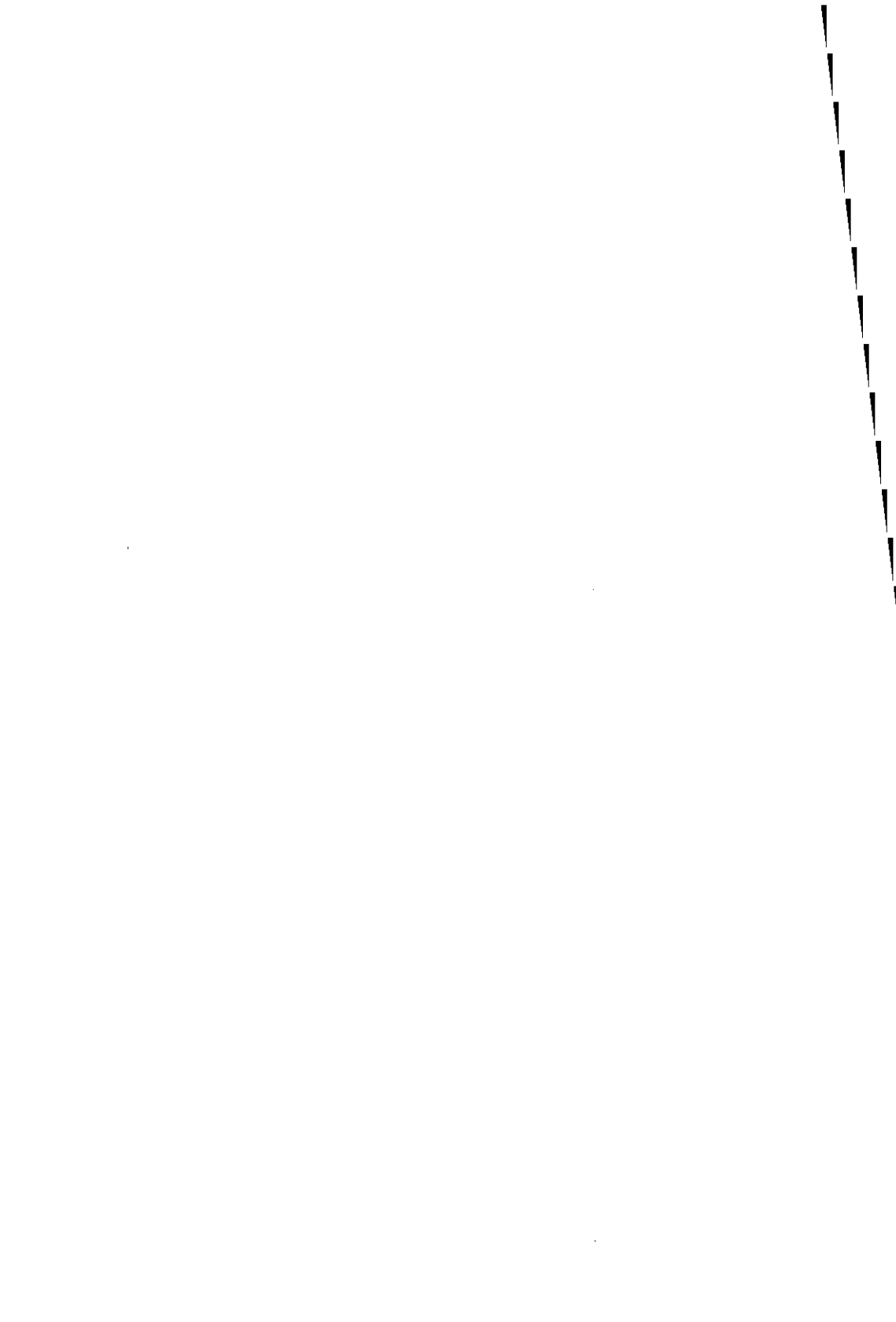


REDOXPOTENTIAAL EN RESIDENTE DARMFLORA VAN DE MUIS



REDOXPOTENTIAAL EN RESIDENTE DARMFLORA VAN DE MUIS

PROEFSCHRIFT

ter verkrijging van de graad van doctor in de geneeskunde aan de Erasmus Universiteit te Rotterdam, op gezag van de Rector Magnificus Prof. Dr. P.W. Klein en volgens besluit van het college van dekanen.
De openbare verdediging zal plaatsvinden op 15 januari 1975, des namiddags te 4.15 uur

door

Johanna Geertruida Hendrika Ruseler-van Embden

geboren te Zeist in 1942.

Promotor ; Prof. Dr. F. Wensinck

Co-referenten : Prof. Dr. W.C. Hülsmann
Dr. D. van der Waay

Voor Herman
Aletje
Coertje

INHOUD

I.	ECOLOGIE VAN DE DARMFLOORA VAN DE MUIS	1
A.	Selectie door milieufactoren die niet door de residente flora worden beïnvloed	2
B.	Selectie door milieufactoren die door de residente flora worden beïnvloed	2
1.	motiliteit van het darmkanaal	2
2.	zuurgraad	3
3.	gasfase en redoxpotentiaal	3
4.	beschikbare voedingsstoffen	4
5.	onderlinge beïnvloeding	6
C.	Residente darmflora van de muis	8
D.	Betekenis van de residente flora voor de gastheer	9
1.	kiemvrije dieren	9
2.	energievoorziening	11
3.	weerstand tegen infecties	11
II.	DOELSTELLING EN OPZET VAN HET ONDERZOEK	14
A.	Doelstelling en opzet van het onderzoek	14
B.	Redoxpotentiaal	16
1.	fysisch-chemische redoxpotentiaal	16
2.	redoxpotentiaal in het darmkanaal	17
III.	MATERIAAL EN METHODEN	19
A.	Proefdieren	19
B.	Bacteriesoorten	20
C.	Media	21
D.	Bepaling van bacterieaantallen in faeces en coecuminhoud	22
E.	Metten van de redoxpotentiaal in het coecum	22
F.	Metten van de redoxpotentiaal in culturen	25
G.	Calibreren van de elektroden	27
H.	Behandeling van de elektroden	29

IV.	REDOXPOTENTIAAL IN HET DARMKANAAL VAN KIEMVRIJE EN CONVENTIONELE MUIZEN	
	REDOXPOTENTIAAL EN KOLONISATIE VAN HET COECUM DOOR STRIKT ANAEROBEN	30
	A. Redoxpotentiaal in het darmkanaal van kiemvrije en conventionele muizen	30
	Resultaten	30
	Bespreking van de resultaten	31
	B. Redoxpotentiaal en kolonisatie van het coecum van kiemvrije muizen door strikt anaeroben	31
	Resultaten	32
	Bespreking van de resultaten	34
V.	REDOXPOTENTIAAL EN KOLONISATIE DOOR STRIKT ANAEROBEN VAN HET DARMKANAAL VAN CONVENTIONELE MUIZEN VAN 4 - 20 DAGEN	37
	Methode	38
	Resultaten	38
	Bespreking van de resultaten	40
VI.	VOLGORDE VAN KOLONISATIE VAN KIEMVRIJE MUIZEN DOOR ANAEROBEN NA CONTACT MET EEN CRF-MUIS	42
	Proefopstelling	42
	Resultaten	43
	Bespreking van de resultaten	45
VII.	DE BEPERKENDE POTENTIAAL VAN ENKELE STRIKT ANAEROBEN	46
	VERANDERINGEN VAN DE REDOXPOTENTIAAL IN GROEIENDE BACTERIECULTUREN	
	A. De beperkende potentiaal van enkele strikt anaeroben	47
	Resultaten	48
	B. De verandering van de redoxpotentiaal in groeiende bacterieculturen	49
	Resultaten	49
	Bespreking van de resultaten	50
	Tabellen en figuren	53
	Literatuur	69
	Samenvatting	77
	Summary	80
	Curriculum vitae	83

H O O F D S T U K I

ECOLOGIE VAN DE DARMFLOORA VAN DE MUIS

De ecologie houdt zich bezig met de onderlinge beïnvloeding van groepen van organismen, dus van populaties en hun milieu. Een ecologische beschouwing is erop gericht, begrijpelijk te maken waarom populaties van een bepaalde samenstelling zich in een bepaald milieu in stand kunnen houden. Heeft men populaties van micro-organismen op het oog dan spreekt men over de residente flora van het desbetreffende milieu. De soortenrijkdom van een residente flora is meestal beperkt en de verhouding tussen de aantallen van de verschillende soorten betrekkelijk stabiel. Daar micro-organismen op grote schaal worden verplaatst vindt men tussen de residenten altijd vertegenwoordigers van niet-residente soorten. Dergelijke transiënten komen meestal in kleine aantallen voor en verdwijnen in korte tijd.

De samenstelling van een residente flora hangt in de eerste plaats af van de kenmerken van het milieu en van deze kenmerken zijn er vaak enkele die een overheersende selecterende invloed uitoefenen. Bij de hierna volgende beschouwingen over de residente darmflora wordt eerst nagegaan welke kenmerken dit vermoedelijk zijn. Daarbij wordt een onderscheid gemaakt tussen die milieukenmerken die niet door de residente flora worden beïnvloed (zoals temperatuur, zoutgehalte en vochtigheidsgraad) en kenmerken waarop deze flora wel invloed uitoefent (zoals motiliteit van het darmkanaal, zuurgraad, gasfase, redoxpotentiaal en beschikbare voedingsstoffen). Door competitie om deze voe-

dingstoffen, door remming en door begunstiging oefenen de micro-organismen van de darmflora een onderlinge invloed uit. Heeft men eenmaal de milieukenmerken vastgesteld, dan kan daaruit worden afgeleid aan welke eisen een soort moet voldoen om tot de residente flora van het milieu te kunnen behoren. De samenstelling van deze flora wordt vervolgens besproken, waarbij wordt nagegaan of de kenmerken van de vertegenwoordigde soorten inderdaad in overeenstemming zijn met de eisen die het milieu stelt. Ten slotte wordt de invloed besproken die de residente flora op het milieu (i.c. de gastheer) heeft. Hierbij is een vergelijking van conventionele en germ-free dieren van groot belang. De gegevens die in dit hoofdstuk worden vermeld hebben in de eerste plaats betrekking op de muis en worden als volgt ingedeeld:

- A. Selectie door milieufactoren die niet door de residente flora worden beïnvloed.
- B. Selectie door milieufactoren die door de residente flora worden beïnvloed.
- C. Residente darmflora van de muis.
- D. Betekenis van de residente flora voor de gastheer.

A. Selectie door milieufactoren die niet door de residente flora worden beïnvloed

De temperatuur in het darmkanaal van de muis bedraagt ongeveer 38°C en de residente flora bestaat derhalve uit mesofielen. Op zouttolerantie wordt niet geselecteerd omdat de concentratie van de Na^{+} en Cl^{-} ionen laag is ($< 1\%$ NaCl). Uiteraard wordt evenmin op resistentie tegen uitdroging geselecteerd. Het behoeft geen nader betoog dat de darmflora uit heterotrofen bestaat.

B. Selectie door milieufactoren die door de residente flora worden beïnvloed

1. Motiliteit van het darmkanaal

De peristaltiek van de dunne darm zorgt voor een snelle passage van de inhoud en men mag deze als de belangrijkste oorzaak voor het lage bacterie-aantal in dit darmgedeelte beschouwen. De verblijftijd in coecum en colon is lang en de bacterieaantallen zijn zeer hoog. De flora zelf versnelt de peristaltiek; Abrams en Bishop (1967) toonden aan dat de passage van darminhoud

bij kiemvrije muizen minder snel is dan bij conventionele. In het algemeen mag men zeggen dat de micro-organismen die de verschillende delen van het darmkanaal bevolken een vermenigvuldigings-snelheid moeten bezitten die groter is dan de verdunningssnelheid omdat zij anders worden "uitgewassen".

2. Zuurgraad

De zuurgraad in het darmkanaal (pH 6,5 - 7,5) ligt vrijwel nergens in een selectief gebied, behalve in de maag en het direct daarop aansluitende deel van het duodenum (pH 3 - 7); deze waarden zijn voor verschillende diersoorten ongeveer dezelfde (Williams Smith, 1965). In de maag is de hoge zuurgraad de belangrijkste selecterende factor. In de muizemaag wordt nog een tamelijk hoog aantal micro-organismen, 10^9 per gram maaginhoud, gevonden (Savage e.a., 1968). Begrijpelijkwijze zijn dit hoofdzakelijk lactobacillen en gisten.

Algemeen wordt aangenomen dat de darmflora door zuurproductie de pH in het darmkanaal verlaagt. Zo heeft bijvoorbeeld het coecum van een conventionele rat een pH van 6,6, bij kiemvrije dieren is deze 7,5 (Wostmann & Bruckner-Kardoss, 1966); bij muizen is het verschil in zuurgraad van de coecuminhoud van conventionele en kiemvrije dieren een halve pH eenheid (Meynell, 1963). Uit het gemak waarmee de zuur-intolerante bacteriesoorten behorende tot de residente darmflora zich in het darmkanaal van kiemvrije dieren vestigen (Morishita e.a., 1972; Raibaud e.a., 1966; Schaedler e.a., 1965b) blijkt dat de maag niet een barrière vormt met een beslissende invloed op de samenstelling van de darmflora.

3. Gasfase en redoxpotentiaal

Het gas in de maag heeft vrijwel dezelfde samenstelling als die van lucht (ongeveer 78% N_2 , 21% O_2 , 1% argon, 0,03% CO_2). Mede door de hoge zuurstofconcentratie in de maag en de dunne darm is het milieu ongeschikt voor strikt anaeroben. In het coecum is de zuurstofconcentratie zeer laag daar facultatief anaeroben zuurstof verbruiken; de kooldioxyde-concentratie is hoog door bacteriële produktie en doordat kooldioxyde vrijkomt bij de neutralisatie van maagzuur door bicarbonaat uit de dunne darm. Voorts kan men in het dikke darm-gas waterstof als eindprodukt van fermentaties aantreffen. Methaan, dat door de darmflora van herbi-

voren en soms ook van de mens wordt gevormd, is bij de muis nooit aangetoond.

Samen met uit bacteriën vrijkomende stoffen met een reducerend vermogen geeft de lage zuurstofspanning in coecum en dikke darm aanleiding tot een lage redoxpotentiaal van de darminhoud. Voor een verdere beschrijving van de redoxpotentiaal zie men hoofdstuk II B 2.

Het milieu in het darmkanaal begunstigt dus facultatief en strikt anaeroben.

4. Beschikbare voedingsstoffen

Hieronder verstaan wij ten eerste de koolstof- en stikstofbronnen die voor de energielevering en de opbouw van celmateriaal dienen en ten tweede al die stoffen die wellicht op een meer specifieke manier bepaalde soorten begunstigen of andere in hun groei remmen. Voor beide groepen geldt dat zij van driërlei herkomst zijn: van de gastheer zelf, van het voedsel dat de gastheer opneemt en van de darmflora.

- a) nutriënten afkomstig van de gastheer zelf, ook wel "endogeen" materiaal genoemd, bestaan uit bestanddelen van afgestoten epitheelcellen, van speeksel, maagsap, gal, pancreassap, darmsap en uit mucopolysacchariden en glycoproteïnen. Hoeveel hiervan het coecum bereikt is niet nauwkeurig bekend; veel van het materiaal wordt in de dunne darm gehydrolyseerd en teruggeresorbeerd.

Dat het endogene materiaal een belangrijke voedingsbron voor de darmflora is valt af te leiden uit de verschillen in samenstelling van het endogene materiaal in faeces van kiemvrije en conventionele dieren. Zo scheiden conventionele ratten ruim tweemaal zoveel neutrale sterolen uit als kiemvrije dieren. Deze neutrale sterolen (coprosterol en cholestanol) worden door bacteriën uit cholesterol gevormd (Kellogg, 1971; Lindstedt e.a., 1965). De totale hoeveelheid stikstof (o.a. hexosaminen) die in de faeces van kiemvrije dieren wordt gevonden is groter dan in conventionele dieren, daar geen bacteriële afbraak plaatsvindt en terugresorptie in het terminale ileum aldus niet mogelijk is (Thompson & Trexler, 1971). Van mucine is bekend dat het in vivo en in vitro door darmbacteriën

wordt afgebroken. In vitro wordt door bacteriën weinig van de eiwitfractie van mucine gebruikt, maar de koolhydraat-component is een belangrijke voedingsbron (Hoskins & Zamcheck, 1968). Het endogene materiaal bevat ook stoffen met een specifieke groeibevorderende of groeiremmende werking, zoals galzure zouten; het merendeel hiervan wordt echter teruggeresorbeerd in het ileum. Bacteroides, Bifidobacterium (Shimada e.a., 1969) en ook Clostridium perfringens zijn in staat de door de lever in geconjugeerde vorm uitgescheiden galzuren te deconjugeren. Dat dit een zeer actief proces is blijkt wel uit het feit dat in faeces vrijwel alleen gedeconjugeerde galzure zouten worden gevonden (Kellog, 1971). Gal kan ook remmend werken. Floch e.a. (1970) vonden in vitro dat lactobacillen in hun groei werden geremd door cholsuur.

- b) de eiwitten, koolhydraten en vetten uit het opgenomen voedsel worden in de dunne darm zo snel gehydrolyseerd en de gevormde aminozuren, peptiden, hexosen, vetzuren, glycerol en monoglyceriden worden zo snel geresorbeerd dat alleen die voedselbestanddelen het coecum kunnen bereiken die in de dunne darm niet worden gesplitst omdat de daarvoor nodige enzymen niet worden gevormd. Dergelijke voedselbestanddelen zijn: cellulose (polymeer van glucose); pectine (polymeer van galacturonzuur, gedeeltelijk veresterd met methylalcohol); raffinose, stachyose, melibiose (oligosacchariden); lignine (het niet-koolhydraat-bestanddeel van houtachtig weefsel, een polymeer dat o.a. uit fenylpropaaneenheden bestaat) en hemicellulosen. Bij hydrolyse met b.v. verdund zuur worden hemicellulosen gesplitst tot suikers, waarnaar zij worden genoemd (glucan, xyloan, galactaan). Deze voedselbestanddelen, dus voornamelijk poly- en oligosacchariden, en het endogene materiaal vormen de voornaamste bron van voeding voor de darmflora. De samenstelling van de darmflora is in het algemeen zeer stabiel en kan alleen worden veranderd door het dieet zeer sterk te wijzigen. Bij een dieet dat zeer veel vet of veel niet resorbeerbare (plantaardige) koolhydraten bevat, kan men bovendien een verandering verwacht-

ten in de aard en de hoeveelheid van het endogene materiaal zoals gal.

Wilkins en Long (1971) vonden bij muizen die een dieet kregen dat geheel resorbeerbaar was, dus met een zeer laag residu, dat het totale aantal bacteriën onveranderd bleef ($5 \cdot 10^{10}$ per gram), maar dat grote verschuivingen in de samenstelling optraden. Tapered anaerobes (zie dit hoofdstuk, C), die in muiszecoeca overheersen en dikke lagen tegen de mucosa vormen, verdwenen geheel; slechts kleine gram-positieve staafjes en kokken bleven over. Het totale aantal aeroben nam toe van 10^7 tot 10^9 per gram door de toename van lactose-fermenterende coliformen (van 10^4 naar 10^9 per gram).

- c) voor nutriënten afkomstig van de darmflora zie men onder 5b en 5c.

5. Onderlinge beïnvloeding

- a) Competitie betekent dat organismen "strijden" om een voedingsbron die slechts in beperkte mate aanwezig is (Brock, 1966). Hoewel competitie een zeer veel voorkomend verschijnsel is, is er weinig over competitie in het darmkanaal bekend. Waarschijnlijk is koolstofbroncompetitie een belangrijke selecterende factor. Competitie kan dikwijls ten gunste van een soort uitvallen die ondanks precies dezelfde voedingsbehoeften een iets grotere groeisnelheid heeft dan een andere soort. Het is bekend dat een residente stam van Escherichia coli in het darmkanaal niet kan worden gewisseld tegen een andere stam van dezelfde soort, zelfs niet door het proefdier een groot aantal per os te geven. Ozawa en Freter (1964) concludeerden dat dit verschijnsel berust op koolstofbroncompetitie; dat deze strijd in het algemeen wordt gewonnen door de residente stam zou zijn oorzaak vinden in het feit dat hij reeds aanwezig is en beter is aangepast, terwijl de "nieuwe" stam wordt uitgewassen tijdens de periode van adaptatie.
- b) Inhibitie of antagonisme wil zeggen dat bepaalde micro-organismen een zodanige invloed op het milieu uitoefenen dat andere micro-organismen daarvan een nadelige invloed ondervinden. Zoals reeds eerder is opgemerkt worden de aeroben in het darmkanaal onderdrukt door de facultatief anaeroben die de zuur-

stof verbruiken en samen met de strikt anaeroben, die veelal reducerende stofwisselingsproducten vormen (verbindingen met SH-groepen, waterstofgas), een lage redoxpotentiaal in stand houden. Tot de stoffen die remmend kunnen werken behoren vluchtige vetzuren, waarvan Meynell (1963) aantoonde dat zij in een gereduceerd milieu (en bij een lage pH) een remmende werking op Salmonella hebben.

Over de productie van antibiotica door de darmflora is weinig bekend; een aantal Enterobacteriaceae kan bacteriocinen vormen die echter zeer soortspecifiek zijn.

- c) Begunstiging kan plaatsvinden door het scheppen van een milieu door bepaalde bacteriën dat voor andere gunstig is (zoals een lage redoxpotentiaal) of door vorming van bepaalde stofwisselingsproducten die groeibevorderend kunnen werken. Een karakteristiek voorbeeld vinden we in het rumen van herkauwers waar de strikt anaerobe methaanbacteriën zich kunnen vermenigvuldigen door de lage redoxpotentiaal en de aanwezigheid van kool-dioxyde en waterstof (als substraat), gevormd door andere rumenbacteriën; methaanbacteriën verkrijgen hun energie immers door oxydatie van waterstof en reduceren kooldioxyde tot methaan (Bryant, 1970). Verder hebben vele rumenbacteriën als groeifactor nodig korte, vertakte vetzuren (b.v. isovaleriaanzuur, isoboterzuur) die aanwezig zijn in de rumenvloeistof (Brock, 1966).

Uit deze bespreking van de milieukenmerken van het darmkanaal kunnen we concluderen dat de residente darmflora zal bestaan uit mesofiele, facultatief anaerobe en strikt anaerobe micro-organismen waaraan niet de eis wordt gesteld dat zij zout- of zuurtolerant zijn. Verder mag men aannemen dat de peristaltiek selectief werkt: alleen relatief snelle groeiers kunnen zich in het darmkanaal vestigen. De beschikbare voedingsstoffen en de daarmee samenhangende koolstofbroncompetitie zijn waarschijnlijk van groot belang voor de stabiliteit en de samenstelling van de residente flora. De opbrengst aan micro-organismen in het coecum is maximaal te noemen (ongeveer 10% van de faeces bestaat uit bacteriën), de groeisnelheid is echter tamelijk laag. De generatietijd in muizen is ongeveer 4 delingen per dag

(Meynell & Subbaiah, 1963). E. coli groeit in een kiemvrije muis in een enorm tempo tot een maximaal aantal ($10^9 - 5 \cdot 10^{10}$ per gram darm-inhoud) om dan te stabiliseren op een lage groeisnelheid van 1,2 delingen per dag (Gibbons e.a., 1964; Gibbons & Kapsimalis, 1967).

C. Residente darmflora van de muis

De darmflora van muizen wordt vrijwel altijd onderzocht bij dieren die onder laboratoriumomstandigheden zijn gehuisvest en op een pel-letdiëet staan, hetgeen wil zeggen dat de condities zeer constant zijn. Tot voor kort werden tot de voornaamste vertegenwoordigers van de residente darmflora gerekend: bacteroidessoorten ($10^9 - 10^{10}$ per gram coecuminhoud), anaerobe lactobacillen en anaerobe streptokokken ($10^8 - 10^9$ per gram). Tevens komen altijd coliformen ($10^3 - 10^7$ per gram) en enterokokken ($10^3 - 10^4$ per gram) voor (Schaedler e.a., 1965a; Smith, 1961; Smith, 1965; Williams Smith & Crabb, 1961). Voorts worden Pseudomonas, Proteus, E. coli, clostridia (Schaedler e.a., 1965a), gisten (Williams Smith, 1965), stafylokokken en Sphaerophorus necrophorus (Hagen e.a., 1968) vaak gevonden.

Onderzoekingen van Dubos en medewerkers (Lee e.a., 1968; Savage & Dubos, 1968) wezen echter uit dat de overheersende soorten van de residente flora niet Bacteroides, lactobacillen en streptokokken, maar staafjes met spits toelopende uiteinden zijn. Deze "tapered rods" zijn zowel gram-positief als gram-negatief en verschillen in vorm en grootte; ze zijn strikt anaeroob en komen voor in aantallen van $10^{10} - 10^{11}$ per gram coecum. Om twee redenen is deze groep lang over het hoofd gezien; zij zijn strikt anaeroob en stellen hoge eisen aan de voedingsbodem.

Een aantal van deze tapered rods zijn door Gordon en Dubos (1970) beschreven; zij worden door hen bij de geslachten Eubacterium, Fusobacterium en Clostridium ingedeeld. Twee soorten tapered rods, beide clostridia, werden door Wensinck en Ruseler-van Embden (1971) uit CRF (Colonization Resistance Factor) muizen geïsoleerd. CRF muizen zijn de nakomelingen van kiemvrije dieren die besmet waren met de flora van gedecontamineerde conventionele muizen (Van der Waay e.a., 1971). Mogelijk zijn de voedselresiduen een belangrijke voedingsbron voor de tapered rods. Wilkins en Long (1971) namen waar dat zij verdwenen wanneer proefdieren werden gevoerd met een geheel absorbeer-

baar, residuloos dieet.

Het is nog niet mogelijk alle bacteriën die zich in het coecum bevinden te kweken. Met de roll-tube techniek van Hungate gelukte het Spears en Freter (1967) 20% van het totale aantal te kweken; het totaal werd in een Petroff-Hauser kamer geteld. Aranki e.a. (1969) kweekten 20 - 40%.

D. Betekenis van de residente flora voor de gastheer

De residente darmflora heeft directe en indirecte effecten op de gastheer. Deze kunnen worden afgeleid uit gegevens over dieren die onder kiemvrije condities worden gehouden.

1. Kiemvrije dieren

Het meeste onderzoek aan kiemvrije dieren is gedaan bij knaagdieren.

a) Anatomische afwijkingen worden bij uitstek gevonden in organen die normaliter intensief met de microflora in contact komen, zoals het maagdarmkanaal en het lymfatische systeem. De wand van het darmkanaal is dunner en lichter in gewicht door een reductie van de cellulaire infiltratie van de lamina propia en een afname van het lymfatische en reticuloëndotheliale weefsel. Bij muizen is het oppervlak van de mucosa 30% kleiner dan in conventionele dieren; de regeneratie van de mucosa is langzamer (Abrams e.a., 1963). Bij ratten daarentegen zijn de villi dunner maar langer dan in conventionele dieren (Van der Meer-Fiegggen, 1973). Deze afwijkingen verdwijnen snel na besmetting met een normale flora. Het lymfatische systeem is slecht ontwikkeld en dit wordt toegeschreven aan een geringe stimulatie door antigenen. Hoewel langere tijd nodig is dan bij conventionele dieren, reageert het systeem normaal na stimulatie met micro-organismen (Abrams e.a., 1963; Gordon & Bruckner-Kardoss, 1961; Philips & Smith, 1959; Thompson & Trexler, 1971).

De meest opvallende afwijking bij knaagdieren is wel het grote coecum. Het kiemvrije muizecoecum neemt ongeveer 5% van het totale lichaamsgewicht voor zijn rekening tegen 1 - 2% bij conventionele dieren (Freter & Abrams, 1972). Bij een cavia vormt het coecum in het algemeen 8,6% van het lichaamsgewicht,

in kiemvrije toestand is dit 22%, maar het kan oplopen tot 50%, hetgeen meestal de dood van het dier tot gevolg heeft (Lev, 1963).

- De inhoud van het coecum is vloeibaar en hypotonisch, de Cl^- en HCO_3^- ionenconcentratie is lager dan normaal, de pH is hoger en het reducerende vermogen is minder (Thompson & Trexler, 1971). Men neemt aan, dat de coecumvergroting op een gestoorde water-absorptie berust. Hoe de flora de regulatie van de water- en zouthuishouding beïnvloedt is niet precies bekend. Asano (1969), die ervan uitging dat de beschikbaarheid van het chloride-ion in het coecum van groot belang is voor de volume-reductie, voerde ratten chloride in de vorm van anion-uitwisselingshars. Hierbij bleek dat naast afname van de coecumgrootte o.a. het watergehalte in het coecum en in de wand afnam, de Cl^- en HCO_3^- ionenconcentratie sterk toenam en de coecumwand voor een deel (histologisch) het aanzien kreeg van een conventionele wand. Gordon (1965) en Wiseman en Gordon (1965) toonden aan dat zich in het coecum een toxische musculo-actieve stof bevindt, die in kiemvrije ratten en muizen in 6 - 8 maal zo grote concentratie voorkomt als in conventionele dieren. De afname van deze substantie bij besmetting van de proefdieren met Salmonella typhimurium ging gepaard met een reductie van de coecumgrootte. Loesche (1969) veronderstelt dat de coecumvergroting zijn oorsprong vindt in de dunne darm waar veel endogeen materiaal (o.a. eiwitten, glycoproteïnen en mucopolysacchariden) en onverteerde voedselresten vrijkomen die niet door bacteriën worden afgebroken tot verbindingen die nog geresorbeerd kunnen worden, zodat deze stoffen zich ophopen in het coecum en water vasthouden. Het coecum is snel tot normale proporties terug te brengen door een proefdier te besmetten met een conventionele flora (Schaedler e.a., 1965b) of met een mengsel van een groot aantal verschillende reïnculturen (Freter & Abrams, 1972).
- b) Van de fysiologische afwijkingen is de gestoorde water- en zouthuishouding reeds genoemd. Een aantal endogene producten en voedselresiduen worden in het darmkanaal van kiemvrije dieren niet door bacteriën gemodificeerd (zie A 4a van dit hoofdstuk). Verder kunnen deficiëntieverschijnselen worden

waargenomen door het ontbreken van productie van vitaminen door de darmflora zoals vitamine K (Gustafsson, 1959), pantotheenzuur en folinezuur (Daft e.a., 1963).

Hiernaast zijn nog een aantal andere verschillen met conventionele dieren waar te nemen, zoals verhoging van de gevoeligheid voor infecties, een langere overlevingstijd na bestraling en het later optreden en langzamer groeien van tumoren (Matsuzaura & Wilson, 1965).

2. Energievoorziening

Ook monogastrische dieren die in het bezit zijn van een groot coecum zijn in staat energie te verkrijgen uit oxydatie van vluchtige vetzuren, die door micro-organismen worden gevormd. De concentratie van vluchtige vetzuren in het coecum van een aantal knaagdieren (cavia, hamster, stekelvarken, rat, konijn) is ongeveer even groot als, zo niet groter dan in het rumen van een herkauwer. Ook de onderlinge verhouding van de drie belangrijkste vluchtige vetzuren is vrijwel gelijk bij al deze diersoorten: ongeveer 70% azijnzuur, 20% propionzuur en 10% boterzuur. Bij knaagdieren wordt een gedeelte van deze vetzuren met de faeces uitgescheiden, de rest wordt in het coecum en het colon geabsorbeerd. Bij de rat is het percentage geabsorbeerde vetzuren ongeveer 60% (Elsden, 1946). Bij een diët waaraan extra cellulose was toegevoegd bleek de hoeveelheid vetzuren in het coecum van de rat toe te nemen, waarschijnlijk door afbraak van cellulose (Yang e.a., 1969). Bij herkauwers zijn vrijwel geen vetzuren in de faeces aanwezig.

De energie die ratten verkrijgen uit vluchtige vetzuren, gevormd door darmbacteriën, kan oplopen tot 4,7% van de calorische opname; bij herkauwers is dit ongeveer 70% (Yang e.a., 1970).

Bij een aantal diersoorten (muis, rat, cavia, konijn) komt coprofagie voor. De faeces ondergaat in de maag een microbiële fermentatie tot producten waarvan een deel weer op normale manier in de dunne darm kan worden verteerd (T-W-Fiennes, 1972). Bij verhindering van coprofagie kan pantotheenzuur-deficiëntie ontstaan (Daft, 1963).

3. Weerstand tegen infecties

Een ander, voor de gastheer belangrijk effect van de residente darmflora is het elimineren van transiënten, in het bijzonder van

pathogene micro-organismen, uit het darmkanaal. Worden muizen oraal besmet met Salmonella enteritidis dan zijn 10^6 micro-organismen nodig om 50% van de muizen te infecteren. Bij een lagere dosis passeren de bacteriën het darmkanaal zonder zich te vermenvuldigen (Miller & Bohnhoff, 1962); dit geldt niet alleen voor Salmonella maar ook voor andere pathogenen. Na toediening van antibiotica, waardoor de residente darmflora wordt verstoord, zijn zeer kleine inocula voldoende om muizen te besmetten. Na een streptomycine- (of penicilline) behandeling kon S. enteritidis zich reeds vestigen wanneer 10 bacteriën per os werden toegediend (Bohnhoff & Miller, 1962). De letale dosis van Salmonella typhimurium voor muizen liep na decontaminatie met streptomycine terug van 10^6 naar 1 (Meynell & Subbaiah, 1963). Ashburner en Mushin (1962) konden muizen infecteren door 10 of minder bacteriën (Escherichia coli) te voeren aan met streptomycine behandelde muizen. Uit bovenstaande gegevens blijkt dat de darmflora omstandigheden schept waardoor de vestiging van pathogene bacteriën in de darm wordt belemmerd. Wat precies het mechanisme is waardoor de residente darmflora zo stabiel blijft en waardoor invasie door deze pathogenen wordt tegengewerkt is nog niet duidelijk. Meynell (1963) nam waar dat vluchtige vetzuren, in eenzelfde concentratie als waarin zij in het coecum voorkomen, in combinatie met een lage pH en anaerobe omstandigheden in vitro een onderdrukkend effect hadden op Salmonella typhimurium. Bohnhoff e.a. (1964a) konden S. enteritidis in vitro onderdrukken met behulp van geautoclaveerde coecum-, colon- en faecessuspensies. Azijnzuur en boterzuur konden daaruit worden geïsoleerd in concentraties die Salmonella onderdrukten. Ook zij vonden dat de werking het sterkst was bij een lage pH (6,2 of lager) en onder anaerobe condities. Werden daarentegen muizen behandeld met streptomycine, waardoor Salmonella gemakkelijk kon invaderen, dan bleek ook de pH van het colon iets te zijn gestegen en de hoeveelheid vluchtige vetzuren te zijn afgenomen (Bohnhoff e.a., 1964b). Freter en Abrams (1972) menen echter dat de vluchtige vetzuren, hoewel zeer belangrijk, niet alleen verantwoordelijk zijn voor de weerstand tegen Salmonella-invasie. Bij experimenten met E. coli vonden zij lang niet altijd een correlatie tussen de concentraties van vetzuren in het

coecum en de aantallen E. coli. Freter en medewerkers veronderstellen dat het antagonisme van de darmflora gedeeltelijk berust op koolstofbroncompetitie. Een residente stam van E. coli bleek niet te kunnen worden verdrongen door een andere stam van dezelfde soort. Deze laatste had, zowel in vivo als in continue cultuur, een adaptatietijd nodig van 1 - 3 dagen; tijdens deze tijd nam hij langzaam in aantal af om op een laag niveau te stabiliseren. Indien aan deze stam, bij het kweken in continue cultuur, onmiddellijk na beënten van het medium een koolstofbron (hiervoor werd o.a. dulcitol gebruikt) werd toegevoegd waaraan hij reeds tevoren was gewend en die niet door de residente stam kon worden gebruikt, dan bleek de adaptatietijd zeer kort te zijn. Ook wanneer deze stam via de darmwand in het darmkanaal van een proefdier (muis) werd gebracht vestigde hij zich snel en gemakkelijk (Freter, 1962; Freter & Ozawa, 1963; Ozawa & Freter, 1964). Zoals ter sprake is gekomen hangt de eliminatie van bacteriën af van het aantal dat oraal aan muizen wordt toegediend. Van der Waay e.a. (1971) definieerden het begrip CR als maat voor de "colonization resistance" als volgt: CR is de logaritme van de orale dosis die tot gevolg heeft dat 50% van de muizen wordt gekoloniseerd. De normale CR van muizen tegen E. coli is 7; tijdens een periode van 2 weken waarin niet resorbeerbare antibiotica oraal werden toegediend daalde de CR tot minder dan 2, maar keerde tot normale waarden terug tijdens de periode van repopulatie van het darmkanaal door organismen die de behandeling hadden overleefd.

Enterobacteriaceae, enterokokken, stafylokokken en gisten waren in het geheel niet meer aanwezig en de flora bleek nog slechts uit anaeroben te bestaan. Bij nakomelingen van kiemvrije muizen die besmet waren met deze anaerobe flora was de CR groter. Deze muizen werden CRF (CR Factor)-muizen genoemd en waren in alle opzichten normaal (ook wat betreft de coecumgrootte). Niet alleen de resistentie tegen E. coli, maar ook tegen Klebsiella pneumoniae en Pseudomonas aeruginosa was verhoogd. Het is duidelijk dat de anaerobe flora voor de kolonisatie resistentie verantwoordelijk is. Deze CRF-muizen met hun vereenvoudigde flora en verhoogde CR zijn uitermate geschikt om te onderzoeken welke mechanismen ten grondslag liggen aan kolonisatie resistentie en welke organismen daarvoor verantwoordelijk zijn.

H O O F D S T U K I I

DOELSTELLING EN OPZET VAN HET ONDERZOEK

A. Doelstelling en opzet van het onderzoek

In dit hoofdstuk worden doelstelling en opzet van het onderzoek besproken en wordt nader ingegaan op de bepaling van de redoxpotentiaal en op de waarden die in het darmkanaal worden gevonden.

In het vorige hoofdstuk zijn de ecologie van de darmflora van de muis en de milieukeurmerken beknopt besproken die de samenstelling van de darmflora bepalen. In dit proefschrift wordt één van deze milieufactoren, de redoxpotentiaal, in zijn relatie tot enkele vertegenwoordigers van de residente darmflora nader onderzocht. De aanleiding tot dit onderzoek was de volgende. De darmflora van CRF-muizen bestaat uitsluitend uit strikt anaerobe bacteriën. Om na te gaan welke van deze micro-organismen verantwoordelijk zijn voor de resistentie werden kiemvrije muizen besmet met stammen die geïsoleerd waren uit het coecum van CRF-muizen; bij deze gnotobionten werd de CR bepaald. Tijdens deze proeven bleek dat enkele strikt anaeroben niet in staat waren zich te vestigen in het coecum van kiemvrije muizen. De oorzaak hiervan zou het feit kunnen zijn dat de redoxpotentiaal in het coecum van kiemvrije muizen veel hoger is dan in dat van conventionele.

Om de juistheid van deze veronderstelling te kunnen toetsen werd een methode ontwikkeld om de redoxpotentiaal in het darmkanaal van muizen te meten. Daarmee werden de volgende experimenten uitgevoerd.

1. De redoxpotentiaal werd in verschillende delen van het darmkanaal van kiemvrije en conventionele muizen gemeten om een indruk te krijgen in hoeverre de darmflora de redoxpotentiaal beïnvloedt.
2. Kiemvrije muizen werden besmet met reinculturen van bacteriën die uit CRF-muizen waren geïsoleerd; nadat was vastgesteld of deze stammen zich in de muizecoeca hadden gevestigd, werd de redoxpotentiaal in het coecum gemeten. Enkele strikt anaeroben, behorende tot de tapered rods, die zich niet konden vestigen in kiemvrije muizen, werden toegediend aan muizen waarvan de redoxpotentiaal in het coecum was verlaagd door de dieren tevoren te besmetten met één van de gemakkelijk groeiende anaeroben. Deze experimenten (1 en 2) worden in hoofdstuk IV beschreven.
3. In jonge muizen vestigen de strikt anaerobe tapered rods zich ongeveer 12 dagen na de geboorte; het is mogelijk dat deze vestiging samenhangt met een geleidelijke daling van de redoxpotentiaal. Om na te gaan of er een relatie bestaat tussen de opkomst van de tapered rods en de waarde van de redoxpotentiaal werd in conventionele muizen van 4 - 20 dagen de potentiaal in het coecum gemeten. Deze experimenten worden beschreven in hoofdstuk V.
4. Ook kiemvrije muizen worden na contact met CRF-muizen pas door tapered rods gekoloniseerd als andere darmbacteriën zich reeds hebben genesteld. Het is mogelijk, dat evenals in het coecum van jonge conventionele muizen (het milieu eerst door andere bacteriesoorten geschikt moet worden gemaakt) o.a. door het verlagen van de redoxpotentiaal, voordat de tapered rods zich kunnen vestigen. De resultaten van de experimenten die hierover zijn uitgevoerd, zijn beschreven in hoofdstuk VI.
5. In verband met deze experimenten leek het van belang, het gedrag van de tapered rods en enkele andere uit CRF-muizen geïsoleerde soorten in vitro te bestuderen. Hiertoe werd een vaatje ontwikkeld waarin strikt anaerobe condities konden heersen en waarin, tijdens de groei van de stam, de pH en redoxpotentiaal konden worden gemeten. Bij deze proeven werd nagegaan in hoeverre het gedrag van de CRF-stammen in cultuur overeenkwam met hun gedrag in de muis. Tevens werd van de stammen die niet konden aanslaan in kiemvrije muizen bepaald, welke de potentiaal is waarbij zij zich nog juist kunnen vermeerderen (de beperkende potentiaal). Zie voor deze

B. Redoxpotentiaal

Gezien de betekenis van de redoxpotentiaal voor ons onderzoek volgt hier een korte bespreking van de grootte redoxpotentiaal en van literatuurgegevens daarover voorzover zij betrekking hebben op het darmkanaal.

1. De fysisch-chemische redoxpotentiaal

Met de redoxpotentiaal kan men de graad van oxydatie of reductie van een chemisch systeem aangeven. De redoxpotentiaal (meestal uitgedrukt in mV) kan worden bepaald door het potentiaalverschil te meten tussen een inerte elektrode van een edel metaal en een referentie-elektrode die zijn geplaatst in een oplossing welke een redoxsysteem bevat. Als referentie-elektrode werd oorspronkelijk gebruik gemaakt van de waterstof-elektrode, d.i. een platina-staaf met daarop aangebracht elektrolytisch fijn verdeeld platina (platina-zwart), die in contact wordt gebracht met waterstofgas; de platinastaaf adsorbeert het gas. In redoxmengsels worden potentiaalverschillen, niet absolute waarden, gemeten. De waterstof-elektrode ($p_{H_2} = 1 \text{ atm}$; $pH = 0$) wordt daarom als nulpunt gekozen. Bij $pH = 7$ en bij 30°C is de redoxpotentiaal van de waterstof-elektrode -420 mV , daar $E_h = 60 \log (H^+)$. Het potentiaalverschil tussen de te meten oplossing en de standaard waterstof-elektrode kan worden uitgedrukt door de formule van Nernst;

$$E_h = E_o + \frac{RT}{nF} \ln \frac{(ox)}{(red)}$$

R = gasconstante

T = temperatuur in $^\circ$ Kelvin

n = aantal elektronen dat aan het proces deelneemt

F = constante van Faraday

(ox) = concentratie van de stof in geoxideerde vorm

(red) = concentratie van de stof in gereduceerde vorm

E_o = redoxpotentiaal van een stof die 50% geoxydeerd en 50% gereduceerd is, gebaseerd op de standaard waterstof-elektrode. Deze potentiaal heet standaard redoxpotentiaal

De redoxpotentiaal kan bij redoxmetingen worden berekend uit:

$$E_h = E (\text{gemeten}) + E (\text{referentie-elektrode})$$

In de praktijk wordt veel gebruik gemaakt van een calomel-elektrode als referentie-elektrode; deze elektrode bestaat uit Hg in een verzadigde Hg_2Cl_2 oplossing, maar omdat calomel zeer weinig oplosbaar is (en zijn verzadigde oplossing daarom een slecht geleidingsvermogen heeft) voegt men een (verzadigde) KCl oplossing toe.

De potentiaal van de calomel-elektrode is t.o.v. de standaard waterstof-elektrode bij $30^\circ\text{C} + 241 \text{ mV}$. Meestal drukt men de E_h uit bij $\text{pH} = 7$ en geeft dit aan met E'_h . De eigen potentiaal van de calomel-elektrode is niet afhankelijk van de pH, de potentiaal van de standaard waterstof-elektrode echter wel, zodat de potentiaal van de calomel-elektrode t.o.v. de standaard waterstof-elektrode voor pH verschillen moet worden gecorrigeerd. E'_h (in mV) = $E + 241 + 60 (\text{pH}_x - 7)$ waarin pH_x de pH is van de vloeistof.

Naast het elektrometrisch bepalen van de redoxpotentiaal is het ook mogelijk redoxpotentialen te meten met behulp van indicator-kleurstoffen. Deze redoxindicatoren zijn organische stoffen die door oxydatie of reductie van kleur veranderen. Bij 50% reductie (en oxydatie) hoort een bepaalde potentiaal (E_o), bij gegeven pH. Aan het al dan niet plaatsvinden van kleuromslag kan men dus vaststellen of de te onderzoeken oplossing een hogere of lagere redoxpotentiaal heeft dan het kleuromslagtraject van de indicator. Colorimetrische bepalingen worden meestal ter oriëntatie gebruikt, in het bijzonder bij het meten van de intracellulaire redoxpotentiaal (Clark, 1961; Hewitt, 1950; Jacob, 1970 & 1971; Kruijff & Overbeek, 1958; Rabotnova, 1963).

2. Redoxpotentiaal in het darmkanaal

In hoofdstuk I is uiteengezet dat de redoxpotentiaal een belangrijke selecterende factor is in het darmkanaal. Strikt aerobe micro-organismen, die zijn aangewezen op zuurstof als terminale elektronen-acceptor, kunnen zich in dit milieu waar een lage zuurstof-spanning heerst niet vermenigvuldigen. Aerobe, facultatief anaerobe micro-organismen kunnen zich echter goed handhaven in het darmkanaal daar zij ook kunnen fermenteren, waarbij organische stoffen terminale elektronen-acceptoren zijn.

Uiteraard is het zuurstofarme milieu van het darmkanaal bijzonder geschikt voor anaerobe micro-organismen. Bij de muis heeft de redoxpotentiaal in het coecum een veel lagere waarde dan in het

overige deel van het darmkanaal; hier bevinden zich zeer grote aantallen micro-organismen die de zuurstof welke het coecum bereikt via de dunne darm (afkomstig van ingeslikte lucht) en door diffusie door de coecumwand, zo snel reduceren dat de zuurstofspanning op een constant laag niveau blijft. Tevens worden organische elektronen-acceptoren gereduceerd.

De invloed van micro-organismen op de redoxpotentiaal in het coecum blijkt duidelijk wanneer gegevens van conventionele en kiemvrije dieren met elkaar worden vergeleken. In tabel I zijn de in de literatuur opgegeven waarden vermeld.

Is het nu mogelijk dat de relatief hoge redoxpotentiaal in kiemvrije dieren een belemmering vormt voor de kolonisatie van strikt anaeroben? Uit de literatuur blijkt dat de meest anaerobe darmbacteriën zich gemakkelijk in kiemvrije muizen en ratten vestigen. Gnotobionten konden worden verkregen door kiemvrije muizen of ratten te besmetten met vertegenwoordigers van de geslachten Clostridium (Raibaud e.a., 1972; Skelly, 1962), Bacteroides (Schaedler e.a., 1965b), Catenabacterium, Eubacterium (Raibaud e.a., 1966), en met anaerobe streptokokken (Schaedler e.a., 1965b). Enkele niet geïdentificeerde staafjes (waarschijnlijk behorend tot de tapered rods) uit het muizecoecum bleken niet in staat te zijn kiemvrije muizen te koloniseren; zij sloegen wel aan in gnotobionten van E. coli. Het is mogelijk dat E. coli, door het verlagen van de redoxpotentiaal in het coecum, het milieu geschikt maakt voor de groei van deze staafjes (Syed e.a., 1970).

H O O F D S T U K I I I

MATERIAAL EN METHODEN

In dit hoofdstuk wordt een beschrijving gegeven van de proefdieren, de gebruikte bacteriesoorten, de media, de bepaling van bacterieaantallen in faeces en coecum, het meten van de redoxpotentiaal in het coecum en in culturen en het calibreren en de behandeling van de elektroden.

A. Proefdieren

Bij de experimenten werd gebruik gemaakt van conventionele, kiemvrije, gnotobiotische en CRF-muizen.

Conventionele dieren waren Swiss ND2 muizen, afkomstig van het Radiobiologisch Instituut T.N.O. te Rijswijk, A/J muizen en C57 Bl/A muizen van het Centraal Proefdieren Bedrijf van de Medische Faculteit Rotterdam; de laatste twee stammen waren ingeteeld. De muizen van 4 - 20 dagen oud, die voor experimenten beschreven in hoofdstuk V nodig waren, werden zelf gefokt uit Swiss ND2 ouders. De muizen werden gevoed met pellets (AM 2, Hope Farms). Het drinkwater werd, ten einde een eventuele vermenigvuldiging van Pseudomonas aeruginosa te voorkomen, met HCl aangezuurd tot pH 2,3 - 2,7.

Kiemvrije muizen, Swiss ND2, werden gedeeltelijk ter beschikking gesteld door het Radiobiologisch Instituut T.N.O. en gedeeltelijk verkregen uit eigen fok. De muizen die afkomstig waren van het Radiobiologisch Instituut werden vervoerd en gehuisvest in separatiebakken ("isolation cages", Van der Waay, 1968). De uit eigen fok verkre-

gen muizen waren gehuisvest in plastic isolatoren (Trexler & Reynolds, 1957). Bij de in- en uitvoer van materiaal werden de sluizen van de isolator met een 2% - ige perazijnzuuroplossing (Laporte Chem. Ltd., Luton, England), waarin 0,5% natriumalkylarylsulfonaat, ontsmet. Gnotobiotische muizen werden verkregen door kiemvrije dieren te besmetten met suspensies van verschillende bacteriestammen, die aan het drinkwater werden toegevoegd. Het voedsel en het drinkwater van de gnotobionten was gelijk aan dat van de kiemvrije muizen. De gnotobionten werden met maximaal 5 tezamen gehuisvest in separatiebakken. Eenmaal per week werden de muizen in een schone bak overgebracht. Dit overzetten vond plaats in een laminar flow cabinet ("stofvrije werkbank", 91/122, Pielkenrood Vinitex N.V.), waarin besmetting via de lucht wordt voorkomen (Van der Waay & Andreas, 1970). CRF (Colonization Resistance Factor)-muizen werden verstrekt door Dr. van der Waay, Radiobiologisch Instituut T.N.O., Rijswijk. De muizen werden vervoerd in separatiebakken en gehuisvest in plastic isolatoren en in separatiebakken.

B. Bacteriesoorten

De stammen die in de experimenten werden gebruikt waren, op Escherichia coli na, geïsoleerd uit CRF-muizen. Hieronder volgt een korte beschrijving en in tabel II zijn de belangrijkste eigenschappen van deze stammen weergegeven; zie ook Wensinck en Ruseler-van Embden (1971).

Clostridium ramosum. Halfcirkelvormig, gram-positief, sporevormend staafje; de sporen zijn rond en terminaal; strikt anaeroob, catalase negatief; saccharolytisch, zuur maar geen gas uit koolhydraten.

Clostridium innocuum. Recht of lichtgebogen, gram-positief, sporevormend staafje; de sporen zijn ovaal en terminaal; strikt anaeroob, catalase negatief; saccharolytisch, zuur en gas uit koolhydraten.

Propionibacterium acnes. Gram-positief staafje; aerotolerant, catalase positief; saccharolytisch, zuur maar geen gas uit koolhydraten; vormt propionaat uit lactaat.

Soort D. Fusiform, gram-negatief, sporevormend staafje; sporen zijn ovaal en subterminaal; strikt anaeroob, catalase negatief; saccharolytisch, zuur en gas uit koolhydraten.

Soort E. Grote, sigaarvormige, gram-positieve, sporevormende staaf; sporen zijn ovaal en subterminaal; strikt anaeroob, catalase negatief;

saccharolytisch, zuur maar geen gas uit koolhydraten.

Bacteroides fragilis. Gram-negatief staafje; strikt anaeroob, catalase negatief; saccharolytisch, zuur maar geen gas uit koolhydraten; groei wordt gestimuleerd door 5% rundergal.

Escherichia coli.

De eerste 5 bacteriesoorten werden door Wensinck en Ruseler-van Embden (1971) uit CRF-muizen geïsoleerd en met de letters A - E aangegeven. A werd later geïdentificeerd als Clostridium ramosum, B als Clostridium innocuum. C was reeds als Propionibacterium acnes geïdentificeerd. D is een clostridium die niet tot een beschreven soort behoort en E wordt waarschijnlijk, tezamen met Wilkins, beschreven onder de naam Clostridium cecinum.

C. Media

Medium I. De eerste vier soorten werden gekweekt op het medium van Hamilton en Zahler (1957): glucose, 0,5%; trypton, 2%; gistextract, 0,2%; NaCl, 0,5%; $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 1%; natriumthioglycolaat, 0,1%. Het medium waaraan 0,0002% resazurine werd toegevoegd als indicator om te zien of anaerobiose gehandhaafd blijft, werd op pH 7,2 gebracht en gedurende 15 minuten op 120°C geautoclaveerd. Voor het kweken van Bacteroides fragilis werd 5% verse rundergal, gesteriliseerd door filtratie, aan het medium toegevoegd.

Medium II. Soort E, de sigaarvormige sporevormer, werd gekweekt op het volgende medium: glucose, 0,5%; trypton, 1,5%; gistextract, 0,3%; NaCl, 0,5%; $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 0,3%; KH_2PO_4 , 0,05%; cysteine HCl, 0,05%; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,05%; resazurine 0,0002%. De pH werd op 7,2 gesteld en het medium werd 15 minuten op 120°C gesteriliseerd. Na afkoeling tot ongeveer 50°C werd de volgende vitamine-oplossing toegevoegd (1 ml op 100 ml): p-aminobenzoëzuur, 100 mg; biotine, 0,03 mg; calciumpanthoënaat, 1,2 g; folinezuur, 100 mg; niacine, 100 mg; pyridoxalfosfaat, 100 mg; riboflavine, 100 mg; thiamine HCl, 100 mg; aqua dest., 1 l. De oplossing werd op pH 6,8 gebracht en gesteriliseerd door filtratie. De stammen, behalve soort E, werden aangehouden door ze éénmaal per week over te enten op buizen met medium I waarin 0,3% agar (met, voor B. fragilis, 5% rundergal). Soort E werd tweemaal per week overgeënt op anaerobe flessen (Wensinck & Ruseler-van Embden, 1971) waarin medium II met 1,5% agar.

D. Bepaling van bacterieaantallen in faeces en coecuminhoud

Faeces (of coecuminhoud) werd gewogen en in 50-voudig volume fysiologisch zout gesuspenderd met behulp van een "whirl mixer" (Fisons Sci.App.) nadat glasparels waren toegevoegd. Bij muizen van 4 - 20 dagen werd coecum met inhoud gehomogeniseerd door het met fysiologisch zout en fijn zand in een mortier fijn te wrijven. Eén standaard druppel (1/40 ml) werd zorgvuldig over 4 cm² op een objectglaasje uitgestreken. In de gebruikte opstelling (Zeiss, olie-immersie-objectief 100 x en oculair 8 x) correspondeert één bacterie per gezichtsveld met 3.10⁷ bacteriën per gram faeces of coecuminhoud. Men kan met deze methode vanaf ongeveer 10⁶ bacteriën per gram tellen. Minimaal werden 10 representatieve gezichtsvelden geteld, waarvan het gemiddelde werd genomen. Ter controle van deze methode werden enkele van de gemakkelijk te kweken anaeroben geteld met de "plaat" methode. In plaats van media in petrischalen werden anaerobe flessen gebruikt met medium I waarin 1,5% agar. De verdunningen die voor de telling nodig waren werden gemaakt in buisjes waardoor N₂/CO₂ gas stroomde (zie fig. 1). In de buisjes bevond zich medium I.

E. Meten van de redoxpotentiaal in het coecum

Voor het meten van de redoxpotentiaal in het darmkanaal werden de volgende elektroden gebruikt:

1. platina-elektrode met een bladvormig oppervlak (P 101, Radiometer).
2. naaldvormige platina-elektroden van eigen fabrikaat. Hiervoor werd platinadraad van 0,3 en 0,8 mm diameter gebruikt. Een platinadraadje van ongeveer 1 cm lengte werd aan het koper van een soepel montagedraadje gesoldeerd. In de lengterichting van een staafje PVC (polyvinylchloride) van ongeveer 1 cm werd een gat geboord; het zo ontstane buisje werd over het soldeerpoint geschoven en aan de uiteinden opgevuld met twee-componentenlijm (Araldiet-Scotch) in een verhouding van 1 : 1. Het uiteinde van de platina-draad werd puntig gemaakt.
3. als referentie-elektrode werd een calomel-elektrode (K 401, Radiometer) gebruikt die werd aangepast aan het meten in het darmkanaal. De elektrode werd verlengd met een rubber slangetje en een daaraan bevestigd glascapillair, dat met 2% agar in verzadigde KCl-oplossing werd gevuld. De diameter van het capillair varieerde van 1

tot 0,3 mm. Het voordeel van deze "agar-zout-brug" is dat het fijne, gemakkelijk te verontreinigen membraan van de calomel-elektrode niet in contact komt met de darminhoud; de agar-zout-brug kan na gebruik worden weggegooid.

4. om de pH in het darmkanaal te meten gebruikten wij een staafvormige gecombineerde glas-calomel-elektrode (GK 2322C, Radiometer). De elektroden werden aangesloten op een pH meter (28, Radiometer).

Het is moeilijk de redoxpotentiaal in de intacte levende muis te bepalen; men moet genoegen nemen met dieren die worden genarcotiseerd of gedood, waarbij de meting direct na de dood plaatsvindt. Wostmann en Bruckner-Kardoss (1966) narcotiseerden kiemvrije en conventionele ratten. De dieren werden ongeveer 55 minuten onder narcose gehouden met natrium-pentobarbital. De redoxpotentiaal in het coecum werd tijdens de hele narcose gemeten nadat de platina- en de referentie-elektrode via een kleine opening in de wand naar binnen waren gebracht. De redoxpotentiaal bleef geleidelijk zakken tot halverwege het experiment een dieptepunt was bereikt (E'_h kiemvrije ratten ong. - 25 mV; conventionele ratten ong. - 340 mV). De laagste waarden komen overeen met het dieptepunt van de narcose hetgeen werd toegeschreven aan de geringere zuurstofvoorziening van het bloed en daarmee van het darmweefsel. Wostmann en Bruckner-Kardoss nemen aan dat de waarden die tijdens het einde van het experiment werden gemeten (op het moment dat de ratten uit hun narcose begonnen bij te komen) de waarden zijn die het meest overeenkomen met die in een levend dier (E'_h kiemvrije ratten ong. + 60 mV; conventionele ratten ong. - 185 mV).

Meynell (1963) bracht de coecuminhoud, samen met vers uitgekookt aqua dest., in een bakje dat onder stikstof werd geplaatst en mat dan de potentiaal. Hij vermeldt echter niet, hoelang na de dood de metingen werden verricht.

Hoewel de methode van Wostmann en Bruckner-Kardoss misschien de meest betrouwbare waarden van de redoxpotentiaal geeft, kozen wij toch de proefopstelling waarbij de proefdieren vlak voor de aanvang van het experiment werden gedood. Wij wilden nl. alle redoxmetingen met elkaar vergelijken, ook degene die bij muizen van 4 - 20 dagen oud werden verkregen en bij deze jonge dieren konden de metingen niet

onder narcose worden verricht. De tijd tussen het doden van de muis en het einde van het experiment bedroeg niet meer dan 5 à 10 minuten. Hoewel deze periode zeer kort is, moeten wij rekening houden met enkele invloeden waarvan we de uitwerking niet precies kennen. Ten eerste wordt de zuurstofvoorziening van het darmweefsel stopgezet waardoor minder zuurstof naar de coecuminhoud diffundeert zodat de redoxpotentiaal zou kunnen dalen. Een goede elektrode geeft echter binnen enkele minuten een vaste waarde aan en het bleek dat bij voortzetting van het meetexperiment (gedurende ca. 1 uur) deze waarde niet of nauwelijks (enkele mV) veranderde. Ten tweede werden de proeven aan de lucht gedaan, waarbij de luchtzuurstof via de darmwand naar binnen kan dringen waardoor de redoxpotentiaal zou kunnen stijgen. Bij vergelijkende experimenten in een zuurstofvrije werkkast (vriendelijk ter beschikking gesteld door Drs. J. Koopman, Proefdierlaboratorium, Katholieke Universiteit, Nijmegen) bleek dat de redoxpotentiaal in het coecum van conventionele muizen niet verschilde van de potentiaal die aan de lucht werd gemeten. Werden daarentegen kiemvrije muizen in een dergelijke kast gemeten dan begon de redoxpotentiaal op hetzelfde niveau als werd gemeten buiten de kast, maar bleef gedurende lange tijd zakken tot ongeveer 150 mV lager dan de beginwaarde. De oorzaak hiervan zou kunnen zijn dat de in het coecum aanwezige zuurstof in een zuurstofvrije omgeving zo snel door de darmwand naar buiten diffundeert dat de redoxpotentiaal zakt. Indien men de muizen aan het begin van het experiment doodt kan men de redoxpotentiaal van de coecuminhoud op de volgende manieren meten:

Ten eerste kunnen de elektroden, nadat de buikwand van de muis is opengeknipt, direct in het coecum worden gebracht door in de wand een kleine opening te knippen of de elektroden er doorheen te prikken. Deze methode is door ons gevolgd omdat de tweede manier, waarbij coecuminhoud gemengd met aqua dest. in een bakje wordt gebracht waarin dan de potentiaal wordt gemeten (Meynell, 1963), grote nadelen oplevert. De redoxpotentiaal van coecuminhoud van kiemvrije muizen bleek bij meten in het bakje veel hogere waarden aan te geven dan wanneer de elektroden direct in het coecum werden gebracht. Bij het overbrengen van het coecuminhoud-aqua dest. mengsel (aqua dest. zelf kan al geen lage potentiaal hebben) naar het bakje kan zuurstof uit

de lucht naar binnendringen; waarschijnlijk is dit de reden waarom de potentiaal zoveel hoger is. Meten we echter de coecuminhoud van conventionele muizen op twee verschillende manieren dan blijkt er geen verschil in potentiaal op te treden, kennelijk heeft de coecuminhoud van conventionele dieren zulke sterk reducerende eigenschappen dat de zuurstof uit de lucht (tijdens de duur van het experiment) er geen invloed op heeft. Ook het direct in het coecum meten van de pH heeft grote voordelen boven het meten in een mengsel van coecuminhoud en fysiologisch zout (Meynell, 1963), daar er tijdens het overbrengen en mengen kooldioxyde ontsnapt en de pH hoger wordt. Het meten van de redoxpotentiaal in het muizecoecum werd als volgt uitgevoerd:

Vlak voor het begin van het experiment werd de muis gedood met ether; met een grote snede werd de buikwand geopend. Door een kleine snede in de coecumwand kunnen de platina-elektrode en de calomel-elektrode tezamen worden ingebracht. Is het coecum nogal klein (in conventionele en zeer jonge muizen) dan is het handiger om het coecum tezamen met een stuk dunne en dikke darm uit de buikholte te lichten en de referentie-elektrode in de dunne (of dikke) darm te brengen en de platina-elektrode, die een scherpe punt heeft, door de coecumwand te steken. Na ongeveer 2 minuten kan de redoxpotentiaal worden afgelezen. De pH werd gemeten door het coecum verder open te knippen en de glas-calomel-elektrode in de inhoud te steken.

Bij het meten van de redoxpotentiaal in muizen van 4 - 20 dagen werd gebruik gemaakt van de platina-elektroden met een diameter van 0,3 mm. Bij de overige metingen gebruikten wij de elektroden met een diameter van 0,8 mm of de P 101 van Radiometer.

F. Meten van de redoxpotentiaal in culturen

Om de veranderingen in redoxpotentiaal en pH tijdens de groei van een bacteriecultuur te kunnen vervolgen werd een vaatje gebruikt dat als volgt was geconstrueerd (zie fig. 2).

Een afgesloten cylindervormig glazen vat van ongeveer 500 ml werd aan de bovenkant van 5 slijpstukken voorzien, waarin elektroden konden worden geplaatst. Aan weerszijden van het vaatje bevonden zich op $\frac{3}{4}$ van de hoogte twee afsluitkranen. Aan één kraan was een waterslot bevestigd gevuld met paraffine-olie. Werde de verandering van redoxpoten-

tiaal en pH tijdens de groei van een cultuur bepaald, dan werden in de bovenste openingen een platina-elektrode, 2 referentie-elektroden en een glas-elektrode geplaatst, alle voorzien van slijpstukken. De volgende elektroden (Ingold) werden gebruikt: platina-elektrode (Pt 800 NS of Pt 805 NS); Argenthal-elektrode (363-90 NS); glas-elektrode (265 NS). Alle elektroden waren autoclaveerbaar (tot 130°C) en voorzien van autoclaveerbare kabel (HT Koax 5 van 50 mm) en stekkers (S 962). De vijfde opening, die tijdens het experiment werd gebruikt voor beënten en monsternamen, werd afgesloten met een geslepen stopje. De afsluitkraantjes en de slijpstukken om de elektroden werden gesmeerd met hoog-vacuüm vet (Glisseal; PMC, Solothurn, Zwitserland). Het vaatje werd gevuld met 300 ml medium. Medium I werd voor alle stammen, behalve voor soort E, gebruikt; voor de groei van Bacteroides fragilis werd 5% gal toegevoegd. Soort E werd gekweekt op medium II. Het vaatje werd, met medium, elektroden en een magnetisch roerstaafje, geautoclaveerd. Tijdens sterilisatie stonden de afsluitkraantjes aan de zijkanten van het vaatje open. Zodra de autoclaaf tot 100°C was afgekoeld werd het vaatje eruit genomen en met de vrije kraan aangesloten op een N₂/CO₂ cylinder om anaerobiose te handhaven.

Het gas werd zeer langzaam over het medium geleid en kon ontsnappen via het andere tuitje. Het daaraan bevestigde waterslot diende om terugstroming van lucht te voorkomen. Het vaatje werd boven een magneetroerder (Cenco G 505) geplaatst; door voortdurend roeren werd tijdens de groei van de cultuur een homogene suspensie verkregen. De elektroden werden verbonden met 2 pH meters zodat redoxpotentiaal en pH konden worden afgelezen. Na afkoeling van het medium werd minstens 6 uur met beënten gewacht; de redoxpotentiaal was dan reeds enkele uren constant.

Het vaatje werd beënt met een oogje van een verse bacteriecultuur, gegroeid op een vaste voedingsbodem. Vlak voor en vlak na het beënten en verder elk half uur werden redoxpotentiaal en pH geregistreerd en werden monsters (2 ml) uit de cultuur genomen om de troebelings te bepalen. Extincties werden spectrofotometrisch bepaald met een Unicam SP 500 spectrofotometer, bij 625 nm. De gehele opstelling bevond zich in een kamer van 37°C. Na afloop van het experiment werd aerob uit het vaatje gekweekt om mogelijke besmetting tijdens het

experiment te achterhalen.

In bovenstaande opstelling was de beginpotentiaal ongeveer - 130 mV. In die gevallen waarbij een hogere redoxpotentiaal gewenst was, namelijk in experimenten waarin werd bepaald wat de hoogste potentiaal is waarbij een bacteriestam zich nog juist kan vermeerderen, werd de opstelling enigszins gewijzigd (zie fig. 3).

Om de redoxpotentiaal te verhogen werd een mengsel van N_2/CO_2 gas en perslucht gebruikt. Dit werd niet over de cultuurvloeistof geleid, maar er doorheen. Met behulp van een titrator (11, Radiometer) en een daarop aangesloten klep ("magnetic valve" MNV 1, Radiometer) werd de persluchttoevoer zo geregeld dat zich een constante redoxpotentiaal van de gewenste waarde in het medium kon handhaven. Het N_2/CO_2 gas en het mengsel van N_2/CO_2 en lucht werden door waterkolommen geleid om de gassen met waterdamp te verzadigen. De beide pH meters werden op een 12 punts recorder (PR 3500, Philips) aangesloten waarop pH en redoxpotentiaal werden geregistreerd.

Cysteine of thioglycollaat werden niet aan de media toegevoegd.

Aangenomen werd dat de geënte bacteriestam groeide wanneer de pH daalde en de cultuurvloeistof troebel werd. In plaats van argenthaal-elektroden, die nogal kwetsbaar zijn, werd in één opening van het vaatje een agar-zout-brug (2% agar in verzadigde KCl oplossing) geplaatst die in verbinding stond met een bekersglas gevuld met een verzadigde KCl oplossing; hierin waren 2 calomel-elektroden geplaatst. De agar-zout-brug werd apart gesteriliseerd.

G. Calibreren van de elektroden

Indien men hoge redoxpotentialen (hoger dan ongeveer + 100 tot + 200 mV) wil meten levert het calibreren geen probleem op. Men kan van verschillende standaardoplossingen gebruik maken zoals een verzadigde quinhydronoplossing in H_2SO_4 (Leistner & Mirna, 1959), een mengsel van ferri- en ferrocyanideoplossingen in KCl (Michaelis, 1929) of een mengsel van ferri- en ferrosulfaatoplossingen in H_2SO_4 (Light, 1972). Deze oplossingen zijn zo geconcentreerd dat de E_h door zuurstof uit de lucht niet wordt beïnvloed.

Bij het testen van verschillende elektroden met deze oplossingen bleken zij dezelfde E_h -waarden aan te geven. Werden zij echter in een goed gegroeide bacteriecultuur (E. coli) gebracht, waarvan de

potentiaal tamelijk laag was, dan lagen de waarden die de elektroden aangaven soms zeer ver uiteen (meer dan 100 mV). Voor het meten van lage redoxpotentialen moet men dus calibreren in een standaardoplossing met een lage potentiaal. Jacob (1970, 1971), een van de weinige auteurs die dit probleem signaleert, gebruikt als "standaardoplossing" een juist volgroeide cultuur van Proteus vulgaris SG2; de E_{cal} hiervan is - 590 mV. Deze methode vonden wij echter nogal moeilijk te verwezenlijken daar men wisselende potentialen vindt wanneer de proefomstandigheden ook maar de geringste afwijkingen vertonen. Een ander nadeel is dat deze methode vergelijkend is; men werkt niet met absolute waarden. Kordatsky (1953) stelde voor om voor 50% gereduceerde kleurstoffen te gebruiken. Hiermee krijgt men weliswaar absolute waarden, maar het is buitengewoon moeilijk een oplossing in een bepaalde gereduceerde toestand te houden.

Toch hebben wij onze elektroden gecalibreerd met redoxindicatoren, maar hebben een eenvoudiger methode toegepast. De elektroden werden getest met redoxkleurstoffen die voor 95 - 100% gereduceerd waren, dus bij het kleuromslagpunt. De te testen elektroden werden in een vaatje gezet (zoals in paragraaf F beschreven is). In het vaatje werd 300 ml van medium I gebracht; de pH werd op 7 gesteld. Aan het medium werd een redoxindicator toegevoegd. Het vaatje met inhoud werd in gereduceerde toestand gebracht door verwarming in een pressure cooker tot de kleur was verdwenen. Langzaam werd lucht door het medium geleid. Bij het kleuromslagpunt (95 - 100% reductie) werden de waarden die de elektroden aangaven afgelezen. Het kleuromslagpunt is tot op ± 5 mV nauwkeurig af te lezen. Daarna werd ter controle de luchttoevoer afgesloten en de zuurstof uit het medium verdreven door N_2/CO_2 gas door te leiden; opnieuw werd het kleuromslagpunt (nu van gekleurd naar kleurloos) vastgesteld. Ook de pH werd gemeten, daar deze onder invloed van kooldioxyde uit het gasmengsel iets daalt.

De volgende redoxindicatoren werden gebruikt:

- methyleenblauw (Kuhlman, Paris) in een concentratie van 0,001%;
 $E'_O = + 11$ mV; de oplossing is kleurloos bij $E'_h = - 49$ mV
- resazurine (British Drug Houses) d.w.z. de gereduceerde vorm, resofurine, in een concentratie van 0,0002%; $E'_O = - 50$ mV; de oplossing is kleurloos bij $E'_h = - 110$ mV.

- nijlblauw (B.D.H.) in een concentratie van 0,001%; $E'_O = -142$ mV; de oplossing is kleurloos bij $E'_h = -202$ mV. Deze lage waarde is nog juist te bereiken in het vaatje met medium I.

Alleen de elektroden die bij deze lage E'_h waarden op 10 mV nauwkeurig aangaven werden bij de experimenten gebruikt. Tussen de experimenten door werden ze steeds opnieuw gecalibreerd.

H. Behandeling van de elektroden

De platina-elektroden werden 's-nachts in geconcentreerd salpeterzuur weggezet of gedurende 5 minuten in warm salpeterzuur gehouden. Daarna werden zij grondig gespoeld met kraanwater en aqua dest. (Kordatsky, 1953). De elektroden werden niet gepolijst zoals Jacob (1971) aanraadt, daar de meeste elektroden die wij gebruikten zo teer waren dat er bij een dergelijke behandeling gemakkelijk breuken konden optreden. Ter voorkoming van fouten in de metingen werd tussen de experimenten telkens gecalibreerd.

HOOFDSTUK IV

REDOXPOTENTIALAAL IN HET DARMKANAAL VAN KIEMVRIJE EN CONVENTIONELE MUIZEN REDOXPOTENTIALAAL EN KOLONISATIE VAN HET COECUM DOOR STRIKT ANAEROBEN

In dit hoofdstuk worden allereerst proeven beschreven die betrekking hebben op de redoxpotentialaal in verschillende delen van het darmkanaal van kiemvrije en conventionele muizen. Daarna worden de kolonisatie van het kiemvrije muizecoecum door strikt anaerobe bacteriën en de veranderingen in redoxpotentialaal die daardoor ontstaan nagegaan.

A. De redoxpotentialaal in het darmkanaal van kiemvrije en conventionele muizen

Om een indruk te krijgen in hoeverre micro-organismen de redoxpotentialaal in de verschillende delen van het darmkanaal beïnvloeden hebben wij de potentialaal gemeten in conventionele en kiemvrije muizen. Voor de toegepaste methodiek wordt verwezen naar hoofdstuk III.

Resultaten

Conventionele muizen

Uit tabel III blijkt dat de redoxpotentialaal, die in de maag hoog is ($+ 27 \pm 25,5$ mV), steeds lager wordt naarmate we het darmkanaal in de richting van het coecum vervolgen; hier bereikt hij zijn laagste waarde ($- 200 \pm 8,1$ mV) om in het rectum weer op te lopen ($- 77 \pm 11$ mV). De pH is laag in de maag, doch in het overige deel van het darmkanaal ongeveer gelijk.

Kiemvrije muizen

Uit tabel IV blijkt dat de redoxpotentiaal in verschillende gedeelten van het darmkanaal van kiemvrije muizen vrijwel gelijk is.

Bespreking van de resultaten

In de maag van conventionele en kiemvrije muizen is de redoxpotentiaal ongeveer gelijk. Klaarblijkelijk heeft de flora van de maag van conventionele dieren, die uit 10^9 lactobacillen en streptokokken per gram bestaat (Schaedler e.a., 1965a), geen invloed op de aanwezige zuurstof. De zuurstof, die de maag samen met het voedsel binnenkomt, vormt snel een evenwichtstoestand met de zuurstof uit het omringende capillaire bloed (Davenport, 1961). Deze toestand handhaaft zich in de rest van het darmkanaal van kiemvrije muizen, zodat de redoxpotentiaal overal ongeveer dezelfde waarden heeft. Bij conventionele dieren daarentegen begint de potentiaal in het ileum te dalen, waarschijnlijk als gevolg van hogere aantallen van bacteriën die zuurstof verbruiken. In het coecum, colon en rectum bevinden zich de meeste micro-organismen, 10^{10} - 10^{11} per gram en wel voornamelijk anaeroben. In het coecum vindt echter de grootste stofwisselingsactiviteit plaats, zodat begrijpelijk is dat daar de redoxpotentiaal lager is dan in het rectum. Er is mij geen literatuur bekend over een soortgelijk onderzoek bij muizen. Bergheim e.a. (1945), die de invloed van het diëet op de redoxpotentiaal bestudeerden, maten de redoxpotentiaal in de verschillende gedeelten van het darmkanaal bij ratten. Hun resultaten stemmen in grote lijnen overeen met die van onze experimenten met conventionele muizen. De redoxpotentiaal die wij vonden in het coecum van conventionele muizen (-200 ± 8 mV) is gelijk aan de waarde die Meynell (1963) vond in het coecum van eveneens conventionele muizen (ca. -200 mV).

B. Redoxpotentiaal en kolonisatie van het coecum van kiemvrije muizen door strikt anaeroben

In deze paragraaf worden experimenten besproken die tot doel hebben na te gaan of strikt anaeroben zich kunnen vestigen in het darmkanaal van kiemvrije muizen. Daarbij wordt tevens nagegaan hoe de redoxpotentiaal in het coecum verandert onder invloed van de nesteling van verschillende micro-organismen.

Groepen van minimaal 10 kiemvrije muizen werden besmet met respectievelijk Clostridium innocuum, Clostridium ramosum, Bacteroides fragilis, Propionibacterium acnes, soort D en soort E, alle geïsoleerd uit CRF-muizen, en E. coli. Na drie weken werden de monogecontamineerde muizen gedood en werden redoxpotentiaal en pH in het coecum gemeten; van de coecuminhoud werden standaardpreparaten gemaakt en werd kwalitatief gekweekt op anaerobe flessen door een druppel coecuminhoud en een stukje van de coecumwand op de voedingsbodem uit te strijken. Op deze manier werd bepaald of de bacteriën die in de preparaten werden waargenomen levensvatbaar waren en in reincultuur in het coecum voorkwamen. E. coli werd kwantitatief gekweekt op bouillonagarplaten. Voor verdere informatie over de gebruikte methoden zie men hoofdstuk III.

Resultaten

Nesteling van micro-organismen en redoxpotentiaal

C. innocuum, C. ramosum, B. fragilis, P. acnes en E. coli vestigden zich zeer gemakkelijk in kiemvrije muizen. Reeds 2 tot 3 dagen na besmetting waren in faecespreparaten veel bacteriën waar te nemen. Uit tellingen in standaardpreparaten bleek dat deze soorten na 21 dagen in aantallen variërend van 10^9 tot 10^{10} per gram coecuminhoud voorkwamen. Uit tabel V blijkt dat de redoxpotentiaal in het coecum van monognotobionten van C. innocuum, B. fragilis, C. ramosum en E. coli sterk was verlaagd ten opzichte van de potentiaal in het coecum van kiemvrije muizen. De redoxpotentiaal in het coecum van kiemvrije muizen die besmet waren met C. innocuum (-242 ± 10 mV) bleek zelfs lager te zijn dan die in het coecum van CRF-muizen (-173 ± 7 mV). De kolonisatie van P. acnes bleek echter nauwelijks effect te hebben op de redoxpotentiaal van het coecum. Soort D en soort E vestigen zich veel moeilijker. Uit tabel VI blijkt dat soort D in het geheel niet koloniseerde in kiemvrije muizen. Werd echter de redoxpotentiaal in het coecum verlaagd door de muizen één week van tevoren te besmetten met B. fragilis, dan vestigde zich soort D zeer gemakkelijk. De redoxpotentiaal bleek tot zeer lage waarden ($-286 \pm 10,2$ mV) te zijn gedaald. In muizen die tevoren waren besmet met P. acnes, die zoals wij gezien hebben de potentiaal maar zeer weinig verlaagde, vestigde soort D zich in 2/3 van de muizen.

Ook hier bereikte de potentiaal, indien soort D koloniseerde, zeer lage waarden. Zoals in tabel VII te zien is werd een dergelijk experiment uitgevoerd met soort E. Deze vestigde zich slechts in 1/3 van het aantal muizen. De bacteriën waren echter in de coecuminhoud nauwelijks aanwezig, maar kwamen voor in de mucosa, zij het in kleine aantallen. De redoxpotentiaal in het coecum van deze muizen was slechts weinig gedaald (tot -8 ± 13 mV). Ook soort E bleek zich gemakkelijk te vestigen als de muizen tevoren waren besmet met een van de gemakkelijk groeiende anaeroben (C. innocuum) of E. coli. Niet alleen in de mucosa maar ook in de coecuminhoud werden grote aantallen van soort E gevonden. De redoxpotentiaal in de coeca van deze muizen stemde overeen met de waarde die gevonden werd in monognotobionten van C. innocuum of E. coli. Werden muizen tevoren besmet met P. acnes dan bleek soort E ongeveer in minder dan de helft van de muizen te koloniseren en vrijwel alleen in de mucosa voor te komen. Ook de redoxpotentiaal bleek slechts weinig te zijn gedaald.

Coecumgrootte

Zo op het oog geschat was in geen van de monognotobionten het coecum verkleind, maar van de 15 muizen, waarin zich C. innocuum en soort E bevonden, hadden er 5 een verkleind coecum. Ook in muizen met P. acnes en soort E hadden 3 van de 11 een iets verkleind coecum. De muizen echter die gekoloniseerd waren met E. coli en soort E hadden alle een coecum dat tot de helft van de grootte van een kiemvrij coecum was gereduceerd.

Aantallen bacteriën in de gnotobionten

Uit tabel VIII blijkt dat de verschillende CRF stammen waarmee kiemvrije muizen werden gecontamineerd zich meestal niet in dezelfde aantallen vestigden als die waarin zij in een CRF-muis voorkomen. C. ramosum, C. innocuum, P. acnes en B. fragilis konden zich op een hoger niveau handhaven. Soort E vestigde zich, samen met E. coli of C. innocuum, in ongeveer dezelfde aantallen als hij voorkomt in CRF-muizen. Het is niet mogelijk om de aantallen van soort D in gnotobionten te vergelijken met die in CRF-muizen, daar soort D morfologisch niet of nauwelijks is te onderscheiden van andere vertegenwoordigers van de groep micro-organismen die bekendstaat onder de naam

"tapered rods" of "tapered anaerobes" (Savage e.a., 1968). Deze tapered rods vormen de dominante groep van de CRF flora, ongeveer $2,5 \cdot 10^{10}$ per gram coecuminhoud. Worden CRF-muizen besmet met E. coli dan blijkt deze soort zich slechts te kunnen handhaven op een niveau van $10^3 - 10^5$ per gram. In kiemvrije muizen bereikt hij echter snel een hoge waarde, $10^9 - 3 \cdot 10^{10}$.

Bespreking van de resultaten

Nesteling van de micro-organismen en redoxpotentiaal

We hebben gezien dat C. innocuum, C. ramosum en B. fragilis de redoxpotentiaal in het coecum van een kiemvrije muis verlagen tot ongeveer het niveau van conventionele en CRF-muizen. Er is nog weinig bekend over de mechanismen die ten grondslag liggen aan het vermogen van bepaalde anaeroben hun omgeving te reduceren. Ook E. coli, de enige niet-anaerobe soort, verlaagt de redoxpotentiaal, hoewel minder sterk dan bovengenoemde CRF stammen; deze verlaging wordt toegeschreven aan zuurstofconsumptie. P. acnes daarentegen blijkt de potentiaal slechts zeer weinig te doen dalen. Het is mogelijk dat P. acnes niet het vermogen bezit zijn milieu te reduceren; daarentegen kan het ook zijn dat de relatief hoge redoxpotentiaal in het kiemvrije muizecoecum een gunstige voorwaarde is voor een goede groei, daar P. acnes immers een micro-aerofiel micro-organisme is dat een vrij hoge zuurstofspanning (doch niet die van lucht) tolereert. Soort D en soort E vestigen zich niet of zelden in het coecum van kiemvrije muizen. Het milieu in het kiemvrije muizecoecum is duidelijk ongeschikt voor het zich handhaven van deze soorten waarschijnlijk omdat de redoxpotentiaal te hoog is. Het bleek inderdaad dat zij zich goed konden vestigen wanneer de potentiaal tevoren was verlaagd door een van de gemakkelijk groeiende anaeroben. In monognotobionten van P. acnes, waarin de potentiaal slechts weinig verlaagd is, koloniseerden soort D en soort E zich slechts in respectievelijk 1/2 en 2/3 van de muizen. Kennelijk is de potentiaal niet genoeg verlaagd voor een gemakkelijk aanslaan. In muizen gekoloniseerd door soort D en B. fragilis of soort D en P. acnes was de eindpotentiaal veel lager dan in monognotobionten van B. fragilis of P. acnes, hetgeen betekent dat deze lage potentialen door soort D veroorzaakt worden. Daarentegen was de eindpotentiaal in muizen gekoloniseerd met soort E en C. innocuum of soort E en

E. coli gelijk aan de potentiaal in monognotobionten van C. innocuum en E. coli; het reducerende vermogen van soort E is kennelijk minder of even sterk als van E. coli.

Soort D en soort E blijken zich in tegenstelling tot vele andere strikt anaerobe soorten moeilijk in het coecum van een kiemvrije muis te vestigen. De meeste strikt anaeroben koloniseren kiemvrije muizen gemakkelijk, zoals Bacteroides (Schaedler e.a., 1965b), Clostridium (Skelly, 1962), Bifidobacterium, Catenabacterium, Veillonella (Raibaud e.a., 1966), Clostridium perfringens (Raibaud e.a., 1972), Fusobacterium fusiforme en een bacteroidesstam (Gibbons e.a., 1964). Ook door anderen is gevonden dat er bacteriën zijn die niet in staat zijn zich te vestigen in kiemvrije muizen, echter wel in muizen die reeds een flora hebben: Treponema microdentium (Gibbons e.a., 1964), Fusobacterium nucleatum (Loesche, 1969), enkele ongeïdentificeerde staafjes (waarschijnlijk tapered rods) uit het muizecoecum (Syed e.a., 1970). Er wordt gesuggereerd dat dit kan samenhangen met een tamelijk beperkt gebied van de redoxpotentiaal waarbinnen deze stammen kunnen gaan groeien (Socransky e.a., 1964; Syed e.a., 1970). Opvallend was dat soort E zich onder ongunstige omstandigheden (hoge redoxpotentiaal) vrijwel alleen in de mucosa bevond. De mucosa vormt een typische niche voor bepaalde darmbacteriën. In de mucosa van het coecum en colon komt een dikke laag tapered anaerobes voor (Savage e.a., 1968). Het is mogelijk dat de tapered anaerobes en dus ook soort E mucine als energiebron gebruiken; een conventionele flora is in staat om hexosaminen uit mucine af te breken (Lindstedt, 1965). Ook glycoproteïnen worden door darmbacteriën afgebroken (Hoskins & Zamcheck, 1968).

Coecumgrootte

Alleen de muizen waarin naast C. innocuum of E. coli ook soort E gevestigd was, toonden een gedeeltelijke verkleining van het coecum. Misschien is soort E daarvoor alleen verantwoordelijk, maar evengoed is mogelijk dat soort E in combinatie met een andere bacteriestam het coecum verkleint. Misschien zijn ook andere dan de door ons gebruikte combinaties van CRF stammen hiertoe in staat. Uit de literatuur zijn verschillende voorbeelden bekend van gedeeltelijke coecum-

verkleining door de kiemvrije dieren te besmetten met micro-organismen (Freter & Abrams, 1972; Hudson & Lucky, 1964; Schaedler e.a., 1965b; Skelly e.a., 1962).

Aantallen bacteriën in gnotobionten

Het is een bekend verschijnsel dat een bacteriestam in monognotobionten in grotere aantallen voorkomt dan wanneer hij deel uitmaakt van de residente flora in conventionele dieren (Ducluzeau & Raibaud, 1968; Raibaud e.a., 1966). In monognotobionten vindt competitie om substraten niet plaats; ook bacteriële interacties die remmend zouden kunnen werken komen niet voor. De meeste CRF micro-organismen blijken in grotere aantallen voor te komen in monognotobionten dan in een CRF-muis. E. coli die zich in een CRF-muis slechts in geringe aantallen kan handhaven bereikt een hoge waarde in kiemvrije muizen. Dit verschijnsel wordt ook beschreven door Schaedler e.a. (1965b) en Ducluzeau e.a. (1968).

H O O F D S T U K V

REDOXPOTENTIALAAL EN KOLONISATIE DOOR STRIKT ANAEROBEN VAN HET DARMKANAAL VAN CONVENTIONELE MUIZEN VAN 4 - 20 DAGEN

De residente flora van het darmkanaal van muizen bestaat vnl. uit enterokokken, lactobacillen, coliformen, bacteroides-soorten en gram-negatieve en gram-positieve fusiforme staafjes, meestal aangeduid als "tapered anaerobes" of "tapered rods". Deze laatste groep is numeriek het belangrijkste; de tapered rods zijn strikt anaeroob en slechts enkele vertegenwoordigers van deze groep zijn in reincultuur gebracht. Onder normale omstandigheden ziet men dat er na de geboorte een bepaalde volgorde in kolonisatie door de verschillende soorten bestaat. De enterokokken en lactobacillen verschijnen reeds in de eerste 2 dagen en de coliformen volgen snel. Bacteroides-soorten en de tapered anaerobes worden, tegelijkertijd, na 12 dagen voor het eerst waargenomen (Lee e.a., 1971; Lee & Gemmell, 1971; Savage e.a., 1968). Zij nemen zeer snel in aantal toe en zijn reeds enkele dagen na hun verschijnen numeriek in de meerderheid.

Lee en Gemmell (1971) wezen erop dat de tapered anaerobes verschijnen kort nadat de muizen voor het eerst, naast moedermelk, vast voedsel nuttigen. Het milieu zou door de opname van vast voedsel geschikt worden gemaakt voor de vestiging van de strikt anaeroben in grote aantallen. Lee e.a. (1971) suggereerden dat naast een behoefte aan bepaalde voedingsstoffen een verlaging van de redoxpotentialaal in het darmkanaal door andere bacteriën van essentieel belang voor de vestiging van

tapered rods zou zijn. Uit een voorgaand experiment (hoofdstuk IV B) is gebleken dat twee vertegenwoordigers van de tapered rods, soort D en soort E, die behoren tot de residente flora van conventionele muizen, zich nauwelijks of niet konden vestigen in het darmkanaal van muizen waarvan de redoxpotentiaal niet eerst was verlaagd door andere soorten. In dit kader is het van belang te weten hoe de redoxpotentiaal na de geboorte verandert bij conventionele muizen en bij welke potentiaal tapered anaerobes zich gaan vestigen.

Methode

Voor dit experiment werden C57 Bl./A muizen gebruikt. Zwangere vrouwtjes werden in afzonderlijke kooien gehuisvest. In het coecum van muizen van 4 tot en met 20 dagen oud werd de redoxpotentiaal gemeten. Voor de leeftijdsgroep van 4 tot en met 12 dagen werden telkens 8 muizen gebruikt, voor die van 13 tot en met 20 dagen steeds 4. De muizen die per leeftijdsgroep werden gebruikt waren afkomstig uit verschillende nesten. Na de meting werd het coecum gehomogeniseerd en werden verdunningen op bouillonagarplaten uitgestreken om het totale aantal aeroben te tellen. Daarnaast werd een standaardpreparaat gemaakt om het totale aantal aeroben + anaeroben te kunnen tellen. Met deze techniek kan men aantallen van 10^6 per gram coecum nog juist aantonen.

Resultaten

De resultaten van deze experimenten zijn weergegeven in de tabellen IX en X. Uit tabel IX blijkt dat de redoxpotentiaal in het coecum van muizen tot een leeftijd van 14 dagen geleidelijk zakt om daarna weer iets op te lopen. Terwijl de redoxpotentiaal in waarde daalt beginnen de tapered anaerobes en de bacteroides-soorten in aantal toe te nemen. Op grond van het microscopisch beeld kan men 4 groepen onderscheiden, nl. groep I waarin anaerobe micro-organismen niet worden waargenomen, groep II waarin alleen kleine en middelgrote tapered rods en soort E, groep III waarin daarnaast ook bacteroides-soorten voorkomen en groep IV waarbij in alle muizen alle soorten aanwezig zijn. In tabel X zijn de gegevens van tabel IX opnieuw weergegeven, waarbij de gemiddelde waarden van de genoemde 4 groepen zijn vermeld. Daar de pH niet kon worden gemeten is de redoxpotentiaal aangegeven met E_h .

Groep I

De gemiddelde redoxpotentiaal in het coecum van muizen van groep I was $+ 27 \pm 4,6$ mV en tapered rods werden nooit waargenomen. Het totale aantal bacteriën in het coecum was $5 \cdot 10^7$ per gram en bestond voornamelijk uit enterokokken en lactobacillen, daarnaast waren ook coliformen aanwezig (10^5 per gram).

Groep II

De gemiddelde redoxpotentiaal van groep II was $- 58 \pm 12,4$ mV en in een derde van het aantal muizen werden kleine en middelgrote tapered rods gevonden in aantallen variërend van $5 \cdot 10^6$ tot 10^8 per gram coecum. In 2 van de 24 muizen werd soort E gevonden. Het totale aantal bacteriën in het coecum was gestegen tot 10^8 per gram.

Groep III

In deze groep was de redoxpotentiaal gezakt tot $- 163 \pm 10$ mV en alle muizen bevatten kleine en middelgrote tapered anaerobes. Hun aantal varieerde van 10^7 tot 10^{10} per gram coecum. Ook soort E had zich nu in de helft van alle muizen gevestigd (10^7 per gram coecum). Bacteroides-soorten verschenen voor het eerst in deze groep in een derde van alle muizen. Het totale aantal bacteriën in het coecum varieerde van $5 \cdot 10^8$ tot 10^{10} per gram.

Groep IV

De redoxpotentiaal in het coecum van muizen behorende tot groep IV was $- 183 \pm 5,3$ mV; dit is niet verschillend van de potentiaal in groep III. In alle muizen uit deze groep hadden zich nu tapered rods en bacteroides-soorten gevestigd. Het aantal kleine en middelgrote tapered rods liep op tot 10^{10} per gram, hetzelfde gold voor bacteroides-soorten (10^{10} per gram); soort E kwam voor in aantallen van $5 \cdot 10^7 - 10^8$ en het totale aantal bacteriën bedroeg $1 - 5 \cdot 10^{10}$ per gram. Uit het bovenstaande blijkt dat de tapered anaerobes zich pas gaan vestigen wanneer de redoxpotentiaal tot ongeveer 75 mV beneden de beginwaarde is gedaald; bij individuele muizen was de hoogste redoxpotentiaal waarbij tapered anaerobes werden waargenomen $- 30$ mV.

Een controle-experiment werd uitgevoerd met jonge kiemvrije muizen van 4 tot en met 20 dagen oud. Van elke leeftijdsgroep werden 3 muizen gebruikt waarin de redoxpotentiaal van het coecum werd bepaald. Uit tabel XI blijkt dat de gemiddelde redoxpotentiaal van groep I, muizen van 4,

H O O F D S T U K VI

VOLGORDE VAN KOLONISATIE VAN KIEMVRIJE MUIZEN DOOR ANAEROBEN NA CONTACT MET EEN CRF-MUIS

Uit het vorige hoofdstuk is gebleken dat de tapered anaerobes het coecum van jonge conventionele muizen pas koloniseren nadat de redoxpotentiaal door andere bacteriën is verlaagd. In dit verband is het interessant te bepalen op welk tijdstip tapered anaerobes zich vestigen in volwassen kiemvrije muizen wanneer de mogelijkheid tot aerogene besmetting met een muizeflora wordt geschapen. Als besmettingsbron werd een CRF-muis gebruikt. De CRF flora biedt het voordeel dat redelijk goed bekend is uit welke soorten zij bestaat; in microscopische preparaten zijn zij gemakkelijk te herkennen. Een ander voordeel is dat deze flora anaeroob is; wij kunnen in dit experiment bepalen welke van deze anaerobe soorten in staat zijn zich als eerste ("minst anaerobe") in een kiemvrije muis, met een relatief hoge redoxpotentiaal in het gehele darmkanaal, te vestigen.

Proefopstelling

In een steriele metalen kooi, voorzien van glazen zijanten, werden 25 kiemvrije muizen gehuisvest. De muizen werden verdeeld over 5 plastic kooien waarvan de bodem met zaagsel was bedekt. De dicht bij elkaar staande kooien waren afgedekt met een open metalen ruif waarin zich het voer bevond en waarop een waterflesje stond. De muizen werden gemerkt door op verschillende plaatsen een stukje van de vacht te knippen. Om

de kolonisatie door de CRF flora in deze afgesloten ruimte via de lucht te laten verlopen, werd een CRF-muis in een aparte kooi tussen de kiemvrije dieren geplaatst. De kooien met de kiemvrije muizen werden iedere twee dagen verschoond, de kooi met de CRF-muis eenmaal per week; hierbij werd er zorgvuldig op gelet dat niet met zaagsel werd gemorst. Iedere dag werd faeces verzameld. Telkens werd één muis in een lege schone kooi waarvan de bodem met filtreerpapier was bedekt, geplaatst met behulp van een steriele pincet, ter voorkoming van contactbesmetting; de faeces werd in een flesje gebracht. Voor de volgende muis werd weer schoon filtreerpapier in de kooi gelegd. De 25 flesjes met faeces werden tegelijk uit de isolator gevoerd. Een gedeelte van de faeces werd geënt in buizen met BHI (Difco) + 5% verse rundergal en in buizen met medium I, beide met 0,3% agar. De culturen werden ingezet om, voordat bacteriën in standaardpreparaten waren te zien, reeds kolonisatie te kunnen vaststellen. Het BHI medium met gal diende om Bacteroides te kweken; medium I voor Clostridium ramosum en de tapered anaerobes. De buizen werden na 1, 2, 3 en 7 dagen bekeken. Elke dag werd één muis opgeofferd om redoxpotentiaal en pH in het coecum te bepalen. Het experiment werd herhaald met enkele kleine wijzigingen. Het aantal muizen dat in de tweede proef werd gebruikt was 20. De kooi van de CRF-muis werd iedere twee dagen verschoond zonder bijzondere voorzorgen, zodat af en toe met zaagsel werd gemorst. Pas nadat standaardpreparaten waren bekeken, werd besloten in welke muizen redoxpotentiaal en pH van het coecum zou worden gemeten.

Resultaten

Volgorde van kolonisatie

In de eerste proef werden na 11 dagen voor het eerst bacteriën in de faeces waargenomen, in de tweede na 6 dagen. Bij de hierna te vermelden gegevens zijn die van de eerste en de tweede proef gecombineerd, met dien verstande dat met de eerste dag de elfde dag van de eerste proef en de zesde dag van de tweede proef wordt bedoeld. In fig. 4 is de volgorde van kolonisatie aangegeven. Zoals uit deze figuur blijkt vestigt Bacteroides zich het gemakkelijkst, dan volgt Clostridium ramosum; van de tapered anaerobes vestigen de kleine en middelgrote zich gemakkelijker dan soort E. Na 9 dagen hebben de 4 belangrijkste vertegenwoordigers van de CRF flora zich in alle muizen genesteld.

Aantallen tijdens de kolonisatie

Uit fig. 5, waarin de aantallen (berekend als gemiddelde waarden voor de muizen waarin bacteriën werden waargenomen) zijn uitgezet tegen de expositietijd (gerekend vanaf het tijdstip dat bacteriën voor het eerst werden waargenomen), blijkt allereerst dat Bacteroides snel het maximum bereikt. Clostridium ramosum doet dit bijna even snel doch de tapered rods en soort E vermenigvuldigden zich duidelijk langzamer. Opvallend is dat zowel Bacteroides als Clostridium ramosum door de tapered rods en soort E worden verdrongen; ongeveer 14 dagen nadat deze verdringing is begonnen is een evenwichtstoestand ontstaan die kenmerkend is voor de CRF flora.

Redoxpotentiaal en kolonisatie

De redoxpotentialen, die werden gemeten in coeca van muizen op verschillende dagen na kolonisatie door de eerste bacteriën, staan vermeld in tabel XII. Uit deze tabel blijkt dat in muis a, waar Bacteroides die dag voor het eerst werd waargenomen (in aantallen van 10^9 per gram) de redoxpotentiaal (E'_h) in het coecum (+ 30 mV) nog gelijk was aan die van de kiemvrije muizen. Muis c en d die na 2 dagen beide Bacteroides bevatten ($4 \cdot 10^9$ en $9 \cdot 10^9$ per gram) hadden reeds een sterk verlaagde redoxpotentiaal (- 57 en - 73 mV). In muis h en k hadden zich na 3 dagen respectievelijk $6 \cdot 10^9$ en $2 \cdot 10^{10}$ Bacteroides en respectievelijk $6 \cdot 10^8$ en $7 \cdot 10^9$ C. ramosum gevestigd. Een combinatie van grote aantallen Bacteroides en C. ramosum ging vrijwel altijd de vestiging van de tapered anaerobes vooraf. De redoxpotentiaal van het coecum van deze muizen was - 100 mV en - 186 mV. Uit het bovenstaande blijkt dat Bacteroides en Bacteroides plus C. ramosum uitstekend in staat zijn de redoxpotentiaal in het coecum te verlagen; dit was te verwachten gezien de resultaten van de experimenten uit hoofdstuk IV. De redoxpotentiaal werd in coeca van 15 muizen gemeten, tijdens een periode van 1 t/m 5 dagen na kolonisatie door de eerste bacteriën. In 7 van deze muizen was het coecum iets verkleind t.o.v. kiemvrije muizen. In 2 muizen (b en l) hadden zich naast Bacteroides en C. ramosum alleen kleine en middelgrote tapered rods gevestigd in betrekkelijk geringe aantallen (10^7 en 10^6 per gram faeces). In de andere 5 muizen (f, g, i, m en n) bevond zich ook soort E.

Bespreking van de resultaten

Werkwijze

Wat reeds aan het begin van dit experiment opviel was dat hoe "schoner" wij werkten, hoe langer het duurde voor zich in de kiemvrije muizen een flora vestigde. Het "via de lucht besmetten" houdt waarschijnlijk in dat bacteriën zich, gehecht aan kleine stof- en zaagseldeeltes die opstuiven in de kooien, verplaatsen.

Kolonisatie en redoxpotentiaal

Bacteroides blijkt zich als eerste in kiemvrije muizen te vestigen; direct daarop volgt C. ramosum. Zij verlagen de redoxpotentiaal waardoor het milieu geschikt wordt gemaakt voor de kolonisatie van de tapered rods. Zoals, gezien de resultaten van hoofdstuk IV en V, te verwachten was, vestigden de tapered anaerobes zich nooit als eerste. Zodra de kleine en middelgrote tapered anaerobes zich explosief gaan vermeerderen, gaat er zich een evenwicht tussen de verschillende floracomponenten instellen. Terwijl het aantal kleine en middelgrote tapered anaerobes nog langzaam toeneemt, vermindert het aantal Bacteroides en C. ramosum.

Coecumverkleining

Opvallend is dat het coecum kleiner wordt zodra tapered anaerobes verschijnen. Ook in hoofdstuk IV B vonden we dat combinaties van verschillende bacteriën (E. coli en C. innocuum met soort E) de coecumgrootte reduceerde. Savage (1970) en Lee e.a. (1971) namen ook waar dat de tapered anaerobes, die in zulk een nauw contact staan met de mucosa, van belang zijn bij de reductie van het coecum in conventionele muizen.

H O O F D S T U K V I I

DE BEPERKENDE POTENTIAAL VAN ENKELE STRIKT ANAEROBEN VERANDERINGEN VAN DE REDOXPOTENTIAAL IN GROEIENDE BACTERIECULTUREN

In voorgaande experimenten (zie hoofdstuk IV) werd waargenomen dat soort D en soort E zelden of nooit in staat waren zich in kiemvrije muizen te vestigen. Hierbij gingen wij ervan uit dat de redoxpotentiaal in het coecum van kiemvrije muizen ($+ 42 \pm 6,5$ mV) te hoog was voor kolonisatie door deze anaeroben. De potentiaal waarbij deze stammen zich wel zouden kunnen vestigen, zou dus in ieder geval lager moeten zijn dan ongeveer $+ 40$ mV.

In dit hoofdstuk worden experimenten in vitro beschreven waarin de beperkende potentiaal van soort D en E wordt bepaald. Met de beperkende potentiaal ("limiting potential") wordt de hoogste potentiaal (E'_h) bedoeld waarbij een bacteriestam zich nog juist kan vermeerderen. Men zou kunnen verwachten dat de beperkende potentiaal van soort D en E lager ligt dan ongeveer $+ 40$ mV, aangenomen dat de proefopstelling in vitro te vergelijken is met de dierexperimenten.

Van C. innocuum en B. fragilis, die beide gemakkelijk kiemvrije muizen koloniseren, werd ook de beperkende potentiaal bepaald; hier kan men een potentiaal verwachten die hoger is dan ongeveer $+ 40$ mV. Soort E vestigt zich in combinatie met C. innocuum zeer gemakkelijk in het coecum van een kiemvrije muis. Hier bestaat de mogelijkheid dat naast het verlagen van de redoxpotentiaal ook de vorming van bepaalde stofwisselingsproducten door C. innocuum de kolonisatie van soort E bevordert.

Om de mogelijke invloed van deze laatstgenoemde factor op de beperkende

potentiaal van soort E na te gaan werd in een medium dat voor een deel bestond uit bacterievrije cultuurvloei-stof van een goed gegroeide cultuur van C. innocuum de beperkende potentiaal van soort E bepaald. Een-zelfde experiment werd uitgevoerd met soort D, gekweekt op medium waar-aan cultuurvloei-stof van B. fragilis was toegevoegd; soort D koloniseert zeer gemakkelijk een kiemvrije muis in combinatie met B. fragilis. De uitvoering en de resultaten van deze experimenten worden onder A besproken. Tevens werden experimenten uitgevoerd om na te gaan of het al dan niet verlagen van de redoxpotentiaal, zoals dat zich voordoet in gnotobionten van CRF soorten, ook bij groei in vitro valt waar te nemen. Uit de proeven die in hoofdstuk IV werden beschreven is gebleken dat, met uitzondering van P. acnes, alle CRF soorten die zich konden vestigen in het coecum van kiemvrije muizen de redoxpotentiaal van de coecuminhoud sterk verlaagden. Soort D in combinatie met B. fragilis of, in een aantal gevallen, met P. acnes, deed de potentiaal het sterkst dalen (tot ongeveer - 300 mV); aangenomen werd dat deze verlaging veroorzaakt werd door soort D. C. innocuum verlaagde de potentiaal iets minder sterk (tot - 242 mV) en hierop volgden B. fragilis (tot - 175 mV) en C. ramosum (tot - 150 mV). In hoeverre soort E de potentiaal doet dalen is uit de voorgaande proeven niet af te leiden, waarschijnlijk niet lager dan - 79 mV; dit is de redoxpotentiaal van het coecum van muizen waarin soort E en E. coli zich hadden gevestigd; deze waarde is gelijk aan die in muizen met alleen E. coli. In hoeverre dit verschijnsel, het al dan niet verlagen van de redoxpotentiaal en de mate waarin, zich ook in vitro voordoet wordt onder B beschreven.

A. De beperkende potentiaal van enkele strikt anaeroben

In dit experiment werd de hoogste redoxpotentiaal waarbij de soorten D en E zich nog juist kunnen vermeerderen bepaald; beide soorten vestigen zich niet of nauwelijks in kiemvrije muizen. Tevens werd de beperkende potentiaal bepaald voor C. innocuum en B. fragilis, soorten die kiemvrije muizen snel en gemakkelijk koloniseren.

De stammen worden geënt in een vaatje waarin elektroden waren aangebracht om pH en redoxpotentiaal te meten. Door het medium werd een mengsel van perslucht en N_2/CO_2 geleid. Met behulp van een automatische titrator en een daarop aangesloten klep werd de persluchttoevoer zo geregeld dat zich een vrijwel constante redoxpotentiaal van een gewenste waarde in het medium kon handhaven; de potentiaal schom-

melde niet meer dan + of - 5 mV om de ingestelde waarde. De redoxpotential en de pH werden geregistreerd op een recorder. Voor nadere bijzonderheden over deze proefopstelling zie men hoofdstuk III F. De redoxpotential in de cultuurvloeistof werd voor ieder experiment op een andere waarde ingesteld; op deze wijze kon worden bepaald bij welke redoxpotential de stammen nog wel en niet meer groeiden.

Resultaten

De resultaten zijn weergegeven in tabel XIII. In deze tabel kan men onderstaande gegevens terugvinden.

Soort D

Bij een redoxpotential van 0 tot + 5 mV werd nog groei waargenomen, bij een potential van 0 tot + 16 mV echter niet meer. De beperkende potential van soort D ligt dus tussen + 5 en + 16 mV.

Soort E

Groei vond nog plaats bij een potential die lag tussen - 7 en + 1 mV, maar bij een redoxpotential tussen + 4 en + 13 mV niet meer. De beperkende potential van soort E ligt dus tussen + 1 en + 13 mV.

C. innocuum

Bij een redoxpotential die lag tussen + 190 en + 206 mV werd nog groei waargenomen, maar tussen + 205 en + 215 mV niet meer. De beperkende potential ligt dus tussen + 205 en + 215 mV.

B. fragilis

Tussen + 168 en + 178 mV vond nog groei plaats, bij een potential tussen + 177 en + 185 mV en hoger echter niet meer. De beperkende potential van B. fragilis ligt dus tussen + 178 en + 185 mV.

In de volgende proeven werd de beperkende potential bepaald van soort D echter met dit verschil dat cultuurvloeistof van een goed gegroeide cultuur van B. fragilis aan het medium werd toegevoegd. Hetzelfde werd gedaan voor soort E met cultuurvloeistof van C. innocuum. Het enige verschil met de proefopstelling uit het vorige experiment was, dat dubbel geconcentreerd medium met een gelijke hoeveelheid cultuurvloeistof van B. fragilis of C. innocuum werd verdund. Deze cultuurvloeistof werd verkregen door een goed gegroeide cultuur te centrifugeren en de bovenstaande vloeistof met behulp van een miliporefilter te steriliseren. De resultaten zijn weergegeven in tabel

XIV. Hieruit kan worden geconcludeerd dat de beperkende potentialen nu een waarde hebben die ongeveer 50 mV hoger ligt dan wanneer cultuurvloeistof niet was toegevoegd.

B. De verandering van de redoxpotentiaal in groeiende bacterieculturen

In groeiende culturen van C. innocuum, C. ramosum, P. acnes, B. fragilis, soort D en soort E werden redoxpotentiaal, pH en extinctie gemeten. De proefopstelling was ongeveer gelijk aan die van het vorige experiment met dit verschil dat perslucht niet werd doorgeleid maar alleen N_2CO_2 (continu); de beginpotentiaal stelde zich op een vrij laag niveau, tussen - 100 en - 140 mV in.

Resultaten

De resultaten van de proeven zijn weergegeven in de figuren 6 t/m 11. Uit deze figuren blijkt dat in alle culturen behalve in die van P. acnes ongeveer hetzelfde plaatsvindt: de redoxpotentiaal wordt tijdens de groei verlaagd en met het bereiken van de stationaire fase in het groeiproces hebben de redoxpotentiaal en de pH hun laagste waarde bereikt. P. acnes, de enige soort die de redoxpotentiaal in het muizecoecum vrijwel niet verlaagde, blijkt ook in de cultuur de potentiaal niet te doen dalen.

C. innocuum (fig. 6) blijkt van alle geteste stammen de grootste verandering in potentiaal teweeg te brengen; de potentiaal zakt van - 125 tot - 333 mV. Ook de andere stammen verlagen de redoxpotentiaal in meerdere of mindere mate (met tenminste 100 mV), behalve P. acnes (fig. 11) die de potentiaal tijdens zijn groei met enkele tientallen mV in geringe mate doet stijgen.

Soort E (fig. 8), B. fragilis (fig. 9) en C. ramosum (fig. 10) verlagen de redoxpotentiaal tijdens hun groei geleidelijk totdat deze, aan het einde van de logaritmische fase, zijn laagste waarde heeft bereikt. Daarentegen vertoont de redoxpotentiaal tijdens de groei van C. innocuum en soort D (fig. 7) de snelste daling van zijn traject in de eerste uren na beënten.

Bij de meeste stammen begint de potentiaal na het bereiken van de stationaire fase in het groeiproces weer wat op te lopen. Dit is zeer opvallend bij C. innocuum en C. ramosum.

Een verklaring voor dit verschijnsel zou kunnen zijn dat stofwisse-

lingsproducten met een reducerende werking (zoals waterstofgas) uit de cultuur worden verdreven (door het N_2/CO_2 gasmengsel dat continu over het medium wordt geleid), wanneer de aanmaak na het beëindigen van de groei stopt. In hoeverre de laagste potentiaal die door een bepaalde stam wordt bereikt afhankelijk is van de waarde van de beginpotentiaal valt niet uit deze proeven af te leiden.

Bespreking van de resultaten

Uit de onder A beschreven experimenten is gebleken dat de beperkende potentiaal van B. fragilis en C. innocuum hoog ligt en die van soort D en E laag. De beperkende potentiaal voor deze laatst genoemde soorten wordt wat hoger, indien cultuurvloeistof van een goed gegroeide cultuur van B. fragilis of C. innocuum aan het medium wordt toegevoegd. C. innocuum en B. fragilis hebben, als zij in vitro worden gekweekt, een beperkende potentiaal die zo hoog is (bij + 175 en + 200 mV) dat het geen verwondering wekt dat zij het coecum van kiemvrije muizen gemakkelijk koloniseren. De potentiaal waarbij soort D en E daarentegen nog net groeiden, rond + 15 mV, ligt beneden de redoxpotentiaal van het coecum van een kiemvrije muis en dit kan er de oorzaak van zijn dat deze soorten zich zelden of nooit in kiemvrije muizen vestigen.

Er is weinig bekend over de beperkende potentiaal van strikt anaerobe darmbacteriën. Smith en Hungate (1958) vonden dat voor het kweken van Methanobacterium ruminantium de redoxpotentiaal zo laag moest zijn dat de redoxindicator benzylviologeen ($E'_O = -359$ mV) ontkleurd was. Dit is een extreem lage potentiaal, ook als wij deze vergelijken met de beperkende potentiaal van soort D en E, die beide toch zeer zuurstofgevoelig zijn.

C. innocuum en B. fragilis hebben een hoge beperkende potentiaal. De beperkende potentiaal van C. innocuum, rond + 200 mV, is ook hoog als deze wordt vergeleken met die van andere clostridia zoals C. tetani met een beperkende potentiaal van rond + 100 mV (Knight & Fildes, 1930), C. histolyticum, beperkende potentiaal tussen + 60 en + 76 mV, C. perfringens, beperkende potentiaal van + 90 mV (Hanke & Bailey, 1945), C. saccharolyticum en C. sporogenes, beide een beperkende potentiaal van + 116 mV bij pH 6,8 (Aubel e.a., 1946). Ook de beperkende potentiaal van B. fragilis ligt zeer hoog, $E'_h = +177$ mV, het-

geen overeenkomt met de waarde die Vennesland en Hanke (1940) vonden voor B. vulgatus (de beperkende potentiaal was + 150 mV bij pH 6,6). Bij het kweken van soort D en E op een medium waaraan cultuurvloei-stof van respectievelijk B. fragilis en C. innocuum was toegevoegd bleek de beperkende potentiaal voor beide ongeveer 50 mV hoger te liggen. Kennelijk is iets aan het medium toegevoegd, afkomstig van B. fragilis en C. innocuum, dat de groei bij een hogere potentiaal mogelijk maakt. Als dit ook plaats zou vinden in kiemvrije muizen die besmet worden met B. fragilis of C. innocuum, zou dat kunnen betekenen dat niet alleen het verlagen van de redoxpotentiaal door deze stammen van belang is voor de vestiging van soort D en E maar ook de productie van een andere factor.

Uit de onder B beschreven experimenten is gebleken dat alle soorten, op P. acnes na, de redoxpotentiaal in cultuur verlagen. Dit verschijnsel vonden wij ook in eerder beschreven dierproeven: alle stammen, uitgezonderd P. acnes, verlaagden de redoxpotentiaal in het coecum van kiemvrije muizen. Het in vitro verlagen van de redoxpotentiaal door een groeiende cultuur is een normaal verschijnsel dat o.a. wordt beschreven voor Clostridium butyricum (Stolp, 1955), C. sporogenes (Rabotnova, 1963), C. paraputrificum, Proteus vulgaris (Jacob, 1970) en gisten (Leman, 1965). Ook aeroben verlagen de redoxpotentiaal, doch tot een minder laag niveau.

De mate waarin de stammen de redoxpotentiaal in vitro verlagen, komt overeen met de verlaging in de coeca van kiemvrije muizen, met één uitzondering: in het muizecoecum verlaagt soort D de redoxpotentiaal het sterkst, terwijl in cultuur C. innocuum de potentiaal het sterkst doet dalen.

Geconcludeerd mag worden dat ten aanzien van de redoxpotentiaal het gedrag van deze 6 soorten tijdens hun groei in cultuurvloei-stof, vrijwel hetzelfde is als in het coecum van muizen. De stammen die de redoxpotentiaal in muizecoeca verlagen, blijken dit ook te doen in cultuur; de enige stam die geen invloed had op de potentiaal in het coecum van een muis, blijkt ook de potentiaal in cultuur niet te veranderen. Tevens komt de mate waarin de potentiaal verlaagd wordt in grote lijnen overeen.

TABELLEN EN FIGUREN

Tabel I. Redoxpotentiaal in de coeca van conventionele en kiemvrije muizen, ratten en caviae

Diersoort	E'_h in mV		Auteur
	conventioneel	kiemvrij	
muis	ca. - 150	ca. + 200 ^x	Meynell, 1963
rat	- 275 ± 12	+ 46 ± 8	Eyssen e.a., 1972 Wostmann & Bruckner-Kardoss, 1966
	- 207 ± 36 ^{xx}	+ 90 ± 15 ^{xx}	
cavia	- 367	- 90	Phillips e.a., 1958

x muizen die na decontaminatie vrijwel hun gehele flora hadden verloren

xx deze waarden zijn in het desbetreffende artikel in E_h gegeven, maar hier omgerekend tot E'_h

Tabel II. Eigenschappen van 6 uit CRF-muizen geïsoleerde soorten

Soort	<u>Clostridium</u> <u>ramosum</u>	<u>Clostridium</u> <u>innocuum</u>	<u>Propionib.</u> <u>acnes</u>	Soort D	Soort E	<u>Bacteroides</u> <u>fragilis</u>
Gramkarakter	+	+	+	-	+	-
Beweeglijkheid	-	-	-	+	+	-
Zwermen	-	-	-	+	+	-
Kapsel	+	-	-	-	-	-
Sporen	+	+	-	+	+	-
Fermentaties ^x :						
pentosen	-	-	-	+	+	+
hexosen	+	+	+	+	+	+
disacchariden	+	+	+	+	+	+
trisacchariden	-	-	-	+	+	+
polysacchariden	-	-	-	-	-	+
glycosiden	+	+	-	+	+	+
alkoholen	-	+	+	-	+	-
Eindproducten:						
mierzuur	+	-	-	-	-	-
azijnzuur	+	+	+	+	+	+
propionzuur	-	-	+	-	+	+
boterzuur	-	+	-	+	+	-
iso-boterzuur	-	-	-	-	+	-
valeriaanzuur	-	-	-	-	-	-
iso-valeriaanzuur	-	-	-	-	+	-
melkzuur	-	+	+	-	-	-
barnsteenzuur	-	-	+	-	-	+
ethanol	+	-	-	-	-	-
gas	-	+	-	+	-	-
Eind pH	5,5	4,8	5,6	4,9	5,3	5,4
Catalase	-	-	+	-	-	-
Indol	-	-	+	+	-	-
Gelatinase	-	-	+	-	-	-
Nitraat reductie	-	-	-	-	-	-
Lipase	-	-	-	-	-	-
Lecithinase	-	-	-	-	-	-

x Hierbij betekent + dat minstens één en - dat geen van de diverse koolhydraten uit de verschillende groepen werden gefermenteerd

Tabel III. Redoxpotentialen in het darmkanaal van conventionele muizen

	E'_h ($\bar{x} \pm \text{s.e. in mV}$)	pH ($\bar{x} \pm \text{s.e.}$)	aantal muizen
maag	+ 27 $\pm$ 25,5	5,0 $\pm$ 0,17	16
duodenum	- 8 $\pm$ 12,5	6,4 $\pm$ 0,05	16
terminale ileum	- 57 $\pm$ 12,4	6,6 $\pm$ 0,08	16
coecum	- 200 $\pm$ 8,1	6,5 $\pm$ 0,07	32
rectum	- 77 $\pm$ 11,0	6,8 $\pm$ 0,08	16

Tabel IV. Redoxpotentialen in het darmkanaal van kiemvrije muizen

	E'_h ($\bar{x} \pm \text{s.e. in mV}$)	pH ($\bar{x} \pm \text{s.e.}$)	aantal muizen
maag	+ 68 $\pm$ 8,0	4,3 $\pm$ 0,03	5
duodenum	+ 37 $\pm$ 5,1	6,4 $\pm$ 0,09	5
terminale ileum	+ 31 $\pm$ 7,5	6,8 $\pm$ 0,03	5
coecum	+ 42 $\pm$ 6,5	6,8 $\pm$ 0,03	20
rectum	+ 60 $\pm$ 4,6	6,8 $\pm$ 0,04	5

Tabel V. Redoxpotentialen in het coecum van gnotobiotische, conventionele, kiemvrije en CRF-muizen

	E'_h ($\bar{x} \pm \text{s.e. in mV}$)	pH ($\bar{x} \pm \text{s.e.}$)	aantal muizen
kiemvrij + <u>C. ramosum</u>	- 150 $\pm$ 9,0	7,1 $\pm$ 0,06	15
kiemvrij + <u>C. innocuum</u>	- 242 $\pm$ 10,0	7,1 $\pm$ 0,05	15
kiemvrij + <u>P. acnes</u>	+ 18 $\pm$ 8,0	7,0 $\pm$ 0,03	15
kiemvrij + <u>B. fragilis</u>	- 175 $\pm$ 9,0	6,7 $\pm$ 0,06	11
kiemvrij + <u>E. coli</u>	- 87 $\pm$ 7,5	7,0 $\pm$ 0,03	13
conventioneel	- 200 $\pm$ 8,1	6,5 $\pm$ 0,07	32
kiemvrij	+ 42 $\pm$ 6,5	6,8 $\pm$ 0,03	20
CRF	- 173 $\pm$ 7,0	6,9 $\pm$ 0,04	18

Tabel VI. Redoxpotentiaal in het coecum en kolonisatie door soort D

	E'_h ($\bar{x} \pm \text{s.e. in mV}$)	pH ($\bar{x} \pm \text{s.e.}$)	soort D ^{xx} gekweekt
kiemvrije muizen besmet met:			
soort D (15) ^x	+ 32 ± 5,0	7,1 ± 0,05	0
<u>B. fragilis</u> + soort D (15)	- 286 ± 10,2	6,8 ± 0,04	15
<u>P. acnes</u> + soort D (5)	+ 24 ± 3,5	7,2 ± 0,10	0
<u>P. acnes</u> + soort D (10)	- 307 ± 25,1	7,0 ± 0,10	10

x aantal muizen dat werd besmet

xx aantal muizen waaruit soort D werd gekweekt

Tabel VII. Redoxpotentiaal in het coecum en kolonisatie door soort E

	E'_h ($\bar{x} \pm \text{s.e. in mV}$)	pH ($\bar{x} \pm \text{s.e.}$)	soort E ^{xx} gekweekt
kiemvrije muizen besmet met:			
soort E (8) ^x	+ 43 ± 17	6,9 ± 0,04	0
soort E (16)	- 8 ± 13	6,9 ± 0,04	16
<u>C. innocuum</u> + soort E (15)	- 229 ± 8	6,8 ± 0,05	15
<u>E. coli</u> + soort E (13)	- 79 ± 4	6,8 ± 0,04	13
<u>P. acnes</u> + soort E (11)	+ 30 ± 7	6,9 ± 0,02	0
<u>P. acnes</u> + soort E (13)	- 23 ± 3	6,8 ± 0,02	13

x aantal muizen dat werd besmet

xx aantal muizen waaruit soort E werd gekweekt

Tabel VIII. Bacterieaantallen in het coecum van met CRF stammen besmette gnotobionten en van CRF-muizen

	Aantal bacteriën per gram coecum	
	gnotobionten	CRF-muizen
<u>C. ramosum</u>	10 ⁹ - 10 ¹⁰	5.10 ⁸
<u>C. innocuum</u>	10 ⁹ - 2.10 ¹⁰	10 ⁶ - 10 ⁸
<u>P. acnes</u>	8.10 ⁸ - 5.10 ⁹	< 10 ⁵
soort D ^x	5.10 ⁸ - 5.10 ⁹	- xxx
soort E ^{xx}	10 ⁸ - 10 ⁹	2,5.10 ⁸
<u>B. fragilis</u>	2.10 ¹⁰	2.10 ⁹
<u>E. coli</u>	10 ⁹ - 3.10 ¹⁰	10 ³ - 10 ⁵ xxxx

x muizen bevatten ook B. fragilisxx muizen bevatten ook E. coli of C. innocuum

xxx kan in CRF-muizen niet worden geteld

xxxx CRF-muizen besmet met E. coli

Tabel IX. Redoxpotentialen en aantallen anaerobe bacteriën in het coecum van jonge conventionele muizen

Groep	Leeftijd in dagen	Aantal muizen	E_h ($\bar{x} \pm s.e.$, in mV)	Kleine en middelgrote tapered rods		soort E		Bacteroides	
				Aantal	Aantal posi- tieve muizen	Aantal	Aantal posi- tieve muizen	Aantal	Aantal posi- tieve muizen
I	4	8	+ 45 $\pm$ 7,4	-	-	-	-	-	-
	5	8	+ 20 $\pm$ 7,2	-	-	-	-	-	-
	6	8	+ 15 $\pm$ 4,5	-	-	-	-	-	-
II	7	8	- 35 $\pm$ 12,0	10^7 - 10^8	2	10^7	1	-	-
	8	8	- 75 $\pm$ 24,9	$5 \cdot 10^6$ - $5 \cdot 10^7$	4	$5 \cdot 10^6$	1	-	-
	9	8	- 65 $\pm$ 25,1	10^7 - 10^8	3	-	-	-	-
III	10	8	- 140 $\pm$ 18,0	10^7 - $5 \cdot 10^8$	8	10^7	3	10^7 - 10^8	4
	11	8	- 170 $\pm$ 16,0	$5 \cdot 10^8$ - 10^9	8	10^7	3	-	-
	12	8	- 180 $\pm$ 16,0	$5 \cdot 10^8$ - 10^{10}	8	10^6 - $5 \cdot 10^7$	5	10^9	3
IV	13	4	- 180 $\pm$ 11,0	$5 \cdot 10^9$ - 10^{10}	4	$5 \cdot 10^6$ - $5 \cdot 10^7$	4	10^9	4
	14	4	- 210 $\pm$ 13,1	10^9 - 10^{10}	4	10^6 - 10^7	4	$5 \cdot 10^9$	4
	15	4	- 210 $\pm$ 10,4	$5 \cdot 10^9$ - 10^{10}	4	$5 \cdot 10^7$ - 10^8	4	10^{10}	4
	16	4	- 210 $\pm$ 4,6	$5 \cdot 10^9$ - 10^{10}	4	$5 \cdot 10^6$ - 10^8	4	10^{10}	4
	17	4	- 190 $\pm$ 12,0	$5 \cdot 10^9$ - 10^{10}	4	$5 \cdot 10^7$ - $5 \cdot 10^8$	4	10^{10}	4
	18	4	- 160 $\pm$ 7,4	$5 \cdot 10^9$ - 10^{10}	4	10^8 - 10^9	4	10^{10}	4
	19	4	- 150 $\pm$ 7,6	10^{10}	4	$5 \cdot 10^7$ - 10^9	4	10^{10}	4
	20	4	- 155 $\pm$ 5,0	10^{10}	4	$5 \cdot 10^7$ - 10^8	4	10^{10}	4

Tabel X. Gemiddelde redoxpotentialen en anaerobe bacteriën in het coecum van jonge conventionele muizen

Groep	Leeftijd in dagen	Aantal muizen	E_h ($\bar{x} \pm s.e.$ in mV)	Kleine en middel- grote tapered rods ^x	Soort E ^x	<u>Bacteroides</u> ^x
I	4 - 7	24	+ 27 $\pm$ 4,6	-	-	-
II	7 - 10	24	- 58 $\pm$ 12,5	9	2	-
III	10 - 13	24	- 163 $\pm$ 10,0	24	11	7
IV	13 - 21	32	- 183 $\pm$ 5,3	32	32	32

x aantal muizen waarin deze bacteriën werden aangetoond

Tabel XI. Redoxpotentiaal in het coecum van jonge kiemvrije muizen

Groep	Leeftijd in dagen	Aantal muizen	E_h ($\bar{x} \pm s.e.$ in mV)	Gemiddelde E_h ($\bar{x} \pm s.e.$ in mV)
I	4	3	+ 47 $\pm$ 4,4	
	5	3	+ 32 $\pm$ 11,0	+ 41 $\pm$ 6,1
	6	3	+ 45 $\pm$ 2,9	
II	7	3	0 $\pm$ 15,3	
	8	3	+ 15 $\pm$ 20,6	+ 17 $\pm$ 9,2
	9	3	+ 35 $\pm$ 6,5	
III	10	3	+ 32 $\pm$ 1,6	
	11	3	+ 35 $\pm$ 8,5	+ 28 $\pm$ 4,1
	12	3	+ 18 $\pm$ 6,2	
IV	13	3	+ 28 $\pm$ 9,2	
	14	3	+ 35 $\pm$ 8,6	
	15	3	+ 45 $\pm$ 2,8	
	16	3	+ 42 $\pm$ 13,0	+ 31 $\pm$ 3,5
	17	3	+ 33 $\pm$ 4,4	
	18	3	+ 20 $\pm$ 10,0	
	19	3	+ 15 $\pm$ 14,4	
	20	3	+ 33 $\pm$ 7,5	

Tabel XII. Redoxpotentiaal en kolonisatie van het coecum van kiemvrije muizen door CRF micro-organismen bij indirect contact met CRF-muis

Muis	Dag ^x	E' _h (in mV) ^{xx}	Aantal bacteriën per gram faeces ^{xxx}			
			<u>Bacteroides</u>	<u>C. ramosum</u>	kleine en middelgrote tapered anaerobes	soort E
a	1	+ 30	10 ⁹	-	-	-
b	1	- 88	10 ¹⁰	10 ⁹	10 ⁷	-
c	2	- 57	4.10 ⁹	-	-	-
d	2	- 73	9.10 ⁹	-	-	-
e	2	- 108	10 ¹⁰	7,5.10 ⁸	3.10 ⁷	-
f	2	- 130	2.10 ¹⁰	-	2.10 ⁸	2.10 ⁶
g	3	- 56	9.10 ⁹	3.10 ⁹	6.10 ⁸	3.10 ⁶
h	3	- 100	6.10 ⁹	6.10 ⁸	-	-
i	3	- 142	10 ¹⁰	10 ⁹	10 ⁷	-
j	3	- 150	10 ¹⁰	5.10 ⁸	2.10 ⁹	3.10 ⁶
k	3	- 186	2.10 ¹⁰	7,5.10 ⁸	-	-
l	4	- 137	2.10 ¹⁰	7.10 ⁹	10 ⁶	-
m	4	- 140	10 ¹⁰	3.10 ¹⁰	2.10 ⁸	6.10 ⁷
n	4	- 153	5.10 ⁹	10 ¹⁰	7,5.10 ⁹	2.10 ⁸
o	5	- 86	1,5.10 ¹⁰	4.10 ⁹	5.10 ⁷	-
CRF ^{xxxx}	28	- 173 ± 7	2.10 ⁹	5.10 ⁸	2,5.10 ¹⁰	2,5.10 ⁸

x dag 1 is de dag waarop de eerste van de geëxposeerde muizen positief werd bevonden

xx pH varieert van 6,8 tot 7,3

xxx microscopische tellingen

xxxx 28 dagen nadat de muizen positief werden bevonden werd aangenomen dat zij CRF-muizen waren

Tabel XIII. De groei in vitro van soort D, soort E, B. fragilis en C. innocuum bij verschillende redoxpotentialen

Bacteriesoort	E'_h (in mV)	groei
soort D	- 58	+
	- 24	+
	- 17	+
	- 16 tot - 8	+
	0 tot + 5	+
	0 tot + 16	-
	+ 27	-
soort E	- 14 tot - 6	+
	- 7 tot + 1	+
	+ 4 tot + 13	-
	+ 10 tot + 15	-
<u>C. innocuum</u>	+ 54	+
	+ 111 tot + 121	+
	+ 104 tot + 126	+
	+ 154	+
	+ 178 tot + 181	+
	+ 190 tot + 206	+
	+ 205 tot + 215	-
<u>B. fragilis</u>	+ 216 tot + 224	-
	+ 102 tot + 112	+
	+ 127 tot + 134	+
	+ 153 tot + 162	+
	+ 168 tot + 178	+
	+ 177 tot + 185	-
	+ 183 tot + 189	-

Tabel XIV. De groei in vitro van soort D en soort E in een verrijkt medium^x, bij verschillende redoxpotentialen

Bacteriesoort	E'_h (in mV)	groei
soort D	+ 27 tot + 40	+
	+ 32 tot + 39	+
	+ 39 tot + 47	+
	+ 51 tot + 61	+
	+ 60 tot + 70	+
	+ 62 tot + 72	-
	+ 67 tot + 77	-
	+ 92 tot + 102	-
soort E	+ 35 tot + 41	+
	+ 36 tot + 46	+
	+ 42	+
	+ 54 tot + 62	-
	+ 57 tot + 67	-
	+ 125	-

x aan het medium van soort D was cultuurvloeistof van een goed gegroeide cultuur van B. fragilis toegevoegd en aan het medium van soort E cultuurvloeistof van C. innocuum

fig. 1. Opstelling om anaeroob te verdunnen

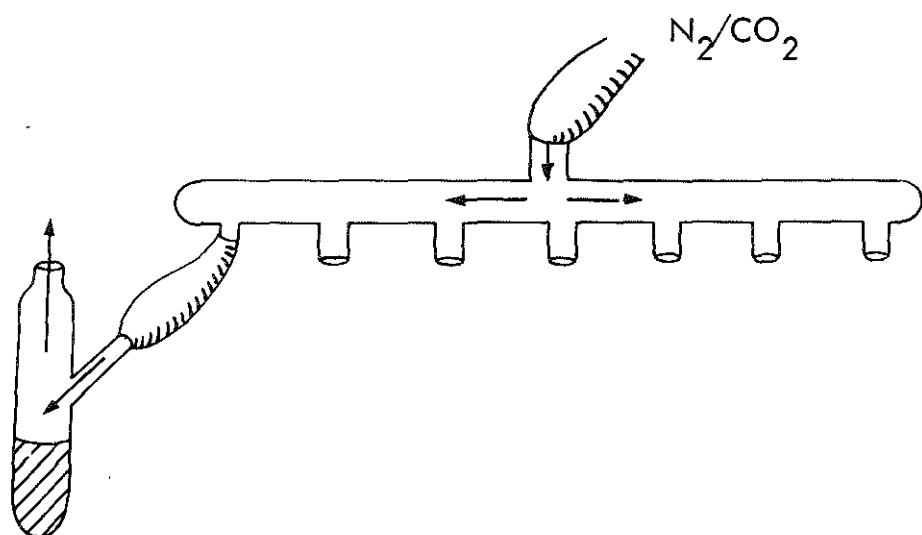


fig. 2. Vaatje voor het meten van redoxpotentiaal en pH tijdens de groei van bacterieculturen

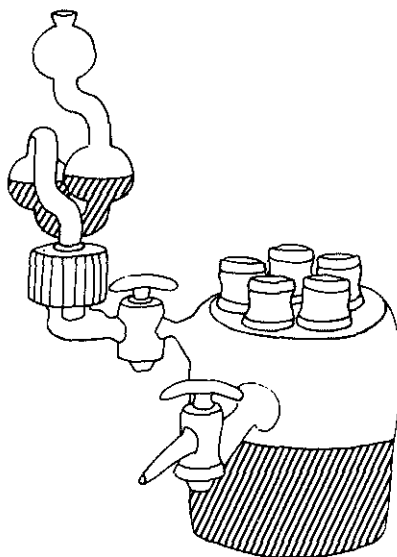


fig. 3. Opstelling voor het bepalen van de beperkende potentiaal van anaeroben

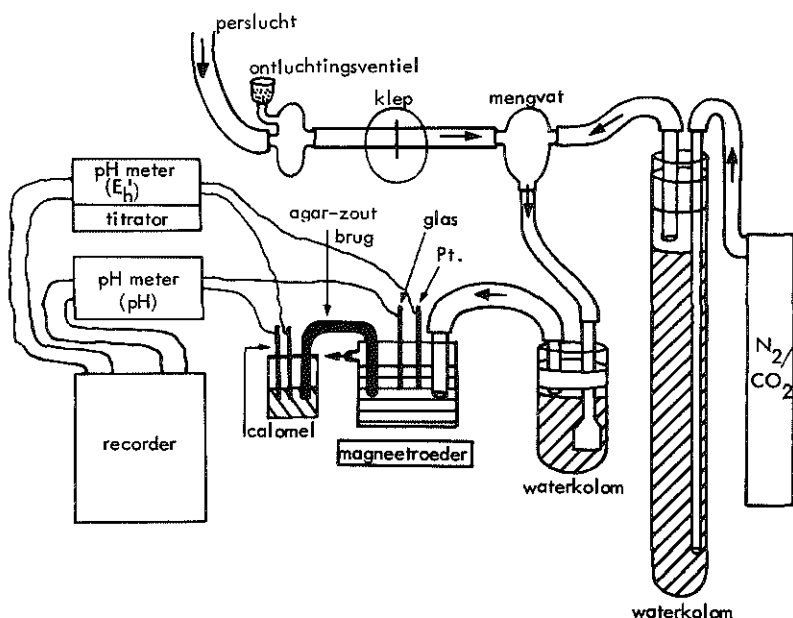


fig. 4. Het verschijnen van CRF micro-organismen in faeces van kiemvrije muizen bij indirect contact met een CRF muis

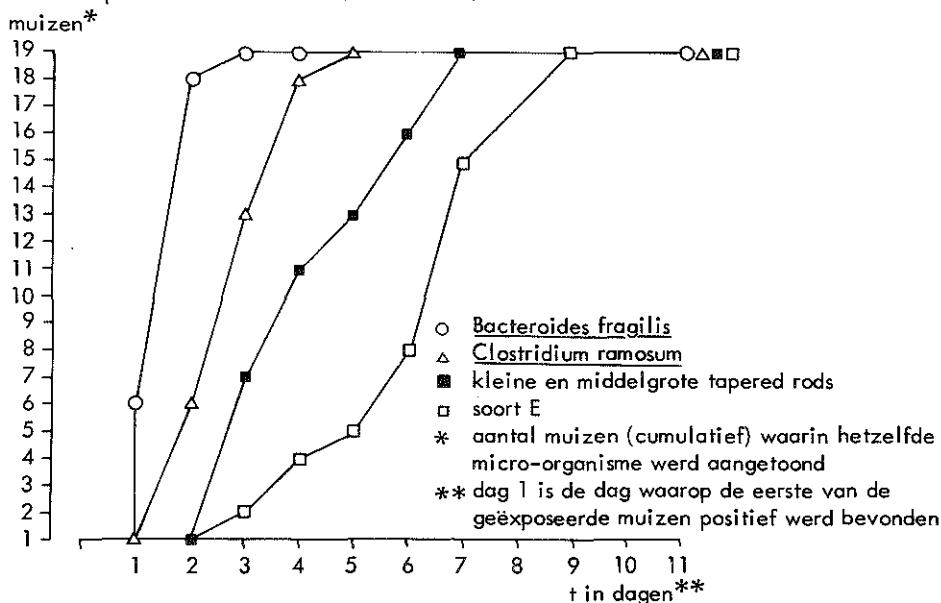
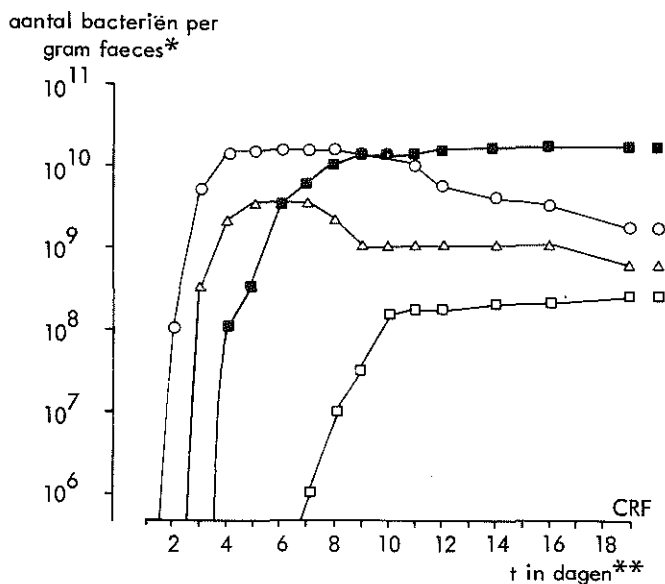


fig. 5. Aantallen CRF micro-organismen in faeces van kiemvrije muizen bij indirect contact met een CRF muis (gemiddelde waarden)



- *Bacteroides fragilis*
- △ *Clostridium ramosum*
- kleine en middelgrote tapered rods
- soort E

* berekend op positieve muizen

** dag 1 is de dag waarop de eerste van de geëxposeerde muizen positief werd bevonden

fig. 6. E'_h , pH en Extinctie in een groeiende cultuur van Clostridium innocuum

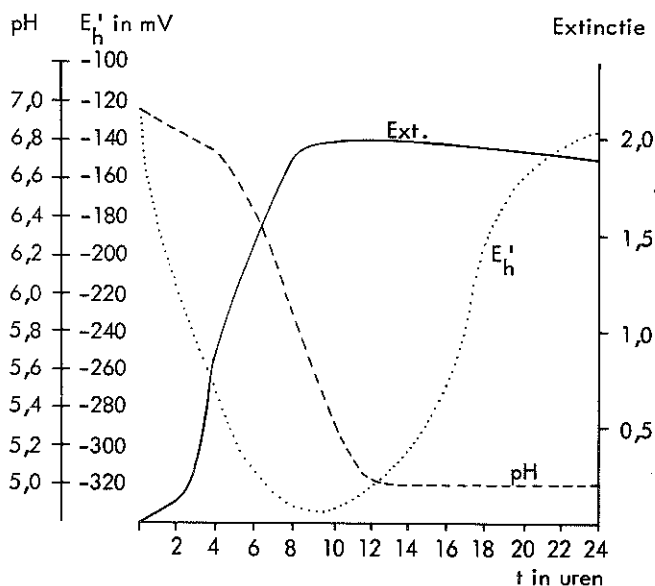


fig. 7. E'_h , pH en Extinctie van een groeiende cultuur van soort D

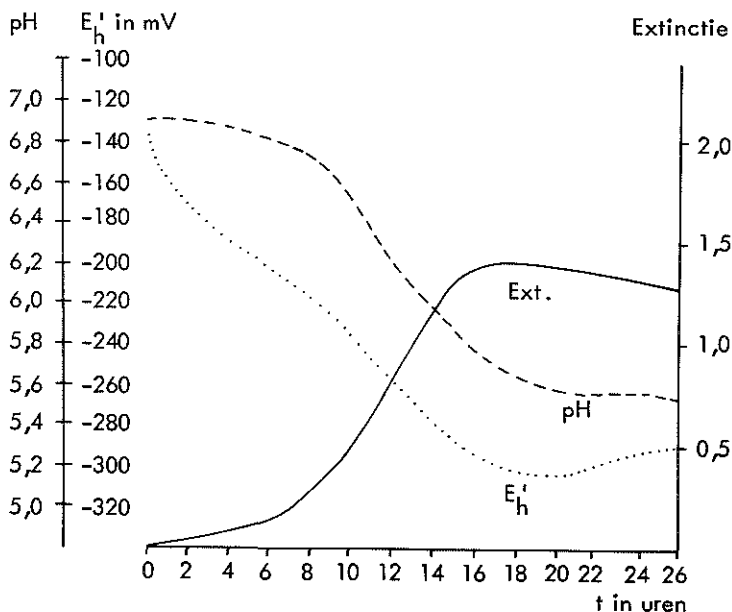


fig. 8. E_h^i , pH en Extinctie in een groeiende cultuur van soort E

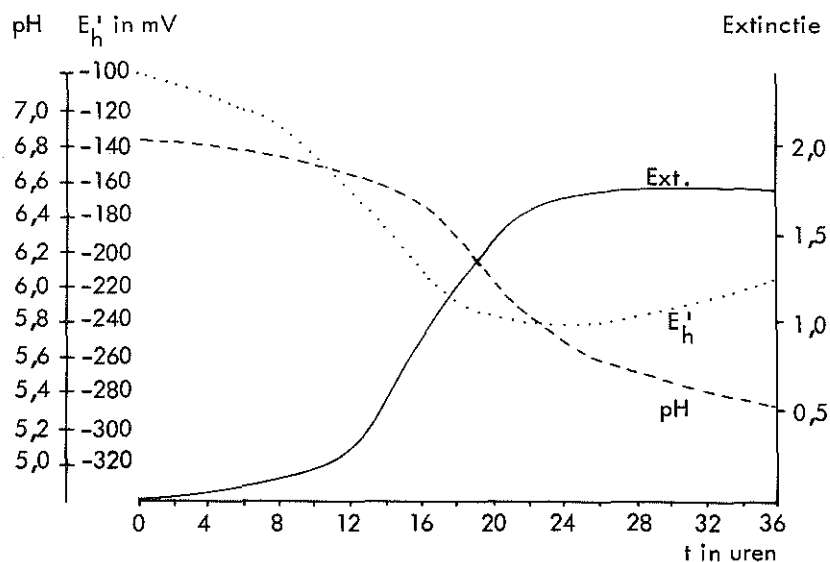


fig. 9. E_h^i , pH en Extinctie in een groeiende cultuur van Bacteroides fragilis

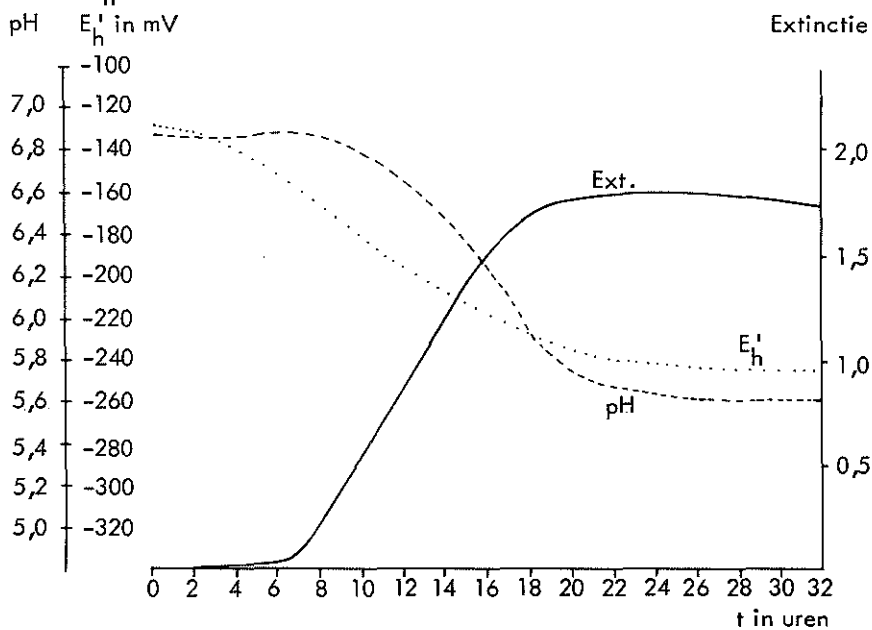


fig. 10. E'_h , pH en Extinctie in een groeiende cultuur
van Clostridium ramosum

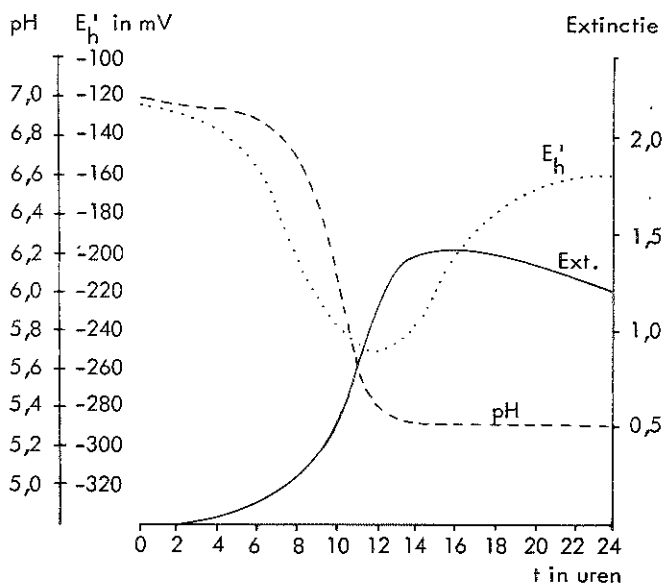
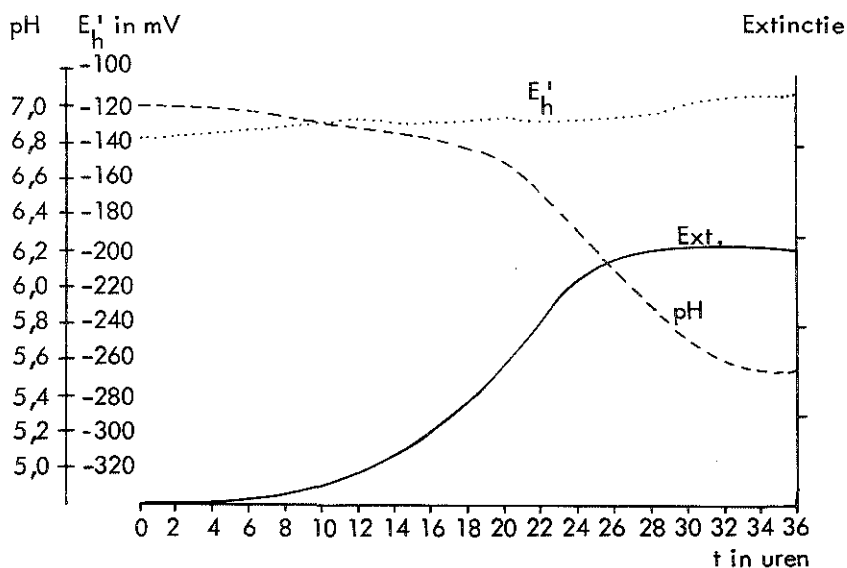


fig. 11. E'_h , pH en Extinctie in een groeiende cultuur van
Propionibacterium acnes



LITERATUUR

- Abrams, G.D., Bauer, H. & Sprinz, H. (1963). "Influence of the normal flora on mucosal morphology and cellular renewal in the ileum". *Laboratory Investigation* 12, 355.
- Abrams, G.D. & Bishop, J.E. (1967). "Effect of the normal microbial flora on gastrointestinal motility". *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 126, 301.
- Aranki, A., Syed, S.A., Kenney, E.B. & Freter, R. (1969). "Isolation of anaerobic bacteria from human gingiva and mouse cecum by means of a simplified glove box procedure". *Applied Microbiology* 17, 568.
- Asano, T. (1969). "Modification of cecal size in germfree rats by long-term feeding of anion exchange resin". *American Journal of Physiology* 217, 911.
- Ashburner, F.M. & Mushin, R. (1962). "Experimental intestinal coliform infections in mice". *Journal of Hygiene* 60, 175.
- Aubel, E., Rosenberg, A.J. & Grünberg, M. (1946). "Etude sur le potentiel d'oxydo-réduction. Limite de croissance des bactéries anaérobies". *Helvetica Chimica Acta* 29, 1267.
- Barnes, R.H. (1962). "Nutritional implications of coprophagy". *Nutrition Reviews* 20, 289.
- Bergheim, O., Kleinberg, J. & Kirch, E.R. (1945). "Oxidation-reduction potential of the contents of the gastrointestinal tract". *Journal of Bacteriology* 49, 453.
- Biochemisches Taschenbuch (1967). Rauen, H.D. Springer Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg, New York.
- Bohnhoff, M. & Miller, C.P. (1962). "Enhanced susceptibility to Salmonella infection in streptomycin-treated mice". *Journal of Infectious Diseases* 111, 117.
- Bohnhoff, M., Miller, C.P. & Martin, W.R. (1964a). "Resistance of the mouse's intestinal tract to experimental Salmonella infection. I. Factors which interfere with the initiation of infection by oral inoculation". *Journal of Experimental Medicine* 120, 805.
- Bohnhoff, M., Miller, C.P. & Martin, W.R. (1964b). "Resistance of the mouse's intestinal tract to experimental Salmonella infection. II. Factors responsible for its loss following streptomycin-treatment". *Journal of Experimental Medicine* 120, 817.

- Brock, T.D. (1966). "Principles of microbial ecology". Prentice-Hall, Inc. Englewood Cliffs, New Jersey.
- Bryant, M.P. (1970). "Normal flora - rumen bacteria". The American Journal of Clinical Nutrition 23, 1440.
- Clark, M.W. (1960). "Oxidation-reduction potentials of organic systems". Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- Daft, F.S., McDaniel, E.G., Herman, L.G., Romine, M.K. & Hegner, J.R. (1963). "Role of coprophagy in utilization of B vitamins synthesized by intestinal bacteria". Federation Proceedings 22, 129.
- Davenport, H.W. (1961). "Physiology of the digestive tract". Year Book Medical Publishers, Inc. Chicago.
- Dobson, A. & Bullen, J.J. (1964). "A method for the control of E_h and pH during bacterial growth". Journal of General Microbiology 35, 169.
- Ducluzeau, R. & Raibaud, P. (1968). "Implantations successives de six souches bactériennes dans le tube digestif de souris 'gnotoxéniques' ". Annales de l'Institut Pasteur 115, 941.
- Elsden, S.R., Hitchcock, M.W.S., Marshall, R.A. & Phillipson, A.T. (1946). "Volatile acid in the digesta of ruminants and other animals". Journal of Experimental Biology 22, 191.
- Eyssen, H., Piessens-Denef, M. & Parmentier, G. (1972). "Role of the cecum in maintaining Δ^5 -steroid- and fatty acid-reducing activity of the rat intestinal micro-flora". Journal of Nutrition 102, 1501.
- Piennens, R.N. T-W- (1972). "Biology of Nutrition". Pergamon Press, Oxford, New York, Toronto, Sydney, Braunschweig.
- Floch, M.H., Gershengoren, W., Diamond, S. & Hersch, Th. (1970). "Cholic acid inhibition of intestinal bacteria". American Journal of Clinical Nutrition 23, 8.
- Freter, R. (1962). "In vivo and in vitro antagonism of intestinal bacteria against Shigella flexneri. II. The inhibitory mechanism". Journal of Infectious Diseases 110, 38.
- Freter, R. & Abrams, G.D. (1972). "Function of various intestinal bacteria in converting germfree mice to the normal state". Infection and Immunity 6, 119.
- Freter, R. & Ozawa, A. (1963). "Explanation for limitation of populations of Escherichia coli in broth cultures". Journal of Bacteriology 86, 904.
- Gibbons, R.J. & Kapsimalis, B. (1967). "Estimates of the overall rate of growth of the intestinal micro-flora of hamsters, guinea pigs and mice". Journal of Bacteriology 93, 510.

- Gibbons, R.J., Socransky, S.S. & Kapsimalis, B. (1964). "Establishment of human indigenous bacteria in germfree mice". *Journal of Bacteriology* 88, 1316.
- Gordon, H.A. (1965). "Demonstration of a bioactive substance in cecal contents of germfree animals". *Nature* 205, 571.
- Gordon, H.A. & Bruckner-Kardoss, E. (1961). "Effect of normal microbial flora on intestinal surface area". *American Journal of Physiology* 201, 175.
- Gordon, H.A. & Dubos, R. (1970). "The anaerobic bacterial flora of the mouse cecum". *Journal of Experimental Medicine* 132, 251.
- Gustafsson, B.E. (1959). "Vitamin K deficiency in germfree rats". *Annals of the New York Academy of Sciences* 78, 166.
- Hagen, D.A., Barbera, P.W., Blair, W.M., Shefner, A.M. & Poiley, S.M. (1968). "Similarity of intestinal microflora of BDF conventional mice from different sources and of different ages". *Laboratory Animal Care* 18, 550.
- Hamilton, R.D. & Zahler, S.A. (1957). "A study of *Leptotrichia buccalis*". *Journal of Bacteriology* 73, 386.
- Hanke, M.E. & Bailey, J.H. (1945). "Oxidation-reduction potential requirements of *C. welchii* and other clostridia". *Proceedings of the Society of Experimental Biology* 59, 163.
- Hewitt, L.F. (1950). "Oxidation-reduction potentials in bacteriology and biochemistry" (sixth edition). E & S Livingstone Ltd., Edinburgh.
- Hoskins, L.C. & Zamcheck, N. (1968). "Bacterial degradation of gastrointestinal mucins. I. Comparison of mucus constituents in the stools of germfree and conventional rats". *Gastroenterology* 54, 268.
- Hudson, J.A. & Luckey, T.D. (1964). "Bacteria induced morphologic changes". *Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine* 116, 628.
- Jacob, H.E. (1970). "Redoxpotential". In: "Methods of Microbiology", vol. II. Norris, J.R. & Ribbons, D.W. Academic Press, London, New York.
- Jacob, H.E. (1971). "Das Redoxpotential in Bakterienkulturen". *Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiologie* 11, 691.
- Kellog, T.F. (1971). "Microbial aspects of enterohepatic neutral sterol and bile acid metabolism". *Federation Proceedings* 30, 1808.
- Knight, B.C.J.G. (1930). "CXXIII. Oxidation-reduction studies in relation to bacterial growth. II. A method of poisoning the oxidation-reduction potential of bacteriological culture media". *Biochemical Journal* 24, 68.

- Knight, B.C.J.G. & Fildes, P. (1930). "CLXV. Oxidation-reduction studies in relation to bacterial growth. III. The positive limit of oxidation potential required for the germination of B. tetani spores in vitro". Biochemical Journal 24, 1496.
- Kordatzki, W. (1953). "Grundlagen der potentiometrischen rH-Messung". Archiv der Pharmazie 286, 43.
- Kruyt, H.R. & Overbeek, J.Th.G. (1958). "Inleiding tot de physische chemie". H.J. Paris, Amsterdam.
- Lee, A. & Gemmell, E. (1972). "Changes in the mouse intestinal microflora during weaning: role of volatile fatty acids". Infection and Immunity 5, 1.
- Lee, A., Gordon, J. & Dubos, R. (1968). "Enumeration of the oxygen sensitive bacteria usually present in the intestine of healthy mice". Nature 220, 1137.
- Lee, A., Gordon, J., Lee, C.J. & Dubos, R. (1971). "The mouse intestinal microflora with emphasis on the strict anaerobes". Journal of Experimental Medicine 133, 339.
- Leistner, J. & Mirna, A. (1959). "Das Redoxpotential von Pökellaken". Die Fleischwirtschaft 8, 659.
- Leman, A. (1965). "Untersuchungen über die intracellulären und extracellulären Redoxpotentiale gärender Hefesuspensionen". Archiv für Mikrobiologie 50, 194.
- Lev, M. (1963). "Studies on bacterial associations in germfree animals and animals with defined flora's". In: "Symbiotic Associations". Thirteenth Symposium of the Society of General Microbiology. Cambridge University Press.
- Light, T.S. (1972). "Standard solution for redox potential measurements". Analytical Chemistry 44, 1038.
- Linstedt, G., Linstedt, S. & Gustafsson, B.E. (1965). "Mucus in intestinal contents of germfree rats". Journal of Experimental Medicine 121, 201.
- Loesche, W.J. (1969). "Effect of bacterial contamination on cecal size and cecal contents of gnotobiotic rodents". Journal of Bacteriology 99, 520.
- Loeschke, K. & Gordon, H.A. (1970). "Water movement across the cecal wall of the germfree rat". Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 133, 1217.

- Matsuzawa, T. & Wilson, R. (1965). "Oxygen changes in tissues of germfree and conventional mice after inoculation of bacterial endotoxin".
Tohoku Journal of Experimental Medicine 85, 361.
- Meynell, G.G. (1963). "Antibacterial mechanism of the mouse gut. II. The role of E_h and volatile fatty acids in the normal gut". British Journal of Experimental Pathology 44, 209.
- Meynell, G.G. & Subbaiah, T.V. (1963). "Antibacterial mechanisms of the mouse gut. I. Kinetics of infection by Salmonella typhimurium in normal and streptomycin - treated mice studied with abortive transductants". British Journal of Experimental Pathology 44, 1977.
- Michaelis, L. (1933). "Oxidations-Reduktionspotentiale. Mit besonderer Berücksichtigung ihren physiologische Bedeutung". Springer Verlag, Berlin.
- Miller, C.P. & Bohnhoff, M. (1962). "A study of experimental Salmonella infection in the mouse". Journal of Infectious Diseases 111, 107.
- Morishita, Y. Mitsuoka, T., Kaneuchi, C., Yamamoto, T., Yamamoto, S. & Ogata, M. (1972). "Establishment of microorganisms isolated from chickens in the digestive tract of germfree chickens". Japanese Journal of Microbiology 16, 27.
- Nottingham, P.M. & Hungate, R.E. (1968). "Isolation of methanogenic bacteria from feces of man". Journal of Bacteriology 96, 2178.
- Ozawa, A. & Freter, R. (1964). "Ecological mechanism controlling growth of Escherichia coli in continuous flow cultures and in the mouse intestine". Journal of Infectious Diseases 114, 235.
- Phillips, A.W. & Smith, J.E. (1959). "Advances in applied microbiology". Academic Press, New York.
- Phillips, B.P., Wolfe, P.A. & Bartgis, J.L. (1958). "Studies on the ameba-bacteria relationship in amebiasis. II. Some concepts on the etiology of the disease". American Journal of Tropical Medicine 7, 392.
- Rabotnowa, I.L. (1963). "Die Bedeutung Physikalisch-chemischer Faktoren (pH und rH_2) für die Lebenstätigkeit der Mikroorganismen". VEB Gustav Fischer Verlag, Jena.
- Raibaud, P., Dickinson, A.B., Sacquet, E., Charlier, H. & Mocquot, G. (1966). "La microflore du tube digestif du rat. IV. Implantation contrôlée chez le rat gnotobiotique de différents genres microbiens isolés du rat conventionnel". Annales de l'Institut Pasteur 111, 193.

- Raibaud, P., Ducluzeau, R., Dubos, F. & Sacquet, E. (1972). "Spore formation and germination of Clostridium perfringens in the digestive tract of holoxenic and axenic mice". Journal of Applied Bacteriology 35, 177.
- Savage, D.C. (1970). "Associations of indigenous microorganisms with gastrointestinal mucosal epithelia". The American Journal of Clinical Nutrition 23, 1495.
- Savage, D.C. & Dubos, R. (1968). "Alterations in the mouse cecum and its flora produced by antibacterial drugs". Journal of Experimental Medicine 128, 97.
- Savage, D.C., Dubos, R. & Schaedler, R.W. (1968). "The gastrointestinal epithelium and its autochthonous bacterial flora". Journal of Experimental Medicine 127, 67.
- Schaedler, R.W., Dubos, R. & Costello, R. (1965a). "The development of the bacterial flora in the gastrointestinal tract of mice". Journal of Experimental Medicine 122, 59.
- Schaedler, R.W., Dubos, R. & Costello, R. (1965b). "Association of germ-free mice with bacteria isolated from normal mice". Journal of Experimental Medicine 122, 77.
- Shimada, K., Bricknell, K.S. & Finegold, S.M. (1969). "Deconjugation of bile acids by intestinal bacteria: review of literature, and additional studies". Journal of Infectious Diseases 119, 273.
- Skelly, B.J., Trexler, P.C. & Tanami, J. (1962). "Effect of a Clostridium species upon cecal size of gnotobiotic mice". Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 110, 455.
- Smith, P.H. & Hungate, R.E. (1958). "Isolation and characterization of Methanobacterium ruminantium n. sp.". Journal of Bacteriology 75, 713.
- Socransky, S.S., Loesche, W.J., Hubersak, C. & MacDonald, J.B. (1964). "Dependency of Treponema microdentium on other oral organisms for isobutyrate, polyamines, and a controlled oxidation-reduction potential". Journal of Bacteriology 88, 200.
- Spears, R.W. & Freter, R. (1967). "Improved isolation of anaerobic bacteria from the mouse cecum by maintaining continuous strict anaerobiosis". Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 124, 903.
- Stolp, H. (1955). "Ernährungs- und entwicklungsphysiologische Untersuchungen an anaeroben Bakterien. II. Die Physiologie der Entwicklung von Clostridien unter besonderer Berücksichtigung des Reduktions-oxydations-Potentials". Archiv für Mikrobiologie 21, 293.

- Syed, S.A., Abrams, G.D. & Freter, R. (1970). "Efficiency of various intestinal bacteria in assuming normal functions of enteric flora after association with germfree mice". *Infection and Immunity* 2, 376.
- Thompson, G.R. & Trexler, P.C. (1971). "Gastrointestinal structure and function in germfree or gnotobiotic animals". *Gut* 12, 230.
- Trexler, P.C. & Reynolds, L.I. (1957). "Flexible film apparatus for rearing and use of germfree animals". *Applied Microbiology* 5, 406.
- Vennesland, B. & Hanke, M.E. (1940). "The oxidation-reduction potential requirements of a non-spore-forming, obligate anaerobe". *Journal of Bacteriology* 39, 139.
- De Vries, W., Wijck-Kapteyn, W.M.C. van, & Stouthamer, A.H. (1972). "Influence of oxygen on growth, cytochrome synthesis and fermentation pattern in propionic acid bacteria". *Journal of General Microbiology* 71, 515.
- Waay, D. van der, Berghuis-de Vries, J.M. & Lekkerkerk-van der Wees, J.E.C. (1971). "Colonization resistance of the digestive tract in conventional and antibiotic-treated mice". *Journal of Hygiene*, 69, 405.
- Waay, D. van der (1968). "Production of bacteria-free mice by antibiotic decontamination". 'Advances in germfree research and gnotobiology'. Miyakawa, M. and Luckey, T.D., Lliffe Books Ltd., London, Chemical Rubber Co., Cleveland, Ohio.
- Waay, D. van der, & Andreas, A.H. (1971). "Prevention of airborne contamination and cross-contamination in germfree mice by laminar flow". *Journal of Hygiene*, 69, 83.
- Wensinck, F. & Ruseler-van Embden, J.G.H. (1971). "The intestinal flora of colonization-resistant mice". *Journal of Hygiene*, 69, 413.
- Wilkins, T.D. & Long, W.R. (1971). "Changes in the flora of the cecal mucosa of mice fed a chemically-defined diet". *Bacteriology Proceedings*, 113.
- Williams Smith, H. (1961). "The development of the bacterial flora of the faeces of animal and man: the changes that occur during aging". *Journal of Applied Bacteriology* 24, 235.
- Williams Smith, H. (1965). "The development of the flora of the alimentary tract in young animals". *Journal of Pathology and Bacteriology* 90, 495.

- Williams Smith, H. & Crabb, W.E. (1961). "The faecal bacterial flora of animals and man: its development in the young". *Journal of Pathology and Bacteriology* 82, 53.
- Wiseman, R.F. & Cole, C.H. (1968). "Transient cecal reduction in gnotobiotic animals". 'Advances in germfree research and gnotobiology'. Miyakawa, M. and Luckey, T.D. Liffle Books Ltd., London. Chemical Rubber Co., Cleveland, Ohio.
- Wiseman, R.F. & Gordon, H.A. (1965). "Reduced levels of a bioactive substance in the caecal content of gnotobiotic rats monoassociated with *Salmonella typhimurium*". *Nature* 4971, 572.
- Wostmann, B.S. & Bruckner-Kardoss, E. (1966). "Oxidation-reduction potential in cecal contents of germfree and conventional rats". *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 121, 1111.
- Yang, M.G., Manoharan, K. & Young, A.K. (1969). "Influence and degradation of dietary cellulose in cecum of rats". *Journal of Nutrition* 97, 260.
- Yang, M.G., Manoharan, K. & Michelsen, O. (1970). "Nutritional contribution of volatile fatty acids from the cecum of rats". *Journal of Nutrition* 100, 545.

SAMENVATTING

In dit proefschrift wordt, in hoofdstuk I, een overzicht gegeven van de milieukenmerken die de samenstelling van de residente darmflora bepalen. Vanuit ecologisch standpunt gezien is de redoxpotentiaal één van de belangrijkste van deze factoren. De lage redoxpotentiaal in het coecum van conventionele dieren is ervoor verantwoordelijk dat de residente flora uit facultatief anaerobe en strikt anaerobe micro-organismen bestaat. De darmflora zelf houdt de redoxpotentiaal op een laag niveau, hetgeen blijkt uit het feit dat de potentiaal in het coecum van kiemvrije muizen ongeveer 200 mV hoger is dan in het coecum van conventionele dieren. In hoeverre de hoge redoxpotentiaal in het coecum van kiemvrije muizen bepalend is voor het al dan niet koloniseren van strikt anaerobe darmbacteriën en hoe de redoxpotentiaal verandert onder invloed van de nesteling van deze micro-organismen wordt in dit onderzoek bestudeerd. Deze doelstelling en een korte uiteenzetting over de redoxpotentiaal vormen de inhoud van hoofdstuk II.

In de meeste experimenten werd gebruik gemaakt van uit CRF-muizen geïsoleerde bacteriesoorten: Clostridium innocuum, Clostridium ramosum, Bacteroides fragilis, Propionibacterium acnes en twee sporevormers (soort D en soort E), beide behorend tot de groep micro-organismen, die worden aangeduid met de naam "tapered rods" of "tapered anaerobes". Alle stammen behoren tot de residente darmflora van de muis en zijn strikt anaeroob, op P. acnes na, die aerotolerant is. Bij het kweken in vitro behoeven soort D en soort E strikt anaerobe condities. Deze soorten en de gebruikte proefopstellingen zijn in hoofdstuk III beschreven.

In hoofdstuk IV worden twee experimenten beschreven. In het eerste experiment werd de redoxpotentiaal in verschillende delen van het darmkanaal bepaald. Bij conventionele muizen is de potentiaal in de maag hoog en deze wordt lager naarmate het darmkanaal in de richting van het coecum wordt vervolgd; hier bereikt hij zijn laagste waarde ($-200 \pm 8,1$ mV). In kiemvrije dieren is de redoxpotentiaal in verschillende gedeelten van het darmkanaal vrijwel gelijk (de potentiaal in het coecum is $+42 \pm 6,5$ mV). In het tweede experiment werd nagegaan of de hoge redoxpotentiaal in het darmkanaal van kiemvrije muizen belemmerend werkt op

de kolonisatie van anaerobe micro-organismen. Kiemvrije muizen werden besmet met de 6 bovengenoemde CRF soorten en Escherichia coli. Na 3 weken werd nagegaan welke van deze soorten zich in de muizecoeca hadden gevestigd en werd de redoxpotentiaal in het coecum gemeten. C. innocuum, C. ramosum, B. fragilis, P. acnes en E. coli vestigden zich zeer gemakkelijk en in grote aantallen (10^9 - 10^{10} per gram coecuminhoud). De redoxpotentiaal in het coecum van monognotobionten van C. innocuum, B. fragilis, C. ramosum en E. coli bleek met resp. 280, 220, 190 en 130 mV te zijn verlaagd ten opzichte van de potentiaal in het coecum van kiemvrije muizen. Kolonisatie van P. acnes bleek nauwelijks effect te hebben op de redoxpotentiaal. Soort D en soort E koloniseerden niet of vrijwel niet in kiemvrije muizen. Werde echter de potentiaal in het coecum tevoren verlaagd door de muizen te besmetten met één van de goed groeiende anaeroben (B. fragilis of C. innocuum), dan koloniseerden soort D en soort E gemakkelijk. Hieruit mag worden geconcludeerd dat de redoxpotentiaal in het coecum van kiemvrije muizen te hoog is voor het aanslaan van deze twee "tapered anaerobes", maar dat zij zich wel kunnen vestigen als het milieu door een andere bacteriesoort daartoe geschikt is gemaakt door het verlagen van de redoxpotentiaal.

In hoofdstuk V wordt nagegaan in welke volgorde de verschillende micro-organismen zich in de darm van pasgeboren conventionele muizen nestelen. Na één dag zijn reeds enterokokken en lactobacillen in het coecum aanwezig; de eerste tapered anaerobes verschijnen echter pas 7 tot 8 dagen na de geboorte. De redoxpotentiaal in de coeca van muizen van 4 tot 14 dagen oud bleek met de leeftijd geleidelijk te dalen van een waarde die gelijk is aan die in het coecum van kiemvrije muizen tot een waarde die overeenkomt met die in het volwassen, conventionele dier. De tapered anaerobes vestigden zich pas wanneer de redoxpotentiaal tot ongeveer 75 mV beneden de beginwaarde was gedaald; de muizen waren dan 7 tot 10 dagen oud. De tapered anaerobes nemen daarna zeer snel in aantal toe om op de 12e tot 14e dag reeds in aantallen van 10^{10} per gram coecuminhoud voor te komen.

Naast de redoxpotentiaal die na verloop van tijd lager wordt en het milieu geschikt maakt voor de vestiging van de strikt anaerobe tapered rods, is waarschijnlijk ook het vaste voedsel dat na ongeveer 10 dagen het melkdieet langzamerhand gaat vervangen, belangrijk voor de explosieve

groei en het in stand houden van hoge aantallen van tapered rods.

In hoofdstuk VI wordt een experiment beschreven waarin werd nagegaan in welke volgorde tot de CRF flora behorende micro-organismen zich in een kiemvrije muis nestelen, wanneer indirect contact tussen kiemvrije en CRF-muizen bestaat en overbrenging via de lucht mogelijk is. Uit de resultaten van dit experiment bleek, dat B. fragilis zich als eerste in het kiemvrije muizecoecum vestigde en vrijwel onmiddellijk werd gevolgd door C. ramosum. Beide soorten verlaagden de redoxpotentiaal binnen enkele dagen met 100 tot 200 mV. Pas dan begonnen de eerste tapered anaerobes (die hier werden onderscheiden in kleine en middelgrote tapered rods, waartoe soort D behoort en de veel grotere soort E) zich te vestigen. Ook hier werd het milieu eerst door andere bacteriën door het verlagen van de redoxpotentiaal geschikt gemaakt voor de vestiging van tapered anaerobes.

Hoofdstuk VII is gewijd aan een bestudering van het gedrag van de 6 uit CRF-muizen geïsoleerde soorten in vitro. Hiertoe werd een vaatje ontwikkeld waarin strikt anaerobe condities konden heersen en waarin tijdens de groei pH en redoxpotentiaal konden worden gemeten. Alle soorten, op P. acnes na, bleken de redoxpotentiaal te verlagen. Dit verschijnsel werd ook waargenomen in de eerder beschreven dierproeven: alle soorten, uitgezonderd P. acnes, verlaagden de potentiaal in het coecum. Tevens werd voor de tapered rods (soort D en soort E), voor B. fragilis en C. innocuum bepaald wat de hoogste potentiaal ("beperkende potentiaal") is waarbij deze stammen zich nog juist kunnen vermeerderen. B. fragilis en C. innocuum, die zich beide gemakkelijk vestigden in het coecum van kiemvrije muizen, hadden een beperkende potentiaal die zeer hoog lag (ongeveer + 200 mV). Soort D en soort E, die zich niet of nauwelijks konden vestigen in het kiemvrije coecum, bleken een beperkende potentiaal te hebben die lager was dan de potentiaal in het coecum van kiemvrije muizen (ongeveer + 10 mV). Werd echter bacterievrije cultuurvloei-stof van een goed gegroeide cultuur van B. fragilis of C. innocuum aan het medium toegevoegd, dan lag de beperkende potentiaal voor soort D en soort E ongeveer 50 mV hoger.

SUMMARY

The environmental factors which determine the composition of the resident intestinal flora are discussed in Chapter I. From an ecological point of view, the redox potential is one of the most important of factors. Because the redox potential in the cecum of conventional animals is low, the resident flora consists of obligate and facultative anaerobes. The intestinal flora itself maintains a low redox potential as appears from the fact that the potential in germ-free mice is 200 mV higher than in conventional animals. This investigation deals with the relationship between redox potential and colonization of obligately anaerobic bacteria and with changes in redox potentials resulting from colonization by these bacteria. Chapter II presents the arguments for performing various experiments and literature data on the calculation and measurements of the redox potential.

In the experiment the following bacterial species, isolated from CRF-mice, were used: Clostridium innocuum, Clostridium ramosum, Propionibacterium acnes, Bacteroides fragilis and two spore-forming species (D and E), both belonging to the so-called "tapered anaerobes" or "tapered rods". All species are members of the resident intestinal flora of mice and obligately anaerobic with the exception of P. acnes, which is aerotolerant. Chapter III describes these species and the various experimental designs.

Two experiments are described in Chapter IV. The first experiment was carried out to determine the redox potential in various parts of the gastrointestinal tract. In conventional mice the potential is high in the stomach and decreases gradually towards the cecum; where the potential reaches its lowest value i.e. - 200 mV. In germ-free animals the redox potentials are more or less equal in various parts of the intestinal tract. The potential in the cecum is + 40 mV. The second experiment was performed to determine if the high potential in the intestinal tract of germ-free mice interferes with the colonization by anaerobes. Germ-free mice were contaminated with the 6 bacterial CRF species as well as with Escherichia coli. After 3 weeks, the cecal flora was cultured and the redox potentials were measured. It was found that

C. innocuum, C. ramosum, P. acnes, B. fragilis and E. coli had colonized the animals and were present in large numbers in the cecum (10^9 - 10^{10} /g). The redox potentials in the cecum of these monocontaminated mice were 280 (C. innocuum), 220 (B. fragilis), 190 (C. ramosum), and 130 (E. coli) mV lower than in germ-free mice. The establishment of P. acnes in the cecum had no effect on the redox potential. Species D and E rarely colonized germ-free mice. However, if the cecal potential had been decreased, by previous contamination with other anaerobes like B. fragilis or C. innocuum, species D and E colonized easily. This justifies the conclusion that the redox potential in the cecum of germ-free mice is too high to meet the growth requirements of the tapered anaerobes. The order in which various bacteria settle in the gastrointestinal tract of new-born conventional mice was investigated in the experiments described in Chapter V. Shortly after birth, enterococci and lactobacilli were present in the cecum. Tapered anaerobes, however, did not appear before the 7th or 8th day. It was found that the redox potential in the cecum of 4 to 14 day old mice gradually decreased with age from a level equal to that of germ-free mice to values corresponding to those in adult conventional animals. Tapered anaerobes did not colonize until the redox potential was lowered to values 75 mV below the initial value. The mice were 7 to 10 days old at that time. The tapered anaerobes rapidly increased in number and 12 to 14 days after birth attained values of 10^{10} /g. In addition to the decrease of the redox potential solid food, which gradually replaces milk in the second week after birth, probably also contributes to the explosive growth and the maintenance of large numbers of tapered rods.

Chapter VI describes an experiment to determine the order in which CRF bacteria colonize germ-free mice when the route of transmission is by air. B. fragilis first invaded the cecum of germ-free mice and was followed almost immediately by C. ramosum. The establishment of these species led to a decrease of 100 to 200 mV in the redox potential. Not until then did the first tapered anaerobes appear. It was concluded from this experiment that decrease of redox potentials is a prerequisite for the establishment of tapered anaerobes when CRF organisms are transmitted by air.

A study of the in vitro behaviour of the 6 CRF species is dealt with in Chapter VII. For this study a culture vessel was designed in which anaerobic conditions could be maintained and pH and redox potential could be measured during growth. All species, except P. acnes, decreased the redox potential of the medium and their in vitro and in vivo behaviour, with respect to redox potential was therefore similar. The limiting potentials at which B. fragilis, C. ramosum and the tapered anaerobes would start to grow were also determined. The limiting potentials of B. fragilis and C. ramosum were found to be high (+ 200 mV). The potentials which permitted growth of the tapered anaerobes were much lower i.e. c. + 10 mV. This value is well below the potential of the germ-free cecum. The in vitro data thus support the conclusion that the establishment of tapered anaerobes is determined to a large extent by the redox potential of the ecological niche. The limiting potential was found to be influenced by cell-free materials, since for the tapered anaerobes it was 50 mV higher when the medium was enriched with cell-free extracts from cultures of B. fragilis or C. innocuum.

CURRICULUM VITAE

De schrijfster van dit proefschrift begon in 1960, na het behalen van het einddiploma HBS-B, te Utrecht haar biologiestedie. In 1967 legde zij haar doctoraallexamen af, met als hoofdvakken Biohistorie en Plantensystematiek en als bijvak Microbiologie.

Van november 1967 tot februari 1973 was zij als wetenschappelijk medewerkster verbonden aan de afdeling Medische Microbiologie van de Medische Faculteit te Rotterdam.

Prof. Dr. F. Wensinck, mijn promotor, die mij heeft ingewijd in de problematiek der anaerobiose, dank ik hartelijk voor zijn interesse en hulp tijdens het onderzoek en het op schrift stellen daarvan.

Prof. Dr. W.C. Hülsman en Dr. D. van der Waay hebben dit proefschrift kritisch beoordeeld. Dr. van der Waay stelde proefdieren, equipment en ruimte in zijn laboratorium beschikbaar in de tijd dat wij daar zelf nog niet over konden beschikken. Ook heeft hij het mogelijk gemaakt om op het Radiobiologisch Instituut vertrouwd te raken met de techniek van het kiemvrij kweken van muizen.

Mevr. P.A.J. Poppelaars-Kustermans is met haar helder inzicht en haar enthousiasme een onmisbare hulp geweest bij de uitvoering van de experimenten.

Ir. R.I. Seyffers is tijdens het gehele onderzoek behulpzaam geweest bij het aankopen van apparatuur en het goed laten functioneren van de proefopstellingen. De inspirerende discussies, die ik met hem hebben mocht, hebben dikwijls zeer verhelderend gewerkt.

Mevr. A.C. Kock-van Dalen heeft gezorgd voor een nauwgezette uitvoering van biochemische bepalingen.

Mevr. Dr. I. Banerjee-Schotsman en mevr. L.M.C. Custers-van Lieshout hebben geholpen met het opzetten en instandhouden van de isolatoren met kiemvrije muizen, hetgeen dikwijls een, letterlijk, zware taak was. De heer B.A.J. Cohen heeft zorggedragen voor de Engelse vertaling van de samenvatting.

De medewerkers van de Audiovisuele Dienst hebben de in dit proefschrift opgenomen tekeningen en grafieken vervaardigd.

Mej. M.P. Lamers heeft het op zich genomen het manuscript persklaar te maken. Haar vaardigheid bij het typen en haar hulp bij het maken van de uiterlijke vormgeving hebben er veel toe bijgedragen dat het geheel uiteindelijk in deze vorm gepresenteerd kan worden.

Allen, ook hen die ik hier niet genoemd heb, dank ik hartelijk voor hun medewerking bij het tot stand brengen van dit proefschrift.