

---

***In vitro* Untersuchungen zum Einfluss von  
transgenem Mais auf Stoffwechsel und Struktur  
der mikrobiellen Gemeinschaft im Rinderpansen**

---

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. Melanie Koch**

geboren am 05.05.1974

in Alfeld/Leine

2008

Referent: Prof. Dr. Breves

Korreferent: Prof. Dr. Jacobsen

Tag der Promotion: 31.01.2008

„Sei du selbst die Veränderung, die du dir wünschst.“

(Mahatma Gandhi, 02.10.1869 - 30.01.1948

indischer Freiheitskämpfer)

Folgende Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

**Koch M., E. Strobel, C. C. Tebbe, J. Heritage, G. Breves and K. Huber 2006.**

Transgenic maize in the presence of ampicillin modifies the metabolic profile and microbial population structure of bovine rumen fluid in vitro. Br J Nutr 96: 820-829

**Koch M., E. Strobel, C. C. Tebbe, J. Heritage, G. Breves and K. Huber 2006.**

Influence of transgenic (GM) maize and ampicillin on the metabolic profile and microbial community structure of bovine rumen fluid. Proc Soc Nutr Physiol 15: 160

## Inhaltsverzeichnis

<b>I</b>	<b>Summery</b>	
<b>II</b>	<b>Zusammenfassung</b>	
<b>III</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	
<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Der Pansen von Wiederkäuern	2
1.2	Weltweiter Anbau transgener Pflanzen	2
1.3	Eigenschaften von GV-Mais (Bt-Mais)	4
1.4	Transgene Konstrukte des Bt-176 Maises	5
1.5	Markergene in gentechnisch veränderten Nutzpflanzen	7
1.6	Fragestellung	8
1.7	Ziele dieser Arbeit	8
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>10</b>
2.1	Das RUSITEC ( <u>R</u> umen <u>S</u> imulation <u>T</u> echnique)-System	10
2.1.1	Die RUSITEC-Anlage	10
2.1.2	Spendertier	11
2.1.3	Versorgung der Fermentationsgefäße	12
2.1.4	Isogene und transgene Maishybriden	12
2.1.5	Versuchsdesign des RUSITEC-Versuches	13
2.1.6	Durchführung der <i>in vitro</i> Versuche mit den RUSITEC-System	14
2.2	Überprüfung der Maishybriden auf das $\beta$ -Laktamase-Gen	15
2.2.1	Isolierung der genomischen Pflanzen-DNA	15
2.2.2	DNA-Analyse der Maishybriden mittels <i>Polymerase Chain Reaktion</i> (PCR)	15
2.3	Durchführung der Analysen zur Erfassung der biochemischen Parameter im RUSITEC-System	16
2.3.1	Bestimmung des pH-Wertes und Redoxpotentials	16
2.3.2	Bestimmung der Konzentration der kurzkettigen Fettsäuren (SCFA)	16
2.3.3	Bestimmung der Ammoniak-Stickstoff-Konzentration	17
2.4	Statistik	18
2.5	Pansen-Mikroorganismen	18
2.5.1	Isolierung der Mikroorganismen aus den Überläufen des RUSITEC-Systems	18
2.6	<i>Single Strand Conformation Polymorphism</i> (SSCP)	19
2.6.1	Extraktion der genomischen DNA	20
2.6.2	<i>Polymerase Chain Reaktion</i> (PCR)	20
2.6.3	Etablierung spezifischer Primer zur Untersuchung der Clostridien	22
2.6.4	„Nested“ PCR	23
2.6.5	Verdau des phosphorylierten Stranges	24
2.6.6	Aufreinigung der Einzelstrang-DNA	24
2.6.7	Polyacrylamid (PAA)-Gelelektrophorese	25
2.6.8	Silbernitratfärbung zur Visualisierung der DNA-Banden	25
2.6.9	Analyse des SSCP-Bandenmusters	26
2.7	DNA-Sequenzierung nach Sanger-Coulson	27
2.7.1	Elution der DNA aus dem SSCP-Gel	27
2.7.2	Klonierung des PCR-Produktes	28
2.7.2.1	Reamplifikation und Aufreinigung der SSCP-Produkte	28
2.7.2.2	Ligation	28
2.7.2.3	Transformation	28

2.7.2.4	Selektion der transformierten Zellen	29
2.7.2.5	Lyse	29
2.7.3	Kontroll-SSCP-Gel	29
2.7.4	DNA-Sequenzierung	30
2.8	Überprüfung der Pansenbakterien auf das bla <sub>TEM</sub> -Gen	31
2.8.1	Isolierung der genomischen und plasmidischen DNA aus Pansenbakterien	31
2.8.2	Klonierung von TOP10S' Zellen mit dem Vektor pUC18	31
2.8.3	Isolierung der plasmidischen DNA (pUC18) aus TOP10S' Zellen	32
2.8.4	<i>Polymerase Chain Reaktion</i> (PCR)	32
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>33</b>
<b>3.1</b>	<b>I. Teil</b>	<b>34</b>
3.1.1	Verifizierung der transgenen Eigenschaften der Bt-Mais-DNA	34
3.1.2	Untersuchung des Einflusses transgener Maisversorgung und Ampicillin im RUSITEC-System	35
3.1.2.1	pH-Wert und Redoxpotential	35
3.1.2.2	Ammoniak-Konzentrationen	36
3.1.2.3	Produktion kurzkettiger Fettsäuren (Acetat, Propionat, Butyrat)	37
3.1.3	Zeitliche Anpassung der Bakterien und Pseudomonaden-Population im Rinderpansen nach Fistulierung	39
3.1.4	Ableitung des endgültigen Versuchsprotokolls aufgrund der erzielten Ergebnisse	40
<b>3.2</b>	<b>II. Teil</b>	<b>41</b>
3.2.1	Untersuchung des Einflusses transgener Maisversorgung und Ampicillin im RUSITEC-System	41
3.2.1.1	pH-Wert und Redoxpotential	41
3.2.1.2	Ammoniak-Konzentrationen	42
3.2.1.3	Produktion kurzkettiger Fettsäuren (Acetat, Propionat, Butyrat)	43
3.2.2	Einfluss transgener Maisversorgung auf die strukturelle Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft unter Ampicillin im RUSITEC-System	46
3.2.2.1	Die gesamte mikrobielle Gemeinschaft im SSCP-Profil	47
3.2.2.2	Die Domäne der Bakterien im SSCP-Profil	48
3.2.2.3	Die Domäne der Archaeen im SSCP-Profil	50
3.2.2.4	Die Gruppe der Clostridien im SSCP-Profil	51
3.2.2.5	Die Gruppe der Pseudomonaden im SSCP-Profil	52
3.2.3	Charakterisierung der DNA-Banden der SSCP-Profile	54
3.2.3.1	Sequenzierung ausgewählter Banden aus den SSCP-Profilen der Bakterien Archaeen und Pseudomonaden	54
<b>3.3</b>	<b>III. Teil</b>	<b>57</b>
3.3.1	Untersuchung des Einflusses transgener Maisversorgung und Kanamycin im RUSITEC-System	57
3.3.1.1	pH-Wert und das Redoxpotential	57
3.3.1.2	Ammoniak-Konzentrationen	58
3.3.1.3	Produktion kurzkettiger Fettsäuren (Acetat, Propionat, Butyrat)	59
3.3.2	Einfluss transgener Maisversorgung auf die strukturelle Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft unter Kanamycin-Behandlung im RUSITEC-System	61
3.3.2.1	Die gesamte mikrobielle Gemeinschaft im SSCP-Profil	61
3.3.2.2	Die Domäne der Bakterien im SSCP-Profil	63

3.3.2.3	Die Domäne der Archaeen im SSCP-Profil	65
3.3.2.4	Die Gruppe der Clostridien im SSCP-Profil	66
3.3.2.5	Die Gruppe der Pseudomonaden im SSCP-Profil	68
3.3.3	Besiedlung der Maiskörner mit Pseudomonaden	69
<b>3.4</b>	<b>IV. Teil</b>	<b>70</b>
3.4.1	Überprüfung des Bakteriengenom auf das Vorhandensein von bla <sub>TEM</sub> -Genen	70
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>71</b>
<b>4.1</b>	<b>I. Teil</b>	<b>71</b>
4.1.1	Bewertung des RUSITEC-Systems für die Versuchsdurchführung	71
4.1.2	Charakterisierung der zeitlichen Anpassung der Struktur der mikrobiellen Gemeinschaft im Rinderpansen nach der Fistulation	73
<b>4.2</b>	<b>II., III. und IV. Teil</b>	<b>75</b>
4.2.1	Wirkung von Ampicillin und Kanamycin auf Pansenmikroorganismen	75
4.2.1.1	pH-Wert und Redoxpotential	75
4.2.1.2	Ammoniak-Konzentrationen	76
4.2.1.3	Kurzkettige Fettsäuren	76
4.2.2	Natürliche Resistenzmechanismen bei Mikroorganismen	78
4.2.3	Substanzielle Äquivalenz	80
4.2.4	Horizontaler Gentransfer	83
4.2.4.1	Abbau von DNA im Gastrointestinaltrakt (GIT)	85
4.2.4.2	Kompetenzentwicklung der Bakterien im GIT	86
4.2.4.3	Einbau fremder DNA in Bakterien	87
4.2.5	Bedeutung des Selektionsdruckes	88
4.2.6	Untersuchungen des bakteriellen Genoms auf bla <sub>TEM</sub> -Gene	88
4.2.7	Bedeutung der Forschungsergebnisse	89
<b>5</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>92</b>
<b>6</b>	<b>Anhang</b>	<b>103</b>
<b>7</b>	<b>Danksagung</b>	<b>106</b>
<b>8</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>107</b>

## Summery

### **Influence of transgenic (GM) maize and ampicillin on the metabolic profile and microbial community structure of bovine rumen *in vitro***

In the context of this study was examined if bacteria have the ability to incorporate transgenic constructs from plants. The *Bt* maize used in the experiment contains a bla<sub>TEM</sub> that encodes for ampicillin resistance and was of bacterial origin. After microbial decomposition of maize kernels in the rumen the released transgene might be incorporated by the bacteria resulting in a “horizontal gene transfer”. By applying ampicillin continuously a selective pressure was created on rumen micro-organisms *in vitro*. Therefore, the incorporation of the transgene into the bacterial genome could be advantageous for the survival of these micro-organisms hypothetically.

Fatty acid production rates were measured in an *in vitro* system called rumen simulation technique (RUSITEC) using hay, concentrate and maize (isogenic or transgenic) as substrates. Significant differences in the fatty acid profile between the feeding groups could be determined. While acetate production remained unchanged, the administration of ampicillin caused a distinct reduction of the propionate and butyrate production initially. Butyrate production remained constantly low during ampicillin application, while propionate production rates recovered to the control levels. But this recovery was significantly faster in fermenters fed transgenic maize than in fermenters fed isogenic maize.

These changes in biochemical profiles dependent on the feeding regime were accompanied by variations in the microbial community structure which were verified by *single strand conformation polymorphism (SSCP)*-Technique. Furthermore, maize kernels were differentially colonized by pseudomonadaceae which resulted in differences of the pseudomonadaceae population in the RUSITEC system. As a consequence, all pseudomonadaceae-specific SSCP studies showed differences between isogenic and transgenic fed fermenters.

The possibility of horizontal gene transfer was discussed based on the observed differences in biochemical profiles as well as in SSCP pattern of microbial populations challenged by ampicillin and transgenic maize. In similar studies kanamycin as antibiotic challenge comparable effects could not be observed. The bla<sub>TEM</sub> could not be detected in either genomic or plasmidic DNA of isolated rumen microbes from the RUSITEC system. These

studies are consistent with findings of the University of Leeds, which detected an ampicillin resistant bacteria subpopulation in the rumen. But these resistance was not based on bla<sub>TEM</sub>. These results indicate that horizontal gene transfer between transgenic plant and bacteria is most unlikely.

On the basis of these results a substantial equivalence between the transgenic maize and its conventional counterpart might be questioned.

Keywords: RUSITEC, transgenic maize, antibiotics

## Zusammenfassung

### ***In vitro* Untersuchungen zum Einfluss von transgenem Mais auf Stoffwechsel und Struktur der mikrobiellen Gemeinschaft im Rinderpansen**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob die Möglichkeit einer Aufnahme eines transgenen Konstruktes aus Pflanzen in Bakterien besteht. Als Pflanze wurde Bt-176 Mais eingesetzt, der als Transgen unter anderem ein  $\beta$ -Laktamase-Gen, welches für eine Ampicillin-Resistenz codiert, besitzt. Dieses ursprünglich aus Bakterien stammende Gen könnte beim mikrobiellen Aufschluss der Maiskörner im Pansensaft möglicherweise von Bakterien aufgenommen und exprimiert werden. Zur Untersuchung dieser als horizontalen Gentransfer bezeichneten Aufnahme wurde über die kontinuierliche Applikation von Ampicillin ein Selektionsdruck auf die Pansenpopulation ausgeübt, der die Aufnahme eines exogenen Resistenzgens zum Vorteil für die entsprechenden Bakterien machen würde.

Anhand der Fettsäure-Produktionsraten eines mit Heu, Kraftfutter und Mais (isogen und transgen) gefütterten *in vitro* Pansen-Simulations-Modells (RUSITEC) konnten definierte Unterschiede zwischen den Fütterungsansätzen festgestellt werden. Während die Acetatproduktion unbeeinträchtigt blieb, konnte initial durch die Gabe von Ampicillin eine deutliche Reduktion der Propionat- und Butyrat-Produktion gefunden werden. Die Butyrat-Produktion blieb in der Phase der Ampicillin-Applikation konstant niedrig, während die Propionat-Bildungsraten wieder auf das Ausgangsniveau anstiegen. Dabei verlief diese Erholungsphase signifikant schneller bei den transgen gefütterten Ansätzen als bei den isogen gefütterten. Jene unterschiedliche Entwicklung der biochemischen Profile in Abhängigkeit von der Fütterung sind auf Variationen in der strukturellen Zusammensetzung der mikrobiellen Population zurückzuführen wie mittels *single strand conformation polymorphism* (SSCP)-Technik bestätigt werden konnte. Diese Methode erlaubt Einblicke in die Diversität und Struktur einer mikrobiellen Gemeinschaft und zeigte in den Untersuchungen Unterschiede in der Domäne der Bakterien in Abhängigkeit von der Fütterung. Zudem konnte auf den zwei Maissorten ein unterschiedlicher Pseudomonadenbesatz gefunden werden, der Auswirkungen auf die Mikroorganismen-Population im RUSITEC-System hatte. In allen ermittelten Pseudomonaden-spezifischen SSCP-Profilen zeigten sich Unterschiede zwischen den mit isogenem und den mit transgenem Mais versorgten Ansätzen.

Die Möglichkeit eines horizontalen Gentransfers wurde aufgrund der Unterschiede in den biochemischen Profilen als auch in den SSCP-Bandenmustern, die nur in Verbindung mit Ampicillin und transgener Maisversorgung, nicht aber durch äquivalent durchgeführte Versuche mit dem Antibiotikum Kanamycin beobachtet werden konnten, diskutiert.  $\beta$ -Laktamase-Gene konnten jedoch weder in der genomischer noch in der plasmidischen DNA isolierter Pansenbakterien aus dem RUSITEC-System nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit Untersuchungen an der Universität Leeds, in denen natürlich Ampicillin-resistente Bakterien aus dem Rinderpansen nachgewiesen werden konnte. Aber diese Resistenz beruhte nicht auf dem Vorhandensein von  $\beta$ -Laktamase-Genen. Diese Ergebnisse sprechen insgesamt gegen einen horizontalen Gentransfer zwischen transgenem Mais und Bakterien.

Aufgrund der in dieser Arbeit gefundenen Unterschiede kann jedoch eine substantielle Äquivalenz zwischen transgenem Bt-176 Mais verglichen mit seiner konventionellen Ausgangssorte in Frage gestellt werden.

Schlagwörter: RUSITEC, transgener Mais, Antibiotika

**Abkürzungsverzeichnis**

μ	mikro
A	Adenin
Abb.	Abbildung
amp	Ampicillin
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
APS	Ammoniumpersulfat
Aq. bidest.	<i>Aqua bidestillata</i>
ATP	Adenosintriphosphat
bla	β-Laktamase
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
Bp	Basenpaare
Bt	<i>Bacillus thuringensis</i>
°C	Grad Celsius
ca.	Circa
cry	<i>crystal</i>
d	Tag
dest.	destilliert
DNA	Desoxyribonucleinsäure
ddNTP	Di-Desoxy-Nucleosid-Triphosphat
dNTP	Desoxy-Nucleosid-Triphosphat
ds	doppelsträngig
et al.	<i>et alii</i>
g	Vielfaches der Erd- oder Normalfallbeschleunigung ( $g_n = 9,80665 \text{ m} \cdot \text{s}^{-2}$ )
g	Gramm
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GIT	Gastrointestinaltrakt
GVO	gentechnisch veränderte Organismen
GVP	gentechnisch veränderte Pflanzen
h	Stunde
ha	Hektar
ISAAA	<i>International Service for the Acquisition of Agribiotech Applications</i>
HGT	horizontaler Gentransfer
kan	Kanamycin
l	Liter
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
mA	Milliampere
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MDE	<i>Mutation Detection Enhancement</i>
Mio.	Millionen
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmol	Millimol
n	Stichprobenumfang
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>

---

ng	Nanogramm
nm	Nanometer
n.s.	nicht signifikant
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PAA	Polyacrylamid
r <sup>2</sup>	Determinationskoeffizient
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
rRNA	<i>ribosomale ribonucleic acid</i>
RUSITEC	<i>Rumen Simulation Technique</i>
s	Sekunde
SCFA	<i>short chain fatty acids</i>
SD	<i>standard deviation</i>
SSCP	<i>single strand conformation polymorphism</i>
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Trisborat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit
UPGMA	<i>unweighted pair group with mathematical averages</i>
UV	Ultraviolett
V	Volt
V <sub>h</sub>	Voltstunden

Chemische Elemente wurden nach der internationalen Nomenklatur abgekürzt.

## 1 Einleitung

Zu Beginn der 80er Jahre wurden erstmals mit Hilfe der Gentechnik neue Eigenschaften in das Erbgut von Pflanzen übertragen (Heldt 1999). Seit dem Jahr 1996 nehmen die Anbauflächen weltweit jährlich für gentechnisch veränderte Pflanzen um etwa 10 % zu (Clive 2006), obwohl die Anwendung der „grünen Gentechnik“ in der Pflanzenzüchtung bis zum heutigen Zeitpunkt umstritten ist. In der Öffentlichkeit werden ihre Vor- und Nachteile kontrovers diskutiert. Allgemein werden genetisch veränderte Organismen (GVO) wie folgt definiert:

*„Organismen, bei denen das genetische Material mit Hilfe von molekularbiologischen Methoden in einer Weise verändert ist, wie es natürlicherweise durch Kreuzen oder natürliche Rekombination nicht möglich ist“* (GenTG, Richtlinie 2001/18/EG).

Eines der größten Sicherheitsbedenken bei der Freisetzung transgener Pflanzen ist unter anderem die mögliche Ausbreitung von Transgenen über die Artgrenze hinweg wie z. B. auf Bakterien. Es wird die Möglichkeit diskutiert, ob die in transgenen Pflanzen zu Selektionszwecken verwendeten Antibiotikaresistenz-Gene auf humane Krankheitserreger übertragen werden können. Bisher konnte unter natürlichen Bedingungen nicht bewiesen werden, ob zusätzlich eingebrachte transgene Konstrukte aus gentechnisch veränderten Pflanzen von Bakterien aufgenommen werden können.

Generell sind Bakterien in der Lage, freie DNA aus ihrem Umgebungsmilieu aufzunehmen. Diese DNA-Aufnahme wird als „horizontaler Gentransfer“ (HGT) bezeichnet, wobei die Aufnahme des genetischen Materials unabhängig von der bestehenden Artgrenze ist (de la Cruz und Davies 2000).

Natürliche Bedingungen, unter denen es zu einer Aufnahme von transgenen Konstrukten aus z. B. Pflanzen kommen könnte, herrschen im Pansen von Wiederkäuern. Zudem werden in der Rinderfütterung vermehrt transgene Pflanzen wie z.B. Mais als Futterpflanze eingesetzt.

## 1.1 Der Pansen von Wiederkäuern

Der Pansen von Wiederkäuern zeichnet sich durch eine vielschichtige mikrobielle Gemeinschaft aus, die sich aus Bakterien, Archaeen, Pilzen und Protozoen zusammensetzt und im Pansen neben einer hohen Dichte zudem eine große Diversität erreicht. Diese Mikroorganismen sind für den Wiederkäuer essentiell, um den Aufschluss der überwiegend strukturreichen pflanzlichen Nahrung zu gewährleisten.

Innerhalb dieser Mikroorganismen-Gemeinschaft stellt jeder Organismus einzelne oder mehrere StoffwechsellLeistungen zur Verfügung, indem die Futterbestandteile zu Intermediärprodukten und diese weiter zu Endprodukten wie kurzkettigen Fettsäuren (SCFA) oder Ammoniak ( $\text{NH}_3$ ) synthetisiert werden. Die verschiedenen biochemischen Stoffwechselwege werden dabei durch interzellulären Austausch von Produkten durchaus von mehreren verschiedenen Mikroorganismen zusammen beschrritten. Die für Wirtstier und Mikroorganismen wesentlichen Milieubedingungen (z.B. pH-Wert, Redoxpotential, Osmolarität und Temperatur) schwanken dabei nur in sehr engen Grenzen. Verändern sich die Milieubedingungen für einzelne Arten, so fehlen auch die spezifischen Stoffwechsellvorgänge, die diese Arten der Gemeinschaft zur Verfügung stellen, und es kann zu Änderungen innerhalb der Struktur der mikrobiellen Gemeinschaft kommen.

Es wird angenommen, dass die Wahrscheinlichkeit eines HGT an Orten, an denen Bakterien mit einer hohen Dichte und Diversität vorkommen und in unmittelbarem Kontakt zu großen Mengen DNA stehen, besonders erhöht ist.

Die im Pansen vorherrschenden Bedingungen könnten ideale Voraussetzungen für einen HGT liefern, da es hier zu engen symbiotischen und endophytischen Interaktionen zwischen Pflanze und Mikroorganismen kommt (Bertolla et al. 2000; Van Elsas et al. 2002; Heritage 2005).

## 1.2 Weltweiter Anbau transgener Pflanzen

Die am weitesten verbreiteten Arten von GVO sind genetisch veränderte Kulturpflanzen (GVP), wie Sojabohne, Mais, Baumwolle und Ölraps (Clive 2006).

Nach Angaben des Agro-Biotechnologie-Verband der ISAAA (International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications) wurden im Jahr 2006 in 22 Ländern auf einer Fläche von rund 100 Millionen Hektar (Mio. ha) transgene Pflanzen angebaut (Abb. 1).

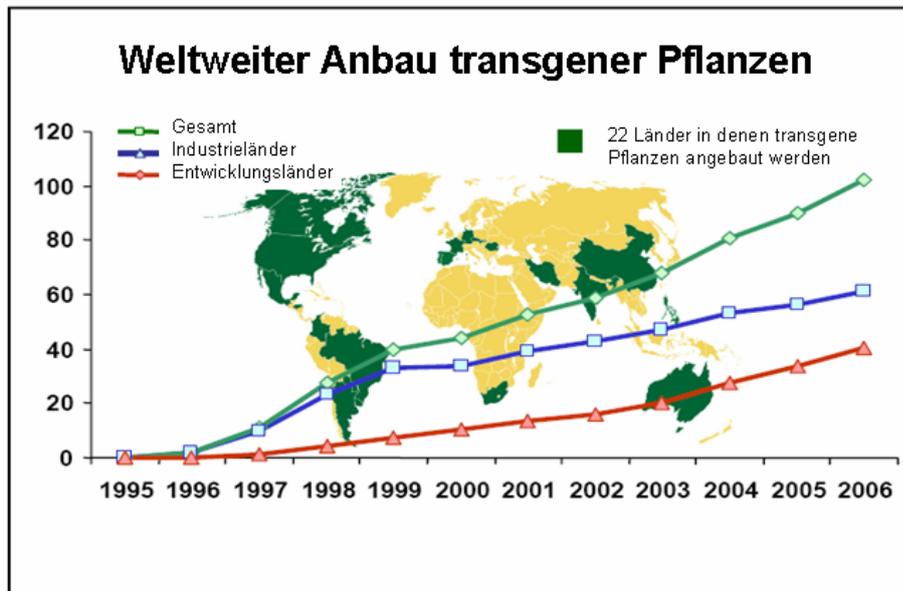


Abb. 1: Zunahme der Anbaufläche in Mio. Hektar von gentechnisch veränderten Pflanzen (modifiziert nach Clive 2006). Im Vergleich Industrieländern zu Entwicklungsländern.

Zu den führenden Anbauländern gehören die USA (54,6 Mio. ha), Argentinien (18 Mio. ha), Brasilien (11,5 Mio. ha), Kanada (6,1 Mio. ha), Indien (3,8 Mio. ha) und China (3,5 Mio. ha). Der stärkste prozentuale Zuwachs konnte in Indien gemessen werden. Hier stieg die Anbaufläche für transgene Pflanzen im Vergleich zum Vorjahr von 1,3 Mio. ha auf 3,8 Mio. ha, gefolgt von Südafrika, wo sich die Anbaufläche verglichen mit dem Vorjahr um 180 Prozent ausweitete. Deutschland gehört mit weiteren sechs EU-Staaten (Spanien, Frankreich, Portugal, Tschechien, Rumänien und der Slowakei) zu den Ländern, die im internationalen Vergleich nur eine Anbaufläche von < 0,1 Mio. ha für den Anbau transgener Pflanzen nutzen. Die weltweit größte Kultur im Anbau von transgenen Pflanzen ist die der Sojabohne. Ihre Anbaufläche lag 2006 bei 58,6 Mio. ha – das sind 77 % der weltweit angebauten Sojabohnen. Neben den USA, Argentinien und Brasilien werden GV-Sojabohnen auch in Kanada, Paraguay, Uruguay, Rumänien, Südafrika und Mexiko angebaut.

Neue Sorten und Zulassungen führten dazu, dass Mais den größten Zuwachs an Anbau aller transgenen Pflanzen zu verzeichnen hat. Die Anbaufläche stieg um 40 Prozent auf nunmehr 25,2 Mio. ha weltweit – das sind 18 % der globalen Gesamtanbaufläche für Mais. Starke Zunahmen beim Anbau von GV-Mais gab es vor allem in Südafrika und auf den Philippinen. In der EU wird mit Ausnahme Rumäniens ausschließlich GV-Mais angebaut. Der GV-Mais wird in allen Ländern nur als Tierfutter verwendet. Ein kleiner Teil geht an die Stärkeindustrie (Clive 2006).

### 1.3 Eigenschaften von GV-Mais (Bt-Mais)

Der aus Europa stammende Maiszünsler (*Ostrinia nubilalis*) gehört zur Familie der Lepidoptera und wurde um 1920 von Europa in die USA eingeschleppt (Gianessi et al. 2003). Jährlich vernichtet die Larve des Maiszünslers etwa 5-7 % der weltweit angebauten Maisernte (Brookes 2002). Sofort nach dem Schlüpfen der Larven beginnen diese sich in die Stängel der Maispflanzen zu bohren, wo sie vor Fraßfeinden geschützt sind und verbleiben dort bis nach der Verpuppung. In dieser Zeit frisst sich die Larve durch den Stängel der Maispflanze, wobei der Wasser- und Nährstofftransport immer weiter eingeschränkt werden. Der Schaden entsteht durch Verminderung des Pflanzenwachstums, kleinere Maiskörner, Missbildung der Maiskolben und Stengelbruch (Melchinger et al. 1998; Bohn et al. 1999). Außerdem tritt bei einem Maiszünslerbefall häufig die Gefahr von Pilz- und Bakterien-Infektionen als Sekundärschaden auf. Die Larven verschleppen die Sporen des pathogenen Pilzes *Fusarium* und erhöhen die Wurzel-, Stängel- und Kolbenfäule im Mais (Melchinger et al. 1998; Bakan et al. 2002). Der gentechnische Ansatz zum Schutz von Maispflanzen gegenüber dem Maiszünsler erfolgte über das Einführen von so genannten Cry-Genen (*crystal*-Genen), welche ursprünglich aus dem Bodenbakterium *Bacillus thuringiensis* (Bt) stammen. Bislang sind ca. 300 verschiedene Cry-Gene isoliert worden ([http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil\\_Crickmore/Bt](http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt), 2007), wovon bis zu fünf verschiedene Cry-Gene in jedem Stamm vorhanden sein können. Diese Gene, dessen Sequenzen so weit modifiziert wurden, um dem Expressionsmuster der Pflanzenzelle angepasst zu sein, codieren für Cry-Proteine (Bt-Toxine). Die Maispflanze ist damit in der Lage, in ihren Zellen Toxine zu exprimieren, um sich selbsttätig speziell gegen einen Befall mit Maiszünslerraupen zu schützen. Die Cry-Proteine wirken spezifisch

gegen bestimmte Insektengruppen und sind für Säugetiere und den Menschen harmlos (Müller 2000).

Bei der Aufnahme von Pflanzenmaterial durch Larven gelangen die Cry-Proteine in den Mitteldarm, wo sie zerfallen und einzelne Cry-Proteine freigesetzt werden. Diese Cry-Proteine entsprechen Protoxinen. Durch die während der Verdauung im Darm wirkenden insektenspezifischen Proteasen kommt es zu einer Spaltung der Protoxine in die aktive Form (Hofte and Whiteley 1989). Diese aktive Toxinform bindet an spezifische Rezeptoren, die in der apikalen Membran des Darmepithels lokalisiert sind (Knowles und Ellar 1986). Es kommt zur Bildung von Poren wodurch die Darmwand aufgelöst wird und schließlich der Tod der Larve eintritt (Schnepf et al. 1998; Ferré und Van Rie 2002). Abhängig vom transferierten Cry-Gen und seiner Kontrolle durch ebenfalls insertierte Regulationssequenzen (Promotoren) exprimiert eine Maispflanze Bt-Toxine in unterschiedlicher Menge.

In der EU sind seit 1997/98 die Insekten-resistenten Mais-Linien Bt-176 (ID-Nummer SYN-EV-176-9 der Firma Syngenta Seeds), MON 810 (ID-Nummer der Firma Monsanto) und T25 (ID-Nummer der Firma Bayer CropScience) für den Anbau zugelassen.

#### **1.4 Transgene Konstrukte des Bt-176 Maises**

Die erstmalige Herstellung von Bt-Mais gelang Koziel et al. (1993) durch das Transferieren des insektizid kodierenden Cry1Ab-Gens mittels Partikelbeschuss. Für die Transformation dieser Mais-Pflanze wurde die 1985 etablierte Technik verwendet, bei der winzige DNA-beschichtete Gold- oder Wolframpartikel mit Hilfe einer Genkanone in embryonale Pflanzenzellen geschossen werden. Der Bt-176 Mais hat auf diesem Weg der Partikel-Bombardierung zwei zusätzlich eingefügte Plasmide erhalten (Koziel et al. 1993). Die transferierten DNA-Moleküle können so direkt in das Kerngenom, aber auch spezifisch in das Genom von Mitochondrien und Chloroplasten integriert werden (Heß 1992). Das erste Plasmid enthält zwei Kopien eines verkürzten Cry1Ab-Gens, wobei beide unter der Kontrolle zweier unterschiedlicher Promotoren stehen. Für die Expression des Bt-Toxins in den grünen Geweben der Maispflanze ist die erste Kopie des Cry1Ab-Gens verantwortlich, welches über einen Phosphoenolpyruvat-Carboxylase-Promotor reguliert wird. Die zweite Kopie des Cry1Ab-Gens wird von einem pollenspezifischen Calcium-

abhängigen Proteinkinase-Promotor reguliert, der ursprünglich aus Maispflanzen stammt. Beide Gene verwenden die 3'-Polyadenylations-Sequenz des 35S Transkripts des *Cauliflower mosaic* Virus (CaMV) als Terminator. Zudem enthält das Plasmid die Kopie eines  $\beta$ -Laktamase ( $\text{bla}_{\text{TEM-1}}$ )-Gens, welches unter der Kontrolle eines prokaryotischen Promotors steht. Das  $\text{bla}_{\text{TEM-1}}$ -Gen codiert für das Enzym  $\beta$ -Laktamase, welches eine Resistenz gegen Ampicillin vermittelt und somit als Markergen fungiert. Das zweite Plasmid enthält eine Kopie des  $\text{bar}$ -Gens, welches aus dem Bodenbakterium *Streptomyces hygrosopicus* stammt, und für das Enzym Phosphinothricin-Acetyl-Transferase (PAT) codiert. Das  $\text{bar}$ -Gen vermittelt durch die Expression des PAT-Enzyms eine Resistenz gegen die in der Landwirtschaft eingesetzten Breitbandherbizide Glufosinat (Ammoniumsalz des Phosphinothricin) und fungiert neben dem  $\text{bla}_{\text{TEM-1}}$ -Gen als zusätzliches Markergen ([www.agbios.com](http://www.agbios.com)).

Die Aufgabe und der Nutzen von Markergenen in transgenen Pflanzen soll im nachfolgenden Kapitel ausführlicher beschrieben werden.

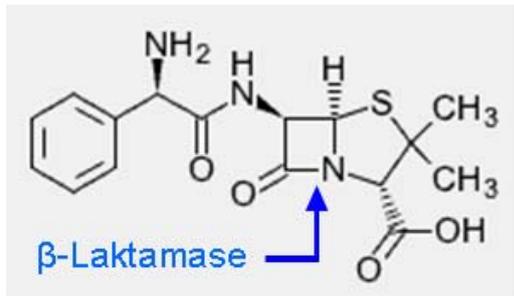
Die angegliederte Tabelle gibt eine Zusammenfassung der transformierten Elemente des Bt-176 Maises (Tab. 1).

**Tab. 1: Zusammenfassende Darstellung der transformierten Elemente des Bt-176 Maises**

Code	Name	Promotor	Terminator	Kopien
cry1Ab	cry1Ab $\delta$ -Endotoxin (Btk HD-1) ( <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>Kurstaki</i> (Btk))	Phosphoenolpyruvat-Carboxylase Calcium-abhängige Proteinkinase	CaMV 35S Poly(A) Signal	2
bar	Phosphinothricin-Acetyl-Transferase ( <i>S. hygrosopicus</i> )	CaMV 35S	CaMV 35S Poly(A) Signal	
bla	$\beta$ -Laktamase	Bakterien-spezifisch		

## 1.5 Markergene in gentechnisch veränderten Nutzpflanzen

Marker spielen eine wichtige Rolle bei der Erzeugung transgener Pflanzen und dienen zur Differenzierung von transgenen und isogenen Sämlingen auf Selektivnährmedien während der Herstellung transgener Pflanzen. Ein häufig verwendetes Markergen ist das Antibiotikaresistenz-Gen  $\text{bla}_{\text{TEM-1}}$  welches z.B. im Bt-176 Mais verwendet wird. Dieses Gen stammt aus dem bakteriellen Transposon  $\text{Tn}_3$  (Lee et al. 1983) und kodiert für eine  $\beta$ -Laktamase. Die Expression von  $\beta$ -Laktamase verleiht eine Resistenz gegen das Antibiotikum Ampicillin, da das Enzym in die Struktur des Ampicillins eingreift und der  $\beta$ -Laktam-Ring gespalten wird. Hierdurch wird die Wirksamkeit von Ampicillin zerstört (Abb. 2).



**Abb. 2: Strukturformel von Ampicillin**

( $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$ )

Spaltung des  $\beta$ -Laktam-Ringes durch  $\beta$ -Laktamase.

Neben dem  $\text{bla}_{\text{TEM-1}}$ -Gen werden weitere Markergene verwendet. Das  $\text{nptII}$ -Gen kodiert für eine Neomycin-Phosphotransferase und stammt aus dem bakteriellen Transposon  $\text{Tn}_5$  (Garfinkel et al. 1981). Dieses Enzym katalysiert die ATP-abhängige Phosphorylierung der 3'-Hydroxyl-Gruppe des Aminohexose-Rings bestimmter Aminoglykosid-Antibiotika (Kanamycin, Neomycin, Geneticin, Butirosin, Gentamycin), die dadurch inaktiviert werden. Zusammen mit dem Markergen wird das erwünschte Gen in die pflanzliche Empfängerzelle eingebracht. Als Möglichkeiten zum Einbringen von Fremd-DNA in Pflanzenzellen stehen in der Pflanzenbiotechnologie unterschiedliche Verfahren zur Verfügung. Der Gentransfer kann mit Hilfe so genannter Ti-Plasmide, die als Vektoren fungieren, erfolgen oder aber über Mikroinjektion, Elektroporation oder Partikel-Bombardement geschehen. Insgesamt ist das Einbringen neuartiger Gene in Pflanzenzellen ein sehr ineffizienter Prozess und nur ein geringer Teil der Zellpopulation baut die eingeführten Gene auch wirklich ein (Fraley et al. 1983). Die frisch transformierten Zellen werden dann unter dem Selektionsdruck des Antibiotikums inkubiert, für das die Zellen bei

erfolgreicher Transformation eine Resistenz aufgrund des erworbenen Markergens aufweisen. Nur die Zellen wachsen anschließend, die das Markergen und somit auch das Gen mit der gewünschten Eigenschaft eingebaut haben und exprimieren können.

## 1.6 Fragestellung

Mit dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob Bakterien des Rinderpansens in der Lage sind, die beim Abbau von gentechnisch veränderten Pflanzen freiwerdenden transgenen Konstrukte über HGT aufzunehmen und in ihr Genom einzubauen.

## 1.7 Ziele dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, in einem künstlichen Pansensystem (RUSITEC) die Möglichkeit eines Transfers des im Bt-176 Mais vorkommenden bla<sub>TEM-1</sub>-Gens in Pansenmikroorganismen zu untersuchen. Durch die Zugabe von Antibiotika (Ampicillin und Kanamycin) sollte ein Selektionsdruck auf die ruminalen Mikroorganismen ausgeübt werden, welcher nur den Bakterien einen Selektionsvorteil einräumt, die in der Lage sind, sich aufgrund von Resistenzmechanismen wie z. B. dem bla<sub>TEM-1</sub>-Gen zu schützen.

Der Einsatz der RUSITEC-Technik erlaubt die Bedingungen im Pansen *in vitro* zu simulieren. Hierbei sollten die biochemischen Parameter wie Ammoniak-Konzentration und die Produktion kurzkettiger Fettsäuren analysiert und als Indikator für Veränderungen des mikrobiellen Stoffwechsels untersucht werden.

Variationen in der strukturellen Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft im RUSITEC aufgrund von Verschiebungen zugunsten resistenter Bakterien sollten durch den Einsatz der *single strand conformation polymorphism* (SSCP)-Technik analysiert werden. Hierbei sollte neben der gesamten mikrobiellen Gemeinschaft, die Domänen der Bakterien und Archaeen, sowie die beiden spezifischen Bakteriengruppen Pseudomonaden und Clostridien näher untersucht werden. Für genauere Aussagen der genetischen Profile der mikrobiellen Gemeinschaft, können Banden aus dem Profil sequenziert und eventuell der entsprechenden Geninformation zugeordnet werden.

Ein weiteres Ziel war, Bakterien aus dem RUSITEC-System zu isolieren. Mit Hilfe der PCR können nach erfolgreicher Isolierung der Plasmide bzw. der genomischen DNA anhand geeigneter Primer Aussagen über das Vorhandensein und die Expression eventuell vorhandener  $\beta$ -Laktamase-Gene getroffen werden.

## 2 Material und Methoden

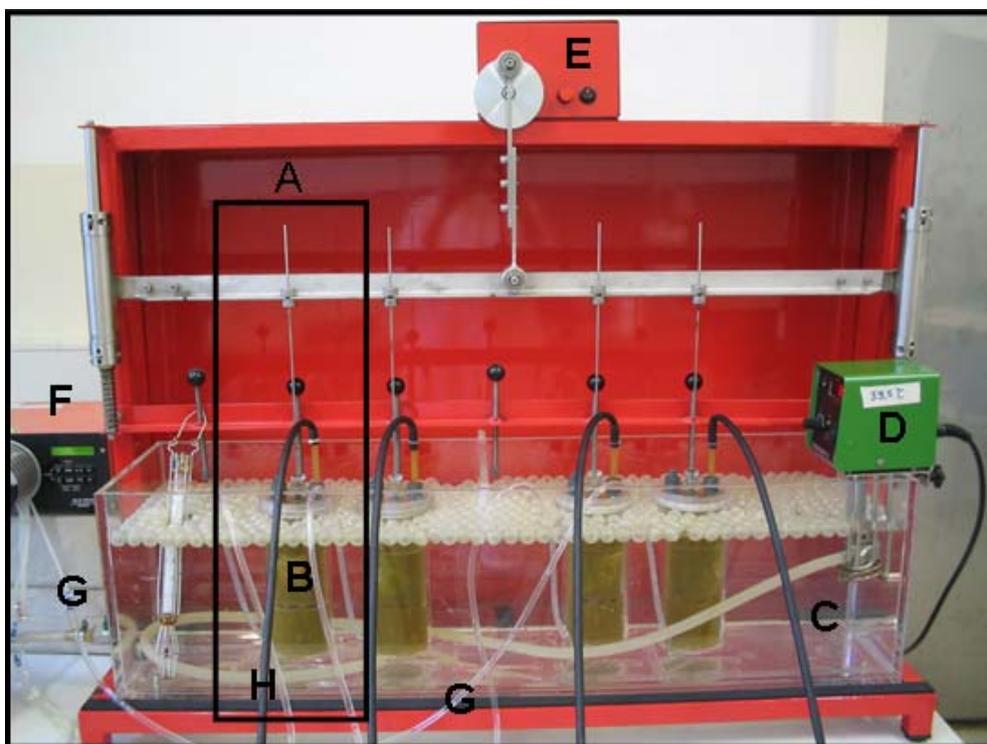
### 2.1 Das RUSITEC (Rumen Simulation Technique)-System

Die Untersuchungen zum mikrobiellen Stoffwechsel wurden mit Hilfe der semi-kontinuierlichen *in vitro* Pansensimulationsmethode (RUSITEC) durchgeführt. Bei dem RUSITEC-System handelt es sich um ein von Czerkawski und Breckenridge (1977) entwickeltes Simulationsmodell für mikrobielle Verdauungsvorgänge im Pansen. Dieses Inkubationssystem erlaubt es, die ruminalen Fermentationsprozesse unter kontrollierten Bedingungen über einen Zeitraum von mehreren Wochen qualitativ und quantitativ zu erfassen (Czerkawski und Breckenridge 1985).

#### 2.1.1 Die RUSITEC-Anlage

Für die Versuche wurden zwei RUSITEC-Anlagen (Abb. 3), die jeweils vier identisch aufgebaute Fermentationsgefäße (**A**) mit einem Flüssigkeitsvolumen von jeweils 1.000 ml enthielten, eingesetzt. Jedes Fermentationsgefäß besaß im Inneren ein weiteres kleineres Gefäß (**B**), in dem sich die feste Phase in Nylonbeuteln (150 µm Porenweite) befand. Dieses Innengefäß verfügte über Perforationen an Deckel und Boden, wodurch der Nylonbeutel von der Pansenflüssigkeit um- und durchspült werden konnte. Ein Austausch der Mikroorganismen zwischen der festen und der flüssigen Phase sowie das Auswaschen der Fermentationsprodukte konnte so gewährleistet werden. Die Fermentationsbehälter befanden sich in einem Wasserbad (**C**), dessen Temperatur durch einen Thermostaten (**D**) (Typ D8, Haake, Karlsruhe, Deutschland) konstant auf 39 °C gehalten wurde. Durch einen Deckel mit Gummidichtung konnten die Fermentationsbehälter sauerstoffundurchlässig verschlossen werden. Die Deckel der Innengefäße waren durch Führungsstangen mit einem Elektromotor (**E**) verbunden, der mit sechs Hüben/min für eine gleichmäßige Auf- und Abwärtsbewegung der Innengefäße sorgte, um die Pansenmotorik zu simulieren. Die kontinuierliche Infusion von täglich 750 ml Pufferlösung/Fermenter wurde über zwei 6-Kanal-Schauchpumpen (**F**) (Typ B1, Ole Dich, Hvidovre, Dänemark) sichergestellt und über Tygon-Schläuche (**G**) (4,0 x 7,2 mm, Omnilab, Gehrden, Deutschland) durch eine

Öffnung am Boden des Behälters ins Innere gepumpt. Im Deckel des Fermentationsbehälters waren zwei Öffnungen vorgesehen. Eine war mit einem Schraubverschluss gesichert, die andere enthielt ein Glasrohr, welches mit einem gasdichten Gummischlauch verbunden war und in einem Erlenmeyerkolben endete. Hierdurch konnte die überschüssige Flüssigkeit, der so genannte Überlauf (**H**), mit den darin enthaltenen Fermentationsprodukten gesammelt werden. Das zusätzlich bei der Fermentation gebildete Gas strömte aus dem Erlenmeyerkolben weiter in einen speziellen Gasbeutel (Plastigas, Linde AG, München, Deutschland).



**Abb. 3: RUSITEC-Anlage mit vier Fermentern.** A = Fermenter; B = Innengefäß; C = Wasserbad; D = Thermostat; E = Elektromotor; F = Pumpe; G = Pufferzulauf über Tygon-Schläuche; H = Überlauf

### 2.1.2 Spendertier

Für alle Experimente wurden sowohl fester als auch flüssiger Panseninhalt aus einem ausgewachsenen weiblichen Rind der Rasse Hinterwälder (4 Jahre alt; 350 kg; trockenstehend) über eine Pansenfistel entnommen. Das Versuchstier wurde gemeinsam mit einem weiteren Rind in einem Laufstall auf Stroh gehalten und mit 500 g Kraftfutter/

Tier/Tag gefüttert. Jeweils drei Wochen vor jedem Versuchsbeginn wurde dem Rind zusätzlich ein Mal täglich eine Menge von 300 g isogenem Mais direkt über die Pansenfistel verabreicht. Heu, Wasser sowie Salz- und Mineralstein standen *ad libitum* zur Verfügung.

### **2.1.3 Versorgung der Fermentationsgefäße**

Die Fermentationsgefäße wurden täglich mit einem Gemisch aus 6 g Heu, dessen Halme auf eine Länge von ca. 1 cm geschnitten wurden, 2 g Kraftfutter für Rinder (deuka Deutsche Tiernahrung GmbH & Co. KG, Bramsche, Deutschland) und 2 g gebrochenem Körner-Mais versorgt. Das Substratgemisch wurde in zuvor autoklavierte Nylonbeutel (16 x 7 cm; 150 µm Porenweite, Linker KG, Kassel, Deutschland), eingewogen und abschließend mit Kabelbindern verschlossen. Bis zum Verbringen in die Fermentationsgefäße wurden die gefüllten Nylonbeutel in einem Exsikkator aufbewahrt.

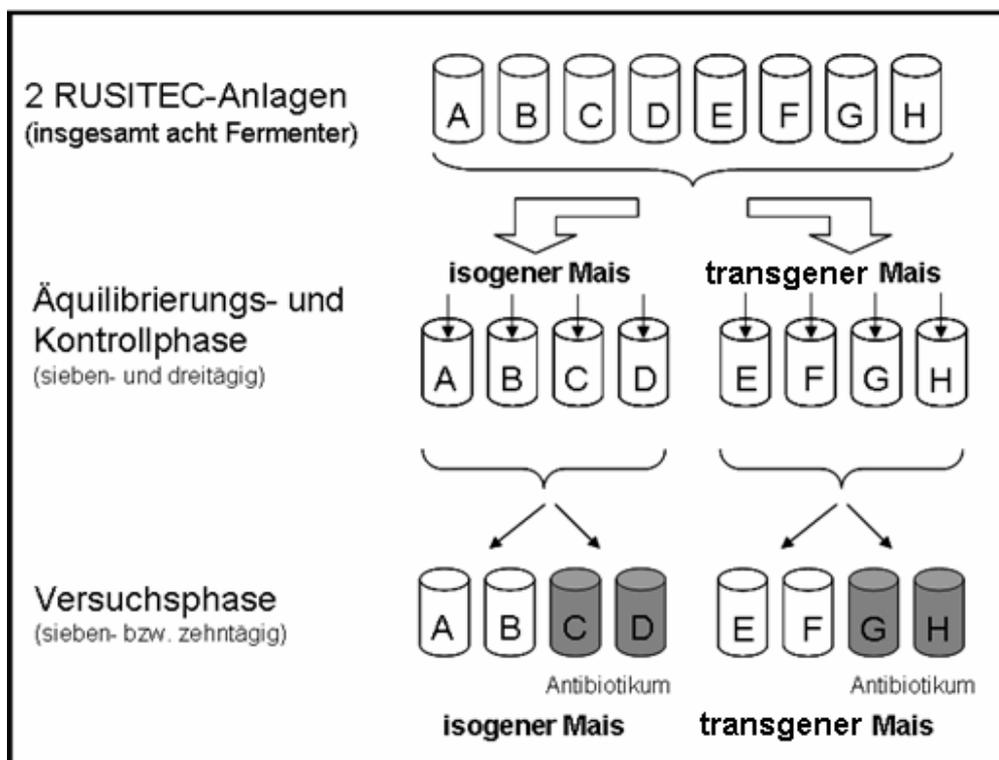
### **2.1.4 Isogene und transgene Maishybriden**

Die in allen Versuchen eingesetzten isogenen und transgenen Maishybriden wurden freundlicherweise vom Institut für Tierernährung der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL) Braunschweig zur Verfügung gestellt. Sie wurden 1999 auf benachbarten Feldern in Sachsen-Anhalt als Körnermais geerntet, bis zu einer Trockenmasse von ca. 87 % getrocknet und an der FAL Braunschweig eingelagert. Bei den isogenen Maishybriden handelte es sich um die Sorte Prelude und bei den transgenen Maishybriden um die Sorte Prelude NX6262. Beide Sorten gehen aus Inzuchtlinien und Hybriden der Maislinie Zea Mays L.CG 00526-176 hervor. Beide Maissorten waren substantiell äquivalent (Reuter et al. 2002).

### 2.1.5 Versuchsdesign des RUSITEC-Versuches

Insgesamt wurde pro Versuchsdurchlauf mit acht Fermentern gearbeitet. Diese Fermenter wurden in zwei Gruppen mit jeweils vier Fermentern unterteilt. Die eine Gruppe ( $n = 4$ ) wurde mit isogenem Mais versorgt, während die andere Gruppe ( $n = 4$ ) transgenen Mais erhielt. Ab der Versuchsphase wurden die Hälfte der Fermenter jeder Gruppe ( $n = 2$ ) jeweils täglich kontinuierlich über den Pufferzulauf mit einem Antibiotikum (Ampicillin oder Kanamycin) versorgt.

Für den ersten Versuchsdurchgang wurde eine Untersuchungsdauer von insgesamt zehn Tagen angesetzt. Die anfängliche siebentägige Äquilibrationsphase diente dem System zur Anpassung der Pansen-Mikroorganismen an die *in vitro* Bedingungen im RUSITEC-System. Erst im Anschluss an die Äquilibrationsphase konnte der Versuch mit der nachfolgenden dreitägigen Kontrollphase gestartet werden. An die Kontrollphase gliederte sich eine siebentägige Versuchsphase, die in den Versuchsgruppen durch die tägliche Gabe von Ampicillin bzw. Kanamycin gekennzeichnet war (Abb.4).



**Abb. 4: Schematischer Versuchsaufbau.** Die acht Fermenter pro Versuchsdurchgang wurden durch Buchstaben gekennzeichnet. Die Fermenter A-D wurden mit isogenem Mais versorgt und die Fermenter E-H mit transgenem Mais. In der Versuchsphase wurden täglich Antibiotika in die isogen versorgten Fermenter C und D sowie in die transgen versorgten Fermenter G und H gegeben.

Nach der Auswertung der ersten Ergebnisse wurde die Versuchsphase für alle nachfolgenden Experimente auf zehn Tage verlängert.

### **2.1.6 Durchführung der *in vitro* Versuche mit dem RUSITEC-System**

Alle Einzelteile des RUSITEC-Systems wurden für 24 h in 3,7 %ige Formaldehydlösung eingelegt und desinfiziert. Nach gründlicher Spülung mit destilliertem Wasser erfolgte eine Trocknung für 12 h im Trockenschrank bei 65 °C. Zudem wurden die Nylonbeutel autoklaviert, getrocknet und anschließend mit dem jeweiligen Versuchsfutter gefüllt und bis zum Versuchsbeginn in einem Exsikkator aufbewahrt.

Zum Start des RUSITEC-Systems wurden die Pumpen auf eine tägliche Perfusionsrate von 750 ml eingestellt. Dem Spendertier wurden über die Pansenfistel mit Hilfe einer Sonde flüssiger Panseninhalt (ca. 7 l), sowie fester Inhalt (700 g) entnommen. Die Pansenflüssigkeit befand sich während des gesamten Sammelvorganges in einem Wärmebad bei konstant 39 °C. Jedes Fermentationsgefäß enthielt einen Nylonbeutel mit 80 g festem Panseninhalt und einen zweiten gefüllt mit der jeweiligen Diät und wurde mit Pansenflüssigkeit aufgefüllt. Anschließend wurden die Fermentationsgefäße luftdicht verschlossen, in die Anlage eingebaut und an die Pumpen angeschlossen. Durch Anschalten des Elektromotors und der Dosierungspumpe wurde das System gestartet. Nach einer Inkubationszeit von 24 h wurde jedes Fermentationsgefäß geöffnet, pH-Wert und Redoxpotential gemessen und der Nylonbeutel mit dem festen Panseninhalt durch einen frischen Beutel ersetzt. Der herausgenommene Beutel wurde mit 40 ml vorgewärmter Pufferlösung in einem Polyethylenbeutel (15 x 30 cm) von Hand mit gleichmäßigem Druck zwei Minuten ausgepresst und die dabei anfallende Spülflüssigkeit in das Fermentationsgefäß zurückgegeben. Dieser Vorgang wurde ein weiteres Mal wiederholt. Danach wurde das Fermentationsgefäß luftdicht verschlossen und zurück in die Anlage gebaut. Der Überlauf wurde in einen Messzylinder gefüllt und das Volumen für die spätere quantitative Bestimmung der Fettsäureproduktionsrate notiert. Zudem wurden zwei Probenfläschchen mit jeweils 100 ml Überlauf abgefüllt und zur Bestimmung der Fettsäureproduktion sowie der Ammoniakkonzentration bei – 20 °C aufbewahrt.

## 2.2 Überprüfung der Maishybriden auf das $\beta$ -Laktamase-Gen

Um sicherzustellen, dass der isogene Mais während der Lagerung bzw. der Verarbeitung nicht mit transgenem Mais verunreinigt wurde und der transgene Mais das für die Untersuchungen wichtige bla<sub>TEM-1</sub>-Gen besaß, wurden beide Mais-Chargen, wie im Folgenden beschrieben, überprüft.

### 2.2.1 Isolierung der genomischen Pflanzen-DNA

Die gebrochenen Maiskörner beider Maishybriden (isogen und transgen) wurden in zuvor autoklavierten Mörsern unter der Verwendung von flüssigem Stickstoff zu feinstem Pulver vermahlen. Mit Hilfe des NucleoSpin<sup>®</sup> Plant Kits (Macherey & Nagel, GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland) konnte die DNA beider Maishybriden nach Herstellerangaben extrahiert werden. Die Reinheit der isolierten DNA wurde am Photometer (Biophotometer 6131, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Deutschland) aus dem Verhältnis der Absorption bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Anschließend wurde die isolierte DNA beider Proben mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) und durch die Wahl geeigneter Primer auf das Vorhandensein des  $\beta$ -Laktamase-Gens überprüft.

### 2.2.2 DNA-Analyse der Maishybriden mittels *Polymerase Chain Reaktion* (PCR)

Die PCR ist eine Methode zur enzymatischen Amplifizierung eines DNA-Abschnitts, der von zwei bekannten Sequenzen (Primern) flankiert wird (Saiki et al., 1985). Für die Untersuchung des bla<sub>TEM-1</sub>-Gens wurde das Primerpaar Tem C/E und die entsprechenden PCR-Bedingungen, wie bei Mabilat et al. (1990) beschrieben, gewählt. Die Primer wurden von der Firma Roth, Karlsruhe, Deutschland synthetisiert und mit Wasser auf eine Konzentration von 50 pmol/ $\mu$ l eingestellt. Als Thermocycler wurde der Mastercycler Gradient, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg verwendet. Um die PCR-Bedingungen überprüfen zu können, wurde das Plasmid pUC 18 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland), welches als *Insert* ein  $\beta$ -Laktamase-Gen besitzt, als so genannte „positive Kontrolle“, eingesetzt. Als Größenmarker wurde der DNA-Ladder-Mix

(Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) verwendet. Die amplifizierte Produkte wurden mit 5 µl DNA-Ladepuffer (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) versetzt und in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt (Elektrophoresekammer von BioRad GmbH, München, Deutschland). Das Gel wurde für 10 min in einer Ethidiumbromidlösung gefärbt und anschließend 15 min in dest. Wasser entfärbt. Die im Gel befindliche DNA konnte unter UV-Licht (Transilluminator T1, Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland) überprüft werden.

## **2.3 Durchführung der Analysen zur Erfassung der biochemischen Parameter im RUSITEC-System**

### **2.3.1 Bestimmung des pH-Wertes und Redoxpotentials**

Täglich wurden vor jedem Beutelwechsel direkt in der flüssigen Phase der Fermentationsbehälter pH-Werte und Redoxpotentials gemessen, um anaerobe Bedingungen in den einzelnen Fermenter zu überprüfen. Die pH-Wert-Messung erfolgte über eine Dauer von 30 s mit einem pH-Meter (Digital-pH-Meter 646, Knick, Berlin) und einer pH-Einstabmesskette (Typ 408, Mettler Toledo, Steinbach, Deutschland). Die Eichung des pH-Meters wurde täglich vor der ersten Messung mit einer Eichlösung für den Bereich von pH 4 und einer Lösung für den Bereich von pH 7 (pH-Pufferlösung, Mettler Toledo, Steinbach, Deutschland) vorgenommen. Das Redoxpotential wurde anschließend für 60 s ebenfalls in der flüssigen Phase des Fermentationsbehältnisses in mV bestimmt. Hierzu wurde eine Einstabmesskette Typ Pt 4805-S7/120 (Mettler Toledo, Steinbach, Deutschland) und ein pH-Meter (Digital-pH-Meter, Typ 643, Knick, Berlin, Deutschland) verwendet.

### **2.3.2 Bestimmung der Konzentration der kurzkettigen Fettsäuren (SCFA)**

Um die Konzentration der kurzkettigen Fettsäuren bestimmen zu können, wurden täglich ca. 5 ml eines jeden Überlaufes in ein Probenfläschchen abgefüllt, dieses luftdicht verschlossen und bis zur Analyse bei -20 °C aufbewahrt. Am Tag der Analyse wurden die

Proben im Kühlschrank aufgetaut und für 20 min bei 4 °C und 40.000 g zentrifugiert (Sorvall RC-5C, Du Pont Instrument, Bad Homburg, Deutschland). Von dem Überstand wurde jeweils 1 ml abpipettiert und mit 0,1 ml 98 %iger Ameisensäure versetzt, gemischt und nochmals zentrifugiert (20 min, 40.000 g, 4 °C). Für die anschließende gaschromatographische Messung (HP, Gaschromatograph 5890 II, Böblingen, Deutschland) wurden 1 ml des Überstandes eingesetzt, dieser in Rollrand-Ampullen (1 ml Nutzvolumen, Fa. Kleinfeld, Hannover, Deutschland) gefüllt, die luftdicht verschlossen wurden. Die verwendete Trennsäule (Länge 1,8 m, Innendurchmesser 2 mm) wurde vor der gaschromatographischen Analyse von Hand gestopft, wobei als Trennmaterial Chromosorb WAW 80/100 mesh, mit 20 % Neopentyl-Glycol-Succinat (NPGS) und 2 % Ortho-Phosphorsäure (Analyt, Müllheim) diente. Die Bedingungen für die gaschromatographischen Analysen sind in folgender Tabelle 2 aufgeführt:

**Tab. 2: Bedingungen für die gaschromatographischen Analysen**

Konditionierung:	24 h bei 240°C
Ofentemperatur:	130°C
Injektionsblock :	225°C
FID:	250°C
Trärgas (N <sub>2</sub> ):	30 ml/min
Wasserstoff:	30 ml/min
Synthetische Luft:	390 ml/min
Injektionsvolumen:	1 µl
Wiederholungen:	2 Einspritzungen
Analysenlaufzeit:	ca. 9 min

Die Konzentration der SCFA wurde über externe Standards (Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland) berechnet, die kontinuierlich nach jeder zehnten Probe mit gemessen wurden.

### 2.3.3 Bestimmung der Ammoniak-Stickstoff-Konzentration

Für die Bestimmung des Ammoniak-Gehaltes wurden von jedem Überlauf ca. 5 ml in Probenfläschchen luftdicht abgefüllt und bis zur Analyse bei -20 °C aufbewahrt. Die Analyse der Proben erfolgte photometrisch mit der Harnstoff-Test-Kombination (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland). Hierbei reagieren die Ammoniumionen mit Phenol und Hypochlorid und bilden einen Farbstoffkomplex, dessen Absorption bei einer

Wellenlänge von 546 nm im Photometer (Spectramax 250, MWG Biotech AG, Ebersberg, Deutschland) erfasst werden kann.

## **2.4 Statistik**

Die statistische Auswertung der RUSITEC-Ergebnisse erfolgte mittels der Software GraphPad Prism Version 4 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Dabei wurden die biochemischen Daten für jeden Tag mit der Varianzanalyse (ANOVA) ausgewertet. Der Einfluss der beiden eingesetzten Maissorten (isogen oder transgen) wurden mit der One-Way ANOVA analysiert (1. – 3. Tag), während zur Untersuchung des Zusammenhangs zwischen dem eingesetztem Mais (isogen oder transgen) und der Gabe des Antibiotikums die Two-Way ANOVA gewählt wurde (4. – 13. Tag). Der Bonferroni-post-Test wurde gewählt, um zu klären, welche der jeweiligen Gruppen sich signifikant voneinander unterschieden. Das Niveau der Signifikanz wurde auf [\*]  $P < 0.05$  festgesetzt. Die Werte wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung ( $n = 4$ ) angegeben. Die Zusammenführung der zwei unabhängigen RUSITEC-Versuche wurde statistisch berücksichtigt, indem die Werte mit Hilfe des Blockeffektes analysiert wurden.

## **2.5 Pansen-Mikroorganismen**

### **2.5.1 Isolierung der Mikroorganismen aus den Überläufen des RUSITEC-Systems**

Während der dreitägigen Kontrollphase sowie der zehntägigen Versuchsphase wurden an zuvor definierten Tagen Proben aus jedem Fermenter zur Isolierung von Pansen-Mikroorganismen entnommen (Abb. 5).

Die Gewinnung der Pansen-Mikroorganismen mit Hilfe der Differentialzentrifugation wurde nach Brandt und Rohr (1981) vorgenommen. Von jedem Überlauf wurden ca. 100 ml abgefüllt und auf zwei Zentrifugationsröhrchen verteilt. Alle Zentrifugationsschritte wurden bei einer Temperatur von 4 °C durchgeführt. Zuerst wurde der Überlauf bei 600 g zentrifugiert. Der dabei gewonnene Überstand wurde anschließend bei 27255 g zentrifugiert und das dabei entstandene Mikroorganismen-Pellet in ca. 30 ml

gekühlter 0,9 %iger NaCl-Lösung (w/v) resuspendiert. Das resuspendierte Mikroorganismen-Pellet wurde wiederholt bei 27255 g zentrifugiert und das Pellet in ca. 30 ml gekühlter 0,9 %iger NaCl-Lösung (w/v) resuspendiert. Diese beiden Schritte wurden noch zwei weitere Male wiederholt. Das aus dem letzten Zentrifugationsschritt gewonnene Mikroorganismen-Pellet wurde in 2 ml NaCl-Lösung aufgenommen und mit einer Glaspipette direkt in flüssigen Stickstoff pipettiert. Die gefrorenen Bakterien-Pellets wurden zur Aufbewahrung in Cryo-Röhrchen abgefüllt und bei - 80 °C gelagert.

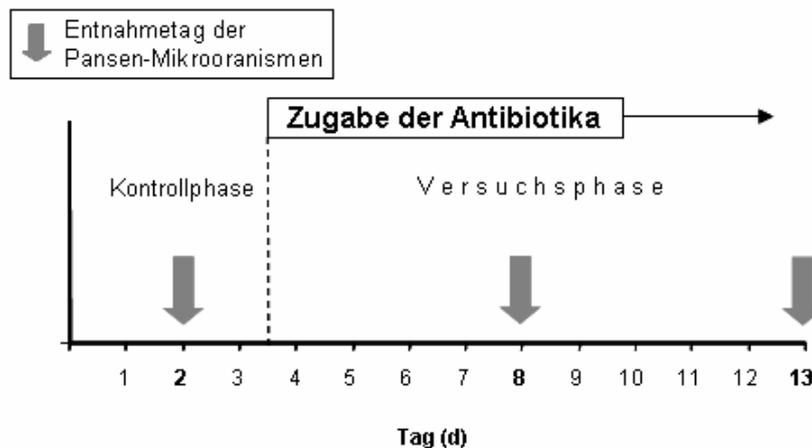


Abb. 5: Zeitverlauf der RUSITEC-Versuche mit den Entnahmetagen der Pansen-Mikroorganismen zur Erstellung der SSCP-Profile. Die grauen Pfeile kennzeichnen die Tage, an denen die Referenzmikroben aus dem System isoliert wurden.

## 2.6 Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)

SSCP-Studien dienen der Erstellung genetischer *finger prints*, die eine Aussage über die Struktur der Mikroorganismen-Gemeinschaft erlauben. Dieser Methode liegt zugrunde, dass mittels PCR konservierte Bereiche aus der 16S rRNA aller oder nur spezifischer Mikroorganismengruppen amplifiziert werden konnten. Diese Amplifikate werden als Template in eine *nested* PCR eingesetzt, und durch die hier eingesetzten Primer Com1 und Com2-Ph auf eine einheitliche Länge in der Sequenz (407 bp) gebracht. Speziesspezifische Unterschiede innerhalb der Sequenz (*polymorphism*) bleiben erhalten und führen zu unterschiedlichen Sekundärstrukturen. Bei der Auftragung des zum Einzelstrang verdauten Amplifikates (*single strand*) wandern diese aufgrund ihrer unterschiedlichen Faltung

(*conformation*) unterschiedlich weit. Der Phosphatrest am 5'-Ende des Com2-Ph Primer dient als Angriffspunkt der enzymatischen Verdauung dieses markierten Einzelstranges.

Die Gesamtheit aller Banden in einer Probe repräsentiert das genetische Profil der mikrobiellen Gemeinschaft, ähnlich eines genetischen *finger prints*. Diese Technik wurde unter Anleitung der Arbeitsgruppe von PD Dr. C.C. Tebbe (Institut für Agrarökologie, FAL) erlernt und auf die Darstellung der mikrobiologischen Lebensgemeinschaften im Pansen von Wiederkäuern angepasst.

### **2.6.1 Extraktion der genomischen DNA**

Die genomische DNA wurde mit dem Fast DNA Kit 50 (Q Biogene, Heidelberg, Deutschland) aus jeweils 120 mg Mikroorganismen-Pellet nach den Angaben des Herstellers isoliert. Von jeder Probe wurde zur abschließenden Kontrolle der Aufreinigung 8 µl von der eluierten genomischen DNA entnommen, mit 2 µl Ladepuffer (Fermentas GmbH, St.Leon-Rot, Deutschland) vermischt und auf ein 0.8 %iges Agarosegel aufgetragen. Die Proben wurden 2,5 h bei einer Spannung von 60 V elektrophoretisch aufgetrennt. Als Größenmarker diente der DNA Marker III (Fermentas GmbH, St.Leon-Rot, Deutschland).

### **2.6.2 Polymerase Chain Reaction (PCR)**

Für die Untersuchungen wurden Primer folgender Mikroorganismen eingesetzt:

Der Domänen Bakterien (Weisburg et al. 1991) und Archaeen (Grosskopf et al. 1998) sowie den Bakteriengruppen Clostridien (siehe Primeretablierung Kapitel 2.6.3) und Pseudomonaden (Milling et al. 2004). Alle Primer wurden von der Firma Roth, Karlsruhe, in Deutschland synthetisiert (Tab. 3).

**Tab. 3: Darstellung der eingesetzten Primerpaare für die SSCP-Analysen der Bakterien, Archaeen und Pseudomonaden**

Target	Primer Name	Primer Position	Primer Sequenz (5'-3')	Annealing-temperatur
16S rRNA Bakterien	F27 R1492	8-27 1492-1513	5'-AGAGTTTGATC(C/A)TGGCTCAG-3' 5'-TACGG(C/T)TACCTTGTTACGACTT-3'	50 °C
16S rRNA Archaeen	A109f A934	109-125 915-934	5'-AC(G/T)GCTCAGTAACACGT-3' 5'-GTGCTCCCCCGCCAATTCCT-3'	52 °C
16S rRNA Pseudo- monadaceen	F311Ps R1459Ps	290-311 1459-1478	5'-CTGGTCTGAGAGGAT-3' 5'-AATCACTCCGTGGTAACCGT-3'	63 °C

Für einen 25 µl Reaktionsansatz wurde die PCR mit 2,5 µl 10 x PCR-Puffer (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland), 1,25 µl dNTP- (Desoxynucleotidtriphosphate) Gemisch (10 mmol/l je dNTP; MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland), 25 µl Vorwärts-Primer (50 pmol/µl), 0,25 µl Rückwärts-Primer (50 pmol/µl), 0,125 µl DNA-Polymerase HotStarTaq, (5 Units/µl, Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) und 20,875 µl H<sub>2</sub>O (doppelt autoklaviert) durchgeführt. Zu jedem Reaktionsgemisch wurde abschließend als Ausgangsmaterial (Template) 0,5 µl genomische DNA bzw. zu einem Reaktionsgemisch H<sub>2</sub>O pipettiert, welches als negative Kontrolle diente. Zur Amplifikation wurde ein Thermocycler (Mastercycler Gradient, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland), wie in Abb. 6 dargestellt, programmiert.



**Abb. 6: Durchführung der PCR in Abhängigkeit des gewählten Primerpaares im programmierten Thermocycler.**

Die Temperatur des 3. Schrittes variierte nach der Wahl des jeweiligen Primerpaares. Von jeder Probe wurden drei identische Ansätze in die PCR eingesetzt. Nach der PCR wurden die Ansätze vereinigt und jeweils 8 µl Probe mit 2 µl Ladepuffer versetzt. Zur Überprüfung des Amplifikationserfolges der PCR wurde, wie unter 2.2.2 beschrieben, verfahren.

### 2.6.3 Etablierung spezifischer Primer zur Untersuchung der Clostridien

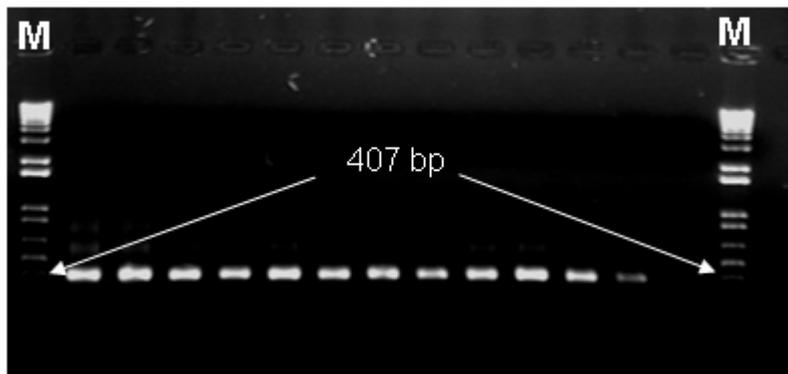
Für die Gruppe der Clostridien wurden Primer vorab designed. In der Gen-Bank Datenbasis NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) wurden die dort verfügbaren Sequenzen der einzelnen Clostridien zusammengetragen. Durch den Vergleich konservierter Bereiche erfolgte die Auswahl der Primersequenzen. Die beiden Primersequenzen wurde anschließend mit dem Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) auf ihre Spezifität in Bezug auf die Clostridien-Gruppe überprüft. Die Primer wurden anschließend von der Firma Roth (Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland) synthetisiert und auf eine Konzentration von 50 pmol/µl eingestellt. Zur Überprüfung der Funktionalität der Primer wurde eine PCR durchgeführt. Der Reaktionsansatz (25 µl) und die Parameter der PCR wurden wie unter 2.6.2 beschrieben übernommen. Die Temperatur für die Primer-Hybridisierung lag für die Clostridienprimer bei 55 °C (Tab. 4). Das Amplifikat wurde anschließend mit dem QIAquick PCR Purification Kits (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die Sequenzierung wurde anschließend durch einen kommerziellen Anbieter (AGOWA, Gesellschaft für molekularbiologische Technologie mbH, Berlin, Hannover) vorgenommen.

**Tab. 4: Darstellung des etablierten Primerpaares für die SSCP-Analysen der Clostridien**

Target	Primer Name	Primer Position	Primer Sequenz (5'-3')	Annealing-temperatur
16S rRNA Clostridien	Clost 1 Clost 2	457-477 898-928	5'-GGAGGAAGCCACGGCTAA-3' 5'-TGGGTATTGCCAACTCTCATG-3'	55°C

### 2.6.4 „Nested“ PCR

Nach der oben beschriebenen spezifischen PCR wurde anschließend eine weitere zweite (*nested*) PCR durchgeführt. Hier diente das Produkt der ersten PCR als Template. Die verwendeten Primer Com1 und Com2-Ph sind spezifisch für Eubakterien (Brosius et al. 1978; Schwieger und Tebbe, 1998). Sie binden an der 16S rRNA der kleinen Untereinheit und amplifizieren ein 407 bp großes Fragment (Abb. 7).



**Abb. 7: Agarosekontrollgel einer *nested* PCR mit dem Primerpaar Com1 und Com2. M = Marker (1 kb) (Der Pfeil zeigt die 407 bp langen PCR-Produkte)**

Die *nested* PCR unterschied sich in folgenden Bereichen von der unter 2.6.2 beschriebenen spezifischen PCR: Der Reaktionsansatz hatte ein Endvolumen von 50  $\mu$ l und setzte sich aus 5  $\mu$ l 10x PCR-Puffer (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland), 1  $\mu$ l dNTP-(Desoxynucleotid-triphosphate) Gemisch (10 mmol/l je dNTP; MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland), 0,5  $\mu$ l Com1-Primer (50 pmol/ $\mu$ l), 0,5  $\mu$ l Com2-Primer (50 pmol/ $\mu$ l), 0,25  $\mu$ l DNA-Polymerase (HotStarTaq, (5 Units/ $\mu$ l; Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) und 41,75  $\mu$ l H<sub>2</sub>O (doppelt autoklaviert) zusammen. Zu jedem Reaktionsgemisch wurde abschließend als Ausgangsmaterial (Template) 1  $\mu$ l der zu amplifizierenden, spezifischen DNA hinzu pipettiert. Die Zyklenanzahl betrug 25 und die Temperatur für die Primer-Hybridisierung lag bei 50 °C (Tab. 5).

**Tab. 5: Darstellung des eingesetzten Primerpaares Com1 und Com2-Ph für die *nested* PCR**

Target	Primer Name	Primer Position	Primer Sequenz (5'-3')	Annealing-temperatur
16S rRNA Bakterien	Com1 Com2-Ph	519-536 907-926	5'-CAGCAGCCGCGGTAATAC-3' 5'-CCGTCAATTCCTTTGAGTTT-3'	50°C

Bevor die DNA-Konzentration der PCR-Produkte bestimmt werden konnte, mussten die Proben mittels QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt werden. Anschließend wurde die DNA in einem Endvolumen von 50 µl eluiert.

Die gereinigten PCR-Produkte wurden zum einen zur fluorometrischen Konzentrationsbestimmung mit dem PicoGreen dsDNA Quantitations Kit (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) nach Herstellerangaben vorbereitet. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte nach Angaben des Herstellers in einem Fluoreszenzphotometer (Fluoroskan II, Labsystems, Helsinki, Finnland).

Zum anderen wurde die DNA-Konzentration mittels Photometermessung (Biophotometer 6131, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Deutschland) ermittelt. Die Konzentration der dsDNA wurde anschließend auf 800 ng in einem Volumen von 26 µl für alle Ansätze durch Verdünnen mit H<sub>2</sub>O eingestellt.

### **2.6.5 Verdau des phosphorylierten Stranges**

Der anschließende Verdau der dsDNA zu Einzelsträngen erfolgte enzymatisch. Die hierbei eingesetzte λ-Exonuclease verdaute den durch den phosphorylierten Com2-Primer markierten DNA-Strang. Ein Reaktionsansatz setzte sich aus 0,5 µl λ-Exonuclease (New England BioLabs), 4 µl λ-Exonuclease-Puffer (New England BioLabs) und 9,5 µl Wasser zusammen und ergab ein Gesamtvolumen von 14 µl je Probe. Dieser Reaktionsansatz wurden zu den 26 µl Probe hinzu gegeben, gevortext, kurz anzentrifugiert und für 45 min bei 37 °C inkubiert.

### **2.6.6 Aufreinigung der Einzelstrang – DNA**

Nach dem Verdau wurde die einzelsträngige DNA mit dem MiniElute PCR Purification Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt und in einem Endvolumen von 10 µl aufgenommen. Das Endvolumen wurde vollständig mit 9 µl SSCP-Ladepuffer versetzt und vor dem Beladen des Gels für 2 min bei 95 °C

denaturiert, um eventuelle Zusammenlagerungen der Einzelstränge wieder zu trennen und anschließend für mindestens 3 min auf Eis gestellt.

### **2.6.7 Polyacrylamid (PAA) - Gelelektrophorese**

Die einzelsträngigen DNA-Moleküle wurden aufgrund ihrer Unterschiede in der Sekundärstruktur während der Elektrophorese in einem nicht-denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Gellösung bestand aus 7,8 ml 2x MDE- (*Mutation Detection Enhancement*) Lösung (Cambrex Bio Science, Rockland, ME USA), 2,5 ml 10x TBE-Puffer, 14,7 ml dest. Wasser, 25 µl 40 % APS und 10 µl TEMED. Die eine Glasplatte wurde mit 700 µl Repel-Silane (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg) beschichtet, um nach der Elektrophorese das Ablösen des Gels zu erleichtern. Die so genannte zweite Trägerplatte, auf welcher das Gel nach der Elektrophorese anhaften sollte, wurde mit 700 µl Bind-Silane (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg) beschichtet, um die Anheftung des Gels an diese Platte zu verbessern. Anhand von Spacern, die seitlich zwischen den beiden Glasplatten positioniert wurden, wurde eine Geldicke von 0,5 mm eingestellt. Nach dem Gießen polymerisierte das Gel für ca. 2 h, bevor es für die Elektrophorese in eine 2010 Macrophor Elektrophoresis Unit bzw. in das DCode<sup>TM</sup> Universal Mutation Detection System (BioRad GmbH, München, Deutschland) eingebaut wurde. Als Laufpuffer wurde 1 x TBE-Puffer verwendet. Die Laufzeit des Gels betrug 17 h bei einer Spannung von 400 V bzw. 350 V (6800V<sub>h</sub>) und einer Stromstärke von 8 mA. Während des gesamten Laufes wurde eine Temperatur von 20 °C aufrechterhalten.

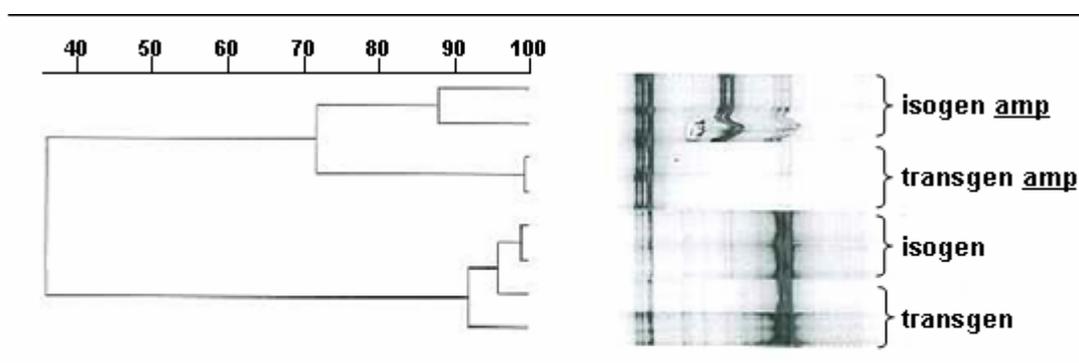
### **2.6.8 Silbernitratfärbung zur Visualisierung der DNA-Banden**

Nach der Elektrophorese wurde das an der Trägerplatte anheftende Gel in einer Färbewanne für 30 min auf einem Schüttler Typ 3015 (GfL, Hannover-Vinnhorst, Deutschland) bei 10 g in ca. 600 ml 10 %ige Essigsäure eingelegt. Zur vollständigen Entfernung der Essigsäure wurde das Gel drei Mal für jeweils 5 min in dest. Wasser gewaschen. Darauf folgte die Silbernitratfärbung für 30 min bei 10 g auf dem Schüttler

Typ 3015 (GFL, Hannover-Vinnhorst, Deutschland). Um die Silbernitratlösung vollständig zu entfernen, wurde das Gel für ca. 1 min mit dest. Wasser gespült. Der Entwicklungsschritt bestand anschließend aus zwei Phasen. Bei Erreichen der erwünschten Bandenintensität, wurde das Gel für ca. 5 min in 10 % Essigsäure fixiert und anschließend mit dest. Wasser gespült. Die fertigen SSCP-Gele wurden über Nacht getrocknet und zur Auswertung mit einem ScanJet 4c/T Scanner mit Durchlichteinrichtung (Hewlett Packard, Böblingen, Deutschland) digitalisiert.

### 2.6.9 Analyse des SSCP-Bandenmusters

Zur Analyse der SSCP-Bandenmuster wurde die Software GelCompar „*Comparative Analysis of Electrophoresis Pattern*“ Version 4.1, Applied Maths, Kortrijk, Belgien verwendet. Die Bandenmuster des SSCP-Gels wurden in Form von densitometrischen Kurven mit dem Programm verglichen und basierend auf Ähnlichkeiten zwischen den einzelnen Bandenmustern ein Dendrogramm erstellt. Um die Vergleichbarkeit der einzelnen Banden zu erhöhen, wurde mit dem „rolling disk“-Mechanismus eine Subtraktion des Hintergrundes durchgeführt. Eine Kalkulation der Ähnlichkeit erfolgte mit dem Pearson *product moment* Korrelations-Koeffizienten. Die Spuren wurden nach dem Grad ihrer Ähnlichkeiten in Form eines Stammbaumes dargestellt. Abbildung 8 zeigt hier als Beispiel den 8. Versuchstag der Pseudomonaden. Der Grad der Ähnlichkeit wurde in Prozent dargestellt.



**Abb. 8: Stammbaumanalyse am Beispiel des 8. Versuchstages der Pseudomonaden mit und ohne Ampicillin-Applikation**

Die Ähnlichkeiten der einzelnen Spuren wurden anschließend tabellarisch zusammengefasst (Tab. 6). Verglichen wurden die isogen und transgen versorgten Ansätze die kein Antibiotikum erhielten miteinander sowie die isogen und transgen versorgten Ansätze, die einer täglich Antibiotika-Applikation ausgesetzt wurden. Zusätzlich wurde noch der Antibiotika-Effekt unabhängig von der Maisversorgung erfasst. Insgesamt wurden Ähnlichkeiten von  $\geq 90$  % als identisch gewertet.

**Tab. 6: Tabellarische Zusammenfassung der Stammbaumanalyse des 8. Versuchstages der Pseudomonaden mit und ohne Ampicillin-Applikation**

Tag	Fermenter	Ähnlichkeiten (%) <sup>*</sup>
8 +	isogen / transgen ohne amp	$\geq 90$
	isogen / transgen mit amp	72
8 #	isogen + transgen mit und ohne amp	39

\* Ähnlichkeiten von  $\geq 90$  % in den Bandenprofilen wurden als gleich gewertet

+ Maisversorgung in Abhängigkeit von der Zugabe von Ampicillin

# Ampicillin-Effekt unabhängig von der Mais-Versorgung

## 2.7 DNA-Sequenzierung nach Sanger-Coulson

Um DNA-Banden des SSCP-Gels genauer charakterisieren zu können, wurde diese aus dem Gel aufgearbeitet und anschließend nach Sanger-Coulson (Sanger et al. 1977) sequenziert.

### 2.7.1 Elution der DNA aus dem SSCP-Gel

Das SSCP-Gel wurde auf einem Leuchttisch (Meßinstrumentebau GmbH, Erlangen, Deutschland) ausgeleuchtet und die zu identifizierenden Banden mit einem Skalpell herausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Elution der DNA wurde unter der Verwendung der „Crush and Soak“-Methode (Sambrook und Russell 2001) durchgeführt und in 12  $\mu$ l 10mM Tris-HCl resuspendiert.

## **2.7.2 Klonierung des PCR-Produktes**

### **2.7.2.1 Reamplifikation und Aufreinigung der SSCP-Produkte**

Die nun vorliegende eluierte, einzelsträngige DNA (1 µl) in eine PCR mit Com1 und Com2-Ph Primern eingesetzt und reamplifiziert. Die PCR-Bedingungen wurden wie in 2.6.4 beschrieben gewählt, jedoch mit nur einem Ansatz pro Probe.

Die Aufreinigung der PCR-Produkte wurde abschließend mit dem NucleoSpin<sup>®</sup>Extract (Macherey & Nagel, GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland) nach Herstellerangaben durchgeführt.

### **2.7.2.2 Ligation**

Das PCR-Produkt wurde in das pGEM<sup>®</sup>-T Vektor System II (Promega, Mannheim, Deutschland) nach Herstellerangaben ligiert. Der Ansatz für eine Ligationreaktion bestand aus 0,5 µl T4 DNA-Ligase, 0,5 µl pGEM-T Vektor und 2,5 µl 2x Ligationspuffer. Zu diesem Ansatz wurde 1,5 µl der aufgereinigten DNA hinzugegeben und anschließen über Nacht bei 4 °C inkubiert.

### **2.7.2.3 Transformation**

Für die Transformation wurden kommerziell erworbene kompetente Zellen von dem *Echerichia coli* Stamm JM 109 (Promega GmbH, Mannheim, Deutschland) verwendet. Die JM109 Zellen wurden für 20 min auf Eis zusammen mit dem Vektor inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in einem Thermomixer (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland) für 45 s bei 42 °C behandelt. Nach der Zugabe der entsprechenden Menge SOC-Flüssigmedium erfolgte eine Inkubation für 90 min bei 37 °C und 600 g in einem Thermomixer (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland).

#### **2.7.2.4 Selektion der transformierten Zellen**

Mit einer so genannten „Blau-Weiß-Selektion“ wurden die Zellen auf die erfolgreiche Klonierung hin überprüft. Durch das Anzüchten der Zellen über Nacht bei 37 °C auf LB/Ampicillin/Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalaktopyranosid (IPTG)/5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid (X-Gal)-Platten konnten anhand der weißlich gewachsenen Kolonien die Zellen herausgefunden werden, bei denen die Klonierung erfolgreich verlaufen war. Das ligierte PCR-Produkt besitzt im Plasmid ein Insert, welches das lacZ'-Gen unterbricht, da es innerhalb des lacZ'-Gens in eine multiple Klonierungsstelle (MCS) eingefügt wurde. Beide Genhälften können keine  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität mehr erzeugen. Die dem Nährboden zugesetzten Substrate IPTG und X-Gal können von diesen Zellen nicht umgesetzt werden und die Kolonien wachsen weiß. Ist kein Insert im Plasmid enthalten, ist das lacZ'-Gen vollständig und die Substrate können umgesetzt werden, woraufhin die Kolonien auf dem Nährmedium blau wachsen.

#### **2.7.2.5 Lyse**

Von den Kolonien wurden drei weiß gefärbte ausgewählt, diese mit einem sterilen Zahnstocher aufgenommen und in 50  $\mu$ l Lysis-Puffer überführt. Das Gemisch wurde anschließend zur vollständigen Lyse für 15 min bei 95 °C und 600 rpm in einem Thermomixer (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland) inkubiert. Zur Gewinnung der DNA wurde jede Probe mit 450  $\mu$ l dest. Wasser vermischt und 4 min bei 8.000 g zentrifugiert.

#### **2.7.3 Kontroll-SSCP-Gel**

Die DNA wurde in eine nachfolgende PCR mit Com-Primern eingesetzt (2.6.4) und auf ein SSCP-Gel aufgetragen, welches der Kontrolle diente. Stimmt die Banden des Kontroll-Gels mit den Banden des SSCP-Gels, aus denen die DNA ursprünglich isoliert wurde, in ihrer Wanderungsverhalten überein, so wurde die überprüften Zellen der weißen Kolonie in LB-Medium überführt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Mit dem

NucleoSpin® Plasmid Kit (Macherey & Nagel, GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland) wurden die Plasmide der Zellen nach Herstellerangaben isoliert.

#### **2.7.4 DNA-Sequenzierung**

Die Vorbereitung der Proben erfolgte mit dem SequiTherm EXCEL™II DNA Sequencing Kit-LC (Epicenter, Madison, USA), wobei die Didesoxynukleotidtriphosphat (ddNTP) statistisch durch PCR eingebaut werden. Der Premix wurde gemäß der Herstellervorschrift angesetzt. Eine 96-Well-Mikrotiterplatte wurde mit 2 µl SequiTherm EXCEL II –LC Terminations Mix, wozu jeweils 4 µl des Premixes hinzu pipettiert wurden, befüllt. Nach kurzem Anzentrifugieren wurde jede Kavität mit einem Öltropfen versehen und ein weiteres Mal anzentrifugiert. Die 96-Well-Mikrotiterplatte wurde mit einer Folie verschlossen und in einem Thermocycler für 5 min auf 95 °C erhitzt, um die doppelsträngige DNA zu trennen. Die Reaktionsbedingungen für die PCR-Reaktion bestanden aus folgenden Schritten, die 29 Mal wiederholt wurden:

1. Schritt: 30 s bei 95 °C; 2. Schritt: 15 s bei 50 °C; 3. Schritt: 60 s bei 70 °C.

Nach der PCR wurde jede Kavität mit 2 µl Stop-Puffer (Biozym Diagnostik GmbH, Oldendorf, Deutschland) versetzt. Jede Probe wurde 3 min bei 95 °C denaturiert und jeweils 1 µl in die Taschen eines denaturierenden Polyacrylamid-Gels aufgetragen. Das Gel bestand aus 16,8 g Harnstoff, 4 ml 10x TBE Puffer, 6 ml Rapid Gel 40 % und dest. Wasser, welches zum Auffüllen auf 40 ml hinzu gegeben wurde. Vor dem Gießen wurde die Gelmatrix steril filtriert, für 2 min entgast und mit 72 µl APS (40 %) und 40 µl TEMED versetzt. Die Auftrennung der Proben erfolgte mittels kontinuierlicher Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Brumbaugh et al., 1987) in einem automatischen Sequenziergerät (MWG-Biotech AG; Ebersberg, Deutschland), in welchem die Detektion der Fragmente automatisch durchgeführt wurde.

## 2.8 Überprüfung der Pansenbakterien auf bla<sub>TEM</sub>-Gene

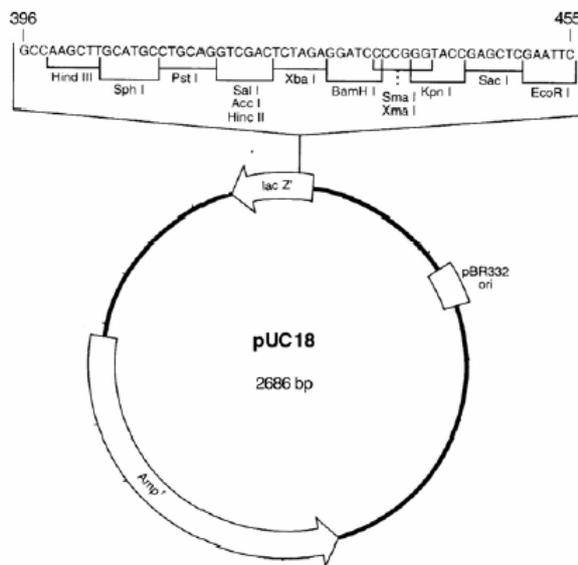
Die genomische sowie plasmidische DNA wurde von den isolierten Pansen-Mikroorganismen (Kapitel 2.5) mittels PCR auf ein Vorkommen von bla<sub>TEM</sub>-Genen überprüft. Als positive Kontrolle für die PCR dienten mit dem Vektor pUC18 klonierte Zellen vom Stamm *Escherichia coli*.

### 2.8.1 Isolierung der genomischen und der plasmidischen DNA aus Pansenbakterien

Die genomische DNA wurde mit dem NucleoSpin<sup>®</sup>-Tissue Kit (Macherey & Nagel, GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland), die plasmidische DNA mit dem NucleoSpin<sup>®</sup>-Plasmid Kit (Macherey & Nagel, GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland) nach Angaben des Herstellers isoliert. Von jeder Probe wurde zur abschließenden Kontrolle der Isolierung 8 µl von der jeweiligen DNA entnommen, mit 2 µl Ladepuffer (Fermentas GmbH, St.Leon-Rot, Deutschland) vermischt und auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen.

### 2.8.2 Klonierung von TOP10S' Zellen mit dem Vektor pUC18

Für die Klonierung wurden kommerziell erworbene kompetente Zellen vom *Escherichia coli* Stamm TOP 10F' (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) sowie der Vektor pUC18 (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) verwendet (Abb. 9). Der Vektor wurde in die Zellen mit dem TorpoTA Cloning Kit (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) nach Herstellerangaben kloniert. Zur Überprüfung der klonierten Zellen wurden diese in 4 ml LB-Medium, welches Ampicillin (0,1 mg/ml) enthielt, bei 37 °C und 600 g in einem Thermomixer (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland) über Nacht inkubiert. Nur die Zellen, denen der Vektor pUC18 erfolgreich inkloniert wurde, konnten sich aufgrund des auf dem Vektor befindlichen Ampicillin-Resistenzgens (Amp<sup>R</sup>) vermehren.



**Abb. 9: Aufbau des Klonierungsvektors pUC18 mit einem  $\beta$ -Laktamase Gen ( $Amp^R$ ).**

### 2.5.2 Isolierung der plasmidischen DNA (pUC18) aus den TOP 10F' Zellen

Die plasmidische DNA wurde mit dem NucleoSpin<sup>®</sup>-Plasmid (Macherey & Nagel, GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland) nach Angaben des Herstellers isoliert. Von jeder Probe wurde zur abschließenden Kontrolle der Isolierung 8  $\mu$ l von der jeweiligen DNA entnommen, mit 2  $\mu$ l Ladepuffer (Fermentas GmbH, St.Leon-Rot, Deutschland) vermischt und auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen.

### 2.5.2 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Die Bedingungen der PCR zum Nachweis des bla<sub>TEM</sub>-Gens erfolgt wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben.

### 3 Ergebnisse

Die Darstellung der Ergebnisse gliedert sich in folgende vier Hauptabschnitte:

#### **Teil I Vorstellung des Vorversuches:**

Studien über Auswirkungen von transgenem Mais im Vergleich zu isogenem Mais auf den mikrobiellen Stoffwechsel unter dem Einfluss von Ampicillin im RUSITEC-System. Die Ergebnisse dienen der Erstellung des Versuchsprotokolls für die unter Teil II und III vorgestellten Hauptversuche. Zusätzlich wurden die Untersuchungen zur Struktur der mikrobiellen Gemeinschaft im Vormagen eines fistulierten Rindes in Abhängigkeit von der Zeit nach der Fistulierung durchgeführt (Kapitel 3.1).

#### **Teil II Vorstellung des ersten Hauptversuches:**

Es wurden äquivalent zum Vorversuch RUSITEC-Studien unter dem Einfluss von Ampicillin durchgeführt und neben den biochemischen Profilen zudem SSCP-Profile an definierten Zeitpunkten erstellt, die eine Aussage über die Beeinflussung der Struktur der mikrobiellen Gemeinschaft durch transgenen Mais unter dem Einfluss von Ampicillin erlauben (Kapitel 3.2).

#### **Teil III Austausch des Antibiotikums Ampicillin durch Kanamycin:**

Durch den Austausch des Antibiotikums sollte gezeigt werden, ob die bei transgenem Mais unter Ampicillin-Einfluss auftretenden Unterschiede im mikrobiellen Stoffwechsel bzw. der strukturellen Zusammensetzung der Gemeinschaft auch unter dem Einfluss des Antibiotikums Kanamycin auftreten (Kapitel 3.3).

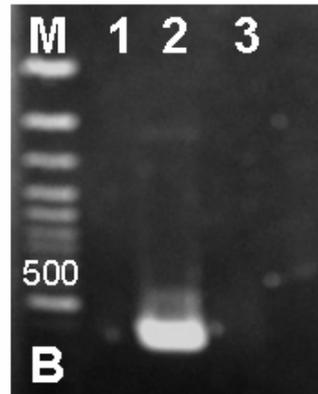
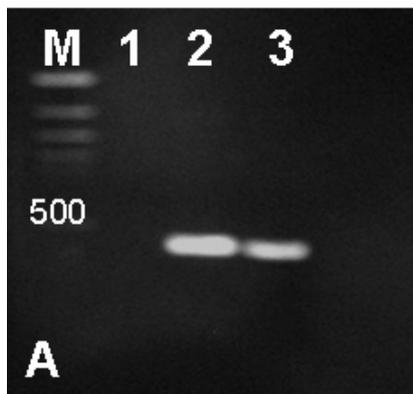
#### **Teil IV Untersuchung des Genoms von Pansenmikroorganismen auf Sequenzen des**

**bla<sub>TEM</sub>-Gens:** Nach Isolierung der genomischen bzw. der plasmidischen DNA von Pansen-Mikroorganismen sollte mittels PCR überprüft werden, ob ein Transfer, des aus der transgenen Pflanze stammende bla<sub>TEM-1</sub>-Gens, stattgefunden hat (Kapitel 3.4).

### 3.1 I. Teil

#### 3.1.1 Verifizierung der transgenen Eigenschaften der Bt-Mais-DNA

Um sicherzustellen, dass der isogene Mais nicht mit transgenem Mais kontaminiert war und der transgene Mais das für die Untersuchungen wichtige  $bla_{TEM-1}$ -Gen enthielt, wurde aus beiden Maischargen die DNA extrahiert. Die Amplifikation des  $bla_{TEM-1}$ -Gens ergab in der transgenen Mais-DNA positive Bande in der gewünschten Größe von 350 bp (Abb. 10 A). In der isogenen Mais-DNA hingegen konnte kein Amplifikat erzeugt werden (Abb. 10 B). Zur Validierung der PCR wurde jeweils eine Negativ-Kontrolle (Wasser anstelle von DNA) sowie eine Positiv-Kontrolle (pUC18-DNA anstelle von Bakterien-DNA) durchgeführt. Diese Ergebnisse bestätigen, dass der in diesen Untersuchungen eingesetzt Bt-176 Mais transgene Eigenschaften besaß und dass der isogene Mais nicht mit transgenem Mais kontaminiert war.



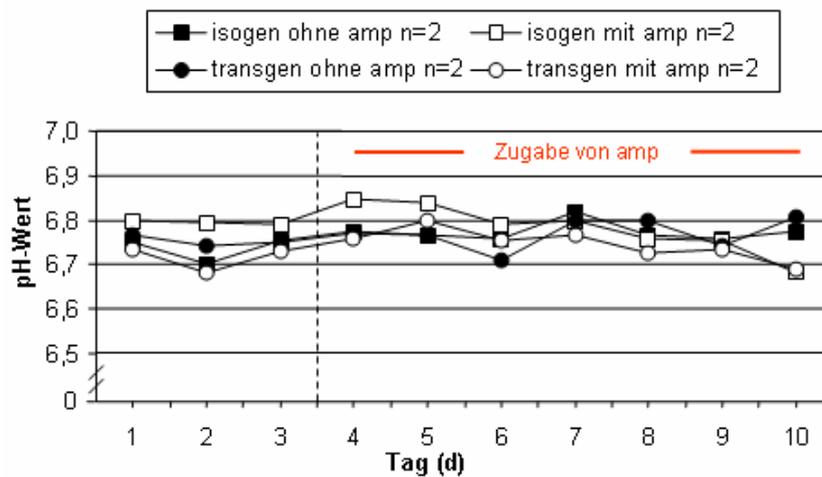
**Abb. 10: PCR-Nachweis des  $bla_{TEM-1}$ -Gens in (A) transgenem Mais und (B) isogenem Mais.**

M = Marker; 1 = Negativ-Kontrolle (Wasser);  
2 = Positiv-Kontrolle (pUC18); 3 = Mais-DNA

### 3.1.2 Untersuchung des Einflusses transgener Maisversorgung und Ampicillin im RUSITEC-System

#### 3.1.2.1 pH-Wert und Redoxpotential

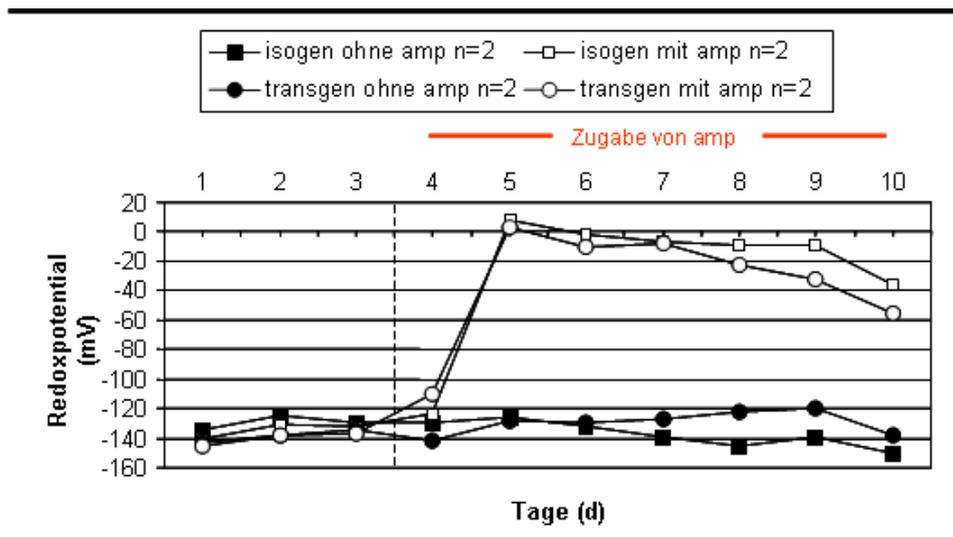
Bei allen Versuchsansätzen schwankten die pH-Werte in der Kontrollphase zwischen 6,68 und 6,80. Die kontinuierliche Zugabe von Ampicillin (1,67 g/l) ab dem 4. Tag hatte weder bei den mit isogenem Mais noch bei den mit transgenem Mais versorgten Ansätzen einen Einfluss auf den pH-Wert (Abb. 11).



**Abb. 11: Einfluss von transgenem Mais auf den pH-Wert im RUSITEC vor und nach Ampicillin-Zugabe.** Dargestellt ist der Verlauf des pH-Wertes über den Versuchszeitraum. Die gestrichelte Linie trennt die Kontrollphase (3 Tage) von der Versuchsphase (7 Tage). Die Zugabe von Ampicillin (amp) erfolgte kontinuierlich ab Tag 4.

Die in der Kontrollphase gemessenen Werte für das Redoxpotential lagen für alle Versuchsansätze in einem Bereich von -140 bis -130 mV (Abb. 12). In den Ansätzen ohne Ampicillin wurden keine Änderungen beobachtet.

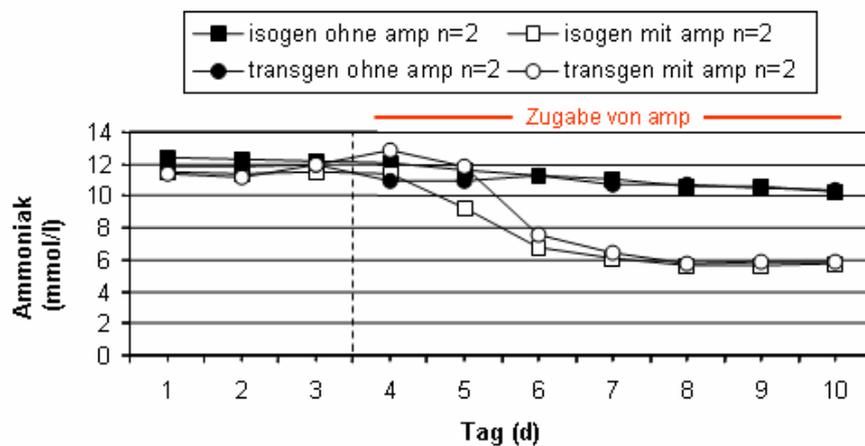
Die Zugabe von Ampicillin bewirkte unabhängig von der Maisversorgung eine Änderung des Redoxpotentials. Über den gesamten Versuchszeitraum konnten sowohl in den isogenen als auch in den transgenen Ansätzen unter Ampicillin-Einfluss positivere Werte gegenüber den Kontrollansätzen gemessen werden.



**Abb. 12: Einfluss von transgenem Mais auf das Redoxpotential im RUSITEC vor und nach Ampicillin-Zugabe.** Dargestellt ist der Verlauf des Redoxpotentials über den Versuchszeitraum. Die gestrichelte Linie trennt die Kontrollphase (3 Tage) von der Versuchsphase (7 Tage). Die Zugabe von Ampicillin (amp) erfolgte kontinuierlich ab Tag 4.

### 3.1.2.2 Ammoniak-Konzentrationen

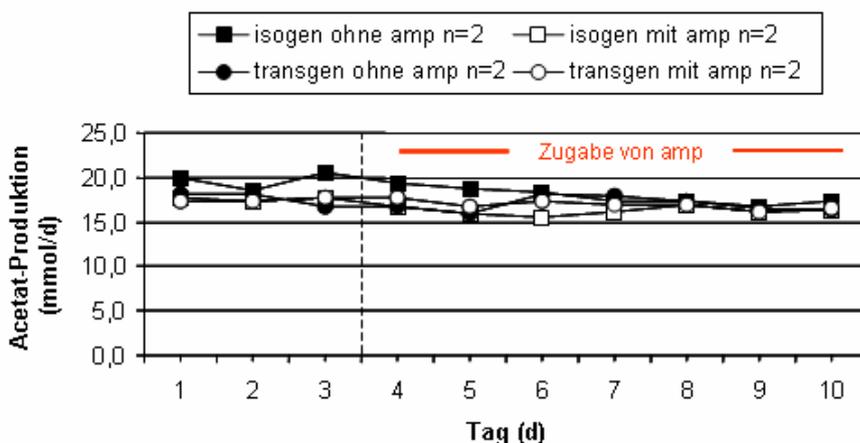
Die Ammoniak-Konzentrationen betragen in der Kontrollphase für alle Ansätze durchschnittlich 11 mmol/l. Nach der Ampicillin-Behandlung wurden für beide Versuchsgruppen die Ammoniak-Konzentrationen auf Werte um 6 mmol/l reduziert. Eine Erholung der Ammoniak-Konzentration konnte weder in den isogen noch in den transgen versorgten Ansätzen unter Ampicillin-Einfluss beobachtet werden. Die unterschiedlichen Maisquellen hatten keine Auswirkungen auf die Ammoniak-Konzentrationen (Abb. 13).



**Abb. 13: Einfluss von transgenem Mais auf die Ammoniak-Konzentrationen im RUSITEC vor und nach Ampicillin-Zugabe.** Dargestellt ist der Verlauf der  $\text{NH}_3$ -Konzentration über den Versuchszeitraum. Die gestrichelte Linie trennt die Kontrollphase (3 Tage) von der Versuchsphase (7 Tage). Die Zugabe von Ampicillin (amp) erfolgte kontinuierlich ab Tag 4.

### 3.1.2.3 Produktion kurzkettiger Fettsäuren (Acetat, Propionat, Butyrat)

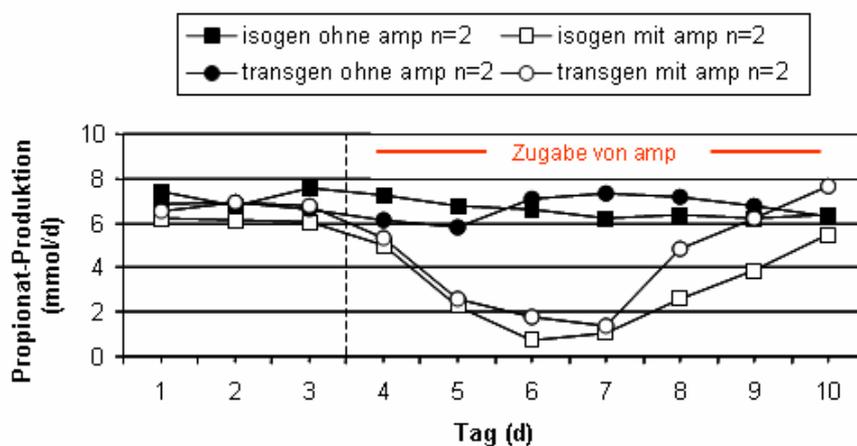
In der Kontrollphase konnte für Acetat bei allen Versuchsgruppen eine Produktionsrate zwischen 17 und 20 mmol/d gemessen werden (Abb. 14).



**Abb. 14: Einfluss von transgenem Mais auf die Acetat-Produktion im RUSITEC vor und nach Ampicillin-Zugabe.** Dargestellt ist der Verlauf der Acetat-Produktionsraten über den Versuchszeitraum. Die gestrichelte Linie trennt die Kontrollphase (3 Tage) von der Versuchsphase (7 Tage). Die Zugabe von Ampicillin (amp) erfolgte kontinuierlich ab Tag 4.

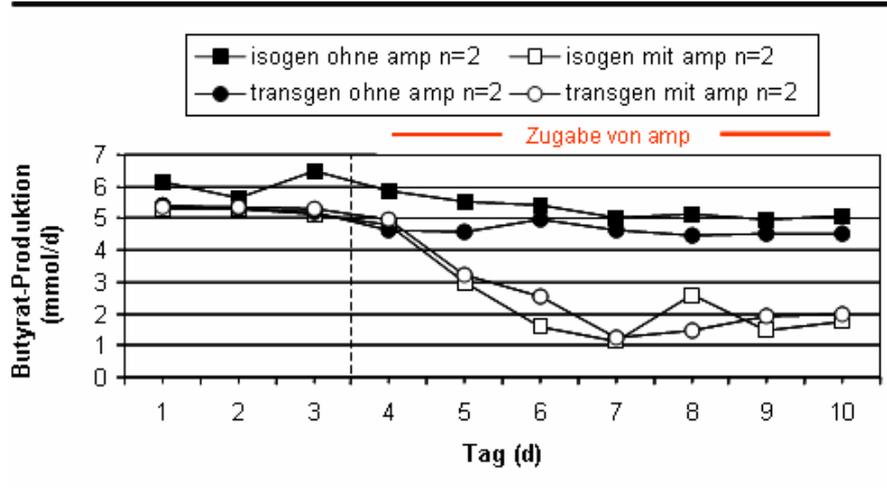
Die Zugabe von Ampicillin hatte weder in den mit isogenem noch in den mit transgenem Mais versorgten Fermentern einen Einfluss (Abb. 14).

Die Produktionsraten für Propionat lagen in der Kontrollphase bei allen Versuchsgruppen zwischen 6 und 8 mmol/d. Die Ampicillin-Behandlung zu Beginn der Versuchsphase bewirkte in beiden mit unterschiedlichen Maisquellen versorgten Versuchsansätzen eine Abnahme der Produktion dieser Fettsäure bis auf 1 mmol/d am 7. Tag. Ab dem 8. Tag konnte in beiden Versuchsansätzen eine Erholung in der Produktionsrate von Propionat beobachtet werden, wobei in den mit transgenem Mais versorgten Ansätze die Ausgangswerte schneller erreicht wurden als in den mit isogenem Mais versorgten Ansätzen (Abb. 15).



**Abb. 15: Einfluss von transgenem Mais auf die Propionat-Produktion im RUSITEC vor und nach Ampicillin-Zugabe.** Dargestellt ist der Verlauf der Propionat-Produktionsraten über den Versuchszeitraum. Die gestrichelte Linie trennt die Kontrollphase (3 Tage) von der Versuchsphase (7 Tage). Die Zugabe von Ampicillin (amp) erfolgte kontinuierlich ab Tag 4.

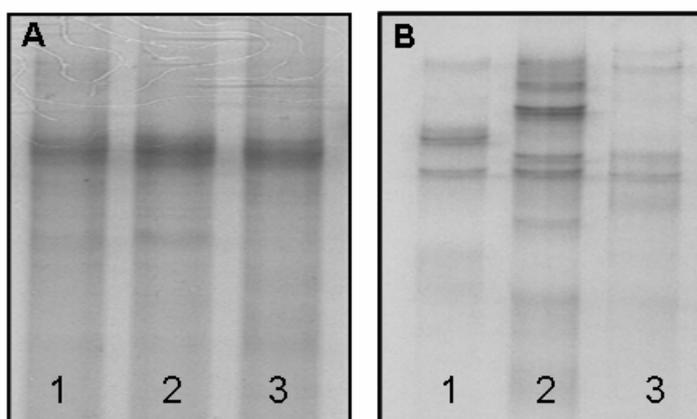
Für Butyrat betrug die Produktionsrate für alle Ansätze während der Kontrollphase durchschnittlich 5.5 mmol/d. Die Zugabe von Ampicillin bewirkte auch bei Butyrat eine deutliche Abnahme in der Produktion, von der sowohl die mit isogenem als auch die mit transgenem Mais versorgten Versuchsansätze betroffen waren. Die geringste Butyrat-Produktion für beide Versuchsgruppen wurde am 7. Tag mit 1,6 mmol/d gemessen. Eine Restitution der Produktionsraten zu den Ausgangswerten konnte nicht beobachtet werden (Abb. 16).



**Abb. 16: Einfluss von transgenem Mais auf die Butyrat-Produktion im RUSITEC vor und nach Ampicillin-Zugabe.** Dargestellt ist der Verlauf der Butyrat-Produktionsraten über den Versuchszeitraum. Die gestrichelte Linie trennt die Kontrollphase (3 Tage) von der Versuchsphase (7 Tage). Die Zugabe von Ampicillin (amp) erfolgte kontinuierlich ab Tag 4.

### 3.1.3 Zeitliche Anpassung der Bakterien- und Pseudomonaden-Populationen im Rinderpensan nach Fistulierung

In Abbildung 17 A wurde das genetische Profil aller Bakterien dargestellt. Die Analyse der Bandenmuster ergab für die drei ausgewählten Zeitpunkte eine Ähnlichkeit von 90 %.



**Abb. 17: SSCP-Profile von PCR amplifizierten 16S rRNA Genen aus der mikrobiellen Gemeinschaften des Rinderpensans. (A) Bakterien bzw. (B) Pseudomonaden.** Die Zahlen beschreiben den Zeitpunkt der Probenentnahme aus dem Pansen. 1= während der Operation; 2= fistuliert (4 Wochen); 3= fistuliert (32 Wochen)

Das genetische Profil der Pseudomonaden wurde in Abbildung 17 B dargestellt. Unmittelbar nach der Fistulierung (1) zeigte sich eine deutlich geringere Diversität verglichen mit dem Zeitpunkt vier Wochen nach der Fistulierung (2). Die Vergleichsanalyse dieser beiden Spuren zeigte eine Ähnlichkeit von 44 %. 32 Wochen nach der Fistulierung (3) nahm die Diversität der Pseudomonadenpopulation deutlich ab und verglichen mit dem Zustand vor der Fistulierung konnte eine Ähnlichkeit von 61 % ermittelt werden.

#### **3.1.4 Ableitung des endgültigen Versuchsprotokolls aufgrund der Ergebnisse**

Den Ergebnissen des I. Teils zufolge wurde das Versuchsdesign und die experimentellen Bedingungen für den ersten (und zweiten) Hauptversuch festgelegt.

In weiteren Untersuchungen sollte geklärt werden, ob sich die ermittelten Ergebnisse unter identischen Voraussetzungen im RUSITEC-System reproduzieren lassen. Hierbei dauerte die Kontrollphase wie zuvor drei Tage, während die anschließende Versuchsphase um drei Tage verlängert wurde, um die Verläufe der biochemischen Parameter im besonderen die Produktion von Propionat, über einen längeren Zeitraum beobachten zu können. Der Versuch wurde anschließend unter identischen Bedingungen wiederholt.

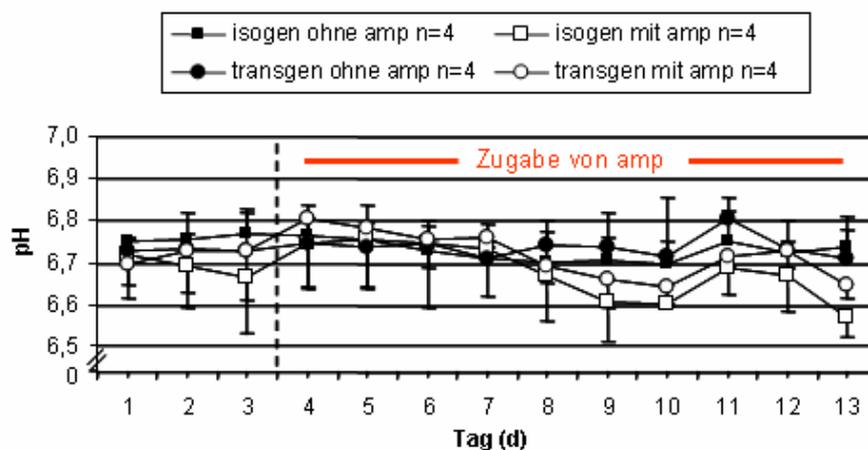
Neben biochemischen Analysen wurden zusätzlich Untersuchungen der Struktur der mikrobiellen Gemeinschaft durchgeführt. Hierzu wurden an definierten Tagen (2. Tag Kontrollphase und 8. und 13. Tag Versuchsphase) Mikroorganismen aus dem RUSITEC-System isoliert und mit Hilfe der SSCP-Technik genetische Profile erstellt.

## 3.2 II. Teil

### 3.2.1 Untersuchung des Einflusses transgener Maisversorgung und Ampicillin im RUSITEC-System

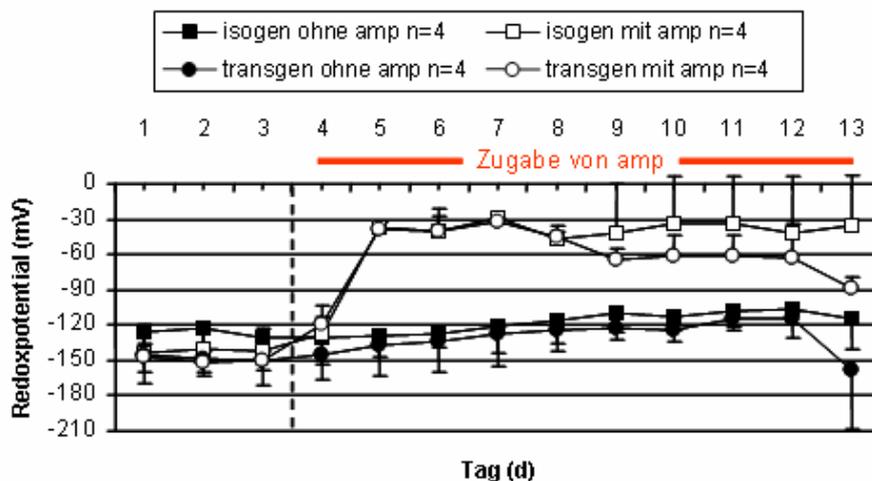
#### 3.2.1.1 pH-Wert und Redoxpotential

Die pH-Werte schwankten für alle Ansätze innerhalb der Kontrollphase in einem engen Bereich zwischen 6,55 und 6,81. Die Zugabe von Ampicillin (1,67 g/l) hatte keinen Einfluss auf den pH-Wert. Über den gesamten Versuchszeitraum konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den isogen und transgen versorgten Ansätzen im pH-Wert gemessen werden (Abb. 18).



**Abb. 18: Einfluss von transgenem Mais auf den pH-Wert im RUSITEC vor und nach Ampicillin-Zugabe.** Dargestellt ist der Verlauf des pH-Wertes über den Versuchszeitraum (Mittelwerte  $\pm$  SEM). (One-Way-ANOVA: Faktor Mais n.s.; Two-Way-ANOVA: Faktor Ampicillin n.s. Faktor Mais n.s.). Die gestrichelte Linie trennt die Kontrollphase (3 Tage) von der Versuchsphase (10 Tage). Die Zugabe von Ampicillin (amp) erfolgte kontinuierlich ab Tag 4.

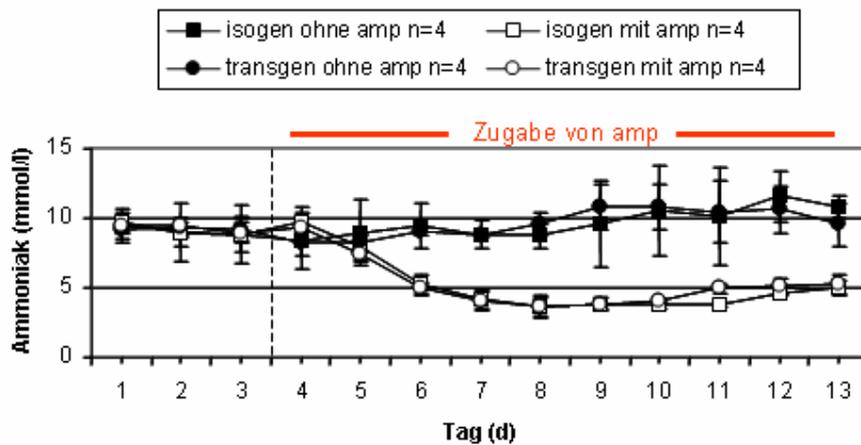
Die Messwerte für das Redoxpotential lagen in der Kontrollphase für alle Ansätze in einem Bereich zwischen -150 bis -120 mV. Nach der Zugabe von Ampicillin konnten ab dem 5. Versuchstag signifikante Änderungen des Redoxpotentials in Richtung positiver Werte verglichen mit den unbehandelten Ansätzen beobachtet werden, während der Faktor Mais keinen Einfluss hatte (Abb. 19).



**Abb. 19: Einfluss von transgenem Mais auf das Redoxpotential im RUSITEC vor und nach Ampicillin-Zugabe.** Dargestellt ist der Verlauf des pH-Wertes über den Versuchszeitraum (Mittelwerte  $\pm$  SEM). (One-Way-ANOVA: 1.-3. Tag Faktor Mais n.s.; Two-Way-ANOVA: 4. Tag Faktor Ampicillin n.s., Faktor Mais n.s.; 5.-13. Tag Faktor Ampicillin  $p < 0.001$ , Faktor Mais n.s.). Die gestrichelte Linie trennt die Kontrollphase (3 Tage) von der Versuchsphase (10 Tage). Die Zugabe von Ampicillin (amp) erfolgte kontinuierlich ab Tag 4.

### 3.2.1.2 Ammoniak-Konzentrationen

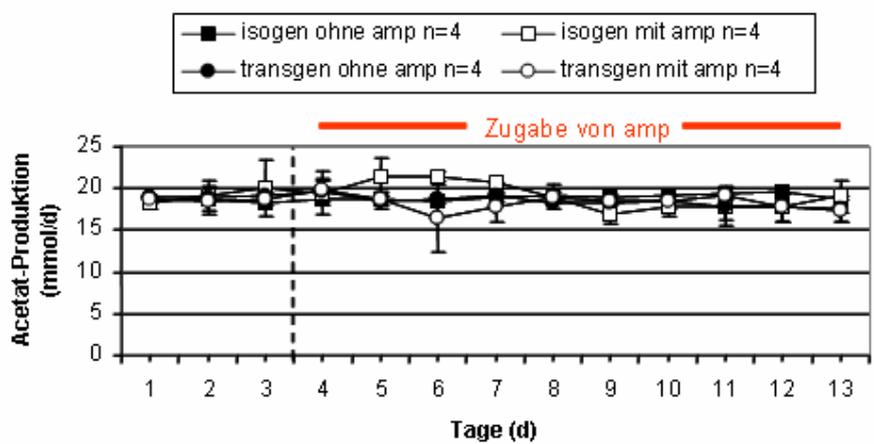
Während der Kontrollphase ergaben die Messungen der Ammoniak-Konzentrationen für alle Ansätze einen durchschnittlichen Wert von 9 mmol/l. Nach der Zugabe des Ampicillins reagierten die isogen sowie die transgen versorgten Versuchsansätze ab dem 6. Versuchstag verglichen mit den Kontrollansätzen mit einer signifikanten Abnahme der Ammoniak-Konzentrationen auf durchschnittlich 4,5 mmol/l und blieben während der gesamten Versuchsphase nahezu konstant. Ein signifikanter Unterschied in Abhängigkeit von der Maisversorgung konnte über den gesamten Versuchszeitraum nicht beobachtet werden (Abb. 20).



**Abb. 20: Einfluss von transgenem Mais auf die Ammoniak-Konzentrationen im RUSITEC vor und nach Ampicillin-Zugabe.** Dargestellt ist der Verlauf der Ammoniak-Konzentration über den Versuchszeitraum (Mittelwerte  $\pm$  SEM). (One-Way-ANOVA: 1.-3. Tag Faktor Mais n.s.; Two-Way-ANOVA: 4.-5. Tag Faktor Ampicillin n.s., Faktor Mais n.s.; 6.-13. Tag Faktor Ampicillin  $p < 0.001$ , Faktor Mais n.s.). Die gestrichelte Linie trennt die Kontrollphase (3 Tage) von der Versuchsphase (10 Tage). Die Zugabe von Ampicillin (amp) erfolgte kontinuierlich ab Tag 4.

### 3.2.1.3 Produktion kurzkettige Fettsäuren (Acetat, Propionat, Butyrat)

Die Produktionsraten von Acetat lagen in der Kontrollphase bei allen Ansätzen bei durchschnittlich 18 mmol/d. Über den gesamten Versuchszeitraum hatten weder die Behandlung mit Ampicillin noch die unterschiedliche Maisversorgung einen signifikanten Einfluss auf die Produktionsraten von Acetat (Abb. 21).

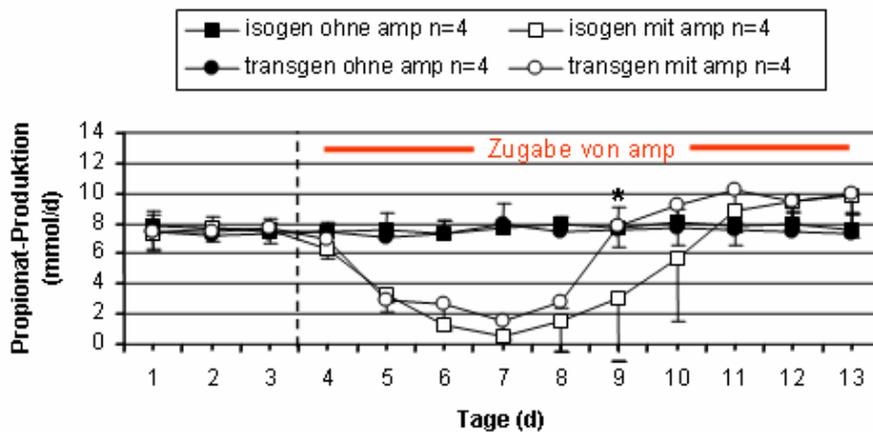


**Abb. 21: Einfluss von transgenem Mais auf die Acetat-Produktion im RUSITEC vor und nach Ampicillin-Zugabe.** Dargestellt ist der Verlauf der Acetat-Produktion über den Versuchszeitraum (Mittelwerte  $\pm$ SEM). (One-Way-ANOVA: 1.-3. Tag Faktor Mais n.s.; Two-Way-ANOVA: 4.-13. Tag Faktor Ampicillin n.s., Faktor Mais n.s.). Die gestrichelte Linie trennt die Kontrollphase (3 Tage) von der Versuchsphase (10 Tage). Die Zugabe von Ampicillin (amp) erfolgte kontinuierlich ab Tag 4.

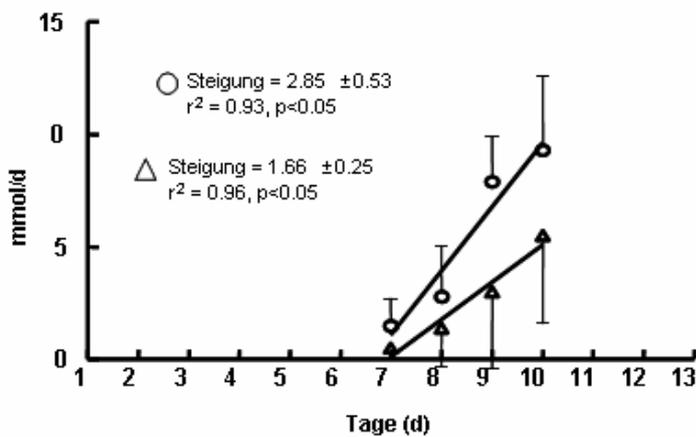
Für Propionat wurden in allen Ansätzen in der Kontrollphase Produktionsraten von 7,5 mmol/d gemessen. Die Zugabe von Ampicillin bewirkte ab dem 5. Versuchstag einen signifikanten Abfall der Produktionsrate von Propionat, der bis zum 7. Versuchstag andauerte. Für den 9. Tag konnte eine signifikant höhere Produktion an Propionat in den mit transgenem Mais versorgten Ansätzen gegenüber den mit isogenem Mais versorgten Ansätzen gemessen werden (Abb. 22).

Analysiert man die Daten dieser Erholungsphase vom 7. bis zum 10. Versuchstag isoliert mittels Regression, so zeigte sich deutlich ein linearer Zusammenhang ( $r^2=0,93$  bzw. 0.96). Die Steigung der aus den mit transgenem Mais versorgten Fermentern betrug 2,85, während die Steigung der isogenem Gruppe 1.66 betrug (Abb. 23). Dies indizierte eine schnellere Erholung der Propionat Produktionsrate bei den mit transgenem Mais versorgten Ansätzen.

Während die transgen versorgten Ansätze bereits am 9. Tag das Produktionsniveau der Kontrollansätze wieder erreicht hatten, näherten die isogen versorgten Ansätze sich erst am 11. Tag dem Produktionsniveau der Kontrollen an.

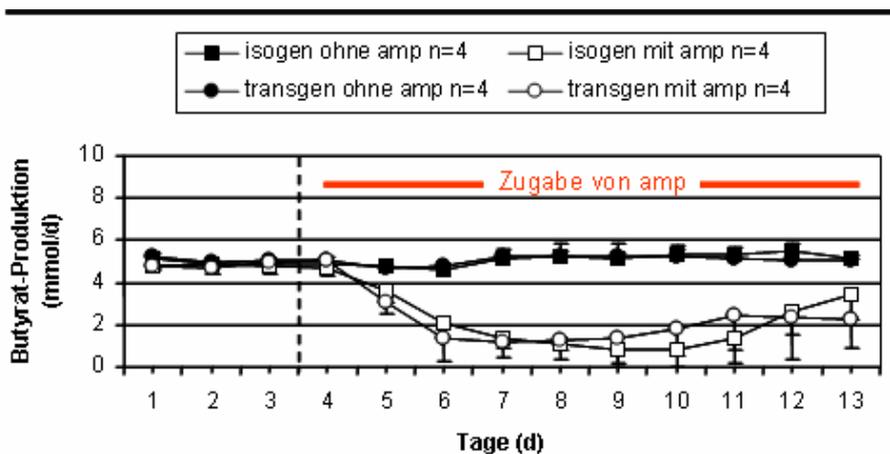


**Abb. 22: Einfluss von transgenem Mais auf die Propionat-Produktion im RUSITEC vor und nach Ampicillin-Zugabe.** Dargestellt ist der Verlauf der Propionat-Produktion über den Versuchszeitraum (Mittelwerte  $\pm$ SEM). (One-Way-ANOVA: 1.-3. Tag Faktor Mais n.s.; Two-Way-ANOVA: 4. Tag Faktor Ampicillin n.s.; Faktor Mais n.s.; 5.-8. Tag Faktor Ampicillin  $p < 0.001$ ; Faktor Mais n.s. nur am 9. Tag  $p < 0.01$  [\*]; 10.-13. Tag Faktor Ampicillin n.s.; Faktor Mais n.s.). Die gestrichelte Linie trennt die Kontrollphase (3 Tage) von der Versuchsphase (10 Tage). Die Zugabe von Ampicillin (amp) erfolgte kontinuierlich ab Tag 4.



**Abb. 23: Darstellung der Propionat Produktionsraten mittels linearer Regression.** Zeitlicher Verlauf der Erholung von transgen (o) und isogen (Δ) versorgten Fermentern in den Tagen 7-10.

Für Butyrat konnte in der Kontrollphase für alle Ansätze eine durchschnittliche Produktionsrate von 5 mmol/d gemessen werden. Nach der Zugabe von Ampicillin konnte ab dem 6. Tag ein signifikanter Rückgang in der Produktion von Butyrat verglichen mit den Kontrollansätzen beobachtet werden sowie eine Erholung innerhalb der Butyrat-Produktion ab dem Tag 11. Ein signifikanter Unterschied zwischen isogen und transgen versorgten konnte bei der Analyse der Butyrat-Produktion nicht abgeleitet werden (Abb. 24).



**Abb. 24: Einfluss von transgenem Mais auf die Butyrat-Produktion im RUSITEC vor und nach Ampicillin-Zugabe.** Dargestellt ist der Verlauf der Butyrat-Produktion über den Versuchszeitraum (Mittelwerte  $\pm$ SEM). (One-Way-ANOVA: 1.-3. Tag Faktor Mais n.s.; Two-Way-ANOVA: 4.-5. Tag Faktor Ampicillin n.s.; Faktor Mais n.s.; 6.-12. Tag Faktor Ampicillin  $p < 0.001$ ; Faktor Mais n.s., 13. Tag Faktor Ampicillin n.s.; Faktor Mais n.s.). Die gestrichelte Linie trennt die Kontrollphase (3 Tage) von der Versuchsphase (10 Tage). Die Zugabe von Ampicillin (amp) erfolgte kontinuierlich ab Tag 4.

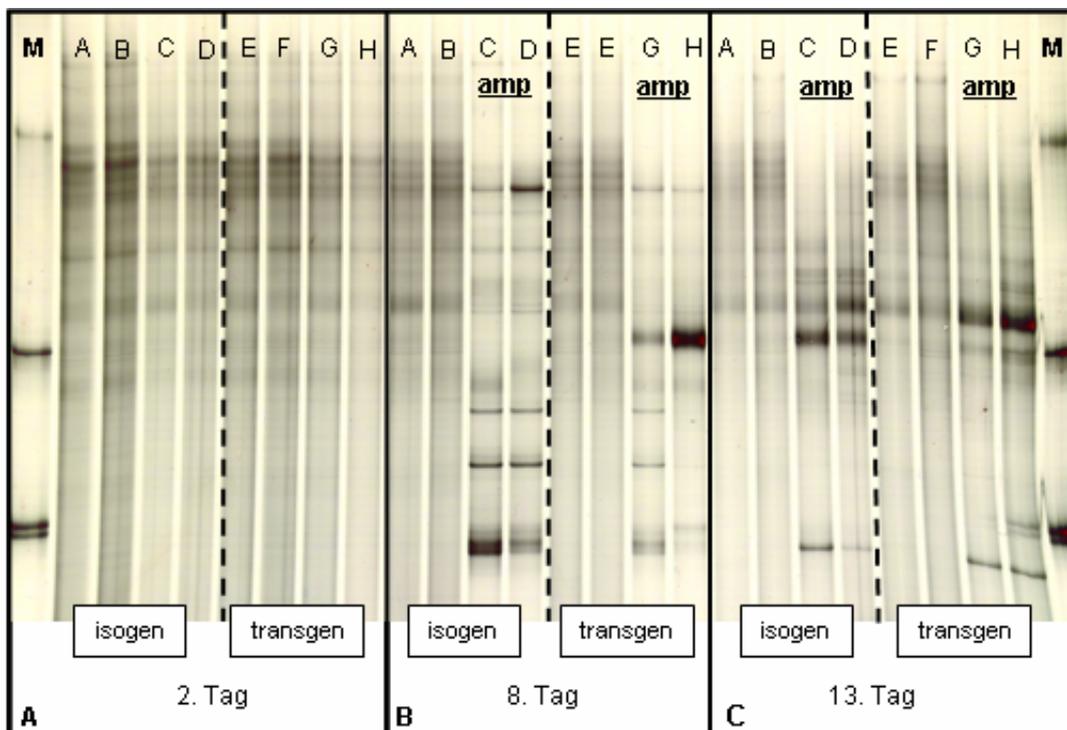
### 3.2.2 Einfluss transgener Maisversorgung auf die strukturelle Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft unter Ampicillin-Behandlung im RUSITEC-System

Die bisher in den RUSITEC-Versuchen gewonnenen biochemischen Daten zeigten die metabolischen Leistungen der gesamten Population. Ein Einblick in die Struktur der mikrobiellen Gemeinschaft sollte helfen, die biochemischen Daten genauer zu beschreiben. Hierzu wurden anhand der 16S rRNA Gene SSCP-Profile für die gesamte

Mikroorganismen-Gemeinschaft, die Domänen Bakterien und Archaeen sowie der beiden Gruppen Clostridien und Pseudomonaden dargestellt.

### 3.2.2.1 Die gesamte mikrobielle Gemeinschaft (Com) im SSCP-Profil

Die Analyse des SSCP-Profiles der gesamten mikrobiellen Gemeinschaft (Com) zeigte in der Kontrollphase (2. Tag) keine Unterschiede zwischen den isogen und transgen versorgten Ansätzen (Abb. 25/Tab. 7).



**Abb. 25: Einfluss von transgenem Mais vor und nach Ampicillin-Zugabe auf die gesamte mikrobielle Gemeinschaft (Com) dargestellt im SSCP-Gel.** A: Kontrollphase; B: Versuchsphase; C: Versuchsphase; Die Buchstaben A-H der einzelnen Spuren bezeichnen die jeweiligen Fermenter. M = Marker; A-D = isogener Mais; E-H = transgener Mais; amp = Ampicillin-Gabe

Am 8. und 13. Tag der Versuchsphase konnte ein deutlicher Einfluss der Ampicillin-Behandlung auf die Mikroorganismenpopulation beobachtet werden. Die unterschiedliche Maisversorgung hatte an beiden Versuchstagen Unterschiede im Bandenmuster zur Folge.

**Tab. 7: Analyse der gesamten mikrobiellen Gemeinschaft (Com) im SSCP-Gel**

Tag	Fermenter	Ähnlichkeiten (%) <sup>*</sup>
2 +	isogen / transgen ohne amp	≥ 90
8 +	isogen / transgen ohne amp	≥ 90
	isogen / transgen mit amp	32
13 +	isogen / transgen ohne amp	89
	isogen / transgen mit amp	60
8 #	isogen + transgen mit und ohne amp	20
13 #	isogen + transgen mit und ohne amp	36

\* Ähnlichkeiten von ≥ 90 % in den Bandenprofilen wurden als gleich gewertet

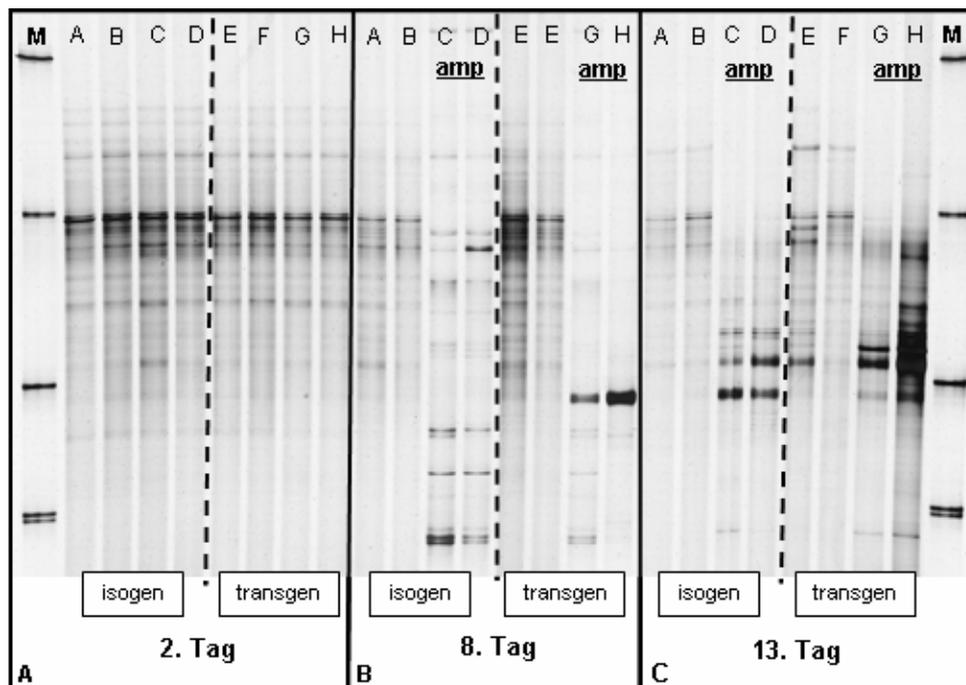
+ Maisversorgung in Abhängigkeit von der Zugabe von Ampicillin

# Ampicillin-Effekt unabhängig von der Mais-Versorgung

### 3.2.2.2 Die Domäne der Bakterien im SSCP-Profil

In der Kontrollphase konnte zwischen den isogenen und transgenen Ansätzen ohne Ampicillin kein Unterschied im Bandenmuster beobachtet werden (Abb. 26/Tab. 8).

Durch die Ampicillin-Behandlung zeigte sich sowohl am 8. als auch am 13. Versuchstag eine deutliche Beeinflussung im Bandenmuster. Wie schon bei dem SSCP-Gel der gesamten mikrobiellen Gemeinschaft beobachtet, zeigte auch das SSCP-Gel der Bakterien unter Ampicillin-Einfluss in Abhängigkeit von der Maisversorgung deutliche Unterschiede im Bandenmuster.



**Abb. 26: Einfluss von transgenem Mais vor und nach Ampicillin-Zugabe auf die Domäne Bakterien dargestellt im SSCP-Gel.** A: Kontrollphase 2. Tag; B: Versuchsphase 8. Tag; C: Versuchsphase 13. Tag. Die Buchstaben A-H der einzelnen Spuren bezeichnen die jeweiligen Fermenter. M = Marker; A-D = isogener Mais; E-H = transgener Mais; amp = Ampicillin-Gabe. Die gestichelte Linie trennt die Ansätze hinsichtlich der Maisversorgung

**Tab. 8: Analyse des Bakterien-SSCP-Gels.**

Tag	Fermenter	Ähnlichkeiten (%) <sup>*</sup>
2 +	isogen / transgen ohne amp	≥ 90
8 +	isogen / transgen ohne amp	≥ 90
	isogen / transgen mit amp	20
13 +	isogen / transgen ohne amp	≥ 90
	isogen / transgen mit amp	55
8 #	isogen + transgen mit und ohne amp	10
13 #	isogen + transgen mit und ohne amp	22

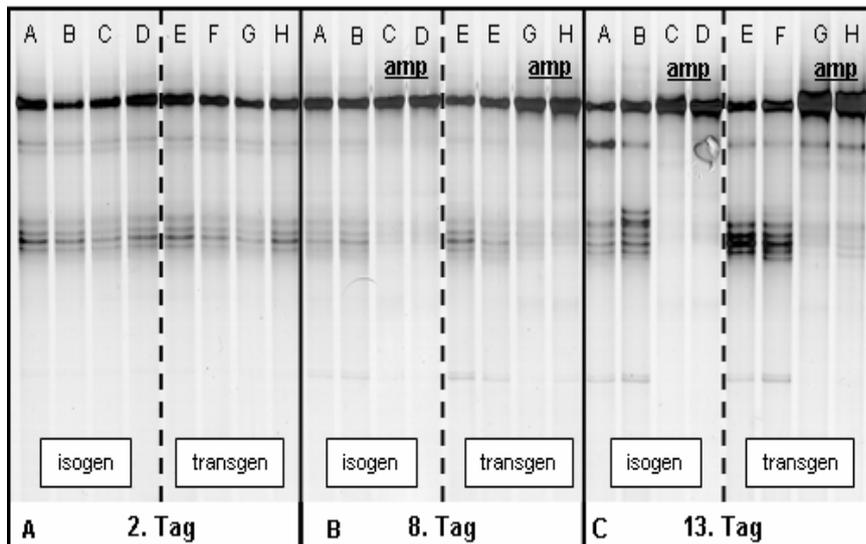
\* Ähnlichkeiten von ≥ 90 % in den Bandenprofilen wurden als gleich gewertet

+ Maisversorgung in Abhängigkeit von der Zugabe von Ampicillin

# Ampicillin-Effekt unabhängig von der Mais-Versorgung

### 3.2.2.3 Die Domäne der Archaeen im SSCP-Profil

Die Auswertung des SSCP-Profiles der Archaeen ergab in der Kontrollphase sowie für den 8. und 13. Tag der Versuchsphase keine Unterschiede im Bandenmuster aller Ansätze (Abb. 27/Tab. 9).



**Abb. 27: Einfluss von transgenem Mais vor und nach Ampicillin-Zugabe auf die Archaeen dargestellt im SSCP-Gel.** A: Kontrollphase 2. Tag; B: Versuchsphase 8. Tag; C: Versuchsphase 13. Tag. Die Buchstaben A-H der einzelnen Spuren bezeichnen die jeweiligen Fermenter. A-D = isogener Mais; E-H = transgener Mais; amp = Ampicillin-Gabe. Die gestichelte Linie trennt die Ansätze hinsichtlich der Maisversorgung.

**Tab. 9: Analyse des Archaeen-SSCP-Gels.**

Tag	Fermenter	Ähnlichkeiten (%) <sup>*</sup>
2 +	isogen / transgen ohne amp	≥ 90
8 +	isogen / transgen ohne amp	≥ 90
	isogen / transgen mit amp	≥ 90
13 +	isogen / transgen ohne amp	≥ 90
	isogen / transgen mit amp	≥ 90
8 #	isogen + transgen mit und ohne amp	≥ 90
13 #	isogen + transgen mit und ohne amp	65

\* Ähnlichkeiten von ≥ 90 % in den Bandenprofilen wurden als gleich gewertet

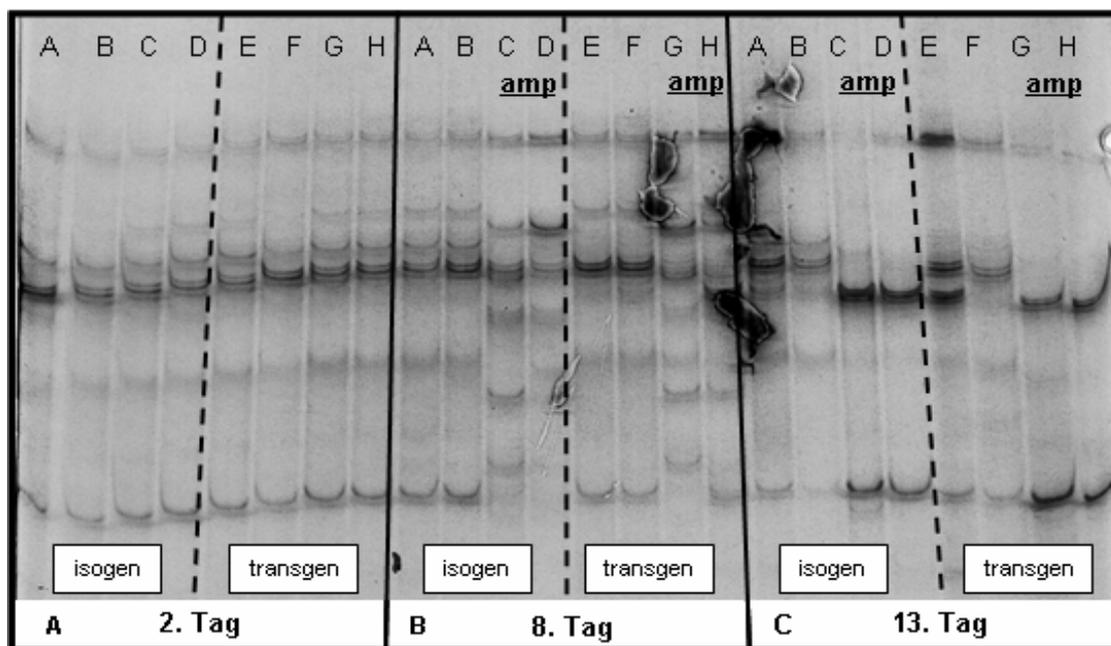
+ Maisversorgung in Abhängigkeit von der Zugabe von Ampicillin

# Ampicillin-Effekt unabhängig von der Mais-Versorgung

Ein Einfluss von Ampicillin konnte nur für den 13. Versuchstag beobachtet werden. Eine Beeinflussung der unterschiedlichen Maisversorgung in Anwesenheit von Ampicillin wurde für die Archaeen nicht beobachtet.

### 3.2.2.4 Die Gruppe der Clostridien im SSCP-Profil

Die Analyse des SSCP-Profiles der Clostridien ergab für die Kontrollphase keine Unterschiede in Abhängigkeit von der Maisversorgung (Abb. 28/Tab. 10).



**Abb. 28: Einfluss von transgenem Mais vor und nach Ampicillin-Zugabe auf die Clostridien dargestellt im SSCP-Gel. A: Kontrollphase 2. Tag; B: Versuchsphase 8. Tag**

**C: Versuchsphase 13. Tag.** Die Buchstaben A-H der einzelnen Spuren bezeichnen die jeweiligen Fermenter. A-D = isogener Mais; E-H = transgener Mais; amp = Ampicillin-Gabe. Die gestrichelte Linie trennt die Ansätze hinsichtlich der Maisversorgung.

Die Ampicillin-Applikation zeigte bei den Clostridien an beiden Versuchstagen eine Beeinflussung im Bandenmuster. Die unterschiedliche Maisversorgung in Verbindung mit der Ampicillin-Behandlung ergab für diese Gruppe keine Unterschiede im SSCP-Bandenmuster.

**Tab. 10: Analyse des Clostridien-SSCP-Gels.**

<b>Tag</b>	<b>Fermenter</b>	<b>Ähnlichkeiten (%)<sup>*</sup></b>
2 +	isogen / transgen ohne amp	≥ 90
8 +	isogen / transgen ohne amp	≥ 90
	isogen / transgen mit amp	≥ 90
13 +	isogen / transgen ohne amp	≥ 90
	isogen / transgen mit amp	≥ 90
8 #	isogen + transgen mit und ohne amp	40
13 #	isogen + transgen mit und ohne amp	65

\* Ähnlichkeiten von ≥ 90 % in den Bandenprofilen wurden als gleich gewertet

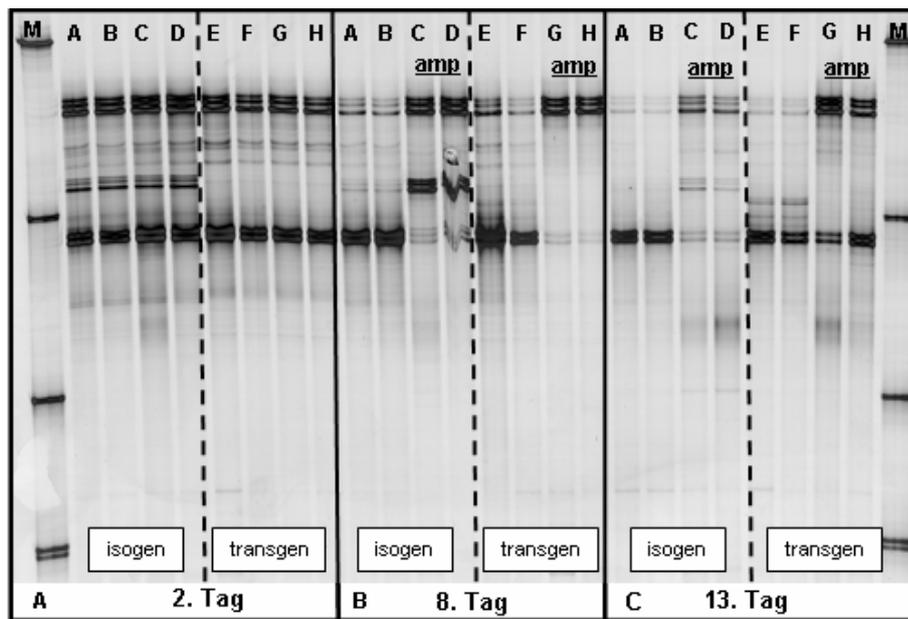
+ Maisversorgung in Abhängigkeit von der Zugabe von Ampicillin

# Ampicillin-Effekt unabhängig von der Mais-Versorgung

### 3.2.2.5 Die Gruppe der Pseudomonaden im SSCP-Profil

Beim Vergleich der isogen und transgen versorgten Ansätzen während der Kontrollphase fallen optische Unterschiede im Bandenmuster in Abhängigkeit von der Maisversorgung auf. Die Analyse der Spuren ergab jedoch keinen Unterschied zwischen den isogen und den transgen versorgten Ansätzen.

Durch die Zugabe von Ampicillin zeigte sich das Bandenmuster der isogen und transgen versorgten Ansätze im Vergleich zu den Ansätzen, die kein Ampicillin erhielten, an beiden analysierten Versuchstagen beeinflusst. Zusätzlich konnten in Abhängigkeit von der Maisversorgung Unterschiede anhand des Bandenmusters zwischen den isogen und den transgen versorgten Ansätzen beobachtet werden (Abb. 29/Tab. 11).



**Abb. 29: Einfluss von transgenem Mais vor und nach Ampicillin-Zugabe auf die Pseudomonaden dargestellt im SSCP-Gel.** A: Kontrollphase 2. Tag; B: Versuchsphase 8. Tag; C: Versuchsphase 13. Tag. Die Buchstaben A-H der einzelnen Spuren bezeichnen die jeweiligen Fermenter. M = Marker; A-D = isogener Mais; E-H = transgener Mais; amp = Ampicillin-Gabe. Die gestichelte Linie trennt die Ansätze hinsichtlich der Maisversorgung.

**Tab. 11: Analyse des Pseudomonaden-SSCP-Gels.**

Tag	Fermenter	Ähnlichkeiten (%) <sup>*</sup>
2 +	isogen / transgen ohne amp	≥ 90
8 +	isogen / transgen ohne amp	≥ 90
	isogen / transgen mit amp	72
13 +	isogen / transgen ohne amp	≥ 90
	isogen / transgen mit amp	79
8 #	isogen + transgen mit und ohne amp	39
13 #	isogen + transgen mit und ohne amp	45

\* Ähnlichkeiten von ≥ 90 % in den Bandenprofilen wurden als gleich gewertet

+ Maisversorgung in Abhängigkeit von der Zugabe von Ampicillin

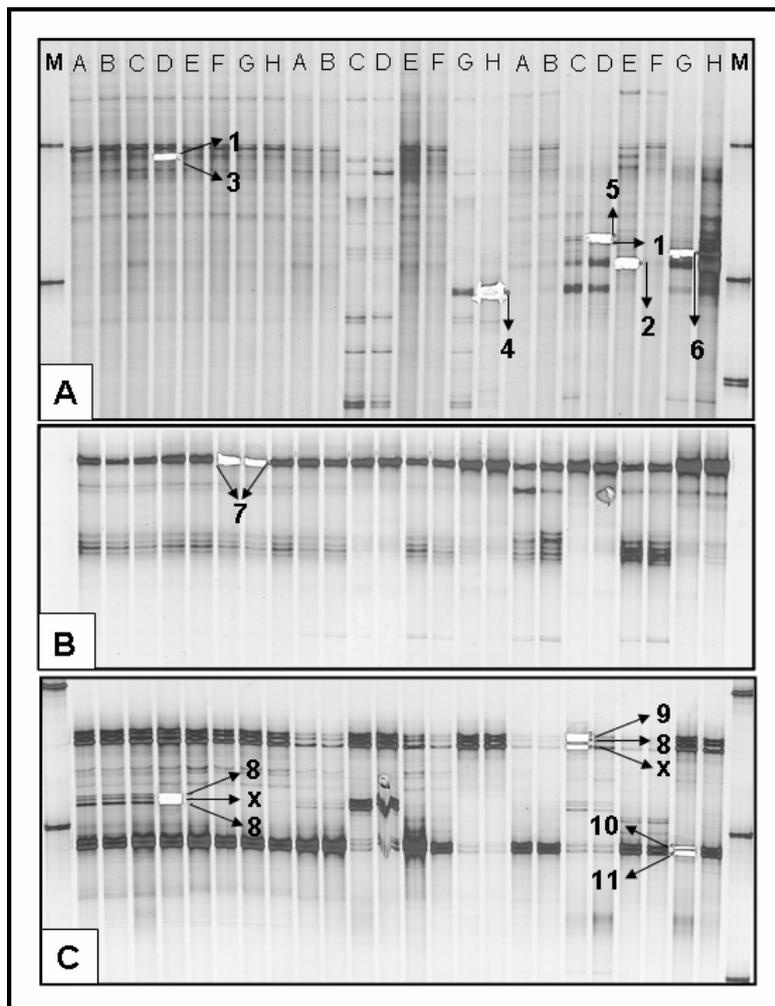
# Ampicillin-Effekt unabhängig von der Mais-Versorgung

### 3.2.3 Charakterisierung der DNA-Banden der SSCP-Profile

Aus den SSCP-Gelen der Bakterien, Archaeen und Pseudomonaden wurden einzelne Banden ausgeschnitten, sequenziert und anschließend mit Hilfe eines Datenbankvergleiches (NCBI = National Center for Biotechnology Information) die nächst verwandte Sequenz ermittelt. Hierbei wurden vorzugsweise Banden ausgewählt, die eine Abhängigkeit von der jeweiligen Maisversorgung zeigten.

#### 3.2.3.1 Sequenzierung ausgewählter Banden aus den SSCP-Profilen der Bakterien, Archaeen und Pseudomonaden

Aus dem SSCP-Gel der Bakterien wurden insgesamt sieben Banden ausgeschnitten, die alle erfolgreich sequenziert werden konnten (Abb. 30).



**Abb. 30: SSCP-Gele mit ausgeschnittenen Banden.**

Die Nummerierung der einzelnen Banden bezieht sich auf die sequenzierten Klone, die in Tabelle 12 näher beschrieben werden.

**A:** Bakterien; **B:** Archaeen;

**C:** Pseudomonaden.

x = erfolglose Sequenzierung;

1 - 11 = erfolgreiche

Sequenzierung

Die ermittelten Sequenzen zeigten größtenteils Ähnlichkeiten zu schon bekannten Eubakterien. Die größten Homologien ergab die NCBI-Datenanalyse mit 99 % Ähnlichkeit zu *Ralstonia pickettii* (Tab. 12; Nr. 3) und 96-99 % Ähnlichkeit zu *Caulobacter sp.* (Tab. 12; Nr. 1). Zusätzlich wurden Homologien zu vier pansenspezifischen Bakterien gefunden. Bei der Datenbankanalyse ergaben sich Ähnlichkeiten von 77-81 % zu *Prevotella ruminicola* (Tab. 12; Nr. 2), 87 % zu *Ruminococcus lactaris* (Tab. 12; Nr. 4) sowie 96 % zu *Eubacterium ruminantium* (Tab. 12; Nr. 5) und 95 % zu einem unkultivierten *Rumenbakterium* 167 (Tab. 12; Nr. 6).

Aus dem SSCP-Profil der Archaeen konnte eine Bande erfolgreich sequenziert werden (Abb. 30-B). Die ermittelte Sequenz zeigte zu 95 % Ähnlichkeit zu einem unkultivierten *Rumenbakterium* 754 aus der Domäne der Archaeen (Tab. 12; Nr. 7).

Von acht Banden aus dem SSCP-Profil der Pseudomonaden konnten sechs Banden erfolgreich sequenziert werden (Abb. 30-C). Die ermittelten Sequenzen zeigten ausschließlich Ähnlichkeiten zu schon bekannten Pseudomonaden. Mit einer Übereinstimmung der Sequenz von 99 % wurden Ähnlichkeiten zu den Arten *Pseudomonas fluorescens* (Tab. 12; Nr. 8/11), *Pseudomonas sp.* NZ052 (Tab. 12; Nr. 9) und *Ralstonia pickettii* (Tab. 12; Nr. 10) gefunden.

Die nachfolgende Tabelle 12 zeigt zusammenfassend alle Ergebnisse der Sequenzen die mittels der Datenbankanalyse BLAST analysiert werden konnten.

**Tab. 12: Zusammenfassung der sequenzierten Klone aus definierten Banden der SSCP-Gele der Bakterien, Archaeen und Pseudomonaden (siehe Abb. 26)**

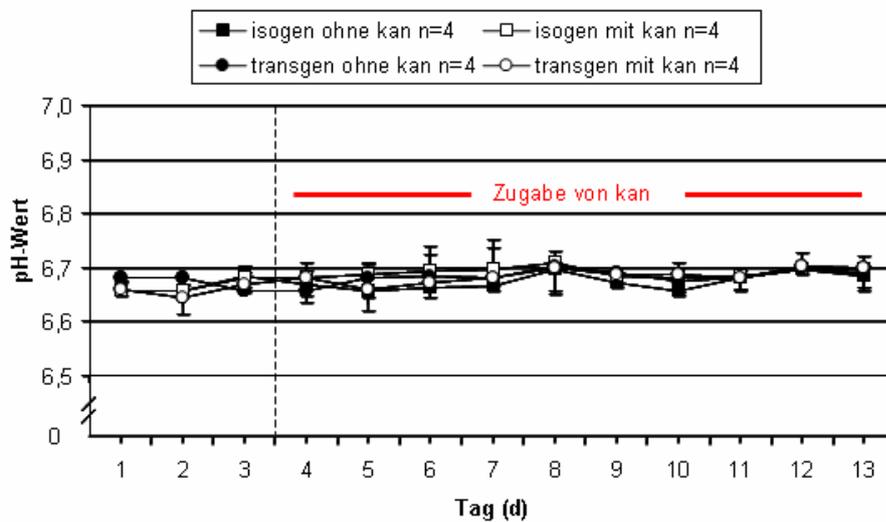
Nr.	Einordnung	Art (Ähnlichkeit)
1	Bacteria/Proteobacteria/Alphaproteobacteria/Caulobacterales/Caulobacteraceae/Caulobacter	Caulobacter sp. (96-99%)
2	Bacteria/Bacteroidetes-Chlorobi-Gruppe/Bacteroidetes/Bacteroides/Bacteroidales/Prevotellaceae	Prevotella ruminicola (77-81%)
3	Bacteria/Proteobacteria/Betaproteobacteria/Burkholderiales/ Burkholderiaceae/Ralstonia	Ralstonia pickettii (99%)
4	Bacteria/Firmicutes/Clostridia/Clostridiales/Lachnospiraceae/Ruminococcus	Ruminococcus lactaris (87%)
5	Bacteria/Firmicutes/Clostridia/Clostridiales/Eubacteriaceae/Eubacterium	Eubacterium ruminantium (96%)
6	Bacteria/Firmicutes/Clostridia/Clostridiales/Eubacteriaceae/Eubacterium	unkultiviertes Rumenbakterium 167 (95%)
7	Archaea/Euryarchaeota/Thermoplasmata/Thermoplasmatales	unkultiviertes Rumenbakterium 754 (95%)
8	Bacteria/Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae	Pseudomonas fluorescens (99%)
9	Bacteria/Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae	Pseudomonas sp NZ052 (99%)
10	Bacteria/Proteobacteria/Betaproteobacteria/Burkholderiales/ Burkholderiaceae/Ralstonia	Ralstonia pickettii (99%)
11	Bacteria/Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Pseudomonadales/Pseudomonadaceae	Pseudomonas fluorescens (99%)

### 3.3 III. Teil

#### 3.3.1 Untersuchung des Einflusses transgener Maisversorgung und Kanamycin im RUSITEC-System

##### 3.3.1.1 pH-Wert und Redoxpotential

Die pH-Werte schwankten für alle Ansätze innerhalb der Kontrollphase in einem sehr engen Bereich von 6,6 und 6,7 (Abb. 31).

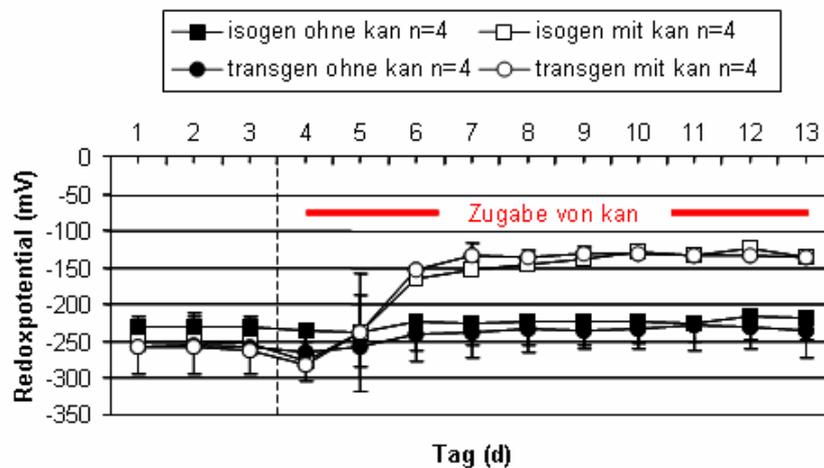


**Abb. 31: Einfluss von transgenem Mais auf den pH-Wert im RUSITEC vor und nach Kanamycin-Zugabe.** Dargestellt ist der Verlauf des pH-Wertes über den Versuchszeitraum (Mittelwerte  $\pm$  SEM). (One-Way-ANOVA: Faktor Mais n.s.; Two-Way-ANOVA: Faktor Kanamycin n.s. Faktor Mais n.s.). Die gestrichelte Linie trennt die Kontrollphase (3 Tage) von der Versuchsphase (10 Tage). Die Zugabe von Kanamycin (kan) erfolgte kontinuierlich ab Tag 4.

Trotz der Applikation von Kanamycin (1,25 g/l) blieben die pH-Werte konstant und es zeigten sich über den gesamten Versuchszeitraum keine signifikanten Änderungen. Die mit isogenem Mais versorgten Ansätze verhielten sich ähnlich zu den mit transgenem Mais versorgten Ansätzen.

Für alle Ansätze wurde während der Kontrollphase ein Redoxpotential zwischen -230 und -250 mV gemessen. Nach der Zugabe von Kanamycin konnte ab Tag 6 über den gesamten Versuchszeitraum eine signifikante Abnahme des Redoxpotentials gegenüber den

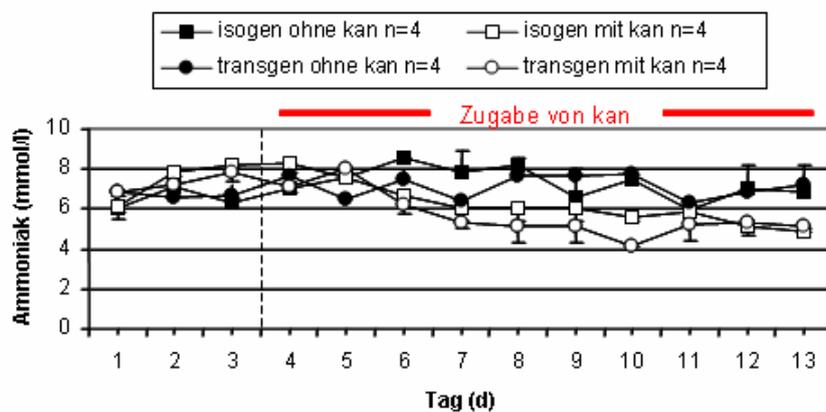
Kontrollansätzen beobachtet werden. Die Maisversorgung hatte unter der Kanamycin-Behandlung keinen signifikanten Einfluss auf das Redoxpotential (Abb. 32).



**Abb. 32: Einfluss von transgenem Mais auf das Redoxpotential im RUSITEC vor und nach Kanamycin-Zugabe.** Dargestellt ist der Verlauf des Redoxpotentials über den Versuchszeitraum (Mittelwerte  $\pm$  SEM). (One-Way-ANOVA: Faktor Mais n.s.; Two-Way-ANOVA: 4.-5. Tag Faktor Kanamycin n.s.; Faktor Mais n.s.; 6.-13. Tag Faktor Kanamycin  $p < 0.001$ ; Faktor Mais n.s.). Die gestrichelte Linie trennt die Kontrollphase (3 Tage) von der Versuchsphase (10 Tage). Die Zugabe von Kanamycin (kan) erfolgte kontinuierlich ab Tag 4.

### 3.3.1.2 Ammoniak-Konzentrationen

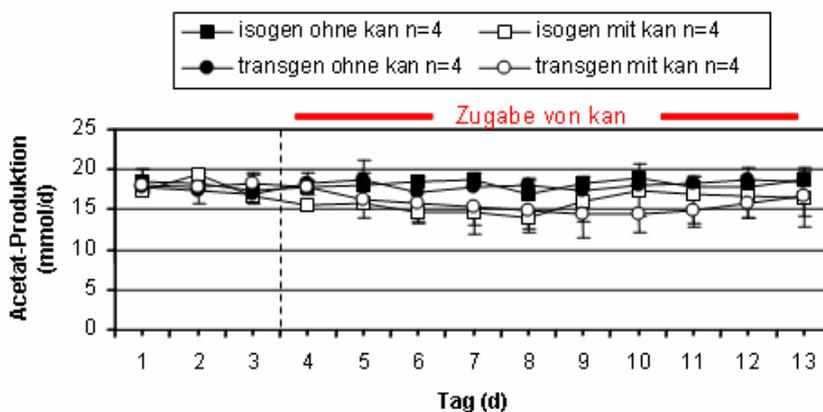
Die Ammoniak-Konzentrationen der Ansätze schwankten während der Kontrollphase in einem engen Bereich von 6 und 8 mmol/l. Die Zugabe von Kanamycin zeigte ab der Hälfte der Versuchsphase für den 8., 10., 12. und 13. Versuchstag für beide Fütterungsgruppen eine signifikante Abnahme in den Ammoniak-Konzentrationen. Die unterschiedliche Maisversorgung hatte hingegen keinen Einfluss auf die Ammoniak-Konzentrationen (Abb. 33).



**Abb. 33: Einfluss von transgenem Mais auf die Ammoniak-Konzentrationen im RUSITEC vor und nach Kanamycin-Zugabe.** Dargestellt ist der Verlauf der Ammoniak-Konzentration über den Versuchszeitraum (Mittelwerte  $\pm$  SEM). (One-Way-ANOVA: Faktor Mais n.s.; Two-Way-ANOVA: 4.-7., 9. und 11. Tag Faktor Kanamycin n.s., 8., 10., 12. und 13. Tag Faktor Kanamycin  $p < 0.05$ , 4-13 Tag Faktor Mais n.s.). Die gestrichelte Linie trennt die Kontrollphase (3 Tage) von der Versuchsphase (10 Tage). Die Zugabe von Kanamycin (kan) erfolgte kontinuierlich ab Tag 4.

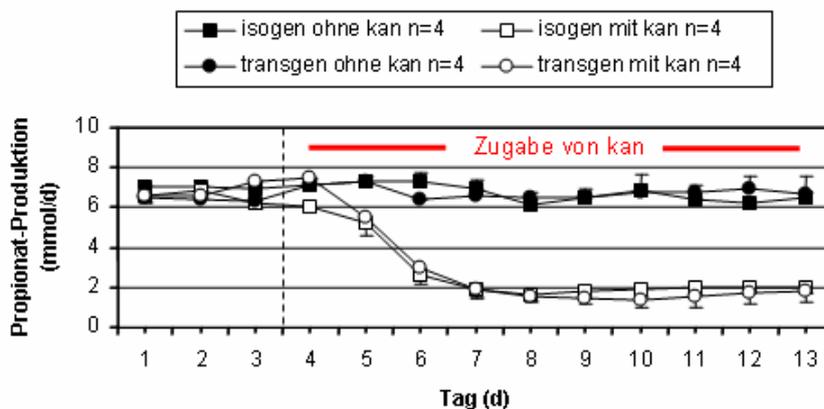
### 3.3.1.3 Kurzkettige Fettsäuren

Die Produktionsraten von Acetat lagen in der Kontrollphase für alle Ansätze bei durchschnittlich 18 mmol/d (Abb. 34). Die Kanamycin-Applikation zeigte über den gesamten Messzeitraum weder bei den isogen noch bei den transgen versorgten Ansätzen einen signifikanten Einfluss auf die Produktion von Acetat.



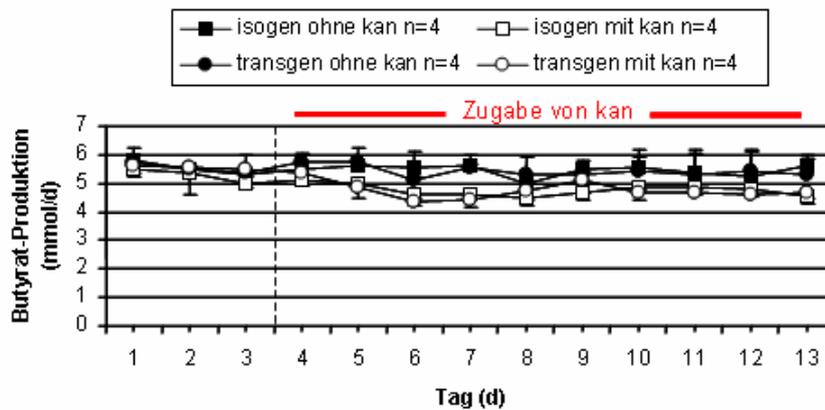
**Abb. 34: Einfluss von transgenem Mais auf die Acetat-Produktion im RUSITEC vor und nach Kanamycin-Zugabe.** Dargestellt ist der Verlauf der Acetat-Produktion über den Versuchszeitraum (Mittelwerte  $\pm$  SEM). (One-Way-ANOVA: Faktor Mais n.s.; Two-Way-ANOVA: Faktor Kanamycin n.s. Faktor Mais n.s.). Die gestrichelte Linie trennt die Kontrollphase (3 Tage) von der Versuchsphase (10 Tage). Die Zugabe von Kanamycin (kan) erfolgte kontinuierlich ab Tag 4.

Die Produktionsraten von Propionat betragen bei alle Ansätzen durchschnittlich 7 mmol/d. Durch die Zugabe von Kanamycin konnte, wie auch schon nach Ampicillin-Zugabe beobachtet, ab Tag 6 ein signifikantes Absinken in der Produktion von Propionat in beiden Versuchsansätzen beobachtet werden. Eine Erholung in der Produktion von Propionat wurde unter Kanamycin-Einfluss bis zum Versuchsende in keinem der beiden Ansätze beobachtet (Abb. 35).



**Abb. 35: Einfluss von transgenem Mais auf die Propionat-Produktion im RUSITEC vor und nach Kanamycin-Zugabe.** Dargestellt ist der Verlauf der Propionat-Produktion über den Versuchszeitraum (Mittelwerte  $\pm$  SEM). (One-Way-ANOVA: Faktor Mais n.s.; Two-Way-ANOVA: 4.-5.Tag Faktor Kanamycin n.s.; Faktor Mais n.s.; 6.-13.Tag Faktor Kanamycin  $p < 0.001$ ; Faktor Mais n.s.). Die gestrichelte Linie trennt die Kontrollphase (3 Tage) von der Versuchsphase (10 Tage). Die Zugabe von Kanamycin (kan) erfolgte kontinuierlich ab Tag 4.

Für Butyrat lagen die Produktionsraten während der Kontrollphase bei allen Versuchsgruppen in einem Bereich von durchschnittlich 5 bis 6 mmol/d. Über den gesamten Versuchszeitraum hatten weder die Zugabe von Kanamycin noch die unterschiedliche Maisversorgung einen signifikanten Einfluss auf die Butyrat-Produktion (Abb. 36).



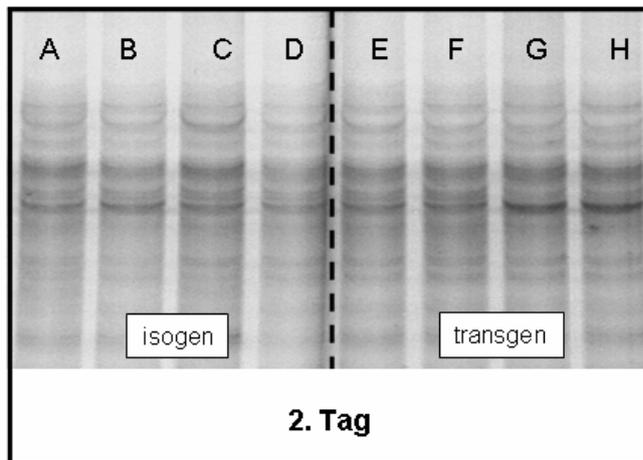
**Abb. 36: Einfluss von transgenem Mais auf die Butyrat-Produktion im RUSITEC vor und nach Kanamycin-Zugabe.** Dargestellt ist der Verlauf der Butyrat-Produktion über den Versuchszeitraum (Mittelwerte  $\pm$  SEM). (One-Way-ANOVA: Faktor Mais n.s.; Two-Way-ANOVA: Faktor Kanamycin n.s. Faktor Mais n.s.). Die gestrichelte Linie trennt die Kontrollphase (3 Tage) von der Versuchsphase (10 Tage). Die Zugabe von Kanamycin (kan) erfolgte kontinuierlich ab Tag 4.

### 3.3.2 Einfluss transgener Maisversorgung auf die strukturelle Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft unter Kanamycin-Behandlung im RUSITEC-System

Für die Anfertigung von SSCP-Profilen wurden die Entnahmezeitpunkte sowie die Auswahl der zu untersuchenden Domänen bzw. Bakterien-Gruppen, wie unter Ampicillin-Behandlung (3.2) beschrieben, übernommen. Die Kontrollphase (2. Tag) und die Versuchsphase (5. und 13. Tag) wurden in Gegensatz zum Ampicillin-Versuch auf getrennten Gelen dargestellt.

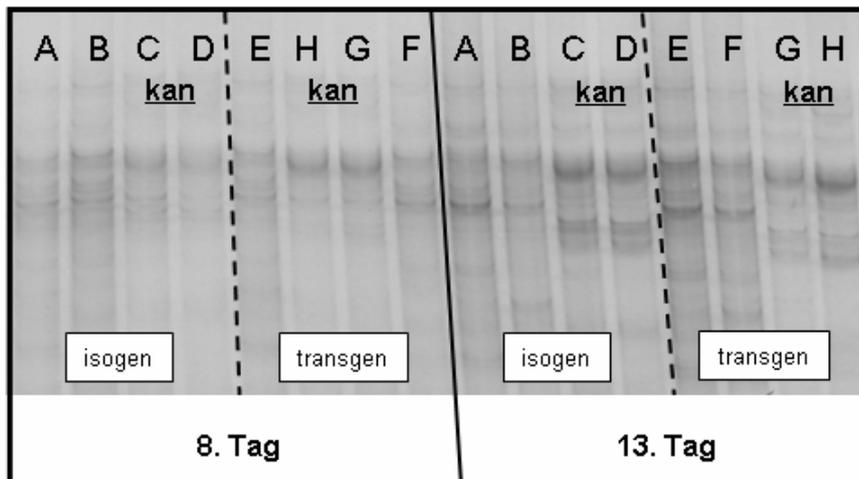
#### 3.3.2.1 Die gesamte mikrobielle Gemeinschaft im SSCP-Profil

Das SSCP-Profil der gesamten mikrobiellen Mikroorganismen-Gemeinschaft zeigte in der Kontrollphase keine Unterschiede im Bandenmuster zwischen den isogen und den transgen versorgten Ansätzen (Abb. 37/Tab. 14).



**Abb. 37: Einfluss von transgenem Mais auf die gesamte mikrobielle Population im SSCP-Profil.** Dargestellt ist der 2. Tag der Kontrollphase. Die Buchstaben A-H bezeichnen die Versuchsansätze. A-D = isogener Mais; E-H = transgener Mais. Die gestrichelte Linie trennt die isogenen von den transgenen Ansätzen.

In der Versuchsphase konnte an beiden Tagen ein deutlicher Einfluss der Kanamycin-Behandlung auf die Diversität der gesamten mikrobiellen Gemeinschaft gegenüber den nicht behandelten Ansätzen beobachtet werden. Die unterschiedliche Maisversorgung zeigte jedoch unter dem Kanamycin-Einfluss an keinem Versuchstag Unterschiede im Bandenmuster, wie dies bei der Ampicillin-Behandlung für die gesamte mikrobielle Gemeinschaft gezeigt werden konnte (Abb. 38/Tab. 13).



**Abb. 38: Einfluss von transgenem Mais nach Kanamycin-Zugabe auf die gesamte mikrobielle Population (Com) im SSCP-Profil.** Dargestellt ist der 8. und 13. Versuchstag. Die Buchstaben A-H bezeichnen die Versuchsansätze; A-D = isogener Mais; E-H = transgener Mais; kan = Kanamycin-Applikation. Die gestrichelte Linie trennt isogen und transgene Ansätze.

**Tab. 13: Analyse der gesamten mikrobiellen Gemeinschaft (Com) im SSCP-Gels.**

Tag	Fermenter	Ähnlichkeiten (%) <sup>*</sup>
2 +	isogen / transgen ohne kan	≥ 90
8 +	isogen / transgen ohne kan	≥ 90
	isogen / transgen mit kan	≥ 90
13 +	isogen / transgen ohne kan	≥ 90
	isogen / transgen mit kan	≥ 90
8 #	isogen / transgen mit und ohne kan	67
13 #	Isogen / transgen mit und ohne kan	56

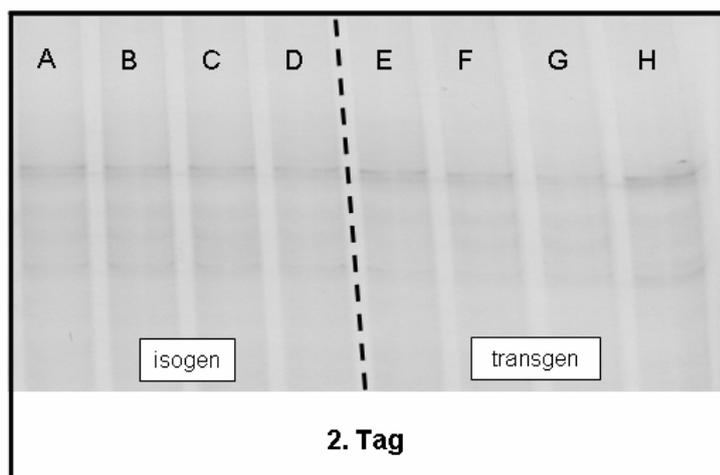
\* Ähnlichkeiten von ≥ 90 % in den Bandenprofilen wurden als gleich gewertet

+ Maisversorgung in Abhängigkeit von der Kanamycin-Applikation

# Kanamycin-Effekt unabhängig von der Mais-Versorgung

### 3.3.2.2 Die Domäne der Bakterien im SSCP-Profil

In der Kontrollphase ergaben sich für die Domäne der Bakterien keine Unterschiede im Bandenmuster zwischen den isogen und transgen versorgten Ansätzen (Abb. 39/Tab. 14).



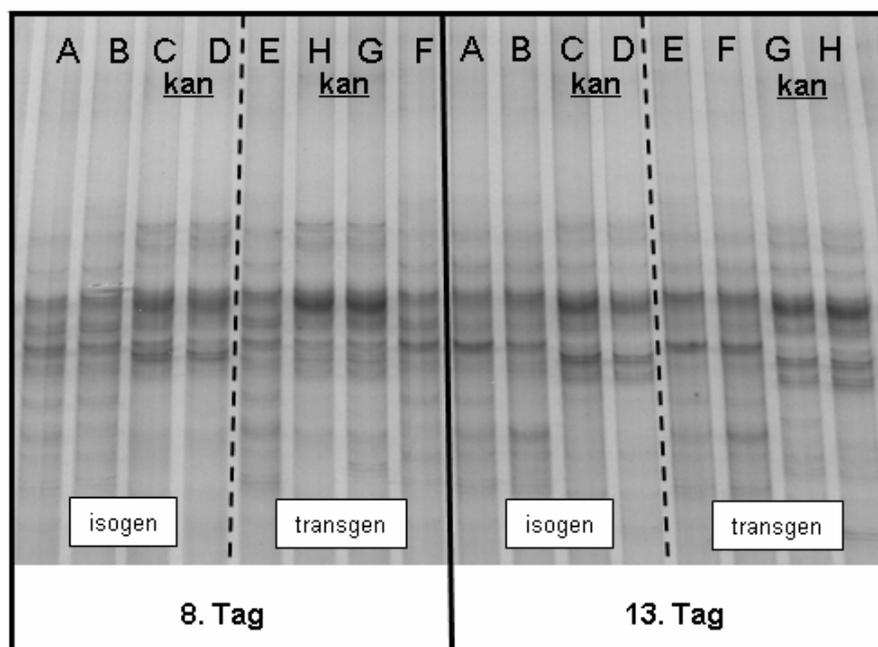
**Abb. 39: Einfluss von transgenem Mais auf die Bakterien im SSCP-Profil.** Dargestellt ist der 2. Tag der Kontrollphase. Die Buchstaben A-H bezeichnen die Versuchsansätze.

A-D = isogener Mais

E-H = transgener Mais

Die gestrichelte Linie trennt isogenen und transgenen Ansätze.

Infolge der Kanamycin-Behandlung konnte an beiden Versuchstagen ein Einfluss auf die Population der Bakterien analysiert werden.



**Abb. 40: SSCP-Profil über den Einfluss von transgenen Mais nach Kanamycin-Zugabe auf die Bakterien im RUSITEC-System.** Dargestellt ist der 8. Tag und 13. Tag der Versuchsphase. Die Buchstaben A-H bezeichnen die Versuchsansätze. A-D = isogener Mais; E-H = transgener Mais; kan = Kanamycin-Applikation. Die gestrichelte Linie trennt isogene und transgene Ansätze.

Die unterschiedliche Maisversorgung in Zusammenhang mit der Kanamycin-Behandlung hatte an keinem der beiden Versuchstage Einfluss auf die Diversität der Bakterien (Abb. 40/Tab. 14).

**Tab. 14: Analyse des Bakterien-SSCP-Gels.**

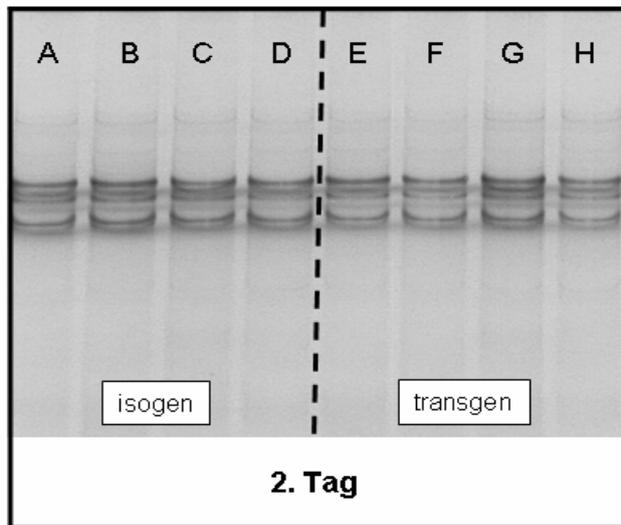
Tag	Fermenter	Ähnlichkeiten (%) <sup>*</sup>
2 +	isogen / transgen ohne kan	≥ 90
8 +	isogen / transgen ohne kan	≥ 90
	isogen / transgen mit kan	≥ 90
13 +	isogen / transgen ohne kan	≥ 90
	isogen / transgen mit kan	≥ 90
8 #	isogen / transgen mit und ohne kan	77
13 #	isogen / transgen mit und ohne kan	78

\* Ähnlichkeiten von ≥ 90 % in den Bandenprofilen wurden als gleich gewertet

+ Maisversorgung in Abhängigkeit von der Kanamycin-Applikation

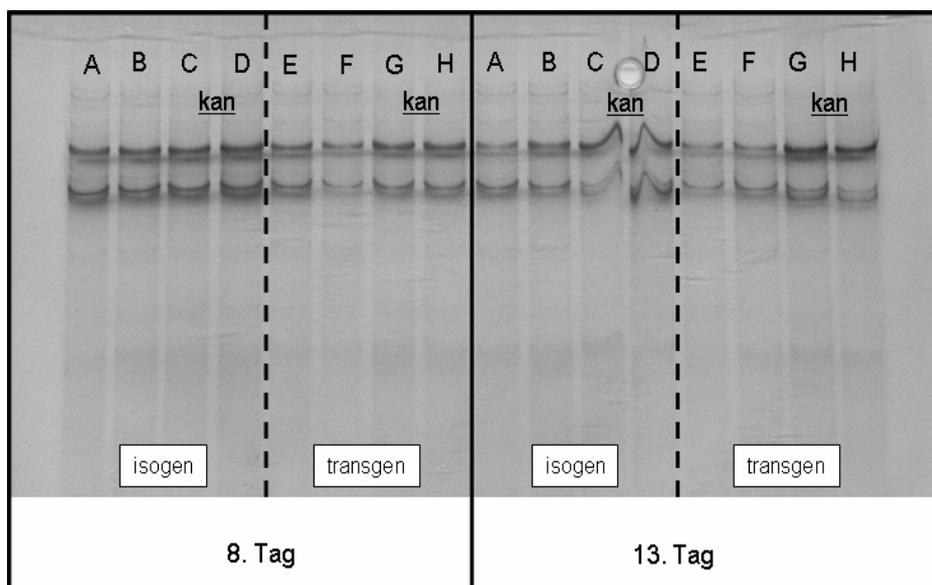
# Kanamycin-Effekt unabhängig von der Mais-Versorgung

Das SSCP-Profil der Archaeen zeigte in der Kontrollphase keine Unterschiede zwischen den isogen und den transgen versorgten Ansätzen. (Abb. 41/Tab. 15).



**Abb. 41: SSCP-Profil über den Einfluss von transgenem Mais auf die Archaeen im RUSITEC-System.** Dargestellt ist der 2. Tag der Kontrollphase. Die Buchstaben A-H bezeichnen die Versuchsansätze. A - D = isogener Mais; E - H = transgener Mais. Die gestrichelte Linie trennt isogene und transgene Ansätze.

Auf die Archaeenpopulation hatte weder die Kanamycin-Behandlung noch die unterschiedliche Maisversorgung einen Einfluss (Abb. 42/Tab. 15).



**Abb. 42: SSCP-Profil über den Einfluss von transgenem Mais unter Kanamycin-Zugabe auf die Archaeen im RUSITEC-System.** Dargestellt ist der 8. Tag und 13. Tag der Versuchsphase. Die Buchstaben A-H bezeichnen die Versuchsansätze. A-D = isogener Mais; E-H = transgener Mais; kan = Kanamycin-Applikation. Die gestrichelte Linie trennt isogene und transgene Ansätze.

Tab. 15: Analyse des Archaeen-SSCP-Gels.

Tag	Fermenter	Ähnlichkeiten (%) <sup>+</sup>
2 +	isogen / transgen ohne kan	≥ 90
8 +	isogen / transgen ohne kan	≥ 90
	isogen / transgen mit kan	≥ 90
13 +	isogen / transgen ohne kan	≥ 90
	isogen / transgen mit kan	≥ 90
8 #	isogen / transgen mit und ohne kan	≥ 90
13 #	isogen / transgen mit und ohne kan	≥ 90

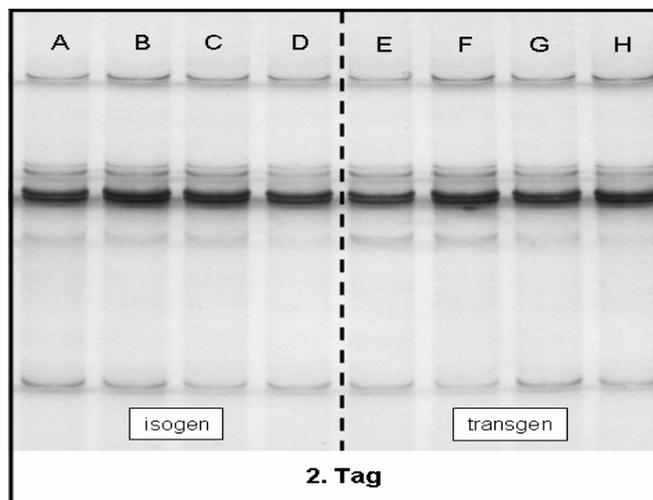
\* Ähnlichkeiten von ≥ 90 % in den Bandenprofilen wurden als gleich gewertet

+ Maisversorgung in Abhängigkeit von der Kanamycin-Applikation

# Kanamycin-Effekt unabhängig von der Mais-Versorgung

### 3.3.2.4 Die Gruppe der Clostridien

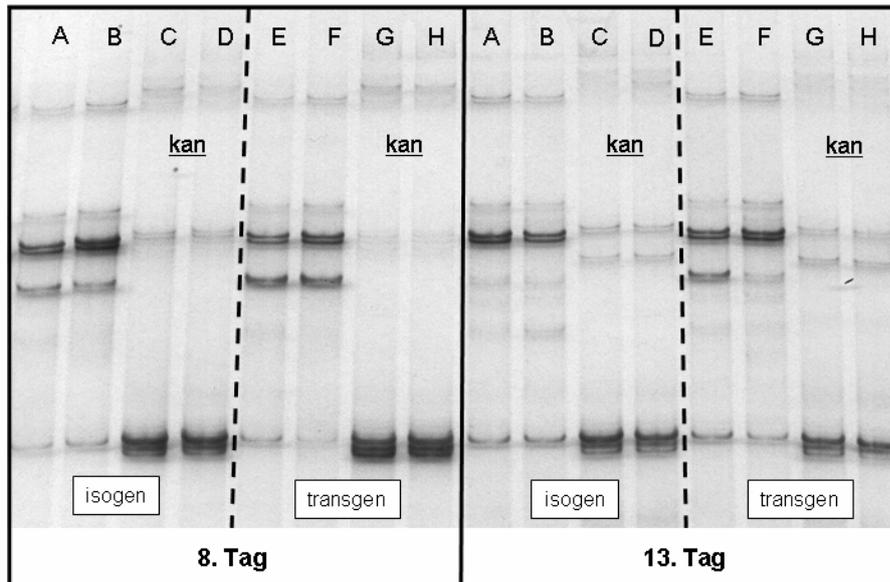
Die Analyse des SSCP-Profiles der Clostridien ergab in der Kontrollphase keine Unterschiede zwischen isogen und transgen versorgten Ansätzen (Abb. 43/Tab.16).



**Abb. 43: SSCP-Profil über den Einfluss von transgenem Mais auf die Clostridien im RUSITEC-System.** Dargestellt ist der 2. Tag der Kontrollphase. Die Buchstaben A-H bezeichnen die Versuchsansätze. A-D = isogener Mais; E-H = transgener Mais. Die gestrichelte Linie trennt isogenen und transgene Ansätze.

Durch die Kanamycin-Behandlung zeigte sich die Clostridienpopulation, wie auch unter Ampicillin-Einfluss, deutlich beeinflusst.

Die unterschiedliche Maisversorgung zeigte unter Kanamycin-Behandlung an keinem der beiden Versuchstage einen Einfluss auf die Clostridienpopulation (Abb. 44/Tab. 16).



**Abb. 44: SSCP-Profil über den Einfluss von transgenem Mais unter Kanamycin-Zugabe auf die Clostridien im RUSITEC-System.** Dargestellt ist der 8. Tag und 13. Tag der Versuchs-phase. Die Buchstaben A-H bezeichnen die Versuchs-ansätze. A-D = isogener Mais; E-H = transgener Mais; kan = Kanamycin-Applikation. Die gestrichelte Linie trennt die isogenen von den transgenen Ansätzen.

**Tab. 16: Analyse des Clostridien-SSCP-Gels.**

Tag	Fermenter	Ähnlichkeiten (%) <sup>+</sup>
2 +	isogen / transgen ohne kan	≥ 90
8 +	isogen / transgen ohne kan	≥ 90
	isogen / transgen mit kan	≥ 90
13 +	isogen / transgen ohne kan	≥ 90
	isogen / transgen mit kan	≥ 90
8 #	isogen / transgen mit und ohne kan	31
13 #	isogen / transgen mit und ohne kan	20

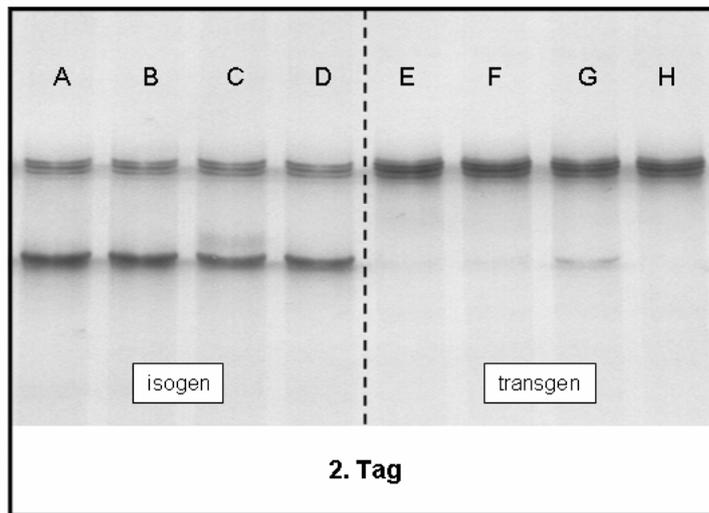
\* Ähnlichkeiten von ≥ 90 % in den Bandenprofilen wurden als gleich gewertet

+ Maisversorgung in Abhängigkeit von der Kanamycin-Applikation

# Kanamycin-Effekt unabhängig von der Mais-Versorgung

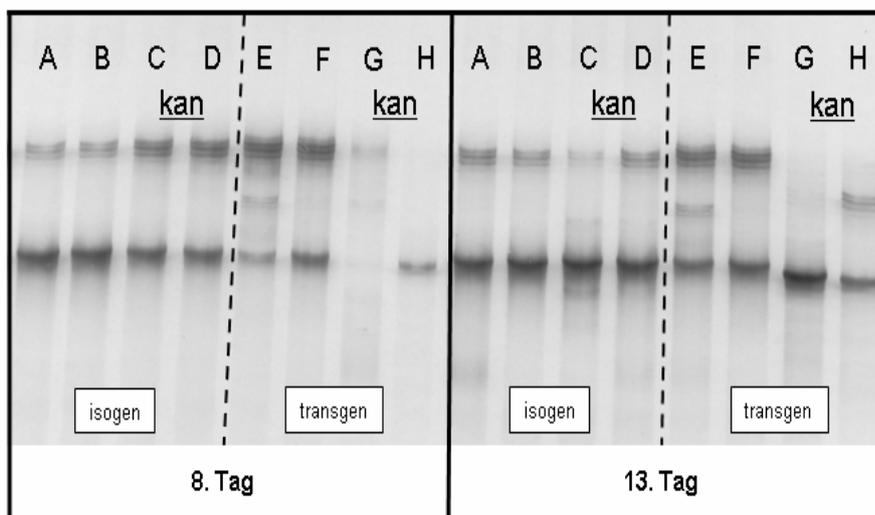
### 3.3.2.5 Die Gruppe der Pseudomonaden

Die Pseudomonaden zeigten im Gegensatz zu den bisher untersuchten Domänen und Familien bereits Unterschiede im SSCP-Profil innerhalb der Kontrollphase zwischen den isogen und transgen versorgten Ansätzen (Abb. 45/Tab. 17).



**Abb. 45: Einfluss von transgenem Mais auf die Pseudomonaden im SSCP-Profil.** Dargestellt ist der 2. Tag der Kontrollphase. Die Buchstaben A-H bezeichnen die Versuchsansätze. A-D = isogener Mais  
E-H = transgener Mais  
Die gestrichelte Linie trennt die isogenen von den transgenen Ansätzen.

Diese Unterschiede zwischen isogener und transgener Maisversorgung innerhalb der Pseudomonaden konnten optisch auch im SSCP-Gel des Ampicillin-Versuchs nachgewiesen werden. Die Analyse der Spuren ergab jedoch keinen Unterschied zwischen isogener und transgener Maisversorgung.



**Abb. 46: SSCP-Profil über den Einfluss von transgenem Mais unter Kanamycin-Behandlung auf die Pseudomonaden im RUSITEC-System.** Dargestellt ist der 8. Tag und 13. Tag der Versuchsphase. Die Buchstaben A-H bezeichnen die Versuchsansätze. A-D = isogener Mais; E-H = transgener Mais; kan = Kanamycin-Applikation. Die gestrichelte Linie trennt die isogenen von den transgenen Ansätzen.

Die Behandlung der isogen versorgten Ansätze mit Kanamycin zeigte an beiden Versuchstagen keine Beeinflussung innerhalb der Population. Im Gegensatz dazu konnten in den transgen versorgten Ansätzen unter Kanamycin-Behandlung deutliche Unterschiede im Bandenmuster beobachtet werden. Vergleichen mit der Pseudomonaden-Population unter Ampicillin-Behandlung kam es auch hier in den isogen versorgten Ansätzen zu einer Beeinflussung (Abb. 46/Tab. 17).

**Tab. 17: Analyse des Pseudomonaden-Gels.**

Tag	Fermenter	Ähnlichkeiten (%) <sup>*</sup>
2 +	isogen / transgen ohne kan	56
8 +	isogen / transgen ohne kan	≥ 90
	isogen / transgen mit kan	47
13 +	isogen / transgen ohne kan	≥ 90
	isogen / transgen mit kan	42
8 #	isogen / transgen mit und ohne kan	72
13 #	isogen / transgen mit und ohne kan	69

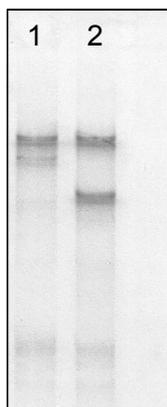
\* Ähnlichkeiten von ≥ 90 % in den Bandenprofilen wurden als gleich gewertet

+ Maisversorgung in Abhängigkeit von der Kanamycin-Applikation

# Kanamycin-Effekt unabhängig von der Mais-Versorgung

### 3.3.3 Besiedlung der Maiskörner mit Pseudomonaden

Um zu überprüfen, ob sich der transgene Mais in der Besiedlung mit Pseudomonaden von isogenem Mais unterschied, wurde ein zusätzliches SSCP-Profil über die anheftenden Pseudomonaden des isogenen Mais im Vergleich zu transgenem Mais erstellt (Abb. 47). Die Auswertung ergab eine Ähnlichkeit der beiden Spuren von 66 %.



**Abb. 47: SSCP-Profil über den Besatz mit Pseudomonaden von isogenem Mais im Vergleich zu transgenem Mais.**

1 = isogener Mais;

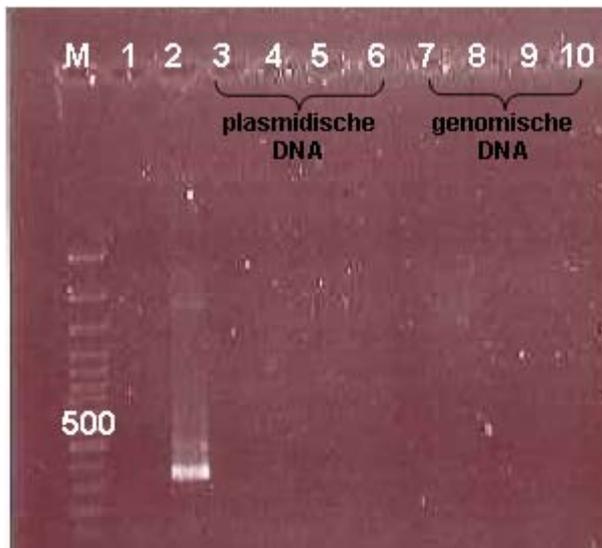
2 = transgener Mais

### 3.4 IV Teil

#### 3.4.1 Überprüfung des Bakteriengenom auf das Vorhandensein von bla<sub>TEM</sub>-Genen

Um zu überprüfen, ob die Pansenbakterien das bla<sub>TEM</sub>-Gen enthielten, wurde sowohl die genomische als auch die plasmidische DNA untersucht. Getestet wurden alle Fermenter (A-H) der Versuchstage 8 und 13. Zur Validierung der PCR wurde jeweils eine Negativ-Kontrolle (Wasser anstelle von DNA) sowie eine Positiv-Kontrolle (mit dem Vektor pUC18 klonierte TOP 10F' Zellen) durchgeführt.

Die Amplifikation des bla<sub>TEM</sub>-Gens ergab für die mit isogenem Mais versorgten Bakterien weder in der plasmidischen noch in der genomischen DNA eine positive Bande in der gewünschten Größe von 350 bp (Abb. 48; Spuren 3/5 und 7/9). Auch für die transgen versorgten Bakterien konnte an keinem der Versuchstage ein Amplifikat erzeugt werden (Abb. 48; Spuren 4/6 und 8/10).



**Abb. 48: PCR-Nachweis des bla<sub>TEM</sub>-Gens**

**in Pansenbakterien.** Die Proben der Spuren 3 - 6 beinhalteten plasmidische DNA, die Spuren 7 - 10 genomische DNA.

M = Marker; 1 = negativ Kontrolle

2 = mit pUC18 klonierte Zellen (positiv Kontrolle); 3 - 6 = plasmidische DNA der Fermenter A, C, E, G; 7 - 10 = genomische DNA der Fermenter A, C, E, G

## 4 Diskussion

### 4.1 Diskussion I. Teil

#### 4.1.1 Bewertung des RUSITEC-Systems für die Versuchsdurchführung

Für die Versuchsplanung war es wichtig, dass die biochemischen Parameter, wie kurzkettige Fettsäuren und Ammoniak, über den geplanten Versuchszeitraum im RUSITEC-System konstant zu simulieren waren.

Nach Czerkawski (1986) wird der Pansen in vier unterschiedliche Kompartimente gegliedert, wobei jedes Kompartiment bestimmte physiologische Aufgaben übernimmt. Im ersten Kompartiment befindet sich die Pansenflüssigkeit oder auch flüssige Phase genannt. Sie dient dem Transport sowie dem Austausch von Futterpartikeln bzw. Mikroorganismen mit ihren Stoffwechselprodukten und ist durch ein großes Volumen mit geringer Mikroorganismendichte gekennzeichnet. Im RUSITEC-System wird dieses Kompartiment durch gazegefilterte Pansenflüssigkeit, welche zu Beginn des Versuches aus dem Spendertier entnommen wird, repräsentiert.

Das dritte Kompartiment beinhaltet die Futterpartikel, an denen sich die anhaftenden Bakterien befinden. Es wird davon ausgegangen, dass sich ca. 70-80 % der im Pansen vorkommenden Mikroorganismen gebunden an den Futterpartikeln befinden (Breves und Leonhard-Marek 2005). Die täglich in das RUSITEC-System eingebrachten Nylonbeutel, welche das Futter enthielten, simulieren *in vitro* die feste Phase. Hierbei ist vor allem die Porenweite des Nylonbeutels ausschlaggebend, wodurch die Fermentation entscheidend beeinflusst werden kann (Meyer und Mackie 1986; Carro et al. 1995). Auf der einen Seite muss der Austausch von Mikroorganismen bzw. die Fermentation gewährleistet sein, während es auf der anderen Seite nicht in großen Mengen zum Verlust von unabgebautem Beutelinhalt kommen darf. Durch das Auspressen der Futterbeutel wird die zurück gewonnene Fermenter-Flüssigkeit mit den ausgeschwemmten, fakultativ gebundenen Mikroorganismen dem System wieder zugeführt. Diese Bakterien werden *in vivo* durch Vormagenmotorik und Wiederkauen von den Partikeln gelöst und stellen auf diese Weise den Kontakt zwischen dem dritten und dem ersten Kompartiment dar und bilden das zweite Kompartiment. Es stellt die Mikroorganismen dar, die sich in der flüssigen Phase in direkter Umgebung der festen Phase befinden.

Das vierte Kompartiment, die Pansenwand, wird meist von fakultativ aeroben Mikroorganismen eingenommen, die ca. 1 % der Mikroorganismenpopulation darstellen. Aufgrund ihrer Vorliebe für Sauerstoff sind sie für die Aufrechterhaltung des anaeroben Milieus im Pansen mit verantwortlich, zudem erfüllen sie Aufgaben der Ureolyse. Dieses Kompartiment kann jedoch im RUSITEC-System nicht simuliert werden, da es hierfür keine entsprechende Struktur gibt, die der Pansenwand nachempfunden wurde.

Der Speichel wurde im RUSITEC-System durch den kontinuierlichen Pufferzulauf simuliert. Das Wiederkäuen und somit die mechanische Zerkleinerung des Futters wurde durch das Einwiegen von klein geschnittenem Heu (1 cm) in die Futterbeutel nachempfunden. Die Durchmischung des Panseninhaltes, welche durch die Vormagenmotorik gesteuert wird, wurde im RUSITEC-System über die Auf- und Abbewegung des Innengefäßes (6 Mal pro Minute) gewährleistet.

Das RUSITEC-System als etablierte semi-kontinuierliche *in vitro* Methode (Czerkawski und Breckenridge 1977) hat sich aufgrund der oben genannten Kriterien zu einer zuverlässigen und bewährten Standardmethode entwickelt, die es erlaubt, unter kontrollierten Bedingungen vergleichende Untersuchungen zum mikrobiellen Stoffwechsel durchzuführen. Eine vollständige Reproduzierbarkeit einer *in vivo* Fermentation mit Hilfe der RUSITEC-Methode kann jedoch nicht erbracht werden (Komisarczuk et al. 1986). Für die in dieser Arbeit geplanten Untersuchungen ergab sich ein ganz entscheidender Vorteil für das RUSITEC-System:

Im Gegensatz zu *in vivo* Untersuchungen, bei denen die Versuchsergebnisse durch inhomogenen Panseninhalt sowie Absorptions- bzw. Sekretionsvorgänge beeinflusst werden, ermöglicht das RUSITEC-System eine exakte Bestimmung der qualitativen und quantitativen Messgrößen des mikrobiellen Stoffwechsels. Dies wird vor allem dadurch begünstigt, dass in allen Fermentern eines Versuches die Mikroorganismenpopulation eines Spendertieres verwendet wird. Die Unterschiede in der Struktur der mikrobiellen Gemeinschaft zwischen Individuen sind aufgrund eines natürlichen individuellen Bakterienbesatzes sehr hoch, wie eigene Untersuchungen an Schweinen und deren Colonpopulation gezeigt haben. Diese würde zu sehr hohen Variationen in den Versuchsergebnissen führen.

#### **4.1.2 Charakterisierung der zeitlichen Anpassung der Struktur der mikrobiellen Gemeinschaft im Rinderpansen nach der Fistulation**

Mit Hilfe der SSCP-Methode war es möglich, die mikrobielle Vielfalt im Pansen eines Rindes direkt während der Fistulation, vier Wochen nach Fistulierung und eine längere Zeit (32 Wochen) nach der Fistulierung vergleichend darzustellen. Diese Untersuchungen dienten der Ermittlung der Ausgangssituation in der Struktur der mikrobiellen Gemeinschaft (*in vivo* Situation in einem fistulierten Tier), die gleichzeitig die Initialpopulation für die RUSITEC-Inkubation darstellte. Zudem sollte das residente Vorkommen aerob lebender Pseudomonaden im Pansen eines fistulierten Rindes untersucht werden. Hypothese war, dass die kontinuierliche Luftzufuhr durch die Fistelöffnung vermehrt aeroben Keimen günstigere Wachstums- und Lebensbedingungen im Pansen ermöglicht, während in einem geschlossenen Tier diese Keime keine Wachstumsmöglichkeit haben sollten.

Der Pansen eines fistulierten Tieres ist durch den Eingriff im Vergleich zu nicht operierten Tieren einer ständigen Sauerstoffbelastung ausgesetzt. In dem SSCP-Bandenmuster der Bakterien zeigte sich jedoch keine Beeinflussung durch das längere Tragen einer Kanüle. Der Einfluss von Sauerstoff bewirkt offensichtlich auf die Bakterienpopulation keinen schädlichen Einfluss. Czerkowski und Breckenridge untersuchten bereits 1969 im RUSITEC-System anhand biochemischer Parameter, wie sich die Gabe von molekularem Sauerstoff ( $O_2$ ) auf die Pansenfermentation auswirkte. Ihren Untersuchungen nach kam es weder zu einer signifikanten Veränderung in der Bildung der kurzkettigen Fettsäuren noch zu Unterschieden in der Gesamtgasproduktion. Auch Bernett und Reid (1961) postulierten eine wesentlich größere Sauerstofftoleranz des Pansenmilieus als bis dahin vermutet, da Versuche mit  $O_2$ -Begasung von Panseninhalt weder das normalerweise sehr niedrige Redoxpotential von ca. -350 bis -400 mV noch die Produktion von kurzkettigen Fettsäuren, Gasen oder Ammoniak beeinflusste. Im Pansen sind anaerobe Bedingungen sehr wichtig, um für optimale Fermentationsbedingungen und darüber hinaus für beste Wachstumsbedingungen der Mikroorganismen zu sorgen. Die Angabe des Redoxpotentials ist ein Maß für die Beurteilung inwieweit anaerobe Verhältnisse im Pansen vorliegen. Die Werte lagen für alle Versuchsansätze im RUSITEC-System in Bereichen von -130 bis -250 mV und waren mit den Werten, welche vorab im Spendertier gemessen werden konnten, vergleichbar und wurden aus diesem Grund als physiologisch angesehen. Bei den Untersuchungen der Bakterienpopulation mittels SSCP-Profil konnten bei der Betrachtung

der Bakterienpopulation keine deutlichen Unterschiede durch einen vermehrten Sauerstoffgehalt infolge der Fistulierung im Pansen beobachtet werden.

Eine Beeinflussung durch Sauerstoff könnte sich jedoch speziell auf aerobe Bakteriengruppen auswirken, indem ihnen ein Vorteil gegenüber anaeroben Keimen verschafft wird. Um diese Auswirkungen analysieren zu können, wurden die Pseudomonaden im SSCP-Profil untersucht. Die Pseudomonaden zählen zu den chemoorganotrophen, streng aerob lebenden Organismen, die kein Gärvermögen besitzen. Einige denitrifizierende Stämme verwenden bei Sauerstoffmangel Nitrat als Wasserstoffakzeptor.

Die Ergebnisse des SSCP-Profiles zeigten eine deutliche Beeinflussung innerhalb der Gruppe der Pseudomonaden und deuten darauf hin, dass die Pseudomonaden im RUSITEC zu überleben scheinen. Bereits zum Zeitpunkt der Fistulierung zeigte sich im SSCP-Gel ein deutliches Bandenmuster mit definierten Banden. Bei SSCP-Proben mit einer sehr hohen Diversität kann davon ausgegangen werden, dass das Bandenmuster nicht mehr ausreichend aufgelöst werden kann. Dies liegt darin begründet, dass das Trennvermögen des Gels überschritten wurde, was zur Konsequenz hat, dass sehr viele Banden miteinander verschwimmen und somit die Spur insgesamt dunkler wird. Eine deutliche Abgrenzung der Banden ist nicht mehr möglich. Beim Vergleich der genetischen Profile zwischen der Domäne der Bakterien und der Gruppe der Pseudomonaden wird dieser Unterschied sehr gut deutlich. Das SSCP-Profil der Pseudomonaden als spezifische Gruppe der Bakterien zeichnet sich hingegen durch klare Banden und einen deutlich helleren Hintergrund aus. Vier Wochen nach der Operation zeigte sich eine deutlich höhere Diversität der Pseudomonaden im Pansen, was aus einer erhöhten Anzahl an Banden im Gel hervorgeht. Daraus könnte geschlossen werden, dass es durch das Eindringen von Sauerstoff in den Pansen zum geringen Teil schon während der Operation aber vor allem innerhalb von vier Wochen nach dem chirurgischen Eingriff zu einer positiven Beeinflussung dieser Gruppe kam. Die Fistulierung über einen Zeitraum von 32 Wochen hatte jedoch wieder einen Rückgang der Diversität zur Folge. Dies könnte darauf hindeuten, dass es bei fistulierten Rindern und dem damit stärkeren Sauerstoffeinfluss zu einer Verschiebung innerhalb der Gruppe aerob vorkommender Pseudomonaden kommen kann.

## 4.2 Diskussion II., III. und IV. Teil

### 4.2.1 Wirkung von Ampicillin und Kanamycin auf Pansenmikroorganismen

Ampicillin zählt zu den  $\beta$ -Laktam Antibiotika, die in Bakterien die Peptidoglykansynthese bei der Zellteilung hemmen. Kanamycin, ein Aminoglykosid-Antibiotikum, hemmt bei Bakterien die Proteinbiosynthese. In der vorliegenden Arbeit wurden beide Antibiotika eingesetzt, um einen Selektionsdruck auf die Pansenmikroorganismen zu erzeugen.

Sowohl die Gabe von Ampicillin, als auch von Kanamycin zeigten deutliche Einflüsse auf die biochemischen Merkmale des mikrobiellen Vormagenstoffwechsels und auf die Struktur der mikrobiellen Gemeinschaft. Besonders für die Domäne der Bakterien zeigte sich in allen SSCP-Profilen unter Applikation beider Antibiotika eine Abnahme in der Biodiversität.

#### 4.2.1.1 pH-Wert und Redoxpotential

Der pH-Wert beträgt im Pansen bei Wiederkäuern unter physiologischen Bedingungen 5,5-7,5 (Dirksen 1985; Martens 2005). Die tägliche Zugabe beider Antibiotika ergab über den gesamten Versuchszeitraum keine pH-Wert Änderung. In Analogie zu *in vivo* Verhältnissen wird für Untersuchungen im RUSITEC-System eine Pufferlösung zur kontinuierlichen Perfusion verwendet, die durch eine hohe Pufferkapazität gekennzeichnet ist. In den vorliegenden Untersuchungen wurde daher eine bicarbonat- und phosphatreiche Pufferlösung ( $\text{HCO}_3^-$ : 97.0 mmol/l;  $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^-$ : 20 mmol/l) kontinuierlich perfundiert, wobei signifikante pH-Änderungen erst bei drastischen Veränderungen des Mikroorganismen-Stoffwechsels zu erwarten sind.

Nach Zugabe beider Antibiotika konnten bereits nach 24 h deutlich positivere Redoxpotentiale in den Ansätzen gemessen werden. Anhand des Redoxpotentials kann eine Aussage über die Aktivität der Pansenbakterien getroffen werden. Je niedriger das Redoxpotential liegt, desto höher ist die Aktivität der Pansenflora (Brohberg 1957; Mish et al. 1970).

Die ermittelten Daten des pH-Wertes sowie des Redoxpotentials waren für beide Antibiotika vergleichbar.

#### **4.2.1.2 Ammoniak-Konzentrationen**

Die in allen Versuchen ermittelten Konzentrationen von Ammoniak ( $\text{NH}_3$ ) lag im physiologischen Bereich zwischen 6 und 12 mmol/l (Martens 2005).

Unter Ampicillin-Applikation konnte bereits nach 24 h ein kontinuierlicher signifikanter Abfall der Ammoniak-Konzentrationen beobachtet werden, während es nach Kanamycin-Applikation erst ab der Hälfte der Versuchsphase zu einer Abnahme der Ammoniak-Konzentrationen kam, die bis zum Versuchsende starken Schwankungen ausgesetzt war. Diese Änderungen können entweder durch einen verminderten Abbau des Futterproteins oder eine Zunahme der mikrobiellen N-Assimilation erklärt werden, die aber angesichts der anderen Veränderungen mikrobieller Stoffwechsellagerungen sehr unwahrscheinlich sind.

#### **4.2.1.3 Kurzkettige Fettsäuren (Acetat, Propionat, Butyrat)**

Kurzkettige Fettsäuren (SCFA) werden auf unterschiedlichen mikrobiellen Stoffwechselwegen als Stoffwechselprodukte von im Pansen vorkommenden Mikroorganismen gebildet. Unter Ampicillin- wie auch Kanamycin-Applikation konnte eine Abnahme in der Gesamt-Fettsäure-Produktion beobachtet werden. Die genauere Untersuchung der einzelnen Fettsäuren zeigte jedoch, dass es zu einer unterschiedlichen Beeinflussung der einzelnen Fettsäuren in Abhängigkeit von der Antibiotika-Applikation kam.

Eine Erklärung für diese Unterschiede könnte sein, dass Acetat als Stoffwechselprodukt von einer Vielzahl unterschiedlicher Bakterien im Pansen gebildet wird, während Propionat und Butyrat die Endprodukte besonders spezialisierter Bakterien darstellen und damit nur von sehr wenigen Bakterien gebildet werden (siehe auch Tab. 18/19).

Tabelle 18 : Gramnegative Bakterien in den Vormägen (Breves und Leonhard-Marek 2005)

<b>Spezies</b>	<b>Bevorzugtes Substrat</b>	<b>Endprodukte</b>
<i>Bacteroides ruminicola</i>	Hemicellulose, Pectin, Xylan	Propionat, Acetat
<i>Bacteroides ampylophilus</i>	Stärke, Pectin,	Acetat
<i>Bacteroides succinogenes</i>	Cellulose, Stärke	Acetat
<i>Selmonas ruminantium</i>	Stärke, lösliche Zucker	Acetat
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	Cellulose, Xylan	Acetat, Butyrat
<i>Anaerovirio lipolytica</i>	Lactat	Acetat, Propionat
<i>Trponema bryantii</i>	Pectin, lösliche Zucker	Acetat
<i>Megashaera elsdenii</i>	Lösliche Zucker, Lactat	Acetat, Propionat, Butyrat
<i>Succinimonas amylolytica</i>	Stärke, Dextrin	Acetat

Tabelle 19 : Grampositive Bakterien in den Vormägen (Breves und Leonhard-Marek 2005)

<b>Spezies</b>	<b>Bevorzugtes Substrat</b>	<b>Endprodukte</b>
<i>Ruminococcus albus</i>	Cellulose, Xylan	Acetat
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	Cellulose, Xylan	Acetat
<i>Streptococcus bovis</i>	Stärke, lösliche Zucker	Acetat
<i>Lachnospira multiparus</i>	Pectin, Stärke	Acetat
<i>Eubacterium ruminantium</i>	lösliche Zucker	Butyrat
<i>Clostridium spp.</i>	Cellulose	Acetat, Butyrat

Werden diese speziellen Bakterien, die als Endprodukte Propionat und Butyrat bilden, durch Antibiotika beeinflusst, hat schon eine geringe Beeinflussung einen sehr hohen Einfluss auf die Produktionsrate dieser Fettsäuren. Im Vergleich dazu wirkt sich ein Selektionsdruck auf Bakterien, die ohnehin mit einer hohen Diversität im Pansen vorkommen, wie z. B. die Acetat-produzierenden Bakterien, verhältnismäßig gering aus. Ein weiterer Grund dafür, dass die Acetat-Produktion unverändert blieb, könnten natürlich vorhandene Resistenzmechanismen der Mikroorganismen gegenüber den in dieser Arbeit eingesetzten Antibiotika sein.

#### 4.2.2 Natürliche Resistenzmechanismen bei Mikroorganismen

Bei Bakterien sind verschiedene natürliche Resistenzmechanismen gegenüber Antibiotika bekannt. Neben Pilzen können auch bestimmte Bakterien Antibiotika produzieren, wie zum Beispiel Rhizobakterien, die im Wurzelbereich von Pflanzen vorkommen. Die Antibiotika produzierenden Stämme benötigen, um sich selber zu schützen, entsprechende Resistenzgene. Im Falle der  $\beta$ -Laktam-Antibiotika sowie der Aminoglycoside können somit Gene in diesen Bakterien vorhanden sein, die für Enzyme kodieren, welche eine Inaktivierung des jeweiligen Antibiotikums bewirken. Diese Gene können über die effizienten Übertragungsmechanismen der Konjugation und Transduktion zwischen Bakterien der gleichen Art oder über Artgrenzen hinweg ausgetauscht werden (Kharazmi et al. 2003). Dadurch wird eine schnelle Verbreitung dieser Gene innerhalb einer Population möglich.

Eine weitere Möglichkeit die antibiotische Wirkung von Ampicillin zu umgehen, besteht in der strukturellen Veränderung der Transpeptidasen, so dass diese nicht mehr den  $\beta$ -Laktam-Ring angreifen können. Auch durch Zellmembranveränderungen kann das Eindringen des Wirkstoffs verhindert werden. Aber auch gegen die Aminoglycoside haben Bakterien weitere Resistenzmechanismen entwickeln können, wie infolge von Mutationen an Proteinen der bakteriellen Ribosomen, die das Ziel der Wirkstoffe darstellen oder aufgrund fehlender Permeationsfähigkeit des Antibiotikums. Studien konnten belegen, dass auch im Pansen von Wiederkäuern Bakterien existieren, die Resistenzgene gegenüber Kanamycin und Ampicillin aufweisen (Malik et al. 2004; Malik et al. 2005).

Die Erholung in der Produktion von Propionat unter Ampicillin-Applikation in der mittleren Versuchphase deutet auf natürliche Resistenzmechanismen bei Mikroorganismen im Pansen hin. Auch die anhand der SSCP-Profilen analysierten Änderungen in der Struktur der mikrobiellen Gemeinschaft innerhalb des untersuchten Zeitraums könnten ein Hinweis sein, dass sich die Mikroorganismen an die Antibiotikawirkung mit Hilfe von natürlichen Resistenzmechanismen angepasst haben. Obwohl sich die Propionat-Produktion am letzten Versuchstag wieder erholt hatte und ähnliche Raten wie die Kontrollen erreichte, konnten Unterschiede in der Struktur der mikrobiellen Gemeinschaft, verglichen mit den Kontrollansätzen, beobachtet werden. Durch eine Reduzierung der Artenvielfalt könnten sich einzelne Keime aufgrund von besseren Lebensbedingungen schneller vermehren. Ein weiterer Hinweis auf natürliche Resistenzmechanismen bei Pansenbakterien könnte eine

gleich bleibend hohe Acetatproduktion unter Ampicillin-Einfluss sein. Bei der Familie der Enterobakterien, die unter anderem zu den residenten Pansenbewohnern gezählt werden und als Hauptprodukt Acetat bilden, konnten gehäuft in verschiedenen Spezies Gene gefunden werden, die eine Resistenz gegenüber Ampicillin und Kanamycin verleihen (Livermore and Woodford 2006). In den SSCP-Profilen konnte zudem ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Domänen Bakterien und Archaeen beobachtet werden. Beide Antibiotika beeinflussten jeweils die Domäne der Bakterien deutlich stärker als die der Archaeen.

Die Archaeen gehören zu den autotroph lebenden Organismen und werden zu den residenten Pansenbewohnern gezählt. Sie weisen besonders deutliche Unterschiede im Aufbau der Zellmembran, verglichen mit den Bakterien, auf. Die Zellwände von Archaeen enthalten kein Murein (Peptidoglykan) und sind insgesamt sehr vielfältig in ihrem Aufbau: Einigen Archaeen fehlt eine Zellwand völlig (*Thermoplasma*) andere wiederum besitzen eine aus vielen Schichten aufgebaute Zellwand (*Methanospirillum*). Das für die Ausbildung der neuen Zellwand benötigte Enzym Murein-Transpeptidase bindet kovalent an das Ampicillin und wird dadurch inaktiviert (Mandell und Petri 1998). Als Konsequenz kann das Mureingerüst der Zellwand nur unvollständig ausgebildet werden und es kommt zum Tod der Keime. Da Archaeen Murein für den Aufbau ihrer Zellwand nicht benötigen, kann als Folge hierdurch die Zellwandsynthese durch Ampicillin nicht beeinflusst werden. Sie besitzen somit eine natürliche Resistenz gegenüber diesem Antibiotikum.

Der Transport der Aminoglycoside über die innere Membran ist vom Elektronentransport abhängig, der durch anaerobe Verhältnisse blockiert oder gehemmt werden kann (Mates et al. 1983). Dadurch ist die antimikrobielle Wirksamkeit der Aminoglycoside in anaeroben Umgebungen deutlich reduziert (Bryan und Kwan 1981). Strikt anaerob lebende Keime wie die Archaeen sind zudem resistenter gegenüber Kanamycin, da ihnen das nötige Transportsystem für diesen Wirkstoff fehlt.

Unter Ampicillin-Applikation konnte jedoch zwischen den isogen und den transgen versorgten Ansätzen ein Unterschied in der Erholung von Propionat beobachtet werden. Unter transgener Maisversorgung stellte sich eine Erholung in der Produktion dieser Fettsäure sehr viel schneller ein, während es unter isogener Maisversorgung im Unterschied zu einer um zwei Tage verzögerten Erholung kam. Dieses Ergebnis könnte ein Hinweis auf Unterschiede zwischen den beiden Maissorten im Hinblick auf ihre substanzielle Äquivalenz liefern.

### 4.2.3 Substanzielle Äquivalenz

Im Rahmen der Zulassungsverfahren für GVO-Pflanzen als Lebens- und Futtermittel wird seit langem geprüft, ob die gentechnische Veränderung einen Einfluss auf den Gehalt der Nähr- und Inhaltsstoffe einer Pflanze hat. Die substanzielle Äquivalenz im Vergleich mit der Ausgangspflanze ist eine Anforderung für eine Marktzulassung. In unterschiedlichen Studien konnte eine substanzielle Äquivalenz beim Vergleich verschiedener konventioneller Maissorten und den jeweils daraus hervorgegangenen gentechnisch veränderten Maispflanzen (Bt-Mais) bestätigt werden (Berberich et al. 1996; Sidhu et al. 2000; Ridley et al. 2002; George et al. 2004; Herman et al. 2004; Herman et al. 2007).

Beide Maissorten wurden vor ihrem Einsatz in diesen Versuchen mit Hilfe der Weender Analyse auf den Gehalt an Rohnährstoffen überprüft und als substanziell äquivalent ermittelt (Reuter et al. 2002). Ohne Antibiotika-Applikation konnten keine signifikanten Unterschiede in den biochemischen Profilen in Abhängigkeit von der Maisversorgung gemessen werden. Diese Ergebnisse indizieren, dass keine Veränderungen in der Populationsstruktur durch transgene Maisfütterung stattgefunden haben. Die Auswertung der SSCP-Profile der gesamten mikrobiellen Gemeinschaft sowie der beiden Domänen Bakterien und Archaeen stimmte mit diesem Ergebnis überein, da auch hier keine Unterschiede analysiert werden konnten. Ähnliche Ergebnisse wurden ebenfalls von Einspanier et al. (2004) erzielt. Hierbei wurden *in vivo* Studien über die Auswirkungen von transgenem Mais auf die gesamte mikrobielle Pansenpopulation durchgeführt. Beim Vergleich der Bakterienflora von Rindern, die vier Wochen mit transgenem bzw. isogenem Mais gefüttert wurden, konnten keine Unterschiede anhand der über 16S rRNA Gene ermittelten phylogenetischen Stammbäume festgestellt werden. Diesen Ergebnissen zufolge scheint eine kurzfristige transgene Maisversorgung keinen Einfluss auf die Bakterienflora im Pansen zu haben.

Eine genauere Untersuchung einzelner Bakterien-Gruppen, wie den Clostridien und Pseudomonaden, mittels SSCP ergab jedoch interessante Ergebnisse. In allen erstellten Pseudomonaden-spezifischen Profilen wurden Unterschiede in der Populationsstruktur zwischen isogener und transgener Maisfütterung gefunden. Dieser Befund könnte auf eine unterschiedliche Besiedlung der Pseudomonaden in den RUSITEC-Ansätzen hindeuten. Es ist bekannt, dass die anhaftende Bakterienflora bei Pflanzen zu einem großen Anteil von Pseudomonaden dominiert wird. In allen durchgeführten RUSITEC-Versuchen wurde Heu

aus einer einheitlichen Charge als Futter verwendet und konnte somit nicht für die Unterschiede in den Pseudomonaden-spezifischen Profilen verantwortlich gemacht werden. Aus diesem Grund wurde die Besiedlung der Pseudomonaden auf den Bt-176 Maiskörner mittels SSCP näher untersucht, wobei deutliche Unterschiede zwischen den isogenen und transgenen Maiskörnern gefunden wurden. Somit dürften die auftretenden Unterschiede im RUSITEC mit dem bakteriellen Besatz der Maispflanze bzw. -körner zusammenhängen und nicht auf unterschiedliche günstige Wachstumsbedingungen in Abhängigkeit von der Maisfütterung beruhen.

Eine Pflanze kann je nach Wachstumsbedingungen wie Klima und Boden Unterschiede in ihrer Nährstoffzusammensetzung aufweisen. Um diese Unterschiede zwischen den beiden Maispflanzen zu vermeiden, wurden beide Sorten auf benachbarten Feldern angebaut und zum gleichen Zeitpunkt geerntet. Bei der Herstellung des gentechnisch veränderten Bt-176 Mais wird gezielt die Erbinformation in Form von artfremden Genen verändert. Dabei wäre es durchaus möglich, dass durch die gentechnische Veränderung auch andere Eigenschaften der neu entstandenen transgenen Pflanze beeinflusst werden. Die unterschiedliche Pseudomonaden-Besiedlung könnte so mit den zusätzlich eingeführten Transgenen des Bt-176 Mais zusammenhängen.

Aufgrund seiner zusätzlichen genetischen Ausstattung mit dem cry1Ab-Gen ist der transgene Mais gegen den Angriff des Maiszünslers geschützt. Durch die Fraßaktivität der Larve des Maiszünslers bei isogenen Maispflanzen kann es zu mechanischen Verletzungen des Pflanzengewebes kommen, wodurch das Eindringen von Pilzen in die Pflanze begünstigt werden kann (Castella et al. 1999). Untersuchungen von Munkvold et al. 1999 konnten einen positiven Zusammenhang zwischen dem Maiszünslerbefall und der Infektion mit Fusarium-Pilzen aufzeigen. Eine Studie von Bakan et al. (2002) zeigte, dass der Befall mit Fusarium-Pilzen und somit die Produktion an Mycotoxinen bei isogenen Maispflanzen wesentlich höher als bei transgenen Maispflanzen ist. Bei Mais kann Fusariumbefall prinzipiell während der gesamten Vegetationsperiode auftreten und alle Pflanzenteile betreffen (Lepschy 1992). Dabei können Stängelfusariosen unabhängig von Kolbenfusariosen auftreten (Lew et al. 1996). Dieser unterschiedliche Befall mit Fusarium-Pilzen und die damit höhere Bildung von Mycotoxinen auf isogenen Maispflanzen könnten sich auf das Milieu der Pflanze ausgewirkt haben. Unterschiedliche Milieubedingungen können unterschiedliche Lebensbedingungen für einzelne Arten der anhaftenden Bakterienflora bedeuten, indem spezielle Arten veränderte Lebensbedingungen vorfinden.

Unter Ampicillin-Applikation konnte aber noch ein weiterer Unterschied zwischen den isogen und transgen versorgten Ansätzen beobachtet werden:

Die transgene Maisversorgung hatte eine deutlich schnellere Erholung der Propionatproduktion zur Folge. Auch die genetischen Profile der gesamten mikrobiellen Gemeinschaft sowie der Bakterien unterschieden sich an beiden Versuchstagen im Bandenmuster in Abhängigkeit von der Maisversorgung. Es ist davon auszugehen, dass bei der Analyse der gesamten mikrobiellen Population der größte Teil der Mikroorganismen zu der Domäne der Bakterien gezählt werden kann. Dies ist auch der Grund, warum die beiden SSCP-Gele eine starke Ähnlichkeit aufwiesen.

Um innerhalb der Domäne der Bakterien Keime zu finden, die eventuell für diese Unterschiede in den SSCP-Profilen verantwortlich sein könnten, wurde die Gruppe der Clostridien näher untersucht. Die Clostridien gehören zu den residenten Pansenbewohnern. Die verschiedensten Clostridium-Arten sind physiologisch durch ausgeprägten Gärungsstoffwechsel charakterisiert und einige Arten bilden als Hauptprodukt Propionat. *Clostridium propionicum* ist in der Lage, vor allem aus Laktat, Glycerin, Succinat, den Aminosäuren Methionin, Cystein, Glutamat, Serin, Alanin und Threonin oder Glukose Propionat zu bilden. Auch beim fermentierenden *Clostridium bryantii* ist Propionat das Endprodukt.  $\delta$ -Aminovalerat, das Endprodukt der D-Prolin-Reduktase-Reaktion kann von *Clostridium aminovalericum* und *Clostridium viride* unter anderem zu Propionat umgesetzt werden (Eikmanns und Buckel 1991). Die Auswertungen der SSCP-Profile ergaben jedoch unter Ampicillin-Applikation keine Unterschiede in Abhängigkeit von der Maisversorgung, womit diese Bakterien-Gruppe für die Unterschiede in der Propionat-Produktion nach transgener Maisversorgung ausgeschlossen werden kann.

Aufgrund der in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse kann jedoch in Frage gestellt werden, ob eine substanzielle Äquivalenz zwischen den beiden verwendeten Maissorten vorgelegen hat bzw. ob mit Hilfe der Weender Analyse subtile Veränderungen in der pflanzlichen Zusammensetzung überhaupt genau genug erfasst werden konnten (Millstone et al. 1999). Transgene Pflanzen können zwar gezielt mit einer neuen Eigenschaft ausgestattet werden, aber der Integrationsort in der Erbsubstanz ist bei den heute verwendeten Techniken rein zufällig. Dies könnte zu Veränderungen der dort vorhandenen Gene oder Regulationssequenzen führen, was wiederum eine Inaktivierung oder Aktivierung dieser gestörten Gene als Konsequenz hätte. Die Bildung und Konzentration von unterschiedlichen Stoffwechselprodukten könnte die Folge sein.

In jüngster Zeit wurden weitere Verfahren entwickelt, die die Detektion von einer großen Anzahl von primären und sekundären Stoffwechselprodukten (Metabolomic), Polypeptiden (Proteomics) oder Transkripten (Transcriptomics) erlauben. Eine Studie an GV-Kartoffeln konnte Unterschiede im Zuckerstoffwechsel im Vergleich zu den konventionellen Kartoffeln finden. Diese Unterschiede wurden auf den Einbau zusätzlicher Gene aus der Artischocke zurückgeführt, wodurch die GV-Kartoffeln eine neue Zuckerart (Inulin) produziert. Neue, unerwartete Inhaltsstoffe wurden jedoch nicht festgestellt (Catchpole 2005).

Manetti et al. (2006) untersuchten mit Hilfe der Metabolomik gentechnisch veränderten Mais im Vergleich zu konventionellem Mais. Hier konnten Variationen speziell in der Bildung von Osmolyten sowie verzweigt-kettigen Aminosäuren, die am Stickstoff-Stoffwechsel der transgenen Pflanze beteiligt sind, gefunden werden. Ein Zusammenhang mit dem zusätzlich erworbenen Cry1Ab-Gen wurde diskutiert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse auf Unterschiede in der Inhaltsstoffzusammensetzung zwischen transgenem und konventionellem Mais hindeuten und zeigen, dass die gängigen Verfahren wie z.B. die Weender Analyse, die zur Bestimmung der substanziellen Äquivalenz als Qualitätskontrolle herangezogen wurde, diese Änderungen möglicherweise nicht erfassen konnte. Die Beurteilung der substanziellen Äquivalenz liefert somit keine eindeutige Aussage in Bezug auf die biochemische Gleichheit von transgenen Pflanzen und ihrer konventionellen Ausgangsorte.

#### **4.2.4 Horizontaler Gentransfer**

Obwohl HGT zwischen Bakterien sehr häufig vorkommt, scheint der HGT zwischen Pflanze und Bakterien allgemein äußerst selten aufzutreten. Spekulationen darüber, dass ein horizontaler Gentransfer von Pflanzen-DNA in Bakterien stattfinden kann, beruht in erster Linie insbesondere auf dem Vergleich der genetischen Information dieser beiden Organismen miteinander. In diesem Zusammenhang konnte für das Enzym Glucose-6-Phosphat-Isomerase (GPI) gezeigt werden, dass die Gene von *Escherichia coli* und der Pflanze *Clarkia unguolata* zu 88% identisch sind (Froman et al. 1989, Smith und Doolittle 1992). Aufgrund dieser großen Übereinstimmung zwischen einer prokaryotischen und

eukaryotischen Sequenz wurde vermutet, dass *Escherichia coli* die Pflanzen-DNA im Darm seines Wirtes aufgenommen haben könnte (Smith und Doolittle 1992).

Einen weiteren Hinweis auf einen HGT zwischen Pflanze und Bakterium liefert die Untersuchung des Gens, das die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) codiert. Von diesem Enzym existieren zwei Formen, die GAPDH-A, die allgemein bei Eukaryoten vorkommt, und die GAPDH-B, die typisch für Prokaryoten bzw. Bakterien ist. Interessanterweise existieren in einigen Darmbakterien beide Formen. Stammbaumanalysen schließen auf einen Transfer des GAPDH-A Gens aus der Pflanze in Bakterien. Ob diese Übertragung im Gastrointestinaltrakt stattgefunden hat, ist unklar (Syvanen 1994).

Ausgehend von der gestellten Arbeitshypothese könnte eine bessere Propionaterholung unter dem Selektionsdruck von Ampicillin auch als eine bessere Resistenzentwicklung in Verbindung mit transgener Maisversorgung interpretiert werden. Das in dem Bt-176 Mais als Transgen eingebrachte bla<sub>TEM-1</sub>-Gen könnte von Pansenbakterien mittels HGT aufgenommen worden sein und diesen nun gegenüber den isogen versorgten Bakterien einen Vorteil verschafft haben.

Damit es überhaupt zu einem HGT kommen kann, müssen mehrere Faktoren zusammentreffen, wodurch insgesamt die Wahrscheinlichkeit eines HGT als ein sehr seltenes Ereignis bewertet wird (Heritage 2004).

- Das Gen bzw. die Sequenz mit der enthaltenden Information darf nicht durch den Abbau durch Nukleasen zerstört werden.
- Es müssen kompetente Zellen vorhanden sein, die das Gen über ihre Zellwände aufnehmen können.
- Das Gen muss in das Genom eingebaut werden und erfolgreich abgelesen werden können.

Im Folgenden soll in Verbindung mit den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen die Wahrscheinlichkeit eines HGT zwischen Pansenbakterien und transgenem Bt-176 Mais ausführlicher diskutiert werden.

#### 4.2.4.1 Abbau von DNA im Gastrointestinaltrakt (GIT)

Bei dem Abbau der transgenen Maiskörner durch mikrobielle Enzyme des Pansens werden große Mengen an DNA freigesetzt, unter anderem auch die zusätzlich eingebrachte transgene DNA. Damit es zu einer erfolgreichen Expression der  $\beta$ -Laktamase in Bakterien und somit zu einer Resistenzentwicklung gegen Ampicillin kommen kann, muss das 858 bp lange bla<sub>TEM-1</sub>-Gen (Mabilat et al. 1990) die Degradationsprozesse im Pansen für eine kurze Zeit überdauern, um die Möglichkeit zu haben, von Bakterien aufgenommen werden zu können. Das Potential für einen erfolgreichen horizontalen Gentransfer wird wesentlich von dem Zeitraum bestimmt, über welchen die DNA-Fragmente im Verdauungssystem intakt bleiben, da DNA im Verdauungstrakt allgemein sehr schnell durch Nukleasen abgebaut wird.

Es konnten Hinweise auf Unterschiede im Abbau freier, ungeschützter DNA im Vergleich zu in Zellen eingeschlossener DNA gefunden werden.

Eine *in vitro* Studie untersuchte die Degradation von transgener DNA aus genetisch veränderter Nahrung im oberen Verdauungssystem von Menschen. Die in Pflanzenzellen enthaltene DNA schien im Gegensatz zu freier DNA vor rascher Degradation geschützt zu sein (Martin-Orue et al. 2002). Hohlweg und Dörfler (2001) konnten diese Aussage in ihren Untersuchungen von Proben aus dem GIT bei Mäusen bestätigen. Auch hier zeigte pflanzenassoziierte DNA gegenüber freier DNA eine höhere Stabilität. In Hühnern, denen transgener Mais gefüttert wurde, konnte das Transgen nicht weiter als bis zum Magen verfolgt werden (Chambers et al. 2002). Dagegen konnten Wilcks et al. (2004) zeigen, dass die im Mais-Futter enthaltene Chloroplasten-DNA eine Darmpassage bei Ratten nicht nur übersteht, sondern auch biologisch aktiv bleibt. *Escherichia coli* Zellen konnten mit dieser DNA *in vitro* transformiert werden.

In Fütterungsversuche an Wiederkäuern mit gentechnisch veränderten Maiskörnern war es möglich noch bis zu fünf Stunden nach Fütterung die gesamte codierende Sequenz des Cry1Ab-Gens mit einer Größe von 1914 bp im Pansensaft nachzuweisen (Duggan et al. 2003). Auch Alexander et al. (2006) konnten im Pansensaft von Schafen noch nach 13 h ein 1363 bp großes transgenes Fragment finden. Eine sofortige vollständige Degradation der DNA durch Nukleasen findet somit entgegen früherer Annahmen nicht statt (Schubbert et al. 1997).

Aus diesen Untersuchungen geht hervor, dass durchaus Fragmente mit einer Größe des in dem transgenen Mais vorkommenden bla<sub>TEM-1</sub>-Gens im GIT über einen längeren Zeitraum überdauern können, um somit die Grundlage für die Möglichkeit eines horizontalen Gentransfers zu schaffen. Jedoch muss diese DNA in Bakterien gelangen, die eine Möglichkeit der Kompetenzentwicklung besitzen.

#### **4.2.4.2 Kompetenzentwicklung der Bakterien im GIT**

Damit Bakterien in der Lage sind, freie DNA aus ihrem Umgebungsmilieu aufzunehmen, müssen sie die Fähigkeit der Kompetenz besitzen. Der Mechanismus der Kompetenzentwicklung in natürlichen Habitaten ist nach wie vor nur teilweise verstanden. Bisher konnten im Pansen von Wiederkäuern eine Reihe von kompetenten Bakterienstämmen beschrieben werden (Salyers et al. 1993; Mercer et al. 1999; Flint 1994). Dies zeigt, dass natürliche Kompetenz auch bei Bakterien im Pansen vorkommt, wobei aufgrund der begrenzten Kultivierbarkeit anaerober Keime bisher nur ein geringer Prozentsatz aller Bakterienarten im Pansen daraufhin untersucht worden ist. Es kann spekuliert werden, dass durchaus noch weitere, bisher unbekannte natürlich transformationsbereite Bakterienstämme im Pansen vorkommen. Bakterien mit natürlicher Kompetenz entwickeln diese normalerweise während bestimmter Wachstumsphasen; in der Regel während der exponentiellen Phase oder in der stationären Phase oder im Übergang von der exponentiellen zur stationären Phase (Lorenz et al. 1992). Es kann davon ausgegangen werden, dass sich gerade im Pansen Bakterien ständig in unterschiedlichen Wachstumsphasen befinden.

Im Pansen können somit kompetente Zellen, vielleicht sogar in hoher Anzahl, nicht ausgeschlossen werden. Die Wahrscheinlichkeit des Zusammentreffens von freier DNA und Zellen, die sich gerade im Zustand der natürlichen Kompetenz befinden, ist infolgedessen im Pansen sehr stark erhöht. Es bestünde somit gerade im Pansen die Möglichkeit, dass durch den engen Kontakt zwischen Pflanzen und den ihnen assoziierten Bakterien diese in der Lage sind, die freiwerdende DNA aufzunehmen.

#### 4.2.4.3 Einbau fremder DNA in Bakterien

Damit es jedoch zu einer Resistenzentwicklung von Bakterien kommen kann, muss das bla<sub>TEM-1</sub>-Gen nicht nur vollständig von der Zelle aufgenommen werden, sondern zudem noch ins Genom bzw. in das Plasmid der Zelle eingebaut und das entsprechende Protein, in diesem Fall die  $\beta$ -Laktamase, synthetisiert werden. Der Einbau über die Zellwand aufgenommener DNA-Abschnitte in das Genom von Bakterien geschieht über den Vorgang der Rekombination. Das bla<sub>TEM-1</sub>-Gen aus der transgenen Maispflanze stammt ursprünglich aus Bakterien und wurde aus dem Vektor pUC18 in das Pflanzengenom übertragen (Duggan et al. 2000). Dort wird das bla<sub>TEM-1</sub>-Gen über einen ebenfalls aus Bakterien stammenden Promotor gesteuert. Bensasson et al. (2004) wiesen eine sehr hohe Homologie zwischen synthetischen, in der Biotechnologie verbreiteten Vektoren und dem Bakteriengenom hin. Es konnte nachgewiesen werden, dass DNA-Abschnitte mit homologen Sequenzen sehr viel effektiver infolge homologer Rekombination in ein Bakterium eingebaut werden verglichen mit DNA-Abschnitten, die wenig bis keine Homologien aufwiesen (Zawadzki und Cohan 1995). Untersuchungen an *Acinetobacter sp.* BD413 und transgenen Zuckerrüben zeigten, dass ein Gentransfer zwischen Pflanze und Bakterium unter optimierten Bedingungen im Labor möglich ist und konnten das Wiederherstellen eines unvollständigen Antibiotikaresistenz-Gens (nptII-Gen) in *Acinetobacter sp.* BD413 nachweisen. Hierzu wurde transgene Zuckerrüben-DNA eingesetzt, die das komplette nptII-Gen als Markergen enthielt. Die Empfängerzellen bauten zur Reparatur ihres mutierten nptII-Gens DNA-Abschnitte aus der transgenen Pflanze ein (Gebhard und Smalla 1998).

Bei erfolgreicher Transformation des bla<sub>TEM-1</sub>-Genes würde dieses so ausgestattet sein, um von Bakterienzellen exprimiert werden zu können. Nur ein Transformationsereignis würde unter Umständen ausreichen, um in relativ kurzer Zeit eine Population mit einer neuen genetischen Ausrichtung entstehen zu lassen. Der Ausübung eines Selektionsdruckes scheint hier einer besonderen Bedeutung zuzukommen, da nur unter dem Einfluss von Ampicillin die Aufnahme eines bla<sub>TEM-1</sub>-Gens ein Zugewinn für die Zelle wäre.

#### 4.2.5 Bedeutung des Selektionsdrucks

Eine wichtige Voraussetzung für die Untersuchung eines HGT von Pflanzen auf Bakterien ist die Erzeugung eines Selektionsdruckes. Es besteht ein enger Zusammenhang zwischen Antibiotikaeinsatz und einer Resistenzentwicklung, womit der Einsatz von Antibiotika zum wichtigsten Faktor bei der Entstehung von resistenten Mikroorganismen zählt (van den Bogaard und Stobberingh 2000; Engberg et al. 2001; Neu 1992). Die Wahrscheinlichkeit, dass sich eine neue Eigenschaft bei Bakterien ohne einen Selektionsvorteil durchsetzt, wird insgesamt als sehr gering gewertet (Jonas et al. 2001).

Für die Beurteilung der Ergebnisse dieser Arbeit wird die Bedeutung des Selektionsdruckes deutlich: Ohne die tägliche Ampicillin-Applikation konnten in den Fettsäureprofilen keine Unterschiede zwischen isogener und transgener Maisversorgung gefunden werden. Erst unter dem Selektionsdruck zeigen sich deutliche Unterschiede in der Produktion von Propionat.

Um den Zusammenhang zwischen Ampicillin und transgener Maisversorgung im Pansen genauer charakterisieren zu können, wurde das Antibiotikum in weiteren RUSITEC-Versuchen durch Kanamycin ersetzt. Weder in den biochemischen noch in den genetischen Profilen konnten Unterschiede in Abhängigkeit von der Maisversorgung gefunden werden. Diese Ergebnisse liefern einen weiteren Hinweis darauf, dass die Möglichkeit eines HGT bestanden haben könnte. Anhand dieser Befunde kann weiter spekuliert werden, dass beim Einsatz des Bt-176 Maises und einem Selektionsdruck, dieses Mal hervorgerufen durch Kanamycin, das Vorkommen eines HGT den Bakterien keinen Vorteil geliefert hat. Ein eindeutiger Beweis für einen HGT kann jedoch auch mit Hilfe dieser Untersuchungen nicht erbracht werden, weshalb in weiteren Experimenten die Erbsubstanz der Bakterien auf das Vorhandensein des bla<sub>TEM-1</sub>-Gens untersucht wurde.

#### 4.2.6 Untersuchungen des bakteriellen Genoms auf bla<sub>TEM</sub>-Gene

Der genetische Austausch zwischen Mikroorganismen erhöht die Möglichkeiten, sich einer veränderten Umwelt anzupassen und das Überleben zu sichern. 1957 wurde das erste konjugative R-Plasmid aus klinischen Proben als Ursache für eine Verbreitung von Antibiotikaresistenzen und damit für den Austausch von Genen erkannt und nachgewiesen

(Ochiai et al. 1959). Es wurde gleichzeitig der Beweis erbracht, dass vier Resistenzen mittels Plasmid übertragen werden konnten und dass die Verbreitung dieser Resistenzen auch horizontal erfolgt (Akiba et al. 1960). Weitere zahlreiche Mechanismen des inter- und intrachromosomalen Gentransfers wurden im Gastrointestinaltrakt beschrieben (Wassenaar et al. 1995). Somit kann über HGT aufgenommene DNA von Bakterien entweder chromosomal oder in das Plasmid eingebaut werden. Untersuchungen im Rahmen dieser Studie konnten mittels PCR-Technik in der chromosomalen und plasmidischen DNA der isolierten Pansen-Bakterien jedoch keine Sequenzabschnitte des bla<sub>TEM-1</sub>-Gens nachweisen. Zusätzlich wurden Zellen getestet, denen das bla<sub>TEM-1</sub>-Gen einkloniert wurde und deren plasmidische DNA anschließend unter identischen Bedingungen wie die der Pansenbakterien isoliert wurden. Hier gelang es, das bla<sub>TEM-1</sub>-Gen nachzuweisen, wodurch die Validität der PCR-Reaktion bestätigt werden konnte. Diesen Ergebnissen zufolge hätte ein HGT zwischen transgener Pflanze und Pansenbakterien in diesen Untersuchungen nicht stattgefunden. Interessanterweise konnten jedoch auch keine natürlich vorkommenden bla<sub>TEM</sub>-Gene in den Pansenbakterien nachgewiesen werden, obwohl das bla<sub>TEM-1</sub>-Gen ein in Bakterien ubiquitär vorkommendes Gen ist. In Untersuchungen der fecalen Flora von Menschen wurde bei 24 % der Patienten Ampicillin-Resistenzen festgestellt. Bei der genaueren Untersuchung nach dem Mechanismus konnten bei 52% der Proben ein bla<sub>TEM</sub>-Gen nachgewiesen werden (Heritage et al. 2001). Wie schon beschrieben konnten in vielen Studien auch bla<sub>TEM</sub>-Gene für unterschiedliche Bakterienspezies im Pansen nachgewiesen werden (Martin und Dean 1989; Fliegerova 1993; Malik et al. 2004).

#### **4.6 Bedeutung der Forschungsergebnisse**

Der Nachweis eines HGT von transgenen Konstrukten aus Pflanzen auf Bakterien ist bisher nur unter optimalen und kontrollierten Laborbedingungen und bei ausreichender Sequenzhomologie gelungen (de Vries und Wackernagel, 2005; Iwaki und Arakawa, 2006). Netherwood et al. (2004) konnten in klinischen Studien ein Fragment des epeps-Gen, welches aus transgenem Soja stammt, in Bakterien nachweisen, die von Patienten mit einem künstlichen Darmausgang isoliert wurden. Ein eindeutiger Beweis für einen HGT konnte jedoch auch mit dieser Untersuchung nicht erbracht werden. Das Potential für einen HGT von transgenen Pflanzen zu Mikroorganismen wird allgemein als sehr gering

eingeschätzt (Smalla et al. 2000; De Vries et al. 2001, Chambers et al. 2002). Auf der anderen Seite wird argumentiert, dass ein bisheriger erfolgreicher Nachweis eines HGT zwischen Pflanze und Bakterien auch mit einem methodischem Nachweisproblem zusammenhängen könnte (Nielsen und Townsend 2004). Insgesamt wird die Sensibilität der verwendeten Nachweisverfahren als sehr gering eingeschätzt. Hinzu kommt, dass bisher in natürlichen Habitaten die gesamte bakteriellen Diversität nur zu einem geringen Prozentsatz kultivierbar ist und eine Charakterisierung einzelner Bakterienarten daher nur begrenzt möglich ist (Van Elsas et al. 2002).

Auch in diesen Untersuchungen wurden Hinweise gefunden, die für einen HGT zwischen transgenem Mais und Bakterien sprechen könnten. Ein eindeutiger Nachweis konnte jedoch mit Hilfe der angewendeten Methoden nicht erbracht werden. Bedeuten diese Ergebnisse aber endgültig, dass ein HGT in diesen Untersuchungen nicht stattgefunden hat? Oder ist dies ein Hinweis darauf, dass mit Hilfe der eingesetzten Methoden ein HGT nicht nachgewiesen werden konnte? Diese Fragen können anhand der Ergebnisse dieser Arbeit nur spekulativ beantwortet werden.

Im Rahmen eines gemeinsamen Projektes mit dem Thema - Examination of potential for gene flow from bacteria in rumen fluid - wurde im Department of Microbiologie, University of Leeds in der Arbeitsgruppe von Prof. J. Heritage (finanziert durch ein persönliches Stipendium des Marie-Curie-Programms) ergänzende Studien zur Problematik des HGT durchgeführt. In diesen Untersuchungen konnten natürlich Ampicillin-resistente Keime im Pansen von Schlachthausrindern nachgewiesen werden. Pansensaft-Mikroorganismen von drei Rindern wurden in einer anaeroben Werkbank auf selektiven Agar (Ampicillin) ausgestrichen. Bei allen Tieren war die Inkubation erfolgreich. Um die Ursache dieser natürlich resistenten Keime genauer zu beschreiben wurden aus den gleichen Pansensaftproben Bakterien isoliert und ihre genomische DNA mittels PCR auf natürlich vorkommende  $bla_{TEM}$ -Gene untersucht. Es konnte jedoch aus keiner Pansensaftprobe  $bla_{TEM}$ -Gene im Genom dieser Bakterien nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse sowie die Ergebnissen dieser Arbeit sprechen für das Vorkommen von natürlich Ampicillin-resistenten Keimen im Rinderpansen, die nicht an das Vorhandensein von  $bla_{TEM}$ -Gene geknüpft sind und somit auf anderen Mechanismen beruhen müssen.

Aufgrund aller Untersuchungen kann angenommen werden, dass die gemessenen Unterschiede in der Propionat-Produktion infolge unterschiedlicher Maisversorgung nicht auf der Grundlage eines horizontalen Gentransfers basieren, sondern wahrscheinlich auf

Unterschieden in der Stoffwechselleistungsfähigkeit der Bakterien beruhen. Diese metabolischen Unterschiede könnten auf eine substanzielle Inäquivalenz der transgenen Maispflanze im Vergleich zu ihrem konventionellen Pendant zurückzuführen sein.

## 5 Literaturverzeichnis

**Akiba, T., K. Koyama, Y. Ishiki, S. Kimura and T. Fukushima 1960.** On the mechanism of the development of multiple-drug-resistant clones of *Shigella*. *Jpn J Microbiol* 4: 219-27.

**Alexander, T. W., T. Reuter, E. Okine, R. Sharma and T.A. McAllister 2006.** Conventional and real-time polymerase chain reaction assessment of the fate of transgenic DNA in sheep fed Roundup Ready rapeseed meal. *Br J Nutr* 6: 997-1005.

**Bakan, B., D. Melcion, D. Richard-Molard and B. Cahagnier 2002.** Fungal growth and fusarium mycotoxin content in isogenic traditional maize and genetically modified maize grown in France and Spain. *J Agric Food Chem* 50: 728-31.

**Bensasson, D., J. L. Boore and K. M. Nielsen 2004.** Genes without frontiers? *Heredity* 92: 483-9.

**Berberich, I., G. Shu, F. Siebelt, J. R. Woodgett, J. M. Kyriakis and E. A. Clark 1996.** Cross-linking CD40 on B cells preferentially induces stress-activated protein kinases rather than nitogen-activated protein kinases. *EMBO J* 15: 92-101.

**Bertolla, F., E. Kay and P. Simonet 2000.** Potential dissemination of antibiotic resistance genes from transgenic plants to microorganisms. *Infect Control Hosp Epidemiol* 21: 390-393.

**Bohn, M., R. C. Kreps, D. Klein and A. E. Melchinger 1999.** Damage and grain yield losses caused by European corn borer (*Lepidoptera: Pyralidae*) in early maturing European maize hybrids. *J. Econ. Entomol.* 92: 723-731.

**Brandt, M. and K. Rohr 1981.** The quantification of nitrogen metabolism in the forestomachs of dairy cows. 1. The examination of microbial nitrogen with <sup>15</sup> nitrogen as a marker. *Z Tierphysiol Tierernähr Futtermittelkd* 46: 39-48.

**Breves G. and S. Leonhard-Marek 2005.** Verdauungsvorgänge in den Vormägen. In W. von Engelhardt und G. Breves (Hrsg.) Physiologie der Haustiere. 2. Auf. Enke Verl. Stuttgart.

**Brookes, G. 2002.** Identity preservation of genetically modified organisms in the food chain: requirements, methods, and costs. J AOAC Int 85: 762-767.

**Brosius, J., M. L. Palmer, P. J. Kennedy and H. F. Noller 1978.** Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci USA 75: 4801-4805.

**Bryan, L. E. and S. Kwan 1981.** Mechanisms of aminoglycoside resistance of anaerobic bacteria and facultative bacteria grown anaerobically. J Antimicrob Chemother 8 Suppl D: 1-8.

**Carro, M. D., P. Lebzien, K. Rohr 1995.** Effect of pore size of nylon bags and dilution rate on fermentation parameters in a semicontinuous artificial rumen. Small Ruminant Resarch. 15: 113-119.

**Catchpole, G. S., M. Beckmann, D. P. Enot, M. Mondhe, B. Zywicki, J. Taylor, N. Hardy, A. Smith, R. D. King, D. B. Kell, O. Fiehn and J. Draper 2005.** Hierarchical metabolomics demonstrates substantial compositional similarity between genetically modified and conventional potato crops. Proc Natl Acad Sci USA 102: 14458-14462.

**Castella, G., Munkvold, G. P., Imerman, P. and W.G. Hyde 1999.** Effects of temperature, incubation period and substrate on production of fusaproliferin by *Fusarium subglutinans* ITEM 2404. Nat Toxins 7: 129-132.

**Chambers, P. A., P. S. Duggan, J. Heritage and J. M. Forbes 2002.** The fate of antibiotic resistance marker genes in transgenic plant feed material fed to chickens. J Antimicrob Chemother 49: 161-164.

**Clive. J. 2006.** Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2006. ISAAA Brief No. 35. ISAAA: Ithaca, NY.

**Czerkawski, J. W. and G. Breckenridge 1977.** Design and development of a long-term rumen simulation technique (Rusitec). Br J Nutr 38: 371-384.

**Czerkawski, J. W. and G. Breckenridge 1969.** The effect of oxygen on fermentation of sucrose by rumen micro-organisms in vitro. *Br J Nutr* 23: 67-80.

**Czerkawski, J. W. and G. Breckenridge 1985.** Metabolism of protein supplements studied by the rumen simulation technique (Rusitec). *Arch Tierernähr* 35: 261-277.

**Czerkawski, J.W. 1986.** Compartmentation in the rumen. In: *An Introduction to rumen studies*, Pergamon Press, Oxford, New York, Toronto, Frankfurt, 65-82.

**de la Cruz, F. and J. Davies 2000.** Horizontal gene transfer and the origin of species: lessons from bacteria. *Trends Microbiol* 8: 128-133.

**de Vries, J., P. Meier and W. Wackernagel 2001.** The natural transformation of the soil bacteria *Pseudomonas stutzeri* and *Acinetobacter sp.* by transgenic plant DNA strictly depends on homologous sequences in the recipient cells. *FEMS Microbiol Lett* 195:211-215.

**de Vries and W. Wackernagel 2005.** Microbial horizontal gene transfer and the DNA release from transgenic crop plant. *Plant and Soil* 266: 91-104.

**Dirksen, G. 1985.** The rumen acidosis complex-recent knowledge and experiences (1). A review. *Tierärztl Prax* 13: 501-512.

**Duggan, P.S., P.A. Chambers, J. Heritage and J.M. Forbes 2000.** Survival of free DNA encoding antibiotic resistance from transgenic maize and the transformation activity of DNA in ovine saliva, ovine rumen fluid and silage effluent. *FEMS Microbiol Lett* 191: 71-77.

**Duggan, P. S., P. A. Chambers, J. Heritage and J. Michael Forbes. 2003.** Fate of genetically modified maize DNA in the oral cavity and rumen of sheep. *Br J Nutr* 89: 159-166.

**Eikmanns, U. and W. Buckel 1991.** A green 2,4-pentadienoyl-CoA reductase from *Clostridium aminovalericum*. *Eur J Biochem* 198: 263-266.

**Einspanier, R., B. Lutz, S. Rief, O. Berezina, V. Zverlov, W. Schwarz and J. Mayer 2004.** Tracing residual recombinant feed molecules during digestion and rumen bacterial diversity in cattle fed transgene maize. *Eur Food Res Technol.* 218: 269-273.

**Engberg, J., F. M. Aarestrup, D. E. Taylor, P. Gerner-Smidt and I. Nachamkin 2001.** Quinolone and macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *C. coli*: resistance mechanisms and trends in human isolates. *Emerg Infect Dis* 7: 24-34.

**Ferré, J. and J. Van Rie 2002.** Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu Rev Entomol* 47: 501-533.

**Fliegerova, K. 1993.** Multiresistant strains of *Escherichia coli* isolated from the rumen of young calves. *Folia Microbiol (Praha)* 38: 363-366.

**Flint, H. J. 1994.** Molecular genetics of obligate anaerobes from the rumen. *FEMS Microbiol Lett* 121: 259-267.

**Fraley, R. T., S. G. Rogers, R. B. Horsch, P. R. Sanders, J. S. Flick, S. P. Adams, M. L. Bittner, L. A. Brand, C. L. Fink, J. S. Fry, G. R. Galluppi, S. B. Goldberg, N. L. Hoffmann and S. C. Woo 1983.** Expression of bacterial genes in plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 4803-4807.

**Froman, B. E., R. C. Tait and L. D. Gottlieb 1989.** Isolation and characterization of the phosphoglucose isomerase gene from *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* 217: 126-131.

**Garfinkel, D. J., R. B. Simpson, L. W. Ream, F. F. White, M. P. Gordon and E. W. Nester 1981.** Genetic analysis of crown gall: fine structure map of the T-DNA by site-directed mutagenesis. *Cell* 27: 143-153.

**Gebhard, F. and K. Smalla 1998.** Transformation of *Acinetobacter sp.* strain BD413 by transgenic sugar beet DNA. *Appl Environ Microbiol* 64: 1550-1554.

**Gentechnikrecht (GenTR) 1993.** Erbach, W., Lange P., eds., C.F. Müller Juristischer Verlag, Heidelberg.

**George, C., W. P. Ridley, J. C. Obert, M. A. Nemeth, M. L. Breeze and J. D. Astwood 2004.** Composition of grain and forage from corn rootworm-protected corn event MON 863 is equivalent to that of conventional corn (*Zea mays* l.). *J Agric Food Chem* 52: 4149-4158.

**Gianessi, L.P., S. Sankuka and N. Reigner 2003.** Pflanzenbiotechnologie: Potenzielle Wirkung bei der Verbesserung der Schädlingsbekämpfung in der europäischen Landwirtschaft, Eine Zusammenfassung von drei Fallstudien Juni 2003, The National Center for Food and Agricultural Policy 1616 P Street, NW Suite 100 Washington, DC 20036.

**Grosskopf, R., P. H. Janssen and W. Liesack 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. *Appl Environ Microbiol* 64: 960-969.

**Heldt, H. W. 1999.** Pflanzenbiochemie. 2. Aufl. Heidelberg; Berlin; Spektrum, Akademischer Verlag.

**Heritage, J. 2004.** The fate of transgenes in the human gut. *Nat Biotechnol* 22: 170-172.

**Heritage, J. 2005.** Transgenes for tea? *Trends Biotechnol* 23: 17-21.

**Heritage, J., N. Ransome, P. A. Chambers and M. H. Wilcox 2001.** A comparison of culture and PCR to determine the prevalence of ampicillin-resistant bacteria in the faecal flora of general practice patients. *J Antimicrob Chemother* 48: 287-289.

**Herman, R. A., A. M. Phillips, R. A. Collins, L. A. Tagliani, F. A. Claussen, C. D. Graham, B. L. Bickers, T. A. Harris, and L. M. and Prochaska 2004.** Compositional equivalency of Cry1F corn event TC6275 and conventional corn (*Zea mays* L.). *J Agric Food Chem* 52: 2726-2734.

**Herman, R. A., N. P. Storer, A. M. Phillips, L. M. Prochaska and P. Windels 2007.** Compositional assessment of event DAS-59122-7 maize using substantial equivalence. *Regul Toxicol Pharmacol* 47: 37-47.

**Heß, D. 1992.** Biotechnologie der Pflanze. Ulmer Taschenbuch Verlag, Stuttgart.

**Hofte, H. and H.R. Whiteley 1989.** Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiol Rev 53: 242-255.

**Hohlweg, U. and W. Doerfler 2001.** On the fate of plant or other foreign genes upon the uptake in food or after intramuscular injection in mice. Mol Genet Genomics 265: 225-233.

**Iwaki, M. and Y. Arakawa 2006.** Transformation of with DNA from commercially available genetically modified potato and papaya. L Appl Microbiol 43: 215-221.

**Jonas, D.A., I. Elmadfa and K.-H. Engel 2001.** Safety considerations of DNA in food. Ann Nutr Metabol 45: 253-254.

**Kharazmi, M., S. Sczesny, M. Blaut, W. P. Hammes and C. Hertel 2003.** Marker rescue studies of the transfer of recombinant DNA to *Streptococcus gordonii in vitro*, in foods and gnotobiotic rats. Appl Environ Microbiol 69: 6121-6127.

**Knowles, B. H. and D. J. Ellar 1986.** Characterization and partial purification of a plasma membrane receptor for *Bacillus thuringiensis var. kurstaki* lepidopteran-specific delta-endotoxin. J Cell Sci 83: 89-101.

**Komisarczuk, S., M. Durand, C. Dumay and M. T. Morel 1986.** Use of a semicontinuous culture system (Rusitec) to study the effect of phosphorus deficiency on rumen microbial digestion. In: DUBORGIER et al. (Hrgs), Progress in Biotechnology 2, Biology of anaerobic bacteria, Elsevier, Amsterdam, 47-53.

**Koziel, M. G., G. L. Beland, C. Bowman, N. B. Carozzi, R. Crenshaw, L. Crossland, J. Dawson, N. Desai, M. Hill, S. Kadwell, K. Launis, K. Lewis, D. Maddox, K. McPherson, M. R. Meghji, E. Merlin, R. Rhodes, G.W. Warren, M. Wright and S.V. Evola 1993.** Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. Nat Biotechnol 11: 194-200.

**Lee, C.H., A. Bhagwat and F. Heffron 1983.** Identification of a transposon Tn3 sequence required for transposition immunity. Proc Natl Acad Sci USA 80: 6765-6769.

**Lepschy, J. 1992.** Fusarientoxine in Getreide - ihre Entstehung und Vorbeugungsmaßnahmen. Gesunde Pflanzen 44: 35-39.

- Lew, H., J. Chelkowski, P. Pronczuk and W. Edinger 1996.** Occurrence of the mycotoxin moniliformin in maize (*Zea mays* L.) ears infected by *Fusarium subglutinans* (Wollenw. & Reinking) Nelson et al. *Food Addit Contam* 13: 321-324.
- Livermore, D. M. and N. Woodford 2006.** The beta-lactamase threat in *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. *Trends Microbiol* 14: 413-420.
- Lorenz, M. G., K. Reipschlager and W. Wackernagel 1992.** Plasmid transformation of naturally competent *Acinetobacter calcoaceticus* in non-sterile soil extract and groundwater. *Arch Microbiol* 157: 355-360.
- Mabilat, C. and P. Courvalin 1990.** Development of "oligotyping" for characterization and molecular epidemiology of TEM beta-lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother* 34: 2210-2216.
- Malik, R., J. Ivan, P. Javorsky and P. Pristas 2005.** Seasonal dynamics of antibiotic-resistant *Enterobacteriaceae* in the gastrointestinal tract of domestic sheep. *Folia Microbiol (Praha)* 50: 349-352.
- Malik, R., P. Pristas and P. Javorsky 2004.** Occurrence of plasmid-mediated ampicillin resistance among *Enterobacteria* from the ovine rumen. *Folia Microbiol (Praha)* 49: 187-190.
- Mandell G.L. and W.A. Petri 1998.** Antimikrobielle Wirkstoffe: Penicilline, Cephalosporine und andere  $\beta$ -Lactam-Antibiotika. In Goodman und Gilman *Pharmakologische Grundlagen der Arzneimitteltherapie*. 9. Auflage. McGraw-Hill
- Manetti, C., C. Bianchetti, L. Casciani, C. Castro, M. E. Di Cocco, A. Miccheli, M. Motto and F. Conti 2006.** A metabonomic study of transgenic maize (*Zea mays*) seeds revealed variations in osmolytes and branched amino acids. *J Exp Bot* 57: 2613-2625.
- Martens, H. 2005.** Transportmechanismen des Pansenepithels. In W. von Engelhardt und G. Breves (Hrsg.) *Physiologie der Haustiere*. 2. Auf. Enke Verlag Stuttgart.
- Martin-Orue, S. M., A. G. O'Donnell, J. Arino, T. Netherwood, H. J. Gilbert and J. C. Mathers 2002.** Degradation of transgenic DNA from genetically modified soya and maize in human intestinal simulations. *Br J Nutr* 87: 533-542.

- Martin, S. A. and R. G. Dean 1989.** Characterization of a plasmid from the ruminal bacterium *Selenomonas ruminantium*. *Appl Environ Microbiol* 55: 3035-3038.
- Mates, S. M., L. Patel, H. R. Kaback and M. H. Miller 1983.** Membrane potential in anaerobically growing *Staphylococcus aureus* and its relationship to gentamicin uptake. *Antimicrob Agents Chemother* 23: 526-530.
- Melchinger, A. E., H. F. Utz and C. C. Schon 1998.** Quantitative trait locus (QTL) mapping using different testers and independent population samples in maize reveals low power of QTL detection and large bias in estimates of QTL effects. *Genetics* 149: 383-403.
- Mercer, D. K., C. M. Melville, K. P. Scott and H. J. Flint 1999.** Natural genetic transformation in the rumen bacterium *Streptococcus bovis* JBI. *FEMS Microbiol Lett* 179: 485-490.
- Meyer, J. H. and R. I. Mackie 1986.** Microbiological evaluation of the intraruminal in sacculus digestion technique. *Appl Environ Microbiol* 51: 622-629.
- Milling, A., K. Smalla, F. X. Moidl, M. Schloter and J. C. Munch 2004.** Effects of transgenic potatoes with an altered starch composition on the diversity of soil and rhizosphere bacteria and fungi. *Plant and Soil* 266: 23-39.
- Millstone, E., E. Brunner and S. Mayer 1999.** Beyond 'substantial equivalence'. *Nature* 401: 525-526.
- Mishra, M., F. A. Martz, R. W. Stanley, H. D. Johnson, J. R. Campbell and E. Hildebrand 1970.** Effect of diet and ambient temperature- humidity on ruminal pH, oxydation reduction potential, ammonia and lactic acid in lactating cows. *J Anim Sci* 30: 1023-1028.
- Müller, W. 2000.** Handbuch "Monitoring und Resistenzmanagement für Bt-Mais". Umweltbundesamt/Federal Environment Agency - Austria. pp. 20–21.
- Munkvold, G. P., R. L. Hellmich and L. G. Rice 1999.** Comparison of fumonisin concentrations in kernels of transgenic Bt Maize Hybrids and nontransgenic Hybrids. *Plant Dis* 83: 130-138.

**Netherwood, T., S. M. Martin-Orue, A. G. O'Donnell, S. Gockling, J. Graham, J. C. Mathers and H. J. Gilbert 2004.** Assessing the survival of transgenic plant DNA in the human gastrointestinal tract. *Nat Biotechnol* 22: 204-209.

**Neu, H. C. 1992.** The crisis in antibiotic resistance. *Science* 257: 1064-1073.

**Nielsen, K. M. and J. P. Townsend 2004.** Monitoring and modeling horizontal gene transfer. *Nat Biotechnol* 22: 1110-1114.

**Ochiai, K., T. Yamanaka, K. Kimura and O. Dawada 1959.** Studies on transfer of drug resistance between *Shigella* strain and *Escherichia coli* strain. *Nihon-ijishimpo* 1861: 34-46.

**Reuter, T., K. Aulrich, A. Berk and G. Flachowsky 2002.** Investigations on genetically modified maize (Bt-maize) in pig nutrition: chemical composition and nutritional evaluation. *Arch Tierernähr* 56: 23-31.

**Ridley, W. P., R. S. Sidhu, P. D. Pyla, M. A. Nemeth, M. L. Breeze and J. D. Astwood 2002.** Comparison of the nutritional profile of glyphosate-tolerant corn event NK603 with that of conventional corn (*Zea mays* L.). *J Agric Food Chem* 50: 7235-7243.

**Sambrook J. and D. W. Russell 2001.** *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, USA.

**Sanger F., Nicklen S. and A. R. Coulson 1977.** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 74: 5463-5467.

**Saiki, R. K., S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich and N. Arnheim 1985.** Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354.

**Salyers, A.A. 1993.** Gene transfer in the mammalian intestinal tract. *Curr Opin Biotechnol* 4: 294-298.

**Schnepf, E., N. Crickmore, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D. R. Zeigler and D. H. Dean 1998.** *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 775-806.

**Schubbert, R., D. Renz, B. Schmitz and W. Doerfler 1997.** Foreign (M13) DNA ingested by mice reaches peripheral leukocytes, spleen, and liver via the intestinal wall mucosa and can be covalently linked to mouse DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 961-966.

**Schwieger, F. and C. C. Tebbe 1998.** A new approach to utilize PCR-single-strand-conformation polymorphism for 16S rRNA gene-based microbial community analysis. *Appl Environ Microbiol* 64: 4870-4876.

**Sidhu, R. S., B. G. Hammond, R. L. Fuchs, J. N. Mutz, L. R. Holden, B. George and T. Olson 2000.** Glyphosate-tolerant corn: the composition and feeding value of grain from glyphosate-tolerant corn is equivalent to that of conventional corn (*Zea mays* L.). *J Agric Food Chem* 48: 2305-2312.

**Smalla, K., E. Kroegerrecklenfort, H. Heuer, W. Dejonghe, E. Top, M. Osborn, J. Niewint, C. Tebbe, M. Barr, M. Bailey, A. Greated, C. Thomas, S. Turner, P. Young, D. Nikolakopoulou, A. Karagouni, A. Wolters, J. D. van Elsas, K. Dronen, R. Sandaa, S. Borin, J. Brabhu, E. Grohmann and P. Sobecky 2000.** PCR-based detection of mobile genetic elements in total community DNA. *Microbiology* 146 (Pt 6):1256-1257.

**Smith, M. W. and R. F. Doolittle 1992.** Anomalous phylogeny involving the enzyme glucose-6-phosphate isomerase. *J Mol Evol* 34: 544-545.

**Syvanen, M. 1994.** Horizontal gene transfer: evidence and possible consequences. *Annu Rev Genet* 28: 237-261.

**Van den Bogaard, A. E. and E. E. Stobberingh 2000.** Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans. *Int J Antimicrob Agents* 14: 327-335.

**Van Elsas, J. D., P. Garbeva and J. Salles 2002.** Effects of agronomical measures on the microbial diversity of soils as related to the suppression of soil-borne plant pathogens. *Biodegradation* 13: 29-40.

**Wassenaar, T. M., B. N. Fry and B. A. van der Zeijst 1995.** Variation of the flagellin gene locus of *Campylobacter jejuni* by recombination and horizontal gene transfer. *Microbiology* 141 (Pt 1): 95-101.

**Weisburg, W. G., S. M. Barns, D. A. Pelletier and D. J. Lane 1991.** 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* 173: 697-703.

**Wilcks, A., A. H. van Hoek, R. G. Joosten, B. B. Jacobsen and H. J. Aarts 2004.** Persistence of DNA studied in different ex vivo and in vivo rat models simulating the human gut situation. *Food Chem Toxicol* 42: 493-502.

**Zawadzki, P. and F. M. Cohan 1995.** The size and continuity of DNA segments integrated in *Bacillus* transformation. *Genetics* 141:1231-1243.

## 6 Anhang

Rezepte für verwendete Lösungen, Puffer und Medien sind in der folgenden Tabelle alphabetisch angeordnet.

<b>Lösungen/Puffer/Medien</b>	<b>Bestandteile</b>
Bind Silane Lösung	10 ml EtOH 96 % 100 µl Essigsäure 100 % 100 µl Bind Silane
DNA-Ladungspuffer	0,25 % w/v Bromphenolblau 0,25 % w/v Xylencyanol 30 % v/v Glycerin in Aq. bidest.
Entwicklerlösung	0,5 g AgNO <sub>3</sub> 0,75 ml 37 % Formaldehydlösung 500 ml Aq. bidest.
Ethidiumbromid-Färbelösung (Stammlösung) 1% [w/v] Färbelösung	0,01 Ethidiumbromid ad. 10 ml Aq. bidest. (steril) 0,4 ml Stammlösung ad. 400 ml TAE-Puffer
Formaldehyd-Lösung (3,7 %)	Formaldehyd 37 % ad. Aq. bidest. auf 1.000 ml
IPTG-Gebrauchslösung	0,238 g IPTG ad. 10 ml mit Aqua bidest.
Kochsalzlösung (NaCl, 0,9 % w/ v)	9 g NaCl ad. 1.000 ml Aq. bidest.
LB-Agar	500 ml LB-Medium 7,5 g Agar
LB-Medium	2,5 g Hefe-Extrakt 5 g Trypton 5 g NaCl 1 ml Ampicillin (50 mg · ml <sup>-1</sup> ) ad. 500 ml Aq. bidest. (pH 7)

<b>Lösungen/Puffer/Medien</b>	<b>Bestandteile</b>
Lysis-Puffer	50 mM Tris-HCl (pH 8) 20 mM Tris-HCl (pH 7,5) 25 % Sucrose [w/v] 0,2 M NaCl 1 mM EDTA
50 x TAE-Puffer	242 g Tris basisch 57,1 ml Eisessig 100 ml 0,5 M Na <sub>2</sub> -EDTA pH 8 auffüllen mit Aq. bidest. auf 1.000 ml 1 x TAE -> 1:50 verdünnen aus 50x TAE
10 x TBE-Puffer	108 g Tris basisch 55 g Borsäure 40 ml 0,5 M Na <sub>2</sub> -EDTA pH 8 ad. Aq. bidest. auf 1.000 ml
RUSITEC-Puffer	1,636 g/l NaCl (28 mmol/l) 0,570 g/l KCl (7,64 mmol/l) 0,5 ml 1n HCl (0,50 mmol/l) 0,032 g/l CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O (0,216 mmol/l) 0,128 g/l MaCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O (0,630 mmol/l) 5,0 g/l NH <sub>4</sub> Cl (0,267 mmol/l) 3,581 g/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12H <sub>2</sub> O (10 mmol/l) 1,380 g/l NaH <sub>2</sub> PO x H <sub>2</sub> O (10 mmol/l) 8,225 g/l NaHCO <sub>3</sub> (97,90 mmol/l) ad. Aq. bidest. auf 1.000 ml pH 7,4; Osm 293
Silbernitratlösung	0,5 g AgNO <sub>3</sub> 0,75 ml 37 % Formaldehydlösung 500 ml Aq. bidest.
SSCP-Ladepuffer	950 µl Formamid 95 % 10 µl NaOH 1M 0,025 % Bromphenolblau
X-Gal Gebrauchslösung	80 mg X-Gal gelöst in 2 ml N,N-Dimethylformamid

**Chemikalien**

Die verwendeten Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

**Sigma-Aldrich Chemie GmbH**, Taufkirchen, Deutschland

**Merck KGaA**, Darmstadt, Deutschland

**Carl Roth GmbH & Co. KG**, Karlsruhe, Deutschland

**Omnilab-Laborzentrum GmbH & Co. KG**, Gehrden, Deutschland

**Serva Electrophoresis GmbH**, Heidelberg, Deutschland

**Invitrogen GmbH**, Karlsruhe, Deutschland

## 7 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei all denen bedanken, die es mir in den vergangenen Jahren auf ganz unterschiedlichen Wegen ermöglicht haben, diese Arbeit entstehen zu lassen.

Mein ganz besonderer Dank geht an Prof. Dr. Gerhard Breves, der mir die Möglichkeit der Anfertigung dieser Arbeit durch die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Überlassung dieser interessanten Thematik ermöglicht hat. Sowie Prof. Dr. Hans-Jörg Jacobsen für die Übernahme des Korreferates und die viele hilfreichen Gedankenanstöße. Und nicht zuletzt PD Dr. Korinna Huber für eine ausgezeichnete Betreuung, die durch eine immergewährte persönliche Unterstützung bei den vielfältigsten Fragen und für unzählige hilfreiche Diskussionen und Anregungen, sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Weiterhin danke ich PD Dr. Christoph Tebbe für die Möglichkeit, die SSCP-Technik sowie das Sequenzieren in seiner Arbeitsgruppe zu erlernen und den mir gewährten Freiraum während dieser Zeit. Sowie Dr. Egbert Strobel für die hervorragende Einweisung in die Kunst der Erstellung von SSCP-Gelen und die vielen hilfreichen praktischen Tipps. Für die herzliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe sowie die exzellente fachliche und persönliche Betreuung während meines Stipendium-Aufenthaltes an der Universität Leeds danke ich Prof. Dr. John Heritage.

Der Schaumann Stiftung bin ich zu großem Dank verpflichtet. Durch Ihre großzügige finanzielle Unterstützung konnte ein Grossteil der Gedanken erst in die Tat umgesetzt werden.

Gerlinde Becker, Ulrike Dringenberg, Kathrin Hansen, Karin Hustedt, Bärbel Leppich und ganz besonders Marion Burmester gebührt mein Dank, für die tatkräftige Unterstützung im Labor, das geduldige Erklären von wahrscheinlichen immer wiederkehrenden Fragen und die vielen netten persönlichen Gespräche.

Yvonne Armbrecht und Michael Rohde danke ich für die hilfreiche Unterstützung der vielen Pansensaftentnahme sowie die tägliche Kaffeeversorgung während der RUSITEC-Versuche.

Vielen Dank an meine Mitdoktoranden und alle Mitarbeiter des Physiologischen Institutes für die nette Zusammenarbeit und Unterstützung.

Besonders danke ich euch: Sandra, Johanna, Nina, Sabine und Diana für die vielen gemeinsamen Stunden durch die Höhen und Tiefen des Wissenschaftsalltags, die gemeinsamen Treffen außerhalb der Arbeitszeit, die abwechslungsreichen Tee- und Kaffeepausen und für eure Freundschaft.

Meiner Familie danke ich für ein immer offenes Ohr, die vielen aufmunternden Worte und ihre immerwährende Unterstützung. Ganz besonders aber danke ich Dir Sina. Danke, für Deine unendliche Geduld und dafür, dass Du immer für mich da bist. Ich weiß, wie wenig von alledem selbstverständlich ist.

## 8 Lebenslauf

Melanie Koch

Geburtsdatum: 05.05.1974 in Alfeld  
Staatsangehörigkeit: Deutsch

### Schulbildung

1980 - 1984 Grundschole Limmer  
1984 - 1991 Jugenddorf-Christophorus-Schole Elze  
1991 - 1994 Michelsenschule Hildesheim  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

### Ausbildung

1994 – 1997 Diätschole der Medizinischen Hochschule Hannover  
Abschluss: Staatlich anerkannte Diätassistentin

### Hochschulstudium

1997 - 2002 Studium der Biologie  
an der Georg-August Universität Göttingen  
05/2002 -12/2002 Diplomarbeit am Max-Planck Institut für Experimentelle Medizin  
Thema: Modulation emotionalen Verhaltens und autonomer  
Funktion bei Mäusen durch Serotonin-Rezeptoren vom Subtyp  $2_{A/C}$   
02/2003 Abschluss: Dipl.-Biologin

### Praktische Tätigkeiten

05/2000 - 04/2003 wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Abteilung Molekulare  
Neuroendokrinologie am Max-Planck Institut für Experimentelle  
Medizin in Göttingen  
05/2004 – 08/2004 School of Biochemistry and Microbiology University of Leeds  
Mitarbeit als wissenschaftliche Angestellte an dem Projekt  
„Examination of potential for gene flow from bacteria in rumen  
fluid“ gefördert durch ein Marie-Curie-Stipendium

### Berufstätigkeit

seit 05/2003 Promotion bei Prof. Dr. Gerhard Breves  
Physiologie und Ernährungsphysiologie  
Abteilung: Molekulare Veterinärphysiologie  
am Physiologischen Institut der Tierärztlichen Hochschule Hannover