

Aus dem Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften
(Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. R. Jahn)

der Naturwissenschaftlichen Fakultät III
(Dekan: Prof. Dr. habil. P. Wycisk)

der
Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg

**„Molekularbiologische Untersuchungen zum Einfluss
der Grobfutterquelle und Futterpartikelgröße
auf die ruminale Mikroorganismengemeinschaft *in vitro*“**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor agriculturarum (Dr.agr.)

vorgelegt von
Diplomagraringenieurin Maren Witzig
geb. am 03.01.1981 in Halle/Saale

Gutachter: Prof. Dr. habil. M. Rodehutschord

Prof. Dr. habil. H.H. Swalve

Prof. Dr. H. Harms

Verteidigung am: 29.06.2009

Halle/Saale 2009

Mit dankenswerter Unterstützung der
Graduiertenförderung des Landes Sachsen-Anhalt

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Texttabellen	III
Verzeichnis der Anhangstabellen.....	V
Verzeichnis der Textabbildungen	VII
Verzeichnis der Anhangsabbildungen	XI
Abkürzungsverzeichnis	XII
1. Einleitung, Hintergrund und Zielstellung.....	1
2. Herkunft der Mikroorganismenproben für die eigenen Untersuchungen.....	12
2.1 <i>In vitro</i> Versuche zur Pansensimulation.....	12
2.2 Futtermittel	14
3. Qualitative Untersuchungen – Analyse von	
 Einzelstrangkonnformationspolymorphismen (SSCP)	18
3.1 Material und Methoden	18
3.1.1 Versuchsdurchführung, Probengewinnung und -aufbereitung.....	18
3.1.2 Extraktion mikrobieller DNA.....	19
3.1.3 PCR für Teilsequenzen der 16S rDNA.....	20
3.1.4 Aufreinigung der PCR-Produkte	24
3.1.5 Exonucleaseverdau und Denaturierung.....	24
3.1.6 Polyacrylamid-Gelelektrophorese	25
3.1.7 Extraktion von 16S rDNA-Fragmenten aus silbergefärbten	
SSCP-Gelen.....	27
3.1.8 Reamplifikation und Klonierung.....	29
3.1.9 Restriktionsanalyse klonierter 16S rDNA-Fragmente (ARDRA).....	31
3.1.10 Sequenzierung	33
3.1.11 Auswertung.....	34
3.2 Ergebnisse.....	39
3.2.1 Optimierung der Temperaturführung für die Gelelektrophorese	40
3.2.2 Vergleichende Sequenzanalyse für Misch- und Einzelproben.....	41
3.2.3 Gruppenspezifische SSCP-Profile.....	45
3.2.4 Sequenzanalyse ausgewählter 16S rDNA-Amplifikate.....	53
3.3 Diskussion	66
3.3.1 Methode	66
3.3.2 Einfluss der Futterpartikelgröße sowie des Mais- und Grassilage-	
anteils im Futter auf die gruppenspezifischen SSCP-Profile.....	74
3.3.3 Sequenzanalyse.....	86

4. Quantitative Untersuchungen – Real-time quantitative PCR und Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung	96
4.1 Real-time quantitative PCR	96
4.1.1 Material und Methoden	96
4.1.1.1 Probengewinnung und –aufbereitung	96
4.1.1.2 PCR.....	97
4.1.1.3 Auswertung.....	101
4.1.2 Ergebnisse.....	102
4.1.3 Diskussion	107
4.2 Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung.....	118
4.2.1 Material und Methoden	118
4.2.1.1 Versuchsdurchführung.....	118
4.2.1.2 Probengewinnung und -aufbereitung.....	118
4.2.1.3 Permeabilisierung der Zellen.....	119
4.2.1.4 Hybridisierung.....	120
4.2.1.5 Mikroskopie und bildanalytische Auswertung	123
4.2.2 Ergebnisse.....	124
4.2.3 Diskussion	131
5. Schlussbetrachtung und Ausblick.....	143
Zusammenfassung	148
Summary	151
Literaturverzeichnis	154
Anhang.....	173

Verzeichnis der Texttabellen

Tabelle 1: Zusammensetzung der Futtermischungen ¹ (in % der T)	15
Tabelle 2: T-Gehalte ¹ , analysierte Rohnährstoffe sowie Gehalte an NDF und ADF in den Futtermischungen I, III und V, Analyse für den ersten Versuch.....	16
Tabelle 3: T-Gehalte ¹ , analysierte Rohnährstoffe und Gehalte an NDF und ADF für die Futtermischungen I-V sowie deren Einzelkomponenten, Analyse für den zweiten Versuch)	16
Tabelle 4: Übersicht der gruppenspezifischen Primerpaare zur Amplifikation von Teilsequenzen des 16S rRNA-Gens	21
Tabelle 5: Reaktionsansätze und PCR-Bedingungen für die gruppenspezifischen PCR.....	22
Tabelle 6: Übersicht der Primerpaare für die nested PCR.....	23
Tabelle 7: Reaktionsansätze und PCR-Bedingungen für die nested PCR.....	23
Tabelle 8: Zusammensetzung eines 0,6 × MDE-Polyacrylamidgels	25
Tabelle 9: Reaktionsansätze für die Reamplifikation der 16S rDNA-Fragmente aus den SSCP-Banden	29
Tabelle 10: Sequenzen der M13-Primer sowie Reaktionsansatz und PCR-Bedingungen für die M13-PCR.....	32
Tabelle 11: Reaktionsansatz und PCR-Bedingungen für die Sequenzierung.....	34
Tabelle 12: RDP-Resultate für die vergleichende Sequenzanalyse von Klonen aus den Banden 1-4 des <i>Fibrobacter</i> -spezifischen SSCP-Gels	44
Tabelle 13: RDP-Resultate für Sequenzen von spezifisch (behandlungsabhängig) aufgetretenen Klonen aus den SSCP-Banden 6, 7, 8 und 14 des <i>Clostridia</i> - spezifischen SSCP-Gels	56
Tabelle 14: RDP-Resultate für Sequenzen von spezifisch (behandlungsabhängig) aufgetretenen Klonen aus den SSCP-Banden 1, 3, 4, 5, 6, 13, 14 und 15 des <i>Bacteroides-Prevotella</i> -spezifischen SSCP-Gels.....	61
Tabelle 15: RDP-Resultate für Sequenzen von spezifisch (behandlungsabhängig) aufgetretenen Klonen aus den SSCP-Banden 2, 5, 6 und 7 des <i>Archaea</i> - spezifischen SSCP-Gels	65
Tabelle 16: Primerkombinationen zur Amplifikation von Teilsequenzen des 16S rRNA-Gens von <i>Ruminococcus albus</i> und <i>Prevotella bryantii</i> in der Real-time qPCR.....	98
Tabelle 17: Reaktionsansatz und PCR-Bedingungen für die Real-time qPCR von <i>Ruminococcus albus</i> und <i>Prevotella bryantii</i>	99

Tabelle 18: Auswahl von <i>in vivo</i> Untersuchungen, in denen <u>kein</u> Einfluss der verwendeten Ration auf die Abundanz von <i>Ruminococcus albus</i> nachgewiesen wurde	114
Tabelle 19: Sequenzen der im Rahmen dieser Arbeit für die FISH verwendeten DNA-Oligonukleotidsonden	121
Tabelle 20: Zusammensetzung von 20 ml Hybridisierungs- und 50 ml Waschpuffer für die FISH in Abhängigkeit von der verwendeten Formamidkonzentration.....	122
Tabelle 21: Prozentualer Anteil der 16S rDNA-Sequenzen in Klonbanken, die den <i>Firmicutes</i> , den <i>Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides</i> (CFB) sowie den <i>Proteobacteria</i> zuzuordnen sind und aus der flüssigen Phase des Pansens von Rindern stammen (ergänzt nach Firkins und Yu, 2006).....	140

Verzeichnis der Anhangstabellen

Tabelle A1: Zusammensetzung der Pufferlösung für die Pansensimulation (in Anlehnung an McDougall, 1948)	173
Tabelle A2: Verdaulichkeit der Rohnährstoffe und berechnete Energiegehalte in den Futtermischungen (MW, s; n = 4).....	173
Tabelle A3: Sequenzen der von Lieber et al. (2003) nach Schwieger und Tebbe (1998) modifizierten Com-Primer sowie die entsprechenden Reaktionsansätze und PCR-Bedingungen für die Amplifikation von Teilsequenzen der 16S rDNA aus Mikroorganismen des Pansens	174
Tabelle A4: Protokoll für die Silberfärbung der SSCP-Gele (in Anlehnung an Bassam et al., 1991)	175
Tabelle A5: Sequenzen der im Vorversuch verwendeten <i>Fibrobacter</i> -Primer sowie die Reaktionsansätze und PCR-Bedingungen für die gruppenspezifische und die nested PCR	176
Tabelle A6: Reaktionsansätze und PCR-Programme für die klassische PCR von <i>Ruminococcus albus</i> und <i>Prevotella bryantii</i> zur Überprüfung der Primerspezifität.....	177
Tabelle A7: 16S rRNA-Teilsequenzen der analysierten Klone aus den zur Extraktion gewählten DNA-Banden des <i>Fibrobacter</i> -spezifischen SSCP-Profil	178
Tabelle A8: 16S rRNA-Teilsequenzen der analysierten Klone aus den zur Extraktion gewählten DNA-Banden der <i>Clostridia</i> -, <i>Bacteroides</i> - <i>Prevotella</i> - und <i>Archaea</i> -spezifischen SSCP-Profil	182
Tabelle A9: Ausgewählte RDP-Resultate für Sequenzen von unspezifisch (behandlungsunabhängig) aufgetretenen Klonen in den SSCP-Banden des <i>Clostridia</i> -spezifischen SSCP-Gels	219
Tabelle A10: Ausgewählte RDP-Resultate für Sequenzen von unspezifisch (behandlungsunabhängig) aufgetretenen Klonen in den SSCP-Banden des <i>Bacteroidetes</i> - <i>Prevotella</i> -spezifischen SSCP-Gels	223
Tabelle A11: Ausgewählte RDP-Resultate für Sequenzen von unspezifisch (behandlungsunabhängig) aufgetretenen Klonen in den SSCP-Banden des <i>Archaea</i> -spezifischen SSCP-Gels	227
Tabelle A12: Ermittelte C _T -Werte (<i>Threshold</i> -Cycle) während der Real-time qPCR für <i>Ruminococcus albus</i> und <i>Prevotella bryantii</i> zur Bestimmung der Reaktionseffizienz	230

Tabelle A13: Ermittelte C_T -Werte (<i>Threshold-Cycle</i>) aus der Real-time qPCR für <i>Ruminococcus albus</i> und <i>Prevotella bryantii</i>	232
Tabelle A14: Detektierte Anzahl DAPI-gefärbter und hybridisierter Zellen je Bild für die Proben aus den Fermentern (EUB 338 I-III: <i>Eubacteria</i> , ARCH 915: <i>Archaea</i> , LGC 354 A-C: <i>Firmicutes</i> , BAC 303: <i>Bacteroides-Prevotella</i> , DELTA 495a: <i>Deltaproteobacteria</i> , F. succ.: <i>Fibrobacter succinogenes</i> , BET 42a: <i>Betaproteobacteria</i> , GAM 42a: <i>Gammaproteobacteria</i> , MB 1174: <i>Methanobacteriaceae</i>).....	235
Tabelle A15: Detektierte Anzahl DAPI-gefärbter und hybridisierter Zellen je Bild für die Proben aus den Überläufen (EUB 338 I-III: <i>Eubacteria</i> , ARCH 915: <i>Archaea</i> , LGC 354 A-C: <i>Firmicutes</i> , BAC 303: <i>Bacteroides-Prevotella</i> , DELTA 495a: <i>Deltaproteobacteria</i> , F. succ.: <i>Fibrobacter succinogenes</i> , BET 42a: <i>Betaproteobacteria</i> , GAM 42a: <i>Gammaproteobacteria</i> , MB 1174: <i>Methanobacteriaceae</i>).....	237

Verzeichnis der Textabbildungen

- Abbildung 1:** Schematische Darstellung einer Fermentereinheit im semi-kontinuierlichen Pansensimulationssystem (modifiziert nach Czerkawski und Breckenridge, 1977)13
- Abbildung 2:** Temperaturabhängige Auftrennung einzelsträngiger 16S rDNA-Fragmente (V4V5) im Polyacrylamidgel: SSCP-Profile für ein DNA-Extrakt aus Mikroorganismen, die direkt aus dem Pansen der Spendertiere gewonnen wurden40
- Abbildung 3:** *Fibrobacter*-spezifische SSCP-Profile für Misch- und Einzelproben extrahierter DNA aus Mikroorganismen, die im Rahmen einer Pansensimulation aus den Überläufen der drei Wiederholungen für ein zu prüfendes Futter gewonnen wurden, S: Speziessstandard, a-c: Einzelproben, m: Mischprobe, 1-4: zur Sequenzanalyse gewählte SSCP-Banden41
- Abbildung 4:** *Clostridia*-spezifische SSCP-Profile amplifizierter 16S rDNA-Fragmente von Mikroorganismen, die aus den Überlaufproben der Pansensimulation zur Prüfung des Einflusses von Futtermischung (I, III, V) und Futterpartikelgröße (1 und 4 mm) gewonnen wurden, S: Speziessstandard, a-c: Wiederholungen einer Behandlung = Einzelproben, m: Mischprobe einer Behandlung.....46
- Abbildung 5:** NMDS-Plots für das *Clostridia*-spezifische SSCP-Gel basierend auf der Jaccard-Distanz (○: Futtermischung I, ◇: Futtermischung III, ▽: Futtermischung V, weiß: 1 mm, schwarz: 4 mm), links: Einbeziehung aller SSCP-Profile; rechts: Ausschluss der Mischproben (m) zur *post hoc* Vektoranpassung verschiedener Umweltvariablen über die drei unabhängigen Wiederholungen (a-c) jeder Behandlung47
- Abbildung 6:** *Bacteroides-Prevotella*-spezifische SSCP-Profil amplifizierter 16S rDNA-Fragmente von Mikroorganismen, die aus den Überlaufproben der Pansensimulation zur Prüfung des Einflusses von Futtermischung (I, III, V) und Futterpartikelgröße (1 und 4 mm) gewonnen wurden, S: Speziessstandard, a-c: Wiederholungen einer Behandlung = Einzelproben, m: Mischprobe einer Behandlung49
- Abbildung 7:** NMDS-Plots für das *Bacteroides-Prevotella*-spezifische SSCP-Gel basierend auf der Jaccard-Distanz (○: Futtermischung I, ◇: Futtermischung III, ▽: Futtermischung V, weiß: 1 mm, schwarz: 4 mm), oben: Einbeziehung aller

SSCP-Profile; unten: Ausschluss der Mischproben (m) zur <i>post hoc</i>	
Vektoranpassung verschiedener Umweltvariablen über die drei unabhängigen	
Wiederholungen (a-c) jeder Behandlung.....	50
Abbildung 8: <i>Archaea</i> -spezifische SSCP-Profile amplifizierter 16S rDNA-Fragmente	
von Mikroorganismen, die aus den Überlaufproben der Pansensimulation zur	
Prüfung des Einflusses von Futtermischung (I, III, V) und Futterpartikelgröße	
(1 und 4 mm) gewonnen wurden, S: Speziessstandard, a-c: Wiederholungen einer	
Behandlung = Einzelproben, m: Mischprobe einer Behandlung.....	51
Abbildung 9: NMDS-Plots für das <i>Archaea</i> -spezifische SSCP-Gel basierend auf der	
Jaccard-Distanz (○: Futtermischung I, ◇: Futtermischung III, ▽: Futtermischung V,	
weiß: 1 mm, schwarz: 4 mm), links: Einbeziehung aller SSCP-Profile; rechts:	
Ausschluss der Mischproben (m) zur <i>post hoc</i> Vektoranpassung verschiedener	
Umweltvariablen über die drei unabhängigen Wiederholungen (a-c) jeder	
Behandlung.....	52
Abbildung 10: Phylogenetische Einordnung des zu den <i>Bacteroidales</i> zählenden Klons	
aus Bande 4 der <i>Bacteroides-Prevotella</i> -spezifischen SSCP-Profile. Die Position der	
ermittelten partiellen 16S rRNA-Sequenz im Stammbaum wurde unter Verwendung	
der ARB-Software nach der Maximum Parsimony-Methode berechnet. Die nächsten	
Verwandten sind einschließlich ihrer GenBank Accession Nummer angegeben. Der	
Maßbalken kennzeichnet 10 % Sequenzdivergenz	58
Abbildung 11: Phylogenetische Einordnung der zum Genus <i>Prevotella</i> zählenden	
Klone aus den Banden 8, 10 und 15 der <i>Bacteroides-Prevotella</i> -spezifischen	
SSCP-Profile. Die Positionen der ermittelten partiellen 16S rRNA-Sequenzen im	
Stammbaum wurden unter Verwendung der ARB-Software nach der Maximum	
Parsimony-Methode berechnet. Die nächsten Verwandten sind einschließlich ihrer	
GenBank Accession Nummer angegeben. Der Maßbalken kennzeichnet 10 %	
Sequenzdivergenz.....	59
Abbildung 12: Phylogenetische Einordnung der zur Klasse der <i>Methanobacteria</i>	
zählenden Klone aus den Banden 5 und 6 der <i>Archaea</i> -spezifischen SSCP-Profile.	
Die Positionen der ermittelten partiellen 16S rRNA-Sequenzen im Stammbaum	
wurden unter Verwendung der ARB-Software nach der Maximum Parsimony-	
Methode berechnet. Die nächsten Verwandten sind einschließlich ihrer GenBank	
Accession Nummer angegeben. Der Maßbalken kennzeichnet 10 %	
Sequenzdivergenz.....	64
Abbildung 13: Überprüfung der DNA-Extraktion im 0,8%igen Agarosegel,	
hochmolekulare DNA aus den Mikroorganismen der Überlaufproben	

(a-c: Wiederholungen je Behandlung, G: DNA-Größenstandard)	66
Abbildung 14: Exemplarische Darstellung von PCR-Produkten, die unter Verwendung der <i>Archaea</i> -spezifischen Primer für die Futtermischungen I, III und V der 4-mm-Variante erhalten wurden, G: DNA-Größenstandard, a-c: Wiederholungen einer Behandlung = Einzelproben, m: Mischprobe der jeweiligen Behandlung	67
Abbildung 15: SSCP-Profile amplifizierter 16S rDNA-Fragmente von Mikroorganismen, die direkt aus dem Pansensaft der Spendertiere gewonnen wurden, ausschließlicher Einsatz universeller Com-Primer, S: Speziesstandard, a-d: SSCP-Profile für PCR-Produkte aus DNA, die wiederholt aus derselben Pansensaftprobe extrahiert wurde.....	70
Abbildung 16: Exemplarische Darstellung des Effekts der jeweiligen Behandlung bzw. der für den Einzelstrangverdau eingesetzten DNA-Menge (ng) auf die <i>Bacteroides-Prevotella</i> -spezifischen SSCP-Profile, roter Pfeil: Bande, die nur in einem der beiden Profile zu detektieren war	76
Abbildung 17: Ermittlung der PCR-Effizienz (E) für die <i>R. albus</i> - und <i>P. bryantii</i> -spezifischen Primer sowie für die Mischproben von DNA, die für die Futtermischungen I, III und V der Futterpartikelgröße 1 mm erstellt wurden	104
Abbildung 18: Relative Häufigkeit der 16S rDNA von <i>R. albus</i> in Abhängigkeit der Futterpartikelgröße sowie des Mais- und Grassilageanteils im Futter (MW, s, n ≤ 3)	106
Abbildung 19: Relative Häufigkeit der 16S rDNA von <i>P. bryantii</i> in Abhängigkeit der Futterpartikelgröße sowie des Mais- und Grassilageanteils im Futter (MW, s, n ≤ 3); unterschiedliche Hochbuchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$)	107
Abbildung 20: Relative Häufigkeit der 16S rDNA von <i>R. albus</i> und <i>P. bryantii</i> in Abhängigkeit der Futterpartikelgröße sowie des Mais- und Grassilageanteils im Futter nach Effizienzkorrektur (MW, s, n ≤ 3); unterschiedliche Hochbuchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$)	110
Abbildung 21: Mittlere Anzahl DAPI-gefärbter Zellen je Aufnahme, die im Rahmen der Hybridisierung mit den Sonden EUB I-III, ARCH 915 und MB 1174 detektiert wurde (MW, s, n = 21), SES: Zellzahl je Bild um die geringere abfiltrierte Kulturmenge korrigiert	125
Abbildung 22: Prozentualer Anteil der mit den FISH-Sonden EUB I-III und ARCH 915 hybridisierten Zellen an den mit DAPI gefärbten Zellen (MW, s, n = 7)	126
Abbildung 23: Anteil der mit den FISH-Sonden LGC 354 A-C, BAC 303,	

DELTA 495a und F. succ. hybridisierten Zellen bezogen auf die Anzahl EUB-hybridisierbarer Zellen in den Proben (MW, s, $8 \geq n \geq 7$)	127
Abbildung 24: Anteil der mit den FISH-Sonden BET 42a und GAM 42a hybridisierten Zellen bezogen auf die Anzahl EUB-hybridisierbarer Zellen in den Proben (MW, s, $10 \geq n \geq 7$)	128
Abbildung 25: Anteil der mit der FISH-Sonde MB 1174 hybridisierten Zellen bezogen auf die Anzahl ARCH-hybridisierbarer Zellen in den Proben (MW, s, $n = 7$)	129
Abbildung 26: Beobachtete Zellpakete in den Fermenterproben für die Futtermischungen I-V sowie die Einzelfuttermittel, Beispielaufnahmen zur FISH der <i>Methanobacteriaceae</i> (blau: DAPI-gefärbte Zellen; rot: mit Sonde MB 1174 hybridisierte Zellen)	130
Abbildung 27: Überlagerung des Fluoreszenzsignals benachbarter, hybridisierter Zellen, links: DAPI-gefärbte und Cy3-markierte Zellen; rechts: DAPI-gefärbte Zellen nach Rot/Grün/Blau-Splittung mittels „ImageJ“ (v.1.4.3.67)	133
Abbildung 28: Anteil der mit den FISH-Sonden LGC 354 A-C, BAC 303, DELTA 495a, F. succ., BET 42a und GAM 42a hybridisierten Zellen bezogen auf die Anzahl DAPI-gefärbter Zellen in den Proben (MW, s, $10 \geq n \geq 7$)	134
Abbildung 29: Anteil der mit der FISH-Sonde MB 1174 hybridisierten Zellen bezogen auf die Anzahl ARCH-hybridisierbarer (oben) bzw. DAPI-gefärbter (unten) Zellen in den Proben (MW, s, $n = 7$)	134

Verzeichnis der Anhangsabbildungen

Abbildung A1: Schmelzkurvenanalyse zur Überprüfung der Produkte aus der Real-time qPCR zur Effizienzbestimmung der Reaktion für <i>Ruminococcus albus</i>	231
Abbildung A2: Schmelzkurvenanalyse zur Überprüfung der Produkte aus der Real-time qPCR zur Effizienzbestimmung der Reaktion für <i>Prevotella bryantii</i>	231
Abbildung A3: Schmelzkurvenanalyse zur Überprüfung der Produkte aus der Real-time qPCR für <i>Ruminococcus albus</i>	234
Abbildung A4: Schmelzkurvenanalyse zur Überprüfung der Produkte aus der Real-time qPCR für <i>Prevotella bryantii</i>	234

Abkürzungsverzeichnis

Neben den Abkürzungen für die Einheiten des internationalen Einheitensystems und den Symbolen für chemische Elemente und Verbindungen sowie denen aus den Richtlinien zur deutschen Rechtschreibung wurden folgende Abkürzungen verwendet:

ADF	Säure-Detergenzien-Faser
ARDRA	Restriktionsanalyse amplifizierter 16S rDNA
Bidest	bidestilliertes Wasser
bp	Basenpaar
CFB	<i>Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides</i>
C _T	<i>Threshold-Cycle</i>
Cy3	Carbocyanin 3
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
DGGE	denaturierende Gradientengelelektrophorese
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
f	vorwärts
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
G	DNA-Größenstandard
× g	Vielfaches der mittleren Erdschwerebeschleunigung
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalacto-pyranosid
kb	kilo-Basenpaar
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
m	Mischprobe
MANOVA	Multivariate Varianzanalyse
MDE	Mutation Detection Enhancement [®] Gel Solution
MW	Mittelwert
NDF	Neutral-Detergenzien-Faser
NEL	Nettoenergie Laktation
NMDS	nichtmetrische multidimensionale Skalierung
OD	optische Dichte
p	Irrtumswahrscheinlichkeit

PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
qPCR	quantitative PCR
R	rückwärts
RDP	Ribosomal Database Project
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
s	Standardabweichung
S	Speziessstandard
S _{ab} score	Ähnlichkeitswert der RDP-Datenbank
SES	Sojaextraktionsschrot
SSCP	Einzelstrangkonformationspolymorphismus
T	Trockensubstanz
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TGGE	Temperaturgradientengelelektrophorese
TMR	totale Mischration
UFZ	Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung
VDLUFA	Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten
XA	Rohasche
XF	Rohfaser
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid
XL	Rohfett
XP	Rohprotein

1. Einleitung, Hintergrund und Zielstellung

Mikroorganismen besiedeln alle erdenklichen Lebensräume auf der Erde und weisen eine enorme genetische sowie metabolische Vielfalt auf. Ihre weitreichende Enzymausstattung erlaubt ihnen den Abbau verschiedener organischer Verbindungen zu Monomeren und Elementen sowie deren Nutzung zur Energiegewinnung und mikrobiellen Synthese. In biologischen Stoffkreisläufen sind sie daher häufig von zentraler Bedeutung (Giesecke, 1973). So auch im Vormagensystem, insbesondere im Pansen des Wiederkäuers, mit dem sie in einzigartiger Symbiose leben. Trotz seiner herbivoren Ernährungsweise ist der Wiederkäuer ebenso wie das monogastrische Tier nicht in der Lage, eigens Enzyme zu synthetisieren, die ihn zur Spaltung β -1,4-glycosidischer Bindungen in pflanzlichen Nichtstärke-Polysacchariden befähigen. Dennoch kann er diese zur Energiegewinnung nutzen, da die symbiotisch im Pansen lebenden Mikroorganismen über ein breites Spektrum an Enzymen verfügen, die nicht nur den Aufschluss von Stärke sondern auch von anderen Polysacchariden wie Cellulose, Hemicellulosen und Pektinen ermöglichen. Hierbei freiwerdende Monosaccharide unterliegen einer Verstoffwechslung zu kurzkettigen Fettsäuren, die anschließend vom Tier über die Pansenwand absorbiert und energetisch verwertet werden. Darüber hinaus bauen die Mikroorganismen im Pansen einen Großteil des mit dem Futter zugeführten Proteins zu Peptiden, Aminosäuren und Ammoniak ab. Diese können anschließend zur mikrobiellen Neusynthese genutzt werden, die u.a. die Bildung verschiedener Vitamine mit sich bringt. Nach Abfluss der Mikroorganismen aus dem Vormagensystem stehen diese dem Tier zur weiteren Verdauung und damit als Protein- bzw. Aminosäuren- sowie Vitaminquelle zur Verfügung.

Im Gegenzug bietet der Wiederkäuer den Mikroorganismen im Pansen relativ stabile Umweltbedingungen. Kennzeichnend sind geringe Temperaturschwankungen in einem Bereich von 38-41°C, ein weitgehend anaerobes Milieu, eine Regulierung des pH-Wertes durch die Pufferkapazität des Speichels sowie ein fortwährender Abtransport hemmender Stoffwechselprodukte des mikrobiellen Stoffumsatzes. Über die Futteraufnahme (pflanzliches Material), den Speichel (Phosphat, Bicarbonat) und die Pansenwand (Harnstoff) sorgt das Tier darüber hinaus für einen ständigen Zufluss von Nährstoffen (Mackie et al., 2001, Dehority, 2003). Durch regelmäßiges Wiederkäuen wird das Futter zerkleinert und die angreifbare Oberfläche des pflanzlichen Materials für die Mikroorganismen vergrößert. Außerdem erfolgt hierbei deren intensive

Einarbeitung in die Futterpartikel. Kontraktionen der Pansenmuskulatur sorgen darüber hinaus für eine ständige Durchmischung der Digesta bzw. der festen und flüssigen Phase (Hobson, 1997).

Mikroorganismen im Pansen

Aufgrund der Heterogenität der durch das Futter bereitgestellten Substrate bietet der Pansen eine Vielzahl ökologischer Nischen, die Raum zur Entwicklung verschiedener Spezies und deren Interaktion ermöglichen. Die biochemischen Reaktionen im Pansen sind folglich komplexer Natur und beinhalten gemeinschaftliche Aktivitäten einer Vielzahl von Mikroorganismen (Madigan und Martink, 2006), die zum Teil verschiedene Kompartimente des Pansens besiedeln. Neben partikelassoziierten finden sich flüssigkeits- und pansenwandassoziierte sowie lose an Futterpartikeln haftende Spezies (Cheng und McAllister, 1997).

Zu den im Pansen des Wiederkäuers vorkommenden Mikroorganismen gehören in erster Linie Bakterien, Archaeen, Protozoen und Pilze, wobei erstere mit bis zu 10^{11} Zellen/g Panseninhalt zahlenmäßig überlegen sind. Protozoen und Pilze sind dagegen weniger häufig anzutreffen (10^4 - 10^6 und 10^2 - 10^4 je g Panseninhalt) (Mackie et al., 2001).

Unter den im Pansen lebenden Bakterien finden sich vor allem anaerobe Spezies, deren Substratspezifität zum Teil beachtlich variiert (Stewart et al., 1997). Während einige Spezies vorwiegend auf Stärke und Zucker zurückgreifen, sind andere zum Abbau von Cellulose, Hemicellulosen und Pektinen fähig. Darüber hinaus lassen sich proteolytisch sowie lipolytisch aktive Arten finden. Andere haben sich dagegen auf pflanzliche Sekundärmetabolite wie Oxalate spezialisiert oder nutzen Fermentationsprodukte wie Succinat und Lactat zur Energiegewinnung (Madigan und Martinko, 2006). Neben ausgesprochenen Spezialisten treten auch etliche Generalisten auf, die sowohl zum Abbau verschiedener Polysaccharide als auch Proteine fähig sind (Stewart et al., 1997). Der Großteil bisher im Pansen nachgewiesener Bakterienspezies stammt aus den Phyla *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Fibrobacteres* und *Actinobacteria*. Darüber hinaus finden sich aber auch Spezies aus 12 weiteren Phyla der *Bacteria* (RDP-Datenbank, Ribosomal Database Project II, v.10.2, Cole et al. 2007).

Die den Pansen besiedelnden Archaeen gehören überwiegend den methanogenen *Euryarchaeota* an (Janssen und Kirs, 2008). Zur Energiegewinnung greifen diese

Organismen lediglich auf Abbauprodukte der mikrobiellen Fermentation zurück. Die Bildung von Methan, das zentraler Bestandteil ihres Energiemetabolismus ist, kann beispielsweise aus Kohlendioxid und Wasserstoff erfolgen (Madigan und Martinko, 2006).

Die Protozoenfauna im Pansen umfasst vorwiegend Ciliaten (Dehority, 2003). Diese sind sowohl am Abbau der Strukturkohlenhydrate als auch Stärke im Pansen beteiligt. Um ihren Bedarf an Aminosäuren und Stickstoff decken zu können, verdauen sie Futterprotein und Bakterien. Daher wird den Protozoen auch eine regulierende Funktion im Hinblick auf die Bakteriendichte im Pansen zugeschrieben (Williams und Coleman, 1997).

Ebenso wie Bakterien und Protozoen haben auch die im Pansen lebenden Pilze Anteil am Abbau verschiedener Kohlenhydrate und Proteine aus dem Futter. Da sie in der Lage sind, mit Hilfe ihrer Rhizoide pflanzliche Gewebe hohen Ligninanteils mechanisch zu penetrieren, wird vermutet, dass sie den Abbau der Strukturkohlenhydrate auch für andere Mikroorganismen im System erleichtern (Akin et al., 1989, Dehority, 1993).

Wechselwirkungen zwischen den Mikroorganismen können synergistischer oder kompetitiver Natur sein (Dehority, 2003). So profitieren beispielsweise nicht-cellulolytisch aktive Spezies von Cellodextrinen, die von cellulolytischen Spezies freigesetzt werden (Russell, 1985). Methanogene *Archaea* nutzen Abbauprodukte der Kohlenhydrat-vergärenden Spezies (Russell und Wallace, 1997, Wolin et al., 1997). Außerdem stellen einige Bakterien für andere Spezies Proliferanten von Wachstumsfaktoren wie etwa Vitaminen und Aminosäuren dar (Miura et al., 1980, Wallace, 1985, Williams et al., 1994). Konkurrenz um Nahrung kann dagegen zur Produktion Bakteriozin-ähnlicher Substanzen führen, die auf andere Spezies inhibierend wirken (Odenyo et al., 1994, Chen et al., 2004). Als negative Interaktion kann auch die Räuber-Beute-Beziehung zwischen Protozoen und Bakterien gedeutet werden (Williams und Coleman, 1997, Dehority, 2003).

Einfluss des Futters auf die mikrobielle Gemeinschaft im Pansen

Allgemein anerkannt ist, dass die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft im Pansen maßgeblich durch die an das Tier verfütterte Ration bestimmt wird (Dehority und Orpin, 1997). Ursache hierfür sind die genannte unterschiedliche Enzymausstattung

und die damit variierende Substratspezifität der vorkommenden Mikroorganismen (Stewart et al., 1997). So fördern beispielsweise höhere Gaben leichtlöslicher Kohlenhydrate wie Stärke und Zucker amylytisch und saccharolytisch aktive Spezies (Dehority und Grubb, 1976, Tajima et al., 2001b), während in Rationen hohen Grobfutteranteils Strukturkohlenhydrat-abbauende Spezies einen Vorteil haben (Tajima et al., 2001b, Mrazek et al., 2006). Außerdem nehmen die eingesetzten Futtermittel Einfluss auf die Wiederkauaktivität, den Speichelfluss sowie die Gasfreisetzung im Pansen (Kurihara et al., 1997, von Engelhardt und Breves, 2000, Krause et al., 2002, Maekawa et al., 2002) und sind daher von entscheidender Bedeutung für das hier vorherrschende Milieu. So ist nach höheren Gaben leicht fermentierbarer Stärke mit einem niedrigeren pH-Wert im Pansen zu rechnen als nach Einsatz von Rationen hohen Faseranteils (Oba und Allen, 2003). Grund hierfür ist u.a. das relativ schnelle Wachstum amylytischer Spezies und deren rapide Fettsäurenproduktion (Russell et al., 1992). Für gewöhnlich schwankt der pH-Wert im Pansen zwischen 5,5 und 7 (Dehority, 2003), ein pH-Wert ≤ 6 wirkt allerdings hemmend auf verschiedene celluloytische Bakterien (Russell und Wilson, 1996) sowie Protozoen (Dehority, 2003). Ändert sich in Abhängigkeit der eingesetzten Futtermittel die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft im Pansen, so ist davon auszugehen, dass sich auch die Zusammensetzung des mikrobiell gebildeten Proteins ändert. Zumindest weisen neuere Untersuchungen auf ein futtermittelbedingt variierendes Aminosäurenmuster des Mikrobenproteins im Pansen hin (Hvelplund, 1986, Cecava et al., 1990, Korhonen et al., 2002, Boguhn et al., 2006a). Da bis zu 80 % des am Dünndarm anflutenden Proteins aus dem im Pansen neu synthetisierten Mikrobenprotein besteht (Nolan und Leng, 1972), wird die Aminosäurenversorgung des Wiederkäuers maßgeblich durch die Zusammensetzung des mikrobiellen Proteins bestimmt.

Die Menge des im Pansen gebildeten Mikrobenproteins hängt von der hier zur Verfügung stehenden Energie aus abbaubaren Kohlenhydraten, Proteinen und Fetten (Clark et al., 1992, Stern et al., 1994) sowie der Stickstoffversorgung der Mikroorganismen ab (Hume et al., 1970). Um ein stabiles Pansenmilieu, die Gesunderhaltung des Tieres sowie eine maximale Futteraufnahme gewährleisten zu können, sollte der Konzentratanteil in Wiederkäuerrationen allerdings 55-60 % der Trockensubstanz (T) nicht überschreiten (Jeroch et al., 1999). Folglich ist die Aufnahme von Energie und Protein mit dem Futter begrenzt und kann im Bereich hoher Milchleistung unzureichend sein. Eine Möglichkeit, die Versorgung der hochleistenden

Milchkuh mit Energie und Protein zu verbessern, bestünde in der Erhöhung der Effizienz der mikrobiellen Proteinsynthese. In diesem Zusammenhang wäre auch eine Reduzierung der Klima-relevanten Gase Methan und Kohlendioxid denkbar, die ebenfalls während der mikrobiellen Fermentation im Pansen entstehen und einen Energieverlust für das Tier darstellen. Bisherige Untersuchungen lassen eine Spannweite von 69-307 g gebildetes Mikrobenprotein je kg verdauter organischer Substanz erkennen (Stern und Hoover, 1979). Schätzungen aus *in vivo* Studien zufolge werden im Pansen 10,1 ($\pm 1,5$) g Mikrobenprotein je MJ umsetzbarer Energie (ME) synthetisiert, wobei die hohe Standardabweichung von 1,5 g die Unsicherheit dieser Schätzung dokumentiert (GfE, 2001). Dies gab bereits Anlass zu einer Reihe von Untersuchungen (Armstrong, 1980), die eine Identifizierung der Ursachen für diese Differenzen sowie deren Quantifizierung und eine gezielte Beeinflussung der Effizienz der mikrobiellen Proteinsynthese zum Ziel hatten. Umfangreiche *in vitro* Untersuchungen von Boguhn et al. (2006b) zu dieser Thematik ließen unter Einsatz verschiedener Mischrationen keine eindeutig identifizierbaren Einflussfaktoren auf die Höhe der Effizienz der mikrobiellen Proteinsynthese erkennen. Es deutete sich jedoch ein positiver Effekt des Rohprotein (XP)-gehaltes im Futter an. Der partielle Austausch von Mais- gegen Grassilage in Rationen hohen Grobfutteranteils führte im Gegensatz zu *in vivo* Studien zu einer erhöhten Effizienz der mikrobiellen Proteinsynthese. Als Ursache für die niedrigere Effizienz der mikrobiellen Synthese im nativen Pansen wird die asynchrone Verfügbarkeit von Stickstoff und Kohlenhydraten aus der Grassilage diskutiert, welche auf den großen Anteil leichtlöslicher Kohlenhydrate, die bereits während der Silierung mikrobiell verstoffwechselt werden, zurückzuführen ist (Givens und Rulquin, 2004). Die beobachteten Differenzen hinsichtlich der Syntheseleistung könnten wie auch im Falle der variierenden Aminosäurenmuster des Mikrobenproteins auf futtermittelbedingte Änderungen der mikrobiellen Gemeinschaft im Pansen zurückzuführen sein. Unter diesen Umständen wäre über eine optimierte Rationsgestaltung die gezielte Einflussnahme auf Syntheseleistung sowie Aminosäurenmuster denkbar.

Methoden zur Charakterisierung, Identifizierung und Quantifizierung ruminaler Mikroorganismen

Das Verständnis um die im Pansen ablaufenden mikrobiellen Prozesse ist Voraussetzung für eine gezielte Beeinflussung der mikrobiellen Gemeinschaft.

Demnach besteht auch die Notwendigkeit einer Charakterisierung und Identifizierung der im Pansen unter verschiedenen Fütterungsbedingungen lebenden Mikroorganismen. Da eine Vielzahl von Spezies in die Fermentation involviert ist und viele Arten in synergistischer Beziehung zueinander stehen, sind Daten, die anhand von isolierten Reinkulturen generiert wurden, nur bedingt von Nutzen, um die komplexe mikrobielle Aktivität im Pansen nachvollziehen zu können (Dehority, 2003). Die Kultivierung von Mikroorganismen lässt lediglich deren nähere Charakterisierung hinsichtlich physiologischer und biochemischer Eigenschaften sowie Studien über Wechselwirkungen zwischen einzelnen Spezies zu. Daher wird zur Beschreibung ruminaler Mikrobengemeinschaften und zur Quantifizierung einzelner Organismen zunehmend mit kultivierungsunabhängigen, molekularbiologischen Methoden gearbeitet (Tajima et al., 1999). Diese erlauben sowohl eine Detektion nicht kultivierbarer Spezies als auch die Untersuchung verschiedener Organismen im Gesamtkontext der Mikrobengemeinschaft. Außerdem sind sie im Gegensatz zu kultivierungsabhängigen Methoden relativ schnell und einfach durchzuführen. Phylogenetische Untersuchungen basieren meist auf einem Vergleich der Sequenzen ribosomaler Ribonukleinsäuren (rRNA) wie der 16S rRNA oder deren dazugehöriger DNA (Desoxiribonukleinsäure)-Sequenzen (rDNA). Das 16S rRNA-Gen ist in allen prokaryotischen Zellen zu finden und sowohl funktionell als auch strukturell stark konserviert. Dennoch enthält es einige hoch variable Regionen, die eine phylogenetische Einordnung bis auf Artebene erlauben. Damit stellt es einen idealen molekularen Marker dar (Ludwig und Schleifer, 1994), der großes Potenzial zur Darstellung prokaryotischer Diversität in Mikrobengemeinschaften besitzt (Olsen et al., 1986, Woese, 1987).

Eine Möglichkeit, die Diversität mikrobieller Gemeinschaften darzustellen und strukturelle Veränderungen nachzuvollziehen, besteht in der Erstellung genetischer Profile, so genannter „Fingerprints“. Zu den Fingerprintmethoden zählen beispielsweise die denaturierende Gradientengelelektrophorese (DGGE) sowie die Temperaturgradientengelelektrophorese (TGGE). Hierbei werden in einem Polyacrylamidgel PCR (Polymerase-Kettenreaktion)-Produkte (z.B. Teilsequenzen des 16S rRNA-Gens) sequenzabhängig entlang eines denaturierenden Gradienten (chemisch oder Temperatur) elektrophoretisch aufgetrennt (Muyzer et al., 1993, Muyzer und Smalla, 1998). Dies führt zu komplexen Bandenmustern im Gel, welche Hinweise auf

die strukturelle Diversität der betrachteten Mikrobengemeinschaften liefern und deren direkten Vergleich möglich machen.

Ähnliche Profile lassen sich auch mit Hilfe der Methode des Einzelstrangkonnformationspolymorphismus (single strand conformation polymorphism/SSCP) darstellen (Schwieger und Tebbe, 1998). Hierbei erfolgt die Gelelektrophorese allerdings unter nicht-denaturierenden Bedingungen. Anstatt doppelsträngiger werden im Rahmen der SSCP einzelsträngige DNA-Fragmente gleicher Länge aufgetrennt. Die PCR erfolgt unter Einsatz eines phosphorylierten und eines nicht-phosphorylierten Primers. Im Anschluss wird mit Hilfe eines λ -Exonukleaseverdau der phosphorylierte DNA-Strang des PCR-Produktes selektiv entfernt. Die einzelsträngigen DNA-Moleküle nehmen daraufhin entsprechend ihrer Sequenzabfolge unterschiedliche Konformationen ein, die deren Laufverhalten während der Elektrophorese im Polyacrylamidgel bestimmen und damit keinen Gradienten erforderlich machen. Ein weiterer Vorteil dieser Methode besteht im Verzicht auf GC-Klammern, die im Rahmen der DGGE und TGGE notwendig sind, um eine vollständige Trennung der Doppelstränge zu verhindern (Muyzer et al., 1993) und damit die Primerauswahl einschränken. Außerdem verringern das Fehlen der GC-Klammer sowie der Einzelstrangverdau die Gefahr der Bildung von Heteroduplexstrukturen während der Elektrophorese (Dohrmann und Tebbe, 2004).

Alle drei Fingerprintmethoden haben den Vorteil, dass eine große Anzahl von Proben gleichzeitig bearbeitet und verschiedene Mikrobengemeinschaften relativ einfach miteinander verglichen werden können. Darüber hinaus können Banden, die von näherem Interesse sind, aus den Gelen ausgeschnitten und sequenzanalytisch bearbeitet werden. Nachteilig ist, dass sich anhand der Bandenintensität keine quantitativen Aussagen machen lassen, da eine Bande durch mehrere Spezies repräsentiert werden kann (Schmalenberger et al., 2003).

Für die Quantifizierung einzelner Spezies in ruminalen Mikrobengemeinschaften bietet sich die Methode der Real-time quantitativen (q) PCR an (Tajima et al., 2001b). Während die klassische PCR lediglich einen qualitativen Nachweis der Endprodukte erlaubt, wird im Verlauf der Real-time qPCR die Zunahme der DNA im PCR-Ansatz fluoremetrisch bestimmt. Hierfür werden dem PCR-Ansatz beispielsweise interkalierende Fluoreszenzfarbstoffe wie SYBR Green zugesetzt. Dieser bindet sequenzunspezifisch an doppelsträngige DNA-Moleküle und kann als

DNA-SYBR-Green-Komplex durch Licht einer bestimmten Wellenlänge zur Fluoreszenz angeregt werden. Mit Zunahme der Amplifikate in jedem PCR-Zyklus nimmt auch die zu messende Fluoreszenz im PCR-Ansatz zu. So kann der Verlauf der Amplifikation über den gesamten Zeitraum der Reaktion verfolgt und aufgezeichnet werden. Allerdings ist die Templatemenge zu Beginn der Reaktion begrenzt und die Wahrscheinlichkeit, dass Template, Primer und Polymerase zueinander finden gering (Polz und Cavanaugh, 1998). Gegen Ende bedingen dagegen abnehmende Primer- und Nukleotidkonzentrationen, eine mögliche Schädigung der Polymerase sowie die Anhäufung der PCR-Produkte einen suboptimalen Reaktionsverlauf (Mülhardt, 2003). Während der exponentiellen Phase der PCR aber stehen genügend Template sowie ausreichend intakte Reagenzien zur Verfügung, um eine optimale Reaktion und damit die Verdopplung jedes Templates pro Zyklus zu ermöglichen. Zu diesem Zeitpunkt der Reaktion ist die Menge der Amplifikate im PCR-Ansatz proportional zur Menge der eingesetzten Template-DNA, was deren Quantifizierung erlaubt (Smith und Osborn, 2009). Diese erfolgt auf Basis des sogenannten C_T (*Threshold-Cycle*), einem Schwellenwert, der angibt, in welchem PCR-Zyklus sich das Fluoreszenzsignal erstmals deutlich von der Hintergrundfluoreszenz abhebt. Die Quantifizierung kann sowohl absolut, mit Hilfe von Standards, oder aber relativ erfolgen.

Eine weitere Möglichkeit zur Quantifizierung einzelner Spezies oder Organismengruppen in mikrobiellen Gemeinschaften bietet die Methode der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) (Amann et al., 1995a). Hierbei werden fluoreszenzmarkierte Sonden zur Hybridisierung von rRNA in fixierten Zellen genutzt. Zur Entwicklung entsprechender Sonden dienen u.a. die Sequenzen des 16S und 23S rRNA-Gens. Die Hybridisierung erfolgt entweder in Lösung oder auf Filtern und Objektträgern. Die Quantifizierung der hybridisierten Zellen wird anschließend am Fluoreszenzmikroskop vorgenommen. Gegenüber der Real-time qPCR hat diese Methode den Vorteil, unabhängig von der DNA-Extraktion sowie PCR-bedingten Verzerrungen zu sein. Außerdem erlaubt sie die Visualisierung und Identifizierung einzelner Mikroorganismen innerhalb ihres natürlichen Mikro-Habitats (Amann et al., 1995a, Moter und Göbel, 2000).

In vivo und *in vitro* Studien

Zur Prüfung verschiedener Einflussfaktoren auf die ruminale Mikrobengemeinschaft können sowohl *in vivo* als auch *in vitro* Untersuchungen durchgeführt werden. Studien

am Tier haben den Vorteil, die mikrobielle Gemeinschaft in ihrem natürlichen Habitat untersuchen zu können und Wechselwirkungen mit dem Wirtstier zu erfassen. Jedoch sind sie mit einem relativ hohen Aufwand verbunden und daher nur mit geringen Tierzahlen zu realisieren. Die Entnahme von Proben aus dem Pansen ist zudem nur unter Beeinträchtigung des Tieres, sei es durch das Setzen von Fisteln oder über das Einführen einer Schlundsonde, vorzunehmen.

Die Simulation der Pansenprozesse bietet dagegen den Vorteil des Erhaltes einer konstanten Umwelt über einen langen Zeitraum ohne Einfluss des Tieres. *In vitro* Systeme sind leicht zu handhaben und gut kontrollierbar, was im Gegensatz zum Tier die Schaffung standardisierter Bedingungen ermöglicht. Die Entnahme repräsentativer Proben fällt leichter, ebenso wie die Quantifizierung von Fermentationsprodukten. Außerdem bieten sie die Möglichkeit, Futtermittel wie Konzentrate allein zu inkubieren, ohne wie im Falle der Fütterung an Tiere die Pansenfunktion zu beeinträchtigen. Von Nachteil ist, dass keine Absorption von Stoffwechselendprodukten simuliert werden kann und diese sich im System akkumulieren. Dennoch zeigten vergleichende Studien, dass in den Fermentergefäßen kontinuierlicher Simulationssysteme ein ähnliches Milieu (pH, Redoxpotential, Konzentration kurzkettiger Fettsäuren) (Merry et al., 1987) sowie ein vergleichbar hoher Abbau der Rohnährstoffe aus dem Futter zu beobachten ist (Hannah et al., 1986) wie im nativen Pansen.

Man unterscheidet semi-kontinuierliche (Czerkawski und Breckenridge, 1977) und kontinuierliche Systeme (Hoover et al., 1976). Letztere haben den Vorteil einer gleichmäßig über den Tag verteilten Zuführung kleinerer Futtermengen sowie deren direkte Inkubation im Pansensaft-Puffergemisch der Fermentergefäße. Auf diesem Wege soll die natürliche Futteraufnahme nachgeahmt werden, jedoch bereitet diese Vorgehensweise Schwierigkeiten im Hinblick auf die Durchmischung im Fermenter sowie die Filtration der Überlaufflüssigkeit (Hoover et al., 1976). Semi-kontinuierliche Systeme sind dagegen technisch einfacher aufgebaut. Einerseits wird das Futter nur einmal täglich zugeführt, andererseits erfolgt die Inkubation in Nylonbeuteln, deren Porengröße (Carro et al., 1995) ebenso wie die zugeleitete Puffermenge (Czerkawski und Breckenridge, 1979, Hoover et al., 1984) Einfluss auf die mikrobielle Fermentationsleistung nehmen kann.

Ein weiterer Nachteil der *in vitro* Systeme besteht darin, das Wiederkauen der Tiere und damit die Zerkleinerung des Futters nicht nachahmen zu können. Das zu inkubierende

Futter wird bisher in Abhängigkeit des Versuchsanstellers unzerkleinert bis zu einem Vermahlungsgrad von 1 mm Siebdurchgang inkubiert. Eine Beeinflussung der mikrobiellen Gemeinschaft durch die angebotene Futterpartikelgröße ist aber weder *in vivo* noch *in vitro* auszuschließen. Mit zunehmender Partikelgröße scheint die Abbaurate der Faserfraktionen aus dem Futter sowohl *in vivo* und *in situ* als auch *in vitro* zu sinken (Smith et al., 1983, Cherney et al., 1988, Bowman und Firkins, 1993). Außerdem deuteten sowohl *in vivo* als auch *in situ* Untersuchungen auf eine höhere Besiedlungsdichte kleinerer Partikel hin (Bowman und Firkins, 1993, Yang et al., 2001). *In vitro* Studien von Rodriguez-Prado et al. (2004) ließen bei Variation der Futterpartikelgröße (3 und 1 mm) nur geringe Unterschiede im Aminosäurenmuster einzelner Mikrobenfraktionen erkennen. Da aber das Aminosäurenmuster des mikrobiellen Proteins kein eindeutiger Faktor zur Beschreibung der Zusammensetzung mikrobieller Gemeinschaften ist, weisen diese Ergebnisse nicht zwingend auf identische Mikrobengemeinschaften in den Fermentern hin. Hinweise auf eine Beeinflussung einzelner Bakterienspezies durch die angebotene Futterpartikelgröße finden sich bei Ölschläger (2007). Systematische Untersuchungen zum Einfluss der gewählten Futterpartikelgröße auf die Zusammensetzung der ruminalen Mikrobengemeinschaft *in vitro* stehen aber nach bisherigem Kenntnisstand noch aus.

Zielstellung der vorliegenden Arbeit war daher,

1. mit Hilfe molekularbiologischer Methoden zu prüfen, inwiefern die Futterpartikelgröße einen Effekt auf die Zusammensetzung der ruminalen Mikrobengemeinschaft *in vitro* hat.

Da vergleichende Untersuchungen zu futtermittelbedingten Änderungen der mikrobiellen Gemeinschaft im Pansen bisher meist unter dem Aspekt Grobfutter zu Konzentrat-Verhältnis durchgeführt wurden, sollte

2. der Frage nachgegangen werden, ob verschiedene Grobfutter und deren Verhältnis zueinander Einfluss auf die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft *in vitro* nehmen.

3. sollte geklärt werden, welche Mikrobengruppen oder Spezies durch den Einsatz unterschiedlicher Grobfutter gefördert bzw. gehemmt werden.

Die Wahl der zu prüfenden Grobfutter fiel auf Mais- und Grassilage, da vorangegangene *in vitro* sowie *in vivo* Studien deren erheblichen Einfluss auf die Effizienz der mikrobiellen Proteinsynthese hatten erkennen lassen und beide europaweit einen bedeutenden Anteil des Grobfutters in Wiederkäuerrationen ausmachen (Givins und Rulquin, 2004).

Mit Hilfe von SSCP-Analysen sollten strukturelle Unterschiede der mikrobiellen Gemeinschaften beschrieben werden. Die anschließende Sequenzierung ausgewählter Banden sollte Hinweise darauf liefern, welche Spezies möglicherweise in Abhängigkeit des Mais- und Grassilageanteils im Futter bzw. der Futterpartikelgröße auftreten. Darüber hinaus sollte unter Verwendung der Real-time qPCR sowie der FISH eine relative Quantifizierung einzelner Mikrobengruppen und Spezies erfolgen, um Veränderungen innerhalb der Mikrobengemeinschaften nachweisen und Aussagen über deren Zusammensetzung treffen zu können.

Da vorausgegangene Arbeiten Hinweise auf Unterschiede der Mikrobenfraktionen geliefert hatten (Boguhn et al. 2006a und 2008), wurde außerdem mit Hilfe der FISH ein Vergleich der isolierten Zellen aus dem Fermenter und Überlauf angestrebt. Ziel war es, die Ursachen dieser Variationen zu definieren und Empfehlungen für weiterführende Untersuchungen zur Probennahme zu geben.

Im Rahmen der für die vorliegende Arbeit durchgeführten *in vitro* Versuche wurden innerhalb eines zweiten Teilprojektes der Abbau der Rohnährstoffe und Faserfraktionen, die Effizienz der mikrobiellen Proteinsynthese, das Aminosäuremuster des mikrobiellen Proteins sowie weitere Fermentationsparameter erfasst. Die Betrachtung der eigenen Daten erfolgte demnach auch unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse.

2. Herkunft der Mikroorganismenproben für die eigenen Untersuchungen

Das in dieser Arbeit verwendete Probenmaterial stammt aus Pansensimulationsversuchen, die im Rahmen des DFG-Projektes „Einfluss unterschiedlicher Anteile von Silagen in Mischrationen für Wiederkäuer auf die ruminale mikrobielle Gemeinschaft und deren Syntheseleistung *in vitro*“ (DFG BO2960/1) durchgeführt wurden. Die Betreuung der Versuche im Nutztierwissenschaftlichen Zentrum Merbitz sowie die Probenahme, Futtermittelanalytik und Betrachtungen zur Effizienz der mikrobiellen Proteinsynthese lagen bei Mitarbeitern der Professur für Tierernährung (Dr. agr. J. Boguhn, Dipl.-Ing. agr. B. Hildebrand). Die molekularbiologischen Untersuchungen zur Zusammensetzung der sich *in vitro* etablierenden mikrobiellen Gemeinschaften erfolgten am Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung UFZ in Leipzig und sind Inhalt der vorliegenden Arbeit.

2.1 *In vitro* Versuche zur Pansensimulation

Die *in vitro* Versuche erfolgten in einem semi-kontinuierlichen Pansensimulationssystem nach Czerkawsky und Breckenridge (1977). Details zur technischen Umsetzung und zum Versuchsablauf finden sich bei Boguhn et al. (2006b). An dieser Stelle sollen das Pansensimulationssystem und die Durchführung der Versuche nur kurz beschrieben werden. In Abbildung 1 ist der Aufbau einer von sechs Einheiten des hier verwendeten Pansensimulationssystems schematisch dargestellt.

Für eine Pansensimulation sind sowohl flüssige (Pansensaft) als auch feste Bestandteile des Panseninhaltes von Wiederkäuern notwendig. Als Spendertiere hierfür standen fünf pansenfistulierte Schafe der Rasse „Schwarzköpfiges Fleischschaf“ aus dem Nutztierwissenschaftlichen Zentrum Merbitz zur Verfügung. Jedes der Tiere erhielt täglich 200 g eines handelsüblichen Konzentratfuttermittels für Schafe sowie zusätzlich 10 g einer Mineralstoff- und Vitaminmischung. Darüber hinaus hatten die Tiere freien Zugang zu Wasser und Wiesenheu.

Zu Beginn jeder Pansensimulation wurde jedes der sechs zylinderförmigen Fermentationsgefäße mit einem Gemisch aus 400 ml frisch entnommenem Pansensaft und 400 ml einer in Anlehnung an McDougall (1948) erstellten Pufferlösung (Anhang,

Tab. A1) befüllt. Die perforierten Innengefäße der Fermenter wurden zunächst mit je zwei Nylonbeuteln (Nylonsiebgewebe der Fa. Linker Industrie Technik GmbH; Porengröße 100 μm) bestückt, von denen einer ~ 60 g feste Bestandteile des Panseninhaltes und der andere 15 g des jeweils zu untersuchenden Futters enthielt. Sowohl der Pansensaft als auch die festen Bestandteile des Panseninhaltes wurden als Mischproben der fünf Spendertiere verwendet.

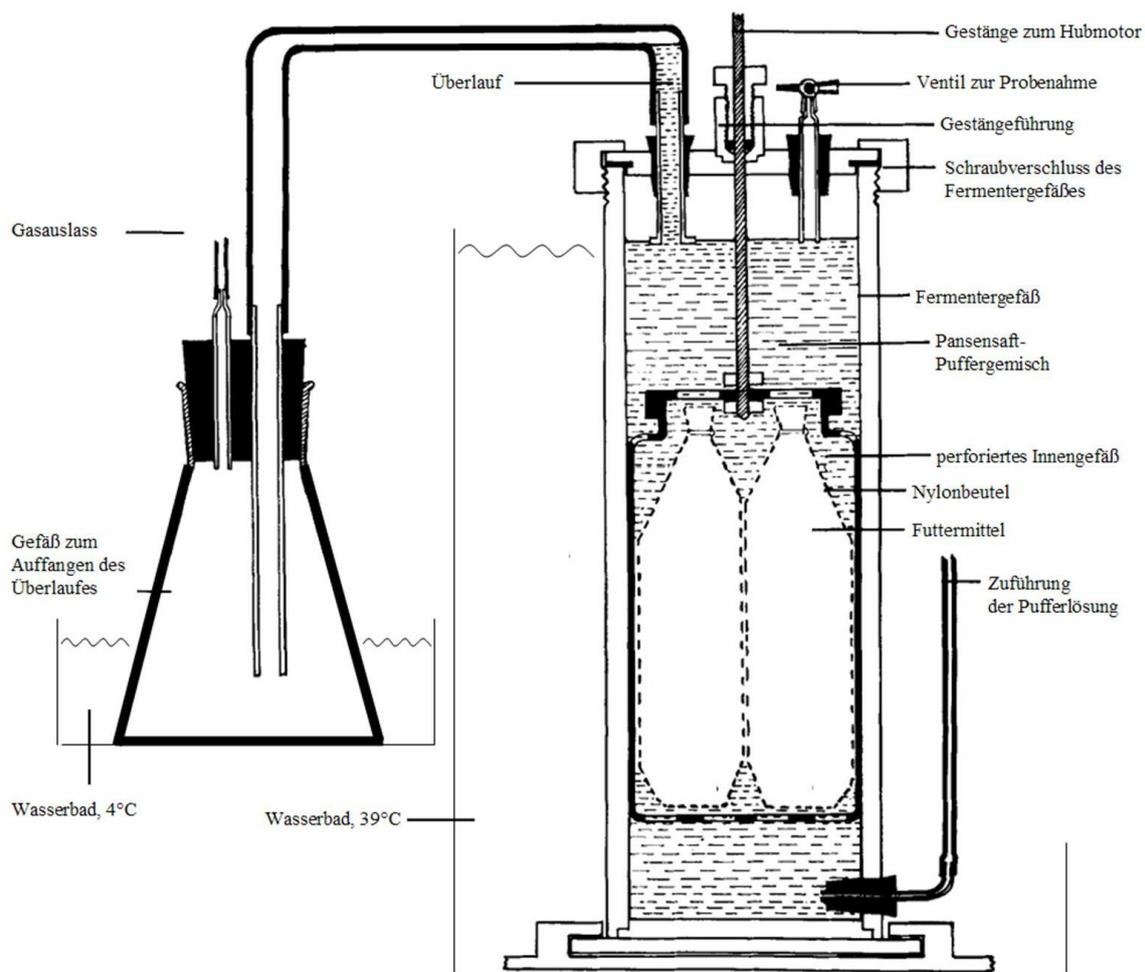


Abbildung 1: Schematische Darstellung einer Fermentereinheit im semi-kontinuierlichen Pansensimulationssystem (modifiziert nach Czerkawski und Breckenridge, 1977)

Um der durchschnittlichen Körpertemperatur des Schafes zu entsprechen, standen die Fermentationsgefäße in einem 39°C warmen Wasserbad. Die Pansenmotorik wurde im Fermenter mit Hilfe vertikaler Hub- und Senkbewegungen der Innengefäße nachgeahmt. Die Zuführung von täglich ca. 600 ml der oben genannten Pufferlösung in die Fermentationsgefäße diente sowohl der Stabilisierung des pH-Wertes im Fermenter als auch der Versorgung des Systems mit Flüssigkeit und weiteren Mineralstoffen.

Darüber hinaus sollte dem System mit der Pufferlösung eine Markersubstanz zugeführt werden, die zur Bestimmung der Effizienz der mikrobiellen Proteinsynthese nötig war. Daher enthielt die Pufferlösung zusätzlich Ammoniumchlorid (0,7 mM), das mit dem natürlichen Isotop ^{15}N angereichert war (Chemotrade Chemiehandelsgesellschaft mbH, deklariert 10 at.-%).

Der Abfluss von Stoffwechselprodukten der mikrobiellen Fermentation und nicht abgebauten Futterpartikeln sowie der Mikrobenmasse aus dem Pansen wurde über die Ausleitung überlaufender Suspension aus dem Fermenter simuliert. Die Überführung erfolgte über Schläuche in separate Auffanggefäße, die zur Unterbindung mikrobieller Aktivität in einem 4°C kalten Wasserbad standen und täglich ausgewechselt wurden.

24 h nach Beginn der Inkubation wurde der mit festen Bestandteilen des Panseninhaltes gefüllte Nylonbeutel im Innengefäß jeden Fermenters gegen einen Futterbeutel ausgetauscht. Nach weiteren 24 h wurde der ab Tag 1 inkubierte Futterbeutel durch einen neuen ersetzt. Innerhalb der folgenden 13 Tage wurde dann alle 24 h jeweils derjenige Futterbeutel ausgewechselt, der bereits 48 h inkubiert worden war. Bei der Entnahme der Nylonbeutel wurden diese mit ca. 70 ml Pufferlösung gespült, um sowohl lose an Futterpartikeln haftende Mikroorganismen als auch restliche Fermenterflüssigkeit in das System zurückzuführen. 13 Tage nach Start der Inkubation wurde die Pansensimulation mit der Probennahme aus den Fermentations- und Überlaufgefäßen abgeschlossen.

2.2 Futtermittel

Zur Klärung der Frage, welchen Einfluss die Grobfutterquelle in Wiederkäuerrationen auf die mikrobielle Gemeinschaft im Pansen hat, wurden für die vorliegende Arbeit fünf Futtermischungen konzipiert, die hauptsächlich aus Mais- und Grassilage bestanden (Tab. 1). Der Konzentratfutteranteil in den Mischungen wurde mit nur 10 % Sojaextraktionsschrot (SES) bewusst niedrig gewählt, um einen möglichen Einfluss der verwendeten Konzentratfutterquelle auf die Mikroorganismengemeinschaft zu minimieren. Das SES diente ausschließlich der Stickstoffversorgung der Mikroben, insbesondere bei der Inkubation der proteinarmen Maissilage. Den in Tabelle 1 aufgeführten Mischungen wurde außerdem die Mineralstoff- und Vitaminmischung zugesetzt, die auch an die Spendertiere verabreicht worden war. Ihr Anteil in der Gesamtfuttermischung machte 1,1 % der T aus.

Tabelle 1: Zusammensetzung der Futtermischungen¹ (in % der T)

Futtermischung	Maissilage	Grassilage	Sojaextraktionsschrot
I	90	0	
II	70	20	
III	45	45	10
IV	20	70	
V	0	90	

¹ plus 10 g der Mineralstoff- und Vitaminmischung

Die verwendeten Silagen stammten von einem Betrieb in Sachsen-Anhalt und wurden unter Praxisbedingungen gewonnen. Die Ernte der Maissilage erfolgte zum Ende der Teigreife. Zeitgleich wurde die Grassilage von einem intensiv bewirtschafteten Grünland geschnitten (4. Schnitt). Die Grassilage sollte etwa 15 bis 20 % Rohprotein und 20 bis 25 % Rohfaser enthalten und eine Energiekonzentration von > 5,8 MJ NEL (Nettoenergie Laktation) je kg T aufweisen. Für die Maissilage wurden 7 bis 10 % Rohprotein und 18 bis 22 % Rohfaser sowie eine Energiekonzentration von > 6,5 MJ NEL/kg T erwartet.

Der erste im Rahmen des oben genannten DFG-Projektes durchgeführte Versuch erfolgte lediglich unter Verwendung der Futtermischungen I, III und V. Die analysierten Gehalte an Weender Rohnährstoffen (Rohasche: XA, Rohprotein: XP, Rohfett: XL, Rohfaser: XF) des hierfür verwendeten Futters sind in Tabelle 2 zu finden. Für einen zweiten, später folgenden Versuch, in dem die Prüfung aller fünf Futtermischungen sowie der Einzelkomponenten anstand, wurde eine erneute Analyse der Rohnährstoffe vorgenommen, um Veränderungen im Futter während der Lagerung berücksichtigen zu können. Die Ergebnisse hierzu sind in Tabelle 3 aufgeführt. Für die Analysen wurde das Futter zunächst 24 h bei 65°C getrocknet und anschließend auf 1 mm Siebdurchgang vermahlen. Die Weender Rohnährstoffanalyse erfolgte nach den Vorgaben des Verbandes Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA, Naumann und Bassler, 1976) im institutseigenen Labor. Zusätzlich wurden die Fraktionen der Neutral- und Säure-Detergenzien-Faser (NDF, ADF) nach Vorschrift der VDLUFA (1988 und 1993) bestimmt. Die analysierten NDF- und ADF-Gehalte sind ebenfalls in den Tabellen 2 und 3 angegeben.

Tabelle 2: T-Gehalte¹, analysierte Rohnährstoffe sowie Gehalte an NDF und ADF in den Futtermischungen I, III und V, Analyse für den ersten Versuch

Futtermischung	T (g/kg)	XA (g/kg T)	XP (g/kg T)	XL (g/kg T)	XF (g/kg T)	NDF (g/kg T)	ADF (g/kg T)
I	920	58	128	33	172	326	193
III	917	88	178	36	196	356	239
V	918	129	232	38	210	390	248

¹ nach 24-stündiger Vortrocknung bei 65°C**Tabelle 3:** T-Gehalte¹, analysierte Rohnährstoffe und Gehalte an NDF und ADF für die Futtermischungen I-V sowie deren Einzelkomponenten, Analyse für den zweiten Versuch

	T (g/kg)	XA (g/kg T)	XP (g/kg T)	XL (g/kg T)	XF (g/kg T)	NDF (g/kg T)	ADF (g/kg T)
Futtermischung							
I	945	55	127	33	191	338	214
II	933	67	151	33	206	352	213
III	929	97	174	35	199	381	208
IV	926	115	202	34	215	406	223
V	952	126	227	34	220	410	230
Einzelkomponenten							
Maissilage	935	43	92	35	205	380	211
Grassilage	935	125	216	31	242	412	252
Sojaextraktions-schrot	886	72	464	17	95	173	129

¹ nach 24-stündiger Vortrocknung bei 65°C

Die Bestimmung der Rohnährstoffverdaulichkeiten und die Berechnung der Energiekonzentrationen (GfE, 2001) in den Futtermischungen erfolgten im Rahmen von Verdaulichkeitsversuchen mit Hammeln (AfBN, 1991), die bereits im Vorfeld der eigenen Untersuchungen durchgeführt worden waren. Die ermittelten Werte zur Verdaulichkeit der Rohnährstoffe sowie die berechneten Energiegehalte können dem Anhang entnommen werden (Tab. A2).

Zur Klärung der Frage, welchen Einfluss die Futterpartikelgröße auf die ruminale Mikrobengemeinschaft hat, sollte das Futter bei unterschiedlichen Partikellängen inkubiert werden. Hierfür wurde das Futter zunächst über 24 h bei 65°C getrocknet und anschließend auf 1 und 4 mm Siebdurchgang vermahlen. Bis zur Einwaage in die

Nylonbeutel kurz vor Versuchsbeginn wurde das aufbereitete Futter in geschlossenen Gefäßen bei Raumtemperatur gelagert.

Da davon auszugehen war, dass während der Vermahlung auch Partikel das Sieb passiert hatten, die größer oder kleiner als 1 und 4 mm waren, wurde zu einem späteren Zeitpunkt die Verteilung der Futterpartikelgröße in den Mischungen bestimmt. Diese Analysen erfolgten allerdings nicht im Rahmen der hier vorgestellten Untersuchungen, sondern wurden von Herrn Hildebrand im Zuge der Bearbeitung des zweiten Teilprojektes durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Analysen fanden daher in der vorliegenden Arbeit ausschließlich Beachtung im Hinblick auf die Diskussion der eigenen Daten. Ungeachtet der tatsächlich ermittelten Verteilung der Futterpartikelgröße in den Mischungen wurde im Folgenden vereinfachend an den Begriffen Futterpartikelgröße sowie 1 und 4 mm festgehalten. Diese Begrifflichkeiten sollen demnach keine Bezeichnung einer definierten Futterpartikellänge von 1 und 4 mm darstellen, sondern beschreiben vielmehr den gewählten Vermahlungsgrad und damit die jeweilige Behandlung.

3. Qualitative Untersuchungen - Analyse von Einzelstrangkonnformationspolymorphismen (SSCP)

3.1 Material und Methoden

3.1.1 Versuchsdurchführung, Probengewinnung und -aufbereitung

Zur Gewinnung von Probenmaterial für die PCR-basierte SSCP-Analyse der mikrobiellen Gemeinschaften kamen in einem ersten Versuch die Futtermischungen I, III und V zum Einsatz (Vergleich 2.2). Da Fingerprintmethoden wie die SSCP-Analyse mit einem hohen Aufwand für die folgenden Sequenzanalysen verbunden sind und zu Beginn der Untersuchungen nicht klar war, wie groß ein möglicher Effekt der Grobfutterquelle auf die mikrobielle Gemeinschaft ausfallen würde, wurde sich in diesem Versuch bewusst für die Prüfung der Mischungen mit Anteilen von 90 % Mais-(I) oder Grassilage (V) sowie für die dazwischen liegende Variante mit gleichen Anteilen beider Silagen (III) entschieden (Tab. 1). In drei aufeinander folgenden Versuchsdurchgängen wurde jede der drei Futtermischungen für die beiden Vermahlungsgrade 1 und 4 mm inkubiert. Für die folgenden Analysen standen demnach drei Wiederholungen je Variante zur Verfügung.

Für die SSCP-Analysen wurde ausschließlich Probenmaterial aus der Mikrobenfraktion der Überläufe gewonnen. Die Probenahme erfolgte am letzten Tag der Inkubation. Aus je 320 ml des Überlaufes eines Fermenters wurden die Mikroorganismen mittels Differenzialzentrifugation nach einem modifizierten Protokoll von Brandt und Rohr (1981) isoliert. Zunächst wurden die Überläufe für 5 min bei $2000 \times g$ und 4°C vorzentrifugiert (Suprafuge 22, Heraeus), um die in der Suspension enthaltenen Futterpartikel abzuscheiden. Anschließend wurden die Überstände für mindestens 24 h tiefgefroren und nach dem Auftauen zur Abtrennung restlicher Futterpartikel einer zweiten Vorzentrifugation unterzogen. Es folgten drei 15-minütige Hauptzentrifugationen bei $27000 \times g$ und 4°C . Zwischen den Zentrifugationsschritten wurden die Mikrobenpellets jeweils mit 10 ml einer 0,9 %igen [w/v] Natriumchloridlösung gewaschen. Nach der dritten Hauptzentrifugation wurden ~100 mg Mikrobenmasse für die DNA-Analyse entnommen und bei -80°C gelagert.

Für die Optimierung der SSCP-Methode im Hinblick auf die eigenen Proben wurden außerdem Mikroorganismen direkt aus dem Pansensaft der Spendertiere isoliert. Die

Zentrifugation und die anschließende Lagerung erfolgte mit Ausnahme der ersten Vorzentrifugation (5 min, 4°C, 2200 × g) wie oben beschrieben.

Für alle im Folgenden beschriebenen molekularbiologischen Untersuchungen qualitativer und quantitativer Art sei angemerkt, dass, sofern nicht weiter erläutert, alle verwendeten Chemikalien in *pro analysi* Qualität von den nachstehend aufgelisteten Firmen bezogen wurden. Das Lösen der Substanzen erfolgte, falls nicht anders angegeben, in destilliertem Wasser.

- Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
- Roth Chemie GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
- Serva Feinbiochemica GmbH & CO (Heidelberg, Deutschland)
- Fluka, Sigma Aldrich Chemie GmbH (Buchs, Schweiz)
- BTS BioTech Trade & Service Laborbedarf GmbH (St. Leon-Rot, Deutschland)

3.1.2 Extraktion mikrobieller DNA

Zur Extraktion und anschließenden Aufreinigung der DNA aus den Mikroorganismen wurde das „Fast DNA[®] KIT“ (Qbiogene) unter Verwendung des „Fast Prep[®] Instrumentes“ (Thermo Savant FastPrep *FP120* Homogenizer, Qbiogene) genutzt. Der Aufschluss der Zellen erfolgte hierbei mechanisch nach der Methode des „Bead-Beating“. Das vom Hersteller vorgegebene Protokoll wurde unverändert übernommen. Die Extraktion wurde aus je ~100 mg Mikrobenmasse vorgenommen. Die Elution der DNA erfolgte in 100 µl reinem, nucleasefreiem Wasser, die Lagerung der extrahierten DNA bei -20°C.

Die DNA-Konzentration in den Eluaten wurde durch Messung der optischen Dichte (OD) bei 260 nm am Spektrophotometer (NanoDrop-1000, NanoDrop Technologies) ermittelt. Hierfür musste lediglich 1 µl Probe auf den Lichtwellenleiter des Gerätes aufgetragen werden. Anhand des Verhältnisses von OD₂₆₀ : OD₂₃₀ bzw. OD₂₆₀ : OD₂₈₀ kann über die Messung der DNA-Konzentration hinaus eine Aussage zur Reinheit der DNA getroffen werden. Das Verhältnis von OD₂₆₀ : OD₂₃₀ sollte im Bereich von 1,8-2,2, das von OD₂₆₀ : OD₂₈₀ bei etwa 1,8 oder darüber liegen, um Verunreinigungen wie Proteine, Polysaccharide, Alkohole oder Phenole ausschließen zu können (Sambrook et al., 1989). Inwiefern hochmolekulare DNA extrahiert werden konnte, wurde mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese überprüft.

Agarosegelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese können DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge im elektrischen Feld aufgetrennt werden. Die Überprüfung der extrahierten DNA erfolgte im 0,8 %igen [w/v] Agarosegel (SeaKem-Agarose LE, Biozym) in $0,5 \times$ Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE, 20 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA, pH 7,4). Der TAE-Puffer diente gleichzeitig als Laufpuffer. Je 5 μ l DNA-Eluat wurden mit 4 μ l Lauf- und 1 μ l Ladepuffer (0,25 % [w/v] Bromphenolblau, 40 % [w/v] Sucrose) versetzt und neben einem DNA-Größenstandard (RaoulTM Ready-to-use, Qbiogene) auf das Gel geladen (Elektrophoresekammern: Mupid 21, Cosmo Bio Co, Bio-Rad). Die Laufzeit wurde anhand des Farbmarkers (Bromphenolblau) im Ladepuffer bestimmt. Anschließend wurden die DNA-Banden im Ethidiumbromidbad (5 μ g/ml) angefärbt. Die Visualisierung der DNA unter UV-Licht erfolgte mit Hilfe des Geldokumentationssystems „GeneGenius“ (Syngene).

Erstellung von DNA-Mischproben

Wie bereits angedeutet, ist die Sequenzanalyse von DNA-Fragmenten aus SSCP-Gelen mit einem hohen Arbeitsaufwand verbunden. Daher ist nur eine begrenzte Anzahl von SSCP-Banden je Gel analysierbar. In der hier vorgestellten Untersuchung sollte mit drei Wiederholungen je Futtermischung gearbeitet werden, was die Anzahl der zu betrachtenden SSCP-Banden um ein Vielfaches erhöhte. Da hier die mikrobielle DNA für jede Behandlung aus jeweils drei Fermentern und damit aus unabhängigen mikrobiellen Gemeinschaften extrahiert wurde, war nicht sichergestellt, dass die Analyse einer von drei auf gleicher Höhe laufenden SSCP-Banden ein repräsentatives Ergebnis für die entsprechende Futtermischung liefern würde. Aufgrund dieser Überlegung wurden zusätzlich Mischproben aus den drei DNA-Extrakten jeder Behandlung erstellt, die im Rahmen der Sequenzanalyse stellvertretend für die drei Einzelproben bearbeitet werden sollten. Die Behandlung der Mischproben entsprach im Weiteren der der Einzelproben.

3.1.3 PCR für Teilsequenzen der 16S rDNA

Die Amplifikation von Teilsequenzen des 16S rRNA-Gens aus dem Genom der Mikroorganismen für die SSCP-Analysen erfolgte in zwei aufeinander folgenden PCR-Schritten nach dem Prinzip der nested PCR. Hierbei wurden während einer ersten PCR mit Hilfe spezifischer Primer vordergründig Sequenzen amplifiziert, die für die

entsprechend gewählte phylogenetische Gruppe von Bakterien oder Archaeen typisch sind. Das erhaltene PCR-Produkt wurde anschließend als Matrize für einen zweiten Amplifikationsschritt, die nested PCR eingesetzt. Diese zweite PCR diente der Egalisierung der Fragmentlängen auf ~ 400 Basenpaar (bp) und der Realisierung eines phosphorylierten 5'-Endes als Bindungsstelle für die Exonuclease.

Gruppenspezifische PCR

Die SSCP-Analyse sollte für die Bakteriengruppen *Clostridia* und *Bacteroides-Prevotella* sowie für die Domäne der *Archaea* erfolgen. Die verwendeten Vorwärts- und Rückwärtsprimer (f, R) für die gruppenspezifische PCR sind in Tabelle 4 aufgelistet. Bezogen wurden die Primer von der Firma Biomers. Die aus den Mikroorganismen extrahierte DNA wurde für die PCR 1:100 verdünnt. Der jeweilige Reaktionsansatz sowie die PCR-Bedingungen sind in Tabelle 5 zu finden.

Durchgeführt wurden sowohl diese als auch alle folgenden PCR unter Verwendung des „DNA Engine® Tetrad 2 Peltier Thermal Cycler“ (PTC-200) der Firma MJ Research. Zur Kontrolle der verwendeten Arbeitsmaterialien wurde jede PCR von einer Blindprobe begleitet, die anstatt der DNA reines PCR-Wasser enthielt.

Um zufällig auftretende Unterschiede im Vervielfältigungsprozess zu berücksichtigen, wurde die PCR für jede Probe in drei 25- μ l-Ansätzen durchgeführt, die nach Ablauf der Reaktion vereinigt wurden.

Tabelle 4: Übersicht der gruppenspezifischen Primerpaare zur Amplifikation von Teilsequenzen des 16S rRNA-Gens

Zielgruppe	<i>Escherichia coli</i> - Positon	Primersequenz 5'- 3'	Referenz
<i>Clostridium</i> - Cluster XIV a und b	482 f	CGG TACY TGA CTA AGA AGC	modifiziert nach Franks et al., 1998
<i>Bacteria</i>	1492 R	TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T	Lane, 1991
<i>Archaea</i>	109 f	ACK GCT CAG TAA CAC GT	Grosskopf et al., 1998
<i>Archaea</i>	934 R	GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT	Stahl und Amann., 1991
<i>Bacteroides</i> - <i>Prevotella</i>	303 f	GAA GGT CCC CCA CAT TG	Bartosch et al., 2004
<i>Bacteria</i>	1100 R	GGG TTG CGC TCG TTG CGG	modifiziert nach Lane, 1991

Tabelle 5: Reaktionsansätze und PCR-Bedingungen für die gruppenspezifischen PCR

	<i>Clostridia</i>		<i>Bacteroides-Prevotella</i>		<i>Archaea</i>	
Reaktionsansatz:						
Taq PCR Master Mix Kit (Qiagen)	12,5 µl		12,5 µl		12,5 µl	
f-Primer (10 mM)	1 µl		0,5 µl		0,5 µl	
R-Primer (10 mM)	1 µl		0,5 µl		0,5 µl	
DNA	~2,5 ng		~2,5 ng		~2,5 ng	
reines PCR-Wasser	10 µl		11 µl		11 µl	
PCR-Bedingungen:						
initiale Denaturierung	4 min	94°C	-	-	4 min	94°C
Denaturierung	45 s	94°C	60 s	94°C	30 s	94°C
Primer-Annealing	45 s	55°C	60 s	56°C	30 s	54°C
Elongation	60 s	72°C	45 s	72°C	60 s	72°C
terminale Elongation	5 min	72°C	5 min	72°C	5 min	72°C
Zyklenzahl	25		30		25	

Im Anschluss wurden die gepoolten PCR-Produkte, wie oben beschrieben, gelelektrophoretisch aufgetrennt, um sie auf die erwartete Fragmentlänge und Ausbeute hin zu überprüfen. Die Elektrophorese erfolgte in einem 1,5 %igen [w/v] Agarosegel. Als Größenstandard diente hier wie auch zur Überprüfung aller weiteren PCR-Produkte ein 100-bp-Standard (New England BioLabs). Alle PCR-Produkte wurden grundsätzlich bei -20°C gelagert.

Nested PCR

Der gruppenspezifischen PCR folgte die Amplifikation der V4V5-Region des 16S rRNA-Gens. Mit Hilfe der universellen Com-Primer 519 f und 926 R (Tab. 6) wurde ein ~ 400 bp langer DNA-Abschnitt innerhalb des zuvor aus der gruppenspezifischen PCR erhaltenen Amplifikates vervielfältigt. Ohne vorherige Aufreinigung wurde das gepoolte Produkt aus der gruppenspezifischen PCR als 1:100er Verdünnung für die *Clostridia* und als 1:5000er Verdünnung für die *Archaea* in der nested PCR verwendet. Die Produkte aus der *Bacteroides-Prevotella*-spezifischen PCR mussten ihrer Menge entsprechend 1:100, 1:1000 und 1:5000 verdünnt werden. Für die *Archaea* erfolgte die nested PCR mit modifizierten Com-Primern (Tab. 6).

Tabelle 6: Übersicht der Primerpaare für die nested PCR

Zielgruppe	<i>Escherichia coli</i> - Positon	Primersequenz 5'- 3'	Referenz
Com 1 <i>Bacteria</i>	519 f	CAG CAG CCG CGG TAA TAC	Schwieger und Tebbe, 1998
Com 2 ¹ <i>Bacteria</i>	926 R	CCG TCA ATT YMT TTG AGT TT	modifiziert nach Schwieger und Tebbe, 1998
Com 1 <i>Archaea</i>	519 f	CAG CMG CCG CGG TAA YAC	Strobel et al. 2008
Com 2 ¹ <i>Archaea</i>	926 R	CCG CCA ATT CCT TTA AGT TT	

¹ am 5'-Ende phosphoryliert

Die Reaktionsansätze sowie die dazugehörigen PCR-Bedingungen sind in Tabelle 7 aufgeführt. Je Probe wurden dreimal 50 µl angesetzt, die im Anschluss an die PCR vereinigt wurden.

Tabelle 7: Reaktionsansätze und PCR-Bedingungen für die nested PCR

	<i>Clostridia</i>		<i>Bacteroides- Prevotella</i>		<i>Archaea</i>	
Reaktionsansatz:						
Taq PCR Master Mix Kit (Qiagen)	25 µl		25 µl		25 µl	
f-Primer (10 mM)	2 µl		1 µl		1 µl	
R-Primer (10 mM)	2 µl		1 µl		1 µl	
DNA (PCR-Produkt)	1 µl		1 µl		1 µl	
reines PCR-Wasser	20 µl		22 µl		22 µl	
PCR-Bedingungen:						
initiale Denaturierung	3 min	94°C	3 min	94°C	3 min	94°C
Denaturierung	60 s	94°C	45 s	94°C	45 s	94°C
Primer-Annealing	60 s	50°C	45 s	50°C	45 s	56°C
Elongation	60 s	72°C	60 s	72°C	60 s	72°C
terminale Elongation	5 min	72°C	5 min	72°C	5 min	72°C
Zyklenzahl	30		30		25	

3.1.4 Aufreinigung der PCR-Produkte

Die Aufreinigung der Produkte aus der nested PCR erfolgte unter Verwendung des „Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System“ (Promega), da mit Hilfe dieses Systems sowohl eine direkte als auch eine gelpräparative Aufreinigung der PCR-Produkte möglich war. Während die nested PCR-Produkte für die *Archaea* im Agarosegel nur eine DNA-Bande von ca. 400 bp zeigten und daher direkt aufgereinigt werden konnten, wurde für die nested PCR-Produkte der beiden Bakteriengruppen eine Doppelbande detektiert. Um einen Einfluss der zweiten, möglicherweise unspezifischen Bande auf die SSCP-Profile der *Clostridia* und *Bacteroides-Prevotella* auszuschließen, wurden die nested PCR-Produkte beider Gruppen gelpräparativ aufgereinigt. Dafür wurden die 150 µl PCR-Produkt je Probe im 1,5 %igen [w/v] Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und die ca. 400 bp langen DNA-Fragmente mittels hitzesterilisiertem Skalpell unter UV-Licht (Transluminator UVT-20 M/L, Herolab) ausgeschnitten. Die Aufreinigung erfolgte im Weiteren nach den Angaben des Herstellers. Anschließend wurden die aufgereinigten PCR-Produkte mit 35 µl reinem, nucleasefreiem Wasser eluiert.

3.1.5 Exonucleaseverdau und Denaturierung

Voraussetzung für eine konformationsabhängige Auftrennung von DNA-Einzelsträngen im Polyacrylamidgel ist eine Gelelektrophorese unter nicht denaturierenden Bedingungen. Für den Erhalt einzelsträngiger DNA ist aber zuvor eine Denaturierung der DNA-Doppelstränge erforderlich. Die DNA-Einzelstränge allerdings neigen unter nicht denaturierenden Bedingungen verstärkt zur Bildung von Heteroduplex-Strukturen oder sie rehybridisieren. In einem SSCP-Gel kann dies zum Auftreten zusätzlicher Banden führen, da doppelsträngige DNA andere Konformationen als einzelsträngige DNA einnimmt. So würde zum einen das SSCP-Profil verfälscht und zum anderen die bildanalytische Auswertung der Gele erschwert. Daher wurden die aufgereinigten PCR-Produkte zunächst einem Einzelstrangverdau mit λ -Exonuclease (New England BioLabs) unterzogen. Das Enzym baut hierbei den durch den Com 2 Primer phosphorylierten Einzelstrang selektiv ab. Auf diesem Wege wird eine anschließende Rehybridisierung der DNA-Stränge verhindert sowie die Bildung von Heteroduplices erschwert.

Den Vorgaben von Dohrmann und Tebbe (2004) entsprechend sollten je Probe mindestens 300 ng doppelsträngige DNA für den Einzelstrangverdau eingesetzt werden. Die Quantifizierung der aufgereinigten PCR-Produkte erfolgte wie oben beschrieben am Spektrophotometer. Durch entsprechende Verdünnung einzelner PCR-Produkte mit reinem, nucleasefreiem Wasser wurden alle Proben einer zu untersuchenden Gruppe auf ähnliche DNA-Konzentrationen eingestellt. Somit konnte sichergestellt werden, dass später auch ähnliche DNA-Mengen auf das SSCP-Gel geladen wurden und eine Vergleichbarkeit der Proben hinsichtlich ihrer SSCP-Profile erhalten blieb. Für die einzelnen Gruppen wurden ca. 670 ng (*Clostridia*), 100-600 ng (*Bacteroides-Prevotella*) und 1300-1700 ng (*Archaea*) DNA verdaut. Dazu wurden 27 µl des aufgereinigten und verdünnten PCR-Produktes nach Zugabe von 4,0 µl 10 × λ-Puffer (New England BioLabs), 0,5 µl λ-Exonuclease (2,5 U) und 8,5 µl reinem, nucleasefreiem Wasser für 60 min bei 37°C in einem Heizblock (Thermomixer comfort, Eppendorf) inkubiert.

Nach dem Einzelstrangverdau wurde jede Probe mit einem Volumen (40 µl) frisch erstellten SSCP-Puffers (95 % [v/v] Formamid, 10 mM Natriumhydroxid, 0,25 % [w/v] Bromphenolblau) versetzt, gevortext und anschließend für 2 min bei 95°C im Heizblock denaturiert. Nachfolgend wurden die Proben sofort für 5 min eisgekühlt, um direkt im Anschluss auf das SSCP-Gel geladen zu werden.

3.1.6 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der einzelsträngigen DNA-Fragmente erfolgte in 0,6 × MDE-Gelen (2 × Mutation Detection Enhancement[®] Gel Solution, Biozym) unter Verwendung von 1 × Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE in bidestilliertem Wasser (Bidest), 89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA). Die Zusammensetzung der Lösung zur Herstellung der Polyacrylamidgele ist in Tabelle 8 zu finden.

Tabelle 8: Zusammensetzung eines 0,6 × MDE-Polyacrylamidgels

Komponente	Volumen
5 × TBE	10,2 ml
Bidest	25,5 ml
2 × MDE [®] -Lösung	15,3 ml
Ammoniumpersulfat (10 %ig [w/v] in Bidest)	210 µl
Tetramethylethyldiamin	21 µl

Zur Fixierung der Gele diente eine Polybond-Folie (TGGE PolyBond film, Whatman Biometra), die zwischen zwei übereinander mit Klammern befestigten Glasplatten positioniert wurde. Abstandhalter zwischen den Glasplatten boten Raum (Schichtdicke ca. 0,6 mm) für das Gießen der Gele. Während der zweistündigen Polymerisation waren die Gele mit wassergesättigtem n-Butanol überschichtet.

Für die Elektrophorese stand eine „TGGE-Maxi-Apparatur“ (Biometra) zur Verfügung. 0.1 %iges [v/v] Triton diente der Wärmeübertragung vom Thermoblock der Apparatur über die Polybond-Folie auf das Polyacrylamidgel. Unter Verwendung frei applizierbarer Silikontaschen (Biometra) wurden 18 µl je aufbereiteter SSCP-Probe auf das Gel geladen. Die elektrophoretische Auftrennung der Proben erfolgte über einen Zeitraum von 18 h bei einer konstanten Spannung von 350 V, maximaler Stromstärke und einer Temperatur von 26°C.

Speziesstandard

Zur Überprüfung des Einzelstrangverdaus und einer erfolgreich gelaufenen Elektrophorese wurde jedes SSCP-Gel zusätzlich mit einem Speziesstandard (Schmalenberger et al., 2001) beladen. Außerdem sollte dieser als Anhaltspunkt für die Laufhöhe einzelner Banden dienen, wenn innerhalb eines Gels Verschiebungen auftraten.

Für die Erstellung des Speziesstandards wurde aus den Genomen von *Bacillus licheniformis* (DSMZ¹ 13), *Rhizobium trifolii* (DSMZ 1980), *Flavobacterium johnsoniae* (DSMZ 2064) und *Rhizobium radiobacter* (DSMZ 30150) jeweils die V4V5-Region des 16S rRNA-Gens mit Hilfe der oben beschriebenen universellen Com-PCR amplifiziert. Daraufhin wurden die aufgereinigten PCR-Produkte der vier Organismen vereinigt und auf 14 µl aliquotiert. Schließlich erfolgten Einzelstrangverdau und Denaturierung des Speziesstandards parallel zu den zu untersuchenden Proben.

Optimierung der Elektrophoresebedingungen

Das Laufverhalten einzelsträngiger DNA im Polyacrylamidgel wird maßgeblich von der Temperatur beeinflusst (Glavac und Dean, 1993). Daher wurde zunächst geprüft, bei welcher Temperatur eine optimale Auftrennung der hier zu analysierenden Proben zu

¹ Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures)

erwarten war. Da das Gerät ursprünglich für die TGGE konzipiert wurde, war es möglich, dieselbe Probe auf einem SSCP-Gel bei verschiedenen Temperaturen (16-31°C) laufen zu lassen (Lieber et al., 2003). Hierfür wurde DNA aus Mikroorganismen extrahiert, die direkt aus dem Pansensaft der Spendertiere gewonnen worden waren (Abschnitt 3.1.1). Die Behandlung und Aufbereitung der Proben für die SSCP-Analyse erfolgte mit Ausnahme der PCR wie oben beschrieben. Auf eine gruppenspezifische PCR wurde hier verzichtet, da das allgemeine Laufverhalten der amplifizierten DNA-Fragmente aus den Pansenmikroben von Interesse war. Zudem wurde die extrahierte DNA für die PCR lediglich 1:10 verdünnt und die Reaktion in nur einer Wiederholung (50 µl) durchgeführt. Darüber hinaus wurden für die Amplifikation der V4V5-Region des 16S rRNA-Gens universelle Primer verwendet, die hinsichtlich ihrer Sequenz nur teilweise den in Tabelle 6 aufgeführten Primern entsprachen (Anhang, Tab. A3). Diese Primer waren im Zuge der Etablierung der SSCP-Methode am UFZ Leipzig von Lieber et al. (2003) in Anlehnung an Schwieger und Tebbe (1998) entwickelt und zunächst für diese Untersuchungen übernommen worden. Der Reaktionsansatz sowie die PCR-Bedingungen für die von Lieber et al. (2003) übernommenen Primer sind in Tabelle A3 angegeben.

Silberfärbung

Die Färbung der SSCP-Gele erfolgte mit Silbernitrat in Anlehnung an Bassam et al. (1991). Das verwendete Protokoll ist Tabelle A4 zu entnehmen. Im Anschluss an die Silbernitratfärbung wurden die SSCP-Profile mit Hilfe des „ScanMaker i 900“ (Microtek) und der Software „SilverFast“ (v.6.2.1r9) digitalisiert.

3.1.7 Extraktion von 16S rDNA-Fragmenten aus silbergefärbten SSCP-Gelen

Auswahl der SSCP-Banden

Bei der Auswahl der SSCP-Banden für die Sequenzanalysen stellte sich zunächst die Frage, inwieweit die Extraktion von 16S rDNA-Fragmenten aus dem SSCP-Profil einer Mischprobe zu repräsentativen Ergebnissen für eine entsprechend zu untersuchende Futtermischung führt. Zur Klärung dieser Frage wurde daher ein SSCP-Gel erstellt, anhand dessen eine vergleichende Sequenzanalyse zwischen Misch- und Einzelproben vorgenommen werden sollte. Da zu Beginn der eigenen Untersuchungen noch keine Proben aus dem oben beschriebenen Versuch (Abschnitt 3.1.1) zur Verfügung standen, musste auf Probenmaterial aus einer vorangegangenen *in vitro* Untersuchung

zurückgegriffen werden. Die Gewinnung und Aufbereitung der Proben erfolgte mit Ausnahme einiger PCR-Parameter (Anhang, Tab. A5) wie vorab beschrieben (Abschnitt 3.1). Da die Erstellung eines *Fibrobacter*-spezifischen SSCP-Gels angedacht war, wurden hierfür während der ersten PCR entsprechende Primer (Anhang, Tab. A5) verwendet. Die extrahierte DNA aus den Mikroorganismen kam in dieser PCR als 1:10er Verdünnung zum Einsatz. Beide PCR wurden jeweils in nur einer Wiederholung durchgeführt. Der Einzelstrangverdau erfolgte hier für ca. 400 ng aufgereinigtes PCR-Produkt je Probe.

Für die vergleichende Sequenzanalyse wurden aus dem *Fibrobacter*-spezifischen Gel vier SSCP-Banden gleicher Laufhöhe ausgewählt, die sowohl für die drei Einzelproben als auch für die Mischprobe aufgetreten waren.

Für alle weiteren Sequenzanalysen wurden vorwiegend SSCP-Banden aus den Profilen der Mischproben ausgewählt. War die Reamplifizierung von DNA aus der SSCP-Bande einer Mischprobe nicht möglich, musste auf die Banden in den Profilen der zugehörigen Einzelproben zurückgegriffen werden. Bearbeitet wurden SSCP-Banden, die entweder für alle Futtermischungen oder nur in Abhängigkeit einzelner Futterkomponenten bzw. der Futterpartikelgröße zu detektieren waren.

Extraktion der DNA

Die Extraktion der 16S rDNA-Fragmente aus den SSCP-Gelen erfolgte nach der durch Schwieger und Tebbe (1998) modifizierten „Crush and Soak“-Methode von Sambrook (2001). Dazu wurden die ausgewählten SSCP-Banden mit Hilfe hitzesterilisierter Skalpelle aus dem Gel ausgeschnitten, mit 50 µl „Crush and Soak“-Puffer (0,5 M Ammoniumacetat, 10 mM Magnesiumacetat, 1 mM EDTA, 0,1 % [w/v] Natriumdodecylsulfat (SDS)) versetzt und für 3 h bei 37°C und 800 rpm in einem Heizblock mit Schütteleinrichtung (Thermomixer comfort, Eppendorf) inkubiert. Nachfolgend wurden 40 µl der Lösung in 80 µl Ethanol (absolut) überführt und die enthaltene DNA über Nacht bei -20°C gefällt. Es folgte eine 15-minütige Zentrifugation bei 19000 × g und 4°C. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet innerhalb von 20 min bei 37°C im Heizblock getrocknet. Im Anschluss wurde die DNA in 15 µl reinem, nucleasefreiem Wasser resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

3.1.8 Reamplifikation und Klonierung

Reamplifikation

Für eine erfolgreiche Klonierung der extrahierten 16S rDNA-Fragmente aus den SSCP-Banden war zunächst ein weiterer PCR-Schritt zur Vervielfältigung der DNA erforderlich. Diese Reamplifikation der DNA erfolgte, wie zuvor die nested PCR zur Erstellung der SSCP-Proben, unter Verwendung der jeweiligen Com-Primer für *Bacteria* und *Archaea* (Tab. 6). Jedoch blieben die hier eingesetzten R-Primer unphosphoryliert, da andernfalls eine Hemmung der Ligase während des ersten Klonierungsschrittes zu erwarten gewesen wäre. Die Reamplifikation erfolgte in einem Reaktionsvolumen von je 50 µl. Die Reaktionsansätze für die einzelnen Gruppen sind in Tabelle 9 aufgeführt. Die PCR-Bedingungen entsprachen denen der oben beschriebenen nested PCR (Abschnitt 3.1.3).

Tabelle 9: Reaktionsansätze für die Reamplifikation der 16S rDNA-Fragmente aus den SSCP-Banden

	<i>Clostridia</i>	<i>Bacteroides- Prevotella</i>	<i>Archaea</i>
Reaktionsansatz:			
Taq PCR Master Mix Kit (Qiagen)	25 µl	25 µl	25 µl
f-Primer (10 mM)	1,5 µl	1 µl	1,25 µl
R-Primer (10 mM)	1,5 µl	1 µl	1,25 µl
Dimethylsulfoxid	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl
Magnesiumchlorid (25 mM)	3 µl	3 µl	3 µl
DNA (aus SSCP-Banden)	5-10 µl		
reines PCR-Wasser	6,5-12,5 µl		

Direkt im Anschluss an die Reaktion erfolgte zur Überprüfung der PCR-Produkte deren elektrophoretische Auftrennung im Agarosegel. Nach erfolgreicher Reamplifikation wurden die PCR-Produkte unter Verwendung des „MinElute[®] PCR Purification Kit“ (Qiagen) entweder direkt (*Clostridia*) oder präparativ (*Bacteroides-Prevotella*, *Archaea*) aufgereinigt. Die Elution der DNA erfolgte in 10 µl reinem, nucleasefreiem Wasser. Zur Überprüfung der Aufreinigung wurden jeweils 2 µl DNA-Eluat einer weiteren Agarosegelelektrophorese unterzogen. Für die anschließende Klonierung der PCR-

Produkte wurde eine Abschätzung der DNA-Menge in den Reamplifikaten anhand des Agarosegels unter Einbeziehung des 100-bp-Standards, der gleichzeitig Molmassesstandard ist, bildanalytisch vorgenommen. Hierfür wurde das Gel-Analyseprogramm „GeneTools“ (Syngene) verwendet.

Klonierung

Da nicht davon auszugehen war, dass jede der ausgeschnittenen SSCP-Banden nur eine Spezies repräsentierte (Schmalenberger und Tebbe, 2003), kam eine direkte Sequenzierung der Reamplifikate nicht in Frage. Eine Klonierung der 16S rDNA-Fragmente machte aber deren Vereinzelung aus den Reamplifikaten möglich. Die Klonierung erfolgte unter Verwendung des „TA Cloning[®] Kit“ der Firma Invitrogen entsprechend den Vorgaben des Herstellers. Je nach DNA-Konzentration im Eluat wurden 1-6 µl des aufgereinigten Reamplikates bei 14°C über Nacht in den pCR[®]2.1 Vektor ligiert. Anschließend wurden die Ligationsprodukte in chemisch kompetente *Escherichia coli*-Zellen (Hanahan, 1983) des Stamms DH5α transformiert und diese bei 37°C (Brutschrank, Heraeus) über Nacht inkubiert. Das hierfür vom Hersteller empfohlene S.O.C. Medium wurde durch das NZY-Medium (1 % [w/v] Pepton, 0,5 % [w/v] Hefeextrakt, 8,6 mM Natriumchlorid, 12,3 mM Magnesiumchlorid, 12,5 mM Magnesiumsulfat, 22 mM Glucose, pH 7,5) ersetzt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Petrischalen auf Luria-Bertani (LB)-Medium (DSMZ, Medium 381). Zur Unterdrückung des Wachstums von nicht transformierten Zellen wurde das Antibiotikum Kanamycin (50 µg/ml LB) verwendet. Die spätere Auswahl (Blau-Weiß-Selektion) von Zellkolonien (weiß), die ein rekombinantes Plasmid aufwiesen, wurde durch den Einsatz von 2 %igem [w/v] X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid) und 0,1 M IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalacto-pyranosid) ermöglicht. Jeweils 40 µl der beiden Lösungen wurden kurz vor Verwendung der Platten auf die Agaroberfläche des LB-Mediums aufgetragen. Je Agarplatte wurden ca. 60 µl des Transformationsansatzes ausgestrichen. Die Auswahl der positiven (weißen) *E. coli*-Klonkolonien erfolgte zufällig. Es wurden ca. 50-150 Klone je Ligationsansatz gepickt, erneut auf LB-Medium mit Kanamycin, X-Gal und IPTG ausgestrichen und über Nacht bei 37°C angezogen.

3.1.9 Restriktionsanalyse klonierter 16S rDNA-Fragmente (ARDRA)

Die Restriktionsanalyse der klonierten 16S rDNA-Fragmente, die im Weiteren auch als Klone bezeichnet werden, diente deren Auswahl zur Sequenzierung. Mit Hilfe der Restriktionsenzyme Alu I und Hae III sollte eine Differenzierung der Klone mit unterschiedlichen Inserts erfolgen. Ziel war die Einschränkung der Anzahl von Klonen, die für jede SSCP-Bande zu sequenzieren waren. Zunächst wurden hierfür 24 positive *E. coli*-Klonkolonien zufällig von den LB-Platten gepickt und über Nacht bei 37°C in 200 µl Flüssig-LB-Medium (50 µg Kanamycin/l) auf 96-Well-Mikrotiterplatten angezogen. Das Separieren der Zellen erfolgte im Anschluss durch eine 45-minütige Zentrifugation der Platten bei 3200 × g und 4°C in einer Tischkühlzentrifuge (Centrifuge 5810 R, Eppendorf). Nach der Zentrifugation wurde das überständige Medium verworfen. Die anschließende DNA-Extraktion aus den *E. coli*-Zellen erfolgte in Anlehnung an Orsini und Romano-Spica (2001) durch Mikrowellenaufschluss. Hierfür wurden die Zellen in 100 µl sterilem Bideest resuspendiert und über einen Zeitraum von 55 s bei 650 W in der Mikrowelle aufgeschlossen. Danach wurden die Aufschlüsse für 10 min auf Eis gestellt, bevor sich eine zweite Zentrifugation wie oben beschrieben anschloss. Letztlich wurde die extrahierte DNA in den Überständen in neue Mikrotiterplatten überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Für den geplanten Restriktionsverdau war zunächst ein weiterer PCR-Schritt erforderlich, um die in den Vektor ligierten 16S rDNA-Fragmente in ausreichenden Mengen zu amplifizieren. Darüber hinaus diente dieser PCR-Schritt einer Überprüfung der Ligation. Die PCR erfolgte unter Verwendung von Vektor-spezifischen M13-Primern (Tab. 10, MWG-Biotech). Mit Hilfe dieser Primer war die Amplifikation eines ca. 600 bp langen DNA-Fragmentes aus dem Vektor möglich, das das entsprechend ligierte 16S rDNA-Fragment beinhaltet. Der Reaktionsansatz für die PCR erfolgte zunächst in 12,5 µl (Tab. 10).

Tabelle 10: Sequenzen der M13-Primer sowie Reaktionsansatz und PCR-Bedingungen für die M13-PCR

Primer	Sequenz 5'-3'	
M13 f	TGT AAA ACG ACG GCC AGT	
M13 R	CAG GAA ACA GCT ATG ACC	
Reaktionsansatz:		
PCR Master Mix Kit (Promega)	6,25 µl	
f-Primer (10 mM)	0,5 µl	
R-Primer (10 mM)	0,5 µl	
DNA (aus <i>E. coli</i>)	0,5 µl	
reines PCR-Wasser	4,75 µl	
PCR-Bedingungen:		
initiale Denaturierung	5 min	95°C
Denaturierung	45 s	95°C
Primer-Annealing	45 s	55°C
Elongation	70 s	72°C
terminale Elongation	5 min	72°C
Zyklenzahl	25	

Im Folgenden wurde eine Überprüfung der PCR-Produkte nach deren elektrophoretischer Auftrennung im Agarosegel vorgenommen. Für den anschließenden Restriktionsverdau wurden nur diejenigen PCR-Produkte verwendet, die die entsprechend erwartete Länge von ca. 600 bp aufwiesen (20-24 Klone). Für alle anderen musste von einer fehlerhaften Ligation oder M13-PCR ausgegangen werden.

Der Verdau mit den Restriktionsenzymen Alu I und Hae III (New England BioLabs) erfolgte über Nacht bei 37°C in folgendem Reaktionsansatz:

- 7,5 µl steriles Bidest
- 0,25 µl Alu I (2,5 U)
- 0,25 µl Hae III (2,5 U)
- 1 µl 10 × Puffer (New England BioLabs)
- 1 µl M13-PCR-Produkt

Im Anschluss wurde der Verdau bei 65°C im Trockenschrank innerhalb von 10 min gestoppt und die Proben auf Eis gestellt. Kurz darauf wurden die verdauten PCR-Produkte mit jeweils 1 µl Ladepuffer versetzt und im 1,8 %igen [w/v] Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (Elektrophoreskammern: Sub-Cell® Model 192, Bio-Rad). Die Ethidiumbromidfärbung und Geldokumentation erfolgten wie bereits beschrieben (Abschnitt 3.1.2).

Für das *Fibrobacter*-spezifische Gel wurde im Rahmen der vergleichenden Sequenzanalyse jeweils ein Klon pro aufgetretenem Restriktionsmuster innerhalb einer SSCP-Bande zur Sequenzierung ausgewählt. Für alle weiteren SSCP-Gele richtete sich die Auswahl der Klone zunächst nach der Häufigkeit ihres Auftretens wie folgt: Trat ein Restriktionsmuster innerhalb einer SSCP-Bande für mehr als zwei Klone auf, dann wurde mindestens ein Klon zur Sequenzierung ausgewählt, für mehr als acht Klone mindestens zwei, für mehr als 13 Klone mindestens drei und für mehr als 18 Klone mindestens vier. Fanden sich für zwei Klone trotz gleicher Restriktionsmuster unterschiedliche Sequenzen, so wurden weitere Klone sequenziert, die das entsprechende Muster ebenfalls zeigten. Darüber hinaus kamen diejenigen Klone zur Sequenzierung, die ein Restriktionsmuster aufwiesen, das betrachtet über alle untersuchten SSCP-Banden innerhalb eines Gels nur einmal vorkam. Ebenso erfolgte ein Sequenzvergleich für Klone, die ein Restriktionsmuster zeigten, das in mehreren SSCP-Banden zu finden war.

Für die zur Sequenzierung ausgewählten Klone wurde anschließend die M13-PCR in einem 25-µl-Ansatz wie oben beschrieben wiederholt. Das erhaltene PCR-Produkt wurde im 1,5 %igen [w/v] Agarosegel überprüft und anschließend mit Hilfe des „Sure Clean Kit“ (Bioline) aufgereinigt. Die Elution erfolgte in 20 µl reinem, nucleasefreiem Wasser.

3.1.10 Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte nach dem Prinzip der Kettenabbruch-Synthese von Sanger et al. (1977) am DNA-Sequenzer „ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer“ (Applied Biosystems). Sequenziert wurden jeweils beide Komplementärstränge der DNA-Fragmente. Unter Verwendung des „BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit“ (Applied Biosystems) wurden daher für jedes der zu analysierenden

M13-PCR-Produkte zwei Sequenzieransätze in einem Reaktionsvolumen von je 10 µl erstellt (Tab. 11).

Tabelle 11: Reaktionsansatz und PCR-Bedingungen für die Sequenzierung

Reaktionsansatz:		
Big Dye (Applied Biosystems)	1 µl	
5 × Big-Dye-Puffer	2 µl	
M13-f-Primer <u>oder</u> M13-R-Primer (10 mM)	1 µl	
DNA (M13-PCR-Produkt)	3 µl	
Wasser (HPLC grade)	3 µl	
PCR-Bedingungen:		
initiale Denaturierung	30 s	96°C
Primer-Annealing	15 s	55°C
Elongation	4 min	60°C
Zyklenzahl	25	

Im Anschluss wurden die Produkte der Sequenzierreaktion mittels Ethanolfällung aufgereinigt. Hierfür wurden sie mit 80 µl HPLC-Wasser, 10 µl Natriumacetat (3 M, pH 4,6) und 250 µl Ethanol (absolut) versetzt und 15 min bei 16000 × g und Raumtemperatur zentrifugiert (Centrifuge 5415 C, Eppendorf). Das erhaltene Pellet wurde mit 300 µl Ethanol (70 %ig [v/v] in HPLC-Wasser) resuspendiert, 5 min bei 16000 × g und Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand verworfen. Daraufhin wurde das Pellet 15 min getrocknet und für die folgende Sequenzierung in 20 µl „Hi-Di™ Formamide“ (Applied Biosystems) aufgenommen.

3.1.11 Auswertung

Bildanalyse und statistische Auswertung

Die bildanalytische Auswertung der SSCP-Gele erfolgte mit Hilfe der Software „TotalLab“ (TL 120 v.2006, Nonlinear Dynamics) und „R“ (v.2.6.1, R Foundation for Statistical Computing, R Development Core Team, 2008).

Für jedes SSCP-Gel wurde zunächst mittels TotalLab das Auftreten bzw. Nicht-Auftreten einzelner Banden über alle Profile in Form eines binären Datensatzes zusammengefasst. Dieser diente im Folgenden als Grundlage zur Berechnung einer Ähnlichkeits- bzw. Distanzmatrix für die zu vergleichenden Einzelprofile des jeweiligen

SSCP-Gels. Die Ähnlichkeit zweier Profile sollte hier unter Verwendung des Jaccard-Index (S_J) (Jaccard, 1901) wie folgt beschrieben werden:

$$S_J = \frac{a}{a+b} \quad (1)$$

mit: a = Anzahl der in beiden Profilen gemeinsam aufgetretenen
SSCP-Banden
b = Anzahl der nicht in beiden Profilen gemeinsam aufgetretenen
SSCP-Banden

Das korrespondierende Distanzmaß (D_J), auf dessen Grundlage im Weiteren sowohl die bildanalytische als auch statistische Auswertung erfolgte, wurde wie nachstehend berechnet:

$$D_J = 1 - S_J \quad (2)$$

Für die graphische Darstellung der berechneten Distanzen zwischen den einzelnen Profilen eines SSCP-Gels wurde das Ordinationsverfahren der nichtmetrischen multidimensionalen Skalierung (NMDS) gewählt. Das Ziel der NMDS besteht in einer Reduzierung der Komplexität höherdimensionaler Daten durch deren geometrische Projektion im niedriger dimensionierten Raum. In diesem Raum soll die Konfiguration der zu betrachtenden Objekte weitgehend deren rechnerisch ermittelte Distanz wiedergeben. Die bildliche Darstellung kann beispielsweise in einem zweidimensionalen Diagramm erfolgen. Damit ermöglicht die NMDS eine Visualisierung von Distanzen zwischen Objekten. Die Ermittlung deren optimaler Konfiguration erfolgt hierbei über ein iteratives Verfahren. Während im Rahmen der metrischen MDS versucht wird, die ursprünglich ermittelten Distanzen zwischen den Objekten im Ordinationsraum zu bewahren (Leyer und Wesche, 2007), ist die von Shepard (1962a, b) entwickelte NMDS lediglich ein rangbasiertes Verfahren. Ausgangspunkt der NMDS ist eine Startkonfiguration der Objekte im n-dimensionalen Raum, die entweder zufällig gewählt ist oder das Ergebnis einer zuvor durchgeführten metrischen MDS darstellt. Für diese Startkonfiguration werden zunächst anhand der Koordinaten des Ordinationsraumes die jeweiligen Distanzen zwischen den Objekten erhoben und eine entsprechende Rangfolge gebildet. Hierbei wird der geringsten Distanz der niedrigste Rang zugeordnet. Weicht diese Rangfolge im Hinblick auf

diejenige der rechnerisch ermittelten Distanzen ab, so werden die einzelnen Objekte im Raum solange umpositioniert, bis die bestmögliche Konfiguration erlangt ist. Der hierfür verwendete Algorithmus geht auf Kruskal (1964a, b) zurück. Entspricht die Rangfolge der Distanzen in der Endkonfiguration einer NMDS der Rangfolge der zuvor rechnerisch ermittelten Distanzen zwischen den Objekten, so zeigt bei deren Vergleich im so genannten Shepard-Diagramm die Verbindung der Punkte einen monoton steigenden Verlauf (Backhaus et al., 2000). Inwiefern die ermittelte Endkonfiguration diese Monotoniebedingung erfüllt, wird durch das so genannte Stress-Maß angegeben. Vereinfacht ausgedrückt beschreibt der Stress die Abweichung der für die NMDS erhobenen Distanzen gegenüber den tatsächlich ermittelten Distanzen. Je höher der Stresswert ausfällt, desto weniger lassen sich die eigenen Daten differenzieren und umso schlechter ist die Güte der ermittelten Konfiguration einzuschätzen. Daher wird der Stress gleichzeitig als Zielkriterium für die Optimierung herangezogen (Kruskal, 1964a). Er kann Werte zwischen 0 und 1 annehmen. Für einen Stress-Wert nahe Null ist von einer relativ guten Übereinstimmung zwischen den während der NMDS erhobenen und den tatsächlich ermittelten Distanzen auszugehen. Der durch das Verfahren der NMDS bedingte Informationsverlust zu Distanzen einzelner Objekte ist in diesem Falle gering. Dem entgegen deutet ein Stress nahe 1 auf einen sehr hohen Informationsverlust hin und lässt eine Interpretation des erhaltenen NMDS-Plots nicht zu. Da das Iterationsverfahren der NMDS lediglich eine Bestimmung lokaler Minima zulässt, ist eine wiederholte Durchführung der NMDS mit unterschiedlichen Startkonfigurationen notwendig, um sich dem globalen Minimum zu nähern.

Die Erstellung der NMDS-Plots für die Distanzmatrizen der SSCP-Gele erfolgte in dieser Arbeit unter „R“ mit Hilfe des Paketes „vegan“ (v.1.8.8, Oksanen, 2008). Unter Verwendung der Prozedur „metaMDS“ war eine wiederholte Berechnung der NMDS-Plots ausgehend von mehreren zufällig gewählten Startkonfigurationen möglich. Die Darstellung erfolgte im zweidimensionalen Diagramm.

Da im Rahmen der NMDS die Ordinationsachsen im Diagramm keinen direkt interpretierbaren Zusammenhang mit den Variablen zeigen (Leyer und Wesche, 2007), können mögliche Einflüsse verschiedener Umweltvariablen nur bedingt nachvollzogen werden. Um die Interpretation der NMDS-Plots zu erleichtern, wurden daher in einem zweiten Schritt die Rohnährstoffgehalte der Futtermischungen, die Futterpartikelgröße sowie der pH-Wert im Fermenter als mögliche Einflussvariablen in die Analysen einbezogen. *Post hoc* wurden hierfür die entsprechend erhobenen Werte mit Hilfe der

„R“-Prozedur „envfit“ über die Ordination gelegt und deren Korrelationen mit den Aufnahmewerten der Ordination nach Pearson berechnet. Die Überprüfung der Korrelationen auf Signifikanz ($p \leq 0,05$) erfolgte auf Grundlage von 1000 zufälligen Permutationen des Datensatzes. Eine signifikant mit der Ordination korrelierte Einflussvariable wird im Diagramm als Vektor dargestellt, dessen Richtung jeweils die größte Änderung der Variable beschreibt. Seine relative Länge im Vergleich zu Vektoren anderer Einflussvariablen hingegen deutet auf die Stärke der Änderung hin und gibt damit Auskunft über die Höhe der Korrelation. Auf diesem Weg war es möglich, die Richtung und Stärke der Auswirkung hier betrachteter Einflussvariablen in Beziehung zu den beobachteten SSCP-Profilen zu setzen (Leyer und Wesche, 2007).

Über die beschriebene explorative Datenanalyse hinaus wurde der Einfluss der Faktoren Futtermischung und Futterpartikelgröße auf die SSCP-Profile der hier untersuchten Mikrobengruppen im Weiteren nach McArdle und Anderson (2001) und Anderson (2001) geprüft. Die Autoren schlagen für den Vergleich von Organismengemeinschaften unter ökologischen Aspekten ein nichtparametrisches Verfahren vor, dem das Prinzip der mehrfaktoriellen MANOVA (multivariate analysis of variance) zu Grunde gelegt ist. Hierbei erfolgt die additive Zerlegung der Varianzen entsprechend der Einflussfaktoren direkt anhand der berechneten Distanzen von Objekten bzw. Gemeinschaften. Zur Ermittlung von Varianzanteilen wird hier die Summe der quadrierten Distanzen bezogen auf die Anzahl zu vergleichender Objekte einer Gruppe verwendet. Da aber im Falle der eigenen Daten weder von einer Normalverteilung der Variablen (hier: SSCP-Banden im jeweiligen Profil) noch von deren gegenseitiger Unabhängigkeit auszugehen war, konnten tabellierte Quantile der F-Verteilung zur Bestimmung signifikanter Unterschiede zwischen den Behandlungen nicht genutzt werden (Anderson, 2001). Allerdings kann für einen solchen Datensatz mit Hilfe von Permutationen eine statistische Verteilung unter Annahme der Nullhypothese generiert werden (u.a. Manly, 1997), was eine Berechnung weiterer F-Werte ermöglicht. Diese können im Anschluss mit dem für die realen Daten bestimmten F-Wert verglichen werden. Die entsprechende Irrtumswahrscheinlichkeit p für eine fälschliche Ablehnung der Nullhypothese nach Anderson (2001) ist dann wie folgt zu ermitteln:

$$p = \frac{(\text{Anzahl der } F^{\Pi} \geq F)}{(\text{Gesamtzahl der } F^{\Pi})} \quad (3)$$

mit: F^{Π} = F-Werte unter Permutationen
 F = F-Wert für realen Datensatz

Da für komplexe Datensätze eine Durchführung aller möglichen Permutationen kaum praktikabel ist, empfehlen die Autoren, basierend auf den Angaben von Manly (1997), die Realisierung von 1000 bzw. 5000 Permutationen für Tests mit einem angestrebten Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ bzw. $0,01$. Der von den Autoren vorgeschlagene paarweise Vergleich einzelner Behandlungen folgt dem Prinzip des multiplen t-Tests und wird ebenfalls direkt anhand der ermittelten Distanzen vorgenommen. Da aber für die eigenen Untersuchungen lediglich drei Beobachtungen je Behandlung vorlagen, war die Anzahl möglicher Permutationen für die paarweisen Vergleiche zu gering, um mit Hilfe des oben beschriebenen Permutationstests p-Werte $< 0,1$ berechnen zu können (Anderson, 2005). Alternativ war aber die Generierung signifikanter p-Werte unter einer Monte-Carlo-Simulation nach Anderson und Robinson (2003) möglich.

Rechnerisch umgesetzt wurde das beschriebene Verfahren unter Verwendung des Programms „PERMANOVA“ (Anderson, 2005). Die Analyse erfolgte wie für die NMDS auf Basis des Jaccard-Index (1). Auf eine vorherige Transformation und Standardisierung der Daten wurde verzichtet. Da für die Auswertung nur relativ wenige Beobachtungen je Variante zur Verfügung standen, wurde die Permutation von Rohdaten gewählt (Gonzalez und Manly, 1998). Die Anzahl der Permutationen wurde auf 1000 beschränkt, da ein Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ als ausreichend erachtet wurde.

Sequenzanalyse

Die Elektropherogramme der 16S rDNA-Teilsequenzen wurden computergestützt mit Hilfe der Software „Sequencing Analysis“ (v.3.7, Applied Biosystems) ausgewertet. Das Verkürzen der DNA-Fragmente um die Vektorsequenzen sowie das Zusammenfügen der sequenzierten Komplementärstränge erfolgte im Anschluss unter Verwendung der Software „AutoAssembler“ (v.2.1, Applied Biosystems). Letztlich wurden die Sequenzen für ihre weitere Verwendung ins FASTA-Format überführt.

Die phylogenetische Einordnung der 16S rDNA-Teilsequenzen erfolgte sowohl über deren direkten Vergleich mit der RDP-Datenbank als auch mit Hilfe des

Softwarepaketes „ARB“ (Ludwig et al., 2004, v. ARBuntu 1.0). Die Ermittlung nächster Verwandter innerhalb der RDP-Datenbank findet unter Zerlegung der Sequenzen in 7 bp lange Oligonukleotide statt. Zur Berechnung eines Ähnlichkeitswertes (S_{ab} score) für zwei zu vergleichende Sequenzen wird zunächst die Anzahl deren einzigartiger, gemeinsam auftretender Oligonukleotide bestimmt. Außerdem wird für jede der beiden Sequenzen die Gesamtzahl einzigartig aufgetretener Oligonukleotide ermittelt. Letztlich wird die Anzahl gemeinsamer, einzigartiger Oligonukleotide durch diejenige Gesamtzahl einzigartiger Oligonukleotide der beiden Sequenzen dividiert, die geringer ausfiel. Diese Vorgehensweise erlaubt u.a. den Vergleich von Sequenzen unterschiedlicher Länge. Der ermittelte S_{ab} score nimmt Werte zwischen 0 und 1 an. Je höher er ausfällt, desto geringer ist die phylogenetische Entfernung zweier Sequenzen einzuschätzen.

Für eine phylogenetische Einordnung unter ARB wurden die Sequenzen zunächst in die für den Zeitpunkt der Bearbeitung aktuelle SILVA-Datenbank SSU Ref Release 92 (Oktober 2007, Pruesse et al., 2007) importiert und unter Verwendung der Funktion „fast aligner“ gegen die gesamte Datenbank abgeglichen. Im Anschluss wurden die Sequenzen unter Nutzung der ARB-Funktion „quick add pasimony“ additiv in den bestehenden Stammbaum der SILVA-Datenbank eingerechnet. Hierbei wurde für die Sequenzen der *Clostridia*- und *Bacteroides-Prevotella*-Gruppe der *Bacteria*-spezifische Filter und für die *Archaea*-Sequenzen der Filter für *Archaea* verwendet. Notwendige Korrekturen des Alignments erfolgten manuell anhand der Sequenzdaten des jeweils ermittelten nächsten Verwandten. Abschließend wurden die korrigierten Sequenzen erneut in den hinterlegten Stammbaum eingerechnet. Die Überprüfung der Sequenzen auf chimäre Strukturen erfolgte mit Hilfe der Programme „Chimera Check“ (v.2.7, Cole et al., 2003) und „Bellerophon“ (Huber et al., 2004).

3.2 Ergebnisse

Das Ziel der SSCP-Analyse bestand vordergründig in der Detektion von möglichen Unterschieden zwischen den untersuchten Mikroorganismengemeinschaften, die auf die beiden zu prüfenden Faktoren Futtermischung und Futterpartikelgröße zurückgeführt werden können. Des Weiteren geben die SSCP-Profile aber auch Aufschluss über die strukturelle Diversität der untersuchten Organismengruppen in einer Probe. Die Sequenzanalyse für ausgewählte 16S rDNA-Fragmente aus einzelnen SSCP-Banden

sollte zusätzlich Informationen zum Auftreten einzelner Organismen in Abhängigkeit der jeweiligen Behandlung liefern.

Dem eigentlichen Versuchsansatz vorausgehend wurden methodische Details wie die optimale Temperatur bei der Gelelektrophorese und die Möglichkeit der Verwendung von Mischproben bei der Sequenzanalyse geklärt, die nachfolgend kurz dargestellt werden sollen.

3.2.1 Optimierung der Temperaturführung für die Gelelektrophorese

Zur Erstellung von SSCP-Profilen, die eine optimale Auftrennung der einzelsträngigen 16S rDNA-Fragmente zeigen, war zunächst die Ermittlung der optimalen Elektrophorese-Temperatur erforderlich. Mit Hilfe der für die Gelelektrophorese verwendeten „TGGE-Maxi-Apparatur“ war das Anlegen eines Temperaturgradienten perpendicular zur Laufrichtung der DNA möglich. Abbildung 2 zeigt verschiedene SSCP-Profile eines PCR-Produktes, das unter Verwendung der von Lieber et al. (2003) modifizierten Com-Primer aus der DNA von Mikroorganismen erhalten wurde, die direkt aus dem Pansen der Spendertiere gewonnen worden waren.

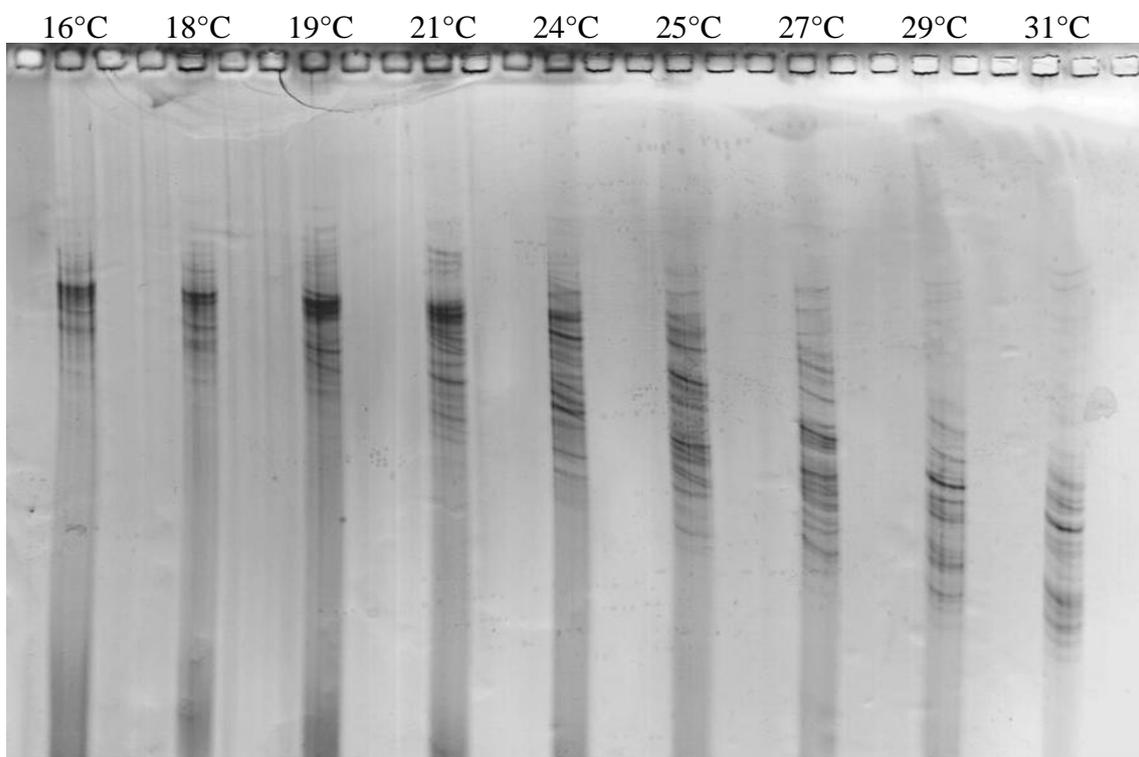


Abbildung 2: Temperaturabhängige Auftrennung einzelsträngiger 16S rDNA-Fragmente (V4V5) im Polyacrylamidgel: SSCP-Profile für ein DNA-Extrakt aus Mikroorganismen, die direkt aus dem Pansen der Spendertiere gewonnen wurden

Deutlich wird, dass die Auftrennung der einzelsträngigen PCR-Produkte temperaturabhängig variiert. Während Temperaturen im Bereich von 16-24°C zu keiner ausreichenden Auftrennung führten, lassen sich bei mehr als 27°C trotz guter Auftrennung einige Banden im SSCP-Profil nur schwer detektieren. Die beste Auftrennung der DNA bei gleichzeitig guter Bandenerkennung ist für den Bereich zwischen 25-27°C festzustellen. Daher wurde im Hinblick auf die eigenen Proben eine Elektrophorese-Temperatur von 26°C als optimal erachtet und nachfolgend verwendet.

3.2.2 Vergleichende Sequenzanalyse für Misch- und Einzelproben

Die vergleichende Sequenzanalyse von 16S rDNA-Fragmenten aus SSCP-Profilen von Misch- und Einzelproben diente zur Klärung der Frage, inwiefern unter Verwendung von Mischproben anstatt der drei einzelnen Wiederholungen eine Verringerung des Arbeitsaufwands hinsichtlich der Sequenzanalysen bei gleichem Informationsgewinn möglich war. Abbildung 3 zeigt einen Ausschnitt des hierfür erstellten *Fibrobacter*-spezifischen SSCP-Gels, das anhand von Probenmaterial aus einem vorangegangenen *in vitro* Versuch angefertigt wurde.

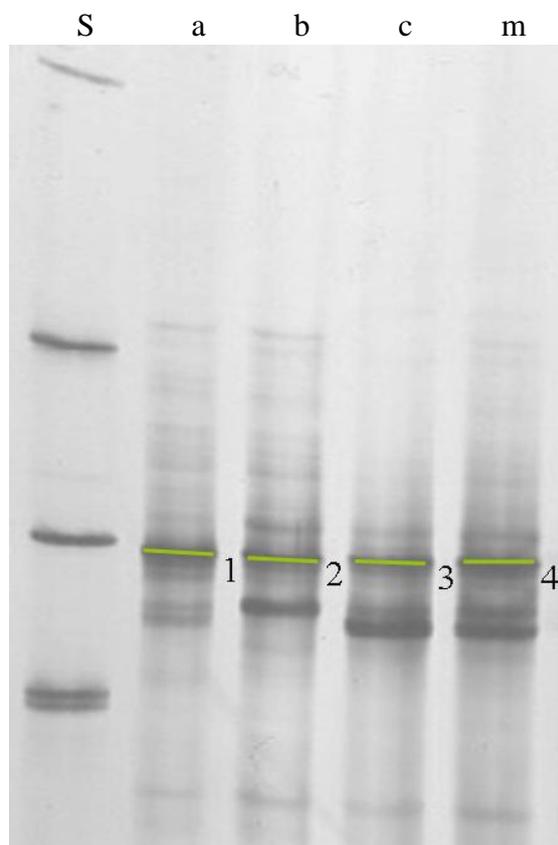


Abbildung 3: *Fibrobacter*-spezifische SSCP-Profile für Misch- und Einzelproben extrahierter DNA aus Mikroorganismen, die im Rahmen einer Pansensimulation aus den Überläufen der drei Wiederholungen für ein zu prüfendes Futter gewonnen wurden, S: Speziesstandard, a-c: Einzelproben, m: Mischprobe, 1-4: zur Sequenzanalyse gewählte SSCP-Banden

Im Vergleich zu den einzelnen Wiederholungen (a-c) konnte für die entsprechende Mischprobe (m) der DNA ein ähnliches SSCP-Profil beobachtet werden. Die in Abbildung 3 grün markierten Banden 1-4 waren in allen vier Profilen auf gleicher Laufhöhe zu detektieren und wurden daher für die vergleichende Sequenzanalyse herangezogen.

Die Ergebnisse der ARDRA sowie der vergleichenden Sequenzanalyse sind in Tabelle 12 zusammengefasst. Während für die SSCP-Banden 1 und 2 lediglich ein Restriktionsverdau von 23 M13-PCR-Produkten aus positiven Klonen zu realisieren war, standen für die Banden 3 und 4 jeweils 24 Klone zur Verfügung. Erwartungsgemäß war für jede der vier SSCP-Banden mehr als nur ein Restriktionsmuster festzustellen. Die SSCP-Banden 1, 2 und 3 zeigten für die untersuchten Klone zwei bis sechs verschiedene ARDRA-Muster, in Bande 4 wurden sieben gefunden. Damit war die höchste Variabilität hinsichtlich der Restriktionsmuster für die Mischprobe festzustellen. Für jedes innerhalb einer Bande detektierte Muster wurde stellvertretend ein Klon zur Sequenzierung gewählt. Die entsprechend ermittelten Sequenzen der analysierten 16S rDNA-Fragmente sind dem Anhang zu entnehmen (Tabelle A7). Klone, deren Sequenzen chimäre Strukturen aufwiesen, sind in Tabelle 12 sowie in den Tabellen 13-15 und A9-A11 grau unterlegt. Waren für eine Sequenz innerhalb der RDP-Datenbank mehr als drei nächste Verwandte mit gleichem Ähnlichkeitswert zu ermitteln, so wird in den entsprechenden Tabellen unter dem Hinweis „und andere“ (u.a.) nur jeweils ein nächster Verwandter aufgeführt. Aus Tabelle 12 geht hervor, dass bei einem Vergleich der Sequenzen mit der RDP-Datenbank mindestens 50 % der für eine Bande analysierten Klone dem Genus *Succiniclacticum* innerhalb der *Firmicutes* zugeordnet werden konnten. Auffallend war das in allen vier Banden relativ häufige Auftreten eines Restriktionsmusters, für das stellvertretend die Klone F_1_A1, F_2_B4, F_3_F7 und F_4_A10 analysiert wurden. Daher war zunächst von einer Dominanz der für diese Klone ermittelten Sequenzen in den vier SSCP-Banden auszugehen. Wie spätere Analysen aber zeigten, können gleiche Restriktionsmuster durchaus unterschiedliche Sequenzen repräsentieren (Vergleich 4.2.4), weshalb nicht uneingeschränkt von einer Sequenz auf diejenigen der anderen Klone mit gleichem Restriktionsmuster zu schließen war. Dennoch lag die Vermutung nahe, dass es sich hier um sehr ähnliche Sequenzen handeln musste, da für die vier stellvertretend analysierten Klone von der RDP-Datenbank die gleichen nächsten Verwandten ausgewiesen wurden. Selbige nächste Verwandte wurden darüber hinaus auch für Klone

mit abweichendem Restriktionsmuster angegeben. Der entsprechende Sequenztyp schien demnach sowohl in den Einzel- als auch in der Mischprobe relativ häufig vorgekommen zu sein, was für eine Verwendbarkeit der Mischproben sprach. Zudem fand sich in Bande 3 ein weiteres Restriktionsmuster, das ebenfalls in Bande 4 detektiert werden konnte. Beide Klone zeigten die gleichen nächsten Verwandten. Die dominante Sequenz in Bande 3 stellte seinem Restriktionsmuster nach der Klon F_3_C7. Wenn auch dasselbe Muster in Bande 4 nicht zu detektieren war, so konnte zumindest einem Klon mit abweichendem Restriktionsmuster der gleiche nächste Verwandte zugeordnet werden. Vier weitere Sequenzen aus den Banden 1-3 waren allerdings anhand der hier untersuchten Klone in Bande 4 nicht nachzuweisen. Der Häufigkeit des Auftretens ihrer Restriktionsmuster nach spielten sie aber nur eine untergeordnete Rolle für die Präsenz der jeweiligen Bande. Damit bleibt festzuhalten, dass die in den Banden 1-3 dominanten Sequenzen in Bande 4 durch ähnliche oder gleiche Sequenzen repräsentiert wurden. Lediglich selten in den Banden 1-3 aufgetretene Sequenzen waren hier nicht zu detektieren. Demzufolge wurde im Weiteren, sofern möglich, auf eine Bearbeitung der SSCP-Banden aus den Profilen der Einzelproben verzichtet und den Mischproben der Vorzug gegeben.

Wie die Ergebnisse der vergleichenden Sequenzanalyse außerdem erkennen ließen, war mit Hilfe der hier verwendeten Primer keine spezifische Amplifikation von 16S rDNA der *Fibrobacter*-Spezies möglich. Daher fanden diese Primer zur Erstellung gruppenspezifischer SSCP-Gele im Folgenden keine Anwendung.

Tabelle 12: RDP-Resultate für die vergleichende Sequenzanalyse von Klonen aus den Banden 1-4 des *Fibrobacter*-spezifischen SSCP-Gels

Klon	Häufigkeit des Restriktionsmusters	S _{ab} score	nächster Verwandter	Taxonomische Einordnung
F_1_A1	20	0,97	uncultured rumen bacterium; BF7; AY244885 u.a.	<i>Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Veillonellaceae; Succiniclasticum</i>
F_1_G3	3	0,93	uncultured rumen bacterium; P5_H09; EU381831	
F_2_B4	17	0,97	uncultured rumen bacterium; BF7; AY244885 u.a.	<i>Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Veillonellaceae; Succiniclasticum</i>
F_2_C4	3	0,97	uncultured rumen bacterium; BF7; AY244885 u.a.	
F_2_A5	1	0,90	uncultured rumen bacterium; BF7; AY244885 u.a.	
F_2_G5	1	0,92	uncultured rumen bacterium; BF7; AY244885 u.a.	
F_2_F5	1	0,91	uncultured bacterium; NED4H6; EF445289	<i>Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Ruminococcaceae; unclassified</i>
F_3_C7	11	0,98	uncultured rumen bacterium; band F10; AM493704	<i>Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Veillonellaceae; Succiniclasticum</i>
F_3_F7	6	0,96	uncultured rumen bacterium; BF7; AY244885 u.a.	
F_3_E9	1	0,88	uncultured rumen bacterium; BF7; AY244885 u.a.	
F_3_B7	1	0,91	uncultured bacterium; GRANT41; AY858420 u.a.	<i>Firmicutes; Clostridia; unclassified</i>
F_3_B8	3	0,94	uncultured bacterium; 1; EU126850	
F_3_G7	2	0,78	uncultured bacterium; B1_401; EU764455 u.a.	<i>Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Ruminococcaceae; unclassified</i>
F_4_A10	15	0,97	uncultured rumen bacterium; BF7; AY244885 u.a.	<i>Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Veillonellaceae; Succiniclasticum</i>
F_4_G12	1	0,86	uncultured rumen bacterium; band F10; AM493704	
F_4_C12	1	0,94	uncultured rumen bacterium; YRC72; EU259448 u.a.	
F_4_B10	3	0,91	uncultured bacterium; GRANT41; AY858420	<i>Firmicutes; Clostridia; unclassified</i>
F_4_F12	1	0,68	uncultured bacterium; 1103200827165; EU842689 u.a.	
F_4_D10	1	0,71	uncultured bacterium; 1103200823390; EU843186 u.a.	<i>Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Ruminococcaceae; Papillibacter</i>
F_4_H11	2	0,93	uncultured bacterium; CAP_aah97f07; EU459465	<i>Bacteroidetes; Bacteroidetes; Bacteroidales; unclassified</i>

3.2.3 Gruppenspezifische SSCP-Profile

Für die Untersuchung der Zusammensetzung mikrobieller Gemeinschaften aus dem unter Abschnitt 3.1.1 beschriebenen Versuch wurden im Rahmen dieser Arbeit spezifische SSCP-Profile für die Organismengruppen *Clostridium*-Cluster XIV a und b, *Bacteroides-Prevotella* und *Archaea* erstellt. Betrachtet wurden lediglich die Proben aus den Überläufen der Pansensimulation. Der Vergleich der SSCP-Profile für die verschiedenen Behandlungen erfolgte innerhalb jeder Organismengruppe. Hierfür wurden auf jeweils ein Gel neben dem Speziesstandard die drei Wiederholungen jeder Behandlung sowie die dazugehörigen Mischproben aufgetragen. Die Überführung der SSCP-Profile in binäre Datensätze erfolgte unter Berücksichtigung aller auf einem Gel erkennbaren Banden. Verglichen wurden die jeweiligen SSCP-Profile eines Gels auf Basis der Jaccard-Distanz. Die graphische Darstellung der Distanzen zwischen den Profilen wurde anhand von NMDS-Plots realisiert.

Im Folgenden werden für jedes gruppenspezifische SSCP-Gel die Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen den Profilen aller Behandlungen herausgearbeitet. Darüber hinaus wird die Wiederholbarkeit der SSCP-Profile von Einzel- und Mischproben näher betrachtet. Die farblichen Markierungen in den Abbildungen der SSCP-Gele (Abb. 4, 6, 8) kennzeichnen die zur Sequenzanalyse ausgewählten Banden. Grün markiert sind hierbei diejenigen Banden, die in den SSCP-Profilen aller Behandlungen auftraten. Die rot markierten Banden hingegen ließen sich nur für einige Behandlungen nachweisen.

Clostridia-spezifische SSCP-Profile

Die spezifischen SSCP-Profile für die *Clostridium*-Cluster XIV a und b sind in Abbildung 4 dargestellt. Der überwiegende Teil der Banden in den SSCP-Profilen war in allen Behandlungen zu finden (u.a. 1, 2, 4, 5, 9, 10, 11, 13). Bei näherer Betrachtung sind aber auch Banden zu erkennen, die nur für wenige oder einzelne Behandlungen auftraten (3, 7, 8, 12, 14). Bande 3 zeigte sich beispielsweise nur in den Maissilage enthaltenden Futtermischungen I und III der Futterpartikelgröße 1 mm. Darüber hinaus konnte Bande 7 ebenfalls in der 4-mm-Variante der Mischung I nachgewiesen werden. Die SSCP-Banden 6 und 8 waren hingegen für beide Futterpartikelgrößen in den Maissilage enthaltenden Mischungen vertreten. Außerdem zeigte sich Bande 6 auch für die 1-mm-Variante der Grassilage-betonten Mischung V.

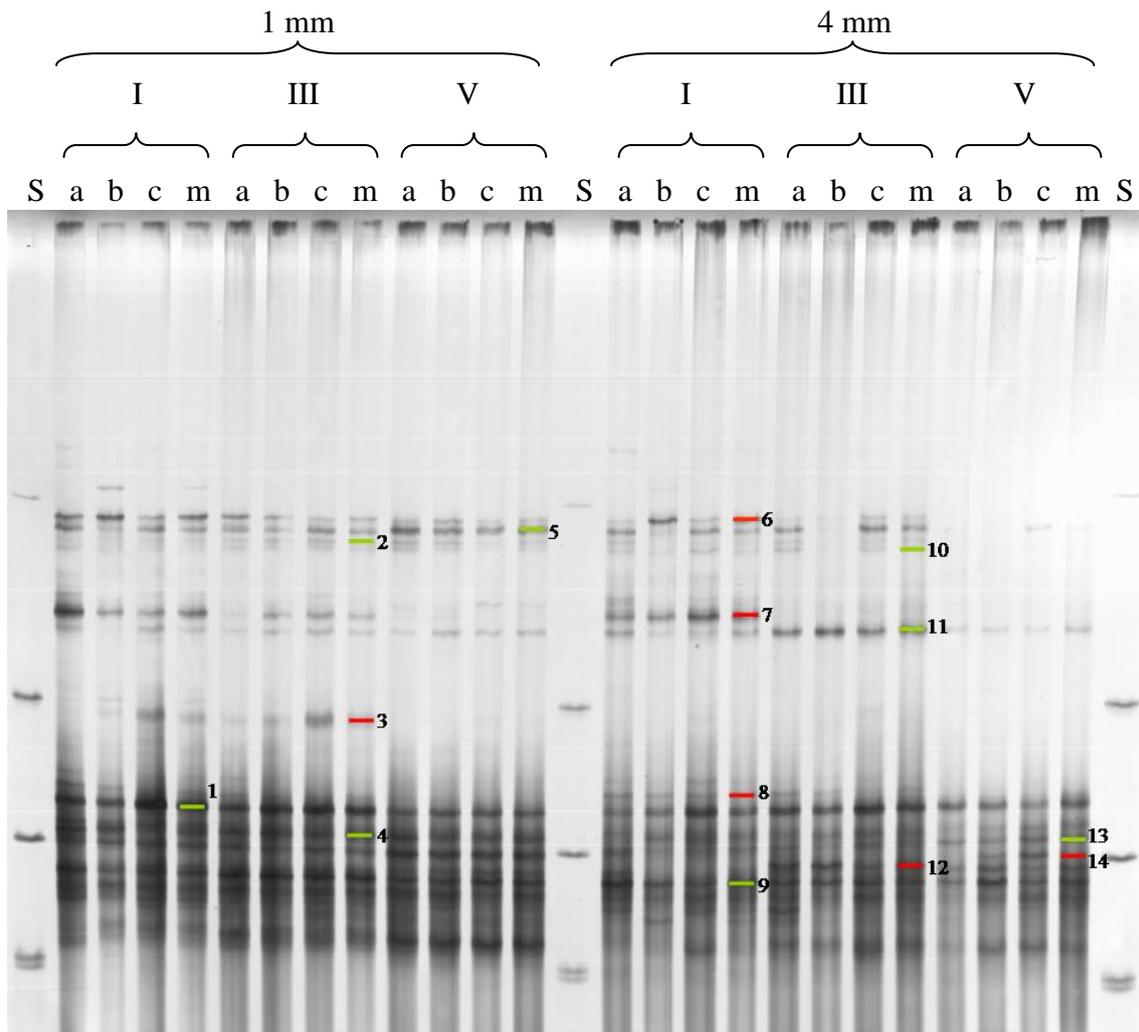


Abbildung 4: *Clostridia*-spezifische SSCP-Profile amplifizierter 16S rDNA-Fragmente von Mikroorganismen, die aus den Überlaufproben der Pansensimulation zur Prüfung des Einflusses von Futtermischung (I, III, V) und Futterpartikelgröße (1 und 4 mm) gewonnen wurden, S: Speziesstandard, a-c: Wiederholungen einer Behandlung = Einzelproben, m: Mischprobe einer Behandlung

Die Banden 12 und 14 waren nur für die Futterpartikelgröße 4 mm zu detektieren. Während erstere in beiden Grassilage enthaltenden Mischungen vorkam, war letztere ausschließlich in Mischung V zu finden.

Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungen zeigten sich auch bei Betrachtung der mittleren Bandenanzahl je SSCP-Profil für die drei Wiederholungen. Tendenziell war entsprechend der oben dargestellten Reihenfolge eine Abnahme der Bandenanzahl von Futtermischung I der Futterpartikelgröße 1 mm bis hin zur 4-mm-Variante der Futtermischung V zu beobachten. Während für die erstgenannte Variante 29 Banden gezählt wurden, waren in letzterer nur noch 17 zu detektieren. Unter Einbeziehung der Mischproben bot sich ein ähnliches Bild.

Die NMDS-Plots für das *Clostridia*-spezifische SSCP-Gel finden sich in Abbildung 5. Während der linke Plot unter Berücksichtigung der Mischprobenprofile (m) erstellt wurde, erfolgte die Berechnung des rechten Plots ohne deren Einbeziehung. Für letzteren wurde außerdem eine *post hoc* Vektoranpassung verschiedener Umweltvariablen (Rohnährstoffgehalte der Futtermischungen, NDF, ADF, Futterpartikelgröße, pH-Wert bei Versuchende) über die drei unabhängigen Wiederholungen (a-c) jeder Behandlung vorgenommen.

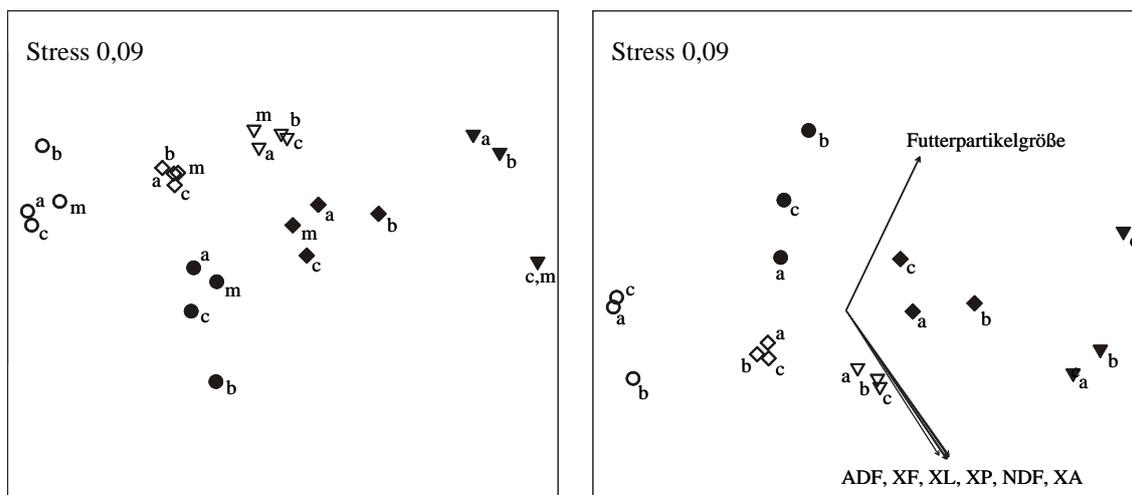


Abbildung 5: NMDS-Plots für das *Clostridia*-spezifische SSCP-Gel basierend auf der Jaccard-Distanz (○: Futtermischung I, ◇: Futtermischung III, ▽: Futtermischung V, weiß: 1 mm, schwarz: 4 mm), links: Einbeziehung aller SSCP-Profile; rechts: Ausschluss der Mischproben (m) zur *post hoc* Vektoranpassung verschiedener Umweltvariablen über die drei unabhängigen Wiederholungen (a-c) jeder Behandlung

Zunächst einmal zeigen die beiden NMDS-Plots eine deutliche Gruppierung der drei Wiederholungen jeder Behandlung, denen außerdem, wie im linken Bild deutlich wird, das SSCP-Profil der jeweiligen Mischprobe zugeordnet werden konnte. Des Weiteren ist eine klare Trennung der SSCP-Profile von Futtermischungen unterschiedlicher Futterpartikelgröße festzustellen. Darüber hinaus lassen die Plots ungeachtet der Futterpartikelgröße einen Gradienten von der Maissilage-betonten Futtermischung I über die Zwischenvariante III zur Grassilage-betonten Mischung V erkennen. Die Richtung der Vektoren für die *post hoc* über die Ordination gelegten Umweltgradienten bestätigte diese Deutung der Plots. Sowohl die einzelnen Rohnährstoff-, NDF- und ADF-Gehalte der Futtermischungen als auch die Futterpartikelgröße korrelieren signifikant mit den Aufnahmewerten der Ordination ($p \leq 0,05$). Mit steigendem Gehalt

an ADF, XF, XL, NDF, XP und XA (Vergleich 2.2, Tab. 2) wird eine ähnlich gerichtete Veränderung der *Clostridia*-spezifischen SSCP-Profile für die Futtermischungen III und V im Vergleich zu Mischung I ersichtlich. Außerdem zeigte sich eine gleichgerichtete Veränderung der Profile bei Erhöhung der Futterpartikelgröße von 1 auf 4 mm. Da die Länge aller Vektoren vergleichbar ist, kann von einer ähnlich starken Beeinflussung der SSCP-Profile durch diese Umweltvariablen ausgegangen werden. Ein Einfluss des bei Versuchsende gemessenen pH-Wertes war nicht zu beobachten.

Die statistische Auswertung der Daten nach McArdle und Anderson (2001) bestätigt die Ergebnisse der NMDS. Sowohl für die Futtermischung ($p = 0,001$) als auch für die Futterpartikelgröße ($p = 0,03$) konnte ein signifikanter Einfluss auf die *Clostridia*-spezifischen SSCP-Profile festgestellt werden. Des Weiteren wurde eine deutliche Interaktion beider Faktoren beobachtet ($p = 0,001$). Der im Anschluss durchgeführte paarweise Vergleich lieferte für alle betrachteten Behandlungen ebenfalls signifikante Unterschiede (Monte Carlo p -Wert $\leq 0,05$).

Bacteroides-Prevotella-spezifische SSCP-Profile

Die spezifisch für die Gruppe der *Bacteroides-Prevotella* erstellten SSCP-Profile sind in Abbildung 6 dargestellt. Im Vergleich zu denen der *Clostridia* (Abb. 4) zeigten die Profile hier ein weniger eindeutiges Bild. Lediglich drei SSCP-Banden (2, 11, 12) ließen sich für alle Behandlungen bzw. Proben detektieren. Für eine ganze Reihe von Banden konnte ein behandlungsabhängiges Auftreten beobachtet werden. Die SSCP-Banden 1, 3, 5 und 9 waren beispielsweise vorwiegend für die Maissilage enthaltenden Futtermischungen I und III zu finden, wobei Bande 9 für die 1-mm-Variante der Mischung I nicht auftrat. Dem entgegen konnte SSCP-Bande 10 ausschließlich für die Futtermischung I der Futterpartikelgröße 4 mm nachgewiesen werden. Bande 4 erschien für die feinere Mischung III sowie teilweise für die Grassilage-betonten Mischungen. Die Bande 15 trat nur für die vorwiegend Grassilage enthaltende Futtermischung V der 4-mm-Variante auf. Darüber hinaus war Bande 13, wenn auch nur schwach, in allen anderen Grassilage enthaltenden Futtermischungen ebenfalls zu erkennen. Ein relativ universelles Auftreten zeigten die Banden 6, 7, 8 und 14, die nur in den SSCP-Profilen der grober vermahlenden Futtermischung I fehlten bzw. hier sehr schwach ausfielen.

Die mittlere Bandenzahl für die einzelnen Wiederholungen jeder Behandlung betrug 12-19 Banden. Es wurden keine Unterschiede zwischen den beiden

Futterpartikelgrößen, jedoch für die drei Futtermischungen ersichtlich. Die Futtermischung I zeigte hier die geringste Bandenanzahl, während die Mischung III die höchste erkennen ließ.

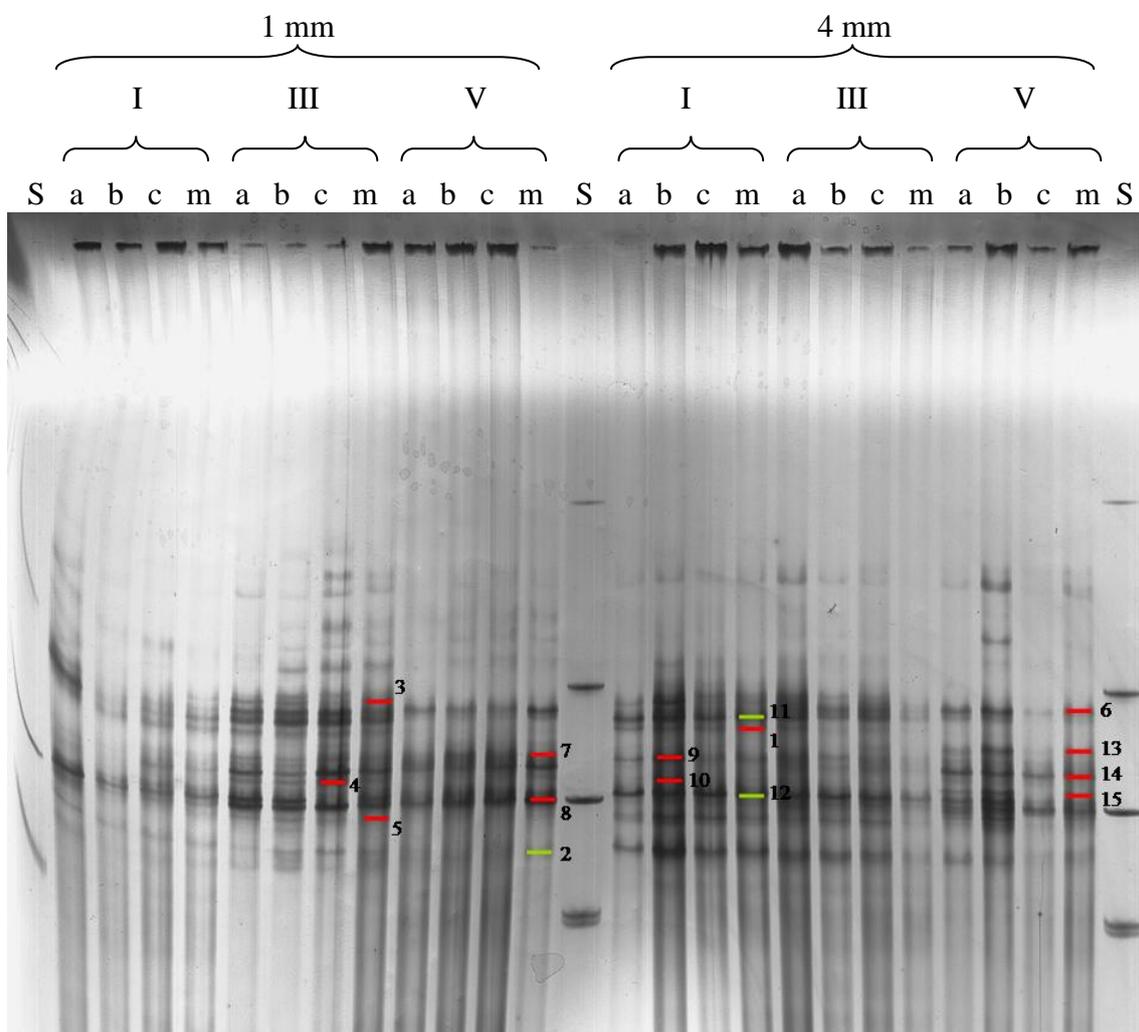


Abbildung 6: *Bacteroides-Prevotella*-spezifische SSCP-Profile amplifizierter 16S rDNA-Fragmente von Mikroorganismen, die aus den Überlaufproben der Pansensimulation zur Prüfung des Einflusses von Futtermischung (I, III, V) und Futterpartikelgröße (1 und 4 mm) gewonnen wurden, S: Speziestandard, a-c: Wiederholungen einer Behandlung = Einzelproben, m: Mischprobe einer Behandlung

In den NMDS-Plots der *Bacteroides-Prevotella*-spezifischen SSCP-Profile zeigte sich, wenn auch weniger deutlich als im Falle der *Clostridia*, ebenfalls eine Gruppierung der jeweils drei Wiederholungen jeder Behandlung (Abb. 7). Auch hier ist eine relativ gute Zuordnung der einzelnen Mischproben zu den entsprechenden Einzelproben erkennbar (Abb. 7, oben). Der für die *Clostridia*-spezifischen SSCP-Profile bereits beschriebene Gradient über die Futtermischungen war auch für die Gruppe der

Bacteroides-Prevotella zu beobachten. Die Rohnährstoff-, NDF- und ADF-Gehalte in den Futtermischungen korrelieren signifikant mit den Aufnahmewerten der Ordination ($p \leq 0,05$). Dies deutete auch für die Gruppe der *Bacteroides-Prevotella* auf eine gleichgerichtete Veränderung der SSCP-Profile in Abhängigkeit des Mais- bzw. Grassilageanteils in der Futtermischung. Ein gerichteter Effekt der Futterpartikelgröße sowie des pH-Wertes war allerdings anhand der dargestellten NMDS-Plots für den zweidimensionalen Raum nicht festzustellen.

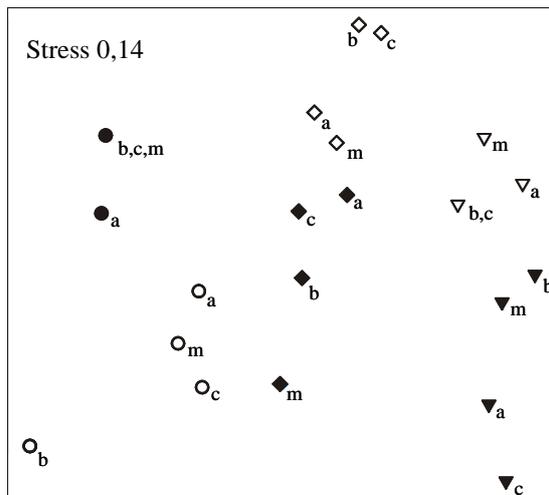
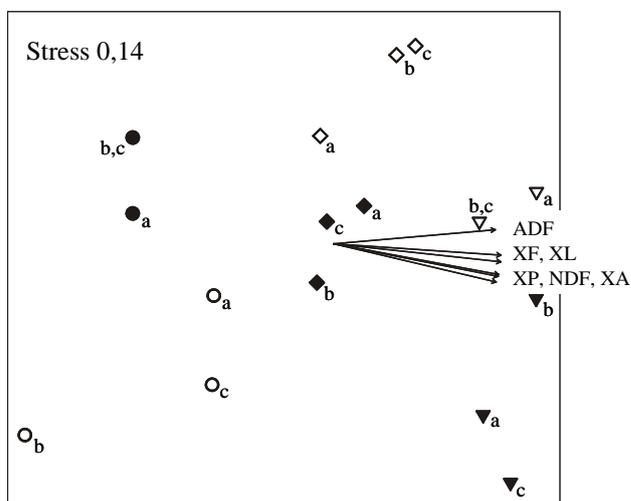


Abbildung 7: NMDS-Plots für das *Bacteroides-Prevotella*-spezifische SSCP-Gel basierend auf der Jaccard-Distanz (\circ : Futtermischung I, \diamond : Futtermischung III, ∇ : Futtermischung V, weiß: 1 mm, schwarz: 4 mm), oben: Einbeziehung aller SSCP-Profile; unten: Ausschluss der Mischproben (m) zur *post hoc* Vektoranpassung verschiedener Umweltvariablen über die drei unabhängigen Wiederholungen (a-c) jeder Behandlung



Die Auswertung der Daten nach McArdle und Anderson (2001) ließ wie zuvor für die *Clostridia* auf einen signifikanten Einfluss der Futtermischung sowie auch der Futterpartikelgröße auf die SSCP-Profile der *Bacteroides-Prevotella*-Gruppe schließen ($p = 0,001$). Auch hier interagierten beide Faktoren deutlich ($p = 0,001$). Der paarweise Vergleich einzelner Behandlungen zeigte ebenfalls ausschließlich signifikante Unterschiede (Monte Carlo p-Wert $\leq 0,05$).

Archaea-spezifische SSCP-Profile

Die spezifischen SSCP-Profile für die Domäne der *Archaea* finden sich in Abbildung 8. Deutlich zu erkennen auf diesem Gel sind die vier, zum Teil relativ starken SSCP-Banden 1, 3, 8 und 9, die behandlungsunabhängig für nahezu alle Proben detektiert wurden.

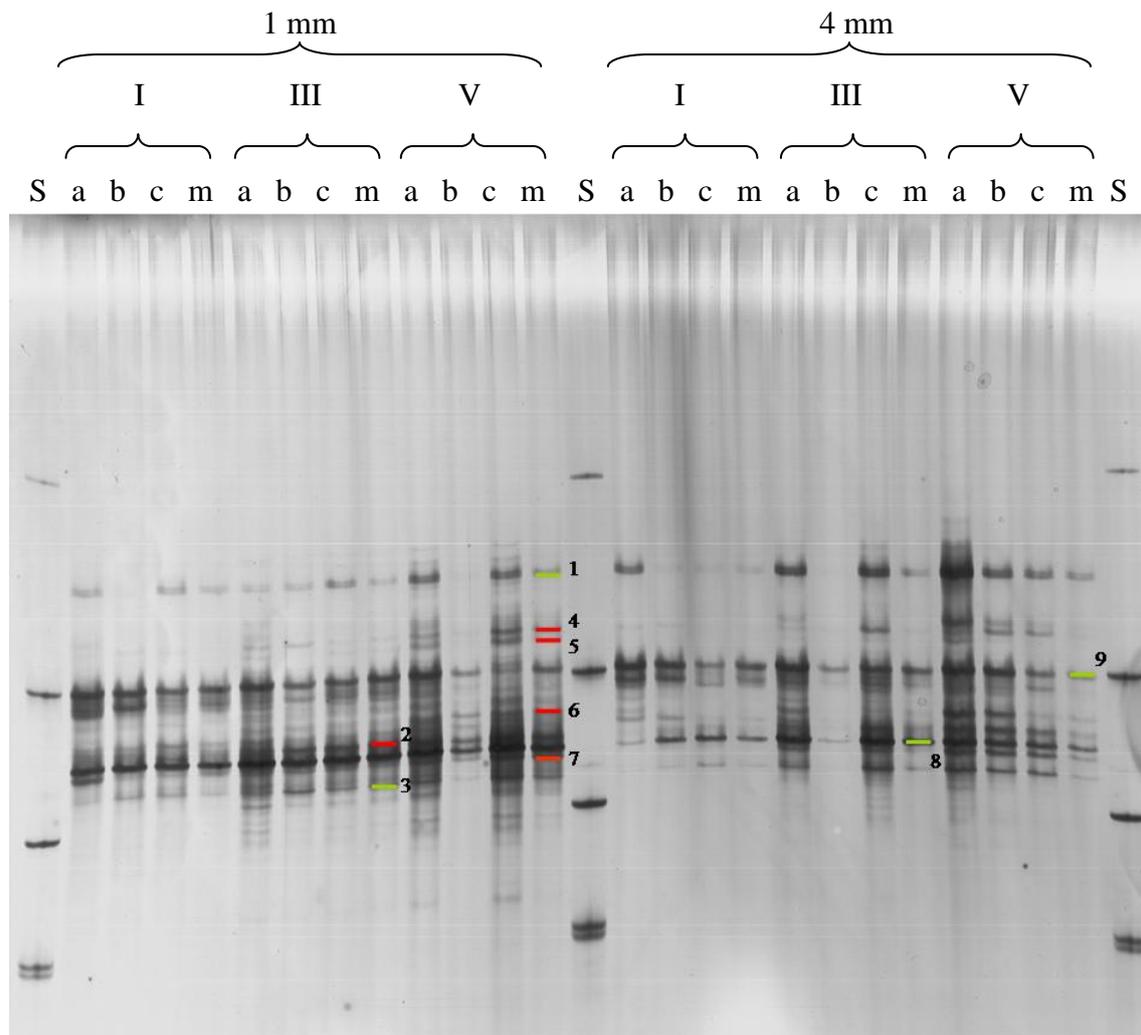


Abbildung 8: *Archaea*-spezifische SSCP-Profile amplifizierter 16S rDNA-Fragmente von Mikroorganismen, die aus den Überlaufproben der Pansensimulation zur Prüfung des Einflusses von Futtermischung (I, III, V) und Futterpartikelgröße (1 und 4 mm) gewonnen wurden, S: Speziestandard, a-c: Wiederholungen einer Behandlung = Einzelproben, m: Mischprobe einer Behandlung

Die SSCP-Banden 2, 4, 5, 6 und 7 dagegen waren vorrangig für die Grassilage enthaltenden Futtermischungen nachzuweisen, wobei letztere auch für die 1-mm-Variante der Maissilage-betonten Futtermischung I in Erscheinung trat.

Für den überwiegenden Teil aller übrigen Banden bleibt ein relativ uneinheitliches Auftreten festzuhalten, das keinen direkten Zusammenhang mit den hier geprüften Einflussfaktoren erkennen ließ. Die mittlere Bandenzahl für die SSCP-Profile der drei Wiederholungen jeder Behandlung lag hier zwischen 10 und 24, wobei für die Futterpartikelgröße 1 mm im Durchschnitt mehr Banden gefunden wurden als für die 4-mm-Variante. Außerdem zeigten die SSCP-Profile der Grassilage enthaltenden Futtermischungen eine erhöhte Bandenzahl gegenüber den Maissilage-betonen Mischungen.

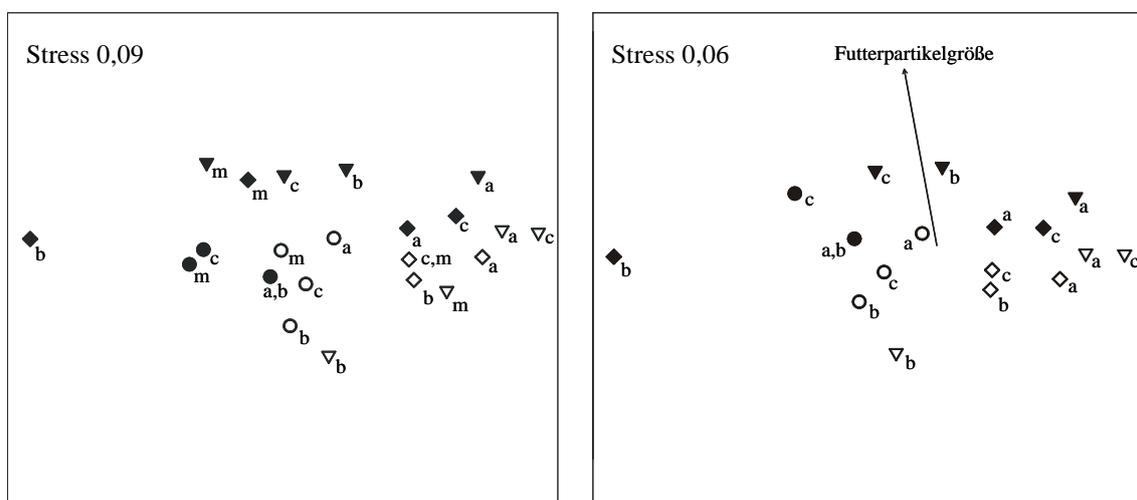


Abbildung 9: NMDS-Plots für das *Archaea*-spezifische SSCP-Gel basierend auf der Jaccard-Distanz (○: Futtermischung I, ◇: Futtermischung III, ▽: Futtermischung V, weiß: 1 mm, schwarz: 4 mm), links: Einbeziehung aller SSCP-Profile; rechts: Ausschluss der Mischproben (m) zur *post hoc* Vektoranpassung verschiedener Umweltvariablen über die drei unabhängigen Wiederholungen (a-c) jeder Behandlung

Die NMDS-Plots für das *Archaea*-spezifische SSCP-Gel in Abbildung 9 lassen eine erkennbare Gruppierung der SSCP-Profile einzelner Behandlungen lediglich für die beiden Maissilage-betonen Futtermischungen sowie für die Mischung III der Futterpartikelgröße 1 mm zu. Die übrigen Behandlungen zeigten ein bis zwei Ausreißer, deren relativ große Distanz zu den anderen SSCP-Profilen der jeweiligen Behandlung bereits in Abbildung 8 deutlich wird. Hier war zu beobachten, dass die SSCP-Profile für die Proben V/b/1 mm, III/b/4 mm und III/m/4 mm vergleichsweise schwach ausfielen, während sich das Profil der Probe V/a/4 mm relativ stark abzeichnete.

Ein Gradient hinsichtlich der Futtermischungen, wie er zuvor für die *Clostridia* und *Bacteroides-Prevotella* beschrieben wurde, konnte anhand der NMDS-Plots für die

Archaea-spezifischen Profile nicht nachvollzogen werden. Allerdings wird eine räumliche Trennung der Futtermischungen unterschiedlicher Futterpartikelgröße im NMDS-Plot ersichtlich. Das Bild der *post hoc* über die Ordination gelegten Umweltvariablen bestätigt diese Beobachtung (Abb. 9, rechts). Hier wird eine gerichtete Veränderung der SSCP-Profile mit zunehmender Futterpartikelgröße erkennbar ($p \leq 0,05$). Ein Zusammenhang zwischen dem pH-Wert im Fermenter sowie den Rohnähstoff-, NDF- und ADF-Gehalten im Futter und der Veränderung der Profile bestand allerdings nicht. Dennoch zeigte die Auswertung der Daten nach McArdle und Anderson (2001) außer für die Futterpartikelgröße ($p = 0,03$) auch einen signifikanten Einfluss der Futtermischung ($p = 0,01$) auf die *Archaea*-spezifischen SSCP-Profile. Eine Interaktion beider Faktoren wurde aber nicht nachgewiesen ($p = 0,37$). Der im Anschluss durchgeführte paarweise Vergleich einzelner Behandlungen zeigte signifikante Unterschiede für die Futtermischungen I und III innerhalb der Futterpartikelgröße 1 mm sowie für die Mischungen I und V der 4-mm-Variante (Monte Carlo p -Wert $\leq 0,05$). Deutliche Unterschiede im Hinblick auf die Futterpartikelgröße waren hier lediglich für die SSCP-Profile der Maissilage-betonten Futtermischung I nachzuweisen (Monte Carlo p -Wert $\leq 0,05$).

3.2.4 Sequenzanalyse ausgewählter 16S rDNA-Amplifikate

Zur Klärung der Frage, welche Organismen zum Auftreten einzelner SSCP-Banden in den *Clostridia*-, *Bacteroides-Prevotella*- und *Archaea*-spezifischen Profilen geführt hatten, wurden insgesamt 38 Banden aus den drei SSCP-Gelen zur Sequenzanalyse ausgewählt (Abb. 4, 6 und 8). Die enthaltenen 16S rDNA-Fragmente wurden extrahiert und reamplifiziert, um sie im Anschluss klonieren und sequenzieren zu können. Die Vorauswahl der Klone zur Sequenzierung erfolgte im Rahmen einer ARDRA unter Verwendung der Restriktionsenzyme Alu I und Hae III. Im Ergebnis des Restriktionsverdau waren für 20-24 untersuchte Klone je SSCP-Bande 5-12 verschiedene Restriktionsmuster zu erkennen, was im Folgenden die Sequenzierung mehrerer Klone je Bande erforderte (2-9). Ausgewählt wurden Klone, die ein relativ häufig oder einzigartig aufgetretenes Restriktionsmuster aufwiesen. Von insgesamt 876 der ARDRA unterzogenen Klonen wurden letztlich 216 sequenziert. Die ermittelten 16S rRNA-Teilsequenzen dieser Klone sind dem Anhang zu entnehmen (Tabelle A8). Die Ergebnisse zu deren phylogenetischer Einordnung mit Hilfe der RDP-Datenbank

sind in den Tabellen 13-15 und A9-A11 aufgeführt. Die für einige Sequenzen unter ARB erstellten Teilstammbäume finden sich in den Abbildungen 10-12.

Das Ergebnis der Sequenzanalyse machte zunächst deutlich, dass ein Großteil der SSCP-Banden durch Sequenzen repräsentiert wurde, die mehreren Phyla zugeordnet werden konnten. Die SSCP-Bande 11 des *Bacteroides-Prevotella*-spezifischen Gels wies beispielsweise Sequenzen aus den drei Phyla *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* und *Proteobacteria* auf (Tab. A10). Demgegenüber war aber auch festzustellen, dass identische Sequenzen wie die der Klone B_3_A8 und B_13_B2 oder die der Klone B_5_E1 und B_15_C7 in SSCP-Banden unterschiedlicher Laufhöhe auftraten, welche zudem entweder nur für die Mais- oder Grassilage enthaltenden Futtermischungen detektiert werden konnten (Abb. 6, Tab. A10). Darüber hinaus zeigte sich, dass eine Reihe von Klonen aus sowohl spezifisch als auch universell aufgetretenen SSCP-Banden denselben nächsten Verwandten zuzuordnen waren. Die entsprechenden Resultate für den Vergleich dieser 16S rRNA-Teilsequenzen mit der RDP-Datenbank sind den Tabellen A9-A11 zu entnehmen ebenso wie die phylogenetische Einordnung aller übrigen Sequenzen, die für die universellen SSCP-Banden ermittelt wurden. Die in den Tabellen 13-15 und Abbildungen 10-12 aufgeführten Klone stammen dagegen alle aus spezifisch aufgetretenen SSCP-Banden und weisen Sequenzen auf, deren nächste Verwandte in den universellen Banden nicht nachzuweisen waren.

Der Vergleich von ARDRA- und Sequenzdaten machte deutlich, dass Klone einer SSCP-Bande, deren Verdau gleiche Restriktionsmuster lieferte, zum Teil unterschiedliche Sequenzen aufwiesen, während andere mit abweichendem ARDRA-Muster durchaus ähnliche Sequenzen zeigten. Für die Klone A_6_F4 und C4 wurden beispielsweise trotz gleicher Restriktionsmuster nächste Verwandte ermittelt, die sogar unterschiedlichen Domänen angehören (Tab. 15, Abb. 12). Die Klone C_3_D7 und G7 waren dagegen trotz unterschiedlichen Verdau denselben nächsten Verwandten zuzuordnen (Tab. 13).

Sequenzanalyse für ausgewählte SSCP-Banden der *Clostridia*-spezifischen Profile

Wie anhand von Abbildung 4 nachzuvollziehen ist, wurden aus den *Clostridia*-spezifischen SSCP-Profilen sechs spezifisch und acht universell aufgetretene Banden zur Sequenzanalyse ausgewählt. Die Sequenzierung erfolgte für 76 Klone. 49 von ihnen wurden den *Firmicutes*, 23 den *Proteobacteria*, zwei den *Bacteroidetes* und einer den *Acidobacteria* zugeordnet (Tab. 13, A9). Ein weiterer Klon konnte lediglich

der Domäne der *Bacteria* zugewiesen werden (Tab. A9). Innerhalb des Phylums der *Firmicutes* erwiesen sich alle 49 Klone als Zugehörige der Ordnung *Clostridiales*, 47 davon waren der Familie der *Lachnospiraceae* zuzuordnen. Von den 23 Klonen, die nahe Verwandte unter den *Proteobacteria* zeigten, konnten sechs als *Alpha*-, neun als *Beta*-, sechs als *Gamma*- und zwei als nicht näher zu klassifizierende *Proteobacteria* identifiziert werden. Für die beiden zum Phylum der *Bacteroidetes* gehörenden Klone waren die nächsten Verwandten unter den *Sphingobacteriaceae* zu finden. Der als einziger den *Acidobacteria* zuzuordnende Klon C_14_D7 ist in Tabelle 13 aufgeführt, da er aus einer spezifisch aufgetretenen SSCP-Bande stammt und sein nächster Verwandter in keiner der universellen Banden aller drei SSCP-Gele nachzuweisen war. Er zeigte nahe Verwandtschaft zu einem bisher nicht kultivierten Bakterium, das dem Genus *Gp3* innerhalb der *Acidobacteriaceae* angehört und erstmals in organisch gedüngtem Boden gefunden wurde. Die nächsten Verwandten aller übrigen Klone, die für das *Clostridia*-spezifische SSCP-Gel nur für einzelne Behandlungen zu detektieren waren, erwiesen sich ebenfalls als bisher nicht kultivierte Organismen, die in erster Linie den *Lachnospiraceae* zuzuordnen waren. Der überwiegende Teil dieser Organismen wurde erstmals im Verdauungstrakt verschiedener Wiederkäuer und monogastrischer Tiere nachgewiesen (Tab.13).

Über die in Tabelle 13 aufgeführten Klone hinaus waren für die spezifisch aufgetretenen SSCP-Banden 3, 6, 7, 8 und 14 aber auch solche zu detektieren, deren nächste Verwandte ebenfalls für Klone aus universellen Banden ermittelt wurden (Tab. A9-A11). Lediglich in SSCP-Bande 12 fand sich kein Klon, dessen nächster Verwandter in irgendeiner der universellen Banden nachgewiesen werden konnte.

Wenn auch für den Großteil aller untersuchten SSCP-Banden des *Clostridia*-spezifischen Gels Klone detektiert wurden, deren nächste Verwandte auch für Klone aus anderen SSCP-Banden standen, so kann dennoch festgehalten werden, dass, ausgenommen Bande 3, jede der betrachteten Banden mindestens einen Klon erkennen ließ, dessen nächster Verwandter in keiner der anderen Banden gefunden wurde.

Tabelle 13: RDP-Resultate für Sequenzen von spezifisch (behandlungsabhängig) aufgetretenen Klonen aus den SSCP-Banden 6, 7, 8 und 14 des *Clostridia*-spezifischen SSCP-Gels

Klon	S_ab score	nächster Verwandter	Accession Nummer	Herkunft	Taxonomische Einordnung
C_6_F5	0,97	uncultured bacterium; FAC81	DQ451520	Waldboden	<i>Proteobacteria</i> ;; <i>Gammaproteobacteria</i> ; unclassified
C_7_A7	0,98	uncultured bacterium; 1103200828862	EU845451	Pansen: Rind	<i>Firmicutes</i> ; <i>Clostridia</i> ; <i>Clostridiales</i> ; <i>Lachnospiraceae</i> ; unclassified.
C_7_A9	0,82				
C_7_F8	0,98				
C_7_D8	0,83				
C_7_D7	0,89				
C_8_C2	0,94	uncultured bacterium; 1103200822104	EU844987	Pansen: Rind	<i>Firmicutes</i> ; <i>Clostridia</i> ; <i>Clostridiales</i> ; <i>Lachnospiraceae</i> ; unclassified
C_8_B1	0,91	uncultured bacterium; RHSD_aaa04h11	EU775950	Kot: Klippschliefer	
		uncultured bacterium; RHSD_aaa04h11_1	EU777964		
C_8_H1	0,94	uncultured bacterium; RHSD_aaa04h11	EU775950	Kot: Klippschliefer	
		uncultured bacterium; RHSD_aaa04h11_1	EU777964		
C_8_B3	0,84	uncultured bacterium; 1103200828862	EU845451	Pansen: Rind	
C_8_G3	0,81	uncultured bacterium; 1103200822304	EU845063	Pansen: Rind	<i>Firmicutes</i> ; <i>Clostridia</i> ; <i>Clostridiales</i> ; <i>Lachnospiraceae</i> ; <i>Butyrivibrio</i>
		unidentified rumen bacterium JW28	AF018556		
C_12_F3	0,99	uncultured alpha proteobacterium; SSCP Band j	AM269463	Boden	<i>Proteobacteria</i> ; <i>Alphaproteobacteria</i> ; <i>Sphingomonadales</i> ; <i>Sphingomonadaceae</i> ; <i>Sphingomonas</i>
C_12_A1	0,89	uncultured bacterium; SJTU_B_16_42	EF403060	Darm: Mensch	<i>Firmicutes</i> ; <i>Clostridia</i> ; <i>Clostridiales</i> ; <i>Lachnospiraceae</i> ; <i>Roseburia</i>

Fortsetzung Tabelle 13:

Klon	S_ab score	nächster Verwandter	Accession Nummer	Herkunft	Taxonomische Einordnung
C_12_H1	0,95	uncultured bacterium; RB146	AB240313	Rhizosphäre: Schilfrohr	<i>Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Methylococcales; Methylococcaceae; Methylomonas</i>
C_12_B1	0,97	uncultured bacterium; 1103200827222	EU842707	Pansen: Rind	<i>Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Lachnospiraceae; unclassified</i>
		uncultured rumen bacterium 3C3d-8	AB034063		<i>Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Lachnospiraceae; Roseburia</i>
		uncultured bacterium; 1103200830978	EU843476		<i>Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Lachnospiraceae; unclassified</i>
C_12_E2	0,97	uncultured bacterium; 1103200827222	EU842707		<i>Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Lachnospiraceae; unclassified</i>
		uncultured rumen bacterium 3C3d-8	AB034063		<i>Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Lachnospiraceae; Roseburia</i>
		uncultured bacterium; 1103200830978	EU843476		<i>Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Lachnospiraceae; unclassified</i>
C_12_G1	0,98	uncultured bacterium; 1103200827222	EU842707		<i>Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Lachnospiraceae; unclassified</i>
		uncultured rumen bacterium 3C3d-8	AB034063		<i>Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Lachnospiraceae; Roseburia</i>
		uncultured bacterium; 1103200830978	EU843476		<i>Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Lachnospiraceae; unclassified</i>
C_14_C9	0,82	uncultured bacterium; 1103200825046	EU842522	Pansen: Rind	<i>Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Lachnospiraceae; Pseudobutyrvibrio</i>
C_14_G7	0,84	uncultured bacterium; 014B-G12 u.a.	DQ905615	Kot: Mensch	<i>Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Lachnospiraceae; unclassified</i>
C_14_D7	0,93	uncultured <i>Firmicutes</i> bacterium; GASP-WC2S2_A06	EF074967	Boden	<i>Acidobacteria; Acidobacteria; Acidobacteriales; Acidobacteriaceae; Gp3</i>
C_14_A7	0,86	unidentified rumen bacterium JW11	AF018547	Pansen: Rind	<i>Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Lachnospiraceae; Lachnospiraceae Incertae Sedis</i>
C_14_H7	0,83	uncultured bacterium; L7-15	AJ400253	Dickdarm: Maus	
		uncultured bacterium; L7-1	AJ400247		

Sequenzanalyse für ausgewählte SSCP-Banden der *Bacteroides-Prevotella*-spezifischen Profile

Wie aus Abbildung 6 hervorgeht, erfolgte die Sequenzanalyse für das *Bacteroides-Prevotella*-spezifische SSCP-Gel anhand von 12 spezifisch und drei universell aufgetretenen SSCP-Banden. Insgesamt wurden 83 Klone zur Sequenzierung ausgewählt, von denen letztlich nur acht dem Phylum der *Bacteroidetes* zugeordnet werden konnten. Sechs davon waren ausschließlich in den spezifisch aufgetretenen SSCP-Banden 4, 8, 10 und 15 nachzuweisen. Während einer dieser Klone innerhalb der Ordnung der *Bacteroidales* nicht näher zu klassifizieren war (Abb. 10), konnten die anderen fünf dem Genus *Prevotella* zugeordnet werden (Abb. 11). Wie den Abbildungen 10 und 11 zu entnehmen ist, wurden die nächsten Verwandten dieser Klone alle erstmals im Pansen von Rindern nachgewiesen. Die beiden übrigen der zu den *Bacteroidetes* gehörenden Klone zeigten nahe Verwandtschaft zu einem nicht kultivierten Bakterium aus der Ordnung der *Spingobacteriales*, stammten aber sowohl aus einer universell als auch einer spezifisch aufgetretenen SSCP-Bande (Tab. A10).

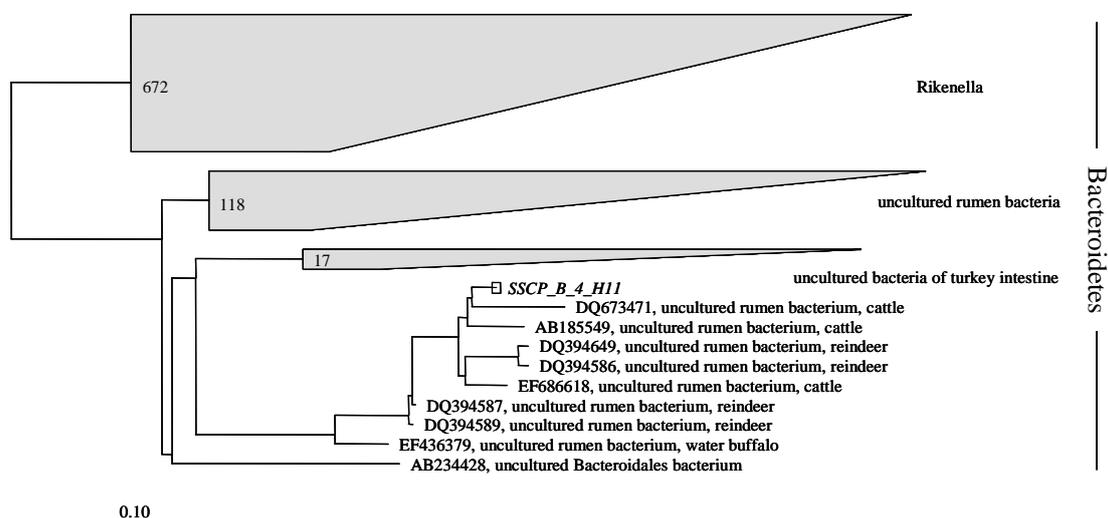
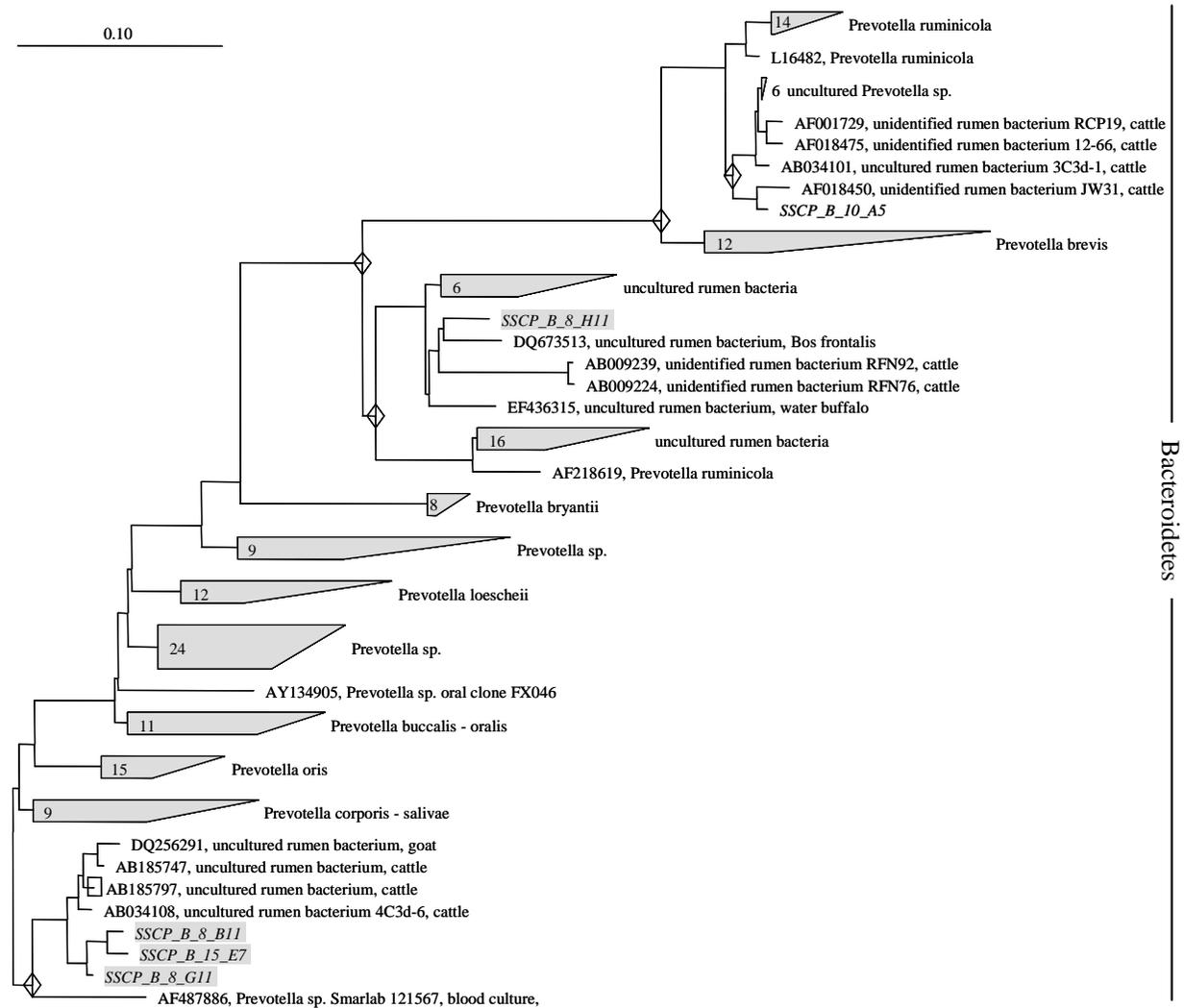


Abbildung 10: Phylogenetische Einordnung des zu den *Bacteroidales* zählenden Klons aus Bande 4 der *Bacteroides-Prevotella*-spezifischen SSCP-Profilen. Die Position der ermittelten partiellen 16S rRNA-Sequenz im Stammbaum wurde unter Verwendung der ARB-Software nach der Maximum Parsimony-Methode berechnet. Die nächsten Verwandten sind einschließlich ihrer GenBank Accession Nummer angegeben. Der Maßbalken kennzeichnet 10 % Sequenzdivergenz.

Abbildung 11: Phylogenetische Einordnung der zum Genus *Prevotella* zählenden Klone aus den Banden 8, 10 und 15 der *Bacteroides-Prevotella*-spezifischen SSCP-Profile. Die Positionen der ermittelten partiellen 16S rRNA-Sequenzen im Stammbaum wurden unter Verwendung der ARB-Software nach der Maximum Parsimony-Methode berechnet. Die nächsten Verwandten sind einschließlich ihrer GenBank Accession Nummer angegeben. Der Maßbalken kennzeichnet 10 % Sequenzdivergenz.



61 der für das *Bacteroides-Prevotella*-spezifische SSCP-Gel sequenzierten Klone wurden dem Phylum der *Proteobacteria* zugewiesen (Tab. 14 und A10). 35 von ihnen wurden den *Burkholderiales* innerhalb der Klasse der *Betaproteobacteria* zugeordnet. Für mehr als die Hälfte dieser Klone wurde dasselbe nicht kultivierte *Aquabacterium* (AJ966866) als nächster Verwandter ermittelt (Tab. A10). In die Klasse der *Alphaproteobacteria* fielen 17 der 61 Klone. Sie wurden als Zugehörige der beiden Ordnungen *Caulobacterales* und *Rhizobiales* ausgewiesen. Neun weitere der zu den *Proteobacteria* zu zählenden Klone waren innerhalb der *Gammaproteobacteria* entweder nicht näher zu klassifizieren oder zeigten nahe Verwandtschaft zu Vertretern der Familie der *Moraxellaceae*.

Von den restlichen der 83 analysierten Klone waren neun den *Actinomycetales* innerhalb der *Actinobacteria* zuzuordnen (Tab. 14 und A10). Die phylogenetische Einordnung eines weiteren Klons erfolgte lediglich auf Domänenebene der *Bacteria* (Tab. A10). Die übrigen vier Klone zeigten nahe Verwandtschaft zu Vertretern der Phyla *Firmicutes* und *Deferribacteres*. Deren phylogenetische Einordnung und nächste Verwandte sind wie für alle anderen Klone, die nicht den *Bacteroidetes* zuzuordnen waren, aber nur für die spezifisch aufgetretenen SSCP-Banden nachgewiesen wurden, Tabelle 14 zu entnehmen. Lediglich zwei dieser Klone zeigten nahe Verwandtschaft zu bereits kultivierten Organismen, Klon B_3_C7 zu *Pelomonas saccharophila* sowie Klon B_15_C9 zu *Tepidimonas taiwanensis*. Alle anderen Klone wurden dagegen bisher nicht kultivierten Organismen zugeordnet. Bemerkenswert ist die Vielfalt an Habitaten, für die deren erstmaliger Nachweis gelang. Auffallend außerdem in Tabelle 14 sowie in Abbildung 10 und 11 ist das Fehlen von Klonen aus den ebenfalls als spezifisch erachteten SSCP-Banden 7 und 9. Da diese beiden SSCP-Banden aber nur Klone aufwiesen, deren nächste Verwandte auch in universell aufgetretenen Banden nachzuweisen waren, finden sich die Ergebnisse der Sequenzanalyse für diese Banden in Tabelle A10. Außerdem geht aus Tabelle A10 hervor, dass letztlich alle der spezifisch aufgetretenen SSCP-Banden Sequenztypen repräsentierten, die auch in den universellen Banden detektiert wurden. Im Hinblick auf die universell aufgetretenen SSCP-Banden 2, 11 und 12 bleibt abschließend festzuhalten, dass die beiden letzteren immerhin je einen Klon aufwiesen, dessen nächster Verwandter für keine der anderen analysierten Banden nachzuweisen war (Tab. A10).

Tabelle 14: RDP-Resultate für Sequenzen von spezifisch (behandlungsabhängig) aufgetretenen Klonen aus den SSCP-Banden 1, 3, 4, 5, 6, 13, 14 und 15 des *Bacteroides-Prevotella*--spezifischen SSCP-Gels

Klon	S_ab score	nächster Verwandter	Accession Nummer	Herkunft	Taxonomische Einordnung
B_1_C3	0,92	<i>Schlegelella</i> sp. KB1a	AY538706	Kompost	<i>Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; unclassified</i>
		<i>Schlegelella</i> sp. Wcf1	DQ417336	heiße Quelle	
		uncultured organism; EME093	EF127603	Gletschereis	
B_3_C7	0,97	<i>Pelomonas saccharophila</i> ; 5-1	AF368755	ultrareines Wasser	<i>Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Incertae sedis 5; Pelomonas</i>
B_4_C12	0,98	uncultured bacterium; Ob2-2_03	AJ880248	Darm: Biene	<i>Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Burkholderiaceae; Ralstonia</i>
		uncultured bacterium; P10F-06b	AM261933	kontaminiertes Grundwasser	
		uncultured bacterium; P11T-05a	AM261940	kontaminiertes Grundwasser	
B_4_D10	0,95	uncultured bacterium; Ob2-2_03	AJ880248	Darm: Biene	<i>Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Bradyrhizobiaceae; Bradyrhizobium</i>
		uncultured bacterium; P10F-06b	AM261933	kontaminiertes Grundwasser	
		uncultured bacterium; P11T-05a	AM261940	kontaminiertes Grundwasser	
B_4_G12	0,85	uncultured soil bacterium; 95_c	DQ303941	Savannenboden, Brasilien	<i>Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Bradyrhizobiaceae; Bradyrhizobium</i>
B_5_F2	0,97	uncultured <i>Acinetobacter</i> sp.; T4150	EU029433	Rohmilch	<i>Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Moraxellaceae; Acinetobacter</i>
		uncultured <i>Acinetobacter</i> sp.; 3P-4-1-B06	EU705993	Kennedy Space Centre, sauberer Fußboden	
B_5_B1	0,90	uncultured bacterium; k5-01	AJ437119	Rhizosphäre: Leguminosen	<i>Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Rhizobiaceae; Rhizobium</i>

Fortsetzung Tabelle 14:

Klon	S_ab score	nächster Verwandter	Accession Nummer	Herkunft	Taxonomische Einordnung
B_6_C5	0,94	uncultured <i>Caryophanon</i> sp.; EMP_R41	EU794212	Kot: Rind	<i>Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Planococcaceae; Caryophanon</i>
		uncultured <i>Caryophanon</i> sp.; T8194	EU029585	Rohmilch	
B_13_A1	0,95	uncultured <i>Bradyrhizobium</i> sp.; SSCP band 14	AJ884740	Grenzschrift zwischen PCB und Wasser	<i>Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Bradyrhizobiaceae; Bradyrhizobium</i>
B_13_E2	0,98	uncultured <i>Streptococcus</i> sp.; SSCP34	EU704162	Gallenweg-Stent	<i>Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Streptococcaceae; Streptococcus</i>
B_14_D6	0,97	uncultured bacterium; 65493	DQ404864	kontaminiertes Sediment	<i>Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Oxalobacteraceae; unclassified</i>
		uncultured <i>Burkholderiaceae</i> bacterium; 401F06	AM420125	subgingivaler Plaque	
		uncultured bacterium; 198	EU531785	Schlammvulkan, China	
B_14_H4	0,98	uncultured bacterium; BB31NT16S-8	EF089481	Steinkorallen im Roten Meer	<i>Actinobacteria; Actinobacteria; Actinomycetales; Corynebacteriaceae; Corynebacterium</i>
B_15_C9	0,96	<i>Tepidimonas taiwanensis</i> (T); I1-1	AY845054	heiße Quelle	<i>Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Incertae sedis 5; Tepidimonas</i>
B_15_G9	0,92	uncultured bacterium; E4	AY526503	anaerober Bioreaktor	<i>Deferribacteres; Deferribacteres; Deferribacterales; Deferribacteraceae; unclassified</i>
		uncultured bacterium; TP16_M	AB290379	anaerober Klärschlamm	
		uncultured bacterium; C74	DQ424926	Kraftstoffzelle	
B_15_B8	0,96	uncultured bacterium; E4	AY526503	anaerober Bioreaktor	<i>Deferribacteres; Deferribacteres; Deferribacterales; Deferribacteraceae; unclassified</i>
		uncultured bacterium; TP16_M;	AB290379	anaerober Klärschlamm	
		uncultured bacterium; C74	DQ424926	Kraftstoffzelle	

Sequenzanalyse für ausgewählte SSCP-Banden der *Archaea*-spezifischen Profile

Wie Abbildung 8 zu entnehmen ist, wurden aus den *Archaea*-spezifischen SSCP-Profilen fünf spezifisch und vier universell aufgetretene Banden zur Sequenzanalyse ausgewählt. Die Sequenzierung erfolgte für 57 Klone, von denen letztlich 41 den *Archaea* und 16 den *Bacteria* zugeordnet werden konnten.

Innerhalb der *Archaea* wurden alle 41 Klone dem Phylum der *Euryarchaeota* zugewiesen. Während 6 dieser Klone nicht näher zu klassifizieren waren, erfolgte die phylogenetische Einordnung für 26 weitere Klone in die Ordnung der *Thermoplasmatales* (Tab. 15, A11). Die übrigen neun der 41 zu den *Archaea* zählenden Klone fanden dagegen ihre nächsten Verwandten unter den *Methanobacteriaceae* innerhalb der Klasse der *Methanobacteria*. Drei von ihnen zeigten nahe Verwandtschaft zu einem nicht näher zu klassifizierenden, bisher nicht kultivierten *Archaeon*, stammten aber sowohl aus spezifisch als auch aus universell aufgetretenen SSCP-Banden. Die entsprechenden Ergebnisse der Sequenzanalyse für diese drei Klone finden sich daher in Tabelle A11. Die restlichen sechs der neun Klone aber waren ausschließlich für die spezifisch aufgetretenen SSCP-Banden 5 und 6 nachzuweisen. Sie erwiesen sich als Angehörige des Genus *Methanosphaera*. Ihre phylogenetische Einordnung ist Abbildung 12 zu entnehmen. Wie zu erkennen ist, weisen jeweils drei der Klone einen gemeinsamen nächsten Verwandten auf, in beiden Fällen ein bisher nicht kultiviertes *Archaeon*. Während das eine von beiden erstmals im Pansen von Ziegen gefunden wurde, war das andere erstmalig im Pansen von Rindern nachzuweisen.

Alle weiteren Klone, die ebenfalls nur in spezifisch aufgetretenen SSCP-Banden zu detektieren waren, sind in Tabelle 15 aufgeführt. Auch hier wird deutlich, dass ein Großteil der Klone nahe Verwandtschaft zu Organismen zeigt, deren erstmaliger Nachweis im Pansen verschiedener Wiederkäuer erfolgte. Lediglich zwei Klone aus SSCP-Bande 5 und 6 weisen einen gemeinsamen Verwandten auf, der innerhalb des Phylums der *Bacteroidetes* den *Sphingobacteriales* zuzuordnen ist und erstmals in Prärieboden nachgewiesen wurde. Darüber hinaus zeigten 13 weitere Klone aus verschiedenen Banden des *Archaea*-spezifischen SSCP-Gels ebenfalls nahe Verwandtschaft zu Vertretern aus der Ordnung der *Sphingobacteriales*. Da deren nächste Verwandte aber sowohl für spezifisch als auch universell aufgetretene SSCP-Banden zu detektieren waren, sind die entsprechenden Ergebnisse der Sequenzanalyse Tabelle A11 zu entnehmen.

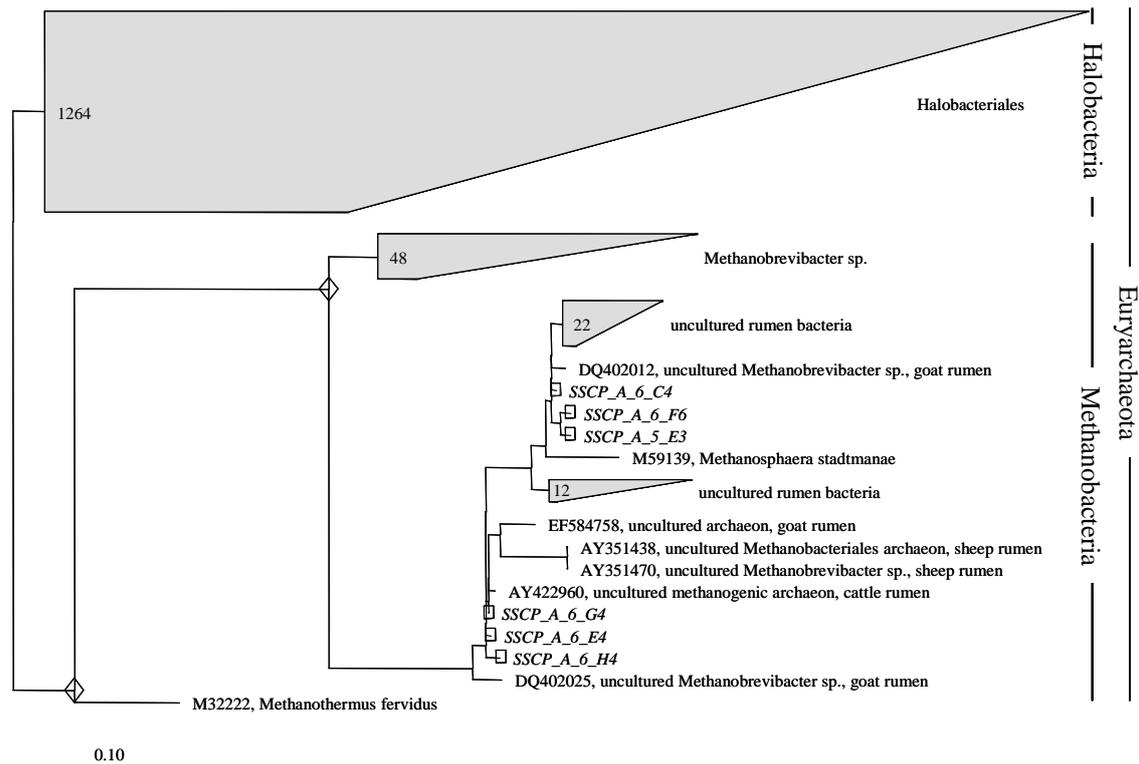


Abbildung 12: Phylogenetische Einordnung der zur Klasse der *Methanobacteria* zählenden Klone aus den Banden 5 und 6 der *Archaea*-spezifischen SSCP-Profile. Die Positionen der ermittelten partiellen 16S rRNA-Sequenzen im Stammbaum wurden unter Verwendung der ARB-Software nach der Maximum Parsimony-Methode berechnet. Die nächsten Verwandten sind einschließlich ihrer GenBank Accession Nummer angegeben. Der Maßbalken kennzeichnet 10 % Sequenzdivergenz.

Nur einer der 16 Klone, die den *Bacteria* zugeordnet wurden, war in das Phylum der *Proteobacteria* einzugruppiert. Er war zwar für die *Archaea*-spezifischen Profile ausschließlich in der spezifischen SSCP-Bande 2 nachzuweisen, zeigte aber innerhalb der *Betaproteobacteria* einen nächsten Verwandten unter den *Burkholderiales*, der bereits für eine Reihe von Klonen aus universellen Banden des *Bacteroides-Prevotella*-spezifischen SSCP-Gels ermittelt werden konnte (Tab. A10 und A9). Letztlich ist aber auch für die spezifisch aufgetretenen SSCP-Banden 4, 5 und 7 des *Archaea*-Gels festzuhalten, dass einige der Klone nächste Verwandte aufwiesen, die auch für Klone aus universellen SSCP-Banden detektiert wurden (Tab. A11). Lediglich in SSCP-Bande 6 fand sich kein Klon, dessen nächster Verwandter in irgendeiner der universellen Banden nachgewiesen werden konnte. Es bleibt aber auch festzuhalten, dass alle universellen SSCP-Banden des *Archaea*-spezifischen Gels mindestens einen Klon zeigten, dessen nächster Verwandter in keiner der anderen Banden zu finden war.

Tabelle 15: RDP-Resultate für Sequenzen von spezifisch (behandlungsabhängig) aufgetretenen Klonen aus den SSCP-Banden 2, 5, 6 und 7 des *Archaea*-spezifischen SSCP-Gels

Klon	S_ab score	nächster Verwandter	Accession Nummer	Herkunft	Taxonomische Einordnung
A_2_C6	0,95	uncultured methanogenic archaeon; LGM-LG07	EU520269	Pansen: Ziege	<i>Euryarchaeota; Thermoplasmata; Thermoplasmatales; unclassified</i>
		uncultured methanogenic archaeon; LGM-LG08	EU520270		
A_2_H4	0,98	uncultured archaeon; LGM-AF04D u.a.	EF222222	Pansen: Ziege	<i>Euryarchaeota; unclassified</i>
A_5_F1	0,94	uncultured euryarchaeote; LGMJN63	EF055552	Pansen: Rind	<i>Euryarchaeota; Thermoplasmata; Thermoplasmatales; unclassified</i>
A_5_A3	0,93	uncultured bacterium; FFCH9847	EU133745	Prärieboden (Langgras)	<i>Bacteroidetes; Sphingobacteria; Sphingobacteriales; unclassified</i>
A_6_F4	0,98	uncultured bacterium; FFCH9847	EU133745	Prärieboden (Langgras)	<i>Bacteroidetes; Sphingobacteria; Sphingobacteriales; unclassified</i>
		uncultured <i>Sphingobacterium</i> sp.	DQ028395	Ikaitsäule: Fjord, Grönland	
A_7_D11	0,97	uncultured archaeon; CSIRO-Qld03 u.a.	AY995277	Pansen: Schaf	<i>Euryarchaeota; Thermoplasmata; Thermoplasmatales; unclassified</i>
A_7_E11	0,96				
A_7_G10	0,99				
A_7_H10	0,96	uncultured methanogenic archaeon; SRmetG5	EU413633	Pansen: Rentier	

3.3 Diskussion

3.3.1 Methode

Wenngleich die SSCP in der Literatur als geeignete Alternative zu anderen Fingerprint-Methoden beschrieben wird, um die strukturelle Diversität mikrobieller Gemeinschaften aus verschiedenen Habitaten darzustellen (Schwieger und Tebbe, 1998, Schmalenberger et al., 2001, Strobel et al., 2004), so unterliegen die im Rahmen von SSCP-Analysen ermittelten Ergebnisse dennoch einer ganzen Reihe von methodisch bedingten Einflussfaktoren, die es im Folgenden zu diskutieren gilt.

Ausschlaggebend zunächst ist, welche Methode zur Extraktion der mikrobiellen DNA gewählt wird (Von Wintzingerode et al., 1997). In der vorliegenden Arbeit wurde nach dem Prinzip des „Bead-Beating“ vorgegangen, einer mechanischen Aufschlussmethode, die für die Präparation mikrobieller DNA aus dem Gastrointestinaltrakt von Mensch und Tier empfohlen wird (Zoetendal et al., 2001, Anderson und Lebepe-Mazur, 2003, Yu und Morrison, 2004). Mit Hilfe dieser Methode konnte bereits hochmolekulare DNA aus gramnegativen und grampositiven Bakterien sowie auch aus Methanogenen gewonnen werden (Whitford et al., 1998, Sawayama et al., 2005). Ein Aufschluss unter Verwendung des „Fast Prep[®] Instrumentes“ wurde bereits für Präparationen mikrobieller DNA aus dem Boden und dem Ileum des Schweins beschrieben (Mesarch et al., 2000, Lieber et al., 2003, Hill et al., 2005). Außerdem fand die Methode bereits Anwendung zur Aufbereitung von Proben aus Pansensimulationssystemen (Koch et al., 2006, Strobel et al., 2008, Boguhn et al., 2008).

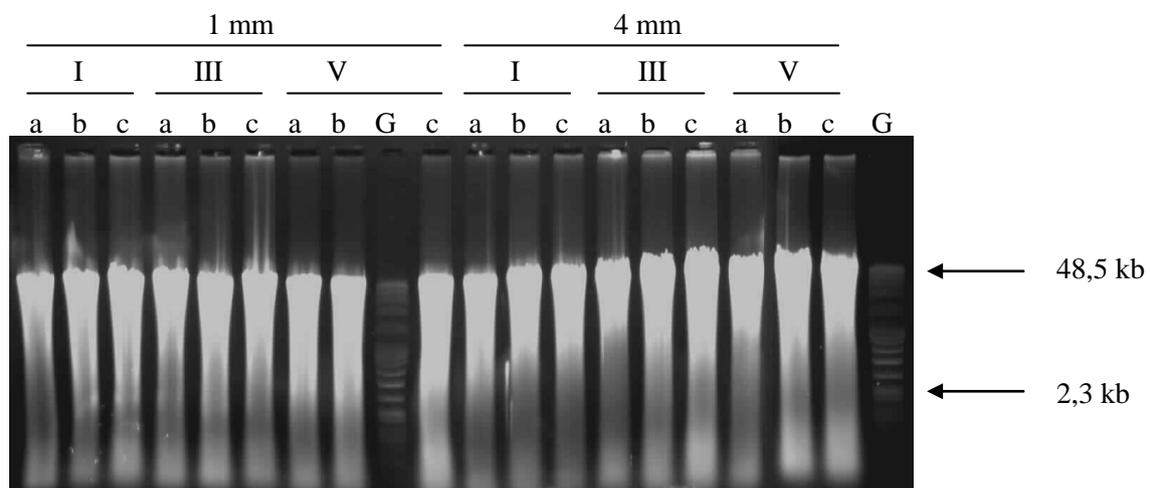


Abbildung 13: Überprüfung der DNA-Extraktion im 0,8%igen Agarosegel, hochmolekulare DNA aus den Mikroorganismen der Überlaufproben (a-c: Wiederholungen einer Behandlung, G: DNA-Größenstandard)

Im Hinblick auf die eigenen Proben war festzustellen, dass die DNA vordergründig in hochmolekularer Form extrahiert werden konnte (Abb. 13). Fragmente, die eine Länge von weniger als 2,3 kb aufwiesen, machten den weitaus geringeren Teil der präparierten DNA aus. Im Mittel konnten für jede Probe 50 µg (s = 10) DNA extrahiert werden. Aufgrund der sehr unterschiedlichen Methoden zur Gewinnung und Aufbereitung von Proben aus dem Pansen ist allerdings ein Vergleich der hier gewonnenen DNA-Mengen mit Angaben aus der Literatur nicht möglich.

Des Weiteren unterliegt das Ergebnis einer SSCP-Analyse dem Einfluss der PCR-Reaktion. Während des Amplifikationsprozesses mikrobieller DNA aus Umweltproben können verschiedene Probleme auftreten. Sowohl eine Hemmung der Reaktion durch Kontaminationen als auch die Bildung von PCR-Artefakten sind denkbar (Von Wintzingerode et al., 1997).

Kontaminationen, wie Proteine und pflanzliche Polysaccharide, die im Zuge der DNA-Präparation co-aufgereinigt werden, können die Amplifikation der DNA stören und damit die Effizienz der PCR senken (Monteiro et al., 1997, Powell et al., 1994). Da aber die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten DNA-Extrakte nach Messung ihrer optischen Dichte optimale Werte für das Verhältnis von $OD_{260} : OD_{280}$ aufwiesen und keinerlei Beeinträchtigung der PCR zu beobachten war, wurde zunächst von keiner negativen Beeinflussung der Amplifikation durch eventuelle Kontaminationen ausgegangen (Abb. 14). Wenngleich auch das Verhältnis von $OD_{260} : OD_{230}$ für einige Proben relativ gering ausfiel und damit auf Verunreinigungen der DNA zu schließen war.

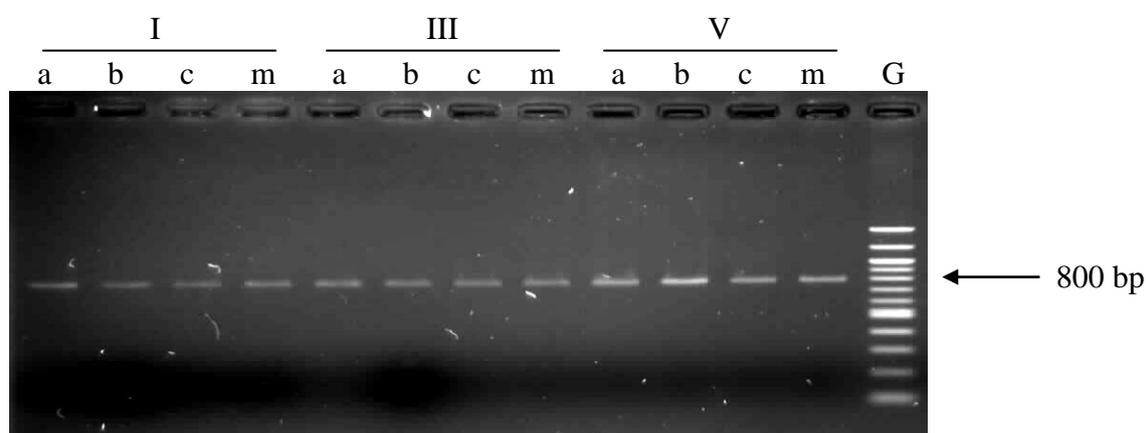


Abbildung 14: Exemplarische Darstellung von PCR-Produkten, die unter Verwendung der *Archaea*-spezifischen Primer für die Futtermischungen I, III und V der 4-mm-Variante erhalten wurden, G: DNA-Größenstandard, a-c: Wiederholungen einer Behandlung = Einzelproben, m: Mischprobe der jeweiligen Behandlung

Mit dem Auftreten von PCR-Artefakten kann im Zuge von Analysen komplexer mikrobieller Gemeinschaften auf Grundlage PCR-basierter Methoden immer gerechnet werden (Von Wintzingerode et al., 1997). Bisher beschrieben wurden chimäre Moleküle, Deletions- und Punktmutationen. Chimären bestehen aus unterschiedlichen DNA-Molekülen, die sehr ähnliche Sequenzen aufweisen. Daher treten sie vor allem dann auf, wenn sich die Template-DNA sehr ähnelt. Außerdem wird die Bildung von Chimären durch eine starke Fragmentierung der DNA gefördert (Von Wintzingerode et al., 1997), die hier aber nicht zu beobachten war (Abb. 13).

Zeigt die Template-DNA sehr stabile Sekundärstrukturen, so kann es zur Formation von Deletionsmutationen kommen (Cariello et al., 1991). Punktmutationen resultieren aus dem Einbau falscher Nukleotide durch die DNA-Polymerase (Von Wintzingerode et al., 1997). Die Fehlerrate der hier verwendeten *Taq*-Polymerase kann in Abhängigkeit der gewählten Reaktionsbedingungen stark variieren. In der Literatur werden daher Fehlerraten zwischen 1 Fehler unter 290 Nukleotiden (3×10^{-3}) und 1 Fehler unter 5411 Nukleotiden (2×10^{-4}) genannt (Von Wintzingerode et al., 1997). Im Hinblick auf das hier betrachtete, relativ kurze 16S rRNA-Gen (ca. 1500 bp) wäre demnach ein durch Punktmutationen verursachter Fehler vernachlässigbar gering, wenn nur eine PCR durchgeführt würde. Jedoch können mehrere aufeinander folgende PCR zu weitaus höheren Fehlerraten führen (Von Wintzingerode et al., 1997). Darüber hinaus konnten Qiu et al. (2001) nachweisen, dass sich auch mit zunehmender Speziesdiversität in der Probe die Zahl mutationsbedingter PCR-Artefakte erhöht.

Je mehr Artefakte aber letztlich in einem PCR-Produkt vorliegen, desto wahrscheinlicher ist das Auftreten zusätzlicher Banden im SSCP-Profil. Damit besteht im Hinblick auf die hier durchgeführte SSCP-Analyse eine Fehlerquelle in der möglichen Formation von PCR-Artefakten. Während eine Detektion von chimären Sequenzen mit Hilfe entsprechender Programme wie „Chimera-Check“ möglich ist, sind mutationsbedingte PCR-Artefakte in Umweltproben nicht zu identifizieren (Qiu et al., 2001). Die Überprüfung der ermittelten Sequenzen auf chimäre Strukturen hin erfolgte hier unter Verwendung zweier Computerprogramme, die unterschiedliche Algorithmen nutzen. Lediglich diejenigen Sequenzen, die von beiden Programmen als potenzielle Chimären ausgewiesen wurden, sind entsprechend gekennzeichnet worden. Von den Betrachtungen ausgeschlossen wurde aber keine der Sequenzen, da die Detektion von Chimären innerhalb kurzer Sequenzen (< 1300 Nukleotide) relativ schwierig ist (Hugenholtz et al., 1998) und die verwendeten Programme lediglich einen

Hinweis auf potenzielle Chimären liefern können (Whitford et al., 1998, Gonzalez et al., 2005).

Einen Einfluss des verwendeten PCR-Kits sowie der eingesetzten DNA-, Primer- und $MgCl_2$ -Konzentration im PCR-Ansatz auf die Ergebnisse der SSCP konnte Lieber (2005) anhand von SSCP-Profilen für *Nitrosomonas*/ *Nitrospira* aus Bodenproben ausschließen. Außerdem fand er keinen Effekt der PCR-Zyklenzahl auf die Profile. Dohrmann und Tebbe (2004) beschreiben für 25 und 30 PCR-Zyklen geringfügige Unterschiede zwischen den SSCP-Profilen einer Mikrobengemeinschaft aus der Rhizosphäre der Wilden Malve (*Malva sylvestris*). Demzufolge sollte die Wahl von 25-30 Zyklen im Hinblick auf die eigenen Proben keinen entscheidenden Einfluss auf die erhaltenen SSCP-Profile gehabt haben.

Ebenso wie Lieber (2005) konnten auch Schwieger und Tebbe (1998) in Abhängigkeit der initialen DNA-Konzentration im PCR-Ansatz keine Unterschiede zwischen den jeweiligen SSCP-Profilen von Mikrobengemeinschaften aus verschiedenen Rhizosphären feststellen. Sie prüften verschiedene DNA-Konzentrationen zwischen 0,2 und 10 ng je 100 μ l PCR-Ansatz. Die in dieser Arbeit für die SSCP-Analysen verwendeten initialen DNA-Konzentrationen lagen etwa zwischen 2 und 3 ng je 50 μ l PCR-Ansatz und damit in dem von Schwieger und Tebbe geprüften Bereich.

Um gesicherte Aussagen über die Ähnlichkeit von SSCP-Profilen verschiedener Mikrobengemeinschaften treffen zu können, ist außerdem wichtig, dass die Wiederholbarkeit der PCR sowie die Reproduzierbarkeit des SSCP-Profiles jeder einzelnen Probe gewahrt ist. Gezielte Untersuchungen dahingehend wurden im Rahmen dieser Arbeit allerdings nicht durchgeführt, da Voruntersuchungen zur DNA-Präparation bereits gezeigt hatten, dass auch nach wiederholter DNA-Extraktion aus Mikroben der gleichen Pansensaftprobe die SSCP-Profile der amplifizierten 16S rDNA-Fragmente kaum Unterschiede aufwiesen (Abb. 15). Demnach war sowohl von einer relativ guten Wiederholbarkeit der DNA-Extraktion als auch der PCR auszugehen. Untersuchungen zur Reproduzierbarkeit des SSCP-Profiles einer Probe nach wiederholter PCR wurden von Seibold (2002) sowie Dohrmann und Tebbe (2004) vorgenommen. Aber auch sie fanden kaum Unterschiede zwischen den SSCP-Profilen von PCR-Produkten, die für ein und dasselbe DNA-Extrakt aus verschiedenen Reaktionsansätzen erhalten wurden. Um dennoch zufällig auftretenden Unterschieden im Vervielfältigungsprozess Rechnung zu tragen, wurde in dieser Arbeit, wie von

Dohrmann und Tebbe (2004) empfahlen, jede PCR in drei Ansätzen durchgeführt, die im Anschluss an die Reaktion vereinigt wurden.

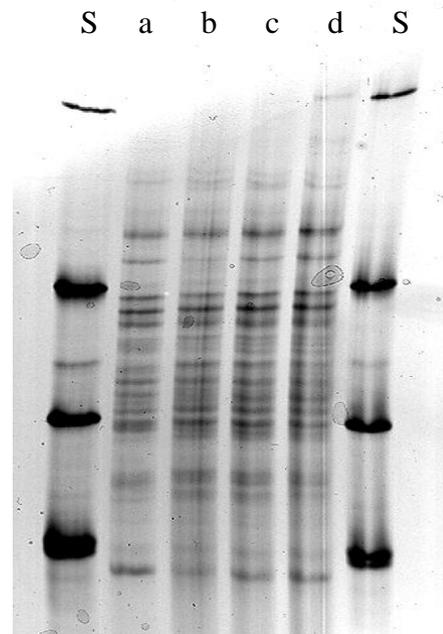


Abbildung 15: SSCP-Profile amplifizierter 16S rDNA-Fragmente von Mikroorganismen, die direkt aus dem Pansensaft der Spendertiere gewonnen wurden, ausschließlicher Einsatz universeller Com-Primer, S: Speziesstandard, a-d: SSCP-Profile für PCR-Produkte aus DNA, die wiederholt aus derselben Pansensaftprobe extrahiert wurde

Der von Glavac und Dean (1993) beschriebene Einfluss der Temperatur auf das Laufverhalten einzelsträngiger DNA im Polyacrylamidgel wurde berücksichtigt, indem hier zunächst eine Auftrennung entsprechender 16S rDNA-Fragmente aus Pansenmikroben bei verschiedenen Temperaturen erfolgte. Die optimale Auftrennung lag zwischen 25 und 27°C (Abb. 2). Lieber et al. (2003) nutzten für ihre SSCP-Analysen dieselbe „TGGE-Maxi-Apparatur“, die in dieser Arbeit verwendet wurde. Sie beobachteten für mikrobielle DNA aus Bodenproben eine optimale Auftrennung bei 26°C.

Um die Vergleichbarkeit der Profile auf einem SSCP-Gel zu wahren, sollten mit jeder Probe gleiche DNA-Mengen geladen werden (Dohrmann und Tebbe, 2004). Daher erfolgte hier vor dem Einzelstrangverdau eine spektrophotometrische Quantifizierung der nested PCR-Produkte. Wie in Abbildung 4 zu erkennen ist, führte der Verdau von ca. 670 ng DNA im Falle der *Clostridia* für alle Proben zu SSCP-Profilen ähnlicher Intensität. Dagegen zeigen die *Archaea*-spezifischen Profile deutliche Unterschiede zwischen den Proben (Abb. 8). Verdaut wurden hier zwischen 1300 und 1700 ng DNA. Auf eine genaue Einstellung der DNA-Konzentration in den PCR-Produkten musste verzichtet werden, da hier für den größten Teil der Proben eine relativ hohe Verdünnung

erforderlich gewesen wäre, die Quantifizierung am Spektrophometer aber durchaus ungenau ausfallen kann. Kontaminationen wie Polysaccharide oder Proteine können hierbei eine Überschätzung der PCR-Ausbeute bedingen. Da das Verhältnis von $OD_{260} : OD_{230}$ für eine Reihe der Proben relativ gering ausfiel, war demnach eine Verunreinigung einiger PCR-Produkte nicht auszuschließen. Da nun anhand der *Archaea*-spezifischen SSCP-Profile durchaus ein Zusammenhang zwischen auftragener DNA-Menge und der Intensität einiger Banden zu erkennen war, muss dies bei einem Vergleich der einzelnen Behandlungen beachtet werden. Auch im Falle der *Bacteroides-Prevotella*-spezifischen SSCP-Profile wurde aus genannten Gründen mit unterschiedlichen DNA-Mengen gearbeitet. Hier fallen die Unterschiede hinsichtlich der Profil- bzw. Bandenintensität aber weitaus geringer aus. Auf Einzelheiten dazu soll aber erst später eingegangen werden (Abschnitt 3.3.2).

Allerdings sei bereits hier darauf hingewiesen, dass auch der Einsatz gleicher DNA-Mengen keine Interpretation der Bandenintensität im Hinblick auf die Abundanz eines Organismus erlaubt. Denn die hohe Ausbeute eines PCR-Produktes kann sowohl auf eine hohe Ausgangskonzentration der entsprechend amplifizierten DNA zurückzuführen sein als auch auf besonders günstige PCR-Bedingungen für das entsprechende Template. So binden beispielsweise universelle Primer, wie die hier verwendeten Com-Primer, nicht an jede Template-DNA gleichermaßen gut. Außerdem bilden einige DNA-Moleküle stabile Sekundärstrukturen aus, die weder eine Anlagerung der Primer noch der DNA-Polymerase ermöglichen (Amann et al., 1994). Demnach werden einige Templates gegenüber anderen bevorzugt amplifiziert, obwohl sie möglicherweise in geringer Ausgangsmenge vorliegen (Amann et al., 1994).

Darüber hinaus konnte bereits mehrfach nachgewiesen werden, dass eine SSCP-Bande oft durch mehr als eine Sequenz repräsentiert wird (Schmalenberger et al., 2003, Tatsuoka et al., 2007). Vermutet wird, dass auch sehr unterschiedliche Sequenzen ein ähnliches Laufverhalten während der Elektrophorese im SSCP-Gel aufweisen können (Schmalenberger et al., 2001). Außerdem wird eine Kontamination einzelner Banden durch häufig auftretende Sequenzen, die unterschiedliche Konformationen einnehmen können, in Betracht gezogen (Dohrmann und Tebbe, 2004). Die eigenen Analysen bestätigen die Ergebnisse von Schmalenberger et al. (2003) bzw. Tatsuoka et al. (2007) und lassen beide Erklärungsansätze plausibel erscheinen. Zum einen traten hier beispielsweise in Bande 12 des *Clostridia*-spezifischen SSCP-Gels lediglich Sequenzen auf, die in keiner der anderen Banden zu finden waren, sich aber dennoch deutlich

voneinander unterschieden (Tab. 12). Zum anderen war in 13 von 15 analysierten SSCP-Banden des *Bacteroides-Prevotella*-spezifischen Gels mindestens eine Sequenz nachzuweisen, für die als nächster Verwandter das nicht kultivierte *Aquabacterium* AJ966866 ausgewiesen wurde. Allein in sieben dieser Banden zeigte der entsprechende Klon gegenüber dem Bakterium einen Ähnlichkeitswert von 1. Demzufolge scheint das entsprechende 16S rDNA-Fragment relativ häufig in den PCR-Produkten vorgelegen zu haben. Eine mögliche Kontamination und damit Verstärkung einzelner SSCP-Banden durch diese Sequenz liegt somit nahe.

Um diesem Problem entgegen zu wirken, schlagen Heuer et al. (1997) sowie Dohrmann und Tebbe (2004) den Einsatz gruppenspezifischer Primer vor, mit Hilfe derer letztlich die Komplexität eines SSCP-Profiles reduziert werden soll. Allerdings erfolgten auch die eigenen Analysen unter Verwendung gruppenspezifischer Primer, dennoch waren für jede der betrachteten SSCP-Banden verschiedene Sequenzen nachzuweisen. Dies mag einerseits an der unzureichenden Spezifität der verwendeten Primer gelegen haben, andererseits könnte das Problem aber auch auf die gewählten phylogenetischen Ebenen zurückzuführen sein. Der Einsatz von Primern auf weitaus niedrigerer phylogenetischer Ebene könnte möglicherweise zu eindeutigeren Ergebnissen führen. Gleichzeitig würde sich aber damit der Arbeitsaufwand erhöhen, da entsprechend mehr Gruppen zu betrachten wären.

Wie bereits angedeutet, besteht ein weiteres Problem der SSCP sowie auch anderer Fingerprint-Methoden darin, dass einzelne Klone aus verschiedenen Banden die gleichen nächsten Verwandten aufweisen. Dieses Phänomen ist u.a. damit zu erklären, dass ein und dieselbe Sequenz mehrere Konformationen einnehmen kann (Schwieger und Tebbe, 1998, Seibold, 2002). Darüber hinaus besitzen einige Organismen mehrere Kopien des hier betrachteten 16S rRNA-Gens, die sich hinsichtlich ihrer Sequenz durchaus unterscheiden können (Von Wintzingerode et al., 1997, Fogel et al., 1999). Im Rahmen dieser Arbeit kamen Primer zur Amplifikation der V4- und V5-Region des 16S rRNA-Gens zum Einsatz. Wie Schmalenberger et al. (2001) anhand von 13 Bakterienspezies nachweisen konnten, eignen sich diese Regionen zur Analyse komplexer Mikrobengemeinschaften besser als andere Abschnitte des Gens. Im Durchschnitt fanden sie hier nur 1,7 Banden je Organismus. Die Autoren schlussfolgerten eine geringere Operonheterogenität und damit höhere Konservierung des Gens in diesem Bereich. Allerdings weisen sie auch darauf hin, dass die

Operonheterogenität des 16S rRNA-Gens für nicht von ihnen untersuchte Organismen aus anderen phylogenetischen Gruppen durchaus höher ausfallen könnte und daher andere Regionen zu bevorzugen wären. Schmalenberger et al. (2001) führten keine Untersuchungen an Vertretern der *Archaea*, *Clostridia* oder der *Bacteroides-Prevotella*-Gruppe durch. Dass im Rahmen der eigenen Analysen eine ganze Reihe von Organismen in weit mehr als nur einer SSCP-Bande detektiert worden sind, könnte demnach auf diese Hypothese zurückgeführt werden.

Auf Grundlage der beobachteten Intensität einer SSCP-Bande können folglich keine quantitativen Aussagen zu einzelnen Organismen gemacht werden (Schmalenberger et al., 2001 und 2003). Die Bandenintensität kann lediglich einen Hinweis auf das vermehrte oder verminderte Auftreten entsprechender Sequenzen liefern. Aussagen zur strukturellen Diversität einer Mikrobengemeinschaft sind dagegen mit Hilfe der SSCP möglich. Allerdings ist die Auflösung im Profil auf etwa 60 Banden beschränkt (Dohrman und Tebbe, 2004). Wenn auch nicht jede Spezies einer mikrobiellen Gemeinschaft zu genau einer SSCP-Bande führt, so kann zumindest bei erhöhter Speziesdiversität eine Zunahme der Bandenanzahl im Profil beobachtet werden (Schwieger und Tebbe, 1998).

Im Rahmen der eigenen Arbeit wurde auf eine Diversitätsanalyse verzichtet, da die Ergebnisse der Sequenzierung deutlich gemacht haben, dass sich hier eine ganze Reihe von Sequenzen überlagern und diese darüber hinaus in mehreren Banden auftreten. Demnach wäre eine Betrachtung der mikrobiellen Diversität in den Proben mit einem nicht einzuschätzenden Fehler behaftet und entsprechende Aussagen nicht belastbar. Aus diesem Grund soll auch auf eine Interpretation der beobachteten Bandenanzahl in den Profilen verzichtet werden.

Ein relativer Vergleich der SSCP-Profile innerhalb eines Gels ist allerdings möglich, da alle Proben gleichermaßen aufbereitet wurden und wiederholte Beobachtungen für jede der Behandlungen in die Betrachtungen eingehen (Hughes et al., 2001). Für diesen Vergleich wurde der Jaccard-Koeffizient gewählt. Er stellt ein Ähnlichkeitsmaß dar, das unabhängig von der Artenzahl im Gesamtdatensatz ist und fehlende Arten bzw. SSCP-Banden nicht berücksichtigt (Leyer und Wesche, 2007). Da das Fehlen einer Art bzw. SSCP-Bande in zwei zu vergleichenden Organismengemeinschaften (Profilen) nicht zwingend auf die selben Gründe zurückzuführen ist, kann auch nicht davon

ausgegangen werden, dass eine hierauf gründende Ähnlichkeit zwischen den beiden Gemeinschaften besteht. Hinsichtlich des Vergleichs der einzelnen Profile konnte demnach unter Verwendung des Jaccard-Koeffizienten eine Überbewertung fehlender Arten bzw. SSCP-Banden vermieden werden (Leyer und Wesche, 2007).

3.3.2 Einfluss der Futterpartikelgröße sowie des Mais- und Grassilageanteils im Futter auf die gruppenspezifischen SSCP-Profile

Um einen möglichen Effekt von Futtermischung und Futterpartikelgröße auf die gruppenspezifischen SSCP-Profile der zu untersuchenden Mikrobengemeinschaften statistisch absichern zu können, wurden in der vorliegenden Arbeit drei unabhängige Wiederholungen je Behandlung betrachtet. In Bezug auf SSCP-Analysen zur mikrobiellen Gemeinschaft des Pansens ist diese Vorgehensweise bisher nur aus *in vivo* Studien bekannt (Strobel et al., 2004). Die Autoren konnten nachweisen, dass die SSCP-Profile für Mikrobengemeinschaften aus dem Pansen verschiedener Schafe eine relativ gute Übereinstimmung zeigen, wenn die Tiere unter gleichen Bedingungen gehalten und gefüttert werden. Dies galt auch für den Vergleich von Proben, die den Tieren an verschiedenen Tagen entnommen wurden.

SSCP-Ergebnisse aus Untersuchungen, in denen mit vergleichbaren *in vitro* Systemen gearbeitet wurde wie hier, basieren lediglich auf einer (Koch et al., 2006) oder mehreren abhängigen (Strobel et al., 2007 und 2008, Boguhn et al., 2008) Stichproben. Zwar inkubierten auch Strobel et al. (2007, 2008) sowie Boguhn et al. (2008) jeweils drei Fermenter mit ein und derselben Futtermischung, allerdings erfolgten die drei Wiederholungen je Behandlung innerhalb eines Versuchsdurchgangs. Ein möglicher Durchgangseffekt fand keine Berücksichtigung. Ungeachtet dessen konnten die Autoren anhand verschiedener gruppenspezifischer SSCP-Gele eine relativ gute Wiederholbarkeit der Profile für die jeweils drei beprobten Mikrobengemeinschaften einer Behandlung nachweisen. Die Beachtung eines möglichen Durchgangseffektes, wie in dieser Untersuchung vorgenommen, ließ jedoch ebenfalls bis auf wenige Ausnahmen hinsichtlich des *Archaea*-spezifischen Gels eine hohe Ähnlichkeit zwischen den Profilen einer Behandlung erkennen (Abb. 4-9). Dies deutet auf eine gute Wiederholbarkeit der *in vitro* Versuche und Reproduzierbarkeit der SSCP-Profile für eine Behandlung hin.

Die Bearbeitung von Mischproben der mikrobiellen DNA, die aus den drei unabhängigen DNA-Extrakten jeder Behandlung erstellt wurden, führte größtenteils zu SSCP-Profilen, die alle Banden aufwiesen, die auch in den Profilen der Einzelproben zu finden waren (Abb. 4, 6, 8). In einigen der Mischprobenprofile aber, wie etwa in der Probe *Archaea*/III/m/1 mm, traten Banden, die in der einen oder anderen Einzelprobe zu detektieren waren, nicht auf (Abb. 8). Die Ursache hierfür dürfte in der Mischprobenbildung liegen. Denn enthielt beispielsweise nur eine der drei Proben die DNA derjenigen Mikroorganismen, die zum Auftreten der entsprechenden SSCP-Bande geführt haben, so kann diese DNA im Zuge der Mischprobenbildung soweit verdünnt worden sein, dass ihre Amplifikation während der PCR erfolglos blieb. Demnach liegt hierin eine Erklärung dafür, dass die Einzelproben in den NMDS-Plots teilweise unterschiedliche Distanzen gegenüber ihrer Mischprobe aufweisen.

Als weitere Ursache für fehlende Banden in Misch- gegenüber Einzelproben sollen aber auch unterschiedliche DNA-Mengen genannt sein, die je Probe auf die Gele aufgetragen wurden. Während zur Erstellung der *Archaea*-spezifischen SSCP-Profile für die Mischproben III und V der 4-mm-Variante nur etwa 1400 und 1500 ng DNA verdaut wurden, konnten für die entsprechenden Einzelproben um bis zu 200 ng mehr in den Einzelstrangverdau eingesetzt werden. Dies führte, wie anhand des *Archaea*-Gels zu erkennen ist, zu SSCP-Profilen, die sich hinsichtlich ihrer Intensität deutlich unterschieden (Abb. 8). In Folge dessen stellten sich die genannten Mischproben im korrespondierenden NMDS-Plot als ausgesprochene Ausreißer ihrer Gruppen dar (Abb. 9). Ebenso dürfte auch das *Bacteroides-Prevotella*-spezifische SSCP-Profil für die Mischprobe der Futtermischung III/4 mm von der eingesetzten DNA-Menge negativ beeinflusst worden sein. Hier wurden etwa 300-600 ng DNA für die Einzelproben, aber nur 100 ng für die Mischprobe verdaut (Abb. 6 und 7).

Dem Einfluss unterschiedlich aufgetragener DNA-Mengen unterlagen aber letztlich auch die Einzelproben. Allerdings fiel dieser im Falle der *Bacteroides-Prevotella*-spezifischen SSCP-Profile relativ gering aus. Obwohl die verdaute DNA-Mengen innerhalb einer Behandlung um 200-300 ng variierte, war unabhängig davon ein Großteil der Banden für alle drei Wiederholungen einer Behandlung zu detektieren (Abb. 16). Dagegen zeigten die SSCP-Profile von Proben, die aus verschiedenen Behandlungen stammten, für die aber gleiche DNA-Menge verdaut und aufgetragen wurde, deutliche Unterschiede im Profil (Abb. 16). Demnach

war auch eine klare Differenzierung der Profile in Abhängigkeit der jeweiligen Behandlung möglich (Abb. 7). Da innerhalb jeder Behandlung sowohl mit relativ hohen (500-600 ng) als auch relativ niedrigen (100-200 ng) DNA-Mengen gearbeitet wurde, stand einem Vergleich der SSCP-Profile über alle Behandlungen nichts entgegen.

Zur Erstellung der *Archaea*-spezifischen SSCP-Profile wurde für alle Proben der Variante mit 4 mm Partikelgröße weniger DNA verdaut (1300-1700 ng) als für die 1-mm-Variante (1700 ng). Die stark variierende Intensität der Profile lässt hier einen deutlich größeren Effekt der aufgetragenen DNA-Menge erkennen als im Falle des *Bacteroides-Prevotella*-spezifischen Gels (Abb. 8).

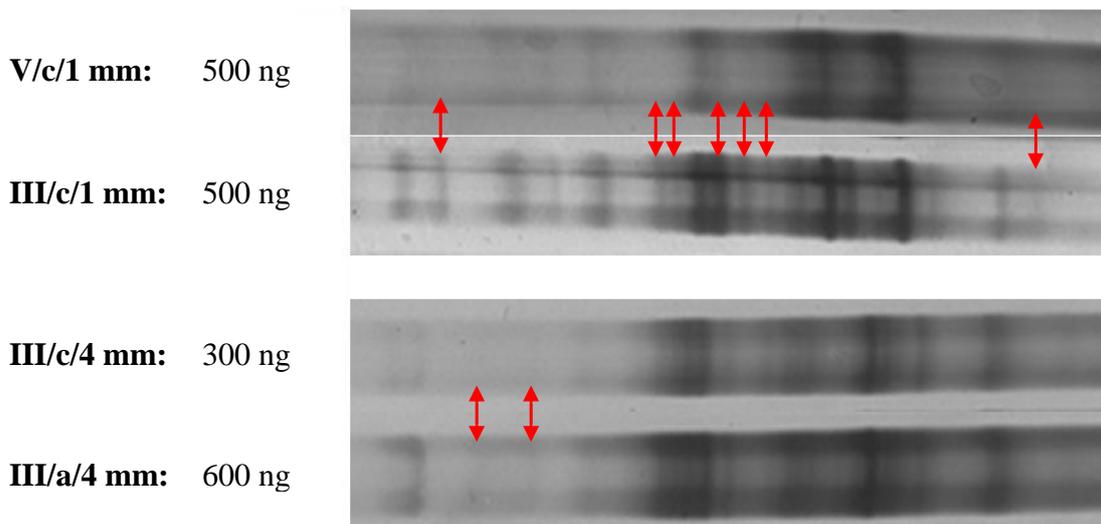


Abbildung 16: Exemplarische Darstellung des Effekts der jeweiligen Behandlung bzw. der für den Einzelstrangverdau eingesetzten DNA-Menge (ng) auf die *Bacteroides-Prevotella*-spezifischen SSCP-Profile, roter Pfeil: Bande, die nur in einem der beiden Profile zu detektieren war

Der beobachtete Effekt der Futterpartikelgröße auf die *Archaea*-spezifischen SSCP-Profile kann demzufolge nicht als gesichert gelten und wäre gegebenenfalls erneut zu prüfen. Gegen einen Vergleich der verschiedenen Futtermischungen innerhalb der Futterpartikelgröße 1 mm spricht allerdings nichts, da hier dieselben DNA-Mengen eingesetzt worden sind. Auch für die Mischungen I und V der 4-mm-Variante sind diese vergleichbar (1500-1700 ng), lediglich für die Mischung III ist der Einfluss unterschiedlich aufgetragener DNA-Mengen zu beachten.

Einfluss der Futtermischung

Die beiden Grobfuttermittel Mais- und Grassilage weisen ganz unterschiedliche Eigenschaften auf. Wie die Weender Rohnstoffanalyse erkennen ließ, enthielt die verwendete Grassilage weitaus höhere XP-, XF- und XA-Gehalte als die Maissilage (Tab. 3). Außerdem wurden in der Grassilage höhere Gehalte an NDF und ADF analysiert. Dementsprechende Unterschiede zeigten auch die drei inkubierten Futtermischungen (Tab. 2). Eine Bestimmung des Stärkegehaltes in den Silagen wurde zwar nicht vorgenommen, es ist aber davon auszugehen, dass der Stärkegehalt der Maissilage deutlich über dem der Grassilage lag. Während für Maissilage gegen Ende der Teigreife mit einem Stärkegehalt von 213-345 g/kg T gerechnet werden kann, weisen Grassilagen, wenn die Ernte der Gräser im vegetativen Stadium erfolgt, keine messbaren Stärkemengen auf (Deutsche Landwirtschafts-Gesellschaft, DLG, 1997).

Darüber hinaus konnte in zahlreichen Untersuchungen nachgewiesen werden, dass die Zellwandzusammensetzung verschiedener Gräser in Abhängigkeit von Pflanzenart und Reifestadium variiert (Reeves, 1987, Osaki et al., 1991, Carpita, 1996, Morrison, 1980, Abedon et al., 2006, Jung und Casler, 2006). Unterschiede im Zellwandaufbau von C₃- (Gräser in Grassilage) und C₄-Gräsern (Mais), die deren Abbau im Pansen beeinflussen, sind unbestritten (Akin, 1989, Wilson, 1993, Buxton und Redfearn, 1997). Außerdem weist Mais gegen Ende der Teigreife einen sichtlich anderen Pflanzenhabitus als die in Grassilagen enthaltenen Gräser auf. Folglich kann von deutlichen Unterschieden in der Zellwandzusammensetzung beider Grobfuttermittel ausgegangen werden (Tamminga, 1998).

Außerdem unterscheiden sich beide Silagen hinsichtlich der Energiebereitstellung für die Mikroorganismen. Während die leichtlöslichen Kohlenhydrate der Grünlandgräser bereits im Zuge der Silierung mikrobiell verstoffwechselt werden, verfügt Maissilage über einen hohen Gehalt an Stärke, die im Vergleich zu Cellulose und Hemicellulosen eine relativ schnell verfügbare Energiequelle darstellt. Gleichzeitig enthalten Mais- und Grassilage einen hohen Anteil leichtlöslicher Proteine und Nicht-Protein-Stickstoffverbindungen (Oshima und McDonald, 1978, Krishnamoorthy et al., 1982, Sniffen et al., 1992). Daher ist bei Einsatz von Maissilage zumindest im Pansen mit einer besseren Synchronisation von Energie- und Stickstoffversorgung für die Mikroorganismen zu rechnen (Givins und Rulquin, 2004).

Aufgrund der dargestellten Unterschiede zwischen Mais- und Grassilage überrascht es nicht, dass sich ein deutlicher Effekt der Futtermischung auf die erstellten SSCP-Profile

erkennen ließ. Die NMDS-Plots der *Clostridia*- und *Bacteroides-Prevotella*-spezifischen-Profile sowie die ermittelten Gradienten deuteten auf eine gerichtete Veränderung der mikrobiellen Gemeinschaft in Abhängigkeit der analysierten Weender Roh Nährstoffe und Faserfraktionen hin (Abb. 5 und 7). Die Vermutung liegt nahe, dass innerhalb dieser beiden Mikrobengruppen die Etablierung einiger Bakterienspezies nur dann erfolgte, wenn entweder eine Mais- oder Grassilage-betonte Mischung angeboten wurde. Aufgrund des hohen Stärkegehaltes dürften bei Inkubation von Mischung I auch amylolytische Spezies gefördert worden sein. Dagegen könnten in Mischung V aufgrund der höheren Gehalte an XP und XF proteolytisch und cellulolytisch aktive Spezies einen Vorteil gehabt haben. Futtermischung III schien hinsichtlich der SSCP-Profile eine Zwischenstellung einzunehmen. Hier fanden sich neben universell aufgetretenen Banden auch solche, die sonst nur in den Mais- oder Grassilage-betonten Mischungen zu detektieren waren. Möglicherweise wurden diese Banden durch Spezies repräsentiert, die sich durch ein breiteres Substratspektrum als andere auszeichnen und demnach flexibler gegenüber den unterschiedlichen Futtermischungen reagierten.

Eine gerichtete Veränderung der *Archaea*-spezifischen SSCP-Profile war nicht zu beobachten (Abb. 9). Bei Außerachtlassung der beiden offensichtlichen Ausreißer V/b/1 mm und III/b/4 mm allerdings, deutet sich aber auch hier der oben für die drei Futtermischungen beschriebene Gradient an. Darüber hinaus dürften auch die Ergebnisse der statistischen Auswertung nach McArdle und Anderson (2001) von den genannten Ausreißern beeinflusst worden sein. Innerhalb der 1-mm-Variante waren hier lediglich signifikante Unterschiede zwischen den Profilen der Mischung I und III festzustellen, obwohl sich auch die beiden Profile a und c der Grassilage-betonten Mischung V deutlich von der Maissilage-betonten Mischung I abgrenzten (Abb. 8). Innerhalb der 4-mm-Variante konnten zumindest signifikante Unterschiede zwischen Mischung I und V nachgewiesen werden. Inwiefern Mischung III sich von diesen abhob, ist allerdings weniger eindeutig zu erkennen.

Die in Abhängigkeit der Futtermischungen beobachteten Verschiebungen der SSCP-Profile innerhalb der betrachteten Organismengruppen dürften auf deren phylogenetische und physiologische Diversität zurückzuführen sein (Mannarelli et al., 1991, Collins et al., 1994, Avgustin et al., 1997, Mackie et al., 2001, Uz und Ogram, 2006). In den *Clostridium*-Clustern XIV a und b beispielsweise finden sich sowohl cellulolytische Spezies wie *Clostridium populeti* (Sleat und Mah, 1985) als auch solche

wie *Eubacterium xylanophilum*, das lediglich zum Abbau von Hemicellulosen befähigt ist (van Gylswyk 1985). Außerdem unterscheiden sich einige Organismen dieser Gruppe wie z.B. *Pseudobutytrivibrio ruminis* und *Butyrivibrio fibrisolvens* deutlich in ihrer proteolytischen und amylolytischen Aktivität (Cotta und Forster, 2006).

Eine große Diversität zeigen auch die *Bacteroides-Prevotella*. Vertreter dieser Gruppe sollen ebenfalls am Abbau von Stärke und Hemicellulosen sowie dem Abbau von Pektinen beteiligt sein (Cotta, 1992, Dehority, 1991). Darüber hinaus wird davon ausgegangen, dass einige *Prevotella*-Spezies eine bedeutende Rolle im Proteinstoffwechsel des Pansens spielen (Wallace et al., 1993, Attwood und Reilly, 1995, Wallace, 1996).

Allerdings erwiesen sich nur wenige Klone aus den *Bacteroides-Prevotella*-spezifischen SSCP-Profilen als Zugehörige dieser Gruppe. Ein Großteil der Klone war den *Proteobacteria* zuzuordnen. Da aber auch diese ein Phylum ausgesprochener metabolischer Vielfalt darstellen (Madigan und Martinko, 2006), sind entsprechende Veränderungen innerhalb dieser Gruppe in Abhängigkeit der eingesetzten Futtermischungen ebenfalls wahrscheinlich.

Die eigenen Beobachtungen bestätigen die Ergebnisse bisher veröffentlichter *in vivo* und *in vitro* Studien. Kocherginskaya et al. (2001) arbeiteten mit Pansensaft von Rindern, denen entweder eine Mais- oder Heu-basierte Ration angeboten wurde. DGGE-Profile der ruminalen Mikrobengemeinschaften deuteten auf beachtliche Unterschiede zwischen beiden Varianten hin. Zusätzlich erstellte 16S rDNA-Klonbanken bestätigten dieses Ergebnis. In beiden Klonbanken konnten vorwiegend Sequenzen nachgewiesen werden, die den *Clostrida*, *Bacteroidetes* oder *Proteobacteria* zuzuordnen waren. Überschneidungen hinsichtlich der gefundenen Phylotypen zeigten sich aber nur wenige. Für die Mais-basierte Ration konnten beispielsweise innerhalb der *Proteobacteria* vor allem nahe Verwandte des amylolytischen *Ruminobacter aminophilus* nachgewiesen werden. Im Falle der Heu-basierten Ration dagegen wurde das Phylum der *Proteobacteria* durch andere Spezies repräsentiert, zu deren Physiologie aber bisher keine Informationen vorliegen. Darüber hinaus konnte für die Mais-basierte Ration eine deutlich höhere mikrobielle Diversität festgestellt werden als für die Heu-basierte. Die Autoren schlussfolgerten, dass sich für jede der angebotenen Ration eine spezifische Mikrobengemeinschaft im Pansen der Tiere etabliert hatte. Veränderungen innerhalb der *Clostrida*, *Bacteroidetes*

und *Proteobacteria* führten Kocherginskaya et al. (2001) ebenfalls auf die physiologische Diversität dieser Organismengruppen zurück.

Boguhn et al. (2008) untersuchten den Einfluss verschiedener Futtermischungen auf die ruminale Mikrobengemeinschaft *in vitro*. Hierfür nutzten sie das gleiche System, das auch in der vorliegenden Arbeit zur Anwendung kam. Sie verwendeten u.a. zwei Futtermischungen, die sich in erster Linie durch variierende Mais- und Grassilageanteile auszeichneten (13 bzw. 46 % Maissilage und 82 bzw. 49 % Grassilage, außerdem 5 % Heu und Stroh). Die Ergebnisse ihrer SSCP-Analysen ließen ebenfalls einen deutlichen Effekt des jeweiligen Silageanteils in der Ration auf die Profile der mikrobiellen Gemeinschaften erkennen. Signifikante Unterschiede waren hier für *Bacteria*- und *Archaea*-spezifische SSCP-Profile festzustellen. Ein Effekt auf die Gruppe der *Clostridia* aber konnte nicht statistisch abgesichert werden. Da allerdings von den Autoren zur Erstellung der *Clostridia*-spezifischen SSCP-Profile ein anderer Vorwärtsprimer verwendet worden ist als in der vorliegenden Arbeit, widersprechen diese Ergebnisse nicht zwingend den eigenen. Denn eine Amplifikation von 16S rDNA-Fragmenten anderer *Clostridia*-Spezies wäre durchaus vorstellbar.

In Übereinstimmung mit den zuvor dargestellten Untersuchungen von Boguhn et al. (2008) wurde auch in dieser Arbeit ein deutlicher Effekt des Mais- und Grassilageanteils in der Ration auf die SSCP-Profile der *Archaea* festgestellt. Auch diese Gruppe zeichnet sich durch eine enorme metabolische Vielfalt aus (Madigan und Martinko, 2006, DeLong et al., 2001). Einer aktuellen Übersichtsarbeit von Janssen und Kirs (2008) zufolge sind allerdings unter den *Archaea* im Pansen hauptsächlich Methanogene zu finden, die Abprodukte der Fermentation wie Wasserstoff und Kohlendioxid oder Formiat zur Energiegewinnung nutzen. Da aufgrund dessen für diese Organismen eine weniger enge Interaktion mit den angebotenen Futtermitteln erwartet werden darf als für viele Bakterien, stellen die Autoren eine eher indirekte Beeinflussung der *Archaea*-Gemeinschaft im Pansen zur Diskussion. Sie führen beispielsweise Veränderungen des pH-Wertes durch das verabreichte Futter an. Allerdings finden sich im Pansen auch andere Methanogene (Janssen und Kirs, 2008), die zur Energiegewinnung auf Substrate wie Methanol, Methylamin oder Acetat angewiesen sind (Madigan und Martinko, 2006). Darüber hinaus ist bekannt, dass verschiedene Methanogene auch auf unterschiedliche Kohlenstoffquellen zurückgreifen und ihr Bedarf an Wachstumsfaktoren wie Acetat, Vitaminen und Aminosäuren deutlich

variiert (Zeikus, 1977). Eine direkte Beeinflussung dieser Organismen durch das angebotene Futter wäre folglich auch möglich.

Neben den Methanogenen besiedeln aber auch andere *Euryarchaeota*, wie die hier nachgewiesenen *Thermoplasmata*, den Pansen domestizierter Wiederkäuer (Tajima et al., 2001a, Wright et al., 2006 und 2007). Phylogenetisch und physiologisch unterscheiden sich diese Organismen deutlich von den Methanogenen (Tajima et al., 2001a, Madigan und Martinko, 2006). Unter den *Thermoplasmata* sind sowohl anaerobe und fakultativ anaerobe als auch aerobe Spezies zu finden. Sie wurden bereits in einer Vielzahl von Habitaten nachgewiesen und sind daher wohl in der Lage, verschiedene organische Verbindungen zu metabolisieren (Schönheit und Schäfer, 1995, Itoh, 2003, Madigan und Martinko, 2006). Eine direkte Beeinflussung durch das angebotene Futter scheint daher auch im Falle der *Thermoplasmata* plausibel.

Rationsbedingte Veränderungen der ruminalen *Archaea*-Gemeinschaft sind folglich zu erwarten. Allerdings sind nach derzeitigem Kenntnisstand gezielte Untersuchungen zum Einfluss der Grobfutterquelle in Wiederkäuerrationen auf die *Archaea* im Pansen nur von Wright et al. (2004) durchgeführt worden. Die Autoren isolierten mikrobielle DNA aus dem Pansensaft von Schafen, die entweder Luzerne- oder Haferheu angeboten bekamen bzw. freien Weidezugang hatten. Anhand von relativ umfangreichen 16S rDNA-Klonbanken wiesen sie deutliche Unterschiede zwischen den drei Fütterungsgruppen nach. Zum einen variierte die Häufigkeit verschiedener *Methanobrevibacter*-Spezies in den Proben, zum anderen deutete sich für die Weidetiere eine höhere Diversität der Methanogenen an als für die Luzerneheu fressenden Tiere. Die Haferheu-Gruppe nahm in beiderlei Hinsicht eine Zwischenstellung ein. Ein Effekt der Grobfutterquelle auf die *Archaea* im Pansen ließ sich demnach auch in den Untersuchungen von Wright et al. (2004) nachweisen.

Weitere Hinweise auf eine tatsächliche Beeinflussung der untersuchten Mikrobengemeinschaften durch die eingesetzten Futtermischungen liefern Ergebnisse von Hildebrand et al. (2008), die im Rahmen des hier zur Diskussion gestellten Versuches den Abbau verschiedener Futterinhaltsstoffe sowie die Effizienz der mikrobiellen Proteinsynthese ermittelten. Während kein Einfluss der Futtermischung auf den Abbau der organischen Substanz und des XP nachgewiesen werden konnte, war jedoch mit steigendem Grassilageanteil in der Mischung ein deutlich höherer NDF-Abbau sowie eine erhöhte Effizienz der mikrobiellen Proteinsynthese zu

beobachten. Eine Hemmung des Wachstums cellulolytisch und hemicellulolytisch aktiver Spezies in den Maissilage enthaltenden Mischungen liegt folglich nahe.

Des Weiteren stellte Hildebrand (unveröffentlicht) in Abhängigkeit der eingesetzten Futtermischung variierende Aminosäurenmuster im Mikrobenprotein sowie ein anderes Verhältnis der kurzkettigen Fettsäuren in den Überläufen fest. Diese Ergebnisse deuten auf Änderungen der Umsetzungsprozesse in den Fermentern und damit ebenfalls auf Unterschiede zwischen den untersuchten Mikrobengemeinschaften hin.

Einfluss der Futterpartikelgröße

Soll die Futterpartikelgröße als möglicher Einflussfaktor auf die ruminale Mikrobengemeinschaft *in vitro* geprüft werden, so ist Voraussetzung, dass die Vermahlung des Futters bei verschiedenen Siebdurchgängen auch zu entsprechenden Unterschieden in der Partikellänge führt. Die Ergebnisse von Hildebrand (unveröffentlicht) ließen im Falle der für diese Untersuchungen gewählten Siebdurchgänge einen tatsächlich erhöhten Anteil größerer Partikel (≥ 1 mm) in der Futtermischung V der 4-mm-Variante erkennen. Die Analyse der Partikelgrößenverteilung für Mischung I war allerdings nicht auswertbar, da durch den hohen Stärkeanteil im Mais ein relativ großer Anteil agglomerierter Teilchen in der Futterprobe vorlag. Den Angaben von Hildebrand (unveröffentlicht) zufolge unterschieden sich aber auch in dieser Mischung beide Varianten augenscheinlich voneinander. Bossen et al. (2008) nutzten zum Vermahlen einer Mais- und Grassilage ebenfalls Siebdurchgänge von 1 und 4 Millimetern und konnten einen erhöhten Anteil längerer Partikel unter Verwendung des 4-mm-Siebes bestätigen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit zeichnete sich ein deutlicher Effekt der Futterpartikelgröße auf die SSCP-Profile der drei untersuchten Organismengruppen ab. Während im Falle der *Clostridia*- und *Archaea*-spezifischen Profile die NMDS-Plots einen gerichteten Partikeleffekt erkennen ließen (Abb. 5 und 9), war dies für die *Bacteroides-Prevotella* nicht zu beobachten (Abb. 7). Wie aber aus Abbildung 6 zu ersehen ist, zeigten die *Bacteroides-Prevotella*-spezifischen Profile für die Futtermischung I der 1-mm-Variante eine Gel-bedingt schlechtere Auftrennung der Banden und zeichneten sich daher gegenüber den anderen Profilen weniger deutlich ab. Dies dürfte einen erheblichen Einfluss auf die Bandendetektion gehabt und zu entsprechend abweichenden Profilen geführt haben. Werden diese von den Betrachtungen ausgeschlossen, so lassen die NMDS-Plots der

Bacteroides-Prevotella-Gruppe ebenfalls einen gerichteten Effekt der Futterpartikelgröße auf die SSCP-Profile vermuten.

Wie bereits erwähnt, ist eine Vielzahl von Vertretern der *Clostridia* und *Bacteroides-Prevotella* am ruminalen Abbau von Strukturkohlenhydraten aus dem Futter beteiligt. Deren Aufschluss ist entscheidend durch die gegebene Futterpartikelgröße beeinflusst, da sich mit abnehmender Partikellänge die angreifbare Oberfläche des abzubauenen Pflanzenmaterials für die Mikroorganismen deutlich erhöht (Weimer et al., 1990, Bowman und Firkins, 1993, Buxton und Redfearn, 1997, Fields et al., 2000).

Faserspaltende Enzyme ruminaler Mikroorganismen liegen zum überwiegenden Teil zellgebunden vor (Williams und Stachan, 1984, Ölschläger, 2007). Daher ist für eine Reihe von Bakterien, die am Zellwandabbau beteiligt sind, eine direkte Besiedlung der Futterpartikel zu beobachten (Cheng et al., 1991). Die Anheftung allerdings erfolgt bei verschiedenen Spezies über unterschiedliche Mechanismen (Latham et al., 1978, Chesson und Forsberg, 1997). Darüber hinaus wurde bereits nachgewiesen, dass Unterschiede hinsichtlich der präferierten Bindungsstellen am Futterpartikel bestehen (Latham et al., 1978, Shinkai und Kobayashi, 2007). *Ruminococcus flavefaciens* beispielsweise bevorzugt die Oberfläche von Epidermis, Phloem und Sklerenchym pflanzlicher Zellwände, *Fibrobacter succinogenes* dagegen findet sich eher an Schnittkanten pflanzlicher Zellen oder wächst auf der Oberfläche von Mesophyll, Epidermis und Phloem (Latham et al., 1978). Der gewählte Vermahlungsgrad des eingesetzten Futters könnte demnach im Zuge der Partikelbesiedlung die eine oder andere Spezies der *Clostridia* und *Bacteroides-Prevotella* entsprechend bevor- oder benachteiligt haben. Allerdings erfolgte in dieser Arbeit lediglich eine Erstellung von SSCP-Profilen für die Mikroben aus den Überläufen. Eine Veränderung der partikelassoziierten Mikrobengemeinschaft sollte aber auch anhand dieser Fraktion erkennbar sein, denn mit zunehmendem Anteil einer partikelassoziierten Spezies dürfte sich deren Zahl auch in der flüssigen Phase erhöhen. Dies sollte zumindest für lose an den Futterpartikeln haftende Mikroorganismen der Fall sein, da nach weitgehendem Abbau eines Partikels die Neubesiedlung anderer erforderlich wird (Cheng und McAllister, 1997). Allerdings finden sich in der Literatur auch Hinweise darauf, dass Veränderungen der fest an den Partikeln haftenden Spezies wie *F. succinogenes* oder *R. flavefaciens* auch anhand mehrfach filtrierten Pansensaftes nachzuvollziehen sind (Tajima et al., 2001b). Außerdem ist hier davon auszugehen, dass auch die gewonnene

Mikrobenmasse trotz mehrerer Waschschriffe noch immer kleinste Futterpartikel enthielt, die ebenfalls dem Prozess der DNA-Extraktion unterlagen.

Darüber hinaus ist aber auch eine indirekte Beeinflussung der *Clostridia* und *Bacteroides-Prevotella* in der flüssigen Phase über eine Veränderung der partikelassoziierten Mikrobengemeinschaft und resultierender Fermentationsprodukte denkbar. Im Falle der 4-mm-Variante könnte beispielsweise der Zellwandabbau vermehrt durch Pilze erfolgt sein. Diese überwinden strukturelle Barrieren wie Lignin deutlich leichter als Bakterien und sind in der Lage, die pflanzliche Kutikula zu durchdringen (Kolattukudy, 1985, Akin et al., 1989 und 1990, Varga und Kolver, 1997). Des Weiteren verfügen ruminale Pilze über eine höhere proteolytische Aktivität als cellulolytische Bakterien und können aufgrund dessen Proteinschichten auf der Pflanzenoberfläche problemlos penetrieren (Orpin und Joblin, 1997). Pilze sind demzufolge weniger abhängig von der Vermahlung des Futters als Bakterien.

Die Ergebnisse zum Nährstoffabbau aus den hier eingesetzten Futtermischungen ließen lediglich einen Effekt der Futterpartikelgröße auf den Abbau des XP erkennen (Hildebrand et al., 2008). Die Autoren beobachteten für die 4-mm- gegenüber der 1-mm-Variante einen signifikant erhöhten Abbau des XP aus dem Futter. Dies stützt die These zur vermehrten Aktivität von Pilzen während der Inkubation.

Für eine Beeinflussung der mikrobiellen Gemeinschaft durch die Futterpartikelgröße sprechen auch die von Hildebrand (unveröffentlicht) erfassten Daten zur täglich gebildeten Menge an kurzkettigen Fettsäuren. Während kein Einfluss der Futterpartikelgröße auf die produzierte Menge an Propionat und Valerat bestand, war ungeachtet der Futtermischungen in der 4-mm- gegenüber der 1-mm-Variante sowohl mehr Acetat als auch Butyrat gebildet worden. Außerdem unterschied sich das Aminosäurenmuster des aus den Überläufen stammenden Mikrobenproteins in Abhängigkeit der gewählten Futterpartikelgröße (Hildebrand, unveröffentlicht).

Fernandez et al. (2004) prüften ebenfalls den Einfluss der Futterartikelgröße einer Maissilage auf verschiedene Parameter der ruminalen Fermentation. Für ihre *in vivo* Studien konzipierten sie eine Maissilage-betonte Ration (79 % der T Maissilage) für Rinder und variierten ausschließlich die Partikellänge des enthaltenen Grobfutters (mittlere Partikellänge: 0,5 und 2,64 mm). Im Gegensatz zu Hildebrand (unveröffentlicht) konnten Fernandez et al. (2004) keinen Effekt der Partikellänge auf

das Verhältnis der gebildeten kurzkettigen Fettsäuren im Pansen der Tiere nachweisen. Bei Verabreichung der gröberen Maissilage zeigte sich lediglich eine leicht erhöhte Ammoniumkonzentration sowie ein geringfügig verminderter Abbau der organischen Substanz, Stärke und NDF. Statistisch absicherbar waren diese Differenzen allerdings nicht. Ebenso wenig konnten weder Hildebrand et al. (2008) noch Bossen et al. (2008) einen Partikeleffekt auf den Abbau der NDF aus Mais- und Grassilage beobachten, wenn für die *in vitro* Inkubation des Futters Siebdurchgänge von einem und vier Millimetern gewählt wurden.

Bowman und Firkins (1993) dagegen wiesen *in situ* einen deutlichen Effekt der Partikelgröße auf den Abbau von NDF und ADF aus verschiedenen vermahlenden Gräsern (*Tripsacum dactyloides*, *Dactylis glomerata*) nach. Sie wählten Siebdurchgänge von 2 und 5 Millimetern. Es zeigte sich, dass NDF und ADF aus den feiner vermahlenden Gräsern deutlich schneller abgebaut wurden als aus den gröber vermahlenden. Den beschleunigten Abbau aus dem feineren Material führten die Autoren auf die Vergrößerung der angreifbaren Oberfläche für die Mikroorganismen zurück. Nach 72-stündiger Inkubation aber lag der Abbau beider Faserfraktionen in der 5-mm-Variante über dem der 2-mm-Variante. Ähnliche Beobachtungen hatten zuvor Lentz und Buxton (1992) gemacht. Sie vermuteten, dass ein sehr feines Vermahlen des Futters strukturelle Veränderungen nach sich zieht und damit die Abbaubarkeit des pflanzlichen Materials negativ beeinflusst. Über die Unterschiede im Abbau der Faserfraktionen NDF und ADF hinaus ermittelten Bowman und Firkins (1993) für die gröberen Futterpartikel eine geringere Besiedlung durch Mikroorganismen. Außerdem stellten sie für beide Futterpartikelgrößen variierende Cellulase-Aktivitäten der Mikroorganismen fest.

Eine deutlich höhere Besiedlungsdichte kleinerer Futterpartikel (0,15 mm) gegenüber größeren (3,35 mm) fanden auch Yang et al. (2001) im Pansen von Rindern, die eine Ration hohen Grobfutteranteils angeboten bekamen.

Unabhängig von der verwendeten Methode lassen sich also eine ganze Reihe von Anhaltspunkten finden, die für einen Effekt der Partikelgröße des eingesetzten Grobfutters auf die ruminale Mikrobengemeinschaft sprechen. Insbesondere die Ergebnisse von Hildebrand (unveröffentlicht) sowie von Hildebrand et al. (2008) bestätigen die eigenen auf molekularbiologischer Ebene gemachten Beobachtungen. Im Hinblick auf den vorgestellten Versuch kann daher von einer Beeinflussung der

untersuchten Gruppen, *Clostridia* und *Bacteroides-Prevotella*, durch die gewählte Partikelgröße des Futters ausgegangen werden.

Der für die *Archaea* beobachtete Partikeleffekt kann aus genannten Gründen als nicht gesichert gelten. Sind allerdings wie gezeigt andere Organismengruppen von einem Partikeleffekt betroffen, so liegt auch eine Veränderung der *Archaea*-Gemeinschaft nahe. Denn vor allem ruminale Methanogene sind für ihre Energiegewinnung auf Abbauprodukte der mikrobiellen Fermentation von Kohlenhydraten angewiesen (Stewart et al., 1997, Wolin et al., 1997) und könnten daher indirekt beeinflusst werden.

3.3.3 Sequenzanalyse

Wie erwartet, hatte die anhand des *Fibrobacter*-spezifischen SSCP-Gels durchgeführte, vergleichende Sequenzanalyse gezeigt, dass die aus den Profilen dreier unabhängiger Proben einer Behandlung gewählten SSCP-Banden trotz gleicher Laufhöhe zum Teil unterschiedliche Sequenzen aufwiesen. Die am häufigsten in den drei Banden aufgetretenen Sequenzen wurden jedoch alle durch ähnliche Sequenzen in der entsprechenden SSCP-Bande aus dem dazugehörigen Mischprobenprofil repräsentiert. Die Mischprobe lieferte demnach ein umfassenderes Ergebnis als die drei unabhängigen Einzelproben für sich. Demzufolge wurde auf eine Bearbeitung der SSCP-Banden aus den Profilen der Einzelproben verzichtet und den Mischproben der Vorzug gegeben. Hierdurch verringerte sich der Arbeitsaufwand für die folgenden Sequenzanalysen deutlich.

In den zur näheren Analyse gewählten Banden aus den drei gruppenspezifischen SSCP-Gelen für *Clostridia*, *Bacteroides-Prevotella* und *Archaea* fanden sich 16S rDNA-Sequenzen, die innerhalb der *Bacteria* den *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Deferribacteres* sowie *Acidobacteria* zuzuordnen waren. Letztere ausgenommen wurden diese Phyla bereits alle im Pansen des Wiederkäuers nachgewiesen (Tajima et al., 2000, Whitford et al., 1998, Kocherginskaya et al., 2001, Ozutsumi et al., 2005, Allison et al. 1993). Ein Vorkommen von *Acidobacteria* im Gastrointestinaltrakt von Tieren wurde dagegen bisher nur für Bockkäfer und Regenwurm beschrieben (Park et al., 2007, Singleton et al., 2003). Unter den *Archaea* waren erwartungsgemäß Methanogene zu detektieren (Janssen und Kirs, 2008). Darüber hinaus fanden sich aber auch Vertreter der *Thermoplasmata*, deren Präsenz im Pansen

bisher nur in wenigen Studien nachgewiesen werden konnte (Tajima et al., 2001a, Wright et al., 2006 und 2007).

Wie die Ergebnisse der Sequenzierung erkennen ließen, war mit Hilfe der in dieser Arbeit eingesetzten Primer keine ausschließliche Amplifikation von 16S rDNA der *Clostridia*, *Bacteroides-Prevotella* oder *Archaea* möglich. Im Falle der *Clostridia* und *Archaea* aber war zumindest ein Großteil der Sequenzen den entsprechend gewählten Organismengruppen zuzuordnen. Gegen eine weitere Verwendung dieser Primerpaare zur Erstellung von Klonbanken beispielsweise würde demnach nichts sprechen. Im Rahmen von SSCP-Analysen allerdings sollte aus oben genannten Gründen auf niedrigerer phylogenetischer Ebene gearbeitet werden, insbesondere dann, wenn eine Sequenzanalyse der SSCP-Banden erfolgen soll. Der zur Amplifikation der *Bacteroides-Prevotella* gewählte R-Primer scheint allerdings ungeeignet zu sein, um eine Selektion dieser Mikrobengruppe zu erreichen. Ein Vergleich mit der RDP-Datenbank macht deutlich, dass dieser sonst universelle Primer nur unter Fehlpaarungen eine Vervielfältigung der 16S rDNA von Vertretern der *Bacteroides-Prevotella* erlaubt. In der vorliegenden Arbeit kam er zum Einsatz, weil andere aus der Literatur bekannte R-Primer, spezifisch oder universell, keine entsprechenden PCR-Produkte erwarten ließen bzw. vorhandene Primerpaare keine nested PCR für die V4V5-Region des 16S rRNA-Gens möglich gemacht hätten. In zukünftigen Untersuchungen aber könnte zur Erstellung von SSCP-Profilen der *Bacteroides-Prevotella*-Gruppe ein Primerpaar eingesetzt werden, das von Bartosch et al. (2004) vorgeschlagen wurde. Es erwies sich als hoch spezifisch und amplifiziert ca. 400 bp lange 16S rDNA-Fragmente. Die PCR-Produkte könnten demnach direkt für die SSCP eingesetzt werden, ohne dass eine folgende nested PCR notwendig wäre.

Wenn auch keine ausschließlich spezifische Amplifikation der gewählten Organismengruppen realisiert werden konnte, so waren dennoch behandlungsabhängige Unterschiede zwischen den Mikrobengemeinschaften anhand der SSCP-Profile zu erkennen. Die Ergebnisse der Sequenzierung sind im Hinblick auf die untersuchten Einflussfaktoren jedoch nur schwer zu interpretieren, da jede der betrachteten SSCP-Banden durch mehr als einen Organismus repräsentiert wurde und einige Sequenzen in mehreren Banden zu finden waren. Auch mit Hilfe des Restriktionsverdau war nicht eindeutig festzustellen, welche der Sequenzen in einer

Bande am häufigsten auftrat (Vergleich. 3.2.2). Da außerdem nur einige Klone je SSCP-Bande zur Sequenzierung ausgewählt wurden, kann letztlich auch nicht als erwiesen gelten, dass eine behandlungsabhängig aufgetretene Sequenz in keiner der anderen Banden zu finden gewesen wäre.

Darüber hinaus erlaubte das relativ kurze 16S rDNA-Fragment von etwa 400 bp häufig keine sichere phylogenetische Einordnung (Sun et al., 2008). Eine Zuordnung aber, die lediglich auf Ebene der Familie oder des Genus erfolgte, machte eine Differenzierung nach den untersuchten Einflussfaktoren oft unmöglich, da entsprechende Vertreter dieser Gruppen zum Teil ganz unterschiedliche physiologische Eigenschaften aufweisen. Für einige Organismen wie zum Beispiel *Butyrivibrio fibrisolvens* trifft dies sogar auf Artebene zu (Stewart et al., 1997). Ohne genaue Kenntnis des Stamms wären entsprechende Aussagen zum Einfluss von Futtermischung oder Futterpartikelgröße nur bedingt möglich. Ein Zusammenhang beispielsweise zwischen dem Auftreten des Organismus und dem verabreichten Futter wäre kaum herzustellen. Außerdem stehen für eine Reihe von Bakterien und Archaeen, insbesondere aber für bisher nicht kultivierte Organismen, nur wenige oder keine Daten aus der Literatur zur Verfügung, die auf deren Physiologie oder Funktion in einem Ökosystem schließen lassen würden. Dies erschwert die Deutung der Sequenzdaten erheblich. Eine ausführliche Diskussion aller Ergebnisse kann aufgrund der umfangreichen Sequenzanalyse ohnehin nicht erfolgen. Daher soll im Anschluss nur beispielhaft auf einige der ermittelten Sequenzen eingegangen werden.

Wie aus Tabelle 13 hervorgeht, fand sich in Bande 12 des *Clostridia*-spezifischen SSCP-Gels u.a ein Klon (C_12_A1), dessen nächster Verwandter (S_ab score: 0,89) ein bisher nicht kultiviertes Bakterium (EF403060) darstellt. Dieses ist dem Genus der *Roseburia* zuzuordnen und wurde erstmalig in menschlichen Exkrementen nachgewiesen (Li et al., 2008). *Roseburia* besiedeln aber auch den Gastrointestinaltrakt verschiedener Tiere (Stanton und Savage, 1983, Leser et al., 2002). Bisher beschriebene *Roseburia*-Spezies gelten als strikt anaerob lebende Bakterien, deren Temperaturoptimum bei 37°C liegt. Zur Energiegewinnung nutzen sie verschiedene Einfachzucker. Einige Spezies sind in der Lage Stärke abzubauen (Duncan et al., 2006). Das Hauptprodukt der Vergärung von Glucose ist Butyrat (Duncan et al., 2002a und 2006). Im Rahmen des eigenen *in vitro* Versuches war ein Anstieg der Menge an gebildetem Butyrat sowohl mit zunehmendem Grassilageanteil in der Mischung als

auch bei erhöhter Futterpartikelgröße zu verzeichnen (Hildebrand, unveröffentlicht). Ein vermehrtes Auftreten von typischen Butyratbildnern wie den *Roseburia* liegt demnach für diese Behandlungen nahe und würde die ausschließliche Detektion der SSCP-Bande 12 für die Grassilage enthaltenden Futtermischungen der 4-mm-Variante erklären. Als nächste, bereits kultivierte Verwandte des Klons C_12_A1 (S_{ab} score: 0,87) erwiesen sich zwei Stämme der Spezies *Roseburia intestinalis* (Stamm L1-82, AJ312385; Stamm L1-8151, AJ312386). Unter *in vitro* Bedingungen zeigen diese Stämme netto einen Acetatverbrauch, Konzentrationen von 20-100 mM Acetat im Medium wirken daher wachstumsfördernd (Duncan et al., 2002b). Die *in vitro* gemessenen Acetatkonzentrationen in der Überlaufflüssigkeit lagen zwischen 20 und 40 mM (Hildebrand, unveröffentlicht). Allerdings waren für die 4-mm-Variante deutlich höhere Konzentrationen an Acetat nachzuweisen als für das feiner vermahlene Futter. Bei Inkubation des größeren Futters könnte demnach das Wachstum einiger *Roseburia*-Spezies begünstigt worden sein. Außerdem sind verschiedene Stämme der Spezies *R. intestinalis* in der Lage Xylane abzubauen (Duncan et al., 2006). Diese machen einen relativ hohen Anteil der in Gräsern vorkommenden Hemicellulosen aus (Aman, 1998). Neben der NDF kann auch die Faserfraktion der ADF noch Hemicellulosen beinhalten (Theander und Westerlund, 1998). Demnach kann mit steigendem NDF- und ADF-Anteil im Futter, wie für die Grassilage enthaltenden Mischungen beobachtet, auch von zunehmenden Xylangehalten ausgegangen werden (Tab. 2). Ein mögliches Mehrangebot dieser Hemicellulosen in den Mischungen III und V könnte demzufolge wachstumsfördernd auf Xylan-abbaubauende *Roseburia*-Spezies gewirkt haben.

Auch im Pansen des Wiederkäuers konnte bereits ein naher Verwandter von *R. intestinalis* nachgewiesen werden (Sun et al., 2008). Für diese *in situ* Untersuchungen verwendeten die Autoren sowohl Blätter als auch Stängel eines Weidelgrases sowie Reisstroh (68-77 % NDF). Die Inkubation der Substrate wurde im Pansen von Ziegen vorgenommen, die ausschließlich Heu gefüttert bekamen. Die Probenahme erfolgte sowohl aus verschiedenen Tieren als auch zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Zur Analyse der sich jeweils *in situ* etablierenden Mikrobengemeinschaft wurden DGGE-Profile von Teilsequenzen der 16S rDNA erstellt. Unabhängig vom Tier, dem Zeitpunkt der Probenahme sowie dem angebotenen Substrat war in allen DGGE-Profilen eine Bande zu detektieren, die eine Sequenz repräsentierte, die zu 92 % mit der von *R. intestinalis* übereinstimmte. Demnach war auch in dieser Studie nach

Inkubation sehr faserreicher Substrate im Pansen eine *Roseburia*-Spezies gefunden worden.

Die Klone C_12_B1, E2 und G1 aus SSCP-Bande 12 des *Clostridia*-spezifischen Geles zeigten ebenfalls nahe Verwandtschaft zu Vertretern der *Roseburia* (Tab. 13). Übereinstimmende Ähnlichkeitswerte wiesen die Sequenzen dieser Klone allerdings auch gegenüber zwei weiteren nicht kultivierten Organismen (EU842707, AB034063) auf, die bisher nur den *Lachnospiraceae* zugeordnet werden konnten. Beide wurden erstmalig im Pansen von Rindern nachgewiesen (Tab. 13). Für ersteren jedoch liegen keine näheren Informationen zur Fütterung der Tiere vor. Letzterer wurde im Pansen von Rindern gefunden, die nach längerem Verzehr einer Heu-betonten Ration (morgens und abends 3,5 kg Heu, 1 kg Heupellets, 1,5 kg Konzentrat) an drei aufeinanderfolgenden Tagen eine Getreide-reiche Ration (morgens 0,5 kg Heu, 2,4 kg Konzentrat, 3,6 kg Gerste, abends ohne Heu) angeboten bekamen (Tajima et al., 2000). Dies muss jedoch den eigenen Beobachtungen nicht zwingend widersprechen, da die in SSCP-Bande 12 nachgewiesenen Klone keine absolute Übereinstimmung mit dem von Tajima et al. (2000) gefundenen Organismus zeigten. Möglicherweise handelt es sich um zwei Bakterien-Spezies, die sich zwar genetisch ähneln, aber ganz unterschiedliche physiologische Eigenschaften aufweisen. Denkbar wäre aber auch, dass Tajima et al. (2000) anhand ihrer 16S rDNA-Klonbanken einen Organismus nachgewiesen haben, der typischerweise für Heu-betonte Rationen zu finden ist aber aufgrund der zum Teil mehrtägigen Verweildauer des Futters im Pansen auch drei Tage nach Futterumstellung noch präsent war. Voraussetzung wäre allerdings eine entsprechende Toleranz der Spezies gegenüber anderen Futtermitteln und Milieubedingungen. In jedem Falle lassen die eigenen Beobachtungen eine gewisse Toleranz der nachgewiesenen Organismen gegenüber Maissilage in der Ration vermuten.

Als nächster bereits kultivierter Verwandter der Klone C_12_B1, E2 und G1 wurde der Stamm Mz3 der Spezies *Butyrivibrio fibrisolvens* (AM039822) ausgewiesen (S_ab score: 0,95-0,97). Dieser Organismus ist allerdings nicht dem Genus *Butyrivibrio*, sondern lediglich den *Lachnospiraceae* zuzuordnen. Erstmalig isoliert wurde das Bakterium aus dem Pansen von weidenden Schafen (Wallace et al., 2006). Dies kann als weiterer Hinweis darauf gewertet werden, dass die Klone C_12_B1, E2 und G1 Sequenzen von Organismen repräsentierten, die im Pansen von Tieren zu finden sind, denen Gras-betonte Rationen angeboten werden.

In den Banden 8, 10 und 15 des *Bacteroides-Prevotella*-spezifischen SSCP-Gels waren u.a. Klone nachzuweisen, deren nächste Verwandte verschiedene *Prevotella*-Spezies darstellen (Abb. 11). Wie in Abbildung 11 zu erkennen ist, handelt es sich bei den *Prevotella* um eine Gruppe von Bakterien, die eine enorme phylogenetische Diversität aufweist (Avgustin et al., 1994). Analog dazu finden sich auch hinsichtlich ihrer physiologischen Eigenschaften gravierende Unterschiede. Eine Besiedlung verschiedener Nischen im Ökosystem Pansen liegt daher für diese Organismen nahe (Avgustin et al., 1997). Für diese These sprechen auch die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen, denn die für die einzelnen Futtermischungen nachgewiesenen *Prevotella*-Spezies ließen sich phylogenetisch deutlich voneinander abgrenzen (Abb. 11). Die größte Sequenzdivergenz war für zwei Klone zu beobachten, von denen einer aus Bande 10 (B_X_A5) für die vorwiegend Maissilage enthaltende Mischung I und der andere aus Bande 15 (B_XV_E7) für die vorwiegend Grassilage enthaltende Mischung V nachgewiesen wurde. Eine weitere *Prevotella*-Spezies (B_VIII_H11) aus SSCP-Bande 8 nahm aus phylogenetischer Sicht bezüglich der in Bande 10 und 15 gefundenen Klone eine Zwischenstellung ein. Bande 8 war für alle drei Futtermischungen aufgetreten. Demnach sollten hier enthaltene Sequenzen von Organismen stammen, die sich unabhängig vom gewählten Mais- und Grassilageanteil in der Ration etablieren konnten. Eine entwicklungsgeschichtliche Zwischenstellung derartiger Organismen hinsichtlich der in Bande 10 und 15 detektierten Spezies wäre folglich nachvollziehbar. Die SSCP-Bande 8 zeichnete sich allerdings für die vorwiegend Maissilage enthaltende Mischung I deutlich schwächer ab als für die Grassilage enthaltenden Mischungen III und V (Abb. 6). Möglicherweise traten die für Bande 8 nachgewiesenen Organismen in Mischung I weniger häufig auf. Denkbar wäre aber auch, dass die Bande 8 im Falle der Mischungen III und V weitere Sequenzen von Spezies beinhaltete, die in Mischung I gar nicht auftraten. Derartige Organismen könnten beispielsweise durch die in Bande 8 detektierten Klone B_VIII_B11 und G11 repräsentiert worden sein. Damit wäre zumindest erklärt, warum diese beiden Klone in ein gemeinsames Cluster mit der für SSCP-Bande 15 gefundenen *Prevotella*-Spezies fallen (Abb. 11) und folglich für diese drei Organismen ähnliche physiologische Eigenschaften zu erwarten sind. Ihr nächster Verwandter stellt ein bisher nicht kultiviertes Bakterium dar (AB034108), das erstmals im Rahmen der genannten Untersuchungen von Tajima et al. (2000) drei Tage nach Umstellung der Ration von Heu-betont auf Getreide-reich nachgewiesen wurde. Angaben zu Nährstoffgehalten

dieser Rationen finden sich bei Tajima et al. (2000) keine. Es kann aber von deutlichen Unterschieden in der Nährstoffzusammensetzung der Grassilage enthaltenden Futtermischungen, die in der vorliegenden Arbeit zum Einsatz kamen, und der Getreide-reichen Ration von Tajima et al. (2000) ausgegangen werden. Eine Gemeinsamkeit bestand dennoch. Bei Tajima et al. (2000) dürfte aufgrund der Rationszusammensetzung sowie des gewählten Konzentrates (24 % Weizenmehl, 20 % Mais, 20 % Weizenkleie, 10 % Sojamehl, 10 % Leinsamenmehl, 6 % Kleber, 5 % Reiskleie, 5 % Mineralstoffe und Vitamine) die Getreide-reiche gegenüber der Heu-betonten Ration einen höheren XP-Gehalt aufgewiesen haben. Auch die Grassilage enthaltenden Futtermischungen aus den eigenen Untersuchungen ließen deutlich höhere XP-Gehalte erkennen als die vorwiegend Maissilage enthaltende Mischung (Tab. 2). Da eine Reihe von Vertretern der *Prevotella* eine relativ hohe proteolytische Aktivität aufweist (Avgustin et al., 1997), wäre folglich denkbar, dass die drei in Bande 8 und 15 nachgewiesenen Organismen sowie deren nächste Verwandte durch erhöhte Proteingehalte im Futter positiv beeinflusst wurden.

Der in SSCP-Bande 10 detektierte Klon dagegen zeigte einen nächsten Verwandten (AF018450), der erstmalig von Whitford et al. (1998) im Pansen von Rindern nachgewiesen wurde, die eine Mais-basierte Mischration angeboten bekamen (30% Maissilage, 26 % Luzernesilage, 9% Heu, 35% Konzentrat: 50,8% Mais, 28,1 % getoastete Sojabohnen, 13 % Gerste, Mineralstoffe und Vitamine). Dies könnte als Hinweis darauf gedeutet werden, dass es für beide Organismen im Pansen oder *in vitro* von Vorteil ist, wenn Mais-basierte Rationen zum Einsatz kommen. Das nächstverwandte, bereits kultivierte Bakterium gehört der Spezies *Prevotella ruminicola* an (L16482). Eine Reihe von Vertretern dieser Spezies ist in der Lage Stärke abzubauen (van Gylswyk, 1990, Cotta, 1992, Avgustin et al., 1997), was in der vorwiegend Maissilage enthaltenden Futtermischung, die mehr Stärke enthielt als die Grassilage enthaltenden Mischungen, einen Vorteil für das in Bande 10 gefundene Bakterium bedeutet haben kann.

Die SSCP-Banden 10 und 15 waren lediglich für die 4-mm-Variante der jeweiligen Futtermischung zu detektieren. Folglich wäre ein Effekt der Futterpartikelgröße auf beide hier nachgewiesenen *Prevotella*-Spezies zu vermuten. Einige Vertreter der *Prevotella* sind am Abbau von Zellwandbestandteilen wie Xylanen und Pektinen beteiligt (van Gylswyk, 1990, Cotta, 1992, Avgustin et al., 1997), wobei synergistische Interaktionen mit cellulolytischen Bakterien eine bedeutende Rolle spielen (Gradel und

Dehority, 1972, Dehority, 1991). Deren Beeinflussung durch die gewählte Futterpartikelgröße liegt aus bereits genannten Gründen nahe (Vergleich 3.3.2). Sollten einige cellulolytische Spezies einen Vorteil im Falle größerer Futterpartikel haben, so wäre deren positiver Einfluss auf verschiedene *Prevotella*-Spezies denkbar. Strukturelle Veränderungen pflanzlicher Bestandteile in den Futtermischungen der 1-mm-Variante, die möglicherweise durch das feine Vermahlen des Futters verursacht wurden (Lentz und Buxton, 1992), könnten die entsprechenden *Prevotella*-Spezies aber auch direkt beeinflusst haben.

In den Banden 5 und 6 des *Archaea*-spezifischen SSCP-Gels wurden sechs Klone nachgewiesen, die innerhalb der Familie der *Methanobacteriaceae* dem Genus *Methanosphaera* zuzuordnen waren (Abb. 12). Bei den *Methanosphaera* handelt es sich wie auch bei allen anderen Methanogenen um strikte Anaerobier. Für ein optimales Wachstum sind Temperaturen zwischen 36 und 40°C sowie ein pH-Wert im Bereich von 6,5-6,9 erforderlich. Außerdem sind *Methanosphaera*-Spezies auf Acetat, CO₂, Isoleucin und Vitamin B₁ angewiesen sowie auf Ammonium als Stickstoffquelle (Miller und Wolin, 1985). Zur Energiegewinnung greifen *Methanosphaera* auf Methanol zurück, das mit Hilfe von H₂ zu Methan reduziert wird. Zur Bildung von Methan aus CO₂ und H₂, Formiat, Acetat oder Methylaminen sind diese Methanogenen allerdings nicht befähigt. Folglich sind sie auf das Vorhandensein von Methanol und H₂ angewiesen (Miller und Wolin, 1985). Da die genannten Voraussetzungen sowohl im Pansen als auch in dem hier verwendeten *in vitro* System erfüllt werden, erscheint das Auftreten von *Methanosphaera*-Spezies in beiden Habitaten plausibel.

In der vorliegenden Arbeit wurden diese Organismen jedoch nur in den SSCP-Banden 5 und 6 des *Archaea*-spezifischen Gels detektiert. Folglich dürften sich die nachgewiesenen *Methanosphaera*-Spezies vorrangig unter Verwendung der Grassilage enthaltenden Futtermischungen etabliert haben (Abb. 8).

Wie Abbildung 12 zu entnehmen ist, fielen die 6 Klone beider Banden in zwei verschiedene Cluster, deren Sequenzdivergenz mehr als 3 % beträgt. Demzufolge ist davon auszugehen, dass beide Cluster unterschiedliche Spezies repräsentieren (Stackebrandt und Göbel, 1994). Als nächster Verwandter der Klone A_5_E3, A_6_C4 und F6 stellte sich ein bisher nicht kultiviertes *Archaeon* (DQ402012) heraus, das erstmals im Pansen von Ziegen nachgewiesen wurde, zu dem aber darüber hinaus keine weiteren Informationen vorliegen. Die Klone A_6_G4, E4 und H4 zeigten dagegen

nahe Verwandtschaft zu einer nicht kultivierten *Methanosphaera*-Spezies (AY422960), die erstmals im Pansen weidender Rinder detektiert wurde (Skillman et al., 2006). Dies geht mit der oben aufgestellten Hypothese konform, dass *Methanosphaera*-Spezies bei Fütterung Gras-betonter Rationen nachzuweisen sind. Eine Reihe weiterer Untersuchungen bestätigt, dass auch bei freiem Weidezugang oder unter Einsatz Heu-betonter Rationen mit dem Auftreten dieser Organismen im Pansen des Wiederkäuers zu rechnen ist (Tokura et al., 1999, Wright et al., 2004, Tatsuoka et al., 2007, Nicholson et al., 2007). Da aber Vertreter der *Methanosphaera* auch nach Fütterung Mais-basierter Rationen beobachtet wurden (Whitford et al., 2001, Wright et al., 2007), schlussfolgerten Skillman et al. (2006), dass es sich hierbei um universell im Pansen auftretende Organismen handelt. Allerdings erfolgte in den genannten Untersuchungen ausschließlich ein qualitativer Nachweis der *Methanosphaera*. Dies lässt offen, ob quantitative Unterschiede im Auftreten dieser Organismen bestanden.

Die eigenen Ergebnisse lassen zumindest vermuten, dass die nachgewiesenen *Methanosphaera*-Spezies einen deutlichen Vorteil bei Inkubation der Grassilage enthaltenden Futtermischungen hatten. Da die Vertreter der *Methanosphaera* zur Energiegewinnung auf Methanol angewiesen sind, sollte dessen Bereitstellung aus dem angebotenen Futter einen entscheidenden Einfluss auf das Vorkommen dieser Organismen während der *in vitro* Inkubation gehabt haben. Methanol im Pansen stammt vorwiegend aus dem mikrobiellen Abbau methylierter Pektine (Howard, 1961, Wright, 1961, Vantchev et al., 1970, Dehority, 2003), die u.a. ein Bestandteil von Zellwänden in Gräsern sind (Knox et al., 1990, Chesson et al., 1995, Carpita, 1996). Folglich wird ein Teil der Pektine erst im Zuge des Faserabbaus für pektinolytische Spezies zugänglich gemacht. Da sich für die vorwiegend Maissilage enthaltende Mischung I ein deutlich geringerer Abbau der NDF aus dem Futter abzeichnete (Hildebrand et al., 2008), ist zu vermuten, dass auch entsprechend weniger methyliertes Pektin hydrolysiert wurde und damit geringere Mengen Methanol zur Verfügung standen. Für einen Zusammenhang zwischen dem Abbau der Faserfraktionen und Pektinen sprechen auch die Ergebnisse aus Untersuchungen von Gradel und Dehority (1972) sowie Osborne und Dehority (1989). Die Autoren beobachteten *in vitro* einen deutlich besseren Abbau von Pektinen aus Knaulgras (*Dactylis glomerata*) und Weicher Trespe (*Bromus hordeaceus*), wenn sie pektinolytische mit cellulolytischen Spezies kombinierten. Darüber hinaus konnte festgestellt werden, dass sich der Pektinabbau mit zunehmendem Reifestadium der Gräser erheblich verringerte. Als Ursache hierfür führten Dehority et al. (1962) die

fortgeschrittene Lignifizierung der Zellen in Pflanzen späterer Entwicklungsstadien an. Aufgrund des erreichten Reifestadiums dürfte auch die Maispflanze gegenüber den Grünlandgräsern eine deutlich vorangeschrittenere Lignifizierung der Zellen in Spross und Blättern aufgewiesen haben. Ein geringerer Abbau des Pektins aus dem Mais scheint daher plausibel.

Bekannt ist aber auch, dass sich die Zusammensetzung der Pektine in verschiedenen Gräsern unterscheidet (Carpita, 1989, Carpita, 1996). Die Maispflanze enthält beispielsweise Pektine, die zu einem nicht unbedeutenden Teil mit anderen Alkoholen als Methanol verestert sind (Kim und Carpita, 1992, Brown und Fry, 1993). Denkbar wäre daher auch, dass in der Maissilage ein geringerer Anteil methylierter Pektine vorlag als in den Gräsern vom Grünland und aufgrund dessen weniger Methanol in der vorwiegend Maissilage enthaltenden Futtermischung freigesetzt wurde.

Wie die vorangegangene Diskussion erkennen lässt, erschwerten die Komplexität der eingesetzten Grobfuttermittel sowie die physiologische Vielfalt einzelner Organismengruppen die Interpretation der Daten erheblich. Inwiefern die angeführten Faktoren tatsächlich das Auftreten einzelner Spezies bedingt haben, muss folglich offen bleiben. Darüber hinaus waren methodisch bedingt keine endgültig gesicherten Aussagen zum behandlungsabhängigen Auftreten einzelner Organismen zu machen. Daher kamen im Folgenden, um die Ergebnisse der qualitativen SSCP-Analyse zu verifizieren, Methoden zum Einsatz, mit deren Hilfe quantitative Veränderungen innerhalb mikrobieller Gemeinschaften nachvollzogen werden können.

4. Quantitative Untersuchungen – Real-time quantitative PCR und Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung

4.1 Real-time quantitative PCR

4.1.1 Material und Methoden

4.1.1.1 Probengewinnung und -aufbereitung

Die Real-time qPCR wurde als ergänzende Methode zur qualitativen SSCP herangezogen, um auf Ebene einzelner Organismen nähere Informationen zum Einfluss der geprüften Faktoren auf die untersuchten Mikrobengemeinschaften zu erlangen. Demnach sollten im Rahmen der Real-time qPCR dieselben DNA-Extrakte zum Einsatz kommen wie zuvor in der SSCP-Analyse. Voruntersuchungen hatten jedoch gezeigt, dass bei Verwendung dieser DNA-Extrakte mit unterschiedlichen PCR-Effizienzen für die drei Futtermischungen zu rechnen war, was einen Vergleich der verschiedenen Behandlungen deutlich erschwert hätte. Da bei der Konzentrationsbestimmung der DNA in den Eluaten am Spektrophotometer (Abschnitt 3.1.2) für eine Reihe der Extrakte ein relativ niedriges Verhältnis von $OD_{260} : OD_{230}$ festgestellt wurde, war davon auszugehen, dass während der DNA-Extraktion aus den Mikroorganismen einige unerwünschte Hemmstoffe wie zum Beispiel Polysaccharide co-extrahiert worden waren. Obwohl hierdurch kein Einfluss auf die konventionelle PCR ersichtlich war, ist eine Detektion möglicher PCR-Beeinträchtigungen im Rahmen der weitaus sensitiveren Methode der Real-time qPCR denkbar. Um störende Hemmstoffe aus den Extrakten zu entfernen, wurde die DNA einer zusätzlichen Aufreinigung mittels Isopropanol-Fällung unterzogen. Hierfür wurden je Probe 20 μ l DNA-Extrakt mit 0,1 Volumen Natriumacetat (1 M, pH 4,8) und 0,7 Volumen Isopropanol (absolut) versetzt. Anschließend wurde gevortext und das Gemisch für 5 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Es folgte eine 15-minütige Zentrifugation bei $12000 \times g$ und Raumtemperatur (Centrifuge 5403, Eppendorf). Der Überstand wurde verworfen und das erhaltene DNA-Pellet zweimal mit 500 μ l Ethanol (70 % [v/v]) gewaschen (5 min bei $12000 \times g$ und Raumtemperatur). Daraufhin wurde ein zweites Mal 15 min wie oben beschrieben zentrifugiert, die überständige Flüssigkeit abpipettiert und das Pellet bei Raumtemperatur im Exsikkator getrocknet. Die Resuspension der DNA erfolgte in

50 µl reinem, nucleasefreiem Wasser. Anschließend wurde erneut die Reinheit der DNA-Extrakte am Spektrophotometer bestimmt (Abschnitt 3.1.2).

Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Bestimmung der DNA-Konzentration in den mit Isoprpropanol aufgereinigten DNA-Extrakten erfolgte mit Hilfe des interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes PicoGreen unter Verwendung des „Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kits“ (Invitrogen). Gemäß den Angaben des Herstellers wurden die Proben nach dem Protokoll „high range assay“ bearbeitet. Zunächst wurden die Proben in $1 \times$ Tris-EDTA-Puffer (TE, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5) 200-fach verdünnt. Zusätzlich wurde eine Verdünnungsreihe von λ -DNA bekannter Konzentration erstellt, die im Folgenden als Standard für die Konzentrationsbestimmung dienen sollte. Am Spektralfluorometer (Gemini EM, Molecular Devices) wurde daraufhin die Hintergrundfluoreszenz jeder Probe ermittelt. Nach Zugabe des Farbstoffes wurde die Messung der Fluoreszenz bei Wellenlängen von 480 (Anregung) und 520 (Emission) nm wiederholt. Im Anschluss wurden die für den Standard ermittelten Fluoreszenzintensitäten den entsprechenden λ -DNA-Mengen gegenübergestellt, um mittels linearer Regression eine Funktion ableiten zu können, die den Zusammenhang zwischen DNA-Konzentration und gemessener Fluoreszenzintensität beschreibt. Anhand dieser Funktion war im Folgenden auf Grundlage der für die Proben ermittelten Fluoreszenzintensitäten die Bestimmung der DNA-Konzentration in den Extrakten möglich.

Für ihre Verwendung in der Real-time qPCR wurden die DNA-Extrakte im Anschluss durch entsprechende Verdünnung mit reinem, nucleasefreiem Wasser auf eine Konzentration von 20 ng DNA/µl eingestellt.

4.1.1.2 PCR

Die Real-time qPCR sollte im Rahmen dieser Arbeit für die beiden Organismen *Ruminococcus albus* und *Prevotella bryantii* erfolgen. Die hierfür verwendeten Primerkombinationen sind in Tabelle 16 aufgelistet. Als Zielgen für die Amplifikation wurde wie auch für die SSCP das 16S rRNA-Gen gewählt. Die in den Referenzen angegebenen Annealing-Temperaturen der Primer wurden nach deren Überprüfung in einer Temperaturgradienten-Real-time qPCR für die eigenen Analysen übernommen. Bevor die Primer jedoch in der Real-time qPCR zum Einsatz kamen, wurde deren

Spezifität für die zu untersuchenden Organismen im Hinblick auf die eigenen Proben überprüft. Hierfür wurde eine DNA-Mischprobe aus allen Extrakten erstellt, jeweils eine entsprechende konventionelle PCR durchgeführt (Anhang, Tab. A6), das Produkt kloniert und anschließend sequenziert (Vergleich 3.1).

Tabelle 16: Primerkombinationen zur Amplifikation von Teilsequenzen des 16S rRNA-Gens von *Ruminococcus albus* und *Prevotella bryantii* in der Real-time qPCR

Ziel-organismus	Primer	Primersequenz 5'-3'	T _a ¹	PCR-Produkt	Referenz
<i>R. albus</i>	f	CCC TAA AAG CAG TCT TAG TTC G	55°C	175 bp	Koike und Kobayashi, 2001
	R	CCT CCT TGC GGT TAG AAC A			Wang et al., 1997
<i>P. bryantii</i>	f	AGC GCA GGC CGT TTG G	61°C	95 bp	Stevenson und Weimer, 2007
	R	GCT TCC TGT GCA CTC AAG TCT GAC			

¹ Annealing-Temperatur

Die Real-time qPCR wurde am „iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System“ (Bio-Rad) unter Verwendung des „iQ™ SYBR Green Supermix“ durchgeführt. Demnach kam für die Real-time qPCR in dieser Arbeit der interkalierende Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green zum Einsatz. Die PCR erfolgte auf 96-Well-Platten. Dies ermöglichte eine gleichzeitige Berücksichtigung aller Proben in nur einem PCR-Lauf je Organismus. Für jede Probe wurde die PCR in drei Parallelen durchgeführt. Es wurde ein Reaktionsvolumen von 25 µl gewählt. Die Reaktionsansätze sowie die entsprechenden PCR-Programme wurden in Anlehnung an Koike et al. (2007) und Stevenson und Weimer (2007) erstellt (Tab. 17).

Um den Pipettierfehler zu minimieren, wurde zunächst für alle Proben ein Reaktionsansatz aus SYBR Green Supermix, Primern und Wasser erstellt. Dieser wurde im Anschluss entsprechend der Probenzahl auf mehrere kleine Ansätze aliquotiert, um nach Abnahme der Blindprobe die jeweiligen DNA-Proben zusetzen zu können. Die abschließend auf die PCR-Platte zu pipettierenden drei Parallelen für jede Probe stammten demnach aus jeweils einem Reaktionsansatz.

Tabelle 17: Reaktionsansatz und PCR-Bedingungen für die Real-time qPCR von *Ruminococcus albus* und *Prevotella bryantii*

	<i>R. albus</i>		<i>P. bryantii</i>	
Reaktionsansatz:				
SYBR Green Supermix	12,5 µl		12,5 µl	
f-Primer (10 mM)	1,25 µl		1,25 µl	
R-Primer (10 mM)	1,25 µl		1,25 µl	
DNA	20 ng		20 ng	
reines PCR-Wasser	9 µl		9 µl	
PCR-Bedingungen:				
initiale Denaturierung	9 min	95°C	10 min	95°C
Denaturierung	20 s	95°C	20 s	95°C
Primer-Annealing	30 s	55°C	60 s	61°C
Elongation	10 s	72°C	90 s	72°C
terminale Elongation	5 min	72°C	5 min	72°C
Zyklenzahl	45		45	

Die Überprüfung der Amplifikate nach Ablauf der PCR erfolgte anhand einer Schmelzkurvenanalyse. Die PCR-Produkte werden hierfür durch kontinuierliche Erhöhung der Temperatur um je 0,5°C von 50°C auf 99,5°C erhitzt. Dabei werden die PCR-Produkte langsam aufgeschmolzen und das SYBR Green wieder freigesetzt. Gleichzeitig nimmt das Fluoreszenzsignal langsam ab. Wird allerdings der Schmelzpunkt eines PCR-Produktes erreicht, der sequenzabhängig und damit spezifisch für ein zu erwartendes Amplifikat ist, so wird in kürzester Zeit eine drastische Reduktion des Fluoreszenzsignals gemessen. Wird während der Erhitzung die beschriebene Reduktion des Fluoreszenzsignals auf die Temperaturänderung ($\Delta T = 0,5^\circ\text{C}$) bezogen und über der jeweils erreichten Temperatur dargestellt, so ist der Schmelzpunkt eines PCR-Produktes im Verlauf der Kurve durch genau einen Peak gekennzeichnet. Zusätzlich auftretende Peaks wären ein Hinweis auf Primerdimere oder unspezifische Amplifikate. Eine Überprüfung der PCR-Produkte hinsichtlich ihrer Größe im Agarosegel - wie unter Abschnitt 3.1.3 beschrieben - erfolgte lediglich im Rahmen der zuvor durchgeführten Temperaturgradienten-Real-time qPCR.

Effizienz der PCR

Um mit Hilfe der Real-time qPCR einen Vergleich verschiedener Mikrobengemeinschaften hinsichtlich der Häufigkeit des Auftretens einzelner Organismen zu ermöglichen, ist sicherzustellen, dass keine wesentlichen Unterschiede in der PCR-Effizienz zwischen den Behandlungen und im Hinblick auf die Primerkombinationen bestehen. Letzteres ist allerdings nur erforderlich, wenn die jeweiligen Anteile der untersuchten Organismen in einer Gemeinschaft quantifiziert werden sollen. Wird aber wie in dieser Arbeit eine relative Quantifizierung angestrebt, die lediglich einen Vergleich der verschiedenen Behandlungen innerhalb eines Organismus zum Ziel hat, so ist eine Überprüfung der PCR-Effizienz für die einzelnen Behandlungen ausreichend. Ähnliche PCR-Effizienzen würden gegen eine behandlungsbedingte Beeinflussung der PCR durch z.B. co-extrahierte Hemmstoffe wie Proteine oder Polysaccharide sprechen. Unter Verwendung gleicher DNA-Mengen für die PCR wäre in diesem Falle ein direkter Vergleich aller für einen Organismus beobachteten C_T -Werte über verschiedene Behandlungen möglich.

Überprüft wurden die PCR-Effizienzen anhand von DNA-Verdünnungsreihen, die individuell für die drei zu untersuchenden Futtermischungen (I, III, V) erstellt worden waren. Die Ermittlung der Effizienz erfolgte hierbei auf Grundlage der linearen Abhängigkeit des C_T -Wertes vom Logarithmus der eingesetzten DNA-Menge (Higuchi et al., 1993, Rasmussen et al., 2001). Die für die jeweilige Verdünnungsreihe bekannten Ausgangsmengen an DNA wurden logarithmiert gegen die dazugehörigen C_T -Werte abgetragen, um eine lineare Regressionsfunktion ableiten zu können. Anhand deren Steigung wurde im Anschluss die PCR-Effizienz nach Rasmussen (2001) wie folgt berechnet:

$$E = 10^{-1/\text{Steigung}} \quad (4)$$

und

$$E(\%) = \frac{(E-1)}{0,01} \quad (5)$$

Um den Aufwand zu minimieren, wurden die drei DNA-Extrakte einer Futtermischung zu je einer Mischprobe vereinigt und folgende DNA-Mengen in der PCR eingesetzt:

- 40, 20, 4 und 1 ng für *R. albus*
- 100, 10, 1 und 0,1 ng für *P. bryantii*

Reaktionsansätze und PCR-Programme entsprachen den oben genannten Parametern. Lediglich der Zusatz von Wasser wurde in Abhängigkeit der zu verwendenden DNA-Menge variiert.

Da für die Futtermischungen der Futterpartikelgröße 4 mm nur sehr geringe DNA-Mengen für die Real-time qPCR zur Verfügung standen, wurde die Mischprobenbildung und Effizienzüberprüfung auf die 1-mm-Variante beschränkt.

Standard

Um sicherzugehen, dass die beiden PCR-Läufe zur Effizienzbestimmung und Analyse der Proben für den jeweiligen Organismus vergleichbar sind, wurde auf beiden PCR-Platten zusätzlich ein Standard mitgeführt. Dieser enthielt in Abhängigkeit des untersuchten Organismus genomische DNA aus einer Reinkultur von *R. albus* (DSMZ 20455) bzw. *P. bryantii* (DSMZ 11371). Die DNA wurde zum einen vom Johann Heinrich von Thünen-Institut (Institut für Biodiversität, Braunschweig) und zum anderen vom United States Department of Agriculture (US Dairy Forage Research Center, Madison, Wisconsin, USA) zur Verfügung gestellt.

Die Vergleichbarkeit zweier PCR-Läufe sollte anhand der jeweils ermittelten Effizienz im Standard abgeschätzt werden. Daher wurde dieser in vier Verdünnungen wie folgt mitgeführt:

- 20, 2, 0,2 und 0,02 ng DNA zur Analyse von *R. albus* und *P. bryantii* sowie für die Effizienzbestimmung von *P. bryantii*
- 20, 0,02, 0,002 und 0,0002 ng DNA für die Effizienzbestimmung von *R. albus*

4.1.1.3 Auswertung

Zur Auswertung der für die Real-time qPCR erhaltenen Daten fand die „iQTM5 Optical System Software“ (v.2.0, Bio-Rad) Anwendung. Hiermit erfolgte die manuelle Bestimmung des *Threshold*-Wertes (Schwellenwert) für den jeweiligen PCR-Lauf, die Auswahl der PCR-Parallelen, die in die Auswertung einbezogen werden sollten, die Berechnung der PCR-Effizienzen sowie die Schmelzkurvenanalyse. Darüber hinaus war mit Hilfe der Software unter Verwendung der ΔC_T -Methode für jede Probe eine relative Quantifizierung der jeweils amplifizierten Zielsequenz im Vergleich zu den restlichen Proben möglich. Als Bezugspunkt diente hier jeweils diejenige Probe, für die im

entsprechenden PCR-Lauf der geringste mittlere C_T -Wert aus den zur Auswertung gewählten PCR-Parallelen nachgewiesen wurde. Die Berechnung sah wie folgt aus:

$$\text{relative Häufigkeit der amplifizierten Zielsequenz}_{Probe} = 2^{(C_{Tmin} - C_{TProbe})} \quad (6)$$

mit: C_{Tmin} = mittlerer C_T -Wert der Probe mit dem kleinsten mittleren C_T -Wert

C_{TProbe} = mittlerer C_T -Wert der Probe

Die graphische Aufbereitung der Daten erfolgte mit Hilfe der Software GraphPad Prism (v.4.0 für Windows, GraphPad Software).

Im Rahmen weiterführender Datenanalysen sollte geklärt werden, inwiefern für die beiden Organismen Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungen hinsichtlich der relativen Häufigkeit der amplifizierten Zielsequenz statistisch abzusichern waren. Da nur auf Daten aus drei Wiederholungen je Behandlung zurückgegriffen werden konnte, war für die zu prüfende Variable von keiner Normalverteilung auszugehen. Demnach erfolgte die Auswertung auf Grundlage eines verteilungsfreien, nichtparametrischen, rangbasierten Verfahrens in Anlehnung an Brunner et al. (2002). Für die Durchführung der Ranganalyse fand das Softwarepaket „SAS“ (v.9.2) Anwendung. Unter Nutzung der SAS-Prozedur „RANK“ wurden den ermittelten Werten zur relativen Häufigkeit einer Zielsequenz im ersten Schritt entsprechende Ränge zugeteilt. Die Ranganalyse erfolgte im Anschluss unter der Prozedur „MIXED“ mit Hilfe der Option „ANOVAF“. Der paarweise Vergleich einzelner Behandlungen erfolgte mittels Tukey-Test. Wie zuvor für die Auswertung der SSCP-Profiles wurde auch hier ein Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ als ausreichend erachtet, um über signifikante Effekte der untersuchten Einflussfaktoren sowie über deutliche Unterschiede zwischen den Behandlungen zu entscheiden.

4.1.2 Ergebnisse

Spezifität der Primer

Eine Voraussetzung zur Quantifizierung einzelner Organismen in mikrobiellen Gemeinschaften mit Hilfe der Real-time qPCR ist die Verwendung hochspezifischer Primer, die lediglich eine Amplifikation der Zielsequenz erlauben. Daher wurde zunächst anhand der eigenen Proben geprüft, inwiefern die gewählten Primer eine spezifische Amplifikation von 16S rDNA-Teilsequenzen aus dem Genom von *R. albus*

und *P. bryantii* erwarten ließen. Hierfür wurden entsprechende PCR-Produkte aus einer Mischprobe aller DNA-Extrakte kloniert und je Organismus sechs Klone zur Sequenzierung zufällig ausgewählt. Im Ergebnis der Sequenzierung war festzustellen, dass alle sechs Klone aus dem PCR-Produkt, das unter Verwendung der für *R. albus* veröffentlichten Primer erhalten wurde, bei ihrem Vergleich mit der RDP-Datenbank einen Ähnlichkeitswert von 1 gegenüber 10 verschiedenen *R. albus*-Stämmen und vier bisher nicht kultivierten *Ruminococcus*-Spezies aufwiesen. Im Falle der für *P. bryantii* ausgewiesenen Primer sah das Ergebnis ähnlich aus. Erwartungsgemäß zeigten alle sechs Klone gegenüber *P. bryantii* (Stamm B14) einen Ähnlichkeitswert von 1. Dieser war aber darüber hinaus auch gegenüber 3 weiteren, bisher nicht kultivierten *Prevotella*-Spezies zu ermitteln.

Effizienz der PCR

Für die relative Quantifizierung der beiden Organismen, wie unter Abschnitt 4.1.1.2 beschrieben, war über die Spezifität der Primer hinaus die Effizienz der PCR in den verschiedenen Proben zu bestimmen. Zuvor wurde die DNA aber einer weiteren Aufreinigung mittels Isopropanolfällung unterzogen. Im Ergebnis der Isopropanolfällung war für die Proben nach Messung deren optischer Dichte am Spektrophotometer ein verbessertes Verhältnis von $OD_{260} : OD_{230}$ zu erkennen. Während die Werte vor der Fällung zwischen 0,1 und 2,7 lagen, wurden anschließend Werte zwischen 1,8 und 2,2 ermittelt. Das Verhältnis von $OD_{260} : OD_{280}$ lag im Bereich von 1,8 und 2,0.

Die Ergebnisse der im Folgenden, zur Bestimmung der PCR-Effizienzen durchgeführten Real-time qPCR sind für beide Organismen Tabelle A12 zu entnehmen. Aufgeführt sind die C_T -Werte der drei Wiederholungen jeder Reaktion. Die grau markierten C_T -Werte wurden von der Auswertung ausgeschlossen, da sie entweder um mehr als einen C_T gegenüber den anderen beiden Wiederholungen abweichen oder da anhand der Schmelzkurve des PCR-Produktes eine unspezifische Amplifikation zu erkennen war. Die Schmelzkurven derjenigen PCR-Produkte, deren C_T -Werte in die Auswertung einbezogen wurden, sind in den Abbildungen A1 und A2 dargestellt. Den einheitlichen Schmelzkurven der PCR-Produkte nach konnte für beide Organismen von einer spezifischen Amplifikation der erwarteten 16S rDNA-Teilsequenzen ausgegangen werden. Die Schmelztemperatur für das PCR-Produkt von *R. albus* lag bei 87°C, für das von *P. bryantii* bei 86°C. Die Ermittlung der PCR-Effizienzen für die verwendeten

Primerpaare und verschiedenen Mischproben, die für jede Futtermischung der 1-mm-Variante erstellt worden waren, ist anhand von Abbildung 17 nachzuvollziehen.

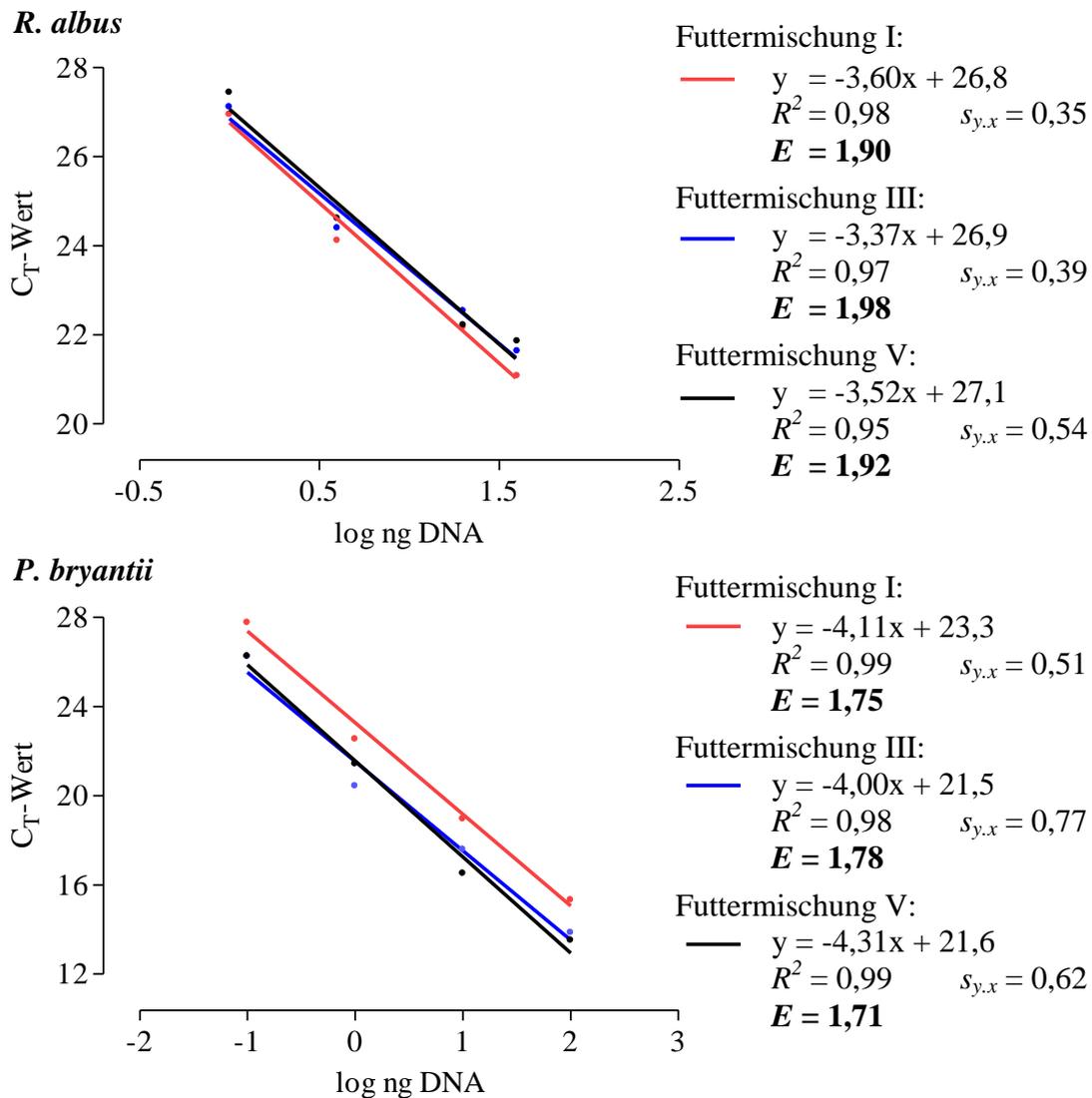


Abbildung 17: Ermittlung der PCR-Effizienz (E) für die *R. albus*- und *P. bryantii*-spezifischen Primer sowie für die Mischproben von DNA, die für die Futtermischungen I, III und V der Futterpartikelgröße 1 mm erstellt wurden

Den Verdünnungsreihen der Mischproben entsprechend wurden hier für beide Organismen die eingesetzten DNA-Mengen logarithmiert den ermittelten C_T -Werten gegenübergestellt. Im Folgenden wurde für jede der Mischproben eine Regressionsgerade angepasst, deren Steigung entsprechend Gleichung 6 zur Ermittlung der PCR-Effizienz diente. Neben der jeweilig berechneten Effizienz sind in Abbildung 17 für jede Mischprobe und damit Futtermischung die geschätzte Funktion sowie deren Bestimmtheitsmaß und Schätzfehler angegeben. Wie der Abbildung zu entnehmen ist,

konnten für *R. albus* PCR-Effizienzen zwischen 1,90 und 1,98 bzw. 90 und 98 % ermittelt werden. Deutlich niedrigere Effizienzen waren dagegen für *P. bryantii* festzustellen (1,71-1,78 bzw. 71-78 %). Für die jeweils eingesetzten Standards wurden PCR-Effizienzen von 93 % für *R. albus* und 52 % für *P. bryantii* ermittelt.

Real-time qPCR für *R. albus* und *P. bryantii*

Die Ergebnisse der Real-time qPCR zur Quantifizierung von *R. albus* und *P. bryantii* sind Tabelle A13 zu entnehmen. Aufgeführt werden die C_T -Werte der drei Wiederholungen jeder Reaktion. Grau markiert sind die Werte, welche nach den oben beschriebenen Kriterien von der Auswertung ausgeschlossen wurden. Die Schmelzkurven der in die Auswertung einbezogenen PCR-Produkte sind in den Abbildungen A3 und A4 dargestellt. Auch hier kann anhand des Kurvenverlaufs der einzelnen PCR-Produkte auf eine spezifische Amplifikation der erwarteten 16S rDNA-Teilsequenzen geschlossen werden. Die ermittelten PCR-Effizienzen für die beiden Standards lagen bei 86 % für *R. albus* und 60 % für *P. bryantii* und damit annähernd im Bereich der zuvor durchgeführten PCR-Läufe.

Da die Ergebnisse der spektrophotometrischen Messung nach der Isopropanolfällung keine Verunreinigungen der DNA-Extrakte mehr erkennen ließen und für die einzelnen Behandlungen ähnliche PCR-Effizienzen innerhalb eines Organismus ermittelt wurden, war von keiner gravierenden Beeinflussung der PCR in den verschiedenen Proben durch mögliche Hemmstoffe auszugehen. Daher erfolgte die Bestimmung der relativen Häufigkeit der 16S rDNA beider Organismen in den Proben unter Annahme gleicher Effizienzen (Vergleich 4.1.1.3). Die entsprechenden Ergebnisse sind in den Abbildungen 18 und 19 zu finden. Dargestellt hier wird die relative Häufigkeit der 16S rDNA, die für jede einzelne Wiederholung einer Behandlung anhand der in die Auswertung einbezogenen C_T -Werte ermittelt wurde. Die angegebenen Fehlerbalken kennzeichnen die jeweilige Standardabweichung für die Messwiederholungen.

Zum Teil zeigten sich relativ große Abweichungen zwischen den einzelnen Messwiederholungen einer Probe. Für die Mehrzahl der Beobachtungen jedoch fielen die Unterschiede zwischen den einzelnen Wiederholungen einer Behandlung größer aus. Dennoch war ein Effekt der betrachteten Einflussvariablen Futtermischung und Futterpartikelgröße auf die untersuchten Organismen zu erkennen.

Wie aus Abbildung 18 hervorgeht, war in den Proben der Futterpartikelgröße 4 mm deutlich weniger 16S rDNA von *R. albus* nachweisbar als in den Proben der

1-mm-Variante ($p = 0,01$), was auch der paarweise Vergleich beider Futterpartikelgruppen bestätigte ($p \leq 0,05$). Zwischen den einzelnen Behandlungen bestanden aber keine signifikanten Unterschiede. Eine Beeinflussung durch die Futtermischung oder signifikante Interaktionen konnten ebenfalls nicht festgestellt werden.

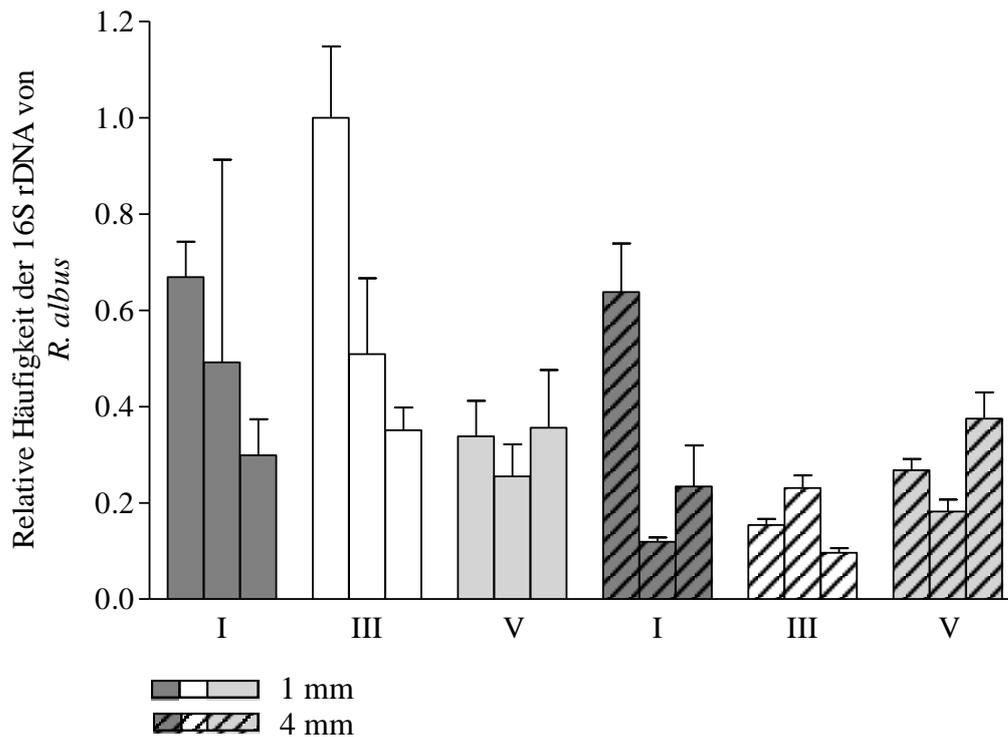


Abbildung 18: Relative Häufigkeit der 16S rDNA von *R. albus* in Abhängigkeit der Futterpartikelgröße sowie des Mais- und Grassilageanteils im Futter (MW, s, $n \leq 3$)

Für *P. bryantii* dagegen war ein deutlicher Effekt der Futtermischung zu erkennen ($p = 0,01$; Abb. 19). Ungeachtet der Futterpartikelgröße war hier mit zunehmendem Grassilageanteil im Futter eine tendenzielle Erhöhung des Gehaltes an 16S rDNA des Organismus in den Proben zu beobachten. Statistisch abzusichern waren die Unterschiede zwischen den Futtermischungen I und V ($p \leq 0,05$). Auf Ebene der einzelnen Behandlungen ließ der paarweise Vergleich aber nur deutliche Unterschiede für die Futtermischung V der 1-mm-Variante und die Mischung I der 4-mm-Variante erkennen ($p \leq 0,05$). Darüber hinaus zeigte sich wie auch für *R. albus* ein Effekt der Futterpartikelgröße auf die relative Häufigkeit der 16S rDNA von *P. bryantii* in den Proben ($p = 0,04$). Eine Interaktion von Futtermischung und Futterpartikelgröße war allerdings nicht festzustellen.

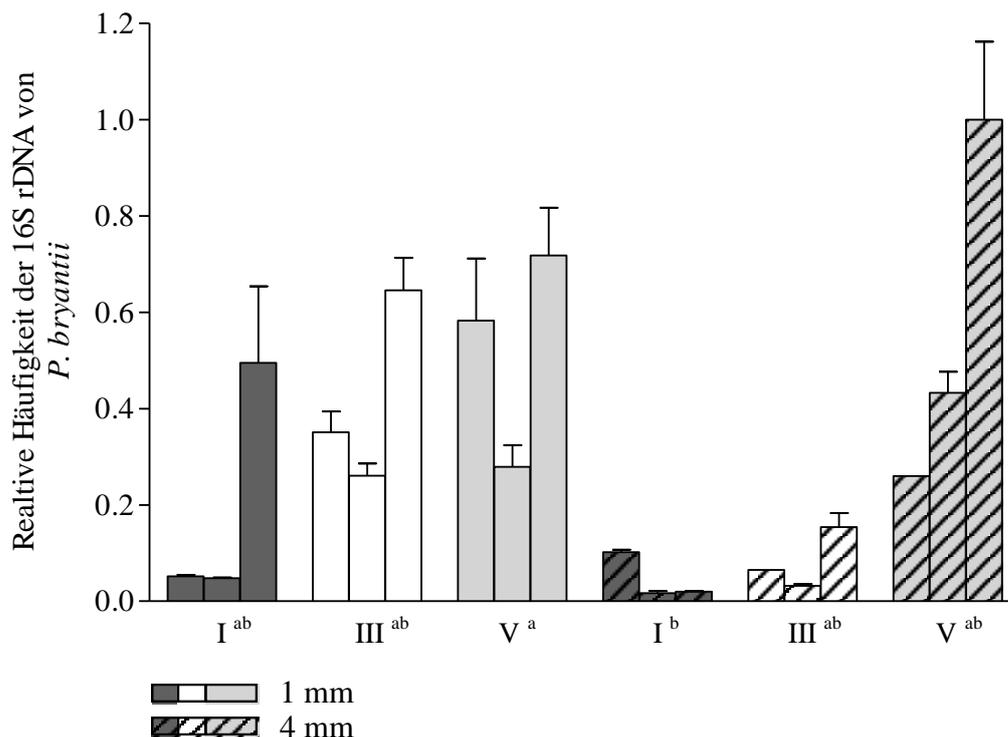


Abbildung 19: Relative Häufigkeit der 16S rDNA von *P. bryantii* in Abhängigkeit der Futterpartikelgröße sowie des Mais- und Grassilageanteils im Futter (MW, s, n ≤ 3); unterschiedliche Hochbuchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$)

4.1.3 Diskussion

Methode

Der für die Real-time qPCR eingesetzte Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green bindet an jedes vorhandene, doppelsträngige DNA-Molekül im PCR-Ansatz. Daher ist unabdingbar, dass die verwendeten Primer hochspezifisch für den entsprechenden Zielorganismus sind. Eine unspezifische Amplifikation von Sequenzen anderer Spezies würde eine Überschätzung der Abundanz des eigentlichen Zielorganismus nach sich ziehen (Smith und Osborn, 2009). In der vorliegenden Arbeit wurde daher zunächst anhand einer Mischprobe aus allen DNA-Extrakten die Spezifität der Primer für *R. albus* und *P. bryantii* überprüft. Im Ergebnis zeigte sich, dass neben den beiden Zielorganismen auch weitere Vertreter des jeweiligen Genus amplifiziert wurden. Allerdings wiesen diese eine enorm hohe Ähnlichkeit gegenüber den beiden Zielorganismen auf (S_{ab} score: 1), was vermuten lässt, dass sie der jeweiligen Art zugeordnet werden können und allenfalls andere Stämme beider Spezies darstellen. Auch der Vergleich der Primersequenzen mit der RDP-Datenbank wies auf eine spezifische Amplifikation von *R. albus* und *P. bryantii* sowie einiger naher Verwandter

hin. Außerdem bestätigen die einheitlichen Schmelzkurven der PCR-Produkte die Amplifikation entsprechend ähnlicher Sequenzen.

Der Einsatz von genomischer DNA anstatt von cDNA für die Real-time qPCR ist mit der relativ schnellen Umwälzung des Fermenterinhalt (~ 550 ml je Tag) und der hohen Nukleaseaktivität im Pansensaft zu rechtfertigen. Während mikrobielle DNA im Boden oder in Meeressedimenten relativ lange überdauern kann und daher zur Quantifizierung aktiver Organismen die Extraktion von RNA sowie die Synthese von cDNA notwendig sind, sollten abgestorbene Mikroorganismen im Fermenter des verwendeten *in vitro* Systems innerhalb weniger Stunden entweder ausgespült oder/und lysiert werden. Hierbei freiwerdende Nukleinsäuren unterliegen dann allerdings einem schnellen Abbau durch die hohe Nukleaseaktivität anderer Vertreter der mikrobiellen Gemeinschaft (Ruiz et al., 2000). Folglich sollte die Extraktion von genomischer DNA und deren Einsatz für die Real-time qPCR eine Quantifizierung aktiver Organismen im System ermöglichen.

Für die Reproduzierbarkeit der Real-time qPCR sowie die Verlässlichkeit der Ergebnisse spielt die Qualität der extrahierten DNA eine entscheidende Rolle (Stults et al., 2001, Fleige et al., 2006). Es wurde bereits dargestellt, dass mit Hilfe der gewählten Extraktionsmethode hochmolekulare DNA gewonnen wurde (Abb. 13). Die erforderliche Reinheit der DNA-Extrakte wurde durch die zusätzliche Aufreinigung der DNA unter Verwendung von Isopropanol erreicht (Vergleich 4.1.2). Das Verhältnis von $OD_{260} : OD_{280}$ und $OD_{260} : OD_{230}$ lag anschließend im geforderten Bereich von 1,8-2,0 bzw. 1,8-2,2. Offensichtliche Verunreinigungen der DNA, die die PCR hätten negativ beeinflussen können (Stults et al., 2001), waren folglich nicht festzustellen. Da aber nicht bekannt ist, bis zu welcher Konzentration mögliche PCR-Inhibitoren wirken, sollte nach Stults et al. (2001) dennoch eine empirische Überprüfung für verschiedene Proben erfolgen, um sicherzugehen, dass zu vergleichende PCR ähnliche Reaktionseffizienzen aufweisen (Smith und Osborn, 2009). Diese wurden in der vorliegenden Arbeit anhand von DNA-Verdünnungsreihen für jede Futtermischung individuell bestimmt. Um den Aufwand zu verringern, wurde hierfür jeweils aus den drei Wiederholungen einer Futtermischung eine Mischprobe erstellt und somit die mittlere Effizienz der drei Proben ermittelt. Für die 4-mm-Variante stand allerdings nur wenig DNA zur Verfügung, weshalb nur die Futtermischungen der 1-mm-Variante überprüft wurden. Unter der Annahme, dass PCR-Inhibitoren vor allem futtermittel-

und weniger partikelgrößenbedingt auftraten, wurden die ermittelten Effizienzen im Anschluss auf die 4-mm-Varianten übertragen.

Zwischen den einzelnen Futtermischungen unterschieden sich die ermittelten PCR-Effizienzen nur geringfügig (Abb. 17). Daher wurde zunächst von gleichen Effizienzen zur Berechnung der relativen 16S rDNA-Häufigkeiten ausgegangen (Gleichung 6). Um zu prüfen, inwieweit diese Annahme gerechtfertigt war, wurden die Ergebnisse der Real-time qPCR zusätzlich einer Effizienzkorrektur wie folgt unterzogen (Pfaffl, 2001):

$$relative\ Häufigkeit\ der\ amplifizierten\ Zielsequenz_{Probe} = \frac{Effizienz_{Futtermischung\ min}^{(C_{Tmin})}}{Effizienz_{Futtermischung\ Probe}^{(C_{TProbe})}} \quad (7)$$

mit: $C_{T\ min}$ = mittlerer C_T -Wert der Probe mit dem kleinsten mittleren C_T -Wert

$C_{T\ Probe}$ = mittlerer C_T -Wert der Probe

$Effizienz_{Futtermischung\ min}$ = Effizienz der Futtermischung, in der der kleinste mittlere C_T -Wert aufgetreten ist

$Effizienz_{Futtermischung\ Probe}$ = Effizienz der Futtermischung, zu der die entsprechende Probe gehört

Das Ergebnis der Effizienzkorrektur ist in Abbildung 20 dargestellt. Im Falle von *R. albus* stellten sich gravierende Veränderungen der Aussage in Bezug auf die Futtermischungen I und III heraus. Während ohne Korrektur lediglich ein Futterpartikeleffekt detektiert wurde, konnte nach der Effizienzkorrektur außerdem ein Einfluss der Futtermischung festgestellt werden ($p = 0,02$). Gegenüber den Mais- und Grassilage enthaltenden Futtermischungen zeigten die Maissilage-betonten Mischungen eine erhöhte relative Häufigkeit der *Ruminococcus*-16S rDNA ($p \leq 0,05$). Der deutlichste Unterschied bestand zwischen Mischung I der 1-mm-Variante und Mischung III der 4-mm-Variante ($p \leq 0,05$). Ein möglicher Effekt des Mais- und Grassilageanteils im Futter auf die Abundanz von *R. albus* würde folglich bei ausschließlicher Betrachtung der nicht korrigierten Real-time-qPCR-Ergebnisse nicht erkannt werden.

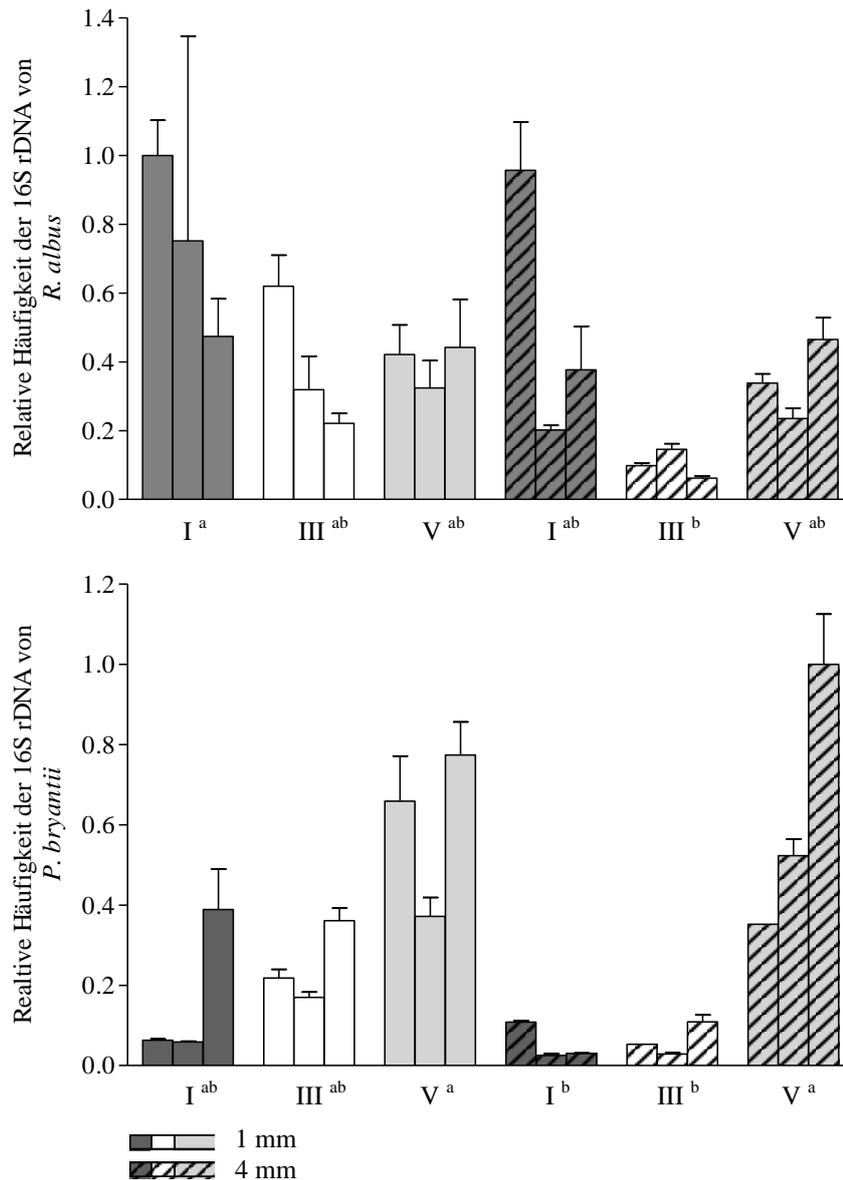


Abbildung 20: Relative Häufigkeit der 16S rDNA von *R. albus* und *P. bryantii* in Abhängigkeit der Futterpartikelgröße sowie des Mais- und Grassilageanteils im Futter nach Effizienzkorrektur (MW, s, n ≤ 3); unterschiedliche Hochbuchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede (p ≤ 0,05)

Im Falle von *P. bryantii* ergab sich nach der Effizienzkorrektur ein ähnliches Bild wie zuvor. Signifikante Unterschiede bestanden auch hier zwischen beiden Futterpartikelvarianten sowie zwischen den Mais- und Grassilage-betonten Mischungen I und V (p ≤ 0,05). Darüber hinaus bestätigte sich der vermutete Unterschied zwischen den Mais- und Grassilage enthaltenden Mischungen III und den Grassilage-betonten Mischungen V (p ≤ 0,05). Auf Ebene der einzelnen Behandlungen waren innerhalb der 4-mm-Variante Unterschiede zwischen den Maissilage enthaltenden Mischungen und

der Grassilage-betonten Mischung statistisch abzusichern ($p \leq 0,05$). Demnach zeichnete sich der beobachtete Trend zu höheren Gehalten an 16S rDNA von *P. bryantii* in den Proben der Grassilage-betonten Mischungen nach der Effizienzkorrektur noch deutlicher ab. Diesen Betrachtungen zufolge sollten die Ergebnisse der Real-time qPCR auch unter Berücksichtigung der Effizienzkorrektur diskutiert werden.

Die Normalisierung der Real-time-Daten erfolgte über den Einsatz gleicher DNA-Mengen für die PCR. Aufgrund dessen waren die ermittelten C_T -Werte bzw. relativen 16S rDNA-Häufigkeiten direkt miteinander zu vergleichen. Für den einfachen Vergleich der sechs Behandlungen war die Nutzung externer Standards oder eines Referenzgens folglich nicht erforderlich. Die Bestimmung der DNA-Menge in den Proben erfolgte für die Real-time qPCR mit Hilfe des interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes PicoGreen® anstatt am Spektrophotometer, da am Fluorometer eine deutlich genauere Quantifizierung zu erwarten war (Sandaa et al., 1998). Während bei Messung der optischen Dichte am Spektrophotometer infolge auftretender Verunreinigungen eine Überschätzung der DNA-Konzentration in den Proben möglich ist, schließt sich dies unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffes aus. Dieser bindet ausschließlich an doppelsträngige DNA und erlaubt damit deren direkte Quantifizierung.

Die externen Standards aus Reinkulturen der beiden Spezies, die in dieser Arbeit zum Einsatz kamen, dienten lediglich als Kontrolle für die beiden PCR-Läufe, die je Organismus durchgeführt wurden. Da die ermittelten PCR-Effizienzen der beiden Standards in den jeweils zwei aufeinander folgenden Läufen ähnlich ausfielen (*R. albus*: 1,93 vs. 1,86; *P. bryantii*: 1,53 vs. 1,60), wurde von einer entsprechenden Wiederholbarkeit der PCR und der damit verbundenen Reaktionseffizienzen in den einzelnen Proben ausgegangen.

Die Wiederholbarkeit der Messung wurde anhand von drei PCR-Ansätzen je Probe überprüft. C_T -Werte, die gegenüber den anderen beiden der jeweiligen Probe um mehr als einen C_T -Wert abwichen, wurden von der Auswertung ausgeschlossen. Im Falle von *R. albus* wichen für eine Probe der Futtermischung I_1mm (b) die C_T -Werte aller drei PCR-Ansätze deutlich voneinander ab (Tab A13). Der Ausschluss einer Messung war daher nicht möglich. Dies erklärt aber auch die hohe Standardabweichung in den Abbildungen 18 und 20. Darüber hinaus waren im Falle von *P. bryantii* für zwei Proben keine Standardabweichungen anzugeben (III_4mm_a und V_4mm_a), da für jeweils zwei der drei PCR-Produkte uneinheitliche Schmelzkurven auf eine unspezifische

Amplifikation hindeuteten. Da aber in allen drei Fällen der vereinfacht ermittelte C_T -Wert dem Trend der jeweiligen Behandlung folgte, sollten dies kaum verzerrend auf die Ergebnisinterpretation gewirkt haben. Ursache für die teilweise schlechte Wiederholbarkeit der Reaktionen könnten Ungenauigkeiten beim Pippettieren sowie beim anschließenden Mischen der PCR-Ansätze sein.

Zumeist fiel aber die Variabilität zwischen den einzelnen Wiederholungen der Behandlungen deutlich größer aus (Abb. 18-20) als zwischen den wiederholten Messungen. Dies lässt auf einen gewissen Durchgangseffekt schließen, der jedoch, wie die Ergebnisse der statistischen Auswertung erkennen lassen, gegenüber dem Einfluss beider Prüffaktoren geringer ausfiel.

Eine Kontamination der eingesetzten Chemikalien und Arbeitsmaterialien mit DNA der Zielorganismen konnte anhand der mitgeführten Blindproben ausgeschlossen werden, denn diese zeigten entweder einen C_T -Wert, der um mehr als 3,3 Zyklen über der Probe mit dem höchsten C_T -Wert lag (Smith et al., 2006), oder beinhalteten Primerdimere anstatt eines spezifischen PCR-Produktes (Abb. A2-A4).

R. albus

R. albus gehört zu den wichtigsten cellulolytisch aktiven Spezies im Pansen (Weimer, 1993, Forsberg et al., 1997, Dehority, 2003) und tritt daher vor allem partikelassoziiert auf (Patterson et al, 1975, Morris und Cole, 1987, Koike et al., 2003a). Die Besiedlung der Futterpartikel erfolgt relativ schnell (Morris und Cole, 1987). Eine deutliche Vermehrung des Organismus ist aber erst nach deren Anheftung an die Partikel zu beobachten (Koike et al., 2003a). Folglich wäre zu vermuten, dass futtermittelbedingte Veränderungen hinsichtlich der Abundanz von *R. albus* anhand der flüssigen Phase aus dem Überlauf kaum nachzuvollziehen sind. Koike et al. (2003a) zeigten jedoch, dass *in situ* inkubiertes Knaulgras nach nur 10 min schon von 10^5 partikelassoziierten *R.-albus*-Zellen/g T besiedelt ist. Daraus schlussfolgerten die Autoren, dass bereits zu Beginn der Inkubation eine beachtliche Menge an *R.-albus*-Zellen in der flüssigen Phase des Panseninhaltes vorhanden gewesen sein muss. Darüber hinaus beobachteten Fields et al. (2000) anhand von *F. succinogenes*, einem anderen cellulolytisch aktiven Bakterium im Pansen, dass Tochterzellen anheftender Organismen in die flüssige Phase abgegeben werden und anschließend andere Futterpartikel besiedeln. Je größer folglich die Population anheftender cellulolytischer Organismen ist, desto mehr freie Tochterzellen sollten auch in der flüssigen Phase des Pansens zu finden sein. Von Ölschläger (2007)

sind zumindest in der flüssigen Phase des Panseninhaltes bereits rationsabhängig variierende Abundanzen von *R. albus* nachgewiesen worden. Quantitative Veränderungen dieser Spezies sollten demnach auch anhand der Überlaufflüssigkeit aus dem in dieser Arbeit verwendeten *in vitro* System nachzuvollziehen sein.

Die Ergebnisse der Real-time qPCR für *R. albus* wiesen zumindest auf einen Effekt der Futterpartikelgröße hin. Tendenziell war in den Mischungen der 4-mm- gegenüber der 1-mm-Variante weniger 16S rDNA des Organismus zu finden (Abb. 18 und 20). Folglich scheint das feinere Vermahlen des Futters und die damit verbundene Vergrößerung der angreifbaren Oberfläche des pflanzlichen Materials positiv auf das Wachstum des Bakteriums gewirkt zu haben. Da der Zellwandabbau durch cellulolytische Bakterien im Pansen oft vom Inneren des Futterpartikels her nach außen gerichtet erfolgt (Weimer, 1996), sind entsprechende Spezies auf natürliche Öffnungen der Pflanze sowie auf den Bruch der Partikel angewiesen (Chesson und Forsberg, 1997). Eine Bevorteilung von *R. albus* im Falle der 1-mm-Variante wäre demnach schlüssig.

Auch *in vivo* lassen sich Hinweise auf einen Effekt der gewählten Futterpartikelgröße bezüglich *R. albus* erkennen. Ölschläger (2007) konzipierte zwei Heu-basierte Rationen niedrigen Konzentratanteils (20 %), die sich nur in Bezug auf die Häcksellänge des Heus unterschieden (6 und 30 mm), und verfütterte diese an Rinder. Die Quantifizierung erfolgte auch in dieser Untersuchung mit Hilfe der Real-time qPCR sowie unter Verwendung der Primer (Tab. 16), die auch in der vorliegenden Arbeit zum Einsatz kamen. Drei Stunden nach Fütterung konnte die Autorin im Pansensaft der Tiere, die das feiner gehäckselte Heu erhalten hatten, einen deutlich höheren Anteil von *R. albus* an der Gesamtbakterienzahl feststellen als nach Einsatz des gröberen Futters. Unterschiede hinsichtlich der festen Phase des Panseninhaltes ließen sich allerdings weder eine Stunde vor noch drei Stunden nach der Fütterung nachweisen.

Ein Effekt des Mais- und Grassilageanteils im Futter auf *R. albus* war zunächst nicht erkennbar (Abb. 18), was in Übereinstimmung mit Ergebnissen anderer Autoren steht, die ebenfalls weder einen Einfluss der Grobfutterquelle noch einen Effekt des Konzentratanteils in der Ration auf die Abundanz des Organismus feststellen konnten (Tab. 18). Nach erfolgter Effizienzkorrektur in der vorliegenden Arbeit zeigte sich allerdings ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Maissilage enthaltenden Futtermischungen I und III. Auf Ebene der einzelnen Behandlungen unterschieden sich

aber lediglich die Futtermischung I der 1-mm-Variante und die Mischung III der Partikelgröße 4 mm. Das tendenziell erhöhte Auftreten von *R. albus* in den Maissilage-betonen gegenüber den Mais- und Grassilage enthaltenden Mischungen ist nur schwer zu erklären. Da das Bakterium keine amylolytische Aktivität zeigt (Stewart et al., 1997) und darüber hinaus auch relativ häufig in den Grassilage-betonen Futtermischungen auftrat, liegt keine positive Beeinflussung durch den höheren Stärkegehalt der Maissilage nahe. Ebenso wenig kann ein Zusammenhang zwischen den Roh Nährstoff-, NDF- sowie ADF-Gehalten und der Abundanz des Organismus hergestellt werden (Tab. 2). Folglich müssen andere Faktoren eine Rolle gespielt haben, die aber anhand der hier verfügbaren Daten nicht zu fassen sind.

Nach derzeitigem Kenntnisstand beziehen sich Untersuchungen, in denen ein futtermittelbedingter Effekt auf die Abundanz von *R. albus* nachgewiesen wurde, nur auf den Vergleich von Rationen hohen und niedrigen Konzentratanteils (Linden et al., 1984, Martin et al., 2001, Ölschläger, 2007). Sie liefern daher keine weiteren Anhaltspunkte für die Interpretation der eigenen Daten.

Inwiefern ein tatsächlicher Einfluss der Futtermischung auf den Organismus *in vitro* bestand, muss daher offen bleiben.

Tabelle 18: Auswahl von *in vivo* Untersuchungen, in denen kein Einfluss der verwendeten Ration auf die Abundanz von *Ruminococcus albus* nachgewiesen wurde

Referenz	Ration	Tierart	Digestaphase	Methode zur Quantifizierung
Weimer et al., 1999	Luzernesilage-versus Maissilage-basiert	Rind	Gemisch aus fester und flüssiger Phase	Hybridisierung
Koike und Kobayashi, 2001	Luzerneheu:Konzentrat 800:200 g 500:500 g 200:800 g	Schaf		Competitive PCR
Mosoni et al., 2007	Heu versus Heu/Konzentrat (1:1)	Schaf		Real-time qPCR

P. bryantii

Im Gegensatz zu *R. albus* zeigt *P. bryantii* kaum cellulolytische Aktivität (Morris und van Gylswyk, 1980, Fields et al. 1998). Allerdings weist *P. bryantii* im Vergleich zu anderen Spezies im Pansen eine relativ hohe xylano- und pectinolytische Aktivität auf,

was darauf hindeutet, dass das Bakterium entscheidend am Abbau von Strukturkohlenhydraten aus dem Futter beteiligt ist (Miyazaki et al., 1997, Matsui et al., 2000). Folglich erstaunt es nicht, dass *P. bryantii* partikelassoziiert auftritt (Koike et al., 2003b, Duval et al., 2007). Da das Bakterium aber auch auf löslichen β -Glucanen und Cellodextrinen wächst (Russell, 1985, Fields et al., 1998), ist es ebenso in der flüssigen Phase des Panseninhaltes zu finden (Tajima et al., 2001b). Ein futtermittelbedingt unterschiedlich häufiges Auftreten dieser Spezies konnte daher bereits sowohl anhand flüssiger (Tajima et al., 2001b) als auch fester Phase (Duval et al., 2007) des Pansens nachvollzogen werden. Demnach sollten auch hier quantitative Veränderungen des Bakteriums anhand der Überlaufflüssigkeit aus den Fermentern nachzuvollziehen sein.

Die Ergebnisse der Real-time qPCR für *P. bryantii* lassen zumindest sowohl in Abhängigkeit der eingesetzten Grobfutterquelle als auch der gewählten Futterpartikelgröße deutliche Unterschiede zwischen den Behandlungen erkennen (Abb. 19 und 20). Unabhängig von der Futterpartikelgröße schien das Bakterium in den Grassilage-betonten Mischungen deutlich öfter aufgetreten zu sein als in den Maissilage enthaltenden Varianten. Ursache hierfür könnten synergistische Beziehungen zwischen cellulolytischen Spezies und *P. bryantii* sein. Zumindest wurde bereits mehrfach nachgewiesen, dass der Abbau sowie die Nutzung von Hemicellulosen und Pektinen durch verschiedene *Prevotella*-Spezies deutlich verbessert wird, wenn diese in Cokultur mit *R. flavefaciens* oder *F. succinogenes* angezogen werden (Coen und Dehority, 1970, Gradel und Dehority, 1972, Osborne und Dehority, 1989, Fondevila und Dehority, 1994). Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass sich im Zuge des Celluloseabbaus die Zugänglichkeit der Hemicellulosen und Pektine für Nichtcellulolyten verbessert (Dehority, 2003). Von einer erhöhten cellulolytischen Aktivität in den Grassilage-betonten Mischungen kann ausgegangen werden, da sich hier gegenüber den Maissilage enthaltenden Mischungen ein höherer XF- bzw. ADF-Abbau andeutete (Hildebrand, unveröffentlicht). Der erhöhte Abbau der NDF (Hildebrand et al., 2008) weist sowohl auf einen höheren Abbau der Cellulose als auch der Hemicellulosen hin, wobei letztere als Substrat für *P. bryantii* zur Verfügung gestanden haben dürften.

Mehrere Autoren weisen darauf hin, dass *Prevotella*-Spezies aufgrund ihrer hohen proteolytischen Aktivität entscheidend am Proteinabbau im Pansen beteiligt sind (Wallace et al., 1993, Griswold et al., 1999). *P. bryantii* ist in der Lage, verschiedene Proteine zu hydrolisieren und sollte daher im Gegensatz zu anderen Spezies einen Vorteil beim Abbau der unterschiedlichen Proteine aus dem Futter haben (Griswold et

al, 1999). Die höheren XP-Gehalte in den Grassilage-betonten Mischungen und das gleichzeitig verstärkte Auftreten der Spezies sprechen für diese Hypothese. Außerdem konnte *in vitro* bereits nachgewiesen werden, dass eine steigende Aminosäurenkonzentration im Medium die Effizienz der mikrobiellen Proteinsynthese des Bakteriums erhöht (Cotta und Russell, 1982). Eine weitere Stimulierung des Wachstums von *P. bryantii* wird allerdings durch den Einsatz von Peptiden erreicht, außerdem sinkt mit zunehmender Peptidkonzentration im Medium die De-novo-Synthese der Aminosäuren in den Zellen (Atasoglu et al., 1998). Folglich ist das Bakterium in der Lage Peptide aufzunehmen, anschließend zu hydrolysieren und die freiwerdenden Aminosäuren für den Aufbau des eigenen Proteins zu nutzen (Pittman et al., 1967, Atasoglu et al., 1998). Höhere Gehalte an Nicht-Protein-Stickstoffverbindungen in der Grassilage, zu denen auch Peptide und Aminosäuren zählen, könnten das Bakterium folglich auch gefördert haben.

Letztlich ist zu vermuten, dass sowohl der erhöhte Zellwandabbau als auch der hohe Gehalt an XP bzw. Nicht-Protein-Stickstoffverbindungen zur Förderung des Wachstums von *P. bryantii* in den Grassilage-betonten Mischungen führten. Einerseits sollte aufgrund der verbesserten Zugänglichkeit von Hemicellulosen und Pektinen weit mehr Substrat für die Energiegewinnung zur Verfügung gestanden haben. Andererseits stand ausreichend Stickstoff sowohl aus zuvor zellwandgebundenen Proteinen als auch leichtlöslichen Stickstoffverbindungen zur Verfügung.

Weitere Versuchsergebnisse auf Basis einer Real-time qPCR ließen ein deutlich vermehrtes Auftreten des Bakteriums bei Verabreichung einer Getreide-reichen im Vergleich zu einer Heu-basierten Ration erkennen (Tajima et al., 2001b). Da *P. bryantii* auch amylolytische Aktivität aufweist (Avgustin et al., 1997), vermuteten die Autoren einen positiven Effekt des höheren Stärkeanteils in der Getreide-betonten Ration. Allerdings zeigt *P. bryantii* gegenüber anderen Spezies im Pansen eine vergleichsweise geringe amylolytische Aktivität (Cotta et al., 1988). Das häufigere Auftreten des Bakteriums könnte folglich auch durch den erhöhten XP-Gehalt in der Getreide-reichen Ration bedingt gewesen sein, was die eigenen Beobachtungen bestätigen würde.

Da *P. bryantii* in der Lage zu sein scheint, sowohl Stärke als auch Hemicellulosen und Pektine zur Energiegewinnung zu nutzen, könnte das verminderte Auftreten in den Maissilage enthaltenden Mischungen auch alleinige Folge des geringeren Stickstoffangebotes gewesen sein.

In situ Untersuchungen von Duval et al. (2007) ließen aber auch Substratpräferenzen des Bakteriums erkennen, die ungeachtet der Stickstoffversorgung zu beobachten sind. Die Autoren konzipierten zwei Grassilage-basierte Rationen mit einem Konzentratanteil von 40 % und verfütterten diese an Schafe. Variiert wurde lediglich der XP-Gehalt des Konzentrates (13 versus 15 %). Nach vierwöchiger Adaptationsphase wurden je Schaf drei verschiedene Getreidemehle 6 h *in situ* inkubiert (Gerste, Weizen, Mais). Anschließend wurde jeder Nylonbeutel sorgfältig gewaschen und die DNA der partikelassoziierten Mikroorganismen extrahiert. Im Ergebnis der folgenden Real-time qPCR zeigte sich, dass *P. bryantii* unabhängig vom XP-Gehalt der eingesetzten Ration häufiger an Gerste als an Weizen und Mais gebunden vorkam. Da die Gerste im Vergleich zu den anderen beiden Getreiden einen geringeren Stärkegehalt und bestenfalls einen ähnlichen XP-Gehalt wie der Weizen aufgewiesen haben sollte (Deutsche Landwirtschafts-Gesellschaft, DLG, 1997), kann allein die Menge dieser beiden Inhaltsstoffe nicht ausschlaggebend für das vermehrte Auftreten des Organismus gewesen sein. Hier scheinen andere Faktoren, wie sie möglicherweise auch im Falle der in dieser Arbeit verwendeten Futtermischungen auftraten, eine Rolle gespielt zu haben. Ein Effekt der gewählten Partikelgröße auf die Abundanz von *P. bryantii* war wie im Falle von *R. albus* lediglich zwischen beiden Futterpartikelgruppen zu beobachten, wobei dieser allein auf die relativ geringen Mengen nachgewiesener *Prevotella*-16S rDNA in den Maissilage enthaltenden Mischungen I und III der 4-mm-Variante zurückzuführen ist (Abb. 19 und 20). Denn nach Inkubation der Grassilage-betonten Mischung V trat das Bakterium ungeachtet der Futterpartikelgröße relativ häufig auf. Auch *R. albus* wurde im Falle der Grassilage-betonten Mischung V kaum von der Futterpartikelgröße beeinflusst (Abb. 18 und 20), ebenso wenig zeigten sich partikelgrößenabhängige Unterschiede im Abbau der NDF (Hildebrand et al., 2008). Eine ähnliche Aktivität cellulolytischer sowie hemicellulolytischer und pectinolytischer Spezies wie *P. bryantii* liegt daher nahe. Im Falle der Maissilage enthaltenden Mischungen war dagegen auch für *R. albus* mit zunehmender Futterpartikelgröße tendenziell weniger 16S rDNA in den Proben nachzuweisen (Abb. 18 und 20). Die geringere Abundanz von *P. bryantii* in den Mischungen I und III der 4-mm-Variante könnte demnach auf das weniger häufige Auftreten von Cellulolyten zuzuführen sein, zu denen synergistische Beziehungen bestehen. Da sich aber letztlich auf Ebene der einzelnen Behandlungen nur die beiden Grassilage-betonten Mischungen signifikant von den Maissilage enthaltenden Mischungen I und III der 4-mm-Variante

unterschieden (Abb. 20), sollte im Hinblick auf die Abundanz des Bakteriums von einem deutlicheren Effekt der Grobfutterquelle als der gewählten Futterpartikelgröße auszugehen sein.

4.2 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung

4.2.1 Material und Methoden

4.2.1.1 Versuchsdurchführung

Für Untersuchungen der mikrobiellen Gemeinschaften mit Hilfe der FISH wurde die Durchführung eines weiteren *in vitro* Versuches notwendig, um intakte Zellen gewinnen zu können. Neben den Futtermischungen I, III und V, die im Rahmen der SSCP-Analyse und Real-time qPCR betrachtet worden waren, wurden hier zusätzlich die Futtermischungen II und IV (Vergleich 2.2) sowie die drei Einzelkomponenten der Mischungen getestet. Da außerdem geprüft werden sollte, ob sich die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften in Fermenter und Überlauf unterschied, wurden beide Mikrobenfraktionen beprobt. Aufgrund des relativ hohen Zeitaufwands, der mit der Durchführung von Pansensimulationen und FISH-Analysen verbunden ist, wurde aber lediglich mit der 1-mm-Variante und mit nur einer Wiederholung je Behandlung gearbeitet. Die Inkubation des Futters erfolgte wie unter Abschnitt 2.1 beschrieben. Alle 8 Varianten wurden zeitgleich inkubiert.

4.2.1.2 Probengewinnung und –aufbereitung

Wie auch in den vorangegangenen Versuchen erfolgte die Probenahme 13 Tage nach Beginn der Inkubation. Unmittelbar nach Beendigung des Versuches wurde für jede Behandlung sowohl aus dem Fermenter- als auch aus dem Überlaufgefäß je 1 ml Probe gewonnen. Zur Fixierung der Mikroorganismen wurden die Suspensionen anschließend mit je 1 ml 1 × PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung, pH 7,6; 137 mM Natriumchlorid, 2,7 mM Kaliumchlorid, 4,3 mM Dinatriumhydrogenphosphat, 1,4 mM Kaliumdihydrogenphosphat) und 6 ml Paraformaldehyd (4 % [w/v] in 1 × PBS) versetzt und 4 h bei 4°C inkubiert. Für die spätere *in situ* Hybridisierung ist die Fixierung der Zellen von zentraler Bedeutung. Das Paraformaldehyd bewirkt hierbei eine Quervernetzung der Proteine in den Zellen und sorgt damit für eine Stabilisierung der Zellwände. Außerdem inaktiviert es Enzyme. Auf diesem Weg ist ein schnelles Abtöten

der Mikroorganismen möglich, wobei aber deren Zellmorphologie weitgehend erhalten bleibt und der Verlust von Nukleinsäuren minimal ist.

Nach der Fixierung wurden 800 µl aus jeder Zellsuspension entnommen und diese 10 min bei $14000 \times g$ und Raumtemperatur zentrifugiert (Centrifuge 5403, Eppendorf). Die erhaltene Zellmasse wurde daraufhin unter gleichen Bedingungen mit 800 µl $1 \times$ PBS gewaschen, um dann für eine Nachfixierung der Zellen über Nacht und deren weitere Lagerung bei -20°C in 400 µl $1 \times$ PBS und 400 µl Ethanol (absolut) aufgenommen zu werden.

Die Hybridisierung der Zellen sollte auf Polycarbonat-Membranfiltern (Porengröße 0,2 µm, Sartorius) erfolgen, was im Weiteren eine Fixierung der Zellen auf den Filtern erforderte. Um eine gleichmäßige Verteilung der Zellen auf der Filteroberfläche zu erreichen, mussten diese zunächst im Ultraschallbad vereinzelt werden. Hierfür wurden je Probe 100 µl der fixierten Zellen mit 4,9 ml $1 \times$ PBS und 5 ml einer 20 mM Natriumpyrophosphatlösung versetzt, die Suspension kurz gevortext und anschließend bei 35 kHz und 240 W 30 s mit Ultraschall (Sonorex TK52H, Bandelin) behandelt. Das Abfiltrieren der Proben erfolgte unter Verwendung von zwei verschiedenen Vakuumfiltriereinheiten (verwendete Vakuumpumpen: Vakuumpumpe DOA-P730 BN, Pall; G-Membranpumpe MZ2, Vacuubrand). Entsprechend der gewählten Filterdurchmesser von 25 und 47 mm wurde zum einen ein Polysulfon-Filter-Trichter (200 ml) der Firma Pall und zum anderen ein Glas-Filtrationstrichter (250 ml) der Firma Sartorius und das entsprechende Zubehör für die Filtration genutzt. Als Stützfilter diente hier ein Cellulose-Nitrat-Membranfilter (Porengröße 0,45 µm, Sartorius). Während für die beiden Proben der Inkubation des SES lediglich 2 ml der Zellsuspension auf die Polycarbonat-Membranfilter pipettiert und abfiltriert wurden, kamen für alle anderen Varianten jeweils 4 ml zum Einsatz. Die Filter wurden mit 4 ml $1 \times$ PBS sowie 4 ml sterilem Bidest gewaschen, luftgetrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

4.2.1.3 Permeabilisierung der Zellen

Während die Zellwand gramnegativer Bakterien für niedermolekulare Verbindungen wie die hier verwendeten fluoreszenzmarkierten Oligonukleotidsonden durchlässig ist, können diese die mehrschichtige Zellwand grampositiver Bakterien wie auch die vieler Archaeen nur unzureichend passieren. Aus diesem Grund war es erforderlich, im Vorfeld der FISH für entsprechende Organismen eine Behandlung der Filter zur

Permeabilisierung der Zellwände vorzunehmen. Um ein Ablösen der Zellen während dieses Prozesses zu verhindern, wurden die Filter zuvor mit 0,1 %iger [w/v] Agarose beschichtet. Für die weitere Behandlung wurden die Filter unter Verwendung eines Skalpells geviertelt.

Die Permeabilisierung der grampositiven Bakterien erfolgte mit Hilfe der Enzyme Lysozym und Achromopeptidase nach einem modifizierten Protokoll von Pernthaler und Pernthaler (2004). Je Probe wurde hierfür ein Filterviertel ausgewählt und dieses zunächst in 50 ml Lysozymbilösung (0,05 mM EDTA, pH 8, 0,1 M Tris-HCl, pH 8, 10 mg Lysozym/ml, 44700 U/mg (Sigma-Aldrich)) für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Filter zweimal in 50 ml Bidest und einmalig in 50 ml Ethanol (absolut) gewaschen. Nach ihrer Trocknung wurden sie in 50 ml Achromopeptidasebilösung (0,01 M Natriumchlorid, 0,01 M Tris-HCl, pH 8, 60 U Achromopeptidase/ml (Sigma-Aldrich)) für 15 min bei 37°C inkubiert. Das Waschen und Trocknen der Filter erfolgte wie zuvor beschrieben. Bis zu ihrer weiteren Verwendung wurden die Filter nachfolgend bei -20°C gelagert.

Die Permeabilisierung der Archaeen erfolgte unter Verwendung von basischem TE-Puffer. Hierfür wurden die gewählten Filterviertel in 50 ml 1 × TE-Puffer (pH 8) 3 min bei 60°C mit Mikrowellen (240 W, Laboratory Microwave Tissue Processor BP-111-RS, Microwave Research & Applications) behandelt. Daraufhin wurden die Filter kurz in destilliertem Wasser gewaschen und luftgetrocknet. Im Falle der Archaeen erfolgte die Hybridisierung der Zellen direkt im Anschluss an die Permeabilisierung.

4.2.1.4 Hybridisierung

Die FISH erfolgte mit Hilfe rRNA-gerichteter DNA-Oligonukleotidsonden, die an ihrem 5'-Ende mit dem Fluorochrom Carbocyanin 3 (Cy3) markiert waren. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Sonden sind in Tabelle 19 aufgeführt. Synthetisiert wurden sie von den Firmen Operon, MWG-Biotech und Biomers. Entsprechend der gewählten Sonden waren für die Hybridisierungsreaktion unterschiedliche Formamidkonzentrationen in den Hybridisierungspuffern zu verwenden (Tab. 20). Während die FISH unter Nutzung der Sonde BAC 303 ohne Formamid erfolgte, war für die Sonde *F. succ.* ein Formamidgehalt von 50 % [v/v] im Hybridisierungspuffer erforderlich. Für alle übrigen Sonden enthielt der Puffer 35 % [v/v] Formamid. In Abhängigkeit von der Formamidkonzentration im Hybridisierungspuffer variierte auch die Zusammensetzung der jeweils verwendeten Waschpuffer (Tab. 20).

Tabelle 19: Sequenzen der im Rahmen dieser Arbeit für die FISH verwendeten DNA-Oligonukleotidsonden

Ziel-organismen	Sonde	Ziel FISH	Sequenz 5' - 3'	Referenz
<i>Bacteria</i>	EUB 338	16S rRNA	GCT GCC TCC CGT AGG AGT	Amann et al., 1990a
	EUB 338 II		GCA GCC ACC CGT AGG TGT	Daims et al., 1999
	EUB 338 III		GCT GCC ACC CGT AGG TGT	
<i>Archaea</i>	ARCH 915	16S rRNA	GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT	Stahl und Amann, 1991
<i>Methanobacteriaceae</i>	MB 1174	16S rRNA	TAC CGT CGT CCA CTC CTT CCT C	Raskin et al., 1994
<i>Grampositive mit niedrigem GC-Gehalt (Firmicutes)</i>	LGC 354 A	16S rRNA	TGG AAG ATT CCC TAC TGC	Meier et al., 1999
	LGC 354 B		CGG AAG ATT CCC TAC TGC	
	LGC 354 C		CCG AAG ATT CCC TAC TGC	
<i>Gamma-proteobacteria</i>	GAM 42a ¹	23S rRNA	GCC TTC CCA CAT CGT TT	Manz et al., 1992
<i>Beta-proteobacteria</i>	BET 42 a ²	23S rRNA	GCC TTC CCA CTT CGT TT	
<i>Delta-proteobacteria</i>	DELTA 495a	16S rRNA	AGT TAG CCG GTG CTT CCT	Loy et al., 2002
	cDELTA 495a ³		AGT TAG CCG GTG CTT CTT	Macalady et al., 2006
<i>Bacteroides-Prevotella</i>	BAC 303	16S rRNA	CCA ATG TGG GGG ACC TT	Manz et al., 1996
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	F. succ.	16S rRNA	TGC CCC TGA ACT ATC CAA GA	Amann et al., 1990b

¹ außerdem als nicht fluoreszenzmarkierte Kompetitorsonde während der Hybridisierung der *Betaproteobacteria* eingesetzt

² außerdem als nicht fluoreszenzmarkierte Kompetitorsonde während der Hybridisierung der *Gammaproteobacteria* eingesetzt

³ unmarkierte Kompetitorsonde

Tabelle 20: Zusammensetzung von 20 ml Hybridisierungs- und 50 ml Waschpuffer für die FISH in Abhängigkeit von der verwendeten Formamidkonzentration

Stammlösung	Formamidkonzentration im Hybridisierungspuffer (% [v/v])		
	0	35 ¹	50 ¹
Hybridisierungspuffer			
5 M Natriumchlorid	3,6 ml	3,6 ml	3,6 ml
1 M Tris-HCl, pH 8	0,4 ml	0,4 ml	0,4 ml
Formamid	-	7 ml	10 ml
destilliertes Wasser	16 ml	7 ml	4 ml
10 × Blocking-Reagent-Lösung ²	-	2 ml	2 ml
Dextransulfat	-	100 mg/ml	100 mg/ml
SDS, 20 % [w/v]	10 µl	20 µl	20 µl
Waschpuffer			
5 M Natriumchlorid	9 ml	0,8 ml	0,28 ml
1 M Tris-HCl, pH 8	1 ml	1 ml	1 ml
0,5 M EDTA	-	0,5 ml	0,5 ml
destilliertes Wasser	40 ml	47,7 ml	48,22 ml
SDS, 20 % [w/v]	25 µl	25 µl	25 µl

¹ nach Pernthaler und Pernthaler (2004)

² Blocking-Reagent (Roche) in Maleinsäure-Puffer (100 mM Maleinsäure, 150 mM Natriumchlorid, pH 7,5)

Für die Hybridisierung wurden die Filterviertel entsprechend ihres Durchmessers entweder gedrittelt (25 mm) oder geviertelt (47 mm). Daraufhin wurde jeweils ein Filterstück je Probe und Sonde in einem Reaktionsgefäß (0,2 ml PCR Gefäß, Eppendorf) platziert und mit 100 (25 mm) bzw. 150 µl (47 mm) des jeweiligen Hybridisierungspuffers benetzt. Anschließend wurden 10 bzw. 15 µl der jeweiligen Sondenlösung (50 ng Sonde/µl) hinzu gegeben und durch Anschnipsen des Reaktionsgefäßes Puffer und Sonde gemischt. Die Hybridisierung wurde wie auch die Permeabilisierung der Archaeen mit Hilfe von Mikrowellen vorgenommen. Da die Mikrowellen das Eindringen der Sonde in die Zelle beschleunigen, war hierdurch eine Verkürzung der Inkubationszeit möglich. Die Reaktionsgefäße mit den Filtern wurden in ein auf 46°C vorgewärmtes Wasserbad gelegt und 30 min bei 240 W in der oben genannten Mikrowelle inkubiert. Das Stoppen der Reaktion sowie das Auswaschen unspezifisch oder nicht gebundener Sonden erfolgten im Anschluss mit Hilfe des

jeweiligen Waschpuffers. Die Filter wurden hierfür in den vorgewärmten Waschpuffer überführt und 5 min bei 48°C im Brutschrank (Klein-Brutschrank, Typ B15, Heraeus Instruments) inkubiert. Daraufhin wurden sie kurz in Bidest und abschließend in Ethanol (absolut) gewaschen und getrocknet.

Zur Visualisierung der Gesamtzellzahl auf den Filtern wurden die Zellen nach der Hybridisierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) gefärbt. Dieser Farbstoff lagert sich sequenzunspezifisch in die kleine Furche der DNA-Doppelhelix ein und bindet hier bevorzugt an AT-reiche Regionen, wodurch seine Fluoreszenz um etwa 20 % verstärkt wird. Die maximale Lichtabsorption und damit maximale Anregung des DNA-gebundenen DAPI erfolgt bei einer Wellenlänge von 358 nm, das Emissionsmaximum liegt bei 463 nm. Das für die FISH verwendete Cy3 hingegen zeigt ein Absorptions- und Emissionsmaximum von 549 bzw. 562 nm. Demnach unterscheiden sich die Emissionsmaxima beider Farbstoffe hinreichend, um deren Trennung mit Hilfe optischer Filter und Farbteiler am Fluoreszenzmikroskop zu realisieren. Dies erlaubt eine Parallelfärbung der Zellen und lässt eine Bestimmung des Anteils hybridisierter Zellen an der Gesamtzellzahl zu, was letztendlich einen Vergleich der Filter und Varianten untereinander ermöglicht.

Die DAPI-Färbung erfolgte hier mit dem Einbetten der Filter auf den Objektträgern in Citifluor (AF1 Citifluor Mountant Solution, CITIFLUOR Ltd.) nach einem Protokoll von Pernthaler et al. (2002). Hierfür wurde das Citifluor mit DAPI versetzt und die Filter anschließend mit etwa 20 µl der Lösung (1 µg DAPI/ml Citifluor) benetzt. Bis zu ihrer mikroskopischen Auswertung wurden sie bei -20°C gelagert.

4.2.1.5 Mikroskopie und bildanalytische Auswertung

Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung erfolgte am „Axio Observer.Z1“ (Zeiss). Mit Hilfe des gewählten Objektivs (Plan-Achromat 63×/1,4 Oil DIC M27, Zeiss) wurde unter Verwendung des entsprechenden Okulars (W-PL 10x/20 Br.foc, Zeiss) eine 630-fache Gesamtvergrößerung der Zellen erreicht. Für die Detektion der hybridisierten Zellen wurde der Filtersatz „43 HE Cy 3“ (Zeiss) verwendet. Die DAPI-gefärbten Zellen wurden durch den Filtersatz „49 DAPI“ (Zeiss) sichtbar gemacht. Zur Bilddokumentation wurde die monochrome Digitalkamera „AxioCam MRm“ (Zeiss) sowie die Software „AxioVision“ (v.4.6.3 SP1, Zeiss) genutzt.

Die Quantifizierung der zu untersuchenden Mikroorganismengruppen erfolgte nicht direkt am Mikroskop, sondern anhand von Aufnahmen der Fluoreszenzsignale. Es wurden je Filter und Sonde 15 zufällige Bilder (Belichtungszeit: DAPI = 100 ms, Cy3 = 250 ms) gemacht, von denen im Anschluss zwischen 7 und 10 zur Auswertung kamen. Mit Hilfe der Software „ImageJ“ (v.1.4.3.67, Rasband, 1997-2008) wurden unter Verwendung des Zusatzmoduls „Cell Counter“ (De Vos, 2008) sowohl die DAPI-gefärbten als auch die hybridisierten Zellen manuell gezählt. Für einen Vergleich der Filter bzw. der verschiedenen Futtermischungen und Mikrobenfraktionen aus der Pansensimulation wurde zunächst die Anzahl hybridisierter Zellen auf einem Filter auf die DAPI-gefärbten Zellen bezogen. Hieraus wurde bei Betrachtung der auf Domänenebene ansetzenden Sonden EUB 338 I-III und ARCH 915 ersichtlich, welcher Anteil der DAPI-gefärbten Zellen überhaupt hybridisierbar war. Damit war im Weiteren die Anzahl der auf niedrigerer phylogenetischer Ebene hybridisierten Zellen auf die im Mittel für eine Probe hybridisierbaren *Bacteria* (EUB 338 I-III) bzw. *Archaea* (ARCH 915) zu beziehen.

4.2.2 Ergebnisse

Aufgrund des Versuchsdesigns konnte nur auf eine Wiederholung je Behandlung zurückgegriffen werden. Daher erfolgte lediglich ein nominaler und kein statistischer Vergleich der ermittelten Werte. Die in den folgenden Diagrammen angegebenen Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (s) resultieren aus den wiederholten Zählungen, die für jede der eingesetzten Sonden anhand mehrerer Bildaufnahmen vorgenommen wurden. Gezählt wurden je Sonde und Probe mindestens 1000 DAPI-gefärbte Zellen. Die für jedes Bild im Einzelnen erhobene Anzahl hybridisierter sowie DAPI-gefärbter Zellen ist dem Anhang zu entnehmen (Tab. A14 und A15).

Abbildung 21 zeigt zunächst die mittlere Gesamtzellzahl je Aufnahme, die für jede der Behandlungen auf den Filtern zu detektieren war. Direkt gegenübergestellt werden jeweils die beiden Mikrobenfraktionen aus Fermenter und Überlauf. Die Berechnung der hier dargestellten Anzahl DAPI-gefärbter Zellen je Aufnahme basiert auf den Werten, die im Rahmen der FISH mit den Sonden EUB I-III, ARCH 915 und MB 1174 erhoben wurden. Die im Zusammenhang mit den anderen Hybridisierungen ermittelten Werte zur DAPI-Zahl konnten nicht berücksichtigt werden, da die FISH für einige

Proben auf Filtern mit größerem Durchmesser wiederholt werden musste, diese aber eine geringere Zelldichte aufwiesen.

Deutlich zu erkennen in Abbildung 21 ist die erhöhte Gesamtzellzahl je Aufnahme in den Fermenter- gegenüber den Überlaufproben. Die dahingehend größten Unterschiede sind für die beiden Maissilage-betonten Futtermischungen I und II festzustellen. Im Vergleich zu den Überläufen waren hier für die Fermenter mehr als doppelt so viele DAPI-gefärbte Zellen je Aufnahme zu zählen. Darüber hinaus lässt ein Vergleich der einzelnen Behandlungen erkennen, dass die mittlere Gesamtzellzahl für die Fermenterproben mit zunehmendem Grassilageanteil im Futter abnahm. Für die Überlaufproben dagegen war diese Beobachtung nicht zu machen. Im Falle der Einzelfuttermittel zeigte die Grassilage gegenüber der Maissilage für beide Mikrobenfraktionen eine minimal erhöhte Gesamtzellzahl je Aufnahme. Wie aus Abbildung 21 aber auch hervorgeht, führte die alleinige Inkubation von SES sowohl für die Fermenter- als auch die Überlaufproben zur Detektion der insgesamt höchsten Zelldichte auf einem Bild.

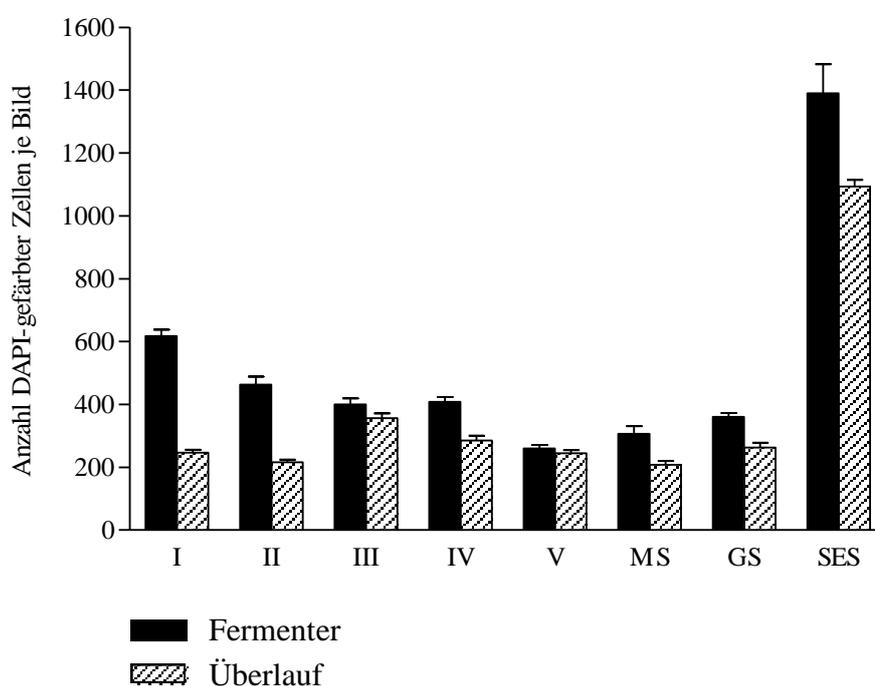


Abbildung 21: Mittlere Anzahl DAPI-gefärbter Zellen je Aufnahme, die im Rahmen der Hybridisierung mit den Sonden EUB I-III, ARCH 915 und MB 1174 detektiert wurde (MW, s, n = 21), SES: Zellzahl je Bild um die geringere abfiltrierte Kulturmenge korrigiert

Die Ergebnisse der Hybridisierungen, die unter Verwendung der auf Domänenebene ansetzenden Sonden EUB I-III und ARCH 915 durchgeführt wurden, sind in

Abbildung 22 dargestellt. Wie hieraus hervorgeht, zeigte ein Großteil der Zellen ein deutliches Hybridisierungssignal unter Einsatz der EUB-Sonden. In den Fermenterproben lag der Anteil dieser Zellen an den mit DAPI gefärbten Zellen zwischen 61 und 77 %, in den Überlaufproben zwischen 67 und 81 %. Der Anteil von Zellen, die in den Überlaufproben mit den EUB-Sonden hybridisierten, war gegenüber den Fermenterproben für alle Futtervarianten bis auf die Grassilage leicht erhöht. Eine gerichtete Veränderung des Anteils EUB-hybridisierter Zellen an der Gesamtzellzahl in Abhängigkeit des Mais- bzw. Grassilageanteils im Futter war nicht zu beobachten. Allerdings waren auch nach Einsatz der Sonde ARCH 915 weder in den Fermenter- noch in den Überlaufproben behandlungsabhängige Unterschiede in Bezug auf die Zahl der hybridisierten Zellen zu erkennen. Insgesamt machte der Anteil ARCH-hybridisierter Zellen lediglich 4 - 10 % der Gesamtzellzahl aus, wobei dieser in den Überläufen für jede einzelne Behandlung geringer ausfiel als in den Fermentern. Damit konnten letztlich unter Verwendung der Sonden EUB I-III und ARCH 915 insgesamt 69 - 87 % bzw. 73 - 85 % aller DAPI-gefärbten Zellen in den Fermenter- bzw. Überlaufproben hybridisiert werden.

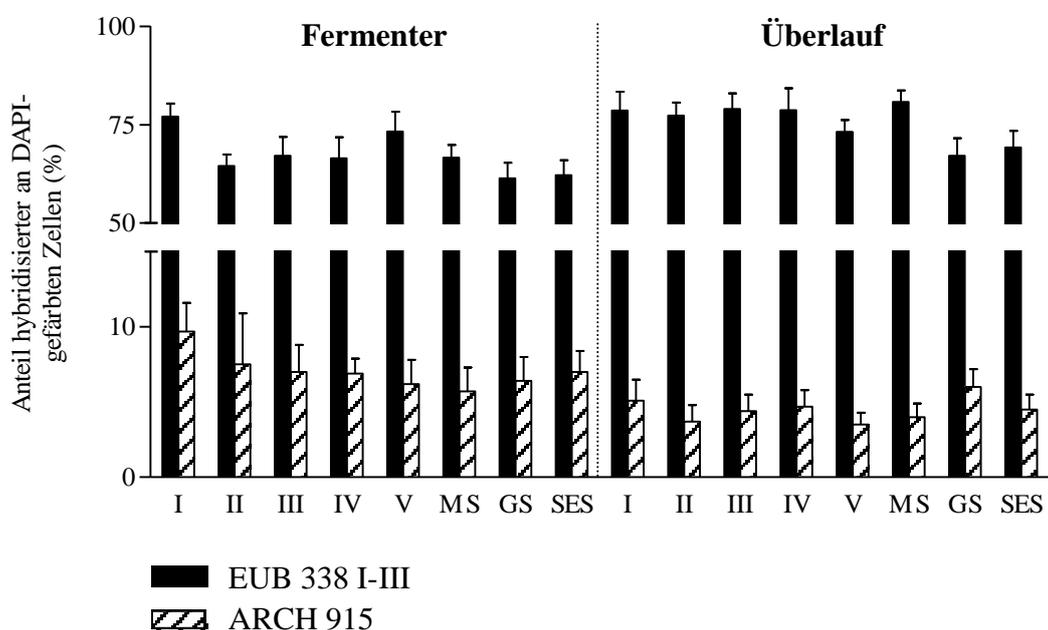


Abbildung 22: Prozentualer Anteil der mit den FISH-Sonden EUB I-III und ARCH 915 hybridisierten Zellen an den mit DAPI gefärbten Zellen (MW, s, n = 7)

Um die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften, die für die acht Behandlungen zu untersuchen waren, näher beschreiben zu können, wurde im Weiteren eine Hybridisierung auf niedrigerer phylogenetischer Ebene vorgenommen. Die

Abbildungen 23-25 zeigen die Ergebnisse der FISH von Vertretern der *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Fibrobacteres* und *Euryarchaeota*, die unter Verwendung der in Tabelle 19 aufgeführten Sonden ermittelt wurden. Dargestellt hier ist der Anteil hybridisierter Zellen an den EUB- bzw. ARCH-hybridisierbaren Zellen, dessen Höhe sich anhand der in Abbildung 21 aufgeführten Ergebnisse ableiten ließ.

Wie aus Abbildung 23 hervorgeht, war unter Einsatz der Sonde BAC 303 ein relativ großer Teil der EUB-hybridisierbaren Zellen (9 - 23 %) in den Fermenterproben zu hybridisieren. Der Anteil LGC-hybridisierter Zellen machte lediglich 3 - 11 % aus, der aller anderen nicht mehr als 3 % (Abb. 23 und 24).

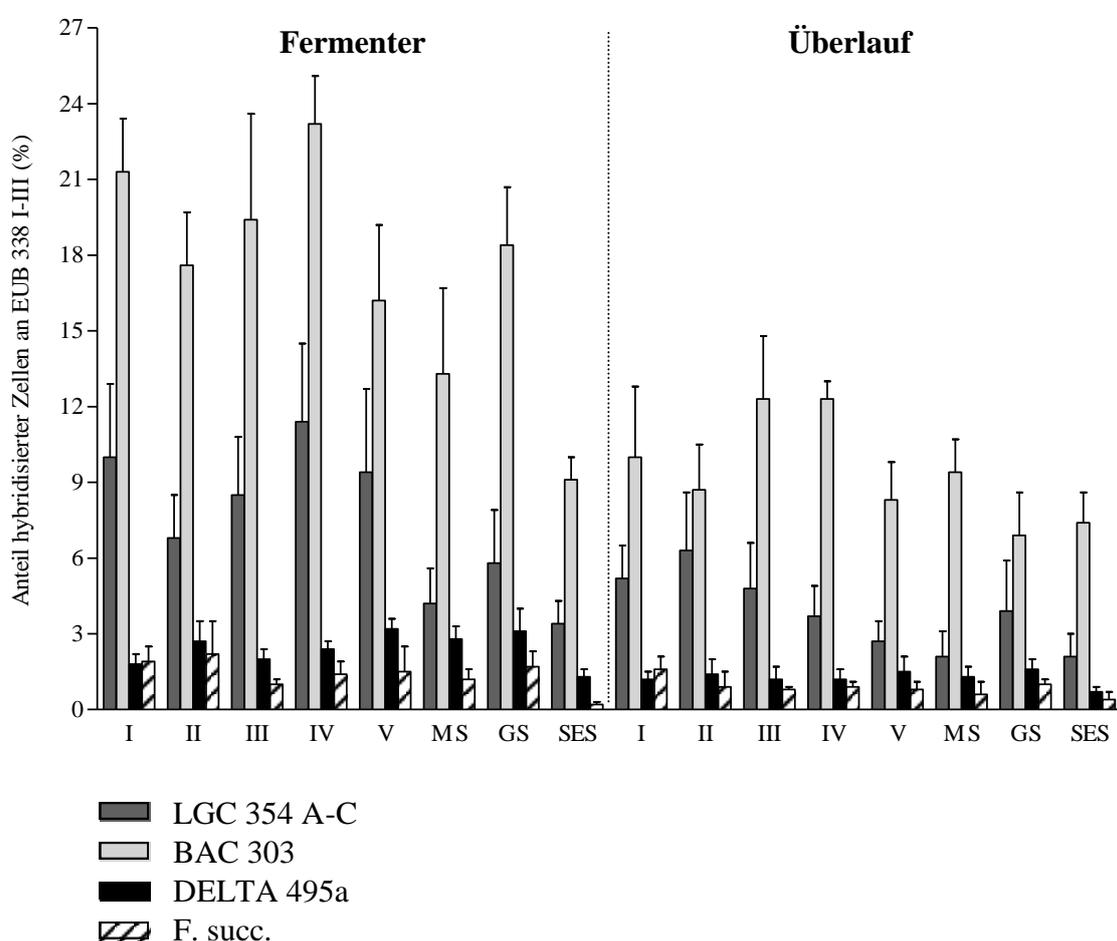


Abbildung 23: Anteil der mit den FISH-Sonden LGC 354 A-C, BAC 303, DELTA 495a und F. succ. hybridisierten Zellen bezogen auf die Anzahl EUB-hybridisierbarer Zellen in den Proben (MW, s, $8 \geq n \geq 7$)

Unter Einsatz der Sonden BAC 303, LGC 354 A-C, DELTA 495a und F. succ. fiel der Anteil hybridisierter Zellen für jede einzelne Gruppe in den Überlaufproben deutlich geringer aus als in den Fermenterproben (Abb. 23). Das Verhältnis der verschiedenen

hybridisierten Zellen zueinander variierte sowohl zwischen den Behandlungen als auch zwischen beiden Mikrobenfraktionen (Abb. 23).

Wie Abbildung 24 erkennen lässt, führte der Einsatz der beiden Sonden BET 42a und GAM 42a zur Hybridisierung der *Beta*- und *Gammaproteobacteria* in den Überläufen zu einem deutlich höheren Anteil hybridisierter Zellen als in den Fermentern. Darüber hinaus war für die Überlaufproben eine Verschiebung des Verhältnisses der beiden Gruppen zugunsten der *Betaproteobacteria* zu beobachten (Abb. 24).

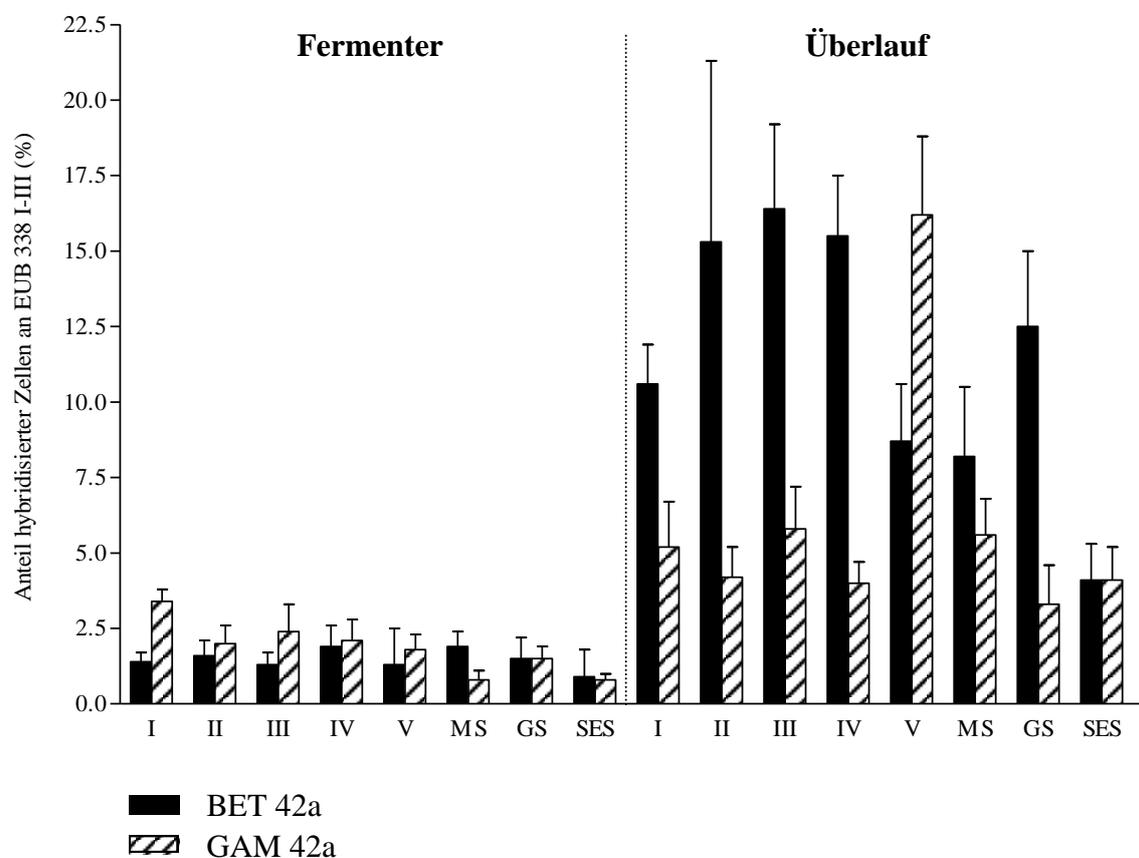


Abbildung 24: Anteil der mit den FISH-Sonden BET 42a und GAM 42a hybridisierten Zellen bezogen auf die Anzahl EUB-hybridisierbarer Zellen in den Proben (MW, s, $10 \geq n \geq 7$)

Gerichtete Veränderungen in Abhängigkeit des Mais- bzw. Grassilageanteils im Futter waren für die hier untersuchten Organismengruppen bezüglich ihres Anteil an der mikrobiellen Gemeinschaft nicht zu erkennen. Lediglich unter Einsatz der Sonde MB 1174 zur Hybridisierung der *Methanobacteriaceae* deutete sich für die Grassilage-betonten Futtermischungen in beiden Mikrobenfraktionen eine erhöhte Zahl

hybridisierter Zellen an (Abb. 25). Hier war der Anteil MB-hybridisierter an ARCH-hybridisierbaren Zellen für einige Proben mit bis zu 40 % vergleichsweise hoch.

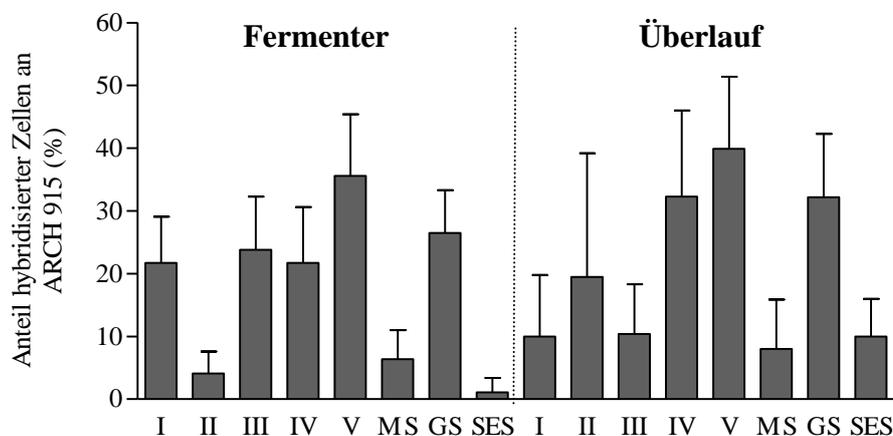


Abbildung 25: Anteil der mit der FISH-Sonde MB 1174 hybridisierten Zellen bezogen auf die Anzahl ARCH-hybridisierbarer Zellen in den Proben (MW, s, n = 7)

Ungeachtet der Hybridisierungen war anhand der DAPI-Färbungen eine Veränderung der mikrobiellen Gemeinschaft in Abhängigkeit des Mais- bzw. Grassilageanteils im Futter nachzuvollziehen. Abbildung 26 zeigt typische Aufnahmen, wie sie für die einzelnen Behandlungen gemacht wurden. Hier wird am Beispiel der FISH für die Gruppe der *Methanobacteriaceae* deutlich, dass mit steigendem Anteil der Maissilage im Futter die Anzahl der in den Bildern markierten Zellpakete erheblich zunahm, während diese in den Maissilage-freien Behandlungen kaum oder gar nicht zu detektieren waren. Da diese Zellpakete häufig in großen Zellverbänden aber auch vereinzelt auftraten, war eine Quantifizierung in den Proben nicht möglich. Darüber hinaus erwies sich die Hybridisierung dieser Zellen als außerordentlich schwierig. Sie zeigten sowohl unter Verwendung *Archaea*- als auch *Bacteria*-spezifischer Sonden (ARCH 915, EUB I-III, MB 1174) eindeutige bis unzureichende Hybridisierungssignale, die letztlich aber keine phylogenetische Zuordnung erlaubten.

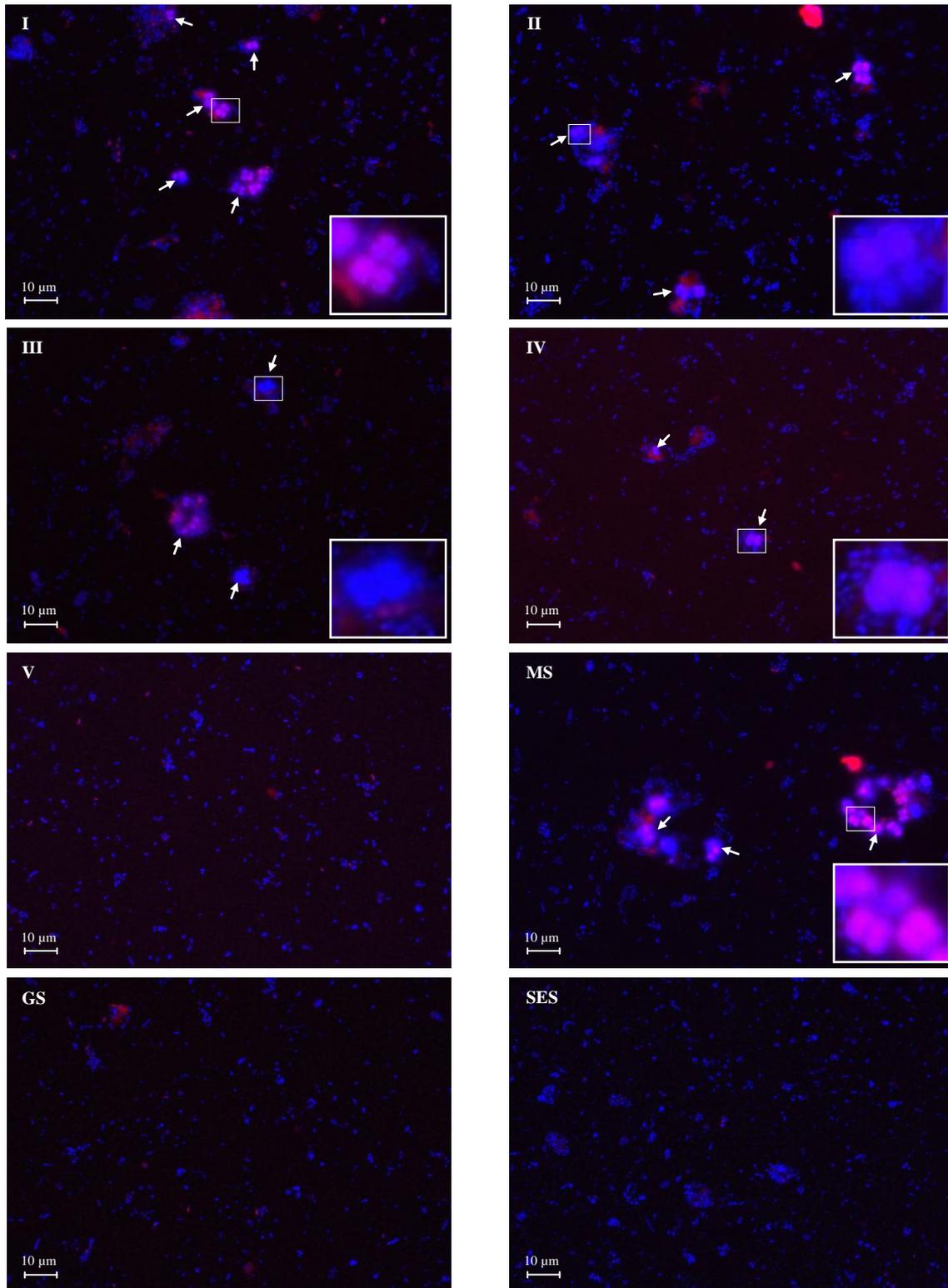


Abbildung 26: Beobachtete Zellpakete in den Fermenterproben für die Futtermischungen I-V sowie die Einzelfuttermittel, Beispielaufnahmen zur FISH der *Methanobacteriaceae* (blau: DAPI-gefärbte Zellen; rot: mit Sonde MB 1174 hybridisierte Zellen)

4.2.3 Diskussion

Methode

Voraussetzung für eine erfolgreiche Hybridisierung ist im ersten Schritt eine optimale Fixierung der Zellen (Reyes et al., 1997, Hristova et al., 2000). Mit Hilfe der hier gewählten Methode ist nach Moter und Göbel (2000) eine ausreichende Penetration der Zellen sowie gleichzeitig der weitgehende Erhalt der Zellmorphologie und RNA möglich. Während PFA, das auch in der vorliegenden Arbeit zum Einsatz kam, gut geeignet ist, um gramnegative Bakterien sowie methanogene *Archaea* zu fixieren (Amann et al., 1995a, Crocetti et al., 2006), werden für Grampositive oft Ethanolbasierte Verfahren empfohlen (Amann et al., 1995b, Moter und Göbel, 2000). Werden aber grampositive Bakterien, die mit PFA oder Formaldehyd fixiert wurden, vor ihrer Hybridisierung mit Lysozym bzw. Lysozym und Achromopeptidase behandelt, so kann eine Verbesserung ihrer Permeabilität erreicht werden (Beimfohr et al., 1993, Hönerlage et al., 1995, Sekar et al., 2003). Darüber hinaus weisen Ergebnisse anderer Autoren darauf hin, dass etliche grampositive Bakterien, die den Vormagen des Wiederkäuers oder den Darmtrakt des Menschen besiedeln, auch nach alleiniger Fixierung mit PFA ohne eine Lysozymbehandlung hybridisierbar sind (Shinkai und Kobayashi, 2007, Franks et al., 1998, Al-Tamimi et al., 2005, Parracho et al., 2005). Ein Großteil der Zellen in den Proben aus dem hier verwendeten *in vitro* System sollte demnach erfolgreich fixiert worden sein.

Für eine spezifische Bindung der Oligonucleotidsonden sind die gewählten Hybridisierungsbedingungen von erheblicher Bedeutung. Formamid kann eingesetzt werden, um die Spezifik einer Sonde zu erhöhen. Durch Schwächung der Wasserstoffbrückenbindungen senkt das Formamid die Schmelztemperatur der DNA- und RNA-Doppelstränge, so dass auch bei niedrigeren Temperaturen eine Hybridisierung unter stringenten Bedingungen erfolgen kann (Moter und Göbel, 2000). Allerdings führen zu hohe Formamidgehalte im Hybridisierungspuffer oft zu einer drastischen Senkung des Fluoreszenzsignals (Manz et al., 1992, Bond et al., 2001). In der vorliegenden Arbeit wurden die Hybridisierungsbedingungen so gewählt wie sie nach Verifizierung anhand von Reinkulturen in der Literatur angegeben werden (Tab. 19). Lediglich im Falle der Sonde *F. succ.* war eine Neubestimmung der optimalen Formamidkonzentration notwendig, da hierzu keine Angaben von den Autoren gemacht wurden. Zwar empfehlen Shinkai und Kobayashi (2007) für eine geringfügig gegenüber *F. succ.* modifizierte Sonde einen Formamidgehalt von 70 % im Hybridisierungspuffer,

jedoch erwiesen sich diese Bedingungen als ungeeignet. Daher wurden verschiedene Formamidgehalte (0, 20, 35, 50 und 70 %) im Hybridisierungspuffer getestet. Das deutlichste Fluoreszenzsignal zeigte sich schließlich bei einem Formamidgehalt von 50 %.

Die Signalintensität hängt allerdings nicht allein von der Hybridisierung sondern auch vom eingesetzten Fluoreszenzfarbstoff sowie der Menge vorhandener rRNA in der Zelle ab (Bouvier und del Giorgio, 2003). Lediglich aktive Zellen mit ausreichender Ribosomenzahl zeigen nach ihrer Hybridisierung ein deutliches Fluoreszenzsignal (DeLong et al., 1989, Amann et al., 1995a, Moter und Göbel, 2000). Der Fluoreszenzfarbstoff Cy3 wurde gewählt, da er gegenüber anderen Fluorochromen eine relativ hohe Signalstabilität sowie -intensität aufweist (Wessendorf und Brelje, 1992) und mit seiner Hilfe die Sensitivität der FISH erhöht werden kann (Glöckner et al., 1996).

Die Auswertung der FISH erfolgte anhand von hochaufgelösten Bildern. Damit ließ sich die Belichtungsdauer der Proben auf ein Minimum reduzieren. Eine Abnahme der Fluoreszenzsignale, wie sie während langwieriger Zählprozesse am Mikroskop zu beobachten ist, konnte demnach vermieden werden. Außerdem erleichterten die Aufnahmen das Zählen deutlich und ließen eine genauere Quantifizierung zu. DAPI-gefärbte Zellen lassen sich oft leichter differenzieren als hybridisierte Zellen (Abb. 27), da das Auflösungsvermögen des Mikroskops u.a. von der Wellenlänge des emittierten Lichtes beeinflusst wird. Mit abnehmender Wellenlänge, wie im Falle des DAPI-Farbstoffes, nimmt die Auflösung zu. Dagegen zeigen benachbarte, hybridisierte Zellen häufig eine Überlagerung ihrer Fluoreszenzsignale, da der zur Markierung der Sonde eingesetzte Farbstoff oft längewelliges Licht emittiert. Aufgrund der relativ hohen Zelldichte, die ein Teil der Proben aufwies, wäre es daher im Falle einer Zählung am Mikroskop wahrscheinlich zur Unterschätzung der Anzahl hybridisierter Zellen gekommen. Die aufgenommenen Bilder aber konnten nach einer Splittung in die Farbkanäle Rot, Grün und Blau parallel ausgewertet werden.

Da Pernthaler et al. (2003) zufolge das Zählen von mehr als 1000 DAPI-gefärbten Zellen je Probe zu keiner weiteren Reduzierung der Variabilität paralleler Hybridisierungen führt, wurde sich auch in der vorliegenden Arbeit auf dieses Mindestmaß beschränkt.

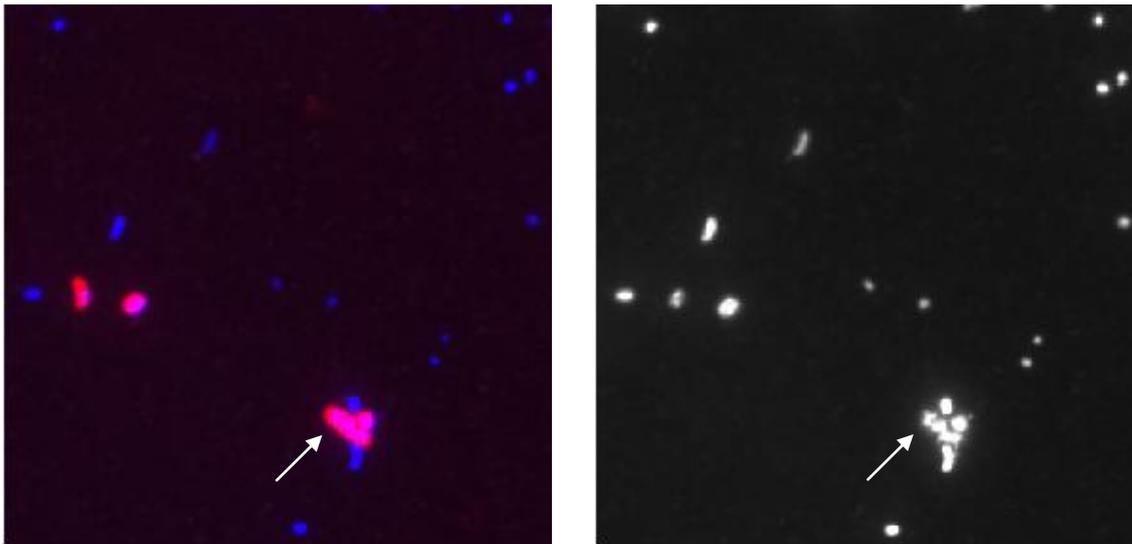


Abbildung 27: Überlagerung des Fluoreszenzsignals benachbarter, hybridisierter Zellen, links: DAPI-gefärbte und Cy3-markierte Zellen; rechts: DAPI-gefärbte Zellen nach Rot/Grün/Blau-Splittung mittels „ImageJ“ (v.1.4.3.67)

Für den Vergleich der verschiedenen Behandlungen wurde der Anteil hybridisierter Zellen an den EUB- bzw. ARCH-hybridisierbaren Zellen ermittelt. Der Anteil EUB- und ARCH-hybridisierbarer Zellen an den DAPI-gefärbten Zellen variierte jedoch erheblich zwischen den Behandlungen, so dass eine Verzerrung der Ergebnisse zu erwarten war. Daher wurde die Anzahl der mit den einzelnen Sonden hybridisierten Zellen zusätzlich auf die Anzahl der DAPI-gefärbten Zellen bezogen (Abb. 28). Im Falle der verschiedenen Bakteriensonden war ein ähnliches Bild zu erkennen wie nach Kalkulation des Anteils der hybridisierten Zellen an den EUB I-III (Vergleich Abb. 23 und 23). In Bezug auf die *Methanobacteriaceae* allerdings ergab sich für die Fraktion aus den Fermentern eine Verschiebung (Abb. 29), was im Zuge der folgenden Diskussion Beachtung finden soll. Während sich zuvor in den Grassilage enthaltenden Mischungen ein etwas höherer Anteil dieser Organismen an den ARCH-hybridisierbaren Zellen angedeutet hatte, stellte sich ihr Anteil in Bezug auf die DAPI-gefärbten Zellen auch in der vorwiegend Maissilage enthaltenden Mischung I relativ hoch dar. Der postulierte höhere Anteil *Methanobacteriaceae* in den Fermentern der Grassilage enthaltenden Mischungen ist demnach nicht zwingend gegeben.

Auf eine absolute Quantifizierung wurde verzichtet, da die Zellen nach ihrer Fixierung einem Waschschrift unterzogen wurden, der eine Zentrifugation notwendig machte. Da hierbei nicht alle Zellen abgeschieden werden, wäre die absolute Zellzahl in den Proben unterschätzt worden.

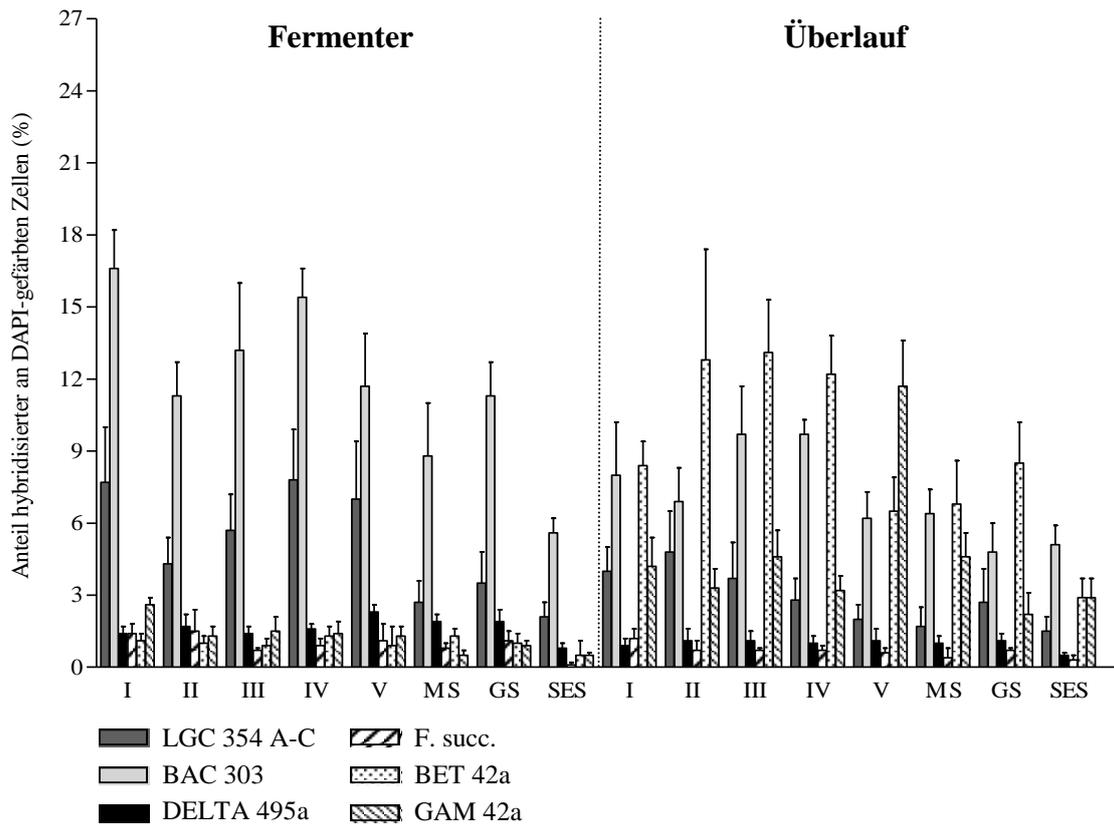


Abbildung 28: Anteil der mit den FISH-Sonden LGC 354 A-C, BAC 303, DELTA 495a, F. succ., BET 42a und GAM 42a hybridisierten Zellen bezogen auf die Anzahl DAPI-gefärbter Zellen in den Proben (MW, s, $10 \geq n \geq 7$)

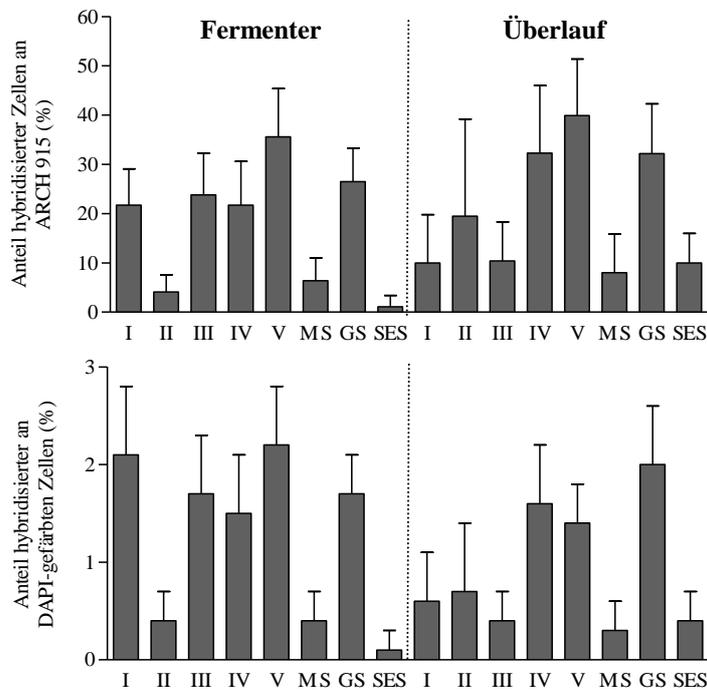


Abbildung 29: Anteil der mit der FISH-Sonde MB 1174 hybridisierten Zellen bezogen auf die Anzahl ARCH-hybridisierbarer (oben) bzw. DAPI-gefärbter (unten) Zellen in den Proben (MW, s, $n = 7$)

Gesamtzellzahl

Bei Betrachtung der Gesamtzellzahlen fällt zunächst die hohe Anzahl DAPI-gefärbter Zellen auf, die nach alleiniger Inkubation des SES festzustellen war (Abb. 21). SES ist ein eiweißreiches Konzentrat, das einen beachtlichen Anteil XP aufweist (Tab. 3), von dem etwa zwei Drittel im Pansen relativ leicht löslich sind (Mosimanyana und Mowat, 1992). Etwa ein Drittel der T besteht aus Stickstoff-freien Extraktstoffen. Der XF-Gehalt ist gering (Tab. 3). Demnach liegt auch der Energiegehalt des SES über dem von Mais- und Grassilage (Deutsche Landwirtschafts-Gesellschaft, DLG, 1997). Im Falle des SES wurden den Mikroorganismen folglich höhere Mengen an Protein und leicht verfügbarer Energie in gelöster Form angeboten, was die erhöhte Zellzahl in der flüssigen Phase des Systems erklärt. Nahe liegt, dass sich hier eine mikrobielle Gemeinschaft etablierte, die einen enorm hohen Anteil proteolytischer Spezies aufwies.

In den Fermentern wurde nach Inkubation der Maissilage-betonten Futtermischungen I und II eine höhere Gesamtzellzahl detektiert als im Falle der Grassilage enthaltenden Varianten (Abb. 21). Ursache hierfür könnte der höhere Gehalt an Stärke in der Maissilage gewesen sein. Diese ist im Gegensatz zu den Strukturkohlenhydraten der Silagen relativ gut löslich und kann daher schnell abgebaut und energetisch genutzt werden (Sniffen et al., 1992). Ein in der Fermenterflüssigkeit vermehrtes Auftreten von Spezies, die vorwiegend Stärke und deren Abbauprodukte zur Energiegewinnung nutzen, erscheint demnach plausibel. Ergebnisse aus einer Untersuchung von Dehority und Grubb (1976) deuteten zumindest auf eine Erhöhung des Anteils kultivierbarer, amylolytischer Spezies im Pansen von Schafen, wenn diese anstatt nur Heu eine Ration bestehend aus 60 % Mais und 40 % Heu angeboten bekamen.

In den Grassilage enthaltenden Varianten dürfte dagegen ein höherer Anteil partikelassoziierter Spezies zu finden gewesen sein. Hierauf weisen zumindest die größeren Mengen mikrobiellen Proteins dieser Fraktion sowie der erhöhte NDF- und ADF-Abbau hin (Hildebrand, unveröffentlicht). Die niedrigere Gesamtzellzahl, die gegenüber den Mischungen I und II nach alleiniger Inkubation der Maissilage festzustellen war, könnte auf die geringere Stickstoffversorgung der Mikroorganismen zurückzuführen sein, denn hier stellten das leichtlösliche Protein und der Nicht-Protein-Stickstoff aus der Maissilage sowie das Ammoniumchlorid aus der Pufferlösung die einzigen Stickstoffquellen dar.

In der Überlauflüssigkeit ließ sich ungeachtet der Behandlung eine geringere Anzahl DAPI-gefärbter Zellen je Aufnahme im Vergleich zur Fermenterflüssigkeit erkennen. Die deutlichsten Unterschiede waren dabei für die beiden Maissilage-betonten Mischungen I und II zu beobachten (Abb. 21). Die höchste Gesamtzellzahl zeigte sich zwar auch hier für das SES, allerdings war der zuvor beobachtete Trend abnehmender Zellzahlen mit zunehmendem Grassilageanteil im Futter nicht mehr nachzuvollziehen. Die Gesamtzellzahlen, die für die Mischungen I-V sowie die beiden Silagen ermittelt wurden, fielen im Vergleich der beiden Flüssigkeiten ähnlich aus. Als Ursache wäre eine selektive Auswaschung verschiedener Mikroorganismen aus dem Fermenter oder deren unterschiedlich starke Lyse im Überlauf denkbar. Untersuchungen zu diesem Themenkomplex sind nicht bekannt.

Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft in Fermenter und Überlauf

Mit Hilfe der auf Domänenebene ansetzenden Sonden EUB I-III und ARCH 915 konnte insgesamt ein relativ großer Anteil (69-85 %) der DAPI-gefärbten Zellen in den Proben aus Fermenter und Überlauf hybridisiert werden. Dies zeigt, dass der überwiegende Teil der fixierten Zellen für die Sonden permeabel und hinreichende Mengen an rRNA-Kopien vorhanden waren, um ein entsprechendes Fluoreszenzsignal zu induzieren (Moter und Göbel, 2000). Diejenigen Zellen, die mit keiner dieser Sonden hybridisiert werden konnten, waren entweder nicht ausreichend permeabel oder beinhalteten keine der Zielsequenzen. Bei einem Abgleich mit der RDP-Datenbank deutete sich zumindest an, dass etwa 200000 (von 720000) *Bacteria* sowie 17600 (von 37000) *Archaea* unter Verwendung der EUB- und ARCH-Sonden nicht zu hybridisieren sind.

Wie aus Abbildung 22 hervorgeht, war mit Hilfe der EUB-Sonden in den Überläufen ein größerer Anteil Zellen zu hybridisieren als in der Fermenterflüssigkeit. Die Anzahl ARCH-hybridisierbarer Zellen fiel in diesen Proben allerdings geringer aus. Diese Ergebnisse könnten ebenfalls auf eine selektive Auswaschung verschiedener Spezies oder deren unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber den Bedingungen im Überlauf hindeuten. Der geringere Anteil ARCH-hybridisierbarer Zellen in den Überläufen könnte ein Hinweis darauf sein, dass die strikt anaeroben Methanogenen einen Nachteil in den nicht luftdicht abgeschlossenen Überläufen hatten. Ein vermehrtes Absterben dieser Spezies würde zudem den erhöhten Anteil EUB-hybridisierbarer Zellen erklären. Dieser könnte aber auch auf einen erhöhten Anteil gramnegativer Bakterien in den

Überläufen zurückzuführen sein, denn diese sind im Vergleich zu einigen Grampositiven sehr viel leichter zu hybridisieren. Die Ergebnisse der FISH für die gramnegativen *Beta*- und *Gammaproteobacteria* würden diese Hypothese stützen, denn unabhängig von der Behandlung lag ihr Anteil in den Überläufen deutlich über dem in den Fermentern (Abb. 24 und 28). Das obligat anaerobe *Gammaproteobacterium Ruminobacter amylophilus* beispielsweise, das in hier nicht präsentierten Voruntersuchungen zur Real-time qPCR in den Proben nachzuweisen war, stellt ein typisches Pansenbakterium mit hoher amylolytischer Aktivität dar (Cotta, 1988). Da es ausschließlich Stärke und Maltose zu fermentieren vermag (Dehority, 2003), ist davon auszugehen, dass es vorwiegend in der flüssigen Phase sowie an Stärkekörnchen zu finden ist (McAllister et al., 1990). Eine vermehrte Auswaschung aus dem Fermenter in den Überlauf wäre daher möglich. Möglich wäre aber auch, dass ein Bakterium wie *R. amylophilus*, das auf eine leicht verfügbare Energiequelle wie Stärke angewiesen ist, nur kurze Zeit nach Beginn der Inkubation eines neuen Futterbeutels ausreichend Substrat vorfindet und zu einem späteren Zeitpunkt bereits aus dem Fermenter ausgewaschen ist.

Im Rahmen der zuvor durchgeführten Sequenzanalysen konnten allerdings auch einige aerobe *Beta*- und *Gammaproteobacteria* nachgewiesen werden. Es fanden sich Vertreter aus den Gattungen *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Commamonas* und *Methylomonas* (Vergleich 3.2.4). Erstere besiedeln u.a. aquatische Systeme und sind in der Lage auf ein breites Spektrum an organischen Verbindungen als Kohlenstoff- oder Energiequelle zurückzugreifen. Es wird davon ausgegangen, dass sie am Abbau verschiedener löslicher Verbindungen aus dem Zerfall pflanzlichen Materials beteiligt sind (Madigan und Martinko, 2006). *Methylomonas*-Spezies sind dagegen methanotrophe Organismen und zur Energiegewinnung auf Einkohlenstoffverbindungen angewiesen (Seghers et al., 2003, Eshinimaev et al, 2004, Madigan und Martinko, 2006). So sind sie in der Lage, Methan mit Hilfe von Sauerstoff zu Methanol zu oxidieren (Hanson und Hanson, 1996). Folglich sind *Methylomonas*-Spezies vor allem dort zu finden, wo Methan aus anoxischen Bereichen in oxische Sphaeren gelangt (Madigan und Martinko, 2006). Da in dem verwendeten *in vitro* System sowohl Methanogene als auch Methanotrophe nachgewiesen werden konnten, müssen folglich für beide Organismengruppen entsprechend ökologische Nischen zur Verfügung gestanden haben. Der Eintrag von Sauerstoff in das System dürfte vor allem während des Futterbeutelwechsels und über die nicht ganz luftdicht abgeschlossenen Überlaufgefäße stattgefunden haben. Aerobe

Organismen hätten sich folglich vorzugsweise nach Beginn der Inkubation des neu zugesetzten Futters und während der Überführung der Überlaufflüssigkeit etablieren können. Nach Verbrauch des Sauerstoffs im Fermenter sollten dagegen anaerobe Spezies wie die Methanogenen einen Vorteil gehabt haben. Obligat aerobe Vertreter aus den genannten Gattungen von *Beta*- und *Gammaproteobacteria* könnten demnach zum Zeitpunkt der Probenahme aus dem Fermenter bereits zu einem großen Teil ausgewaschen gewesen sein. Hierin läge zumindest ein weiterer Erklärungsansatz für deren häufigeres Auftreten in den Überläufen.

Im Gegensatz dazu zeichnete sich unter Einsatz der Sonden BAC 303, LGC A-C, DELTA 495a und F. succ. ein gegenläufiges Bild ab. Hier lag der Anteil entsprechend hybridisierter Zellen in den Überläufen unter dem in den Fermentern (Abb. 23 und 28). Da mit Hilfe dieser Sonden eine Vielzahl typischer Pansenbakterien mit anaerobem Stoffwechsel hybridisiert werden können, wäre wie auch im Falle der *Archaea* ein negativer Effekt des in die Überlaufgefäße eingetragenen Sauerstoffs oder deren spätere Etablierung im Fermenter denkbar. Außerdem sind eine Reihe von Vertretern der *Bacteroides-Prevotella*, *Firmicutes* sowie *Fibrobacteres* vorwiegend partikelassoziiert vorzufinden (Tajima et al., 1999, Koike et al., 2003b, Shinkai und Kobayashi, 2007) und könnten aufgrund dessen weniger schnell ausgewaschen worden sein als andere Spezies.

Die Hybridisierung der *Methanobacteriaceae* (MB 1174) ließ ebenfalls Unterschiede zwischen den Orten der Probennahme erkennen (Abb. 29). Allerdings waren unter Einsatz der Sonde MB 1174 keine gerichteten Veränderungen zu beobachten. Während sich für einige der Behandlungen ein höherer Anteil hybridisierter *Methanobacteriaceae* im Fermenter zeigte, war für andere ein höherer Anteil im Überlauf zu finden.

Darüber hinaus zeichnete sich in den Überläufen gegenüber den Fermentern ein verschobenes Verhältnis der einzelnen Organismengruppen zueinander ab (Abb. 23-25 und 28-29). Die mikrobiellen Gemeinschaften in Fermenter und Überlauf sollte sich diesen Beobachtungen zufolge deutlich unterschieden haben und sind nicht gleich zu stellen. Einen weiteren Hinweis zur Stützung dieser These liefern die variierenden Aminosäurenmuster beider Mikrobenfraktionen, die im Rahmen des Teilprojektes von Hildebrand (unveröffentlicht) ermittelt wurden. Unterschiede hinsichtlich des Aminosäurenmusters der Mikroben aus Fermenter und Überlauf waren darüber hinaus bereits in einer Untersuchung von Boguhn et al. (2006a) festgestellt worden, in der unter Verwendung des gleichen *in vitro* Systems verschiedene TMR (totale

Mischrationen) zum Einsatz kamen. Ferner lassen auch Ergebnisse aus SSCP-Analysen Unterschiede zwischen den mikrobiellen Gemeinschaften in Fermenter und Überlauf erkennen (Strobel et al., 2008). Folglich ist kritisch zu hinterfragen, inwiefern die alleinige Beprobung der Mikroben aus dem Fermenter oder dem Überlauf ein repräsentatives Ergebnis in Bezug auf das verwendete *in vitro* System und die sich etablierende mikrobielle Gemeinschaft liefert.

Einfluss des Mais- und Grassilageanteils im Futter auf die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft in Fermentern und Überläufen

Ein gerichteter Effekt des Mais- und Grassilageanteils im Futter auf die Abundanz untersuchten Organismengruppen war nicht festzustellen (Abb. 22-25 und 28-29). Für das cellulolytisch aktive Bakterium *F. succinogenes* war aber nach alleiniger Inkubation des SES ein deutlich verringertes Auftreten als nach Einsatz der Silagen zu erkennen (Abb. 23 und 28). Während sein Anteil im Falle des SES nicht mehr als 0,4 % der EUB-hybridisierbaren Zellen ausmachte, lag dieser nach Inkubation der Silage-haltigen Futter zwischen 0,8 und 2,2 % und damit in dem aus anderen Untersuchungen bekannten Bereich von 0,8 %-8,5 % (Briesacher, et al, 1992, Ölschläger, 2007, Stevenson und Weimer, 2007). Ursache für das geringe Auftreten im Falle des SES sollte dessen geringerer Gehalt an Strukturkohlenhydraten gewesen sein (Tab. 3).

Den größten Anteil der hybridisierbaren Organismen machten Vertreter der *Bacteroides-Prevotella* und *Firmicutes* aus (Abb. 23 und 28). Bis zu 23 bzw. 11 % der EUB-hybridisierbaren Zellen zeigten unter Verwendung der Sonden BAC 303 und LGC A-C ein entsprechendes Fluoreszenzsignal. Relativ viele Vertreter dieser Gruppen finden sich auch in Klonbanken, die auf Grundlage von Proben aus der flüssigen Phase des Pansens von Rindern erstellt wurden (Tab. 21). Der Anteil der *Firmicutes* in den Klonbanken fiel aber höher aus als in den eigenen Untersuchungen. Mögliche Ursachen hierfür könnten ein verzerrender Effekt der PCR (Vergleich 3.3.1) sowie die unterschiedlichen Umweltbedingungen *in vivo* und *in vitro* sein. Von entscheidender Bedeutung sollte aber die Wahl der Sonden gewesen sein. Wie ein Vergleich mit der RDP-Datenbank zeigte, sind unter Einsatz der in dieser Arbeit verwendeten LGC-Sonden sehr viele *Bacilli* aber nur wenige *Clostridia* zu hybridisieren. Erstere spielen aber im Pansen eher eine untergeordnete Rolle und treten in größeren Mengen allenfalls bei Fütterung Konzentrat-reicher Rationen auf (Stewart et al., 1997, Dehority, 2003). Die geringe Anzahl LGC-hybridisierbarer Zellen sollte daher auf die wenigen

Bacilli im System oder einige *Clostridia* zurückzuführen sein, die mit diesen Sonden dennoch hybridisiert werden können. Die Klonbanken wurden dagegen unter Verwendung universeller Primer erstellt, die auch eine Amplifikation der im Pansen häufig zu findenden *Clostridia* erlauben.

Tabelle 21: Prozentualer Anteil der 16S rDNA-Sequenzen in Klonbanken, die den *Firmicutes*, den *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* (CFB) sowie den *Proteobacteria* zuzuordnen sind und aus der flüssigen Phase des Pansens von Rindern stammen (ergänzt nach Firkins und Yu, 2006)

Referenz	Grobfutter/ Konzentrat	<i>Firmicutes</i>	CFB	<i>Proteobacteria</i>	Primer (Klone)
Whitford et al., 1998	65/35	55	30	1	27f/1492R (31)
Tajima et al., 1999	80/20	52	38	5	27f/1544R (84)
Tajima et al., 2000	75/25	90	4	4	27f/1544R (51)
	4/96	72	22	0	27f/1544R (58)
Kocherginskaya et al., 2001	100/0	25	67	3	341f/534R (96)
	20/80	15	58	27	341f/534R (107)
Ozutsumi et al., 2005	66/34	59	34	1	27f/1544R (151)
An et al., 2005	55/45	22	40	27	530f/1492R (197)

Der Anteil der *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* in den Klonbanken fiel ebenfalls höher aus als der, der in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe der BAC-Sonde zu ermitteln war. Die Abweichungen können auch hier methodisch bedingt sein. Vor allem aber zählen zur Gruppe der *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* weit mehr Organismen als unter Verwendung der *Bacteroides-Prevotella*-spezifischen Sonde hybridisiert werden können. Dazu kommt, dass in keiner der in Tabelle 21 aufgeführten Untersuchungen mit vergleichbaren Futtermitteln gearbeitet wurde. Häufig diente als Grobfutterquelle nur Heu anstatt Silagen.

Beta-, *Gamma*- und *Deltaproteobacteria* machten gemeinsam zwischen 3 und 26 % der EUB-hybridisierbaren Zellen in den Proben aus, was in etwa den Angaben aus anderen Untersuchungen entspricht (Tab. 21).

Der Anteil der *Archaea*, die mit Hilfe der Sonde ARCH 915 hybridisiert werden konnten, lag zwischen 4 und 10 % der DAPI-gefärbten Zellen (Abb. 22) und damit im Bereich von Literaturangaben, die sich sowohl auf *in vitro* Systeme als auch den Pansen beziehen (Sharp et al., 1998, Ziemer et al., 2000, Yanagita et al., 2000, Soliva et al., 2004a). Behandlungsabhängige Unterschiede hinsichtlich ihrer Abundanz waren nicht festzustellen.

In Übereinstimmung mit Ergebnissen aus anderen *in vitro* Untersuchungen (Soliva et al., 2004a und b) konnten in dieser Arbeit bis zu 35 % der nachgewiesenen *Archaea* als *Methanobacteriaceae* identifiziert werden. In Abhängigkeit des Mais- und Grassilageanteils im Futter waren keine gerichteten Veränderungen hinsichtlich ihrer Abundanz zu erkennen. Jedoch erwies sich ihr Anteil an der Gesamtzellzahl sowie in Bezug auf die ARCH-hybridisierten Zellen nach Inkubation der Mischung II, der Maissilage und des SES als vergleichsweise gering (Abb. 29). Folglich sollten behandlungsabhängige Unterschiede hinsichtlich der Zusammensetzung der *Archaea*-Gemeinschaften in den Fermentern bestanden haben. Für deren nähere Analyse wurden daher weitere Sonden zur Hybridisierung der *Methanomicrobiales*, *Methanosarcina* und *Methanosaeta* eingesetzt (Raskin et al., 1994), ohne jedoch eine weitere Differenzierung darstellen zu können. Entweder wurden suboptimale Hybridisierungsbedingungen eingestellt oder die übrigen *Archaea* gehörten anderen Organismengruppen wie etwa den *Thermoplasmatales* an, die ebenfalls in diesem System zu finden waren (Vergleich 3.2.4).

Eine futtermittelbedingt unterschiedliche Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften deutete sich allerdings auch anhand der hybridisierten Bakterien an. Zumindest variierte das Verhältnis der einzelnen Organismengruppen zueinander sichtlich (Abb. 23-24 und 28). Unter Einsatz der Sonden BAC 303 und LGC A-C waren darüber hinaus in den Fermentern aber auch gleichgerichtete Veränderungen zu beobachten. Mit abnehmendem Anteil BAC-hybridisierter Zellen verringerte sich auch der Anteil LGC-hybridisierter Zellen. Ursache hierfür könnten synergistische Interaktionen sein, wie sie etwa für *Ruminococcus*- und *Prevotella*-Spezies bestehen (Gradel und Dehority, 1972). Allerdings wäre ebenso möglich, dass Vertreter beider Gruppen auf ähnliche Substrate zugreifen.

Ein gerichteter Effekt des Mais- und Grasilageanteils im Futter auf die mikrobielle Zusammensetzung in den Fermenter- und Überlaufproben zeigte sich letztlich aber nur in Bezug auf die unterschiedlich häufig detektierten Zellpakete (Abb. 26). Deren Auftreten schien mit steigendem Maissilageanteil zuzunehmen. Da allerdings keine einheitliche Hybridisierung dieser Zellen gelang, war deren phylogenetische Zuordnung nicht möglich. Ihrer Form (Paket-artig) und Größe (ca. 2 μm) zu Folge könnte es sich hierbei um grampositive Bakterien aus der Gattung *Sarcina* handeln. Diese obligaten Ananobier vergären verschiedene Zucker und wurden bereits in tierischen Exkrementen nachgewiesen (Madigan und Martinko, 2006). Sie umgeben sich mit einer dicken, fibrösen Zelluloseschicht, die das Ineinanderlaufen benachbarter Zellen zur Folge hat und möglicherweise die Permeabilisierung der Zellen behindert. Allerdings weisen auch etliche andere *Bacteria* und *Archaea* ähnliche phänotypische Merkmale auf. Die Festlegung auf eine bestimmte phylogenetische Gruppe wäre daher vage.

5. Schlussbetrachtung und Ausblick

Die Innovation der vorliegenden Arbeit auf Basis einer *in vitro* Inkubation besteht in der Kombination sowohl qualitativer Fingerprint- als auch quantitativer Methoden wie die Real-time qPCR und die FISH zur Beschreibung der mikrobiellen Gemeinschaft im Pansen. Als Einflussfaktoren wurden verschiedene Mais- und Grassilageanteile in Futtermischungen sowie die Futterpartikelgröße gewählt. Im Folgenden sollen die Ergebnisse entsprechender Analysen kurz zusammengefasst, Methoden-übergreifend betrachtet und Schlussfolgerungen gezogen werden.

Die Ergebnisse der SSCP-Analysen lieferten erste Hinweise auf strukturelle Veränderungen der untersuchten Mikrobengemeinschaften in Abhängigkeit beider Einflussfaktoren. Die erstellten SSCP-Profile für die Organismengruppen der *Clostridia*, *Bactreoides-Prevotella* und *Archaea* zeigten deutliche Unterschiede bei Variation der Silagenanteile. Die gewählte Futterpartikelgröße ließ ebenfalls einen Einfluss auf die Profile erkennen, war jedoch aufgrund der unterschiedlich aufgetragenen DNA-Mengen im Falle der *Archaea* nicht eindeutig nachzuweisen. In den korrespondierenden NMDS-Plots deutete sich darüber hinaus eine gerichtete Veränderung der SSCP-Profile an, die sowohl mit den Rohnährstoff- und Fasergehalten der Futtermischungen als auch mit der Futterpartikelgröße in Verbindung zu bringen war.

Ferner ist die gute Wiederholbarkeit der SSCP-Profile für die drei Wiederholungen je Behandlung hervorzuheben. Damit bestätigte sich gleichzeitig die Reproduzierbarkeit der *in vitro* Versuche. Bisherige *in vitro* Untersuchungen hatten den zeitlichen Aspekt unbeachtet gelassen und lediglich die Wiederholbarkeit innerhalb eines Versuchsdurchganges nachgewiesen.

Zur Steigerung der Effektivität der Sequenzanalyse und Einbeziehung möglichst vieler Banden wurde geprüft, inwiefern ein Einsatz von DNA-Mischproben der drei Wiederholungen je Behandlung zu ähnlichen SSCP-Profilen führt wie für die Einzelproben und ob diese zur Sequenzierung genutzt werden können. Im Ergebnis zeigte sich in den Mischprobenprofilen eine gute Reproduzierbarkeit der Banden aus den Einzelproben, wenngleich einige Abweichungen zu beobachten waren. Ebenso ließ die vergleichende Sequenzanalyse erkennen, dass unter Verwendung der SSCP-Banden

aus den Mischprobenprofilen ein für die drei Einzelproben repräsentatives Ergebnis zu erwarten ist.

Für zukünftige Arbeiten wäre das Mischen der Einzelproben erst nach erfolgter PCR und dem Einzelstrangverdau zu empfehlen. Auf diesem Wege wären einerseits Zeit- und Materialaufwand bereits vor der Sequenzierung zu verringern. Andererseits sollte sich die Reproduzierbarkeit der Einzelprobenprofile in der Mischprobe verbessern. Dies dürfte sich auch positiv auf das Ergebnis der Sequenzierung auswirken, da diese Mischprobe nicht dem Einfluss der PCR unterliegt, sondern die enthaltenen Amplifikate lediglich aus den Einzelproben stammen.

Die Sequenzierung ausgewählter SSCP-Banden konnte nur bedingt die Hypothese einer Faktoren-abhängigen Veränderung der Anteile einzelner Organismen an der mikrobiellen Gemeinschaft unterstützen. Dies hat v.a. methodische Gründe. Die Sequenzanalyse für ausgewählte SSCP-Banden der *Clostridia*-, *Bacteroides-Prevotella*- und *Archaea*-spezifischen Profile zeigte, dass jede der Banden durch mehr als einen Organismus repräsentiert wurde. Außerdem waren einige Sequenzen in mehreren Banden zu detektieren. Dies erschwerte die Interpretation der Sequenzdaten erheblich. In zukünftigen Untersuchungen sollten daher für SSCP-Analysen Primer zum Einsatz kommen, die auf weitaus niedrigerer phylogenetischer Ebene ansetzen und damit eine höhere Auflösung erlauben. Darüber hinaus erwiesen sich die zur Darstellung der *Bacteroides-Prevotella*-spezifischen SSCP-Profilen gewählten Primer als ungeeignet. Zu empfehlen wäre daher die Prüfung anderer, wie der von Bartosch et al. (2004) vorgeschlagenen Primer.

Beachtung fanden letztlich diejenigen Sequenzen, die ausschließlich in behandlungsabhängig aufgetretenen Banden nachzuweisen waren. Wenngleich aufgrund der begrenzten Anzahl sequenzierter Klone nicht auszuschließen ist, dass diese Sequenzen auch in anderen SSCP-Banden vorkamen, so kann deren Detektion zumindest als Hinweis auf ein behandlungsabhängiges Auftreten entsprechender Organismen gedeutet werden. Dies liefert Ansatzpunkte für weitere, evtl. auch quantitative Analysen. So wäre beispielsweise zu prüfen, inwiefern die im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesenen *Roseburia*-Spezies tatsächlich einen Vorteil in den Grassilage enthaltenden Mischungen der gröberen Futterpartikelgröße hatten. Zu klären wäre auch, ob der Einsatz von Grassilage tatsächlich zu einer erhöhten Abundanz der

detektierten *Methanosphaera*-Spezies führt. Voraussetzung aber wäre auch hier die Verfügbarkeit entsprechender hoch-spezifischer Primer oder Sonden.

Im Ergebnis der quantitativen Untersuchungen bestätigte sich das Bild der SSCP-Analysen. So führte die Inkubation des gröber vermahlenden Futters im Falle der Maissilage enthaltenden Mischungen zu einer verringerten Abundanz von *Ruminococcus albus* und *Prevotella bryantii*. Da letztere Spezies auch hemicellulolytische sowie pectinolytische Aktivität zeigt, ist eine indirekte negative Beeinflussung durch das verminderte Auftreten eines Cellulolyten wie *R. albus* wahrscheinlich. Futtermittelbedingte Unterschiede hinsichtlich der Abundanz waren nur für *P. bryantii* festzustellen. Ursache für das vermehrte Auftreten dieses Organismus in den vorwiegend Grassilage enthaltenden Mischungen könnte u.a. der im Vergleich höhere XP-Gehalt bzw. hohe Anteil an Nicht-Protein-Stickstoff sein. Da das Bakterium bei Verfügbarkeit von Peptiden und Aminosäuren zu einer effizienteren Proteinsynthese befähigt ist als unter Nutzung von anorganischem Stickstoff, läge hierin möglicherweise eine Begründung für die höhere Effizienz der Proteinsynthese, die im Falle der Grassilage enthaltenden Mischungen von Hildebrand et al. (2008) nachzuweisen war. Eine veränderte Syntheseleistung der Mikroorganismen *in vitro* oder im Pansen könnte daher auf die Förderung oder Hemmung entsprechend effizient arbeitender Spezies zurückzuführen sein. Diese Hypothese müsste zukünftig mit weiteren, systematischen molekular- sowie mikrobiologischen Untersuchungen unteretzt werden.

Analog zu den soeben dargestellten Daten der Real-time qPCR ließen auch die Ergebnisse der FISH eine futtermittelbedingt unterschiedliche Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften *in vitro* erkennen. Es zeichnete sich eine Verschiebung der Relationen einzelner Organismengruppen zueinander ab. Allerdings waren weder für die Gruppe der *Bacteroides-Prevotella* oder *Firmicutes* noch für verschiedene *Proteobacteria* gerichtete Veränderungen zu beobachten. Der Einsatz von Sonden, die auf niedrigerer phylogenetischer Ebene ansetzen, könnte wie auch im Falle der SSCP mehr Aufschluss zu dieser Fragestellung bieten.

Die Verwendung der einzigen artspezifischen Sonde, die zur Detektion von *Fibrobacter succinogenes* diente, zeigte eindeutig, dass für diese Spezies keine Beeinflussung durch die Anteile von Mais- und Grassilage in den Futtermischungen bestand. Die Abundanz in der Überlaufflüssigkeit schien demnach wie für *R. albus* unabhängig von der

inkubierten Silage zu sein. Die Ergebnisse der DAPI-Färbung der Zellen deuten dagegen auf gerichtete Veränderungen der untersuchten Mikrobengemeinschaften hin. Mit zunehmendem Maissilageanteil im Futter nahm die Anzahl Paket-förmiger Zellzusammenschlüsse zu. Hierbei handelte es sich offensichtlich um Spezies, die bei Inkubation der Maissilage einen Vorteil hatten, deren phylogenetische Einordnung allerdings nicht gelang.

Den dargestellten Ergebnissen zufolge führte der Einsatz unterschiedlicher Mais- und Grassilageanteile im Futter zu deutlichen Unterschieden in der Zusammensetzung der ruminalen Mikrobengemeinschaft *in vitro*. Da auch das Aminosäurenmuster des mikrobiellen Proteins sowie verschiedene Fermentationsparameter in Abhängigkeit der eingesetzten Silagen variierten (Hildebrand et al., 2008, Hildebrand, unveröffentlicht), gilt die futtermittelbedingte Beeinflussung der mikrobiellen Gemeinschaften als gesichert. Da Silagen ein sehr heterogenes Substrat darstellen und die enzymatische Ausstattung einzelner Mikroorganismen, wenn überhaupt bekannt, sowohl extrem spezialisiert als auch generalisiert sein kann, sind Aussagen über die tatsächliche Ursache für das Auftreten einzelner Spezies kaum zu treffen.

Überraschenderweise deutet sich *in vitro* eine höhere Effizienz der mikrobiellen Proteinsynthese bei Austausch von Mais- gegen Grassilage an (Boguhn et al., 2006 Hildebrand et al., 2008), wogegen *in vivo* scheinbar umgekehrte Verhältnisse vorliegen (Givins und Rulquin, 2004). Der hiermit in Verbindung gebrachte Effekt einer besseren Synchronisation der Stickstoff- und Energieversorgung bei Verfütterung von Maissilage scheint demnach *in vitro* weniger Bedeutung zu haben. Nahe liegt, dass der leichtlösliche Stickstoff aus der Grassilage zwar schnell freigesetzt wird, das System jedoch nur langsam verlässt und damit den Mikroorganismen auch während des Abbaus der langsam fermentierbaren Substanz zur Verfügung steht. Im nativen Pansen dagegen wird frei werdender Stickstoff in Form von Ammoniak über die Pansenwand absorbiert. Es ist daher sehr fraglich, ob eine Übertragung der *in vitro* ermittelten Daten zum Einfluss des Mais- und Grassilageanteils im Futter auf das Tier ohne Weiteres möglich ist.

Weitere methodische Details, wie die gewählte Partikelgröße des zu inkubierenden Futters, haben offensichtlich auch einen entscheidenden Einfluss auf die mikrobielle Gemeinschaft und damit die *in vitro* ermittelten Daten. Da im Pansen Futterpartikel

unterschiedlichster Größe zu finden sind, wäre möglicherweise eine Inkubation in Originalgröße oder einer Vermahlung bei verschiedenen Siebdurchgängen der Vorzug zu geben. In jedem Falle wäre eine Standardisierung und Validierung der Pansensimulation wünschenswert, um die Vorteile einer *in vitro* Inkubation besser nutzen und gleichzeitig die Ergebnisse verschiedener Untersuchungen miteinander vergleichen zu können.

Auch die Mikrobenfraktion, die als Referenz für die mikrobielle Gemeinschaft sowie die Bestimmung der Effizienz der mikrobiellen Proteinsynthese genutzt wird, variiert zwischen verschiedenen Untersuchungen. Um eine Vergleichbarkeit mit Literaturdaten zu gewährleisten, ermittelten Hildebrand et al. (2008) die Effizienz der mikrobiellen Proteinsynthese anhand der Mikroben aus den Überläufen. In Anlehnung an dieses Komplementärprojekt erfolgten auch in der vorliegenden Arbeit die SSCP-Analysen sowie die Real-time qPCR anhand dieser Mikrobenfraktion. Der im Rahmen der FISH durchgeführte Vergleich der Organismen in der Fermenter- und Überlaufflüssigkeit ließ aber deutliche Unterschiede zwischen den Mikrobenfraktionen erkennen. Ob diese durch den Sauerstoffeintrag, zeitlich bedingte Veränderungen der mikrobiellen Gemeinschaft oder eine unterschiedliche Auswaschung aus dem Fermenter verursacht wurden, muss offen bleiben. In jedem Falle fanden sich neben vielen anaeroben auch etliche obligat aerob lebende Spezies in der Überlaufflüssigkeit. Aerobe sind aber auch im Pansen des Wiederkäuers nicht Ungewöhnliches, da auch hier ein Sauerstoffeintrag über den Schlund sowie das Futter erfolgt. Um alle der eben genannten Störfaktoren ausschließen zu können und ein repräsentatives Ergebnis im Hinblick auf die an der Fermentation beteiligten Spezies zu erhalten, wäre eine täglich mehrfache Beprobung des Fermenters möglicherweise von Vorteil.

Zusammenfassung

Das Verständnis um die im Pansen ablaufenden mikrobiellen Prozesse sowie das Wissen um die daran beteiligten Mikroorganismen sind Voraussetzung zur gezielten Optimierung von Futtermischungen für Wiederkäuer.

Im Rahmen dieser Untersuchung sollte mit Hilfe molekularbiologischer Methoden geklärt werden, welchen Einfluss unterschiedliche Anteile von Mais- und Grassilage in Futtermischungen auf die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft im Pansen haben. Zur Gewinnung mikrobieller Masse und Isolation von DNA wurde eine Pansensimulation (Rusitec) gewählt, da *in vitro* Systeme gegenüber dem Tier besser kontrollierbar und standardisierbar sind. Da die angreifbare Oberfläche des pflanzlichen Materials ein wichtiger Parameter für den Grad des fermentativen Abbaus des Futters und damit für die mikrobielle Gemeinschaft ist, wurde zusätzlich der Vermahlungsgrad und damit die Futterpartikelgröße variiert.

Zunächst wurden drei verschiedene Futtermischungen in einem semi-kontinuierlichen Pansensimulationssystem inkubiert. Diese enthielten jeweils 10 % Sojaextraktionsschrot sowie 90 % Mais- und Grassilage in variierenden Anteilen (1:0; 0,5:0,5; 0:1 auf Basis der Trockensubstanz, T). Zur Prüfung des Effektes der Futterpartikelgröße wurde das Futter auf 1 und 4 mm Siebdurchgang vermahlen. Je Behandlung wurden drei Wiederholungen angesetzt, die in drei verschiedenen Versuchsdurchgängen realisiert wurden.

Die Probenahme erfolgte stets am 14. Tag der Inkubation. Mittels Differentialzentrifugation wurden die Mikroorganismen aus der Überlaufflüssigkeit abgeschieden und deren genomische DNA extrahiert. Zur Darstellung struktureller Unterschiede der Mikrobengemeinschaften wurden anschließend auf Grundlage von Teilsequenzen des 16S rRNA-Gens spezifische SSCP-Profile (single strand conformation polymorphism) für die Gruppen *Clostridia*, *Bacteroides-Prevotella* und *Archaea* erstellt. Es war eine sehr gute Wiederholbarkeit für die SSCP-Profile der drei Wiederholungen je Behandlung zu beobachten, was gleichzeitig auf eine entsprechende Reproduzierbarkeit der *in vitro* Versuche deutete. Die Profile aller drei Organismengruppen variierten in Abhängigkeit der Anteile der Silagen in den Futtermischungen deutlich. Außerdem war im Falle der *Clostridia* und *Bacteroides-Prevotella* ein Effekt der Futterpartikelgröße nachweisbar. In den korrespondierenden NMDS (nichtmetrische multidimensionale Skalierung)-Plots war

darüber hinaus eine gerichtete Veränderung der SSCP-Profile zu erkennen. Diese konnte auf den zunehmenden Gehalt an Rohprotein, Rohfett und Rohfaser in den Grassilage enthaltenden Futtermischungen sowie auf die gewählte Futterpartikelgröße zurückgeführt werden.

Die Sequenzanalyse ausgewählter SSCP-Banden sollte Aufschluss darüber geben, welche Organismen behandlungsabhängig auftraten. Im Vorfeld konnte gezeigt werden, dass der Einsatz von DNA-Mischproben der drei Wiederholungen je Behandlung ähnliche SSCP-Profile bedingte wie die korrespondierenden Einzelproben und dass die Sequenzierung von Banden aus den Profilen der Mischproben zu repräsentativen Ergebnissen in Bezug auf die Einzelproben führte. Demnach wurde zur Sequenzierung ausschließlich auf die Banden aus den Mischprobenprofilen zurückgegriffen.

Im Zuge der Sequenzanalyse einzelner SSCP-Banden war festzustellen, dass diese häufig durch weit mehr als einen Organismus repräsentiert wurden. Es fanden sich sowohl identische Sequenzen in mehreren Banden als auch behandlungsabhängig aufgetretene Sequenzen in einzelnen SSCP-Banden. Inwiefern entsprechende Organismen tatsächlich einem Einfluss der eingesetzten Futtermischungen oder gewählten Partikelgröße unterlagen, wäre in weiterführenden Untersuchungen mit Hilfe quantitativer Methoden zu klären.

Um behandlungsabhängige Unterschiede auf Ebene einzelner Spezies quantitativ nachzuweisen, wurde eine Real-time quantitative (q)PCR für *Ruminococcus albus* und *Prevotella bryantii* durchgeführt. Im Ergebnis war für beide Spezies, die vor allem partikelassoziiert vorkommen, bei einer Partikelgröße von 4 mm eine geringere Abundanz festzustellen. Die Verminderung der angreifbaren Oberfläche des pflanzlichen Materials könnte hier limitierend gewirkt haben. Darüber hinaus ließen zunehmende Grassilageanteile im Futter einen positiven Effekt auf *P. bryantii* erkennen. Da dieses Bakterium aktiv in den Stickstoff-Stoffwechsel im Pansen eingreift, könnte sein vermehrtes Auftreten auf die höheren Gehalte an Rohprotein bzw. Nichtprotein-Stickstoff-Verbindungen in den Grassilage enthaltenden Mischungen zurückgeführt werden. Die Ergebnisse der Real-time qPCR bestätigten damit die anhand der SSCP-Profile vermuteten strukturellen Unterschiede zwischen den untersuchten Mikrobengemeinschaften.

In einem weiteren *in vitro* Versuch wurden sowohl die im ersten Versuch verwendeten Futtermischungen als auch zwei weitere, die ein Mais-/Grassilageverhältnis von 0,75:0,25 und 0,25:0,75 aufwiesen, sowie die drei Einzelfuttermittel (Mais-, Grassilage

und Sojaextraktionsschrot) mit einer Partikelgröße von 1 mm in einfacher Wiederholung inkubiert. Der Versuch diente der Beschreibung der Mikrobengemeinschaften anhand einer PCR-unabhängigen Methode, der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH). Außerdem wurde die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften in Fermenter und Überlauf miteinander verglichen. Das Ergebnis der FISH ließ auf deutliche Verschiebungen der Relationen einzelner Organismengruppen zueinander in Abhängigkeit der Futtermischung schließen. Gerichtete Veränderungen in Abhängigkeit der eingesetzten Silageanteile waren aber nur anhand der DAPI(4',6-Diamidino-2-phenylindol)-gefärbten Zellen zu beobachten. So deutete sich mit zunehmendem Maissilageanteil im Futter ein vermehrtes Auftreten Paket-förmiger Zellzusammenschlüsse an. Eine phylogenetische Einordnung dieser Spezies gelang nicht.

Unterschiede ließen sich darüber hinaus auch zwischen den Mikrobenfraktionen in Fermenter und Überlauf erkennen. Während in den Fermentern die *Bacteroides-Prevotella* (9-23 %) sowie die *Firmicutes* (3-11 %) den größten Anteil der hybridisierten Zellen ausmachten, war in den Überläufen außerdem ein erhöhter Anteil *Beta-* sowie *Gammaproteobacteria* zu finden (4-16 %). Es muss daher kritisch hinterfragt werden, welche *in vitro* gewonnene Mikrobenfraktion repräsentativ für die gesamte Mikrobengemeinschaft ist.

In Zusammenfassung dieser Untersuchung konnte demnach mit Hilfe verschiedener molekularbiologischer Methoden nachgewiesen werden, dass sich die mikrobielle Gemeinschaft *in vitro* in Abhängigkeit der Mais- und Grassilageanteile im Futter ändert. Dies könnte die Ursache der in einer assoziierten Untersuchung festgestellten erhöhten Effizienz der mikrobiellen Proteinsynthese mit zunehmendem Grassilageanteil in der Futtermischung sein. Der deutliche Effekt der gewählten Futterpartikelgröße auf die *in vitro* ermittelten Daten legt eine Standardisierung des Vermahlungsgrades des zu inkubierenden Futters nahe.

Von einer Übertragung dieser Ergebnisse auf das Tier sollte ohne vorherige Prüfung Abstand genommen werden, da insbesondere die im Pansen stattfindenden Absorptionsvorgänge der Fermentationsprodukte innerhalb des verwendeten Simulationssystems nicht berücksichtigt wurden.

Summary

The understanding of microbial processes in the rumen as well as the knowledge of microorganisms involved are important for optimising ruminant rations.

This study was conducted to investigate the influence of different maize silage to grass silage ratios in ruminant rations on the composition of ruminal microbial community by using molecular techniques. A semi-continuous rumen simulation technique (Rusitec) was chosen for obtaining microbial mass and DNA as *in vitro* systems are easier to manage and standardise than *in vivo* studies. Since the accessible surface area of plant material is an important parameter for the fermentation of feed and thus for the microbial community, the feed particle size was also varied.

In a first experiment three different rations that contained 10 % soybean meal as well as maize silage and grass silage in different ratios (1:0; 0,5:0,5; 0:1 on dry matter basis) were incubated. In order to study the effect of feed particle size the rations were dried and ground through sieves with a 1 or 4 mm screen. Three replicates per treatment were used during three successive experimental runs.

Samples were taken after 13 days of incubation. Microbes were isolated from the liquid effluent by stepwise centrifugation and genomic DNA of the microbial community was extracted. Structural differences of microbial communities were assessed by PCR-SSCP (single strand conformation polymorphism) analysis of 16S rDNA fragments amplified using primers specific for *Clostridia*, *Bacteroides-Prevotella* or *Archaea*. SSCP profiles of the three replicates per treatment showed a good reproducibility, thus indicating a suitable repeatability of the *in vitro* experiments. The inclusion levels of different silages led to significant differences within group specific profiles. An additional effect of the feed particle size was detected for *Clostridia* and *Bacteroides-Prevotella*. Furthermore the corresponding NMDS (non-metric multidimensional scaling) plots revealed a shift of the SSCP profiles which could be attributed to the higher content of crude protein, ether extract and crude fibre in grass silage as well as to the particle size of the incubated feed.

In order to identify organisms which occurred in dependence on certain treatments 16S rDNA-fragments were extracted from single SSCP bands and sequenced after reamplification and cloning. PCR products of mixed DNA samples of the three replicates per treatment showed similar SSCP profiles as the PCR products of the corresponding individual samples. Moreover, sequence analyses of bands cut out from

profiles of mixed samples gave representative results with respect to the corresponding bands in profiles of individual samples. Therefore, sequencing was restricted to bands from profiles of mixed samples.

Results of the sequence analyses showed that each band was represented by more than one organism. On the one hand identical sequences were found to be present in several bands. On the other hand sequences were detected which seemed to occur in dependence on treatment. To what extent the respective organisms were actually influenced by maize silage to grass silage proportion in ration or the feed particle size has to be verified in further studies by using quantitative methods.

In order to detect quantitative differences at species level in this study real time quantitative (q) PCR was carried out for *Ruminococcus albus* and *Prevotella bryantii*. Both species which are known to be particle-associated bacteria showed a lower abundance after incubation of feed ground to pass a 4 mm sieve. The reduction in surface area of plant material can be considered as a limiting factor for species growth. Results also suggested a higher abundance of *P. bryantii* with increasing grass silage proportion in the rations. Due to the fact that this bacterium is involved in the ruminal nitrogen metabolism its higher abundance may have been caused to the higher contents of crude protein and non-protein nitrogen compounds in the grass silage containing rations. Thus, the results of the real time qPCR confirmed the results of the SSCP analyses which indicated structural differences between microbial communities.

In a second *in vitro* experiment the same rations as in the first experiment as well as two further rations (maize silage to grass silage ratios: 0,75:0,25 and 0,25:0,75) and single feed components (maize silage, grass silage, soybean meal) were used. Rations were only ground through a 1 mm screen. Incubation was carried out once per treatment. Fresh and intact cells for an analysis of the microbial communities by a non PCR based method, the fluorescence *in situ* hybridization (FISH), were taken. A further objective was to compare the composition of microbial communities in the fermenter vessels and the liquid effluent was compared to each other.

The results of the FISH indicated different relations of several organism groups to each other in dependence on the incubated feed. A shift of microbial communities depending on the maize silage to grass silage ratio was only detectable by DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole) staining of the cells. Thus, an increased amount of a

certain kind of cells which were clustered in packages seemed to appear with increasing maize silage content of the incubated feed. A phylogenetic identification of these species was not possible. Differences were observed between microbial fractions obtained from the fermenter vessels and the liquid effluent. While in the fermenter vessels a higher amount of *Bacteroides-Prevotella* (9-23%) and *Firmicutes* (3-11%) was detected, a lot of cells were also identified as *Beta-* and *Gammaproteobacteria* (4-16%) in the liquid effluents. This gives further support to the hypothesis, that it is difficult to obtain a microbial fraction that is representative for the microbial community as a whole.

In conclusion this study showed by using different molecular techniques that the microbial communities *in vitro* varied in dependence on the maize to grass silage proportions in ruminant rations. The changes of microbial community may have been caused a higher efficiency of microbial protein synthesis in grass silage rich rations found in an associated study. The significant effect of the feed particle size suggests that a standardisation of the grinding is needed in *in vitro* experiments.

Results of the present study cannot be transferred to the situation in a functional rumen without further studies on the comparability of results.

Literaturverzeichnis

- Abedon, B.G., Harfield, R.D. und W.F. Tracy, 2006: Cell wall composition in juvenile and adult leaves of maize (*Zea mays* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 3896-3900.
- AfBN, 1991: Leitlinien für die Bestimmung der Verdaulichkeit von Roh Nährstoffen an Wiederkäuern. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 65: 229-234.
- Akin, D.E., 1989: Histological and physical factors affecting digestibility of forages. *Agronomy Journal*, 81: 17-25.
- Akin, D.E., Lyon, C.E., Windham, W.R. und L.L. Rigsby, 1989: Physical degradation of lignified stem tissues by ruminal fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, 55: 611-616.
- Akin, D.E. und W.S. Borneman, 1990: Role of rumen fungi in fiber degradation. *Journal of Dairy Science*, 73: 3023-3032.
- Allison, M.J., Mayberry, W.R., McSweeney, C.S. und D.A. Stahl, 1993: Synergistes-Jonesii, gen-nov, sp-nov – a rumen bacterium that degrades toxic pyridinediols. *Systematic and Applied Microbiology*, 16: 164.
- Al-Tamimi, M.A.H.M., Palframan, R.J., Cooper, J.M., Gibson, G.R. und R.A. Rastall, 2005: In vitro fermentation of sugar beet arabinan and arabinooligosaccharides by the human gut microflora. *Journal of Applied Microbiology*, 100: 407-414.
- Aman, P., 1998: Composition and structure of cell wall polysaccharides in forages. In: Forage cell wall structure and digestibility. Jung, H.G., Buxton, B.R., Hartfield, R.D. und J. Ralph. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, USA: 183-199.
- Amann, R.I., Binder, B.J., Olson, R.J., Chisholm, S.W., Devereux, R. und D.A. Stahl, 1990a: Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Applied and Environmental Microbiology*, 56: 1919-1925.
- Amann, R.I., Krumholz, L. und D.A. Stahl, 1990b: Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *Journal of Bacteriology*, 172: 762-770.
- Amann, R.I., Ludwig W. und K.H. Schleifer, 1994: Identification of uncultured bacteria: a challenging task for molecular taxonomists. *ASM News* 60: 360-365.
- Amann, R.I., Ludwig W. und K.H. Schleifer, 1995a: Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, 59: 143-169.
- Amann, R.I., 1995b: In situ identification of micro-organisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes. In: *Molecular Microbial Ecology Manual*. Akkermaans, A.D.L., van Elsas, J.D. und F.J. de Bruijn. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London: 3.3.6.
- An, D.D., Dong, X.Z. und Z.Y. Dong, 2005: Prokaryote diversity in the rumen of yak (*Bos grunniens*) and Jinnan cattle (*Bos taurus*) estimated by 16S rDNA homology analyses. *Anaerobe*, 11: 207-215.
- Anderson, K.L. und S. Lebepe-Mazur, 2003: Comparison of rapid methods for the extraction of bacterial DNA from colonic and caecal lumen contents of the pig. *Journal of Applied Microbiology*, 94: 988-993.
- Anderson, M.J., 2001: A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Australian Ecology*, 26: 32-46.

- Anderson, M.J., 2005: PERMANOVA: a FORTRAN computer program for permutational multivariate analysis of variance. Department of Statistics, University of Auckland, New Zealand.
- Anderson, M.J. und J. Robinson, 2003: Generalized discriminant analysis based on distances. *Australian and New Zealand Journal of Statistics*, 45: 301-318.
- Armstrong, D.G., 1980: Net efficiencies (in vivo) of microbial N synthesis in ruminant livestock. In: 3th EAAP-Symposium on Protein Metabolism and Nutrition, Braunschweig: 400-413.
- Atasoglu, C., Valdes, C., Walker, N.D., Newbold, C.J. und R.J. Wallace, 1998: De novo synthesis of amino acids by the ruminal bacteria *Prevotella bryantii* B₁₄, *Selenomonas ruminantium* HD4, and *Streptococcus bovis* ES1. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 2836-2843.
- Attwood, G.T. und K. Reilly, 1995: Identification of proteolytic rumen bacteria isolated from New Zealand cattle. *Journal of Applied Bacteriology*, 79: 22-29.
- Avgustin, G., Wright, F. und H.J. Flint, 1994: Genetic diversity and phylogenetic relationships among strains of *Prevotella* (*Bacteroides*) *ruminicola* from the rumen. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44: 246-255.
- Avgustin, G., Wallace, R.J. und H.J. Flint, 1997: Phenotypic diversity among ruminal isolates of *Prevotella ruminicola*: Proposal of *Prevotella brevis* sp. nov., *Prevotella bryantii* sp. nov., and *Prevotella albensis* sp. nov. and redefinition of *Prevotella ruminicola*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47: 284-288.
- Backhaus, K., Erichson, B., Plinke, W. und R. Weiber, 2000: *Multivariate Analysemethoden: Eine anwendungsorientierte Einführung*. Springer-Verlag Berlin/Heidelberg/ New York: 499-563.
- Bartosch, S., Fite, A., Macfarlane, G.T. und M.E.T. McMurdo, 2004: Characterization of bacterial communities in feces from healthy elderly volunteers and hospitalized elderly patients by using real-time PCR and effects of antibiotic treatment on the fecal microbiota. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 3575-3581.
- Bassam, B.J., Caetano-Anolles, G. und P.M. Greehoff, 1991: Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamid gels. *Analytical Biochemistry*, 196: 80-83.
- Beimfohr, C., Krause, A., Amann, R., Ludwig, W., and K.H. Schleifer, 1993: In situ identification of lactococci, enterococci and streptococci. *Systematic and Applied Microbiology*, 16: 450-456.
- Boguhn, J., 2004: In vitro-Untersuchungen zum Einfluss der Rationszusammensetzung auf die Synthese und das Aminosäurenmuster des mikrobiellen Proteins im Pansen. Dissertation, Halle, Deutschland.
- Boguhn, J., Kluth, H. und M. Rodehutschord, 2006a: Effect of total mixed ration composition on amino acid profiles of different fractions of ruminal microbes in vitro. *Journal of Dairy Science*, 89: 1592-1603.
- Boguhn, J., Kluth, H. und M. Rodehutschord, 2006b: Effect of total mixed ration composition on fermentation and efficiency of ruminal microbial crude protein synthesis in vitro. *Journal of Dairy Science* 89: 1580-1591.
- Boguhn, J., Strobel, E., Witzig, M., Tebbe, C.C. und M. Rodehutschord, 2008: Description of the structural diversity of rumen microbial communities in vitro using single-strand conformation polymorphism profiles. *Archives of Animal Nutrition*, 62: 454-467.
- Bond, P.L. und Banfield, J.F., 2001: Design and performance of rRNA targeted oligonucleotide probes for in situ detection and phylogenetic identification of

- microorganisms inhabiting acid mine drainage environments. *Microbial Ecology*, 41: 149-161.
- Bosch, M.W., van Bruchem, J., Bongers, L.J.G.M. und S. Tamminga, 1994: Influence of stage of maturity of grass silages on protein digestion and microbial protein synthesis in the rumen. *Netherlands Journal of Agricultural Science*, 42: 203-215.
- Bossen, D., Mertens, D.R. und M.R. Weisbjerg, 2008: Influence of fermentation methods on neutral detergent fiber degradation parameters. *Journal of Dairy Science*, 91: 1464-1476.
- Bouvier, T. und P.A. del Giorgio, 2003: Factors influencing the detection of bacterial cells using fluorescence in situ hybridization (FISH): A quantitative review of published reports. *FEMS Microbiology Ecology*, 44: 3-15.
- Bowman, J.G. und J.L. Firkins, 1993: Effects of forage species and particle size on bacterial cellulolytic activity and colonization in situ. *Journal Animal Science*, 71: 1623-1633.
- Brandt, M. und K. Rohr, 2002: Beiträge zur Quantifizierung der N-Umsetzungen in den Vormägen von Milchkühen 1. Mitteilung: Bestimmung des Mikrobenstickstoffs im Duodenalchymus mit Hilfe von ¹⁵N. *Zeitschrift für Tierphysiologie, Tierernährung und Futtermittelkunde* 46: 39-48, 1981.
- Briesacher, S.L., May, T., Grigsby, K.N., Kerley, M.S., Anthony, R.V., und J.A. Paterson, 1992: Use of DNA probes to monitor nutritional effects on ruminal prokaryotes and *Fibrobacter succinogenes* S85. *Journal of Animal Science*, 70: 289-295.
- Brown, J.A. und S.C. Fry, 1993: Novel O-D-galacturonoyl esters in the pectic polysaccharides of suspension-cultured plant cells. *Plant Physiology*, 103: 993-999.
- Brunner, E., S. Domhof, and F. Langer, 2002: *Nonparametric Analysis of Longitudinal Data in Factorial Experiments*. New York: John Wiley & Sons, Inc.
- Buxton, D.R. und D.D. Redfearn, 1997: Plant limitations to fiber digestion and utilization. *Journal of Nutrition*, 127 (Suppl. 5): 814S-818S.
- Cariello, N.F., Thilly, W.C., Swenberg, J.A. und T.R. Skopek, 1991: Deletion mutagenesis during polymerase chain reaction: dependence on DNA polymerase. *Gene*, 99:105-108.
- Carpita, N.C., 1989: Pectic polysaccharides of maize coleoptiles and proso millet cells in liquid culture. *Phytochemistry*, 28: 121-125.
- Carpita, N.C., 1996: Structure and biogenesis of the cell wall of grasses. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47: 445-476.
- Carro, M. D., Lebzién, P. und K. Rohr, 1995: Effects of pore size of nylon bags and dilution rate on fermentation parameters in a semi-continuous artificial rumen. *Small Ruminant Research*, 15: 113-119.
- Chen, J., Stevenson, D.M. und P.J. Weimer, 2004: Albusin B, a bacteriocin from the ruminal bacterium *Ruminococcus albus* 7 that inhibits growth of *Ruminococcus flavefaciens*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 3167-3170.
- Cheng, K.J., Forsberg, C.W., Minato, H. und J.W. Costerton, 1991: Microbial ecology and physiology of feed degradation within the rumen. In: *Physiological Aspects of Digestion and Metabolism in Ruminants*, Tsuda, T., Sasaki, H. und R. Kawahima. Academic Press, New York: 595-624.
- Cheng, K.J. und T.A. McAllister, 1997: Compartmentation in the rumen. In: *The Rumen Microbial Ecosystem*. Hobson, P.N. und C.S. Stewart. Blackie Academic Professional, London, 2. Auflage: 492-522.

- Cherney, J.H., Cherney, D.J.R. und D.R. Mertens, 1988: Fiber composition and digestion kinetics in grass stem internodes as influenced by particle size. *Journal of Dairy Science*, 71: 2112-2122.
- Chesson, A., Gordon, A.H. und L. Scobbie, 1995: Pectic polysaccharides of mesophyll cell walls of perennial ryegrass leaves. *Phytochemistry*, 38: 579-583.
- Chesson, A. und C.W. Forsberg, 1997: Polysaccharide degradation by rumen microorganisms. In: *The Rumen Microbial Ecosystem*. Hobson, P.N. und C.S. Stewart. Blackie Academic Professional, London, 2. Auflage: 329-381.
- Clark, J.H., Klusmeyer, T.H. und M.R. Cameron, 1992: Symposium: Nitrogen metabolism and amino acid nutrition in dairy cattle: Microbial protein synthesis and flows of nitrogen fractions to the duodenum of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 75: 2304-2323.
- Coen, J.A. und B.A. Dehority, 1970: Degradation and utilization of hemicellulose from intact forages by pure cultures of rumen bacteria. *Applied Microbiology*, 20: 362-368.
- Cole, J.R., Chai, B., Marsh, T.L., Farris, R.J., Wang, Q., Kulam, S.A., Chandra, S., McGarrell, D.M., Schmidt, T.M., Garrity, G.M. und J.M. Tiedje, 2003: The Ribosomal Database Project (RDP-II): previewing a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy. *Nucleic Acids Research*, 31: 442-443.
- Cole, J.R., Chai, B., Farris, R.J., Wang, Q., Kulam-Syed-Mohideen, A.S., McGarrell, D.M., Bandela, A.M., Cardenas, E., Garrity, G.M. und J. M. Tiedje, 2007: The ribosomal database project (RDP-II): introducing *myRDP* space and quality controlled public data. *Nucleic Acids Research*, 35 (Database issue): D169-D172; doi: 10.1093/nar/gkl889.
- Collins, M.D., Lawson, P.A., Willems, A., Cordoba, J.J., Fernandezgarayzabal, J., Garcia, P., Cai, J., Hippe, H. und J.A.E. Farrow, 1994: The phylogeny of the genus *Clostridium* - Proposal of 5 new genera and 11 new species combinations. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44: 812-826.
- Cotta, M., 1988: Amylolytic Activity of Selected Species of Ruminant Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 54: 772-776
- Cotta, M., 1992: Interaction of ruminal bacteria in the production and utilization of maltooligosaccharides from starch. *Applied and Environmental Microbiology*, 58: 48-54
- Cotta, M. und J.B. Russell, 1982: Effect of peptides and amino acids on efficiency of rumen bacterial protein synthesis in continuous culture. *Journal of Dairy Science*, 65: 226-234.
- Cotta, M. und R. Forster, 2006: The family Lachnospiraceae, including the genera *Butyrivibrio*, *Lachnospira* and *Roseburia*. *Prokaryotes*, 4: 1002-1021.
- Crocetti, G., Murto, M. und L. Björnsson, 2006: An update and optimisation of oligonucleotide probes targeting methanogenic Archaea for use in fluorescence in situ hybridisation (FISH). *Journal of Microbiological Methods*, 65: 194-201.
- Czerkawski, J.W. und G. Breckenridge, 1977: Design and development of a long-term rumen simulation technique (Rusitec). *British Journal of Nutrition*, 38:371-384.
- Czerkawski, J. W. und G. Breckenridge, 1979: Experiments with the long-term rumen simulation technique (Rusitec); use of soluble food and inert solid matrix. *British Journal of Nutrition*, 42: 229-245.
- Daims, H., Brühl, A., Amann, R., Schleifer, K.-H. und M. Wagner, 1999: The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria: Development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Systematic and Applied Microbiology*, 22: 434-444.

- Dehority, B.A., 1991: Effects of microbial synergism on fiber digestion in the rumen. *Proceedings of the Nutrition Society*, 50: 149-159.
- Dehority, B.A., 1993: Microbial ecology of cell wall fermentation. In: *Forage Cell Wall Structure and Digestibility*. Jung, H.G., Buxton, D.R., Hatfield, R.D. und J. Ralph. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, USA: 425-453.
- Dehority, B.A., 2003: *Rumen Microbiology*. B.A. Dehority. Nottingham University Press.
- Dehority, B.A., Johnson, R.R. und H.R. Conrad, 1962: Digestibility of forage hemicellulose and pectin by rumen bacteria in vitro and the effect of lignification thereon. *Journal of Dairy Science*, 45: 508-512.
- Dehority, B.A. und C.G. Orpin, 1997: Development of, and natural fluctuations in, rumen microbial populations. In: *The Rumen Microbial Ecosystem*. Hobson, P.N. und C.S. Stewart. Blackie Academic Professional, London, 2. Auflage: 196-245.
- Dehority, B.A. und J.A. Grubb, 1976: Basal medium for the selective enumeration of rumen bacteria utilizing specific energy sources. *Applied and Environmental Microbiology*, 32: 703-710.
- Delong, E.F. und N.R. Pace, 2001: Environmental diversity of Bacteria and Archaea. *Systematic Biology*, 50: 470-478.
- Delong, E.F., Wickham, G.S. und N.R. Pace, 1989: Phylogenetic stains: Ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. *Science*, 243: 1360-1363.
- Delos Reyes, F.L., Ritter, W., und L. Raskin, 1997: Group-specific small-subunit rRNA hybridization probes to characterize filamentous foaming in activated sludge systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 1107-1117.
- De Vos, K., 2008: Cell Counter. University of Sheffield, Academic Neurology.UK. <http://rsb.info.nih.gov/ij/plugins/cell-counter.html>.
- DLG, Deutsche Landwirtschafts-Gesellschaft, 1997: *DLG-Futterwerttabellen Wiederkäuer*. DLG-Verlag, Frankfurt, 7. Auflage.
- Dohrmann, A. und C.C. Tebbe, 2004: Microbial community analysis by PCR-single-strand conformation polymorphism (PCR-SSCP). In: *Molecular Microbial Ecology*, 1. Kowalchuk, G.A., de Bruijn, F.J., Head, I.M., Akkermans, A.D.L. und J.D. van Elsas. Kluwer. Academic Publishers: 809-838.
- Duncan, S.H., Hold, G.L., Barcenilla, A., Stewart, C.S. und H.J. Flint, 2002a: *Roseburia intestinalis* sp. nov., a novel saccharolytic, butyrate-producing bacterium from human faeces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52: 1615-1620.
- Duncan, S.H., Barcenilla, A., Stewart, C.S., Pryde, S.E. und H.J. Flint, 2002b: Acetate utilization and butyryl coenzyme A (CoA): Acetate-CoA transferase in butyrate-producing bacteria from the human large intestine. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 5186-5190.
- Duncan, S.H., Aminov, R.I., Scott, K.P., Louis, P., Stanton, T.B. und H.J. Flint, 2006: Proposal of *Roseburia faecis* sp. nov., *Roseburia hominis* sp. nov. and *Roseburia inulinivorans* sp. nov., based on isolates from human faeces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56: 2437-2441.
- Duval, S.M., McEwan, N.R., Graham, R.C., Wallace, R.J. und C.J. Newbold, 2007: Effect of a blend of essential oil compounds on the colonization of starch-rich substrates by bacteria in the rumen. *Journal of Applied Microbiology*, 103: 2132-2141.
- Ehle, F.R., 1984: Influence of feed particle density on particulate passage from rumen of Holstein cow. *Journal of Dairy Science*, 67: 693-697.

- Ehle, F.R. und M.D. Stern, 1984: Physical and chemical variables influencing particle passage and size reduction. International Workshop on Modelling Ruminant Digestion and Metabolism: 27-33.
- Engelhardt, W. v. und G. Breves, 2000: Physiologie der Haustiere. Enke im Hippokrates Verlag GmbH, Stuttgart, 1. Auflage.
- Eshinimaev, B.T., Medvedkova, K.A., Khmelenina, V.N., Suzina, N.E., Osipov, G.A., Lysenko, A.M. und Y.A. Trotsenko, 2004: New thermophilic methanotrophs of the genus *Methylocaldum*. *Microbiology*, 73: 448-456.
- Fernandez, I., Noziere, P. und B. Michalet-Doreau, 2004: Site and extent of starch digestion of whole-plant maize silages differing in maturity stage and chop length, in dairy cows. *Livestock Production Science*, 89: 147-157.
- Fields, M.W., Russell, J.B. und D.B. Wilson, 1998: The role of ruminal carboxymethylcellulases in the degradation of β -glucans from cereal grain. *FEMS Microbiology Ecology*, 27: 261-268.
- Fields, M.W., Mallik, S. und J.B. Russell, 2000: *Fibrobacter succinogenes* S85 ferments ball-milled cellulose as fast as cellobiose until cellulose surface area is limiting. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54: 570-574.
- Firkins, J.L. und Z. Yu, 2006: Characterisation and quantification of the microbial populations of the rumen. In: Ruminant physiology: Digestion, metabolism and impact of nutrition on gene expression, immunology and stress. Sejrsen, K., Hvelplund, T. und M.O. Nielson. Wageningen Academic Publishers, Netherlands: 19-54.
- Flachowsky, G., Lebzien, P. und E. Strobel, 2003: "Biotechnikum" Pansen – Potenziale und Grenzen. *Züchtungskunde*, 75: 46-65.
- Fleige, S., Walf, V., Huch, S., Prgomet, C., Sehm, J. und M.W. Pfaffl, 2006: Comparison of relative mRNA quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR. *Biotechnology Letters*, 28:1601-1613.
- Fogel, G.B., Collins, C.R., Li, J. und C.F. Brunk, 1999: Prokaryotic genome size and SSU rDNA copy number: estimation of microbial relative abundance from a mixed population. *Microbiology Ecology*, 38, 93-113.
- Fondevila, M. und B.A. Dehority, 1994: Degradation and utilization of forage hemicellulose by rumen bacteria, singly in coculture or added sequentially. *Journal of Applied Bacteriology*, 77: 541-548.
- Forsberg, C.W., Cheng, K.J. und B.A. White, 1997: Polysaccharide degradation in the rumen and large intestine. In: *Gastrointestinal Microbiology*. Mackie, R.I. und B.A. White. Chapman and Hall, New York: 319-379.
- Franks, A.H., Harmsen H.J., Raangs, G.C., Jansen, G.J., Schut, F. und G.W. Welling, 1998: Variations of bacterial populations in human feces measured by fluorescent in situ hybridization with group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 3336-3345.
- GfE, Gesellschaft für Ernährungsphysiologie, 2001: Empfehlungen zur Energie- und Nährstoffversorgung der Milchkühe und Aufzuchttrinder. DLG Verlags GmbH, Frankfurt/Main.
- Giesecke, D. und H.K. Hendrickx, 1973: Biologie und Biochemie der mikrobiellen Verdauung. Giesecke, D. und H.K. Hendrickx. BLV Verlagsgesellschaft, München, Bern, Wien.
- Givens, D.I. und H. Rulquin, 2004: Utilisation by ruminants of nitrogen compounds in silage-based diets. *Animal Feed Science and Technology*, 114: 1-18.

- Glavac, D. und M. Dean, 1993: Optimization of the Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP) Technique for Detection of Point Mutations. *Human Mutation*, 2: 404-414.
- Glöckner, F.O., Amann R.I., Alfreider, A., Pernthaler, J, Psenner R., Trebesius, K. und K.H. Schleifer, 1996: An in situ hybridization protocol for detection and identification of planktonic bacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, 19: 403-406.
- Gonzalez, L. und B.F.J. Manly, 1998: Analysis of variance by randomization with very small data sets. *Environmetrics*, 9: 53-65.
- Gonzalez, J.M., Zimmermann, J. und C. Saiz-Jimenez, 2005: Evaluating putative chimeric sequences from PCR-amplified products. *Bioinformatics*, 21: 333-337.
- Gradel, C.M., und B.A. Dehority, 1972: Fermentation of isolated pectin and pectin from intact forages by pure cultures of rumen bacteria. *Applied Microbiology*, 23: 332-340.
- Griswold, K.E., White, B.A. und R.I. Mackie, 1999: Diversity of extracellular proteolytic activities among *Prevotella* Species from the rumen, *Current Microbiology*, 39: 187-194.
- Großkopf, R., Janssen, P.H. und 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. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 960-969.
- Hanahan, D., 1983: Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 166: 557-580.
- Hannah, S.M., Stern, M.D. und F.R. Ehle, 1986: Evaluation of a dual flow continuous culture system for estimating bacterial fermentation in vivo of mixed diets containing various soya bean products. *Animal Feed Science and Technology*, 16: 51-62.
- Hanson, R.S. und T.E. Hanson, 1996: Methanotrophic Bacteria. *Microbiological Reviews*, 60: 439-471.
- Hespell, R.B., Akin, D.E. und B.A. Dehority, 1996: Bacteria, fungi and protozoa of the rumen. In: *Gastrointestinal Microbiology II*. Mackie, R.I., White, B.A. und R.E. Isaacson. Chapman and Hall, New York: 59-141.
- Heuer, H., Krsek, M., Baker, P., Smalla, K. und E.M.H. Wellington, 1997: Analysis of Actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 3233-3241.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. und R. Watson, 1993: Kinetic PCR analysis-Real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology*, 11: 1026-1030.
- Hildebrand, B., Boguhn, J. und M. Rodehutschord, 2008: Effect of forage source and feed particle size on fermentation rate and efficiency of microbial protein synthesis in a RUSITEC. *Proceedings of the Society of Nutrition Physiology*, 17: 89.
- Hildebrand, unveröffentlicht: Dissertation in Vorbereitung. DFG-Projekt: Einfluss unterschiedlicher Anteile von Silagen in Mischrationen für Wiederkäuer auf die ruminale mikrobielle Gemeinschaft und deren Syntheseleistung in vitro (DFG BO2960/1).
- Hill, J.E., Hemmingsen, S.M., Goldade, B.G., Dumonceaux, T.J., Klassen, J., Zijlstra, R.T., Goh, S.H. und A.G. van Kessel, 2005: Comparison of Ileum Microflora of Pigs Fed Corn-, Wheat-, or Barley-Based Diets by Chaperonin-60 Sequencing and Quantitative PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 867-875.

- Hobson, P.N., 1997: The Rumen Microbial Ecosystem. Hobson, P.N. und C.S. Stewart. Blackie Academic Professional, London, 2. Auflage: 10-72.
- Hönerlage, W., Hahn, D. und J. Zeyer, 1995: Detection of mRNA of nprM in *Bacillus megaterium* ATCC 14581 grown in soil by whole-cell hybridization. *Archives of Microbiology*, 163:235-241.
- Hoover, W.H., Crooker, B.A. und C.J. Sniffen, 1976: Effect of differential solid-liquid removal rates on protozoa numbers in continuous cultures of rumen content. *Journal of Animal Science*, 43: 528-534.
- Hoover, W.H., Kincaid, C.R., Varga, G.A., Thayne, W.V. und L.L. Junkins, 1984: Effect of solids and liquid flows on fermentation in continuous cultures. IV. pH and dilution rate. *Journal of Animal Science*, 58: 692-699.
- Howard, B.H., 1961: Fermentation of pectin by rumen bacteria. *Proceedings of the Nutrition Society*, 20 : XXIX.-XXX.
- Hristova, K.R., Mau, M., Zheng, I.D., Aminov, R.I., Mackie, R.I., Gaskins, H.R. und L. Raskin, 2000: Desulfotomaculum genus- and subgenus-specific 16S rRNA hybridization probes for environmental studies. *Environmental Microbiology*, 2: 143-159.
- Huber, T., Faulkner, G. und P. Hugenholtz, 2004: Bellerophon; a program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments, *Bioinformatics*, 20: 2317-2319.
- Hugenholtz, P., Goebel, B.M. und N.R. Pace, 1998: Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *Journal of Bacteriology*, 180: 4765-4774.
- Hughes, J.B., Hellmann, J.J., Ricketts, T.H. und B.J. Bohannon, 2001: Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 4399-406.
- Hume, I.D., Moir, R.J. und M. Somers, 1970: Synthesis of microbial protein in the rumen I. Influence of the level of nitrogen intake. *Australian Journal for Agriculture Research*, 21: 283-296.
- Itoh, T., 2003: Taxonomy of nonmethanogenic hyperthermophilic and related thermophilic Archaea. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 96: 203-212.
- Jaccard, P., 1901 : Distribution de la flore alpine dans le bassin des Dranses et dans quelques régions voisines. *Bulletin del la Société Vaudoise des Sciences Naturelles*, 37 : 241-272.
- Janssen, P.H. und M. Kirs, 2008: Minireview: Structure of the archaeal community of the rumen. *Applied and Environmental Microbiology*, 74: 3619-3625.
- Jeroch, H., Drochner, W. und O. Simon, 1999: Ernährung landwirtschaftlicher Nutztiere. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart.
- Jung, H.G. und M.D. Casler, 2006: Maize stem tissues: cell wall concentration and composition during development. *Crop Science*, 46: 1793-1800.
- Kim, J.B. und N.C. Carpita, 1992: Changes in esterification of the uronic acid groups of cell wall polysaccharides during elongation of maize coleoptiles. *Plant Physiology*, 98: 646-653.
- Knox, J.P., Linstead, P.J., King, J., Cooper, C. und K. Roberts, 1990: Pectin esterification is spatially regulated both within cell walls and between developing tissues of root apices. *Planta*, 181: 512-521.
- Koch, M., Strobel, E., Tebbe, C.C., Heritage, J., Breves, G. und K. Huber, 2006: Transgenic maize in the presence of ampicillin modifies the metabolic profile and microbial pulation structure of bovine rumen fluid in vitro. *British Journal of Nutrition*, 96: 820-829.

- Kocherginskaya, S.A., Rustam, I.A. und A.W. Bryan, 2001: Analysis of the rumen bacterial diversity under two different diet conditions using denaturing gradient gel electrophoresis, random sequencing and statistical ecology approaches. *Anaerobe*, 7: 119-134.
- Koike, S. und Y. Kobayashi, 2001: Development and use of competitive PCR assays for the rumen cellulolytic bacteria: *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* and *Ruminococcus flavefaciens*. *FEMS Microbiology Letters*, 204: 361-366.
- Koike, S., Pan, J., Kobayashi, Y. und K. Tanaka, 2003a: Kinetics of in sacco fiber-attachment of representative ruminal cellulolytic bacteria monitored by competitive PCR. *Journal of Dairy Science*, 86: 1429-1435.
- Koike, S., Yoshitani, S., Kobayashi, Y. und K. Tanaka, 2003b: Phylogenetic analysis of fiber-associated rumen bacterial community and PCR detection of uncultured bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 229: 23-30.
- Koike, S., Yabuki, H. und Y. Kobayashi, 2007: Validation and application of real-time polymerase chain reaction assays for representative rumen bacteria. *Animal Science Journal*, 78: 135-141.
- Kolattukudy, P.E., 1985: Enzymatic penetration of the plant cuticle by fungal pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 23: 223-250.
- Krause, K.M., Combs, D.K. und K.A. Beauchemin, 2002: Effects of forage particle size and grain fermentability in midlactation cows. II. Ruminal pH and chewing activity. *Journal of Dairy Science*, 85: 1947-1957.
- Krishnamoorthy, U., Muscato, T.V., Sniffen, C.J. und P. J. van Soest, 1982: Nitrogen fractions in selected feedstuffs. *Journal of Dairy Science*, 65: 217-225.
- Kruskal, J.B., 1964a: Multidimensional scaling by optimizing goodness of fit to a nonmetric hypothesis. *Psychometrika*, 29: 1-27.
- Kruskal, J.B., 1964b: Nonmetric Multidimensional Scaling: A Numerical Method. *Psychometrika*, 29: 115-129.
- Kurihara, M., Shibata, M., Nishida, T., Purnomoadi, A. und F. Terada, 1997: Methane production and its dietary manipulation in ruminants. In: *Rumen microbes and digestive physiology in ruminants*. Onodera, R., Itabashi, H., Ushida, K., Yano, H. und Y. Sasaki. Japan Scientific Societies Press, Tokyo: 199-208.
- Lane, D.J., 1991: 16S/23S rRNA sequencing. In: *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. Stackebrandt, E. und M. Goodfellow. Chichester: Wiley & Sons: 115-175.
- Latham, M.J., Brooker, B.E., Pettipher, G.L. und P.J. Harris, 1978: Adhesion of *Bacteroides succinogenes* in pure culture and in the presence of *Ruminococcus flavefaciens* to cell wall in leaves of perennial ryegrass (*Lolium perenne*). *Applied and Environmental Microbiology*, 35: 1166-1173.
- Lentz, E.M., und D.R. Buxton, 1992: Digestion kinetics of orchardgrass as influenced by leaf morphology, fineness of grind, and maturity group. *Crop Science*, 32: 482.
- Leser, T.D., Amenuvor, J.Z., Jensen, T.K., Lindecrona, R.H., Boye, M. und K. Møller, 2002: Culture-independent analysis of gut bacteria: the pig gastrointestinal tract microbiota revisited. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 673-690.
- Leyer, I. und K. Wesche, 2007: *Multivariate Statistik in der Ökologie*. Springer-Verlag Berlin/Heidelberg/New York: 57-152.
- Li, M., Wang, B., Zhang, M., Rantalainen, M., Wang, S., Zhou, H., Zhang, Y., Shen, J., Pang, X., Zhang, M., Wei, H., Chen, Y., Lu, H., Zuo, J., Su, M., Qiu, Y., Jia, W., Xiao, C., Smith, L.M., Yang, S., Holmes, E., Tang, H., Zhao, G., Nicholson, J.K., Li, L. und L. Zhao, 2008: Symbiotic gut microbes modulate human

- metabolic phenotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105: 2117-2122.
- Lieber, A., Kiesel, B. and W. Babel, 2003: Microbial diversity analysis of soil by SSCP fingerprinting technique using TGGE Maxi System. In: *Prozessregulation in der Wurzelsphäre*. 13. Borkheider Seminar zur Ökophysiologie des Wurzelraumes. Hrsg. W. Merbach, B.W. Hütsch, J. Augustin, B.G. Teubner - Stuttgart Leipzig Wiesbaden: 61-65.
- Lieber, A., 2005: Der Einfluss von O,O-Diethyl-O-3,5,6-trichlor-2-pyridylphosphorothioat auf die Bakteriozönose einer Ackerbrache. Dissertation, Leipzig, Deutschland.
- Loy, A., Lehner, A., Lee, N., Adamczyk, J., Meier, H., Ernst, J., Schleifer, K.-H. und M. Wagner, 2002: Oligonucleotide microarray for 16S rRNA gene-based detection of all recognized lineages of sulfate-reducing prokaryotes in the environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 5064-5081.
- Ludwig, W. und K.H. Schleifer, 1994: Bacterial phylogeny based on 16S and sequence analysis. *FEMS Microbiology Reviews*, 15: 155-173.
- Ludwig, W., Strunk, O., Westram, R., Richter, L. Meier, H., Yadhukumar, Buchner, A., Lai, T., Steppi, S., Jobb, G., Förster, W., Brettske, I., Gerber, S., Ginhart, A.W., Gross, O., Grumann, S., Hermann, S., Jost, R., König, A., Liss, T., Lüßmann, R., May, M., Nonhoff, B., Reichel, B., Strehlow, R., Stamatakis, A., Stuckmann, N., Vilbig, A., Lenke, M., Ludwig, T., Bode, A. und K.H. Schleifer, 2004: ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Research*, 32: 1363-1371.
- Macalady, J.L., Lyon, E.H., Koffman, B., Albertson, L.K., Meyer, K., Galdenzi, S. und S. Mariani, 2006: Dominant microbial populations in limestone-corroding stream biofilms, Frasassi cave system, Italy. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 5596-5609.
- Mackie, R.I., McSweeney, C.S. und R.I. Aminov, 2001: Rumen. In: *Encyclopedia of Life Sciences*. Nature Publishing Group: John Wiley & Sons. www.els.net.
- Madigan, M.T. und J.M. Martinko, 2006: *Brock Mikrobiologie*. 11. Pearson Studium, Pearson Education Deutschland, 11. Auflage.
- Maekawa, M., K. A. Beauchemin und D.A. Christensen, 2000: Effect of concentrate level and feeding management on chewing activities, saliva production, and ruminal pH of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 85: 1165-1175.
- Manly, B.F.J., 1997: *Randomization, bootstrap and Monte Carlo methods in biology*. Chapman und Hall, London.
- Mannarelli, B.M., Ericsson, L.D., Lee, D. und R.J. Stack, 1991: Taxonomic relationships among strains of the anaerobic bacterium *Bacteroides rumenicola* determined by DNA and extracellular polysaccharide analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 57: 2975-2980.
- Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Wagner, M. und K.-H. Schleifer, 1992: Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of Proteobacteria: problems and solutions. *Systematic and Applied Microbiology*, 15: 593-600.
- Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Vancanneyt, M. und K.-H. Schleifer, 1996: Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum cytophaga-flavobacter-bacteroides in the natural environment. *Microbiology-Uk*, 142: 1097-1106.
- Martin, C., Millet, L., Fonty, G. und B. Michalet-Doreau, 2001: Cereal supplementation modified the fibrolytic activity but not the structure of the cellulolytic bacterial

- community associated with rumen solid digesta. *Reproduction, Nutrition, Development*, 41: 413-424.
- Matsui, H., Ogata, K., Tajima, K., Nakamura, M., Nagamine, T., Aminov, R.I. und Y. Benno, 2000: Phenotypic characterization of polysaccharidases produced by four *Prevotella* type strains. *Current Microbiology*, 41: 45-49.
- McAllan, A.B., Sutton, J.D., Beever, D.E. und D.J. Napper, 1994: Rumen fermentation characteristics and duodenal nutrient flow in lactating cows receiving two types of grass silage with two levels of concentrates. *Animal Feed Science and Technology*, 46: 277-291.
- McAllister, T.A., Cheng, K.J., Rode, L.M. und C.W. Forsberg, 1990: Digestion of barley, maize, and wheat by selected species of ruminal bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 56: 3146-3153.
- McArdle, B.H. und M.J. Anderson, 2001: Fitting multivariate models to community data: a comment on distance-based redundancy analysis. *Ecology*, 82: 290-297.
- McDougall, E.I., 1948: Studies on ruminant saliva, 1. The composition and output of sheep's saliva. *Biochemical Journal*, 43: 99-109.
- Meier, H., Amann, R., Ludwig, W. und K.-H. Schleifer, 1999: Specific oligonucleotide probes for in situ detection of a major group of gram-positive bacteria with low DNA G+C content. *Systematic and Applied Microbiology*, 22: 186-196.
- Merry, R.J., Smith, R.H. und A.B. McAllan, 1987: Studies of rumen function in an in vitro continuous culture system. *Archive of Animal Nutrition*, 37: 475-488.
- Mesarch, M.B., Nakatsu, C.H. und L. Nies, 2000: Development of Catechol-2,3-Dioxygenase-specific primers for monitoring bioremediation by competitive quantitative PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 678-683.
- Miller, T.L. und M.J. Wolin, 1985: *Methanosphaera stadtmaniae* gen. nov., sp. nov.: a species that forms methane by reducing methanol with hydrogen *Archives of Microbiology*, 141:116-122.
- Miura, H., Horiguchi, M. und T. Matsumoto, 1980: Nutritional interdependence among rumen bacteria, *Bacteroides aminophilus*, *Megasphaera elsdenii*, and *Ruminococcus albus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 40: 294-300.
- Miyazaki, K., Martin, J.C., Marinsek-Logar, R. und H.J. Flint, 1997: Degradation and utilization of xylans by the rumen anaerobe *Prevotella bryantii*. *Anaerobe*, 3: 373-381.
- Monteiro, L., Bonnemaïson, D., Verkis, A., Petry, K.G., Bonnet, J., Vidal, R., Cabrita, J. und F. Megraud, 1997: Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: *Helicobacter pylori* model. *Journal of Clinical Microbiology*, 35: 995-998.
- Morris, E.J. und van Gylswyk, N.O, 1980: Comparison of the action of rumen bacteria on cell walls of *Eragrostis tef*. *Journal of Agricultural Science*, 95: 313-323.
- Morris, E.J. und O.J. Cole, 1987: Relationship between cellulolytic activity and adhesion to cellulose in *Ruminococcus albus*. *Journal of General Microbiology*, 133: 1023-1032.
- Morrison, I.M., 1980: Changes in the lignin and hemicellulose concentrations of ten varieties of temperate grasses with increasing maturity. *Grass and Forage Science*, 35: 287-293.
- Mosimanyana, B.M. und D.N. Mowat, 1992: Rumen protection of heat-treated soybean proteins. *Canadian Journal of Animal Science*, 72: 71-81.
- Mosoni, P., Chaucheyras-Durand, F., Bera-Maillet, C. und E. Forano, 2007: Quantification by real-time PCR of cellulolytic bacteria in the rumen of sheep after supplementation of a forage diet with readily fermentable carbohydrates: effect of a yeast additive. *Journal of Applied Microbiology*, 103: 2676-2685.

- Moter, A. und U.B. Göbel, 2000: Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, 41: 85-112.
- Mrazek, J., Tepsic, K., Avgustin, G. und J. Kopečný, 2006: Diet-dependent shifts in ruminal butyrate-producing bacteria. *Folia Microbiologica*, 51: 294-298.
- Mühlhardt, C., 2003: *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*. 4. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg/Berlin.
- Muyzer G., De Waal, E.C. und A.G. Uitterlinden, 1993: Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 59: 695-700.
- Muyzer, G. und K. Smalla, 1998: Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*, 73: 127-141.
- Naumann, C. and R. Bassler, 1976: *VDLUFA-Methodenbuch*, Vol. III. Die chemische Untersuchung von Futtermitteln. Loose leaflet collection with supplements from 1983, 1988, 1993, and 1997. VDLUFA-Verlag, Darmstadt.
- Nicholson, M.J., Evans, P.N. und K.N. Joblin, 2007: Analysis of methanogen diversity in the rumen using temporal temperature gradient gel electrophoresis: identification of uncultured methanogens. *Microbial Ecology*, 54: 141-150.
- Oba, M. und M.S. Allen, 2003: Effects of diet fermentability on efficiency of microbial nitrogen production in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 86:195-207.
- Odenyo, A.A., Mackie, R.I., Stahl, D.A. und B.A. White, 1994: The use of 16S rDNA-targeted oligonucleotide probes to study competition between ruminal fibrolytic bacteria: development of probes for *Ruminococcus* species and evidence for bacteriocin production. *Applied and Environmental Microbiology*, 60: 3688-3696.
- Oksanen, J., 2008: *Multivariate Analysis of Ecological Communities in R: vegan Tutorial*. URL <http://cc.oulu.fi/~jarioksa/opetus/metodi/vegantutor.pdf>.
- Ölschläger, V., 2007: *Molekularbiologische und enzymatische Untersuchungen zum Einfluss von Partikellänge und Konzentratanteil auf Parameter der fibrolytischen Pansenverdauung*. Dissertation, Stuttgart/Hohenheim, Deutschland.
- Olsen, G.J., Lane, D.J., Giovannoni, S.J., Pace, N.R. und D.A. Stahl, 1986: Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Annual Review of Microbiology*, 40: 337-365.
- Orpin, C.G. und K.N. Joblin, 1997: The rumen anaerobic fungi. In: *The Rumen Microbial Ecosystem*. Hobson, P.N. und C.S. Stewart. Blackie Academic Professional, London, 2. Auflage: 140-196.
- Orsini, M. und V. Romano-Spica, 2001: A microwave-based method for nucleic acid isolation from environmental samples. *Letters in Applied Microbiology*, 33: 17-20.
- Osaki, M., Shinano, T. und T. Tadano, 1991: Redistribution of carbon and nitrogen compounds from the shoot to the harvesting organs during maturation in field crops. *Soil Science and Plant Nutrition*, 37: 117-128.
- Osborne, J.M. und B.A. Dehority, 1989: Synergism in degradation and utilization of intact forage cellulose, hemicellulose, and pectin by three pure cultures of ruminal bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 55: 2247-2250.
- Oshima, M. und P. McDonald, 1978: A review of the changes in nitrogenous compounds of herbage during ensilage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 29: 491-505.

- Overton, T.R., Cameron, M.R., Elliot, J.P. und J.H. Clark, 1995: Ruminant fermentation and passage of nutrients to the duodenum of lactating cows fed mixtures of corn and barley. *Journal of Dairy Science*, 78: 1981-1998.
- Ozutsumi, Y., Tajima, K., Takenaka, A. und H. Itabashi, 2005: The effect of protozoa on the composition of rumen bacteria in cattle using 16S rRNA gene clone libraries. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 69: 499-506.
- Park, D.S., Oh, H.W., Jeong, W.J., Kim, H., Park, H.Y. und K.S. Bae, 2007: A culture-based study of the bacterial communities within the guts of nine longicorn beetle species and their exo-enzyme producing properties for degrading xylan and pectin *The Journal of Microbiology*, 45: 394-401.
- Parracho, H.M.R.T., Bingham, M.O., Gibson, G.R. und A.L. McCartney, 2005: Differences between the gut microflora of children with autistic spectrum disorders and that of healthy children. *Journal of Medical Microbiology*, 54: 987-991.
- Patterson, H.A., Irvin, R., Costerton, J.W. und K.J. Cheng, 1975: Ultrastructure and adhesion properties of *Ruminococcus albus*. *Journal of Bacteriology*, 122: 278-287.
- Pernthaler, A., Pernthaler, J. und R. Amann, 2002: Fluorescence in situ hybridization and catalyzed reporter deposition for the identification of marine bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 3094-3101.
- Pernthaler, J., Pernthaler, A. und R. Amann, 2003: Automated enumeration of groups of marine picoplankton after fluorescence in situ hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 2631-2637.
- Pernthaler, A. und J. Pernthaler, 2004: Sensitive multi-color fluorescence in situ hybridization for the identification of environmental microorganisms. In: *Molecular Microbial Ecology Manual*, 1. Kowalchuk, G.A., de Bruijn, F.J., Head, I.M., Akkermans, A.D.L. und J.D. van Elsas. Kluwer Academic Publishers: 711-725.
- Pfaffl, M.W., 2001: A new mathematical model for relative quantification in real-time-RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29: 2002-2007.
- Pittman, K.A., Lakshmanan, S. and M.P. Bryant, 1967: Oligopeptide uptake by *Bacteroides ruminicola*. *Journal of Bacteriology*, 93: 1499-1508.
- Polz, M.F. und C.M. Cavanaugh, 1998: Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 3724-3730.
- Powell, H.A., Gooding, C.M., Garrett, S.D., Lund, B.M. und R.A. McKee, 1994: Proteinase inhibition of the detection of *Listeria monocytogenes* in milk using the polymerase chain reaction. *Letters in Applied Microbiology*, 18: 59-61.
- Pruesse, E., Quast, C., Knittel, K., Fuchs, B.M., Ludwig, W.G., Peplies, J. und F.O. Glöckner, 2007: SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Research*, 35: 7188-7196.
- Qiu, X., Wu, L., Huang H., McDonel, P.E., Palumbo, A.V., Tiedje, J.M. und J. Zhou, 2001: Evaluation of PCR-generated chimeras, mutations, and heteroduplexes with 16S rRNA gene-based cloning. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 880-887.
- R Development Core Team, 2008: R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org>.
- Rasband, W.S., 1997-2008: ImageJ. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA. <http://rsb.info.nih.gov/ij/>.

- Raskin, L., Stromley, J.M., Rittmann, B.E. und D.A. Stahl, 1994: Group specific 16S rRNA hybridization probes to describe natural communities of methanogens. *Applied and Environmental Microbiology*, 60: 1232-1240.
- Rasmussen, R., 2001: Quantification on the LightCycler. In: *Rapid Cycle Realtime PCR, Methods and Applications*. Meuer, S., Wittwer, C. und K. Nakagawara. Springer Press, Heidelberg: 21-34.
- Reeves, J.B., 1987: Lignin and fiber compositional changes in forages over a growing season and their effects on in vitro digestibility. *Journal of Dairy Science*, 70: 1583-1594.
- Rinne, M., Jaakkola, S. und P. Huhtanen, 1997: Grass maturity effects on cattle fed silage-based diets. 1. Organic matter digestion, rumen fermentation and nitrogen utilization. *Animal Feed Science Technology*, 67: 1-17.
- Rodríguez-Prado, M., Calsamiglia, S. und A. Ferret, 2004: Effects of fiber content and particle size of forage on the flow of microbial amino acids from continuous culture fermenters. *Journal Dairy Science*, 87: 1413-1424.
- Ruiz, T.R., Andrews, S. und G.B. Smith, 2000: Identification and characterization of nuclease activities in anaerobic environmental samples. *Canadian Journal of Microbiology*, 46: 736-740.
- Russell, J.B., 1985: Fermentation of cellodextrins by cellulolytic and non-cellulolytic rumen bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 49: 572-576.
- Russell, J.B. und Wilson, 1996: Why are ruminal cellulolytic bacteria unable to digest cellulose at low pH? *Journal of Dairy Science*, 79: 1513-1509.
- Russell, J.B. und R.J. Wallace, 1997: Energy yielding and energy-consuming reactions. In: *The Rumen Microbial Ecosystem*. Hobson, P.N. und C.S. Stewart. Blackie Academic Professional, London, 2. Auflage: 246-282.
- Russell, J.B., O'Connor, J.D., Fox, D.G., van Soest, P.J. und C.J. Sniffen, 1992: A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. Ruminal fermentation. *Journal of Animal Science*, 70: 3551-3561.
- Sambrook, J., 2001: Isolation of DNA Fragments from Polyacrylamide Gels by the Crush and Soak Method. In: *Molecular cloning: a laboratory manual*. Sambrook, J. und D.W. Russell. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York: 5.51-5.54.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und T. Maniatis, 1989: *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.
- Sandaa, R.A., Enger, O. und V. Torsvik, 1998: Rapid method for fluoremetric quantification of DNA in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 30: 265-268.
- Sanger, F., Nicklen, S. und A.R. Coulson, 1977: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74: 5463-5467.
- Sawayama, S., Tada, C., Tsukahara, K. und T. Yagishita, 2004: Effect of ammonium addition on methanogenic community in fluidized bed anaerobic digestion. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 97: 65-70.
- Schmalenberger, A., Schwieger, F. und C.C. Tebbe, 2001: Effect of primers hybridizing to different evolutionarily conserved regions of the small-subunit rRNA gene in PCR-based microbial community analyses and genetic profiling. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 3557-3563.
- Schmalenberger, A. und C.C. Tebbe, 2003: Bacterial diversity in maize rhizospheres: conclusions on the use of genetic profiles based on PCR-amplified partial small subunit rRNA genes in ecological studies. *Molecular Ecology*, 12: 251-262.
- Schönheit, P. und T. Schäfer, 1995: Metabolism of hyperthermophiles. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 11: 26-57.

- Schwieger, F. und C.C. Tebbe, 1998: A new approach to utilize PCR-single-strand-conformation polymorphism for 16S rRNA gene-based microbial community analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 4870-4876.
- Seghers, D., Top, E.M., Reheul, D., Bulcke, R., Boeckx, P., Verstraete, W. und S.D. Siciliano, 2003: Long-term effects of mineral versus organic fertilizers on activity and structure of the methanotrophic community in agricultural soils. *Environmental Microbiology*, 5: 867-877.
- Seibold, A., 2002: Strukturelle und funktionelle Analysen von Bakterienpopulationen mit Hilfe der PCR-SSCP in sechs unterschiedlichen Modellböden. Dissertation, Aachen, Deutschland.
- Sekar, R., Pernthaler, A., Pernthaler, J., Warnecke, F., Posch, T. und R.I. Amann, 2003: An improved protocol for quantification of freshwater Actinobacteria by fluorescence in situ hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 2928-2935.
- Sharp, R., Ziemer, C.J., Stern, M.D. und D.A. Stahl, 1998: Taxon-specific associations between protozoal and methanogen populations in the rumen and a model rumen system. *FEMS Microbiology Ecology*, 36: 71-78.
- Shepard, R.N., 1962a: The analysis of proximities: Multidimensional scaling with an unknown distance function. I. *Psychometrika*, 27: 125-139.
- Shepard, R.N., 1962b: The analysis of proximities: Multidimensional scaling with an unknown distance function. II. *Psychometrika*, 27: 219-246.
- Shinkai, T. und Y. Kobayashi, 2007: Localization of ruminal cellulolytic bacteria on plant fibrous materials as determined by fluorescence in situ hybridization and real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 1646-1652.
- Singleton, D.R., Hendrix, P.F., Coleman, D.C. und W.B. Whitman, 2003: Identification of uncultured bacteria tightly associated with the intestine of the earthworm *Lumbricus rubellus* (Lumbricidae; Oligochaeta). *Soil Biology & Biochemistry*, 35: 1547-1555.
- Skillman, L.C., Evans, P.N., Strömpl, C. und K.N. Joblin, 2006: 16S rDNA directed PCR primers and detection of methanogens in the bovine rumen. *Letters in Applied Microbiology*, 42: 222-228.
- Sleat, R. und R.A. Mah, 1985: *Clostridium populeti* sp. nov., a cellulolytic species from a woody-biomass digester. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 35: 160-163.
- Smith, L.W., Weinland, B.T., Waldo, D.R. und E.C. Leffel, 1983: Rate of plant cell wall particle size reduction in the rumen. *Journal of Dairy Science*, 66: 2124-2136.
- Smith, C.J., Nedwell, D.B., Dong, L.F. und A.M. Osborn, 2006: Evaluation of quantitative polymerase chain reaction-based approaches for determining gene copy and gene transcript numbers in environmental samples. *Environmental Microbiology*, 8: 804-815.
- Smith, C.J. und M. Osborn, 2009: Advantages and limitations of quantitative PCR(Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology*, 67: 6-20.
- Sniffen, C.J., O'Connor, J.D., van Soest, P.J., Fox, D.G. und J.B. Russell, 1992: A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. *Journal of Animal Science*, 70: 3562-3577.
- Soliva, C.R., Meile, L., Cieslak, A., Kreuzer, M. und A. Machmüller, 2004a: Rumen simulation technique study on the interactions of dietary lauric and myristic acid supplementation in suppressing ruminal methanogenesis. *British Journal of Nutrition*, 92: 689-700.

- Soliva, C.R., Meile, L., Hindrichsen, I.K., Kreuzer, M. und A. Machmüller, 2004b: Myristic acid supports the immediate inhibitory effect of lauric acid on ruminal methanogens and methane release. *Anaerobe*, 10: 269-276.
- Stackebrandt, E. und B.M. Göbel, 1994: Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44: 846-849.
- Stahl, D.A., Flesher, B., Mansfield, H.R. und L. Montgomery, 1988: Use of phylogenetically based hybridization probes for studies of ruminal microbial ecology. *Applied and Environmental Microbiology*, 54: 1079-1084.
- Stahl, D.A., und R. Amann, 1991: Development and application of nucleic acid probes. In: *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. Stackebrandt, E. und M. Goodfellow (eds). Chichester: Wiley & Sons: 205-248.
- Stanton, T.B. und D. Savage, D. C., 1983: *Roseburia cecicola* gen. nov., sp. nov., a motile, obligately anaerobic bacterium from a mouse cecum. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 33: 618-627.
- Stern, M.D. und W.H. Hoover, 1979: Methods for determining and factors affecting rumen microbial protein synthesis: A review. *Journal of Animal Science*, 49:1590-1603.
- Stern, M.D., Varga, G.A., Clark, J.H., Firkins, J.L., Huber, J.T. und D.L. Palmquist, 1994: Symposium: Metabolic relationship in supply of nutrients for milk protein synthesis: Evaluation of chemical and physical properties of feeds that affect protein metabolism in the rumen. *Journal of Dairy Science*, 77: 2762-2786.
- Stevenson, D.M. und P.J. Weimer, 2007: Dominance of *Prevotella* and low abundance of classical ruminal bacterial species in the bovine rumen revealed by relative quantification real-time PCR: *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75: 165-174.
- Stewart, C.S., Flint, H.J. und M.P. Bryant, 1997: The rumen bacteria. In: *The Rumen Microbial Ecosystem*. Hobson, P.N. und C.S. Stewart. Blackie Academic Professional, London, 2. Auflage: 10-72.
- Strobel, E., Wesolowski, J., Flachowsky, G. und C.C. Tebbe, 2004: Genetic profiles of rumen microbial communities: A cultivation independent technique to study the effect of feeding. *Proceedings of the Society of Nutrition Physiology*, 13: 81.
- Strobel, E., Neumann, D., Boguhn, J., Helm, A., Dännicke, S., Meyer, U. und C.C. Tebbe, 2007: Impact of *Fusarium*-contaminated triticale in total mixed rations for dairy cows on the microbial communities from rumen in vitro (RUSITEC). *Proceedings of the Society of Nutrition Physiology*, 16: 80.
- Strobel, E., Seeling, K. und C.C. Tebbe, 2008: Diversity responses of rumen microbial communities to *Fusarium*-contaminated feed, evaluated with rumen simulating technology. *Environmental Microbiology*, 10: 483-496.
- Stults, J.R., Snoeyenbos-West, O., Methe, B., Lovley, D.R. und D.P. Chandler, 2001: Application of the 50 fluorogenic exonuclease assay (TaqMan) for quantitative ribosomal DNA and rRNA analysis in sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 2781-2789.
- Sun, Y.Z., Mao, S.Y., Yao, W. und W.Y. Zhu, 2008: DGGE and 16S rDNA analysis reveals a highly diverse and rapidly colonising bacterial community on different substrates in the rumen of goats. *Animal*, 2: 391-398.
- Tajima, K., Aminov, R.I., Nagamine, T., Ogata, K., Nakamura, M., Matsui, H. und Y. Benno, 1999: Rumen bacterial diversity as determined by sequence analysis of 16S rDNA libraries. *FEMS Microbiology Ecology*, 29: 159-169.

- Tajima, K., Arai, S., Ogata, K., Nagamine, T., Matsui, H., Nakamura, M., Aminov, R.I. und Y. Benno, 2000: Rumen bacterial community transition during adaptation to high-grain diet. *Anaerobe*, 6: 273-284.
- Tajima, K., Nagamine, T., Matsui, H., Nakamura, M. und R.I. Aminov, 2001a: Phylogenetic analysis of archaeal 16S rRNA libraries from the rumen suggests the existence of a novel group of Archaea not-associated with known methanogens. *FEMS Microbiology Letters*, 200: 67-72.
- Tajima, K., Aminov, R.I., Nagamine, T., Matsui, H., Nakamura, M. und Y. Benno, 2001b: Diet-dependent shifts in the bacterial population of the rumen revealed with real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 2766-2774.
- Tamminga, S., 1998: Influence of feeding management on ruminant fiber digestibility. In: *Forage Cell Wall Structure and Digestibility*. Jung, H.G., Buxton, D.R., Hatfield, R.D. und J. Ralph. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, USA: 571-602.
- Tatsuoka, N., Mohammed, N., Mitsumori, M., Tajima, K., Hara, K., Kurihara, M. und H. Itabashi, 2007: Analysis of methanogens in the bovine rumen by polymerase chain reaction single-strand conformation polymorphism. *Animal Science Journal*, 78: 512-518.
- Theander, O. und E. Westerlund, 1998: Quantitative analysis of cell wall components. In: *Forage cell wall structure and digestibility*. Jung, H.G., Buxton, D.R., Hatfield, R.D. und J. Ralph. American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc., Soil Science Society of America, Inc., Madison, Wisconsin, USA: 83-104.
- Tokura, M., Chagan, I., Ushida, K. und Y. Kojima, 1999: Phylogenetic study of methanogens associated with rumen ciliates. *Current Microbiology*, 39: 123-128.
- Uz, I. und A.V. Ogram, 2006: Cellulolytic and fermentative guilds in eutrophic soils of the Florida Everglades. *FEMS Microbiology Ecology*, 57: 396-408.
- Van Es, A.J.H., 1978: Feed evaluation for ruminants. I. The systems in use from May 1977 onwards in the Netherlands. *Livestock Production Science*, 5: 331-345.
- Van Gylswyk, N.O., 1990: Enumeration and presumptive identification of some functional groups of bacteria in the rumen of dairy cows fed grass silage-based diets. *FEMS Microbiology Ecology*, 73: 243-254.
- Van Gylswyk, N.O. und J.J.T.K. van der Toorn, 1985: *Eubacterium uniforme* sp. nov. and *Eubacterium xylanophilum* sp. nov., fiber-digesting bacteria from the rumina of sheep fed corn stover. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 35: 323-326.
- Vantchev, Z.M., Pradhan, K. und R.W. Hemken, 1970: Rumen methanol in vivo and in vitro. *Journal of Dairy Science*, 53: 1511-1514.
- Varga, G.A. und E.S. Kolver, 1997: Microbial and animal limitations to fiber digestion and utilization. *Journal of Nutrition*, 127 (Suppl. 5): 819S-823S.
- VDLUFA (Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten), 1988: *VDLUFA-Methodenbuch*, 2. Ergänzung 1988, Methode 6.5.1.
- VDLUFA (Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten), 1993: *VDLUFA-Methodenbuch*, 3. Ergänzung 1993, Methode 6.5.2.
- Von Wintzingerode, F., Gobel, U.B. und E. Stackebrandt, 1997: Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiology Reviews*, 21: 213-229.

- Walker, A.W., Duncan, S.H., Harmsen, H.J.M., Holtrop, G., Welling, G.W. und H.J. Flint, 2008: The species composition of the human intestinal microbiota differs between particle-associated and liquid phase communities. *Environmental Microbiology*, 10: 3275-3283.
- Wallace, R.J., 1985: Synergism between different species of proteolytic rumen bacteria. *Current Microbiology*, 12: 59-64.
- Wallace, R.J., 1996: The proteolytic system of ruminal microorganisms. *Annales de Zootechnie*, 45 (Suppl. 1): 301-308.
- Wallace, R.J., McKain, N. und G.A. Broderick, 1993: Breakdown of different peptides by *Prevotella* (*Bacteroides*) *ruminicola* and mixed microorganisms from the sheep rumen. *Current Microbiology*, 26: 333-336.
- Wallace, R.J., Chaudhary, L.C., McKain, N., McEwan, N.R., Richardson, A.J., Vercoe, P.E., Walker, N.D. und D. Paillard, 2006: *Clostridium proteoclasticum*: a ruminal bacterium that forms stearic acid from linoleic acid. *FEMS Microbiology Letters*, 265: 195-201.
- Wang, R.F., Cao, W.W. und C.E. Cerniglia, 1997: PCR detection of *Ruminococcus* spp. in human and animal faecal samples. *Molecular and Cellular Probes*, 11: 259-265.
- Weimer, P.J., 1993: Microbial and molecular mechanisms of cell wall degradation-session synopsis. In: *Forage Cell Wall Structure and Digestibility*. Jung, H.G., Buxton, B.R., Hartfield, R.D. und J. Ralph. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, USA: 485-498.
- Weimer, P.J., 1996: Why don't ruminal bacteria digest cellulose faster? *Journal of Dairy Science*, 79: 1496-1502.
- Weimer, P.J., Lopez-Guisa, J.M. und A.D. French, 1990: Effect of cellulose fine structure on kinetics of its digestion by mixed ruminal microorganisms in vitro. *Applied and Environmental Microbiology*, 56: 2421-2429.
- Weimer, P.J., Waghorn, G.C., ODT, C.L. und D.R. Mertens, 1999: Effect of diet on populations of three species of ruminal cellulolytic bacteria in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 82: 1221-1234.
- Wessendorf, M.W., Brelje, T.C., 1992: Which fluorophore is the brightest? A comparison of the staining obtained using fluorescein, tetramethylrhodamine, lissamine rhodamine, Texas Red, and cyanine 3.18. *Histochemistry*, 98: 81-85.
- Whitford, M.F., Forster, R.J., Beard, C.E., Gong, J.H. und R.M. Teather, 1998: Phylogenetic analysis of rumen bacteria by comparative sequence analysis of cloned 16S rRNA genes. *Anaerobe*, 4: 153-163.
- Whitford, M.F., Teather, R.M. und R. J. Forster, 2001: Phylogenetic analysis of methanogens from the bovine rumen. *BMC Microbiology*, 1: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/1/5>.
- Williams, A.G. und N.H. Stachan, 1984: The distribution of polysaccharide-degrading enzymes in the bovine rumen digesta ecosystem. *Current Microbiology*, 10: 215-220.
- Williams, A.G., Joblin, K.N. und G. Fonty, 1994: Interactions between the rumen chytrid fungi and other microorganisms. In: *Anaerobic Fungi*. Mountford, D.O. und C.G. Orpin. Marcel Dekker, Inc., New York: 191-228.
- Williams, A.G. und G.S. Coleman, 1997: The rumen protozoa. In: *The Rumen Microbial Ecosystem*. Hobson, P.N. und C.S. Stewart. Blackie Academic Professional, London, 2. Auflage: 73-139.
- Wilson, J.R., 1993: Organization of forage plant tissues. In: *Forage Cell Wall Structure and Digestibility*. Jung, H.G., Buxton, B.R., Hartfield, R.D. und J. Ralph. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, USA: 1-32.

- Woese C.R., 1987: Bacterial Evolution. *Microbiological Reviews*, 51: 221-271.
- Wolin, M.J., Miller, T.L. und C.S. Stewart, 1997: Microbe-microbe interactions. In: *The Rumen Microbial Ecosystem*. Hobson, P.N. und C.S. Stewart. Blackie Academic Professional, London, 2. Auflage: 467-491.
- Wright, D.E., 1961: Bloat in Cattle. XIX. The metabolism of pectin by rumen microorganisms. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 4: 203-215.
- Wright, A.D.G., Williams, A.J., Winder, B., Christophersen, C.T., Rodgers, S.L. und K.D. Smith, 2004: Molecular Diversity of rumen methanogens from sheep in Western Australia. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 1263-1270.
- Wright, A.D.G., Toovey, A.F. und C.L. Pimm, 2006: Molecular identification of methanogenic archaea from sheep in Queensland, Australia reveal more uncultured novel Archaea. *Anaerobe*, 12: 134-139.
- Wright, A.D.G., Auckland, C.H. und D.H. Lynn, 2007: Molecular diversity of methanogens in feedlot cattle from Ontario and Prince Edward Island, Canada. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 4206-4210.
- Yanagita, K., Kamagata, Y., Kawaharasaki, M., Suzuki, T., Nakamura, Y. und H. Minato, 2000: Phylogenetic analysis of methanogens in sheep rumen ecosystem and detection of *Methanomicrobium mobile* by fluorescence in situ hybridization. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 64: 1737-1742.
- Yang, W.Z., Beauchemin, K.A. und L. M. Rode, 2001: Effect of dietary factors on distribution and chemical composition of liquid- or solid-associated bacterial populations in the rumen of dairy cows. *Journal of Animal Science*, 79: 2736-2746.
- Yu, Z.T. und M. Morrison, 2004: Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. *Biotechniques*, 36: 808-812.
- Zeikus, J.G., 1977: The biology of methanogenic bacteria. *Bacteriological Reviews*, 41: 514-541.
- Ziemer, C.J., Sharp, R., Stern, M.D., Cotta, M.A., Whitehead, T.R. und D.A. Stahl, 2000: Comparison of microbial populations in model and natural rumens using 16S ribosomal RNA-targeted probes. *Environmental Microbiology*, 2: 632-643.
- Zoetendal, E.G., Ben-Amor, K., Akkermans, A.D.L., Abbe, T. und W.M. de Vos, 2001: DNA isolation protocols affect the detection limit of PCR approaches of bacteria in samples from the human gastrointestinal tract. *Systematic and Applied Microbiology*, 24: 405-410.

Anhang

Tabelle A1: Zusammensetzung der Pufferlösung für die Pansensimulation (in Anlehnung an McDougall, 1948)

Chemikalien	mM
Natriumchlorid	8,04
Kaliumchlorid	7,65
Kalziumchlorid	0,22
Magnesiumchlorid	0,63
Natriumhydrogenphosphat	26,20
Natriumhydrogencarbonat	117,9

Tabelle A2: Verdaulichkeit der Rohnährstoffe und berechnete Energiegehalte in den Futtermischungen (MW, s; n = 4)

Futtermischung	Rohnährstoffverdaulichkeit (%)					Energiegehalt MJ/kg T	
	Organische Substanz	XP	XL	XF	N-freie Extraktstoffe	ME	NEL
I	78,9	74,3	84,0	64,8	83,6	11,6	7,1
	1,1	2,4	1,7	3,3	0,3		
II	79,7	77,3	75,4	72,7	83,1	11,5	7,1
	1,7	1,9	4,7	3,4	1,3		
III	80,7	78,3	77,1	74,6	84,1	11,6	7,1
	0,4	1,0	2,5	0,9	0,1		
IV	81,1	81,4	66,7	81,2	82,3	11,3	6,9
	1,0	0,8	2,9	2,2	0,7		
V	83,9	84,2	63,1	84,7	85,3	11,5	7,1
	0,9	0,7	2,3	0,6	1,5		

Tabelle A3: Sequenzen der von Lieber et al. (2003) nach Schwieger und Tebbe (1998) modifizierten Com-Primer sowie die entsprechenden Reaktionsansätze und PCR-Bedingungen für die Amplifikation von Teilsequenzen der 16S rDNA aus Mikroorganismen des Pansens

Primer	<i>E. coli</i> - Position	Sequenz 5'- 3'												
modifizierter Com 1	515 f	GTG CCA GCA GCC GCG												
modifizierter Com 2 ¹	927 R	CCC GTC AAT TYM TTT GAG TT												
PCR														
Reaktionsansatz	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 25 µl Mastermix (Qiagen) ▪ 1 µl f-Primer (10 pmol) ▪ 1 µl R-Primer (10 pmol) ▪ 1 µl DNA ▪ 22 µl reines PCR-Wasser 													
PCR-Bedingungen	<table style="border: none; width: 100%;"> <tr> <td style="padding-right: 10px;">94°C</td> <td style="padding-right: 10px;">3 min initiale Denaturierung</td> <td rowspan="5" style="font-size: 3em; vertical-align: middle; padding: 0 10px;">}</td> <td rowspan="5" style="vertical-align: middle;">30 Zyklen</td> </tr> <tr> <td>94°C</td> <td>20 s Denaturierung</td> </tr> <tr> <td>54°C</td> <td>30 s Primer-Annealing</td> </tr> <tr> <td>72°C</td> <td>1 min Elongation</td> </tr> <tr> <td>72°C</td> <td>5 min terminale Elongation</td> </tr> </table>		94°C	3 min initiale Denaturierung	}	30 Zyklen	94°C	20 s Denaturierung	54°C	30 s Primer-Annealing	72°C	1 min Elongation	72°C	5 min terminale Elongation
94°C	3 min initiale Denaturierung	}	30 Zyklen											
94°C	20 s Denaturierung													
54°C	30 s Primer-Annealing													
72°C	1 min Elongation													
72°C	5 min terminale Elongation													

¹ am 5'-Ende phosphoryliert

Tabelle A4: Protokoll für die Silberfärbung der SSCP-Gele (in Anlehnung an Bassam et al., 1991)

Fixieren	30 min mit 10 %iger [v/v] Essigsäure in Bidest
Waschen I	3 * 5 min mit Bidest
Imprägnieren	30 min mit 0,1 %iger [w/v] AgNO ₃ -Lösung in Bidest (300 ml) unter Zugabe von 450 µl Formaldehyd (37 %) kurz vor Anwendung
Waschen II	20 s mit Bidest
Waschen III	1 min in Bidest
Entwickeln	10 s in 200 ml Entwicklerlösung (3 %ige [v/v] NaOH in Bidest unter Zugabe von 750 µl Formaldehyd (37 %) kurz vor Anwendung) 10–30 min in 300 ml Entwicklerlösung
Stoppen	30 min mit 10 %iger [v/v] Essigsäure in Bidest
Waschen IV	3 * 15 min mit Bidest
Konservieren	30 min mit 13 %iger [v/v] Ethanol- und 10 %er [v/v] Glycerollösung in Bidest
Trocknen	Einweckfolie in Bidest tränken und das Gel mit der Folie luftblasenfrei abdecken

Tabelle A5: Sequenzen der im Vorversuch verwendeten *Fibrobacter*-Primer sowie die Reaktionsansätze und PCR-Bedingungen für die gruppenspezifische und die nested PCR

Zielgruppe	<i>E. coli</i> -Positon	Sequenz 5' - 3'		Referenz
<i>Fibrobacter</i>	225 f	GGG ATG AGC TTG CGT CCG ATT		Stahl et al., 1988
<i>Bacteria</i>	1492 R	TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T		Weisburg et al., 1991
		Gruppen-spezifische PCR	Nested PCR ¹	Reamplifikation ¹
Reaktionsansatz:				
Mastermix (Qiagen)	12,5	25 µl	25 µl	25 µl
f-Primer (10 mM)	1,25 µl	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl
R-Primer (10 mM)	1,25 µl	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl
Dimethylsulfoxid ²	-	-	-	2,5 µl
Magnesiumchlorid ³	-	-	-	3,0 µl
DNA	0,5 µl	1 µl	1 µl	5-10 µl
reines PCR-Wasser	9,5 µl	19 µl	19 µl	4,5-9,5 µl
PCR-Bedingungen:				
initiale Denaturierung	4 min bei 94°C	3 min bei 94°C	3 min bei 94°C	
Denaturierung	45 s bei 94°C	1 min bei 94°C	1 min bei 94°C	
Primer-Annealing	45s bei 59°C	1 min bei 50°C	1 min bei 50°C	
Elongation	70 s bei 72°C	70 s bei 72°C	70 s bei 72°C	
terminale Elongation	10 min bei 72°C	10 min bei 72°C	10 min bei 72°C	
Zyklenanzahl	30	30	30	

¹ Die PCR erfolgte unter Verwendung der in Tabelle 4 aufgeführten Com-Primer für *Bacteria*.

² 100 %ig

³ Stammlösung: 25 mM

Tabelle A6: Reaktionsansätze und PCR-Programme für die klassische PCR von *Ruminococcus albus* und *Prevotella bryantii* zur Überprüfung der Primerspezifität

	<i>R. albus</i>	<i>P. bryantii</i>
Reaktionsansatz	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 12,5 µl Mastermix (Qiagen) ▪ 1,25 µl f-Primer (12,5 pmol) ▪ 1,25 µl R-Primer (12,5 pmol) 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 1 µl DNA (30 ng) ▪ 9 µl reines PCR-Wasser
PCR-Bedingungen:		
initiale Denaturierung	94°C 9 min	94°C 10 min
Denaturierung	94°C 30 s	94°C 20 s
Primer-Annealing	55°C 30 s	61°C 60 s
Elongation	72°C 30 s	72°C 90 s
terminale Elongation	72°C 10 min	72°C 5 min
Zyklenanzahl	30	30

Tabelle A7: 16S rRNA-Teilsequenzen der analysierten Klone aus den zur Extraktion gewählten DNA-Banden des *Fibrobacter*-spezifischen SSCP-Profiles

```

>F_1_A1          408 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGUGGCAAG CGUUGUCCGG AAUUAUUGGG
CGUAAAAGCGC AUGUAGGCGG UAAUUUAAGU CUGUCGUGAA ACUGCGGGGC
UCAGCCCCCGU AUGGCGAUGG AAACUGGGUU ACUUGAGUGC AGGAGAGGAA
AGGGGAACUC CCAGUGUAGC GGUGAAAUGC GUAGAUAUUG GGAAGAACAC
CGGUGGCGAA GGCGCCUUUC UGGACUGUGU CUGACGCUGA GAUGCGAAAG
CCAGGGUAGC GAACGGGAUU AGAUACCCCG GUAGUCCUGG CCGUAAACGA
UGGGUACUAG GUGUGGGAGG UAUCGACCCC UUCCGUGCCG GAGCUAACGC
AAUAAGUACC CCGCCUGGGG AGUACGGCCG CAAGGCUUAA ACUCAAAGGA
AUUGACGG

>F_1_G3          408 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGUGGCAAG CGUUGUCCGG AAUUAUUGGG
CGUAGAGCGC AUGUAGGCGG UAAUUUAAGC GGUCUGUCGU GAAACUGGGC
UCAGCCCCCGU AUGGCGAUGG AAACUGGGUU ACUUGAGCGC AGGAGAGGAA
AGGGGAACUC CCAGUGUAGC GGUGAAAUGC GUAGAUAUUG GGAAGAACAC
CGGUGGCGAA GGCGCCUUUC UGGACUGUGU CUGACGCUGA GAUGCGAAAG
CCAGGGUAGC GAACGGGAUU AGAUACCCCG GUAGUCCUGG CCGUAAACGA
UGGGUACUAG GUGUGGGAGG UAUCGACCCC UUCCGUGCCG GAGUUAACGC
AAUAGGUACC CCGCCUGGGG AGUACGGCCG CAAGGCUUAA ACUCAAAUAA
AUUGACGG

>F_2_B4          408 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGUGGCAAG CGUUGUCCGG AAUUAUUGGG
CGCAAAGCGC AUGUAGGCGG UAAUUUAAGU CUGUCGUGAA ACUGCGGGGC
UCAGCCCCCGU AUGGCGAUGG AAACUGGGUU ACUUGAGUGC AGGAGAGGAA
AGGGGAACUC CCAGUGUAGC GGUGAAAUGC GUAGAUAUUG GGAAGAACAC
CGGUGGCGAA GGCGCCUUUC UGGACUGUGU CUGACGCUGA GAUGCGAAAG
CCAGGGUAGC GAACGGGAUU AGAUACCCCG GUAGUCCUGG CCGUAAACGA
UGGGUACUAG GUGUGGGAGG UAUCGACCCC UUCCGUGCCG GAGUUAACGC
AAUAAGUACC CCGCCUGGGG AGUACGGCCG CAAGGCUUAA ACUCAAAUAA
AUUGACGG

>F_2_C4          408 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGUGGCAAG CGUUGUCCGG AAUUAUUGGG
CGUAAAAGCGC AUGUAGGCGG UAAUUUAAGU CUGUCGUGAA ACUGCGGGGC
UCAGCCCCCGU AUGGCGAUGG AAACUGGGUU ACUUGAGUGC AGGAGAGGAA
AGGGGAACUC CCAGUGUAGC GGUGAAAUGC GUAGAUAUUG GGAAGAACAC
CGGUGGCGAG GGCGCCUUUC UGGACUGUGU CUGACGCUGA GAUGCGAAAG
CCAGGGUAGC GAACGGGAUU AGAUACCCCG GUAGUCCUGG CCGUAAACGA
UGGGUACUAG GUGUGGGAGG UAUCGACCCC UUCCGUGCCG GAGCUAACGC
AAUAAGUACC CCGCCUGGGG AGUACGGCCG CAAGGCUUAA ACUCAAAGGA
AUUGACGG

>F_2_A5          408 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGUGGCUAG CGUUGUCCGG AAUUAUUGGG
CGUAAAAGCGC AUGUAGGCGG UAAUUUAAGU CUGUCGUGAA ACUGCGGGGC
UCAGCCCCCGU AUGGCGAUGG AAACUGGGUU ACUUGAGUGC AGGAGAGGAA
AGGGGAACUC CCAGUGUAGC GGUUAAAUGC GUAGAUAUUG GGAAGAACAC
CGGUGGCGAA GGCGCCUUUC UGGACUGUGU CUGACGCUGA GACGCGAAAG
CCAGGGUAGC GAACGGGAUU AGAUACCCCG GUAGUCCUGG CCGUAAACGA
UGGGUACUAG GUGUGGGAGG UAUCGACCCC UCCCGUGCCG GAGUUAACGC
AAUAAGUACC CCGCCUGGGG AGUACGGCUG CAAGGCUUAA ACUCAAAUAA
AUUGACGG

```

>F_2_F5 409 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUAUGU AGGGAGCAAG CGUUAUCCGG AUUUUAUUGGG
UGUAAAAGGGU GCGUAGACGG AUUAACAAGU UGGUUGUGAA AUCCCUCGGC
UUAACUGAGG AACUGCAACC AAAACUAUUA AUCUUGAGUA CUGGAGGGGA
AAGUGGAAAU CCUAGUGUAG CGGUGAAAUG CGUAGAUUUU AGGAAGAACA
CCGGUGGCGA AGGCGACUUU CUGGACAGUA ACUGACGUUG AGGCACGAAA
GUGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC ACCGUACACG
AUGGAUACUU GGUGUAGGCU GUGAUGAGCA GUCUGUGCCG GAAGCUAACG
CGAUAAAGU AU CCCACCUGGG GAGUACGACU GCAAGGUUGA AACUCAAAUA
AAUUGACGG

>F_2_G5 408 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGUGGCAAG CGUUGUCCGG AAUUAUUGGG
CGUAAAAGCGC AUGUAGGCGG UAAUUUAAGU CUGUCGUGAA ACUGCGGGGC
UCGGCCCCCGU AUGGCGAUGG AAACUGGGUU ACUUGAGUGC AGGAGAGGAA
AGGGGAACUC CCAGUGUAGC GGUGAAAUGC GAAGAUUUUG GGAAGAACAC
CGGUGGCGAA GGCGCCUUUC UGGACUGUGU CUGACGCUGA GAUGCGAAAG
CCAGGGUAGC GAACGGGAUU AGAUACCCCG GUUUUGACGG CCGCAAGGCU
UAAACUCAAA GAAAGUCCUG GCCGUAAACG AUGGGUACUA GGUGUGGGAG
GUAUCGACCC CUUCCGUGCC GGAGUUAACG CAAUAAGUAC CCCGCUUGGG
GAGUACGG

>F_3_B7 408 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGGGGCAAG CGUUGUCCGG AGUGAUUGGG
CGUAAAAGGGC GCGUAGGCGG CCUUAUAAGU CUGGAGUGAA AGUCCUGUUC
UUCAAGAUGG GAAUUGCUUU GGAUACUGUA GGGCUUGAGU GCAGGAGAGG
UAAGUGGAAU UCCAGUGUA GCGGUGAAAU GCGUAGAGAU UGGGAGGAAC
ACCAGUGGCG AAGGCGACUU ACUGGACUGU AACUGACGCU GAGGCGCGAA
AGUGUGGGGA GCAAACAGGA UUAGAUACCC UGGUAGUCCm CrCUGUAAmC
GAUGAAUGCU AGGUGUAGGG GGUAUCGACC CCUUCUGUGC CGCAGUUAAC
ACAAUAAGCA UUCCGCCUGG GGAGUACGGC CGCAAGGUUG AAACUCAAAG
AAAUUGAC

>F_3_C7 409 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUAUGU AGGUGGCAAG CGUUGUCCGG AAUUAUUGGG
CGUAAAAGCGC AUGUAGGCGG UAAUUUAAGU CUGUCGUGAA ACUGCGGGGC
UCAGCCCCCGU AUGGCGAUGG AAACUGGGUU ACUUGAGUGC AGGAGAGGAA
AGGGGAACUC CCAGUGUAGC GGUGAAAUGC GUAGAUUUUG GGAAGAACAC
CGGUGGCGAA GGCGCCUUUC UGGACUGUGU CUGACGCUGA GAUGCGAAAG
CCAGGGUAGC GAACGGGAUU AGAUACCCCG GUAGUCCUGG CCGUAAACGA
UGGGUACUAG GUGUGGGAGG UAUCGACCCC UUCCGUGCCG GAGUUAACGC
AAUAAGUACC CCGCCUGGGG AGUACGGCCG CAAGGCUUUA AACUCAAAUA
AAUUGACGG

>F_3_F7 408 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGUGGCAAG CGUUGUCCGG AAUUAUUGGG
CGUAAAAGCGC AUGUAGGCGG UAAUUUAAGU CUGUCGUGAA ACUGCGGGGC
UCAGCCCCCGU AUGGCGAUGG AAACUGGGUU ACUUGAGUGC AGGAAAGGAA
AGGGGAACUC CCAGUGUAGC GGUGAAAUGC GUAGAUUUUG GGAAGAACAC
CGGUGGCGAA GGCGCCUUUC UGGACUGUGU CUGACGCUGA GAUGCGAAAG
CCAGGGUAGC GAACGGGAUU AGAUACCCCG GUAGUCCUGG CCGUAAACGA
UGGGUACUAG GUGUGGGAGG UAUCGACCCC UUCCGUGCCG GAGUUAACGC
AAUAAGUACC CCGCCUGGGG AGUACGGCCG CAAGGCUUUA ACUCAAAGAA
AUUGACGG

>F_3_G7 406 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGUGGCGAG CGUUGUCCGG AUUUACUGGG
UGUAAAAGGGU GUGUAGGCGG GGGAGCAAGU CAGAUGUGAA AACCCAAGGC
UUAACCAUGG GAGUGCAUCU GAAACUGUUU UUCUUGAGUG ACGGAGAGGC
AAGCGGAAAU CCUAGUGUAG CGGUAAAUG CGUAGAUUUU AGGAGGAACA
CCAGUGGCGG AGGCGGCUUG CUGGGCUUUU ACUGACGCUG AGGCUCGAAA
GUGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC ACCGUAACG
AUGAUUACUA GGUGUGGGGG CGUCAAGCUU CCGUGCCGGA GUUAACACAA
UAAGUAAUCC ACCUGGGGAG UACGGCCGCA AGGUUGAAAC UCAAUUGAAU
UGACGG

>F_3_B8 402 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGGGGCGAG CGUUGUCCGG AAUGAUUGGG
CGUAAAAGGC GCGUAGGCGG CUCGGUAAAGU CUGAAGUGAA AGUCCUGCUU
UUAAGGUGGG AAUUGCUUUG GAUACUGUCG GGCUAGAGUG CAGGAGAGGU
AAGUGGAAU CCAGUGUAG CGGUGAAAUG CGUAGAGAUU GGGAGGAACA
CCAGUGGCGA AGGCGACUUA CUGGACUGUA ACUGACGCUG AGGCGCUAAA
GUGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC ACUGUAAACG
AUGAAUGC UA GGUGUAGGGG GUAUCGACCC CUUCUGUGCC GCAGUUAACA
CAAUAAGCAU UCCGCCUGGG GAGUACGGCC GCAAGGUUGA AACUCAAAUA
AA

>F_3_E9 388 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGUGGCAAG CGUUGUCCGG GAAUUAUUGG
GCGUAAAAGC GCAUGUAGGC GGUAAUUUA GUCUGUCGUG AAAACUGCGG
GGGCUCAGCC CCGUAUGGCG AUGGAAACUG GGUUACUUGA GUGCAGGAGA
GGAAAAGGGG ACUCCAGUG UAGCGGUGAA AUGCGUAGAU AUUGGGAAGA
ACACCGGUGG CGAAGGCGCC UUUCUGGACU GUGUCUGACG CUGUGAUGCG
AAAGCCAGGG UAGCGAACGG GAUJAGAUAC CCCGGUAGUC CUGGCCGUAA
ACGAUGGGUA CUAGGUGUGG GAGGUUAUCGA CCCCUUCCGU GCCGGAGUUA
ACACAAUAAG UAUCCACCU GGGGAGUACG GUCGCAAG

>F_4_A10 410 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGUGGCAAG CGUUGUCCGG AAUUAUUGGG
CGUAAAAGGC AUGUAGGCGG UAAUUUAAGU CUGUCGUGAA ACUGCGGGGC
UCAGCCCCGU AUGGCGAUGG AAACUGGGUU ACUUGAGUGC AGGAGAGGAA
AGGGGAACUC CCAGUGUAGC GGUGAAAUGC GUAGAUUUG GGAAGAACAC
CGGUGGCGAA GGCCCUUUC UGGACUGUGU CUGACGCUGA GAUGCGAAAG
CCAGGGUAGC GAACGGGAU AGAUACCCCG GUAGUCCUGG CCGUAAACGA
UGGGUACUAG GUGUGGGAGG UAUCGACCC CUUCUGUGCC GAGUUAGCGC
AAUAAGUACC CCGCCUGGGG AGUACGGCCG CAAGGUUUA ACUCAAAUA
AUUGACGGAG

>F_4_B10 409 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUAUGU AGGGGGCAAG CGUUGUCCGG AAUGAUUGGG
CGUAAAAGGC GCGUAGGCGG CCUUAUAAGU CUGGAGUGAA AGUCCUGUCU
UCAAGAUGGG AAUUGCUUUG GAUACUGUAG GGCUUGAGUG CAGGAGAGGU
AAGUGGAAU CCAGUGUAG CGGUGAAAUG CGUAGAGAUU GGGAGGAACA
CCAGUGGCGA AGGCGACUUA CUGGACUGUA ACUGACGCUG AGGCGCGAAA
GUGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC ACUGUAAACG
AUGAAUGC UA GGUGUAGGGG GUAUCGACCC CUUCUGUGCC GCAGUUAACA
CAAUAAGCAU CCCGCCUGGG GAGUACGGCC GCAAGGUUGA AACUCAAAUA
AAUUGACGG

>F_4_D10 405 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGUGGCGAG CGUUGUCCGG AUUUACUGGG
UGUAAAAGGC GUGUAGGCGG GGGAGCAAGU CAGAUGUGAA AACCCAAGGC
UUAACCAUGG GACUGCAUUU GAAACUGUUU UUCUUGAGUG ACGGAGAGGC
AAGCGGAAU CCUAGUGUAG CGGUAAAUG CGUGGAUUAU AGGAGGAACA
CCGGUGGCGA AGGCGCUUG CUGGACGUUA ACUGACGCUG AGACGCGAAA
GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCGC ACCGUAAACA
AUGCAUACUG GGGUGUCCGG GGAUUUCCCC GGGUACCGUA GCCAACGCGU
UAUGUAUGCC CGCCUGGGGA GUACGUACGC AAGUAUAAAC UCAAUAUUU
GACGG

>F_4_H11 407 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUAUGG AGGAAGCGAG CGUUAUCCGG AUUUUAUUGGG
UUUAAAAGGU GCGUAGGCGG GACGUCAAGU CAGCrGGGUG AAUACUGUG
GCUCAACCAU AGCAUUGCCG UUGAAACUGG CGACCUUGAG UGCGGCAGAG
GUAGCGGAA UGUGUGGUGU AGCGGUGAAA UGCUUAGAU UCACACAGAA
CACCGAUUGC GAAGGCAGCU UACUGGAGCG CAACUGACGC UGAGGCACGA
AAGCGUGGGU AUCGAACAGG AUUAGAUACC CUGGUAGUCC ACGCUGUAAA
CGAUGAUGAC UAGCUGUUGG CGAUACAAUG UCAGCGGCAC AGCGAAAGCG
UUAUGUCAUC CACCUGGGGA GUACGCCGGC AACGGUGAAA CUCAAUUGAA
UUGACGG

>F_4_C12 408 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGUGGCAAG CGUUGUCCGG AAUUAUUGGG
CGUAAAAGCGC AUGUAGGCGG UAAUUUAAGU CUGUCGUGAA ACUGCGGGGC
UCAGCCCCGU AUGGCGAUGG AAGCUGGGUU ACUUGAGUGC AGGAGAGGAA
AGGGGAACUC CCAGUGUAGC GGUGAAAUGC GUAGAUAUUG GGAAGAACAA
CGGUGGCGAA GGCGCCUUUC UGGACUGUGU CUGACGCUGA GAUGCGAAAG
CCAGGGUAGC GAACGGGAUU AGAUACCCCG GUAGUCCUGG CCGUAAACGA
UGGGUACUAG GUGUGGGAGG UAUCGACCCC UUCGUGCCG GAGUUAACGU
AAUAAGUACC CCGCCUGGGG AGUACGGCCG CAAGGUUAA ACUCAAAUAA
AUUGACGG

>F_4_F12 407 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUUAUGU AGGUGGCAAG CGUUGUCCGG AAUUAUUGGG
CGUAAAAGCGC AUGUAGGCGG UAAUUUAAGU CUGUCGUGAA ACUGCGGGGC
UCAGCCCCGU AUGGCGAUGG AAACUGGGUU ACUUGAGUGC AGGAGAGGAA
AGGGGAACUC CCAGUGUAGC GGUGAAAUGC GUAGAGAUUG GGAGGAACAC
CAGUGGCGAA GGCACUUAC UGGACUGUAA CCGACGCUGA GGCGCCAAAG
UGUAGGGAGC AAACAGGAUU AGAUACCCUG GUAGUCCACA CUGUAAACGA
UGAAUGCUAG GUGUAGGGGG UAUCGACCCC UUCUGUGCCG CAGUUAACAC
AAUAAGCAUU CCGCCUGGGG AGGACGGCCG CAAGGUUAAA CUCAAAGAAA
UUGACGG

>F_4_G12 407 bp
AGCAGCCGCG GUAAUAUGUA GGUGGCAAGC GUUGUUCGGA AUUAUUGGGC
GUAAAAGCGUA UGUAGGCGGU AAUUUAAGUC UGUCGUGAAA CUGCGGGGCU
CAGCCCCGUA UGGCGAUGGA AACUGGGUUA CUUGAGAGCA GGAGAGGAAA
GGGGAACUUU CAGUGUAGCG GUGAAAUGCG UAGAUAUUGG GAAGAACACC
GGUGGCGAAG GCGCCUUUCU GGACUGUGUC UGACGCUGAG AUGCGAAAGC
CAGGGUAGCG AACGGGAUUA GAUACCCCGG UAGUUCUGGC CGUAAACGAU
GGGUACUAGG UGUGGGAGGU AUCGACCCCU UCCGUGCCGG AGUUAACGCA
AUAAGUACCC UGCCUGGGGA GUACGGCUGC AAGGUUAAA CUCAAAUAAA
UUGACGG

Tabelle A8: 16S rRNA-Teilsequenzen der analysierten Klone aus den zur Extraktion gewählten DNA-Banden der *Clostridia*-, *Bacteroides-Prevotella*- und *Archaea*-spezifischen SSCP-Profile

```

>C_1_C1      408 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGGGGCAAG CGUUAUCCGG AUUUACUGGG
UGUAAAAGGGG GCGCAGACGG CGAUGCAAGU CUGAAGUGAA AUCCCACGGC
UCAACUGUGG AAUUGC UUUG GAAACUGUAU UGCUUGAGUG CUGGAGAGGU
AAGCGGAAU CCUGGUGUAG CGGUGAAAUG CGUAGAU AUC AGGAAGAACA
UCAGUGGCCG AGGCGGC UUA CUGGACAGCA ACUGACGUUG AGGCCCGAAA
GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCCGUAACG
AUGAAUACUA GGUGUUGGGG AGCAAAGCUC CUCGGUGCCG GCGCUAACGC
AUUAAGUAU CCACCUGGGG AGCACGUUCG CAAGAAUAAA ACUCAAGAA
AUUGACGG

>C_1_G2      408 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGGGGCAAG CGUUAUCCGG AUUUACUGGG
UGUAAAAGGGG GCGCAGACGG CGAUGCAAGU CUGAAGUGAA AUCCCACGGC
UCAACUGUGG AAUUGC UUUG GAAACUGUAU UGCUUGAGUG CUGGAGAGGU
AAGCGGAAU CCUGGUGUAG CGGUGAAAUG CGUAGAU AUC AGGAAGAACA
UCAGUGGCCG AGGCGGC UUA CUGGACAGCA ACUGACGUUG AGGCCCGAAA
GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCCGUAACG
AUGCAUACUA GGUGUUGGGG AGCAAAGCUC CUCGGUGCCG GCGCUAACGC
AUUAAGUAU CCACCUGGGG AGUACGUUCG CAAGAAUAAA ACUCAAUAA
AUUGACGG

>C_1_H3      408 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGGGGCAAG CGUUAUCCGG AUUUACUGGG
UGUAAAAGGGG GCGCAGACGG CGAUGCAAGU CUGAAGUGAA AUCCCACGGC
UCAACUGUGG AAUUGC UUUG GAAACUGUAU UGCUUGAGUG CUGGAGAGGU
AAGCGGAAU CCUGGUGUAG CGGUGAAAUG CGUAGAU AUC AGGAAGAACA
UCAGUGGCCG AGGCGGC UUA CUGGACAGCA ACUGAUGUUG AGGCCCGAAA
GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCCGUAACG
AUGAAUACUA GGUGUUGGGG AGCAAAGCUC CUCGGUGCCG GCGCUAACGC
AUUAAGUAU CCACCUGGGG AGUACGUUCG CAAGAAUAAA ACUCAAUUGA
AUUGACGG

>C_1_B1      408 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGGGGCAAG CGUUAUCCGG AUUUACUGGG
UGUAAAAGGGA GCGUAGACGG AAGGACAAGU CUGAUGUGAA AGCCCAGGGC
UCAACUGCGG AACUGCAUUG GAAACUGUCC AUCUGGAGUA UCGGAGGGGU
GAGCGGAAU CCUGGUGUAG CGGUGAAAUG CGCAGAU AUC AGGAAGAACA
CCGGCGGCCG AGGCGGCUCA CUGGACGAUA ACUGACGUUG AGGCUCGAAA
GCGUGGGUAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCUGUGAACG
AUGAAUACUA GGUGUGGGUG AGCACAGCUC AUCCGUGCCG CAGCAAACGC
AAUAAGUAU CCACCUGGGG AGUACGUUCG CAAGAAUGAA ACUCAAUAA
AUUGACGG

>C_2_B4      407 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGGUGCGAG CGUUAUCCGG AUUUACUGGG
CGUAAAAGCGU GCGCAGGCGG CUUUGCAAGA CAGAGGUGAA AUCCCAGGGC
UCAACCUGGG AACUGCCUUU GUGACUGCAA GGCUAGAGUA CGGCAGAGGG
GGAUGGAAU CCGCGUGUAG CAGUGAAAUG CGUAGAU AUC CGGAGGAACA
CCGAUGGCCG AGGCAAUCCC CUGGGCCUGU ACUGAUGCUC AUGCACGAAA
GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCCGUAACG
AUGUCAACUG GUUGUUGGAC GGCUUGCUGU UCAGUAACGA AGCUAACGCG
UGAAGUUGAC CGCCUGGGGA GUACGGCCGC AAGGUUGAAA CUCAAUGAA
UUGACGG

```

>C_2_F4 408 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGGUGCGAG CGUUAUUCGG AAUUCUGGG
CGUAAAAGCGU GCGCAGGCGG CUUUGCAAGA CAGAGGUGAA AUCCCCGGGC
UCAACCUUGGG AACUGCCUUU GUGACUGCAA GGCUAGAGUA CGGCAGAGGG
GGAUGGAAAU CCGCGUGUAG CAGUGAAAUG CGUAGAUUUG CGGAGGAACA
CCGAUGGCCG AGGCAAUCCC CUGGGCCUGU ACUGACGCUC AUGCACGAAA
GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCCCUAAACG
AUGUCAACUG GUUGUUGGAC GGCUUGCUGU UCAGUAACGA AGCUAACGCG
UGAAGUGACC GCCUGGGGAG UACGGCCGCA AAGGUUGAAA ACUCAAAUAA
AUUGACGG

>C_2_A6 408 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACAG AGGGUGCGAG CGUUAUUCGG AAUUCUGGG
CGUAAAAGCGU GCGUAGACGG UUCUGUAAGU CGGAUGUGAA AUCCCCGGGC
UCAACCUUGGG AAUUGCAUUC GAGACUGCAA AGCUAGGGUG CGGAAGAGGG
AAGCGGAAAU UCCGGUGUAG CGGUGAAAUG CGUAGAUUUC GGAAGGAACA
UCAGUGGCCG AAGCGGCUUC CUGGUCCAGC ACCGACGUUC AGGCACGAAA
GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCCAUAAACG
AUGAGAACUA GACGUUGAGA GGGUAAAGCCU CCCAGUGUCG CAGCUAACGC
GCUAAGUUCU CCGCCUGGGG AGUACGGCCG CAAGGUUGAA ACUCAAAAGGA
AUUGACGG

>C_2_G6 408 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGGGGCAAG CGUUAUCCGG AUUUACUGGG
UGUAAAAGGGA GCGUAGACGG AAUAGCAAGU CUGGAGUGAA AUGUAGGGGC
UUAACCCUG AACUGCUUUG GAAACUGUUG AUCUUGUGUA CCGGAGGGGC
AGGCGGAAAU CCUGGUGUAG CGGUGAAAUG CGUAGAUUUC AGGAAGAACA
CCGGUGGCCG AGGCGGCCUG CUGGACGGUA ACUGACGUUG AGGCUCGAAA
GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUGCAC GCCGUAACG
AUGAAUACUA AGUGUCGGCA UCCGAAGGGU GUCGGUGCUG CCGUUAACAC
AGUAAGUAU CCACCUGGGG AGUACGUACG CAAGUAUGAA ACUCAAGAA
AUUGACGG

>C_2_D6 407 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGUGGCAAG CGUUGUCCGA AUUACUGAGU
GUAAAAGGGAG CGUAGGCGGG AAGGCAAGUU GGAUGUGAAA ACUGUGGGCU
CAACCGACAG ACUGCAUUCA AAACUGUUUU UCUUGAGUGC UGUAGAGGCA
AGCGGAAUUC CUAGUGUAGC GGUGAAAUGC GUAGAUUUA GGAGGAACAC
CAGUGGCCGA GCGGCUUUG UGGGCUUUUA CUGACGCUGA GGCUCGAAAG
UGUGGGGAGC AAACAGGAU AGAUACCCUG GUAGUCCACA CUCGUAACG
AUGAUUACUA GGUGUGGGGG CGUCAAGCUU CCGUGCCGGA GUUAACACUA
AUAAGUAAUC CACCUGGGGA GUACGGCCGC AAGGUUGAAG CUCAAGAAA
UUGACGG

>C_2_E6 409 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACAG AGGGUGCAAG CGUUGUUCGG AAUUCUGGG
CGUAAAAGCGU GCGUAGUCGG UAUUGAGAGU CACGGGUGAA AUCCCAGGGC
UUAACCCUGG AACUGCCUGU GAGACCUCAG UACUAGAGUG UGAGAGGGGA
UAGUGGAAUA CCCAGUGUAG CGGUGAAAUG CGUAGAGAUU GGGUGGAACA
CCGGUGGCCG AGGCGGCUAU CUGGCUCACA ACUGACGAUC AGGCACGAAA
GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCCGUAACU
AUGCACACAA GCUGUAGUGG GAUUUUACUC CUGCUGUGGC GAAGCUAACG
CAAUUGAGUGU GCCGCCUGGG GAGUACGGUC GCAAGACUAA AACUCAAAUA
AAUUGACGG

>C_3_D7 407 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGGUGCGAG CGUUAUUCGG AAUUCUGGG
CGUAAAAGCGU GCGCAGGCGG CUUUGCAAGA CAGAGGUGAA AUCCCCGGGC
UCAACCUUGGG AACUGCCUUU GUGACUGCAA GGCUAGAGUA CGGCAGAGGG
GGAUGGAAAU CCGCGUGUAG CAGUGAAAUG CGUAGAUUUG CGGAGGAACA
CCGAUGGCCG AGGCAAUCCC CUGGGCCUGU ACUGACGCUC AUGCACGAAA
GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCCCUAAACG
AUGUCAACUG GUUGUUGGAC GGCUUGCUGU UCAGUAACGA AGCUAACGCG
UGAAGUUGAC CGCCUGGGGA GUACGGCCGC AAGGUUGAAA CUCAAGAAA
UUGACGG

>C_3_C8 407 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGGGGCAAG CGUUAUCCGG AUUUACUGGG
UGUAAAAGGA GCGUAGACGG CGCGGCAAGU CCGAAGUGAA AGGCGGGGGC
CCAACCCCGG GACUGCUCUG GAAACUGUCA UGCUUGAGUG CGGGAGGGGC
AGGCGGAAU CCUAGUGUAG CGGUGAAAUG CGUAGAUUU AGGAGGAACA
CCGGCGGCGA AGGCGGCCUG CUGGACCGUA ACUGACGUUG AGGCUCGAAG
GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCGGUAACG
AUGAUCACUA GGUGUCCGGG GACACGGUCC CCGGGUGCCG CAGCCAACGC
AUUAAGUGAC CCACCUGGGG AGUACGUUCG CAAGAAUAAA CUCAAAUGAA
UUGACGG

>C_3_G8 408 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGA AGGGGGCUAG CGUUGCUCGG AAUUUACUGG
GCGUAAAAGG GCGUAGGCG GACAGUUGAG UUGGGGGUGA AAGCCCGGGG
CUCAACCCUG GAAAUGCCUU CAAUACUGGC UGUCUUGAGU ACGGGAGAGG
UGUGUGGAAC UCCGAGUGUA GAGGUGAAAU UCGUAGAUUU UCGGAAGAAC
ACCAGUGGCG AAGGCGACUC ACUGGCCCGU UACUGACGCU GAGGCGCGAA
AGCGUGGGGA GCAAACAGGA UUAGAUACCC UGGUAGUCCA CGCCGUAAC
GAUGAGUCU AGUUGUCGGC AUGCAUGCAU GUCGGUGACG CAGCUAACGC
AUUAAGCACU CCGCCUGGGG AGUACGGUCG CAAGAUUAAA ACUCAAAGAA
AUUGACGG

>C_3_A7 410 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACAG AGGGUGCAAG CGUUGUUCGG AAUUACUGGG
CGUAAAAGCG GCGUAGUCGG UAUUGAGAGU CGCGGGUGAA AUCCCAGGGC
UUAACCCUGG AACUGCUUGC GAGACCUCAG UACUAGAGUG UGAGAGGGGA
UAGUGGAAUA CCCAGUGUAG CGGUGAAAUG CGUAGAGAUU GGGUGGAACA
CCGGUGGCGA AGGCGGCUAU CUGGCUCACA ACUGACGAUC AGGCACGAAA
GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCUGUAAACU
AUGCAUACAA GCUGUAGUGG GAUUUUACUC UCUGCUGUGG CGAAGCUAAC
GCAAUUAGUA UGCCGCCUGG GGAGUACGGU CGCAAGACUA AAACUCAAG
AAAUUGACGG

>C_3_G7 409 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGGUGCGAG CGUUAUCCGG AAUUACUGGG
CGUAAAAGCG GCGCAGGCGG CUUUGCAAGA CAGAGGUGAA AUCCCAGGGC
UCAACCCUGG AACUGCCUUU GUGACUGCAA GGCUAGAGUA CGGCAGAGGG
GGAUGGAAU CCGCGUGUAG CAGUGAAAUG CGUAGAUUUG CGGAGGAACA
CCGAUGGCGA AGGCAAUCCU CUGGGCCUGU ACUGACGCU AUGCACGAAA
GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCCCUAAACG
AUGUCAACUG GUUGUUGGAC GGCUUGCUGU UCUAGUAACG AAGGUAACGC
GUGAAUGUUG ACCGCCUGGG GAGUACGGCC GCAAGGUUGA AACUCAAUUG
AAUUGACGG

>C_4_A10 409 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGGGGCAAG CGUUAUCCGG AUUUACUGGG
UGUAAAAGGA GCGUAGGCGG CGAUGCAAGU CAGAAGUGAA AGCCCGGGGC
UCAACCGCGG GACUGCUUUU GAAACUGCGU UGCUGGAUUA CAGGAGAGGU
AAGCGGAAU CCUAGUGUAG CGGUGAAAUG CGUAGAUUU AGGAGGAACA
CCAGUGGCGA AGGCGGCUUA CUGGACUGUU AAUGACGCUG AGGCUCGAAA
GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCCGUAACG
AUGAAUACCA GGUGUUGGGU CCCAUAAAGG AUUCAGUGCC GCGCAAACG
CAUUAAGUAU UCCACCUGGG GAGUACGUUC GCAAGAAUGA AACUCAAUUA
AAUUGACGG

>C_4_B11 409 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGGGGCAAG CGUUAUCCGG AUUUACUGGG
UGUAAAAGGA GCGUAGACGG CGUGGCAAGU CAGAUGUGAA AACCCGGGGC
UCAACCCCGG GAUUGCAUUU GAAACUGUCA AGCUAGAGUA UCGGAGAGGU
AAGUGGAAU CCUAGUGUAG CGGUGAAAUG CGUAGAUUU AGGAGGAACA
CCAGUGGCGA AGGCGGCUUA CCGGACGAAA ACUGACGUUG AGGCUCGAAA
GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCCGUAACG
AUGAAUACUA GGUGUUGGCA GGCAAAGCCU GUCGGUGCCG CAGCAAACGC
AAUAAGUAU CCACCUGGGG AGUACGUUCG CAAGAAUGAA AACUCAAUUA
AAUUGACGG

>C_4_E11 408 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGGGGCAAG CGUUAUCCGG GUUUACUGGG
UGUAAAAGGGA GCGUAGACGG GAUGGCAAGU CCGAAGUGAA AUCCUGCGGC
UUAACCGCAG AAUUGCUUUG GAAACUGUCA ACCUGGAGUG UCGGAGAGGU
AAGCGGAAU CCUAGUGUAG UAGUGAAAUG CGUAGAGAUU AGGAAGAACA
CCGGAGGCGA AGGCGGCUUA CUGGGCGAUA ACUGACGUUG AGGCUCGGAA
GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCCGUAAACG
AUGAAUACUA GGUGUCGGCA UGCGAAGCAU GUCGGUGCCG CCGCUAACGC
AUUAAGUAU CCACCUGGGG AGUACGUUCG CAAGAAUGAA ACUCAAAUGA
AUUGACGG

>C_4_H12 409 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGGGGCAAG CGUUAUCCGG AUUUACUGGG
UGUAAAAGGGA GCGCAGACGG GCGAUGCAAG UCUGAAGUGA AAUCCCACGG
CUCAACUGUG GAAUUGCUUU GGAAACUGUA UUGCUUGAGU GCUGGAGAGG
UAAGCGGAAU UCCUGGUGUA GCGGUGAAAU GCGUAGAUAU CAGGAAGAAC
AUCAGUGGCG AAGGCGGCUU ACUGGACAGC AACUGACGUU GAGGCCCGAA
AGCGUGGGGA GCAAACAGGA UUAGAUACCC UGGUAGUCCA CGCCGUAAAC
GAUGAAUACU AGGUGUUGGG GAGCAAAGCU CUUCGGUGCC GGCGCUAACG
CAUUAAGUAU UCCACCUGGG GAGUACGUUC GCAAGAAUAA AACUCAAAUA
AAUUGACGG

>C_4_C12 409 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGGGGCAAG CGUUAUCCGG AUUUACUGGG
UGUAAAAGGGA GCGUAGACGG CUUGGCAAGU CUGAAGUGAA AGCUCGGGGC
UCAACCCCGG AACUGCUUUG GAAACUGUCU GGCUAGAGUG CAGGAGAGGU
AAGCGGAAU CCUAGUGUAG CGGUGGAAUG CGUAGAUAUU AGGAGGAACA
CCAGAGGCGA AGGCGGCUUA CUGGACUGUA ACUGACGUUG AGGCUCGAAG
GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCGGUAAACG
AUGAUCACUA GGUGUUGGCU AUGCAUAGCG UGUCGGUGCC GCAGCAAACG
CAAUAAGUGA UCCACCUGGG GAGUACGUUC GCAAGAAUGA AACUCAAAUG
AAUUGACGG

>C_4_C10 408 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGGGGCAAG CGUUAUCCGG AUUUACUGGG
UGUAAAAGGGA GCGCAGACGG CGAUGCAAGU CUGAAGUGAA AUCCCACGGC
UCAACUGUGG AAUUGCUUUG GAAACUGUAU UGCUUGAGUG CUGGAGAGGU
AAGCGGAAU CCUGGUGUAG CGGUGAAAUG CGUAGAUAUU AGGAAGAACA
UCAGUGGCGA AGGCGGCUUA CUGGACAGCA ACUGACGUUG AGGCUCGAAG
GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCGGUAAACG
AUGAAUACUA GGUGUUGGGA GACAUAGUCU UUCAGUGCCG UCGCUAACGC
AGUAAGUAU CCACCUGGGG AGUACGUUCG CAAGAAUGAA ACUCAAGAA
AUUGACGG

>C_4_D12 408 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGGGGCAAG CGUUAUCCGG AUUUACUGGG
UGUAAAAGGGA GCGUAGGCGG CGCGGCAAGU CCGAAGUGAA AGGUGGGGGC
CCAACCCCGG GACUGCUUUG GAAACUGUCA UGCUUGAGUG CGGGAGGGGC
AGGCGGAAU CCUGGUGUAG CGGUGAAAUG CGUAGAUAUU AGGAGGGACA
CCGGCGGCGA AGGCGGCCUG CUGGACCGUA ACUGACGUUG AGGCUCGAAG
GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCGGUAAACG
AUGAUCACUA GGUGUCUGGG GACAUGGUCC CCGGGUGCCG CAGCCAACGC
AUUAAGUGAU CCACCUGGGG AGUACGUUCG CAAGAAUGAA ACUCAAAUGA
AUUGACGG

>C_4_G10 408 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGGGGCAAG CGUUAUCCGG AUUUACUGGG
UGUAAAAGGGA GCGCAGACGG CGAUGCAAGU CUGAAGUGAA AUCCCACGGC
UCAACUGUGG AAUUGCUUUG GAAACUGUAU UGCUUGAGUG CUGGAGAGGU
AAGCGGAAU CCUGGUGUAG CGGUGAAAUG CGUAGAUAUU AGGAAGAACA
UCAGUGGCGA AGGCGGCUUA CUGGACAGCA ACUGACGUUG AGGCUCGAAG
GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCGGUAAACG
AUGAAUACUA GGUGUUGGGA GACAUAGUCU UUCAGUGCCG UCGCUAACGC
AGUAAGUAU CCACCUGGGG AGUACGUUCG CAAGAAUAAA ACUCAAAUGA
AUUGACGG

>C_5_B1 409 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGGUGCGAG CGUUAUCCGG AAUUCUGGG
CGUAAAAGCGU GCGCAGGCGG CUUUGCAAGA CAGAGGUGAA AUCCCCGGGC
UCAACCUGGG AACUGCCUUU GUGACUGCAA GGCUAGAGUA CGGCAGAGGG
GGAUGGAAU CCGCGUGUAG CAGUGAAAUG CGUAGAUUUG CGGAGGAACA
CCGAUGGCGA AGGCAAUCCC CUGGGCCUGU ACUGACGCUC AUGCACGAAA
GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCCCUAAACG
AUGUCAACUG GUUGUUGGAC GGCUUGCUGU CCAGUAACGA AGCUAUACGC
GUGAAGUUGA CCGCCUGGGG AGUACGGCCG CAAGGUUGAA AACUCAAUA
AAUUGACGG

>C_5_D1 408 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGGGGCAAG CGUUAUCCGG AUUUACUGGG
UGUAAAAGGGA GCGCAGACGG UAUGGCAAGU CUGAAGUGAA AUCAUGGAGC
UCAACUCCGU AAUUGCUUUG GAAACUGUCA AACUCGAGUA CCGGAGGGGC
AGGCGGAAU CCUGGUGUAG CGGUGAAAUG CGUAGAUUUC AGGAAGAACA
CCGGUGGCGA GGGCGGCCUG CUGGACGGUA ACUGACGUUC AGGCUCGAAA
GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCCGUAACG
AUGAAUACUA AGUGUCGGCA UCCGAAGGAU GUCGGUGCUG CCGUAAACAC
AAUAAGUAU CCACCUGGGG AGUACGUACG CAAGUAUGAA ACUCAAAUAA
AUUGACGG

>C_5_C2 408 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGGGGCAAG CGUUAUCCGG AUUUACUGGG
UGUAAAAGGGA GCGUAGACGG AACAGCAAGU CUGAGGUGAA AUGUAGGGGC
UCAACUCCUG AACUGCCUUG GAAACUGUUG AUCUGGAGUA CCGGAGGGGC
AGGCGGAAU CCUGGUGUAG CGGUGAAGUG CGUAGAUUUC AGGAAGAACA
CCGGUGGCGA AGGCGGCCUG CUGGACGGUA ACUGACGUUG AGGCUCGAAA
GCGCGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCCGUAACG
AUGAAUACUA GGUGUUGGGA ACCACAGGUU UUCAGUGCCG UCGCUAACGC
AGUAAGUAU CCACCUGGGG AGUACGUUCG CAAGAAUGAA ACUCAAAUAA
AUUGACGG

>C_6_A4 407 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGGUGCGAG CGUUAUCCGG AAUUCUGGG
CGUAAAAGCGU GCGCAGGCGG CUUUGCAAGA CAGAGGUGAA AUCCCCGGGC
UCAACCUGGG AACUGCCUUU GUGACUGCAA GGCUAGAGUA CGGCAGAGGG
GGAUGGAAU CCGCGUGUAG CAGUGAAAUG CGUAGAUUUG CGGAGGAACA
CCGAUGGCGA AGGCAAUCCC CUGGGCCUGU ACUGACGCUC AUGCACGAAA
GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCCCUAAACG
AUGUUAACUG GUUGUUGGAC GGCUUGCUGU UCAGUAACGA AGCUAACGCG
UGAAGUUGAC CGCCUGGGGA GUACGGCCGC AAGGUUGAAA CUCAAAGAAA
UUGACGG

>C_6_C4 407 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGA AGGGGGCUAG CGUUGCUCGG AAUUCUGGG
CGUAAAAGGCG GCGUAGGCGG ACAGUUAAGU UGGGGGUGAA AGCCCCGGGC
UCAACCUCGG AAUUGCCUUC AAUACUGGCU GUCUUGAGUA CGGGAGAGGU
GAGUGGAACU CCGAGUGUAG AGGUGAAAU CGUAGAUUUC CGGAAGAACA
CCAGUGGCGA AGGCGACUCA CUGGCCCGUU ACUGACGCUG AGGCGCGAAA
GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCCGUAACG
AUGAGUGCUA GUUGUCGGCA UGCAUGCAUG UUGGUGACGC AGCUAACGCA
UUAAGCACUC CGCCUGGGGA GUACGGUCGC AAGAUUAAAA CUCAAAGAAA
UUGACGG

>C_6_E4 407 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGA AGGGGGCUAG CGUUGCUCGG AAUUCUGGG
CGUAAAAGGCG GCGUAGGCGG ACAGUUAAGU UGGGGGUGAA AGCCCCGGGC
UCAACCUCGG AAUUGCCUUC AAUAAUGGCU GUCUUGAGUA CGGGAGAGGU
GAGUAGAACU CCGAGUGUAG AGGUGAAAU CGUAGAUUUC CGGAAGAACA
CCAGUGGCGA AGGCGACUCA CUGGCCCGUU ACUGACGCUG AGGCGCGAAA
GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCCGUAACG
AUGAGUGCUA GUUGUCGGCA UGCAUGCAUG UCGGUGACGC AGCUAACGCA
UUAAGCACUC CGCCUGGGGA GUACGGUCGC AAGAUUAAAA CUCAAAGAAA
UUGACGG

>C_6_C6 408 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACAG AGGGUGCAAG CGUUAUUCGG AAUUCUGGG
CGUAAAAGCGU GCGUAGACGG UUACAUAGU CGGGUGUGAA AGCCCCGGGC
UCAACCUUGGG AAUUGCAUUC GAGACUGCGU AGCUAGGGUG CGGAAGAGGG
AAGCGGAAU UCCGGUGUAG CGGUGAAAUG CGUAGAUUUC GGAAGGAACA
CCAGUGGCCA AAGCGGCUUC CUGGUCCAGC ACCGACGUUC AGGCACGAAA
GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCCAUAAACG
AUGAGAACUA GACGUUGAAG GGGUAAAGCC UCCAGUGUCG UAGCUAACGC
GCUAAGUUCU CCGCCUGGGG AGUACGGCCG CAAGGUUGAA ACUCAAGAA
AUUGACGG

>C_6_F5 405 bp
CAGCCGCGGU AAUACAGAGG GUGCGAGCGU UAAUCGGAU UACUGGGCGU
AAAGCGCACG UAGAUGGCUU UGUAAGUCGG AUGUGAAAUC CCCGGGCUCA
ACCUGGGAAAC UGCAUUCGAA ACUGCAUUGC UCGAAUGUGG AAGAGGGAAG
CGGAAUUGCA GGUGUAGCGG UGAAAUGCGU AGAUUUCUGG AGGAACAUCA
GUGGCGAAGG CGGCUUCCUG GUCCAACAUC GACAUUCAGG UGCGAAAGCG
UGGGGAGCAA ACAGGAUUG AUACCCUGGU AGUCCACGCC AUAAACGAUG
AGAACUAGAU GUCGGGCGGG UUAGCCGUCC GGUGUCGCAG CUAACGCGUU
AAGUUCUCCG CCUGGGGAGU ACGGCCGCAA GGUUGAAACU CAAAGGAAU
GACGG

>C_7_A7 410 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGGGGCAAG CGUUAUCCGG AUUUACUGGG
UGUAAAAGGGA GCGUAGGCGG CGGUGCAAGU CAGCAGUGAA AACCCGGGGC
CCAACUCCGG GCAUGCUGUU GAAACUGCAU UGCUUGAUUC CGGGAGGGGU
AAGCGGAAU CCUGGUGUAG CGGUGAAAUG CGUAGAUUUC AGGAGGAACA
CCGGUGGCCA AGGCGGCUUA CUGGACCGGC AAUGACGCUG AGGCUCGAAA
GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCCGUAAACG
AUGAAUACUA GGUGUCCGUG GGCAUGAAGC CCGGGGUGC CGCCGAAAC
GCAUUAAGUA UUCCACCUGG GGAGUACGUU CGCAAGAAUG AAACUCAAU
AAAUUGACGG

>C_7_E7 407 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGA AGGGGGCUAG CGUUGCUCGG AAUUCUGGG
CGUAAAAGGGC GCGUAGGCGG ACAGUUAAGU UGGGGGUGAA AGCCCCGGGC
UCGACCUCGG AAUUGCCUUC AAUACUGGCU GUCUUGAGUA CGGGAGAGGU
GAGUGGAACU CCGAGUGUAG AGGUGAAAU CGUAGAUUUC CGGAAGAACA
CCAGUUGCGA AGGCGACUCA CUGGCCCGUU ACUGACGCUG AGGCAGGAAA
GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCCGUAAACG
AUGAGUGCUA GUUGUCGGCA UGCAUGCAUG UCGGUGACUC AGCUAACGCA
UUAAGCACUC CGCCUGGGGA GUACGGUCGC AAGAUUAAAA CUCAAUAAA
UUGACGG

>C_7_B8 405 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGG AGGAUCCGAG CGUUAUCCGG AUUUUUGGG
UUUAAAAGGGU GCGUAGGCGG CCUGUUAAGU CAGAGGUGAA AGGCGGUAGC
UUAACUACUG GAGUGCUIUU GAUACUGACG GGCUIUGAAUG CAGCUGAGGU
AGGCGGAAUG UGACAAGUAG CGGUGAAAUG CAUAGAUUUG UCACAGAACA
CCAAUUGCGA AGGCAGCUUA CUAAAGUGUG AUUGACGCUG AGGCACGAAA
GCGUGGGGGAU CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCCCUAAACG
AUGAAUACUC GAUGUUGGCG AUUACGGUC AGCGUCUAG CGAAAGCGUU
AAGUAUUGCA CCUGGGGAGU ACGCCCCGAA GGGUGAAACU CAAUAAAU
GACGG

>C_7_D8 408 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGGGGCAAG CGUUAUUCGG AUUUACUGGG
UGUAAAAGGGU GCGUAGGCGG CGGUGCAAGU CAGCAGUGAA AACCCGGGGC
CCAACUCCGG GCAUGCUGUU GAAACUGCAU UGCUUGAUUC CGGGAGGGGU
AAGCGGAGUU CCUGGUGUAG CGGUGAAAUG CGUAGAUUUC AGGAGGAACA
CCGGUGGCCA AGGCGGCUUA CUGGACCGGC AAUGACGCUG AGGCUCGAAA
GCGUGGGGAG CAAACAUGAU CAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCCGUAAACG
AUGAAUACUA GGUGUUGGCU UCCAUGGGGA GUCGGUGCCG CAGCAAACGC
AAUAAGUAU CCACCUGGGG AGUACGUUCG CAAGAAUGAA ACUCAAGAA
AUUGACGG

>C_7_D7 412 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGGGGCAAG CGUUAUCCGG AUUUACUGGG
CGUAAAAGGGA GCGUAGGCGG CGGUACAAGU CAGCAGUGAA AACCCGGGGC
CCAACUCCGG GCAUGCUGUU GAAACUGCAU UGCUUGAUUC CGGGAGGGGU
AAGCGGAAU CCUGGUGUAG CGGUGAAAUG CGUAGAUUUC AGGAGGAACA
CCGGUGGCGA AGGCGGCUUA CUGGACCGGC AAUGACGCUG AGGCUCGAAA
GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAAAUACCCU GGUAGUCCAC GCCGUAACG
AUGAAUACUA GGUGUCCGUG GGCUAUGAAG CCCGGGGGUG CUCGCCGCAA
ACGCAUUAGG UAUUCCACCU GGGGAGUACG UUCGCAAGAA UGAAACUCAA
AGAAAUUGAC GG

>C_7_F8 410 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGGGGCAAG CGUUAUCCGG AUUUACUGGG
UGUAAAAGGGA GCGUAGGCGG CGGUGCAAGU CAGCAGUGAA AACCCGGGGC
CCAACUCCGG GCAUGCUGUU GAAACUGCAU UGCUUGAUUC CGGGAGGGGU
AAGCGGAAU CCUGGUGUAG CGGUGAAAUG CGUAGAUUUC AGGAGGAACA
CCGGUGGCGA AGGCGGCUUA CUGGACCGGC AAUGACGCUG AGGCUCGAAA
GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCCGUAACG
AUGAAUACUA GGUGUCCGUG GGCAUGAAGC CCGGGGGUGC CGCCGCAAAC
GCAUUAAGUA UUCCACCUAGG GGAGUACGUU CGCAAGAAUG AACUCAAAG
AAAUUGACGG

>C_7_A9 409 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGGGGCAAG CGUUAUCCGG AUUUACUGGG
UGUAAAAGGGA GCGUAGGCGG CGGUGCAAGU CAGCAGUGAA GACCCGGGGC
CCAACUCCGG GCAUGCUGUU GAAACUGCAU UGCUUGAUUC CGGGAGGGGU
AAGCGGAAU CCUGGUGUAG CGGUGAAAUG CGUAGAUUUC AGGAGGAACA
CCGGUGGCGA AGGCGGCUUA CUGGACCGGC AAUGACGCUG AGGCUCGAAA
GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCUCGUAAC
GAUGAAUGCU AGGUGUUGGC AGCUAUGAGC UGUCGGUGCC GCCGUAACG
CAUUAAGCAU UCCACCUAGG GAGUACGUUC GCAAGAAUAA AACUCAAGA
AAUUGACGG

>C_7_D9 405 bp
CAGCCGCGGU AAUACAGAGG GUGCGAGCGU UAAUCGGAUU UACUGGGCGU
AAAGCGCGG UAGGUGGCUA AUUAAGUCA AUGUGAAUUC CCCGAGCUUA
ACUUGGGAAU UGCAUUCGAU ACUGGUUAGC UAGAGUAUGG GAGAGGAUGG
UAGAAUCCA GGUGUAGCGG UGAAAUGCGU AGAGAUCUGG AGGAAUACCG
AUGGCGAAG CAGCAUCUG GCCUAAUACU GACACUGAGG UGCGAAAGCA
UGGGGAGCAA ACAGAUUAG AUACCCUGGU AGUCCAUGCC GUAAACGAUG
UCUACUAGCC GUUGGGGCCU UUGAGGCUU AGUGGCGCAG CUAACGCGAU
AAGUAGACCG CCUGGGGAGU ACGGUCGCAA GACUAAAACU CAAAUGAAU
GACGG

>C_8_A1 408 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGGGGCAAG CGUUAUCCGG AUUUACUGGG
UGUAAAAGGGA GCGUAGACGG GAUGGCAAGU CUGGAGUGAA AUCCUGCGGC
UUAACCGCAG AAUUGCUIUG GAAACUGUCA ACCUGGAGUG UCGGAGAGGU
AAGCGGAAU CCUAGUGUAG UAGUGAAAUG CGUAGAGAUU AGGAAGAACA
CCGGAGGCGA AGGCGGCUUA CUGGACGAUA ACUGACGUUG AGGCUCGAAA
GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUUCCU GGUAGUCCAC GCCGUAACG
AUGAAUACUA GGUGUCGGCA UGCGAAGCAU GUCGGUGCCG CCGCUAACGC
AUUAAGUAU CCACCUAGGG AGUACGUUCG CAAGAAUGAA ACUCAAGGA
AUUGACGG

>C_8_B1 408 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AUGUGGCAAG CGUUAUCCGG AUUUACUGGG
UGUAAAAGGGA GCGUAGACGG UAAUACAAGU CUGGAGUGAA AGGCAUGGGC
UCAACCGUG GACUGUCUG GAAACUGUAU AACUAGAGUA CCGGAGGGGU
AAGCGGAAU CCUGGUGUAG CGGUGAAAUG CGUAGAUUUC AGGAGGAACA
CCGGUGGCGA AGGCGGCUUA CUGGACGGAA ACUGACGUUG AGGCUCGAAA
GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCCCUAACG
AUGAAUGCUA GGUGUUGGCA GCUAUGAGCU GUCGGUGCCG CCGCUAACGC
AUUAAGCAU CCACCUAGGG AGUACGUUCG CAAGAAUAAA ACUCAAGGA
AUUGACGG

>C_8_G3 409 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGGGGCAAG CGUUAUCCGG AUUUACUGGG
UGUAAAAGGGA GCGCAGACGG UGAUGUAAGU CUGAAGUGAA ACCCCACGGC
UCAACUGUGG GCUUGC UUUG GAAACUAUUAU GACUAGAGUA CUGGAGAGGU
AAGCGGAAU CCUAGUGUAG CGGUGAAAUG CGUAGAUUUAU AGGAGGAACA
UCGGUGGCCA AGGCGGCUUA UUGGACAGCA GCUGACGUUG AGGCUCGAA
GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCCGUAACG
AUGAAUACUA GGUGUUGGGU UCCAAUAGGG AUUCGGUGCC GCAGCUAACG
CAAUAAGUAU UCCACCUGGG GAGUACGUUC GCAAGAAUGA AACUCAAUA
AAUUGACGG

>C_8_H1 408 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AUGGGGCAAG CGUUAUCCGG AUUUACUGGG
UGUAAAAGGGA GCGUAGACAG UAAUACAAGU CUGGAGUGAA AGGCAUGGGC
UCAACCUUGUG GACUGCUCUG GAAACUGUAU AACUAGAGUA CCGGAGGGGU
AAGCGGAAU CCUGGUGUAG CGGUGAAAUG CGUAGAUUUAU AGGAGGAACA
CCGGUGGCCA AGGCGGCUUA CUGGACGGAA ACUGACGUUG AGGCUCGAAA
GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCCGUAACG
AUGAAUGCUA GGUGUUGGCA GCUAUGAGCU GUCGGUGCCG CCGCUAACG
AUUAAGCAU CCACCUGGGG AGUACGUUCG CAAGAAUAAA ACUCAAUA
AUUGACGG

>C_8_C2 409 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGGGGCAAG CGUUAUCCGG AUUUACUGGG
UGUAAAAGGGA GUGUAGGCGG CUGUGCAAGU CAGAAGUGAA AGCCCGGGGC
UUAACCCCGG GACUGCCUUU GAAACUGCAU AGCUUGAGUG CAGGAGAGGU
AAGCGGAAU CCUAGUGUAG CGGUGAGAUG CGUAGAUUUAU AGGAAGAACA
CCGGUGGCCA AGGCGGCUUA CUGGGCUGAG ACUGACGCUG AGGCUCGAAA
GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCCGUAACG
AUGAAUACCA GGUGCUGGGG ACUGAAUAGU CUUCGGUGCC GAAGCAAACG
CAUUAAGUAU UCCACCUGGG GAGUACGUUC GCAAGAAUGA AACUCAAUA
AAUUGACGG

>C_8_D2 408 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGGGGCAAG CGUUAUCCGG AUUUACUGGG
UGUAAAAGGGA GCGUAGGCGG CGGUGCAAGU CAGCAGUGAA AACCCGGGGC
CCAACUCCGG GCAUGCUGUU GAAACUGCAU UGCUUGACUC CGGGAGGGGU
AAGCGGAAU CCUGGUGUAG CGGUGAAAUG CGUAGAUUUAU AGGAAGAACA
UCAGUGGCCA AGGCGGCUUA CUGGACAGCA ACUGACGUUG AGGCCGAAA
GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCCGUAACG
AUGAAUACUA GGUGUUGGGG AGCAAAGCUC CUCGGUGCCG GCGCUAACG
AUUAAGUAU CCACCUGGGG AGUACGUUCG CAAGAAUAAA ACUCAAAGAA
AUUGACGG

>C_8_B3 408 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGGGGCAAG CGUUAUCCGG AUUUACUGGG
UGUAAAAGGGA GCGUAGGCGG CGGUGCAAGU CAGCAGUGAA AACCCGGGGC
CCAACUCCGG GCAUGCUGUU GAAACUGCAU UGCUUGAUUC CGGGAGGGGU
AAGCGGAAU CCUGGUGUAG CGGUGAAAUG CGUAGAUUUAU AGGAGGAACA
CCUGUGGCCA AGGCGGCUUA CUGGACGAUA ACUGACGCUG AGGCUCGAAA
GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCCGUAACG
AUGAAUACUA GGUGUUGGCU UCCAUAGGGA GUCGGUGCCG CAGCAAACG
AAUAAGUAU CCACCUGGGG AGUACGUUCG CAAGAAUGAA ACUCAAUA
AUUGACGG

>C_9_C4 406 bp
AGCAGCCCGG GUAAUACGUA GGGAGCGAGC GUUAUCCGGA UUUACUGGGU
GUAAAAGGUG CGUAGGCGGU UUGUUAAGUC AGAAGUGAAA UUUAGGGGCU
CAACCUUAA CGUGCUUCUG AAACUGAUGA ACUAGAGUGU GGGAGAGGAA
AGUGGAAUUC CGAGUUAAGC GGUGAAAUGC GUAGAGAUUC GGAGGAACAC
CAGUAGCGAA GGC GGCUUUC UGGACCAUAA CUGACGCUGA GGCACGAAAG
CGUGGGGAGC AAAUAGGAU AGAUACCCUG GUAGUCCACG CUGUAAACGA
UGAAUGCUAG GUGUCGGGGC UUACGGGUCU CGGUGCCGAA GUUAACACAU
UAAGCAUUC ACCUGGGAAG UACGAUCGCA AGAUUGAAAC UCAAAGAAU
UGACGG

>C_9_C5 408 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGGGGCAAG CGUUAUCCGG AUUUACUGGG
UGUAAAAGGGA GCGUAGACGG GAUGGCAAGU CUGAAGUGAA AUCCUGCGGC
UUAACCCGAG AAUUGCUUUG GAAACUGUCA AUCAGGAGUG UCGGAGAGGU
AAGCGGAAU CCUAGUGUAG UAGUGAAAUG CGUAGAGAUU AGGAAGAACA
CCGGAGGCGA AGGCGGCUUA CUGGACGAUA ACUGACGUUG AGGCUCGAAG
GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAAAUACCCU GGUAGUCCAC GCCGUAAACG
AUGAAUACUA GGUGUCGGCA UGCGAAGCAU GUCGGUGCCG CCGCUAACGC
AUUAAGUAU CCACCUGGGG AGUACGUUCG CAAGAAUGAA ACUCAAGGA
AUUGACGG

>C_10_B7 407 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGGUGCGAG CGUUAUCCGG AAUUACUGGG
CGUAAAAGCGU GCGCAGGCGG CUUUGCAAGA CCGAGGUGAA AUCCCCGGGC
UCAACCUGGG AACUGCCUUU GUGACUGCAA GGCUAGAGUA CGGCAGAGGG
GGAUGGAAU CCGCGUGUAG CAGUGAAAUG CGUAGAUUUG CCGAGGAACA
CCGAUGGCGA AGGCAAUCCC CUGGGCCUGU ACUGACACUC AUGCACGAAA
GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCCCUAAACG
AUGUCAACUG GUUGUUGGAC GGCUUGCUGU UCAGUAACGA AGCUAACGCG
UGAAGUUGAC CGCCUGGGGA GUACGGCCGC AAGGUUGAAA CUCAAAGAAA
UUGACGG

>C_10_D7 407 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGGUGCGAG CGUUAUCCGG AAUUACUGGG
CGUAAAAGCGU GCGCAGGCGG CUUUGCAAGA CAGAGGUGAA AUCCCCGGGC
UCAACCUGGG AACUGCCUUU GUGACUGCAA GGCUAGAGUA CGGCAGAGGG
GGAUGGAAU CCGCGUGUAG CAGUGAAAUG CGUAGAUUUG CCGAGGAACA
CCGAUGGCGA AGGCAAUCCC CUGGGCCUGU ACUGACGCUC AUGCACGAAA
GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCCCUAAACG
AUGUCAACUG GUUGUUGGAC GGCUUGCUGU UCAGUAACGA AGCUAACGCG
UGAAGUUGAC CGCCUGGGGA GUACGGCCGC AAGGUUGAAA CUCAAUAAA
UUGACGG

>C_10_F7 408 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACAG AGGGUGCAAG CGUUAUCCGG AAUUACUGGG
CGUAAAAGCGU GCGUAGACGG UUAUAUAGU CGGGUGUGAA AGCCCCGGGC
UCAACCUGGG AAUUGCAUUC GAGACUGCGU AGCUAGGGUG CGGAAGAGGG
AAGCGGAAU UCCGGUGUAG CCGUGAAAUG CGUAGAUUUC GGAAGGAACA
CCAGUGGCGA AAGCGGCUUC CUGGUCCAGC ACCGACGUUC AGGCACGAAA
GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCCUAAACG
AUGGGCACUA GACGUUGAAG GGGUAAGCCC UCCAGUGUCG UAGCUAACGC
GCUAAGUGCC CCGCCUGGGG AGUACGGCCG CAAGGUUGAA ACUCAAUAA
AUUGACGG

>C_10_D9 411 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACAG AGGGUGCAAG CGUUGUUCGG AAUUACUGGG
CGUAAAAGCGU GCGUAGUCGG UAUUGAGAGU CACGGGUGAA AUCCCAGGGC
UUAACCCUGG AACUGCCUGU GAGACCUCAG UACUAGAGUG UGAGAGGGGA
UAGUGGAAUA CCCAGUGUAG CCGUGAAAUG CGUAGAGAUU GGGUGGAACA
CCGGUGGCGA AGGCGGCUAU CUGGCUCACA ACUGACGAUC AGGCACGAAA
GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCCGUAAACU
AUGCACACAA GCUGUAGUGG GAUUUUACUC UCUGCUGUGG CGAAGCUAAC
GCAAUUGAGUG UGCCACCUGG GGAGUGCGGU CGCAAGACUA AAACUCUAAA
UAAAUUGACG G

>C_11_A10 408 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGGGGCAAG CGUUAUCCGG AUUUACUGGG
UGUAAAAGGGA GCGCAGACGG GCGAGCAAGU CUGAAGUGAA AGCCCCGGGC
UUAACUCCGG GAAACUGCUG UGCUUGAGUA UCGGAGGGGC
AGGCGGAAU CCCAGUGUAG CCGUGAAAUG CGUAGAUUUG GGAAGAACA
CCGGUGGCGA AGGCGGCCUG CUGGACGAUA ACUGACGUUG AGGCUCGAAG
GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCGUAAACG
AUGAAUACUA GGUGUUGGCA UCCAAAGGAU GUCGGUGCCG GCGCAAACGC
AUUAAGUAU CCACCUGGGG AGUACGUUCG CAAGAAUGAA ACUCAAUAA
AUUGACGG

>C_11_B10 406 bp
GCUUGCCGCG GUAAUACGAA GGGGGCUAGC GUUGCUCGGA AUUACUGGGC
GUAAAAGGGCG CGUAGGCGGA CAGUUAAGUU GGGGGUGAAA GCCCGGGGCU
CAACCUCGGA AUUGCCUUCA AUACUGGCUG UCUUGAGUAC GGGAGAGGUG
AGUGGAAACUC CGAGUGUAGA GGUGAAAUUC GUAGAUAUUC GGAAGAACAC
CAGUGGCGAA GGCGACUCAC UGGCCC GUUA CUGACGCUGA GGCGCGAAAG
CGUGGGGAGC AAACAGGAU AGAUACCCUG GUAGUCCACG CCGUAAACGA
UGAGUGCUAG UUGUCGGCAU GCAUGCAUGU CGGUGACGCA GCUAACGCAU
UAAGCACUCC GCCUGGGGAG UACGGUCGCA AGAUUAAAAC UCAAAGAAU
UGACGG

>C_11_F10 408 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGGGGCAAG CGUUAUCCGG AUUUACUGGG
UGUAAAAGGGA GCGCAGACGG CGCAGCAAGU CUGAAGUGAG AGCCCGGGGC
UUAACUCCGG GACUGCUUUG GAAACUGCUG UGCUUGAGUA UCGGAGGGGC
AGGCGGAAU CCCAGUGUAG CGGUGAAAUG CGUAGAUAUU GGAAGAACA
CCGGUGGCGA AGGCGGCCUG CUGGACGAUA ACUGACGUUG AGGUCGAAG
GCGUGGGGAG CAAACUGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCGUAAACG
AUGAGUACUA GGUGUUGGCA UCCAAAGGAU GUCGGUGCCG GCGCAAACGC
AUUAAGUAU CCACCUGGGG AGUACGUACG CAAGAAUGAA ACUCAAGAA
AUUGACGG

>C_11_D12 408 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGGGGCAAG CGUUAUCCGG AUUUACUGGG
UGUAAAAGGGA GCGCAGACGG CGCAGCAAGU CUGAAGUGAA AGCCCGGGGC
UUAACUCCGG GACUGCUUUG GAAACUGCUG UGCUUGAGUA UCGGAGGGGC
AGGCGGAAU CCCAGUGUAG CGGUGAAAUG CGUAGAUAAU GGAAGAACA
CCGGUGGCGA AGGCGGCCUG CUGGACAAUA ACUGACGUUG AGGUCGAAG
GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCGUAAACG
AUGAAUACUA GGUGUUGGCA UCCAAAGGAU GUCGGUGCCG GCGCAAACGC
AUUAAGUAU CCACCUGGGG AGUACGUUCG CAAGAAUGAA ACUCAAUAA
AUUGACGG

>C_11_H11 407 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGGUGCGAG CGUUAUCCGG AAUACUGGG
CGUAAAAGCGU GCGCAGAGCG GCUUUGCAAG ACAGAGGUGA AAUCCCGGG
CUCAACCCUG GAACUGCCU UGUGACUGCA AGGCUAGAGU ACGGCAGAGG
GGGAUGGAAU UCCGCGUGUA GCAGUGAAU GCGUAGAUAU GCGGAGGAAC
ACCGAUGGCG AAGCAAUCC CUUGGGCCUG UACUGACGCU CAUGCACGAA
AGCGUGGGGA GCAAACAGGA UAGAUACCC UGGUAGUCCA CGCCUAAAC
GAUGUCAACU GGUGUUGGGA CGGCUUGCUG UUCAGUAACG AAGCUACGCG
UGAAGUUGAC CGCCUGGGGA GUACGGCCGC AAGGUUGAAA CUCAAAGAA
UUGACGG

>C_12_B1 408 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AUGGUGCAAG CGUUAUCCGG AUUUACUGGG
UGUAAAAGGGA GCGCAGGCGG UACGGCAAGU CUGAUGUGAA AGCCCGGGGC
UCAACCCUG UACUGCAUUG GAAACUGUC AACUAGAGUG UCGGAGGGGU
AAGUGGAAU CCUAGUGUAG CGGUGAAAUG CGUAGAUAUU AGGAGGAACA
CCAGUGGCGA AGGCGGCUUA CUGGACGAUC ACUGACGCUG AGGUCGAAA
GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCGUAAACG
AUGAAUACUA GGUGUCGGGA GGCAUUGCCU UUCGGUGCCG UCGCUAACGC
AGUAAGUAU CCACCUGGGG AGUACGUUCG CAAGAAUGAA ACUCAAGAA
AUUGACGG

>C_12_G1 408 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AUGGUGCAAG CGUUAUCCGG AUUUACUGGG
UGUAAAAGGGA GCGCAGGCGG UACGGCAAGU CUGAUGUGAA AGCCCGGGGC
UCAACCCUG UACUGCAUUG GAAACUGUC AACUAGAGUG UCGGAGGGGU
AAGUGGAAU CCUAGUGUAG CGGUGAAAUG CGUAGAUAUU AGGAGGAACA
CCAGUGGCGA AGGCGGCUUA CUGGACGAUC ACUGACGCUG AGGUCGAAA
GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCGUAAACG
AUGAAUACUA GGUGUCGGGA GGCAUUGCCU UUCGGUGCCG UCGCUAACGC
AGUAAGUAU CCACCUGGGG AGUACGUUCG CAAGAAUGAA ACUCAAGGA
AUUGACGG

>C_12_E2 408 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AUGGUGCAAG CGUUAUCCGG AUUUACUGGG
UGUAAAAGGGA GCGCAGGCGG UACGGCAAGU CUGAUGUGAA AGCCCGGGGC
UCAACCCCGG UACUGCAUUG GAAACUGUCG AACUAGAGUG UCGGAGGGGU
AAGUGGAAU CCUAGUGUAG CGGUGAAAUG CGUAGAUUU AGGAGGAACA
CCAGUGGCGA AGGCGGCUUA CUGGACGAUC ACUGAUGCUG AGGCUCGAAA
GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCCGUAACG
AUGAAUACUA GGUGUCGGGA GGCAUUGCCU UUCGGUGCCG UCGCUAACGC
AGUAAGUAU CCACCGGGG AGUACGUUCG CAAGAAUGAA ACUCAAAUAA
AUUGACGG

>C_12_A1 407 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AUGGUGCAAG CGUUAUCCGG AUUUACUGGG
UGUAAAAGGGA GCGCAGGCGG UACGGCAAGU CUGAUGUGAA AGCCCGGGGC
UCAACCCCGG UACUGCAUUG GAAACUGUCG AACUAGAGUG UCGGAGGGGU
AAGUGGAAU CCUAGUGUAG CGGUGAAAUG CGUAGAUUU AGGAGGAACA
CCAGUGCGAA GCGGCGUAC UGGACGAUCA CUGACGCUGA GGCUCGAAAG
CGUGGGGAGC AAACAGGAU AGAUACCCUG GUAGUCCACG CCGUAAACGA
UGAAUACUA GUGUUGGGUA GCGAAGCUAU UCAGUGCCGG CGCAAACGCA
AUAAGUAUUC CACCGGGGA GUACGUUCG AAGAAUGAA CUCAAUGAA
UUGACGG

>C_12_H1 408 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGG AGGGUGCAAG CGUUAUCCGG AAUUACUGGG
CGUAAAAGCGU GCGUAGGCGG CUUGUUCAGU CAGAUGUGAA AGCCUGGGC
UUAACCGGG AACUGCAUUU GAUACUGGCA GGCUAGAGUU UAGUAGAGGG
GAGUGGAAU UCAGGUGUAG CGGUGAAAUG CGUAGAGGUC UGAAGGAACA
CCAGUGGCGA AGGCGGCUCC CUGGACUAAA ACUGACGCUG AGGUACGAAA
GCGUGGGUAG CAAACAGGAU UAGAUACCCA GGUAGUCCAC GCCGUAACG
AUGUCAACUA ACCGUUGGGU UCUUAAAGAA CUUAGUGGUG GAGCUAACGU
AUUAAGUUGA CCGCCUGGGG AGUACGGCCG CAAGGCUAAA ACUCAAAUAA
AUUGACGG

>C_12_F3 407 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGG AGGGAGCUAG CGUUAUCCGG AAUUACUGGG
CGUGAAGCGC ACGUAGGCGG CUUUGUAAGU UAGAGGUGAA AGCCUGGAGC
UCAACUCCAG AAUUGCCUUU AAGACUGCAU CGCUUGAAUC CAGGAGAGGU
GAGUGGAAU CCGAGUGUAG AGGUGAAAU CGUAGAUUU CGGAAGAACA
CCAGUGGCGA AGGCGGCUCA CUGGACUGGU AUUGACGCUG AGGUGCGAAA
GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCCGUAACG
AUGAUAAACUA GCUGUCGGGG CUCUAGAGC UUCGGUGGCG CAGCUAACGC
AUUAAGUUAU CCGCCUGGGG AGUACGGCCG CAAGGUUAAA AUCAAAGAAA
UUGACGG

>C_13_A4 408 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGGGGCAAG CGUUAUCCGG AUUUACUGGG
UGUAAAAGGGA GCGUAGACGG UAAAGCAAGU CUGAAGUGAA AGCCCGCGGC
UCAACUGCGG GACUGCUUUG GAAACUGUUU AACUGGAGUG UCGGAGAGGU
AAGUGGAAU CCUAGCGUAG CGGUGAAAUG CGUAGAUUU AGGAGGAACA
CCAGUGGCGA AGGCGACUUA CUGGACGAUA ACUGACGUUG AGGCUCGAAA
GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCCGUAACG
AUGAAUACUA GGUGUUGGGG AGCAAAGCUC UUCGGUGCCG UCGCAAACGC
AGUAAGUAU CCACCGGGG AGUACGUUCG CAAGAAUGAA ACUCAAGAA
AUUGACGG

>C_13_D4 408 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGGGGCAAG CGUUAUCCGG AUUUACUGGG
UGUAAAAGGGA GCGCAGACGG UAAAGCAAGU CUGAAGUGAA AGCCCGCGGC
UCAACUGCGG GACUGCUUUG GAAACUGUUU AACUAGAGUG CUGGAGAGGU
AAGCGGAAU CCUAGUGUAG CGGUGAAAUG CGUAGAUUU AGGAAGAACA
UCAGUGGCGA AGGCGGCUUA CUGGACAGUA ACUGACGUUC AGGCUUGAAA
GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCCGUAACG
AUGAAUACUA GGUGUCGGGG GGCAAAGCCC UUCGGUGCCG CCGCAAACGC
AAUAAGUAU CCACCGGGG AGUACGUUCG CAAGAAUGAA ACUCAAGAA
AUUGACGG

```

>C_13_B5      409 bp
CAGCAGCCGC  GGUAAUACGU  AGGGGGCAAG  CGUUAUCCGG  AUUUACUAGG
GUGUAAAAGGG  GCGCAGACG  GCGAUGCAAG  UCUGAAGUGA  AAUCCACGG
CUCAACUGUG  GAAUUGCUUU  GGAAACUGUU  UGGCUAGAGU  ACUGGAGAGG
UAAGCGGAAU  UCCUGGUGUA  GCGGUGAAAU  GCGUAGAUAU  CAGGAAGAAC
AUCAGUGGCG  AAGGCGGCUU  ACUGGACAGC  AACUGACGUU  GAGGCCCGAA
GGCGUGGGGA  GCAAACAGGA  UUAGAUACCC  UGGUAGUCCA  CGCCGUAAAC
GAUGAAUACU  AGGUGUUGGG  GAGCAAAGCU  CUUCGGUGCC  GGCGCUAACG
CAUUAAGUAU  UCCACCUGGG  GAGUACGUUC  GCAAGAAUAA  AACUCAAAUA
AAUUGACGG

>C_13_E5      409 bp
CAGCAGCCGC  GGUAAUACGU  AGGGGGCAAG  CGUUAUCCGG  AUUUACUAGG
GUGUAAAAGGG  AGCGUAGACG  GUAAGCAAG  UCUGAAGUGA  AAGCCCGCGG
CUCAACUGCG  GGACUGCUUU  GGAAACUGUU  UAACUGGAGU  GUCGGAGAGG
UAAGUGGAAU  UCCUAGUGUA  GCGGUGAAAU  GCGUAGAUAU  AAGGAGGGAC
ACCAGUGGCG  AAGGCGACUU  ACUGGACGAU  AACUGACGUU  GAGGCUCGAA
AGCGUGGGGA  GCAAACAGGA  UUAGAUACCC  UGGUAGUCCA  CGCCGUAAAC
GAUGAAUACU  AGGUGUUGGA  UAGCAUAGCU  AUUCGGUGCC  GCAGCUAACG
CAAUAAGUAU  UCCACCUGGG  GAGUACGUUC  GCAAGAAUGA  AACUCAAAUA
AAUUGACGG

>C_13_D6      405 bp
CAGCAGCCGC  GGUAAUACGG  AGGAUCCGAG  CGUUAUCCGG  AUUUAUUGGG
UUUAAAAGGGU  GCGUAGGCGG  CCUGUUAAGU  CAGAGGUGAA  AGGCGGUAGC
UUAACUAUCG  GAGUGCCUUU  GAUACUGACG  GGCUUGAAUG  CAGCUGAGGU
AGGCGGAAUG  UGACAAGUAG  CGGUGAAAUG  CAUAGAUUAG  UCACGGAACA
CCAAUUGCGA  AGGCAGCUUA  CUAAAGUGUG  AUUGACGCUG  AGGCACGAAA
GCGUGGGGAU  CAAGCAGGAU  UAGAUACCCU  GGUAGUCCAC  GCCCUAAACG
AUGAAUACUC  GAUGUUGGCG  AUAUACGGUC  AGCGUCUAA  CGAAAGCGUU
AAGUAUUGCA  CCUGGGGAGU  ACGCCCGCAA  GGGUGAAACU  CAAUUGAAUU
GACGG

>C_14_D7      407 bp
CAGCAGCCGC  GGUAAUACGU  AGGCAGCAAG  CGUUGUCCGG  AGUUACUGGG
CGUAAAAGAGU  GCGUAGGCGG  UGCCCUAAGU  CUGUUGUGAA  AUCUCCCGGC
UUAACUGGGA  GGGUGCGGUG  GAAACUGGGG  UGCUUGAGAG  UGGGAGAGGU
UAGCGGAAUU  CCUGGUGUAG  CGGUGAAAUG  CGUAGAUUUC  AGGAGGAACA
CCGGUGGUGU  AGACGGCUGA  CUGGACCACG  ACUGACGCUG  AGGCACGGAA
GCGUGGGUAG  CAAACAGGAU  UAGAUACCCU  GGUAGUCCAC  GCCCUAAACG
AUGCAUACUU  GGUGUGAGCC  AUUCAUUUGG  UUCGUGCCGG  AGCUAACCGG
UUAAGUAUUG  CGCCUGGGGA  GUACGGUCGC  AAGGCUGAAA  CUCAAUAAA
UUGACGG

>C_14_G7      407 bp
AGCAGCCGCG  GUAAUACGUA  GGGGGCAAGC  GUUAUCCGGA  UUUACUGGGU
GUAAAAGGGAG  CGUAGACGGC  GAAGCAAGUC  UGAAGUGAAA  ACCCAGGGCU
CAACCCUGGG  ACUGCUUUGG  AAACUGCUUU  GCUAGAGUGU  CGGAGAGGUA
AGUGGAAUUC  CUAGUGUAGC  GGUGAAAUGC  GUAGAUUUA  GGAGGAACAC
CAGUGGCGAA  GCGGCUUAC  UGGUCGAUAA  CUGACGUUGA  GGCUCGAAAG
CGUGGGGAGC  AAACAGGAU  AGAUACCCUG  GUAGUCCACG  CCGUAAACGA
UGAAUACUAG  GUGUCGGCAU  GCGAAGCAUG  UCGGUGCCGC  CGCUAACGCA
UUAAGUAUUC  CACCUGGGGA  GUACGUUCGC  AAGAAUGAAA  CUCAAUAAA
UUGACGG

>C_14_D8      408 bp
CAGCAGCCGC  GGUAAUACGU  AGGGGGCAAG  CGUUAUCCGG  AUUUACUGGG
UGUAAAAGGG  GCGUAAACGG  UAAAGCAAGU  CUGAAGUGAA  AGCCCGCGGC
UCAACUGCGG  GACUGCUUUG  GAAACUGUUU  AACUGGAGUG  UCGGAGAGGU
AAGUGGAAUU  CCUAGUGUAG  CGGUGAAAUG  CGUAGAUUUA  AGGAGGAACA
CCAGUGGCGA  AGGCGACUUA  CUGGACGAUA  ACUGACGUUG  AGGCUCGAAA
GCGUGGGGAG  CAAACAGGAU  UAGAUACCCU  GGUAGUCCAC  GCCGUAAACG
AUGAAUACUA  GGUGUUGGGG  AGCAAAGCUC  UUCGGUGCCG  UCGCAAACGC
AGUAAGUAUU  CCACCUGGGG  AGUACGUUCG  CAAGAAUGAA  ACUCAAAUGA
AUUGACGG

```

>C_14_C9 408 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGGGGCAAG CGUUAUCCGG AUUUACUGGG
UGUAUAGGGA GCGUAGACGG UAUAGCAAGU UUGAUGUGAA AACCCGGGGC
UCAACUCCGG GAUUGCAUUG GAAACUGUAG AACUAGAGUG UCGGAGGGGU
AAGUGGAAU CCUAGUGUAG CGGUGAAAUG CGUAGAUAUU AGGAGGAACA
CCAGUGGCGA AGGCGGCUUA CUGGACGAU ACUGACGCUG AGGCUCGAAA
GCAUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCCGUAACG
AUGAAUACUA GGUGUUGGCU UCCAUGAGGG GUCGGUGCCG CAGCCAACGC
AAUAAGUAU CCACCUAGGG AGUACGUUCG CAAGAAUGAA ACUCAAAUAA
AUUGACGG

>C_14_E7 406 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGGGGCAAG CGUUAUCCGG AUUUACUGGG
UGUAAAAGGG GCGCAGACGG CGAUGCAAGU CUGAAGUGAA AUCCCAGGGC
UCAACUGUGG AAUUGCUUUG GAAACUGUAU UGCUUGAGUG CUGGAGAGGU
AAGCGGAAU CCUGGUGUAG CGGUGAAAUG CGUAGAUAUU AGGAAGAACA
UCAGUGGCGA AGGCGGCUUA CUGGACAGCA GCUGACGUUG AGGCCCGAAA
GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCCGUAACG
AUGAAUACUA GGUGUUGGGG AGCAAAGCUC UUCGGUGCCG GCGCUAACGC
AUUAAGUAU CCACCUAGGG AGUGCGUUCG CAAGAAUAAA ACUCAAAUAA
AUUGAC

>C_14_H7 410 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGGGGCAAG CGUUAUCCGG AUUUACUGGG
UGUAAAAGGGA GCGUAGACGG CGAAGCAAGU CUGAAGUGAA AACCCAGGGC
UCAACCCUGG GACUGCUUUG GAAACUGUUU UGCUAGAGUG UCGGAGAGGU
AAGUGGAAU CCUAGUGUAG CGGUGAAAUG CGUAGAUAUU AGGAGGAACA
CCAGUGGCGA AGGCGGCUUA CUGGACUGUA ACUGACGUUG AGGCUCGAAA
GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCCGUAACG
AUGAAUACUA GGUGUCGGCA UGCGAAGCAU GUCGGUGCUC GCCGCUAACG
CAUUAAGUAU UCCACUCUGG GGAGUACGUU CGCAAGAAUG AAACUCAAAU
AAAUUGACGG

>C_14_A7 408 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGGGGCAAG CGUUAUCCGG AUUUACUGGG
UGUAAAAGGGA GCGUAGGCGG CAUGGCAAGU CAGAAGUGAA AGCCCAGGGC
UCAACUCCGG GAUUGCUUUU GAAACUGUCA AGCUUGAGUG UCGGAGAGGU
AAGUGGAAU CCUAGUGUAG CGGUGGAAUG CGUAGAUAUU AGGAGGAACA
CCAGUGGCGA AGGCGGCUUA CUGGACGAUA ACUGACGUUG AGGCUCGAAA
GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCCGUAACG
AUGAAUACUA GGUGUCGGCA UGCGAAGCAU GUCGGUGCCG CCGCUAACGC
AUUAAGUAU CCACCUAGGG AGUACGUUCG CAAGAAUGAA ACUCAAAUGA
AUUGACGG

>C_14_B9 409 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGGGGCAAG CGUUAUCCGG AUUUACUGGG
UGUAAAAGGGA GCGUAGACGG GAUGGCAAGU CUGAAGUGAA AUCCUGCGGC
UUAACCGCAG AAUUGCUUAG GAAACUGUCA ACCUGGAGUG UCGGAGAGGU
AAGCGGAAU CCUAGUGUAG UAGUGAAAUG CGUAGAGAUU AGGAAGAACA
CCGGAGGCGA AGGCGGCUUA CUGGACGAUA ACUUACGUUG AGGCUCGAAA
GCGUGGGGAG CAAACAGGAA UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCUGUAAACG
AUGAUUACUA GGUGUUGGGG AACAAUAGUU CUUCGGUGCC GUCGCUAACG
CAAUAAGUAA UCCACCUAGG GAGUACGUUC GCAAGAAUGA AACUCAAGA
AAUUGACG

>B_1_D1 407 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGGUGCGAG CGUUAUCCGG AUUUACUGGG
CGUAAAAGCG GCGCAGGCGG CUUUGCAAGA CAGAGGUGAA AUCCCAGGGC
UCAACUGGG AACUGCCUUU GUGACUGCAA GGCUAGAGUA CGGCAGAGGG
GGAUGGAAU CCGCGGUUAG CAGUGAAAUG CGUAGAUAUU CGGAGGAACA
CCGAUGGCGA AGGCAAUCCC CUGGGCCUGU ACUGACGCUC AUGCACGAAA
GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCCCUAAACG
AUGUCAACUG GUUGUUGGAC GGCUUGCUGU UCAGUACGA AGCUAACGCG
UGAAGUUGAC CGCCUGGGGA GUACGGCCGC AAGGUUGAAA CUCAAGAAA
UUGACGG

>B_1_D2 407 bp
 CAGCAGCCGC GGUAAUACGA AGGGGGCUAG CGUUGCUCGG AAUUACUGGG
 CGUAAAAGGC GCGUAGGCGG ACAGUUAAGU UGGGGGUGAA AGCCCCGGGC
 UCAACCUCGG AAUUGCCUUC AAUACUGGCU GUCUUGAGUA CGGGAGAGGU
 GAGUGGAAACU CCGAGUGUAG AGGUGAAAU CGUAGAUUU CGGAAGAACA
 CCAGUGGCGA AGGCGACUCA CUGGCCCGUU ACUGACGCUG AGGCGCGAAA
 GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCCGUAAACG
 AUGAGUGCUA GUUGUCGGCA UGCAUGCAUG UCGGUGACGC AGCUAACGCA
 UUAAGCACUC CGCCUGGGGA GUACGGUCGC AAGAUUAAAA CUCAAUAAA
 UUGACGG

>B_1_G1 407 bp
 CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGGUGCAAG CGUUAUUCGG AAUUACUGGG
 CGUAAAAGCGU GCGCAGGCGG UUAUGCAAGA CAGAGGUGAA AUCCCCGGGC
 UCAACCUGGG AACUGCCUUU GUGACUGCAU GGCUAGAGUA CGGUAGAGGG
 GGAUGGAAAU CCGCGUGUAG CAGUGAAAUG CGUAGAUUUG CGGAGGAACA
 CCGAUGGCGA AGGCAAUCCC CUGGACCGU ACUGACGCUC AUGCACGAAA
 GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCCCUAAACG
 AUGUCAACUG GUUGUUGGGA GGGUUCUUC UCAGUAACGU AGCUAACGCG
 UGAAGUUGAC CGCCUGGGGA GUACGGCCGC AAGGUUGAAA CUCAAUAAA
 UUGACGG

>B_1_C3 407 bp
 CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGGUGCGAG CGUUAUUCGG AAUUACUGGG
 CGUAAAAGCGU GCGCAGGCGG UUGUGCAAGA CAGAUGCAGAA AUCCCCGGGC
 UUAACCUGGG AACUGCAUUU GUGACUGCAC GGCUAGAGUG CGGCAGAGGG
 GAGUGGAAAU CCGCGUGUAG CAGUGAAAUG CGUAGAUGUG CGGAGGAACA
 CCGAUGGCGA AGGCAGCUCC CUGGGCCUCC ACUGACGCUC AUGCACGAAA
 GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCCCUAAACG
 AUGUCAACUG GUUGUUGGUC CUUCACUGGA UCAGAAACGU AGCGAACGCG
 UGAAGUUGAC CGCCUGGGGA GUACGGCCGC AAGGUUGAAA CUCAAUAAA
 UUGACGG

>B_2_A4 407 bp
 CAGCAGCCGC GGUAAUACGA AGGGGGCUAG CGUUGCUCGG AAUUACUGGG
 CGUAAAAGGC GCGUAGGCGG ACAGUUAAGU UGGGGGUGAA AGCCCCGGGC
 UCAACCUCGG AAUUGCCUUC AAUACUGGCU GUCUUGAGUA CGGGAGAGGU
 GAGUGGAAACU CCGAGUGUAG AGGUGAAAU CGUAGAUUU CGGAAGAACA
 CCAGUGGCGA AGGCGACUCA CUGGCCCGUU ACUGACGCUG AGGCGCGAAA
 GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCCGUAAACG
 AUGAGUGCUA GUUGUCGGCA UGCAUGCAUG UCGGUGACGC AGCUAACGCA
 UUAAGCACUC CGCCUGGGGA GUACGGUCGC AAGAUUAAAA CUCAAAGGAA
 UUGACGG

>B_2_G4 406 bp
 CAGCAGCCGC GGUAAUACGA AGGGGGCUAG CGUUGCUCGG AAUUACUGGG
 CGUAAAAGGC GCGUAGGCGG ACAGUUAAGU UGGGGGUGAA AGCCCCGGGC
 UCAACCUCGG AAUUGCCUUC AAUACUGGCU GUCUUGAGUA CGGGAGAGGU
 GAGUGGAAACU CCGAGUGUAG AGGUGAAAU CGUAGAUUU CGGAAGAACA
 CCAGUGGCGA AGGCGACUCA CUGGCCCGUU ACUGACGCUG AGGCGCGAAA
 GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCCGUAAACG
 AUGAGUGCUA GUUGUCGGCA UGCAUGCAUG UCGGUGACGC AGCUAACGCA
 UUAAGCACUC CGCCGGGGAG UACGGUCGCA AAGAUUAAAA UCAAAGAAU
 UGACGG

>B_2_D5 410 bp
 CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGGUGCGAG CGUUGUCCGG AUUUUUUGGG
 CGUAAAAGGC UCGUAGGUGG UUGAUCGCGU CGGAAGUGUA AUCUUGGGGC
 UUAACCCUGA CCGUGCUUUC GAUACGGGUU GACUUGAGGA AGGUAGGGGA
 GAAUGGAAAU CCUGUGGAG GCGUGGAAUG GCGAGAUUUC AGGAGGAACA
 CCAGUGGCGA AGGCGGUUCU CUGGGCCUUU CCUGACGCUG AGGAGCGAAA
 GCGUGGGGAG CGAACAGGCU UAGACACCCU GGUAGUCCAC GCUGUAAACG
 GUGGGUACUA GGUGUGGGGU CCAUCCACG GGUUCCGUGC CGUAGCUAAC
 GCUUUAAAGUA CCCC GCCUGG GGAGUACGGC CGCAAGGCUA AAACUCAAG
 AAAUUGACGG

>B_2_B4 408 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGGUGCAAG CGUAAUUCGG AAUACUGGG
CGUAAAGCGU GCGCAGGCGG UUAUGCAAGA CAGAGGUGAA AUCCCCGGGC
UCAACCUGGG AACUGCCUUU GUGACUGCAU GGCUAGAGUA CGGUAGAGGG
GGAUGGAAAU CCGCGUGUAG CAGUGAAAUG CGUAGAUUUG CGGAGGAACA
CCGAUGGCCG AGGCAAUCCC CUGGACCUGU ACUGACGCUC AUGCACGAAA
GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCCCUAAACG
AUGUCAACUG GUUGUUGGGA GGGUUUCUUC UCUAGUAACG UAGCUAACGC
GUGAAGUUGA CCGCCUGGGG AGUACGGCCG CAAGGUUGAA ACUCAAAUGA
AUUGACGG

>B_2_E5 411 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGGUGCGAG CGUUGUCCGG AUUUUUGGG
CGUAAAGGGC UCGUAGGUGG UUGAUCGCGU CGGAAGUGUA AUCUUGGGGC
UUAACCCUGA GCGUGCUUUC GAUACGGGUU GACUUGAGGA AGGUAGGGGA
GAAUGGAAAU CCUGGUGGAG CGGUGGAAUG CGCAGAUUUC AGGAGGAACA
CCAGUGGCCG AGGCGGUUCU CUGGGCCUUU CCUGACGCUC AGGAGCGAAA
GCGUGGGGAG CGAACAGGCU UAGACACCCU GGUAGUCCAC GCUGUAAACG
GUGGGUACUA GGUUGGGGUU CCAUUCACG GGUUCCGUGC UCGUAGCUAA
CGCUUUAAGU ACCCCGCCUG GGGAGUACGG CCGCAAGGCU AAAACUCAA
GAAAUUGACG G

>B_2_F5 411 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGA AGGGGGCUAG CGUUGCUCGG AAUACUGGG
CGUAAAGGGC GCGUAGGCGG ACAGUUAAGU GGGGGGUGAA AGCCCGGGGC
UCAACCUCGG AAUUGCCUUC AAUACUGGCU GUCUUGAGUA CGGGAGAGGU
GAGUGGAAAU CCGAGUGUAG AGGUGAAAU CGUAGAUUUC CGGAAGAACA
CCAGUGGCCG AGGCGACUCA CUGGCCCGUU ACUGACGCUC AGGCGCGAAA
GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCUCGUAAC
GAUGAGUGCU AGUUGUCGGC UAUGCUAUGC UAUGCUGGUG ACGCAGCUAA
CGCAUUAAGC ACUCCGCCUG GGGAGUACGG UCGCAAGAUU AAAACUCAA
GAAAUUGACG G

>B_2_D6 408 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGA AGGGGGCUAG CGUUGCUCGG AAUACUGGG
CGUAAAGGGC GCGUAGGCGG ACAGUUAAGU GGGGGGUGAA AGCCCGGGGC
UCAACCUCGG AAUUGCCUUC AAUACUGGCU GUCUUGAGUA CGGGAGAGGU
GAGUGGAAAU CCGAGUGUAG AGGUGAAAU CGUAGAUUUC CGGAAGAACA
CCAGUGGCCG AGGCGACUCA CUGGCCCGUU ACUGACGCUC AGGCGCGAAA
GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCUCGUAAC
GAUGAGUGCU AGUUGUCGGC AUGCAUGCAU GUCGGUGACG CAGCUAACGC
AUUAAGCACU CCGCCUGGGG AGUACGGUCG CAAGAUUAAA ACUCAAGAA
AUUGACGG

>B_3_E7 407 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGGUGCGAG CGUAAUUCGG AAUACUGGG
CGUAAAGCGU GCGCAGGCGG CUUUGCAAGA CAGAGGUGAA AUCCCCGGGC
UCAACCUGGG AACUGCCUUU GUGACUGCAA GGCUAGAGUA CGGCAGAGGG
GGAAGGAAAU CCGCGUGUAG CAGUGAAAUG CGUAGAUUUG CGGAGGAACA
CCGAUGGCCG AGGCAAUCCC CUGGGCCUGU ACUGACGCUC AUGCACGAAA
GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCCCUAAACG
AUGUCUACUG GUUGUUGGAC GGCUUGCUGU UCAGUAACGA AGCUAACGCG
UGAAGUUGAC CGCCUGGGGA GUACGGCCCG AAGGUUGAAA CUCAAAGAAA
UUGACGG

>B_3_A8 407 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGGUGCGAG CGUAAUUCGG AAUACUGGG
CGUAAAGCGU GCGCAGGCGG CUUUGCAAGA CAGAGGUGAA AUCCCCGGGC
UCAACCUGGG AACUGCCUUU GUGACUGCAA GGCUAGAGUA CGGCAGAGGG
GGAUGGAAAU CCGCGUGUAG CAGUGAAAUG CGUAGAUUUG CGGAGGAACA
CCGAUGGCCG AGGCAAUCCC CUGGGCCUGU ACUGACGCUC AUGCACGAAA
GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCCCUAAACG
AUGUCAACUG GUUGUUGGAC GGCUUGCUGU UCAGUAACGA AGCUAACGCG
UGAAGUUGAC CGCCUGGGGA GUACGGCCCG AAGGUUGAAA CUCAAUAAA
UUGACGG

```

>B_3_A7      408 bp
CAGCAGCCGC  GGUAAUACGU  AGGGUGCAAG  CGUAAUUCGG  AAUUACUGGG
CGUAAAAGCGU  GCGCAGGCGG  UUUUGUAAGU  CUGAUGUGAA  AUCCCCGGGC
UCAACCUGGG  AACUGCAUUG  GAGACUGCAA  GGCUAGAGUG  UGUCAGAGGG
GGGUAGAAU  CCACGUGUAG  CAGUGAAAUG  CGUAGAGAUG  UGGAGGAAUA
CCGAUGGCCG  AGGCAGCCCC  CUGGGUAUAC  ACUGACGCUC  AUGCACGAAA
GCGUGGGGAG  CAAACAGGAU  UAGAUACCCU  GGUAGUCCAC  GCCCUAAACG
AUGUCUACUU  AGUUGUCGGG  ACUUAUUUGU  CUUGGUAACG  CAGCUAACGC
GUGAAGUAGA  CCGCCUGGGG  AGUACGGUCG  CAAGAUUAAA  ACUCAAGGA
AUUGACGG

>B_3_C7      408 bp
CAGCAGCCGC  GGUAAUACGU  AGGGUGCAAG  CGUAAUUCGG  AAUUACUGGG
CGUAAAAGCGU  GCGCAGGCGG  UUAUGCAAGA  CAGAGGUGAA  AUCCCCGGGC
UCAACCUGGG  AACUGCCUUU  GUGACUGCAU  GGCUAGAGUA  CGGUAGAGGG
GGAUGGAAU  CCGCGAGUAG  CAGUGAAAUG  CGUAGAUUUG  CGGAGGAACA
CCGAUGGCCG  AGGCAAUCCC  CUGGACCUGU  ACUGACGCUC  AUGCACGAAA
GCGUGGGGAG  CAAACAGGAU  UAGAUACCCU  GGUAGUCCAC  GCCCUAAACG
AUGUCAACUG  GUUGUUGGGA  GGGUUUCUUC  UCUAGUAACG  UAGCUAACGC
GUGAAGUUGA  CCGCCUGGGG  AGUACGGCCG  CAAGGUUGAA  ACUCAAGGA
AUUGACGG

>B_4_A10     407 bp
CAGCAGCCGC  GGUAAUACGA  AGGGGGCUAG  CGUUGCUCGG  AAUUACUGGG
CGUAAAAGGGC  GCGUAGGCGG  ACAGUUAAGU  UGGGGGUGAA  AGCCCCGGGC
UCAACCUCGG  AAUUGCCUUC  AAUACUGGCU  GUCUUGAGUA  CGGGAGAGGU
GAGUGGAAU  CCGAGUGUAG  AGGUGAAAUU  CGUAGAUUUG  CGGAAGAACA
CCAGUGGCCG  AGGCGACUCA  CUGGCCUGUU  ACUGACGCUG  AGGCGCGAAA
GCGUGGGGAG  CAAACAGGAU  UAGAUACCCU  GGUAGUCCAC  GCCGUAACG
AUGAGUGCUA  GUUGUCGGCA  UACAUGCAUG  UCGGUGACGC  AGCUAACGCA
UUAAGCACUC  CGCCUGGGGA  GUACGGUCGC  AAGAUUAAAA  CUCAAAUAAA
UUGACGG

>B_4_G10     407 bp
CAGCAGCCGC  GGUAAUACGU  AGGGUGCGAG  CGUAAUUCGG  AAUUACUGGG
CGUAAAAGCGU  GCGCAGGCGG  CUUUGCAAGA  CAGAGGUGAA  AUCCCCGGGC
UCAACCUGGG  AACUGCCUUU  GUGACUGCAA  GGCUAGAGUA  CGGCAGAGGG
GGAUGGAAU  CCGCGUGUAG  CAGUGAAAUG  CGUAGAUUUG  CGGAGGAACA
CCGAUGGCCG  AGGCAAUCCC  CUGGGCCUGU  ACUGACGCUC  AUGCACGAAA
GCGUGGGGAG  CAAACAGGAU  UAGAUACCCU  GGUAGUCCAC  GCCCUAAACG
AUGUCAACUG  GUUGUUGGAC  GGCUUGCUGU  UCAGUAACGA  AGCUAACGCG
UGAAGUUGAC  CGCCUGGGGA  GUACGGCCGC  AAGGUUGAAA  CUCAAAUAAA
UUGACGG

>B_4_F10     408 bp
CAGCAGCCGC  GGUAAUACGU  AGGGUGCAAG  CGUAAUUCGG  AAUUACUGGG
CGUAAAAGCGU  GCGCAGGCGG  UUAUGCAAGA  CAGAGGUGAA  AUCCCCGGGC
UCAACCUGGG  AACUGCCUUU  GUGACUGCAU  GGCUAGAGUA  CGGUAGAGGG
GGAUGGAAU  CCGCGUGUAG  CAGUGAAAUG  CGUAGAUUUG  CGGAGGAACA
CCGAUGGCCG  AGGCAAUCCC  CUGGACCUGU  ACUGACGCUC  AUGCACGAAA
GCGUGGGGAG  CAAACAGGAU  UAGAUACCCU  GGUAGUCCAC  GCCCUAAACG
AUGUCAACUG  GUUGUUGGGA  GGGUUUCUUC  UCUAGUAACG  UAGCUAACGC
GUGAAGUUGA  CCGCCUGGGG  AGUACGGCCG  CAAGGUUGAA  ACUCAAGAA
AUUGACGG

>B_4_B11     406 bp
CAGCAGCCGC  GGUAAUACGG  AGGAUCCGAG  CGUUAUCCGG  AUUUUUUGGG
CUUAAAAGGGU  GCGUAGGCGG  CCUGUUAAGU  CAGAGGUGAA  AGGCGGUAGC
UUAACUACUG  GAGUACCCUU  GAUACCGACG  GGCUUGAAUG  CAGCUGAGGU
AGGCGGAAUG  UGACAAGUAG  CGGUGAAAUG  CAUAGAUUUG  UCACAGAACA
CCAAUUGCGA  AGGCAGCUUA  CUAAAUGUGU  AUUGACGCUG  AGGCACAAAA
GCGUGGGGAG  CAAACAGGAU  UAGAUACCCU  GGUAGUCCAC  UGCCUAGAC
GAUGAAUACU  CGAUGUUGGC  GAUAUACGGU  CAGCGUCUAA  GCGAAAGCGU
UAAGUAUUC  ACCUGGGGAG  UACGCCCGCA  AGGGUGAAAC  UCAAAUGAAU
UGACGG

```

>B_4_D10 407 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGGUCCAAG CGUAAUUCGG AAUUACUGGG
CGUAAAAGCGU GCGCAGGCGG UUGUGCAAGA CCGAUGUGAA AUCCCCGAGU
UUAACUUGGG AAUUGCAUUG GUGACUGCAC GGCUAGAGUG UGUCAGAGGG
GGGUAGAAU CCACGUGUAG CAGUGAAAUG CGUAGAGAUG UGGAGGAAUA
CCGAUGGCCG AGGCAGCCCC CUGGGAUAA ACUGACGCUC AUGCACGAAA
GCGUGGGGAG CAAACAGGAU AGAUACCCUG GUAGUCCACG CCCUAAACGA
UGUCAACUAG UUGUUGGGGA UUCAUUCUC UUAGUAACGU AGCUAACGCG
UGAAGUUGAC CGCCUGGGGA GUACGGUCGC AAGAUUAAAA CUCAAAGAAA
UUGACGG

>B_4_H11 405 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGG AGGAUGCGAG CGUUAUCCGG AUUUAUUGGG
UUAAAAGGGU GCGUAGGCGG UUUGUCAAGU CAGCGGUGAA ACGCAAGGGC
UUAACCCUUG ACCUGCCGUU GAAACUGAUU GACUAGAAUG CGUAUGCUGU
GGGAGGAAUG UGUGGUGUAG CGGUGAAAUG CAUAGAUUUC ACACAGAACA
CCGAUUGCGA AGGCAUCUCA CAAAUCCGUG AUUGACGCUC AGGCACGAAA
GUGUGGGGGAU CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC ACUGUAAACG
AUGAUGACUC GCUGUCGGCG AUUAJACAGUC GGUGGCCAAG CGAAAGCGAU
AAGUCAUCCA CCUGGGGAGU ACGACCGCAA GGUUGAAACU CAAAGAAAUU
GACGG

>B_4_C12 407 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGGUCCAAG CGUAAUUCGG AAUUACUGGG
CGUAAAAGCGU GCGCAGGCGG UUGUGCAAGA CCGAUGUGAA AUCCCCGAGC
UUAACUUGGG AAUUGCAUUG GUGACUGCAC GGCUAGAGUG UGUCAGAGGG
GGGUAGAAU CCACGUGUAG CAGUGAAAUG CGUAGAGAUG UGGAGGAAUA
CCGAUGGCCG AGGCAGCCCC CUGGGAUAA ACUGACGCUC AUGCAUGAAA
GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCCCUAAACG
AUGUCAACUA GUUGUUGGGG AUUCAUUCU UUAGUAACGU AGCUAACGCG
UGAAGUUGAC CGCCUGGGGA GUACGGUCGC AAGAUUAAAA CUCAAAGAAA
UUGACGG

>B_4_G12 417 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGA AGGGGGGCUA GCGUUGCUCG GAAUCACUGG
GCGUAAAAGGG UGCGUAGGUG GAUCUUUAAG UCAGGGGUGA AAUCCUGGAG
CUCAGCUCCA GAACUGCCUU UGAUACUGAG GAUCUUGAGU UCGGGAGAGG
UAAGUGGAU UGCGAGUGUA GAGGUGAAAU UCGUAGAUU UCGCAAGAAC
ACCAGUGCCG AAGCGGCUU ACUGGCCCGA UACUGACACU GAGGCACGAA
AGCGUGGGGA GCAAACAGGA UUAGAUACCC UGGUAGUCCA CGCCGUAAAC
GAUGAAUGCC AGCCGUUGGG GGGUUUACUC CUCAGCGGCG CAGCUAACGC
UUUAAGCAU CCGCCUGAAG CCGAAUCCA GCACACUGGC GGCCGUUACU
AGUGGAUCCG AGCUCGG

>B_5_B1 407 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGA AGGGGGCUAG CGUUGUUCGG AAUUACUGGG
CGUAAAAGCGC ACGUAGGCGG ACAUUAAGU CAGGGGUGAA AUCCCCGGGC
UCAACCUCGG AACUGCCUUU GAUACUGGGU GUCUUGAGUA UGGAAGAGGU
AAGUGGAAU GCGAGUGUAG AGGUGAAAU CGUAGAUUU AGCAGGAACA
CCAGUGGCCG AGGCGGCUUA CUGGUCCAU ACUGACGCUC AGGUGCGAAA
GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UGGAUACCCU GGUAGUCCAC GCCGUAAACG
AUGAAUGUUA GCCGUCGGGC AGUUGACUGU UCGGUGGCGC AGCUAACGCA
UUAAAACAUU CGCCUGGGGA GUACGGUCGC AAGAUUAAAA CUCAAUGAA
UUGACGG

>B_5_E1 410 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGGUGCGAG CGUUGUCCGG AUUUAUUGGG
CGUAAAAGGG UCGUAGGUGG UUGAUCGCGU CGGAAGUGUA AUCUUGGGGC
UUAACCCUGA GCGUGCUUUC GAUACGGGUU GACUUGAGGA AGGUAGGGGA
GAAUGGAAU CCUGUGGAG CGGUGGAAUG GCGAGAUUUC AGGAGGAACA
CCAGUGGCCG AGGCGGUUCU CUGGGCCUUU CCUGACGCUC AGGAGCGAAA
GCGUGGGGAG CGAACAGGCU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCUGUAAACG
GUGGGUACUA GGUGUGGGGU CCAUUCACG GGUUCCGUGC CGUAGCUAAC
GCUUUAAGUA CCCCUGGCGG GGAGUACGGC CGCAAGGCUA AAACUCAAU
AAAUUGACGG

>B_5_F2 408 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACAG AGGGUGCGAG CGUAAUUCGG AUUUACUGGG
CGUAAAAGCGU GCGUAGGCGG CUUCUUAAGU CGGAUGUGAA AUCCCUGAGC
UUAACUUAGG AAUUGCAUUC GAUACUGGGA AGCUAGAGUA UGGGAGAGGA
UGGUAGAAU CCAGGUGUAG CGGUGAAAUG CGUAGAGAU UGGAGGAAUA
CCGAUGGCGA AGGCAGCCAU CUGGCCUAAU ACUGACGCUG AGGUACGAAA
GCAUGGGGGG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAU GCCGUAACG
AUGUCUACUA GCCGUUGGGG CCUUGAGGC UUUAGUGGCG CAGCUAACGC
GAUAAGUAGA CCGCCUGGGG AGUACGGUCG CAAGACUAAA ACUCAAGAA
AUUGACGG

>B_5_D3 409 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACAG AGGGUGCGAG CGUAAUUCGG AAUUACUGGG
CGUAAAAGCGA GUGUAGGUGG CUCAUUAAGU CACAUGUGAA AUCCCCGGGC
UUAACCUUGG AACUGCAUGU GAUACUGGUG GUGCUAGAAU AUGUGAGAGG
GAAGUAGAAU UCCAGGUGUA GCGGUGAAAU GCGUAGAGAU CUGGAGGAAU
ACCGAUGGCG AAGGCAGCUU CCUGGCAUAA UAUUGACACU GAGAUUCGAA
AGCGUGGGUA GCAAACAGGA UUAGAUACCC UGGUAGUCCA CGCCGUAAC
GAUGUCUACU AGCCGUUGGG GUCCUUGAGA CUUUAGUGGC GCAGUUUACG
CGAUAAGUAG ACCGCCUGGG GAGUACGGCC GCAAGGUAAA AACUCAAGA
AAUUGACGG

>B_6_A4 407 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGGUGCGAG CGUAAUUCGG AAUUACUGGG
CGUAAAAGCGU GCGCAGGCGG CUUUGCAAGA CAGAGGUGAA AUCCCCGGGC
UCAACCUUGG AACUGCCUUU GUGACUGCAA GGCUAGAGUA CGGCAGAGGG
GGAUGGAAU CCGCGUGUAG CAGUGAAAUG CGUAGAUUUG CGGAGGAACA
CCGAUGGCGA AGGCAAUCCC CUGGGCCUGU ACUGACGCUC AUGCACGAAA
GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCCUAAAACG
AUGUCAACAG GUUGUUGGAC GGCUUGCUGU UCAGUAACGA AGCUAACGCG
UGAAGUUGAC CGCCUGGGGG GUACGGCCGC AAGGUUGAAA CUCAAAUAAA
UUGACGG

>B_6_C5 409 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGUGGCAAG CGUUGUCCGG AAUUAUUGGG
CGUAAAAGCGC GCGCAGGUGG UUCUUUAAGU CUGGUGUGAA AGCCCCGGGC
UCAACCGGGG AGGGUCAUUG GAAACUGGGG AACUUGAGUG CAGAAGAGGA
UAGUGGAAU CCAAGUGUAG CGGUGAAAUG CGUAGAGAU UGGAGGAACA
CCAGUGGCGA AGGCGACUGU CUGGUCUGUA ACUGACACUG AGGCGCGAAA
GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCCGUAACG
AUGAGUGCUA AGUGUUGGGG GGUUCCGCC CCUCAGUGUU GCAGCUAACG
CAUCAAGCAC UCCGCCUGGG GAGUACGGUC GCAAGACUGA AACUCAAU
AAUUGACGG

>B_6_H5 408 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACAG AGGGUGCAAG CGUAAUUCGG AAUUACUGGG
CGUAAAAGCGU GCGUAGACGG UUACAUUAGU CGGGUGUGAA AGCCCCGGGC
UCAACCUUGG AAUUGCAUUC GAGACUGCGU AGCUAGGGUG CGGAAGAGGG
AAGCGGAAU UCCGGUGUAG CGGUGAAAUG CGUAGAUUUG GGAAGGAACA
CCAGUGGCGA AAGCGGCUUC CUGGUCCAGC ACCGACGUUC AGGCACGAAA
GCGUGGGGAG CAAGCAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCCAUAAAACG
AUGAGAACUA GACGUUGAAG GGGUAAGCCC UCCAGUGUCG UAGCUAACGC
GCUAAGUUCU CCGCCUGGGG AGUACGGCCG CAAGGUCGAA ACUCAAGAA
AUUGACGG

>B_6_C4 411 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACAG AGGGUGCAAG CGUAAUUCGG AAUUACUGGG
CGUAAAAGCGU GCGUAGACGG UUACAUUAGU CGGGUGUGAA AGCCCCGGGC
UCAACCUUGG AAUUGCAUUC GAGACUGCGG UAGUUAGGGU CCGGAAGAGG
GAAGCGGAAU UUCCGGUGUA GCGGUGAAAU GCGUAGAUU CCGAAGGUAC
ACCAGUGGCG AAAGCGGCUU CCUGGUCCAG CACCGACGUU CAGGCACGAA
AGCGUGGGGA GCAAACAGGA UUAGAUACCC UGGUAGUCCA CGCCAUAAAC
GAUGAGAACU AGACGUUGAA GGGGUAAGCC UCUCUAGUG UCGUAGCUAA
CGCGCUAAGU UCUCGCCUG GGGAGUACGG CCGCAAGGUU GAAACUCAA
GAAAUUGACG G

>B_6_D6 408 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACAG AGGGUGCGAG CGUAAUUCGG AUUUACUGGG
CGUAAAAGCGC GCGUAGGUGG CUAAUUAAGU CAAAUGUGAA AUCCCCGAGC
UUAACUUGGG AAUUGCAUUC GAUACUGGUU AGCUAGAGUA UGGGAGAGGA
UGGUAGAAU CCAGGUGUAG CGGUGAAAUG CGUAGAGAUC UGGAGGAAUA
CCGAUGGCCA AGGCAGCCAU CUGGCCUAAU ACUGACACUG AGGUGCGAAA
GCAUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAU GCCGUAACG
AUGUCUACUA ACCGUUGGGG CCUUGAGGC UUUAGUGGCG CAGCUAACGC
GAUAAGUAGA CCGCCUGGGG AGUACGGUCG CAAGACUAAA ACUCAAAUAA
AUUGACGG

>B_7_C7 407 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGA AGGGGGCUAG CGUUGCUCGG AAUUACUGGG
CGUAAAAGGC GCGUAGGCGG ACAGUUAAGU UGGGGGUGAA AGCCCCGGGC
UCAACCUCGG AAUUGCCUUC AAUACUGGCU GUCUUGAGUA CGGGAGAGGU
GAGUGGAAU CCGAGUGUAG AGGUGAAAU CGUAGAUAU CGGAAGAACA
CCAGUGGCCA AGGCGACUCA CUGGCCCGU ACUGACGCUG AGGCGCGAAA
GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCCGUAACG
AUGAGUCUA GUUGUCGGCA UGCAUGCAUG UCGGUGACGC AGCUAACGCA
UUAAGCACUC CGCCUGGGGA GUACGGUCGC AAGAUUAAA CUCAAUUGAA
UUGACGG

>B_7_F7 407 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACAU AGGGUGCGAG CGUAAUUCGG AAUUACUGGG
CGUAAAAGCGU GCGCAGGCGG CUUUGCAAGA CAGAGGUGAA AUCCCCGGGC
UCAACCUGGG AACUGCCUUU GUGACUGCAA GGCUAGAGUA CGGCAGAGGG
GGAUGGAAU CCGCGUGUAG CAGUGAAAUG CGUAGAUUUG CGGAGGAACA
CCGAUGGCCA AGGCAAUCCC CUGGGCCUGU ACUGACGCUC AUGCACGAAA
GCGUGGGGAG CAGACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCCCUAACG
GUGUCAACUG GUUGUUGGAC GGCUUGCUGU UCAGUAACGA AGCUAACGCG
UGAAGUUGAC CGCCUGGGGA GUACGGCCGC AAGGUUGAAA CUCAAUUGAA
UUGACGG

>B_7_F8 410 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGGUGCGAG CGUUGUCCGG AUUUUUGGG
CGUAAAAGGC UCGUAGGUGG UUGAUCGCGU CGGAAGUGUA AUCUUGGGGC
UUAACCCUGA GCGUGCUIUC GAUACGGGUU GACUUGAAGA AGGUAGGGGA
GAAUGGAAU CCUGGUGGAG CGGUGGAAUG CGCAGAUUUC AGGAGGAACA
CCAGUGGCCA AGGCGGUUCU CUGGGCCUUU CCUGACGCUG AGGAGCGAAA
GCGUGGGGAG CGAACAGGCU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCUGUAAACG
GUGGGUACUA GGUGUGGGU CCAUUCACG GGUUCCGUGC CGUAGCUAAC
GCUUUUAGUA CCCC GCCUGG GGAGUACGGC CGCAAGGCUA AAACUCAAU
AAAUUGACGG

>B_7_H8 409 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACAG AGGGUGCGAG CGUUAACCGG AAUUACUGGG
CGUAAAAGCGA GUGUAGGUGG CUCAUUAAGU CACAUGUGAA AUCCCCGGGC
UUAACCCUGG AACUGCAUGU GAUACUGGUG GUGCUAGAAU AUGUGAGAGG
GAAGUAGAAU UCCAGGUGUA GCGGUGAAAU GCGUAGAGAU CUGGAGGAAU
ACCGAUGGCG AAGGCAGCUU CCUGGCAUAA UAUUGACACU GAGAUUCGAA
AGCGUGGGUA GCAAACAGGA UUAGAUACCC UGGUAGUCCA CGCCGUAAC
GAUGUCUACU AGCCGUUGGG GUCCUUGAGA CUUUAGUGGC GCAGUUAACG
CGUAAGUAG ACCGCCUGGG GAGUACGGCC GCAAGGUUAA AACUCAAU
AAUUGACGG

>B_7_B8 407 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGGUGCAAG CGUAAUUCGG AAUUACUGGG
CGUAAAAGCGU GCGCAGGCGG UUUUGUAAGU CUGAUGUGAA AUCCCCGGGC
UCAACCUGGG AACUGCAUUG GAGACUGCAA GGCUAGAGUG UGUCAGAGGG
GGGUAGAAU CCACGUGUAG CAGUGAAAUG CGUAGAGAUG UGGAGGAAUA
CCGAUGGCCA AGGCAGCCCC CUGGGAUAA ACUGACGCUC AUGCACGAAA
GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCCCUAACG
AUGUCUACUA GUUGUCGGGA CUUAAUUGUC UUGGUAACGC AGCUAACGCG
UGAAGUAGAC CGCCUGGGGA GUACGGUCGC AAGAUUAAA CUCAAUUGAA
UUGACGG

```

>B_7_E7      408 bp
CAGCAGCCGC  GGUAAUACAU  AGGGUGCGAG  CGUUAUUCGG  AAUUACUGGG
CGUAAAAGCGU  GCGCAGGCGG  CUUUGCAAGA  CAGAGGUGAA  AUCCCCGGGC
UCAACCUGGG  AACUGCCUUU  GUGACUGCAA  GGCUAGAGUA  CGGCAGAGGG
GGAUGGAAU  CCGCGUGUAG  CAGUGAAAUG  CGUAGAUUAG  CGGAGGAACA
CCGAUUGCGA  AGGCAAUCCC  CUGGGCCUGU  ACUGACGCUC  AUGCACGAAA
GCGUGGGGAG  CAGACAGGAU  UAGAUACCCU  GGUAGUCCAC  GCCCUAAACG
GUGUCAACUG  GUUGUUGGAC  GGCUUGCUGU  UCUAGUAACG  AAGCUAACGC
GUGAAGUUGA  CCGCCUGGGG  AGUACGGCCG  CAAGGUUGAA  ACUCAAAUGA
AUUGACGG

>B_7_D8      411 bp
CAGCAGCCGC  GGUAAUACGU  AGGGUGCGAG  CGUUGUCCGG  AUUUAUUGGG
CGUAAAAGGGC  UCGUAGGUGG  UUGAUCGCGU  CGGAAGUGUA  AUCUUGGGGC
UUAACCCUGA  GCGUGCUUUC  GAUACGGGUU  GACUUGAGGA  AGGUAGGGGA
GAAUGGAAU  CCUGGUGGAG  CGGUGGAAUG  CGCAGAUUUC  AGGAGGAACA
CCAGUGGCGA  AGGCGGUUCU  CUGGGCCUUU  CCUGACGCUG  AGGAGCGAAA
GCGUGGGGAG  CGAACAGGCU  UAGAUACCCU  GGUAGUCCAC  GCUGUAAACG
GUGGGUACUA  GGUGUGGGGU  CCAUUCACG  GGUUCCGUGC  UCGUAGCUAA
CGCUUUAAGU  ACCCCGCCUG  GGGAGUACGG  CCGCAAGGCU  AAAACUCAA
UAAAUUGACG  G

>B_8_B11     405 bp
CAGCAGCCGC  GGUAAUACGG  AAGGUCCAGG  CGUUAUCCGG  AUUUAUUGGG
UUUAAAAGGGA  GCGUAGGCCG  GAGAUUAAGU  GUGUUGUGAA  AUGUAGGUGC
UCAACAUCUG  CACUGCAGCG  CAUACUGGUU  UCCUUGAGUA  CACACAAUGU
UGGCUGAAU  CGUCGUGUAG  CGGUGAAAUG  CUUAGAUUAG  ACGAAGAACU
CCGAUUGCGA  AGGCAGCUGA  CGGGAGUGCA  ACUGACGCUG  AAGCUCGAAA
GUGCGGGUUA  CGAACAGGAU  UAGAUACCCU  GGUAGUCCGC  ACGGUAAACG
AUGGAUGCCC  GCUAUUCGGC  CGAAUGGUUG  AGUGGCCAAG  CGAAAGCAU
AAGCAUCCCA  CCUGGGGAGU  ACGCUGGCAA  CGGUGAAACU  CAAUUGAAU
GACGG

>B_8_D10     407 bp
CAGCAGCCGC  GGUAAUACGU  AGGGUGCGAG  CGUUAUUCGG  AAUUACUGGG
CGUAAAAGCGU  GCGCAGGCGG  CUUUGCAAGA  CAGAGGUGAA  AUCCCCGGGC
UCAACCUGGG  AACUGCCUUU  GUGACUGCAA  GGCUAGAGUA  CGGCAGAGGG
GGAUGGAAU  CCGCGUGUAG  CAGUGAAAUG  CGUAGAUUAG  CGGAGGGACA
CCGAUUGCGA  AGGCAAUCCC  CUGGGCCUGU  ACUGACGCUC  AUGCACGAAA
GCGUGGGGAG  CAAACAGGAU  UAGAUACCCU  GGUAGUCCAC  GCCCUAAACG
AUGUCAACUG  GUUGUUGGAC  GGCUUGCUGU  UCAGUAACGA  AGCUAACCGG
UGAAGUUGAC  CGCCUGGGGA  GUACGGCCGU  AAGGUUGAAA  CUCAAAGAAA
UUGACGG

>B_8_G11     405 bp
CAGCAGCCGC  GGUAAUACGG  AAGGUCCAGG  CGUUAUCCGG  AUUUAUUGGG
UUUAAAAGGGA  GCGUAGGCCG  GAGAUUAAGU  GUGUUGUGAA  AUUAGGCCG
UCAACGUCUG  CACUGCAGCG  CAUACUGGUU  UCCUUGAGUA  CACACAACGU
UGGCGGAAU  CGUCGUGUAG  CGGUGAAAUG  CUUAGAUUAG  ACGAAGAACU
CCGAUUGCGA  AGGCAGCUGA  CGGGAGUGCA  ACUGACGCUG  AAGCUCGAAA
GUGCGGGUUA  CGAACAGGAU  UAGAUACCCU  GGUAGUCCGC  ACGGUAAACG
AUGGAUGCCC  GCUAUUCGGC  CGAAUGGUUG  AGUGGCCAAG  CGAAAGCAU
AAGCAUCCCA  CCUGGGGAGU  ACGCCGGCAA  CGGUGAAACU  CAAUUGAAU
GACGG

>B_8_H11     405 bp
CAGCAGCCGC  GGUAAUACGG  AAGGUCCGGG  CGUUAUCCGG  AUUUAUUGGG
UUUAAAAGGGA  GCGCAGGCCG  GAGAUUAAGC  GUGACGUGAA  AUGUAGACGC
UCAACGUCUG  AAUUGCGUCG  CGAACUGGUU  UCCUUGAGUG  AGAACGACGU
GUACGGAAU  CGUGGUGUAG  CGGUGAAAUG  CUUAGAUUUC  ACGAAGAACC
CCGAUUGCGA  AGGCAGUGCA  CGAGUCCUUU  ACUGACGCUA  AAGCUCGAAA
GUGCGGGUUA  CGAACAGGAU  UAGAUACCCU  GGUAGUCCGC  ACGGUAAACG
AUGGAUGCCC  GCUUUUGCG  AUACAGUGUA  AGCGGCCAAG  CGAAAGCGUU
AAGCAUCCCA  CCUGGGGAGU  ACGCCGGCAA  CGGUGAAACU  CAAAGGAAU
GACGG

```

>B_9_B1 407 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGA AGGGGGCUAG CGUUGCUCGG AAUUACUGGG
CGUAAAGGGC GCGUAGGCGG ACAGUUAAGU UGGGGGUGAA AGCCCGGGGC
UCAACCUCGG AAUUGCCUUC AAUACUGGCU GUCUUGAGUA CGGGAGAGGU
GCGUGGAAACU CCGAGUGUAG AGGUGAAAU CGUAGAUUU CGGAAGAACA
CCAGUGGCGA AGGCGACUCA CUGGCCCGUU ACUGACGCUG AGGCGCGAAA
GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCCGUAACG
AUGAGUGCUA GUUGUCGGCA UGCAUGCAUG UCGGUGACGC AGCUAACGCA
UUAAGCACUC CGCCUGGGGA GUACGGUCGC AAGAUUAAAA CUCAAAUAAA
UUGACGG

>B_9_E2 408 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGGUGCGAG CGUUAUUCGG AAUUACUGGG
CGUAAAGCGU GCGCAGGCGG CUUUGCAAGA CAGAGGUGAA AUCCCGGGGC
UCAACCUGGG AACUGCCUUU GUGACUGCAA GGCUAGAGUA CGGCACGAGG
GGGAUGGAAU UCCGCGUGUA GCAGUGAAAU GUGUAGAUUU GCGGAGGAAC
ACCGAUGGCG AAGGCAAUCC CCUGGGCCUG UACUGACGCU CAUGCACGAA
AGCGUGGGGA GCAAACAGGA UUAGAUACCC UGGUAGUCCA CGCCUAAAC
GAUGUCAACU GGUUGUUGGA CGGCUUGCUG UUCAGUAACG AAGCUAACGC
GUGAAGUUGA CGCCUGGGG AGUACGGCCG CAAGGUUGAA ACUCAAUUGA
AUUGACGG

>B_9_F1 407 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGGUGCGAG CGUUAUUCGG AAUUACUGGG
CGUAAAGCGU GCGCAGGCGG CUUUGCAAGA CAGAGGUGAA AUCCCGGGGC
UCAACCUGGG AACUGCCUUU GUGACUGCAA GGCUAGAGUA CGGCAGAGGG
GGAUGGAAUU CCGCGUGUAG CAGUGAAAUG CGUAGAUUUG CGGAGGAACA
CCGAUGGCGA AGGCAAUCCC CUGGGCCUGU ACUGACGCUC AUGCACGAAA
GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUGGUCCAC GCCCUAAACG
AUGUCAACUG GUUGUUGGAC GGCUUGCUGU UCAGUAACGA AGCUAACGCG
UGAGGUUGAC CGCCUGGGGA GUACGGCCGC AAGGUUGAAA CUCAAUUGAA
UUGACGG

>B_9_C2 407 bp
AGCAGCCGCG GUAAUACGUA GGGUGCAAGC GUUAUUCGGA AUUACUGGGC
GUAAAGCGUG CGCAGGCGGU UAUGCAAGAC AGAGGUGAAA UCCCGGGGCU
CAACCUGGGA ACUGCCUUUG UGACUGCAUG GCUAGAGUAC GGUAGAGGGG
GAUGGAAUUC CGCGUGUAGC AGUGAAAUGC GUAGAUUUGC GGAGGAACAC
CGAUGGGCGA AGCAAUCCCC UGGACCUGUA CUGACGCUCA UGCACGAAAG
CGUGGGGAGC AAACAGGAU AGAUACCCUG GUAGUCCACG CCCUAAACGA
UGUCAACUGG UUGUUGGGAG GGUUUCUUCU CUAGUAACGU AGCUAACGCG
UGAAGUUGAC CGCCUGGGGA GUACGGCCGC AAGGUUGAAA CUCAAAGAAA
UUGACGG

>B_10_C4 407 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGGUGCGAG CGUUAUUCGG AAUUACUGGG
CGUAAAGCGU GCGCAGGCGG CUUUGCAAGA CAGAGGUGAA AUCCCGGGGC
UCAACCUGGG AACUGCCUUU GUGACUGCAA GGCUAGAGUA CGGCAGAGGG
GGAUGGAAUU CCGCGUGUAG CAGUGAAAUG CGUAGAUUUG CGGAGGAACA
CCGAUAGCGA AGGCAAUCCC CUGGGCCUGU ACUGACGCUC AUGCACGAAA
GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCCCUAAACG
AUGUCAACUG GUUGUUGGAC GGCUUGCUGU UCAGUAACGA AGCUAACGCG
UGAAGUUGAC CGCCUGGGGA GUACGGCCGC AAGGUUGAAA CUCAAAGAAA
UUGACGG

>B_10_F4 411 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGA AGGGGGCUAG CGUUGCUCGG AAUUACUGGG
CGUAAAGGGC GCGUAGGCGG ACAGUUAAGU UGGGGGUGAA AGCCCGGGGC
UCAACCUCGG AAUUGCCUUC AAUACUGGCU GUCUUGAGUA CGGGAGAGGU
GAGUGGAAACU CCGAGUGUAG AGGUGAAAU CGUAGAUUU CGGAAGAACA
CCAGUGGCGA AGGCGACUCA CUGGCCCGUU ACUGACGCUG AGGCGCGAAA
GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCUCGUAAC
GAUGAGUGCU AGUUGUCGGC UAUGCUAUGC UAUGCUGGUG ACGCAGCUAA
CGCAUUAAGC ACUCCGCCUG GGGAGUACGG UCGCAAGAU AAAACUCAAA
UGAAUUGACG G

>B_10_A5 405 bp
 CAGCAGCCGC GGUAAUACGG AAGGUCCGGG CGUUAUCCGG AUUUUAUUGGG
 UUUAAAAGGGA GCGCAGGCCG AAGGUUAAGC GUGACGUGAA AUGUAGCCGC
 UCAACGGCUG AACUGCGUCG CGAACUGGCU UUCUUGAGUG AGUUCGAUGU
 AGGCGGAAU CGUGGUGUAG CGGUGAAAUG CUUAGAUUUC ACGAAGAACU
 CCGAUUGCGA AGGCAGCCUA CAAGGCCUUU ACUGACGCUA AAGCUCGAAG
 GUGCGGGUUA CGAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCGC ACGGUAACG
 AUGGAUGCCC GCUGUUCGCG AUAGACUGUG AGCGGCCAAG AGAAAUCGUU
 AAGCAUCCCA CCUGGGGAGU ACGCCGGCAA CGGUGAAACU CAAAUAAAU
 GACGG

>B_10_D5 410 bp
 CAGCAGCCGC GGUAAUACGA AGGGGGCUAG CGUUGCUCGG AAUUACUGGG
 CGUAAAAGGC GCGUAGGCCG ACAGUUAAGU UGGGGGUGAA AGCCCGGGGC
 UCAACCUCGG AAUUGCCUUC AAUACUGGCU GUCUUGAGUA CGGGAGAGGU
 GAGUGGAAU CCGAGUGUAG AGGUGAAAU CGUAGAUUUC CGGAAGAACA
 CCAGUGGCGA AGGCGACUCA CUGGCCCGUU ACUGACGCUA AGGCAGGAAA
 GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCUCGUAAC
 GAUGAGUGCU AGUCGUCGGC UAUGCAUGCU AUGUCGGUGA CGCAGCUAAC
 GCAUUAAGCA CUCCGCCUGG GGAGUACGGU CGCAAGAUUA AAACUCAAG
 AAUUGACGG

>B_10_E5 407 bp
 CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGGUGCAAG CGUUAUCCGG AAUUACUGGG
 CGUAAAAGCGU GCGCAGGCCG UUAUGCAAGA CAGAGGUGAA AUCUCCGGGC
 UCAACCUGGG AACUGCCUUU GUGACUGCAU GGCUAGAGUA CGGUAGAGGG
 GGAUGGAAU CCGCGUGUAG CAGUGAAAUG CGUAGAUUUC CGGAGGAACA
 CCGAUGGCGA AGGCAAUCCC CUGGACCUGU ACUGACGCUC AUGCACGAAA
 GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCUAC GCCCUAACG
 AUGUCAACUG GUUGUUGGGA GGGUUUCUUC UCUAGUAACG UAGCUAACGC
 GUGAAGUUGA CCGCCUGGGG AGUACGGCCG CAAGGUUGAA ACUCAAUUA
 AUUGACG

>B_10_C6 410 bp
 CAGCAGCCGC GGUAAUACAG AGGGUGCAAG CGUUAUCCGG AAUUACUGGG
 CGUAAAAGCGU GCGUAGACC G UACAUAAAGU CGGGUGUGAA AGCCCGGGC
 UCAACCUGGG AAUUGCAUUC GAGACUGCGU AGCUAGGGCG CGGAAGAGGG
 AAGCGGAAU UCCGGUGUAG CGGUGAAAUG CGUAGAUUUC GGAAGGAACA
 CCAGUGGCGA AAGCGGCUUC CUGGUCCAGC ACCGACGUUC AGGCAGGAAA
 GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCCAUAAACG
 AUGAGAACUA GACGUUGAAG GGGUAAGCUC UCUCAGUGU CGUAGCUAAC
 GCGCUAAGUU CUCCGCCUGG GGAGUACGGC CGCAAGGUUG AAACUCAAG
 AAUUGACGG

>B_11_A7 407 bp
 CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGGUGCGAG CGUUAUCCGG AAUUACUGGG
 CGUAAAAGCGU GCGCAGGCCG CUUUGCAAGA CAGAGGUGAA AUCCCGGGC
 UCAACCUGGG AACUGCCUUU GUGACUGCAA GGCUAGAGUA CGGCAGAGGG
 GGAUGGAAU CCGCGUGUAG CAGUGAAAUG CGUAGAUUUC CGGAGGAACA
 CCGAUGGCGA AGGCAAUCCC CUGGGCCUGU ACUGACGCUC AUGCACGAAA
 GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCCCUAACG
 AUGUCAACUG GUUGUUGGAC GGCUUGCUGU UCAGUAACGA AGCUAACCGG
 UGAAGUUGAC CGCCUGGGGA GUACGGCCGC AAGGUUGAAA CUCAAAUGAA
 UUGACGG

>B_11_F7 405 bp
 CAGCAGCCGC GGUAAUACGG AGGAUCCGAG CGUUAUCCGG AUUUUAUUGGG
 UUUAAAAGGGA GCGUAGGCCG CCUGUUAAGU CAGAGGUGAA AGGCGGUAGC
 UUAACUACUG GAGUACGCUU GAGUACGACG GGCUUGAAUG CAGCUGAGGU
 AGGCGGAAUG UGACAAGUAG CGGUGAAAUG CAUAGAUUUC UCACAGAACA
 CCAAUUGCGA AGGCAGCUUA CUAAAUGUG AUUGACGCUC AGGCAGGAAA
 GCGUGGGGGAU CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCCCUAACG
 AUGAAUACUC GAUGUUGGCG AUUAACGGUC AGCGUCUAG CGAAAGCGUU
 AAGUAUCCA CCUGGGGAGU ACGCCCGCAA GGGUGAAACU CAAUUGAAU
 GACGG

>B_11_B9 407 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGGUGCGAG CGUAAUUCGG AAUACUGGG
CGUAAAGCGU GCGCAGGCGG CUUUGCAAGA CAGAGGUGAA AUCCCCGGGC
UCAACCUGGG AACUGCCUUU GUGACUGCAA GGCUAGAGUA CGGCAGAGGG
GGAUGGAAU CCGCGUGUAG CAGUGAAAUG CGUAGAUUUG CGGAGGAACA
CCGAUGGCCA AGGCAAUCCC CUGGGCCUGU ACUGACGCUC AUGCACGAAA
GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCCCUAAACG
AUGUCAACUG GUUGUUGGAC GGCUUGCUGU UCAGUAACGA AGCUAACGCG
UGAAGUUGAC CGCCUGGGGA GUACGGCCGC AAGGUUGAAA CUCAAAUGAA
UUGACGG

>B_11_E7 411 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGGUGCAAG CGUUGUCCGG AAUUAUUGGG
CGUAAAGAGC UCGUAGGCGG UCUGUCGCGU CGGCUGUGAA AACCUGGGGC
UUAACUCCGG GCCUCGAGCC GAUACGGUCA GACUAGAGUU CGGCAGGGGA
GACUGGAAU CCUGGUGUAG CGGUGAAAUG CGCAGAUUUC AGGAGGAACA
CCGGUGGCCA AGGCGGGUCU CUGGGCCGAU ACUGACGCUC AGGAGCGAAA
GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCUCGUAAAC
GUUGGGCGCU AGGUUGGGU CUCAUUCAC GAGGUCCGUG CCGCAGCUAA
CGCAUUAAG CCCCCCGUG GGGAGUACGG CCGCAAGGCU AAAACUCAA
UAAAUUGACG G

>B_12_B10 407 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGGUGCGAG CGUAAUUCGG AAUACUGGG
CGUAAAGCGU GCGCAGGCGG CUUUGCAAGA CAGAGGUGAA AUCCCCGGGC
UCAACCUGGG AACUGCCUUU GUGACUGCAA GGCUAGAGUA CGGCAGAGGG
GGAUGGAAU CCGCGUGUAG CAGUGAAAUG CGUAGAUUUG CGGAGGAACA
CCGAUGGCCA AGGCAAUCCC CUGGGCCUGU ACUGACGCUC AUGCACGAAA
GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCCCUAAACG
AUGUCAACUG GUUGUUGGAC GGCUUGCUGU UCAGUAACGA AGCUAACGCG
UGAAGUUGAC CGCCUGGGGA GUACGGCCGC AAGGUUGAAA CUCAAUAAA
UUGACGG

>B_12_D10 408 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACAG AGGGUGCAAG CGUAAUUCGG AAUACUGGG
CGUAAAGCGU GCGUAGACGG UJACAUAAU CGGGUGUGAA AGCCCCGGGC
UCAACCUGGG AAUUGCAUUC GAGACUGCGU AGCUAGGGUG CGGAAGAGGG
AAGCGGAAU UCCGGUGUAG CGGUGAAAUG CGUAGAUUUC GGAAGGAACA
CCAGUGGCCA AAGCGGCUUC CUGGUCCAGC ACCGACGUUC AGGCACGAAA
GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCCAUAAACG
AUGAGAACUA GACGUUGAAG GGGUAAGCCC UCCAGUGUCG UAGCUAACGC
GCUAAGUUCU CCGCCUGGGG AGUACGGCCG CAAGGUUGAA ACUCAAAGGA
AUUGACGG

>B_12_H11 408 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGA AGGGGGCUAG CGUUGCUCGG AAUACUGGG
CGUAAAGGGC GCGUAGGCGG ACAGUUAAGU UGGGGGUGAA AGCCCCGGGC
UCAACCUCGG AAUUGCCUUC AAUACUGGCU GUCUUGAGUA CGGGAGAGGU
GAGUGGAACU CCGAGUGUAG AGGUGAAACU CGUAGAUUUC CGGAAGAACA
CCAGUGGCCA AGGCGACUCA CUGGCCCGUU ACUGACGCUC AGGCGCGAAA
GCGUGGGGAG CAAACAGAAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCCGUAAACG
AAUGAGUGCU AGUUGUCGGC AUGCAUGCAU GUCGGUGACG CAGCUAACGC
AUUAAGCACU CCGCCUGGGG AGUACGGUCG CAAGAUUAAA ACUCAAAGAA
AUUGACGG

>B_12_B12 407 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGGUGCGAG CGUAAUUCGG AAUACUGGG
CGUAAAGCGU GCGCAGGCGG CUUUGCAAGA CAGAGGUGAA AUCCCCGGGC
UCAACCUGGG AACUGCCUUU GUGACUGCAA GGCUAGAGUA CGGCAGAGGG
GGAUGGAAU CCGCGUGUAG CAGUGAAAUG CGUAGAUUUG CGGAGGAACA
CCGAUGGCCA AGGCAAUCCC CUGGGCCUGU ACUGACGCUC AUGCACGAAA
GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCCCUAAACG
AUGUCAACUG GUUGUUGGAC GGCUUGCUGU UCAGUAACGA AGCUAACGCG
UGAAGUUGAC CGCCUGGGGA GUACGGCCGC AAGGUUGAAA CUCAAAGGAA
UUGACGG

>B_12_F10 408 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGGUGCAAG CGUUAGUCGG AAUUACUGGG
CGUAAAAGCGU GCGCAGGCGG UUAUGCAAGA CAGAGGUGAA AUCCCCGGGC
UCAACCUGGG AACUGCCUUU GUGACUGCAU GGCUAGAGUA CGGUAGAGGG
GGAUGGAAU CCGCGUGUAG CAGUGAAAUG CGUAGAUUUG CGGAGGAACA
CCGAUGGCCA AGGCAAUCCC CUGGACCUGU ACUGACGCUC AUGCACGAAA
GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCCCUAAACG
AUGUCAACUG GUUGUUGGGA GGGUUUCUUC UCUAGUAACG UAGCUAACGC
GUGAAGUUGA CCGCCUGGGG AGUACGGCCG CAAGGUUGAA ACUCAAGAA
AUUGACGG

>B_13_E1 407 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGA AGGGGGCUAG CGUUGCUCGG AAUUACUGGG
CGUAAAAGGGC GCGUAGGCGG ACAGUUAAGU UGGGGGUGAA AGCCCCGGGC
UCAACCUCGG AAUUGCCUUC AAUACUGGCU GUCUUGAGUA CGGGAGAGGU
GAGUGGAAU CCGAGUGUAG AGGUGAAAU CGUAGAUUUG CGGAAGAACA
CCAGUGGCCA AGGCGACUCA CUGGCCCGUU ACUGACGCUC AGGCGCGAAA
GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCCGUAAACG
AUGAGUCUA GUUGUCGGCA UGCAUGCAUG UCGGUGACGC AGCUAACGCA
UUAAGCACUC CGCCUGGGGA GUACGGUCGC AAGAUUAAAA CUCAAAGAAA
UUGACGG

>B_13-G1 407 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGGUGCGAG CGUAAUUCGG AAUUACUGGG
CGUAAAAGCGU GCGCAGGCGG CUUCGCAAGA CAGAGGUGAA AUCCCCGGGC
UCAACCUGGG AACUGCCUUU GUGACUGCAA GGCUAGAGUA CGGCAGAGGG
GGAUGGAAU CCGCGUGUAG CAGUGAAAUG CGUAGAUUUG CGGAGGAACA
CCGAUGGCCA AGGCAAUCCC CUGGGCCUGU ACUGACGCUC AUGCACGAAA
GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCCCUAAACG
AUGUCAACUG GUUGUUGGAC GGCUUGCUGU UCAGUAACGA AGCUAACGCG
UGAAGUUGAC CGCCUGAGGA GUACGGCCGC AAGGUUGAAA CUCAAAUGAA
UUGACGG

>B_13_B2 407 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGGUGCGAG CGUAAUUCGG AAUUACUGGG
CGUAAAAGCGU GCGCAGGCGG CUUUGCAAGA CAGAGGUGAA AUCCCCGGGC
UCAACCUGGG AACUGCCUUU GUGACUGCAA GGCUAGAGUA CGGCAGAGGG
GGAUGGAAU CCGCGUGUAG CAGUGAAAUG CGUAGAUUUG CGGAGGAACA
CCGAUGGCCA AGGCAAUCCC CUGGGCCUGU ACUGACGCUC AUGCACGAAA
GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCCCUAAACG
AUGUCAACUG GUUGUUGGAC GGCUUGCUGU UCAGUAACGA AGCUAACGCG
UGAAGUUGAC CGCCUGGGGA GUACGGCCGC AAGGUUGAAA CUCAAAUAAA
UUGACGG

>B_13_G3 409 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGGUGCAAG CGUAAUUCGG AAUUACUGGG
CGUAAAAGCGU GCGCAGGCGG UUAUGCAAGA CAGAGGUGAA AUCCCCGGGC
UCGACCUGGG GACUGCCUUU GUGACUGCAU GGCUAGAGUA CGGUAGAGGG
GGAUGGAAU CCGCGUGUAG CAGUGAAAUG CGUAGAUUUG CGGAGGAACA
CCGAUGGCCA AGGCAAUCCC CUGGACCUGU ACUGACGCUC AUGCACGAAA
GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCCCUAAACG
AUGUCAACUG GUUGUUGGGA GGGUUUCUUC UCUAGUAACG UAGCUAACGC
GUGAAGUUGA CCGCUCUGGG GAGUACGGCC GCAAGGUUGA AACUCAAGA
AAUUGACGG

>B_13_A1 402 bp
GCCGCGGUA UACGAAGGGG GCUAGCGUUG CACGGAAUCA CUGGGCGUAA
AGGGUGCGUA GCGGGGUUUU UAAGUCAGGG GUGAAAUCU GGAGCUAAC
UCCAGAAGUC CCUUGAUAC UGAAGGUUUU GAGUCCGGGA GAGGUGAGUG
GAACUGCGAG UGUAGAGGUG AAAUUCGUAG AUUUUCGCAA GAACACCAGU
GGCGAAGGCG GCUCACUGGC CCGGUACUGA CGCUGAGGCA CGAAAGCGUG
GGGAGCAAAC AGGAUUAGAU ACCCUGGUAG UCCACGCCGU AAACGAUGAA
UGCCAGCCGU UAGUGGGUUU ACUCACUAGU GCGCGAGCUA ACGCUUUAAG
UAUUCGCCU GGGGAGUACG GUCGCAAGAU UAAAACUCAA AGAAAUUGAC
GG

>B_13_E2 408 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGUCCCGAG CGUUGUCCGG AUUUAUUGGG
CGUAAAAGCGA GCGCAGGCGG UUAGAUAAAGU CUGAAGUUAA AGGCUGUGGC
UUAACCAUAG UACGCUUUGG AAACUGUUUA ACUUGAGUGC AAGAGGGGAG
AGUGGAAUUC CAUGUGUAGC GGUGAAAUGC GUAGAUUAU AUUAGGAAACAC
CGGUACCGAA AGCGGCUCUC UGGCUUGUAA CUGACGCUGA GGCUCGAAAG
CGUGGGGAGC AAACAGGAU AUAGAUACCCUG GUAGUCCACG CCGUAAACGA
UGAGUGCUAG GUGUUAGACC CUUUCGGGGG UUUAGUGCCG CAGCUAACGC
AUUAAGCACU CCGCCUGGGG AGUACGACCG CAAGGUUGAA ACUCAAGAA
AUUGACGG

>B_14_B4 407 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGGUGCGAG CGUUAUUCGG AAUUACUGGG
CGUAAAAGCGU GCGCAGGCGG CUUUGCAAGA CAGAGGUGAA AUCCCCGGGC
UCAACCUGGG AACUGCCUUU GUGACUGCAA GGCUAGAGUA CCGCAGAGGG
GGAUGGAAU CCGCGUGUAG CAGUGAAAUG CGUAGAUUAG CCGAGGAACA
CCGAUGGCGA AGGCAAUCCC CUGGGCCUGU ACUGACGCUC AUGCACGAAA
GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCCCUAAACG
AUGUCAACUG GUUGUUGGAC GGCUUGCGU UCAGUAACGA AGCUAACGCG
UGAAGUUGAC CGCCUGGGGA GUACGGCCGC AAGGUUGAAA CUCAAAGAAA
UUGACGG

>B_14_E4 407 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGA AGGGGGCUAG CGUUGCUCGG AAUUACUGGG
CGUAAAAGGGC GCGUAGGCGG ACAGUUAAGU UGGGGGUGAA AGCCCCGGGC
UCAACCUCGG AAUUGCCUUC AAUACUGGCU GUCUUGAGUA CCGGAGAGGU
GAGUGGAAU CCGAGUGUAG AGGUGAAAU CGUAGAUU AUUAGGAACA
CCAGUGGCGA AGGCGACUCA CUGGCCCGU ACUGACGCUG AGGCGCGAAA
GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCCCUAAACG
AUGAGUGCUA GUUGUCGGCA UGCAUGCAUG UCGGUGACGC AGCUAACGCA
UUAAGCACUC CGCCUGGGGG GUACGGUCGC AAGAUUAAAA CUCAAUAAAA
UUGACGG

>B_14_D6 407 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGGUGCAAG CGUUAUUCGG AAUUACUGGU
CGUAAAAGCGU GCGCAGGCGG UUUUGUAAGU CUGAUGUGAA AUCCCCGGGC
UCAACCUGGG AACUGCAUUG GAGACUGCAA GGCUAGAGUG UGUCAGAGGG
GGGUAGAAU CCACGUGUAG CAGUGAAAUG CGUAGAGAUG UGGAGGAUA
CCGAUGGCGA AGGCGACCC CUGGGAUAA ACUGACGCUC AUGCACGAAA
GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCCCUAAACG
AUGUCUACUA GUUGUCGGGA CUUAAUUGUC UUGGUAAACGC AGCUAACGCG
UGAAGUAGAC CGCCUGGGGG GUACGGUCGC AAGAUUAAAA CUCAAAGAAA
UUGACGG

>B_14_E5 411 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGA AGGGGGCUAG CGUUGCUCGG AAUUACUGGG
CGUAAAAGGGC GCGUAGGCGG ACAGUUAAGU UGGGGGUGAA AGCCCCGGGC
UCAACCUCGG AAUUGCCUUC AAUACAGGCU GUCUUGAGUA CCGGAGAGGU
GAGUGGAAU CCGAGUGUAG AGGUGAAAU CGUAGAUU AUUAGGAACA
CCAGUGGCGA AGGCGACUCA CUGGCCCGU ACUGACGCUG AGGCGCGAAA
GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCUCGUAAC
GAUGAGUGCU AGUUGUCGGC UAUGCUAUGC UAUGUCGGUG ACGCAGCUAA
CGCAUUAAGC ACUCCGCCUG GGGAGUACGG UCGCAAGAUU AAAACUCAA
UGAAUUGACG G

>B_14_H4 411 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGGUGCGAG CGUUGUCCGG AAUUACUGGG
CGUAAAAGGGC UCGUAGGUGG UUUGUCGCGU CGUCUGUGAA AUUCCGGGGC
UUAACUCCGG GCGUCAGGCG GAUACGGGCA UAACUUGAGU ACUGUAGGGG
UAACUGGAAU UCCUGGUGUA GCGGUGAAU GCGCAGAUU CAGGAGGAAC
ACCGAUGGCG AAGGCAGGUU ACUGGGCAGU UACUGACGCU GAGGAGCGAA
AGCAUGGGUA GCGAACAGGA UUAGAUACCC UGGUAGUCCA UGCCGUAAC
GGUGGGCGCU AGGUGUGAGG GUCUUUUCAC GACUUUCGUG CCGUAGCUAA
CGCAUUAAGC GCCCGCCUG GGGAGUACGG CCGCAAGGCU AAAACUCAA
UAAAUUGACG G

>B_14_H5 408 bp
 CAGCAGCCGC GGUAAUACAG AGGGUGCAAG CGUUGUUCGG AAUUCUGGG
 CGUAAAGCGU GCGUAGUCGG UAUUGAGAGU CGCGGGUGAA AUCCCAGGGC
 UUAACCCUGG AACUGCCUGC GAGACCUCAG UACUAGAGUG UGAGAGGGGA
 UAGUGGAAUA CCCAGUGUAG CGGUGAAAUG CGUAGAGAUU GGGUGGAACA
 CCGGUGGCGA AGCGGCUAUC UGGCUCACAA CUGACGAUCA GGCACGAAAG
 CGUGGGGAGC AAACAGGAU AGAUACCCUG GUAGUCCACG CCGUAAACUA
 UGCAUACAAG CUGUAGUGGG AUUUUACUCC UGCUGUGGCG AAGCUAACGC
 AAUAGUAUG CCGCCUGGGG AGUACGGUCG CAAGACUAAA ACUCAAAUGA
 AUUGACGG

>B_14_F6 408 bp
 CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGGUGCGAG CGUUAUUCGG AAUUCUGGG
 CGUAAAGCGU GCGCAGGCGG CUUUGCAAGA CAGAGGUGAA AUCCCCGGGC
 UCAACCCUGG AACUGCCUUU GUGACUGCAA GGCUAGAGUA CGGCAGAGGG
 GGAUGGAAU CCGCGUGUAG CAGUGAAAUG CGUAGAUUAG CCGAGGAACA
 CCGAUGGCGA AGGCAAUCCC CUGGGCCUGU ACUGACGCUC AUGCACGAAA
 GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCCCUAAACG
 AUGUCAACUG GUUGUUGGAC GGCUUGCUGU UCUAGUAACG AAGCUAACGC
 GUGAAGUUGA CCGCCUGGGG AGUACGGCCG CAAGGUUGAA ACUCAAGAA
 AUUGACGG

>B_15_C7 410 bp
 CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGGUGCGAG CGUUGUCCGG AUUUUUGGG
 CGUAAAGGGC UCGUAGGUGG UUGAUCGCGU CGGAAGUGUA AUCUUGGGGC
 UUAACCCUGA GCGUGCUUUC GAUACGGGUU GACUUGAGGA AGGUAGGGGA
 GAAUGGAAU CCUGGUGGAG CGGUGGAAUG CGCAGAUUUC AGGAGGAACA
 CCAGUGGCGA AGGCGGUUCU CUGGGCCUUU CCUGACGCUG AGGAGCGAAA
 GCGUGGGGAG CGAACAGGCU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCUGUAAACG
 GUGGGUACUA GGUGUGGGGU CCAUUCACG GGUUCCGUGC CGUAGCUAAC
 GCUUUUAGUA CCCCUGGCGG GGAGUACGGC CGCAAGGCUA AAACUCAAU
 AAAUUGACGG

>B_15_G7 407 bp
 CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGGUGCGAG CGUUAUUCGG AAUUCUGGG
 CGUAAAGCGU GCGCAGGCGG CUUUGCAAGA CAGAGGUGAA AUCCCCGGGC
 UCAACCCUGG AACUGCCUUU GUGACUGCAA GGCUAGAGUA CGGCAGGGGG
 GGAUGGAAU CCGCGUGUAG CAGUGAAAUG CGUAGAUUAG CCGAGGAACA
 CCGAUGGCGA AGGCAAUCCC CUGGGCCUGU ACUGACGCUC AUGCACGAAA
 GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCCCUAAACG
 AUGUCAACUG GUUGUUGGAC GGCUUGCUGU UCAGUAACGA AGCUAACCGG
 UGAAUUGAC CGCCUGGGGA GUACGGCCGC AAGGUUGAAA CUCAAAUGAA
 UUGACGG

>B_15_B8 409 bp
 CAGCAGCCGC GGUAAUACGG AGGGGGCAAG CGUUGUUCGG AAUUCUGGG
 CGUAAAGCGC ACGUAGGCGG UUUUGUAAGU CUGGGGUCAA AGGCGACAGC
 UCAACUGUCG UAAGGCCUCA GAUACUUAUG AACUGGAGUG CCAGAGAGGA
 UGGCGGAAU CCGGUGUAG CGGUGAAAUG CGUAGAUUUC GGGAGGAACA
 CCAUUGGCGA AGGCGGCUAU CUGGCUGGUA ACUGACGCUG AGGUGCGAGA
 GCGUAGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCUAC GCUGUAAACG
 AUGGAUGUUA GAUGUUGGUG GAACCGACCC CAUCAGUGUC GAAGCUAACG
 CGUAAAACAU CCCGCCUGGG GAGUAUGCUC GCAAGAGUGA AACUCAAU
 AAUUGACGG

>B_15_F9 408 bp
 CAGCAGCCGC GGUAAUACAG AGGGUGCAAG CGUUAUUCGG AAUUCUGGG
 CGUAAAGCGU GCGUAGACGG UUAUAUAAGU CGGGUGUGAA AGCCCCGGGC
 UCAACCCUGG AAUUGCAUUC GAGACUGCGU AGCUAGGGUG CGGAAGAGGG
 AAGCGGAAU UCCGGUGUAG CGGUGAAAUG CGUAGAUUUC GGAAGGAACA
 CCAGUGGCGA AAGCGGCUUC CUGGUCCAGC ACCGACGUUC AGGCACGAAA
 GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCCAUAAACG
 AUGAGAACUA GACGUUGAAG GGGUAAGCCC UCCAGUGUCG UAGCUAACGC
 GCUAAGUUCU CCGCCUGGGG AGUACGGCCG CAAGGUUGAA ACUCAAUUA
 AUUGACGG

>B_15_D9 411 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGGUGCGAG CGUUGUCCGG AUUUUAUUGGG
CGUAAAAGGC UCGUAGGUGG UUGAUCGCGU CGGAAGUGUA AUCUUGGGGC
UUAACCCUGA GCGUGCUUUC GAUACGGAU GACUUGAGGA AGGUAGGGGA
GAAUGGAAU CCUGGUGGAG CGGUGGAAUG CGCAGAUUUC AGGAGGAACA
CCAGUGGCGA AGGCGGUUCU CUGGGCCUUU CCUGACGCUG AGGAGCGAAA
GCGUGGGGAG CGAACAGGCU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCUGUAAACG
GUGGGUACUA GGUGUGGGGU CCAUUCACG GGUUCCGUGC UCGUAGCUAA
CGCUUUAAGU ACCCCGCCUG GGGAGUACGG CCGCAAGGCU AAAACUCAA
UAAAUUGACG G

>B_15_G9 411 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGG AGGGGGCAAG CGUUGUCCGG AAUUACUGGG
CGUAAAAGGC ACGUAGGCGG UUUUGUAAGU CUGGGGUCAA AGGCGACAGC
UCAACUGUCG UAAGGCCUCA GAUACUAUAG AACUGGAGUG CCAGAGAGGA
UGGCGGAAU CCCGGUGUAG CGGUGAAAUG CGUAGAUUUC GGGAGGAACA
CCAUUGGCGA AGGCGGCUAU CUGGCUGGUA GCUGACGCUG AGGUGCGAGA
GCGUAGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCUAC GCUGUAAACG
AUGGAUGUUA GAUGUUGGUG GAACCGACCC UCAUCUAGUG UCGAAGCUAA
CGCGUUAAC AUCCCGCCUG GGGAGUAUGC UCGCAAGAGU GAAACUCAA
UGAAUUGACG G

>B_15_C9 407 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGGUGCGAG CGUAAUCCGG AAUUACUGGG
CGUAAAAGCG GCGCAGGCGG UUGUGUAAGA CAGGCGUGAA AUCCCCGGGC
UCAACUGGG AAUGGCGCUU GUGACUGCAC GGCUGGAGUG CGGCAGAGGG
GGAUGGAAU CCGCGUGUAG CAGUGAAAUG CGUAGAUUUC GGGAGGAACA
CCGAUGGCGA AGGCAGUCCC CUGGGCCUUC ACUGACGCUC AUGCACCAAA
GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCCUAAACG
AUGUCGACUG GUUGUUGGGU CUUAGGUGAC UCAGUAACGA AGCUAACGCG
UGAAGUCGAC CGCCUGGGGA GUACGGCCGC AAGGUUGAAA CUCAAAUAAA
UUGACGG

>B_15_E7 404 bp
AGCAGCCCGG GUAAUACGGA AGGUCCAGGC GUUAUCCGGA UUUUAUUGGGU
UUAAAAGGGAG CGUAGGCCGG AGAUUAAGUG UGUUGUGAAA UGUAGAUGCU
CAACAUCUGC ACUGCAGCGC AUACUGGUUU CCUUGAGUAC ACACAACGUU
GGCGGAAUUC GUCGUGUAGC GGUGAAAUGC UJAGAUUAGA CGAAGAACUC
CGAUUGCGAA GGCAGCCGAC GGGAGUGCAA CUGACGCUGA AGCUCGAAAG
UGCAGGUAUC GAACAGGAAC AGAUACCCUG GUAGUCCGCA CGGUAAACGA
UGGAUGCCCG CUAUUCGGCC GAAUGGUUGA GUGGCCAAGC GAAAGCAUUA
AGCAUCCAC CUGGGGAGUA CGCCGGCAAC GGUGAAACUC AAAUGAAUUG
ACGG

>A_1_B2 410 bp
GCCGCCGCGG UAAUACCGU AGCCCAAGUG GUGGUCGAUU UUAUUGAGUC
UAAAACGUUC GUAGCCGGUU CGGUAAAUCU UUGGGUAAU CGGGAAGCUC
AACUUCCGA CUUCCGAAGA GACUGCCGAA CUUGGGACCG GGAGAGGCUA
GAGGUACUUC UGGGUAGGG GUAAAUCU GUAAUCCUAG AAGGACCACC
GGUGUCGAAG GCGUCUAGCU AGAACGGGUC CGACGGUGAG GGACGAAGCC
CUGGGUCGCA AACGGGAUUA GAUACCCCGG UAGUCCAGGG UGUAAACGCU
GCAGACUUGG UGUUGGAGGC AAUUCGGUUG CAUUCAGUGC CGGAGAGACG
UUGUUAAGUC UGCUACUUGG GGUGUACGUC CGCAAGGAUG AAACUUAAG
GAAUUGGCGG

>A_1_C1 404 bp
CAGCAGCCGC GGUAACACGG AGGGUGCAAG CGUUAUCCGG AUUCACUGGG
UUUAAAAGGG GCGUAGGCGG GUAUGUAAGU CAGUGGUGAA AUCUCGGAGC
UUAACUCCGA AACUGCAUUA GAUACUAUUA AUCUUGAAUA UUGUGGAGGU
CUGCGGAAUA UGUCAUGUAG CGGUGAAAUG CUAGAUUAGA CAUAGAACAC
CUAUUGCGAA GGCAGCAGGC UACACAUUA UUGACGCUGA GGCACGAAAG
CGUGGGGAUC AAACAGGAU AGAUACCCUG GUAGUCCACG CCCUAAAGGA
CGGAUACUCG ACAUACGCGA UACACUGUGU GUGUCUGAGC GAAAGCAUUA
AGUAUCCAC CUGGGAAAGUA CGACCGCAAG GUUGAAACU AAAGGAAUUG
GCGG

```

>A_1_D1      412 bp
CAGCAGCCCGC GGUAACACCU GCAGCCCAAG UGGUGGUCGA UUUUAUUGAG
UCUAAAACCGU UCGUAGCCGG UUUGGUAAAU CUUUGGGUAA AUCGGGAAGC
UCAACUUUCC  GACUUCGGAA GAGACUGCCG AACUUGGGAC CGGGAGAGGC
UAGAGGUACU  UCUGGGGUAG GGGUAAAUC  CUGUAAUCCU AGAAGGACCA
CCGGUGGCCG  AGGCGUCUAG CUAGAACGGA UCCGACGGUG AGGGACGAAG
CCCUGGGUCG  CAAACGGGAU UAGAUACCCC GGUAGUCCAG GGUGUAAACG
CUGCAGACUU  GGUGUUGGAG GCAGUUCGGU UGCAUUCAGU GCCGGAGAGA
AGUUGUUAAG  UCUGCUACUU GGGGAGUACG UCCGCAAGGA UGAAACUUA
AGGAAUUGGC  GG
>A_2_A4      412 bp
CAGCCGCCCGC GGUAAUACCU GCAGCCCAAG UGGUGGUCGA UUUUAUUGAG
UCUAAAACCGU UAGUAGCCGG UUUGGUAAAU CUUUGGGUAA AUCGGGAAGC
UCAACUUUCC  GACUUCGGAA GAGACUGUCA AACUUGGGAC CGGGAGAGGC
UAGAGGUACU  UCUGGGGUAG GGGUAAAUC  CUGUAAUCCU AGAAGGACCA
CCGGUGGCCG  AGGCGUCUAG CUAGAACGGA UCCGACGGUG AGGGACGAAG
CCCUGGGUCG  CAAACGGGAU UAGAUACCCC GGUAGUCCAG GGUGUAAACG
CUGCCGACUU  GGUGUUGGAG GCCCUUCGGG GGCAUUCAGC GCCGGAGAGA
AGUUGUUAAG  UCGGCUACUU GGGGAGUACG UCCGCAAGGA UGAAACUUA
AGGAAUUGGC  GG
>A_2_B4      413 bp
CAGCCGCCCGC GGUAAACACCU GCAGCCCAAG UGGUGGUCGA UUUUAUUGAG
UCUAAAACCGU UCGUAGCCGG UUUGGUAAAU CUUUGGGUAA AUCGGGAGGC
UCAACUUUCC  GACUUCGGAA GAGACUGUCA AACUUGGGAC CGGGAGAGGC
UAGAGGUACU  UCUGGGGUAG GGGUAAAUC  CUGUAAUCCU AGAAGGACCA
CCGGUGGCCG  AGGCGUCUAG CUAGAACGGA UCCGACGGUG AGGGACGAAG
CCCUGGGUCG  CAAACGGGAU UAGAUACCCC GGUAGUCCAG GGUGUAAACG
CUGCCGACUU  GGUGUUGGAG GCCCUUCGGG GGCAUUCAGU GCCGGAGAGA
AGUUGUUAAG  UCGGCUACU  UGGGGGUAC  GACC GCAAGG AUGAAACUUA
AAGGAAUUGG  CGG
>A_2_H4      412 bp
CAGCCGCCCGC GGUAAUACCU GCAGCCCAAG UGGUGGUCGA UUUUAUUGAG
UCUAAAACCGU UCGUAGCCGG UUUGGUAAAU CUUUGGGUAA AUCGGGAGGC
UCAACUUUCC  GACUUCGGAA GAGACUGUCA AACUUGGGAC CGGGAGAGGC
UAGAGGUACU  UCUGGGGUAG GGGUAAAUC  CUGUAAUCCU AGAAGGACCA
CCGGUGGCCG  AGGCGUCUAG CUAGAACGGA UCCGACGGUG AGGGACGAAG
CCCUGGGUCG  CAAACGGGAU UAGAUACCCC GGUAGUCCAG GGUGUAAACG
CUGCCGACUU  GGUGUUGGAG GCCCUUCGGG GGCAUUCAGU GCCGGAGAGA
AGUUGUUAAG  UCGGCUACUU GGGGGUACG  UCCGCAAGGA UGAAACUUA
AGGAAUUGGC  GG
>A_2_C6      413 bp
CAGCCGCCCGC GGUAAACACCU GCAGCCCAAG UGGUGGUCGA UUUUAUUGAG
UCUAAAACCGU UCGUAGCCGG UUUGGUAAAU CUUUGGGUAA AUCGGGAAGC
UUAACUUUUC  CGACUUCGGA AGAGACUGUC AAACUUGGGA CCGGGAGAGG
CUAGAGGUAC  UUCUGGGGUA GGGUAAAUC  CCUGUAAUCC UAGAAGGACC
ACCGGUGGCG  AAGGCGUCUA GCUAGAACGG AUCCGACGGU GAGGGACGAA
GCCCUUGGUC  GCAAACGGGA UUAGAUACCC CGGUAGUCCA GGGUGUAAAC
GCUGCCGACU  UGGUGCUGGA GGCCCUUCGG GGGCAUUCAG UGCCGGAGAG
AAGUUGUUA  GUCGGCUACU UGGGGAGUAC GUCCGCAAGG AUGAAACUUA
AAGGAAUUGG  CGG
>A_2_D4      412 bp
CAGCCGCCCGC GGUAAACACCU GCAGCCCAAG UGGUGGUCGA UUUUAUUGAG
UCUAAAACCGU UCGUAGCCGG UUUGGUAAAU CUUUGGGUAA AUCGGGAAGC
UCAACUUUCC  GACUUCGGAA GAGACUGUCA AACUUGGGAC CGGGAGAGGC
UAGAGGUACU  UCUGGGGUAG GGGUAAAUC  CUGUAAUCCU AGAAGGACCA
CCGGUGGCCG  AGGCGUCUAG CUAGAACGGA UCCGACGGUG AGGGACGAAG
CCCUGGGUCG  CAAACGGGAU UAGAUACCCC GGUAGUCCAG GGUGUAAACG
CUGCCGACUU  GGUGUUGGAG GCCCUUCGGG GGCAUUCAGU GCCGGAGAGA
AGUUGUUAAG  UCGGCUACUU GGGGAGUACG UCCGCAAGGA UGAAACUUA
AGGAAUUGGC  GG

```

>A_2_B5 412 bp
CAGCCGCCGC GGUAAUACCU GCAGCCCAAG UGGUGGUCGA UUUUACUGAG
UCUAAAACGU UCGUAGCCGG UUUGGUAAAU CUUUGGGUAA AUCGGGAAGC
UCAACUUUCC GACUUCGGAA GAGACUGUCA AACUUGGGAC CGGGAGAGGC
UAGAGGUACU UCUGGGGUAG GGGUAAAUC CUGUAAUCCU AGAAGGACCA
CCGGUGGCCA AGGCGUCUAG CUAGAACGGA UCCGACGGUG AGGGACGAAG
CCCUGGGUCG CAAACGGGAU UAGAUACCCC GGUAGUCCAG GGUGUAAACG
CUGCCGACUU GGUGUUGGAG GCCCUUCGGG GGUAUUCAGU GCCGGAGAGA
AGUUGUUAAG UCGGCUACUU GGGGAGUACG UCCGCAAGGA UGAAACUUA
AGGAAUUGGC GG

>A_2_E5 407 bp
CAGCCGCCGC GGUAAUACCU AGGGUGCAAG CGUAAUUCGG AAUUACUGGG
CGUAAAACGU GCGCAGCCGG UUAUGCAAGA CAGAGGUGAA GUCCCCGGGC
UCAACCUUGG AACUGCCUUU GUGACUGCAU GGCUAGAGUA CGGUAGAGGG
GGAUGGAAU CCGCGUGUAG CAGUGAAAUG CGUAGAUUUG CGGAGGAACA
CCGAUGGCCA AGGCAAUCCC CUGGACCUGU ACUGACGCUC AUGCACGAAA
GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCCCUAAACG
AUGUCAACUG GUUGUUGGGA GGGUUUCUUC UCAGUAACGU AGCUAACGCG
UGAAGUUGAC CGCCUGGGGA GUACGGCCGC AAGGUUGAAA CUUAAAGGAA
UUGCCGG

>A_2_A6 412 bp
CAGCCGCCGC GGUAAACACCU GUAGCCCAAG UGGUGGUCGA UUUUAUUGAG
UCUAAAACGU UCGUAGUCGG UUUGGUAAAU CUUUGGGUAA AUCGGGAGGC
UCAACUUUCC GACUUCGGAA GAGACUGUCA AACUUGGGAC CGGGAGAGGC
UAGAGGUACU UCUGGGGUAG GGGUAAAUC CUGUAAUCCU AGAAGGACCA
CCGGUGGCCA AGGCGUCUAG CUAGAACGGA UCCGACGGUG AGGGACGAAG
CCCUGGGUCG CAAACGGGAU UAGAUACCCC GGUAGUCCAG GGUGUAAACG
CUGCUGACUU GGUGUUGGAG GCCCUUCGGG GGCAUUCAGU GCCGGAGAGA
AGCUGUUAAG UCGGCUACUU GGGGAGUACG UCCGCAAGGA UGAAACUUA
AGGAAUUGGC GG

>A_3_A7 413 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACCU GCAGCCCAAG UGGUGGUCGA UUUUAUUGAG
UCUAAAACGU UCGUAGCCGG UUUGGUAAAU CUUUGGGUAA AUCGGGAAGC
UCAACUUUCC GACUUCGGAA GAGACUGUCA AACUUGGGAC CGGGAGAGGC
UAGAGGUACU UCUGGGGUAG GGGUAAAUC CCUGCAAUCC UAGAGGGACC
ACCGUGGCCG AAGCGUCUA GCUAGAACGG AUCCGACGGU GAGGGACGAA
GCCCUGGGUC GCAAACGGGA UUAGAUACCC CGGUAGUCCA GGGUGUAAAC
GCUGCCGACU UGGUGUUGGA GGCCUUCGG GGGCAUUCAG UGCCGGAGAG
AAGUUGUUA GUCGGCUACU UAGGGAGUAC GUCCGCAAGG AUGAAACUUA
AAGGAAUUGG CGG

>A_3_D7 405 bp
CAGCCGCCGC GGUAAUACCG AGGGUGCAAG CGUUAUCCGG AUUCACUGGG
UUUAAAAGGU GCGUAGCCGG GUAUGUAAGU CAGUGGUGAA AUCUCGGAGC
UUAACUCCGA AACUGCCAUU GAUACUAUUAU AUCUUGAAUA UUGUGGAGGU
UUGCGGAAUA UGUCAUGUAG CGGUGAAAUG CUUAGAUUUG ACAUAGAACA
CCUAUUGCGA AGGCAGCAGG CUACACAUUAU AUUGACGCUG AGGCACGAAA
GCGUGGGGAU CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCCCUAAACG
AUGGAUACUC GACAUACGCG AUACACUGUG UGUGUCUGAG CGAAAGCAUU
AAGUAUCCCA CCUGGGGAAGU ACGACCCGCA GGUUGAAACU UAAAGGAAU
GGCGG

>A_3_G8 412 bp
CAGCCGCCGC GGUAAACACCU GCAGCCCAAG UGGUGGUCGA UUUUAUUGAG
UCUAAAACGU UCGUAGCCGG UUUGGUAAAU CUUUGGGUAA AUCGGGAAGC
UUAACUUUCC GACUUCGGAA GAGACUGUCA AACUUGGGAC CGAGAGAGGC
UAGAGGUACU UCUGGGGUAG GGGUAAAUC CUGUAAUCCU AGAAGGACCA
CCGGUGGCCA AGGCGUCUAG CUAGAACGGA UCCGACGGUG AGGGACGAAG
CCCUGGGUCG CAAACGGGAU UAGAUACCCC GGUAGUCCAG GGUGUAAACG
CUGCCGACUU GGUGUUGGAG GCCCUUCGGG GGCAUUCAGU GCCGGAGAGA
AGUUGUUAAG UCGGCUACUU GGGGAGUACG UCCGCAAGGA UGAAACUUA
AGGAAUUGGC GG

>A_3_B9 412 bp
CAGCCGCCGC GGUAAUACCU GCAGCCCAAG UGGUGGUCGA UUUUAUUGAG
UCUAAAACGU UCGUAGCCGG UUUGGUAAAC CUUUGGGUAA AUCGGGAAGC
UCAACUUUCC GACUUCGGAA GAGACUGUCA AACUUGGGAC CGGGAGAGGC
UAGAGGUACU UCUGGGGUAG GGGUAAAAUC CUGUAAUCCU AGAAGGACCA
CCGGUAGCGA AGGCGUCUAG CUAGAACUGA UCCGACGGUG AGGGACGAAG
CCCUGGGUCG CAAACGGGAU UAGAUACCCC GGUAGUCCAG GGUGUAAACG
CUGCCGACUU GGUGUUGGAG GCCCUUCGGG GGCAUUCAGU GCCGAAGAGA
AGUUGUUAAG UCGGCUACUU GGGGAGUACG UCCGCAAGGC UGAAACUUA
AGGAAUUGGC GG

>A_3_E7 413 bp
CAGCCGCCGC GGUAAUACCU GCAGCCCAAG UGGUAGGUCG AUUUUAUUGA
GUCUAAAACG UUCGUAGCCG GUUUGGUAAA UC UUUGGGUA AAUCGGGAAG
CUCAACUUUC CGACUUCCGA AGAGACUGUC AAACUUGGGA CCGGGAGAGG
CUAGAGGUAC UUCUGGGGUA GGGGC AAAAU CCUGUAAUCC UAGAAGGACC
ACCGGUGGCG AAGGCGUCUA GCUAGAACGG AUCCGACGGU GAGGGACGAA
GCCUGGGUC GCAAACGGGA UUAGAUACCC CGGUAGUCCA GGGUGUAAAC
GCUGCCGACU UGGUGUUGGA GGCCUUCGG GGGCAUUCAG UGCCGGAGAG
AAGUUGUUA GUCGCUACU UGGGGAGUAC GUCCGCAAGG AUGAAACUUA
AAGGAAUUGG CGG

>A_3_H7 410 bp
GCCGCCCGG UAACACCGC AGCCCAAGUG GUGGUCGAUU UUAUUGAGUC
UAAAACGUUC GUAGCCGGUU UGGUAAAUC UUGGGUAAU CGGGAAGCUC
AACUUUCCGA CUUCCGAAGA GACUGUCAA CUUGGGACCG GAAGAGGCUA
GAGGUACUUC UGGGGUAGGG GUAAAUCU GUAUCCUAG AAGGACCACC
GGUGGCGAAG GCGUCUAGCU AGAACGGAUC CGACGGUGAG GGACGAAGCC
CUGGGUCGCA AACGGGAUUA GAUACCCCG UAGUCCAGG UGUAAACGCU
GCCGACUUG UGUUGGAGG CCUUCGGGG CAUUCAGUGC CGGAGAGAAG
UUGUUAAGUC GGUACUUGG GGAGUACGUC CGCAAGGAUG AAACUUAAAG
GAAUUGGCGG

>A_3_A8 411 bp
CAGCCGCCGC GGUAAACACC GCAGCCCAAG UGGUGGUCGA UUUUAUUGAG
UCUAAAACGU UCGUAGCCGG UUUGGUAAAU CUUUGGGUAA AUCGGGAAGC
UCAACUUUCC GACUUCGGAA GAGACUGUCA AACUUGGGAC CGGGAGAGGC
UAGAGGUACU UCUGGGUAGG GGUAAAUC UGUAAUCCUA GAAGGACCAC
CGGUGGCGA AGCGUCUAGC UAGAACGGAU CCGACGGUGA GGGACGAAGC
CCUGGGUCG CAAACGGGAU AGAUACCCCG GUAGUCCAGG GUGUAAACGC
UGCCGACUUG GUGUUGGAGG CCCUUCGGGG GCAUUCAGUG CCGGAGAGAA
GUUGUUAAGU CGGCUACUUG GGGAGUACGU CCGCAAGGAU GAAACUAAA
GGAAUUGGCG G

>A_4_A10 405 bp
CAGCAGCCGC GGUAAACCGG AGGGUGCAAG CGUUAUCCGG AUUCACUGGG
UUUAAAAGGU GCGUAGGCGG GUAUGUAAGU CAGUGGUGAA AUCUCGGAGC
UUAACUCCGA AACUGCCAU GAUACUAUAU AUCUUGAAUA UUGUGGAGGU
UUGCGGAAUA UGUCAUGUAG CGGUGAAAUG CUUAGAUUAG ACAUAGAACA
CCUAUUGCGA AGGCAGCAGG CUACACUAUA AUUGACGCUG AGGCACGAAA
GCGUGGGGAU CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCCCUAAACG
AUGGAUACUC GACAUACGCG AUACACUGUG UGUGUCUGAG CGAAAGCAUU
AAGUAUCCCA CCUGGGAAAGU ACGACCCGAA GGUUGAAACU UAAAGGAAU
GGCGG

>A_4_B10 412 bp
CAGCCGCCGC GGUAAUACCU GCAGCCCAAG UGGUGGUCGA UUUUAUUGAG
UCUAAAACGU UCGUAGCCGG UUCGGUAAAU CUUUGGGUAA AUCGGGAAGC
UCAACUUUCC GACUUCGGAA GAGACUGCCG AACUUGGGAC CGGGAGAGGC
UAGAGGUACU UCUGGGUAG GGGUAAAAUC CUGUAAUCCU AGAAGGACCA
CCGGUGGCGA AGGCGUCUAG CUAGAACGGA UCCGACGGUG AGGGACGAAG
CCCUGGGUCG CAAACGGGAU UAGAUACCCC GGUAGUCCAG GGUGUAAACG
CUGCAGACUU GGUGUUGGAG GCAAUUCGGU UGCAUUCAGU GCCGGAGAGA
AGUUGUUAAG UCUGCUACUU GGGGAGUACG UCCGCAAGGA UGAAACUUA
AGGAAUUGGC GG

>A_4_F11 405 bp
CAGCCGCCGC GGUAAUACGG AGGGUGCAAG CGUUAUCCGG AUUCACUGGG
UUUAAAAGGGU GCGUAGGCCG GUAUGUAAGU CAGUGGUGAA AUCUCGGAGC
UUAACUCCGA AACUGCCAUU GAUACUAUUAU AUCUUGAAUA UUGUGGAGGU
UUGCGGAAUA UGUCAUGUAG CGGUGAAAUG CUUAGAUUAUG ACACAGAACA
CCUAUUGCGA AGGCAGCAGG CUACACAUAU AUUGACGCUG AGGCACGAAA
GCGUGGGGAU CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCCCUAAACG
AUGGAUACUC GACAUACGCG AUACACUGCG UGUGUCUGAG CGAAAGCAUU
AAGUAUCCCA CCUGGGAAGU ACGACCGCAA GGUUGAAACU UAAAGGAAUU
GGCGG

>A_5_A2 412 bp
CAGCCGCCGC GGUAACACCU GCAGCCCAAG UGGUGGUCGA UUUUAUUGAG
UCUAAAACGU UCGUAGCCGG UUUGGUAAAU CUUUGGGUUA AUCGGGAAGC
UCAACUUUCC GACUUCGGAA GAGACUGUCA AACUUGGGAC CGGGAGAGGC
UAGAGGUACU UCUGGGGUAG GGGUAAAUC CUGUAAUCCU AGAAGGACCA
CCGGUGGCCA AGGCGUCUAG CUAGAACGGA UCCGACGGUG AGGGACGAAG
CCCUGGGUCG CAAACGGGAU UAGAUACCCG GGUAGUCCAG GGUGUAAACG
CUGUCGACUU GGUGUUGGAG GCCCUUCGGG GGCAUUCAGU GCCGGAGAGA
AGUUGUUAAG UCGGCUACUU GGGGAGUACG UCCGCAAGGA UGAAACUUA
AGGAAUUGGC GG

>A_5_A3 405 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGG AGGGUGCAAG CGUUAUCCGG AUUCACUGGG
UUUAAAAGGGU GCGUAGGCCG GCAUGUAAGU CAGUGGUGAA AUCUCGGAGC
UUAACUCCGA AACUGCCAUU GAUACUAUUAU UUCUUGAAUA UUGUGGAGGU
UUGCGGAAUA UGUCAUGUAG CGGUGAAAUG CUUAGAUUAUG ACAUAGAACA
CCUAUUGCGA AGGCAGCAGG CUACACAUAU AUUGACGCUG AGGCACGAAA
GCGUGGGGAU CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCCCUAAACG
AUGGAUACUC GACAUACGCG AUACACUGUG UGUGUCUGAG CGAAAGCAUU
AAGUAUCCCA CCUGGGAAGU ACGACCGCAG GGUUGAAACU UAAAGGAAUU
GGCGG

>A_5_D2 405 bp
CAGCCGCCGC GGUAAUACGG AGGGUGCAAG CGUUAUCCGG AUUCACUGGG
UUUAAAAGGGU GCGUAGGCCG GUAUGUAAGU CAGUGGUGAA AUCUCGGAGC
UUAACUCCGA AACUGCCAUU GAUACUAUUAU AUCUUGAAUA UUGUGGUGGU
UUGCGGAAUA UGUCAUGUAG CGGUGAAAUG CUUAGAUUAUG ACAUAGAACA
CCUAUUGCGA AGGCAGCAGG CUACACAUAU AUUGACGCUG AGGCACGAAA
GCGUGGGGAU CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCCCUAAACG
AUGGAUACUC GACAUACGCG AUACACUGUG UGUGUCUGAG CGAAAGCAUU
AAGUAUCCCA CCUGGGAAGU ACGACCGCAA GGUUGAAACU UAAAGGAAUU
GGCGG

>A_5_F1 412 bp
CAGCCGCCGC GGUAACACCU GCAGCCCAAG UGGUGGUCGA UUUUAUUGAG
UCUAAAACGU UCGUAGCCGG UUUGGUAAAU CUUUGGGUUA AUCGGGAAGC
UCAACUUUCC GACUUCGGAA GAGACUGUCA AACUUGGGAC CGGGAGAGGC
UAGAGGUACU UCUGGGGUAG GGGUAAAUC CUGUAAUCCU AGAAGGACCA
CCGGUGGCCA AGGCGUCUAG CUAGAACGGA UCCGACGGUG AGGGACGAAG
CCCUGGGUCG CAAGCGGGAU UAGAUACCCG GGUAGUCCAG GGUGUAAACG
CUGCCGACUU GGUGUUGGAG GCCCUUCGGG GGCAUUCAGU GCCGGAGAGA
AGUUGUUAAG UCGGCUACUU GGGGAGUACG UCCGCAGGGA UGAAACUUA
AGGAAUUGGC GG

>A_5_A1 413 bp
CAGCAGCCGC GGUAACACCU GCAGCCCAAG UGGUGGUCGA UUUUAUUGUG
UCUAAAACGU UCGUAGCCGG UUUGGUAAAU CUUUGGGUUA AUCGGGAAGC
UCAACUUUCC GACUUCGGAA GAGACUGUCA AACUUGGGAC CGGGAGAGGC
UAGAGGUACU UCUGGGUAG GGGUAAAUC CUGUAAUCCU AGAAGGACCA
CCGGUGGCCA AGGCGUCUAG CUAGAACGGA UCCGACGGUG AGGGACGAAG
CCCUGGGUCG CAAACGGGAU UAGAUACCCG GGUAGUCCAG GGUGUAAACG
CUGCUCGACU UGGUGUUGGA GGCCCUUCGG GGGCAUUCAG UGCCGGAGAG
AAGUUGUUA GUCGGCUACU UGGGGAGUAC GUCCGCAAGG AUGAAACUUA
AAGGAAUUGG CGG

```

>A_5_B1      413 bp
CAGCCGCCGC  GGUAACACCU  GCAGCCCAAG  UGGUGGUCGA  UUUUAUUGAG
UCUAAAACGU  UCGUAGCCGG  UUUGGUAAAU  CUUUGGGUAA  AUCGGGAAGC
UCAACUUUCC  GACUUCGGAA  GAGACUGUUA  AACUUGGGAC  CGGGAGAGGC
UAGAGGUACU  UCUGGGGUAG  GGGUAAAAC  CUGUAAUCCU  AGAAGGACCA
CCGGAGGCGA  AGGCGUCUAG  CUAGAACGGA  UCCGACGGUG  AGGGACGAAG
CCCUGGGUCG  CAAACGGGAU  UAGAUACCCC  GGUAGUCCAG  GGUGUAAACG
CUGCCGACUU  GGUGUUGGAG  GCCCUUCGGG  GGCAUUCUAG  UGCCGGAGAG
AAGUUGUUA  GUCGGCUACU  UGGGGAGUAC  GUCCGCAAGG  AUGAAACUUA
AAGGAAUUGG  CGG

>A_5_C1      412 bp
CAGCAGCCGC  GGUAACACCU  GCAGCCCAAG  UGGUGGUCGA  UUUUAUUGAG
UCUGAAAACGU  UCGUAGCCGG  UUUGGUAAAU  CUUUGGGUAA  AUCGGGAAGC
UCAACUUUCC  GACUUCGGAA  GAGACUGUCA  AACUUGGGAC  CGGGAGAGGC
UAGAGGUACU  UCUGGGGUAG  GGGUAAAAC  CUGUAAUCCC  AGAAGGACCA
CCGGUGGCGA  AGGCGUCUAG  CUAGAACGGA  UCCGACGGUG  AGGGACGAAG
CCCUGGGUCG  CAAACGGGAU  UAGAUACCCC  GGUAGUCCAG  GGUGUAAACG
CUGCCGACUU  GGUGUUGGAG  GCCCUUCGGG  GGCAUUCAGU  GCCGGAGAGA
AGUUGUUA  UCGGCUACUU  GGGGAGUACG  UCCGCAAGGA  UGAAACUUA
AGGAAUUGGC  GG

>A_5_B3      412 bp
CAGCCGCCGC  GGUAUACCU  GCAGCCCAAG  UGGUGGUCGA  UUUUAUUGAG
UCUAAAACGU  UCGUAGCCGG  UUUGGUAAAU  CUUUGGGUAA  AUCGGGAAGC
UCAACUUUCC  GACUUCGGAA  GAGACUGUCA  AACUUGGGAC  CGGGAGAGGC
UAGAGGUACU  UCUGGGGUAG  GGGUAAAACC  CUGUAAUCCU  AGAAGGACCA
CCGGUGGCGA  AGGCGUCUAG  CUAGAACGGA  UCCGACGGUG  AGGGACGAAG
CCCUGGGUCG  CAAACGGGAU  UAGAUACCCC  GGUAGUCCAG  GGUGUAAACG
CUGCCGACUU  GGUGUUGGAG  GCCCUUCGGG  GGCAUUCAGU  GCCGGAGAGA
AGUUGUUAAG  UCGGCUACUU  GGGGAGUACG  UCCGCAAGGA  UGAAACUUA
AGGAAUUGGC  GG

>A_5_E3      413 bp
CAGCCGCCGC  GGUAUACCG  GCAGCUCGAG  UGGUAGCUGU  UUUUAUUGGG
CCUAAAACGU  UCGUAGCCGG  UUUGAUAAAGU  CUUUGGUGAA  AGCUUGUAGC
UUAACUAUAA  GAAUUGCUGG  AGAUACUAUU  AGACUUGAAG  UCGGGAGAGG
UUAGAGGUAC  UACCGGGGUA  GGGGUGAAAC  CCUAUAAUCC  UGGGAGGACC
ACCUUGGGCG  AAGGCGUCUA  ACUGGAACGA  UCUUGACGGU  GAGUAACGAA
AGCCAGGGGC  GCGAACC GGA  UUAGAUACCC  GGGUAGUCCU  GGCCGUAAC
GAUGUGGACU  UGGUGUUGGA  AUGGCUUUGA  GUUGUUCGG  UGCCGAAAGG
AAGCUGUUA  GUCCACC GCC  UGGGAAGUAC  GGUCGCAAGA  CUGAAACUUA
AAGGAAUUGG  CGG

>A_6_C4      413 bp
CAGCAGCCGC  GGUAACACCG  GCAGCUCGAG  UGGUAGCUGU  UUUUAUUGGG
CCUAAAACGU  UCGUAGCCGG  UUUGAUAAAGU  CUUUGGUGAA  AGCUUGUAGC
UUAACUAUAA  GAAUUGCUGG  AGAUACUAUU  AGACUUGAAG  UCGGGAGAGG
UUAGAGGUAC  UACCGGGGUA  GGGGUGAAAU  CCUAUAAUCC  UGGGAGGACC
ACCUUGGGCG  AAGGCGUCUA  ACUGGAACGA  UCUUGACGGU  GAGUAACGAA
AGCCAGGGGC  GCGAACC GGA  UUAGAUACCC  GGGUAGUCCU  GGCCGUAAC
GAUGUGGACU  UGGUGUUGGA  AUGGCUUUGA  GUUGUUCGG  UGCCGAAAGG
AAGCUGUUA  GUCCACC GCC  UGGGAAGUAC  GGUCGCAAGA  CUGAAACUUA
AAGGAAUUGG  CGG

>A_6_E4      413 bp
CAGCAGCCGC  GGUAACACCG  GCAGCUCGAG  UGGUAGCUGU  UUUUAUUGGG
CCUAAAACGU  UCGUAGCCGG  UUUGAUAAAGU  CUUUGGUGAA  AGCUUGUAGC
UUAACUAUAA  GAAUUGCUGG  AGAUACUAUU  AGACUUGAAG  UCGGGAGAGG
UUAGAGGUAC  UACCGGGGUA  GGGGUGAAAU  CCUAUAAUCC  UGGGAGGACC
ACCUUGGGCG  AAGGCGUCUA  ACUGGAACGA  UCUUGACGGU  GAGUAACGAA
AGCCAGGGGC  GCGAACC GGA  UUAGAUACCC  GGGUAGUCCU  GGCCGUAAC
GAUGUGGACU  UGGUGUUGGA  AUGGCUUUGA  GUUGUUCGG  UGCCGAAAGG
AAGCUGUUA  GUCCACC GCC  UGGGAAGUAC  GGUCGCAAGA  CUGAAACUUA
AAGGAAUUGG  CGG

```

>A_6_G4 413 bp
CAGCCGCCGC GGUAACACCG GCAGCUCGAG UGGUAGCUGU UUUUAUUGGG
CCUAAAAGCGU UCGUAGCCGG UUUGAUAAAGU CUUUGGUGAA AGCUUGUAGC
UUAACUAUAA GAAUUGCUGG AGAUACUAUU AGACUUGAAG UCGGGAGAGG
UUAGAGGUAC UACCGGGGUA GGGGUGAAAU CCUAUAAUCC UGGGAGGACC
ACCUUGGGCG AAGGCUCUA ACUGGAACGA UCUUGACGGU GAGUAACGAA
AGCCAGGGGC GCGAACCGGA UUAGAUACCC GGGUAGUCCU GGCCGUAAC
GAUGUGGACU UGGUGUUGGA AUGGCUUUGA GUUGUUCGG UGCCGAAGGG
AAGCUGUUA GUCCACCGCC UGGGAAGUAC GGUCGCAAGA CUGAAACUUA
AAGGAAUUGG CGG

>A_6_F4 405 bp
CAGCCGCCGC GGUAAUACCG AGGGUGCAAG CGUUAUCCGG AUUCACUGGG
UUUAAAAGGGU GCGUAGCCGG GUAUGUAAGU CAGUGGUGAA AUCUCGGAGC
UUAACUCCGA AACUGCCAUU GAUACUAUUAU AUCUUGAAUA UUGUGGAGGU
UUGCGGAAUA UGUCAUGUAG CGGUGAAAUG CUUAGAUUAG ACAUAGAACA
CCUAUUGCGA AGGCAGCAGG CUACACAUAU AUUGACGCUG AGGCACGAAA
GCGUGGGGAU CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCCCUAACG
AUGGAUACUC GACAUACCGG AUACACUGUG UGUGUCUGAG CGAAAGCAUU
AAGUAUCCCA CCUGGGAAGU ACGACCGCAA GGUUGAAACU UAAAGGAAUU
GGCGG

>A_6_H4 413 bp
CAGCCGCCGC GGUAAUACCG GCAGCUCGAG UGGUAGCUGU UUUUAUUGGG
CCUAAAAGCGU UCGUAGCCGG UUUGAUAAAGU CUUUGGUGAA AGCUUGUAGC
UUAACUAUAA GAAUUGCUGG AGAUACUAUU AGACUUGAAG UCGGGAGAGG
UUAGAGGUAC UACCGGGGUA GGGGUGAAAU CCUAUAAUCC UGGGAGGACC
UCCUGUGGGC AAGGCUCUA ACUGGAACGA UCUUGACGGU GAGUAACGAA
AGCCAGGGGC GCGAACCGGA UUAGAUACCC GGGUAGUCCU GGCCGUAAC
GAUGUGGACU UGGUGUUGGA AUGGCUUUGA GUUGUUCGG UGUCGAAGGG
AAGCUGUUA GUCCACCGCC UGGGAAGUAC GGUCGCAAGA CUGAAACUUA
AAGGAAUUGG CGG

>A_6_F6 413 bp
CAGCCGCCGC GGUAAUACUG GCAGCUCGAG UGGUAGCUGU UUUUAUUGGG
CCUAAAAGCGU UCGUAGCCGG UUUGAUAAAGU CUUUGGUGAA AGCUUGUAGC
UUAACUAUAA GAAUUGCUGG AGAUACUAUU AGACUUGAAG UCGGGAGAGG
UUAGAGGUAC UACCGGGGUA GGGGUGAAAU CCUAUAAUCC UGGGAGGACC
ACCUUGGGCG AAGGCUCUA ACUGGAACGA UCUUGACGGU GAGUAACGAA
AGCCAGGGGC GCGAACCGGA UUAGAUACCC GGGUAGUCCU GGCCGUAAC
GAUGUGGACU UGGUGUUGGA AUGGCUUUGA GUUGUUCGG UGCCGAAGGG
AAGCUGUUA GUCCACCGCC UGGGAAGUAC GGUCGCAAGA CUGAAACUUA
AAGGAAUUGG CGG

>A_7_A10 412 bp
CAGCCGCCGC GGUAACACCU GCAGCCCAAG UGGUGGUCGA UUUUAUUGAG
CCUAAAACCGU UCGUAGCCGG UUUGGUAUUU CUUUGGGUAA AUCGGGAAGC
UCAACUUUCC GACUUCGAA GAGACUGUCA AACUUGGGAC CGGGAGAGGC
UAGAGGUACU UCUGGGGUAG GGGUAAAUC CUGUAAUCCU AGAAGGACCA
CCGGUGGCGA AGGCGUCUAG CUAGAACGGA UCCGACGGUG AGGGACGAAG
CCCUGGGUCG CAAACGGGAU UAGAUACCC GGUAGUCCAG GGUGUAAACG
CUGCCGACUU GGUGUCGGAG GCCCUUCGGG GGCAUUCAGU GCCGGAGAGA
AGUUGUUAAG UCGGCUACUU GGGGAGUACG UCCGCAAGGA UGAAACUUA
AGGAAUUGGC GG

>A_7_D11 412 bp
CAGCCGCCGC GGUAAUACCU GCAGCCCAAG UGGUGGUCGA UUUUAUUGAG
UCUAAAACCGU UCGUAGCCGG UUUGGUAUUU CUUUGGGUAA AUCGGGAAGC
UUAACUUUCC GACUUCGAA GAGACUGUCA AACUUGGGAC CGGGAGAGGC
UAGAGGUACU UCUGGGUAG GGGUAAAUC CUGUAAUCCU AGAAGGACCA
CCGGUGGCGA UGGCGUCUAG CUAGAACGGA UCCGACGGUG AGGGACGAAG
CCCUGGGUCG CAAACGGGAU UAGAUACCC GGUAGUCCAG GGUGUAAACG
CUGCAGACUU GGUGUUGGAG GCCCUUCGGG GGCAUUCAGU GCCGGAGAGA
AGUUGUUAAG UCUGCUACUU GGGGAGUACG UCCGCAAGGA UGAAACUUA
AGGAAUUGGC GG

>A_7_G10 412 bp
CAGCCGCCGC GGUAACACCU GCAGCCCAAG UGGUGGUCGA UUUUAUUGAG
UCUAAAACGU UCGUAGCCGG UUUGGUAAAU CUUUGGGUAA AUCGGGAAGC
UUAACUUUCC GACUUCGAA GAGACUGUCA AACUUGGGAC CGGGAGAGGC
UAGAGGUACU UCUGGGGUAG GGGUAAAUC CUGUAAUCCU AGAAGGACCA
CCGGUGGCGA AGGCGUCUAG CUAGAACGGA UCCGACGGUG AGGGACGAAG
CCCUGGGUCG CAAACGGGAU UAGAUACCCG GGUAGUCCAG GGUGUAAACG
CUGCAGACUU GGUGUUGGAG GCCCUUCGGG GGCAUUCAGU GCCGGAGAGA
AGUUGUUAAG UCUGCUACUU GGGGAGUACG UCCGCAAGGA UGAAACUUA
AGGAAUUGGC GG

>A_7_H12 412 bp
CAGCCGCCGC GGUAAUACCU GCAGCCCAAG UGGUGGUCGA UUUUAUUGAG
UCUAAAACGU UCGUAGCCGG UUUGGUAAAU CUUUGGGUAA AUCGGGAAGC
UCAACUUUCC GACUUCGAA GAGACUGUCA AACUUGGGAC UGGGAGAGGC
UAGAGGUACU UCUGGGGUAG GGGUAAAUC CUGUAAUCCU AGAAGGACCA
CCGGUGGCGA AGGCGUCUAG CUAGAACGGA UCCGACGGUG AGGGACGAAG
CCCUGGGUCG CAAACGGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAG GGUGUAAACG
CUGCCGACUU GGUGUUGGAG GCCCUUCGGG GGCAUUCAGU GCCGGAGAGA
AGUUGUUAAG UCGGCUACUU GGGGAGUACG UCCGCAAGGA UGAAACUUA
AGGAAUUGGC GG

>A_7_B10 413 bp
CAGCCGCCGC GGUAAUACCU GCAGCCCAAG UGGUGGUCGA UUUUAUUGAG
UCUAAAACGU UCGUAGCCGG UUUGGUAAAU CUUUGGGUAA AUCGGGAAGC
UCAACUUUCC GACUUCGAA GAGACUGUCA AACUUGGGAC CGGGAGAGGC
UAGAGGUACU UCUGGGGUAG GGGUAGAAUC CUGUAAUCCU AGAAGGACCA
CCGGUGGCGA AGGCGUCUAG CUAGAACGGA UCCGACGGUG AGGGACGAAG
CCCUGGGUCG CAAACGGGAU UAGAUACCCG GGUAGUCCAG GGUGUAAACG
CUGCCUACUU GGUGUUGGAG GCCCUUCGGG GGCAUUCUAG UGCCGGAGAG
AAGUUGUUA GUCGCUACU UGGGGAGUAC GUCCGCAAGG AUGAAACUUA
AAGGAAUUGG CGG

>A_7_H10 413 bp
CAGCCGCCGC GGUAACACCU GCAGCCCAAG UGGUGGUCGA UUUUAUUGAG
UCUAAAACGU UCGUAGCCGG UUUAGGUAAA UCUIUGGGUA AAUCGGGAAG
CUUAACUUUC CGACUCCGA AGAGACUGUC AAACUUGGGA CCGGGAGAGG
CUAGAGGUAC UUCUGGGGUA GGGGUAAAUC CCUGUAAUCC UAGAAGGACC
ACCGUGGCGA AAGCGUCUA GCUAGAACGG AUCCGACGGU GAGGGACGAA
GCCUUGGGUC GCAAACGGGA UUAGAUACCC CGGUAGUCCA GGGUGUAAAC
GCUGCAGACU UGGUGUUGGA GGCCUUCGG GGGCAUUCAG UGCCGGAGAG
AAGUUGUUA GUCUGCUACU UGGGGAGUAC GUCCGCAAGG AUGAAACUUA
AAGGAAUUGG CGG

>A_7_E11 412 bp
CAGCAGCCGC GGUAACACCU GCAGCCCAAG UGGUGGUCGA UUUUAUUGAG
UCUAAAACGU UCGUAGCCGG UUUGGUAAAU CUUUGGGUAA AUCGGGAAGC
UUAACUUUCC GACUUCGAA GAGACUGUCA AACUUGGGAC CGGGAGAGGC
UAGAGGUACU UCUGGGGUAG GGGUAAAUC CUGUAAUCCU AGAAGGACCA
CCGGUGGCGA AGGCGUCUAG CUAGAACGGA UCCGACGGUG AGGGACGAAG
CCCUGGGUCG CAAACGGGAU UAGAUACCCG GGUAGUCCAG GGUGUAAACG
CUGCAGACUU GGUGUUGGAG GCCCUUCGGG GGCAUUCAGU GCCGGAGAGA
AGUUGUUAAG UCUGCUACUU GGGGAGUACG UCCGCAAGGA CGAAACUUA
AGGAAUUGGC GG

>A_7_G12 414 bp
CAGCCGCCGC GGUAAUACCU AGCAGCCCAA GUGGUGGUCG AUUUUAUUGAG
AGUCUAAAAC GUUCGUAGCC GGUUUGGUAA ACCUUGGGU AAAUCGGGA
GCUCAACUUU CCGACUCCG AAGAGACUGU CAAACUUGGG ACCGGGAGAG
GCUAGAGGUA CUUCUUGGGU AGGGGUAAA UCCUGUAAUC CUAGAAGGAC
CACCGGUGGC GAAGGCGUCU AGCUAGAACG GAUCCGACGG UGAGGGACGA
AGCCCUUGGU CGCAAACGGG AUUAGAUACC CCGGUAGUCC AGGGUGUAAA
CGCUGCCGAC UUGGUGUUGG AGGCCCUUCG GGGGCAUUCU GUGCCGGAGA
GAAGUUGUUA AGUCGGCUAC UUGGGGAGUA CGUCCGCAAG GAUGAAACU
AAAGGAAUUG GCGG

>A_8_A7 412 bp
CAGCCGCCGC GGUAAUACCU GCAGCCCAAG UGGUGGUCGA UUUUAUUGAG
UCUAAAACGU UCGUAGCCGG UUUGGUAAAU CUUUGGGUAA AUCGGGAAGC
UCAACUUUCC GACUUCGGAA GAGACUGCCG AACUUGGGAC CGGGAGAGGC
UAGAGGUACU UCUGGGGUAG GGGUAAAUC CUGUAAUCCU AGAAGGACCA
CCGGUGGCCA AGGCGUUUAG CUAGAACGGA UCCGACGGUG AGGGACGAAG
CCCUGGGUCG CAAACGGGAU UAGAUACCCC GGUAGUCCAG GGUGUAAACG
CUGCAGACUU GGUGUUGGAG GCAAUUCGGU UGCAUUCAGU GCCGGAGAGA
AGUUGUUAAG UCUGCUACUU GGGGAGUACG UCCGCAAGGA UGAAACUUA
AGGAAUUGGC GG

>A_8_G7 405 bp
CAGCCGCCGC GGUAAUACGG AGGGUGCAAG CGUUAUCCGG AUUCACUGGG
UUUAAAAGGU GCGUAGCCGG GUAUGUAAGU CAGUGGUGAA AUCUCGGAGC
UUAACCCCGA AACUGCCAUU GAUACUAUUAU AUCUUGAAUA UUGUGGAGGU
UUGCGGAAUA UGUCAUGUAG CGGUGAAAUG CUUAGAUUAUG ACAUAGAACA
CCUAUUGCGA AGGCAGCAGG CUACACAUAU AUUGACGCUG AGGCACGAAA
GCGUGGGGAU CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCCCUAAACG
AUGGAUACUC GACAUACGCG AUACACUGUG UGUGUCUGAG CGAAAGCAUU
AAGUAUCCCA CCUGGGAAGU ACGACCGCAA GGUUGAAACU UAAAGGAAUU
GGCGG

>A_8_B8 411 bp
CAGCAGCCGC GGUAAACACCU GCAGCCCAAG UGGUGGUCGA UUUUAUUGAG
UCUAAAACGU UCGUAGCCGG UUUGGUAAAU CUUUGGGUAA AUCGGGAAGC
UCAACUUUCC GACUUCGGAA GAGACUGUCA AACUUGGGAC CGGGAGAGGC
UAGAGGUACU UCUGGGGUAG GGGUAAAUC CUGUAAUCCU AGAAGGACCA
CCGGUGGCCA AGGCGUCUAG CUAGAACGGA UCCGACGGUG AGGGACGAAG
CCCUGGGUCG CAAACGGGAU UAGAUACCCC GGUAGUCCAG GGUGUAAACG
CUCCCGACUU GGUGUUGGAG GCCCUUCGGG GGCAUUCAGU GCCGGAGAGA
AGUUGUUAAG UCGGCUACUU GGGGAGUACG UCCGCAAGAU GAAACUUA
GGAAUUGGCG G

>A_8_C7 405 bp
CAGCCGCCGC GGUAAUACGG AGGGUGCAAG CGUUAUCCGG AUUCACUGGG
UUUAAAAGGU GCGUAGCCGG GUAUGUAAGU CAGUGGUGAA AUCUCGGAGC
UUAACUCCGA AAUUGCCAUU GAUACUAUUAU AUCUUGAAUA UUGUGGAGGU
UUGCGGAAUA UGUCAUGUAG CGGUGAAAUG CUUAGAUUAUG ACAUAGAACA
CCUAUUGCGA AGGCAGCAGG CUACACAUAU AUUGACGCUG AGGCACGAAA
GCGUGGGGAU CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCCCUAAACG
AUGGAUACUC GACAUACGCG AUACACUGUG UGUGUCUGAG CGAAAGCAUU
AAGUAUCCCA CCUGGGAAGU ACGACCGCAA GGUUGAAACU UAAAGGAAUU
GGCGG

>A_8_E7 412 bp
CAGCCGCCGC GGUAAUACCU GCAGCCCAAG UGGUGGUCGA UUUUAUUGAG
UCUAAAACGU UCGUAGCCGG UUUGGUAAAU CUUUGGGUAA AUCGGGAAGC
UCAACUUUCC GACUUCGGAA GAGACUGUCA AACUUGGGAC CGGGAGAGGC
UAGAGGUACU UCUGGGGUAG GGGUAAAUC CUGUAAUCCU AGAAGGACCA
CCGGUGGCCA AGGCGUCUAG CUAGAACGGA UCCGACGGUG AGGGACGAAG
CCCUGGGUCG CAAACGGGAU UAGAUACCCC GGUAGUCCAG GGUGUAAACG
CCGCCGACUU GGUGUUGGAG GCCCUUCGGG GGCAUUCAGU GCCGGAGAGA
AGUUGUUAAG UCGGCUACUU GGGGAGUACG UCCGCAAGGA UGAAACUUA
AGGAAUUGGC GG

>A_8_F7 413 bp
CAGCCGCCGC GGUAAUACCU GCAGCCCAAG CGGUGGUCGA UGUUAUUGAG
UCUAAAAGCGU UCGUAGCCGG UUUGGUAAAU CUUUGGGUAA AUCGGGAAGC
UCAACUUUCC GACUUCGGAA GAGACUGUCA AACUUGGGAC CGGGAGAGGC
UAGAGGUACU UCUGGGGUAG GGGUAAAUC CUGUAAUCCU AGAAGGACCA
CCGGUGGCCA AGGCGUCUAG CUAGAACGGA UCCGACGGUG AGGGACGAAG
CCCUGGGUCG CAAACGGGAU UAGAUACCCC GGUAGUCCAG GGUGUAAACU
GCUGCCGACU UGGUGUUGGA GGCCCUUCGG GGGCAUUCAG UGCCGGAGAG
AAGUUGUUAU GUCGGCUACU UGGGGAGUAC GUCCGCAAGG AUGAAACUUA
AAGGAAUUGG CGG

```

>A_8_F8      412 bp
CAGCCGCCGC GGUAAUACUU GCAGCCCAAG UGGUGGUCGA UUUUAUUGAG
UCUAAAACGU UCGUAGCCGG UUUGGUAAAU CUUUGGGUAA AUCGGGAAGC
UCAACUUUCC GACUUCGGAA GAGACUGUCA AACUUGGGAC CGGGAGAGGC
UAGAGGUACU UCUGGGGUAG GGGUAAAAUC CUGUAAUCCU AGAAGGACCA
CCGGUGGCGA AGGCGUCUAG CUAGAACGGA UCCGACGGUG AGGGACGAAG
CCCUGGGUCG CAAACGGGAU UAGAUACCCC GGUAGUCCAG GGUGUAAACG
CUGCCGACUU GGUGUUGGAG GCCCUUCGGG GGC AUUCAGU GCCCGAGAGA
AGUUGUUAAG UCGGCUACUU GGGGAGUACG UCCGCAAGGA UGAAACUUA
AGGAAUUGGC GG
>A_9_A1      405 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGA AGGGUGCAAG CGUUAUCCGG AUUCACUGGG
UUUAAAAGGGU GCGUAGGCGG GUAUGUAAGU CAGUGGUGAA AUCUCGGAGC
UUAACUCCGA AACUGCCAUU GAUACUAUUAU AUCUUGAUUA UUGUGGAGGU
UUGCGGAAUA UGUCAUGUAG CGGUGAAAUG CUUAGAUUAUG ACAUAGAACA
CCUAUUGCGA AGGCAGCAGG CUACACAUUAU AUUGACGCUG AGGCACGAAA
GCGUGGGGAU CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCCCUAAACG
AUGGAUACUC GACAUACGCG AUACACUGCG UGUGUCUGAG CGAAAGCAUU
AAGUAUCCCA CCUGGGAAGU ACGACCGCAA GGUUGAAACU UAAAGGAAUU
GGCGG
>A_9_E1      405 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACGA AGGGUGCAAG CGUUAUCCGG AUUCACUGGG
UUUAAAAGGGU GCGUAGGCGG GUAUGUAAGU CAGUGGUGAA AUCUCGGAGC
UUAACUCCGA AACUGCCAUU GAUACUAUUAU AUCUUGAUUA UUGUGGAGGU
UUGCGGAAUA UGUCAUGUAG CGGUGAAAUG CUUAGAUUAUG ACAUAGAACA
CCUAUUGCGA AGGCAGCAGG CUACACAUUAU AUUGACGCUG AGGCACGAAA
GCGUGGGGAU CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCCCUAAACG
AUGGAUACUC GACAUACGCG AUACACUGCG UGUGUCUGAG CGAAAGCAUU
AAGUAUCCCA CCUGGGAAGU ACGACCGCAA GGUUGAAACU UAAAGGAAUU
GGCGG
>A_9_G1      405 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACCG AGGGUGCAAG CGUUAUCCGG AUUCACUGGG
UUUAAAAGGGU GCGUAGGCGG GUAUUAAGU CAGUGGUGAA AUCCUAGAGC
UUAACUCUAG AACUGCCAUU GAUACUAUUU AUCUUGAAUA UUGUGGAGGU
AAGCGGAAUA UGUCAUGUAG CGGUGAAAUG CUUAGAUUAUG ACAUAGAACA
CCUAUUGCGA AGGCAGCUUA CUACGCAUUAU AUUGACGCUG AGGCACGAAA
GCGUGGGGAU CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCCCUAAACG
AUGGAUACUC GACAUACGCG AUACACUGUG UGUGUCUGAG CGAAAGCAUU
AAGUAUCCCA CCUGGGAAGU ACGACCGCAA GGUUGAAACU UAAAGGAAUU
GGCGG
>A_9_A2      405 bp
CAGCCGCCGC GGUAAUACCG AGGGUGCAAG CGUUAUCCGG AUUCACUGGG
UUUAAAAGGGU GCGUAGGCGG AUAGGUAAAGU CAGGGGUGAA AUCCUGGAGC
UUAACUCCAG AACUGCCUUU GAUACUAUCU AUCUUGAAUA UGGUGGAGGU
AAGCGGAAUA UGUCAUGUAG CGGUGAAAUG CAUAGAUUAUG ACAUAGAACA
CCUAUUGCGA AGGCAGCUUA CUACGCCUUAU AUUGACGCUG AGGCACGAAA
GCGUGGGGAU CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCCCUAAACG
AUGAUUACUC GACGUAUGCG AUACACAGUA UGCGUCUGAG CGAAAGCAUU
AAGUAAUCCA CCUGGGAAGU ACGACCGCAA GGUUGAAACU UAAAGGAAUU
GGCGG
>A_9_H1      406 bp
CAGCAGCCGC GGUAAUACCG AGGGUGCAAG CGUUAUCCGG AUUCACUGGG
UUUAAAAGGGU GCGUAGGCGG AUAGGUAAAGU CAGGGGUGAA AUCCUGGAGC
UUAACUCCAG AACUGCCUUU GAUACUAUCU AUCUUGAAUA UGGUGGAGGU
AAGCGGAAUA UGUCAUGUAG CGGUGAAAUG CAUAGAUUAUG ACAUAGAGCA
CCUAUUGCGA AGGCAGCUUA CUACGCCUUAU AUUGACGCUG AGGCACGAAA
GCGUGGGGAU CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC GCCCUAAACG
AUGAUUACUC GACGUAUGCG AUACACUAGU AUGCGUCUGA GCGAAAGCAU
UAAGUAAUCC ACCUGGGAUG UAUGACCGCA GGGUUGAAAC UUAAGGAAU
UGGCGG

```

```
>A_9_C2      406 bp
CAGCCGCCGC  GGUAAUACGG  AGGGUGCAAG  CGUUAUCCGG  AUUCACUGGG
UUUAAAGGGU  GCGUAGGCGG  AUAGGUAAAGU  CAGGGAGUGA  AAUCCUGGAG
CUUAACUCCA  GAACUGCCUU  UGAUACUAUC  UAUCUUGAAU  AUGGUGGAGG
UAAGCGGAAU  AUGUCAUGUA  GCGGUGAAAU  GCAUAGAUAU  GACAUAGAAC
ACCUAUUGCG  AAGGCAGCUU  ACUACGCCUA  UAUUGACGCA  GAGGCACGAA
AGCGUGGGGA  UCAAACAGGA  UUAGAUACCC  UGGUAGUCCA  CGCCCUAAAC
GAUGAUUACU  CGACGUAUGC  GAUACACAGU  AUGCGUCUGA  GCGAAAGCAU
UAAGUAAUCC  ACCUGGGAAG  UACGACCGCA  AGGUUGAAAC  UAAAGGAAU
UGGCGG
```

Tabelle A9: Ausgewählte RDP-Resultate für Sequenzen von unspezifisch (behandlungsunabhängig) aufgetretenen Klonen in den SSCP-Banden des *Clostridia*-spezifischen SSCP-Gels

Klon	S_ab score	nächster Verwandter und Accession Nummer	Taxonomische Einordnung
C_1_B1	0,95	uncultured bacterium; 1103200823704; EU844189	<i>Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Lachnospiraceae</i>
C_1_C1	0,97	<i>Clostridium aminophilum</i> ; 152R-1b; DQ278862	
C_1_G2	0,96		
C_1_H3	0,97		
C_2_D6	0,86	uncultured bacterium; KsuB12; AB291446 u.a.	<i>Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Ruminococcaceae</i>
C_2_G6	0,95	uncultured bacterium; 1103200820170; EU844109	<i>Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Lachnospiraceae</i>
C_2_B4	0,98	uncultured <i>Aquabacterium</i> sp.; SSCP Band 56-B547 from PCB-biofilm 5; AJ966866	<i>Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Incertae sedis 5</i>
C_2_F4	0,97		
C_2_A6	0,94	uncultured bacterium; WIM-Mc-37; AY309104	<i>Proteobacteria; Gammaproteobacteria; unclassified</i>
C_2_E6	1,00	uncultured bacterium; SSCP band Rum_12d; AJ874226	<i>Proteobacteria; unclassified</i>
C_3_G8	0,95	uncultured bacterium; SSCP band Ant_09d; AJ874181	<i>Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Caulobacterales; Caulobacteraceae</i>
C_3_D7	1,00	uncultured <i>Aquabacterium</i> sp.; SSCP Band 56-B547 from PCB-biofilm 5; AJ966866	<i>Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Incertae sedis 5</i>
C_3_G7	0,95		
C_3_C8	0,83	uncultured bacterium; TRT72; FJ032553	<i>Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Lachnospiraceae; unclassified</i>
C_3_A7	0,93	uncultured bacterium; DGGE band: KH03-30B; AB307981	unclassified <i>Bacteria</i>
C_4_D12	0,79	uncultured bacterium; TRT72; FJ032553	<i>Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Lachnospiraceae; unclassified</i>

Fortsetzung Tabelle A9:

Klon	S_ab score	nächster Verwandter und Accession Nummer	Taxonomische Einordnung
C_4_A10	0,93	uncultured bacterium; NWD62; AB334040	<i>Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Lachnospiraceae</i>
C_4_C12	0,91	uncultured bacterium; 1103200821686; EU843149	
C_4_B11	0,81	uncultured bacterium; 1103200828366; EU845299	
C_4_C10	0,85	<i>Clostridium aminophilum</i> ; 152R-1b; DQ278862	
C_4_G10	0,87		
C_4_H12	0,94		
C_4_E11	0,92	uncultured rumen bacterium 4C3d-8; AB034056 u.a.	
C_5_C2	0,81	uncultured bacterium; 1103200825370; EU843319	<i>Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Lachnospiraceae</i>
C_5_D1	0,94	uncultured bacterium; 1103200831002; EU843487	
C_5_B1	0,96	uncultured <i>Aquabacterium</i> sp.; SSCP Band 56-B547 from PCB-biofilm 5; AJ966866	<i>Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales;</i> <i>Incertae sedis 5</i>
C_6_C4	0,97	uncultured bacterium; ODP-92B-02; DQ490042 u.a.	<i>Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Caulobacterales;</i> <i>Caulobacteraceae</i>
C_6_E4	0,96	uncultured bacterium; ODP-92B-02; DQ490042 u.a.	
C_6_A4	0,98	uncultured <i>Aquabacterium</i> sp.; SSCP Band 56-B547 from PCB-biofilm 5; AJ966866	<i>Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales;</i> <i>Incertae sedis 5</i>
C_6_C6	1,00	uncultured bacterium; NAT70; AJ607025	<i>Proteobacteria; Gammaproteobacteria; unclassified</i>
C_7_B8	0,93	uncultured <i>Cytophagales</i> bacterium; DGGE gel band LY03; EU685803	<i>Bacteroidetes; Sphingobacteria; Sphingobacteriales;</i> <i>Sphingobacteriaceae</i>
C_7_E7	0,94	uncultured bacterium; ODP-92B-02; DQ490042 u.a.	<i>Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Caulobacterales;</i> <i>Caulobacteraceae</i>
C_7_D9	1,00	uncultured bacterium; EV818BHEB5102702SAS92; DQ256352	<i>Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales;</i> <i>Moraxellaceae</i>

Fortsetzung Tabelle A9:

Klon	S_ab score	nächster Verwandter und Accession Nummer	Taxonomische Einordnung
C_8_A1	0,97	uncultured rumen bacterium 4C3d-8; AB034056 u.a.	<i>Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Lachnospiraceae</i>
C_8_D2	0,79	<i>Clostridium aminophilum</i> ; 152R-1b; DQ278862	
C_9_C4	0,97	<i>Clostridium lentocellum</i> ; DSM 5427; X76162 u.a.	<i>Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; unclassified</i>
C_9_C5	0,95	uncultured rumen bacterium 4C3d-8; AB034056 u.a.	<i>Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Lachnospiraceae</i>
C_10_B7	0,96	uncultured <i>Aquabacterium</i> sp.;	<i>Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Incertae sedis 5</i>
C_10_D7	1,00	SSCP Band 56-B547 from PCB-biofilm 5; AJ966866	
C_10_F7	0,98	uncultured bacterium; NAT69; AJ607024	<i>Proteobacteria; Gammaproteobacteria; unclassified</i>
C_10_D9	0,94	uncultured bacterium; SSCP band Rum_12d; AJ874226	<i>Proteobacteria; unclassified</i>
C_11_A10	0,97	uncultured bacterium; NED5E8; EF445268	<i>Firmicutes; Clostridia; Clostridiales Lachnospiraceae</i>
C_11_D12	0,95		
C_11_F10	0,90		
C_11_B10	0,98	uncultured bacterium; SSCP band Ant_09d; AJ874181	<i>Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Caulobacterales; Caulobacteraceae</i>
C_11_H11	0,97	uncultured <i>Aquabacterium</i> sp.;	<i>Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Incertae sedis 5</i>
		SSCP Band 56-B547 from PCB-biofilm 5; AJ966866	
C_13_A4	0,97	uncultured bacterium; C764; AY916349 u.a.	<i>Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Lachnospiraceae</i>
C_13_B5	0,90	<i>Clostridium aminophilum</i> ; 152R-1b; DQ278862	
C_13_D4	0,82	uncultured bacterium; SJTU_D_15_41; EF401759	
C_13_E5	0,85	uncultured bacterium; SJTU_D_11_18; EF401468	

Fortsetzung Tabelle A9:

Klon	S_ab score	nächster Verwandter und Accession Nummer	Taxonomische Einordnung
C_13_D6	0,91	uncultured <i>Cytophagales</i> bacterium; DGGE gel band LY03; EU685803	<i>Bacteroidetes; Sphingobacteria; Sphingobacteriales;</i> <i>Sphingobacteriaceae</i>
C_14_B9	0,80	uncultured rumen bacterium 4C3d-8; AB034056 u.a.	<i>Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Lachnospiraceae</i>
C_14_D8	0,98	uncultured bacterium; C764; AY916349 u.a.	
C_14_E7	0,93	<i>Clostridium aminophilum</i> ; 152R-1b; DQ278862	

Tabelle A10: Ausgewählte RDP-Resultate für Sequenzen von unspezifisch (behandlungunabhängig) aufgetretenen Klonen in den SSCP-Banden des *Bacteroidetes-Prevotella*-spezifischen SSCP-Gels

Klon	S_ab score	nächster Verwandter und Accession Nummer	Taxonomische Einordnung
B_1_D1	1,00	uncultured <i>Aquabacterium</i> sp.; SSCP Band 56-B547 from PCB-biofilm 5; AJ966866	<i>Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales;</i> <i>Incertae sedis 5</i>
B_1_G1	1,00	uncultured <i>Burkholderiales</i> bacterium; NSP3Q1s46; EU629394	
B_1_D2	0,98	uncultured bacterium; SSCP band Ant_09d; AJ874181	<i>Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Caulobacterales;</i> <i>Caulobacteraceae</i>
B_2_D5	0,98	uncultured bacterium; AL1-1_02; AJ880159 u.a.	<i>Actinobacteria; Actinobacteria; Actinomycetales;</i> <i>Propionibacteriaceae</i>
B_2_E5	0,96	uncultured bacterium; AL1-1_02; AJ880159 u.a.	
B_2_A4	1,00	uncultured bacterium; ODP-92B-02; DQ490042 u.a.	<i>Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Caulobacterales;</i> <i>Caulobacteraceae</i>
B_2_D6	0,95	uncultured bacterium; ODP-92B-02; DQ490042 u.a.	
B_2_F5	0,92	uncultured bacterium; ODP-92B-02; DQ490042 u.a.	
B_2_G4	0,96	uncultured bacterium; SSCP band Ant_09d; AJ874181	
B_2_B4	0,98	uncultured <i>Burkholderiales</i> bacterium; NSP3Q1s46; EU629394	<i>Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales;</i> <i>Incertae sedis 5</i>
B_3_A7	0,99	uncultured bacterium; CD140; DQ441391 u.a.	<i>Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales;</i> <i>Incertae sedis 5</i>
B_3_E7	0,96	uncultured <i>Aquabacterium</i> sp.;	
B_3_A8	1,00	SSCP Band 56-B547 from PCB-biofilm 5; AJ966866	
B_4_B11	0,86	uncultured <i>Cytophagales</i> bacterium; DGGE gel band LY03; EU685803	<i>Bacteroidetes; Sphingobacteria; Sphingobacteriales;</i> <i>Sphingobacteriaceae</i>
B_4_A10	0,95	uncultured bacterium; SSCP band Ant_09d; AJ874181	<i>Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Caulobacterales;</i> <i>Caulobacteraceae</i>

Fortsetzung Tabelle A10:

Klon	S_ab score	nächster Verwandter und Accession Nummer	Taxonomische Einordnung
B_4_F10	0,98	uncultured <i>Burkholderiales</i> bacterium; NSP3Q1s46; EU629394	<i>Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales;</i> <i>Incertae sedis 5</i>
B_4_G10	1,00	uncultured <i>Aquabacterium</i> sp.; SSCP Band 56-B547 from PCB-biofilm 5; AJ966866	
B_5_E1	1,00	uncultured bacterium; AL1-1_02; AJ880159 u.a.	<i>Actinobacteria; Actinobacteria; Actinomycetales;</i> <i>Propionibacteriaceae</i>
B_5_D3	0,95	<i>Moraxella osloensis</i> ; 3; Y15855 u.a.	<i>Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales;</i> <i>Moraxellaceae</i>
B_6_A4	0,97	uncultured <i>Aquabacterium</i> sp.; SSCP Band 56-B547 from PCB-biofilm 5; AJ966866	<i>Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales;</i> <i>Incertae sedis 5</i>
B_6_C4	0,93	uncultured bacterium; NAT70; AJ607025	<i>Proteobacteria; Gammaproteobacteria; unclassified</i>
B_6_H5	0,98		
B_6_D6	0,97	uncultured bacterium; EV818BHEB5102702SAS92; DQ256352	<i>Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales;</i> <i>Moraxellaceae</i>
B_7_C7	0,98	uncultured bacterium; ODP-92B-02; DQ490042 u.a.	<i>Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Caulobacterales;</i> <i>Caulobacteraceae</i>
B_7_B8	0,98	uncultured bacterium; CD140; DQ441391 u.a.	<i>Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales;</i> <i>Oxalobacteraceae</i>
B_7_E7	0,94	uncultured <i>Aquabacterium</i> sp.; SSCP Band 56-B547 from PCB-biofilm 5; AJ966866	<i>Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales;</i> <i>Incertae sedis 5</i>
B_7_F7	0,96		
B_7_H8	0,97	<i>Moraxella osloensis</i> ; 3; Y15855 u.a.	<i>Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales;</i> <i>Moraxellaceae</i>
B_7_D8	0,98	uncultured bacterium; AL1-1_02; AJ880159 u.a.	<i>Actinobacteria; Actinobacteria; Actinomycetales;</i> <i>Propionibacteriaceae</i>
B_7_F8	0,98	uncultured bacterium; AL1-1_02; AJ880159 u.a.	

Fortsetzung Tabelle A10:

Klon	S_ab score	nächster Verwandter und Accession Nummer	Taxonomische Einordnung
B_8_D10	0,96	uncultured <i>Aquabacterium</i> sp.; SSCP Band 56-B547 from PCB-biofilm 5; AJ966866	<i>Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Incertae sedis 5</i>
B_9_B1	0,95	uncultured bacterium; ODP-92B-02; DQ490042	<i>Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Caulobacterales; Caulobacteraceae</i>
B_9_C2	0,98	uncultured <i>Burkholderiales</i> bacterium; NSP3Q1s46; EU629394	<i>Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Incertae sedis 5</i>
B_9_E2	0,96	uncultured <i>Aquabacterium</i> sp.;	
B_9_F1	0,96	SSCP Band 56-B547 from PCB-biofilm 5; AJ966866	
B_10_D5	0,92	uncultured bacterium; SSCP band Ant_09d; AJ874181	<i>Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Caulobacterales; Caulobacteraceae</i>
B_10_F4	0,93		
B_10_C4	0,98	uncultured <i>Aquabacterium</i> sp.; SSCP Band 56-B547 from PCB-biofilm 5; AJ966866	<i>Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Incertae sedis 5</i>
B_10_E5	0,95	uncultured <i>Burkholderiales</i> bacterium; NSP3Q1s46; EU629394	<i>Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Incertae sedis 5</i>
B_10_C6	0,96	uncultured bacterium; NAT70; AJ607025	<i>Proteobacteria; Gammaproteobacteria; unclassified</i>
B_11_E7	0,86	uncultured bacterium; Rock63; AM773399	<i>Actinobacteria; Actinobacteria; Actinomycetales; unclassified</i>
B_11_F7	0,95	uncultured <i>Cytophagales</i> bacterium; DGGE gel band LY03; EU685803	<i>Bacteroidetes; Sphingobacteria; Sphingobacteriales; Sphingobacteriaceae</i>
B_11_A7	1,00	uncultured <i>Aquabacterium</i> sp.; SSCP Band 56-B547 from PCB-biofilm 5; AJ966866	<i>Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Incertae sedis 5</i>
B_11_B9	1,00		
B_12_H11	0,93	uncultured bacterium; ODP-92B-02; DQ490042 u.a.	<i>Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Caulobacterales; Caulobacteraceae</i>
B_12_D10	1,00	uncultured eubacterium WD2124; AJ292676 u.a.	<i>Proteobacteria; Gammaproteobacteria; unclassified</i>

Fortsetzung Tabelle A10:

Klon	S_ab score	nächster Verwandter und Accession Nummer	Taxonomische Einordnung
B_12_B10	1,00	uncultured <i>Aquabacterium</i> sp.; SSCP Band 56-B547 from PCB-biofilm 5; AJ966866	<i>Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Incertae sedis 5</i>
B_12_B12	1,00	uncultured <i>Aquabacterium</i> sp.; SSCP Band 56-B547 from PCB-biofilm 5; AJ966866	
B_12_F10	0,96	uncultured <i>Burkholderiales</i> bacterium; NSP3Q1s46; EU629394	
B_13_E1	0,98	uncultured bacterium; ODP-92B-02; DQ490042 u.a.	<i>Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Caulobacterales; Caulobacteraceae</i>
B_13_B2	1,00	uncultured <i>Aquabacterium</i> sp.; SSCP Band 56-B547 from PCB-biofilm 5; AJ966866	<i>Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Incertae sedis 5</i>
B_13_G1	0,96		
B_13_G3	0,93	uncultured <i>Burkholderiales</i> bacterium; NSP3Q1s46; EU629394	
B_14_E4	0,97	uncultured bacterium; SSCP band Ant_09d; AJ874181	<i>Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Caulobacterales; Caulobacteraceae</i>
B_14_E5	0,92	uncultured bacterium; ODP-92B-02; DQ490042 u.a.	
B_14_B4	1,00	uncultured <i>Aquabacterium</i> sp.; SSCP Band 56-B547 from PCB-biofilm 5; AJ966866	<i>Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Incertae sedis 5</i>
B_14_F6	0,97		
B_14_H5	0,97	uncultured bacterium; DGGE band: KH03-30B; AB307981	unclassified <i>Bacteria</i>
B_15_C7	1,00	uncultured bacterium; AL1-1_02; AJ880159 u.a.	<i>Actinobacteria; Actinobacteria; Actinomycetales; Propionibacteriaceae</i>
B_15_D9	0,97	uncultured bacterium; AL1-1_02; AJ880159 u.a.	
B_15_G7	0,98	uncultured <i>Aquabacterium</i> sp.; SSCP Band 56-B547 from PCB-biofilm 5; AJ966866	<i>Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Incertae sedis 5</i>
B_15_F9	1,00	uncultured bacterium; NAT70; AJ607025	<i>Proteobacteria, Gammaproteobacteria, unclassified</i>

Tabelle A11: Ausgewählte RDP-Resultate für Sequenzen von unspezifisch (behandlungsunabhängig) aufgetretenen Klonen in den SSCP-Banden des *Archaea*-spezifischen SSCP-Gels

Klon	S_ab score	nächster Verwandter und Accession Nummer	Taxonomische Einordnung
A_1_C1	0,90	0863 uncultured <i>Sphingobacterium</i> sp.; DQ028395 u.a.	<i>Bacteroidetes; Sphingobacteria; Sphingobacteriales; unclassified</i>
A_1_B2	0,92	uncultured archaeon; JB13-2; EF614366	<i>Euryarchaeota; Thermoplasmata; Thermoplasmatales; unclassified</i>
A_1_D1	0,94	uncultured methanogenic archaeon; LGM-LG17; EU520279	<i>Euryarchaeota; unclassified</i>
A_2_A6	0,92	uncultured methanogenic archaeon; LGM-LG11; EU520273 u.a.	<i>Euryarchaeota; unclassified</i>
A_2_A4	0,95	uncultured methanogenic archaeon; NRmetA8; EU284787	<i>Euryarchaeota; Methanobacteria; Methanobacteriales; Methanobacteriaceae</i>
A_2_B4	0,94	uncultured methanogenic archaeon; 6; DQ372975 u.a.	<i>Euryarchaeota; Thermoplasmata; Thermoplasmatales; unclassified</i>
A_2_B5	0,95	uncultured methanogenic archaeon; 6; DQ372975 u.a.	
A_2_D4	0,97	uncultured methanogenic archaeon; 6; DQ372975 u.a.	
A_2_E5	0,98	uncultured Burkholderiales bacterium; NSP3Q1s46; EU629394	<i>Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Incertae sedis 5</i>
A_3_D7	0,98	uncultured <i>Sphingobacterium</i> sp.; DQ028395 u.a.	<i>Bacteroidetes; Sphingobacteria; Sphingobacteriales; unclassified</i>
A_3_G8	0,96	uncultured methanogenic archaeon; LGM-LG06; EU520268 u.a.	<i>Euryarchaeota; unclassified</i>
A_3_E7	0,96	uncultured methanogenic archaeon; 6; DQ372975 u.a.	<i>Euryarchaeota; Thermoplasmata; Thermoplasmatales; unclassified</i>
A_3_H7	0,94	uncultured methanogenic archaeon; 6; DQ372975 u.a.	
A_3_A8	0,96	uncultured methanogenic archaeon; 6; DQ372975 u.a.	
A_3_B9	0,91	uncultured methanogenic archaeon; 6; DQ372975 u.a.	

Fortsetzung Tabelle A11:

Klon	S_ab score	nächster Verwandter und Accession Nummer	Taxonomische Einordnung
A_3_A7	0,94	uncultured archaeon; 1; DQ355968	<i>Euryarchaeota; Thermoplasmata; Thermoplasmatales;</i> unclassified
A_4_A10	0,97	uncultured <i>Sphingobacterium</i> sp.; DQ028395 u.a.	<i>Bacteroidetes; Sphingobacteria; Sphingobacteriales;</i> unclassified
A_4_F11	0,94	uncultured <i>Sphingobacterium</i> sp.; DQ028395 u.a.	
A_4_B10	0,98	uncultured archaeon; JB13-2; EF614366	<i>Euryarchaeota; Thermoplasmata; Thermoplasmatales;</i> unclassified
A_5_D2	0,96	uncultured <i>Sphingobacterium</i> sp.; DQ028395 u.a.	<i>Bacteroidetes; Sphingobacteria; Sphingobacteriales;</i> unclassified
A_5_A1	0,94	uncultured methanogenic archaeon; LGM-LG06; EU520268	<i>Euryarchaeota;</i> unclassified
A_5_A2	0,94	uncultured methanogenic archaeon; 6; DQ372975 u.a.	<i>Euryarchaeota; Thermoplasmata; Thermoplasmatales;</i> unclassified
A_5_B1	0,93	uncultured methanogenic archaeon; 6; DQ372975 u.a.	
A_5_B3	0,95	uncultured methanogenic archaeon; 6; DQ372975 u.a.	
A_5_C1	0,93	uncultured methanogenic archaeon; 6; DQ372975 u.a.	
A_7_G12	0,94	uncultured methanogenic archaeon; LGM-LG06; EU520268	<i>Euryarchaeota;</i> unclassified
A_7_B10	0,95	uncultured methanogenic archaeon; NRmetA8; EU284787	<i>Euryarchaeota; Methanobacteria; Methanobacteriales;</i> <i>Methanobacteriaceae</i>
A_7_H12	0,95	uncultured methanogenic archaeon; 6; DQ372975 u.a.	<i>Euryarchaeota; Thermoplasmata; Thermoplasmatales;</i> unclassified
A_7_A10	0,94	uncultured methanogenic archaeon; 6; DQ372975 u.a.	
A_8_C7	0,96	uncultured <i>Sphingobacterium</i> sp.; DQ028395	<i>Bacteroidetes; Sphingobacteria; Sphingobacteriales;</i> unclassified
A_8_G7	0,96	uncultured <i>Sphingobacterium</i> sp.; DQ028395 u.a.	

Fortsetzung Tabelle A11:

Klon	S_ab score	nächster Verwandter und Accession Nummer	Taxonomische Einordnung
A_8_E7	0,96	uncultured methanogenic archaeon; NRmetA8; EU284787	<i>Euryarchaeota; Methanobacteria; Methanobacteriales; Methanobacteriaceae</i>
A_8_A7	0,95	uncultured archaeon; JB13-2; EF614366	<i>Euryarchaeota; Thermoplasmata; Thermoplasmatales; unclassified</i>
A_8_F7	0,87	uncultured methanogenic archaeon; LGM-LG08; EU520270	
A_8_B8	0,93	uncultured methanogenic archaeon; 6; DQ372975 u.a.	
A_8_F8	0,95	uncultured methanogenic archaeon; 6; DQ372975 u.a.	
A_9_H1	0,89	uncultured bacterium; HKT35; DQ309379	
A_9_A2	0,97		
A_9_C2	0,94		
A_9_A1	0,93	uncultured <i>Sphingobacterium</i> sp.; DQ028395 u.a.	<i>Bacteroidetes; Sphingobacteria; Sphingobacteriales; unclassified</i>
A_9_E1	0,93	uncultured <i>Sphingobacterium</i> sp.; DQ028395 .u.a.	
A_9_G1	0,97	uncultured bacterium; 47mm40; AY796040 u.a.	

Tabelle A12: Ermittelte C_T -Werte (*Threshold-Cycle*) während der Real-time qPCR für *Ruminococcus albus* und *Prevotella bryantii* zur Bestimmung der Reaktionseffizienz

Probe/ Futtermischung	eingesetzte DNA (ng)	<i>R. albus</i> C_T^2	eingesetzte DNA (ng)	<i>P. bryantii</i> C_T^2
Blindprobe	0	43,50	0	30,72
Standard	20	12,91	20	12,73
		12,46		13,70
		11,53		14,06
	2	22,68	0,02	16,95
		22,56		16,93
		22,75		16,63
	0,2	26,10	0,002	24,30
		26,03		24,18
		26,24		24,54
	0,002	30,81	0,0002	29,68
		30,32		29,22
		28,48		28,49
I ¹	100	21,17	40	15,54
		20,98		15,22
		19,28		15,18
	10	22,27	20	18,78
		16,38		19,46
		21,96		19,14
	1	25,00	4	22,58
		24,30		22,30
		23,93		22,77
	0,1	27,35	1	27,83
		26,72		27,66
		26,77		27,79
III ¹	100	21,44	40	13,83
		21,83		13,59
		20,12		14,14
	10	22,84	20	17,24
		22,51		17,84
		22,26		17,68
	1	24,64	4	20,64
		24,35		20,21
		24,19		20,44
	0,1	27,40	1	26,18
		26,82		26,20
		27,13		26,35
V ¹	100	21,42	40	13,63
		20,82		13,39
		22,29		14,93
	10	23,76	20	19,13
		22,08		16,32
		22,35		16,71
	1	24,42	4	21,43
		24,73		21,22
		24,68		21,63
	0,1	26,99	1	25,79
		28,41		27,52
		27,89		26,73

¹ Mischproben der DNA aus den drei wiederholten Pansensimulationsversuchen für die Futtermischungen der Futterpartikelgröße 1 mm

² grau markierte C_T -Werte wurden von der Auswertung ausgeschlossen

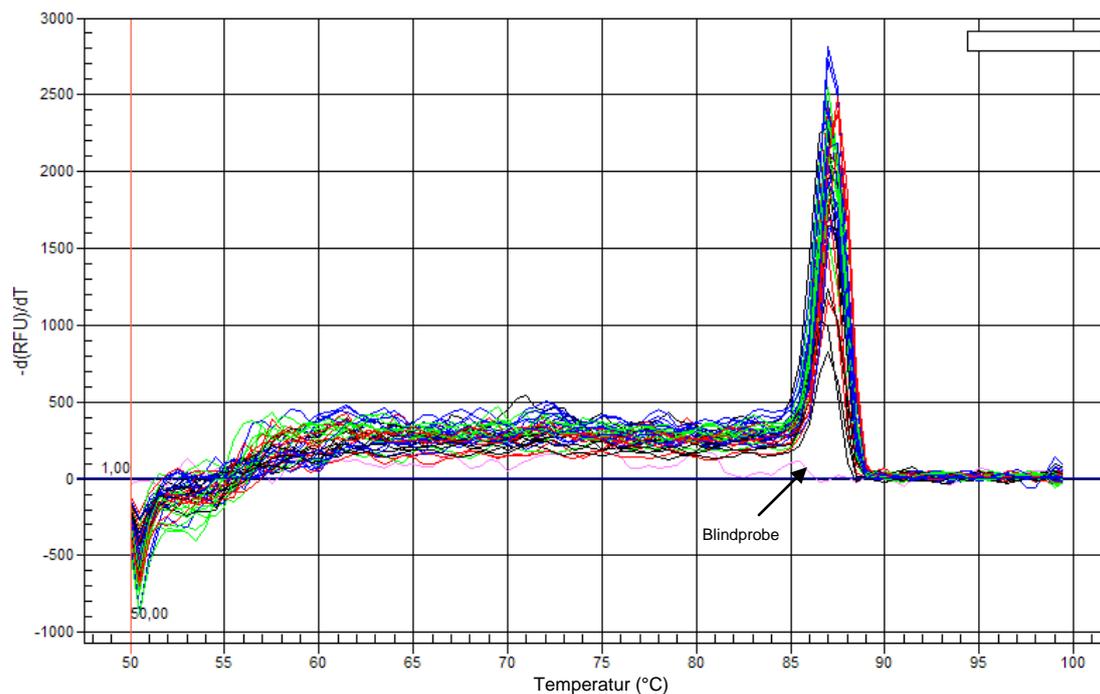


Abbildung A1: Schmelzkurvenanalyse zur Überprüfung der Produkte aus der Real-time qPCR zur Effizienzbestimmung der Reaktion für *Ruminococcus albus*

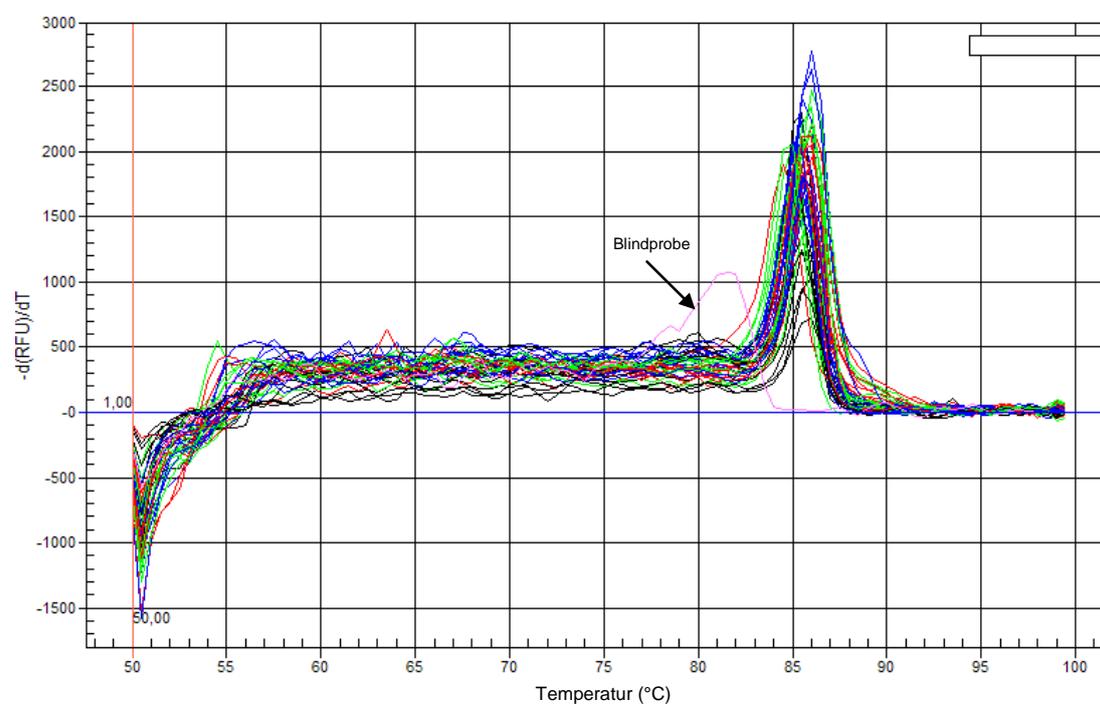


Abbildung A2: Schmelzkurvenanalyse zur Überprüfung der Produkte aus der Real-time qPCR zur Effizienzbestimmung der Reaktion für *Prevotella bryantii*

Tabelle A13: Ermittelte C_T -Werte (*Threshold-Cycle*) aus der Real-time qPCR für *Ruminococcus albus* und *Prevotella bryantii*

Probe/ Futtermischung	Futterpartikel- größe	Wiederholung der Pansensimulation	eingesetzte DNA (ng)	<i>R. albus</i> C_T^1	<i>P. bryantii</i> C_T^1
I	1 mm	a	20	21,27	20,66
				21,28	20,53
				21,00	17,75
		b		22,50	20,67
				8,34	20,73
				20,75	4,96
		c		22,74	17,66
				22,27	16,81
				22,03	17,55
III	1 mm	a	21,60	17,96	
			20,75	17,71	
			20,45	16,37	
		b	21,89	18,28	
			22,57	18,40	
			21,26	18,13	
		c	22,25	17,11	
			22,20	16,82	
			21,89	16,95	
V	1 mm	a	22,98	17,91	
			22,39	16,88	
			21,95	17,33	
		b	22,94	18,42	
			22,59	17,95	
			22,18	18,15	
		c	22,07	16,95	
			21,61	16,67	
			22,59	18,13	
I	4 mm	a	23,15	20,86	
			21,41	19,68	
			21,09	19,58	
		b	23,55	22,05	
			23,74	22,03	
			23,74	22,63	
		c	22,29	20,33	
			23,29	22,00	
			22,51	21,89	
III	4 mm	a	23,21	20,28	
			23,44	18,25	
			23,25	17,86	
		b	22,83	21,29	
			22,60	21,14	
			21,66	21,49	
		c	25,28	18,90	
			23,88	19,34	
			24,08	18,84	
V	4 mm	a	3,64	18,27	
			22,42	17,12	
			22,59	17,80	
		b	23,23	17,60	
			22,84	17,64	
			23,11	17,37	
		c	21,78	16,54	
			22,20	16,08	
			22,06	16,37	

¹ grau markierte C_T -Werte wurden von der Auswertung ausgeschlossen

Fortsetzung Tabelle A13:

Probe/ Futtermischung	Futterpartikel- größe	Wiederholung der Pansensimulation	eingesetzte DNA (ng)	<i>R. albus</i> C _T ¹	<i>P. bryantii</i> C _T ¹
Blindprobe	-	-	0	35,28	40,76
Standard	-	-	20	10,60	14,00
				10,86	13,70
				12,44	14,39
			2	15,95	18,31
				16,09	18,33
				14,42	17,55
			0,2	17,08	22,05
				17,09	23,62
				16,83	23,96
			0,02	22,87	28,37
				23,91	28,87
				23,14	9,11

¹ grau markierte C_T -Werte wurden von der Auswertung ausgeschlossen

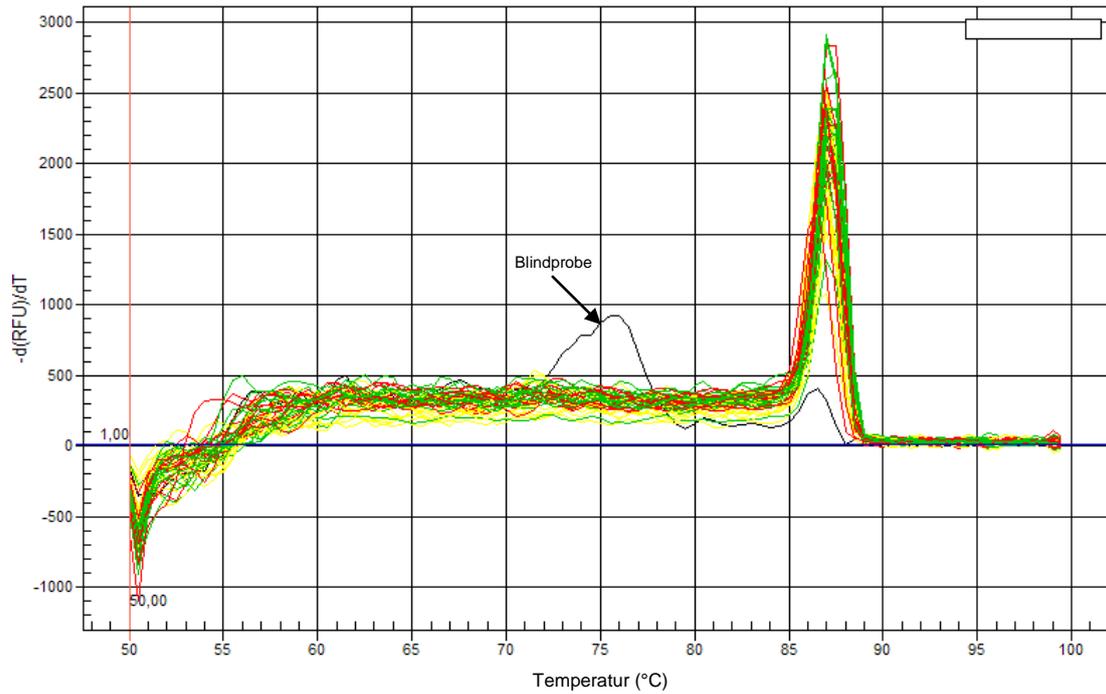


Abbildung A3: Schmelzkurvenanalyse zur Überprüfung der Produkte aus der Real-time qPCR für *Ruminococcus albus*

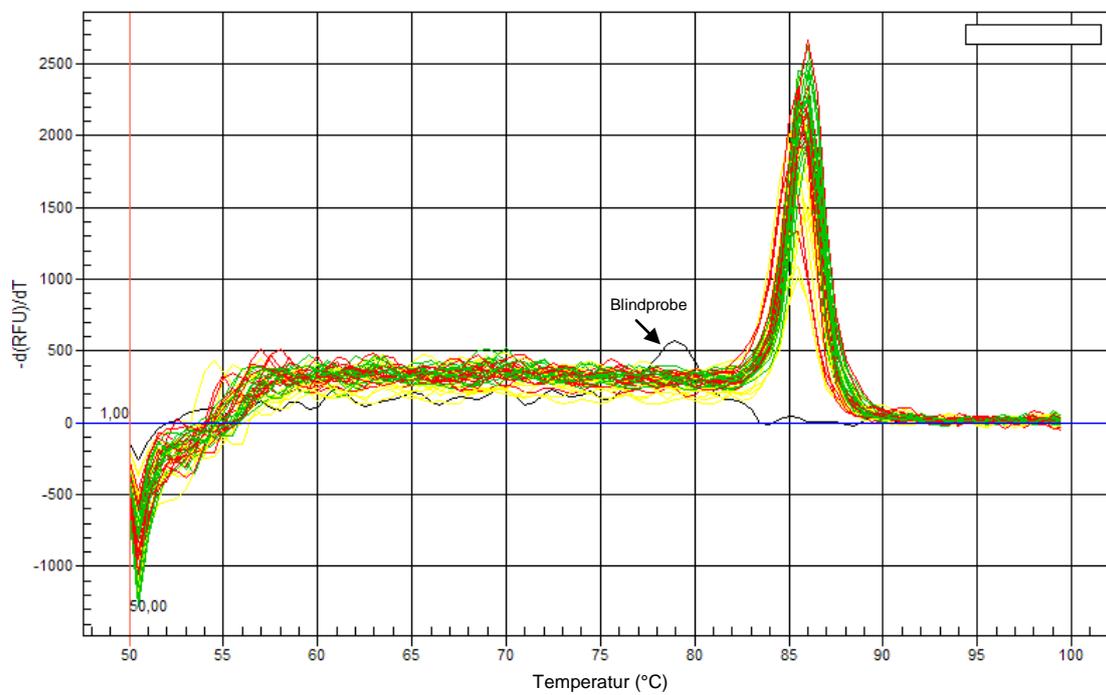


Abbildung A4: Schmelzkurvenanalyse zur Überprüfung der Produkte aus der Real-time qPCR für *Prevotella bryantii*

Fortsetzung Tabelle A14:

Futter	Bild	EUB 338 I-III		ARCH 915		LGC 354 A-C		BAC 303		DELTA 495a		F. succ.		BET 42a		GAM 42 a		MB 1174	
		DAPI	Sonde	DAPI	Sonde	DAPI	Sonde	DAPI	Sonde	DAPI	Sonde	DAPI	Sonde	DAPI	Sonde	DAPI	Sonde	DAPI	Sonde
V	1	301	196	241	13	246	13	271	28	161	3	128	3	245	5	110	2	353	7
	2	319	220	218	9	270	14	179	15	127	3	144	2	241	3	109	2	209	7
	3	264	200	293	14	225	9	267	39	160	3	123	2	287	3	149	2	266	6
	4	290	227	235	16	250	23	231	23	201	5	175	1	300	3	115	0	283	5
	5	235	170	219	19	215	23	254	33	120	3	139	1	255	3	112	0	359	7
	6	192	142	195	15	260	17	240	29	119	3	105	0	262	3	84	1	294	8
	7	202	159	250	14	227	18	286	38	194	5	142	2	296	5	98	0	242	4
	8											108	1			103	0		
	9															75	1		
	10															105	2		
MS	1	240	162	258	14	306	10	269	22	219	4	146	1	245	1	166	2	631	1
	2	274	180	418	24	352	13	261	27	96	2	134	1	225	1	158	2	485	1
	3	283	194	331	14	249	7	251	17	220	4	142	1	237	1	181	2	475	3
	4	236	158	243	20	252	9	245	29	185	4	117	1	257	1	164	3	276	2
	5	380	229	255	11	188	5	262	17	163	2	162	1	233	2	247	2	165	0
	6	255	169	298	14	266	5	217	15	149	3	151	1	312	2	132	2	206	1
	7	251	178	257	19	265	3	299	33	133	3	149	2	182	1	163	2	222	1
GS	1	338	217	333	28	394	17	377	51	182	4	334	3	103	1	151	1	269	5
	2	320	193	436	36	287	8	347	38	252	4	320	2	183	2	161	1	325	6
	3	378	234	441	26	334	20	404	38	225	3	328	2	109	1	168	2	368	3
	4	353	241	390	26	328	8	513	55	179	5	414	6	146	1	163	1	326	5
	5	356	216	504	20	371	13	433	44	205	5	281	3	148	1	123	2	266	5
	6	391	221	392	20	285	9	432	54	210	3	263	4	148	1	137	2	330	7
	7	344	200	345	22	375	9	429	51	220	4	415	5	163	2	170	1	359	7
SES	1	705	420	909	53	584	16	690	43	297	2	582	1	361	2	377	0	943	0
	2	575	386	954	62	559	12	659	32	283	3	756	1	278	1	398	0	774	1
	3	634	411	1024	71	643	18	731	46	266	2	777	1	521	3	340	4	794	0
	4	504	313	857	77	684	10	647	35	299	3	657	0	362	1	342	4	787	0
	5	721	402	394	35	601	15	663	37	295	2	702	1	374	2	379	4	800	0
	6	309	200	795	43	534	10	613	31	288	2	803	1	369	2	310	1	287	0
	7	398	245	733	48	727	11	752	45	305	3	748	2	277	1	261	0	699	3

Tabelle A15: Detektierte Anzahl DAPI-gefärbter und hybridisierter Zellen je Bild für die Proben aus den Überläufen (EUB 338 I-III: *Eubacteria*, ARCH 915: *Archaea*, LGC 354 A-C: *Firmicutes*, BAC 303: *Bacteroides-Prevotella*, DELTA 495a: *Deltaproteobacteria*, F. succ.: *Fibrobacter succinogenes*, BET 42a: *Betaproteobacteria*, GAM 42a: *Gammaproteobacteria*, MB 1174: *Methanobacteriaceae*)

Futter	Bild	EUB 338 I-III		ARCH 915		LGC 354 A-C		BAC 303		DELTA 495a		F. succ.		BET 42a		GAM 42 a		MB 1174	
		DAPI	Sonde	DAPI	Sonde	DAPI	Sonde	DAPI	Sonde	DAPI	Sonde	DAPI	Sonde	DAPI	Sonde	DAPI	Sonde	DAPI	Sonde
I	1	340	247	250	12	260	13	249	19	144	1	160	2	229	8	124	11	321	2
	2	295	250	281	13	215	9	281	21	160	1	89	1	273	13	169	15	198	2
	3	194	155	225	9	199	6	302	16	150	2	112	2	210	10	123	11	301	0
	4	214	178	210	14	217	6	255	29	114	1	155	2	297	7	192	12	248	0
	5	244	197	235	17	225	7	270	16	249	2	128	1	200	12	139	12	191	1
	6	290	220	202	7	237	11	288	23	100	1	236	2	239	9	209	17	273	1
	7	218	159	220	11	250	13	218	23	172	2	185	3	214	9	141	13	220	3
II	1	186	151	214	10	203	14	183	14	138	1	109	0	205	9	126	15	230	0
	2	214	160	250	8	218	10	179	12	128	2	104	0	228	6	174	20	186	3
	3	179	131	261	6	167	5	322	16	215	2	85	1	231	6	134	24	235	4
	4	203	150	205	7	186	14	166	15	158	1	107	1	162	5	117	23	260	1
	5	223	174	181	6	179	6	222	16	137	1	118	1	163	4	253	21	290	1
	6	186	148	209	7	154	6	201	11	113	2	181	1	194	7	226	30	280	3
	7	197	158	161	9	183	8	186	14	127	2	101	1	166	7	228	16	188	0
	8											95	1						
	9											100	1						
III	1	271	209	441	25	327	6	141	13	268	2	180	1	266	9	120	17	343	0
	2	259	199	349	18	283	8	160	19	169	2	181	1	371	21	189	17	467	3
	3	243	184	352	19	419	24	162	15	132	2	128	1	272	16	193	25	510	4
	4	326	244	451	16	378	9	196	24	185	2	178	1	376	18	143	22	374	2
	5	302	246	267	12	306	12	190	14	182	3	157	1	313	15	174	24	385	0
	6	278	225	329	11	395	16	159	17	480	3	142	1	325	16	160	19	408	1
	7	413	355	327	10	304	16	180	13	158	1	121	1	360	10	168	25	379	3
IV	1	201	146	226	10	129	2	135	13	117	1	167	1	266	7	169	19	459	4
	2	228	193	336	14	224	7	161	15	179	1	149	1	318	9	188	20	366	9
	3	245	181	316	12	131	3	141	13	132	1	147	1	268	8	152	20	349	8
	4	169	141	258	15	138	5	138	14	145	2	156	1	286	12	169	17	344	5
	5	210	175	270	18	164	7	139	13	140	1	96	1	288	9	123	16	274	5
	6	232	188	294	12	136	3	120	13	163	2	128	1	285	8	131	17	343	3
	7	238	172	280	12	190	5	170	16	158	2	159	1	266	10	214	31	345	4

Fortsetzung Tabelle A15:

Futter	Bild	EUB 338 I-III		ARCH 915		LGC 354 A-C		BAC 303		DELTA 495a		F. succ.		BET 42a		GAM 42 a		MB 1174	
		DAPI	Sonde	DAPI	Sonde	DAPI	Sonde	DAPI	Sonde	DAPI	Sonde	DAPI	Sonde	DAPI	Sonde	DAPI	Sonde	DAPI	Sonde
V	1	232	175	287	10	152	4	186	11	136	2	188	1	199	28	163	13	281	3
	2	172	122	270	9	136	2	178	8	247	4	121	1	207	23	101	8	228	3
	3	226	163	288	14	174	4	173	11	146	1	117	1	234	30	164	9	236	3
	4	173	122	253	10	153	2	162	13	160	1	174	1	260	35	188	11	178	4
	5	228	180	247	7	150	4	157	10	139	1	119	1	170	17	173	9	206	3
	6	207	151	291	8	136	3	164	11	126	2	211	1	185	16	158	8	344	5
	7	204	146	306	9	149	2	244	13	121	1	241	1	157	18	111	9	271	3
MS	1	171	135	228	9	262	7	204	13	114	1	116	0	219	8	115	6	200	1
	2	201	174	154	6	200	6	209	10	89	1	219	0	249	12	127	6	174	1
	3	254	203	224	10	190	3	297	16	126	2	108	0	322	11	121	6	164	0
	4	175	142	346	15	353	5	180	12	120	1	148	1	267	13	120	8	186	1
	5	283	223	160	9	300	4	324	22	180	2	276	2	273	16	115	9	253	0
	6	257	201	184	6	294	4	148	10	152	1	134	1	180	7	85	9	117	0
	7	251	205	254	7	236	2	189	15	122	1	103	1	178	10	102	8	138	1
	8									146	2					141	9		
	9															120	8		
GS	1	210	156	246	18	183	4	226	9	218	3	147	1	229	8	231	15	188	5
	2	225	145	356	28	180	3	150	9	156	1	170	1	239	6	151	13	265	6
	3	201	130	260	13	127	6	182	11	156	2	157	1	259	3	144	9	311	4
	4	190	120	299	17	167	3	157	7	87	1	140	1	189	3	129	14	309	8
	5	199	144	281	13	170	2	175	10	210	2	148	1	208	5	151	13	253	5
	6	198	134	217	12	145	6	233	7	150	2	187	1	202	6	163	16	266	6
	7	235	149	452	28	148	5	238	10	138	1	113	1	203	3	242	22	363	4
SES	1	565	424	604	30	480	6	312	15	243	1	240	1	519	19	256	3	510	0
	2	517	387	477	16	516	9	300	15	310	2	221	1	568	10	264	9	608	3
	3	639	412	475	16	402	11	307	15	242	1	258	1	684	20	227	7	485	1
	4	546	380	538	28	508	6	294	20	358	2	222	1	589	16	219	7	540	3
	5	526	353	568	26	515	5	324	16	303	1	267	0	704	15	247	8	592	3
	6	632	418	577	23	450	5	302	16	278	2	234	0	549	22	217	5	574	3
	7	505	341	523	31	503	6	236	10	242	1	339	1	493	14	223	8	473	4

Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Die Arbeit wurde bisher in gleicher oder ähnlicher Form keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Halle/Saale, den 28.02.09

Maren Witzig

Lebenslauf

Name, Vorname: Witzig, Maren

Geburtsdatum: 03.01.1981

Geburtsort: Halle (Saale)

Schulbildung

September 1987 - August 1991	Besuch der Grundschule am Brühl in Halle
September 1991 - Juli 1999	Besuch der Latina August Hermann Francke in Halle

Praktikum

September 1999 - August 2000	Freiwilliges Ökologisches Jahr auf dem Gutshof Döllnitz
------------------------------	---------------------------------------------------------

Studium

Oktober 2000 - Dezember 2005	Studium der Agrarwissenschaften an der Landwirtschaftlichen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Abschluss im Dezember 2005:	Studienrichtung: Nutztierwissenschaften Thema der Diplomarbeit: „Untersuchungen zur Nettoabsorption und Verwertung von Phosphor und Calcium beim Broiler“

Promotionsstudium

seit Februar 2006:	Promotionsstudium am Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften, Naturwissenschaftliche Fakultät III der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
--------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Danksagung

Allen Personen, die zur Entstehung und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, möchte an dieser Stelle herzlich danken.

Für die Überlassung des überaus interessanten Themas danke ich Herrn Prof. M. Rodehutschord, ebenso wie für seine immerwährende Diskussionsbereitschaft und jegliche Hilfestellung, die mir zuteil wurde.

Darüber hinaus gilt mein Dank Herrn Prof. H. Harms, der mir die Möglichkeit bot, den praktischen Teil meiner Arbeit am Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung UFZ in Leipzig durchzuführen und damit überhaupt erst die Realisierung der geplanten molekularbiologischen Untersuchungen möglich machte.

Ein weiteres Dankeschön für die vielfältige Unterstützung sowie ihre stete Bereitschaft zur Diskussion jedweder Fragen soll sich an Frau Dr. J. Boguhn sowie auch Dr. M. Bulang und Dr. H. Kluth richten.

Für anregende Diskussionen sowie ihre stete Hilfsbereitschaft danke ich des Weiteren Sabine, Magali, Bärbel, Annelie und Ingo. Für die weitreichende Unterstützung und Hilfestellung im Labor sei darüber hinaus ein großes Dankeschön an Anett, Ute, Verena, Ines und Julia gerichtet.

Außerdem sei allen Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe sowie des Institutes für Ernährungswissenschaften für ihre freundliche Unterstützung in jeglicher Hinsicht gedankt. Insbesondere möchte ich mich bei Bastian für die gewissenhafte Betreuung und Durchführung der Versuche sowie die Erhebung und Bereitstellung verschiedener zusätzlicher Daten bedanken. Außerdem sei an dieser Stelle Reza, Ricarda, Tina, Christian, Linda und Anke für ihre stete Hilfsbereitschaft gedankt.

Für die Gewährung des Promotionsstipendiums danke ich des Weiteren der Graduiertenförderung des Landes Sachsen-Anhalt.

Ein sehr herzlicher Dank gilt darüber hinaus meiner Familie, insbesondere meinen Eltern und Daniel sowie all meinen Freunden für das aufgebrachte Verständnis und die stete Unterstützung, ohne die die Anfertigung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.