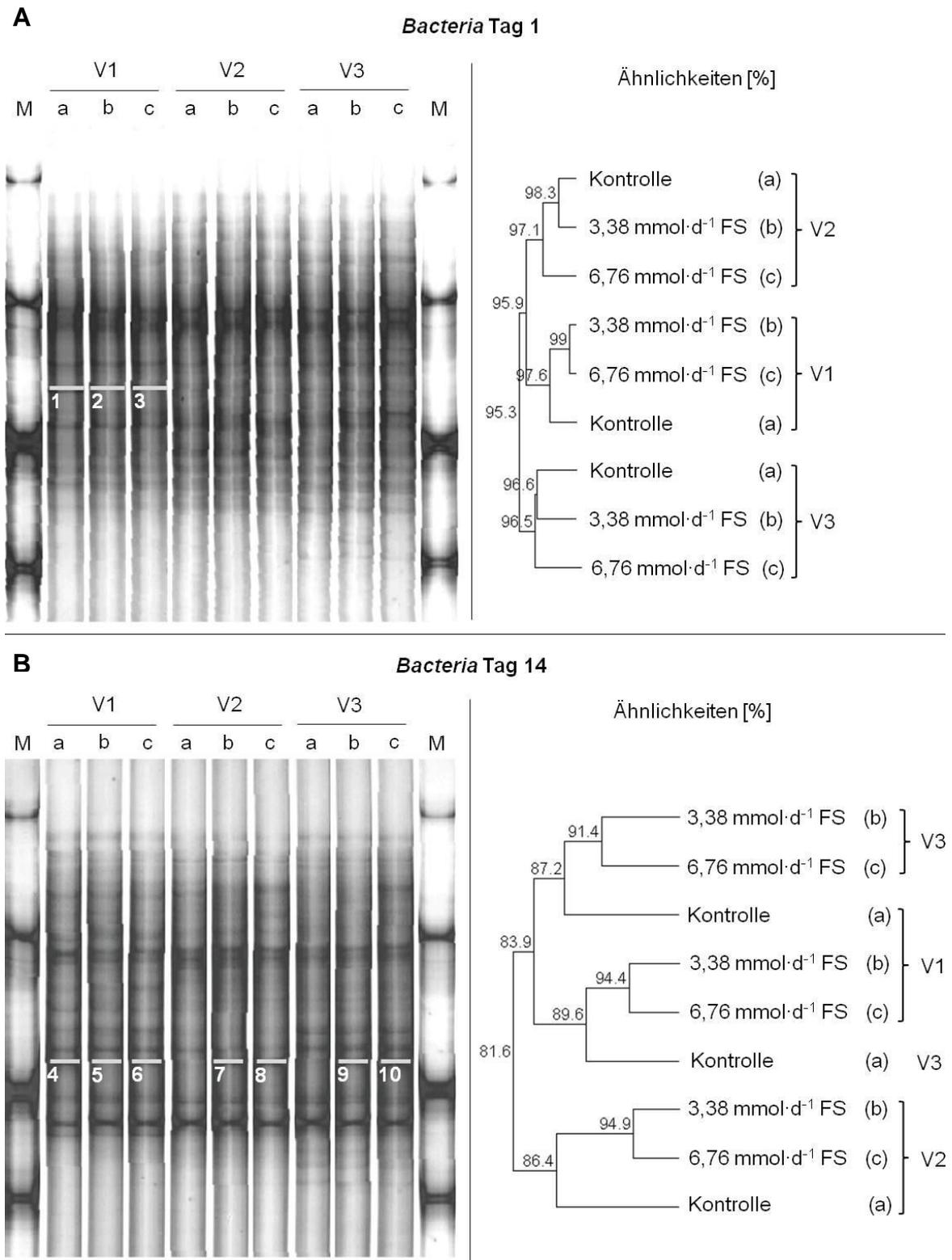


Abb. 3.33: *Bacteria*-Profile der LAM an Tag 1 (**A**) und Tag 14 (**B**) mit Dendrogrammen für die Versuche (V1, V2, V3) mit den Kontrollen (a) und den Fumarsäure-Behandlungen (3,38 mmol·d⁻¹ FS (b); 6,76 mmol·d⁻¹ FS (c)); M=Speziesstandard; 1-10: Nummer der ausgeschnittenen Banden.

SAM

Die Diversität der SAM für die *Bacteria* im SSCP-Profil war sehr homogen (Abb. 3.34). Die Clusteranalyse gruppierte die Behandlungen eines Versuchs im Dendrogramm aufgrund von Ähnlichkeitswerten >96%. Auch die Versuche ähnelten sich zu mehr als 90%. Statistisch konnte kein Einfluss der FS auf die Diversität der mit dem Futter assoziierten *Bacteria* nachgewiesen werden ($p_{MC}=0,7$).

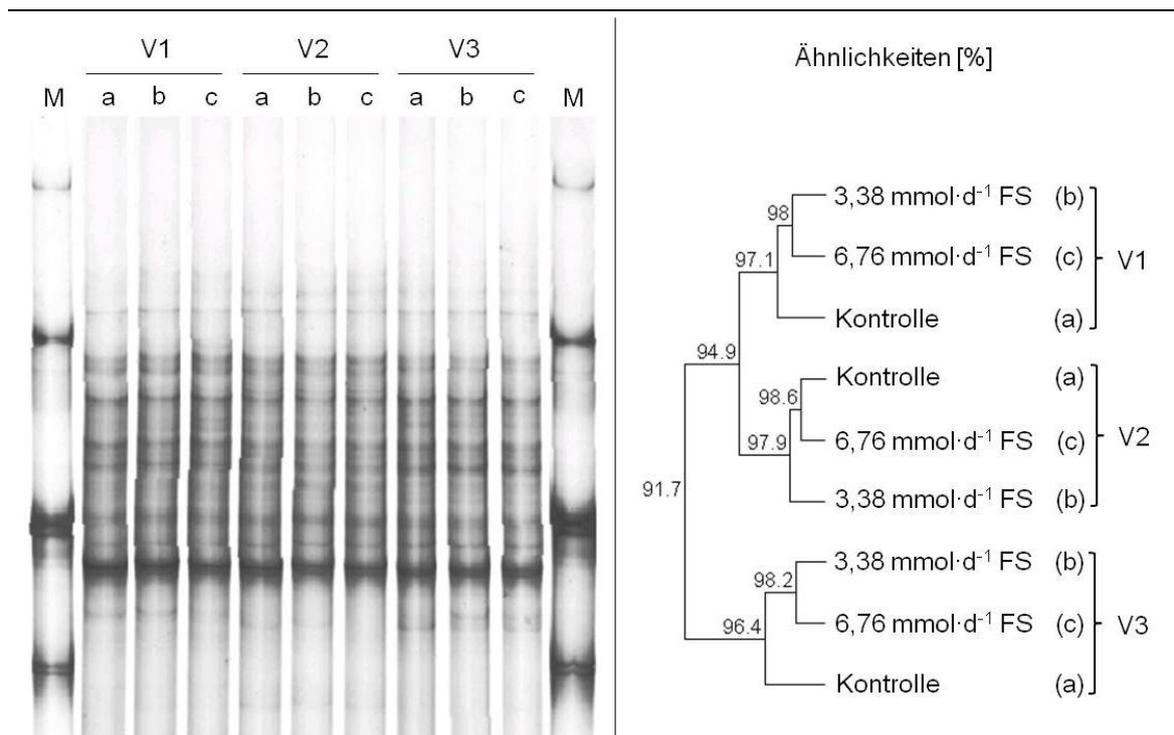


Abb. 3.34: *Bacteria*-Profil der SAM an Tag 14 mit Dendrogramm für die Versuche (V1, V2, V3) mit den Kontrollen (a) und den Fumarsäure-Behandlungen (3,38 mmol·d⁻¹ FS (b); 6,76 mmol·d⁻¹ FS (c)); M=Speziesstandard.

3.1.2.2 Charakterisierung der Banden aus den *Bacteria*-Profilen

Die in Abb. 3.33 gekennzeichneten Banden (Nr.1-10) wurden ausgeschnitten und die extrahierten DNA-Fragmente über den Zwischenschritt der Klonierung sequenziert. In Tab. 3.22 sind die Ergebnisse der Sequenzierung kurz zusammengefasst. Je Bande wurden maximal drei Klone sequenziert, wobei nicht jede Sequenzierung erfolgreich war.

Für die im *Bacteria*-Profil von Tag 1 markierten Banden (Nr.1-3) war bei den Kontroll-Fermentern und der Behandlung mit 6,76 mmol·d⁻¹ FS die Gattung *Streptococcus* mit einer Übereinstimmung von 100% zur Datenbank des

Ergebnisse

Ribosomal Database Projects (RDP) verantwortlich. Für die mit $3,38 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ FS behandelten Fermenter wurde mit einer Übereinstimmung von 66% *Acetivibrio* identifiziert (Bande Nr.2). Im *Bacteria*-Profil an Tag 14 wurde sowohl in der Kontrolle von V1 (Bande Nr.4) als auch in den FS-behandelten Fermentern von V1, V2 und V3 *Succiniclasticum* gefunden (Banden Nr. 5, 7, 8, 10). Außerdem wurden die Gattungen *Prevotella* in der Kontrolle von V1 (Bande Nr.4) und den mit FS behandelten Fermentern von V1 und V3 (Bande Nr.6 und 9) identifiziert. *Anaerovibrio* wurde in den mit $3,38 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ FS behandelten Fermentern in V1 gefunden (Bande Nr.5).

Tab. 3.22: Sequenzierte Klone aus entsprechender Bande und Ergebnisse des Sequenzvergleichs mit der Datenbank des *Ribosomal Database Projects* (RDP).

Profil	Bande Nr.	Klon Nr.	Domäne/Klasse/Ordnung/Familie	Gattung (Ähnlichkeit)
Bacteria Tag 1	1	1	Bacteria/Bacilli/Lactobacillales/Streptococcaceae	<i>Streptococcus</i> (100%)
	1	2	Bacteria/Bacilli/Lactobacillales/Streptococcaceae	<i>Streptococcus</i> (100%)
	2	2	Bacteria/Bacilli/Clostridiales/Ruminococcaceae	<i>Acetivibrio</i> (66%)
	3	1	Bacteria/Bacilli/Lactobacillales/Streptococcaceae	<i>Streptococcus</i> (100%)
	3	2	Bacteria/Bacilli/Lactobacillales/Streptococcaceae	<i>Streptococcus</i> (81%)
	3	3	Bacteria/Bacilli/Lactobacillales/Streptococcaceae	<i>Streptococcus</i> (100%)
Bacteria Tag 14	4	2	Bacteria/Bacteroidetes/Bacteroidales/Prevotellaceae	<i>Prevotella</i> (100%)
	4	3	Bacteria/Clostridia/Clostridiales/Veillonellaceae	<i>Succiniclasticum</i> (100%)
	5	2	Bacteria/Clostridia/Clostridiales/Veillonellaceae	<i>Anaerovibrio</i> (90%)
	5	3	Bacteria/Clostridia/Clostridiales/Veillonellaceae	<i>Succiniclasticum</i> (100%)
	6	2	Bacteria/Bacteroidetes/Bacteroidales/Prevotellaceae	<i>Prevotella</i> (100%)
	7	2	Bacteria/Clostridia/Clostridiales/Veillonellaceae	<i>Succiniclasticum</i> (100%)
	7	3	Bacteria/Clostridia/Clostridiales/Veillonellaceae	<i>Succiniclasticum</i> (100%)
	8	3	Bacteria/Clostridia/Clostridiales/Veillonellaceae	<i>Succiniclasticum</i> (100%)
	9	1	Bacteria/Bacteroidetes/Bacteroidales/Prevotellaceae	<i>Prevotella</i> (100%)
	10	3	Bacteria/Clostridia/Clostridiales/Veillonellaceae	<i>Succiniclasticum</i> (100%)

3.1.2.3 SSCP-Profil der *Archaea*

LAM

Bei Betrachtung des SSCP-Profiles der LAM für die *Archaea* an Tag 1 fallen keine qualitativen Unterschiede zwischen den Behandlungen auf (Abb. 3.35 A). Die ermittelten Ähnlichkeitswerte der Clusteranalyse für die Bandenmuster innerhalb eines Versuchs sind größer als 96%. Auch die Versuche ähneln sich stark mit minimalen Werten von 83,6%. Es zeigte sich keine signifikante Beeinflussung der Diversität der *Archaea* an Tag 1 durch die Zugabe von FS ($p_{MC}=0,4$).

Auch das SSCP-Profil der LAM für die *Archaea* an Tag 14 zeichnete sich durch Homogenität der Bandenmuster aus (Abb. 3.35 B). Dieser Eindruck wird auch im Dendrogramm der Clusteranalyse in den Ähnlichkeitswerten der Bandenmuster zueinander reflektiert. Die Werte für die Ähnlichkeiten der Behandlungen innerhalb eines Versuchs liegen bei >95%. V1 weist eine Ähnlichkeit von 81,2% zu V2 und V3 auf. Ein Effekt durch die Behandlung mit FS auf die mikrobielle Diversität ließ sich nicht nachweisen ($p_{MC}=0,07$). Der Vergleich der *Archaea*-Profile an Tag 1 und Tag 14 zeigte keinen signifikanten Einfluss der Zeit auf die Veränderung der Diversität der *Archaea* ($p_{MC}=0,8$).

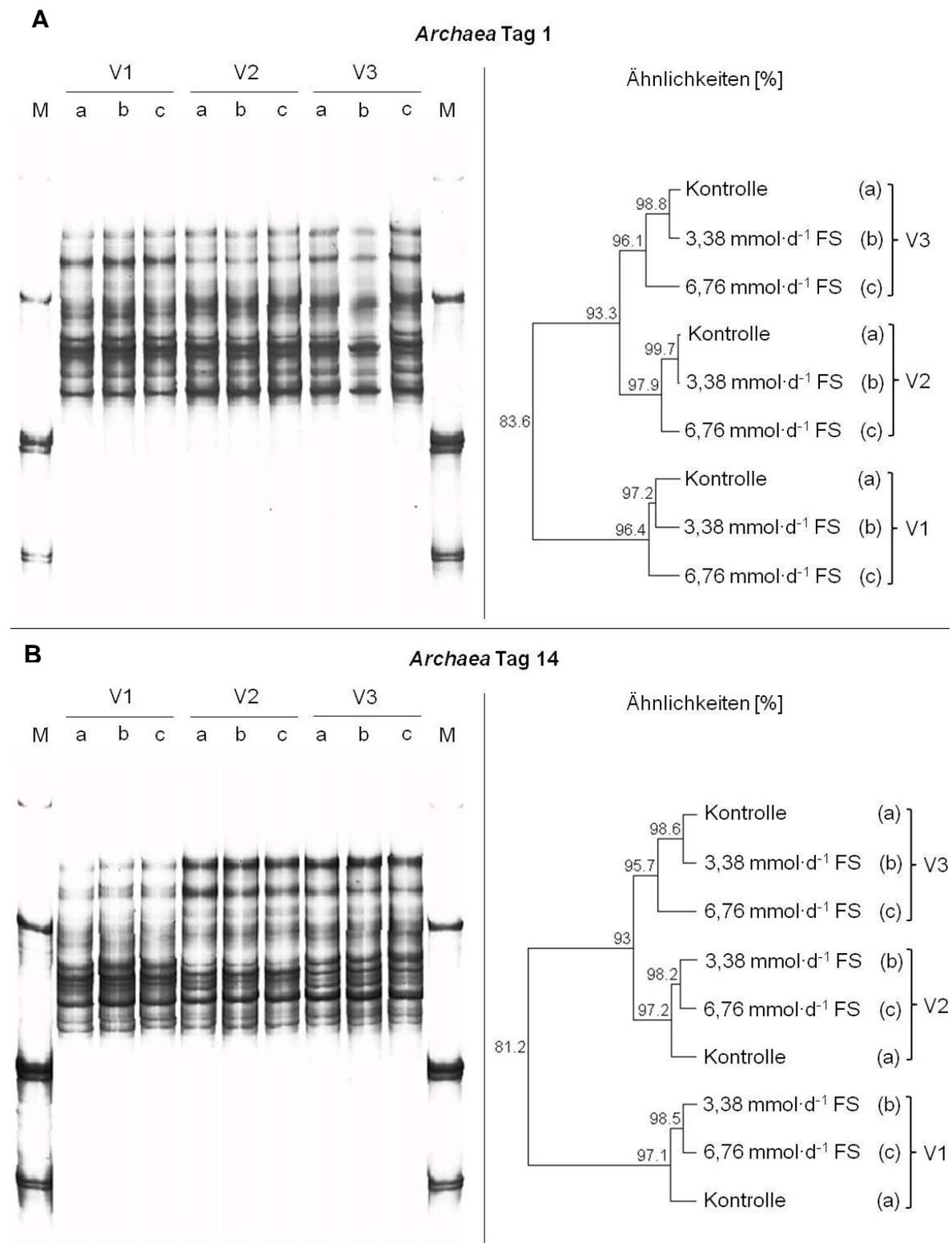


Abb. 3.35: *Archaea*-Profile der LAM an Tag 1 (**A**) und Tag 14 (**B**) mit Dendrogrammen für die Versuche (V1, V2, V3) mit den Kontrollen (a) und den Fumarsäure-Behandlungen (3,38 mmol·d⁻¹ FS (b); 6,76 mmol·d⁻¹ FS (c)); M=Speziesstandard.

SAM

Im *Archaea*-Profil der SAM an Tag 14 konnten keine qualitativen Unterschiede festgestellt werden (Abb. 3.36). Das Dendrogramm mit den Ähnlichkeitswerten aus der Clusteranalyse zeigt hier, dass die Bandenmuster der Kontrollen zu den mit FS behandelten Fermentern eines Versuchs mit Werten >95% nahezu vollständig identisch waren. Es wurde kein statistischer Unterschied in der Diversität der *Archaea* durch die Behandlung mit FS ermittelt ($p_{MC}=0,4$).

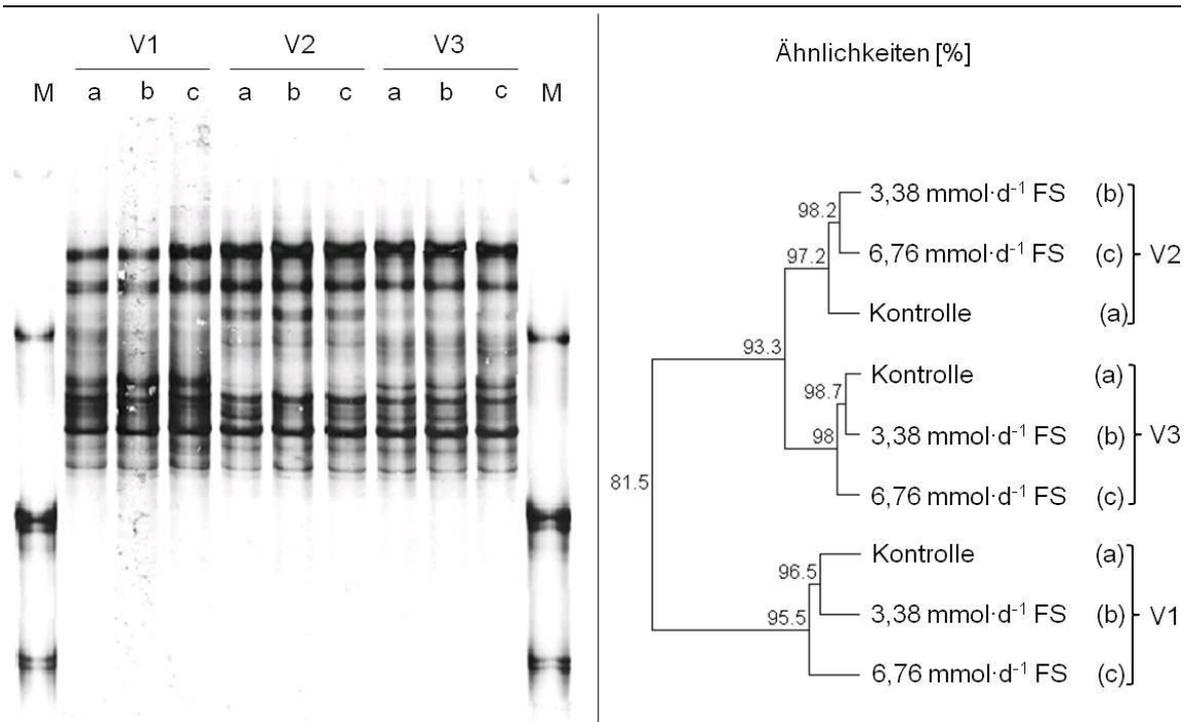


Abb. 3.36: *Archaea*-Profil der SAM an Tag 14 und Dendrogramm für die Versuche (V1, V2, V3) mit den Kontrollen (a) und den Fumarsäure-Behandlungen (3,38 mmol·d⁻¹ FS (b); 6,76 mmol·d⁻¹ FS (c)); M=Speziessstandard.

3.2 Fumarsäure und Maissilage

Aufgrund der Tatsache, dass die drei Versuchsdurchgänge mit Grassilage als Grundfutter tendenziell zu ähnlichen Ergebnissen führten, wurde für die Kombination von Fumarsäure (FS) mit dem Grundfutter Maissilage nur ein RUSITEC-Versuch durchgeführt (V4). Die Graphiken für die biochemischen Parameter zeigen die Ergebnisse für diesen Versuch mit dem Mittelwert und dem Standardfehler (*standard error of the mean*, SEM) der vier gleichbehandelten Fermenter (n=4) für die gesamte Versuchsphase.

3.2.1 RUSITEC-Versuch

3.2.1.1 pH-Werte

Die pH-Werte lagen für alle Behandlungen im Bereich zwischen 6,6 und 6,7 (Abb. 3.37). Die Zugabe von FS bewirkte eine signifikante Abnahme des pH-Werts gegenüber der Kontrolle (p<0,01). Der Faktor Zeit hatte zudem einen signifikanten Einfluss (p<0,01), der jedoch nicht gerichtet zu sein schien.

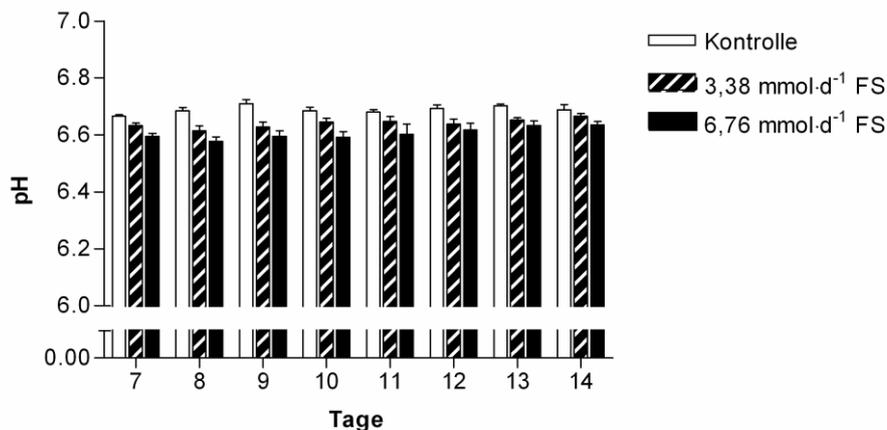


Abb. 3.37: pH-Werte der Kontrolle und Fumarsäure-Behandlungen (FS) ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; n=4). Ergebnisse der two-way ANOVA: Behandlung p<0,01 (Kontrolle vs. 3,38 mmol·d⁻¹ FS, Kontrolle vs. 6,76 mmol·d⁻¹ FS), Zeit p<0,01, Behandlung x Zeit n.s..

3.2.1.2 Redoxpotentiale

Die FS-Zugabe führte nicht zu signifikanten Unterschieden im Redoxpotential zwischen den Behandlungen (Abb. 3.38). Über die gesamte Versuchsphase wurde beobachtet, dass das Redoxpotential von Tag 7 an konstant negativer wurde. Dieser Zeiteffekt war signifikant ($p < 0,001$).

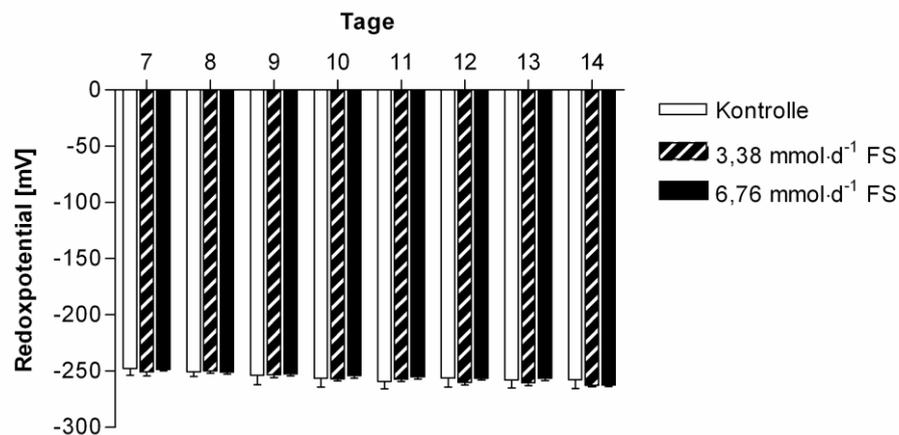


Abb. 3.38: Redoxpotentiale der Kontrolle und Fumarsäure-Behandlungen (FS) ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; $n=4$). Ergebnisse der two-way ANOVA: Behandlung n.s., Zeit $p < 0,001$, Behandlung x Zeit n.s..

3.2.1.3 Produktion der SCFA

Während die Produktionsraten der gesamten SCFA für die Kontrollen Werte unter 40 mmol pro Tag annahmen, lag durch die Zugabe von FS eine signifikante Erhöhung auf Werte von über 40 mmol pro Tag vor (Abb. 3.39; $p < 0,01$). Ein Einfluss der Zeit war statistisch nachweisbar ($p < 0,01$).

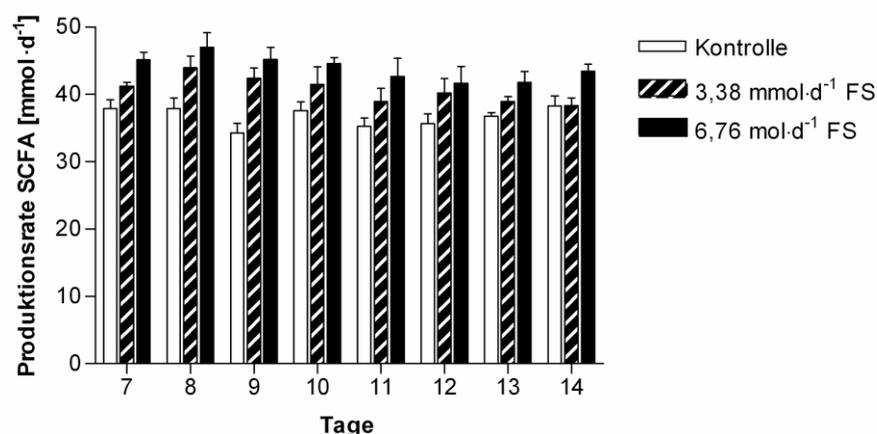


Abb. 3.39: Gesamte SCFA-Produktion der Kontrolle und der Fumarsäure-Behandlungen (FS) ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; $n=4$). Ergebnisse der two-way ANOVA: Behandlung $p < 0,01$ (Kontrolle vs. 3,38 mmol·d⁻¹ FS, Kontrolle vs. 6,76 mmol·d⁻¹ FS), Zeit $p < 0,01$, Behandlung x Zeit n.s..

Acetat-Produktion

Es wurden im Mittel pro Tag etwa 20 mmol Acetat gebildet, wobei die Behandlung mit FS keinen Einfluss auf die Acetat-Produktion zeigte (Abb. 3.40). Ein signifikanter Einfluss der Zeit spiegelte sich auch hier wider ($p < 0,01$).

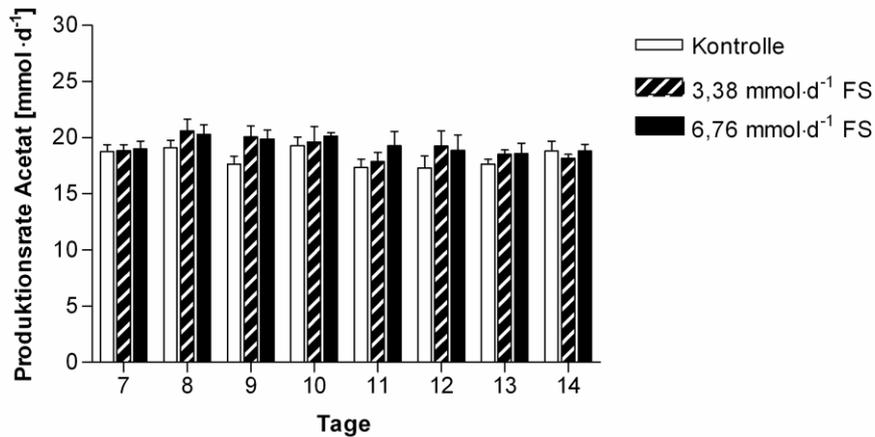


Abb. 3.40: Acetat-Produktion der Kontrolle und Fumarsäure-Behandlungen (FS) ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; $n=4$). Ergebnisse der two-way ANOVA: Behandlung n.s., Zeit $p < 0,01$, Behandlung x Zeit n.s..

Propionat-Produktion

Die Propionat-Produktion wurde durch die FS-Zugabe signifikant beeinflusst (Abb. 3.41). Die Zugabe von $6,76 \text{ mmol} \cdot \text{d}^{-1}$ FS führte zu einer signifikanten Erhöhung von ca. 10 mmol Propionat pro Tag auf 15 mmol ($p < 0,001$). Die Propionat-Produktion war durch den Faktor Zeit signifikant beeinflusst ($p < 0,001$).

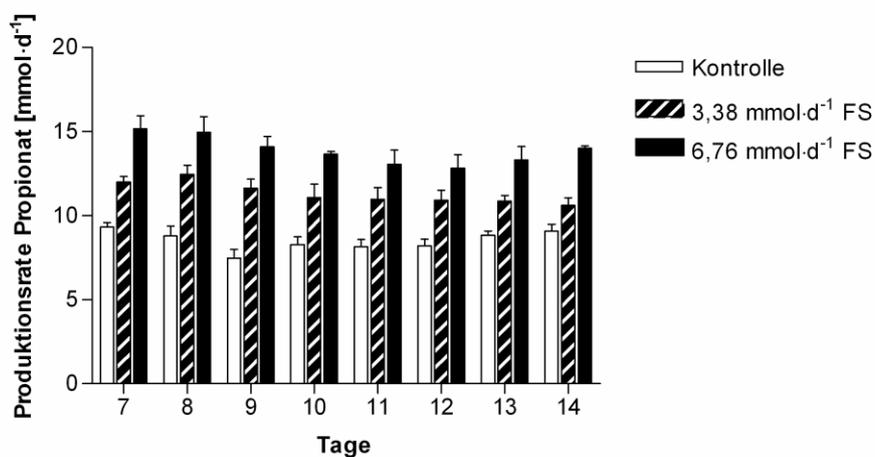


Abb. 3.41: Propionat-Produktion der Kontrolle und Fumarsäure-Behandlungen (FS) ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; $n=4$). Ergebnisse der two-way ANOVA: Behandlung $p < 0,001$ (Kontrolle vs. $3,38 \text{ mmol} \cdot \text{d}^{-1}$ FS, Kontrolle vs. $6,76 \text{ mmol} \cdot \text{d}^{-1}$ FS, $3,38 \text{ mmol} \cdot \text{d}^{-1}$ FS vs. $6,76 \text{ mmol} \cdot \text{d}^{-1}$ FS), Zeit $p < 0,001$, Behandlung x Zeit n.s..

Butyrat-Produktion

Die Butyrat-Produktion lag zu Beginn der Versuchsphase bei etwa 5 mmol pro Tag und sank an Tag 14 auf Werte von unter 4 mmol pro Tag (Abb. 3.42; $p < 0,001$). Es konnte kein Einfluss von FS auf die Butyrat-Produktion nachgewiesen werden.

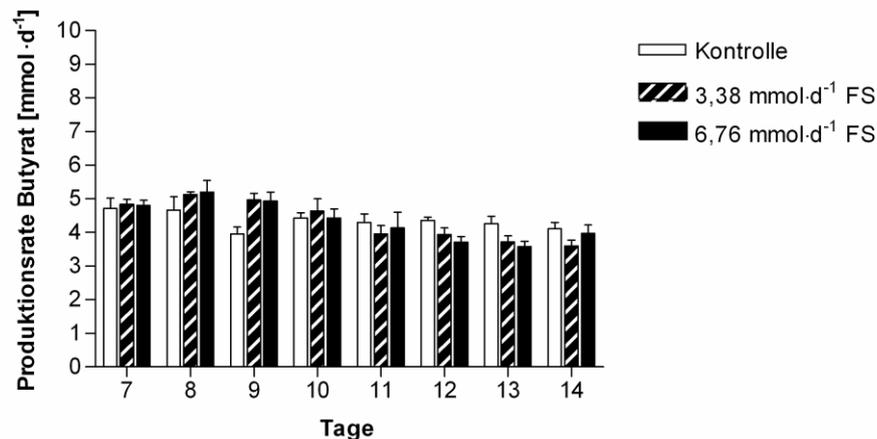


Abb. 3.42: Butyrat-Produktion der Kontrolle und Fumarsäure-Behandlungen (FS) ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; $n=4$). Ergebnisse der two-way ANOVA: Behandlung n.s., Zeit $p < 0,001$, Behandlung x Zeit $p < 0,01$.

Isovalerat-Produktion

Die Isovalerat-Produktion stieg von 4 mmol an Tag 7 auf etwa 5 mmol an Tag 14 an (Abb. 3.43; $p < 0,001$). Während kein Behandlungseffekt durch FS nachgewiesen werden konnte, lag eine signifikante Interaktion der Faktoren Behandlung und Zeit vor ($p < 0,05$).

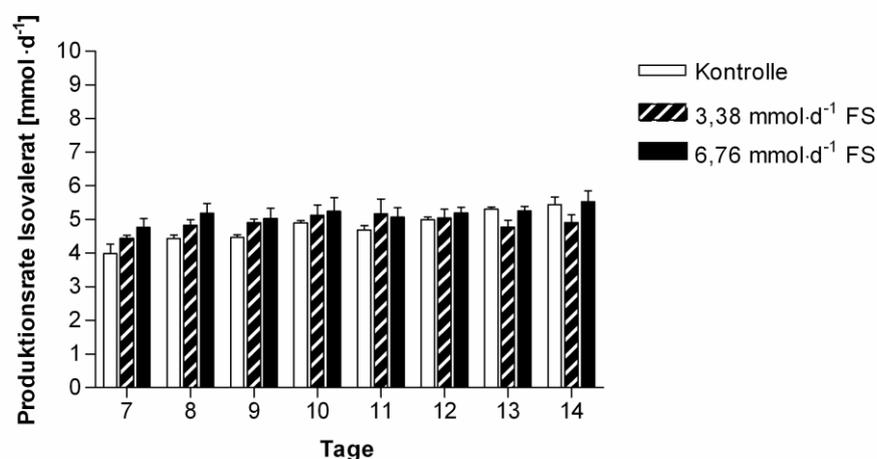


Abb. 3.43: Isovalerat-Produktion der Kontrolle und Fumarsäure-Behandlungen (FS) ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; $n=4$). Ergebnisse der two-way ANOVA: Behandlung n.s., Zeit $p < 0,001$, Behandlung x Zeit $p < 0,05$.

Valerat-Produktion

Die Valerat-Produktion erreichte Werte von etwa 1 mmol pro Tag (Abb. 3.44). Es konnten weder durch FS-Zugabe hervorgerufene Behandlungseffekte noch Zeiteffekte nachgewiesen werden.

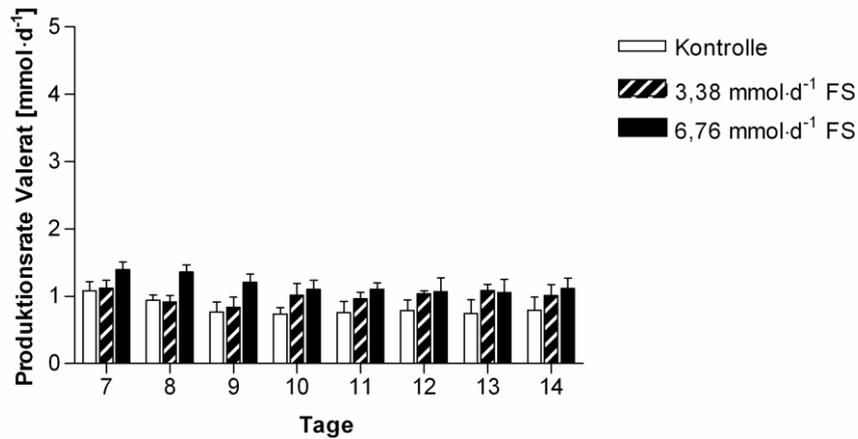


Abb. 3.44: Valerat-Produktion der Kontrolle und Fumarsäure-Behandlungen (FS) ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; n=4). Ergebnisse der two-way ANOVA: Behandlung n.s., Zeit n.s., Behandlung x Zeit n.s..

3.2.1.4 Molare Anteile der SCFA im Inokulum

Die molaren Anteile der SCFA in der Pansenflüssigkeit am Starttag des Versuchs wurden aus den SCFA-Konzentrationen (Tab. 6.12) berechnet. Die Konzentration des Acetats (C2) belief sich auf $67,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (Tab. 6.12), dies entsprach einem molaren Anteil von 70% (Abb. 3.45). Die Konzentrationen des Propionats (C3) und des Butyrats (C4) wurden auf $19,3 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ bzw. $8,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (Tab. 6.12) bestimmt. Daraus ergaben sich ein molarer Propionat-Anteil von 20% und ein molarer Butyrat-Anteil von 9%. Die Konzentrationen des Isobuty rats (iC4) und des Valerats lagen unter der Nachweisgrenze ($<0,3 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$). Für Isovalerat (iC5) wurde eine Konzentration von $0,6 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (Tab. 6.12) nachgewiesen, was einem molaren Anteil von 1% entsprach.

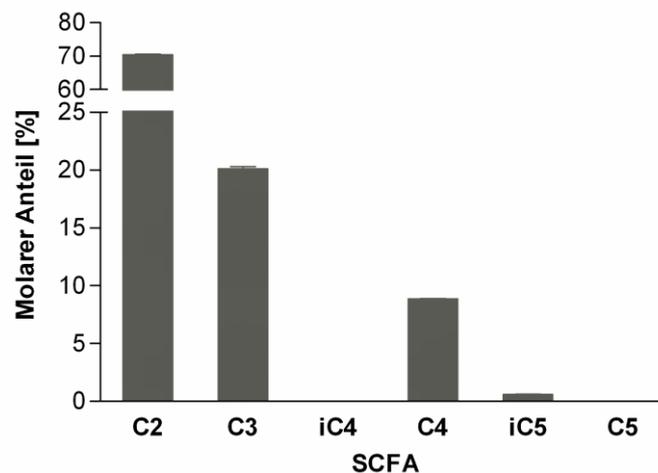


Abb. 3.45: Molare Anteile der SCFA in der Pansenflüssigkeit, die für die Inokulation von V4 aus dem Rind entnommen wurde ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; $n=3$; C2=Acetat, C3=Propionat; iC4=Isobuty rat; C4=Butyrat; iC5=Isovalerat; C5=Valerat). Werte fehlender Säulen lagen unter der Nachweisgrenze ($<0,3 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$).

3.2.1.5 Molare Anteile der SCFA in den Fermentern

Molare Acetat-Anteile

Die molaren Acetat-Anteile an der gesamten SCFA-Produktion lagen bei 40-50% (Abb. 3.46). Die FS-Zugabe bewirkte eine signifikante Abnahme des molaren Acetat-Anteils ($p < 0,001$). Sowohl die Zeit ($p < 0,05$) als auch die Interaktion von Behandlung und Zeit ($p < 0,01$) hatten einen signifikanten Einfluss.

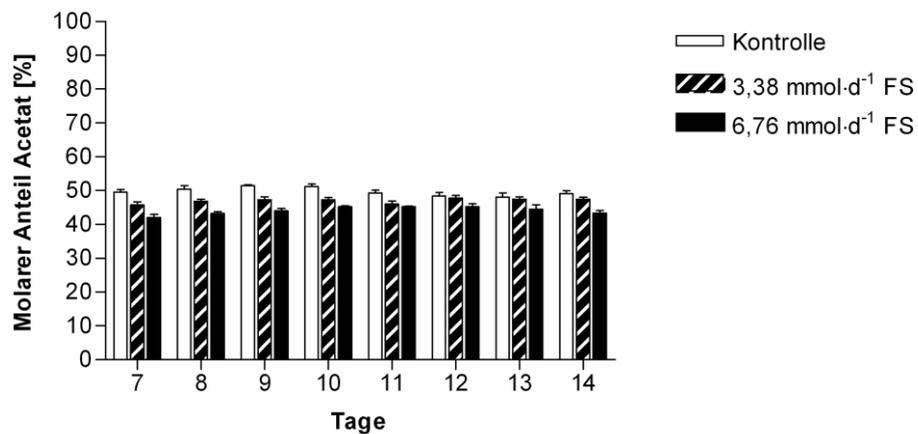


Abb. 3.46: Molare Acetat-Anteile der Kontrolle und Fumarsäure-Behandlungen (FS) ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; $n=4$). Ergebnisse der two-way ANOVA: Behandlung $p < 0,001$ (Kontrolle vs. $3,38 \text{ mmol} \cdot \text{d}^{-1}$ FS, Kontrolle vs. $6,76 \text{ mmol} \cdot \text{d}^{-1}$ FS, $3,38 \text{ mmol} \cdot \text{d}^{-1}$ FS vs. $6,76 \text{ mmol} \cdot \text{d}^{-1}$ FS), Zeit $p < 0,05$, Behandlung x Zeit $p < 0,01$.

Molare Propionat-Anteile

Die molaren Propionat-Anteile an der Gesamtproduktion der SCFA stiegen signifikant von 25% (Kontrolle) durch die Zugabe von $6,76 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ FS auf über 30% an (Abb. 3.47; $p < 0,01$). Es lag ein signifikanter Einfluss der Zeit vor ($p < 0,05$).

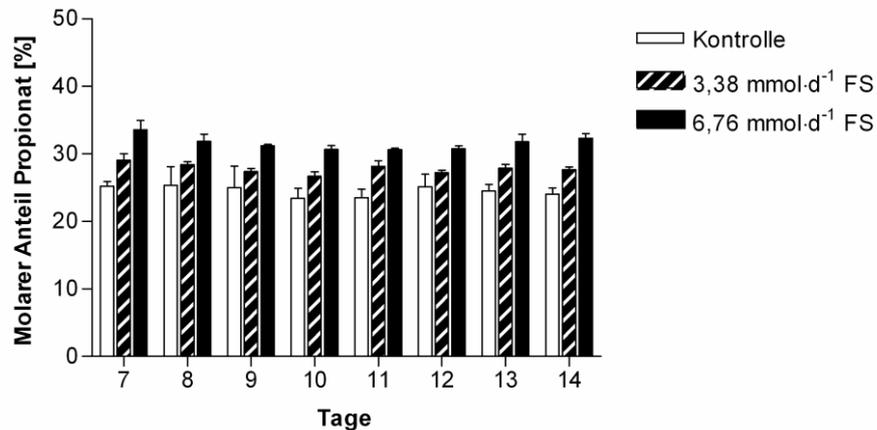


Abb. 3.47: Molare Propionat-Anteile der Kontrolle und Fumarsäure-Behandlungen (FS) ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; $n=4$). Ergebnisse der two-way ANOVA: Behandlung $p < 0,01$ (Kontrolle vs. $6,76 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ FS), Zeit $p < 0,05$, Behandlung x Zeit n.s..

Molare Butyrat-Anteile

In der Kontrolle betrug der molare Butyrat-Anteil an der Gesamtproduktion der SCFA etwa 12% (Abb. 3.48). Durch FS sank der molare Anteil signifikant ($p < 0,01$). Die Zeit ($p < 0,001$) und die Interaktion zwischen den Faktoren Behandlung und Zeit beeinflussten den molaren Butyrat-Anteil signifikant ($p < 0,01$).

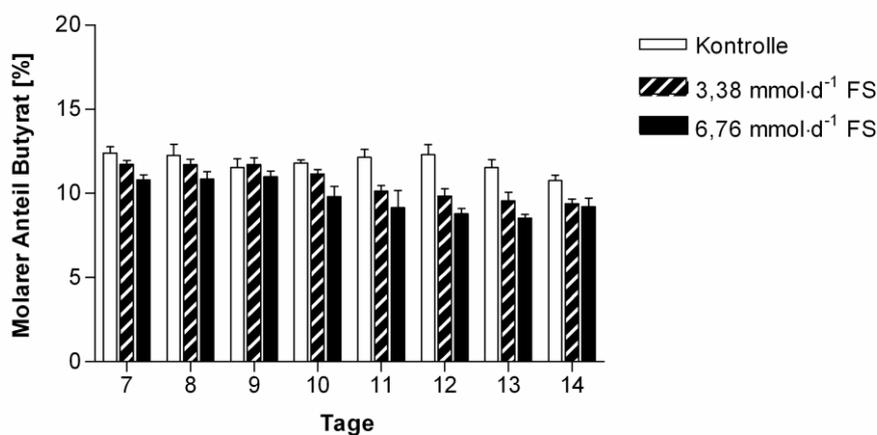


Abb. 3.48: Molare Butyrat-Anteile der Kontrolle und Fumarsäure-Behandlungen (FS) ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; $n=4$). Ergebnisse der two-way ANOVA: Behandlung $p < 0,01$ (Kontrolle vs. $3,38 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ FS, Kontrolle vs. $6,76 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ FS), Zeit $p < 0,001$, Behandlung x Zeit $p < 0,01$.

Molare Isovalerat-Anteile

Die Zugabe von FS hatte keinen Einfluss auf die molaren Isovalerat-Anteil an der Gesamtproduktion der SCFA (Abb. 3.49). Es zeigte sich ein Einfluss der Zeit ($p < 0,001$), der zu einer signifikanten Zunahme der molaren Anteile von 10% an Tag 7 auf 14% an Tag 14 führte.

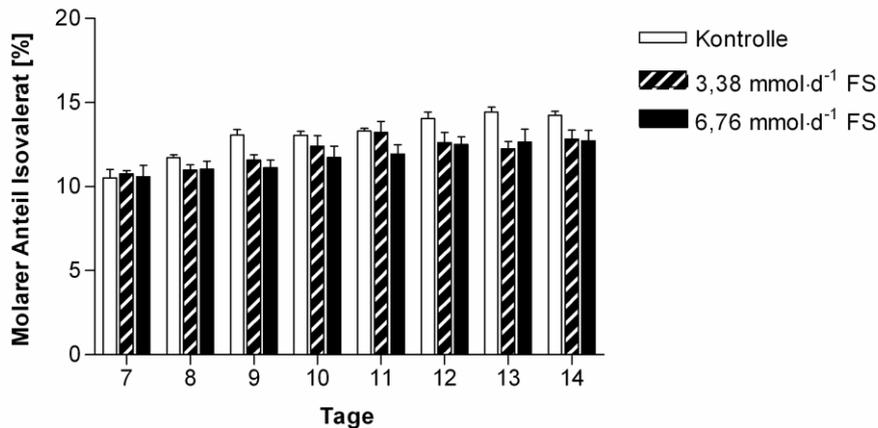


Abb. 3.49: Molare Isovalerat-Anteile der Kontrolle und Fumarsäure-Behandlungen (FS) ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; $n=4$). Ergebnisse der two-way ANOVA: Behandlung n.s., Zeit $p < 0,001$, Behandlung x Zeit n.s..

Molare Valerat-Anteile

Für Valerat wurden molare Anteile an der Gesamtproduktion der SCFA von 2-3% ermittelt (Abb. 3.50). Diese wurden weder durch die Behandlung mit FS noch durch die Zeit oder der Interaktion beider Faktoren beeinflusst.

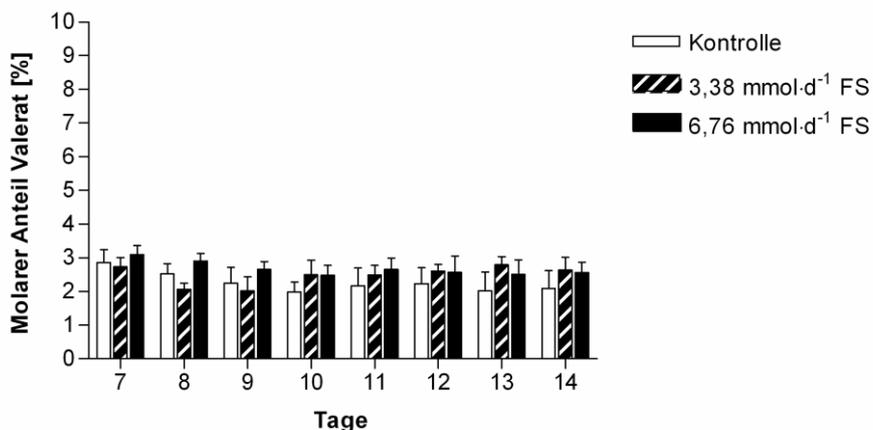


Abb. 3.50: Molare Valerat-Anteile der Kontrolle und Fumarsäure-Behandlungen (FS) ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; $n=4$). Ergebnisse der two-way ANOVA: Behandlung n.s., Zeit n.s., Behandlung x Zeit n.s..

3.2.1.6 Acetat-Propionat-Verhältnisse

Signifikante FS-Effekte ließen sich für die Verhältnisse von Acetat zu Propionat nachweisen (Abb. 3.51; $p < 0,001$). Während in den Kontroll-Fermentern Werte von etwa 2 erreicht wurden, kam es durch FS zu einer signifikanten Abnahme auf bis zu 1,3. Zusätzlich wurde ein signifikanter Einfluss der Zeit festgestellt ($p < 0,001$).

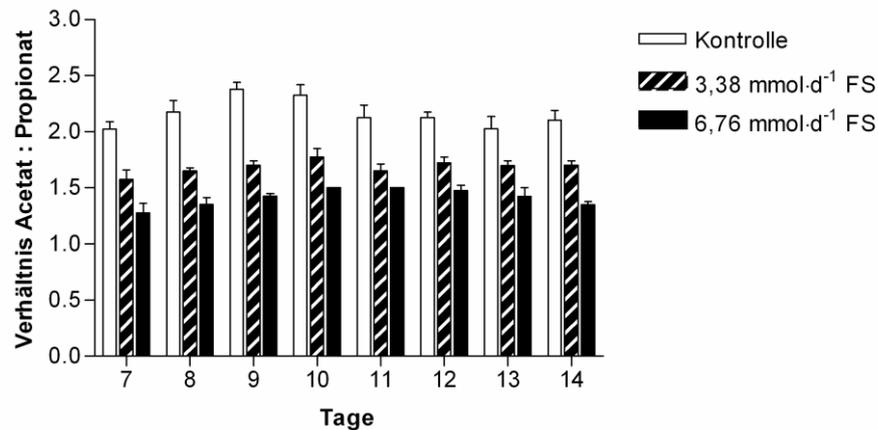


Abb. 3.51: Acetat-Propionat-Verhältnisse der Kontrolle und der Fumarsäure-Behandlungen (FS) ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; $n=4$). Ergebnisse der two-way ANOVA: Behandlung $p < 0,001$ (Kontrolle vs. $3,38 \text{ mmol} \cdot \text{d}^{-1}$ FS, Kontrolle vs. $6,76 \text{ mmol} \cdot \text{d}^{-1}$ FS, $3,38 \text{ mmol} \cdot \text{d}^{-1}$ FS vs. $6,76 \text{ mmol} \cdot \text{d}^{-1}$ FS), Zeit $p < 0,001$, Behandlung x Zeit n.s..

3.2.1.7 Fermentationsgas

Für die Produktion des gesamten Fermentationsgases wurden pro Tag Werte zwischen 300 ml und 400 ml ermittelt (Abb. 3.52). Die Gasproduktion war durch die Zugabe von FS nicht verändert verglichen mit der Kontrolle. Es zeigte sich ein signifikanter zeitlicher Einfluss auf die Gasproduktion ($p < 0,01$).

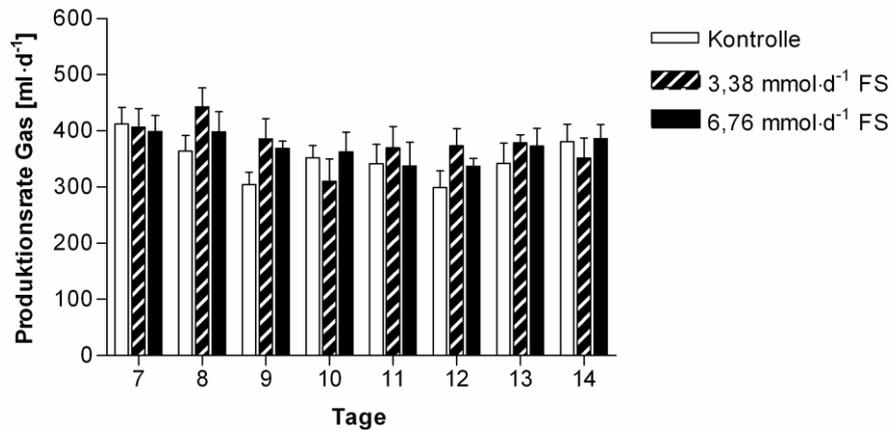


Abb. 3.52: Produktion des gesamten Fermentationsgas der Kontrolle und Fumarsäure-Behandlungen (FS) ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; $n=4$). Ergebnisse der two-way ANOVA: Behandlung n.s., Zeit $p < 0,01$, Behandlung x Zeit n.s..

CH₄-Produktion

Die Zugabe von FS hatte keinen Einfluss auf die CH₄-Produktion (Abb. 3.53). Zu Beginn der Versuchsphase lag die tägliche Produktion bei ca. 100 ml, fiel dann auf 70 ml ab und stieg gegen Versuchsende wieder auf ca. 100 ml an. Dieser zeitliche Einfluss war signifikant ($p < 0,01$).

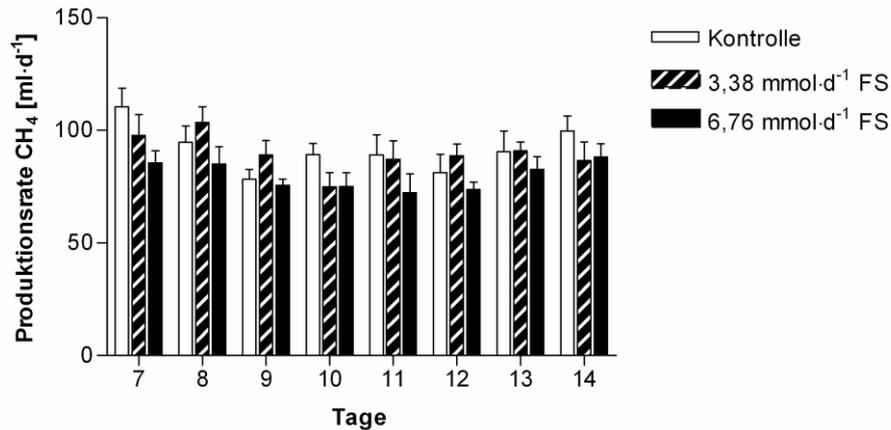


Abb. 3.53: CH₄-Produktion der Kontrolle und Fumarsäure-Behandlungen (FS) ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; $n=4$). Ergebnisse der two-way ANOVA: Behandlung n.s., Zeit $p < 0,01$, Behandlung x Zeit n.s..

CH₄-Anteile

Das Fermentationsgas bestand zu etwa einem Drittel aus CH₄ und zwei Drittel aus CO₂ (Abb. 3.54, 3.56). Es kam zu einer signifikanten Reduktion der CH₄-Anteile auf 23% bzw. 20% durch die Zugabe von 3,38 mmol·d⁻¹ bzw. 6,76 mmol·d⁻¹ FS (Abb. 3.54; $p < 0,001$). Es lag ein signifikanter Zeiteffekt vor ($p < 0,05$).

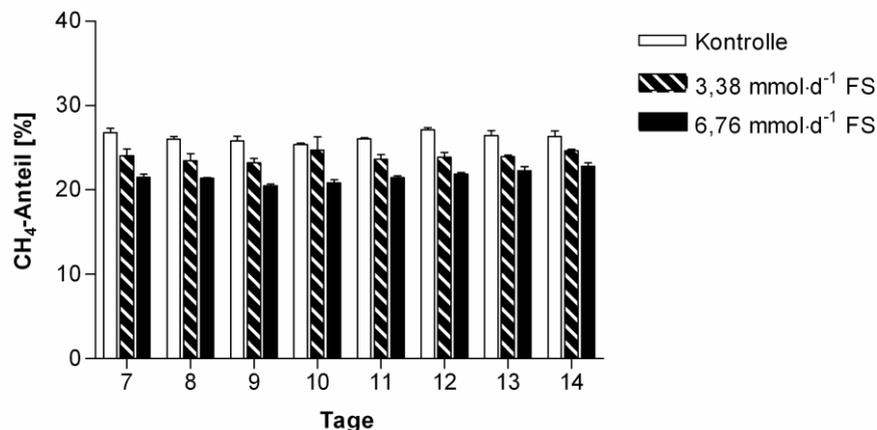


Abb. 3.54: CH₄-Anteile am Fermentationsgas der Kontrolle und Fumarsäure-Behandlungen (FS) ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; $n=4$). Ergebnisse der two-way ANOVA: Behandlung $p < 0,001$ (Kontrolle vs. 3,38 mmol·d⁻¹ FS, Kontrolle vs. 6,76 mmol·d⁻¹ FS, 3,38 mmol·d⁻¹ FS vs. 6,76 mmol·d⁻¹ FS), Zeit $p < 0,05$, Behandlung x Zeit n.s..

CO₂-Produktion

Die CO₂-Produktion schwankte in einem Bereich von täglich 200-340 ml (Abb. 3.55). Es konnten keine signifikanten Änderungen in der CO₂-Produktion durch FS gezeigt werden. Demgegenüber stand ein signifikanter Einfluss der Zeit ($p < 0,05$).

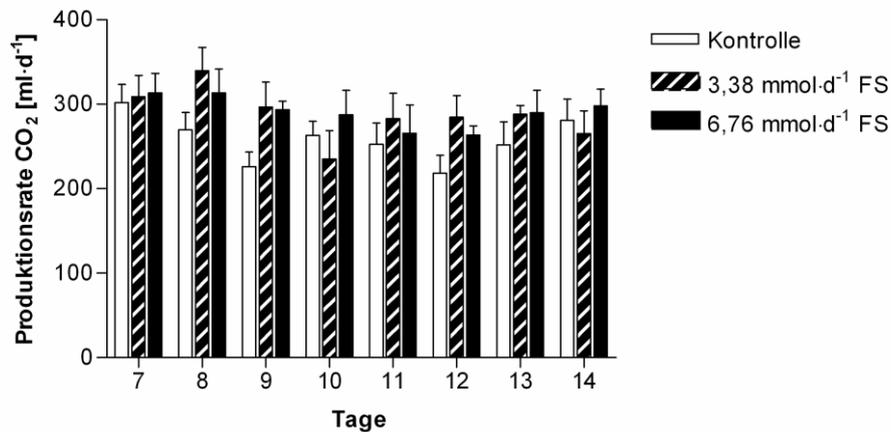


Abb. 3.55: CO₂-Produktion der Kontrolle und Fumarsäure-Behandlungen (FS) ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; $n=4$). Ergebnisse der two-way ANOVA: Behandlung n.s., Zeit $p < 0,05$, Behandlung x Zeit n.s..

CO₂-Anteile

Die Zugabe von FS beeinflusste die CO₂-Anteile am Fermentationsgas signifikant (Abb. 3.56; $p < 0,001$). Diese stiegen infolge der Behandlungen mit 3,38 mmol·d⁻¹ bzw. 6,76 mmol·d⁻¹ FS auf 76% bzw. 78% an. Der Faktor Zeit beeinflusste die CO₂-Anteile zusätzlich signifikant ($p < 0,05$).

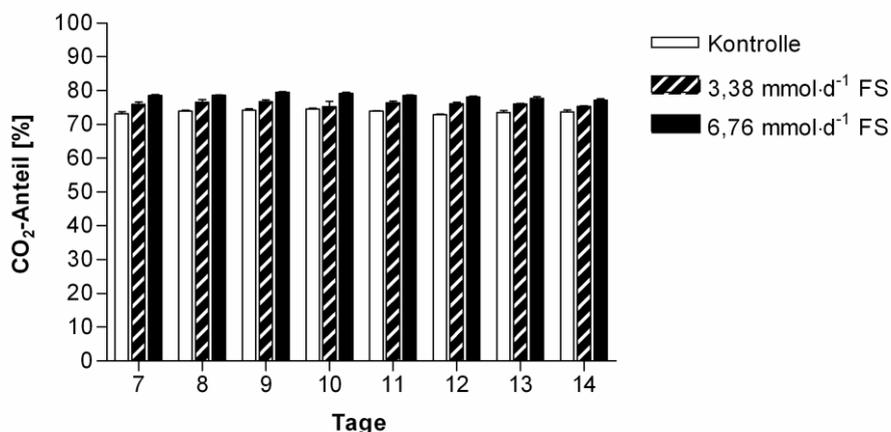


Abb. 3.56: CO₂-Anteile am Fermentationsgas der Kontrolle und Fumarsäure-Behandlungen (FS) ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; $n=4$). Ergebnisse der two-way ANOVA: Behandlung $p < 0,001$ (Kontrolle vs. 3,38 mmol·d⁻¹ FS, Kontrolle vs. 6,76 mmol·d⁻¹ FS, 3,38 mmol·d⁻¹ FS vs. 6,76 mmol·d⁻¹ FS), Zeit $p < 0,05$, Behandlung x Zeit n.s..

Mittlere CH₄- und CO₂-Produktion

Zusammenfassend sind in Abb. 3.57 die Ergebnisse der über die gesamte Versuchsphase gemittelten CH₄- und CO₂-Produktion gezeigt. Es konnte eine leichte numerische Reduktion der CH₄-Produktion durch die FS-Behandlung beobachtet werden, die jedoch nicht statistisch signifikant war. Die numerische Reduktion betrug durch Zugabe von 6,76 mmol·d⁻¹ FS in V1 pro Tag etwa 12 ml.

Bei der CO₂-Produktion kam es zu einer numerischen Zunahme durch die Behandlung mit FS. Infolge der Zugabe von 6,76 mmol·d⁻¹ FS konnte eine Zunahme um 32 ml beobachtet werden. Auch hierbei handelte es sich nicht um einen signifikanten Einfluss.

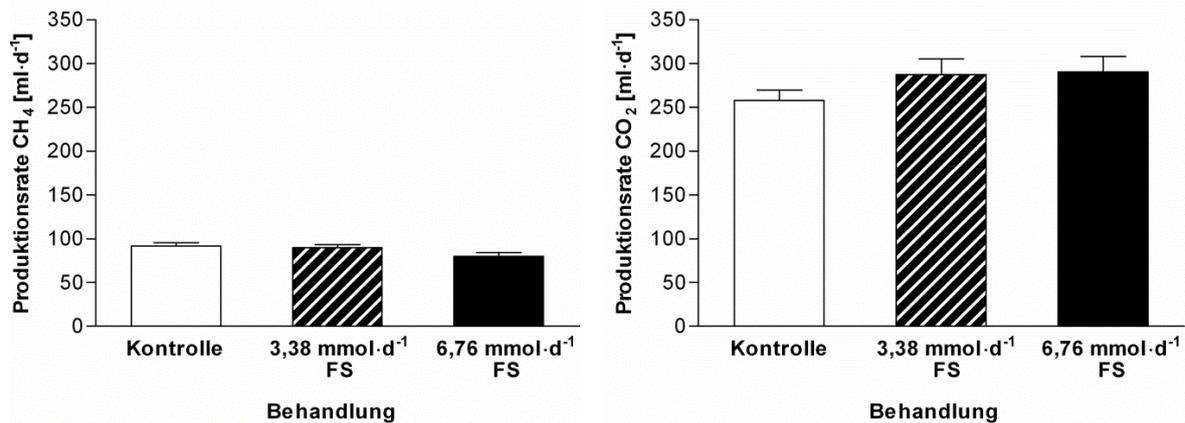


Abb. 3.57: Mittlere CH₄- und CO₂-Produktion über die gesamte Versuchsphase für die Kontrollen und Fumarsäure-Behandlungen (FS) ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; n=4). Ergebnisse der two-way ANOVA: Behandlung: n.s.

3.2.1.8 Ammoniak-Konzentrationen

Die Konzentrationen des Ammoniaks lagen bei 8-10 mmol·l⁻¹. Es konnte kein Einfluss durch die Zugabe von FS festgestellt werden (Abb. 3.58). Der Faktor Zeit wirkte sich nicht auf die Ammoniak-Konzentrationen aus.

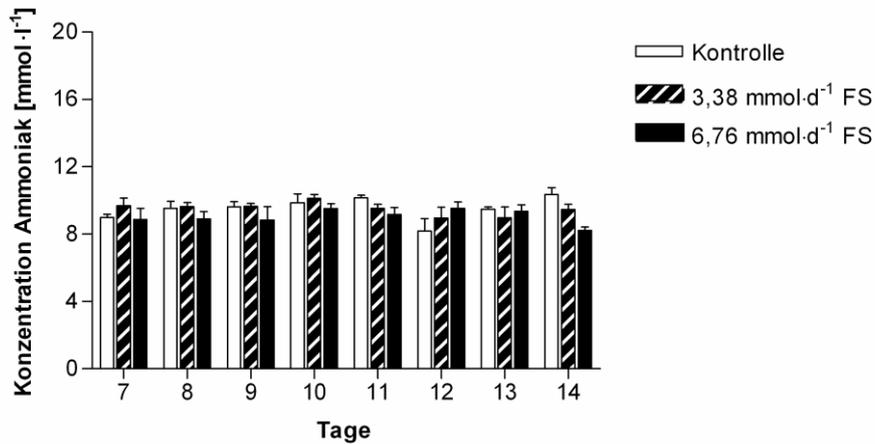


Abb. 3.58: Ammoniak-Konzentrationen der Kontrolle und der Fumarsäure-Behandlungen (FS) ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; n=4). Ergebnisse der two-way ANOVA: Behandlung n.s., Zeit n.s., Behandlung x Zeit $p < 0,05$.

3.2.1.9 Mikrobielle Proteinsynthese

Insgesamt wurde pro Tag 450-480 mg mikrobielles Protein synthetisiert (Abb. 3.59). Die Behandlung mit FS beeinflusste die gesamte mikrobielle Proteinsynthese nicht.

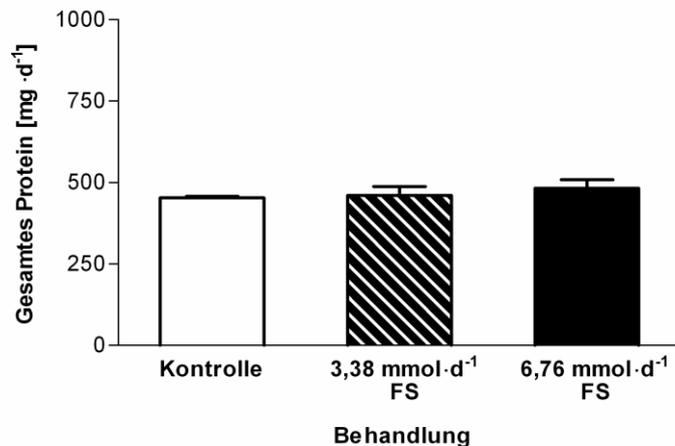


Abb. 3.59: Gesamtes gebildetes Protein der Kontrolle und Fumarsäure-Behandlungen (FS) über die gesamte Versuchsphase ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; n=4). Ergebnisse der one-way ANOVA: Behandlung n.s..

Mikrobielle Proteinsynthese der LAM und SAM

Sowohl für die Proteinsynthese durch die LAM als auch durch die SAM konnte kein FS-Einfluss nachgewiesen werden (Abb. 3.60). Die LAM bildeten mit einer mittleren Menge von 315 mg pro Tag mehr Protein als die SAM (150 mg pro Tag).

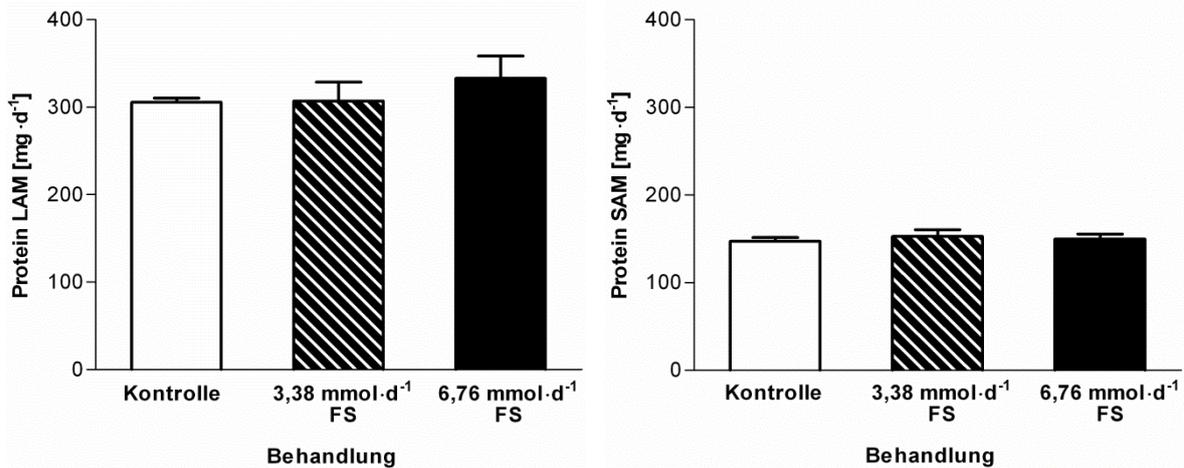


Abb. 3.60: Gebildetes Protein durch die LAM bzw. SAM für Kontrollen und Fumarsäure-Behandlungen (FS) über die gesamte Versuchsphase ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; $n=4$). Ergebnisse der one-way ANOVA: Behandlung n.s.

Effizienzen der mikrobiellen Proteinsynthese

Es wurde etwa 80 g mikrobielles Protein pro kg abgebauter OS synthetisiert (Abb. 3.61). Es traten keine signifikanten Unterschiede in der Effizienz der mikrobiellen Proteinsynthese (EMP) durch die Zugabe von FS auf.

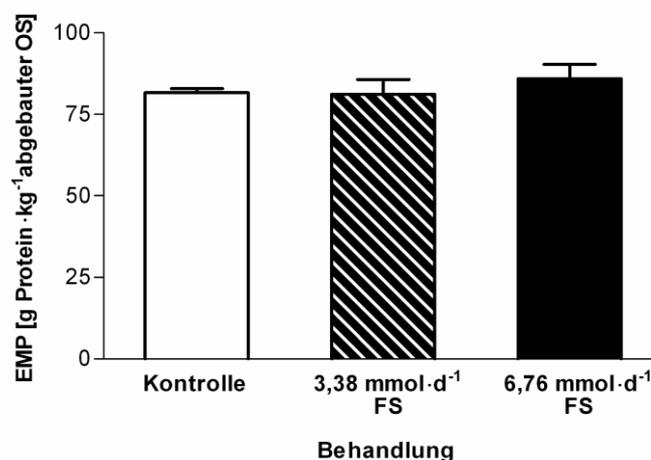


Abb. 3.61: Effizienzen der mikrobiellen Proteinsynthese (EMP) für Kontrollen und Fumarsäure-Behandlungen (FS) über die gesamte Versuchsphase ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; $n=4$). Ergebnisse der one-way ANOVA: Behandlung n.s.

3.2.1.10 Verdaulichkeiten der Rohnährstoffe

Weder die Verdaulichkeiten der OS noch des XP wiesen signifikante Unterschiede auf (Abb. 3.62). Im Mittel wurden Werte um 57% für die Verdaulichkeiten der OS erreicht. Die Verdaulichkeiten des XP lagen im Mittel bei 55%.

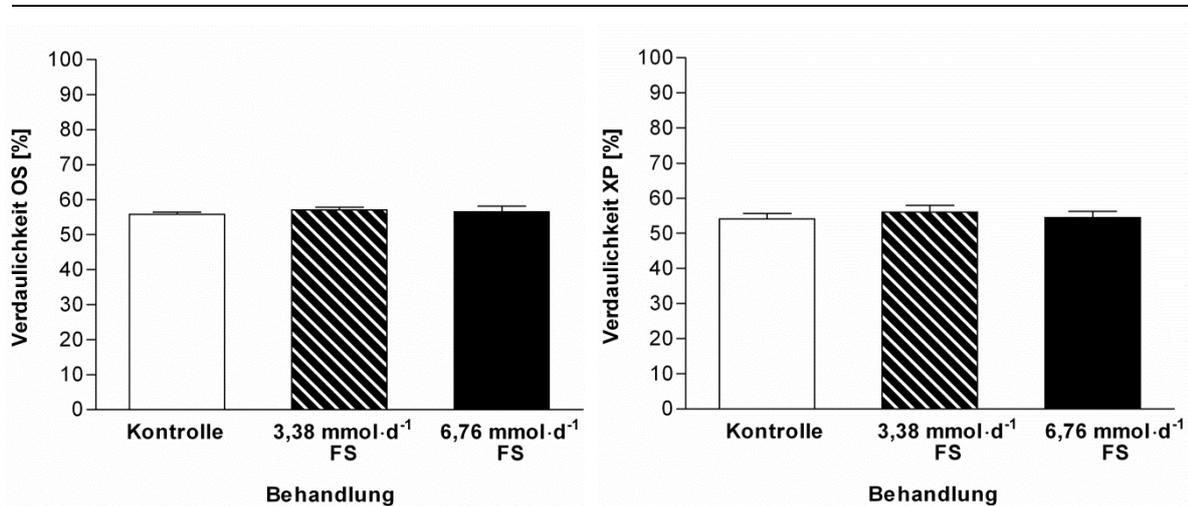


Abb. 3.62: Verdaulichkeiten der organischen Substanz (OS) bzw. des Rohproteins (XP) für Kontrollen und Fumarsäure-Behandlungen (FS) über die gesamte Versuchsphase ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; n=4). Ergebnisse der one-way ANOVA: Behandlung n.s..

Für die Verdaulichkeiten der NDF und ADF verhielt es sich ähnlich wie für die OS und das XP. In beiden Fällen führte die Zugabe von FS zu keinem signifikanten Behandlungseffekt (Abb. 3.63). Für die NDF wurde Verdaulichkeiten von etwa 25% und für die ADF von 16% ermittelt.

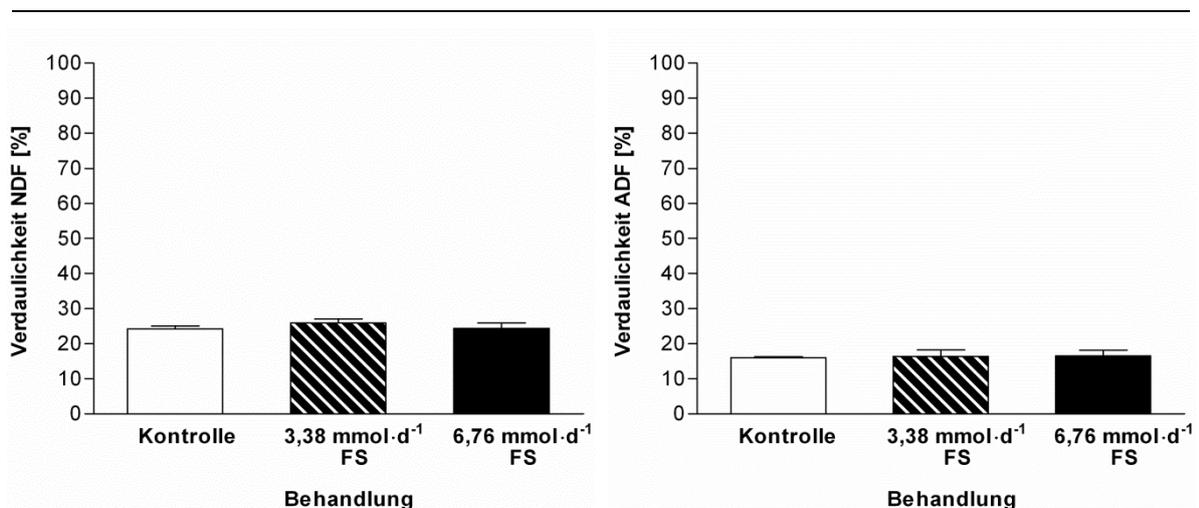


Abb. 3.63: Verdaulichkeiten der neutralen (NDF) bzw. der sauren Detergenzienfasern (ADF) für Kontrollen und Fumarsäure-Behandlungen (FS) über die gesamte Versuchsphase ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; n=4). Ergebnisse der one-way ANOVA: Behandlung n.s..

3.2.1.11 Protozoa

Die entnommene Pansenflüssigkeit (native Probe) hatte eine signifikant höhere Anzahl an *Protozoa* als die nach einem Versuchstag entnommene Probe aus den Kontroll-Fermentern (Abb. 3.64; t-test, $\bar{x} \pm \text{SEM}$; $n=3$; $p<0,001$). Während die native Probe 217.000 *Protozoa* pro ml enthielt, befanden sich an Tag 1 etwa 50.000 pro ml in den Fermentern. Nach 14 Tagen nahm die Zahl weiter auf etwa 10.000 pro ml ab. Dieser Einfluss der Zeit auf die *Protozoa* war hoch signifikant ($p<0,001$). Ein Effekt der FS wurde nicht festgestellt.

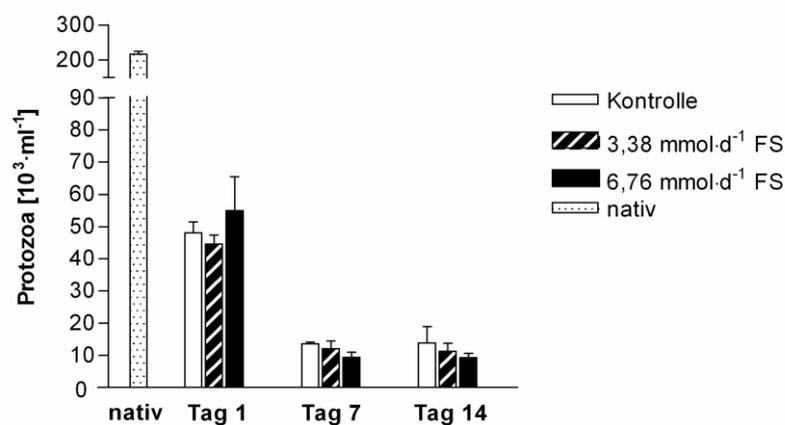


Abb. 3.64: Anzahlen der *Protozoa* in der nativen Probe ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; $n=3$), den Kontroll-Fermentern und den mit Fumarsäure (FS) behandelten Fermentern ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; $n=4$). Ergebnisse der one-way ANOVA: Behandlung n.s., Zeit $p<0,001$, Behandlung x Zeit n.s..

3.2.2 Ergebnisse der SSCP-Analyse

Auch für die Untersuchung des Einfluss der FS in Kombination mit Maissilage als Grundfutter wurde zunächst die gDNA isoliert. Die Agarose-Gelbilder der sich anschließenden *nested* PCR (Abb. 3.65) zeigen, dass die gewünschten PCR-Produkte mit der Länge von 408 bp für die *Bacteria* (Abb. 3.65 A) und *Archaea* (Abb. 3.65 B) erfolgreich aus der gDNA amplifiziert werden konnten.

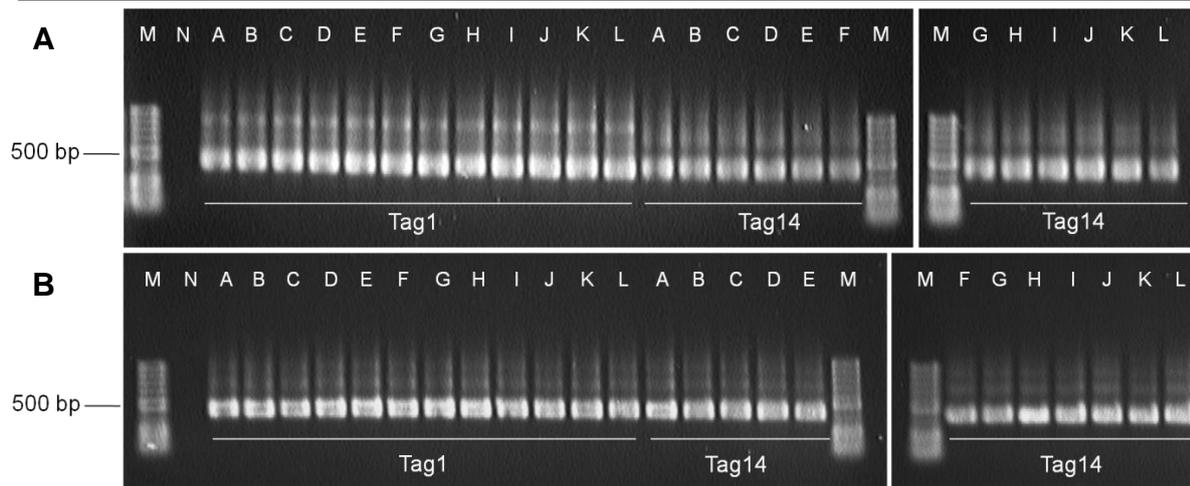


Abb. 3.65: Agarose-Gelbilder der *nested* PCR der *Bacteria* (A) und der *Archaea* (B) für den Versuch mit Maissilage und Fumarsäure an Tag 1 und Tag 14 (Fermenter A, F, I, J=Kontrolle; B, E, H, K=3,38 mmol·d⁻¹ FS; C, D, G, L=6,76 mmol·d⁻¹ FS; M=GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder; N=Negativ-Kontrolle).

3.2.2.1 SSCP-Profile der *Bacteria*

LAM

Das SSCP-Profil der partikelassoziierten *Bacteria* für Tag 1 zeigte keine Unterschiede bezüglich der Bandenmuster zwischen Kontroll-Fermentern und mit FS behandelten Fermentern (Abb. 3.66 A). Das Dendrogramm mit den Ähnlichkeitswerten bestätigte diesen Eindruck. Die Bandenmuster wiesen eine minimale Ähnlichkeit von 93,9% auf. Auch statistisch wurde kein signifikanter Einfluss von Fumarsäure auf die Diversität der *Bacteria* nachgewiesen ($p_{MC}=1,0$).

In dem *Bacteria*-Profil an Tag 14 waren, wenn auch in unterschiedlicher Intensität, in jeder Spur die gleichen Banden vorhanden. Das Profil zeichnete sich durch eine minimale Ähnlichkeit der Bandenmuster von 75,2% aus (Abb. 3.66 B). Der Permutationstest konnte keine signifikante Beeinflussung der Bandenmuster der Fermenter durch den Faktor Behandlung detektieren ($p_{MC}=0,9$). Ein Vergleich der Profile von Tag 1 und Tag 14 führte zu keinem signifikanten Nachweis einer zeitlichen Anpassung der *Bacteria* im RUSITEC-Versuch ($p_{MC}=0,7$).

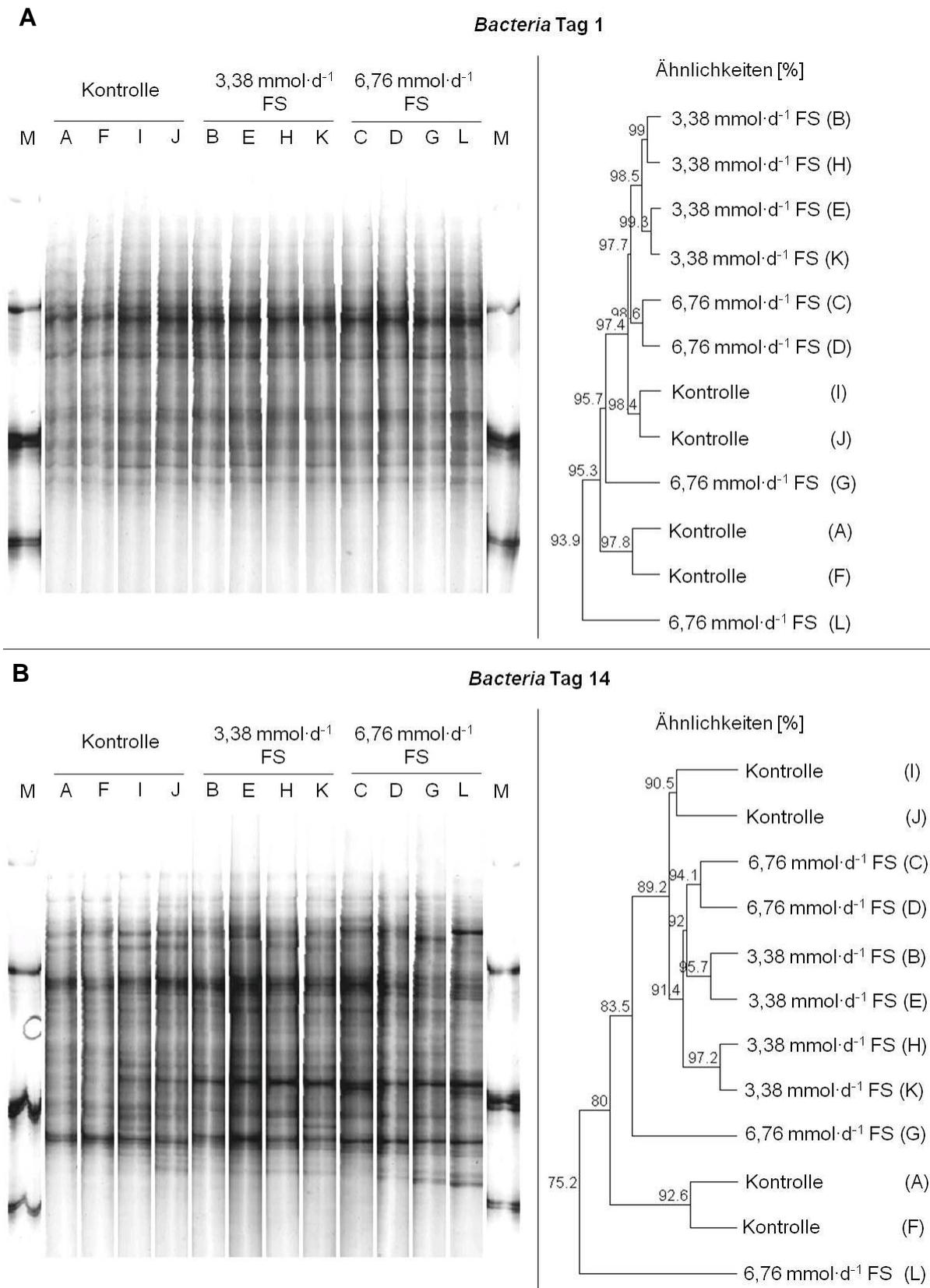


Abb. 3.66: *Bacteria*-Profile der LAM an Tag 1 (**A**) und Tag 14 (**B**) mit Dendrogrammen (Fermenter A, F, I, J=Kontrolle; B, E, H, K=3,38 mmol·d⁻¹ FS; C, D, G, L=6,76 mmol·d⁻¹ FS; M=Speziesstandard).

SAM

In dem Profil der an die Futterpartikel gebundenen *Bacteria* konnten keine qualitativen Unterschiede zwischen den Kontroll-Fermentern und den mit FS behandelten Fermentern festgestellt werden (Abb. 3.67). Sowohl das Dendrogramm mit Ähnlichkeitswerten von $\geq 96,8\%$ für die Bandenmuster als auch die statistische Auswertung mit Hilfe des Permutationstests ($p_{MC} = 0,2$) konnten dies bestätigen.

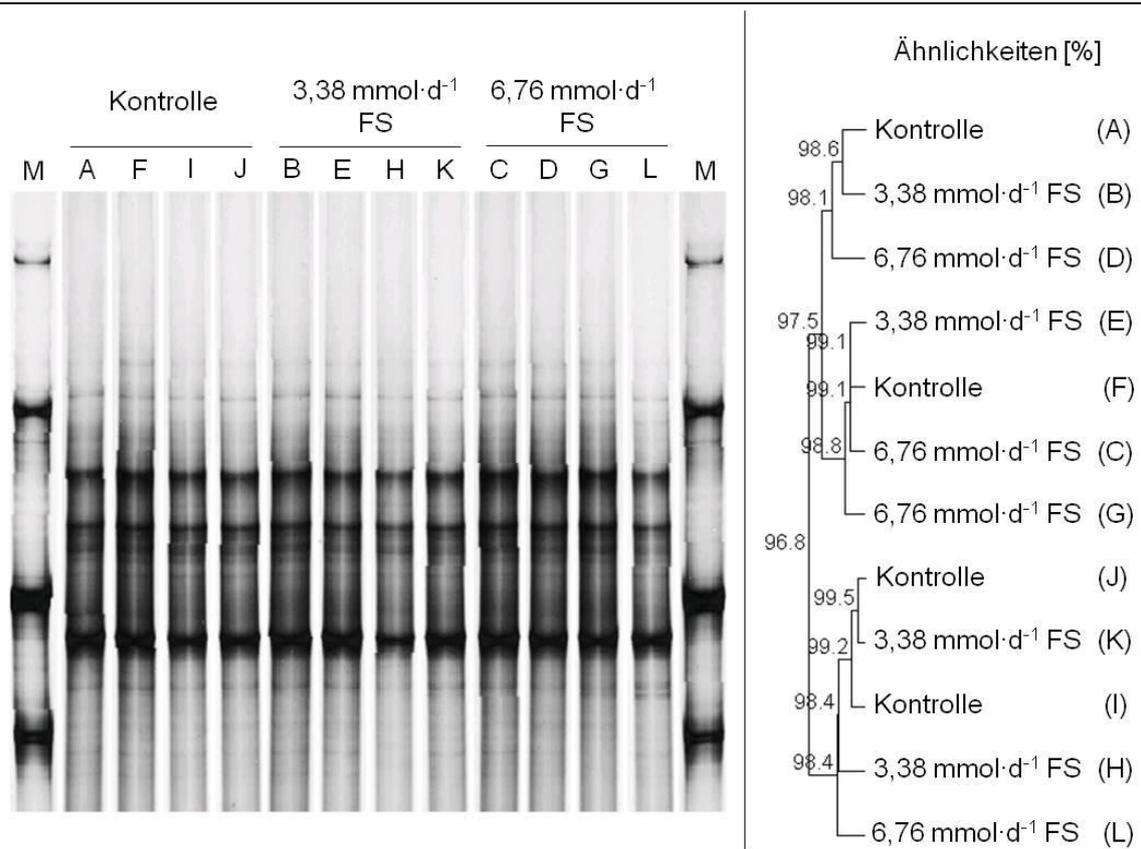


Abb. 3.67: *Bacteria*-Profil der SAM an Tag 14 mit Dendrogramm (Fermenter A, F, I, J=Kontrolle; B, E, H, K=3,38 mmol·d⁻¹ FS; C, D, G, L=6,76 mmol·d⁻¹ FS; M=Speziessstandard).

3.2.2.2 SSCP-Profil der *Archaea*

LAM

Die LAM-Profil der *Archaea* an Tag 1 und Tag 14 zeigten eine deutliche Homogenität der Bandenmuster (Abb. 3.68 A und B). Die Dendrogramme kamen zu demselben Ergebnis. An Tag 1 ähnelten sich die unterschiedlich behandelten Fermenter insgesamt zu $\geq 95,3\%$, an Tag 14 noch zu $81,9\%$. Dieses Resultat konnte im Permutationstest bestätigt werden. Es wurde weder ein signifikanter Einfluss der FS auf die Diversität der *Archaea* an Tag 1 ($p_{MC}=0,09$) noch an Tag 14 ($p_{MC}=0,9$) festgestellt.

Beim Vergleich beider Tage miteinander konnte kein signifikanter zeitlicher Einfluss nachgewiesen werden ($p_{MC}=0,9$). Die Diversität der mit der Fermenterflüssigkeit assoziierten *Archaea* veränderte sich im RUSITEC-Versuch bei Verwendung von Maissilage und Krafffutter als Substrat im Laufe der Zeit nicht.

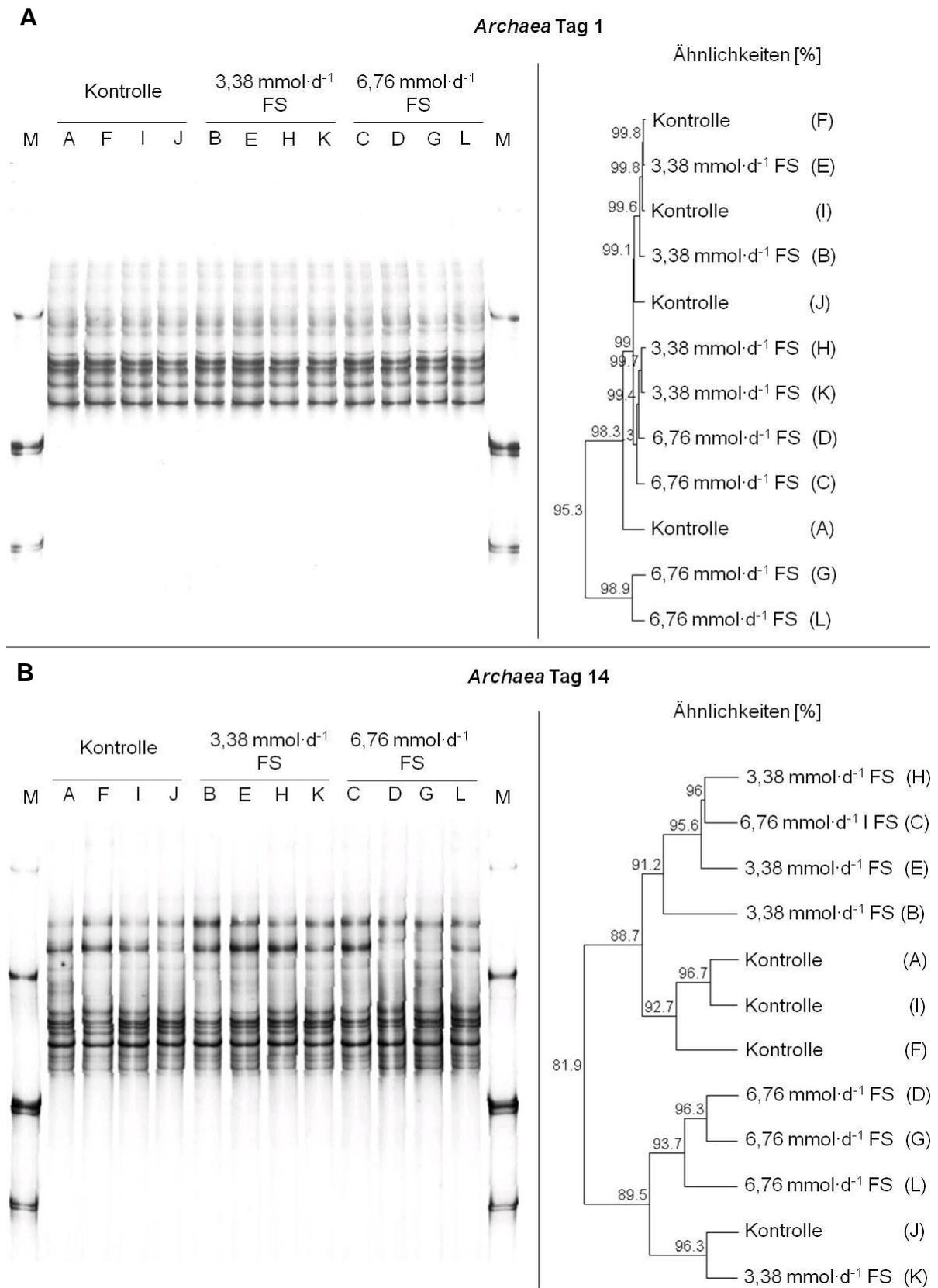


Abb. 3.68: *Archaea*-Profile der LAM an Tag 1 (**A**) und Tag 14 (**B**) mit Dendrogrammen (Fermenter A, F, I, J=Kontrolle; B, E, H, K=3,38 mmol·d⁻¹ FS; C, D, G, L=6,76 mmol·d⁻¹ FS; M=Speziessstandard).

SAM

In dem Profil der an die Partikel gebundenen *Archaea* war in allen Spuren die gleiche Anzahl von Banden vorhanden (Abb. 3.69). Die Clusteranalyse konnte insgesamt Ähnlichkeiten von $\geq 77,6\%$ ermitteln. Der Permutationstest ergab eine signifikante Änderung der Diversität der *Archaea* durch die Behandlung ($p_{MC} < 0,05$). Im paarweisen Vergleich der Behandlungen (*pair-wise a posteriori comparison*) konnte nicht nachgewiesen werden, zwischen welchen Behandlungen die signifikanten Unterschiede in den Bandenmustern auftraten (Kontrolle vs. $3,38 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ FS: $p_{MC} = 0,6$; Kontrolle vs. $6,76 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ FS: $p_{MC} = 0,1$; $3,38 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ FS vs. $6,76 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ FS: $p_{MC} = 0,8$).

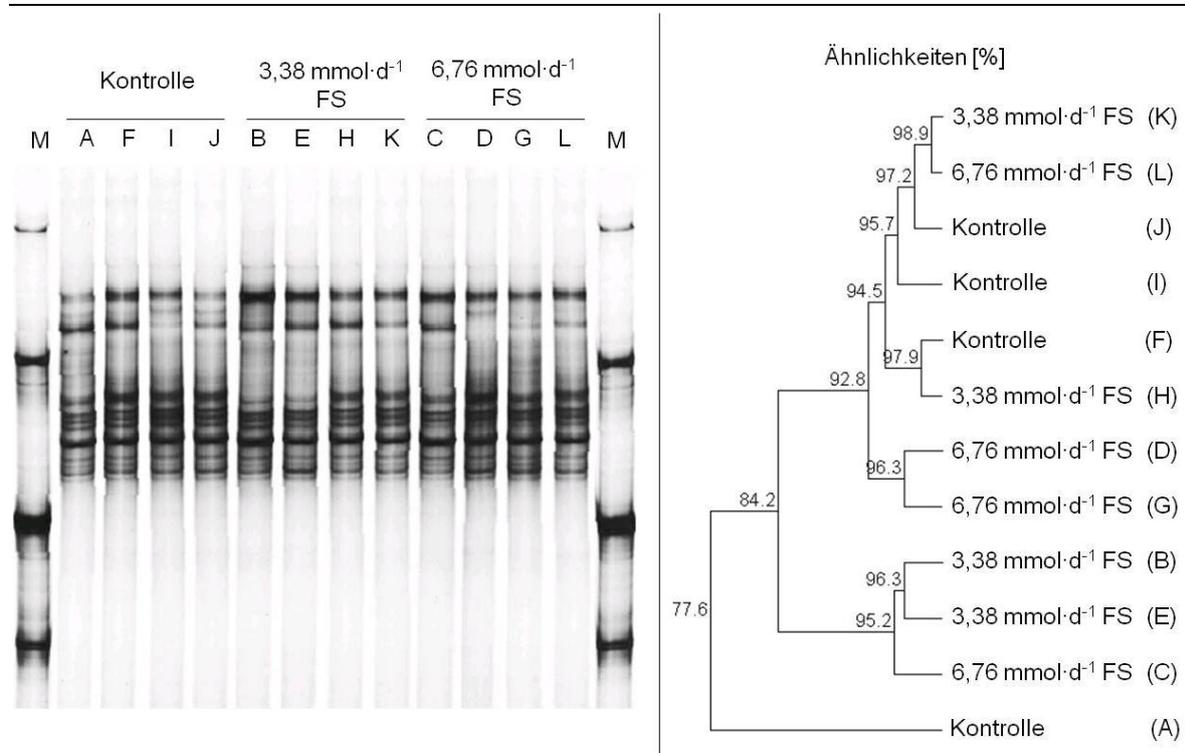


Abb. 3.69: *Archaea*-Profil der SAM an Tag 14 mit Dendrogramm (Fermenter A, F, I, J=Kontrolle; B, E, H, K= $3,38 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ FS; C, D, G, L= $6,76 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ FS; M=Speziestandard).

3.3 H₂-Bilanz

In Tab. 3.23 ist die H₂-Bilanz für die Zugabe von 6,76 mmol·d⁻¹ FS in allen Versuchen (V1, V2, V3, V4) zusammengefasst, da sich bezüglich dieser FS-Dosis die meisten signifikanten Veränderungen ergeben haben. Es sind die über die Versuchszeit gemittelten Werte für den Überschuss an Propionat und Acetat und für die Reduktion des CH₄ verglichen mit der Kontrolle gezeigt, sowie die benötigte oder freigesetzte Menge an H₂ bei der entsprechenden Reaktion (\bar{x} ; n=4).

Tab. 3.23: H₂-Bilanz im RUSITEC-System aller Versuche (V1, V2, V3, V4) für die Zugabe von 6,76 mmol·d⁻¹ FS berechnet für die gemittelten Werte über die Versuchsphase (Δ Differenz zur Kontrolle; - Reduktion um; + Zunahme um).

[mmol·d ⁻¹]		Grassilage						Maissilage	
		V1		V2		V3		V4	
Δ Propionat	-H ₂	+4,35	-4,35	+4,69	-4,69	+4,49	-4,49	+5,37	-5,37
Δ Acetat	+2H ₂	+1,52	+3,04	+0,66	+1,32	+1,31	+2,62	+1,12	+2,24
Δ CH ₄	+4H ₂	-0,32	+1,28	-0,43	+1,72	-0,32	+1,28	-0,53	+2,12
Restl. H₂ aus Pool		-0,03		-1,65		-0,59		-1,01	
Σ Propionat, Acetat		5,87		5,35		5,80		6,49	
Metabolisierte FS		86,8%		79,1%		85,8%		96,0%	

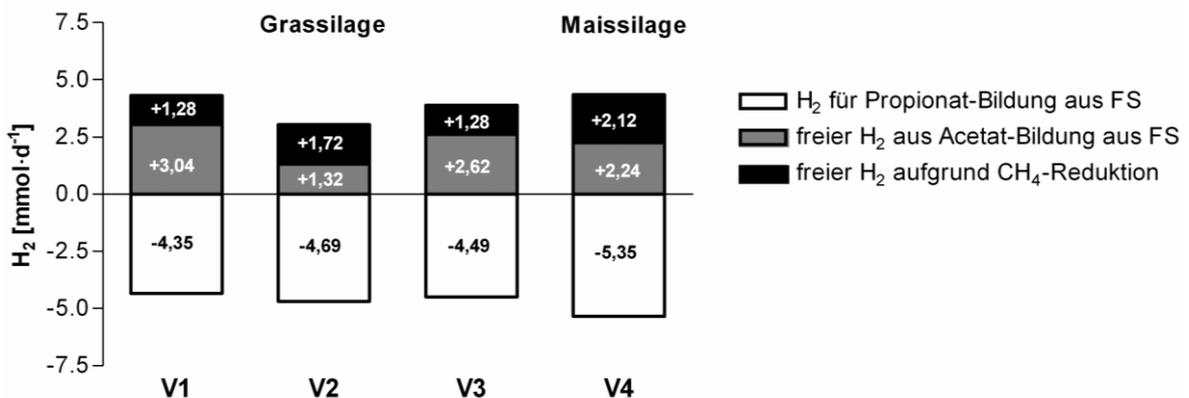


Abb. 3.70: H₂-Bilanz für die Zugabe von 6,76 mmol·d⁻¹ FS für V1, V2, V3 und V4 basierend auf der Propionat-Bildung aus FS, der Acetat-Bildung aus FS und der CH₄-Reduktion.

In V1 entsprach die für die Propionat-Bildung aus FS benötigte H₂-Menge von 4,35 mmol·d⁻¹ nahezu der Summe derjenigen, die durch die numerische CH₄-Reduktion um 0,32 mmol·d⁻¹ und der Acetat-Produktion aus FS von 1,52 mmol·d⁻¹ erreicht wurde (Tab. 3.23, Abb. 3.70). In V2-4 wurde mehr H₂ für die Propionat-Bildung benötigt als durch die Acetat-Produktion und die unterdrückte

Ergebnisse

CH₄-Produktion bereitgestellt werden konnte. Die restliche H₂-Menge belief sich dabei in V2, V3 und V4 auf 1,65 mmol·d⁻¹, 0,59 mmol·d⁻¹ und 1,01 mmol·d⁻¹.

Die Tab. 3.23 zeigt, dass in den vier Versuchen zwischen 80% und 96% der FS zu Acetat und Propionat metabolisiert worden ist.

4 DISKUSSION

In der vorliegenden Untersuchung wurde der Einfluss von zwei unterschiedlichen Dosierungen von Fumarsäure ($3,38 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ FS und $6,76 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ FS) auf den mikrobiellen Stoffwechsel und die Diversität der mikrobiellen Gemeinschaft im Pansen des Wiederkäuers mit Hilfe der Rumen-Simulationstechnik untersucht. Dies erfolgte zum einen mit Grassilage (V1, V2, V3) und zum anderen mit Maissilage (V4) als Grundfutter.

4.1 Beurteilung der Rumen-Simulationstechnik als Untersuchungsmethode

Die Rumen-Simulationstechnik (RUSITEC) wurde 1977 erstmals von Czerkawski und Breckenridge als In-vitro-Inkubationsmethode zur langzeitigen Untersuchung ruminaler Stoffwechselprozesse entwickelt und beschrieben. Diese Methode gewährleistet die Simulation von drei der vier ruminalen Kompartimente (CZERKAWSKI 1986; CZERKAWSKI 1988). Anhand der gemessenen Werte der untersuchten Parameter und des Vergleichs mit Ergebnissen aus In-vivo-Untersuchungen wird im Folgenden die Simulation des Pansenstoffwechsels im RUSITEC-System bewertet.

4.1.1 pH-Werte

Die erzielten pH-Werte der vorliegenden RUSITEC-Versuche 1-4 lagen mit 6,6 bis 6,8 im physiologischen Bereich für den Pansen (CZERKAWSKI 1986). Da der detektierte Zeiteinfluss bei Betrachtung der Graphiken (Abb. 3.1, Abb. 3.37) nicht gerichtet zu sein schien, kann man die pH-Werte als konstant ansehen. Beobachtungen zufolge werden stabile Bedingungen nach etwa vier bis sechs Tagen erreicht (CZERKAWSKI 1986; CZERKAWSKI & BRECKENRIDGE 1977). In dieser Untersuchung führte eine Äquilibrierungsphase von sieben Tagen zu *in vivo* ähnlichen, konstanten pH-Werten, welche für die hohe Stabilität des RUSITEC-Systems sprechen.

4.1.2 Redoxpotentiale

Das anaerobe Milieu im Pansen äußert sich in einem negativen Redoxpotential, das zwischen -100 mV bis -300 mV variieren kann (BARRY *et al.* 1977; BREVES &

LEONHARD-MAREK 2010; MAROUNEK *et al.* 1991). Zur Aufrechterhaltung dieser anaeroben Verhältnisse im RUSITEC-System wurde der Sauerstoff, der bei jedem Öffnen in die Fermenter gelangt war, mittels Begasung mit Stickstoff aus dem RUSITEC-System verdrängt. Die ermittelten Werte der Redoxpotentiale wiesen im Vergleich zwischen den einzelnen Versuchen Unterschiede auf, die innerhalb des physiologischen Schwankungsbereichs lagen. Da die Zeiteffekte keine gerichteten Unterschiede aufwiesen, ist also von konstanten anaeroben Bedingungen auszugehen.

4.1.3 SCFA

In Abhängigkeit vom Substrat können die molaren SCFA-Anteile im Pansen von Wiederkäuern für Acetat zwischen 40-70%, Propionat zwischen 15-40%, Isobutyrat zwischen 0,4-2,8%, Butyrat zwischen 10-15%, Isovalerat zwischen 0,5-4% und für Valerat zwischen 0,5-3% variieren (BREVES & LEONHARD-MAREK 2010; CZERKAWSKI 1986; HUNGATE 1966). In der Pansenflüssigkeit, die am Starttag der Versuche für die Inokulation verwendet wurde, wurden molare Anteil von 70% für Acetat, 18-22% für Propionat, 2% für Isobutyrat, 9-10% für Butyrat, 0,5-2,0% für Isovalerat und 2% für Valerat gemessen. Die während der Versuche ermittelten molaren SCFA-Anteile in den Fermentern lagen mit Werten von 40-60% für Acetat, 20-35% für Propionat, 8-10% für Butyrat und 2-5% für Valerat weitgehend in den in der Literatur beschriebenen Bereichen. Auffallend war allerdings der mit 5-15% sehr hohe molare Isovalerat-Anteil.

Da weder In-vivo- noch In-vitro-Untersuchungen mit molaren Isovalerat-Anteilen über 5% bekannt sind, können die Ursachen dieser hohen Anteile nicht abschließend beurteilt werden. Isovalerat entsteht als Fermentationsprodukt beim mikrobiellen Proteinabbau (EL-SHAZLY 1952; HUNGATE 1966). Die hohen molaren Isovalerat-Anteile sind aus diesem Grund wahrscheinlich ein Hinweis auf einen hohen Proteinabbau. Insgesamt kennzeichnen die Ergebnisse der SCFA nicht nur eine erfolgreiche Kultivierung der mikrobiellen Population mit ihren fermentativen Eigenschaften, sondern auch deren gelungene Aufrechterhaltung und Stabilität über den Versuchszeitraum im RUSITEC-System.

4.1.4 Fermentationsgas

Die Produktion des Fermentationsgases unter In-vitro Bedingungen ist generell nicht zu vergleichen mit der In-vivo-Produktion, da sie u.a. vom Volumen der Fermentationskammer abhängt. Die in den vorliegenden RUSITEC-Versuchen ermittelten Produktionsraten von täglich 300 ml bis 500 ml liegen aber in der Größenordnung, die bereits für die Gasproduktion in zahlreichen In-vitro-Untersuchungen im RUSITEC-System beschrieben wurden. In Abhängigkeit vom verwendeten Substrat und den Versuchsbedingungen kann die Produktion des Fermentationsgases zwischen 300 ml und 2000 ml pro Tag sehr variabel sein (CARRO & MILLER 1999; CZERKAWSKI & BRECKENRIDGE 1977; DOHME *et al.* 2001; DURAND *et al.* 1988; GIRALDO *et al.* 2007; HILDEBRAND *et al.* 2010; KLEVENHUSEN *et al.* 2009; NEWBOLD *et al.* 2005).

Die Zusammensetzung des Fermentationsgases aus etwa 30% CH₄ und 70% CO₂ in dieser Studie entspricht den Werten, die auch *in vivo* im Wiederkäuer nachgewiesen wurden (HUNGATE 1966; NELSON *et al.* 1960). Aufgrund der Tatsache, dass der ermittelte Zeiteffekt für die relativen Anteile von CH₄ und CO₂ am Fermentationsgas nicht gerichtet gewesen ist, kann man die Werte als stabil ansehen. Diese Ergebnisse sprechen daher ebenfalls für die erfolgreiche Simulation der ruminalen Stoffwechselprozesse und die Aufrechterhaltung einer stabilen mikrobiellen Population im RUSITEC-System.

4.1.5 Ammoniak-Konzentrationen und mikrobielle Proteinsynthese

Es besteht ein Zusammenhang zwischen der Ammoniak-Konzentration und der mikrobiellen Proteinsynthese. Ammoniak entsteht im Pansen des Wiederkäuers einerseits beim Abbau des zugeführten Rohproteins und der Nicht-Protein-Stickstoffhaltigen (NPN) Verbindungen und andererseits beim Abbau von mikrobiellem Protein (BELASCO 1954; MCDONALD 1948; OBARA *et al.* 1989; OWENS & ZINN 1988). Ein erheblicher Anteil des mikrobiellen Proteins stammt aus dem Ammoniak-Pool der Pansenflüssigkeit (BELASCO 1954; OWENS & ZINN 1988; PISULEWSKI *et al.* 1981).

In Abhängigkeit vom fermentiertem Substrat und dem Zeitpunkt der Probenentnahme wurden *in vivo* im Pansen des Wiederkäuers Ammoniak-Konzentrationen zwischen 5 mmol·l⁻¹ und 45 mmol·l⁻¹ ermittelt (AHARONI *et al.*

1991; HUNGATE 1966; RAMOS *et al.* 2009). In dieser Untersuchung lagen die Ammoniak-Konzentrationen in V1-V3 bei 10-14 mmol·l⁻¹ und in V4 bei 8-10 mmol·l⁻¹. Auch in bereits publizierten RUSITEC-Versuchen wurden bei ähnlicher Substratversorgung ähnliche Ammoniak-Konzentrationen gemessen (GIRALDO *et al.* 2007; MARTINEZ *et al.* 2009; OEZTUERK *et al.* 2005; SOLIVA *et al.* 2004).

Die Effizienz der mikrobiellen Proteinsynthese wird *in vivo* bei einer Heu-basierenden Fütterung mit 140-200 g·kg⁻¹ abgebauter OS beschrieben (MARTINEZ *et al.* 2010a). Die mikrobiell synthetisierten Proteinmengen von 120-170 g·kg⁻¹ abgebauter OS in den RUSITEC-Versuchen mit Grassilage stimmten damit überein. In dem RUSITEC-Versuch mit Maissilage wurde mit 80 g·kg⁻¹ abgebauter OS ein geringerer Wert erreicht. Ursächlich für diesen niedrigeren Wert scheint der geringere Rohproteingehalt der Maissilage zu sein (Tab. 2.2), bei dessen Abbau weniger Ammoniak entstehen kann (BOGUHN *et al.* 2006). Insgesamt stimmte sowohl die synthetisierte Menge des mikrobiellen Proteins (450-900 mg) als auch die Effizienz der mikrobiellen Proteinsynthese mit den Ergebnissen aus vorangegangenen RUSITEC-Versuchen überein (FRASER *et al.* 2007; GARCIA-GONZALEZ *et al.* 2010; JALC & CERTÍK 2005; OEZTUERK *et al.* 2005; SENG *et al.* 2008).

4.1.6 Verdaulichkeiten der Rohnährstoffe

In vivo können die ruminalen Verdaulichkeiten für die organische Substanz (OS) bei 40-60%, für das Rohprotein (XP) bei 40-70% und für die neutralen und sauren Detergenzienfasern (NDF, ADF) bei 50-64% und 25-66% liegen (GONTHIER *et al.* 2004; MARTINEZ *et al.* 2010a; PLASCENCIA & ZINN 1996; TAMMINGA 1979; WU *et al.* 1994). Die in dieser Studie ermittelten Verdaulichkeiten beliefen sich für die OS auf 60%, für das XP auf 55-70%, für die NDF auf 25-40% und für die ADF auf 16-35%. Während die Verdaulichkeiten der NDF und ADF in der vorliegenden *In-vitro*-Untersuchung niedriger als *in vivo* waren, stimmten jedoch alle analysierten Werte mit denen in anderen RUSITEC-Experimenten ermittelten überein (FRASER *et al.* 2007; GIRALDO *et al.* 2007; MARTINEZ *et al.* 2009; MARTINEZ *et al.* 2010a; SOLIVA *et al.* 2004). In einer direkten Vergleichsstudie von ruminaler *In-vivo*- und *In-vitro*-Fermentation konnte bereits gezeigt werden, dass die Verdaulichkeit für

NDF und ADF *in vitro* deutlich unter denen *in vivo* lagen (MARTINEZ *et al.* 2010a). Als Ursache hierfür kommen die Unterschiede in der selektiven Retentionszeit der Futterpartikel zwischen In-vivo- und In-vitro-Untersuchung in Frage (MARTINEZ *et al.* 2010a).

4.1.7 Protozoa

Die Anzahl der *Protozoa in vivo* im Pansen von Wiederkäuern ist mit beschriebenen Werten zwischen 170.000 pro ml und 700.000 pro ml sehr variabel (DEHORITY 1984; MARTINEZ *et al.* 2010b; MICHALOWSKI 1975; MICHALOWSKI *et al.* 1986). Die Anzahl der in dieser Studie ermittelten *Protozoa in vivo* (native Proben) belief sich auf 120.000-400.000 pro ml und liegt damit weitgehend in dem o.g. Bereich. Allerdings konnte während aller RUSITEC-Versuche ein starker Rückgang der Anzahl der *Protozoa* auf etwa 10.000 pro ml beobachtet werden. Dieses Phänomen wurde in vorangegangenen In-vitro-Untersuchungen häufig beobachtet und scheint typisch für RUSITEC-Versuche zu sein (MANSFIELD *et al.* 1995; MARTINEZ *et al.* 2010b; SLYTER *et al.* 1964; SLYTER & PUTNAM 1967; ZIEMER *et al.* 2000). Die Ursachen sind nicht bis ins Detail geklärt, ein zu hoher Flüssigkeitsturnover könnte jedoch zur Auswaschung einiger *Protozoa* geführt haben, da diese relativ lange Generationszeiten aufweisen (MANSFIELD *et al.* 1995; MARTINEZ *et al.* 2010b; SLYTER & PUTNAM 1967; ZIEMER *et al.* 2000). Als weitere Einflussfaktoren werden die Substratmenge und die Retentionszeit der festen Phase beschrieben (CRAWFORD *et al.* 1980; THEATHER & SAUER 1988). Die In-vitro-Kultivierbarkeit der *Protozoa* ist also als begrenzt zu bewerten. Dennoch reflektiert die konstante *Protozoa*-Population und deren Aufrechterhaltung ab dem 7. Versuchstag ein stabiles RUSITEC-System.

4.1.8 Populationsstruktur der mikrobiellen Gemeinschaft

Der Nachweis von zeitabhängigen Veränderungen der mikrobiellen Gemeinschaft der *Bacteria* während der RUSITEC-Versuche 1-3 beim Vergleich der Profile von Tag 1 mit Tag 14 zeigt, dass eine Anpassung an das In-vitro-System stattgefunden hat. Obwohl solche Unterschiede in der Diversität der bakteriellen Gemeinschaft zwischen In-vivo- und In-vitro-Systemen auftreten können (MARTINEZ *et al.* 2010b), konnte dennoch eine starke Ähnlichkeit im Aufbau der Gemeinschaften nachgewiesen werden (ZIEMER *et al.* 2000). Fest steht daher,

dass die Rumen-Simulationstechnik eine wertvolle Methode zur Untersuchung mikrobieller Gemeinschaften unter kontrollierten Bedingungen darstellt.

4.1.9 Abschließende Beurteilung

Festzuhalten ist, dass Diskrepanzen zwischen den im Pansen von Wiederkäuern und den *in vitro* gemessenen Parametern im RUSITEC-System auftreten können. Im Gegensatz zu der u.a. *in vivo* im Wiederkäuer nicht konstanten Rate der Speichelsekretion und dem Abtransport der Fermentationsprodukte aus dem Pansen (HUNGATE 1966), handelt es sich bei der Rumen-Simulationstechnik um ein konstantes System mit kontrollierbaren, definierten Bedingungen. Diese Eigenschaft und die Tatsache, dass es gelungen ist, die meisten Parameter des ruminalen Stoffwechsels *in vitro* zu simulieren, machen das RUSITEC-System zu einer geeigneten Untersuchungsmethode. Insgesamt bestätigen die Ergebnisse der RUSITEC-Versuche 1-4 die erfolgreiche Simulation des Pansenstoffwechsels als Voraussetzung für eine In-vitro-Untersuchung zum Einfluss von FS auf das biochemische Profil des mikrobiellen Stoffwechsels und der mikrobiellen Diversität.

4.2 Reproduzierbarkeit der Versuche mit Fumarsäure und Grassilage

Die Reproduzierbarkeit identischer RUSITEC-Versuche wurde anhand von V1, V2 und V3 untersucht.

4.2.1 pH-Werte

Die pH-Werte waren innerhalb der Behandlung mit $3,38 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ FS bei V1, V2 und V3 identisch. Innerhalb der Kontrollen und der Behandlung mit $6,76 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ FS kam es zu signifikanten Unterschieden zwischen den Versuchen, obwohl die Graphik (Abb. 3.1) eine hohe Konstanz der pH-Werte innerhalb der Behandlungen bei den Versuchen zeigte. Diese statistisch signifikanten Unterschiede scheinen das Resultat der geringen absoluten Unterschiede gleichbehandelter Fermenter und der hohen Messgenauigkeit der pH-Elektrode zu sein. Die Versuche werden als reproduzierbar eingestuft, da bei allen ein gleiches Muster bezüglich der Veränderungen des pH-Wertes durch die Zugabe von FS festzustellen war.

4.2.2 Redoxpotentiale

Die Redoxpotentiale der Kontrollen und der FS-Behandlungen waren in jedem Versuch unterschiedlich (Abb. 3.2). Da die Versuchsbedingungen jedoch identisch waren, ist die einzige mögliche Erklärung hierfür die Verwendung von verschiedenen Redox-Elektroden. Dies wurde notwendig aufgrund von Beschädigungen. Die erste Elektrode (V1: InLab[®] 501) war bereits in mehreren Versuchen zum Einsatz gekommen und führte zu weniger negativen Redoxpotentialen führte als die InLab[®] Redox Pro Elektrode in V2. Diese sollte für die Messung in der vorliegenden Suspension der Fermenterflüssigkeit laut Hersteller besser geeignet sein. In V3 wurde dann eine neue typgleiche Elektrode verwendet, die zu den negativsten Ergebnissen führte. Die Messung des Redoxpotentials scheint demnach stark abhängig vom Elektrodentyp zu sein. Aufgrund der Verwendung verschiedener Elektroden war die Messung des Redoxpotentials in V1, V2 und V3 wahrscheinlich nicht reproduzierbar.

4.2.3 SCFA

Die Produktion der gesamten SCFA führte in V1, V2 und V3 zu denselben Ergebnissen (Abb. 3.3). Diesbezüglich spricht dies für eine erfolgreiche Reproduzierbarkeit der drei Versuche.

Bei der Acetat-Produktion wurden signifikante Unterschiede zwischen den Versuchen detektiert. Da Abb. 3.4 allerdings zeigt, dass diese Unterschiede quantitativ nicht ausgeprägt sind, ist es wahrscheinlich, dass sie aus einer hohen Messgenauigkeit innerhalb eines Versuchs resultieren. Zudem führten die Behandlungen in allen Versuchen tendenziell zu den gleichen Ergebnissen. Für die molaren Acetat-Anteile wurden keine signifikanten Unterschiede durch den Faktor Versuch festgestellt.

Die Propionat-Produktion wurde innerhalb der Kontrolle und der Behandlung mit $6,76 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ FS nicht durch den Faktor Versuch beeinflusst (Abb. 3.5). Die Zugabe von $6,76 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ FS führte in allen Versuchen zu demselben Ergebnis. Damit konnte gezeigt werden, dass das RUSITEC-System in identischen Versuchen in gleicher Weise auf eine Behandlung reagiert hat.

Sowohl bezüglich der Butyrat-Produktion als auch der molaren Butyrat-Anteile kamen V1, V2 und V3 zu demselben Ergebnis (Abb. 3.6). Dies war somit reproduzierbar.

Am auffälligsten waren die Ergebnisse für die Produktion von Valerat und Isovalerat (Abb. 3.7, 3.8). Zu Beginn wurde in V2 verglichen mit V1 und V3 zwar weniger Isovalerat, aber dafür mehr Valerat gebildet. Im Laufe der Versuchszeit stieg die Isovalerat-Produktion jedoch an und die Valerat-Produktion nahm ab. Dennoch wurden in der Summe insgesamt geringere Mengen in V2 verglichen mit V1 und V3 produziert. Die Diskrepanz bezüglich der Produktion von Isovalerat und Valerat zwischen den Versuchen wurde in den molaren Anteilen reflektiert.

Verzweigtkettige Fettsäuren, wie Isovalerat, aber auch Valerat sind einerseits Fermentationsprodukte des mikrobiellen Proteinabbaus (EL-SHAZLY 1952; HUNGATE 1966). Andererseits fördern Isovalerat und Valerat die mikrobielle Proteinsynthese durch bestimmte cellulolytische Mikroorganismen im Pansen, da sie als sog. Wachstumsfaktoren gelten (ALLISON *et al.* 1962; BENTLEY *et al.* 1954; BRYANT & DOETSCH 1955; DEHORITY *et al.* 1967; WEGNER & FOSTER 1963). Im Hinblick auf die Ergebnisse dieser Untersuchung bedeutet das, dass in V2 entweder zu Versuchsbeginn weniger Protein abgebaut wurde oder mehr Isovalerat und Valerat in die mikrobielle Neusynthese eingegangen sind. Wäre weniger Protein abgebaut worden, hätten aufgrund einer positiven Korrelation

auch die Ammoniak-Konzentrationen in V2 zu Versuchsbeginn geringer sein müssen (EL-SHAZLY 1952). Dies konnte jedoch in dieser Studie nicht bestätigt werden. Allerdings könnte die erhöhte mikrobielle Proteinsynthese durch die SAM in V2 (Abb. 3.25) ein Hinweis auf den Verbleib des Isovalerats und Valerats sein.

Mit den Ausnahmen von Isovalerat und Valerat zeigten V1, V2 und V3 ähnliche Fettsäuremuster. Das RUSITEC-System hat bei der Mehrheit der einzelnen SCFA in gleicher Weise auf die Behandlung reagiert, so dass diese Ergebnisse als reproduzierbar beurteilt werden können.

4.2.4 Acetat-Propionat-Verhältnisse

Die Verhältnisse von Acetat zu Propionat waren bei V1, V2 und V3 in den Kontrollen identisch (Abb. 3.15). Signifikante Unterschiede ergaben sich innerhalb der FS-Behandlungen zwischen den Versuchen. Insgesamt war die Reaktion des RUSITEC-Systems auf die Behandlung zwischen den Versuchen reproduzierbar (Tab. 3.14).

4.2.5 Fermentationsgas

Es traten durch den Faktor Versuch bedingte signifikante Unterschiede bei der gesamten Gasproduktion, der CH₄- und CO₂-Produktion, sowie bei den CH₄- und CO₂-Anteilen zwischen den Versuchen innerhalb aller Behandlungen auf (Abb. 3.16-3.21). Obwohl der relative CH₄-Anteil von V1 über V2 bis zu V3 anstieg, wurde damit einhergehend eine abnehmende CH₄-Produktion festgestellt. Die Ursache scheinen die unterschiedlichen Volumina des Fermentationsgases zu sein, die von V1 über V2 bis zu V3 kontinuierlich abfielen (Abb. 3.16).

Als mögliche Ursache für die höhere Produktion des Fermentationsgases in V1 käme eventuell eine größere Anzahl von Mikroorganismen in Frage. Da CO₂ und CH₄ während der Fermentation durch die Mikroorganismen entstehen (CZERKAWSKI 1986), könnte mehr Gas gebildet worden sein, wenn mehr Mikroorganismen vorhanden sind. Denkbar ist auch, dass eine Kombination aus einer erhöhten Anzahl Mikroorganismen und die spezielle Messmethodik ursächlich für diese Unterschiede sind. Mit Hilfe des Trommelgaszählers wurde das gesamte Gasvolumen im Gasbeutel erfasst, inklusive des durch Begasung der Überläufe zugeführten Stickstoffs. Die Bestimmung des tatsächlichen

Volumens des Fermentationsgases (CH_4 und CO_2) erfolgte durch die Subtraktion des Stickstoff-Volumens basierend auf dem gaschromatographisch analysierten Stickstoff-Anteil in den Gasproben. Die Berechnung des Volumens des Fermentationsgases hängt also direkt mit den gemessenen Gas-Anteilen zusammen. Es ist nun denkbar, dass aufgrund des geringen CH_4 -Anteils in der gesamten Gasprobe in V1 eine gewisse Messungenauigkeit auftritt (pers. Mitteilung, LOREY 2010) und so auch das Volumen des Fermentationsgases beeinflusst wird. Hinzu kommt, dass die gaschromatographischen Analysen in dieser Studie von mehr als einer Person durchgeführt wurden. Schlussfolgernd bedeutet das, dass die Ergebnisse zur Produktion des Fermentationsgases möglicherweise leicht durch äußere begrenzt kontrollierbare Faktoren beeinflusst waren. Es ist aber festzuhalten, dass die drei Versuche in gleicher Weise auf die Behandlung reagiert haben, welche somit reproduzierbar war.

4.2.6 Ammoniak-Konzentrationen und mikrobielle Proteinsynthese

Bei allen Behandlungen ließen sich signifikante Unterschiede in den Ammoniak-Konzentrationen zwischen den Versuchen nachweisen.

In V1 wurden die signifikant geringsten Ammoniak-Konzentrationen festgestellt (Abb. 3.22). Außerdem wurde in V1 die größte Menge mikrobiellen Proteins durch die LAM synthetisiert, wodurch sich auch insgesamt eine höhere Proteinsynthese in V1 ergeben hat (Abb. 3.23). Auch die Effizienzen der mikrobiellen Proteinsynthese waren in V1 am größten (Abb. 3.26). Zwar wurde in V2 die größte synthetisierte Menge des SAM-Proteins ermittelt, dies hatte jedoch keinen Einfluss auf die gesamte mikrobielle Proteinsynthese. Der Zusammenhang zwischen der Ammoniak-Konzentration und der mikrobiellen Proteinsynthese wird im Folgenden beschrieben.

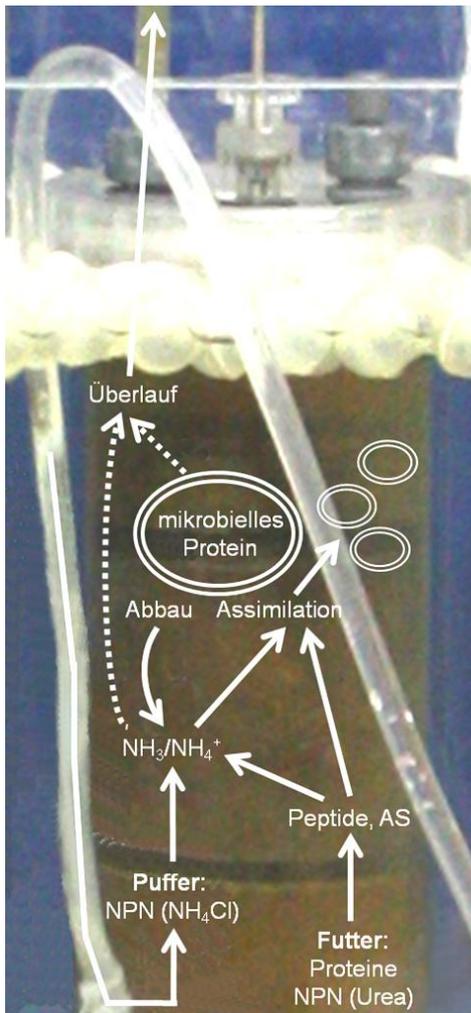


Abb. 4.1: Umsetzung Stickstoffhaltiger Verbindungen im RUSITEC-System am Beispiel eines Fermenters (AS: Aminosäuren; NPN: Nicht-Protein-Stickstoffhaltige-Verbindungen).

Der Ammoniak-Pool in den Fermentern des RUSITEC-Systems wird von verschiedenen Faktoren bestimmt (Abb. 4.1). Infundiert wurden mit der RUSITEC-Pufferlösung $5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ NH}_4\text{Cl}$ als Stickstoffquelle für das optimale Wachstum der Mikroorganismen (SATTER & SLYTER 1974). Ammoniak entsteht dann einerseits beim Abbau des zugeführten Rohproteins und der NPN-Verbindungen und andererseits beim Abbau von mikrobiellem Protein (BELASCO 1954; McDONALD 1948; OBARA *et al.* 1989; OWENS & ZINN 1988). Während der mikrobiellen Proteinsynthese wird Ammoniak wiederum gebunden (BELASCO 1954; OWENS & ZINN 1988; PISULEWSKI *et al.* 1981). Außerdem wird es mit dem Überlauf aus den Fermentern entfernt.

Die mikrobielle Proteinsynthese in V1 scheint demnach aufgrund der Bindung einer größeren Menge Ammoniak erhöht gewesen zu sein. Dies könnte in V1 zu den geringeren Ammoniak-Konzentrationen in den Fermentern

geführt haben. Die höheren Ammoniak-Konzentrationen in V2 und V3 lassen sich demzufolge mit einer verminderten mikrobiellen Proteinsynthese gegenüber V1 erklären. Die mikrobielle Proteinsynthese ist gleichbedeutend mit mikrobiellem Wachstum (SATTER & SLYTER 1974), welches dementsprechend in V1 höher gewesen sein müsste als in V3.

Da allerdings in allen Versuchen (V1, V2, V3) den Fermentern die gleiche Stickstoffmenge (NH_4Cl in der Pufferlösung, Rohprotein im Futter, NPN-Verbindungen) zugeführt wurde, bleibt die Ursache für die zwischen den Versuchen unterschiedlichen Reaktionen innerhalb einer Behandlung zunächst ungeklärt. Dennoch sind die Ergebnisse der drei Versuche innerhalb der physiologischen Grenzen als reproduzierbar zu bewerten.

4.2.7 Verdaulichkeiten der Rohnährstoffe

Während die Verdaulichkeiten der NDF und ADF in allen Versuchen gleich waren, konnten in V3 die signifikant geringste Verdaulichkeiten der OS und des XP nachgewiesen werden (Abb. 3.27-3.30). Die höchsten Verdaulichkeiten des XP wurden in V1 festgestellt. Diese Ergebnisse passen sehr gut zu den Erkenntnissen aus dem Kapitel 4.2.6. Das dort beschriebene erhöhte mikrobielle Wachstum in V1 könnte zu einer höheren Verdaulichkeit des XP und der OS geführt haben (GRISWOLD *et al.* 2003). Im Umkehrschluss könnte das geringere mikrobielle Wachstum in V3 im Vergleich zu V1 zu niedrigeren Verdaulichkeiten des XP geführt haben.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass versuchsbedingte Unterschiede nicht in den Verdaulichkeiten der Rohnährstoffe auftraten. Dort, wo sie aufgetreten sind, lassen sie sich anhand der Ergebnisse zur Ammoniak-Konzentrationen und mikrobiellen Proteinsynthese erklären. Innerhalb der physiologischen Grenzen für die Werte waren die Ergebnisse der drei Versuche reproduzierbar.

4.2.8 Protozoa

Die Zahl der *Protozoa* in der Pansenflüssigkeit (native Probe) und an Tag 1 war in V1 signifikant am geringsten, und unterschied sich damit von V2 und V3 (Abb. 3.31). Obwohl die Inokula in den drei Versuchen in der Quantität der *Protozoa* nicht gleichwertig gewesen sind, machte sich dieser signifikante Unterschied an den Tagen 7 und 14 nicht mehr bemerkbar. Das bedeutet, dass das RUSITEC-System bei V1, V2 und V3 die Zahl der *Protozoa* auf die gleiche Weise beeinflusst hat. Aus diesem Grund waren diese Ergebnisse reproduzierbar.

4.2.9 Populationsstruktur der mikrobiellen Gemeinschaft

Mit der SSCP-Analyse konnten im *Bacteria*-Profil der LAM in V1 an Tag 1 sowohl in den FS-Ansätzen als auch in der Kontrolle definierte Banden (Abb. 3.33; Banden Nr.1-3) detektiert werden, die in V2 und V3 nicht vorhanden waren. Im *Bacteria*-Profil der LAM an Tag 14 war dies der Fall für die Bande Nr.4 in der Kontrolle von V1.

Im *Bacteria*-Profil der LAM an Tag 1 konnten zwei der drei Banden der Gattung *Streptococcus* (Banden Nr.1+3) und eine Bande *Acetivibrio* (Bande Nr.2)

zugeordnet werden. Im Gegensatz zu *Streptococcus* lag die Ähnlichkeit des sequenzierten 16S rDNA-Genabschnitts zu *Acetivibrio* nur bei 66%.

Innerhalb der Gattung *Acetivibrio* ist nur eine Spezies bekannt, *A. cellulolyticus* (MURRAY 1986). Cellobiose und Cellulose dienen als Substrat, wobei als Fermentationsprodukte Acetat, CO₂ und H₂ entstehen können (KHAN *et al.* 1984; PATEL *et al.* 1980). Mikrobielles Wachstum findet bei Umgebungstemperaturen von 20-40°C und bei pH-Werten um 7,0 statt (PATEL *et al.* 1980). Obwohl *A. cellulolyticus* bisher nur im Klärschlamm nachgewiesen wurde (PATEL *et al.* 1980) und sich die hier beschriebene Ähnlichkeit der gefundenen Sequenz nur auf 66% beläuft, wäre es aufgrund der Eigenschaften dieser Art dennoch durchaus denkbar, dass sie auch im Pansen vorkommt.

Für den Pansen ist *S. bovis* als Vertreter der Gattung *Streptococcus* bekannt (BRYANT 1959; HUNGATE 1966). *S. bovis* fermentiert Stärke, Glucose und andere Substrate, wobei als Endprodukte Acetat, Formiat und CO₂ entstehen können. Es können aber auch Lactat und Ethanol gebildet werden (HUNGATE 1966). *S. bovis* wurde in V1 in den Banden Nr.1 und 3 nachgewiesen. Die aus der Bande Nr.2 stammenden Klone konnten nicht alle erfolgreich sequenziert werden. Naheliegender ist jedoch, dass es bei der Sequenzierung weiterer Klone neben *Acetivibrio* auch zur Identifikation von *S. bovis* gekommen wäre. Es war davon auszugehen, dass auch in V2 und V3 *S. bovis* nachweisbar sein sollte, da es sich um eine natürlich im Pansen vorkommende *Bacteria*-Spezies handelt. Weshalb ist dann aber für V2 und V3 in der entsprechenden Laufhöhe keine ebenso deutliche Bande wie in V1 zu sehen? Bisherigen Erkenntnissen zufolge kann eine Spezies mehrere Banden im SSCP-Gel hervorrufen, weil eine Nucleotid-Sequenz verschiedene Konformationen annehmen kann (DOHRMANN & TEBBE 2004). Außerdem verfügen viele *Bacteria* über mehrere Kopien der 16S rRNA-Gene (FOGEL *et al.* 1999), welche sich in ihrer Nucleotid-Sequenz voneinander unterscheiden können (CILIA *et al.* 1996). Es kann also aufgrund dessen vermutet werden, dass sich in den Fermentern der V2 und V3 ebenfalls *S. bovis* befunden hat, wobei die entsprechende Nucleotid-Sequenz an anderer Stelle im SSCP-Gel zu einer Bande geführt haben müsste.

Im *Bacteria*-Profil der LAM an Tag 14 konnte die Sequenzierung der aus den Banden Nr.4-10 extrahierten DNA eine phylogenetische Zugehörigkeit zu den Gattungen *Anaerovibrio* (Bande Nr.5), *Prevotella* (Banden Nr. 4, 6, 9) und *Succiniclacticum* (Banden Nr. 4, 5, 7, 8, 10) belegen. Für die Gattung *Anaerovibrio* ist im Pansen die Spezies *A. lipolytica* beschrieben (PRINS *et al.* 1975). Für die Gattung *Prevotella* sind *P. albensis*, *P. brevis*, *P. bryantii* und *P. ruminicola* bekannt (AVGUŠTIN *et al.* 1997). Der einzige bekannte Vertreter seiner Gattung ist *Succiniclacticum ruminis* (GYLSWYK 1995). Molekularbiologischen Untersuchungen zufolge dominiert im Rinderpansen die Gattung *Prevotella* die bakterielle Population (STEVENSON & WEIMER 2007). *A. lipolytica*, *S. ruminis* und *Prevotella* sind im Pansen unter physiologischen Bedingungen präsent (GYLSWYK 1995; HUNGATE 1966).

Das Auftreten der Bande Nr.4 in der Kontrolle von V1 scheint eine Ausnahme zu sein. In V2 und V3 konnten keine Banden in gleicher Laufhöhe identifiziert werden. Da viele *Bacteria* über mehrere Kopien der 16S rRNA-Gene verfügen (FOGEL *et al.* 1999), welche sich in ihrer Nucleotid-Sequenz voneinander unterscheiden können (CILIA *et al.* 1996), bedeutet das vorliegende Ergebnis nicht, dass *Prevotella* in den Kontroll-Fermentern in V2 und V3 nicht vorkam.

In den mit gleicher FS-Dosis behandelten Ansätzen ließen sich hinter den Banden einer Laufhöhe nicht immer dieselben Spezies identifizieren. In dem mit $3,38 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ FS behandelten Ansatz wurde *S. ruminis* in V1 (Bande Nr.5), *S. ruminis* in V2 (Bande Nr.7) und *Prevotella* in V3 (Bande Nr.9) nachgewiesen. In dem mit $6,76 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ FS behandelten Ansatz trat *Prevotella* in V1 (Bande Nr.6), *S. ruminis* in V2 (Bande Nr.8) und V3 (Bande Nr.10) auf. Da die Sequenzierung gezeigt hat, dass sich hinter einer Bande mehrere verschiedene Nucleotid-Sequenzen und damit auch mehrere Spezies verbergen können, ist es wahrscheinlich, dass die Sequenzierung weiterer Klone auch zur Identifikation gleicher Spezies in den Banden geführt hätte. Diese ist keine neue Beobachtung, sondern wurde bei Analysen von mikrobiellen Gemeinschaften schon häufig festgestellt (GOMES *et al.* 2001; SCHMALENBERGER & TEBBE 2003; SEKIGUCHI *et al.* 2001). Als Ursachen kommen ähnliche oder gleiche Wandereigenschaften der Sequenzen im SSCP-Gel in Frage (DOHRMANN & TEBBE 2004).

Es ließen sich keine Bandenunterschiede zwischen den Versuchen im *Bacteria*-Profil der SAM, in den *Archaea*-Profilen der LAM an den Tagen 1 und 14 und der SAM nachweisen (Abb. 3.34-3.36). Insgesamt lassen die Ergebnisse den Schluss zu, dass die Resultate zur mikrobiellen Diversität in den Versuchen reproduzierbar gewesen sind.

4.2.10 Abschließende Beurteilung

Insgesamt deuten die Ergebnisse der drei Versuche daraufhin, dass in V1 das mikrobielle Wachstum am stärksten war. Infolge dessen könnten niedrigere Ammoniak-Konzentrationen, höhere Verdaulichkeiten der OS und des XP verzeichnet worden sein, wodurch mehr Fermentationsgas gebildet worden sein könnte. Die möglichen Ursachen können jedoch nicht eindeutig definiert werden. Das Substrat und die Pufferlösung können ausgeschlossen werden, da sie in allen Versuchen identisch waren.

In Frage kommt als einzige Variable der zur Inokulation verwendete feste und flüssige Panseninhalt. Obwohl die Entnahmen bei allen Versuchen aus demselben Rind zur selben Uhrzeit erfolgten und die Art der Fütterung identisch war, konnten signifikante Unterschiede in den molaren SCFA-Anteilen zwischen den Versuchen belegt werden (Abb. 3.9). Dies könnte ein Hinweis auf die Verschiedenheit der Inokula sein. Die Zusammensetzung des Panseninhalts ist abhängig von mehreren Faktoren und nur in einem gewissen Rahmen kontrollierbar: Flüssigkeitsaufnahme, Futteraufnahme, Speichelproduktion, Zustand des Tieres (OWENS & GOETSCH 1988).

Aufgrund der Tatsache, dass potentielle interexperimentelle Einflussfaktoren im Rahmen des Möglichen durch den identischen Versuchsaufbau minimiert wurden, konnten bei der Mehrheit der Parameter gleiche oder ähnliche Reaktionen der drei Versuche im RUSITEC-System beobachtet werden. Da diese Reaktionen und Tendenzen zudem innerhalb des physiologischen Bereichs für die einzelnen Parameter lagen (Kapitel 4.1), sind die RUSITEC-Versuche als reproduzierbar einzustufen.

4.3 Einfluss von Fumarsäure

Infolge der Reproduzierbarkeit der drei RUSITEC-Versuche mit Fumarsäure (FS) und Grassilage (V1, V2, V3) wurde für die Kombination von FS und Maissilage als Grundfutter nur ein RUSITEC-Versuch (V4) durchgeführt. Da die Ergebnisse der Versuche mit FS und Grassilage auf die mit FS und Maissilage extrapolierbar sind, werden diese im Folgenden gemeinsam diskutiert.

4.3.1 Einfluss von Fumarsäure auf den mikrobiellen Stoffwechsel

Bisher liegen keine Publikationen zum Einfluss von FS auf den mikrobiellen Stoffwechsel aus RUSITEC-Untersuchungen vor. Aus diesem Grund werden die vorliegenden Ergebnisse mit Resultaten aus Studien verglichen, in denen Fumarat untersucht wurde. Fumarat ist das bei der Dissoziation von FS entstehende Anion. Da FS bei einem pH-Wert von 4,5 zu 50% als Fumarsäure und zu 50% als Fumarat vorliegt (LATSCHA & KLEIN 1997), ist dieser Vergleich zulässig.

Insgesamt konnten die deutlichsten Effekte auf die meisten biochemischen Parameter sowohl bei den Versuchen mit Gras- als auch mit Maissilage durch die Zugabe von $6,76 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ FS verzeichnet werden.

4.3.1.1 pH-Werte

Die signifikante Senkung des pH-Werts in den Fermentern der Versuche mit Grassilage und Maissilage durch die Zugabe von FS erklärt sich aufgrund der Säurestärke von FS, welche mit einen $\text{pK}_{\text{s}1}$ - und $\text{pK}_{\text{s}2}$ -Wert von 3,0 und 4,5 als stark einzustufen ist (LATSCHA & KLEIN 1997). Da die Zugabe von FS mit einer Steigerung der SCFA-Produktion einherging, ist davon auszugehen, dass die SCFA zu der Senkung des pH-Werts beigetragen haben. Durch die Verwendung der RUSITEC-Pufferlösung wurde der pH-Wert jedoch nicht über den physiologischen Bereich hinaus gesenkt (Tab. 3.1, Abb. 3.1, Abb. 3.37).

Vergleichbare Mengen Fumarat wirkten sich in den in der Literatur beschriebenen RUSITEC-Experimenten nicht (LÓPEZ *et al.* 1999) oder sogar leicht erhöhend auf den pH-Wert aus (JALC & CERTÍK 2005; NEWBOLD *et al.* 2005). Eine Erhöhung des pH-Wertes durch FS wurde auch *in vivo* nachgewiesen (MOLANO *et al.* 2008), andere In-vivo-Studien zeigten hingegen keine pH-Änderungen (BEAUCHEMIN & MCGINN 2006; MCGINN *et al.* 2004). Eine Senkung des pH-Werts durch FS konnte

nur *in vitro* mit der *batch culture* Methode festgestellt werden (NEWBOLD *et al.* 2005; WALLACE *et al.* 2006).

Die möglichen Gründe für die unterschiedlichen Auswirkungen auf den pH-Wert können vielfältig sein. Die beschriebenen RUSITEC-Experimente unterscheiden sich nicht nur untereinander im Flüssigkeitsturnover, im verwendeten Substrat und dessen Menge, sondern auch verglichen mit dieser Untersuchung in der Zusammensetzung der RUSITEC-Pufferlösung mit dem daraus resultierenden pH-Wert. Bei der in dieser Untersuchung verwendeten Pufferlösung handelte es sich nicht um den Puffer mit einem pH-Wert von 8,4 (MCDUGALL 1948), sondern um eine modifizierte Variante, die für den Einsatz in RUSITEC-Versuchen ebenfalls etabliert ist (KOCH *et al.* 2006; OEZTUERK *et al.* 2005).

4.3.1.2 Redoxpotentiale

Die Redoxpotentiale innerhalb eines Versuchs deuten auf stabile anaerobe Bedingungen hin, die durch FS nicht verändert wurden. Das bedeutet, dass die Voraussetzung für die erfolgreiche Kultivierung einer funktionierenden mikrobiellen Gemeinschaft auch nach Zugabe von FS gegeben war.

4.3.1.3 SCFA

Die Zugabe von $6,76 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ FS in dieser Untersuchung führte zu einer signifikant gesteigerten Produktion der gesamten SCFA. Auch in anderen In-vitro-Experimenten wurde bei der Applikation von Fumarat in den Dosierungen $3,76 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ und $6,25 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ eine Erhöhung der Produktion der gesamten SCFA nachgewiesen (GIRALDO *et al.* 2007; LÓPEZ *et al.* 1999; NEWBOLD *et al.* 2005). Da Fumarat und FS von einigen ruminalen *Bacteria* als Substrate genutzt werden können, wobei als Fermentationsprodukt vorwiegend Propionat, aber auch Acetat entstehen kann (Abb. 4.2) (ASANUMA & HINO 2000; CARRO & RANILLA 2003; DEMEYER & HENDERICKX 1967), scheint der Grund für die in der Literatur beschriebenen und in der vorliegenden Untersuchung ebenfalls erhobenen Befunde die durch FS oder Fumarat gesteigerte Propionat-Produktion zu sein.

Acetat

Die mikrobielle Fermentation der FS zu Acetat konnte durch die Zugabe von $6,76 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ FS nur in der Kombination mit Grassilage als Grundfutter für V1 und V3 signifikant bestätigt werden (Tab. 3.4). Für den RUSITEC-Versuch mit Maissilage als Grundfutter konnte dies nicht statistisch abgesichert werden.

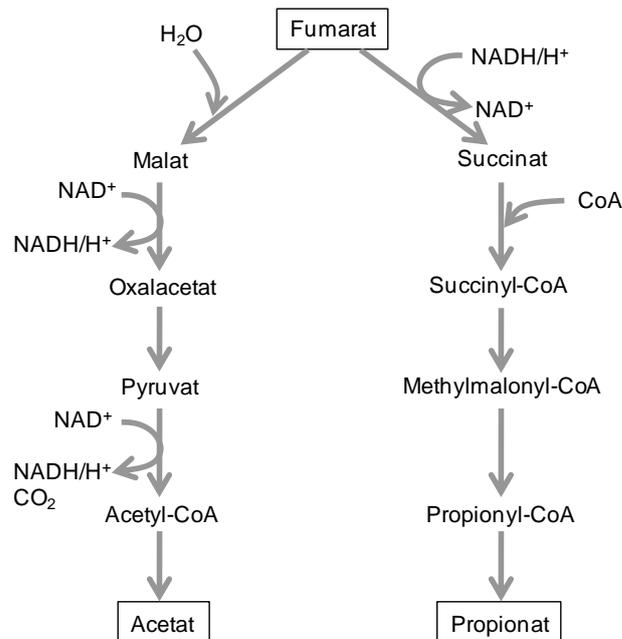


Abb. 4.2: Vereinfachtes Schema zum ruminalen Fumarsäure-Metabolismus (modifiziert nach DEMEYER & HENDERICKX 1967; UNGERFELD *et al.* 2007).

Die Abb. 4.2 zeigt, dass es bei der Bildung von 1 mol Acetat aus 1 mol FS zur Freisetzung von 2 mol H_2 kommt (DEMEYER & HENDERICKX 1967). Für diese Untersuchung bedeutet das, dass in V1 bei einer im Mittel um $1,52 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ und in V3 bei einer um $1,31 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ erhöhten Acetat-Produktion $3,04 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ bzw. $2,62 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ H_2 frei geworden sein müssten (Kapitel 3.3). Dies ist insofern eine recht ungünstige Voraussetzung für die Erzielung einer Reduktion der CH_4 -Produktion durch FS, da die Bestrebungen dabei in Richtung der Senkung des H_2 -Partialdruckes und der H_2 -Verfügbarkeit für die *Archaea* gehen (Kapitel 1.3) (ASANUMA *et al.* 1999; CASTILLO *et al.* 2004; MCALLISTER & NEWBOLD 2008; NEWBOLD & RODE 2006). Welche Bedingungen die Acetat-Produktion aus FS begünstigen, ist bislang nicht bekannt.

Während die Erhöhung der Acetat-Produktion durch FS in *batch cultures* typisch zu sein scheint (ASANUMA *et al.* 1999; CALLAWAY & MARTIN 1996; CARRO & RANILLA 2003; GARCÍA-MARTÍNEZ *et al.* 2005), konnte dieser Effekt nur in einer Studie für das RUSITEC-System belegt werden (GIRALDO *et al.* 2007).

Die signifikante Senkung der molaren Acetat-Anteile durch FS ergab sich als Konsequenz aus der in V2, V3 und V4 unveränderten Acetat-Produktion und der insgesamt signifikant erhöhten SCFA-Produktion.

Propionat

Die signifikante Steigerung der gesamten SCFA-Produktion durch die Zugabe von $6,76 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ FS wurde hauptsächlich von einer signifikanten Erhöhung der Propionat-Produktion getragen (Abb. 3.3 und 3.5, Abb. 3.39 und 3.41). Eine gesteigerte Propionat-Produktion in Folge der Zugabe verschiedener Mengen FS bzw. Fumarat wurde auch *in vitro* mit der *batch culture* Methode (ASANUMA *et al.* 1999; CALLAWAY & MARTIN 1996; CARRO & RANILLA 2003; GARCÍA-MARTÍNEZ *et al.* 2005), im RUSITEC-System (GIRALDO *et al.* 2007; JALC & CERTÍK 2005; LÓPEZ *et al.* 1999; NEWBOLD *et al.* 2005) und *in vivo* festgestellt (BAYARU *et al.* 2001; BEAUCHEMIN & MCGINN 2006). Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass FS und Fumarat, wie bereits zuvor erwähnt, den ruminalen *Bacteria* als Substrat gedient haben.

Für die Bildung von 1 mol Propionat aus 1 mol FS wird 1 mol H_2 benötigt (Abb. 4.2) (DEMEYER & HENDERICKX 1967). Das bedeutet hinsichtlich der vorliegenden Ergebnisse, dass bei der in V1 um $4,35 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$, in V2 um $4,69 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$, in V3 um $4,49 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ und in V4 um $5,37 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ erhöhten Propionat-Bildung die gleichen Mengen an H_2 benötigt worden sein müssten (Kapitel 3.3). Der in die Propionat-Bildung aus FS eingegangene H_2 müsste laut Schlussfolgerungen von ASANUMA *et al.* (1999) und LÓPEZ *et al.* (1999) den methanogenen *Archaea* für die Methanogenese fehlen. In Folge dessen wurde dort eine Reduktion der CH_4 -Produktion festgestellt (ASANUMA *et al.* 1999; LÓPEZ *et al.* 1999; NEWBOLD *et al.* 2005).

Die Erhöhung der Propionat-Produktion durch FS in dieser Studie wurde auch in den molaren Propionat-Anteilen reflektiert.

In der vorliegenden Untersuchung sind nur 80-96% der FS ($6,76 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$) zu Acetat und Propionat fermentiert worden (Kapitel 3.3). Was mit dem Rest geschehen ist, ist unklar. Einerseits wäre es denkbar, dass FS noch unmetabolisiert vorgelegen hat oder nur bis zum Zwischenprodukt Succinat reduziert wurde. Da Succinat aber in der Regel sehr schnell zu Propionat reduziert wird (BLACKBURN & HUNGATE 1963), ist dies unwahrscheinlich. Ein weiterer interessanter Aspekt ist, dass einige methanogene *Archaea*, z.B. *Methanobacterium thermoautotrophicum*, ebenfalls über das Enzym Fumarat-Reduktase verfügen, welche sich aber von derjenigen der *Bacteria* in einigen Punkten unterscheidet (BOBIK & WOLFE 1989; FUCHS *et al.* 1978; HEIM *et al.* 1998). Die Fumarat-Reduktase war bei den methanogenen *Archaea* an der Synthese von Proteinen aus FS beteiligt (FUCHS *et al.* 1978). Dieser Weg könnte den weiteren Verbleib der nicht zu Acetat oder Propionat metabolisierten FS erklären und daraufhin deuten, dass FS von den methanogenen *Archaea* ebenfalls metabolisiert worden sein könnte.

Butyrat

Sowohl die Ergebnisse der hier durchgeführten als auch der in der Literatur beschriebenen RUSITEC-Versuche (GIRALDO *et al.* 2007; LÓPEZ *et al.* 1999; NEWBOLD *et al.* 2005) zeigten deutlich, dass FS bzw. Fumarat keinen Einfluss auf die Produktion des Butyrats nimmt (Abb. 3.6 und 3.42). Dies lässt den Schluss zu, dass Butyrat kein Fermentationsprodukt der FS zu sein scheint.

Die signifikante Reduktion der molaren Butyrat-Anteile durch FS ergab sich in Folge der unveränderten Butyrat-Produktion und der insgesamt signifikant erhöhten SCFA-Produktion.

Isovalerat

Die Produktion des Isovalerats wurde nur in V1 durch $6,76 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ FS signifikant erhöht (Tab. 3.7, Abb. 3.7). Ein FS-Einfluss auf den molaren Isovalerat-Anteil verglichen mit der Kontrolle konnte nicht gezeigt werden. NEWBOLD *et al.* (2005) stellten zwar ebenfalls eine numerisch erhöhte Isovalerat-Produktion durch die Zugabe von $6,25 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ Fumarat ins RUSITEC-System fest, diese war aber nicht signifikant.

Der vorliegende Behandlungseffekt durch FS bei einem Versuch ist nicht ohne Weiteres zu erklären. Es ist nicht bekannt, wie FS den Stoffwechsel von Proteinen, aus deren Abbau Isovalerat stammt, beeinflusst haben könnte. Denn es konnte weder ein Behandlungseffekt durch FS auf die Ammoniak-Konzentrationen, noch auf die mikrobielle Proteinsynthese oder die Verdaulichkeit des Rohproteins nachgewiesen werden.

Valerat

In Übereinstimmung mit vorangegangenen Untersuchungen konnte kein eindeutiger FS-Einfluss festgestellt werden, da nur in V2 eine signifikante Erhöhung der Valerat-Produktion durch die Zugabe von $6,76 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ FS eingetreten ist (Abb. 3.8). Der molare Valerat-Anteil wurde nicht durch die Zugabe von FS beeinflusst. Während GIRALDO *et al.* (2007) eine signifikante Steigerung der Valerat-Produktion nachweisen konnten, wurde dies in anderen In-vitro-Studien widerlegt (ASANUMA *et al.* 1999; CALLAWAY & MARTIN 1996; CARRO & RANILLA 2003; GARCÍA-MARTÍNEZ *et al.* 2005; LÓPEZ *et al.* 1999).

Es ist bekannt, dass Valerat als Fermentationsprodukt beim Kohlenhydratabbau entstehen kann (NAGARAJA *et al.* 1997; SUTTON 1969), durch Kondensation von Propionyl-CoA Molekülen oder von Acetyl-CoA mit Propionyl-CoA (BERGMAN 1990; RUSSELL 1988). Da FS die Bildung von Acetat und Propionat beeinflussen kann, deren metabolische Vorstufen Acetyl-CoA bzw. Propionyl-CoA sind (Abb. 1.1), ist es denkbar, dass FS auf diesem Wege auch eine gesteigerte Valerat-Produktion bewirken könnte, wie es in V2 festgestellt worden ist (Tab. 3.8, Abb. 3.8).

4.3.1.4 Acetat-Propionat-Verhältnisse

Der Einfluss von $6,76 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ FS auf das Acetat-Propionat-Verhältnis resultierte vor allem aus der Erhöhung der Propionat-Produktion. Eine Senkung des Verhältnisses in Folge der Zugabe ähnlicher Mengen Fumarat *in vitro* (CALLAWAY & MARTIN 1996; CARRO & RANILLA 2003; GARCÍA-MARTÍNEZ *et al.* 2005; GIRALDO *et al.* 2007; JALC & CERTÍK 2005; NEWBOLD *et al.* 2005) und FS *in vivo* (BEAUCHEMIN & MCGINN 2006) konnte ebenfalls in zahlreichen Untersuchungen beobachtet werden.

4.3.1.5 Fermentationsgas

In der vorliegenden Untersuchung wurde bei der Zugabe von $6,76 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ FS eine geringfügige Reduktion der mittleren CH_4 -Produktion um 7-12 ml beobachtet (Abb. 3.21, Abb. 3.57). Es handelte sich dabei jedoch nicht um eine statistisch signifikante Reduktion. Dieses Ergebnis ist auch Tab. 3.16, Abb. 3.17 und Abb. 3.53 zu entnehmen. Für die CO_2 -Produktion in Tab. 3.18 und Abb. 3.55 wurde kein Einfluss von FS nachgewiesen. Die Abb. 3.21 zeigte jedoch eine vermeintlich signifikante Erhöhung der mittleren CO_2 -Produktion in V1, V2 und V3 mit Grassilage um 17-27 ml nach Zugabe von $6,76 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ FS. Da dieses unterschiedliche statistische Ergebnis eine Folge der Bildung des Mittelwerts über die Zeit sein könnte, bleibt unklar, ob es sich tatsächlich um ein signifikantes Ergebnis gehandelt hat. Sowohl die numerische Steigerung der CO_2 -Produktion in V4 mit Maissilage als auch die Erhöhung um 17-27 ml in V1-V3 könnten bei der Fermentation von FS zu Acetat frei geworden sein (Abb. 4.2).

Interessanterweise stand der nicht signifikant beeinflussten absoluten CO_2 - und CH_4 -Produktion ein signifikanter Einfluss von $6,76 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ FS auf die relativen Anteile von CH_4 und CO_2 am Fermentationsgas gegenüber. Die CH_4 -Reduktionen fielen mit etwa 3-4% bei den Versuchen mit Grassilage und mit 5% in dem Versuch mit Maissilage allerdings niedrig aus. Ursächlich für die scheinbare Kontroverse, dass zwar eine signifikante Reduktion des CH_4 -Anteils durch FS eingetreten ist, dies aber in den absoluten Werten nicht reflektiert wurde, sind vermutlich die starken Varianzen für die gesamte Gasproduktion. Dies ist an den hohen Werten für den SEM erkennbar. Aufgrund dessen konnte wahrscheinlich eine eventuelle Reduktion der CH_4 -Produktion nicht statistisch abgesichert werden. Dasselbe könnte für die numerische Steigerung der CO_2 -Produktion gelten.

Die bisher durchgeführten Untersuchungen zum Einfluss von FS oder Fumarat auf die CH_4 -Produktion kamen zu unterschiedlichen Ergebnissen. Während in In-vivo-Experimenten mit FS eine deutliche Reduktion der CH_4 -Produktion festgestellt werden konnte (BAYARU *et al.* 2001; WALLACE *et al.* 2006), wobei WALLACE *et al.* (2006) die bisher stärkste aber stöchiometrisch nicht erklärbare Reduktion von 75% gemessen haben, konnten MCGINN *et al.* (2004) und BEAUCHEMIN *et al.* (2006) bei ähnlichen Dosierungen keine methanreduzierenden Eigenschaften der

FS belegen. Auch Fumarat bewirkte bei Zugabe vergleichbarer Mengen ins RUSITEC-System einerseits eine signifikante CH₄-Reduktion (LÓPEZ *et al.* 1999; NEWBOLD *et al.* 2005). Andererseits zeigten GIRALDO *et al.* (2007) und JALC & CERTÍK (2005) in Übereinstimmung mit der vorliegenden Untersuchung, dass 3,75 mmol·d⁻¹ bzw. 6,25 mmol·d⁻¹ Fumarat die CH₄-Produktion nicht signifikant beeinflussten. Während JALC & CERTÍK (2005) dies nicht diskutierten, begründeten GIRALDO *et al.* (2007) dies mit der geringen Menge Fumarat, die appliziert wurde. Trotz der Verwendung der mit 6,76 mmol·d⁻¹ FS derzeit höchsten Dosierung im RUSITEC-System in dieser Studie, wurde die CH₄-Produktion nicht signifikant reduziert. In Anbetracht der Ergebnisse von LÓPEZ *et al.* (1999) und NEWBOLD *et al.* (2005) zu 6,25 mmol·d⁻¹ Fumarat erweckt diese Tatsache den Anschein, dass die Menge FS nicht alleine ausschlaggebend sein könnte. Vielmehr könnte der Erfolg einer CH₄-Reduktion auch abhängig von der Menge und der Art des verwendeten Substrats sein, welche beim Vergleich der genannten Untersuchungen die größten Variablen waren. Für die bessere Vergleichbarkeit wäre es aus diesem Grund sinnvoll, die RUSITEC-Versuche zumindest in den Grundzügen laborübergreifend gleich zu gestalten (Art und Menge des Substrats, Flüssigkeitsturnover).

4.3.1.6 Ammoniak-Konzentrationen und mikrobielle Proteinsynthese

Die vorliegenden Versuche zeigten im Einklang mit anderen Untersuchungen im RUSITEC-System (GIRALDO *et al.* 2007; JALC & CERTÍK 2005; NEWBOLD *et al.* 2005), dass FS weder einen Einfluss auf die Ammoniak-Konzentrationen (Tab. 3.20, Abb. 3.58) noch auf die mikrobielle Proteinsynthese (Abb. 3.23, Abb. 3.59) hatte. Bei der Berechnung der Effizienz der mikrobiellen Proteinsynthese wurde nur in V3 mit Grassilage eine signifikante Erhöhung durch 6,76 mmol·d⁻¹ FS belegt (Abb. 3.26). Dies könnte man als Hinweis auf ein stärkeres mikrobielles Wachstum durch die Verfügbarkeit von zusätzlichem Substrat in Form von FS interpretieren. LÓPEZ *et al.* (1999) publizierte bereits eine erhöhte Anzahl cellulolytischer *Bacteria* infolge der Bereitstellung von Fumarat als zusätzlichem Substrat. Dies wirkte sich steigend auf die Verdaulichkeit der Trockensubstanz aus.

4.3.1.7 Verdaulichkeiten der Rohnährstoffe

Die Zugabe von FS bewirkte keine Beeinflussung der Verdaulichkeiten der Rohnährstoffe (Kapitel 3.1.1.10 und 3.2.1.10). Dies entspricht den Ergebnissen zur Wirkung von Fumarat in vorangegangenen RUSITEC-Versuchen (GIRALDO *et al.* 2007; JALC & CERTÍK 2005; NEWBOLD *et al.* 2005).

In der Untersuchung von LÓPEZ *et al.* (1999) ging eine erhöhte Verdaulichkeit der Trockensubstanz durch Fumarat mit einer Zunahme der cellulolytischen *Bacteria* einher. Dies zeigt, dass die beiden Parameter voneinander abhängen können, denn eine größere Anzahl *Bacteria* ist in der Lage, mehr Substrat zu fermentieren. Obgleich in Kapitel 4.3.1.6 abschließend vermutet wurde, dass in V1 eventuell erhöhtes mikrobielles Wachstum aufgetreten sein könnte, sprechen die vorliegenden Ergebnisse zu den Verdaulichkeiten in dieser Untersuchung gegen eine Beeinflussung der Anzahl der Mikroorganismen durch FS.

4.3.1.8 Protozoa

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der vorliegenden RUSITEC-Versuche mit FS wurde auch in anderen Untersuchungen keine Veränderung der Anzahl der *Protozoa* durch Fumarat festgestellt (LÓPEZ *et al.* 1999; NEWBOLD *et al.* 2005). Diese Beobachtung deutet daraufhin, dass FS bzw. Fumarat keine Substrate für *Protozoa* zu sein scheinen (ASANUMA *et al.* 1999). Andernfalls wäre es denkbar gewesen, dass die Zugabe von FS zu einer erhöhten *Protozoa*-Anzahl hätte führen können.

4.3.2 Einfluss von Fumarsäure auf die Populationsstruktur der mikrobiellen Gemeinschaft

In dieser Studie wurde zum ersten Mal der Einfluss von FS auf die Populationsstruktur der mikrobiellen Gemeinschaft im RUSITEC-System mit Hilfe der SSCP-Analyse untersucht.

4.3.2.1 Einfluss von Fumarsäure auf die Gemeinschaft der *Bacteria*

Es konnte weder ein Einfluss von FS auf die Populationsstruktur der *Bacteria* bei den Versuchen in Kombination mit Grassilage (V1, V2, V3) noch in Kombination mit Maissilage (V4) festgestellt werden (Abb. 3.33, 3.34 und 3.66, 3.67).

Es kam jedoch im *Bacteria*-Profil von Tag 14 in V2 und V3 mit Grassilage zur Ausprägung von jeweils einer Bande in den mit FS-behandelten Ansätzen. Hinter diesen Banden konnte in V2 *Succiniclasticum ruminis*, und in V3 *Prevotella* und *S. ruminis* nachgewiesen werden (Tab. 3.22). Wären die Banden und die Sequenzen mit der entsprechenden phylogenetischen Zuordnung nur in den FS-Ansätzen gefunden worden, hätte dies auf eine Populationsverschiebung hingedeutet. Da es sich sowohl bei *Prevotella* als auch bei *S. ruminis* um Spezies handelt, welche unter physiologischen Bedingungen im Pansen vertreten sind (GYLSWYK 1995; HUNGATE 1966), wäre eine Zunahme der molekularbiologischen Diversität innerhalb der Mikroorganismen-Spezies aufgrund erhöhter Verfügbarkeit von Substrat, in diesem Fall FS, denkbar gewesen. Da die Bande jedoch tatsächlich auch in gleicher Laufhöhe mit den Nucleotid-Sequenzen von *Prevotella* und *S. ruminis* in der Kontrolle in V1 präsent war, kann ein FS-Effekt ausgeschlossen werden. In der Clusteranalyse zeigte sich zwar eine geringere Ähnlichkeit der Bandenmuster der Kontrolle zu den FS-Behandlungen als diese untereinander aufwiesen, in der statistischen Auswertung konnte jedoch keine Signifikanz nachgewiesen werden.

Gegen einen Einfluss von FS sprechen auch die metabolischen Eigenschaften der in den FS-Ansätzen identifizierten Gattungen/Spezies, die in keinem klaren, direkten Zusammenhang zu FS stehen (Abb. 4.3). Zwar verfügen *A. lipolytica* (V1: 3,38 mmol·d⁻¹ FS) und *Prevotella* (V1: 6,76 mmol·d⁻¹ FS; V3: 3,38 mmol·d⁻¹ FS) über das Enzym Fumarat-Reduktase (ASANUMA & HINO 2000) und können daher FS bzw. Fumarat direkt als Substrat nutzen, wobei während der mikrobiellen

Fermentation als Produkte Succinat und Propionat entstehen können (ASANUMA & HINO 2000; PRINS *et al.* 1975; STEWART & BRYANT 1988). *Prevotella* wurde aber auch in der Kontrolle von V1 identifiziert. Für *S. ruminis* lässt sich ebenfalls kein direkter Zusammenhang zu FS herstellen. Diese Spezies ist nur in der Lage, Succinat zu Propionat zu reduzieren (GYLSWYK 1995). Es scheint sich daher nicht um einen gerichteten Effekt bzw. eine durch FS ausgelöste Populationsverschiebung zu handeln.

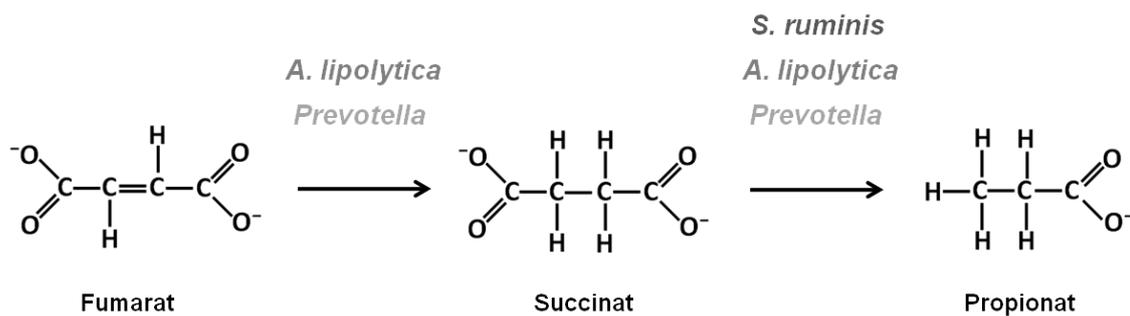


Abb. 4.3: Reaktionsweg zur Reduktion von FS bzw. Fumarat und daran beteiligte *Bacteria*-Spezies.

Zusammenfassend lässt sich damit sagen, dass die bakterielle Nutzung von FS als Substrat keine Auswirkungen auf die Populationsstruktur und Diversität der *Bacteria* hatte. Dieses Ergebnis zeigte sich sowohl für die Versuche mit Grassilage als auch für den Versuch mit Maissilage. Aufgrund der Verfügbarkeit des zusätzlichen Substrats kann jedoch davon ausgegangen werden, dass eine Anpassung bestimmter Stoffwechselprozesse bei den FS-reduzierenden *Bacteria* erfolgt sein sollte. In Frage kommt dafür die erhöhte Expression der Fumarat-Reduktase infolge der Anwesenheit von FS (ASANUMA & HINO 2000), wodurch sehr gut die gesteigerte Propionat-Produktion erklärt werden könnte. Möglich wäre auch ein vermehrtes bakterielles Wachstum gewesen, wie z.B. für die cellulolytischen *Bacteria* in einer RUSITEC-Untersuchung berichtet wurde (LÓPEZ *et al.* 1999). Die Quantität der Mikroorganismen wurde in dieser Studie nicht direkt bestimmt. Die von FS unbeeinflussten Ergebnisse zur mikrobiellen Proteinsynthese und Verdaulichkeit sprechen jedoch gegen eine quantitative Veränderung der gesamten Mikroorganismen. Abschließend kann dieser Diskussionspunkt deshalb nicht geklärt werden.

4.3.2.2 Einfluss von Fumarsäure auf die Gemeinschaft der *Archaea*

Die SSCP-Analysen in V1-3 mit Grassilage und der LAM in V4 mit Maissilage führten zu dem Ergebnis, dass FS die Populationsstruktur der *Archaea*-Gemeinschaft nicht verändert.

Die statistische Auswertung des SSCP-Profiles der SAM in V4 erbrachte zwar den Nachweis eines signifikanten Behandlungseffektes auf die Diversität der *Archaea*, es konnte allerdings nicht ermittelt werden, zwischen welchen Behandlungen dieser Effekt aufgetreten ist (Abb. 3.69). Hinzu kommt, dass dieser Behandlungseffekt nicht mit der Ausprägung oder dem Fehlen bestimmter Banden in Einklang zu bringen war. Inwiefern es sich deswegen tatsächlich um einen Behandlungseffekt gehandelt hat, bleibt unklar.

Denkbar wäre auch eine Beeinflussung der Quantität der *Archaea* durch FS gewesen. Da dies jedoch kein Bestandteil dieser Untersuchung war, kann dazu keine Aussage getroffen werden. Gegen eine quantitative Veränderung der gesamten Mikroorganismen sprechen jedoch die von FS unbeeinflussten Ergebnisse zur mikrobiellen Proteinsynthese und Verdaulichkeiten. In Übereinstimmung damit konnten LÓPEZ *et al.* (1999) keinen Einfluss von FS auf die Anzahl der *Archaea* feststellen.

Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse der SSCP-Analysen, dass die Zugabe von FS in dieser Untersuchung keinen Einfluss auf die Zusammensetzung der gesamten mikrobiellen Gemeinschaft ausgeübt hat. In zukünftigen SSCP-Analysen könnte es allerdings sinnvoll sein, die mikrobielle Diversität zusätzlich zu den Domänen *Bacteria* und *Archaea* auf niedrigerer taxonomischer Ebene (Ordnungen, Familien) zu untersuchen, um die Anzahl der hinter einer Bande stehenden Nucleotid-Sequenzen zu minimieren und übersichtlichere Profile zu erhalten.

4.3.3 Zusammenfassung des Wirkungsmechanismus von Fumarsäure

Zahlreiche Studien haben sich bislang mit dem Einfluss von Fumarat auf den mikrobiellen Stoffwechsel *in vitro* befasst. LÓPEZ *et al.* (1999) und NEWBOLD *et al.* (2005) stellten im RUSITEC-System eine mit der CH₄-Reduktion einhergehende erhöhte Propionat-Produktion fest. Auch mit der *batch culture* Methode wurde

diese Beobachtung gemacht (ASANUMA *et al.* 1999; CARRO & MILLER 2002; GARCÍA-MARTÍNEZ *et al.* 2005). Propionat konnte als bakterielles Fermentationsprodukt von FS/Fumarat nachgewiesen werden (ASANUMA *et al.* 1999; HENDERSON 1980), wobei die Nutzbarkeit von FS/Fumarat als Substrat H_2 bedarf (ASANUMA & HINO 2000; CASTILLO *et al.* 2004; HENDERSON 1980).

Da die *Archaea* für die Methanogenese ebenfalls H_2 benötigen (MADIGAN *et al.* 2000) und die Methanogenese- und Wachstumsraten bei der methanogenen *Archaea*-Spezies *Methanobacterium thermoautotrophicum* aufgrund eines reduzierten H_2 -Angebots erniedrigt waren (MORGAN *et al.* 1997; SCHÖNHEIT *et al.* 1980), schlossen die Autoren aus ihren Ergebnissen zur CH_4 -Reduktion, dass der für die Reduktion von Fumarat zu Propionat durch die *Bacteria* verwendete H_2 den *Archaea* für die CH_4 -Produktion gefehlt haben müsste. Es scheint sich demnach um eine Konkurrenz zwischen *Archaea* und *Bacteria* um den H_2 zu handeln.

In der vorliegenden Untersuchung zeigte sich mit der erhöhten Propionat-Produktion infolge der Zugabe von FS ebenfalls dessen Nutzung als Substrat für die *Bacteria*. Außerdem konnten mit der leichten numerischen Reduktion der CH_4 -Produktion und der reduzierten CH_4 -Anteile zumindest Hinweise für einen FS-Einfluss auf die Methanogenese gefunden werden (Kapitel 4.3.1.5). Aufgrund der nur numerisch reduzierten CH_4 -Produktion liegt die Vermutung nahe, dass es sich zwar um eine Konkurrenz gehandelt hat, aber der H_2 -Bedarf beider Mikroorganismen-Gruppen größtenteils gedeckt werden konnte. Dabei scheinen auch Affinitätsunterschiede der jeweiligen Enzyme zum H_2 eine große Rolle zu spielen.

Zudem zeigte sich in dieser Untersuchung, dass FS keinen Einfluss auf die Zusammensetzung der Gemeinschaft der *Archaea* ausgeübt hat. Da diese von der Verfügbarkeit an H_2 abhängt (HANSEL *et al.* 2008; LEIBO *et al.* 2006), sprechen die Ergebnisse der SSCP-Analyse ebenfalls für eine nicht signifikant limitierte H_2 -Verfügbarkeit durch die Zugabe von FS.

Im Rahmen der Konkurrenzsituation ist es daher wahrscheinlich, dass bestimmte Anpassungsstrategien des mikrobiellen Stoffwechsels anstelle von Anpassungen der mikrobiellen Gemeinschaft getreten sein müssten, damit die Mikroorganismen an H_2 gelangen und konkurrenzfähig bleiben konnten. Um welche möglichen

Anpassungsstrategien es sich dabei handeln könnte, soll im nächsten Kapitel erläutert werden.

4.4 Sicherstellung der Versorgung mit H₂

Die vorliegenden Ergebnisse deuten daraufhin, dass die Zugabe von FS zu einer Konkurrenz zwischen den *Archaea* und *Bacteria* geführt haben müsste. Diese scheint sich in einer numerischen Reduktion der CH₄-Produktion geäußert zu haben und spricht dafür, dass die H₂-Verfügbarkeit im Vergleich mit anderen RUSITEC-Versuchen nicht signifikant limitiert war. Wie könnte nun die Versorgung mit H₂ für *Archaea* aber auch *Bacteria* sichergestellt worden sein? Verschiedene Anpassungsstrategien kommen dafür in Frage.

4.4.1 Anpassungen der FS-reduzierenden *Bacteria* und Propionat-Produktion

In Anpassung an die Zugabe von Fumarat ist es bei einigen ruminalen *Bacteria* zu einer Erhöhung der Aktivität der Fumarat-Reduktase und auch zu einer gesteigerten Expression des Enzyms gekommen (ASANUMA & HINO 2000). Berechnungen von UNGERFELD & KOHN (2006) zufolge ist jedoch die Voraussetzung dafür, dass Fumarat in erhöhten Mengen als Substrat genutzt werden konnte und zu einer erhöhten Propionat-Bildung geführt hat (BAYARU *et al.* 2001; LÓPEZ *et al.* 1999; NEWBOLD *et al.* 2005; WALLACE *et al.* 2006), die Tatsache, dass die Reduktion von FS/Fumarat thermodynamisch im Pansen sehr günstig zu sein scheint, und zwar günstiger als die Methanogenese. Dafür sprechen auch die Ergebnisse einer Untersuchung von CORD-RUWISCH *et al.* (1988).

Demnach müssten die FS-reduzierenden *Bacteria* den *Archaea* bei der Konkurrenz um H₂ im Vorteil sein. Die beobachteten Ergebnisse zur Propionat-Produktion stehen damit im Einklang. Die numerische CH₄-Reduktion deutet jedoch daraufhin, dass die methanogenen *Archaea* trotzdem an ausreichend H₂ gelangt sein müssten.

4.4.2 Anpassungen der methanogenen *Archaea* und CH₄-Produktion

Aufgrund ihrer Position nahe der Wurzel des universellen phylogenetischen Baumes werden die *Archaea* heute als die am wenigsten entwickelten

Organismen angesehen, die am nächsten mit den frühen Lebensformen auf der Erde verwandt sind. Unterstützt wird dies durch die Tatsache, dass es *Archaea* sind, die vor allem in extremen Lebensräumen eine ökologische Nische besetzen (hoher Salzgehalt, sehr hohe bzw. niedrige Temperaturen) (MADIGAN *et al.* 2000). Auch das Ökosystem Pansen ist mit einem H₂-Anteil von unter 1% am ruminalen Fermentationsgas (CZERKAWSKI 1986; HUNGATE 1967; NELSON *et al.* 1960) eine extremer anaerober Lebensraum. Die methanogenen *Archaea*, die auf H₂ und CO₂ als einzige Energiequelle angewiesen sind, müssen daher optimal an niedrige H₂-Konzentrationen im Medium angepasst sein.

4.4.2.1 H₂ als Reduktionsäquivalent

Die Abhängigkeit des Stoffwechsels und des Wachstums der methanogenen *Archaea* von der H₂-Konzentration wurden bereits vielfach untersucht (ABRAM & NEDWELL 1978; HUNGATE 1967; LOVLEY *et al.* 1982; MORGAN *et al.* 1997; SCHÖNHEIT *et al.* 1980). Vorwiegend war dabei zu beobachten, dass zum einen mit steigenden H₂-Konzentrationen auch die Methanogeneserate und das Wachstum zunehmen und zum anderen beides bei abrupter Senkung der H₂-Konzentration stark reduziert ist, aber weiterhin stattfinden kann (MORGAN *et al.* 1997).

Interessanterweise scheint diesen Anpassungsstrategien an wechselnde H₂-Konzentrationen im Milieu die Regulation der Expression verschiedener Gene zu Grunde zu liegen. Bei niedrigen H₂-Konzentrationen konnte nämlich eine erhöhte Expression der Gene festgestellt werden, welche für die an der Methanogenese beteiligten Enzyme kodieren (HENDRICKSON *et al.* 2007). Auf diese Weise bleiben auch unter limitierten Bedingungen die Bereitstellung von H₂ als Reduktionsäquivalent für CO₂ und die damit verbundene Energiegewinnung gewährleistet.

Außerdem führte eine Limitierung des H₂ zu einer gesteigerten Expression der für die Synthese von Flagellen verantwortlichen Gene der *Archaea*-Spezies *Methanococcus jannaschii* und *Methanococcus maripaludis* (HENDRICKSON *et al.* 2008; MUKHOPADHYAY *et al.* 2000). Die Fähigkeit dieser Methanococcales, die Biosynthese der Flagellen und damit die Lokomotion zu kontrollieren, kann als Anpassung für die optimale Nutzung des H₂ in einem Milieu mit niedrigem H₂-Partialdruck verstanden werden. Da sich auch unter den ruminalen *Archaea* einige

Vertreter dieser Gruppe befinden (SOLIVA *et al.* 2004), welche sich durch den Besitz von Flagellen auszeichnen (WHITMAN & LIU 2008), könnte eine solche Anpassung auch für den Pansen und das RUSITEC-System gelten.

Des Weiteren können die methanogenen *Archaea* im Pansen mit hydrogenen *Protozoa* assoziiert sein (FINLAY *et al.* 1994; KRUMHOLZ *et al.* 1983; VOGELS *et al.* 1980; VOGELS & STUMM 1980), wobei durch die physische Assoziation der interspezifische H₂-Transfer zusätzlich begünstigt ist (MILLER 1995).

Trotz dieser Anpassungsstrategien zur effektiven H₂-Nutzung, sind die *Archaea* jedoch unter einem kritischen Wert, dem sog. Schwellenwert für den H₂-Partialdruck, nicht mehr in der Lage, H₂ aufzunehmen und zu metabolisieren (CORD-RUWISCH *et al.* 1988). Der Schwellenwert der methanogenen *Archaea*, der in In-vitro-Untersuchungen beschrieben wurde, liegt zwischen 6-12 Pa (LOVLEY 1985; LOVLEY *et al.* 1984; THAUER *et al.* 2008). Allerdings scheinen diese Schwellenwerte in Reinkulturen von *Archaea* höher zu sein als in natürlichen Habitaten (LOVLEY 1985), in denen der H₂-Partialdruck zwischen 1 Pa und 10 Pa variieren kann (THAUER 1990; THAUER *et al.* 2008).

4.4.2.2 Formiat als alternatives Reduktionsäquivalent

Aus bisherigen Untersuchungen wurde geschlossen, dass die H₂-Konzentration grundsätzlich ein limitierender Faktor für die CH₄-Produktion der *Archaea* darstellt (ABRAM & NEDWELL 1978; HUNGATE 1967; LOVLEY *et al.* 1982; MORGAN *et al.* 1997; SCHÖNHEIT *et al.* 1980). Es kommt aber auch die Nutzung von Formiat als alternatives Reduktionsäquivalent für die Methanogenese einiger *Archaea* in Frage (MADIGAN *et al.* 2000).

Der Formiat-Anteil im Pansen wird mit 0-5% beschrieben (GRAY *et al.* 1952). Es entsteht als Zwischenprodukt im Pansen bei der mikrobiellen Fermentation u.a. durch cellulolytische *Bacteria* (BEIJER 1952; BREVES & LEONHARD-MAREK 2010; HUNGATE 1950; HUNGATE *et al.* 1970). Im zweiten Schritt kann es dann als Substrat für die Methanogenese verwendet werden (BEIJER 1952; CARROL & HUNGATE 1955). Ruminale *Archaea* der Gattung *Methanobrevibacter*, *Methanobacterium formicicum* und viele andere hydrogenotrophe Spezies besitzen die Fähigkeit, Formiat zu metabolisieren (BOONE *et al.* 1989; LOVLEY *et al.*

1984; MADIGAN *et al.* 2000; REA *et al.* 2007). Dem zugrunde liegt folgende Reaktionsgleichung:



Da der Metabolismus von Formiat zu CH_4 energetisch fast genauso günstig ist wie die Methanogenese aus H_2 und CO_2 , wäre es überraschend, wenn einige ruminale methanogenen *Archaea* Formiat nicht als Energiequelle nutzen würden (LOVLEY *et al.* 1984). Tatsächlich deuten einige Untersuchungen daraufhin, dass bei Unterschreitung des Schwellenwerts der *Archaea* für den H_2 -Partialdruck oder in Abwesenheit von H_2 alternativ Formiat für die Methanogenese verwendet werden kann (HENDRICKSON *et al.* 2007; SPARLING & DANIELS 1990; WOOD *et al.* 2003). Dies geschieht aufgrund der Regulation der *fdh*-Gene, deren Transkription bei Mangel oder Abwesenheit von H_2 stimuliert wird, wodurch wiederum die Expression des katalysierenden Enzyms, der Formiat-Dehydrogenase, erhöht wird (HENDRICKSON *et al.* 2007; SPARLING & DANIELS 1990; WOOD *et al.* 2003).

Es könnte demzufolge also sein, dass bei Konkurrenz um H_2 als Reduktionsäquivalent die Propionat-Produktion durch die Zugabe von FS thermodynamisch zwar günstiger war als die Methanogenese aus CO_2 und H_2 , die *Archaea* im Falle eines H_2 -Defizits aber ungehindert weiterhin CH_4 bilden konnten, weil sie ihren Stoffwechsel an die veränderten Milieubedingungen angepasst haben und nun Formiat als Substrat genutzt haben. Die Voraussetzung hierfür wäre eine große Menge an Formiat. Sollte jedoch die Formiat-Bildung in dem gleichen Maße erfolgen, wie in der Kontrolle, scheint es unwahrscheinlich, dass Formiat für die Methanogenese verantwortlich gewesen ist. Wäre allerdings die Formiat-Bildung durch FS-Zugabe gesteigert worden, ähnlich wie die Acetat-Produktion, ist dieser Stoffwechselweg für die hohe CH_4 -Bildung denkbar. Diese und die zuvor erwähnten Anpassungsstrategien würden dann sowohl die erhöhte Propionat-Bildung als auch die numerisch reduzierte CH_4 -Produktion erklären.

4.4.3 Freisetzung von H_2 aus Acetat-Produktion

Aufschluss über die Gründe der nur numerisch reduzierten CH_4 -Produktion könnte die H_2 -Bilanz geben (Kapitel 3.3). Theoretisch sollte eine CH_4 -Reduktion um 1 mol durch die Zugabe von 4 mol FS erreicht werden (FLACHOWSKY & BRADE 2007). Im

Fall dieser Untersuchung hätte man daher für die Zugabe und Metabolisierung von $6,76 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ FS zu Propionat eine CH_4 -Reduktion um $1,69 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ erwartet. Die tatsächlichen Werte waren jedoch weitaus geringer (Tab. 3.23).

Der Grund für diese Beobachtung könnte der H_2 sein, der in allen Versuchen bei der numerisch gesteigerten Acetat-Bildung aus FS freigesetzt worden sein müsste (Tab. 3.23, Abb. 4.2). Bei der Acetat-Produktion aus 1 mol FS werden 2 mol H_2 frei, das ist mehr als bei der Propionat-Produktion (1 mol H_2) verbraucht wird (Abb. 4.2) (UNGERFELD *et al.* 2007). Dies ist insofern eine recht ungünstige Reaktion für die Erzielung einer Reduktion der CH_4 -Produktion, da die Bestrebungen dabei in Richtung der Senkung des H_2 -Partialdruckes und der H_2 -Verfügbarkeit für die *Archaea* gehen.

In V1 kam es zu einer um $1,52 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ erhöhten Acetat-Produktion verglichen mit der Kontrolle (Tab. 3.23). Dies führte zur Freisetzung von $3,04 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ H_2 . Gleichzeitig wurde eine numerische CH_4 -Reduktion um $0,32 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ festgestellt, die eine Verfügbarkeit von viermal so viel H_2 ermöglicht haben müsste ($1,28 \text{ mmol}\cdot\text{d}^{-1}$). In V1 könnte auf diese Weise fast vollständig die Herkunft des H_2 erklärt werden, der für die Propionat-Produktion benötigt worden zu sein scheint. In V2-4 dagegen ist die erhöhte Propionat-Bildung alleine nicht mit der Reduktion der CH_4 -Produktion und der erhöhten Acetat-Bildung zu erklären. Der restliche H_2 müsste dann aus dem H_2 -Pool oder aus anderen Reaktionen stammen, die in der Tabelle nicht berücksichtigt wurden. In Erwägung zu ziehen wäre diesbezüglich z.B. auch die Valerat-Produktion, welche teilweise durch Fumarsäure beeinflusst wurde. Bei der Valerat-Produktion könnte es ähnlich wie bei der Acetat-Produktion ebenfalls zur Freisetzung von H_2 gekommen sein.

Die Generierung zusätzlicher Reduktionsäquivalente bei der Acetat-Produktion aus FS könnte daher z.T. eine Erklärung für die hohe CH_4 -Produktion nach FS-Zugabe sein. Der Grund für die Unterschiede in der Beeinflussung der CH_4 -Produktion zwischen den Versuchen könnte die Größe des H_2 -Pools sein, durch den der H_2 -Bedarf zunächst gedeckt worden sein könnte. Insgesamt spricht nicht nur der frei werdende H_2 bei der Acetat-Produktion sondern auch die numerische CH_4 -Reduktion für eine nicht signifikant limitierte H_2 -Konzentration für die *Archaea*.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in zukünftigen Studien für eine genaue H₂-Bilanz die Ausweitung gaschromatographischer Analysen sinnvoll ist. Diese könnte dann Aufschluss geben über den H₂-Anteil am Fermentationsgas, sowie über die Konzentrationen von Succinat, FS und Formiat.

4.5 Einsatz von Fumarsäure in der Praxis?

Die vorliegende Studie hat demonstriert, dass FS als methanreduzierende Substanz *in vitro* nicht wirkungsvoll erscheint. Zum einen konnte kein signifikanter reduktiver Einfluss auf die CH₄-Produktion bestätigt werden. Zum anderen trat zwar eine signifikante Reduktion des CH₄-Anteils auf, diese betrug aber nur etwa 3-4%.

Im RUSITEC-System konnte zwar der ruminale Stoffwechsel erfolgreich simuliert werden, die Übertragung der Ergebnisse auf In-vivo-Verhältnisse darf jedoch nur mit Vorsicht geschehen, da im Wiederkäuer zusätzlich systemische Effekte eine Rolle spielen. Allerdings ist der Nutzen von In-vitro-Untersuchungen dennoch groß, da der entscheidende Vorteil gegenüber In-vivo-Ansätzen darin liegt, dass durch die isolierte Betrachtungsweise ohne Einwirkung des Wirtstieres das gemessene biochemische Profil direktere Rückschlüsse auf den mikrobiellen Stoffwechsel zulässt. Außerdem dienen sie als eine Art Test-Untersuchung und helfen dabei einzuschätzen, inwiefern sich Veränderungen im ruminalem Stoffwechsel auf die Tiergesundheit auswirken können.

Es wurde zwar parallel zu dieser In-vitro-Untersuchung ein In-vivo-Experiment zum Einfluss von FS an Mastbullen und Fistelkühen durchgeführt. In diesem wurden jedoch nicht die CH₄-Emissionen der Tiere ermittelt. Aus diesem Grund muss diesbezüglich auf eine Extrapolation der vorliegenden Ergebnisse auf In-vivo-Verhältnisse zurückgegriffen werden. Dies führt zu dem Schluss, dass eine CH₄-Reduktion um 3-4% bei CH₄-Emissionen von bis zu 500 l pro Tier und Tag (KIRCHGESSNER *et al.* 1995) bei einer vergleichbaren In-vivo-Dosierung von 600 g FS täglich nur 15-20 l entsprechen würde. Angesichts der mit dem Erwerb von 1 kg FS verbundenen Kosten von 17,14 Euro (www.carlroth.com), der nur minimalen CH₄-Reduktion, sowie des Fehlens eines unmittelbaren Nutzens für den Landwirt, wäre der Einsatz von FS in der Praxis wahrscheinlich nicht durchsetzbar oder zu rechtfertigen. Zudem wurde in dem In-vivo-Versuch an

Kühen festgestellt, dass die Applikation von FS eine Abnahme des pH-Werts im Pansen nachsichziehen kann (pers. Mitteilung: PROF. DR. DÄNICKE), was zu einer Pansenacidose führen und negative Auswirkungen auf die Tiergesundheit haben kann.

4.6 Schlussfolgerungen

Die Zugabe von FS bewirkte keine signifikante Reduktion der CH₄-Produktion. Ein Anzeichen für eine Einflussnahme waren aber sowohl dessen numerische Reduktion als auch der reduzierte CH₄-Anteil. Die Ursache dafür war jedoch keine Veränderung der Diversität der mikrobiellen Gemeinschaft. Es wurde ein Einfluss von FS auf die mikrobielle Fermentation der SCFA nachgewiesen. Die gesteigerte Propionat-Produktion war diesbezüglich die auffälligste Veränderung, welche im Einklang mit dem in der Literatur beschriebenen Wirkungsmechanismus der FS als Substrat für die *Bacteria* steht.

Aufgrund der Tatsache, dass zwar einerseits die erhöhte Propionat-Produktion durch FS eingetreten ist, es aber andererseits zu keiner signifikanten Reduktion der CH₄-Produktion gekommen ist, scheint es nicht zu einer signifikanten Limitierung der Reduktionsäquivalente im RUSITEC-System gekommen zu sein.

Zum einen scheinen durch die FS-Zugabe selbst über den Weg der Acetat-Produktion H₂ generiert worden zu sein. Es sind auch weitere beteiligte Reaktionen denkbar, bislang ist dazu allerdings nichts Näheres bekannt. Zum anderen ist es wahrscheinlich, dass sich auch Anpassungen des *Archaea*-Stoffwechsels (Regulation der an der Methanogenese beteiligten Gene, Proteinexpression) ereignet haben. Aufgrund dessen waren die *Archaea* wahrscheinlich in der Lage, mit den *Bacteria* um die verfügbaren Reduktionsäquivalente zu konkurrieren und Energie zu gewinnen. Eine Anpassung oder Veränderung der mikrobiellen Gemeinschaft scheint aufgrund der nicht signifikant limitierten H₂-Konzentration nicht stattgefunden zu haben. Insgesamt kann der Wirkungsmechanismus der FS auf den ruminalen Stoffwechsel als sehr komplex beurteilt werden. Die in den RUSITEC-Versuchen abgelaufenen Prozesse können deshalb nicht restlos aufgeklärt werden.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass sich zwar der Einsatz von FS zumindest *in vitro* zur CH₄-Reduktion nicht geeignet hat. Aufgrund des derzeit stattfindenden Klimawandels mit seinen globalen negativen Auswirkungen auf die Biodiversität von Ökosystemen, die klimatischen Veränderungen auf der Erde und die unabsehbaren langfristigen Konsequenzen für die gesamte Menschheit, muss jedoch weiterhin jede Möglichkeit zur CH₄-Reduktion in Betracht gezogen und deren Potential untersucht werden.

5 LITERATURVERZEICHNIS

- ABRAM, J. W., and NEDWELL, D. B. (1978) Hydrogen as a substrate for methanogenesis and sulphate reduction in anaerobic saltmarsh sediment. *Archiv für Mikrobiologie* **117**: 93-97.
- AHARONI, Y., TAGARI, H., and BOSTON, R. C. (1991) A new approach to the quantitative estimation of nitrogen metabolic pathways in the rumen. *British Journal of Nutrition* **66**: 407-422.
- ALLISON, M. J., BRYANT, M. P., and DOETSCH, R. N. (1962) Studies on the metabolic function of branched-chain volatile fatty acids, growth factors for ruminococci. I. Incorporation of isovalerate into leucine. *Journal of Bacteriology* **83**: 523-532.
- ANDERSON, M. J. (2001) A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecology* **26**: 32-46.
- ANDERSON, M. J. (2005) Permanova: a FORTRAN computer program for permutational multivariate analysis of variance, Department of Statistics, University of Auckland, New Zealand.
- ANDERSON, M. J., and ROBINSON, J. (2003) Generalized discriminant analysis based on distances. *Australian & New Zealand Journal of Statistics* **45**: 301-318.
- ASANUMA, N., and HINO, T. (2000) Activity and properties of fumarate reductase in ruminal bacteria. *Journal of General and Applied Microbiology* **46**: 119-125.
- ASANUMA, N., IWAMOTO, M., and HINO, T. (1999) Effect of the addition of fumarate on methane production by ruminal microorganisms in vitro. *Journal of Dairy Science* **82**: 780-787.
- AVGUŠTIN, G., WALLACE, R. J., and FLINT, H. J. (1997) Phenotypic diversity among ruminal isolates of *Prevotella ruminicola*: proposal of *Prevotella brevis* sp. nov., *Prevotella bryantii* sp. nov., and *Prevotella albensis* sp. nov. and redefinition of *Prevotella ruminicola*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **47**: 284-288.
- BARRY, T. N., THOMPSON, A., and ARMSTRONG, D. G. (1977) Rumen fermentation studies on two contrasting diets. *Journal of Agricultural Science* **89**: 183-195.
- BAYARU, E., KANDA, S., KAMADA, T., ANDOH, S., NISHIDA, T., ISHIDA, M., ITOH, T., and ISOBE, Y. (2001) Effect of fumaric acid on methane production, rumen fermentation and digestibility of cattle fed roughage alone. *Animal Science Journal* **72**.

- BEAUCHEMIN, K. A., KREUZER, M., O'MARA, F., and MCALLISTER, T. A. (2008) Nutritional management for enteric methane abatement: a review. *Australian Journal of Experimental Agriculture* **48**: 21-27.
- BEAUCHEMIN, K. A., MCALLISTER, T. A., and MCGINN, S. M. (2009) Dietary mitigation of enteric methane from cattle. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources* **4**: 1-18.
- BEAUCHEMIN, K. A., and MCGINN, S. M. (2006) Methane emissions from beef cattle: effects of fumaric acid, essential oil, and canola oil. *Journal of Animal Science* **84**: 1489-1496.
- BEIJER, W. H. (1952) Methane fermentation in the rumen of cattle. *Nature* **170**: 576-577.
- BELASCO, I. J. (1954) New nitrogen feed compounds for ruminants - a laboratory evaluation. *Journal of Animal Science* **13**: 601-610.
- BENTLEY, O. G., LEHMKUHL, A., JOHNSON, R. R., HERSHBERGER, T. V., and MOXON, A. L. (1954) The "cellulolytic factor" activity of certain short chained fatty acids. *Journal of the American Chemical Society* **76**: 5000-5001.
- BERGMAN, E. N. (1990) Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiological Reviews* **70**: 567-590.
- BLACKBURN, T. H., and HUNGATE, R. E. (1963) Succinic acid turnover and propionate production in the bovine rumen. *Applied Microbiology* **11**: 132-135.
- BOBIK, T. A., and WOLFE, R. S. (1989) An unusual thiol-driven fumarate reductase in *Methanobacterium* with the production of the heterodisulfide of coenzyme M and N-(7-mercaptoheptanoyl)threonine-O³-phosphate. *Journal of Biological Chemistry* **264**: 18714-18718.
- BOGUHN, J., KLUTH, H., and RODEHUTSCORD, M. (2006) Effect of total mixed ration composition on fermentation and efficiency of ruminal microbial crude protein synthesis *in vitro*. *Journal of Dairy Science* **89**: 1580-1591.
- BOGUHN, J., NEUMANN, D., HELM, A., STROBEL, E., TEBBE, C. C., DÄNICKE, S., and RODEHUTSCORD, M. (2010) Effects of concentrate proportion in the diet with or without *Fusarium*-toxin contaminated triticale on ruminal fermentation and the structural diversity of rumen microbial communities *in vitro*. *Archives of Animal Nutrition* **64**: 467-483.
- BOONE, D. R., JOHNSON, R. L., and LIU, Y. (1989) Diffusion of the interspecies electron carriers H₂ and formate in methanogenic ecosystems and its implications in the measurement of *K_m* for H₂ or formate uptake. *Applied and Environmental Microbiology* **55**: 1735-1741.
- BRANDT, M., and ROHR, K. (1981) Beiträge zur Quantifizierung der N-Umsetzungen in den Vormägen von Milchkühen. *Zeitschrift für Tierphysiologie, Tierernährung und Futtermittelkunde* **46**: 39-48.

- BREVES, G., and LEONHARD-MAREK, S. (2010) Verdauungsvorgänge in den Vormägen. In: *Physiologie der Haustiere* (ed. VON ENGELHARDT, W.). Enke Verlag, Stuttgart.
- BROUDISCOU, L. P., PAPON, Y., and BROUDISCOU, A. F. (2000) Effects of dry plant extracts on fermentation and methanogenesis in continuous culture of rumen microbes. *Animal Feed Science and Technology* **87**: 263-277.
- BRYANT, M. P. (1959) Bacterial species of the rumen. *Bacteriological Reviews* **23**: 125-153.
- BRYANT, M. P., and DOETSCH, R. N. (1955) Factors necessary for the growth of *Bacteroides succinogenes* in the volatile fatty acid fraction of rumen fluid. *Journal of Dairy Science* **38**: 340-350.
- CALLAWAY, T. R., and MARTIN, S. A. (1996) Effects of organic acid and monensin treatment on in vitro mixed ruminal microorganism fermentation of cracked corn. *Journal of Animal Science* **74**: 1982-1989.
- CARRO, M. D., and MILLER, E. L. (1999) Effect of supplementing a fibre basal diet with different nitrogen forms on ruminal fermentation and microbial growth in an in vitro semi-continuous culture system (RUSITEC). *British Journal of Nutrition* **82**: 149-157.
- CARRO, M. D., and MILLER, E. L. (2002) Comparison of microbial markers (¹⁵N and purine bases) and bacterial isolates for the estimation of rumen microbial protein synthesis. *Animal Science* **75**: 315-321.
- CARRO, M. D., and RANILLA, M. J. (2003) Influence of different concentrations of disodium fumarate on methane production and fermentation of concentrate feeds by rumen micro-organisms *in vitro*. *British Journal of Nutrition* **90**: 617-623.
- CARROL, E. J., and HUNGATE, R. E. (1955) Formate dissimilation and methane production in bovine rumen contents. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **65**: 525-536.
- CARULLA, J. E., KREUZER, M., MACHMÜLLER, A., and HESS, H. D. (2005) Supplementation of *Acacia mearnsii* tannins decreases methanogenesis and urinary nitrogen in forage-fed sheep. *Australian Journal of Agricultural Research* **56**: 961-970.
- CASTILLO, C., BENEDITO, J. L., MÉNDEZ, J., PEREIRA, V., LÓPEZ-ALONSO, M., MIRANDA, M., and HERNÁNDEZ, J. (2004) Organic acids as a substitute for monensin in diets for beef cattle. *Animal Feed Science and Technology* **115**: 101-116.
- CILIA, V., LAFAY, B., and CHRISTEN, R. (1996) Sequence heterogeneities among 16S ribosomal RNA sequences, and their effect on phylogenetic analyses at the species level. *Molecular Biology and Evolution* **13**: 451-461.

- CORD-RUWISCH, R., SEITZ, H.-J., and CONRAD, R. (1988) The capacity of hydrogenotrophic anaerobic bacteria to compete for traces of hydrogen depends on the redox potential of the terminal electron acceptor. *Archiv für Mikrobiologie* **149**: 350-357.
- CRAWFORD, R. J., HOOVER, W. H., and KNOWLTON, P. H. (1980) Effects of solids and liquid flows on fermentation in continuous cultures. I. Dry matter and fiber digestion, VFA production and protozoa numbers. *Journal of Animal Science* **51**: 975-985.
- CZERKAWSKI, J. W. (1986) An introduction to rumen studies. 1. Auflage. Pergamon Press, Oxford.
- CZERKAWSKI, J. W. (1988) Compartmentation in the rumen. In: *The rumen microbial ecosystem* (ed. HOBSON, P. N.). Elsevier Science Publications, London and New York.
- CZERKAWSKI, J. W., and BRECKENRIDGE, G. (1977) Design and development of a long-term rumen simulation technique (Rusitec). *British Journal of Nutrition* **38**: 371-384.
- DEHORITY, B. A. (1984) Evaluation of subsampling and fixation procedures used for counting rumen protozoa. *Applied and Environmental Microbiology* **48**: 182-185.
- DEHORITY, B. A., SCOTT, H. W., and KOWALUK, P. (1967) Volatile fatty acid requirements of cellulolytic rumen bacteria. *Journal of Bacteriology* **94**: 537-543.
- DEMEYER, D., and HENDERICKX, H. (1967) Competitive inhibition of *in vitro* methane production by mixed rumen bacteria. *Archives internationales de Physiologie, de Biochimie et de Biophysique* **75**: 157-159.
- DOHME, F., MACHMÜLLER, A., WASSERFALLEN, A., and KREUZER, M. (2001) Ruminant methanogenesis as influenced by individual fatty acids supplemented to complete ruminant diets. *Letters in Applied Microbiology* **32**: 47-51.
- DOHRMANN, A. B., and TEBBE, C. C. (2004) Microbial community analysis by PCR-single-strand conformation polymorphism (PCR-SSCP). In: *Molecular Microbial Ecology Manual* (eds. KOWALCHUK, G. A., DE BRUIJN, F. J., HEAD, I. M., AKKERMANS, A. D. L., and VAN ELSAS, J. D.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.
- DURAND, M., DUMAY, C., BEAUMATIN, P., and MOREL, M. T. (1988) Use of the rumen simulation technique (RUSITEC) to compare microbial digestion of various by-products. *Animal Feed Science and Technology* **21**: 197-204.
- EL-SHAZLY, K. (1952) Degradation of protein in the rumen of the sheep. 1. Some volatile fatty acids, including branched-chain isomers, found *in vivo*. *Biochemical Journal* **51**: 640-647.

- FINLAY, B. J., ESTEBAN, G., CLARKE, K. J., WILLIAMS, A. G., EMBLEY, T. M., and HIRT, R. P. (1994) Some rumen ciliates have endosymbiotic methanogens. *FEMS Microbiology Letters* **117**: 157-161.
- FLACHOWSKY, G., and BRADE, W. (2007) Potenziale zur Reduzierung der Methan-Emissionen bei Wiederkäuern. *Züchtungskunde* **79**: 417-465.
- FLACHOWSKY, G., and LEBZIEN, P. (2007) Lebensmittel liefernde Tiere und Treibhausgase - Möglichkeiten der Tierernährung zur Emissionsminderung. *Übersichten zur Tierernährung* **35**: 191-231.
- FOGEL, G. B., COLLINS, C. R., LI, J., and BRUNK, C. F. (1999) Prokaryotic genome size and SSU rDNA copy number: estimation of microbial relative abundance from a mixed population. *Microbial Ecology* **38**: 93-113.
- FRASER, G. R., CHAVES, A. V., WANG, Y., McALLISTER, T. A., BEAUCHEMIN, K. A., and BENCHAAAR, C. (2007) Assessment of the effects of cinnamon leaf oil on rumen microbial fermentation using two continuous culture systems. *Journal of Dairy Science* **90**: 2315-2328.
- FUCHS, G., STUPPERICH, E., and THAUER, R. K. (1978) Function of fumarate reductase in methanogenic bacteria (*Methanobacterium*). *Archiv für Mikrobiologie* **119**: 215-218.
- GARCIA-GONZALEZ, R., GONZALEZ, J. S., and LOPEZ, S. (2010) Decrease of ruminal methane production in Rusitec fermenters through the addition of plant material from rhubarb (*Rheum* spp.) and alder buckthorn (*Frangula alnus*). *Journal of Dairy Science* **93**: 3755-3763.
- GARCÍA-MARTÍNEZ, R., RANILLA, M. J., TEJIDO, M. L., and CARRO, M. D. (2005) Effects of disodium fumarate on *in vitro* rumen microbial growth, methane production and fermentation of diets differing in their forage:concentrate ratio. *British Journal of Nutrition* **94**: 71-77.
- GIRALDO, L. A., RANILLA, M. J., TEJIDO, M. L., and CARRO, M. D. (2007) Influence of exogenous fibrolytic enzymes and fumarate on methane production, microbial growth and fermentation in Rusitec fermenters. *British Journal of Nutrition* **98**: 753-761.
- GOMES, N. C. M., HEUER, H., SCHÖNFELD, J., COSTA, R., MENDONÇA-HAGLER, L., and SMALLA, K. (2001) Bacterial diversity of the rhizosphere of maize (*Zea mays*) grown in tropical soil studied by temperature gradient gel electrophoresis. *Plant and Soil* **232**: 167-180.
- GONTHIER, C., MUSTAFA, A. F., BERTHIAUME, R., PETIT, H. V., MARTINEAU, R., and OUELLET, D. R. (2004) Effects of feeding micronized and extruded flaxseed on ruminal fermentation and nutrient utilization by dairy cows. *Journal of Dairy Science* **87**: 1854-1863.
- GOTTSCHALK, G. (1986) *Bacterial Metabolism*. 2. Auflage. Springer Verlag, New York.

- GRAINGER, C., CLARKE, T., BEAUCHEMIN, K. A., MCGINN, S. M., and ECKARD, R. J. (2008) Supplementation with whole cottonseed reduces methane emissions and can profitably increase milk production of dairy cows offered a forage and cereal grain diet. *Australian Journal of Experimental Agriculture* **48**: 73-76.
- GRAY, F. V., PILGRIM, A. F., RODDA, H. J., and WELLER, R. A. (1952) Fermentation in the rumen of the sheep. IV. The nature and origin of the volatile fatty acids in the rumen of the sheep. *Journal of Experimental Biology* **57**: 57-65.
- GRISWOLD, K. E., APGAR, G. A., BOUTON, J., and FIRKINS, J. L. (2003) Effects of urea infusion and ruminal degradable protein concentration on microbial growth, digestibility, and fermentation in continuous culture. *Journal of Animal Science* **81**: 329-336.
- GROBKOPF, R., JANSSEN, P. H., and LIESACK, W. (1998) Diversity and structure of the methanogenic community in anoxic rice paddy soil microcosms as examined by cultivation and direct 16S rRNA gene sequence retrieval. *Applied and Environmental Microbiology* **64**: 960-969.
- GYLSWYK, N. O. (1995) *Succiniclasticum ruminis* gen. nov., sp. nov., a ruminal bacterium converting succinate to propionate as the sole energy-yielding mechanism. *International Journal of Systematic Bacteriology* **45**: 297-300.
- HANSEL, C. M., FENDORF, S., JARDINE, P. M., and FRANCIS, C. A. (2008) Changes in bacterial and archaeal community structure and functional diversity along a geochemically variable soil profile. *Applied and Environmental Microbiology* **74**: 1620-1633.
- HEIM, S., KUNKEL, A., THAUER, R. K., and HEDDERICH, R. (1998) Thiol:fumarate reductase (Tfr) from *Methanobacterium thermoautotrophicum*--identification of the catalytic sites for fumarate reduction and thiol oxidation. *European Journal of Biochemistry* **253**: 292-299.
- HENDERSON, C. (1980) The influence of extracellular hydrogen on the metabolism of *Bacteroides ruminicola*, *Anaerovibrio lipolytica* and *Selenomonas ruminantium*. *Journal of General Microbiology* **119**: 485-491.
- HENDRICKSON, E. L., HAYDOCK, A. K., MOORE, B. C., WHITMAN, W. B., and LEIGH, J. A. (2007) Functionally distinct genes regulated by hydrogen limitation and growth rate in methanogenic Archaea. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U S A* **104**: 8930-8934.
- HENDRICKSON, E. L., LIU, Y., ROSAS-SANDOVAL, G., PORAT, I., SÖLL, D., WHITMAN, W. B., and LEIGH, J. A. (2008) Global responses of *Methanococcus maripaludis* to specific nutrient limitations and growth rate. *Journal of Bacteriology* **190**: 2198-2205.
- HESS, H. D., KREUZER, M., DÍAZ, T. E., LASCANO, C. E., CARULLA, J. E., SOLIVA, C. R., and MACHMÜLLER, A. (2003) Saponin rich tropical fruits affect fermentation and methanogenesis in faunated and defaunated rumen fluid. *Animal Feed Science and Technology* **109**: 79-94.

- HILDEBRAND, B., BOGUHN, J., and RODEHUTSCORD, M. (2010) Effect of maize silage to grass silage ration and feed particle size on ruminal fermentation *in vitro*. *Animal* **5**: 528-536.
- HINDRICHSEN, I. K., WETTSTEIN, H. R., MACHMÜLLER, A., JÖRG, B., and KREUZER, M. (2005) Effect of the carbohydrate composition of feed concentrates on methane emission from dairy cows and their slurry. *Environmental monitoring and assessment* **107**: 329-350.
- HINDRICHSEN, I. K., WETTSTEIN, H. R., MACHMÜLLER, A., and KREUZER, M. (2006) Methane emission, nutrient degradation and nitrogen turnover in dairy cows and their slurry at different milk production scenarios with and without concentrate supplementation. *Agriculture, Ecosystems & Environment* **113**: 150-161.
- HOFMAN, R. R. (1988) Anatomy of the gastro-intestinal tract. In: *The ruminant animal* (ed. CHURCH, D. C.). Prentice Hall, New Jersey.
- HUBY-CHILTON, F., BEVERIDGE, I., GASSER, R. B., and CHILTON, N. B. (2001) Single-strand conformation polymorphism analysis of genetic variation in *Labiostrongylus longispicularis* from kangaroos. *Electrophoresis* **22**: 1925-1929.
- HUNGATE, R. E. (1950) The anaerobic mesophilic cellulolytic bacteria. *Bacteriological Reviews* **14**: 1-49.
- HUNGATE, R. E. (1966) *The rumen and its microbes*. Academic Press, New York.
- HUNGATE, R. E. (1967) Hydrogen as an intermediate in the rumen fermentation. *Archiv für Mikrobiologie* **59**: 158-164.
- HUNGATE, R. E., BRYANT, M. P., and MAH, R. A. (1964) The rumen bacteria and protozoa. *Annual Review of Microbiology* **18**: 131-166.
- HUNGATE, R. E., SMITH, W., BAUCHOP, T., YU, I., and RABINOWITZ, J. C. (1970) Formate as an intermediate in the bovine rumen fermentation. *Journal of Bacteriology* **102**: 389-397.
- IPCC (2001) *Climate Change 2001: The scientific basis*. Contribution of working group I to the third assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change (eds. HOUGHTON, J. T., DING, Y., GRIGGS, D. J., NOGUER, M., VAN DER LINDEN, P. J., DAI, X., MASKELL, K., and JOHNSON, C. A.), Cambridge University Press, Cambridge, UK and New York, NY, USA. 881.
- IPCC (2007) *Climate Change 2007: The physical science basis*. Contribution of working group I to the fourth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change (eds. SOLOMON, S., QIN, D., MANNING, M., CHEN, Z., MARQUIS, M., AVERYT, K. B., TIGNOR, M., and MILLER, H. L.), Cambridge University Press, Cambridge, UK and New York, NY, USA.
- JALC, D., and CERTÍK, M. (2005) Effect of microbial oil, monensin and fumarate on rumen fermentation in artificial rumen. *Czech Journal of Animal Science* **50**: 467-472.

- JOHNSON, K. A., and JOHNSON, D. E. (1995) Methane emissions from cattle. *Journal of Animal Science* **73**: 2483-2492.
- JOUANY, J. P. (1994) Manipulation of microbial activity in the rumen. *Archives of Animal Nutrition* **46**: 133-153.
- KASKE, M. (2010) Motorik des Magen-Darm-Kanals. In: *Physiologie der Haustiere* (ed. VON ENGELHARDT, W.). Enke Verlag, Stuttgart.
- KHAN, A. W., MEEK, E., SOWDEN, L. C., and COLVIN, J., R. (1984) Emendation of the genus *Acetivibrio* and description of *Acetivibrio cellulosolvens* sp. nov., a nonmotile cellulolytic mesophile. *International Journal of Systematic Bacteriology* **34**: 419-422.
- KIRCHGESSNER, M., WINDISCH, W., and MÜLLER, H. L. (1995) Nutritional factors for the quantification of methane production. *Proceedings of the Eighth International Symposium on Ruminant Physiology: Digestion, Metabolism, Growth and Reproduction*
- KLEVENHUSEN, F., BERNASCONI, S. M., HOFSTETTER, T. B., BOLOTIN, J., KUNZ, C., and SOLIVA, C. R. (2009) Efficiency of monolaurin in mitigating ruminal methanogenesis and modifying C-isotope fractionation when incubating diets composed of either C3 or C4 plants in a rumen simulation technique (Rusitec) system. *British Journal of Nutrition* **102**: 1308-1317.
- KOCH, M., STROBEL, E., TEBBE, C. C., HERITAGE, J., BREVES, G., and HUBER, K. (2006) Transgenic maize in the presence of ampicillin modifies the metabolic profile and microbial population structure of bovine rumen fluid *in vitro*. *British Journal of Nutrition* **96**: 820-829.
- KRUMHOLZ, L. R., FORSBERG, C. W., and VEIRA, D. M. (1983) Association of methanogenic bacteria with rumen protozoa. *Canadian Journal of Microbiology* **29**: 676-680.
- LANE, D. J. (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In: *Nucleic acid techniques in bacterial systematics* (eds. STACKEBRANDT, E., and GOODFELLOW, M.). John Wiley & Sons Ltd., Chichester, England.
- LARSEN, N., OLSEN, G. J., MAIDAK, B. L., MCCAUGHEY, M. J., OVERBEEK, R., MACKE, T. J., MARSH, T. L., and WOESE, C. R. (1993) The ribosomal database project. *Nucleic Acids Research* **21**: 3021-3023.
- LATIF, M. (2006) Klima. 2. Auflage. Fischer Taschenbuch Verlag, Frankfurt am Main.
- LATSCHA, H. P., and KLEIN, H. A. (1997) Organische Chemie: Chemie Basiswissen II. 4. Auflage. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- LEIBO, A. I., NETRUSOV, A. I., and CONRAD, R. (2006) [Effect of hydrogen concentration on the hydrogenotrophic methanogenic community structure studied by T-RELP analysis of 16S rRNA gene amplicons]. *Mikrobiologija* **75**: 786-791.

- LÓPEZ, S., VALDÉS, C., NEWBOLD, C. J., and WALLACE, R. J. (1999) Influence of sodium fumarate addition on rumen fermentation *in vitro*. *British Journal of Nutrition* **81**: 59-64.
- LOVLEY, D. R. (1985) Minimum threshold for hydrogen metabolism in methanogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **49**: 1530-1531.
- LOVLEY, D. R., DWYER, D. F., and KLUG, M. J. (1982) Kinetic analysis of competition between sulfate reducers and methanogens for hydrogen in sediments. *Applied and Environmental Microbiology* **43**: 1373-1379.
- LOVLEY, D. R., GREENING, R. C., and FERRY, J. G. (1984) Rapidly growing rumen methanogenic organism that synthesizes coenzyme M and has high affinity for formate. *Applied and Environmental Microbiology* **48**: 81-87.
- LUND, A. (1974) Yeasts and moulds on the bovine rumen. *Journal of General Microbiology* **81**: 453-462.
- MADIGAN, M., MARTINKO, J. M., and PARKER, J. (2000) *Brock Biology of Microorganisms*. 9.Auflage. Prentice-Hall, New Jersey.
- MANSFIELD, H. R., ENDRES, M. I., and STERN, M. D. (1995) Comparison of microbial fermentation in the rumen of dairy cows and dual flow continuous culture. *Animal Feed Science and Technology* **55**: 47-66.
- MAROUNEK, M., BREZINA, P., SIMUNEK, J., and BARTOS, S. (1991) Influence of redox potential on metabolism of glucose in mixed cultures of rumen microorganisms. *Archives of Animal Nutrition* **41**: 63-69.
- MARTINEZ, M. E., RANILLA, M. J., RAMOS, S., TEJIDO, M. L., and CARRO, M. D. (2009) Effects of dilution rate and retention time of concentrate on efficiency of microbial growth, methane production, and ruminal fermentation in Rusitec fermenters. *Journal of Dairy Science* **92**: 3930-3938.
- MARTINEZ, M. E., RANILLA, M. J., TEJIDO, M. L., RAMOS, S., and CARRO, M. D. (2010a) Comparison of fermentation of diets of variable composition and microbial populations in the rumen of sheep and Rusitec fermenters. I. Digestibility, fermentation parameters, and microbial growth. *Journal of Dairy Science* **93**: 3684-3698.
- MARTINEZ, M. E., RANILLA, M. J., TEJIDO, M. L., SARO, C., and CARRO, M. D. (2010b) Comparison of fermentation of diets of variable composition and microbial populations in the rumen of sheep and rusitec fermenters. II. Protozoa population and diversity of bacterial communities. *Journal of Dairy Science* **93**: 3699-3712.
- MCALLISTER, T. A., and NEWBOLD, C. J. (2008) Redirecting rumen fermentation to reduce methanogenesis. *Australian Journal of Experimental Agriculture* **48**: 7-13.
- MCCARTHUR, J. M., and MILTIMORE, J. E. (1961) Rumen gas analysis by gas-solid chromatography. *Canadian Journal of Animal Science* **41**.

- MCDONALD, I. W. (1948) The absorption of ammonia from the rumen of the sheep. *Biochemical Journal* **42**: 584-587.
- MCDUGALL, E. I. (1948) Studies on ruminant saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva. *Biochemical Journal* **43**: 99-109.
- MCGINN, S. M., BEAUCHEMIN, K. A., COATES, T., and COLOMBATTO, D. (2004) Methane emissions from beef cattle: effects of monensin, sunflower oil, enzymes, yeast, and fumaric acid. *Journal of Animal Science* **82**: 3346-3356.
- MICHALOWSKI, T. (1975) Effect of different diets on the diurnal concentrations of ciliate protozoa in the rumen of water buffalo. *Journal of Agricultural Science* **85**: 145-150.
- MICHALOWSKI, T., HARMEYER, J., and BREVES, G. (1986) The passage of protozoa from the reticulo-rumen through the omasum of sheep. *British Journal of Nutrition* **56**: 625-634.
- MILLER, T. L. (1995) Ecology of methane production and hydrogen sinks in the rumen. In: *Ruminant Physiology: Digestion, Metabolism, Growth and Reproduction* (eds. VON ENGELHARDT, W., LEONHARD-MAREK, S., BREVES, G., and GIESECKE, D.). Enke Verlag, Stuttgart.
- MINATO, H., ENDO, A., HIGUCHI, M., OOTOMO, Y., and UEMURA, T. (1966) Ecological treatise on the rumen fermentation. I. The fractionation of bacteria attached to rumen digesta solids. *Journal of General and Applied Microbiology* **12**: 39-52.
- MOLANO, G., KNIGHT, T. W., and CLARK, H. (2008) Fumaric acid supplements have no effect on methane emissions per unit of feed intake in wether lambs. *Australian Journal of Experimental Agriculture* **48**: 165-168.
- MORGAN, R. M., PIHL, T. D., NÖLLING, J., and REEVE, J. N. (1997) Hydrogen regulation of growth, growth yields, and methane gene transcription in *Methanobacterium thermoautotrophicum* Δ H. *Journal of Bacteriology* **179**: 889-898.
- MOSS, A. R., JOUANY, J. P., and NEWBOLD, C. J. (2000) Methane production by ruminants: its contribution to global warming. *Annales de Zootechnie* **49**: 231-253.
- MUKHOPADHYAY, B., JOHNSON, E., and WOLFE, R. S. (2000) A novel p_{H_2} control on the expression of flagella in the hyperthermophilic strictly hydrogenotrophic methanarchaeon *Methanococcus jannaschii*. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **97**: 11522-11527.
- MURRAY, W. D. (1986) *Acetivibrio cellulosolvans* is a synonym for *Acetivibrio cellulolyticus*: emendation of the genus *Acetivibrio*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **36**: 314-316.

- NAGARAJA, T. G., NEWBOLD, C. J., VAN NEVEL, C. J., and DEMEYER, D. (1997) Manipulation of ruminal fermentation. In: *The rumen microbial ecosystem* (ed. HOBSON, P. N.). Blackie Academic and Professional, Weinheim, Deutschland.
- NEEFS, J. M., VAN DE PEER, Y., DE RIJK, P., CHAPELLE, S., and DE WACHTER, R. (1993) Compilation of small ribosomal subunit RNA structures. *Nucleic Acids Research* **21**: 3025-3049.
- NELSON, W. O., BROWN, R. E., and KINGWILL, R. G. (1960) Factors affecting ratios of CO₂:CH₄ in bovine rumen gas. *Journal of Dairy Science* **43**: 1654-1655.
- NEWBOLD, C. J., LÓPEZ, S., NELSON, N., OUDA, J. O., WALLACE, R. J., and MOSS, A. R. (2005) Propionate precursors and other metabolic intermediates as possible alternative electron acceptors to methanogenesis in ruminal fermentation *in vitro*. *British Journal of Nutrition* **94**: 27-35.
- NEWBOLD, C. J., and RODE, L. M. (2006) Dietary additives to control methanogenesis in the rumen. *International Congress Series* **1293**: 138-147.
- OBARA, Y., DELLOW, D. W., and NOLAN, J. V. (1989) The influence of energy-rich supplements on nitrogen kinetics in ruminants *Physiological aspects of digestion and metabolism in ruminants*.
- OEZTUERK, H., SCHROEDER, B., BEYERBACH, M., and BREVES, G. (2005) Influence of living and autoclaved yeasts of *Saccharomyces boulardii* on *in vitro* ruminal microbial metabolism. *Journal of Dairy Science* **88**: 2594-2600.
- ORITA, M., IWAHANA, H., KANAZAWA, H., HAYASHI, K., and SEKIYA, T. (1989) Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U S A* **86**: 2766-2770.
- OWENS, F. N., and GOETSCH, A. L. (1988) Ruminal fermentation. In: *The ruminant animal* (ed. CHURCH, D. C.). Prentice Hall, New Jersey.
- OWENS, F. N., and ZINN, R. (1988) Protein metabolism of ruminant animals. In: *The ruminant animal* (ed. CHURCH, D. C.). Prentice Hall, New Jersey.
- PATEL, G. B., KHAN, A. W., AGNEW, B. J., and COLVIN, J., R. (1980) Isolation and characterization of an anaerobic, cellulolytic microorganism, *Acetivibrio cellulolyticus* gen. nov., sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **30**: 179-185.
- PISULEWSKI, P. M., OKORIE, A. U., BUTTERY, P. J., HARESIGN, W., and LEWIS, D. (1981) Ammonia concentration and protein synthesis in the rumen. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **32**: 759-766.
- PLASCENCIA, A., and ZINN, R. A. (1996) Influence of flake density on the feeding value of steam-processed corn in diets for lactating cows. *Journal of Animal Science* **74**: 310-316.

- PRINS, R. A., LANKHORST, A., VAN DER MEER, P., and VAN NEVEL, C. J. (1975) Some characteristics of *Anaerovibrio lipolytica*, a rumen lipolytic organism. *Antonie Van Leeuwenhoek* **41**: 1-11.
- RAHMSTORF, S., and SCHELLNHUBER, H. J. (2007) *Der Klimawandel*. 5. Auflage. C. H. Beck, München.
- RAMOS, S., TEJIDO, M. L., MARTÍNEZ, M. E., RANILLA, M. J., and CARRO, M. D. (2009) Microbial protein synthesis, ruminal digestion, microbial populations, and nitrogen balance in sheep fed diets varying in forage-to-concentrate ration and type of forage. *Journal of Animal Science* **87**: 2924-2934.
- REA, S., BOWMAN, J. P., POPOVSKI, S., PIMM, C., and WRIGHT, A. D. (2007) *Methanobrevibacter millerae* sp. nov. and *Methanobrevibacter olleyae* sp. nov., methanogens from the ovine and bovine rumen that can utilize formate for growth. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **57**: 450-456.
- RUCKEBUSCH, Y. (1988) Motility of the gastro-intestinal tract. In: *The ruminant animal* (ed. CHURCH, D. C.). Prentice Hall, New Jersey.
- RUSSELL, J. B. (1988) Energy yielding and consuming reactions. In: *The rumen microbial ecosystem* (ed. HOBSON, P. N.). Elsevier Science Publications, London and New York.
- SAMBROOK, J., and RUSSEL, D. W. (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- SATTER, L. D., and SLYTER, L. L. (1974) Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production *in vitro*. *British Journal of Nutrition* **32**: 199-208.
- SCHMALENBERGER, A., and TEBBE, C. C. (2003) Bacterial diversity in maize rhizospheres: conclusions on the use of genetic profiles based on PCR-amplified partial small subunit rRNA genes in ecological studies. *Molecular Ecology* **12**: 251-262.
- SCHÖNHEIT, P., MOLL, J., and THAUER, R. K. (1980) Growth parameters (K_s , μ_{max} , Y_s) of *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Archiv für Mikrobiologie* **127**: 59-65.
- SCHWIEGER, F., and TEBBE, C. C. (1998) A new approach to utilize PCR-single-strand-conformation polymorphism for 16S rRNA gene-based microbial community analysis. *Applied and Environmental Microbiology* **64**: 4870-4876.
- SEKIGUCHI, H., TOMIOKA, N., NAKAHARA, T., and UCHIYAMA, H. (2001) A single band does not always represent single bacterial strains in denaturing gradient gel electrophoresis. *Biotechnology Letters* **23**: 1205-1208.
- SENG, M., BONORDEN, S., NISSEN, J., ISSELSTEIN, J., and ABEL, H. (2008) Fermentation patterns and nutrient contents of forage-containing silages and their effects on microbial fermentation in the artificial rumen system RUSITEC. *Journal of Agricultural Science* **146**: 333-341.

- SHARP, R., ZIEMER, C. J., STERN, M. D., and STAHL, D. A. (1998) Taxon-specific associations between protozoal and methanogen populations in the rumen and model rumen system. *FEMS Microbiology Ecology* **26**: 71-78.
- SKILLMAN, L. C., EVANS, P. N., NAYLOR, G. E., MORVAN, B., JARVIS, G. N., and JOBLIN, K. N. (2004) 16S ribosomal DNA-directed PCR primers for ruminal methanogens and identification of methanogens colonising young lambs. *Anaerobe* **10**: 277-285.
- SLYTER, L. L., NELSON, W. O., and WOLIN, M. J. (1964) Modifications of a device for maintenance of the rumen microbial population in continuous culture. *Applied Microbiology* **12**: 374-377.
- SLYTER, L. L., and PUTNAM, P. A. (1967) In vivo vs. in vitro continuous culture of ruminal microbial populations *Journal of Animal Science* **26**: 1421-1427.
- SOLIVA, C. R., MEILE, L., CIESLAK, A., KREUZER, M., and MACHMÜLLER, A. (2004) Rumen simulation technique study on the interactions of dietary lauric and myristic acid supplementation in suppressing ruminal methanogenesis. *British Journal of Nutrition* **92**: 689-700.
- SPARLING, R., and DANIELS, L. (1990) Regulation of formate dehydrogenase activity in *Methanococcus thermolithotrophicus*. *Journal of Bacteriology* **172**: 1464-1469.
- STAHL, D. A., and AMANN, R. I. (1991) Development and application of nucleic acid probes. In: *Nucleic acid techniques in bacterial systematics* (eds. STACKEBRANDT, E., and GOODFELLOW, M.). John Wiley & Sons Ltd., New York.
- STEINFELD, H., GERBER, P., WASSENAAR, T., CASTEL, V., ROSALES, M., and DE HAAN, C. (2006) Livestock's long shadow. Environmental issues and options. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rom.
- STEVENSON, D. M., and WEIMER, P. J. (2007) Dominance of *Prevotella* and low abundance of classical ruminal bacterial species in the bovine rumen revealed by relative quantification real-time PCR. *Applied Microbiology and Biotechnology* **75**: 165-174.
- STEWART, C. S., and BRYANT, M. P. (1988) The rumen bacteria. In: *The rumen microbial ecosystem* (ed. HOBSON, P. N.). Elsevier Science Publications, London and New York.
- STUMM, C. K., GIJZEN, H. J., and VOGELS, G. D. (1982) Association of methanogenic bacteria with ovine rumen ciliates. *British Journal of Nutrition* **47**: 95-99.
- SUTTON, J. D. (1969) The fermentation of soluble carbohydrates in rumen contents of cows given diets containing a large proportion of flaked maize. *British Journal of Nutrition* **23**: 567-583.
- TAMMINGA, S. (1979) Protein degradation in the forestomachs of ruminants. *Journal of Animal Science* **49**: 1615-1630.

- THAUER, R. K. (1990) Energy metabolism of methanogenic bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta* **1018**: 256-259.
- THAUER, R. K., KASTER, A. K., SEEDORF, H., BUCKEL, W., and HEDDERICH, R. (2008) Methanogenic archaea: ecologically relevant differences in energy conservation. *Nature Reviews Microbiology* **6**: 579-591.
- THEATHER, R. M., and SAUER, F. D. (1988) A naturally compartmented rumen simulation system for the continuous culture of rumen bacteria and protozoa. *Journal of Dairy Science* **71**: 666-673.
- UNGERFELD, E. M., KOHN, R. A., WALLACE, R. J., and NEWBOLD, C. J. (2007) A meta-analysis of fumarate effects on methane production in ruminal batch cultures. *Journal of Animal Science* **85**: 2556-2563.
- VAN AARDENNE, J. A., DENTENER, F. J., OLIVIER, J. G. J., KLEIN GOLDEWIJK, C. G. M., and LELIEVELD, J. (2001) A high resolution dataset of historical anthropogenic trace gas emissions for the period 1890-1990. *Global Biogeochemical Cycles* **15**: 909-928.
- VDLUFA (2006) *Handbuch der Landwirtschaftlichen Versuchs- und Untersuchungsmethodik. Band III. Die chemische Untersuchung von Futtermitteln.* VDLUFA-Verlag, Darmstadt, Deutschland.
- VOGELS, G. D., HOPPE, W. F., and STUMM, C. K. (1980) Association of methanogenic bacteria with rumen ciliates. *Applied and Environmental Microbiology* **40**: 608-612.
- VOGELS, G. D., and STUMM, C. (1980) Interactions between methanogenic bacteria and hydrogenic ciliates in the rumen. *Antonie Van Leeuwenhoek* **46**: 108.
- WALLACE, R. J., WOOD, T. A., ROWE, A., PRICE, J., YANEZ, D. R., WILLIAMS, S. P., and NEWBOLD, C. J. (2006) Encapsulated fumaric acid as means of decreasing ruminal methane emissions. *International Congress Series* **1293**: 148-151.
- WEGNER, G. H., and FOSTER, E. M. (1963) Incorporation of isobutyrate and valerate into cellular plasmalogen by *Bacteroides succinogenes*. *Journal of Bacteriology* **85**: 53-61.
- WEISBURG, W. G., BARNS, S. M., PELLETIER, D. A., and LANE, D. J. (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* **173**: 697-703.
- WHITMAN, W. B., and LIU, Y. (2008) Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic archaea. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1125**: 171-189.
- WILLIAMS, A. G. (1986) Rumen holotrich ciliate protozoa. *Microbiological Reviews* **50**: 25-49.

- WOOD, E. G., HAYDOCK, A. K., and LEIGH, J. A. (2003) Function and regulation of the formate dehydrogenase genes of the methanogenic archaeon *Methanococcus maripaludis*. *Journal of Bacteriology* **185**: 2548-2554.
- WRIGHT, A. D., TOOVEY, A. F., and PIMM, C. L. (2006) Molecular identification of methanogenic archaea from sheep in Queensland, Australia reveal more uncultured novel archaea. *Anaerobe* **12**: 134-139.
- WU, Z., SADIK, M., SLEIMAN, F. T., SIMAS, J. M., PESSARAKLI, M., and HUBER, J. T. (1994) Influence of yucca extract on ruminal metabolism in cows. *Journal of Animal Science* **72**: 1038-1042.
- YOKOYAMA, M. T., and JOHNSON, K. A. (1988) Microbiology of the rumen and intestine. In: *The ruminant animal* (ed. CHURCH, D. C.). Prentice Hall, New Jersey.
- ZIEMER, C. J., SHARP, R., STERN, M. D., COTTA, M. A., WHITEHEAD, T. R., and STAHL, D. A. (2000) Comparison of microbial populations in model and natural rumens using 16S ribosomal RNA-targeted probes. *Environmental Microbiology* **2**: 632-643.

6 ANHANG

6.1 Lösungen und Puffer

Die Rezepte der angesetzten Lösungen und Puffer sind in Tabelle 6.1 aufgeführt.

Tab. 6.1: Lösungen und Puffer

RUSITEC-Versuche (Kapitel 2.2)			
0,9%-ige NaCl-Lösung		Bestandteile	
NaCl		9 g	
		ad 1000 ml Aq. bidest.	
3,7%-ige Formaldehyd-Lösung			
Formaldehyd (37%)		2 l	
		ad 20 l Aq. dest.	
Methylcellulose-Lösung			
Methylcellulose		5 g	
NaCl		45 g	
		ad 5000 ml Aq. dest.	
Methylgrün-Lösung			
Methylgrün		0,6 g	
NaCl		8 g	
Formaldehyd (37,7%)		92,8 ml	
		ad 1000 ml Aq. dest.	
RUSITEC-Pufferlösungen			
Bestandteile [mmol·l⁻¹]	Kontrolle	3,38 mmol·d⁻¹ FS	6,76 mmol·d⁻¹ FS
NaCl	28,00	28,00	28,00
KCl	7,69	7,69	7,69
HCl (1N)	0,50	0,50	0,50
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,22	0,22	0,22
MgCl ₂ · 6 H ₂ O	0,63	0,63	0,63
NH ₄ Cl	4,30	4,30	4,30
Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	10,00	10,00	10,00
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	10,00	10,00	10,00
NaHCO ₃	97,90	97,90	97,90
NH ₄ Cl (10 At.% ¹⁵ N)	0,70	0,70	0,70
Ethanol (99,8%)	0,08%	0,08%	0,08%
Fumarsäure	-	4,48	9,04
pH-Wert	7,7	7,14	6,95
Osmolarität [mosm·l ⁻¹]	303 ± 0,7	306 ± 1	309 ± 1,5

SSCP-Analyse (Kapitel 2.3)	
Agarose-Gele	Bestandteile
Für 0,8%/1%-iges Gel: Agarose	0,8 g/1 g
	ad 100 ml 1x TAE-Puffer, lösen durch Aufkochen
APS-Lösung (40%)	
APS	0,4 g
	ad 1000 µl Aq. bidest.
	steril filtrieren, aliquotieren, bei -20°C lagern
Bind Silane Lösung	
Ethanol (96%)	5 ml
Essigsäure (96%)	50 µl
PlusOne Bind Silane	50 µl
Bromphenolblau-Lösung (2,5%)	
Bromphenolblau	0,05 g
	ad 2000 µl autoklaviertes Aq. bidest.
CTAB-Lösung (10%)	
CTAB	20 g
NaCl (4 M)	35 ml (0,7 M)
	ad 200 ml Aq. bidest., ca. 5 h verrühren lassen
	autoklavieren
Entwicklerlösung	
Natriumcarbonat-Decahydrat	33,75 g
	ad 550 ml Aq. bidest., bei 4°C kalt stellen
Formaldehyd (37%)	1,2 ml
Natriumthiosulfat (0,2%)	0,6 ml
	ad 600 ml Aq. bidest.
Essigsäure (10%)	
Essigsäure (96%)	52 ml
	ad 500 ml Aq. bidest.
Ethanol (80%)	
Ethanol (99,8%)	40 ml
	ad 50 ml DNase-freies H ₂ O
Ethidiumbromid-Färbelösung	
Ethidiumbromid (0,5%)	5 Tropfen auf 500 ml 1x TAE
Lysozym-Lösung (100 mg·ml⁻¹)	
Lysozym	100 mg
	ad 1000 µl DNase-freies H ₂ O
	steril filtrieren, aliquotieren

Anhang

NaCl (4 M)	
NaCl	58,44 g
	ad 250 ml Aq. bidest., autoklavieren
Na₂EDTA-Lösung (0,5 M; pH 8,0)	
Titriplex III EDTA	37,22 g
NaOH-Plätzchen	4 g
	ad 200 ml Aq. bidest., pH einstellen, autoklavieren
Natriumthiosulfat (0,2%)	
Natriumthiosulfat	0,2 g
	ad 100 ml Aq. bidest.
	aliquotieren, bei -20°C lagern
Polyacrylamid-Gel (0,625x)	
MDE [®] -Gel Solution	7,8 ml
TBE (10x)	2,5 ml
Aqua dest.	14,7 ml
TEMED	10 µl
APS (40%)	25 µl
Proteinase K-Lösung (20 mg·ml⁻¹)	
Proteinase K	20 mg
	ad 1000 µl autoklaviertes Aq. bidest.
	steril filtrieren, aliquotieren
SDS-Lösung (20%)	
SDS	20 g
	ad 100 ml Aq. bidest.
	steril filtrieren
Silbernitrat-Färbelösung	
Silbernitrat	0,5 g
Formaldehyd (37%)	0,75 ml
	ad 500 ml Aq. bidest.
	Im Dunkeln lagern!
SSCP-Ladepuffer	
Formamid	950 µl
NaOH (1 M)	10 µl
Bromphenolblau (2,5%)	10 µl
	bei 4°C lagern
TAE-Puffer (50x)	
Trizma [®] Base	242 g
Eisessig	57,1 ml
Na ₂ EDTA-Lösung (0,5 M; pH 8,0)	100 ml
	ad 1000 ml Aq. bidest., autoklavieren
	1x TAE: 1:50 verdünnen mit Aq. bidest.

TBE-Puffer (10x)	
Trizma [®] Base	108 g (0,89 M)
Borsäure	55 g (0,89 M)
Na ₂ EDTA-Lösung (0,5 M; pH 8,0)	40 ml (20 mM)
	ad 1000 ml Aq. bidest.
	1x TBE: 1:10 verdünnen mit Aq. bidest.
TE-Puffer	
Tris-HCl (1 M; pH 8,0)	1 ml (10 mM)
Na ₂ EDTA-Lösung (0,5 M; pH 8,0)	0,2 ml (1 mM)
	ad 100 ml Aq. bidest., autoklavieren
	aliquotieren, bei -20°C lagern
TEN-Puffer (2x)	
Tris-HCl (1 M; pH 8,0)	2,5 ml (10 mM)
Na ₂ EDTA-Lösung (0,5 M; pH 8,0)	5 ml (10 mM)
NaCl (4 M)	9,375 ml (150 mM)
	ad 250 ml Aq. bidest., autoklavieren
	1xTEN:1:2 verdünnen mit Aq. bidest. autoklaviert
Tris-HCl (1 M; pH 8,0)	
Trizma [®] Base	24,22 g
HCl (32%)	8 ml
	ad 200 ml Aq. bidest., pH einstellen
	autoklavieren
Identifikation einzelner Banden aus dem SSCP-Gel (Kapitel 2.4)	
Ampicillin-Lösung (50 mg·ml⁻¹)	
Ampicillin	50 mg
	ad 1000 µl Aq. bidest.
	steril filtrieren, aliquotieren, bei -20°C lagern
Crush & Soak-Puffer	
Ammoniumacetat	3,854 g (0,5 M)
Magnesiumacetat	0,215 g (10 mM)
Na ₂ EDTA-Lösung (0,5 M; pH 8,0)	0,2 ml (1 mM)
SDS-Lösung (10%)	1 ml (0,1%)
	ad 100 ml Aq. bidest., steril filtrieren
Glycerol-Lösung (15%)	
Glycerol	15 g
	ad 100 ml Aq. bidest., autoklavieren
IPTG-Lösung (0,1 M)	
IPTG	0,238 g
	ad 10 ml Aq. bidest.
	steril filtrieren, aliquotieren, bei -20°C lagern

Anhang

LB-Agar	
LB-Agar	20 g
	ad 500 ml Aq. bidest., autoklavieren, abkühlen
	500 µl Ampicillin-Lösung zugeben (50 µg/ml)
LB-Medium	
LB-Fertigmedium	12,5 g
	ad 500 ml Aq. bidest., autoklavieren, abkühlen
	bei unter 50°C 1 ml Ampicillin-Lösung zugeben
Lysispuffer	
NaOH (1 M)	12,5 ml (0,05 M)
SDS (10%)	0,625 ml (0,025%)
	ad 250 ml Aq. bidest.
	steril filtrieren, bei 4°C lagern
SDS-Lösung (10%)	
SDS	5 g
	ad 50 ml Aq. bidest., steril filtrieren
X-Gal-Lösung	
X-Gal	80 mg
	ad 2 ml Dimethylformamid
	aliquotieren, lichtgeschützt bei -20°C lagern

6.2 Chemikalien

Der Tabelle 6.2. sind die verwendeten Chemikalien und deren Hersteller zu entnehmen.

Tab. 6.2: Chemikalien

Produkt	Hersteller
Agarose NEEO Ultra-Qualität	Roth GmbH & Co. KG, D-76185 Karlsruhe
Ameisensäure (98-100%; p.a.)	Merck KGaA, D-64271 Darmstadt
Ammoniumacetat	Sigma-Aldrich GmbH, D-89555 Steinheim
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl; 10 Atom% ¹⁵ N)	Chemotrade GmbH, D-40477 Düsseldorf
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl; p.a.)	Merck KGaA, D-64271 Darmstadt
Ampicillin	Serva GmbH, D-69115 Heidelberg
APS (Ammoniumperoxodisulfat ≥ 98%; p.a.)	Roth GmbH & Co. KG, D-76185 Karlsruhe
Borsäure	Sigma-Aldrich GmbH, D-89555 Steinheim
Bromphenolblau (Natriumsalz; reinst)	Serva GmbH, D-69115 Heidelberg
CaCl ₂ · 2 H ₂ O (Calciumchlorid-Dihydrat; p.a.)	Merck KGaA, D-64271 Darmstadt
Chloroform-Isoamylalkohol (24:1)	Sigma-Aldrich GmbH, D-89555 Steinheim
CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromid)	Roth GmbH & Co. KG, D-76185 Karlsruhe
N, N'-Dimethylformamid	Sigma-Aldrich GmbH, D-89555 Steinheim
dNTPs (pH = 7,0)	Fermentas GmbH, D-68789 St. Leon-Rot

Eisessig (100%; p.a.)	Roth GmbH & Co. KG, D-76185 Karlsruhe
Essigsäure (96%)	Roth GmbH & Co. KG, D-76185 Karlsruhe
Ethanol ($\geq 99,8\%$; p.a.)	Roth GmbH & Co. KG, D-76185 Karlsruhe
Ethanol (96%)	Roth GmbH & Co. KG, D-76185 Karlsruhe
Ethidiumbromid (0,5%)	Roth GmbH & Co. KG, D-76185 Karlsruhe
Formaldehyd (37,7%)	Sigma-Aldrich GmbH, D-89555 Steinheim
Formaldehyd (37%) für RUSITEC	AppliChem GmbH, D-64291 Darmstadt
Formamid	Sigma-Aldrich GmbH, D-89555 Steinheim
Fumarsäure (99,5%)	Roth GmbH & Co. KG, D-76185 Karlsruhe
GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder	Fermentas GmbH, D-68789 St. Leon-Rot
Glycerol (99%)	Sigma-Aldrich GmbH, D-89555 Steinheim
Titripur® HCl (Salzsäure)	Merck KGaA, D-64271 Darmstadt
HCl konzentriert (Salzsäure; 32%; reinst)	Merck KGaA, D-64271 Darmstadt
Isopropanol	Sigma-Aldrich GmbH, D-89555 Steinheim
IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid)	Fermentas GmbH, D-68789 St. Leon-Rot
KCl (Kaliumchlorid; p.a.)	Merck KGaA, D-64271 Darmstadt
LB-Agar	Roth GmbH & Co. KG, D-76185 Karlsruhe
LB-Fertigmedium	Roth GmbH & Co. KG, D-76185 Karlsruhe
Magnesiumacetat	Merck KGaA, D-64271 Darmstadt
MDE®-Gel Solution	Biozym, D- 31840 Hessisch Oldendorf
Methylcellulose	Roth GmbH & Co. KG, D-76185 Karlsruhe
Methylgrün	Sigma-Aldrich GmbH, D-89555 Steinheim
MgCl ₂ · 6 H ₂ O (Magnesiumchlorid-Hexahydrat; p.a.)	Merck KGaA, D-64271 Darmstadt
NaCl (p.a.)	Merck KGaA, D-64271 Darmstadt
Na ₂ CO ₃ · 10 H ₂ O (Natriumcarbonat-Decahydrat; 99%; p.a.)	Roth GmbH & Co. KG, D-76185 Karlsruhe
Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O (Dinatriumhydrogenphosphat-Dodecahydrat; krist. reinst)	Merck KGaA, D-64271 Darmstadt
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O (Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat; p.a.)	Merck KGaA, D-64271 Darmstadt
NaHCO ₃ (Natriumhydrogencarbonat; p.a.)	Merck KGaA, D-64271 Darmstadt
NaOH (Natriumhydroxid; 1 M)	AppliChem GmbH, D-64291 Darmstadt
NaOH-Plätzchen	Sigma-Aldrich GmbH, D-89555 Steinheim
Natriumthiosulfat (Na ₂ S ₂ O ₃ · 5 H ₂ O; 99,5%; p.a.)	Roth GmbH & Co. KG, D-76185 Karlsruhe
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1)	Roth GmbH & Co. KG, D-76185 Karlsruhe
PlusOne Bind Silane	Amersham Biosciences GmbH, D-79111
PlusOne Repel Silane	Amersham Biosciences GmbH, D-79111
SDS (Natriumsalz)	Serva GmbH, D-69115 Heidelberg
Silbernitrat	Roth GmbH & Co. KG, D-76185 Karlsruhe
SOC-Medium	Invitrogen GmbH, D-64293 Darmstadt
TEMED (N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin)	Sigma-Aldrich GmbH, D-89555 Steinheim
Titriplex III EDTA Dinatriumsalz-Dihydrat (p.a.)	Merck KGaA, D-64271 Darmstadt
Trizma® Base (99,9%)	Sigma-Aldrich GmbH, D-89555 Steinheim

Anhang

X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid)	Fermentas GmbH, D-68789, St. Leon-Rot
Marker	
100 bp DNA Ladder	New England Biolabs GmbH, D-65926 Frankfurt
GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder	Fermentas GmbH, D-68789 St. Leon-Rot
MassRuler™ DNA Ladder Mix	Fermentas GmbH, D-68789 St. Leon-Rot
λ -Hind III Marker	Fermentas GmbH, D-68789 St. Leon-Rot
Enzyme und zugehörige Puffer	
Lysozym	Serva GmbH, D-69115 Heidelberg
Proteinase K	Sigma-Aldrich GmbH, D-89555 Steinheim
RNase A (10 mg/ml)	Fermentas GmbH, D-68789 St. Leon-Rot
HotStarTaq DNA Polymerase (5 U/ μ l)	Qiagen GmbH, D-40724 Hilden
PCR Puffer (10x)	Qiagen GmbH, D-40724 Hilden
λ -Exonuclease (5000 U/ml)	New England Biolabs GmbH, D-65926
λ -Exonuclease-Puffer (10x)	New England Biolabs GmbH, D-65926
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, D-40724 Hilden
MinElute PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, D-40724 Hilden
PureYield™ Plasmid Miniprep System	Promega Corporation, Madison WI, USA
pGEM®-T Vector System II	Promega Corporation, Madison WI, USA

6.3 Rohdaten der RUSITEC-Versuche

Tab. 6.3: pH-Werte in V1-V4.

Phase	Tag	Kontrolle					3,38 mmol-d ⁻¹ FS					6,76 mmol-d ⁻¹ FS				
		A	F	I	J	\bar{x}	B	E	H	K	\bar{x}	C	D	G	L	\bar{x}
Äquibrierung	0	6,99	6,99	6,99	6,99	6,99	6,99	6,99	6,99	6,99	6,99	6,99	6,99	6,99	6,99	6,99
	1	6,77	6,66	6,78	6,78	6,75	6,75	6,75	6,74	6,76	6,75	6,71	6,70	6,72	6,76	6,72
	2	6,72	6,70	6,72	6,70	6,71	6,64	6,68	6,67	6,70	6,67	6,59	6,63	6,64	6,66	6,63
	3	6,68	6,66	6,72	6,72	6,70	6,71	6,67	6,67	6,69	6,69	6,64	6,62	6,66	6,66	6,65
	4	6,76	6,71	6,69	6,76	6,73	6,70	6,66	6,69	6,71	6,69	6,64	6,61	6,65	6,64	6,64
	5	6,75	6,70	6,70	6,70	6,71	6,68	6,69	6,68	6,70	6,69	6,68	6,65	6,66	6,61	6,65
Versuch	6	6,68	6,67	6,68	6,68	6,68	6,69	6,68	6,68	6,64	6,67	6,62	6,65	6,61	6,59	6,62
	7	6,71	6,73	6,74	6,73	6,73	6,70	6,69	6,76	6,69	6,71	6,61	6,67	6,63	6,60	6,63
	8	6,74	6,73	6,72	6,72	6,73	6,71	6,69	6,71	6,68	6,70	6,67	6,64	6,65	6,62	6,65
	9	6,75	6,70	6,70	6,72	6,72	6,66	6,69	6,67	6,67	6,67	6,64	6,62	6,61	6,61	6,62
	10	6,72	6,70	6,75	6,74	6,73	6,69	6,70	6,67	6,68	6,69	6,63	6,61	6,63	6,62	6,62
	11	6,71	6,70	6,75	6,76	6,73	6,68	6,68	6,66	6,68	6,68	6,63	6,61	6,65	6,64	6,63
	12	6,71	6,71	6,73	6,76	6,73	6,68	6,68	6,68	6,68	6,68	6,63	6,63	6,65	6,67	6,65
	13	6,71	6,70	6,72	6,74	6,72	6,67	6,72	6,67	6,69	6,69	6,65	6,63	6,61	6,65	6,64
	14	6,69	6,72	6,71	6,73	6,71	6,68	6,70	6,66	6,66	6,68	6,64	6,61	6,58	6,62	6,61
Phase	Tag	V2														
Äquibrierung	0	6,76	6,76	6,76	6,76	6,76	6,76	6,76	6,76	6,76	6,76	6,76	6,76	6,76	6,76	6,76
	1	6,70	6,72	6,74	6,71	6,72	6,68	6,70	6,69	6,71	6,70	6,63	6,61	6,60	6,61	6,61
	2	6,69	6,72	6,73	6,72	6,72	6,69	6,69	6,66	6,71	6,69	6,65	6,61	6,61	6,62	6,62
	3	6,68	6,71	6,72	6,71	6,71	6,68	6,67	6,67	6,69	6,68	6,63	6,60	6,62	6,61	6,62
	4	6,70	6,70	6,72	6,73	6,71	6,70	6,67	6,66	6,67	6,68	6,65	6,62	6,60	6,60	6,62
	5	6,71	6,71	6,71	6,75	6,72	6,68	6,69	6,69	6,68	6,69	6,62	6,61	6,59	6,65	6,62
Versuch	6	6,72	6,71	6,70	6,72	6,71	6,69	6,67	6,69	6,70	6,69	6,62	6,61	6,63	6,61	6,62
	7	6,70	6,72	6,73	6,75	6,73	6,69	6,68	6,67	6,70	6,69	6,64	6,62	6,64	6,64	6,64
	8	6,70	6,72	6,72	6,73	6,72	6,68	6,67	6,68	6,69	6,68	6,63	6,61	6,62	6,61	6,62
	9	6,71	6,73	6,74	6,73	6,73	6,68	6,68	6,68	6,68	6,68	6,65	6,62	6,60	6,62	6,62
	10	6,72	6,69	6,72	6,72	6,71	6,69	6,67	6,69	6,67	6,68	6,64	6,63	6,63	6,61	6,63
	11	6,69	6,69	6,69	6,69	6,69	6,68	6,68	6,66	6,72	6,69	6,63	6,61	6,59	6,61	6,61
	12	6,69	6,69	6,69	6,70	6,69	6,70	6,65	6,67	6,70	6,68	6,65	6,60	6,63	6,63	6,63
	13	6,70	6,76	6,70	6,72	6,72	6,70	6,65	6,66	6,69	6,68	6,60	6,61	6,61	6,65	6,62
	14	6,69	6,73	6,70	6,71	6,71	6,68	6,67	6,66	6,70	6,68	6,62	6,62	6,60	6,66	6,63
Phase	Tag	V3														
Äquibrierung	0	6,88	6,88	6,88	6,88	6,88	6,88	6,88	6,88	6,88	6,88	6,88	6,88	6,88	6,88	6,88
	1	6,73	6,73	6,74	6,73	6,73	6,71	6,69	6,67	6,70	6,69	6,66	6,65	6,67	6,66	6,66
	2	6,66	6,72	6,71	6,72	6,70	6,68	6,61	6,66	6,67	6,66	6,64	6,62	6,65	6,63	6,64
	3	6,68	6,70	6,70	6,70	6,70	6,64	6,60	6,68	6,67	6,65	6,62	6,62	6,59	6,63	6,62
	4	6,73	6,72	6,72	6,72	6,72	6,69	6,64	6,68	6,68	6,67	6,63	6,64	6,60	6,61	6,62
	5	6,74	6,72	6,75	6,71	6,73	6,68	6,66	6,68	6,68	6,68	6,60	6,66	6,66	6,62	6,64
Versuch	6	6,73	6,76	6,74	6,74	6,74	6,69	6,67	6,69	6,69	6,69	6,56	6,67	6,64	6,66	6,63
	7	6,71	6,74	6,75	6,71	6,73	6,68	6,67	6,70	6,70	6,69	6,56	6,65	6,62	6,67	6,63
	8	6,72	6,72	6,77	6,73	6,74	6,69	6,68	6,70	6,69	6,69	6,63	6,65	6,65	6,66	6,65
	9	6,73	6,74	6,77	6,71	6,74	6,71	6,68	6,69	6,70	6,70	6,63	6,67	6,63	6,64	6,64
	10	6,73	6,77	6,75	6,74	6,75	6,71	6,68	6,70	6,68	6,69	6,67	6,70	6,67	6,67	6,68
	11	6,74	6,76	6,74	6,74	6,75	6,68	6,69	6,70	6,67	6,69	6,66	6,68	6,67	6,66	6,67
	12	6,71	6,71	6,77	6,77	6,74	6,70	6,70	6,69	6,68	6,69	6,63	6,65	6,67	6,66	6,65
	13	6,74	6,70	6,78	6,76	6,75	6,70	6,70	6,70	6,68	6,70	6,65	6,62	6,65	6,66	6,65
	14	6,69	6,73	6,71	6,72	6,71	6,70	6,69	6,69	6,68	6,69	6,64	6,64	6,64	6,66	6,65
Phase	Tag	V4														
Äquibrierung	0	6,64	6,64	6,64	6,64	6,64	6,64	6,64	6,64	6,64	6,64	6,64	6,64	6,64	6,64	6,64
	1	6,59	6,62	6,68	6,67	6,64	6,57	6,60	6,63	6,62	6,61	6,57	6,56	5,89	6,59	6,40
	2	6,64	6,61	6,67	6,67	6,65	6,64	6,64	6,59	6,64	6,63	6,58	6,63	6,54	6,59	6,59
	3	6,68	6,64	6,70	6,73	6,69	6,67	6,61	6,60	6,69	6,64	6,59	6,63	6,60	6,63	6,61
	4	6,60	6,65	6,65	6,71	6,65	6,60	6,58	6,59	6,65	6,61	6,64	6,56	6,57	6,64	6,60
	5	6,64	6,69	6,68	6,69	6,68	6,68	6,62	6,60	6,65	6,64	6,59	6,58	6,62	6,59	6,60
Versuch	6	6,70	6,65	6,64	6,68	6,67	6,63	6,62	6,67	6,62	6,64	6,60	6,61	6,59	6,62	6,61
	7	6,68	6,65	6,67	6,66	6,67	6,64	6,61	6,65	6,63	6,63	6,57	6,61	6,59	6,61	6,60
	8	6,66	6,67	6,71	6,70	6,69	6,57	6,61	6,65	6,63	6,62	6,53	6,60	6,59	6,59	6,58
	9	6,67	6,71	6,73	6,73	6,71	6,59	6,64	6,61	6,67	6,63	6,54	6,63	6,61	6,60	6,60
	10	6,65	6,71	6,69	6,69	6,69	6,63	6,68	6,62	6,65	6,65	6,55	6,64	6,59	6,59	6,59
	11	6,67	6,66	6,69	6,70	6,68	6,61	6,64	6,65	6,69	6,65	6,50	6,62	6,65	6,64	6,60
	12	6,67	6,69	6,73	6,68	6,69	6,60	6,62	6,65	6,68	6,64	6,56	6,60	6,66	6,65	6,62
	13	6,70	6,70	6,72	6,69	6,70	6,66	6,64	6,67	6,64	6,65	6,60	6,67	6,61	6,65	6,63
	14	6,65	6,67	6,69	6,74	6,69	6,66	6,64	6,68	6,68	6,67	6,60	6,64	6,64	6,66	6,64

Tab. 6.4: Redoxpotential [mV] in V1-V4.

Phase	Tag	Kontrolle					3,38 mmol·d ⁻¹ FS					6,76 mmol·d ⁻¹ FS				
		A	F	I	J	\bar{x}	B	E	H	K	\bar{x}	C	D	G	L	\bar{x}
Äquibrierung	0	-130	-130	-130	-130	-130	-130	-130	-130	-130	-130	-130	-130	-130	-130	-130
	1	-142	-118	-195	-189	-161	-122	-156	-160	-191	-157	-138	-130	-152	-182	-151
	2	-160	-125	-212	-207	-176	-167	-183	-190	-208	-187	-179	-164	-173	-200	-179
	3	-135	-145	-210	-212	-176	-185	-199	-200	-189	-193	-155	-210	-222	-193	-195
	4	-142	-152	-212	-215	-180	-195	-193	-205	-236	-207	-191	-180	-188	-214	-193
	5	-148	-200	-191	-177	-179	-166	-208	-187	-192	-188	-189	-204	-163	-192	-187
	6	-134	-167	-212	-212	-181	-171	-182	-224	-231	-202	-166	-183	-193	-216	-190
Versuch	7	-130	-175	-185	-180	-168	-169	-170	-170	-200	-177	-211	-210	-145	-208	-194
	8	-193	-186	-190	-190	-190	-181	-222	-199	-212	-204	-209	-192	-186	-200	-197
	9	-145	-162	-198	-196	-175	-180	-220	-191	-192	-196	-150	-190	-155	-211	-177
	10	-143	-175	-187	-207	-178	-176	-206	-187	-190	-190	-160	-198	-200	-200	-190
	11	-162	-166	-206	-202	-184	-165	-207	-197	-210	-195	-166	-178	-191	-190	-181
	12	-158	-169	-230	-230	-197	-156	-173	-224	-212	-191	-185	-205	-206	-196	-198
	13	-170	-181	-202	-202	-189	-170	-165	-204	-212	-188	-162	-150	-214	-200	-182
	14	-160	-142	-213	-194	-177	-177	-122	-177	-194	-168	-167	-165	-125	-212	-167
Phase	Tag	V2														
Äquibrierung	0	-100	-100	-100	-100	-100	-100	-100	-100	-100	-100	-100	-100	-100	-100	-100
	1	-144	-149	-161	-174	-157	-136	-154	-162	-170	-156	-127	-155	-162	-165	-152
	2	-164	-166	-178	-195	-176	-154	-165	-180	-191	-173	-143	-170	-183	-184	-170
	3	-190	-195	-218	-234	-209	-181	-205	-218	-229	-208	-167	-203	-222	-218	-203
	4	-204	-210	-226	-240	-220	-188	-221	-231	-231	-218	-175	-216	-230	-223	-211
	5	-202	-204	-220	-234	-215	-185	-213	-226	-223	-212	-170	-215	-225	-221	-208
	6	-200	-208	-225	-229	-216	-186	-218	-223	-228	-214	-170	-216	-222	-217	-206
Versuch	7	-208	-223	-223	-228	-221	-188	-220	-222	-225	-214	-172	-218	-223	-218	-208
	8	-201	-203	-215	-225	-211	-188	-206	-211	-214	-205	-170	-217	-216	-209	-203
	9	-220	-209	-212	-223	-216	-184	-210	-207	-218	-205	-171	-209	-218	-214	-203
	10	-202	-212	-218	-222	-214	-186	-211	-216	-221	-209	-174	-214	-218	-215	-205
	11	-193	-196	-207	-224	-205	-186	-197	-208	-215	-202	-170	-201	-218	-211	-200
	12	-190	-197	-209	-223	-205	-180	-199	-218	-218	-204	-170	-203	-202	-207	-196
	13	-193	-199	-210	-225	-207	-181	-201	-215	-223	-205	-172	-204	-212	-213	-200
	14	-191	-198	-218	-238	-211	-183	-198	-222	-232	-209	-171	-206	-222	-220	-205
Phase	Tag	V3														
Äquibrierung	0	-284	-284	-284	-284	-284	-284	-284	-284	-284	-284	-284	-284	-284	-284	-284
	1	-296	-306	-309	-307	-305	-279	-300	-301	-300	-295	-303	-300	-300	-299	-301
	2	-301	-309	-308	-309	-307	-281	-305	-302	-304	-298	-301	-301	-298	-305	-301
	3	-301	-310	-307	-307	-306	-284	-306	-303	-305	-300	-300	-299	-300	-305	-301
	4	-300	-307	-307	-306	-305	-285	-303	-301	-302	-298	-302	-303	-300	-301	-302
	5	-300	-306	-304	-303	-303	-281	-303	-298	-301	-296	-295	-300	-300	-300	-299
	6	-305	-310	-310	-312	-309	-283	-309	-300	-304	-299	-296	-302	-303	-307	-302
Versuch	7	-305	-309	-309	-310	-308	-280	-306	-300	-304	-298	-298	-300	-302	-306	-302
	8	-292	-306	-306	-307	-303	-280	-304	-298	-304	-297	-298	-300	-297	-305	-300
	9	-296	-306	-306	-306	-304	-280	-304	-302	-307	-298	-298	-300	-301	-306	-301
	10	-294	-308	-306	-311	-305	-279	-302	-306	-307	-299	-294	-297	-300	-306	-299
	11	-305	-316	-311	-315	-312	-280	-306	-306	-308	-300	-306	-302	-304	-311	-306
	12	-305	-315	-315	-315	-313	-284	-313	-307	-311	-304	-305	-307	-310	-311	-308
	13	-300	-315	-310	-316	-310	-281	-310	-305	-309	-301	-305	-304	-307	-311	-307
	14	-306	-310	-313	-314	-311	-292	-312	-305	-309	-305	-307	-307	-307	-307	-307
Phase	Tag	V4														
Äquibrierung	0	-315	-315	-315	-315	-315	-315	-315	-315	-315	-315	-315	-315	-315	-315	-315
	1	-293	-286	-278	-276	-283	-290	-280	-273	-276	-280	-282	-281	-240	-275	-270
	2	-255	-282	-278	-277	-273	-265	-277	-269	-270	-270	-271	-263	-262	-260	-264
	3	-252	-280	-285	-275	-273	-270	-274	-273	-271	-272	-277	-266	-265	-270	-270
	4	-247	-270	-267	-268	-263	-258	-267	-261	-266	-263	-260	-260	-256	-264	-260
	5	-247	-265	-254	-254	-255	-242	-250	-240	-254	-247	-245	-250	-250	-252	-249
	6	-230	-265	-250	-252	-249	-260	-260	-248	-251	-255	-250	-250	-252	-250	-251
Versuch	7	-230	-259	-250	-252	-248	-252	-260	-248	-243	-251	-250	-250	-245	-250	-249
	8	-240	-260	-253	-250	-251	-250	-254	-245	-251	-250	-252	-255	-246	-251	-251
	9	-230	-266	-260	-260	-254	-246	-256	-256	-256	-254	-253	-257	-252	-248	-253
	10	-234	-266	-266	-260	-257	-253	-260	-256	-259	-257	-260	-252	-255	-250	-254
	11	-240	-267	-264	-266	-259	-255	-263	-255	-256	-257	-255	-257	-250	-259	-255
	12	-234	-270	-258	-263	-256	-255	-266	-260	-260	-260	-257	-260	-256	-253	-257
	13	-238	-268	-261	-265	-258	-260	-266	-254	-262	-261	-259	-260	-254	-253	-257
	14	-235	-269	-263	-264	-258	-260	-266	-262	-263	-263	-263	-264	-264	-259	-263

Tab. 6.5: Überläufe [ml] in V1-V4.

Phase	Tag	Kontrolle					3,38 mmol·d ⁻¹ FS					6,76 mmol·d ⁻¹ FS				
		A	F	I	J	\bar{x}	B	E	H	K	\bar{x}	C	D	G	L	\bar{x}
Äquilibration	1	715	650	793	740	725	715	710	720	740	721	730	695	790	800	762
	2	760	760	795	760	769	750	730	775	765	755	790	750	820	735	768
	3	765	750	755	740	753	755	775	730	745	751	790	765	790	790	782
	4	770	720	710	735	734	745	755	740	735	744	765	755	800	790	782
	5	780	760	790	770	775	785	800	770	765	780	845	795	810	795	800
	6	750	750	720	695	729	740	760	720	700	730	770	765	685	725	725
Versuch	7	770	755	760	740	756	775	790	750	750	766	820	770	800	780	793
	8	750	735	725	715	731	760	755	710	725	738	780	750	725	745	750
	9	760	740	720	720	735	765	755	720	700	735	795	755	730	745	756
	10	750	745	730	715	735	765	775	715	720	744	775	745	730	755	751
	11	755	765	735	710	741	740	770	745	730	746	780	775	750	755	765
	12	755	750	740	735	745	760	770	750	750	758	805	755	755	760	769
	13	755	750	740	785	758	755	770	745	715	746	770	760	740	745	754
	14	770	735	720	705	733	750	750	725	715	735	740	755	735	700	733
Phase	Tag	V2														
Äquilibration	1	640	740	630	745	689	680	665	655	730	683	650	680	660	700	673
	2	705	735	710	755	726	730	715	730	750	731	735	735	720	735	731
	3	750	780	735	700	741	780	730	725	730	741	770	765	725	735	749
	4	570	590	370	700	558	565	560	720	755	650	575	595	740	735	661
	5	730	750	440	720	660	770	720	715	735	735	730	750	730	725	734
	6	755	760	740	800	764	770	755	755	775	764	730	770	640	730	718
Versuch	7	730	750	720	800	750	760	650	750	770	733	725	755	625	730	709
	8	750	770	740	800	765	765	750	765	775	764	730	765	690	730	729
	9	735	790	645	790	740	780	765	790	770	776	750	760	725	740	744
	10	745	780	715	710	738	765	750	740	740	749	740	740	705	700	721
	11	765	795	740	775	769	780	770	745	775	768	745	735	740	750	743
	12	760	800	740	790	773	805	755	745	765	768	760	740	750	765	754
	13	755	790	750	805	775	780	755	750	770	764	760	740	765	740	751
	14	750	785	720	730	746	800	755	730	760	761	755	740	735	750	745
Phase	Tag	V3														
Äquilibration	1	690	670	690	685	684	625	620	685	680	653	660	720	680	680	685
	2	720	720	700	685	706	695	630	700	685	678	705	735	715	670	706
	3	775	740	735	700	738	710	645	720	715	698	730	785	740	685	735
	4	770	720	740	720	738	720	655	730	705	703	720	755	740	690	726
	5	750	745	750	730	744	740	660	730	720	713	730	790	750	705	744
	6	755	700	735	680	718	715	690	650	705	690	740	775	735	765	754
Versuch	7	760	720	780	690	738	730	720	740	700	723	650	815	740	780	746
	8	765	730	790	730	754	705	710	720	665	700	740	760	755	750	751
	9	765	725	760	735	746	710	685	710	665	693	690	700	730	730	713
	10	750	710	770	745	744	710	685	675	650	680	670	745	750	760	731
	11	735	730	755	715	734	735	690	630	660	679	705	525	710	775	679
	12	651	650	795	710	702	710	700	655	705	693	700	725	730	730	721
	13	735	720	770	685	728	700	740	630	715	696	665	660	735	750	703
	14	710	750	760	650	718	760	690	650	710	703	700	720	685	770	719
Phase	Tag	V4														
Äquilibration	1	500	525	650	675	588	580	550	650	685	616	570	580	735	575	630
	2	630	575	710	715	658	630	645	690	715	670	615	625	770	650	682
	3	750	690	765	790	749	720	740	750	775	746	725	740	780	725	748
	4	755	700	770	790	754	735	750	760	785	758	750	745	780	730	752
	5	740	710	760	760	743	745	755	745	760	751	745	760	750	690	733
	6	720	700	740	745	726	710	740	685	750	721	750	765	685	725	725
Versuch	7	725	720	755	735	734	735	750	705	770	740	730	780	765	750	756
	8	720	710	755	750	734	725	775	695	810	751	730	760	795	710	749
	9	725	700	745	750	730	735	760	720	765	745	725	750	730	725	733
	10	730	710	740	710	723	750	740	765	760	754	750	785	755	730	755
	11	700	665	730	710	701	745	710	725	775	739	720	760	800	670	738
	12	690	700	750	730	718	760	720	715	780	744	745	745	755	750	749
	13	700	705	750	735	723	780	700	725	730	734	750	750	785	735	755
	14	700	690	745	735	718	755	680	705	760	725	745	750	765	735	749

Tab. 6.6: Produktion der gesamten SCFA [mmol·d⁻¹] in V1-V4.

Phase	Tag	Kontrolle					3,38 mmol·d ⁻¹ FS					6,76 mmol·d ⁻¹ FS				
		A	F	I	J	\bar{x}	B	E	H	K	\bar{x}	C	D	G	L	\bar{x}
Versuch	7	41,2	36,7	41,8	36,4	39,0	41,5	38,2	36,0	39,4	38,8	50,8	40,3	44,6	47,5	45,8
	8	41,3	36,3	40,3	37,4	38,8	37,7	35,3	37,9	40,8	37,9	43,5	43,0	46,9	46,2	44,9
	9	38,5	35,9	36,7	36,7	37,0	43,1	34,8	39,7	36,8	38,6	47,8	42,0	42,6	43,3	43,9
	10	39,6	41,0	39,2	37,7	39,4	41,2	40,8	42,3	42,3	41,6	45,5	45,6	46,4	48,7	46,5
	11	41,1	36,5	37,4	35,0	37,5	41,8	39,3	41,8	40,0	40,7	43,8	39,3	41,6	43,5	42,0
	12	41,8	38,2	37,0	37,6	38,6	42,8	41,2	43,3	38,4	41,4	48,2	40,5	45,3	45,0	44,7
	13	39,8	37,4	37,2	40,1	38,6	43,6	36,9	41,6	37,0	39,8	42,9	45,0	45,9	46,4	45,1
	14	40,4	34,7	38,6	37,2	37,7	39,8	35,3	41,4	42,3	39,7	38,7	44,3	49,7	46,0	44,7
Phase	Tag	V2														
Versuch	7	38,5	35,9	40,7	38,6	38,4	45,1	34,4	39,8	42,8	40,5	48,4	41,1	38,0	44,8	43,1
	8	42,6	39,1	43,6	36,4	40,4	43,3	39,2	42,2	48,7	43,4	48,6	43,6	41,6	48,9	45,7
	9	42,5	40,8	36,3	39,4	39,8	45,1	38,4	45,4	43,9	43,2	45,5	42,5	42,6	46,5	44,3
	10	40,1	39,4	33,4	35,6	37,1	38,0	39,0	36,8	40,1	38,5	43,4	39,9	38,3	43,2	41,2
	11	42,2	42,4	35,4	35,2	38,8	38,0	36,8	37,5	37,5	37,5	47,5	41,7	41,6	47,7	44,6
	12	41,8	40,7	38,3	40,1	40,2	43,4	39,5	36,9	44,0	41,0	48,1	43,3	48,9	46,9	46,8
	13	39,2	36,1	37,0	41,2	38,4	40,7	45,0	38,2	42,4	41,6	50,6	44,9	47,7	47,0	47,6
	14	38,6	35,7	38,2	37,5	37,5	43,3	47,4	37,0	40,9	42,1	49,4	45,1	43,0	45,8	45,8
Phase	Tag	V3														
Versuch	7	39,3	37,2	37,3	35,0	37,2	46,3	41,1		36,8	41,4	42,1	48,3	46,7	41,5	44,6
	8	39,9	38,6	37,7	37,1	38,3	43,2	39,2	37,5	36,1	39,0	46,4	44,5	46,0	39,9	44,2
	9	37,5	37,7	34,6	37,5	36,8	39,7	39,9	37,7	35,7	38,3	43,1	39,6	44,0	39,5	41,6
	10	38,5	33,8	36,7	37,9	36,7	39,5	41,3	37,3	36,4	38,6	39,5	43,0	43,9	42,6	42,3
	11	39,4	33,4	36,7	38,3	36,9	40,0	39,4	36,2	36,4	38,0	39,4	42,9	39,2	39,8	40,3
	12	34,3	36,1	36,8	32,4	34,9	39,8	37,9	40,8	40,9	39,8	40,3	46,0	43,0	38,3	41,9
	13	37,1	40,8	31,9	31,2	35,3	38,5	39,0	37,8	38,4	38,4	40,8	44,0	43,2	40,1	42,0
	14	34,8	43,0	36,2	29,5	35,9	41,7	35,6	35,8	37,7	37,7	39,4	45,8	39,8	41,1	41,5
Phase	Tag	V4														
Versuch	7	37,5	41,4	37,7	35,0	37,9	42,5	41,0	39,9	41,6	41,2	44,8	45,7	47,7	42,3	45,1
	8	40,7	40,4	34,8	35,7	37,9	47,3	46,5	39,8	42,2	43,9	49,1	49,0	49,4	40,5	47,0
	9	38,5	32,6	33,2	32,9	34,3	46,4	42,0	42,1	39,2	42,4	48,4	46,3	39,8	46,1	45,1
	10	41,3	35,5	36,1		37,6	47,1	37,7	44,7	36,4	41,5	46,1	46,2	42,7	43,2	44,6
	11	37,6	35,4	36,2	31,8	35,3	44,6	36,5	38,5	36,2	38,9	47,8	44,6	43,1	35,2	42,7
	12	39,6	33,6	33,4	36,0	35,6	46,6	39,1	37,6	37,5	40,2	48,8	40,0	37,6	40,2	41,7
	13	35,9	37,9	36,0	37,3	36,8	40,6	38,2	37,5	39,5	39,0	46,0	38,5	42,3	40,4	41,8
	14	41,5	36,6	40,0	34,9	38,3	40,2	35,6	37,3	40,1	38,3	45,5	44,7	40,9	42,7	43,5

Tab. 6.7: Produktion des Acetats [$\text{mmol}\cdot\text{d}^{-1}$] in V1-V4.

Phase	Tag	Kontrolle					3,38 $\text{mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ FS					6,76 $\text{mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ FS				
		A	F	I	J	\bar{x}	B	E	H	K	\bar{x}	C	D	G	L	\bar{x}
Versuch	7	20,9	20,3	23,5	20,5	21,3	21,7	19,9	18,8	20,6	20,2	23,3	19,8	22,1	23,6	22,2
	8	20,9	20,5	22,7	21,4	21,4	19,3	18,7	19,7	21,6	19,8	21,9	21,6	22,8	23,8	22,5
	9	20,8	20,1	20,3	20,5	20,4	22,6	18,5	20,2	19,3	20,2	22,8	19,4	21,8	22,3	21,6
	10	20,9	23,4	21,8	21,6	21,9	21,8	22,2	22,4	22,7	22,3	23,6	23,6	24,0	25,4	24,1
	11	21,6	21,1	20,8	19,5	20,7	22,4	21,4	21,8	21,4	21,8	22,8	20,6	21,3	22,5	21,8
	12	22,3	22,4	20,3	21,0	21,5	22,4	22,9	23,1	21,0	22,4	25,8	21,2	23,3	23,7	23,5
	13	20,8	21,5	19,9	21,8	21,0	23,3	20,3	21,7	19,4	21,2	22,8	22,6	23,0	22,4	22,7
	14	21,0	20,3	21,3	20,8	20,8	20,6	19,6	22,2	22,3	21,2	19,9	23,0	25,5	22,9	22,8
Phase	Tag	V2														
Versuch	7	C	D	G	L	\bar{x}	B	E	H	K	\bar{x}	A	F	I	J	\bar{x}
	8	20,4	19,9	22,1	21,4	20,9	22,8	18,3	20,8	21,5	20,8	22,3	20,0	19,1	23,1	21,1
	9	22,9	21,5	24,0	20,7	22,3	21,5	20,8	22,6	24,8	22,4	22,9	22,2	21,4	22,7	22,3
	10	22,6	21,0	20,4	21,9	21,5	22,8	20,8	24,7	23,7	23,0	22,2	21,8	21,6	21,2	21,7
	11	22,5	21,3	19,2	20,1	20,8	19,7	20,8	20,0	21,5	20,5	21,5	20,3	19,3	19,6	20,2
	12	21,7	21,4	19,5	19,4	20,5	18,8	19,3	19,6	19,6	19,3	21,8	20,8	20,5	22,1	21,3
	13	22,8	21,2	20,3	21,7	21,5	20,6	20,3	19,3	21,4	20,4	21,9	21,3	23,8	22,2	22,3
	14	21,4	19,4	19,7	22,4	20,7	19,2	22,0	19,7	20,5	20,3	23,1	22,1	23,4	22,0	22,7
Phase	Tag	V3														
Versuch	7	B	E	H	K	\bar{x}	A	F	I	J	\bar{x}	C	D	G	L	\bar{x}
	8	19,9	18,9	20,4	19,2	19,6	22,0	20,7		19,4	20,7	19,6	22,8	22,2	20,9	21,4
	9	20,7	21,0	20,5	20,5	20,7	21,0	19,8	19,1	18,9	19,7	21,8	21,8	22,1	19,9	21,4
	10	19,0	19,7	18,9	20,9	19,6	19,6	20,4	19,4	18,8	19,5	20,5	19,6	21,1	20,0	20,3
	11	19,3	18,5	19,7	21,1	19,7	19,8	21,4	19,5	19,1	20,0	19,3	21,0	21,2	21,5	20,7
	12	19,4	17,8	19,5	20,6	19,3	20,7	20,5	19,4	19,3	20,0	19,1	21,1	20,1	20,4	20,2
	13	17,4	19,0	20,5	18,4	18,8	20,0	19,5	21,1	21,4	20,5	20,1	22,8	21,4	19,7	21,0
	14	18,8	21,3	18,1	16,9	18,8	19,1	20,2	20,2	20,3	19,9	19,6	21,5	19,9	20,5	20,4
Phase	Tag	V4														
Versuch	7	A	F	I	J	\bar{x}	B	E	H	K	\bar{x}	C	D	G	L	\bar{x}
	8	18,4	20,0	19,4	17,2	18,8	19,6	19,8	17,5	18,6	18,8	18,8	20,3	19,7	17,1	19,0
	9	21,0	19,2	18,2	18,0	19,1	23,0	21,5	18,3	19,6	20,6	21,1	21,7	20,5	17,8	20,3
	10	19,7	16,6	17,3	16,9	17,6	22,6	20,4	19,2	18,1	20,1	21,5	19,6	17,9	20,7	19,9
	11	21,3	17,5	19,1		19,3	23,0	18,1	20,5	16,8	19,6	20,6	20,7	19,5	19,7	20,1
	12	19,3	16,7	17,7	15,9	17,4	20,2	17,7	17,0	16,6	17,9	21,8	20,1	19,3	15,9	19,3
	13	20,2	16,3	15,4	17,4	17,3	23,2	19,0	17,4	17,4	19,3	22,7	18,8	16,6	17,3	18,9
	14	18,5	17,7	16,4	18,0	17,6	19,5	18,8	17,6	18,2	18,5	21,1	18,0	18,5	16,8	18,6
Phase	Tag	V4														
Versuch	7	A	F	I	J	\bar{x}	B	E	H	K	\bar{x}	C	D	G	L	\bar{x}
	8	21,3	17,9	18,9	17,2	18,8	18,9	17,5	17,7	18,7	18,2	20,2	19,3	18,2	17,5	18,8

Tab. 6.8: Produktion des Propionats [$\text{mmol}\cdot\text{d}^{-1}$] in V1-V4.

Phase	Tag	Kontrolle					3,38 $\text{mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ FS					6,76 $\text{mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ FS				
		A	F	I	J	\bar{x}	B	E	H	K	\bar{x}	C	D	G	L	\bar{x}
Versuch	7	10,8	7,9	9,4	7,4	8,9	10,3	9,4	8,3	10,0	9,5	17,6	11,7	13,1	14,2	14,2
	8	11,4	7,6	8,8	7,7	8,9	9,7	8,0	9,4	9,3	12,7	12,5	13,8	13,0	13,0	
	9	9,5	8,0	8,0	7,5	8,3	11,1	8,1	10,6	9,2	9,7	15,3	13,1	12,8	12,5	13,4
	10	10,8	9,6	8,0	7,6	9,0	10,4	10,0	10,7	10,3	10,3	13,2	12,9	13,4	13,7	13,3
	11	10,9	8,1	6,7	6,7	8,1	10,0	9,5	10,6	9,5	9,9	12,3	11,1	11,8	12,4	11,9
	12	10,6	8,1	7,7	7,2	8,4	10,3	9,2	10,7	8,3	9,6	13,0	10,9	12,3	12,6	12,2
	13	10,1	8,2	8,1	8,3	8,7	10,1	7,9	10,4	9,0	9,3	11,3	12,8	13,5	13,8	12,8
14	10,3	7,0	7,9	7,3	8,1	9,0	7,6	9,8	10,3	9,2	10,4	12,2	13,8	12,9	12,3	
Phase	Tag	V2														
Versuch	7	C	D	G	L	\bar{x}	B	E	H	K	\bar{x}	A	F	I	J	\bar{x}
	8	11,7	10,2	10,7	10,1	10,7	16,1	10,2	12,3	13,9	13,1	19,1	14,0	12,6	14,6	15,1
	9	13,3	11,2	12,3	9,5	11,6	15,1	12,0	13,2	15,7	14,0	18,6	14,5	13,7	18,7	16,4
	10	13,8	13,2	9,8	10,5	11,8	15,2	11,3	13,7	12,5	13,2	16,6	13,4	14,4	18,0	15,6
	11	10,9	10,8	8,3	9,1	9,8	10,8	11,5	10,2	11,4	11,0	14,4	12,4	12,9	16,1	13,9
	12	13,7	12,4	8,9	8,3	10,8	10,5	10,2	10,3	9,8	10,2	17,0	12,8	13,8	16,0	14,9
	13	10,9	9,1	9,6	9,8	9,8	13,3	10,9	10,0	10,9	11,3	16,0	12,5	16,2	14,3	14,7
14	9,4	7,4	8,2	9,5	8,6	12,0	13,6	10,2	10,3	11,5	17,2	12,3	14,8	14,1	14,6	
Phase	Tag	V3														
Versuch	7	B	E	H	K	\bar{x}	A	F	I	J	\bar{x}	C	D	G	L	\bar{x}
	8	10,4	9,6	8,0	7,5	8,9	14,5	10,5		8,5	11,2	13,6	14,5	14,1	11,4	13,4
	9	10,9	9,1	8,8	8,4	9,3	13,6	10,6	9,7	9,3	10,8	15,6	13,1	13,9	11,2	13,5
	10	10,1	8,9	7,8	8,5	8,8	12,0	10,9	9,7	9,3	10,5	13,6	11,6	13,5	11,6	12,6
	11	9,6	6,5	8,7	8,4	8,3	11,6	11,3	10,0	9,4	10,6	11,8	13,1	13,4	12,6	12,7
	12	9,5	6,4	8,6	9,1	8,4	10,4	10,3	10,2	8,9	9,9	11,6	13,4	12,7	11,2	12,2
	13	7,8	7,9	7,2	6,0	7,2	11,0	9,5	12,3	10,4	10,8	12,0	15,1	12,6	10,8	12,6
14	8,8	9,5	5,6	6,8	7,7	10,6	10,1	10,6	9,4	10,2	12,4	14,8	13,5	11,4	13,0	
Phase	Tag	V4														
Versuch	7	A	F	I	J	\bar{x}	B	E	H	K	\bar{x}	C	D	G	L	\bar{x}
	8	9,4	10,0	8,8	9,0	9,3	12,2	11,0	12,5	12,3	12,0	14,9	13,7	17,4	14,6	15,2
	9	9,6	10,0	7,5	8,1	8,8	13,2	13,6	11,6	11,5	12,5	15,7	14,4	17,1	12,7	15,0
	10	9,0	6,9	7,1	6,8	7,5	12,9	11,2	12,0	10,4	11,6	15,1	14,4	12,3	14,6	14,1
	11	9,5	8,0	7,2		8,3	12,2	9,7	12,7	9,8	11,1	14,1	13,5	13,4	13,6	13,7
	12	8,5	9,1	7,9	7,1	8,2	12,5	9,7	11,7	10,0	11,0	14,8	13,4	13,2	10,8	13,1
	13	9,3	7,4	7,8	8,3	8,2	12,7	10,3	10,7	10,0	10,9	15,2	11,8	11,8	12,6	12,8
14	8,2	9,5	9,0	8,6	8,8	11,2	10,2	10,4	11,6	10,9	14,5	11,1	14,4	13,2	13,3	
Phase	Tag	V4														
Versuch	7	A	F	I	J	\bar{x}	B	E	H	K	\bar{x}	C	D	G	L	\bar{x}
	8	9,4	10,0	8,8	9,0	9,3	12,2	11,0	12,5	12,3	12,0	14,9	13,7	17,4	14,6	15,2
	9	9,6	10,0	7,5	8,1	8,8	13,2	13,6	11,6	11,5	12,5	15,7	14,4	17,1	12,7	15,0
	10	9,0	6,9	7,1	6,8	7,5	12,9	11,2	12,0	10,4	11,6	15,1	14,4	12,3	14,6	14,1
	11	9,5	8,0	7,2		8,3	12,2	9,7	12,7	9,8	11,1	14,1	13,5	13,4	13,6	13,7
	12	8,5	9,1	7,9	7,1	8,2	12,5	9,7	11,7	10,0	11,0	14,8	13,4	13,2	10,8	13,1
	13	9,3	7,4	7,8	8,3	8,2	12,7	10,3	10,7	10,0	10,9	15,2	11,8	11,8	12,6	12,8
14	8,2	9,5	9,0	8,6	8,8	11,2	10,2	10,4	11,6	10,9	14,5	11,1	14,4	13,2	13,3	
Phase	Tag	V4														
Versuch	7	A	F	I	J	\bar{x}	B	E	H	K	\bar{x}	C	D	G	L	\bar{x}
	8	9,4	10,0	8,8	9,0	9,3	12,2	11,0	12,5	12,3	12,0	14,9	13,7	17,4	14,6	15,2
	9	9,6	10,0	7,5	8,1	8,8	13,2	13,6	11,6	11,5	12,5	15,7	14,4	17,1	12,7	15,0
	10	9,0	6,9	7,1	6,8	7,5	12,9	11,2	12,0	10,4	11,6	15,1	14,4	12,3	14,6	14,1
	11	9,5	8,0	7,2		8,3	12,2	9,7	12,7	9,8	11,1	14,1	13,5	13,4	13,6	13,7
	12	8,5	9,1	7,9	7,1	8,2	12,5	9,7	11,7	10,0	11,0	14,8	13,4	13,2	10,8	13,1
	13	9,3	7,4	7,8	8,3	8,2	12,7	10,3	10,7	10,0	10,9	15,2	11,8	11,8	12,6	12,8
14	8,2	9,5	9,0	8,6	8,8	11,2	10,2	10,4	11,6	10,9	14,5	11,1	14,4	13,2	13,3	

Tab. 6.9: Produktion des Butyrats [mmol·d⁻¹] in V1-V4.

Phase	Tag	Kontrolle					3,38 mmol·d ⁻¹ FS					6,76 mmol·d ⁻¹ FS				
		A	F	I	J	\bar{x}	B	E	H	K	\bar{x}	C	D	G	L	\bar{x}
Versuch	7	3,3	2,6	2,8	2,9	2,9	2,9	2,9	2,3	2,8	2,7	3,2	2,6	2,4	2,8	2,7
	8	3,1	2,7	2,7	2,9	2,9	2,6	2,5	2,6	2,9	2,6	2,7	3,0	2,8	2,8	2,8
	9	2,8	2,8	2,7	3,3	2,9	3,0	2,7	2,8	2,7	2,8	3,1	3,4	2,2	2,6	2,8
	10	2,6	2,8	2,9	2,9	2,8	2,8	2,7	3,0	3,0	2,9	2,7	3,2	2,4	2,7	2,7
	11	3,0	2,6	2,8	3,2	2,9	3,0	2,8	3,0	2,8	2,9	2,7	2,7	2,1	2,6	2,5
	12	3,2	2,9	2,8	3,1	3,0	3,5	3,2	2,9	2,5	3,0	3,0	2,8	2,3	2,5	2,7
	13	3,3	3,1	3,0	3,4	3,2	3,4	3,1	2,9	2,4	3,0	2,8	3,4	2,6	3,0	2,9
	14	3,3	2,8	3,0	2,8	3,0	3,5	2,8	2,8	3,0	3,0	2,3	3,1	2,9	2,9	2,8
Phase	Tag	V2														
Versuch	7	C	D	G	L	\bar{x}	B	E	H	K	\bar{x}	A	F	I	J	\bar{x}
	8	3,2	3,0	3,4	3,2	3,2	3,5	2,8	2,9	3,4	3,1	3,6	2,8	2,5	3,0	3,0
	9	3,4	3,3	3,5	2,8	3,3	3,3	3,0	3,0	4,3	3,4	3,4	3,0	2,7	3,5	3,1
	10	3,1	3,3	3,1	3,1	3,1	3,3	2,7	3,4	3,7	3,3	3,1	3,0	2,9	3,5	3,1
	11	3,0	3,2	2,8	2,9	3,0	3,0	2,8	2,7	3,4	3,0	3,1	2,7	2,7	3,3	2,9
	12	3,0	3,4	2,9	3,0	3,1	3,1	2,6	2,9	3,1	2,9	3,7	2,7	2,8	3,8	3,3
	13	3,2	3,3	3,4	3,6	3,4	3,3	2,8	3,0	4,3	3,3	3,7	3,0	3,4	3,9	3,5
	14	3,2	3,2	3,1	3,6	3,2	3,3	3,3	3,0	3,9	3,4	3,9	3,1	3,2	3,8	3,5
Phase	Tag	V3														
Versuch	7	B	E	H	K	\bar{x}	A	F	I	J	\bar{x}	C	D	G	L	\bar{x}
	8	3,2	2,8	3,0	3,0	3,0	3,2	3,1		3,0	3,1	2,6	3,2	3,3	2,9	3,0
	9	3,1	3,1	2,8	2,9	3,0	2,8	2,8	2,8	2,7	2,8	2,7	2,8	3,2	2,7	2,8
	10	2,9	3,1	2,6	2,8	2,8	2,6	2,8	2,9	2,6	2,7	2,7	2,4	3,0	2,4	2,6
	11	3,3	2,9	2,7	3,0	3,0	2,7	2,9	2,9	2,6	2,8	2,5	2,6	2,7	2,5	2,6
	12	3,9	3,1	2,8	3,1	3,2	3,0	2,8	3,0	2,7	2,8	2,6	3,0	2,7	2,3	2,6
	13	3,4	3,3	2,9	2,8	3,1	3,0	2,8	3,6	3,1	3,1	2,6	3,5	2,8	2,4	2,8
	14	3,4	3,8	2,6	2,6	3,1	2,6	2,6	3,0	2,9	2,8	2,8	3,8	2,9	2,6	3,0
Phase	Tag	V4														
Versuch	7	A	F	I	J	\bar{x}	B	E	H	K	\bar{x}	C	D	G	L	\bar{x}
	8	4,6	5,6	4,6	4,1	4,7	5,1	4,7	4,5	5,1	4,8	4,7	5,2	4,8	4,5	4,8
	9	4,8	5,8	3,9	4,2	4,7	5,2	5,3	4,9	5,2	5,1	5,6	5,6	5,4	4,2	5,2
	10	4,4	4,3	3,6	3,6	4,0	5,2	4,6	5,4	4,7	5,0	5,4	5,4	4,4	4,5	4,9
	11	4,9	4,4	4,1		4,4	5,2	4,1	5,3	4,0	4,6	4,9	4,6	4,5	3,7	4,4
	12	4,4	4,5	4,7	3,5	4,3	4,5	3,5	4,3	3,5	4,0	4,8	4,5	4,4	2,8	4,1
	13	4,4	4,6	4,3	4,2	4,4	4,3	3,7	4,2	3,6	3,9	4,2	3,6	3,5	3,5	3,7
	14	3,8	4,8	4,1	4,4	4,3	4,0	3,4	4,1	3,5	3,7	3,8	3,1	3,6	3,8	3,6
Phase	Tag	V4														
Versuch	7	A	F	I	J	\bar{x}	B	E	H	K	\bar{x}	C	D	G	L	\bar{x}
	8	4,4	4,3	4,2	3,6	4,1	3,9	3,1	3,7	3,7	3,6	4,3	4,1	3,2	4,2	4,0

Tab. 6.10: Produktion des Isovalerats [$\text{mmol}\cdot\text{d}^{-1}$] in V1-V4.

Phase	Tag	Kontrolle					3,38 $\text{mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ FS					6,76 $\text{mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ FS				
		A	F	I	J	\bar{x}	B	E	H	K	\bar{x}	C	D	G	L	\bar{x}
Versuch	7	5,0	4,8	5,2	4,9	5,0	5,8	5,3	5,6	5,3	5,5	5,6	5,2	5,9	5,8	5,6
	8	5,0	4,7	4,9	4,7	4,8	5,3	5,2	5,2	5,1	5,2	5,3	5,2	5,7	5,4	5,4
	9	4,9	4,5	4,7	4,6	4,7	5,5	4,9	5,0	4,9	5,1	5,5	5,1	4,8	4,9	5,1
	10	4,6	4,6	5,3	4,7	4,8	5,3	5,3	5,2	5,2	5,2	5,2	5,0	4,7	5,4	5,1
	11	4,3	4,3	6,0	4,7	4,9	5,5	4,9	5,3	5,3	5,3	4,9	4,9	4,8	5,0	4,9
	12	4,8	4,5	5,2	5,3	4,9	5,6	5,3	5,5	5,7	5,5	5,6	5,1	5,6	5,3	5,4
	13	4,6	4,3	5,1	5,7	4,9	5,6	5,2	5,5	5,5	5,5	5,2	5,2	5,8	5,7	5,5
14	5,0	4,3	5,3	5,4	5,0	5,6	5,1	5,5	5,8	5,5	5,2	5,4	6,0	5,9	5,6	
Phase	Tag	V2														
Versuch	7	2,0	1,3	2,6	2,7	2,1	1,5	2,0	2,3	2,0	2,0	1,8	2,6	2,0	1,9	2,1
	8	1,8	1,3	1,9	1,9	1,7	1,6	1,7	1,7	1,7	1,7	1,4	1,9	1,5	1,5	1,6
	9	1,7	1,6	1,4	1,7	1,6	1,9	1,9	1,7	1,6	1,8	1,4	2,2	1,5	1,4	1,6
	10	2,0	2,2	1,6	1,7	1,9	3,0	2,2	2,0	2,1	2,3	2,5	2,8	1,7	2,1	2,3
	11	2,4	3,8	2,4	2,6	2,8	4,5	2,9	2,7	3,7	3,4	3,3	3,7	2,5	3,7	3,3
	12	3,2	5,7	3,6	3,7	4,0	5,0	3,9	3,3	6,3	4,6	5,1	4,9	3,4	4,8	4,5
	13	4,0	5,6	4,5	4,5	4,6	5,2	4,6	4,0	6,3	5,0	5,0	5,8	3,8	5,2	4,9
14	4,1	5,7	4,4	4,5	4,7	5,4	5,3	4,1	5,6	5,1	5,8	5,8	3,7	5,2	5,1	
Phase	Tag	V3														
Versuch	7	5,4	5,2	4,9	6,7	5,5	5,8	6,0		5,2	5,7	5,2	6,8	5,9	5,7	5,9
	8	4,6	4,9	4,7	6,3	5,1	5,1	5,5	5,0	4,5	5,0	5,4	6,0	6,1	5,3	5,7
	9	4,9	5,1	4,6	6,2	5,2	5,0	5,1	4,8	4,2	4,8	5,2	5,4	5,6	4,8	5,2
	10	5,4	5,4	4,9	6,2	5,5	4,8	4,9	3,9	4,5	4,5	5,0	5,4	5,5	5,0	5,2
	11	6,0	5,9	4,9	6,5	5,8	5,4	5,0	2,8	4,6	4,4	5,4	4,8	2,5	5,1	4,4
	12	5,1	5,4	5,4	6,2	5,5	5,3	5,2	2,7	5,0	4,5	4,8	3,9	5,2	4,7	4,6
	13	5,4	5,5	5,0	6,2	5,5	5,3	5,0	2,8	4,8	4,5	4,5	3,1	5,8	4,6	4,5
14	5,0	4,4	4,9	6,1	5,1	5,3	4,7	2,4	4,7	4,3	3,7	3,0	5,2	4,6	4,1	
Phase	Tag	V4														
Versuch	7	4,4	4,5	3,6	3,4	4,0	4,7	4,6	4,3	4,3	4,4	5,4	5,0	4,2	4,5	4,8
	8	4,6	4,7	4,2	4,3	4,4	5,1	4,9	4,3	5,0	4,8	5,6	5,8	4,8	4,6	5,2
	9	4,7	4,4	4,3	4,5	4,5	5,2	4,8	4,7	4,9	4,9	5,2	5,8	4,3	4,8	5,0
	10	5,1	4,8	4,8		4,9	6,1	5,0	4,7	4,7	5,1	5,4	6,3	4,5	4,8	5,2
	11	5,0	4,6	4,8	4,4	4,7	6,4	4,9	4,4	4,9	5,2	5,1	5,8	4,9	4,5	5,1
	12	5,2	4,8	5,0	5,0	5,0	5,5	5,1	4,3	5,3	5,0	5,5	5,2	4,7	5,4	5,2
	13	5,2	5,3	5,5	5,2	5,3	4,8	5,0	4,2	5,0	4,8	5,2	5,6	5,0	5,3	5,3
14	5,7	5,1	5,9	5,1	5,5	4,7	4,9	4,5	5,6	4,9	5,3	6,4	4,9	5,7	5,5	

Tab. 6.11: Produktion des Valerats [$\text{mmol}\cdot\text{d}^{-1}$] in V1-V4.

Phase	Tag	Kontrolle					3,38 $\text{mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ FS					6,76 $\text{mmol}\cdot\text{d}^{-1}$ FS				
		A	F	I	J	\bar{x}	B	E	H	K	\bar{x}	C	D	G	L	\bar{x}
Versuch	7	1,1	1,1	1,0	0,6	0,9	0,8	0,8	1,0	0,8	0,8	1,1	1,0	1,1	1,1	1,1
	8	0,9	0,7	1,2	0,7	0,9	0,9	0,8	1,1	1,0	1,0	0,9	0,6	1,8	1,2	1,1
	9	0,4	0,6	1,1	0,9	0,7	0,9	0,6	1,1	0,8	0,8	1,0	1,0	1,0	0,9	1,0
	10	0,8	0,5	1,2	0,9	0,9	0,9	0,6	1,1	0,9	0,9	0,7	0,8	1,9	1,6	1,3
	11	1,2	0,4	1,1	0,9	0,9	0,9	0,6	1,1	0,9	0,9	1,1	0,0	1,5	1,0	0,9
	12	0,9	0,3	1,0	0,9	0,8	0,9	0,5	1,1	0,9	0,9	0,8	0,5	1,8	1,0	1,0
	13	1,0	0,4	1,0	1,0	0,8	1,1	0,5	1,2	0,7	0,9	0,9	1,0	1,1	1,5	1,1
14	0,9	0,3	1,0	0,9	0,8	1,2	0,3	1,1	0,9	0,9	0,9	0,6	1,4	1,4	1,1	
Phase	Tag	V2														
Versuch	7	C	D	G	L	\bar{x}	B	E	H	K	\bar{x}	A	F	I	J	\bar{x}
	8	1,3	1,5	1,9	1,3	1,5	1,4	1,2	1,5	2,0	1,5	1,7	1,7	1,8	2,2	1,9
	9	1,3	1,8	1,9	1,5	1,6	1,7	1,7	1,8	2,2	1,9	2,4	1,9	2,3	2,4	2,3
	10	1,3	1,8	1,6	2,3	1,7	1,9	1,8	1,9	2,4	2,0	2,1	2,2	2,1	2,4	2,2
	11	1,8	1,9	1,4	1,7	1,7	1,6	1,7	1,9	1,8	1,7	1,9	1,7	1,8	2,2	1,9
	12	1,5	1,4	1,6	2,1	1,7	1,1	1,8	2,1	1,4	1,6	1,7	1,8	1,9	2,1	1,9
	13	1,8	1,4	1,4	1,4	1,5	1,3	1,6	1,2	1,2	1,3	1,5	1,6	2,2	1,8	1,8
14	1,3	0,6	1,5	1,4	1,2	1,0	1,5	1,4	1,3	1,3	1,4	1,7	2,5	1,9	1,9	
14	1,5	0,6	1,5	1,3	1,2	1,0	1,6	1,4	1,6	1,4	1,0	1,5	2,0	1,9	1,6	
Phase	Tag	V3														
Versuch	7	B	E	H	K	\bar{x}	A	F	I	J	\bar{x}	C	D	G	L	\bar{x}
	8	0,5	0,7	0,9	0,7	0,7	0,8	0,8		0,8	0,8	1,0	1,0	1,1	0,7	0,9
	9	0,5	0,6	1,0	0,7	0,7	0,6	0,5	1,0	0,7	0,7	1,0	0,8	0,8	0,8	0,8
	10	0,7	1,0	0,8	0,8	0,8	0,7	0,7	1,0	0,7	0,8	1,1	0,7	0,9	0,7	0,9
	11	1,0	0,4	0,7	0,9	0,7	0,6	0,9	1,0	0,9	0,8	1,0	1,0	1,0	0,9	1,0
	12	0,7	0,2	0,9	0,9	0,7	0,6	0,9	0,9	0,9	0,8	0,8	0,6	1,2	0,8	0,9
	13	0,7	0,5	1,0	0,8	0,8	0,5	0,9	1,1	1,0	0,9	0,8	0,7	1,0	0,8	0,8
14	0,7	0,7	0,6	0,7	0,7	1,0	1,0	1,2	1,0	1,1	1,5	0,9	1,2	1,0	1,1	
14	0,7	0,8	0,8	0,7	0,7	0,6	1,0	1,4	1,0	1,0	0,8	0,9	1,2	1,2	1,0	
Phase	Tag	V4														
Versuch	7	A	F	I	J	\bar{x}	B	E	H	K	\bar{x}	C	D	G	L	\bar{x}
	8	0,7	1,2	1,1	1,3	1,1	0,9	1,0	1,1	1,5	1,1	1,1	1,4	1,6	1,5	1,4
	9	0,8	0,8	1,0	1,2	0,9	0,9	1,2	0,7	0,9	0,9	1,1	1,5	1,6	1,3	1,4
	10	0,7	0,4	0,9	1,1	0,8	0,4	0,9	0,8	1,2	0,8	1,1	1,3	0,9	1,5	1,2
	11	0,5	0,7	1,0		0,7	0,6	0,9	1,4	1,2	1,0	1,0	1,2	0,8	1,4	1,1
	12	0,5	0,5	1,1	1,0	0,8	1,0	0,7	1,1	1,1	1,0	1,2	0,8	1,2	1,2	1,1
	13	0,6	0,5	1,1	1,1	0,8	1,0	1,0	1,0	1,2	1,0	1,2	0,5	1,0	1,5	1,1
14	0,3	0,6	1,1	1,1	0,7	1,1	0,8	1,3	1,1	1,1	1,4	0,6	0,8	1,4	1,1	
14	0,8	0,3	1,0	1,1	0,8	1,3	0,6	1,3	0,9	1,0	1,3	1,2	0,7	1,3	1,1	

Tab. 6.12: Konzentration der SCFA [$\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$] in der Pansenflüssigkeit in V1-4 (u.N. unter der Nachweisgrenze $<0,3 \text{ mmol/l}$).

SCFA-Konzentration [mmol/l]	V1				\bar{x}	V2				\bar{x}	V3				\bar{x}	V4				\bar{x}
	C2	52,6	52,6	53,7	53,0		58,2	60,3	61,2	59,9		50,7	51,4	52,6	51,6		67,2	69,1	65,9	67,4
C3	15,9	15,6	17,7	16,4		15,6	16,2	16,4	16,1		13,7	14,1	14,1	14,0		19,4	20,0	18,4	19,3	
iC4	u.N.	u.N.	u.N.	u.N.		0,96	1,03	1,0	1,0		u.N.	u.N.	u.N.	u.N.		u.N.	u.N.	u.N.	u.N.	
C4	5,7	5,6	5,7	5,7		7,7	7,6	7,7	7,7		5,7	5,6	5,8	5,7		8,5	8,7	8,2	8,5	
iC5	u.N.	u.N.	u.N.	u.N.		1,5	1,5	1,5	1,5		0,9	0,8	0,7	0,8		0,6	0,6	0,5	0,6	
C5	u.N.	u.N.	u.N.	u.N.		1,08	1,0	1,18	1,1		u.N.	u.N.	u.N.	u.N.		u.N.	u.N.	u.N.	u.N.	
Σ	74,2	73,8	77,0	75,0		85,1	87,6	89,1	87,2		70,9	71,9	73,3	72,0		95,7	98,4	93,0	95,7	

Tab. 6.13: Molare SCFA-Anteile [%] in der Pansenflüssigkeit in V1-4 (u.N. unter der Nachweisgrenze $<0,3 \text{ mmol/l}$).

Molarer SCFA-Anteil [%]	V1				\bar{x}	V2				\bar{x}	V3				\bar{x}	V4				\bar{x}
	C2	70,9	71,3	69,7	70,6		68,4	68,8	68,7	68,6		71,5	71,4	71,8	71,6		70,2	70,2	70,8	70,4
C3	21,4	21,1	22,9	21,8		18,4	18,5	18,4	18,4		19,3	19,6	19,3	19,4		20,3	20,3	19,8	20,1	
iC4	u.N.	u.N.	u.N.	u.N.		1,1	1,2	1,1	1,1		u.N.	u.N.	u.N.	u.N.		u.N.	u.N.	u.N.	u.N.	
C4	7,7	7,6	7,4	7,6		9,1	8,7	8,7	8,8		8,0	7,8	7,9	7,9		8,9	8,9	8,9	8,9	
iC5	u.N.	u.N.	u.N.	u.N.		1,8	1,7	1,7	1,8		1,2	1,1	1,0	1,1		0,6	0,6	0,5	0,6	
C5	u.N.	u.N.	u.N.	u.N.		1,3	1,1	1,3	1,2		u.N.	u.N.	u.N.	u.N.		u.N.	u.N.	u.N.	u.N.	

Tab. 6.14: Molare Anteile des Acetats [%] in V1-V4.

Phase	Tag	Kontrolle					3,38 mmol·d ⁻¹ FS					6,76 mmol·d ⁻¹ FS				
		A	F	I	J	\bar{x}	B	E	H	K	\bar{x}	C	D	G	L	\bar{x}
Versuch	7	50,8	55,4	56,1	56,4	54,7	52,3	52,0	52,2	52,3	52,2	46,0	49,0	49,6	49,7	48,6
	8	50,6	56,5	56,2	57,1	55,1	51,2	53,1	51,9	53,0	52,3	50,3	50,3	48,8	51,5	50,2
	9	53,9	55,8	55,2	55,9	55,2	52,5	53,2	51,0	52,5	52,3	47,7	46,2	51,2	51,5	49,1
	10	52,6	57,1	55,6	57,3	55,7	52,9	54,4	52,9	53,8	53,5	51,9	51,7	51,7	52,2	51,9
	11	52,7	57,8	55,6	55,6	55,4	53,5	54,6	52,3	53,5	53,5	52,1	52,3	51,3	51,6	51,8
	12	53,3	58,6	54,8	55,9	55,6	52,5	55,6	53,4	54,6	54,0	53,5	52,3	51,4	52,5	52,4
	13	52,3	57,5	53,6	54,4	54,4	53,5	54,8	52,1	52,5	53,2	53,1	50,3	50,1	48,2	50,4
14	51,9	58,5	55,3	55,9	55,4	51,6	55,5	53,5	52,7	53,3	51,4	52,1	51,4	49,8	51,2	
Phase	Tag	V2														
Versuch	7	C	D	G	L	\bar{x}	B	E	H	K	\bar{x}	A	F	I	J	\bar{x}
	8	52,9	55,5	54,3	55,5	54,5	50,5	53,1	52,2	50,2	51,5	46,1	48,7	50,2	51,6	49,2
	9	53,7	55,0	55,0	56,8	55,1	49,6	53,0	53,6	51,0	51,8	47,1	50,9	51,5	46,5	49,0
	10	53,2	51,3	56,2	55,5	54,0	50,6	54,1	54,5	54,0	53,3	48,9	51,4	50,9	45,6	49,2
	11	56,1	54,1	57,6	56,6	56,1	51,7	53,2	54,4	53,6	53,2	49,6	50,9	50,3	45,4	49,0
	12	51,3	50,4	55,2	55,0	53,0	49,5	52,4	52,3	52,2	51,6	46,0	49,8	49,4	46,4	47,9
	13	54,5	52,1	53,1	54,1	53,4	47,3	51,4	52,4	48,5	49,9	45,5	49,2	48,7	47,2	47,6
14	54,6	53,8	53,3	54,2	54,0	47,2	48,8	51,6	48,4	49,0	45,7	49,1	49,0	46,9	47,7	
14	55,0	54,6	53,4	53,9	54,2	46,6	47,4	52,2	50,1	49,1	47,0	49,2	49,8	47,9	48,5	
Phase	Tag	V3														
Versuch	7	B	E	H	K	\bar{x}	A	F	I	J	\bar{x}	C	D	G	L	\bar{x}
	8	50,6	50,9	54,8	54,9	52,8	47,5	50,3		52,8	50,2	46,6	47,2	47,6	50,3	47,9
	9	51,9	54,3	54,3	55,3	54,0	48,6	50,5	50,9	52,5	50,6	46,8	49,0	48,0	50,0	48,5
	10	50,7	52,3	54,7	55,7	53,4	49,3	51,3	51,4	52,6	51,1	47,7	49,4	47,8	50,7	48,9
	11	50,2	54,9	53,7	55,6	53,6	50,1	51,8	52,3	52,5	51,7	48,7	48,7	48,4	50,5	49,1
	12	49,2	53,4	53,3	53,7	52,4	51,7	52,2	53,7	53,1	52,6	48,4	49,1	51,2	51,3	50,0
	13	50,6	52,7	55,6	56,8	53,9	50,4	51,6	51,8	52,4	51,5	50,0	49,7	49,8	51,3	50,2
14	50,6	52,3	56,7	54,1	53,4	49,6	51,8	53,5	52,8	51,9	48,1	48,8	46,0	51,0	48,5	
14	52,1	53,0	54,1	56,6	54,0	51,0	52,6	54,5	53,0	52,8	51,6	50,5	48,2	51,0	50,4	
Phase	Tag	V4														
Versuch	7	A	F	I	J	\bar{x}	B	E	H	K	\bar{x}	C	D	G	L	\bar{x}
	8	49,2	48,5	51,6	49,0	49,6	46,2	48,2	43,8	44,6	45,7	42,0	44,5	41,4	40,4	42,1
	9	51,6	47,5	52,2	50,4	50,4	48,6	46,3	46,0	46,5	46,9	43,0	44,3	41,5	44,0	43,2
	10	51,2	50,9	52,2	51,5	51,4	48,7	48,7	45,8	46,2	47,3	44,5	42,2	44,8	44,8	44,1
	11	51,6	49,5	52,7		51,2	48,9	48,0	45,9	46,2	47,3	44,8	44,7	45,6	45,7	45,2
	12	51,2	47,1	48,9	49,8	49,3	45,2	48,6	44,3	45,9	46,0	45,6	45,1	44,9	45,2	45,2
	13	51,1	48,4	46,0	48,3	48,4	49,6	48,7	46,4	46,5	47,8	46,5	47,1	44,2	43,1	45,2
14	51,4	46,8	45,5	48,4	48,0	47,9	49,1	46,8	46,2	47,5	45,9	46,9	43,7	41,5	44,5	
14	51,3	48,8	47,3	49,2	49,2	46,9	49,1	47,4	46,6	47,5	44,4	43,2	44,5	41,1	43,3	

Tab. 6.15: Molare Anteile des Propionats [%] in V1-V4.

Phase	Tag	Kontrolle					3,38 mmol·d ⁻¹ FS					6,76 mmol·d ⁻¹ FS				
		A	F	I	J	\bar{x}	B	E	H	K	\bar{x}	C	D	G	L	\bar{x}
Versuch	7	26,3	25,6	22,4	20,4	23,7	24,8	24,6	23,2	25,3	24,4	34,7	29,1	29,4	30,0	30,8
	8	27,6	22,1	21,8	20,5	23,0	25,6	22,7	24,9	24,8	24,5	29,3	29,1	29,4	28,1	29,0
	9	24,8	22,6	21,8	20,4	22,4	25,7	23,3	26,6	24,9	25,1	32,0	31,3	30,0	29,0	30,6
	10	27,2	24,4	20,4	20,3	23,1	25,2	24,5	25,2	24,5	24,8	29,0	28,4	28,9	28,0	28,6
	11	26,5	26,1	18,0	19,1	22,4	23,9	24,3	25,3	23,8	24,3	28,1	28,3	28,4	28,5	28,3
	12	25,4	24,2	20,9	19,3	22,4	24,1	22,4	24,7	21,5	23,2	27,1	26,8	27,2	27,9	27,3
	13	25,3	21,1	21,9	20,6	22,2	23,1	21,4	25,0	24,2	23,4	26,3	28,4	29,4	29,6	28,4
	14	25,4	21,8	20,5	19,6	21,8	22,6	21,4	23,8	24,4	23,1	26,8	27,5	27,7	28,0	27,5
Phase	Tag	V2														
Versuch	7	C	D	G	L	\bar{x}	B	E	H	K	\bar{x}	A	F	I	J	\bar{x}
	8	30,5	28,4	26,3	26,0	27,8	35,6	29,7	30,9	32,5	32,2	34,0	34,0	33,2	32,7	33,5
	9	31,2	28,6	28,2	26,2	28,5	34,9	30,5	31,1	32,2	32,2	33,3	33,3	33,0	38,3	34,5
	10	32,6	32,3	27,1	26,6	29,7	33,6	29,3	30,3	28,5	30,4	31,5	31,5	33,9	38,8	33,9
	11	27,2	27,4	24,9	25,6	26,3	28,5	29,6	27,7	28,5	28,6	31,0	31,0	33,7	37,2	33,2
	12	32,3	29,3	25,3	23,5	27,6	27,6	27,7	27,3	26,1	27,2	30,7	30,7	33,1	33,6	32,0
	13	26,0	22,4	24,9	24,4	24,4	30,5	27,6	27,2	24,8	27,5	28,9	28,9	33,1	30,4	30,3
	14	24,0	20,4	22,3	22,9	22,4	29,6	30,1	26,6	24,4	27,7	27,4	27,4	31,1	29,9	29,0
Phase	Tag	V3														
Versuch	7	B	E	H	K	\bar{x}	A	F	I	J	\bar{x}	C	D	G	L	\bar{x}
	8	26,4	25,8	21,5	21,5	23,8	31,4	25,6		23,0	26,7	32,4	30,0	30,3	27,5	30,0
	9	27,3	23,6	23,4	22,6	24,2	31,5	26,9	25,8	25,9	27,5	33,6	29,4	30,3	28,2	30,4
	10	26,9	23,5	22,5	22,7	23,9	30,1	27,4	25,8	26,2	27,4	31,7	29,3	30,6	29,3	30,2
	11	24,9	19,2	23,8	22,1	22,5	29,4	27,2	26,9	25,7	27,3	29,8	30,4	30,5	29,5	30,0
	12	24,1	19,3	23,4	23,8	22,6	25,9	26,0	28,1	24,5	26,1	29,5	31,3	32,3	28,2	30,3
	13	22,6	21,9	19,4	18,6	20,6	27,7	25,1	30,2	25,5	27,1	29,8	32,8	29,3	28,2	30,0
	14	23,7	23,3	17,5	21,9	21,6	27,5	26,0	27,9	24,4	26,5	30,5	33,7	31,2	28,5	31,0
Phase	Tag	V4														
Versuch	7	A	F	I	J	\bar{x}	B	E	H	K	\bar{x}	C	D	G	L	\bar{x}
	8	25,1	26,6	23,5	25,8	25,2	28,7	26,9	31,4	29,4	29,1	33,2	30,1	36,5	34,6	33,6
	9	23,5	33,6	21,7	22,6	25,3	27,8	29,2	29,1	27,4	28,4	31,9	29,5	34,6	31,3	31,8
	10	23,5	34,4	21,5	20,6	25,0	27,9	26,7	28,5	26,5	27,4	31,2	31,0	30,9	31,7	31,2
	11	23,1	27,2	20,0		23,4	26,0	25,6	28,4	26,8	26,7	30,6	29,2	31,4	31,5	30,7
	12	22,6	27,3	21,9	22,2	23,5	28,1	26,5	30,5	27,5	28,1	31,1	29,9	30,7	30,8	30,6
	13	23,5	30,7	23,2	23,2	25,1	27,2	26,4	28,4	26,8	27,2	31,1	29,5	31,3	31,2	30,8
	14	22,8	27,0	25,1	23,1	24,5	27,7	26,8	27,7	29,4	27,9	31,6	28,8	34,1	32,6	31,8
Phase	Tag	V4														
Versuch	7	A	F	I	J	\bar{x}	B	E	H	K	\bar{x}	C	D	G	L	\bar{x}
	8	22,4	26,1	24,9	22,8	24,1	28,5	26,9	27,2	28,1	27,7	31,8	30,7	34,0	32,7	32,3

Tab. 6.16: Molare Anteile des Butyrats [%] in V1-V4.

Phase	Tag	Kontrolle					3,38 mmol·d ⁻¹ FS					6,76 mmol·d ⁻¹ FS				
		A	F	I	J	\bar{x}	B	E	H	K	\bar{x}	C	D	G	L	\bar{x}
Versuch	7	8,0	7,2	6,6	7,9	7,4	7,1	7,7	6,4	7,0	7,0	6,2	6,5	5,3	5,6	5,9
	8	7,6	7,4	6,6	7,8	7,4	6,9	7,1	6,8	7,1	7,0	6,1	7,0	5,9	5,5	6,1
	9	7,3	7,7	7,3	8,9	7,8	7,0	7,7	7,1	7,2	7,2	6,5	8,0	5,1	5,1	6,2
	10	6,5	6,8	7,5	7,8	7,2	6,9	6,7	7,1	7,1	6,9	6,0	7,1	5,2	5,1	5,8
	11	7,4	7,2	7,4	9,0	7,8	7,2	7,2	7,1	7,0	7,1	6,1	7,0	5,0	5,1	5,8
	12	7,6	7,6	7,6	8,3	7,8	8,3	7,7	6,6	6,5	7,3	6,3	6,9	5,1	4,8	5,8
	13	8,2	8,3	8,2	8,4	8,3	7,9	8,4	7,0	6,5	7,4	6,6	7,5	5,6	6,3	6,5
14	8,2	8,0	7,8	7,6	7,9	8,7	7,8	6,8	7,1	7,6	5,8	7,0	5,9	5,7	6,1	
Phase	Tag	V2														
Versuch	7	C	D	G	L	\bar{x}	B	E	H	K	\bar{x}	A	F	I	J	\bar{x}
	8	8,2	8,5	8,4	5,7	7,7	7,7	8,0	7,3	8,0	7,7	7,3	6,9	6,6	6,7	6,9
	9	7,9	8,4	8,1	5,0	7,4	7,7	7,7	7,2	8,7	7,8	6,9	7,0	6,4	7,2	6,9
	10	7,3	8,0	8,5	5,5	7,4	7,4	7,0	7,5	8,5	7,6	6,9	7,0	6,8	7,4	7,0
	11	7,4	8,1	8,4	5,1	7,3	7,8	7,1	7,4	8,5	7,7	7,2	6,8	7,0	7,6	7,1
	12	7,1	7,9	8,3	5,4	7,2	8,3	7,0	7,8	8,2	7,8	7,8	6,4	6,8	8,0	7,2
	13	7,6	8,1	8,9	6,6	7,8	7,6	7,1	8,2	9,7	8,2	7,6	6,8	6,9	8,2	7,4
14	8,0	8,7	8,3	6,6	7,9	8,1	7,4	7,7	9,2	8,1	7,7	6,8	6,7	8,1	7,3	
Phase	Tag	V3														
Versuch	7	B	E	H	K	\bar{x}	A	F	I	J	\bar{x}	C	D	G	L	\bar{x}
	8	8,2	7,6	8,2	8,5	8,1	6,9	7,4		8,1	7,5	6,2	6,7	7,0	5,7	6,4
	9	7,8	8,0	7,4	7,8	7,8	6,6	7,2	7,5	7,4	7,2	5,8	6,3	6,9	5,3	6,0
	10	7,6	8,1	7,4	7,4	7,6	6,5	7,0	7,6	7,3	7,1	6,2	6,0	6,7	4,8	5,9
	11	8,4	8,7	7,3	7,8	8,1	6,8	7,0	7,8	7,1	7,2	6,2	6,2	6,2	5,0	5,9
	12	9,8	9,1	7,5	8,0	8,6	7,5	7,1	8,2	7,3	7,5	6,5	7,0	7,0	4,5	6,2
	13	9,8	9,0	7,8	8,6	8,8	7,5	7,3	8,8	7,4	7,7	6,4	7,6	6,6	4,7	6,3
14	9,3	9,3	8,2	8,4	8,8	6,7	6,8	8,0	7,6	7,3	6,9	8,5	6,8	5,0	6,8	
Phase	Tag	V4														
Versuch	7	A	F	I	J	\bar{x}	B	E	H	K	\bar{x}	C	D	G	L	\bar{x}
	8	12,2	13,5	12,3	11,7	12,4	12,0	11,4	11,4	12,3	11,7	10,5	11,5	10,0	11,2	10,8
	9	11,7	14,2	11,2	11,8	12,2	11,0	11,3	12,3	12,2	11,7	11,4	11,4	11,0	9,5	10,8
	10	11,3	13,1	10,8	10,9	11,5	11,3	10,9	12,8	11,9	11,7	11,1	11,7	11,1	10,1	11,0
	11	11,8	12,3	11,3		11,8	11,0	10,8	12,0	10,9	11,2	10,7	9,9	10,6	8,1	9,8
	12	11,7	12,8	13,0	11,1	12,1	10,1	9,6	11,1	9,8	10,1	10,1	10,2	10,2	6,1	9,2
	13	11,0	13,8	12,7	11,8	12,3	9,3	9,4	11,2	9,5	9,8	8,6	9,1	9,4	8,0	8,8
14	10,5	12,7	11,3	11,7	11,6	9,7	8,8	10,9	8,9	9,6	8,2	8,1	8,5	9,2	8,5	
14	10,6	11,7	10,4	10,3	10,8	9,7	8,7	10,0	9,2	9,4	9,4	9,3	7,8	10,3	9,2	

Tab. 6.17: Molare Anteile des Isovalerats [%] in V1-V4.

Phase	Tag	Kontrolle					3,38 mmol·d ⁻¹ FS					6,76 mmol·d ⁻¹ FS				
		A	F	I	J	\bar{x}	B	E	H	K	\bar{x}	C	D	G	L	\bar{x}
Versuch	7	12,2	13,0	12,5	13,6	12,8	14,0	13,8	15,5	13,5	14,2	11,0	12,9	13,2	12,3	12,3
	8	12,1	13,1	12,3	12,6	12,5	13,9	14,7	13,7	12,6	13,7	12,3	12,2	12,2	11,6	12,1
	9	12,9	12,5	12,8	12,4	12,6	12,7	14,2	12,6	13,2	13,2	11,6	12,2	11,4	11,4	11,7
	10	11,6	11,3	13,5	12,4	12,2	12,9	12,9	12,3	12,4	12,6	11,5	11,0	10,2	11,0	10,9
	11	10,6	11,8	16,1	13,6	13,0	13,2	12,5	12,7	13,4	12,9	11,1	12,5	11,6	11,5	11,7
	12	11,5	11,7	14,2	14,0	12,8	13,1	13,0	12,7	15,0	13,4	11,5	12,7	12,4	11,7	12,1
	13	11,7	11,4	13,8	14,2	12,8	12,9	14,2	13,1	14,9	13,8	12,0	11,6	12,6	12,4	12,1
	14	12,4	12,3	13,8	14,5	13,2	14,1	14,5	13,3	13,8	13,9	13,5	12,1	12,1	12,8	12,6
Phase	Tag	V2														
Versuch	7	C	D	G	L	\bar{x}	B	E	H	K	\bar{x}	A	F	I	J	\bar{x}
	8	5,2	3,6	6,4	6,9	5,5	3,3	5,9	5,7	4,8	4,9	3,6	6,3	5,3	4,1	4,8
	9	4,2	3,3	4,4	5,2	4,3	3,7	4,4	4,0	3,5	3,9	2,8	4,4	3,5	3,1	3,5
	10	3,9	3,9	3,8	4,4	4,0	4,1	5,0	3,7	3,6	4,1	3,1	5,1	3,4	2,9	3,6
	11	5,0	5,7	4,9	4,9	5,1	7,8	5,7	5,4	5,2	6,0	5,8	7,0	4,4	4,8	5,5
	12	5,8	9,0	6,7	7,2	7,2	11,7	8,0	7,2	9,8	9,2	6,9	8,9	6,1	7,7	7,4
	13	7,7	13,9	9,4	9,1	10,0	11,5	9,9	9,0	14,3	11,2	10,6	11,4	6,9	10,2	9,8
	14	10,1	15,4	12,0	10,9	12,1	12,7	10,3	10,5	14,9	12,1	9,8	12,9	7,9	11,0	10,4
Phase	Tag	V3														
Versuch	7	B	E	H	K	\bar{x}	A	F	I	J	\bar{x}	C	D	G	L	\bar{x}
	8	13,7	14,0	13,1	13,2	13,5	12,5	14,7		14,1	13,8	12,4	14,2	12,7	13,6	13,2
	9	11,6	12,7	12,3	12,5	12,3	11,9	14,0	13,3	12,4	12,9	11,6	13,5	13,2	13,3	12,9
	10	12,9	13,5	13,2	12,2	12,9	12,5	12,7	12,6	11,9	12,4	12,0	13,6	12,8	12,1	12,6
	11	14,0	16,0	13,4	12,2	13,9	12,1	11,9	10,4	12,4	11,7	12,8	12,4	12,6	11,8	12,4
	12	15,1	17,6	13,4	12,1	14,6	13,6	12,6	7,6	12,6	11,6	13,7	11,2	6,4	12,7	11,0
	13	14,9	14,9	14,5	13,7	14,5	13,3	13,6	6,7	12,3	11,5	11,9	8,4	12,0	12,2	11,1
	14	14,6	13,5	15,6	13,5	14,3	13,7	12,8	7,5	12,5	11,6	10,9	7,0	13,3	11,6	10,7
Phase	Tag	V4														
Versuch	7	A	F	I	J	\bar{x}	B	E	H	K	\bar{x}	C	D	G	L	\bar{x}
	8	11,8	10,9	9,6	9,8	10,5	11,0	11,1	10,7	10,2	10,8	12,0	11,0	8,8	10,6	10,6
	9	11,2	11,7	12,0	11,9	11,7	10,7	10,6	10,9	11,9	11,0	11,5	11,7	9,6	11,3	11,0
	10	12,2	13,5	12,8	13,7	13,1	11,2	11,5	11,1	12,5	11,6	10,8	12,4	10,9	10,4	11,1
	11	12,4	13,6	13,2		13,0	12,9	13,2	10,6	13,0	12,4	11,7	13,6	10,6	11,1	11,7
	12	13,2	13,0	13,3	13,7	13,3	14,4	13,4	11,4	13,7	13,2	10,8	13,0	11,3	12,8	12,0
	13	13,1	14,4	14,9	13,9	14,1	11,7	13,1	11,5	14,2	12,6	11,3	13,0	12,5	13,3	12,5
	14	14,6	14,1	15,2	13,9	14,4	11,9	13,1	11,2	12,8	12,3	11,3	14,6	11,7	13,1	12,7
Phase	Tag	V4														
Versuch	7	A	F	I	J	\bar{x}	B	E	H	K	\bar{x}	C	D	G	L	\bar{x}
	8	13,8	13,8	14,8	14,5	14,2	11,7	13,6	12,1	13,9	12,8	11,6	14,2	11,9	13,2	12,7

Tab. 6.18: Molare Anteile des Valerats [%] in V1-V4.

Phase	Tag	Kontrolle					3,38 mmol·d ⁻¹ FS					6,76 mmol·d ⁻¹ FS				
		A	F	I	J	\bar{x}	B	E	H	K	\bar{x}	C	D	G	L	\bar{x}
Versuch	7	2,7	3,0	2,4	1,7	2,4	1,9	2,0	2,7	2,0	2,1	2,2	2,5	2,6	2,3	2,4
	8	2,2	2,0	3,0	1,9	2,3	2,4	2,3	2,8	2,5	2,5	2,1	1,5	3,8	2,6	2,5
	9	1,1	1,7	2,9	2,4	2,0	2,1	1,7	2,7	2,2	2,2	2,2	2,3	2,4	2,2	2,3
	10	2,1	1,3	3,1	2,3	2,2	2,2	1,5	2,5	2,2	2,1	1,6	1,8	4,0	3,3	2,7
	11	2,9	1,1	3,0	2,6	2,4	2,1	1,5	2,7	2,3	2,1	2,6	0,0	3,7	2,4	2,2
	12	2,2	0,9	2,6	2,5	2,1	2,1	1,3	2,6	2,3	2,1	1,7	1,3	3,9	2,2	2,3
	13	2,5	1,0	2,6	2,5	2,2	2,6	1,3	2,8	1,9	2,2	2,0	2,3	2,5	3,2	2,5
	14	2,1	0,9	2,7	2,5	2,0	2,9	0,8	2,6	2,1	2,1	2,5	1,4	2,9	3,1	2,5
Phase	Tag	V2														
Versuch	7	C	D	G	L	\bar{x}	B	E	H	K	\bar{x}	A	F	I	J	\bar{x}
	8	3,2	4,1	4,6	3,5	3,8	3,0	3,4	3,8	4,7	3,7	3,6	4,1	4,7	5,0	4,3
	9	3,0	4,7	4,3	4,0	4,0	4,0	4,4	4,2	4,6	4,3	5,0	4,4	5,5	5,0	5,0
	10	3,0	4,4	4,5	5,7	4,4	4,3	4,7	4,1	5,4	4,6	4,6	5,1	5,0	5,3	5,0
	11	4,4	4,7	4,2	4,8	4,5	4,3	4,4	5,1	4,4	4,5	4,3	4,3	4,6	5,0	4,6
	12	3,6	3,4	4,5	5,9	4,3	2,8	5,0	5,5	3,8	4,3	3,5	4,2	4,7	4,3	4,2
	13	4,2	3,4	3,8	3,5	3,7	3,0	4,0	3,2	2,8	3,3	3,1	3,8	4,4	3,9	3,8
	14	3,3	1,7	4,1	3,3	3,1	2,3	3,4	3,6	3,1	3,1	2,8	3,7	5,3	4,0	4,0
Phase	Tag	V3														
Versuch	7	B	E	H	K	\bar{x}	A	F	I	J	\bar{x}	C	D	G	L	\bar{x}
	8	1,2	1,7	2,5	1,9	1,8	1,7	2,0		2,1	1,9	2,4	2,0	2,4	1,7	2,1
	9	1,3	1,4	2,6	1,8	1,8	1,5	1,3	2,5	1,9	1,8	2,3	1,8	1,7	1,9	1,9
	10	1,9	2,5	2,2	2,0	2,2	1,6	1,7	2,6	2,1	2,0	2,6	1,8	2,1	1,8	2,0
	11	2,5	1,3	1,8	2,2	2,0	1,5	2,1	2,7	2,4	2,2	2,5	2,3	2,3	2,2	2,3
	12	1,9	0,6	2,4	2,5	1,8	1,4	2,2	2,5	2,5	2,1	2,0	1,5	3,1	2,0	2,2
	13	2,2	1,4	2,7	2,5	2,2	1,2	2,4	2,6	2,5	2,2	1,9	1,6	2,4	2,1	2,0
	14	1,9	1,6	2,0	2,1	1,9	2,5	2,7	3,2	2,7	2,8	3,6	2,0	2,8	2,5	2,7
Phase	Tag	V4														
Versuch	7	A	F	I	J	\bar{x}	B	E	H	K	\bar{x}	C	D	G	L	\bar{x}
	8	1,8	2,9	3,0	3,7	2,9	2,2	2,5	2,7	3,5	2,7	2,4	3,0	3,3	3,6	3,1
	9	2,0	2,0	2,8	3,2	2,5	1,9	2,6	1,7	2,1	2,1	2,2	3,1	3,2	3,1	2,9
	10	1,7	1,2	2,7	3,3	2,2	1,0	2,2	2,0	3,0	2,0	2,4	2,7	2,3	3,3	2,7
	11	1,3	2,0	2,7		2,0	1,3	2,3	3,2	3,2	2,5	2,3	2,6	1,8	3,2	2,5
	12	1,3	1,3	3,0	3,2	2,2	2,1	1,9	2,8	3,1	2,5	2,4	1,9	2,9	3,5	2,7
	13	1,4	1,4	3,1	3,0	2,2	2,2	2,5	2,6	3,1	2,6	2,5	1,4	2,7	3,7	2,6
	14	0,7	1,5	3,0	2,9	2,0	2,8	2,2	3,4	2,8	2,8	3,0	1,6	2,0	3,4	2,5
Phase	Tag	V4														
Versuch	7	A	F	I	J	\bar{x}	B	E	H	K	\bar{x}	C	D	G	L	\bar{x}
	8	1,8	0,7	2,6	3,2	2,1	3,2	1,7	3,3	2,3	2,6	2,9	2,6	1,7	3,1	2,6

Tab. 6.19: Acetat-Propionat-Verhältnisse in V1-V4

Phase	Tag	Kontrolle					3,38 mmol·d ⁻¹ FS					6,76 mmol·d ⁻¹ FS				
		A	F	I	J	\bar{x}	B	E	H	K	\bar{x}	C	D	G	L	\bar{x}
Versuch	7	1,9	2,6	2,5	2,8	2,4	2,1	2,1	2,3	2,1	2,1	1,3	1,7	1,7	1,7	1,6
	8	1,8	2,7	2,6	2,8	2,5	2,0	2,3	2,1	2,1	2,1	1,7	1,7	1,7	1,8	1,7
	9	2,2	2,5	2,5	2,7	2,5	2,0	2,3	1,9	2,1	2,1	1,5	1,5	1,7	1,8	1,6
	10	1,9	2,4	2,7	2,8	2,5	2,1	2,2	2,1	2,2	2,2	1,8	1,8	1,8	1,9	1,8
	11	2,0	2,6	3,1	2,9	2,7	2,2	2,2	2,1	2,2	2,2	1,9	1,9	1,8	1,8	1,8
	12	2,1	2,8	2,6	2,9	2,6	2,2	2,5	2,2	2,5	2,3	2,0	1,9	1,9	1,9	1,9
	13	2,1	2,6	2,4	2,6	2,4	2,3	2,6	2,1	2,2	2,3	2,0	1,8	1,7	1,6	1,8
	14	2,0	2,9	2,7	2,9	2,6	2,3	2,6	2,3	2,2	2,3	1,9	1,9	1,9	1,8	1,9
Phase	Tag	V2														
Versuch	7	C	D	G	L	\bar{x}	B	E	H	K	\bar{x}	A	F	I	J	\bar{x}
	8	1,7	2,0	2,1	2,1	2,0	1,4	1,8	1,7	1,5	1,6	1,2	1,4	1,5	1,6	1,4
	9	1,7	1,9	2,0	2,2	1,9	1,4	1,7	1,7	1,6	1,6	1,2	1,5	1,6	1,2	1,4
	10	1,6	1,6	2,1	2,1	1,8	1,5	1,8	1,8	1,9	1,8	1,3	1,6	1,5	1,2	1,4
	11	2,1	2,0	2,3	2,2	2,1	1,8	1,8	2,0	1,9	1,9	1,5	1,6	1,5	1,2	1,5
	12	1,6	1,7	2,2	2,3	2,0	1,8	1,9	1,9	2,0	1,9	1,3	1,6	1,5	1,4	1,4
	13	2,1	2,3	2,1	2,2	2,2	1,6	1,9	1,9	2,0	1,8	1,4	1,7	1,5	1,6	1,5
	14	2,3	2,6	2,4	2,4	2,4	1,6	1,6	1,9	2,0	1,8	1,3	1,8	1,6	1,6	1,6
Phase	Tag	V3														
Versuch	7	B	E	H	K	\bar{x}	A	F	I	J	\bar{x}	C	D	G	L	\bar{x}
	8	1,9	2,0	2,5	2,6	2,2	1,5	2,0		2,3	1,9	1,4	1,6	1,6	1,8	1,6
	9	1,9	2,3	2,3	2,4	2,2	1,5	1,9	2,0	2,0	1,9	1,4	1,7	1,6	1,8	1,6
	10	1,9	2,2	2,4	2,5	2,3	1,6	1,9	2,0	2,0	1,9	1,5	1,7	1,6	1,7	1,6
	11	2,0	2,9	2,3	2,5	2,4	1,7	1,9	1,9	2,0	1,9	1,6	1,6	1,6	1,7	1,6
	12	2,0	2,8	2,3	2,3	2,3	2,0	2,0	1,9	2,2	2,0	1,6	1,6	1,6	1,8	1,7
	13	2,2	2,4	2,9	3,0	2,6	1,8	2,1	1,7	2,1	1,9	1,7	1,5	1,7	1,8	1,7
	14	2,1	2,2	3,2	2,5	2,5	1,8	2,0	1,9	2,2	2,0	1,6	1,4	1,5	1,8	1,6
Phase	Tag	V4														
Versuch	7	A	F	I	J	\bar{x}	B	E	H	K	\bar{x}	C	D	G	L	\bar{x}
	8	2,0	2,0	2,2	1,9	2,0	1,6	1,8		1,5	1,6	1,3	1,5	1,1	1,2	1,3
	9	2,2	1,9	2,4	2,2	2,2	1,7	1,6	1,6	1,7	1,7	1,3	1,5	1,2	1,4	1,4
	10	2,2	2,4	2,4	2,5	2,4	1,7	1,8	1,6	1,7	1,7	1,4	1,4	1,5	1,4	1,4
	11	2,2	2,2	2,6		2,3	1,9	1,9	1,6	1,7	1,8	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
	12	2,3	1,8	2,2	2,2	2,1	1,6	1,8	1,5	1,7	1,7	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
	13	2,2	2,2	2,0	2,1	2,1	1,8	1,8	1,6	1,7	1,7	1,5	1,6	1,4	1,4	1,5
	14	2,3	1,9	1,8	2,1	2,0	1,7	1,8	1,7	1,6	1,7	1,5	1,6	1,3	1,3	1,4
Phase	Tag	V4														
Versuch	7	A	F	I	J	\bar{x}	B	E	H	K	\bar{x}	C	D	G	L	\bar{x}
	8	2,0	2,0	2,2	1,9	2,0	1,6	1,8		1,5	1,6	1,3	1,5	1,1	1,2	1,3
	9	2,2	1,9	2,4	2,2	2,2	1,7	1,6	1,6	1,7	1,7	1,3	1,5	1,2	1,4	1,4
	10	2,2	2,4	2,4	2,5	2,4	1,7	1,8	1,6	1,7	1,7	1,4	1,4	1,5	1,4	1,4
	11	2,2	2,2	2,6		2,3	1,9	1,9	1,6	1,7	1,8	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
	12	2,3	1,8	2,2	2,2	2,1	1,6	1,8	1,5	1,7	1,7	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
	13	2,2	2,2	2,0	2,1	2,1	1,8	1,8	1,6	1,7	1,7	1,5	1,6	1,4	1,4	1,5
	14	2,3	1,9	1,8	2,1	2,0	1,7	1,8	1,7	1,6	1,7	1,5	1,6	1,3	1,3	1,4
Phase	Tag	V4														
Versuch	7	A	F	I	J	\bar{x}	B	E	H	K	\bar{x}	C	D	G	L	\bar{x}
	8	2,0	2,0	2,2	1,9	2,0	1,6	1,8		1,5	1,6	1,3	1,5	1,1	1,2	1,3
	9	2,2	1,9	2,4	2,2	2,2	1,7	1,6	1,6	1,7	1,7	1,3	1,5	1,2	1,4	1,4
	10	2,2	2,4	2,4	2,5	2,4	1,7	1,8	1,6	1,7	1,7	1,4	1,4	1,5	1,4	1,4
	11	2,2	2,2	2,6		2,3	1,9	1,9	1,6	1,7	1,8	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
	12	2,3	1,8	2,2	2,2	2,1	1,6	1,8	1,5	1,7	1,7	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
	13	2,2	2,2	2,0	2,1	2,1	1,8	1,8	1,6	1,7	1,7	1,5	1,6	1,4	1,4	1,5
	14	2,3	1,9	1,8	2,1	2,0	1,7	1,8	1,7	1,6	1,7	1,5	1,6	1,3	1,3	1,4

Tab. 6.20: Ammoniak-Konzentrationen [mmol·l⁻¹] in V1-V4.

Phase	Tag	Kontrolle					3,38 mmol·d ⁻¹ FS					6,76 mmol·d ⁻¹ FS				
		A	F	I	J	\bar{x}	B	E	H	K	\bar{x}	C	D	G	L	\bar{x}
Versuch	7	12,5	11,5	13,1	11,1	12,1	11,8	10,3	12,1	12,0	11,6	11,3	9,8	11,8	12,4	11,3
	8	12,4	11,5	11,8	11,9	11,9	11,9	10,2	11,6	11,1	11,2	10,1	12,0	11,8	11,5	11,3
	9	12,5	11,5	13,0	13,5	12,6	13,0	10,2	13,2	13,3	12,4	12,8	12,0	13,3	12,2	12,6
	10	12,4	13,0	11,6	12,4	12,4	11,6	13,7	12,6	12,9	12,7	11,9	11,5	11,7	11,7	11,7
	11	10,6	11,8	11,2	11,9	11,4	11,4	11,9	11,7	12,6	11,9	11,7	9,9	11,3	11,3	11,1
	12	10,5	12,0	12,2	13,2	12,0	11,7	11,8	11,3	10,6	11,4	11,1	11,0	11,4	9,9	10,8
	13	10,5	11,1	12,6	12,4	11,7	10,2	11,9	11,2	12,9	11,6	10,3	11,1	12,4	12,1	11,5
14	11,2	11,1	11,9	12,3	11,6	11,4	11,4	11,9	12,3	11,8	11,2	11,5	12,0	11,8	11,6	
Phase	Tag	V2														
Versuch	7	C	D	G	L	\bar{x}	B	E	H	K	\bar{x}	A	F	I	J	\bar{x}
	8	12,7	12,7	14,2	11,6	12,8	12,4	13,3	12,8	12,4	12,7	10,7	12,1	14,2	12,5	12,4
	9	13,7	13,0	14,0	12,2	13,2	11,2	12,9	12,8	13,5	12,6	12,9	11,5	14,1	11,8	12,6
	10	14,3	13,8	13,9	14,2	14,1	12,6	12,6	13,6	12,5	12,8	12,3	12,4	13,8	12,8	12,8
	11	13,8	14,1	13,3	14,0	13,8	12,0	12,9	13,3	12,7	12,7	13,1	12,5	13,1	13,1	13,0
	12	13,8	12,4	12,7	12,5	12,8	12,9	12,4	13,0	12,5	12,7	13,0	12,6	13,4	12,6	12,9
	13	13,5	13,3	13,6	13,1	13,4	12,6	13,0	13,0	11,7	12,6	12,6	12,9	14,0	12,7	13,1
14	13,2	12,1	13,6	13,3	13,1	12,6	13,9	13,1	13,0	13,1	12,7	13,0	13,6	13,1	13,1	
14	12,8	11,7	14,1	11,2	12,5	14,1	13,3	13,7	12,8	13,5	12,6	13,1	13,7	12,9	13,0	
Phase	Tag	V3														
Versuch	7	B	E	H	K	\bar{x}	A	F	I	J	\bar{x}	C	D	G	L	\bar{x}
	8	13,9	13,1	13,5	14,3	13,7	14,1	14,3		13,5	14,0	13,7	13,4	15,4	11,8	13,6
	9	14,8	14,3	13,0	13,9	14,0	11,8	13,5	14,1	13,8	13,3	12,5	12,8	14,4	12,4	13,0
	10	12,6	13,6	13,2	12,9	13,1	12,1	13,3	13,5	13,7	13,2	13,6	11,7	12,3	12,6	12,5
	11	12,5	13,9	11,7	13,2	12,8	12,2	11,1	13,2	14,1	12,6	12,4	10,9	11,9	11,3	11,6
	12	13,2	14,2	13,0	13,8	13,5	10,2	13,7	9,8	12,4	11,5	12,9	12,2	12,6	12,0	12,4
	13	13,0	13,8	12,7	11,8	12,8	12,6	11,8	14,9	12,0	12,8	12,9	11,7	12,5	11,1	12,0
14	13,0	14,8	11,4	10,6	12,4	11,9	13,0	14,2	13,1	13,0	13,4	13,5	12,1	12,7	12,9	
14	12,5	12,5	12,8	13,9	12,9	11,2	11,7	14,2	11,6	12,2	12,9	12,6	12,2	12,9	12,7	
Phase	Tag	V3														
Versuch	7	A	F	I	J	\bar{x}	B	E	H	K	\bar{x}	C	D	G	L	\bar{x}
	8	9,0	8,7	9,6	8,7	9,0	10,9	9,9	9,3	8,8	9,7	9,9	9,2	6,9	9,4	8,9
	9	9,8	8,7	10,5	9,1	9,5	9,8	10,1	9,8	9,0	9,6	9,9	9,4	8,2	8,2	8,9
	10	9,1	9,4	10,5	9,4	9,6	9,4	10,0	9,8	9,4	9,7	9,7	9,0	6,6	10,1	8,8
	11	8,4	10,3	10,8	10,1	9,9	9,8	9,8	10,8	10,2	10,1	10,1	9,8	8,8	9,4	9,5
	12	9,9	10,2	10,6	10,0	10,2	10,1	9,8	9,2	9,0	9,5	10,0	9,3	8,1	9,3	9,2
	13	8,9	9,9	6,6	7,3	8,2	9,1	9,7	9,9	7,1	9,0	10,6	9,5	9,1	8,8	9,5
14	9,7	9,7	9,2	9,3	9,5	8,7	10,2	7,3	9,7	9,0	10,2	9,8	9,1	8,4	9,4	
14	11,1	9,4	10,1	10,9	10,4	9,9	9,7	8,5	9,8	9,5	8,4	7,6	8,7	8,2	8,2	

Tab. 6.21: Gasproduktion [ml·d⁻¹] in V1-V4

Phase	Tag	Kontrolle					3,38 mmol·d ⁻¹ FS					6,76 mmol·d ⁻¹ FS				
		A	F	I	J	\bar{x}	B	E	H	K	\bar{x}	C	D	G	L	\bar{x}
Versuch	7	476,0	402,3	464,0	405,8	437,0	292,3	469,1	291,4	386,4	359,8	540,3	440,9	293,6	531,0	451,5
	8	427,6	374,9	461,5	459,1	430,7	418,0	294,1	406,9	419,3	384,6	390,2	475,9	397,8	408,8	418,2
	9	368,4	463,0	462,3	492,9	446,7	323,9	432,8	474,9	419,2	412,7	463,7	510,7	575,2	408,4	489,5
	10	418,0	517,8	419,9	416,9	443,1	403,7	457,1	483,5	439,0	445,8	460,3	344,0	473,6	495,4	443,3
	11	431,6	449,7	326,0	325,3	383,1	450,9	486,7	498,9	437,2	468,4	461,6	334,4	408,1	410,9	403,8
	12	480,4	486,5	474,8	393,1	458,7	450,9	455,8	458,9	274,6	410,1	557,0	471,9	420,0	376,9	456,5
	13	451,7	533,2	459,5	371,4	453,9	520,6	443,5	510,1	442,7	479,2	448,7	495,7	551,4	377,0	468,2
14	398,8	320,7	440,1	357,5	379,3	373,7	372,0	446,8	460,0	413,1	437,2	417,5	626,9	383,6	466,3	
Phase	Tag	V2														
Versuch	7	327,9	244,2	327,2	351,8	312,8	301,9	331,3	341,1	383,3	339,4	403,8	406,3	383,1	428,3	405,4
	8	389,5	385,7	466,1	373,8	403,8	350,3	340,7	397,3	465,8	388,5	342,6	475,6	342,6	472,1	408,2
	9	442,8	383,8	484,5	494,3	451,4	319,5	405,2	494,2	419,5	409,6	409,3	435,9	338,1	403,7	396,7
	10	352,2	421,6	301,1	373,4	362,1	286,9	386,9	333,2	372,8	344,9	332,5	355,5	384,3	383,3	363,9
	11	411,5	341,7	399,6	346,1	374,7	295,0	319,8	380,5	307,7	325,8	344,7	396,3	370,1	420,1	382,8
	12	401,2	404,1	405,8	335,7	386,7	313,9	434,8	384,1	335,3	367,0	332,7	455,8	387,3	365,5	385,3
	13	380,6	289,2	360,4	353,2	345,8	319,4	481,5	451,8	348,4	400,3	356,9	422,8	403,6	370,9	388,5
14	356,2	271,7	429,4	374,0	357,9	366,1	486,4	425,6	334,4	403,1	378,6	418,6	365,9	373,6	384,2	
Phase	Tag	V3														
Versuch	7	291,3	175,7	274,9	313,2	263,8	258,0	296,2	280,4	251,6	271,6	229,7	297,7	348,5	260,8	284,2
	8	279,4	320,7	270,1	271,1	285,3	222,4	295,0	287,6	332,1	284,3	280,4	235,6	293,1	257,7	266,7
	9	201,7	269,5	259,3	352,0	270,6	280,4	370,6	293,2	247,7	298,0	292,3	272,9	305,8	333,0	301,0
	10	285,1	252,9	289,9	262,3	272,6	219,2	373,8	310,3	311,7	303,7	251,7	287,8	292,6	251,4	270,9
	11	268,8	269,8	322,7	265,4	281,7	271,4	289,5	274,8	298,2	283,4	265,6	272,4	299,6	257,9	273,9
	12	290,0	336,3	271,0	240,6	284,4	221,4	260,6	360,1	341,4	295,8	296,1	370,7	280,4	335,6	320,7
	13	249,5	345,0	274,6	233,0	275,5	224,8	268,0	289,1	314,2	274,0	296,0	330,7	311,5	288,3	306,6
14	277,0	314,3	364,0	283,4	309,7	202,3	320,5	348,4	301,7	293,2	271,0	327,6	305,6	300,5	301,2	
Phase	Tag	V4														
Versuch	7	383,8	499,3	373,6	392,8	412,4	454,3	384,6	322,5	465,5	406,7	397,0	413,9	461,0	322,2	398,5
	8	399,4	423,8	315,3	318,2	364,2	458,8	421,6	526,0	365,1	442,9	475,8	369,5	435,3	312,9	398,4
	9	352,6	315,0	302,6	247,3	304,4	473,6	339,9	413,6	315,5	385,6	391,1	341,6	390,1	353,1	368,9
	10	384,0	379,5	354,7	290,9	352,3	356,4	202,7	380,9	300,2	310,0	409,7	325,7	432,0	282,2	362,4
	11	275,8	423,1	371,3	296,1	341,6	443,2	403,8	365,4	266,6	369,7	429,3	378,4	306,9	237,2	337,9
	12	227,8	332,0	276,4	360,6	299,2	460,2	365,0	351,4	315,6	373,0	358,5	357,2	333,6	299,6	337,2
	13	243,1	415,1	368,6	341,9	342,2	372,9	344,1	385,3	413,3	378,9	363,8	320,6	465,0	341,2	372,6
14	443,6	348,7	421,4	308,8	380,6	437,2	346,1	359,4	264,7	351,8	355,3	434,4	423,0	333,1	386,4	

Tab. 6.22: CH₄-Produktion [ml·d⁻¹] in V1-V4

Phase	Tag	Kontrolle					3,38 mmol·d ⁻¹ FS					6,76 mmol·d ⁻¹ FS				
		A	F	I	J	\bar{x}	B	E	H	K	\bar{x}	C	D	G	L	\bar{x}
Versuch	7	117,9	109,8	122,0	116,5	116,6	74,9	124,5	77,3	109,8	96,6	122,4	101,6	65,7	130,7	105,1
	8	110,9	102,2	123,3	132,2	117,1	106,9	81,9	105,0	116,5	102,6	93,5	113,7	96,3	103,5	101,8
	9	102,6	129,4	127,3	152,3	127,9	83,3	118,4	124,2	118,5	111,1	116,9	127,5	144,0	112,8	125,3
	10	111,1	138,9	114,0	125,0	122,3	104,9	125,9	127,3	122,6	120,2	115,1	85,5	122,2	129,4	113,1
	11	117,7	130,8	89,2	105,5	110,8	117,7	136,2	132,7	123,2	127,4	120,2	86,3	108,4	105,6	105,1
	12	127,2	141,0	126,4	120,1	128,7	118,0	130,3	121,4	82,3	113,0	144,9	121,7	109,2	96,5	118,1
	13	124,2	147,3	127,5	111,7	127,7	136,2	125,5	129,3	122,0	128,2	118,2	120,0	133,1	93,8	116,3
14	106,3	89,1	120,8	109,0	106,3	100,1	101,8	120,6	125,3	111,9	111,3	101,2	152,8	98,0	115,8	
Phase	Tag	V2														
Versuch	7	99,4	71,3	99,7	113,2	95,9	80,9	97,8	93,1	120,7	98,1	98,6	104,3	92,2	117,3	103,1
	8	116,2	117,8	142,0	120,0	124,0	100,0	102,5	109,6	142,5	113,7	91,7	130,0	95,2	130,4	111,8
	9	133,8	117,2	151,7	158,6	140,3	90,3	117,2	140,0	132,7	120,0	113,1	117,3	103,8	113,7	112,0
	10	104,7	120,2	97,6	106,1	107,1	79,3	112,5	99,8	110,3	100,5	84,7	100,9	87,5	106,7	94,9
	11	115,3	102,0	120,6	114,8	113,2	84,8	93,9	107,9	92,5	94,8	87,7	108,3	99,4	101,5	99,2
	12	113,5	117,3	121,8	100,6	113,3	83,0	122,1	110,4	95,3	102,7	84,5	119,1	97,3	97,6	99,6
	13	104,0	83,6	109,2	108,9	101,4	86,3	133,1	109,7	95,4	106,1	89,0	113,9	111,5	97,7	103,0
14	104,2	84,7	129,5	115,1	108,4	98,3	139,5	114,9	98,0	112,7	96,9	116,4	103,0	94,2	102,6	
Phase	Tag	V3														
Versuch	7	89,7	56,8	88,2	98,1	83,2	71,5	90,8	80,8	74,7	79,4	56,8	85,1	96,4	73,7	78,0
	8	85,9	104,9	88,4	87,6	91,7	66,8	90,0	83,5	95,3	83,9	76,6	67,3	85,5	73,8	75,8
	9	67,2	92,2	84,7	109,1	88,3	83,2	110,4	85,6	76,9	89,0	81,1	70,0	87,2	92,3	82,7
	10	91,6	86,7	93,6	85,1	89,2	66,8	113,0	96,9	88,8	91,4	74,2	87,2	83,2	72,2	79,2
	11	84,3	88,4	101,3	86,8	90,2	77,6	89,1	93,7	88,0	87,1	78,8	78,9	84,8	74,3	79,2
	12	92,2	103,5	89,9	81,1	91,7	66,2	83,3	126,8	100,1	94,1	89,6	111,8	82,5	96,5	95,1
	13	77,7	115,8	95,2	78,8	91,9	67,2	85,7	88,9	94,4	84,0	85,7	105,3	90,9	84,4	91,6
14	89,6	114,5	120,4	90,0	103,6	60,3	98,5	110,6	92,4	90,5	81,2	107,9	88,0	89,7	91,7	
Phase	Tag	V4														
Versuch	7	101,3	133,4	96,1	111,1	110,5	100,5	92,5	77,4	121,0	97,9	89,0	89,0	94,4	69,6	85,5
	8	100,5	112,3	83,3	82,7	94,7	99,0	96,7	124,3	93,5	103,4	102,1	79,2	92,0	67,2	85,1
	9	88,0	81,4	76,4	67,5	78,3	104,1	81,4	94,6	76,1	89,1	78,7	70,8	81,7	70,9	75,5
	10	96,6	95,6	88,8	75,6	89,2	85,7	59,4	84,6	70,0	74,9	83,8	70,2	86,1	60,4	75,1
	11	72,2	110,6	97,3	76,0	89,0	97,3	100,0	87,1	63,7	87,0	90,0	81,3	66,0	51,8	72,3
	12	60,3	90,9	76,5	97,0	81,2	103,1	87,5	85,8	78,1	88,6	79,0	79,1	70,7	66,1	73,7
	13	63,2	104,3	99,5	94,7	90,4	89,9	80,6	92,2	100,4	90,8	80,7	75,8	99,3	74,7	82,6
14	110,7	89,7	111,4	86,7	99,6	107,1	84,9	87,8	66,6	86,6	83,3	102,1	92,2	75,0	88,1	

Tab. 6.23: CO₂-Produktion [ml·d⁻¹] in V1-V4.

Phase	Tag	Kontrolle					3,38 mmol·d ⁻¹ FS					6,76 mmol·d ⁻¹ FS				
		A	F	I	J	\bar{x}	B	E	H	K	\bar{x}	C	D	G	L	\bar{x}
Versuch	7	358,0	292,5	342,0	289,2	320,5	217,4	344,6	214,1	276,6	263,2	417,9	339,3	227,9	400,3	346,4
	8	316,8	272,6	338,2	326,9	313,6	311,1	212,2	301,9	302,8	282,0	296,7	362,2	301,5	305,3	316,4
	9	265,8	333,6	335,0	340,6	318,8	240,5	314,3	350,7	300,7	301,6	346,8	383,3	431,1	295,5	364,2
	10	306,9	378,9	305,8	291,9	320,9	298,8	331,2	356,2	316,4	325,7	345,1	258,5	351,4	365,9	330,2
	11	313,9	318,9	236,7	219,8	272,3	333,2	350,6	366,2	314,1	341,0	341,5	248,1	299,7	305,4	298,6
	12	353,2	345,5	348,4	273,0	330,0	333,0	325,6	337,5	192,3	297,1	412,1	350,2	310,8	280,5	338,4
	13	327,5	385,9	332,1	259,7	326,3	384,4	318,0	380,8	320,7	351,0	330,5	375,6	418,3	283,3	351,9
14	292,5	231,7	319,3	248,5	273,0	273,7	270,2	326,2	334,7	301,2	325,9	316,3	474,1	285,6	350,5	
Phase	Tag	V2														
Versuch	7	228,5	173,0	227,5	238,6	216,9	220,9	233,5	248,0	262,6	241,2	305,1	302,0	290,9	311,0	302,3
	8	273,4	267,9	324,2	253,8	279,8	250,3	238,2	287,7	323,3	274,9	251,0	345,6	247,4	341,7	296,4
	9	309,0	266,6	332,8	335,7	311,0	229,2	288,0	354,2	286,9	289,6	296,2	318,6	234,3	290,0	284,8
	10	247,5	301,4	203,6	267,3	254,9	207,6	274,4	233,4	262,5	244,5	247,7	254,7	296,9	276,6	269,0
	11	296,2	239,8	279,0	231,4	261,6	210,2	225,9	272,7	215,2	231,0	257,1	288,0	270,7	318,6	283,6
	12	287,7	286,8	284,1	235,1	273,4	230,9	312,6	273,8	240,0	264,3	248,2	336,7	290,0	267,9	285,7
	13	276,6	205,7	251,2	244,3	244,4	233,1	348,3	342,2	253,0	294,2	267,9	308,9	292,1	273,3	285,5
14	252,1	187,1	300,0	258,9	249,5	267,8	346,9	310,6	236,4	290,4	281,7	302,2	263,0	279,4	281,6	
Phase	Tag	V3														
Versuch	7	201,6	118,8	186,7	215,1	180,6	186,5	205,4	199,7	176,9	192,1	172,9	212,6	252,2	187,1	206,2
	8	193,5	215,8	181,7	183,5	193,6	155,6	205,0	204,1	236,8	200,4	203,8	168,4	207,7	183,9	190,9
	9	134,5	177,2	174,6	242,9	182,3	197,2	260,2	207,6	170,8	208,9	211,1	202,9	218,6	240,8	218,3
	10	193,5	166,2	196,3	177,3	183,3	152,4	260,7	213,4	223,0	212,4	177,5	200,6	209,4	179,3	191,7
	11	184,5	181,5	221,4	178,7	191,5	193,8	200,3	181,1	210,2	196,3	186,9	193,5	214,9	183,6	194,7
	12	197,8	232,8	181,1	159,4	192,8	155,2	177,2	233,3	241,2	201,7	206,4	258,9	197,9	239,2	225,6
	13	171,9	229,2	179,5	154,2	183,7	157,7	182,2	200,2	219,8	190,0	210,3	225,5	220,6	203,9	215,1
14	187,4	199,8	243,6	193,4	206,1	142,0	222,0	237,7	209,3	202,7	189,8	219,7	217,5	210,8	209,4	
Phase	Tag	V4														
Versuch	7	282,5	365,9	277,6	281,7	301,9	353,7	292,1	245,1	344,5	308,9	308,0	324,9	366,6	252,6	313,0
	8	298,9	311,5	232,1	235,5	269,5	359,8	324,9	401,6	271,6	339,5	373,8	290,2	343,3	245,8	313,3
	9	264,6	233,6	226,2	179,8	226,1	369,6	258,5	319,0	239,4	296,6	312,4	270,8	308,4	282,1	293,4
	10	287,4	283,9	265,9	215,3	263,1	270,7	143,2	296,3	230,2	235,1	325,9	255,5	346,0	221,8	287,3
	11	203,6	312,5	274,1	220,0	252,5	345,9	303,8	278,3	203,0	282,7	339,4	297,1	240,8	185,4	265,7
	12	167,5	241,1	199,9	263,5	218,0	357,2	277,4	265,6	237,4	284,4	279,5	278,1	262,9	233,5	263,5
	13	179,9	310,8	269,0	247,2	251,7	283,0	263,4	293,1	312,9	288,1	283,1	244,7	365,7	266,5	290,0
14	332,9	258,9	309,9	222,1	281,0	330,1	261,2	271,7	198,1	265,3	272,0	332,3	330,8	258,1	298,3	

Tab. 6.24: CH₄-Anteil [%] in V1-V4.

Phase	Tag	Kontrolle					3,38 mmol·d ⁻¹ FS					6,76 mmol·d ⁻¹ FS				
		A	F	I	J	\bar{x}	B	E	H	K	\bar{x}	C	D	G	L	\bar{x}
Versuch	7	24,8	27,3	26,3	28,7	26,8	25,6	26,5	26,5	28,4	26,8	22,7	23,1	22,4	24,6	23,2
	8	25,9	27,3	26,7	28,8	27,2	25,6	27,9	25,8	27,8	26,8	24,0	23,9	24,2	25,3	24,3
	9	27,9	27,9	27,5	30,9	28,6	25,7	27,4	26,2	28,3	26,9	25,2	25,0	25,0	27,6	25,7
	10	26,6	26,8	27,2	30,0	27,6	26,0	27,5	26,3	27,9	26,9	25,0	24,9	25,8	26,1	25,5
	11	27,3	29,1	27,4	32,4	29,0	26,1	28,0	26,6	28,2	27,2	26,0	25,8	26,6	25,7	26,0
	12	26,5	29,0	26,6	30,6	28,2	26,2	28,6	26,5	30,0	27,8	26,0	25,8	26,0	25,6	25,9
	13	27,5	27,6	27,7	30,1	28,2	26,2	28,3	25,4	27,6	26,8	26,3	24,2	24,1	24,9	24,9
14	26,7	27,8	27,5	30,5	28,1	26,8	27,4	27,0	27,2	27,1	25,5	24,3	24,4	25,5	24,9	
Phase	Tag	V2														
Versuchsphase	7	C	D	G	L	\bar{x}	B	E	H	K	\bar{x}	A	F	I	J	\bar{x}
	8	30,3	29,2	30,5	32,2	30,5	26,8	29,5	27,3	31,5	28,8	24,4	25,7	24,1	27,4	25,4
	9	29,8	30,5	30,5	32,1	30,7	28,6	30,1	27,6	30,6	29,2	26,8	27,3	27,8	27,6	27,4
	10	30,2	30,5	31,3	32,1	31,0	28,3	28,9	28,3	31,6	29,3	27,6	26,9	30,7	28,2	28,4
	11	29,7	28,5	32,4	28,4	29,8	27,6	29,1	30,0	29,6	29,1	25,5	28,4	22,8	27,8	26,1
	12	28,0	29,8	30,2	33,2	30,3	28,8	29,4	28,4	30,1	29,1	25,4	27,3	26,9	24,2	25,9
	13	28,3	29,0	30,0	30,0	29,3	26,5	28,1	28,7	28,4	27,9	25,4	26,1	25,1	26,7	25,8
14	27,3	28,9	30,3	30,8	29,3	27,0	27,7	24,3	27,4	26,6	25,0	27,0	27,6	26,3	26,5	
14	29,2	31,2	30,2	30,8	30,3	26,9	28,7	27,0	29,3	28,0	25,6	27,8	28,1	25,2	26,7	
Phase	Tag	V3														
Versuch	7	B	E	H	K	\bar{x}	A	F	I	J	\bar{x}	C	D	G	L	\bar{x}
	8	30,8	32,4	32,1	31,3	31,6	27,7	30,6	28,8	29,7	29,2	24,7	28,6	27,7	28,3	27,3
	9	30,8	32,7	32,7	32,3	32,1	30,0	30,5	29,0	28,7	29,6	27,3	28,6	29,2	28,6	28,4
	10	33,3	34,2	32,7	31,0	32,8	29,7	29,8	29,2	31,0	29,9	27,8	25,7	28,5	27,7	27,4
	11	32,1	34,3	32,3	32,4	32,8	30,5	30,2	31,2	28,5	30,1	29,5	30,3	28,4	28,7	29,2
	12	31,4	32,8	31,4	32,7	32,0	28,6	30,8	34,1	29,5	30,7	29,7	29,0	28,3	28,8	28,9
	13	31,8	30,8	33,2	33,7	32,4	29,9	32,0	35,2	29,3	31,6	30,3	30,2	29,4	28,7	29,6
14	31,1	33,6	34,7	33,8	33,3	29,9	32,0	30,7	30,1	30,7	29,0	31,8	29,2	29,3	29,8	
14	32,3	36,4	33,1	31,8	33,4	29,8	30,7	31,8	30,6	30,7	30,0	32,9	28,8	29,8	30,4	
Phase	Tag	V4														
Versuch	7	A	F	I	J	\bar{x}	B	E	H	K	\bar{x}	C	D	G	L	\bar{x}
	8	26,4	26,7	25,7	28,3	26,8	22,1	24,1	24,0	26,0	24,0	22,4	21,5	20,5	21,6	21,5
	9	25,2	26,5	26,4	26,0	26,0	21,6	23,0	23,6	25,6	23,4	21,5	21,5	21,1	21,5	21,4
	10	24,9	25,9	25,3	27,3	25,8	22,0	24,0	22,9	24,1	23,2	20,1	20,7	21,0	20,1	20,5
	11	25,2	25,2	25,0	26,0	25,4	24,0	29,3	22,2	23,3	24,7	20,5	21,6	19,9	21,4	20,8
	12	26,2	26,1	26,2	25,7	26,0	22,0	24,8	23,9	23,9	23,6	21,0	21,5	21,5	21,9	21,4
	13	26,5	27,4	27,7	26,9	27,1	22,4	24,0	24,4	24,8	23,9	22,0	22,2	21,2	22,1	21,9
14	26,0	25,1	27,0	27,7	26,5	24,1	23,4	23,9	24,3	23,9	22,2	23,7	21,4	21,9	22,3	
14	25,0	25,7	26,5	28,1	26,3	24,5	24,5	24,4	25,2	24,7	23,4	23,5	21,8	22,5	22,8	

Tab. 6.25: CO₂-Anteil [%] in V1-V4.

Phase	Tag	Kontrolle					3,38 mmol·d ⁻¹ FS					6,76 mmol·d ⁻¹ FS				
		A	F	I	J	\bar{x}	B	E	H	K	\bar{x}	C	D	G	L	\bar{x}
Versuch	7	75,2	72,7	73,7	71,3	73,2	74,4	73,5	73,5	71,6	73,2	77,4	77,0	77,6	75,4	76,8
	8	74,1	72,7	73,3	71,2	72,8	74,4	72,2	74,2	72,2	73,3	76,0	76,1	75,8	74,7	75,7
	9	72,1	72,1	72,5	69,1	71,4	74,3	72,6	73,9	71,7	73,1	74,8	75,0	75,0	72,4	74,3
	10	73,4	73,2	72,8	70,0	72,4	74,0	72,5	73,7	72,1	73,1	75,0	75,1	74,2	73,9	74,5
	11	72,7	70,9	72,6	67,6	71,0	73,9	72,0	73,4	71,8	72,8	74,0	74,2	73,4	74,3	74,0
	12	73,5	71,0	73,4	69,5	71,8	73,8	71,4	73,5	70,0	72,2	74,0	74,2	74,0	74,4	74,2
	13	72,5	72,4	72,3	69,9	71,8	73,8	71,7	74,7	72,4	73,2	73,7	75,8	75,9	75,1	75,1
	14	73,4	72,2	72,6	69,5	71,9	73,2	72,6	73,0	72,8	72,9	74,5	75,8	75,6	74,5	75,1
Phase	Tag	V2														
Versuch	7	C	D	G	L	\bar{x}	B	E	H	K	\bar{x}	A	F	I	J	\bar{x}
	8	69,7	70,8	69,5	67,8	69,5	73,2	70,5	72,7	68,5	71,2	75,6	74,3	75,9	72,6	74,6
	9	70,2	69,5	69,5	67,9	69,3	71,5	69,9	72,4	69,4	70,8	73,2	72,7	72,2	72,4	72,6
	10	69,8	69,5	68,7	67,9	69,0	71,7	71,1	71,7	68,4	70,7	72,4	73,1	69,3	71,8	71,6
	11	70,3	71,5	67,6	71,6	70,2	72,4	70,9	70,1	70,4	70,9	74,5	71,6	77,3	72,2	73,9
	12	72,0	70,2	69,8	66,9	69,7	71,3	70,6	71,7	70,0	70,9	74,6	72,7	73,1	75,8	74,1
	13	71,7	71,0	70,0	70,0	70,7	73,6	71,9	71,3	71,6	72,1	74,6	73,9	74,9	73,3	74,2
	14	72,7	71,1	69,7	69,2	70,7	73,0	72,4	75,7	72,6	73,4	75,1	73,1	72,4	73,7	73,5
Phase	Tag	V3														
Versuch	7	B	E	H	K	\bar{x}	A	F	I	J	\bar{x}	C	D	G	L	\bar{x}
	8	69,2	67,7	67,9	68,7	68,4	72,3	69,4	71,2	70,3	70,8	75,3	71,4	72,4	71,7	72,7
	9	69,2	67,3	67,3	67,7	67,9	70,0	69,5	71,0	71,3	70,4	72,7	71,4	70,8	71,4	71,6
	10	66,7	65,8	67,3	69,0	67,2	70,3	70,2	70,8	69,0	70,1	72,2	74,3	71,5	72,3	72,6
	11	67,9	65,7	67,7	67,6	67,2	69,5	69,8	68,8	71,5	69,9	70,5	69,7	71,6	71,3	70,8
	12	68,6	67,3	68,6	67,3	68,0	71,4	69,2	65,9	70,5	69,3	70,3	71,0	71,7	71,2	71,1
	13	68,2	69,2	66,8	66,3	67,6	70,1	68,0	64,8	70,7	68,4	69,7	69,8	70,6	71,3	70,4
	14	68,9	66,4	65,4	66,2	66,7	70,1	68,0	69,3	70,0	69,3	71,1	68,2	70,8	70,7	70,2
Phase	Tag	V4														
Versuch	7	A	F	I	J	\bar{x}	B	E	H	K	\bar{x}	C	D	G	L	\bar{x}
	8	73,6	73,3	74,3	71,7	73,2	77,9	75,9	76,0	74,0	76,0	77,6	78,5	79,5	78,4	78,5
	9	74,8	73,5	73,6	74,0	74,0	78,4	77,1	76,4	74,4	76,6	78,6	78,6	78,9	78,5	78,6
	10	75,1	74,2	74,8	72,7	74,2	78,0	76,0	77,1	75,9	76,8	79,9	79,3	79,1	79,9	79,5
	11	74,8	74,8	75,0	74,0	74,7	76,0	70,7	77,8	76,7	75,3	79,5	78,5	80,1	78,6	79,2
	12	73,8	73,9	73,8	74,3	74,0	78,1	75,2	76,2	76,1	76,4	79,1	78,5	78,5	78,2	78,6
	13	73,5	72,6	72,3	73,1	72,9	77,6	76,0	75,6	75,2	76,1	78,0	77,9	78,8	77,9	78,1
	14	74,0	74,9	73,0	72,3	73,5	75,9	76,6	76,1	75,7	76,1	77,8	76,4	78,7	78,1	77,7
Phase	Tag	V4														
Versuch	7	A	F	I	J	\bar{x}	B	E	H	K	\bar{x}	C	D	G	L	\bar{x}
	8	73,6	73,3	74,3	71,7	73,2	77,9	75,9	76,0	74,0	76,0	77,6	78,5	79,5	78,4	78,5
	9	74,8	73,5	73,6	74,0	74,0	78,4	77,1	76,4	74,4	76,6	78,6	78,6	78,9	78,5	78,6
	10	75,1	74,2	74,8	72,7	74,2	78,0	76,0	77,1	75,9	76,8	79,9	79,3	79,1	79,9	79,5
	11	74,8	74,8	75,0	74,0	74,7	76,0	70,7	77,8	76,7	75,3	79,5	78,5	80,1	78,6	79,2
	12	73,8	73,9	73,8	74,3	74,0	78,1	75,2	76,2	76,1	76,4	79,1	78,5	78,5	78,2	78,6
	13	73,5	72,6	72,3	73,1	72,9	77,6	76,0	75,6	75,2	76,1	78,0	77,9	78,8	77,9	78,1
	14	74,0	74,9	73,0	72,3	73,5	75,9	76,6	76,1	75,7	76,1	77,8	76,4	78,7	78,1	77,7
Phase	Tag	V4														
Versuch	7	A	F	I	J	\bar{x}	B	E	H	K	\bar{x}	C	D	G	L	\bar{x}
	8	73,6	73,3	74,3	71,7	73,2	77,9	75,9	76,0	74,0	76,0	77,6	78,5	79,5	78,4	78,5
	9	74,8	73,5	73,6	74,0	74,0	78,4	77,1	76,4	74,4	76,6	78,6	78,6	78,9	78,5	78,6
	10	75,1	74,2	74,8	72,7	74,2	78,0	76,0	77,1	75,9	76,8	79,9	79,3	79,1	79,9	79,5
	11	74,8	74,8	75,0	74,0	74,7	76,0	70,7	77,8	76,7	75,3	79,5	78,5	80,1	78,6	79,2
	12	73,8	73,9	73,8	74,3	74,0	78,1	75,2	76,2	76,1	76,4	79,1	78,5	78,5	78,2	78,6
	13	73,5	72,6	72,3	73,1	72,9	77,6	76,0	75,6	75,2	76,1	78,0	77,9	78,8	77,9	78,1
	14	74,0	74,9	73,0	72,3	73,5	75,9	76,6	76,1	75,7	76,1	77,8	76,4	78,7	78,1	77,7

Tab. 6.26: Luftdruck [hPa] in V1-V4.

Phase	Tag	Kontrolle				3,38 mmol·d ⁻¹ FS						6,76 mmol·d ⁻¹ FS				
		A	F	I	J	\bar{x}	B	E	H	K	\bar{x}	C	D	G	L	\bar{x}
Versuch	7	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013
	8	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013
	9	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013
	10	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013
	11	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013
	12	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013
	13	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013
14	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	
Phase	Tag	V2														
Versuch	7	C	D	G	L	\bar{x}	B	E	H	K	\bar{x}	A	F	I	J	\bar{x}
	8	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013
	9	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013
	10	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013
	11	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013
	12	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013
	13	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013
14	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	1013	
Phase	Tag	V3														
Versuch	7	B	E	H	K	\bar{x}	A	F	I	J	\bar{x}	C	D	G	L	\bar{x}
	8	1003	1003	1003	1003	1003	1003	1003	1003	1003	1003	1003	1003	1003	1003	1003
	9	970	970	970	970	970	970	970	970	970	970	970	970	970	970	970
	10	975	975	975	975	975	975	975	975	975	975	975	975	975	975	975
	11	985	985	985	985	985	985	985	985	985	985	985	985	985	985	985
	12	1020	1020	1020	1020	1020	1020	1020	1020	1020	1020	1020	1020	1020	1020	1020
	13	1029	1029	1029	1029	1029	1029	1029	1029	1029	1029	1029	1029	1029	1029	1029
14	1030	1030	1030	1030	1030	1030	1030	1030	1030	1030	1030	1030	1030	1030	1030	
Phase	Tag	V4														
Versuch	7	A	F	I	J	\bar{x}	B	E	H	K	\bar{x}	C	D	G	L	\bar{x}
	8	1037	1037	1037	1037	1037	1037	1037	1037	1037	1037	1037	1037	1037	1037	1037
	9	1010	1010	1010	1010	1010	1010	1010	1010	1010	1010	1010	1010	1010	1010	1010
	10	1017	1017	1017	1017	1017	1017	1017	1017	1017	1017	1017	1017	1017	1017	1017
	11	1016	1016	1016	1016	1016	1016	1016	1016	1016	1016	1016	1016	1016	1016	1016
	12	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024
	13	1026	1026	1026	1026	1026	1026	1026	1026	1026	1026	1026	1026	1026	1026	1026
14	1032	1032	1032	1032	1032	1032	1032	1032	1032	1032	1032	1032	1032	1032	1032	

Tab. 6.27: Temperatur [°C] in V1-V4.

Phase	Tag	Kontrolle					3,38 mmol·d ⁻¹ FS					6,76 mmol·d ⁻¹ FS				
		A	F	I	J	\bar{x}	B	E	H	K	\bar{x}	C	D	G	L	\bar{x}
Versuch	7	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0
	8	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0
	9	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0
	10	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0
	11	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0
	12	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0
	13	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0
	14	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0
Phase	Tag	V2														
Versuch	7	C	D	G	L	\bar{x}	B	E	H	K	\bar{x}	A	F	I	J	\bar{x}
	8	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0
	9	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0
	10	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0
	11	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0
	12	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0
	13	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0
	14	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0
Phase	Tag	V3														
Versuch	7	B	E	H	K	\bar{x}	A	F	I	J	\bar{x}	C	D	G	L	\bar{x}
	8	23,0	23,0	23,0	23,0	23,0	23,0	23,0	23,0	23,0	23,0	23,0	23,0	23,0	23,0	23,0
	9	24,0	24,0	24,0	24,0	24,0	24,0	24,0	24,0	24,0	24,0	24,0	24,0	24,0	24,0	24,0
	10	23,0	23,0	23,0	23,0	23,0	23,0	23,0	23,0	23,0	23,0	23,0	23,0	23,0	23,0	23,0
	11	22,0	22,0	22,0	22,0	22,0	22,0	22,0	22,0	22,0	22,0	22,0	22,0	22,0	22,0	22,0
	12	22,0	22,0	22,0	22,0	22,0	22,0	22,0	22,0	22,0	22,0	22,0	22,0	22,0	22,0	22,0
	13	22,0	22,0	22,0	22,0	22,0	22,0	22,0	22,0	22,0	22,0	22,0	22,0	22,0	22,0	22,0
	14	22,0	22,0	22,0	22,0	22,0	22,0	22,0	22,0	22,0	22,0	22,0	22,0	22,0	22,0	22,0
Phase	Tag	V4														
Versuch	7	A	F	I	J	\bar{x}	B	E	H	K	\bar{x}	C	D	G	L	\bar{x}
	8	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0
	9	17,0	17,0	17,0	17,0	17,0	17,0	17,0	17,0	17,0	17,0	17,0	17,0	17,0	17,0	17,0
	10	17,5	17,5	17,5	17,5	17,5	17,5	17,5	17,5	17,5	17,5	17,5	17,5	17,5	17,5	17,5
	11	18,0	18,0	18,0	18,0	18,0	18,0	18,0	18,0	18,0	18,0	18,0	18,0	18,0	18,0	18,0
	12	18,0	18,0	18,0	18,0	18,0	18,0	18,0	18,0	18,0	18,0	18,0	18,0	18,0	18,0	18,0
	13	18,0	18,0	18,0	18,0	18,0	18,0	18,0	18,0	18,0	18,0	18,0	18,0	18,0	18,0	18,0
	14	18,0	18,0	18,0	18,0	18,0	18,0	18,0	18,0	18,0	18,0	18,0	18,0	18,0	18,0	18,0

Tab. 6.28: Mikrobielle Proteinsynthese [mg·d⁻¹] in V1-4.

Protein	Kontrolle					3,38 mmol·d ⁻¹ FS					6,76 mmol·d ⁻¹ FS				
	A	F	I	J	\bar{x}	B	E	K	H	\bar{x}	C	D	G	L	\bar{x}
LAM	818,3	814,5	704,9	721,8	764,9	782,0	793,1	734,7	776,7	771,6	759,9	744,7	781,9	803,5	772,5
SAM	139,1	129,0	125,1	122,0	128,8	147,2	159,3	115,9	116,4	134,7	151,0	138,6	107,0	115,3	128,0
Gesamt	957,4	943,4	830,0	843,8	893,7	929,2	952,4	850,6	893,0	906,3	910,9	883,4	888,9	918,8	900,5
	V2														
	C	D	G	L	\bar{x}	B	E	H	K	\bar{x}	A	F	I	J	\bar{x}
LAM	583,6	641,6	598,4	637,5	615,3	576,1	597,7	580,2	597,2	587,8	615,4	587,7	551,6	618,1	593,2
SAM	156,8	139,9	132,9	151,9	145,4	141,7	144,7	169,2	169,1	156,2	128,9	166,8	138,3	169,8	150,9
Gesamt	740,4	781,5	731,3	789,4	760,6	717,8	742,4	749,5	766,3	744,0	744,3	754,5	690,0	787,9	744,2
	V3														
	B	E	H	K	\bar{x}	A	F	I	J	\bar{x}	C	D	G	L	\bar{x}
LAM	532,9	506,0	520,6	436,7	499,0	628,1	587,8	470,1	523,9	552,5	578,0	584,8	582,9	568,4	578,5
SAM	133,7	118,1	122,5	151,9	131,5	134,9	127,9	136,5	135,9	133,8	146,6	133,4	152,4	150,3	145,7
Gesamt	666,6	624,1	643,1	588,5	630,6	763,0	715,7	606,6	659,8	686,3	724,6	718,3	735,3	718,6	724,2
	V4														
	A	F	I	J	\bar{x}	B	E	H	K	\bar{x}	C	D	G	L	\bar{x}
LAM	292,9	305,7	317,9	304,9	305,3	290,1	255,3	348,9	334,4	307,2	314,7	312,7	409,1	294,9	332,9
SAM	148,0	155,4	135,5	150,4	147,3	148,1	138,2	173,5	151,9	152,9	133,0	158,2	150,6	156,9	149,7
Gesamt	440,9	461,1	453,4	455,3	452,7	438,1	393,5	522,4	486,3	460,1	447,8	470,9	559,7	451,8	482,5

Tab. 6.29: Effizienzen der mikrobiellen Proteinsynthese [g Protein:(kg abgebauter OS)⁻¹] in V1-4.

Kontrolle					3,38 mmol·d ⁻¹ FS					6,76 mmol·d ⁻¹ FS				
V1														
A	F	I	J	\bar{x}	B	E	K	H	\bar{x}	C	D	G	L	\bar{x}
174,57	165,08	153,34	160,45	163,4	162,39	177,79	161,29	165,15	166,7	158,64	163,45	160,43	164,15	161,7
V2														
C	D	G	L	\bar{x}	B	E	H	K	\bar{x}	A	F	I	J	\bar{x}
132,27	141,09	127,87	142,76	136,0	138,02	143,17	137,3	141,16	139,9	138,51	142,89	129,21	140,1	137,7
V3														
B	E	H	K	\bar{x}	A	F	I	J	\bar{x}	C	D	G	L	\bar{x}
122,85	120,45	129,12	113,76	121,5	142,62	134,9	121,56	131,19	132,6	137,83	142,29	139,56	143,04	140,7
V3														
A	F	I	J	\bar{x}	B	E	K	H	\bar{x}	C	D	G	L	\bar{x}
79,72	82,48	79,80	84,76	81,7	75,14	71,89	90,96	86,59	81,1	75,39	85,84	96,47	86,18	86,0

Tab. 6.30: Verdaulichkeiten [%] der organischen Substanz (OS), des Rohproteins (XP), der sauren (ADF) und neutralen Detergenzienfasern (NDF) in V1-4.

Rohnährstoff	Kontrolle					3,38 mmol·d ⁻¹ FS					6,76 mmol·d ⁻¹ FS				
	V1														
	A	F	I	J	\bar{x}	B	E	K	H	\bar{x}	C	D	G	L	\bar{x}
OS	60,8	63,4	60,0	58,3	60,6	63,4	59,4	58,5	59,9	60,3	63,7	59,9	61,4	62,1	61,8
XP	73,0	74,7	73,8	71,4	73,2	74,5	72,6	71,7	73,3	73,0	74,6	71,2	73,2	75,8	72,8
NDF	38,6	42,0	35,7	34,8	37,8	43,1	36,2	32,9	35,5	36,9	43,1	37,2	39,5	40,0	40,0
ADF	34,2	35,5	29,4	28,5	31,9	39,2	30,4	26,0	29,7	31,3	38,1	31,9	33,1	33,8	34,2
V2															
	C	D	G	L	\bar{x}	B	E	H	K	\bar{x}	A	F	I	J	\bar{x}
OS	62,1	61,4	63,4	61,3	62,1	57,7	57,5	60,5	60,2	59,0	59,6	58,6	59,2	62,4	60,0
XP	74,5	74,4	74,3	73,8	74,3	70,5	70,3	73,4	72,9	71,8	72,1	71,6	72,3	75,3	72,8
NDF	41,4	41,1	44,3	40,0	41,7	34,6	34,6	38,7	37,6	36,4	38,9	37,7	37,2	40,8	38,7
ADF	36,4	34,6	39,3	35,3	36,4	31,0	29,0	34,6	33,2	32,0	32,7	33,3	33,6	36,6	34,1
V3															
	B	E	H	K	\bar{x}	A	F	I	J	\bar{x}	C	D	G	L	\bar{x}
OS	60,2	57,5	55,3	57,4	57,6	59,3	58,9	55,3	55,8	57,3	58,3	56,0	58,4	55,7	57,1
XP	71,7	68,7	66,3	68,5	68,8	70,4	70,9	68,0	68,5	69,5	70,3	68,3	70,6	66,8	69,0
NDF	40,7	36,1	33,3	34,6	36,2	41,4	38,8	32,3	33,5	36,5	37,5	34,7	36,1	33,7	35,5
ADF	35,0	32,6	26,2	29,4	30,8	36,6	33,9	28,8	27,8	31,8	34,0	33,0	32,4	27,4	31,7
V4															
	A	F	I	J	\bar{x}	B	E	K	H	\bar{x}	C	D	G	L	\bar{x}
OS	55,7	56,3	57,2	54,1	55,8	58,7	55,1	57,8	56,6	57,1	59,8	55,2	58,4	52,8	56,6
XP	53,0	56,2	56,9	50,5	54,2	56,2	51,0	60,6	56,4	56,1	57,7	54,7	56,1	49,5	54,5
NDF	24,1	24,0	26,4	22,4	24,2	28,3	23,4	24,4	27,5	25,9	26,7	22,2	27,3	21,2	24,4
ADF	16,4	15,6	16,7	15,2	16,0	20,1	16,1	11,6	17,9	16,4	19,8	14,9	18,7	12,9	16,6

Tab. 6.31: Protozoa-Zahlen [10³·ml⁻¹] in der Nativ-Probe und an Tag 1, 7, 14 der V1-4.

Tage	Kontrolle					3,38 mmol·d ⁻¹ FS					6,76 mmol·d ⁻¹ FS				
	V1														
nativ	121,6	117,2	113,2		117,3					\bar{x}					\bar{x}
1	38,7	37,7	39,5	35,1	37,7	22,4	34,0	35,2	32,5	31,0	34,1	36,4	32,5	33,1	34,0
7	11,9	13,1	14,0	14,1	13,3	12,9	13,5	13,5	11,3	12,8	11,5	10,5	10,0	8,9	10,2
14	12,9	13,1	12,0	12,7	12,7	15,2	15,9	12,4	11,7	13,8	17,3	17,2	11,5	12,0	14,5
V2															
nativ	365,8	369,6	369,6		368,3					\bar{x}					\bar{x}
1	74,9	65,6	74,7	70,1	71,3	69,9	76,1	81,6	80,5	77,0	72,4	82,7	75,2	80,5	77,7
7	10,8	9,6	12,1	10,4	10,7	9,9	12,1	8,3	11,9	10,5	11,5	10,3	10,5	10,9	10,8
14	9,7	10,8	10,5	11,1	10,5	9,3	11,5	10,7	6,7	9,5	10,3	15,3	11,1	9,2	11,5
V3															
nativ	444,2	328,5	252,0		341,6					\bar{x}					\bar{x}
1	78,4	67,7	89,1	67,2	75,6	82,4	83,7	73,1	93,6	83,2	88,8	69,6	79,5	67,2	76,3
7	8,5	9,2	7,6	9,6	8,7	6,8	8,4	8,8	10,0	8,5	9,1	9,1	11,2	12,5	10,5
14	3,9	6,9	4,5	6,3	5,4	5,6	4,8	6,3	4,8	5,4	4,1	4,8	5,5	5,1	4,9
V4															
nativ	231,4	209,0	210,9		217,1					\bar{x}					\bar{x}
1	47,5	52,0	38,4	54,1	48,0	50,9	38,7	47,5	41,1	44,5	52,3	49,3	84,0	34,1	54,9
7	13,1	14,8	12,7	14,1	13,7	8,1	9,5	18,8	11,9	12,1	5,7	8,5	13,6	9,6	9,4
14	8,3	5,6	28,1	13,6	13,9	6,0	7,7	16,7	14,5	11,2	6,3	8,9	12,7	9,3	9,3

6.4 Sequenzen der Klone

Die Sequenzen der ausgewählten Klone sind in 5'-3'-Richtung aufgeführt. Die Primersequenzen (Com1 *fw* /Com2 *rv*) sind unterstrichen. Die Bezeichnung der Sequenzen setzt sich aus der Banden Nr. und der Klon Nr. zusammen.

1 Klon 1

CAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTCCCGAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAG
CGCAGGCGGTTTAATAAGTCTGAAGTTAAAGGCAGTGGCTTAACCATTGTTTCGCTTTGGAA
ACTGTTAGACTTGAGTGCAGAAGGGGAGAGTGGAAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTA
GATATATGGAGGAACACCGGTGGCGAAAGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCT
CGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGT
GCTAGGTGTTAGGCCCTTTCCGGGGCTTAGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCT
GGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGG

1 Klon 2

CAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTCCCGAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAG
CGCAGGCGGTTTAATAAGTCTGAAGTTAAAGGCAGTGGCTTAACCATTGTTTCGCTTTGGAA
ACTGTTAGACTTGAGTGCAGAAGGGGAGAGTGGAAATTCATGTGCAGCGGTGAAATGCGTA
GATATATGGAGGAACACCGGTGGCGAAAGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCT
CGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGT
GCTAGGTGTTAGGCCCTTTCCGGGGCTTAGTGCCGCAGCTAACGCATTGAGCACTCCGCCT
GGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGG

2 Klon 2

CAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGACAAGCGTTATCCGGATTTACTGGGCGTAAAGGGCG
TGTAGGCGGTCTTGCAAGTCAGAAGTGAATTCCTGAGCTCAACTCGGGCGCTGCTTCTGA
AACTGCAGGACTTGAGTGCTGGAGGGGATAGCGGAATTCCTAGTGGAGCGGTAAAATGCGC
AGATATTAGGAAGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCTATCTGGACAGTAACTGACGCTGAGGC
GCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAA
TGTTAGGTGTTGCGGGTATCGACCCCTGCAGTGCCGGAGTAAACACAATAAACATTCCGCC
TGGGGAGTACGCGCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGG

3 Klon 1

CAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTCCCGAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAG
CGCAGGCGGTTTAATAAGTCTGAAGTTAAAGGCAGTGGCTTAACCATTGTTTCGCTTTGGAA
ACTGTTAGACTTGAGTGCAGAAGGGGAGAGTGGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTA
GATATATGGAGGAACACCGGTGGCGAAAGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCT
CGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGT
GCTAGGTGTTAGGCCCTTTCCGGGGCTTAGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCT
GGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGG

3 Klon 2

CAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTCCCGAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAG
CGCAGGCGGTTTAATAAGTCTGAAGTTAAAGGCAGTGGCTTAACCATTGTTTCGCTTTGGAA
ACTGTTAGACTTGAGTGCAGAAGGGGAGAGTGGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTA
GATATATGGAGGAACACCGGTGGCGAAAGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCT
CGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGAAT
ACTAGGTGTGGGGGACTGACCCCTTCCGTGCCGCAGTTAACACAATAAGTATTCCACCTG
GGGAGTACGGCCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGG

3 Klon 3

CAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTCCCGAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAG
CGCAGGCGGTTTAATAAGTCTGAAGTTAAAGGCAGTGGCTTAACCATTGTTTCGCTTTGGAA
ACTGTTAGACTTGAGTGCAGAAGGGGAGAGTGGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTA
GATATATGGAGGAACACCGGTGGCGAAAGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCT
CGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGT
GCTAGGTGTTAGGCCCTTTCCGGGGCTTAGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCT
GGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGG

4 Klon 2

CAGCAGCCGCGGTAATACGGAAGGTCCAGGCGTTATCCGGATTTATTGGGTTTAAAGGGAG
CGCAGGCTGATGATTAGGCGTGACGTGAAATGTAGCCGCTCAACGGCTGAACTGCGTCGCG
AACTGGTTATCTTGAGTGAGTTCGATGTTGGCGGAACTCGTGGTGTAGCGGTGAAATGCTT
AGATATCACGAAGAACTCCGATTGCGAAGGCAGCCAACAAGGCCTTTACTGACGCTAAAGC
TCGAAGGTGCGGGTATCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCGCACGGTAAACGATGGA
TGCCCCTGTTTTCGATATACTGTGAGCGGCCAAGAGAAATCGTTAAGCATCCCACCTGGG
GAGTACGCCGCAACGGTGAAACTCAAAGGAATTGACGG

4 Klon 3

CAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCCGGAATGATTGGGCGTAAAGGGCG
CGTAGGCGGTAATTTAAGTCTGTCTGTGAAACTGCGGGGCTCAGCCCCGTATGGCGATGGAA
ACTGGGTTACTTGAGTGCAGGAGAGGAAAGGGGAACTCCCAGTGTAGCGGTGAAATGCGTA
GATATTGGGAAGAACACCCGGTGGCGAAGGCGCCTTTCTGGACTGTGTCTGACGCTGAGATG
CGAAAGCCAGGGTAGCGAACGGGATTAGATACCCCGGTAGTCCTGGCCGTAAACGATGGGT
ACTAGGTGTGGGAGGTATCGACCCCTTCCGTGCCGGAGTTAACGCAATAAGTACCCCGCCT
GGGGAGTACGGCCGCAAGGCTTAAACTCAAAGGAATTGACGG

5 Klon 2

CAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGAG
CGCAGGTGGGATTGTAAGTCAGTCTTAAAAGTTCGGGGCTCAACCCCGTGATGGGATTGAA
ACTACAATTCTTGAGTGCAGGAGAGGAAAGCGGAATTCCTAGTGTAGCAGTCAAATGCGTA
GATATTAGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGCCTTTCTGGACTGTAAGTACACTGAGGCT
CGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGAAT
ACTAGGTGTGGGGGACTGACCCTCTCCGTGCCGCAGTTAACACAATAAGTATTCCACCTG
GGGAGTACGGCCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGG

5 Klon 3

CAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCA
TG TAGGCGGTAATTTAAGTCTGTCTGTGAAACTGCGGGGCTCAGCCCCGTATGGCGATGGAA
ACTGGGTTACTTGAGTGCAGGAGAGGAAAGGGGAACTCCCAGTGTAGCGGTGAAATGCGTA
GATATTGGGAAGAACACCCGGTGGCGAAGGCGCCTTTCTGGACTGTGTCTGACGCTGAGATG
CGAAAGCCAGGGTAGCGAACGGGATTAGATACCCCGGTAGTCCTGGCCGTAAACGATGGGT
ACTAGGTGTGGGAGGTATCGACCCCTTCCGTGCCGGAGTTAACGCAATAAGTACCCCGCCT
GGGGAGTACGGCCGCAAGGCTTAAACTCAAAGGAATTGACGG

6 Klon 2

CAGCAGCCGCGGTAATACGGAAGGTCCGGGCGTTATCCGGATTTATTGGGTTTAAAGGGAG
CGTAGGCCGTTTGGTAAGCGTGTGTGAAATGTCCGGGCTCAACCTGGGCACTGCAGCGCG
AACTGCCAGACTTGAGTGCAGGAGGAGCGGGCGGAATTCGTGGTGTAGCGGTGAAATGCTT
AGATATCACGAAGAAGTCCAATTGCGAAGGCAGCTCGCTGTAGTGTACTGACGCTAAAGC
TCGAAAGTGCGGGTATCGAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCGCACGGTAAACGATGGA
TGCCCGCTGTTTGCCCTTCGGGGTGAAGTGGCTAAGCGAAAGCGTTAAGCATCCCACCTGGG
GAGTACGCCGGCAACGGTGAAACTCAAAGGAATTGACGG

7 Klon 2

CAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCA
TGTAGGCGGTAATTTAAGTCTGTCGTGAAACTGCGGGGCTCAGCCCCGTATGGCGATGGAA
ACTGGGTTACTTGAGTGCAGGAGAGGAAAGGGGAACTCCCAGTGTAGCGGTGAAATGCGTA
GATATTGGGAAGAACACCGGTGGCGAAGGCGCCTTTCTGGACTGTGTCTGACGCTGAGATG
CGAAAGCCAGGGTAGCGAACGGGATTAGATACCCCGGTAGTCCTGGCCGTAAACGATGGGT
ACTAGGTGTGGGAGGTATCGACCCCTTCCGTGCCGGAGTTAACGCAATAAGTACCCCGCCT
GGGGAGTACGGCCGCAAGGCTTAAACTCAAAGGAATTGACGG

7 Klon 3

CAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCA
TGTAGGCGGTAATTTAAGTCTGTCGTGAAACTGCGGGGCTCAGCCCCGTATGGCGATGGAA
ACTGGGTTACTTGAGTGCAGGAGAGGAAAGGGGAACTCCCAGTGTAGCGGTGAAATGCGTA
GATATTGGGAAGAACACCGGTGGCGAAGGCGCCTTTCTGGACTGTGTCTGACGCTGAGATG
CGAAAGCCAGGGTAGCGAACGGGATTAGATACCCCGGTAGTCCTGGCCGTAAACGATGGGT
ACTAGGTGTGGGAGGTATCGACCCCTTCCGTGCCGGAGTTAACGCAATAAGTATTCCACCT
GGGGAGTACGGCCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGG

8 Klon 3

CAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCA
TGTAGGCGGTAATTTAAGTCTGTCGTGAAGCTGCGGGGCTCAGCCCCGTATGGCGATGGAA
ACTGGGTTACTTGAGTGCAGGAGAGGAAAGGGGAACTCCCAGTGTAGCGGTGAAATGCGTA
GATATTGGGAAGAACACCGGTGGCGAAGGCGCCTTTCTGGACTGTGTCTGACGCTGAGATG
CGAAAGCCAGGGTAGCGAACGGGATTAGATACCCCGGTAGTCCTGGCCGTAAACGATGGGT
ACTAGGTGTGGGAGGTATCGACCCCTTCCGTGCCGGAGTTAACGCAATAAGTACCCCGCCT
GGGGAGTACGGCCGCAAGGCTTAAACTCAAAGGAATTGACGG

9 Klon 1

CAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGATTTATTGGGTTTAAAGGGAG
CGCAGGCCGATTGGTAAGCGTGACGTGAAATGTAGCCGCTCAACGGCTGAACTGCGTCGCG
AACTGGTTATCTTGAGTGAGTTCGATGTTGGCGGAATTTGTGGTGTAGCGGTGAAATGCTT
AGATATCACGAAGAACTCCGATTGCGAAGGCAGCCAACAAGGCCTTTACTGACGCTAAAGC
TCGAAGGTGCGGGTATCGAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCGCACGGTAAACGATGGA
TGCCCGCTATTTGCGATATACTGTGAGCGGCCAAGAGAAATCGTTAAGCATCCCACCTGGG
GAGTACGCCGGCAACGGTGAAACTCAAAGGAATTGACGG

10 Klon 3

CAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCA
TGTAGGCGGTAATTTAAGTCTGTCGTGAAACTGCGGGGCTCAGCCCCGTATGGCGATGGAA
ACTGGGTTACTTGAGTGCTGGAGAGGAAAGGGGAACTCCCAGTGTAGCGGTGAAATGCGTA
GATATTGGGAAGAACACCGGTGGCGAAGGCGCCTTTCTGGACTGTGTCTGACGCTGAGATG
CGAAAGCCAGGGTAGCGAACGGGATTAGATACCCCGGTAGTCCTGGCCGTAAACGATGGGT
ACTAGGTGTGGGAGGTATCGACCCCTTCCGTGCCGGAGTTAACGCAATAAGTACCCACCT
GGGGAGTACGGCCGCAAGGCTTAAACTCAAAGGAATTGACGG

7 LEBENSLAUF

Persönliche Daten

Name Susanne Becker
Geburtsdatum 28.05.1981
Geburtsort Gehrden
Familienstand ledig

Schulbildung

1993 – 2000 Matthias-Claudius-Gymnasium, Gehrden
Abschluss: Abitur

Studium

2000-2006 Gottfried Wilhelm Leibniz Universität, Hannover
Studiengang: Diplom-Biologie
Hauptfach: Zoologie
Nebenfächer: Genetik, Verhaltensbiologie

2006-2007 Stiftung Tierärztliche Hochschule, Hannover
Diplomarbeit im Institut für Tierökologie und Zellbiologie im
Bereich Genetik/Zoologie
Thema: Experimentelle Studien zur Expression und Funktion von
ANTP-Genen bei dem Placozoon *Trichoplax adhaerens*
Betreuer: Prof. Dr. Bernd Schierwater
Abschluss des Studiums als Diplom-Biologin (Note: sehr gut)

Promotion

Seit 2007 Stiftung Tierärztliche Hochschule, Hannover
Physiologisches Institut
Thema: Reduziert der Zusatz von Fumarsäure die ruminale
Methanproduktion durch Beeinflussung der Populationsstruktur
der mikrobiellen Gemeinschaft?
Betreuer: Prof. Dr. Gerhard Breves

Auslandsaufenthalt

2003-2004 DAAD-geförderter Auslandsaufenthalt als ISAP-Studentin in
Costa Rica an der Universidad Nacional, Heredia

Veröffentlichungen

Becker, S., und Breves, G. (2010). In-vitro-Untersuchungen zur Wirkung von Fumarsäure auf die Methanproduktion, mikrobielle Fermentation und Populationsstruktur der *Archaea*-Gemeinschaft im Rinderpansen. 19. Symposium der Fachgruppe Physiologie und Biochemie der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG), 14.-16. Februar 2010, Hannover. Abstract zum Poster in: Tagungsband der Fachgruppe Physiologie und Biochemie der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft, S.82

Becker, S., und Breves, G. (2011). Does fumaric acid reduce ruminal methane production by influencing the population structure of *Archaea* community? 65. GfE-Tagung, 15.-17. März 2011, Göttingen. Abstract zum Vortrag in: Proceedings of the Society of Nutrition Physiology, Band 20, S.110

8 DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen oder die Entstehung überhaupt erst möglich gemacht haben haben:

...Herrn Prof. Dr. G. Breves für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die finanzielle Unterstützung und die kompetente Betreuung bedanken.

...Frau Prof. Dr. K. Huber für die Hilfestellung in molekularbiologischen Fragen und bei der Orientierung gerade zu Beginn meiner Arbeit.

...Marion Burmester für ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft, Kerstin Kiri und Karin Hustedt für die technische Unterstützung im Labor, für ihre Zuverlässigkeit und auch für die unzähligen Kaffeepausen!

...Jeannette Boguhn, Maren Witzig und Gerald Wischer von der Universität Hohenheim für die Analysen und die tatkräftige Unterstützung bei einigen Versuchen.

... Dem FLI in Braunschweig für die Bereitstellung des Substrates.

... Dem ISAH für die Analysen der Gasproben.

... Klaus Grunert für die Hilfe und tatkräftige Unterstützung beim RUSITEC und ebenso Dirk Voigtländer für seine immerwährende Hilfsbereitschaft.

... Yvonne Armbrecht und Michael Rohde für den leckeren Kaffee, für die Ablenkung und die Unterstützung im Stall.

... Mirja und Alex für ihre Erfahrung und nützlichen Tipps.

... Maria für das zeitaufwendige Korrekturlesen dieser Arbeit, Steffi insbesondere für die Korrekturen zur Henderson-Hasselbalch-Gleichung!

...alle Doktoranden und Mitarbeiter des Physiologischen Instituts für die angenehme Atmosphäre und Hilfsbereitschaft.

...meinen neu gewonnen Freunden Nina, Nina und Inga, die mich immer wieder ermutigt und zum Lachen gebracht haben!

...meinen Eltern für die tatkräftige Unterstützung, die ständige Begleitung und den positiven Zuspruch.

...meinem Freund Nico, der die ganze Zeit meine Launen ertragen hat und trotzdem immer für mich da war. Ohne ihn hätte ich das alles nicht geschafft!

9 ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und alle benutzten Hilfsmittel und Quellen sowie evtl. zur Hilfestellung herangezogenen Institutionen vollständig angegeben habe.

Diese Dissertation wurde nicht schon als Master-, Diplom- oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover, den 12.11.2011

Susanne Becker