

Aus dem Institut für Tierernährung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Einfluss der Verfütterung des Probiotikums *E. faecium* NCIMB 10415 im
frühen postnatalen Stadium auf die Zusammensetzung und
Stoffwechselaktivität der gastrointestinalen Mikrobiota bei Ferkeln**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Irina Klär (geb. Gordeeva)

Tierärztin aus Dzerzhinsk, Russische Föderation

Berlin 2008

Journal-Nr.: 3227

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Leo Brunnberg
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Ortwin Simon
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Lothar H. Wieler
Dritter Gutachter: Prof. Dr. Karl-Heinz Lahrmann

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

pigs, piglet feeding, feed additives, probiotics, Enterococcus faecium, digestive tract, microbial flora, polymerase chain reaction, electrophoresis, lactic acid, ammonia, fatty acid

Tag der Promotion: 13.10.2008

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-86664-494-6

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2008

Dissertation, Freie Universität Berlin

D188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© **mbv** 2008

Nordendstr. 75 - 13156 Berlin – 030-45494866
verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Meiner Familie

INHALT

EINLEITUNG	1
1. DIE MAGEN-DARM-MIKROBIOTA ALS KOMPLEXES MIKROÖKOLOGISCHES SYSTEM	4
1.1 Komponenten des mikrobiellen Ökosystems	4
1.1.1 Mikrohabitate	5
1.1.2 Diversität der Magen-Darm-Mikrobiota	6
1.1.3 Lebensfähigkeit der Bakterien	9
1.2 Interaktionen zwischen Makro- und Mikroorganismus.....	10
1.3 Entwicklung der intestinalen Mikrobiota beim Schwein	20
1.3.1 Erstbesiedlung	20
1.3.2 Saugphase.....	24
1.3.3 Absetzen	27
1.4 Einfluss von Probiotika auf die Entwicklung der intestinalen Mikrobiota	30
1.4.1 Definition	30
1.4.2 Wirkungsmechanismen	31
1.4.3 Anwendungsgebiete	33
1.4.4 <i>Enterococcus faecium</i> NCIMB 10415 als Probiotikum.....	34
2. MATERIALIEN UND METHODEN	36
2.1 Fütterungsversuch.....	36
2.1.1 Tiere und Tierhaltung.....	36
2.1.2 Fütterung	36
2.1.3 Probenentnahme	38
2.2 Bestimmung und Optimierung der analytischen Auflösung der Real-Time PCR- Assays	39
2.2.1 Herstellung des Quantifizierungsstandards	40
2.2.1.1 Kultivierung der Referenzstämmen	40
2.2.1.2 Beimpfung der Faeces-Proben	41
2.2.1.3 Überprüfung des Quantifizierungsstandards auf koloniebildende Einheiten... ..	42
2.2.1.4 Gewinnung bakterieller DNA aus den Standard-Proben	42
2.2.2 Durchführung der Real-Time PCR	44
2.2.2.1 Verwendete Primer.....	44
2.2.2.2 Reaktionsbedingungen	46
2.2.2.3 Auswertung	48
2.2.3 Optimierungsstrategie	48
2.3 Untersuchung der gastrointestinalen Proben von Versuchstieren	49
2.3.1 Vorbereitung der Proben für die DNA-basierte Analyse	49
2.3.1.1 Gewinnung bakterieller DNA	49
2.3.1.2 Bestimmung der DNA-Konzentration	49
2.3.2 Quantifizierung der Bakterien mittels validierter Real-Time PCR.....	51
2.3.2.1 Primer und Reaktionsbedingungen	51
2.3.2.2 Auswertung	52

2.3.3 Bestimmung bakterieller Diversität mittels DGGE	52
2.3.3.1 Durchführung der DGGE	52
2.3.3.2 Densitometrische Auswertung des Gels	56
2.3.3.3 Berechnung ökologischer Indizes	59
2.3.4 Bestimmung mikrobieller Metaboliten	62
2.3.4.1 Laktat	62
2.3.4.2 Ammoniak	62
2.3.4.3 Flüchtige Fettsäuren	63
2.4 Datenverarbeitung und Statistik	63
3. ERGEBNISSE	65
3.1 Analytische Charakteristika der Real-Time PCR-Assays.....	65
3.1.1 Zusammensetzung der Kalibrier-Proben.....	65
3.1.2 Überprüfung der Kalibrier-Proben auf koloniebildende Einheiten.....	65
3.1.3 Optimierung der PCR-Bedingungen	66
3.1.3.1 Spezifität der Real-Time PCR Assays	67
3.1.3.2 Sensitivität der Real-Time PCR Assays.....	69
3.1.4 Vergleich von Real-Time PCR und klassischer Kultivierung	71
3.1.5 Zusammenfassung zur Optimierung der Real-Time PCR Assays	71
3.2 Quantifizierung des probiotischen <i>E. faecium</i> NCIMB 10415 im Magen-Darm-Trakt der Ferkel	72
3.3 Einfluss des probiotischen <i>E. faecium</i> NCIMB 10415 auf die mikrobielle Besiedlung des Magens der Ferkel	75
3.3.1 Gesamte eubakterielle Zellzahlen	75
3.3.2 Diversität der gesamten bakteriellen 16S rDNA-Population	76
3.3.3 Ähnlichkeit der gesamten bakteriellen 16S rDNA-Population	77
3.3.4 Quantität der dominanten bakteriellen Gruppen	78
3.3.5 Quantität der einzelnen Stämme	81
3.3.6 Laktat.....	86
3.4 Einfluss des probiotischen <i>E. faecium</i> NCIMB 10415 auf die mikrobielle Besiedlung des distalen <i>Jejunums</i> der Ferkel	89
3.4.1 Gesamte eubakterielle Zellzahlen	89
3.4.2 Diversität der eubakteriellen 16S rDNA-Population im distalen <i>Jejunum</i> der Ferkel.....	90
3.4.3 Ähnlichkeit der gesamten bakteriellen 16S rDNA-Population im distalen <i>Jejunum</i> der Ferkel.....	92
3.4.4 Quantität der dominanten bakteriellen Gruppen	93
3.4.5 Quantität von <i>Lactobacillus spp.</i> - und <i>Enterococcus spp.</i> -Arten.....	96
3.4.6 Laktat.....	100
3.4.7 Ammoniumionen-Konzentration	101
3.4.8 Flüchtige Fettsäuren	102
3.4.9 Zusammenfassung Jejunum	106
3.5 Einfluss des probiotischen <i>E. faecium</i> NCIMB 10415 auf die mikrobielle Besiedlung des <i>Colon ascendens</i> der Ferkel	108
3.5.1 Gesamte eubakterielle Zellzahlen	108
3.5.2 Diversität der gesamten bakteriellen 16S rDNA-Population im <i>Colon ascendens</i> der Ferkel.....	109

3.5.3 Ähnlichkeit der gesamten bakteriellen 16S rDNA-Population im <i>Colon ascendens</i> der Ferkel.....	110
3.5.4 Quantität der dominanten bakteriellen Gruppen	111
3.5.5 Quantität von <i>Lactobacillus spp.</i> - und <i>Enterococcus spp.</i> -Arten.....	114
3.5.6 Laktat.....	119
3.5.8 Konzentration von flüchtigen Fettsäuren im <i>Colon ascendens</i>	120
3.5.9 Zusammenfassung <i>Colon ascendens</i>	125
4. DISKUSSION	127
4.1 Methodenkritik.....	127
4.2 <i>E. faecium</i> NCIMB 10415 im Magen-Darm-Trakt der Ferkel	133
4.3 Einfluss des probiotischen <i>E. faecium</i> NCIMB 10415 auf die Zusammensetzung der Magen-Darm-Mikrobiota der Ferkel	139
4.4 Einfluss des probiotischen <i>E. faecium</i> NCIMB 10415 auf die bakterielle Stoffwechselaktivität der Magen-Darm-Mikrobiota der Ferkel	152
5. ZUSAMMENFASSUNG	156
6. SUMMARY.....	159
LITERATUR	162
ANHANG	182

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Auswertung des Quantitative Plate Read-Experiment und Berechnung der DNA-Konzentration	51
Abb. 2: Quantifizierung des probiotischen <i>E. faecium</i> NCIMB 10415 im Magen, distalen <i>Jejunum</i> und <i>Colon ascendens</i> von Ferkeln der Probiotikum-Gruppe	73
Abb. 3: Gehalt der extrahierten DNA und der eubakteriellen 16S rDNA im Magen der Versuchsferkel.....	76
Abb. 4: Diversität der bakteriellen 16S rDNA-Populationen im Magen der Versuchsferkel.....	77
Abb. 5: Sörensen-Ähnlichkeitswerte der bakteriellen 16S rDNA-Populationen im Magen der Versuchsferkel, innerhalb und zwischen den Fütterungsgruppen	78
Abb. 6: Populationen von <i>Lactobacillus spp.</i> und <i>Enterococcus spp.</i> im Magen der Versuchsferkel.....	79
Abb. 7: Populationen von <i>Escherichia spp.</i> und <i>Bifidobacterium spp.</i> im Magen der Versuchsferkel.....	81
Abb. 8: Populationen von <i>L. amylovorus</i> und <i>L. johnsonii</i> im Magen der Versuchsferkel.....	83
Abb. 9: Populationen von <i>L. mucosae</i> und <i>L. reuteri</i> im Magen der Versuchsferkel	84
Abb. 10: Laktat im Magen der Versuchsferkel	87
Abb. 11: Gehalt der extrahierten DNA und der eubakteriellen 16S rDNA im distalen <i>Jejunum</i> der Versuchsferkel	90
Abb. 12: Diversität der bakteriellen 16S rDNA-Populationen im distalen <i>Jejunum</i> der Versuchsferkel.....	91
Abb. 13: Sörensen-Ähnlichkeitswerte der bakteriellen 16S rDNA-Populationen im distalen <i>Jejunum</i> der Versuchsferkel innerhalb und zwischen den Fütterungsgruppen.....	92
Abb. 14: Populationen von <i>Lactobacillus spp.</i> und <i>Enterococcus spp.</i> im distalen <i>Jejunum</i> der Versuchsferkel	94
Abb. 15: Populationen von <i>Escherichia spp.</i> und <i>Bifidobacterium spp.</i> im distalen <i>Jejunum</i> der Versuchsferkel	95
Abb. 16: Populationen von <i>L. amylovorus</i> und <i>L. johnsonii</i> im distalen <i>Jejunum</i> der Versuchsferkel.....	97
Abb. 17: Populationen von <i>L. mucosae</i> und <i>L. reuteri</i> im distalen <i>Jejunum</i> der Versuchsferkel.....	98
Abb. 18: Laktat im distalen <i>Jejunum</i> der Versuchsferkel	101
Abb. 19: Ammoniumionen-Gehalt im distalen <i>Jejunum</i> der Versuchsferkel	102
Abb. 20: Gehalt von flüchtigen Fettsäuren im distalen <i>Jejunum</i> der Versuchsferkel	102
Abb. 21: Gehalt der extrahierten DNA und der eubakteriellen 16S rDNA im <i>Colon ascendens</i> der Versuchsferkel	108
Abb. 22: Diversität der bakteriellen 16S rDNA-Populationen im <i>Colon ascendens</i> der Versuchsferkel.....	110
Abb. 23: Sörensen-Ähnlichkeitswerte der bakteriellen 16S rDNA-Populationen im <i>Colon ascendens</i> der Versuchsferkel innerhalb und zwischen den Fütterungsgruppen.....	111

ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS

Abb. 24: Populationen von <i>Lactobacillus spp.</i> und <i>Enterococcus spp.</i> im <i>Colon ascendens</i> der Versuchsferkel	112
Abb. 25: Populationen von <i>Escherichia spp.</i> und <i>Bifidobacterium spp.</i> im <i>Colon ascendens</i> der Versuchsferkel	114
Abb. 26: Populationen von <i>L. amylovorus</i> und <i>L. johnsonii</i> im <i>Colon ascendens</i> der Versuchsferkel.....	116
Abb. 27: Populationen von <i>L. mucosae</i> und <i>L. reuteri</i> im <i>Colon ascendens</i> der Versuchsferkel.....	117
Abb. 28: Laktat im <i>Colon ascendens</i> der Versuchsferkel	119
Abb. 29: Ammoniumionen-Gehalt im <i>Colon ascendens</i> der Versuchsferkel	120
Abb. 30: Gehalt von flüchtigen Fettsäuren im <i>Colon ascendens</i> der Versuchsferkel.....	121
Abb. A1: DGGE-Profile der eubakteriellen 16S rDNA-Populationen im Magen der Ferkel vor- und nach dem Absetzen.....	192
Abb. A2: DGGE-Profile der eubakteriellen 16S rDNA-Populationen im distalen Jejunum der Ferkel vor- und nach dem Absetzen	199
Abb. A3: DGGE-Profile der eubakteriellen 16S rDNA-Populationen im <i>Colon ascendens</i> der Ferkel vor- und nach dem Absetzen	206

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1: Bakterielle Diversität der porcinen <i>Ileum</i> -, <i>Cecum</i> - und <i>Colon</i> -Mikrobiota auf dem Phylum-, Gattungs- und Spezies-Niveau nach LESER et al. (2002).....	8
Tab. 2: Charakteristika einiger morphologischer, physiologischer und biochemischer Prozesse im Darm gnotobiotischer Nagetiere im Vergleich mit konventionellen Nagetieren nach BERG (1996)	12
Tab. 3: Bakterielle Besiedlung der Faeces von Saugferkeln [Log KBE/g] nach STROMPFOVA et al. (2006).....	25
Tab. 4: Risikofaktoren des Absetzensphase nach LALLES et al. (2004).....	28
Tab. 5: Zusammensetzung des Sauen- und Ferkelfutters.....	37
Tab. 6: Fütterungsvarianten hinsichtlich des Probiotikagehalts.....	38
Tab. 7: Cylactin®-Dosierung und entsprechende Konzentrationen des <i>Enterococcus faecium</i> NCIMB 10415	38
Tab. 8: Gruppen und speziesspezifische Oligonukleotide für Detektion der ausgewählten Bakterien	45
Tab. 9: Zusammensetzung verwendeter kommerzieller Master-Mixe.....	46
Tab. 10: Pipettierschemata der Real-Time PCR-Ansätze	47
Tab. 11: Standard-Temperaturprogramm einer Real-Time PCR	47
Tab. 12: Zusammensetzung des Master-Mixes für die Bestimmung der DNA-Konzentration	50
Tab. 13: Primer und Reaktionsbedingungen	52
Tab. 14: Erstellung der denaturierenden Gradienten.....	55
Tab. 15: Begriffe der Populationstatistik und entsprechende Phoretix-Äquivalente für die Berechnung der Diversitätsindizes.....	60
Tab. 16: Zusammensetzung der Standard-Proben.....	65

ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 17: Wiederfindungsraten bei der klassischen Kultivierung	66
Tab. 18: Spezifität der gruppenspezifischen Real-Time PCR-Assays für die Referenzstämme	68
Tab. 19: Sensitivitätsparameter der gruppenspezifischen Real-Time PCRs für die Standard-Proben	69
Tab. 20: Sensitivität der speziesspezifischen Real-Time PCRs für die Standard-Proben.....	70
Tab. 21: Zelldichte der <i>E. faecium</i> - und <i>E. faecalis</i> -Population im Magen der Ferkel.....	85
Tab. 22: Zelldichte der <i>E. faecium</i> - und <i>E. faecalis</i> -Population im distalen <i>Jejunum</i> der Versuchsferkel.....	99
Tab. 23: Essigsäure-Gehalt im distalen <i>Jejunum</i> der Versuchsferkel	103
Tab. 24: Propionsäure-Gehalt im distalen <i>Jejunum</i> der Versuchsferkel	103
Tab. 25: n-Buttersäure-Gehalt im distalen <i>Jejunum</i> der Versuchsferkel	104
Tab. 26: n-Valeriansäure-Gehalt im <i>Jejunum</i> der Versuchsferkel	104
Tab. 27: i-Buttersäure-Gehalt im distalen <i>Jejunum</i> der Versuchsferkel	105
Tab. 28: i-Valeriansäure-Gehalt im distalen <i>Jejunum</i> der Versuchsferkel	105
Tab. 29: Zelldichte der <i>E. faecium</i> -/ <i>E. faecalis</i> -Population im <i>Colon ascendens</i> der Versuchsferkel.....	118
Tab. 30: Essigsäure-Gehalt im <i>Colon ascendens</i> der Versuchsferkel	121
Tab. 31: Propionsäure-Gehalt im <i>Colon ascendens</i> der Versuchsferkel.....	122
Tab. 32: n-Buttersäure-Gehalt im <i>Colon ascendens</i> der Versuchsferkel	123
Tab. 33: n-Valeriansäure-Gehalt im <i>Colon ascendens</i> der Versuchsferkel	123
Tab. 34: i-Buttersäure-Gehalt im <i>Colon ascendens</i> der Versuchsferkel	124
Tab. 35: i-Valeriansäure-Gehalt im <i>Colon ascendens</i> der Versuchsferkel	124
Tab. 36: Korrelation von L(+) und D(-)-Laktat in Magen, <i>Jejunum</i> und <i>Colon ascendens</i> .	153
Tab. A1: Zusammensetzung des Prämixes (pro kg Hauptfutter)	182
Tab. A2: Materialien für die Herstellung des Real-Time PCR- Quantifizierungsstandards.	183
Tab. A3: Referenzstämme und Kultivierungsbedingungen	184
Tab. A4: Zusammensetzung der Nährmedien für die Kultivierung der Referenzstämme	185
Tab. A5: Zusammensetzung und Zubereitung der Selektivmedien	187
Tab. A6: Zusammensetzung der GITC- und Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung.....	188
Tab. A7: Verwendete Materialien für die Durchführung der Real-Time PCR.....	188
Tab. A8: Verwendete Materialien für die Durchführung der DGGE.....	189
Tab. A9: Verwendete Lösungen für die Durchführung der DGGE und der Färbung des fertigen Gels	190
Tab. A10: Kolonisierung des gastrointestinalen Trakts der Ferkel mit dem probiotischen <i>E. faecium</i> NCIMB 10415.....	191
Tab. A11: Gehalt der extrahierten DNA und Zelldichte der eubakteriellen 16S rDNA-Population im Magen der Versuchsferkel.....	192
Tab. A12: Diversität der bakteriellen Gemeinschaften (<i>Richness</i> und <i>Evenness</i>) im Magen der Versuchsferkel	193
Tab. A13: Sörensen-Ähnlichkeitswerte der bakteriellen Gemeinschaften im Magen der Versuchsferkel	193
Tab. A14: Populationen von <i>Lactobacillus spp.</i> und <i>Enterococcus spp.</i> im Magen der Versuchsferkel.....	194

Tab. A15: Populationen von <i>Escherichia spp.</i> und <i>Bifidobacterium spp.</i> im Magen der Versuchsferkel.....	195
Tab. A16: Populationen von <i>L. acidophilus</i> , <i>L. amylovorus</i> und <i>L. johnsonii</i> im Magen der Versuchsferkel.....	196
Tab. A17: Populationen von <i>L. mucosae</i> und <i>L. reuteri</i> im Magen der Versuchsferkel.....	197
Tab. A18: Gesamt-Laktat im Magen der Versuchsferkel	198
Tab. A19: Gehalt von L(+)- und D(-)-Isomeren des Laktats im Magen der Versuchsferkel	198
Tab. A20: Gehalt der extrahierten DNA und Zelldichte der eubakteriellen 16S rDNA-Population im distalen <i>Jejunum</i> der Versuchsferkel	199
Tab. A21: Diversität der bakteriellen Gemeinschaften (<i>Richness</i> und <i>Evenness</i>) im distalen <i>Jejunum</i> der Versuchsferkel.....	200
Tab. A22: Sörensen-Ähnlichkeitswerte der bakteriellen Gemeinschaften im distalen <i>Jejunum</i> der Versuchsferkel	200
Tab. A23: Populationen von <i>Lactobacillus spp.</i> und <i>Enterococcus spp.</i> im distalen <i>Jejunum</i> der Versuchsferkel	201
Tab. A24: Populationen von <i>Escherichia spp.</i> und <i>Bifidobacterium spp.</i> im distalen <i>Jejunum</i> der Versuchsferkel	202
Tab. A25: Populationen von <i>L. acidophilus</i> , <i>L. amylovorus</i> und <i>L. johnsonii</i> im distalen <i>Jejunum</i> der Versuchsferkel	203
Tab. A26: Populationen von <i>L. mucosae</i> und <i>L. reuteri</i> im distalen <i>Jejunum</i> der Versuchsferkel	204
Tab. A27: Gesamt-Laktat im distalen <i>Jejunum</i> der Versuchsferkel	205
Tab. A28: Gehalt von L(+)- und D(-)-Isomeren des Laktats im distalen <i>Jejunum</i> der Versuchsferkel.....	205
Tab. A29: Ammoniumionen-Gehalt im distalen <i>Jejunum</i> der Versuchsferkel	205
Tab. A30: Gehalt der extrahierten DNA und Zelldichte der eubakteriellen 16S rDNA-Population im <i>Colon ascendens</i> der Versuchsferkel.....	206
Tab. A31: Diversität der bakteriellen Gemeinschaften im <i>Colon ascendens</i> der Versuchsferkel.....	207
Tab. A32: Sörensen-Ähnlichkeitswerte der bakteriellen Gemeinschaften im <i>Colon ascendens</i> der Versuchsferkel	207
Tab. A33: Populationen von <i>Lactobacillus spp.</i> und <i>Enterococcus spp.</i> im <i>Colon ascendens</i> der Versuchsferkel	208
Tab. A34: Populationen von <i>Escherichia spp.</i> und <i>Bifidobacterium spp.</i> im <i>Colon ascendens</i> der Versuchsferkel	209
Tab. A35: Populationen von <i>L. acidophilus</i> , <i>L. amylovorus</i> und <i>L. johnsonii</i> im <i>Colon ascendens</i> der Versuchsferkel	210
Tab. A36: Populationen von <i>L. mucosae</i> und <i>L. reuteri</i> im <i>Colon ascendens</i> der Versuchsferkel.....	211
Tab. A37: Gesamt-Laktat im <i>Colon ascendens</i> der Versuchsferkel	212
Tab. A38: Gehalt von L(+)- und D(-)-Isomeren des Laktats im <i>Colon ascendens</i> der Versuchsferkel.....	212
Tab. A39: Ammoniumionen-Gehalt im <i>Colon ascendens</i> der Versuchsferkel.....	213

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
a.p.	<i>ante partum</i> (vor dem Geburtszeitpunkt)
b	Basen
bp	Basenpaare
Ct	Zykluszahl während einer Real-Time PCR, bei der sich das Fluoreszenz-signal deutlich vom Hintergrund abhebt
CSB	Citrat-Sarcosin-Puffer
d	Tage (<i>days</i>)
D-/L-	rechts- bzw. linksdrehende Isomere vom Laktat
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
dpi	dots per inch
DSM/DSMZ	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
DGGE	denaturierende Gradientengelelektrophorese
DMPC	Dimethyl pyrocarbonate
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraacetat
et al.	<i>et alii</i> (weitere Autoren)
FM	Feuchtmasse
g	Erdbeschleunigung (<i>gravity</i> , bezeichnet Zentifugenkraft)
ggf.	gegebenenfalls
GIT	gastrointestinaler Trakt
GITC	Guanidin-Isothiocyanat
IgA, IgG	Immunglobulin A,G
i.d.R.	in der Regel
I.E./I.U.	internationale Einheiten (Units)
IL	Interleukin
KBE/g	koloniebildende Einheiten pro Gramm
Kb	Kilobasen
KG	Kontrollgruppe
Lg, Log10	Logarithmus
m	Meter
mg	Milligramm
M	Molar
Max.	Maximum
Min.	Minimum
mg/g	Milligramm pro Gramm
mM	milli-molar
ml/kg	Milliliter pro Kilogramm
mmol/L	Millimol pro Liter
min	Minute
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µg	Mikrogramm
NCIMB	National Collection of Industrial and Marine Bacteria (Scotland)
ng	Nanogramm
ng/µl	Nanogramm pro Mikroliter
nM	nano-molar
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PG	Probiotikum-Gruppe

pg/μl	Picogramm pro Mikroliter
pmol	Picomol
p.p.	<i>post partum</i> (nach der Geburt)
ROX	6-carboxy-X-rhodamine, Referenzfarbstoff bei einer Real-Time PCR
rDNA	ribosomale Desoxyribonucleinsäure
RNase	Ribonuclease
s, sec	Sekunde
s.	siehe
S.	Seite
spp.	Spezies
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Tab.	Tabelle
UpM	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
vs.	<i>versus</i> (gegen)
vgl.	vergleiche

EINLEITUNG

Der gastrointestinale Trakt der Säugetiere wird von tausenden Millionen von Mikroorganismen kolonisiert, deren Zahl um den Faktor 10 höher liegt als die der körpereigenen Zellen (BÄCKHED et al., 2005). Vermutlich sind ca. 90% aller Zellen des Körpers mikrobieller Herkunft (EGERT et al., 2006). Die Kodierungsfähigkeit des gesamten mikrobiellen Genoms (od. *microbiom*) ist dabei erheblich größer als die des Genoms der Säugetiere und kodiert biochemische Stoffwechselwege, die im Wirtsgenom nicht vorhanden, aber lebenswichtig sind, wie etwa die Fermentation von Glukanen (MAGALHAES et al., 2007).

Der Charakter der Interaktionen zwischen den Bakterien und dem Organismus der Säugetiere ist sehr komplex und noch nicht vollständig entschlüsselt, wird aber von vielen Forschern als mutualistisch bezeichnet (BÄCKHED et al., 2005; DETHLEFSEN et al., 2007; LEY et al., 2006). So können zum Beispiel einerseits die Zusammensetzung und funktionelle Aktivität der bakteriellen Populationen durch einzelne Komponenten des lokalen mukosalen Immunsystems („*pattern recognition*“-Rezeptoren) beeinflusst werden, die gleichzeitig die Eliminierung unerwünschter Spezies und die Persistenz autochtoner Bakterien erlauben (KELL et al., 1998; MAGALHAES et al., 2007). Andererseits können Bakterien *per se* regulativ auf den Wirtsorganismus wirken: *Bacteroides thetaiotaomicron* etwa kann die Expression der Gene in den Epithelzellen fördern, die für verschiedene physiologische Funktionen wie Absorption und Immunantwort verantwortlich sind (HOOPER & GORDON, 2001). Nicht zuletzt hängen Bakterien-Wirt-Interaktionen von den Interaktionen zwischen einzelnen Mitgliedern innerhalb der bakteriellen Populationen ab. Aufgrund der Existenz von „Selbstmord“-Genen (*sok/hok*) bei manchen Bakterien und der Expression von Autolysinen oder Bakteriozinen können bakterielle Gemeinschaften hinsichtlich der Lebensfähigkeit und metabolischen Aktivität eine gewisse Heterogenität aufweisen (KELL et al., 1998; APAJALAHTI et al., 2003; BENAMOR et al., 2005). Die Mikrobiota kann dabei sowohl metabolisch aktive Zellen als auch lebendige aber nicht kultivierbare (*viable but non-culturable*, VBNC), physiologisch aktive aber nicht kultivierbare (*active but non-culturable*, ABNC) sowie tote Zellen erhalten (YAMAMOTO, 2000).

Einer von vielen Faktoren, die die Komplexität des gastrointestinalen Mikroökosystems bzw. dessen Wechselwirkungen mit dem Wirtsorganismus beeinflussen, ist die hohe Diversität bakterieller Gemeinschaften. Neueren Studien zufolge, die auf der 16S rRNA-Analyse basieren, können mehr als 1000 verschiedene Spezies den Darm der Säugetiere besiedeln. Davon können bis zu 80% zu den bis jetzt nicht kultivierbaren Spezies mit nur zu geringem Teil verstandenen Funktionen, Wechselwirkungen und Potenzialen gehören (DETHLEFSEN et al.,

2007). Am intensivsten werden derzeit Zusammensetzung und Diversität der luminalen bakteriellen Gemeinschaften des Dickdarms untersucht, was aber aufgrund der Existenz mehrerer einzigartiger und von einander verschiedener Makro- und Mikrohabitate innerhalb des Verdauungstraktes („räumlicher Gradient“ EGERT et al., 2006) keinen Aufschluss auf die Mikrobiota der vorderen Abschnitte (Magen, Dünndarm) oder der Schleimhäute gibt (FRETTER 1992; MACFARLANE & DILLON 2007; ZOETENDAL et al., 2002; ECKBURG et al., 2005).

Allerdings beeinflusst nicht nur der räumliche, sondern auch der zeitliche Gradient die Komplexität und die metabolische Aktivität der intestinalen Mikroökosystems: Während des Lebens des Makroorganismus (hier: des Schweins) entwickeln sich die bakteriellen Gemeinschaften von einer einfachen und labilen Mikrobiota in der neonatalen Phase zu einer komplexen und stabilen bakteriellen Besiedlung während des erwachsenen Lebens (MACKIE et al., 1999; EGERT et al., 2006). Die Entwicklung der gastrointestinalen Mikrobiota des Schweins ist dabei nicht nur ein komplexer, sondern auch ein sehr dynamischer Prozess: Unter konventionellen Bedingungen werden Ferkel in der dritten bis vierten Lebenswoche von der Mutter abgesetzt und die Milchdiät durch ein Festfutter ersetzt. Diese Ereignisse sind sowohl mit der drastischen morphologischen und immunologischen Reifung des gastrointestinalen Traktes als auch mit der Veränderung der Zusammensetzung und der Stoffwechselaktivität der gastrointestinalen Mikrobiota verbunden (INOUE et al., 2005). Die bedeutsamsten Folgen des Absetzens und des Diätwechsels für das Tier sind Stress und eine darauf folgende hohe Durchfallinzidenz (bis zu 52%) sowie eine möglicherweise höhere Sterblichkeit (JONSSON & CONWAY, 1992; KATOULI & WALLGREEN, 2005).

Vor diesem Hintergrund werden seit Jahrzehnten verschiedene Mittel entwickelt, welche die Mikrobiota des Darms der Säugetiere bzw. der Schweine (auch in der frühen neonatalen Phase) günstig beeinflussen und stabilisieren sollen. Die Anwendung von Probiotika, die zu diesen Mitteln gehören, zielt in der Landwirtschaft vor allem auf die Verbesserung der Leistungsparameter der Tiere; Probiotika werden dort in geringerem Maße als Therapeutika eingesetzt. Das seit 2006 in Kraft befindliche EU-Verbot antibiotischer Leistungsförderer und die mehrfach nachgewiesene signifikante Reduzierung der Durchfälle bei abgesetzten Ferkeln hat Probiotika zu einem attraktiven Futterzusatzstoff in der Schweineernährung gemacht, wobei allerdings hinsichtlich vieler anderer Leistungsparameter (Futterverwertung, Gewichtszunahme), die ebenso die wirtschaftliche Effizienz der Schweinezucht bestimmen, nur selten signifikante Effekte beobachtet werden (FULLER, 1999; SIMON, 2005; TARAS et al., 2005, 2007). Von besonderem Interesse ist dabei die Teilnahme der probiotischen Bakterien an der

Verdauung von Nahrungssubstraten, die unmittelbar die Futterverwertung bzw. Gewichtszunahme beim Tier beeinflussen könnte. Obwohl die Monogastriden nicht zu den Tierarten gehören, bei denen die bakterielle Verdauung unabdingbarer Bestandteil der Ernährungsphysiologie ist (JEROCH et al., 1999), werden Laktat und flüchtige Fettsäuren – Endprodukte bakterieller Kohlenhydrat-Fermentation – entlang des gesamten gastrointestinalen Traktes von Schweinen (je nach Darmabschnitt in unterschiedlichen Konzentrationen) detektiert (SIMON, 2006). Über die quantitative Bedeutung des bakteriellen Nährstoffabbaus bei Schweinen stehen aber nur unzureichende Kenntnisse zur Verfügung. Ein möglicher Grund sind die oben gekennzeichnete Komplexität bzw. die immer noch mangelhaften Kenntnisse über die Zusammensetzung und die Wechselwirkungen des porcinen intestinalen Mikroökosystems, dessen Modifizierung allerdings als Hauptwirkungsmechanismus der Probiotika in der Tierernährung betrachtet wird.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss des probiotischen *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 auf die Milchsäuremikrobiota und ihre Stoffwechselaktivität im gastrointestinalen Trakt (Magen, distales *Jejunum* und *Colon ascendens*) von Ferkeln unter Zuhilfenahme molekularbiologischer Methoden – Real-Time PCR und DGGE – zu untersuchen. Ausgehend von der Hypothese, dass artverwandte bzw. das gleiche Habitat besiedelnde Bakterien am ehesten Kandidaten für einen probiotischen Einfluss sind, sollte vor allem die Population der Laktobazillen, die phylogenetisch mit den Enterokokken verwandt sind und einen wichtigen Teil der „gesunden“ gastrointestinalen Mikrobiota darstellen, auf einem qualitativen und quantitativen Niveau untersucht werden. Die Analyse sollte Aufschluss darüber geben, ob durch frühzeitigen Probiotikaeinsatz (ab dem 1. Lebenstag) die bakterielle Besiedlung von Ferkeln derart modifiziert werden kann, dass ihre Widerstandsfähigkeit gegen mögliche Krankheitserreger an kritischen Lebenspunkten (Wechsel der Diät, Absetzen) erhöht wird. Im Einzelnen sollten mit der Untersuchung folgende Ziele verfolgt werden:

1. Bestimmung und Verbesserung der Nachweisgrenzen der Real-Time PCR und DGGE für die Analyse der gastrointestinalen Mikrobiota beim Schwein;
2. Ermittlung der Überlebensfähigkeit des probiotischen *E. faecium* NCIMB 10415 in verschiedenen Bereichen des Verdauungstrakts (Magen, distales *Jejunum*, *Colon ascendens*) bei Ferkeln;
3. Qualitative und quantitative Charakterisierung der Mikrobiota sowie ihrer Stoffwechselaktivität (Laktat, Ammonium, flüchtige Fettsäuren) in verschiedenen Bereichen des Verdauungstrakts und in verschiedenen Lebensabschnitten (Saugperiode, Zeit um das Absetzen) bei Ferkeln nach Probiotikum-Gabe

1. DIE MAGEN-DARM-MIKROBIOTA ALS KOMPLEXES MIKRO-ÖKOLOGISCHES SYSTEM

1.1 Komponenten des mikrobiellen Ökosystems

Auf der Oberfläche und im Körper der Säugetiere existieren rund 10^{13} - 10^{14} mikrobielle Zellen. Diese bakteriellen Populationen werden als offene und dynamische Ökosysteme betrachtet, die sich in ständigen Interaktionen mit dem Makroorganismus befinden (LEY et al., 2006). Komponenten dieses mikrobiellen Ökosystems werden auch mithilfe einer Reihe ökologischer Termini beschrieben. So teilen MIKELSAAR et al. (2004) das gesamte mikrobielle Ökosystem in Mikrobiozenosen und Mikrobiotope ein. Haupteinheit des mikrobiellen Ökosystems ist dabei die Mikrobiozenose (od. Mikrobiota), die als „eine Gemeinschaft von qualitativ verschiedenen Gruppen von Mikroorganismen, die sich in dynamischen Fluktuationen befinden, aber relativ stabile quantitative Charakteristika haben“, beschrieben werden kann. Das Mikroökosystem enthält mehrere Mikrobiozenosen, die sich in bestimmten Lokalisationen des Wirts (mikrobielle Biotop, Nischen, Mikrohabitate) verorten lassen. Daraus folgt, dass das mikrobielle Biotop oder Mikrobiotop „ein Areal ist, das für Leben und Wachstum der Mikroorganismen geeignet ist“ (MIKELSAAR et al., 2004).

Laut KASSEN & RAINEY (2004) verläuft die bakterielle Besiedlung bestimmter Mikrohabitate nach den grundlegenden Prinzipien der Evolutionstheorie: Die Nischen des Makroorganismus sind nur mit denjenigen bakteriellen Spezies besiedelt, die sich im Zuge einer Selektion den Nische-spezifischen Bedingungen am besten angepasst haben. Solche Spezies werden als *autochton* oder *indigen* bezeichnet; zu ihren typischen Merkmalen gehören unter anderem die langfristige Assoziation mit dem Makroorganismus sowie das Verharren ihrer Populationsgröße auf einem bestimmten Niveau (SAVAGE, 1977). Die autochtonen Spezies bilden außerdem innerhalb der Nische eine Gemeinschaft (*climax community*, SAVAGE, 1977), in welcher jede bakterielle Art nur eine bestimmte Zelldichte erreichen kann und deren Zusammensetzung bzw. Funktionen sich oft von den Gemeinschaften anderer Mikrohabitate deutlich unterscheiden. Eine der wichtigsten Funktionen autochtoner Bakterien ist das Ermöglichen der Kolonisationsresistenz (BERG, 1996; ZOETENDAL et al., 1998). Eine weitere Komponente des mikrobiellen Ökosystems sind Bakterien, die aus der Umwelt in den Makroorganismus gelangen und als *allochton* bezeichnet werden. Sie treten normalerweise nur vorübergehend auf und gehen keine Interaktionen mit dem Mikrohabitat ein. In einigen Fällen, wie z.B. bei Störungen des bakteriellen Gleichgewichtes, können diese Spezies jedoch die Mikrohabitate autochtoner Bakterien besiedeln, was zur Expression pathogener Faktoren führen kann (DETHLEFSEN et al., 2007).

Die Einteilung der Bakterien in autochtone und allochtone Spezies wird allerdings von zahlreichen Autoren kritisiert. So vermerkt WALTER (2005), dass aufgrund der Einmaligkeit einiger Mikrohabitate autochtone Spezies eines Habitats (z.B. Peristaltik des Darms) für andere Nischen allochton sein können. Besonders schwer sind beide Typen von Bakterien in der frühen postnatalen Phase zu unterscheiden, während der große Fluktuationen in der Diversität der Mikrobiota sowie die Herausbildung neuer Mikrohabitate erfolgen (VANBELLE et al., 1990).

1.1.1 Mikrohabitate

Durch die anatomischen und histologischen Besonderheiten des gastrointestinalen Trakts werden verschiedene, oft einzigartige Mikrobiotope für die Mikrobiota etabliert und dadurch auch in ihrer ganzen Zusammensetzung und ihren Funktionen beeinflusst (SAVAGE, 1977; BERG 1996). Nach FRETER (1992) können Mikroorganismen innerhalb des gastrointestinalen Traktes vier verschiedene Mikrohabitate besiedeln. Das erste Habitat, das vor allem *in vitro* untersucht wurde, ist die Oberfläche der epithelialen Zelle, an die sich Bakterien mithilfe ihrer zahlreichen Adhäsionsmechanismen anheften können. Das zweite Mikrohabitat ist die in den Lieberkühn-Krypten liegende Mukosa, die besonders durch spiralförmige Bakterien wie *Borrelia*, *Treponema*, *Spirillum* u.a. besiedelt ist. Ein weiteres Habitat ist die Mukosa epithelialer Zellen, die in engem Kontakt mit dem Epithelium steht, allerdings aufgrund der aufwendigen Probenentnahme die wissenschaftliche Analyse vor gewisse Komplikationen stellt.

Das vierte und am häufigsten untersuchte Habitat ist das *Lumen* des Darms. Hinsichtlich der Zusammensetzung und Funktionen der *Lumen*-Mikrobiota existieren in der Literatur divergierende Meinungen. Nach SAVAGE (1977) repräsentiert die *Lumen*-Mikrobiota diejenigen bakteriellen Populationen, deren Lebensraum die Oberfläche der Nahrungspartikel ist, und unterscheidet sich in ihrer Zusammensetzung deutlich von den mukosalen Gemeinschaften. Eine ähnliche Definition findet sich auch bei FRETER (1992), der Ursprung und Zusammensetzung der luminalen Mikrobiota diskutiert, jedoch schlussfolgert, dass luminale bakterielle Populationen sowohl Ergebnis der Vermehrung luminaler Bakterien als auch Folge der Vermehrung mukosa-assoziiierter Bakterien sein können. LESER et al. (2002) vertreten die Meinung, dass beide Mikrohabitate (Mukosa und Lumen) durch Mukosa-Exkretion, epithelialen Turnover und Darm-Peristaltik verbunden sind und die mukosa-assoziierten Bakterien eine Subpopulation der luminalen Mikrobiota darstellen.

Deutliche qualitative und funktionale Unterschiede der mukosalen und luminalen bakteriellen Populationen wurden von MACFARLANE & DILLON (2007) nachgewiesen. Mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie weisen die Autoren im *Lumen* des humanen *Colons* nicht

nur Mikrokolonien auf der Oberfläche der Nahrungssubstrate nach, sondern auch verstreute, allein liegende Zellen. Beide bakteriellen Gemeinschaften (an der Oberfläche der Nahrungspartikel haftende bzw. nicht haftende) enthielten gleiche Arten und Spezies, waren jedoch unterschiedlich metabolisch aktiv. So wurde gezeigt, dass Bakterien, die mit der Oberfläche der Nahrungspartikel verbunden waren, am schnellsten Polysacharide fermentierten, nicht haftende Zellen hingegen Oligosacharide. Auch im Hinblick auf einzelne Enzymaktivitäten waren Unterschiede zwischen beiden Populationen zu verzeichnen. Die Expression von α -Fucosidase und N-acetyl α -Galactosaminidase bei haftenden Zellen etwa war schwächer als bei nicht haftenden Bakterien.

In derselben Arbeit untersuchten MACFARLANE & DILLON auch die Zusammensetzung mukosaler bakterieller Populationen. Bei Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) und *live/dead*-Färbung der mukosalen Bakterien zeigte sich, dass die Mehrheit der beobachteten Bakterien (Enterokokken, Bakteroiden, Bifidobakterien) und besonders Zellen, die nahe der Oberfläche der Mukosa lagen, lebendig waren. Die Autoren vermuten, dass diese in der Mukosa detektierten Bakterien zu aktivem Wachstum fähig sind und eine einzigartige Population darstellen, deren Anwesenheit kein Ergebnis einer passiven Übertragung aus dem Lumen ist. Eine indirekte Bestätigung dieser These findet sich bei ZOETENDAL et al. (2002), die mittels PCR-DGGE humane bakterielle 16S rDNA-Profile aus Biopsie-Proben von *Colon ascendens*, *transversum* und *descendens* im Vergleich zu Faeces untersucht haben. Mittels errechneter Ähnlichkeits-Indizes wurde festgestellt, dass Colon- und Faeces-Proben ca. 13% Ähnlichkeit aufwiesen, die Colon-Proben untereinander dagegen etwa 90-99%. ECKBURG et al. (2005) haben ebenso deutliche Unterschiede zwischen den Zusammensetzungen der Mukosa- und Faeces-Mikrobiota festgestellt. Auf Basis von 16S rDNA-Analysen von Biopsie-Proben aus dem *Colon (ascendens, transversum, descendens und sigmoid)* und Faeces-Proben konnten signifikante Differenzen in der Präsenz einzelner phylogenetischer Gruppen in beiden Habitaten nachgewiesen werden. Anhand der Ähnlichkeits-Indizes folgerten die Autoren, dass die Faeces-Mikrobiota „eine Kombination aus einzelnen mukosalen und nicht haftenden Bakterien des Lumens“ ist.

1.1.2 Diversität der Magen-Darm-Mikrobiota

Die bakterielle Diversität des gesamten Planeten wird derzeit auf 55 Phyla *Bacteria* und 13 Phyla *Archaea* geschätzt (LEY et al., 2006). Besonders intensiv wurde die bakterielle Diversität im vergangenen Jahrzehnt über 16S rRNA-Gene untersucht, die als Zielsequenzen für die Detektion und Identifizierung der Bakterien dienen. Auf diese Weise wurde ermittelt, dass in tierischen Organismen nur vier Phyla von *Bacteria* – *Firmicutes*, *Bacteroides*, *Actinobacteria*

und *Proteobacteria* – dominieren. In humanen *Colon*-Proben konnte auch eine Spezies von *Archeae* – *Methanobrevibacter smithii* – nachgewiesen werden (BÄCKHED et al., 2005; ECKBURG et al., 2005). Innerhalb der genannten sowie anderen, weniger dominanten Phyla (*Chlamydiae*, *Cyanobacteria*, *Defferibacteres*, *Deinococcus-Thermus*, *Fusobacteria*, *Spirochaetes*, *Verrucomicrobia*, *TM7*, *SRI*) konnten mithilfe der 16S rRNA-Analyse mehr als 1000 verschiedene Spezies ermittelt werden. Die Mehrzahl dieser detektierten Stämme gehört zu den Gram-positiven Bakterien und 80% von ihnen zu den bis jetzt nicht kultivierten Spezies (DETHLEFSEN et al., 2007).

Die bakterielle Diversität der Säugetiere kann laut EGERT et al. (2006) „durch deutliche raum-zeitliche Gradienten“ charakterisiert werden. Bakterielle Gemeinschaften weisen während des Lebens des Wirtsorganismus eine bestimmte Entwicklung auf: von einer einfachen und unstabilen Mikrobiota in der neonatalen Phase zu dauerhaften komplexen und stabilen Gemeinschaften während des erwachsenen Lebens. Betrachtet man den räumlichen Gradient, können die einzelnen humanen und tierischen Mikrobiota auf Phylum-Niveau eine ähnliche Zusammensetzung, auf dem Gattungs-, Spezies- und Stämme-Niveau jedoch einzigartige Profile aufweisen (DETHLEFSEN et al., 2007).

Die Diversität der intestinalen Mikrobiota der Tiere scheint – auf 16S rRNA-Analyse basierenden Studien zufolge – sehr komplex zu sein und kann bis zu 83% an diversen unklassifizierten und unkultivierten Spezies enthalten (LESER et al., 2002). Die Mehrheit der detektierten bakteriellen Phylotypen der porcinen *Ileum*, *Cecum* und *Colon* gehört, analog zur humanen Mikrobiota, zu den Phyla *Firmicutes* und *Bacteriodes*. Tabelle 1 liefert einen Überblick über die Diversität der porcinen intestinalen Mikrobiota nach LESER et al. (2002).

LITERATURÜBERSICHT

Tab. 1: Bakterielle Diversität der porcinen *Ileum*-, *Cecum*- und *Colon*-Mikrobiota auf dem Phylum-, Gattungs- und Spezies-Niveau nach LESER et al. (2002)

Phylogenetische Gruppe	Anzahl detektierter Phylotypen	Verbindung detektierter Phylotypen zu den einzelnen Spezies
<i>Eubacterium</i> und verwandte	125	<i>Butyrivibrio</i> <i>crossotus</i> , <i>B. fibrisolvans</i> , <i>B. fibrisolvans</i> . <i>Clostridium</i> <i>aerotolerans</i> , <i>C. aminobutyricum</i> , <i>C. coccoides</i> , <i>C. glycolicum</i> , <i>C. herbivorans</i> , <i>C. lituseburense</i> , <i>C. polysaccharolyticum</i> , <i>C. populeti</i> , <i>C. symbiosum</i> , <i>C. xylanolyticum</i> . <i>Coprococcus</i> <i>eutactus</i> . <i>Eubacterium</i> <i>cellulosolvans</i> , <i>E. eligens</i> , <i>E. formicigenerans</i> , <i>E. hadrum</i> , <i>E. hallii</i> , <i>E. ramulus</i> , <i>E. rectale</i> , <i>E. ruminantium</i> , <i>E. timidum</i> , <i>E. ventriosum</i> , <i>E. xylanophilum</i> . <i>Lachnospira</i> <i>pectinoschiza</i> . <i>Pseudobutyrvibrio</i> <i>ruminis</i> . <i>Roseburia</i> <i>cecicola</i> . <i>Ruminococcus</i> <i>gnavus</i> , <i>R. lactaris</i> , <i>R. obeum</i> , <i>R. schinkii</i> .
<i>Clostridium</i> und verwandte	109	<i>Clostridium</i> <i>baratum</i> , <i>C. botulinum</i> , <i>C. celatum</i> , <i>C. leptum</i> , <i>C. longisporum</i> , <i>C. perfringens</i> , <i>C. termolacticum</i> . <i>Eubacterium</i> <i>desmolans</i> , <i>E. siraeum</i> . <i>Ruminococcus</i> <i>albus</i> , <i>R. bromii</i> , <i>R. callidus</i> , <i>R. flavefaciens</i> . <i>Sporobacter</i> <i>termitidis</i> .
<i>Bacillus</i> - <i>Lactobacillus</i> - <i>Streptococcus</i> -Untergruppe	46	<i>Abiotrophia</i> <i>adiacens</i> . <i>Enterococcus</i> <i>faecium</i> , <i>E. hirae</i> . <i>Gemella</i> <i>haemolysans</i> . <i>Lactobacillus</i> <i>agilis</i> , <i>L. alimentarius</i> , <i>L. amylovorus</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. collinoides</i> , <i>L. delbrueckii</i> , <i>L. farciminis</i> , <i>L. johnsonii</i> , <i>L. mucosae</i> , <i>L. murinus</i> , <i>L. panis</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. pontis</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. ruminis</i> , <i>L. salivarius</i> subsp. <i>salivarius</i> , <i>L. vaginalis</i> , <i>Pediococcus</i> <i>parvulus</i> . <i>Staphylococcus</i> <i>epidermidis</i> . <i>Streptococcus</i> <i>alactolyticus</i> , <i>S. hyointestinalis</i> , <i>S. gallolyticus</i> , <i>S. saliva</i> , <i>S. suis</i> . <i>Weissella</i> <i>confusa</i> .
<i>Flexibacter</i> - <i>Cytophaga</i> - <i>Bacteroides</i> -Gruppe	42	<i>Bacteroides</i> <i>distasonis</i> , <i>B. fragilis</i> , <i>B. merdae</i> , <i>B. putredinis</i> , <i>B. uniformis</i> . <i>Porphyromonas</i> <i>macacae</i> . <i>Prevotella</i> <i>albensis</i> , <i>P. bryantii</i> , <i>P. buccae</i> , <i>P. denticola</i> , <i>P. nigrescens</i> , <i>P. loescheii</i> , <i>P. oris</i> , <i>P. ruminicola</i> , <i>P. tannerae</i> , <i>P. veroralis</i> . <i>Rikenella</i> <i>microfusus</i> .
<i>Proteobacteriae</i>	20	<i>Actinobacillus</i> <i>minor</i> , <i>A. porcinus</i> . <i>Blastobacter</i> <i>denitrificans</i> . <i>Campylobacter</i> sp. <i>Desulfomonas</i> <i>pigra</i> . <i>E. coli</i> . <i>Gallionella</i> <i>ferruginea</i> , <i>Haemophilus</i> sp., <i>Halomonas</i> <i>aquamarina</i> , <i>Helicobacter</i> <i>rodentium</i> , <i>Oceanospirillum</i> <i>pusillum</i> , <i>Oxalobacter</i> <i>formigenes</i> , <i>Pantoea</i> <i>agglomerans</i> , <i>Pasteurella</i> <i>aerogenes</i> , <i>Pelobacter</i> <i>propionicus</i> , <i>Roseateles</i> <i>depolymerans</i> , <i>Sutterella</i> <i>wadsworthensis</i> , <i>Thiocapsa</i> <i>roseopersicina</i> .
<i>Sporomusa</i> und verwandte	15	<i>Acidaminococcus</i> <i>fermentans</i> , <i>Dialister</i> <i>pneumosintes</i> , <i>Megasphaera</i> <i>elsdenii</i> , <i>Mitsuokella</i> <i>multacida</i> , <i>Phascolarctobacterium</i> <i>faecium</i> , <i>Peptococcus</i> <i>niger</i> , <i>Schwartzia</i> <i>succinivorans</i> , <i>Selenomonas</i> <i>ruminantium</i> , <i>Veillonella</i> <i>dispar</i> , <i>V. parvula</i> .
<i>Mycoplasma</i> und verwandte	8	<i>Spiroplasma</i> sp. <i>Mycoplasma</i> sp.
Hoch-G-C-Bakterien	4	<i>Atopobium</i> <i>parvulum</i> , <i>Bifidobacterium</i> <i>asteroids</i> , <i>Eggerthella</i> <i>lenta</i> , <i>Sanguibacter</i> <i>inulinus</i> .
<i>Spirochetes</i> und verwandte	2	<i>Spirochaeta</i> sp. <i>Treponema</i> <i>bryanti</i> .
<i>Clostridium purinolyticum</i> -Gruppe	1	<i>Pseudoramibacter</i> <i>alactolyticus</i>
<i>Planctomyces</i> und verwandte	1	<i>Pirellula</i> <i>marina</i>
<i>Flexistipes sinusarabici</i> assemblage	1	<i>Dethiosulfovibrio</i> <i>peptidovorans</i> , <i>Flexistipes</i> <i>sinusarabici</i> , <i>Geovibrio</i> <i>ferrireducens</i> .
<i>Anaerobaculum thermoterrenum</i> -Gruppe	1	<i>Anaerobaculum</i> <i>thermoterrenum</i>

1.1.3 Lebensfähigkeit der Bakterien

Einzelne bakterielle Gemeinschaften des Wirtsorganismus können sich nicht nur hinsichtlich der qualitativen und quantitativen Strukturen unterscheiden. Auch bezüglich der funktionalen Aktivität ihrer einzelnen Mitglieder können bakteriellen Gemeinschaften eine gewisse Heterogenität aufweisen. Es ist dabei wichtig zu wissen, ob alle Mitglieder der Gemeinschaft gleich lebensfähig und metabolisch aktiv sind (ZOETENDAL et al., 2006). Der einfachste Test für die Bestimmung der Lebensfähigkeit der Bakterien ist ihre Kultivierung. Vor dem Hintergrund der Tatsache, dass sich bakterielle Zellen in verschiedenen physiologischen Zuständen befinden können, liefern Ergebnisse dieses Tests jedoch lediglich Aufschluss über solche Bakterien, die lebendig und vermehrungsfähig bzw. aktiv und kultivierbar sind (KELL et al., 1998).

Neben aktiven Zellen enthalten bakterielle Populationen auch lebendige aber nicht kultivierbare (*viable but non-culturable*, VBNC), physiologisch aktive aber nicht kultivierbare (*active but non-culturable*, ABNC), sowie tote Zellen. Die VBNC werden dabei als lebensfähige, aber durch verschiedene Schädigungsfaktoren weniger physiologisch bzw. vermehrungsaktive Zellen bezeichnet. Die ABNC sind im Prinzip tote Zellen, die mikroskopisch jedoch noch einige Lebensmerkmale (Zell-Elongation, funktionale Enzyme) aufweisen können (YAMAMOTO, 2000). Bei toten Zellen können einzelne Komponenten wie Membrane, fragmentierte DNA oder einige Enzyme, die keine funktionale Bedeutung haben, detektiert werden.

Den unkultivierbaren Zustand und die Beschädigung bakterieller Zellen können sowohl ungünstige Kultivierungsbedingungen (Temperatur, Sauerstoffkonzentration) als auch physische Beschädigungen der Zellen (u.a. ihrer Membrane oder DNA), ein Mangel an zellulären Komponenten (z.B. Ribosomen), die Aktivierung lysogener Bakteriophagen und der „Selbstmord“-Gene (z.B. *sok/hok*) oder auch die Expression von Autolysinen verursachen (KELL et al., 1998). In einem unkultivierbaren Zustand (VNBC) wird bei den Zellen eine Reduzierung des Nährstofftransportes und der Sauerstoffrate sowie die Verhinderung der Biosynthese verschiedener Makromoleküle beobachtet (PORTER et al., 1995; BEUMER et al., 1992; FEDERIGHI et al., 1998; YARON & MATTHEWS, 2002). Die Expression von Virulenzgenen kann aber durch den unkultivierbaren Zustand nicht beeinflusst werden (JONES et al., 1991; COLWELL et al., 1996; RAHMAN et al., 1996; PRUZZO et al., 2002; ADAMS et al. 2003). Die Rückkehr unkultivierbarer Zellen (VNBC) in den aktiven, kultivierbaren Zustand ist durch die Eliminierung von Stressfaktoren (Zugabe zusätzlicher Nahrungssubstrate, Veränderung der Temperatur, Rückkehr in das passende Habitat) sowie die Reparatur von Beschädi-

gungen und die Aktivierung replikativer Funktion durch einen Temperaturschock oder durch Behandlung mit Ammoniumsalzen möglich (YAMAMOTO, 2000).

Die Bestimmung des physiologischen Zustandes der bakteriellen Zellen kann durch die Anwendung verschiedenen Methoden erreicht werden. Mithilfe der Durchflusszytometrie mit live/dead-Färbung konnten APAJALAHTI et al. (2003) zeigen, dass ein Drittel aller Bakterien in humanem Faeces tot waren. Unter Verwendung eines ähnlichen Protokolls zeigten BEN-AMOR et al. (2005), dass 50% der Zellen lebendig waren. 20% reagierten sowohl auf *live*- als auch auf *dead*-Färbung positiv und wurden von den Autoren als beschädigte Zellen bezeichnet. Innerhalb aktiver Populationen wurden dabei Butyrat bildende Bakterien detektiert, unter den toten Zellen hingegen Vertreter der Gattungen *Bacteroides*, *Ruminococcus* und *Eubacterium*.

1.2 Interaktionen zwischen Makro- und Mikroorganismus

Die Magen-Darm Mikrobiota, die sich im Zuge einer langen, ko-evolutionären Folge symbiotischer Interaktionen zwischen den Mikro- und Makroorganismus entwickelt, spielt eine wichtige Rolle in der Unterstützung der humanen und tierischen Gesundheit (MAGALHAES et al., 2007). Diese vollzieht sich sowohl durch die Verhinderung der Kolonisierung mit pathogenen Mikroorganismen und die Teilnahme an der Verdauung der Futterkomponenten, als auch durch die Unterstützung des mukosalen Immunsystems (KELLY et al., 2007). Neuere Studien zeigen, dass die Mikrobiota, vor allem ihre nicht pathogenen Vertreter, auch andere metabolische Prozesse des Wirts wie z.B. den Lipidstoffwechsel, die Veranlagung zu Fettleibigkeit, die Entwicklung des Immunsystems, Entzündungs- und Reparatur-Reaktionen sowie die Angiogenese beeinflussen können (BÄCKHED et al., 2004; LEY et al., 2006; TURNBAUGH et al., 2006; KELLY et al., 2004; STAPPENBECK et al., 2002).

a) Darm-Morphologie und Peristaltik

Zahlreiche Erkenntnisse über den Einfluss der intestinalen Mikrobiota auf die Morphologie des Darms stammen aus gnotobiotischen Studien, in denen keimfreie Nagetiere (Mäuse, Ratten) sowie Vögel (Broiler) mit konventionellen Tieren verglichen werden.

Zu den morphologischen Änderungen, die bei keimfreien Tieren registriert wurden, gehörte die Verringerung der intestinalen Masse, Breite und Länge (u.a. länglicher *Caecum* mit dünner mukosaler Schicht) (BERG 1996; VAN KESSEL et al., 2004). Anhand der Ultrastruktur des Darms zeigten ICHIKAWA et al. (1999), dass keimfreie Tiere längere Zotten und weniger tiefe Krypten aufweisen, was zur Reduzierung des mitotischen Index und der Erneuerungsrate von Epithelzellen führen kann (ALAM et al, 1994). Diese Effekte werden dabei sowohl durch Bakterien *per se* als auch durch ihre Metaboliten bedingt. VISEK (1987) zufol-

ge können Produkte des bakteriellen Stickstoff-Metabolismus (Ammoniak und Amine) einen schädlichen Einfluss auf die mukosale Struktur ausüben. HAMPSON (1986) und MILLER et al. (1986) wiesen eine drastische Verringerung der Zotten-Länge und eine Vertiefung der Krypten bei abgesetzten Ferkeln nach und begründeten dies mit der radikalen Veränderung der Mikrobiota nach dem Absetzen.

Abgesehen von den genannten Beispielen haben Bakterien und ihre Metaboliten jedoch einen unterschiedlichen Einfluss auf das Darm-Epithelium. GARCIA-LAFUENTE et al. (2001) haben festgestellt, dass Laktobazillen die Dichte der intestinalen bakteriellen Barriere erhöhen können und *E. coli* die Permeabilität der Kolonozyten für luminale Toxine. Auch bakterielle Metaboliten wie flüchtige Fettsäuren sind in der Lage, die Erneuerungsrate der epithelialen Zellen der Krypten erhöhen, was insgesamt einen Anstieg der Darmwand-Masse ermöglicht (SAKATA, 1987; MACFARLANE & MACFARLANE, 2003).

Auch die Peristaltik des Magen-Darm-Traktes kann durch die Mikrobiota beeinflusst werden. FALK et al (1998) berichten, dass die Peristaltik des vorderen Darmtraktes bei keimfreien Tieren im Vergleich zu den konventionellen langsamer ist. Eine Reihe von Forschern hat diesen Effekt den Endprodukten des bakteriellen Metabolismus – den flüchtigen Fettsäuren – zugeschrieben. *In vitro*-Untersuchungen von YAJIMA (1985) zeigten, dass verschiedene Konzentrationen flüchtiger Fettsäuren auch unterschiedliche Auswirkungen auf die Peristaltik des Ratten-Dickdarms (*Colon*) haben können. So wurde eine maximale kontraktile Aktivität bei der Konzentration von 10 mM beobachtet, während 100 mM zu ihrer vollständigen Er-lahmung führten. Der Wirkungsmechanismus kann dabei nach TOPPING & CLIFTON (2001) sowohl systematische humorale und neuronale Wege als auch lokale Reflexe bzw. einen myogenen Einfluss flüchtiger Fettsäuren auf die glatte Muskulatur einbeziehen.

In zahlreichen Versuchen mit gnotobiotischen Tieren wurden auch andere mögliche Einflüsse der Mikrobiota auf die Morphologie sowie physiologische und biochemische Prozesse im Darm aufgezeigt. Ein Vergleich der morphologischen, physiologischen und biochemischen Prozesse im Darm bei gnotobiotischen und konventionellen Nagetieren ist etwa in der Arbeit von BERG (1996) zu finden. Zusammengefasst ist dieser Vergleich in Tabelle 2.

Tab. 2: Charakteristika einiger morphologischer, physiologischer und biochemischer Prozesse im Darm gnotobiotischer Nagetiere im Vergleich mit konventionellen Nagetieren nach BERG (1996)

Morphologie

Verlängertes *Caecum*
Niedrigere Masse bzw. reduzierte Oberfläche der Darm-Wand
Dünnere Zotten
Dünnere *Lamina propria*
Reduzierte Leber-, Herz-, Nebennierengröße
Reduziertes Blut-Volumen

Physiologie und Biochemie

Reduzierte intestinale Peristaltik (erhöhte Transitzeit)
Reduzierte Erneuerungsrate von Epithelzellen der Zotten
Veränderte Enzymaktivität (z.B. reduzierte Trypsin-, erhöhte β -Glucuronidase-Konzentrationen)
Niedrigerer pH-Wert des intestinalen Inhalts
Erhöhtes Sauerstoff-Niveau bzw. Redoxpotenzial
Reduzierte Herzleistung
Reduzierter Blutstrom (zu Darm, Leber usw.)
Reduzierte Synthese der Vitamine K und B
Fehlen der Transformation von Gallensäuren
Mangel an flüchtigen Fettsäuren

b) Epithelzellen als Hauptort der Wirt-Bakterien-Interaktionen

Die Epithelzelle und ihre Oberfläche stellen einen Ort besonders intensiver wechselseitiger Kontakte zwischen Makro- und Mikroorganismus dar. Das Hauptergebnis dieser Interaktionen (od. „*cross-talk process*“) ist die Entstehung der Kolonisationsresistenz, welche die Rolle der ersten Barriere in der Abwehr gegen Pathogene einnimmt, sowie der Erwerb der gesamten Mikrobiota-Struktur des gastrointestinalen Traktes (ZOETENDAL et al., 2006). Der Wirt kann einerseits die Eliminierung pathogener Bakterien fördern und andererseits günstige Bedingungen für autochtone, nicht pathogene Spezies schaffen (HOOPER & GORDON, 2001). Eine kritische Rolle spielen dabei unter anderem die Glykokonjugate oder Glykane – hoch glykolysierte Makromoleküle mit einer komplexen Zusammensetzung und Diversität, die von Becherzellen des Krypten- und Zotten-Epitheliums entlang des Darms produziert werden und an der Erkennung oberflächlicher Polysaccharide und Proteine der Bakterien beteiligt sind (MAGALHAES et al., 2007). Das Glykokonjugat(Mucine)-Netz bildet eine relativ klebrige Struktur, in der pathogene Bakterien gefangen und durch die intestinale Peristaltik aus dem Organismus eliminiert werden können (HOOPER & GORDON, 2001). Die funktionale Aktivität der Glykokonjugate bzw. die Beschaffenheit der Kolonisationsresistenz kann dabei von

solchen Faktoren wie Wirtsgenetik, Reife der Epithelzelle, Lokalisation im Darm (Darmabschnitt), Alter des Tiers sowie Fütterungstyp beeinflusst werden (FALK et al., 1998; SPECIAN & OLIVER, 1991; BARROW et al., 1980; TURCK et al., 1993; SHARMA & SCHUMACHER, 1995).

Aktuelle Arbeiten zeigten allerdings, dass nicht nur Glykokonjugate (Mucine) die bakterielle Besiedlung, sondern umgekehrt auch die Bakterien selbst die Muzineexpression beeinflussen bzw. modifizieren können. Das bekannteste und am häufigsten zitierte Beispiel hierfür ist die Interaktion zwischen *Bacteroides thetaiotaomicron* und den Enterozyten des Mäusedarms. BRY et al. (1996) zeigten, dass *B. thetaiotaomicron* einerseits Fukose aus dem Mukus verstoffwechselt und andererseits die Produktion von Fuca1,2Gal β -Glykanen stimuliert, die der Art als Energiequelle dienen können. HOOPER & GORDON (2001) stellten in der Folge fest, dass *B. thetaiotaomicron* auch die Expression der Gene in den Epithelzellen fördern kann, die für verschiedene physiologische Funktionen (z.B. Absorption und Immunantwort) verantwortlich sind. In einer weiteren Studie wiesen HOOPER et al. (2004) nach, dass die Anwesenheit von *B. thetaiotaomicron* zur Sekretion eines Peptids (Angiogenin Ang4) in Paneth-Zellen der intestinalen Krypten im Mäusedarm führen kann. Als Haupteigenschaften dieses Peptids werden eine antibakterielle Wirkung, ein Einfluss auf die lokale Immunantwort sowie die Teilnahme an der Entwicklung des vaskulären Netzes in den Darmzotten genannt (STAPPENBECK et al., 2002, HOOPER & GORDON, 2001). Nach ZOETENDAL et al. (2006) können derartige Wirt-Bakterien-Interaktionen nicht nur das Immunsystem des Darms, sondern das gastrointestinale Ökosystem insgesamt beeinflussen.

c) Immunität

Es ist bekannt, dass das Immunsystem der Säugetiere in erster Linie für die Abwehr pathogener Mikroorganismen und anderer körperfremder Substanzen verantwortlich ist. Gnotobiotischen Studien zufolge beeinflusst die Anwesenheit der Bakterien im Darm auch die Reifung und Entwicklung des lokalen Darm- sowie des gesamten Immunsystems. BERG (1996) zeigt, dass immunologische Parameter wie die Anzahl von *Lamina propria*-Lymphozyten und IgA-produzierenden Plasmazellen sowie die Konzentration von Gammaglobulinen im Serum bei keimfreien Tieren signifikant niedriger lagen. Auch die Unterentwicklung der Milz und der Lymphknoten sowie eine verzögerte Immunantwort nach der Impfung waren bei diesen Tieren zu beobachten. Besonders bedeutsam ist die Anwesenheit bakterieller Gemeinschaften im Darm und in anderen Organen für die Entwicklung des Immunsystems während der postnatalen Phase: Bei den Schweinen, die immunologisch unreif geboren werden, wird die Mikrobi-

ta auch als Hauptquelle der Antigene und als entscheidend für die Stimulierung des Immunsystems der Ferkel während der ersten 4-7 Wochen betrachtet (KELLY et al., 2007).

Das Immunsystem befindet sich dabei allerdings in ständiger Konfrontation mit kommensalen, nicht pathogenen Bakterien. Dabei ist es wichtig, dass eine bestimmte Balance zwischen dem Immunsystem und den kommensalen Bakterien besteht. Im Fall eines Ungleichgewichts, so PAMER (2007), besteht die Möglichkeit entweder einer überzogenen Immunantwort und der Entstehung entzündlicher Krankheiten oder aber einer mangelhaften Abwehr und der Entwicklung invasiver mikrobieller Infektionen. Die Mechanismen, die dem Immunsystem gleichzeitig die Eliminierung unerwünschter Spezies und die Persistenz der autochtonen (kommensalen) Bakterien gestatten, werden derzeit intensiv untersucht, allerdings besteht bislang noch Mangel an gesicherten Erkenntnissen.

Gezeigt werden konnte, dass eine führende Rolle bei der Bildung der antibakteriellen und antiviralen Immunabwehr den „*pattern recognition*“-Rezeptoren (PRR, auch: „*pattern recognition*“-Moleküle, PRM) zukommt. Die PRM lassen sich an der Membrane der Zellen oder im Zytosol lokalisieren und bestehen aus einer heterogenen Proteine-Familie, die Vertreter von Lectin-, Cystein-, Leucin- sowie Helikase-Domänen umfasst. Bedeutung für die Erkennung pathogener Mikroorganismen im Darm haben dabei insbesondere zwei Klassen der PRM – „*toll-like*“-Rezeptoren (TLR) und „*nod-like*“-Rezeptoren (NLR) (MAGALHAES et al., 2007). TLR sind eine Familie von Erkennungsrezeptoren, die mit den Epithelzellen und mit ihnen assoziierten dendritischen Zellen sowie mit den Monozyten und den Makrophagen verbunden sein können (KELLY et al., 2007). Die Expression der TLR kann sowohl auf der Oberfläche der Zellen als auch innerhalb der intrazellulären Organellen stattfinden (ZOE-TENDAL et al., 2006; MAGALHAES et al., 2007). Hauptfunktion der TLR ist dabei die Erkennung der als „*pathogen-associated molecular patterns* (PAMP) oder „*microbe-associated molecular patterns* (MAMP)“ bezeichneten mikrobiellen Komponenten (Lipoproteine, Lipoteichonsäure, Lipopolysaccharide, Flagelline, doppelsträngige RNA von Viren, unmethylierte bakterielle DNA-CpG DNA) (MAGALHAES et al., 2007). Das durch TLR geförderte Immunsystem ist in der Lage, antibakterielle Peptide, Interferone, pro- und anti-entzündliche Cytokine und Chemokine zu produzieren sowie dendritische Zellen mit anschließender Regulierung der Aktivität der T- und B-Zellen zu aktivieren (PASARE & MEDZHINTOV, 2004, 2005).

NLR gehören zu den intrazellulären Rezeptoren und sind im Zytosol der Zelle zu finden. Wie TLR sind NLR für die Erkennung verschiedener PAMP und MAMP verantwortlich. Nod1 und Nod2-Rezeptoren, die zu den NLR gehören, erkennen zum Beispiel Peptidoglykane, die

Hauptkomponenten der bakteriellen Zelle. MAGALHAES et al. (2005) berichteten dabei über einem möglichen Einfluss der Herkunft von Nod1 und Nod2 auf ihre Spezifität. So erkennen die humanen Nod1 die Tripeptide, die Nod1 von Ratten dagegen Tetrapeptide (z. B. das tracheale Cytotoxin). Nach FRITZ et al. (2005) induzieren NLR pro-entzündliche Cytokine und Chemokine und lösen die Aktivierung dendritischer Zellen aus.

Da pathogene und kommensale Bakterien oft gleiche molekulare Strukturen enthalten, mit denen sie von den TLR erkannt werden können, konnten sich eine Reihe von Mechanismen entwickeln, die dem Wirt die Erkennung beider Bakterientypen erlauben. KELLY et al. (2007) und MAGALHAES et al. 2007 vermuten, dass manche PAMP oder MAMP vom Wirtsorganismus aufgrund der räumlich getrennten Expression von TLR ignoriert werden können. So wird nur eine sehr schwache Expression von TLR5 als Antwort auf die Flagelline der kommensalen Bakterien beobachtet, weil sich TLR5 auf der basolateralen Membrane lokalisieren lässt und nur bei Präsenz pathogener Bakterien aktiv wird (KELLY et al., 2007). WERTS et al. (2006) berichten, dass Rezeptoren wie z.B. TLR3, 7, 8 und 9 in den intrazellulären Organellen exprimiert werden und deswegen auch keinen direkten Kontakt mit den mikrobiellen Komponenten der apathogenen Bakterien haben. Ein weiterer Mechanismus, infolge dessen die Anwesenheit der kommensalen Bakterien vom Wirt toleriert wird, ist die Schwächung der Immunantwort (Immunsuppression). LOTZ et al. (2006) vermelden eine immunologische Toleranz gegenüber TLR4, der bakterielle Lipopolysaccharide erkennt, was die Autoren mit einer Verringerung der Expression von Interleukin1-Kinase erklären. KELLY et al. (2004) verzeichnen eine Korrelation zwischen der Anwesenheit von *Bacteroides thetaiotaomicron* und der Induzierung des PPAR γ -Rezeptors (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma*). Der PPAR γ -Rezeptor fördert den Transfer der RelA-Einheit von NF- κ B (*nuclear factor κ B*) vom Nukleus ins Zytosol, was die Entstehung einer Entzündungsreaktion hemmen kann (KATAYAMA et al., 2003; KELLY et al., 2004). Die Inhibition von NF- κ B kann auch durch die Stabilisierung von I κ B α erfolgen – einem Inhibitor, der NF- κ B-Dimere im Zytosol ausschaltet. NEISH et al. (2000) und TIEN et al. (2006) beobachteten einen solchen Effekt bei der Anwesenheit apathogener Salmonellen und des probiotischen *Lactobacillus casei*. Was die Mechanismen betrifft, mit denen die Regulierung des Immunsystems durch NLR durchgeführt wird, existieren bislang nur wenige gesicherte Erkenntnisse. Es ist allerdings bekannt, dass Mutationen von Nod2-Genen zur Entstehung der Krohn-Krankheit führen, was indirekt auf eine wichtige Rolle der NLR bei der Detektion kommensaler Bakterien und der Kontrolle von Pathogenen verweist (KELLY et al., 2007).

d) Nährstoffumsatz

Die Mikrobiota ist bedeutsam für die Verdauung der Nahrungssubstrate, die aufgrund des Fehlens bestimmter endogener Verdauungsenzyme vom Wirt nicht metabolisiert werden können. Besonders wichtig für den Wirt ist die mikrobielle Verdauung in den unteren Abschnitten des gastrointestinalen Traktes, wo sich die unverdaulichen Nahrungssubstrate im Vergleich zu den proximalen Teilen des gastrointestinalen Traktes für eine längere Zeit befinden (JEROCH et al., 1999).

Kohlenhydrate

Kohlenhydrate gehören zu den wichtigsten Energiequellen sowohl des Wirtes als auch der Darm-Mikrobiota. Als Ergebnis der bakteriellen Verdauung von Kohlenhydraten werden Milchsäure, flüchtige Fettsäuren (Essig-, Propion-, Buttersäure) sowie verschiedene Gase (Wasserstoff, Kohlendioxid, Methan) gebildet (BACH-KNUDSEN et al., 1991).

Laktat gehört zu den bedeutsamsten mikrobiellen Metaboliten des Magens und des Dünndarms und wird von Bakterien vor allem aus Laktose und Hexosen synthetisiert. Im Magen der Saugferkel, welche einen Mangel an HCl haben, ist Laktat für die pH-Regulierung bzw. die Etablierung des Säure-Milieus verantwortlich (CRANWELL et al., 1976). Die pH-Senkung durch Präsenz des Laktats kann auch bakterizid und bakteriostatisch auf die säuresensitiven Bakterien (u.a. pathogener Spezies) wirken, was oft als probiotischer Effekt von Milchsäurebakterien betrachtet wird (NOUSIANEN et al., 2004). Weitere positive Aspekte des bakteriellen Laktats sind die verbesserte Verdaulichkeit von Milchproteinen durch Ausfällung von Partikeln, das Anregen der Magensaftbildung, die Aktivierung der Magenperistaltik sowie die Teilnahme an der Gluconeogenese und an der enteralen Resorption von Kalzium (KOOLMAN & RÖHM, 2003). Die größten Mengen Laktat – 80-90% aller organischen Säuren (od. 50-80 mmol/L) – werden entsprechend in der Saugperiode gebildet, in der die Ferkel viel Laktose aus der Sauenmilch erhalten. In der Folge sinkt der Laktat-Anteil dann auf bis zu 50% ab (AXELSSON, 2004). Während der Fermentation können verschiedene bakterielle Spezies entweder L- oder D-Stereoisomere der Milchsäure separat oder als eine Mischung (wenn das Enzym Racemase vorhanden ist) produzieren. Aufgrund der nachgewiesenen Beteiligung des L-Isomers an der Resynthese von Glukose und Glykogen wird diese Form als das „physiologische Isomer“ bezeichnet (GIESECKE et al., 1985). D-Milchsäure ist schwieriger zu beurteilen. Es ist allerdings bekannt, dass das D-Isomer kein Produkt des endogenen Metabolismus des Wirts ist und aus der bakteriellen Fermentation der Kohlenhydrate stammt (GARVIE, 1980; OMOLE et al., 2001; KOOLMAN & RÖHM, 2003). D-Laktat wird langsamer und weniger leicht vom Wirtsorganismus metabolisiert, und eine hohe Konzentration

kann zu Azidosen (u.a. zur schweren Azidemia bei neugeborenen Kälbern) führen (LORENZ, 2004; LORENZ et al., 2005; SHIMOMURA & SATO, 2006). Diese und weitere Befunde haben gezeigt, dass das D-Isomer vom Laktat eher als das „unphysiologische Isomer“ betrachtet werden sollte, obwohl sein Anteil am Gesamtlaktat etwa in Kälber-Faeces 30-50% erreichen kann (SHIMOMURA & SATO, 2006).

Flüchtige Fettsäuren werden in großen Mengen bei der Fermentation von Kohlenhydraten im Dickdarm synthetisiert (BACH-KNUDSEN et al., 1991). Die Balance der synthetisierten Produkte hängt dabei von mit Wirt und Bakterien zusammenhängenden Faktoren ab (MACFARLANE & MACFARLANE, 2003). Zu den vom Wirt abhängigen Faktoren zählen Diät, Alter, Aktivität des neuroendokrinen Systems, pankreatische und andere Arten der Sekretion im GIT, Mukusproduktion, Krankheiten und Annahme der therapeutischen Mittel (Antibiotika) sowie die Dauer des epithelialen Turnover. Bakterielle Faktoren beinhalten die Diversität und die Quantität der bakteriellen Populationen, kompetitive und kooperative Interaktionen zwischen einzelnen Spezies in der Mikrobiota sowie die jeweiligen Fermentationsstrategien dieser Spezies. Für das Mengenverhältnis zwischen einzelnen flüchtigen Fettsäuren gilt: Essigsäure > Propionsäure \geq Buttersäure (BACH-KNUDSEN, 1991). Die höchsten Konzentrationen kurzkettiger Fettsäuren werden dabei im *Caecum* und im proximalen *Colon* mit 70-140 mmol/L registriert. Im distalen *Colon* fällt der Wert auf bis zu 20-70 mmol/L ab (TOPPING & CLIFTON, 2001). Die Gesamtazidität des porcinen Chymus ist mit etwa 150-200 mmol/L zu veranschlagen; das prozentuale Verhältnis von Acetat:Propionat:Butyrat beträgt dabei ca. 60:30:15 (NOUSIANEN et al., 2004).

Die Auswirkungen flüchtiger Fettsäuren lassen sich unterteilen in solche, die im *Lumen* auftreten, und jene, die als Folge von Interaktionen mit Epithelzellen der Darmwand erscheinen (TOPPING & CLIFTON, 2001). Die Präsenz flüchtiger Fettsäuren im *Lumen* (z.B. im *Colon*) führt zu einer Veränderung des pH-Werts, was auf einige Bakterien (*E. coli*, Salmonellen) hemmend, auf andere (z.B. *Serpulina hyodysenteriae*) hingegen fördernd wirken kann (CHERRINGTON et al., 1991; PLUSKE et al., 1998). Dadurch dass zusammen mit den kurzkettigen Fettsäuren auch Natrium-, Kalium- und Chlor-Ionen absorbiert werden, wird als mögliche Wirkungsweise dieser Säuren die Unterstützung der Elektrolyten-Balance genannt (LE LEIKO & WALSH, 1996; SELLIN & SOIGNIE, 1998). Die Absorption bestimmter flüchtiger Fettsäuren im Dickdarm findet ferner mit einem Energiegewinn statt, der bei aufwachsenden Schweinen bis zu 15% des gesamten Energiebedarfs decken kann (NOUSIANEN et al., 2004).

Betrachtet man die Wirkung einzelner flüchtiger Fettsäuren auf den Makroorganismus, finden sich in der Literatur zahlreiche Hinweise darauf, dass Essigsäure (Acetat) über das Blut in die peripheren Gewebe gelangt und zum Beispiel als Energiequelle für die Myozyten fungiert (BERGMAN, 1990). Von besonderem Interesse ist dabei die Rolle der n-Buttersäure. Für die Kolonozyten ist sie nicht nur die Hauptquelle der Energie (60-70%), sondern auch der Induktor ihrer Proliferation, was für den Erhalt der epithelialen Barriere besonders wichtig ist (WANG & FRIEDMAN, 1998; TOPPING & CLIFTON, 2001). MCROBERTS & RILEY (1994) zeigen, dass n-Buttersäure auch die Permeabilität der Epithelzelle erhöhen und ihr zytoplasmatisches Skelett stärken kann.

Eine Reihe weiterer Wirkungen flüchtiger Fettsäuren auf den Makroorganismus wurden beobachtet. Dazu zählen die Regulierung der Glyko- und Ketogenese in der Leber (SANO et al., 1995), die konzentrationsabhängige Verringerung oder Erhöhung der kontraktilen Aktivität der glatten Muskulatur des Darms (YAJIMA 1985; CHERBUT et al., 1997), der Einfluss auf die Genexpression in den Enterozyten (BASSON et al., 2000), auf die Wachstums- und Follikel-stimulierenden Hormone der Hypophyse (BOUKHLIQ & MARTIN 1997; MATSUNAGA et al., 1998) sowie die Verringerung der Replikation von Herpes- und Cytomegaloviren (ASAI et al., 1991; WU et al., 1994). Ein Mangel an flüchtigen Fettsäuren kann ferner zur Entwicklung einer Reihe von Krankheiten führen – hierzu zählen colorectale Adenome, Anemie, arterielle Hypertension, antibiotika-assoziiertes Durchfall, das Malabsorption-Syndrom und Eierstockkrebs (SANO et al., 1995; CHERBUT et al., 1997; BARNARD et al., 1997; MATSUNAGA et al., 1998; BOUKHLIQ & MARTIN, 1997). Daneben sind allerdings auch einige negative Einflüsse von Fettsäuren auf den Makroorganismus zu verzeichnen. So wurde etwa gezeigt, dass die n-Buttersäure eine immunsuppressive Wirkung auf die Proliferation von T- und B-Lymphozyten ausüben und eine Schädigung der Membranstruktur von Monozyten verursachen kann (BOHMIG et al., 1997; KURITA-OCHIAI et al., 1995).

Proteine

Für einige Bakterien, zu welchen unter anderem potenziell pathogene Bakterien gehören, zählen die Proteine zu den wichtigsten Substraten. Die nach der Protein-Fermentation entstehenden Ammoniak, Amine und Amide werden dabei für den Wirt als potenziell toxische und mutagene Substanzen betrachtet (MACFARLANE & MACFARLANE 1995; NYACHOTI et al., 2006). Zur Desaminierung und Decarboxylierung der Aminosäuren sind einzelne Vertreter der Gattungen *Bacteroides spp.*, Enterobakterien, *Lactobacillus spp.* und *Streptococcus spp.* fähig (MACFARLANE & MACFARLANE, 1995). Eine übermäßige Einnahme von Proteinen kann zumindest bei Hunden auch zur Vermehrung von *Clostridium perfringens* und der

Reduzierung der Bifidobakterien im Faeces führen (ZENTEK, 1995; VAN DER STEEN et al., 1997). Das synthetisierte Ammoniak kann dabei von Epithelzellen absorbiert, in Harnstoff umgewandelt und im Darm wiederverwertet oder als Komponente des Urins aus dem Organismus eliminiert werden. Die Abwicklung dieses enterohepatischen Kreislaufs des Harnstoffs benötigt eine gewisse Energiemenge vom Wirt und kann auch die intestinale Mukosa reizen (NOUSIANEN et al., 2004). Einigen Studien (MOSENTHIN et al., 1994; CANH et al., 1998; JEROCH et al., 1999) zufolge können Bakterien, wenn genug andere Fermentationssubstrate bzw. ein Energiegewinn zur Verfügung stehen, Ammoniak als Stickstoffquelle für ihr Wachstum verwenden und anschließend die gesamte NH_3 -Belastung des Wirtes verringern. NH_3 wird dabei in Form eines mikrobiellen Proteins und nicht als Harnstoff im Urin ausgeschieden, was den Energieaufwand für den Wirt verringern und die Ammoniak-Kontaminierung der Umwelt vermindern kann.

Lipide

Die intestinale Mikrobiota kann an der Metabolisierung der Lipide auf zwei verschiedene Arten mitwirken: Bakterien können exogene und endogene Lipide mithilfe von Lipasen und Dehydrogenasen bis zu freien Fettsäuren abbauen, und sie können an der Dekonjugation der Gallensäuren und der Modifizierung des Cholesterol-Metabolismus beteiligt sein (NOUSIANEN et al., 2004). Zur Dekonjugation der Gallensäuren sind eine Reihe von Milchsäurebakterien fähig, wie Laktobazillen und Bifidobakterien (TANNOCK, 2000). Nach der mikrobiellen Dekonjugation (Dehydroxylierung) der Gallensäuren entstehen sekundäre Gallensäuren (z.B. Desoxy- und Litocholsäure), die als wesentlich weniger wirksame Form für die Fettemulgation betrachtet werden (KOOLMAN & RÖHM, 2003). Als Vorteile der bakteriellen Dekonjugation der Gallensäuren nennen BARON & HYLEMON (1997) mögliche Energiegewinne und die Inhibierung von Bakterien, welche nicht ans Wachstum im GIT angepasst sind. Ferner gibt es Hinweise auf Toxizität und Mutagenität dekonjugierter Gallensäuren für den Wirtorganismus. So weisen die sekundären Gallensäuren eine deutliche Aktivität im *Colon* auf und können Zellnekrose und entzündliche Reaktionen in der Leber und im Gallenblasengang verursachen (ROWLAND, 1992). Berichtet wird auch, dass die Mikrobiota die Katabolisierung des Cholesterols erhöhen und es in eine weniger absorbierbare Form umwandeln kann (NOUSIANEN et al., 2004). Es wird vermutet, dass die Verringerung des Cholesterol-Niveaus mit der Aktivität bakterieller Gallensalzhydrolasen (*bile salt hydrolases*, BSH), welche die Dekonjugierung der Gallensäuren ermöglichen, in Verbindung stehen könnte. FRANZ & HOLZAPFEL (2004) gehen davon aus, dass die Entstehung der sekundären Gallensäuren (durch Dekonjugation) und ihre im Vergleich zu den konjugierten Gallensäuren intensivere Exkretion aus dem GIT zu einem erhöhten Verbrauch von Cholesterin für die *de novo*-

Synthese der Gallensäuren führen kann und dadurch das Cholesterin-Niveau deutlich verringert wird. Diese Hypothese schließt allerdings negative Einflüsse der sekundären Gallensäuren nicht aus.

1.3 Entwicklung der intestinalen Mikrobiota beim Schwein

Die Entwicklung der neo- und postnatalen intestinalen Mikrobiota der Säugetiere ist ein komplexer Prozess, der sowohl die Übernahme der mütterlichen Mikrobiota als auch Interaktionen zwischen dem wachsenden Organismus und den bakteriellen Gemeinschaften beinhaltet. Das Ergebnis der neo- und postnatalen Fluktuationen der bakteriellen Gemeinschaften ist die Etablierung der dichten, stabilen und metabolisch aktiven autochtonen bakteriellen Populationen (MACKIE et al., 1999).

Die Entwicklung und Etablierung bakterieller Gemeinschaften bei Säugetieren gliedert sich laut COOPERSTOCK & ZEDD (1983) sowie MACKIE et al. (1999) in vier Phasen: Die erste Phase ist die erste Bildung der Mikrobiota während und sofort nach der Geburt, die zweite der Zeitraum, in dem das Hauptnahrungsmittel der Neugeborenen Muttermilch ist (Saugperiode). Die dritte Phase ist jene Zeit, während der die Milchdiät um ein Beifutter ergänzt wird, und die vierte Phase ist die des Absetzens und des Übergangs zu der Diät, die für den erwachsenen Organismus typisch ist. INOUE et al. (2005) merken allerdings an, dass nicht nur der Wechsel der Ernährungsweise sondern auch die morphologische und immunologische Reifung des intestinalen Traktes ein Grund für die Transformierung der Mikrobiota sein kann. Die Entwicklung der Mikrobiota wird in dieser Arbeit entlang der genannten vier Phasen beschrieben.

1.3.1 Erstbesiedlung

Seit geraumer Zeit ist die Forschung sich weitgehend einig, dass der gastrointestinale Trakt des Fötus steril bzw. keimfrei ist. Innerhalb weniger Stunden nach der Geburt gelangen aber Bakterien in den Körper des Neugeborenen. Als Hauptquellen der ersten tierischen intestinalen Mikrobiota dienen die vaginale, intestinale und Hautmikrobiota der Mutter sowie die Umgebung, in der die Geburt stattfindet (PENDERS et al., 2007). Dadurch dass das intestinale Milieu des Neugeborenen ein positives Redoxpotenzial zeigt, wird der gastrointestinale Trakt zuerst mit fakultativ-anaeroben Bakterien wie Enterobakterien, *Staphylococcus spp.*, *Lactobacillus spp.* und *Streptococcus spp.* kolonisiert (MIKELSAAR et al., 2004). Während der ersten Woche wird das Redoxpotenzial durch den massiven Sauerstoffverbrauch dieser Bakterien gesenkt und zumindest im Darm ein anaerobes Milieu für streng anaerobe Spezies wie *Bacteroides spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Eubacterium spp.*, *Clostridium spp.* und *Peptostreptococcus spp.* geschaffen (MIKELSAAR et al., 2004). Die Erhöhung der Diversität der Mikro-

biota entspricht dabei einem Anstieg der gesamten bakteriellen Zellzahl. Die Besiedlung des intestinalen Traktes der Ferkel, Küken und Kälber läuft im Ganzen wie folgt: Die ersten Kolonisatoren sind fakultativ-anaerobe Bakterien, deren Population sich ab dem 5. Lebenstag auf Kosten der streng-anaeroben Spezies vergrößert (SWORDS et al., 1993; BAUER et al., 2006). Die Zelldichte der dominanten Spezies im Faeces neugeborener Ferkel – z.B. *E.coli* und *Streptococcus spp.* – kann in Konzentrationen von 10^7 - 10^9 Zellen/g Kot detektiert werden (STEWART, 1997). Die Gesamtpopulation kann dabei schon 12 Stunden nach der Geburt im *Colon* 10^9 - 10^{10} Zellen erreichen (SWORDS et al., 1993). Die qualitative und quantitative Zusammensetzung der sich entwickelnden Mikrobiota hängt von einer Reihe von Faktoren ab, von denen einige in der Folge näher betrachtet werden.

a) Transfer der mütterlichen Mikrobiota zum Kind

Viele pathogene Bakterien (z.B. Vertreter der *Proteobacteria*) gelangen auf oral-fäkalem Wege in den Makroorganismus und können sich außerhalb des Wirts in zahlreichen Umwelt-Reservoirs vermehren. Einzelne Vertreter von *Firmicutes* und *Bacteroides*, die im tierischen gastrointestinalen Trakt detektiert wurden und zu den dominanten bakteriellen Phyla zählen, wachsen dagegen außerhalb des Wirtsorganismus nicht und werden vermutlich von den Eltern geerbt (LEY et al., 2006). Für die Bestätigung dieser „parent-to-offspring transmission“-Hypothese werden mütterliche Mikrobioten und solche ihrer Babys verglichen und der Grad ihrer Übereinstimmung festgestellt. So untersuchten LEY et al. (2005) mithilfe der 16S rRNA-Analytik die *Cecum*-Mikrobiota genetisch fettleibiger und magerer Mäuse. Unter anderem wurde eine hohe Ähnlichkeit der Mikrobiota zwischen Mutter und Kindern sowie zwischen Geschwistern festgestellt. Gemessen anhand der taxonomischen Einheiten waren die untersuchten Proben meistens auf dem Phylum-, Familien-, Klassen- und Ordnerniveau ähnlich, wiesen auf dem Gattungsniveau jedoch gewisse Unterschiede auf.

Es wird vermutet, dass die erste Kontaminierung der neugeborenen Tiere mit Bakterien durch den Kontakt mit der vaginalen, intestinalen und Hautmikrobiota der Mutter erfolgt. Die Übertragung der Mikroflora vollzieht sich dabei durch verschiedene mechanische Prozesse: Beim Geburtsvorgang kann der Fetus Fruchtwasser und Vaginalsekrete verschlucken, die Elemente der Mikrobiota der Mutter enthalten. Nach der Geburt kommt es durch Hautkontakt und Saugen zu einer weiteren bakteriellen Kontaminierung (MACKIE et al., 1999).

Eine Reihe von Forschern (TANNOCK et al., 1990a; MATSUMIYA et al., 2002; MIKELSAAR et al., 2004) hat allerdings nachgewiesen, dass bakterielle Spezies nicht in gleicher Weise übertragen werden können und schon kurz nach der Geburt die Mikrobiota von Mutter und Kind eine unterschiedliche Zusammensetzung aufweisen kann. So untersuchten TAN-

NOCK et al. (1990a, 1990b) Plasmidprofile von Laktobazillen, Enterobakterien und Bifidobakterien aus vaginalen, oralen und rektalen Abstrichen der Mutter sowie Faeces-Proben ihrer neugeborenen Kindern (0, 10 und 30 Tage). Die Plasmidprofile von Entero- und Bifidobakterien waren in den Mutter-Kind-Proben identisch, während bei den Laktobazillen deutliche Unterschiede auftraten. Als mögliche Gründe der begrenzten Übertragung von Laktobazillen und anderen bakteriellen Gruppen und Spezies von Mutter zu Kind (auch nach der Geburt) werden sowohl hohe hygienische Standards genannt, unter deren die menschliche Geburt stattfindet, als auch eine – im Vergleich etwa zur Kokken-Flora – geringere Resistenz der Laktobazillen gegen einige Antibiotika.

Bei den Tieren erfolgt tendenziell ein umfangreicherer Transfer der mütterlichen Mikrobiota auf ihr Kind als beim Menschen, wobei sich jedoch ebenfalls Hindernisse bei der Übertragung einzelner bakterieller Gruppen und Spezies ergeben können. So wird vermutet, dass die intestinalen Mikrobioten der Ferkel durch eine direkte Aufnahme von Sauen-Faeces (nach SANSOM & GLEED (1981) durchschnittlich 20g/Tag) mit darin enthaltenen Bakterien etabliert werden können (JADAMUS et al., 2001; MACHA et al., 2004; VAHJEN et al., 2007). Wichtig sind dabei die Häufigkeit der Aufnahme sowie die Menge der aufgenommenen Faeces. In Anbetracht der Tatsache, dass in jedem Wurf eine bestimmte Heterogenität zu beobachten ist, können zudem schwerere bzw. weniger aktive Ferkel öfter und länger Kontakt zu Sauenzitzen haben als die leichteren und aktiveren, die dafür häufiger mit herumliegendem Kot in Berührung kommen. VAHJEN et al. (2007) vermuten daher, dass die intestinalen Mikrobioten der aktiveren (leichteren) Ferkel tendenziell die intestinale- bzw. Faeces-Mikrobiota der Sau widerspiegeln werden, während die Zusammensetzung der intestinalen bakteriellen Gemeinschaften weniger aktiver Ferkel stärker von mikrobiellen Komponenten der Sauenmilch beeinflusst sind.

b) Genotyp

Der Einfluss des Genotyps des Wirtsorganismus auf seine mikrobielle Besiedlung wird derzeit intensiv untersucht. LEY et al. (2006) bezeichnen den Wirtsgenotyp als „variablen Faktor, der die vertikale Übertragung der Mikrobiota von den Eltern auf ihre Kinder beeinflusst“. ZOETENDAL et al. (2002) untersuchen PCR-DGGE-Profile humaner Faeces-Proben von eineiigen Zwillinge und ihrer Ehepartner. Die Ähnlichkeit der fäkalen Mikrobiota der Zwillinge lag dabei signifikant höher als die Ähnlichkeit zwischen den Proben der Zwillinge und ihrer Partner. Als Grund für die Identität der fäkalen Mikroflora der Zwillinge wurden sowohl der Genotyp als auch die gemeinsame Quelle der ersten Mikrobiota – die Mutter – genannt. In einer Studie von LEY et al. (2005) wird der Einfluss des Genotyps auf die Präsenz einzelner

bakterieller Gruppen gezeigt. So weisen genetisch fettleibige (*ob/ob*) Mäuse im Vergleich zu genetisch mageren (*ob/+* und *+/+*) Tieren eine statistisch signifikante 50%ige Reduzierung von *Bacteroides* sowie eine ebenfalls signifikant erhöhte Zahl von *Firmicutes* (v.a. *Clostridium* cluster XIVa mit einem Anteil von 75% an allen *Firmicutes*) auf.

c) Fütterungstyp

Ein weiterer Faktor, der die postnatale Mikrobiota beeinflusst und momentan regelmäßiger Forschungsgegenstand ist, ist die Art der Fütterung der Neugeborenen bzw. der Einfluss der mütterlichen Milch und ihres Ersatzes auf die intestinale Mikrobiota des Kindes. Aus humanmedizinischen Studien ist bekannt, dass bestimmte Eigenschaften der Milch (z.B. hohes Laktose-Niveau, weniger Kasein und Kalziumphosphat sowie niedrigere Pufferungskapazität) die Entwicklung einzelner bakterieller Spezies (vor allem Bifidobakterien) begünstigen können (BEZIRTZOGLU 1997; PENDERS et al., 2007). Auch bei Ferkeln beeinflusst der Fütterungstyp die intestinale Mikrobiota. So verglichen BARROW et al. (1977) die Magen-, *Duodenum*- und *Jejunum*-Mikrobiota von Ferkeln, die ab dem 2. Lebenstag Sauenmilch bzw. einen Sauenmilch-Ersatz bekamen. Im Vergleich zu den „Sauenmilch“-Ferkeln wiesen die Tiere der zweiten Gruppe signifikant mehr hämolytischen *E. coli* auf und – statistisch allerdings insignifikant – weniger Laktobazillen (u.a. *L. fermentum*) und Streptokokken (u.a. *S. salivarius*). Die Autoren merkten an, dass die *E. coli*-Population der „Ersatzmilch“-Ferkel keine mit Durchfall assoziierten Serotypen enthielt, was aber die Anwesenheit untypischer und zur Zeit der Untersuchung noch nicht klassifizierter Serotypen nicht ausschließt.

c) Diät der Mutter

Die Diät bzw. Bestandteile der Diät gehören zu den wichtigsten Faktoren bei der Zusammensetzung und der metabolischen Aktivität der gastrointestinalen Mikrobiota monogastrischer Tiere (MACFERLANE et al., 1992). Es wird vermutet, dass die maternale Diät nicht nur die muttereigene sondern auch die neo- und postnatale Mikrobiota des Kindes beeinflussen kann (PENDERS et al., 2007). DEMECKOVÁ et al. (2002) untersuchten den Einfluss fermentierten (*L. plantarum*) flüssigen Futters für Sauen (verfüttert während der zwei letzten Wochen *ante partum*) auf das Verhältnis von Milchsäure- und koliformen Bakterien im Kot ihrer Ferkel. Es wurde festgestellt, dass Ferkel von Müttern, die das fermentierte Futter bekamen, signifikant weniger koliforme und mehr Milchsäurebakterien aufwiesen als die Ferkel von Sauen, die konventionell gefüttert wurden. Ähnliche günstige Effekte der mütterlichen Diät für die Ferkel bestätigt eine Reihe von Studien (SCHAREK et al., 2005; POLLMANN et al., 2005; VAHJEN et al., 2007). Die Autoren zeigen, dass die Verfütterung des probiotischen *E. faecium* NCIMB 10415 an die Sau (ab dem 90. Tag *ante partum*) bei den Ferkeln zu einer

Senkung der Nachweishäufigkeit der *E. coli*-Pathovaren, einer (um 50%) reduzierten Übertragung von *Chlamydia suis* von *Chlamydia*-positiven Sauen sowie einer Verringerung der *E. faecalis*-Zellzahl im *Colon* führte. In der Studie von PEDERSEN et al. (1992) bekamen Sauen rifampizin-resistente Stämme von Milchsäurebakterien (verfüttert während der letzten Woche *ante partum*), was aber keine Auswirkungen auf die intestinale Mikrobiota der Ferkel hatte: Probiotische Zellen wurden in sehr niedriger Quantität im Sauen-Kot detektiert, aber nicht in den Ferkel-Proben nachgewiesen.

d) Umgebung und Art der Geburt

Die Zusammensetzung der intestinalen Mikroflora der Säuglinge hängt oft auch vom Ort und der Art der Geburt ab (PENDERS et al., 2007; KELLY et al., 2007). Eine unlängst erschienene Studie von PLUSKE et al. (2007) dokumentiert deutliche (mittels 16S rDNA PCR-DGGE bestimmte) Unterschiede in der intestinalen bakteriellen Diversität zwischen Ferkeln, die in einem Raum unter konventionellen Bedingungen zur Welt kamen, und solchen, die im Freien geboren wurden. Die Autoren erklären die höhere Diversität bei den im Freien geborenen Ferkeln durch die Aufnahme von Komponenten des Bodens, des Grases und des Strohs, mit der der Aufenthalt im Freien verbunden ist.

1.3.2 Saugphase

Die Saugperiode bezeichnet den Zeitraum, in dem das Hauptnahrungsmittel der Neugeborenen die Milch der Mutter ist. Für die Ferkel beträgt die Saugperiode vom Tag der Geburt 21-23 (Frühabsetzen) oder bis zu 35 Tage (JEROCH et al., 1999). Ab dem 14. Lebenstag bis zum Absetzen werden die Ferkel in der Regel zusätzlich mit einem Beifutter (Prästarter, *creep feed*) gefüttert, dessen Gabe nach dem Absetzen endet.

Milchdiät der Ferkel

Das Kolostrum und anschließend die Muttermilch sind nicht nur Lieferanten lebenswichtiger Antikörper, deren Transfer durch die porcine Plazenta nicht möglich ist, sondern auch eine wichtige Quelle der Bakterien. Die Milchmikrobiota besteht dabei aus den Bakterien, die die Zitzen und die nahen Hautbereiche besiedeln (WEST et al., 1979). GAVIN & OSTOVAR (1977) und WEST et al. (1979) zufolge enthält die Milch-Mikrobiota vorwiegend Bakterien der Gattungen *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* sowie *Enterococcus*. Auch die Bestandteile der Milch wie z.B. Glycoproteine, Glycolipide und Lysozyme, die auf viele bakterielle Spezies antimikrobiell wirken, beeinflussen die Entwicklung der intestinalen Mikrobiota des Menschen und des Tiers in der Saugphase (BAUER et al., 2006).

Die dominanten Populationen im gastrointestinalen Trakt der Säuglinge, vor allem in seinen oberen Abschnitten, stellen diejenigen Spezies dar, welche die Komponenten der Milch für ihren Metabolismus und ihr Wachstum ausnutzen können (NOUSIAINEN et al., 2004). Zu den predominantesten Spezies der intestinalen Mikrobiota der Saugferkel gehören Laktobazillen, Enterokokken und *E. coli*, deren Populationen während der gesamten Saugperiode nicht nur zellzahlreich sind, sondern auch hochdivers (KATOULI & WALLGREN 2005). So konnten TANNOCK et al. (1990a) in den Speiseröhre- und Magen-Proben von 1.-14. Tage alten Saugferkeln zwölf verschiedene Plasmidprofile von Laktobazillen nachweisen. Die gesamte Laktobazillen-Population bestand dabei aus 10^7 - 10^9 Zellen. KONSTANTINOV et al. (2006) detektierten einzelne Laktobazillen-Spezies (*L. sobrius*, *L. reuteri*, *L. acidophilus*) in den ilealen Proben 2.-12. Tage alter Ferkel, deren Populationsgröße sich auf einem Niveau von 10^4 - 10^8 Zellen/g luminalem Inhalt befand. Auch Populationen koliformer Bakterien sind in dieser Phase bei den Ferkeln sehr zahlreich und divers: Bei einem Vergleich der *E. coli*-Populationen im Faeces von Sauen und ihrer saugenden Ferkel registrierten KATOULI et al. (1995) in den Ferkel-Proben insgesamt 239 biochemische Phenotypen, in den Sauen-Proben dagegen lediglich 94. Die Bifidobakterien, die bei den menschlichen Säuglingen zu den predominantesten Spezies der intestinalen Mikrobiota gehören, spielen bei Ferkeln dagegen nur untergeordnete Rolle. Ihr Anteil an der gesamten bakteriellen Population beträgt MIKKELSEN et al. (2003) zufolge weniger als 1%.

Je nach der verwendeten Nachweismethode stehen momentan verschiedene qualitative und quantitative Charakteristika der intestinalen Mikrobiota der Saugferkel zur Diskussion. Eine mögliche Zusammensetzung der gastrointestinalen Mikrobiota von Saugferkeln, die die Studie von STROMPFOVA et al. (2006) liefert, ist in Tabelle 3 dargestellt.

Tab. 3: Bakterielle Besiedlung der Faeces von Saugferkeln [Log KBE/g] nach STROMPFOVA et al. (2006)

Detektierte Spezies	Tage nach der Geburt		
	1	7	14
Koagulase-positive Staphylokokken	6,1	4,0	3,1
Koagulase-negative Staphylokokken	6,9	4,8	4,8
<i>Enterococcus spp.</i>	6,8	7,1	6,4
<i>E.coli</i>	7,4	10,1	9,7
andere <i>Enterobacteriaceae</i>	6,9	5,7	6,3
<i>Lactobacillus spp.</i>	5,5	7,1	6,2

Da sich der Magen-Darm-Trakt der Saugferkel sowohl mikrobiell als auch immunologisch in der Entwicklung befindet, ist das intestinale Mikroökosystem für viele negative Einflüsse sehr sensibel. Besonders wichtig sind dabei Veränderungen der bakteriellen Gemeinschaften zugunsten pathogener, mit Durchfall assoziierter Spezies und Stämme wie *Clostridium perfringens* oder *E. coli* (FAIRBROTHER, 1999; TAYLOR, 1999). Eine Dominanz dieser Stämme in der intestinalen Mikrobiota (beim 1.000-10.000fachen des Normalwertes nach EICH & SCHMIDT, 1998) korreliert in der Regel mit dem Auftreten schweren Durchfalls, der zu den wesentlichen Verlustursachen in der Ferkelzucht gehört. Populationen dieser Stämme, die sich auf subdominantem Niveau ($<10^4$ g/Darminhalt) befinden, werden allerdings zu den autochthonen Spezies gezählt. So beobachten INOUE et al. (2005) mittels TGGE-Analyse (*temperature gradient gel electrophoresis*) der Kot-Proben gesunder Saugferkel eine Eliminierung der *Clostridium perfringens*-Bande zum 7. Lebenstag und das Auftreten einiger neuer Banden, die vermutlich zu den Gattungen *Eubacterium*, *Fusobacterium* oder *Propionibacterium* gehören dürften. Als mögliche Erklärung für diese Veränderungen nennen die Autoren unter anderem die Ersetzung der IgA in der mütterlichen Milch durch IgG zum 7. Tag *post partum*, die Veränderungen in der Mikrobiota nach sich zieht.

Ergänzung der Milchdiät um Beifutter

In der ersten Lebenswoche wird der Energie- und Nährstoffbedarfs des Saugferkels ausschließlich durch Sauenmilch gedeckt. Ab der zweiten und dritten Lebenswoche treten, besonders bei großen Würfen, Versorgungslücken auf (LINDERMAYER et al., 1994). Um Nährstoffdefizite auszugleichen, die Ferkel an Festfutter zu gewöhnen, eine gezielte Nährstoffsupplementierung durchzuführen und der Gefahr der Absäugung der Sauen zu begegnen, wird den saugenden Ferkel ab dem 7.-14. Lebenstag ein Beifutter angeboten (JÉROCH et al., 1999). Es wird vermutet, dass die Einführung des Beifutters die Reifung und Stabilisierung des Magen-Darm-Traktes unterstützt, die Kolonisierung mit enterotoxischen *E. coli* (ETEC) während der Absetzzeit hemmt und nach dem Absetzen eine erhöhte Futteraufnahme ermöglicht (CARSTENSEN et al., 2005).

Es gibt nur wenige Studien, welche die Entwicklung der Mikrobiota in dieser Phase untersuchen. Die Mehrzahl von ihnen hat sich auf den Einfluss des Beifutters auf bestimmte bakterielle Gruppen konzentriert, wobei die Ergebnisse von Studie zu Studie sehr unterschiedlich sind. So untersuchten MATHEW et al. (1994) die *Ileum*-Mikrobiota von Ferkeln, deren Saugperiode mit bzw. ohne Beifutter verlief. Dabei wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede in den Konzentrationen hämolytischer *E. coli*, von Laktobazillen oder bakteriellen Metaboliten (Laktat und flüchtige Fettsäure) festgestellt. CARSTENSEN et al. (2005) dage-

gen vermelden eine signifikant verringerte Nachweisbarkeit hämolytischer *E. coli* in den Kot-Proben der „Beifutter“-Ferkel. Allerdings zeigten Ferkel, die niedrigere Mengen Beifutter zu sich nahmen, nach dem Absetzen auch eine geringere Durchfall-Inzidenz. INOUE et al. (2005) registrierten während der „Beifutter-Phase“ eine deutliche Steigerung der Diversität; MURREY et al. (1987) beobachteten hohe Konzentrationen flüchtiger Fettsäuren während dieser Zeit. Es wird vermutet, dass die Variabilität der beobachteten mikrobiologischen Effekte mit der von Wurf zu Wurf verschieden stark ausgeprägten Beifutteraufnahme zusammenhängt (BRUININX et al., 2002; WATTANAKUL et al., 2005; CARSTENSEN et al., 2005).

1.3.3 Absetzen

Das Absetzen mit seinen möglichen Folgen (Störungen des gastrointestinalen Systems, erhöhte Empfindlichkeit für Infektionen oder Durchfall) gehört zu den kritischsten Perioden der Ferkelzucht. Ferkel in der kommerziellen Ferkelzucht können im Alter von 19-23 (Frühabsetzen) oder 28-35 Tage (konventionelles Absetzen) von der Mutter abgesetzt werden (JEROCH et al., 1999). SWORDS et al. (1993) und INOUE et al. (2005) bezeichnen das Absetzen als die nach Erstbesiedlung und Saugperiode nächste Phase, während der (vor allem durch die Einführung des Festfutters) Veränderungen der intestinalen Mikrobiota verursacht werden.

Während des natürlichen Absetzens werden die Ferkel schrittweise von der Sauenmilch entwöhnt. Um sich selbst vor dem Absaugen zu schützen, vermeiden Wildsauern den ständigen Kontakt mit ihrem Nachwuchs, so dass die Ferkel selbst nach alternativen zusätzlichen Quellen der Nahrungsaufnahme suchen müssen. Auf diese Weise wird der gastrointestinale Trakt der Frischlinge nach und nach an die Aufnahme und Verdauung von Festfutter angepasst. Ab der 10.-16. Woche werden diese Ferkel problemlos von der Sau abgesetzt und sind gut auf die Aufnahme anderer Futtermitteln vorbereitet (CASTILLO et al., 2007; KATOULI & WALLGREN, 2005). Domestizierte bzw. kommerzielle Schweine befinden sich dagegen zwangsläufig in engerem Kontakt mit ihren Ferkeln und können überschüssiges Saugen nicht vermeiden. Die Ferkel ihrerseits benötigen keine anderen Nahrungsquellen und haben zum Zeitpunkt des Absetzens einen oft unreifen und für die Aufnahme festen Futters nicht ausreichend vorbereiteten Magen-Darm-Trakt (KATOULI & WALLGREN, 2005).

Die negativen Folgen des Absetzens werden laut LALLES et al. (2004) durch psychologische, soziale, ökologische und diätische Stressfaktoren verursacht. Der unmittelbare Effekt des Absetzens besteht dabei in der dramatischen Reduzierung der Futteraufnahme, wobei 50% der abgesetzten Ferkel erst innerhalb von 24 Stunden nach dem Absetzen zum ersten Mal Futter akzeptieren, während 10% der Ferkel erst nach 48 Stunden die erste Nahrung zu sich nehmen (BROOKS et al., 2001). Erst um den 8.-14. Tag nach dem Absetzen erreichen die Ferkel ihre

LITERATURÜBERSICHT

Futteraufnahme-Werte von vor dem Absetzen wieder (LE DIVIDICH & SEVE, 2000). Zu den intestinalen Neuerungen können Veränderungen der Zotten- und Krypten-Morphologie sowie eine Reduzierung der digestiven Enzymaktivitäten und die Kolonisierung mit pathogenen Mikroorganismen (*E. coli* und Rotavirus) hinzukommen (PLUSKE et al., 1997). Eine Übersicht über die Risikofaktoren des Absetzens ist in Tabelle 4 dargestellt.

Tab. 4: Risikofaktoren des Absetzensphase nach LALLES et al. (2004)

Faktoren	Kurzbeschreibung
1. Unreife	<ul style="list-style-type: none"> - Unreife des Tiers bezüglich der Zuchtumstände (u.a. Fütterung); - Unreife des Magen-Darm-Traktes (Sekretion, Peristaltik, Verdauung, Absorption usw.); - Unreife des Immunsystem (Gesamt- und intestinales)
2. Stress	
a) psychologischer	<ul style="list-style-type: none"> - Abrupte Trennung von der Mutter; - Mischen mit Ferkeln anderer Würfe; - neue Umgebung (Stall, Farm usw.)
b) diätischer	<ul style="list-style-type: none"> - Absetzen der Milch (flüssig, schmackhaft, verdaubar) und Einführung des Festfutters (fest, weniger schmackhaft und verdaubar); - getrennter Zugang zu Trinkwasser
3. Induzierte Störungen des intestinalen Traktes	
a) Veränderungen der intestinalen Architektur und ihrer Funktionen	<ul style="list-style-type: none"> - Morphologie: Atrophie der Zotten gefolgt von Krypten-Hyperplasie - reduzierte Aktivität der intestinalen Verdauungsenzyme; - Störung der intestinalen Absorption, Sekretion und Permeabilität
b) Darmassoziierte pathogene Mikroorganismen	<ul style="list-style-type: none"> - Bakterien (enterotoxigene oder enteropathogene <i>E. coli</i>); - Viren (Rotavirus).
4. Hauptrisikofaktoren	
a) Diätische Faktoren	<ul style="list-style-type: none"> - niedrige oder unregelmäßige Futteraufnahme; - Anwesenheit von antinutritionalen Faktoren (antitryptische Faktoren, Lektine usw.); - Rationen mit hoher Komplexität der Zusammensetzung und niedriger Verdaulichkeit (Proteine, Kohlenhydrate); - hohe Konzentrationen von Proteinen (+ hohe Puffer-Kapazität)
b) Haltungsbedingte Faktoren	<ul style="list-style-type: none"> - hohe Zahl der Ferkel pro Wurf / niedrige Lebendmassen beim Absetzen; - Hygienemangel; - ungewohnte Umgebung (niedrige Temperaturen, niedrige Luftqualität usw.)

Offensichtlich können die in Tabelle 4 ausgewiesenen Stressfaktoren auch die intestinalen Mikrobioten abgesetzter Ferkel beeinflussen. Die Bakterienvielfalt der gastrointestinalen Flora kurz nach dem Absetzen nimmt typischerweise drastisch ab, wodurch sich auch die Kolonisationsresistenz verringert (KATOULI & WALLGREN, 2005). Die Größe der bakteriellen Population kann dabei laut MELIN et al. (1997) unverändert bleiben, was durch die Proliferation einzelner Spezies und Stämme (auch pathogener) zu erklären ist. FRANKLIN et al. (2002), KONSTANTINOV et al. (2006) sowie CASTILLO et al. (2007) registrierten kurz nach dem Absetzen eine signifikante Abnahme der Gesamtzahl an Bakterien, vor allem *Lactobacillus* spp. (*L. reuteri*, *L. acidophilus*, *L. salivarius*), sowie eine signifikante Zunahme von *E. coli*. SWORDS et al. (1993) und JENSEN (1998) fanden ebenso, dass nach dem Absetzen vor allem Gram-negative Bakterien wie *Enterobacteriaceae* und *Bacteroides* spp. in der intestinalen Mikrobiota dominieren. Die Populationen koliformer Bakterien bestehen dabei aus Spezies und Stämmen, die in der Saugperiode nicht vorhanden waren und für die Unterschiede in der Zusammensetzung der intestinalen Mikrobioten der Saug- und abgesetzten Ferkel verantwortlich sein können (KATOULI et al., 1997).

Die gastrointestinale Mikrobiota einzelner Tiere des Wurfs kann während des Absetzens sehr variabel sein. KONSTANTINOV et al. (2006) und MELIN et al. (1997) weisen nach, dass die – mittels PCR-DGGE bestimmte – Ähnlichkeit der intestinalen Mikrobiota zwischen Ferkeln sowie zwischen Ferkeln und ihrer Mutter in dieser Phase niedriger ist als während der Saugperiode. CASTILLO et al. (2007) stellten keine Unterschiede in der Stabilität der Mikrobiota der Saug- und abgesetzten Ferkel fest, fanden aber deutliche Unterschiede in ihrer Zusammensetzung. KATOULI & WALLGREN (2005) postulieren, dass die Stabilisierung der bakteriellen Gemeinschaften erst in der 2.-3. Woche nach dem Absetzen erreicht wird.

Angaben über die metabolische Aktivität der intestinalen Mikrobiota während des Absetzens variieren ebenfalls von Autor zu Autor teils sehr stark. FRANKLIN et al. (2002) registrierten bei abgesetzten Ferkeln im Vergleich zu Saugferkeln keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Konzentrationen von Laktat und Fettsäuren insgesamt, während die Essigsäurekonzentration bei den abgesetzten Tiere niedriger war. KONSTANTINOV et al. (2006) vermelden für abgesetzte Tiere eine signifikante Abnahme der Ammoniak- und signifikant höhere Laktat-Konzentrationen. Die Menge der flüchtigen Fettsäuren war dabei nicht signifikant unterschiedlich. In der Studie von THYMANN et al. (2007) werden bei abgesetzten Ferkeln im Vergleich zu den Saugferkeln signifikant höhere Werte von Essig- und Propionsäure ermittelt.

Wie bereits erwähnt, sind für die Unterschiede in der intestinalen Mikrobiota der Saug- und abgesetzten Ferkel vermutlich vor allem Umstellungen der Diät verantwortlich. Diese kann unter anderem zur Vermehrung der Populationen pathogener Stämme wie Toxin bildenden *E. coli* oder *Salmonella* führen, deren überdurchschnittliche Anwesenheit im gastrointestinalen Trakt der abgesetzten Ferkel mit dem Auftreten schwerer Durchfälle verbunden sein kann (BERTSCHINGER, 1999). MELIN et al. (2000) berichten allerdings, dass auch nicht mit Durchfall assoziierte koliforme Bakterien, die bis zu 4 Wochen bei abgesetzten Ferkeln persistieren, zur Dysbiose der gastrointestinalen Mikrobiota dieser Ferkel führen können.

1.4 Einfluss von Probiotika auf die Entwicklung der intestinalen Mikrobiota

Da die Zusammensetzung der individuellen Mikrobiota durch die Ergänzung um neue oder durch die Eliminierung unerwünschter Spezies entscheidend beeinflusst werden kann, wurden diverse Strategien entwickelt, die eine solche gezielte Kontrolle gestatten (MACKIE et al., 1999). Es wird vermutet, dass eine Modifizierung der intestinalen Mikrobiota des Tiers durch Ergänzung der ursprünglichen bakteriellen Gemeinschaften um neue bakterielle Spezies, die auf die Gesundheit des Wirts fördernd wirken, sowohl durch die Verfütterung von Nahrungssubstraten (z.B. Oligosacharide), die das Wachstum bestimmter autochtoner Spezies stimulieren können, als auch durch direkte Gabe des exogenen spezifischen Stamms erfolgen kann (RAMBAUD et al., 1993). Im zweiten Fall handelt es sich um die so genannten „probiotischen“ Bakterien, deren Wirkungsmechanismen, ungeachtet der vielen beobachteten Effekte auf den Wirtsorganismus, bislang noch weitgehend ungeklärt sind.

1.4.1 Definition

Die Überlegung, dass bestimmte bakterielle Stämme positive Einflüsse auf die Gesundheit des Wirtes ausüben können, wurde vom späteren Nobelpreisträger Ilija Mechnikoff bereits zu Anfang des 20. Jahrhunderts propagiert. Der Terminus „Probiotikum“ wurde aber erst in den 60er Jahren definiert und für Organismen oder Substanzen verwendet, die das Wachstum erwünschter, für den Makroorganismus förderlicher Spezies aktivieren und somit zur Etablierung eines günstigen mikrobiellen Gleichgewichtes beitragen (LILLY & STILLWELL, 1965). In der Folge entwickelten sich Definitionen von Probiotika auf Grundlage nachgewiesener klinischer und *in vitro*-Effekte. NOUSIANEN et al. (2004) etwa bezeichnen als tierische Probiotika „lebensfähige Mikroorganismen, die zu einer Verbesserung des gastrointestinalen Mikroökosystem beitragen und so eine Verringerung intestinaler Infektionen, eine Erhöhung der Produktion und/oder eine Verbesserung der Futter-Hygiene bewirken“. Die Mehrzahl der probiotischen Stämme wurde ursprünglich aus der intestinalen Mikrobiota des Menschen und des Tieres isoliert. In der Tierernährung werden aber auch Stämme verwendet,

deren natürliches Habitat der Boden (*Bacillus cereus*), Früchte (*Saccharomyces cerevisiae*) oder Milch (*Pediococcus acidilactici*) sind (SIMON, 2005). Für die Schweineernährung sind derzeit in der EU insgesamt 14 probiotische Keime zugelassen, darunter fünf Stämme von *Enterococcus faecium*, *Bacillus cereus* var. *toyoi*, *Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus farciminis*, *Sacharomyces cerevisiae*, *Klyveromyces marxianus* sowie Kombinationen von *E. faecium* und *Lactobacillus rhamnosus* sowie *Bacillus licheniformis* und *B. subtilis*.¹

1.4.2 Wirkungsmechanismen

Funktionale Effekte, die bei der Anwendung der Probiotika registriert und als mögliche Wirkungsmechanismen betrachtet wurden, umfassen die Inhibierung pathogener Mikroorganismen, die Veränderung des mikrobiellen Metabolismus (Enzymaktivität), die Verstärkung der gastrointestinalen mukosalen Barriere, antimutagene und antikanzerogene Aktivitäten, die Stimulierung des Immunsystems sowie die Senkung der Cholesterin-Konzentration im Blut (FULLER, 1989; SALMINEN et al., 1996; FRANZ & HOLZAPFEL, 2004). Hauptwirkungsmechanismus der Probiotika scheint allerdings die Modifizierung mikrobieller Populationen zu sein, wobei die Veränderung der Struktur und der Funktionen des intestinalen Epitheliums und der Einfluss auf das Immunsystem als sekundäre Effekte betrachtet werden können (SIMON, 2005).

Die Proliferation probiotischer Bakterien im gastrointestinalen Trakt führt zu einem Ungleichgewicht der residenten Mikrobiota und infolgedessen zu einer Erhöhung der Kolonisationsresistenz. Diese „Schutzfunktion“ der probiotischen Bakterien gegen pathogene Spezies wird oft mit dem Begriff der „*competitive exclusion*“ beschrieben. Zu den Elementen der „*competitive exclusion*“ gehören nach HEYMAN & MENARD (2002), NOUSIAINEN et al. (2004) und SIMON (2005):

(i) Konkurrenz um Adhäsionsrezeptoren an den Epithelzellen der Darmwand

Probiotische Stämme können die Genexpression von Muzinen induzieren bzw. den Zugang von Pathogenen zu Adhäsionsrezeptoren verhindern, oder mithilfe ihrer zahlreichen Adhäsionsmoleküle (Polysaccharide, Proteine, Lipide, Lipoteichoicinsäure) diese Adhäsionsrezeptoren effektiver als pathogene Spezies für die eigene Adhäsion verwenden (MACK et al., 1999; SERVIN & COCCONIER, 2003). Auch einzelne Komponenten einiger probiotischer Stämme, wie z.B. hochmolekulare Produkte (bestehend aus Glukose, N-Acetylglucosamine und Galaktose) von *Lactobacillus fermentum* oder Biosurfaktanten von *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus rhamnosus* oder *Streptococcus mitis*, können die Adhäsion von Enteropathoge-

¹ Vgl.: Das geltende Futtermittelrecht, Grüne Broschüre, 19. Auflage, Stand Dezember 2007.

nen (*Escherichia spp.*, *Salmonella spp.*, *Clostridium spp.*) blockieren (BLOMBERG et al., 1993; OUWEHAND & CONWAY, 1996; VAN HOOGMOED et al., 2000; HEINEMANN et al., 2000; COLLADO et al., 2007).

(ii) Konkurrenz um Nährstoffe

Die Hypothese, dass zwischen Bakterien eine Nährstoffkonkurrenz möglich ist, ist bereits in den 80er Jahren aufgestellt worden. FRETER et al. (1983) beobachteten beispielsweise ein vermindertes Wachstum von *E. coli*, *Fusobacterium spp.* und *Eubacterium spp.* in der *Cecum*-Mikrobiota der Maus. Dies wurde vor allem bei individueller Zugabe dieser Spezies registriert, was die Autoren mit einer vermehrten Verwertung derselben Nährsubstrate durch die *Cecum*-Mikrobiota erklären, die auch für die getesteten Bakterien notwendig sind. Als Hauptfaktor solcher limitierender Vermehrung der Pathogene bei Anwesenheit probiotischer Bakterien nennt HENTGES (1992) die erhöhte Nutzung der leicht verwertbaren Kohlenhydrate durch probiotische Spezies bzw. den Mangel an Energiesubstraten auf Seiten der unerwünschten Spezies.

(iii) Produktion spezifischer antimikrobieller Substanzen, die entweder direkt inhibierend auf pathogene Spezies wirken (Bakteriozine) oder ungünstige Bedingungen für das Wachstum und die Kolonisation unerwünschter Spezies schaffen (Milchsäure, Essigsäure, Wasserstoffperoxide) (GENOVESE et al., 2000).

Die antimikrobielle Effizienz von Bakteriozinen, die insbesondere durch probiotische Laktobazillen (in geringerem Maße auch durch Bifidobakterien und Enterokokken) synthetisiert werden, wurde *in vitro* nachgewiesen. Die Wirksamkeit der Bakteriozine im gastrointestinalen Trakt des Menschen und des Tieres ist aber wegen ihrer sehr engen und spezifischen Aktivitäten (Verhinderung des Wachstums nahverwandter oder einzelner Spezies) noch Gegenstand der Diskussion (DU TOIT et al., 2000; DE VUYST et al., 2003; RODRIGES et al., 2003; OUWEHAND & VESTERLUND, 2004; COLLADO et al., 2005). Eine höhere inhibierende bzw. antimikrobielle Aktivität weisen Stoffwechselprodukte oder Metabolite probiotischer Bakterien auf. So besitzt die Milchsäure, die viele probiotische Bakterien bilden, eine bakterizide Wirkung gegen koliforme Bakterien, Salmonellen und Klostridien, die vor allem durch Senkung des pH-Werts erfolgt (NOUSIAINEN et al. 2004). Metabolite wie Essig- und Propionsäure wirken dagegen direkt auf pathogene Bakterien; sie können dabei nicht nur gegen Bakterien sondern auch gegen Schimmelpilze und Hefe aktiv werden (BLOM & MØRTVEDT, 1991; SUOMALAINEN & MÄYRÄ-MÄKINEN, 1999; OUWEHAND, 2004). Wasserstoffperoxid, das milchsäurebildende, probiotische Stämme ebenfalls zu synthetisieren vermögen, kann ebenso eine bakterizide Aktivität aufweisen, die durch einen starken

oxidierenden Effekt auf die bakterielle Zelle zustande kommt: Es werden sowohl sulfhydryle Gruppen von Zellproteinen als auch Lipide der Membran oxidiert. Für Gram-positive Bakterien wird dabei ein bakteriostatischer, für Gram-negative dagegen ein bakterizider Effekt beobachtet (LINDGREN & DOBROGOSZ, 1990; FONTAINE et al., 1996; OUWEHAND & VESTERLUND, 2004). Auch Kohlendioxid, das probiotische Bakterien während der Fermentation der Hexosen synthetisieren, kann in höheren Konzentrationen vor allem auf Gram-negative Spezies inhibierend wirken (DEVLIEGHERE & DEBEVERE, 2000).

1.4.3 Anwendungsgebiete

Die Anwendung von Probiotika zielt nach FULLER (1992) vor allem auf die Verbesserung der gastrointestinalen Mikrobiota in folgenden Fällen: wenn der Wirt sich in der Gefahr einer Besiedlung durch pathogene oder unerwünschte Bakterien befindet, wenn der Transfer der Mikrobiota von Mutter zu Kind gestört ist, oder wenn wiederholte antibiotische Behandlungen vorliegen. Von besonderem Interesse ist die Applikation von Probiotika in einem immundefiziten Zustand, insbesondere in der neonatalen Periode (MACKIE et al., 1999). Das mukosale Immunsystem des Darms ist in der frühen postnatalen Phase bei Mensch und Tier unreif und „unerfahren“, soll aber für die Erkennung sowohl harmloser als auch gefährlicher Antigenen sorgen. Inadäquate Immunantworten auf diätische Komponenten und indigene Bakterien sowie unangemessene Reaktionen auf potenziell pathogene Spezies können die Invasion von Pathogenen und – in der Folge – eine signifikante Morbidität in der frühen neonatalen und späteren postnatalen Phase hervorrufen (RAUTAVA, 2007). Besonders ausgeprägt ist dieses Phänomen bei Ferkeln der konventionellen Ferkelzucht. Das Fehlen der Übertragung von Antikörpern durch die Plazenta sowie der rasche, ab der 2. Lebenswoche erfolgende Übergang zu Festfutter und das anschließende Absetzen führen zu einer hohen Durchfallinzidenz (bis zu 52%), die durch Invasion sowohl von Bakterien (z.B. *E. coli*, *Clostridia spp*) als auch von Viren (z.B. Rotavirus) verursacht werden können (JONSSON & CONWAY, 1992; KATOULI & WALLGREEN, 2005). Eine hohe Sterblichkeit ist dabei insbesondere in der Zeit vor dem Absetzen und wenige Tage danach zu beobachten. JONSSON & CONWAY (1992) zufolge sterben ca. 20% der Ferkel während ihrer ersten sechs Lebenswochen, was i.d.R. substantielle wirtschaftliche Verluste verursacht. Um den ökonomischen Schaden zu begrenzen, wird versucht, die neonatale Mikrobiota der Ferkel unter anderem durch die Anwendung verschiedener Probiotika zu modifizieren (FULLER et al., 1989).

1.4.4 *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 als Probiotikum

Enterokokken gehören zu den Milchsäurebakterien, deren natürliches Habitat der Magen-Darm-Trakt der Säugetiere ist (FRANZ & HOLZAPFEL, 2004). Aus dem Darm der Schweine werden dabei am häufigsten *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. hirae* und *E. cecorum* isoliert, aus dem Kot vorwiegend *E. faecium* (DEVRIESE et al., 1994; LECLERC et al., 1996). Aufgrund ihrer engen Beziehungen mit dem Magen-Darm-Trakt und ihrer funktionellen und technologischen Eigenschaften werden manche Enterokokken-Stämme als Probiotika verwendet (FRANZ et al., 1999). *Enterococcus faecium* NCIMB 10415, in der Vergangenheit auch als *Enterococcus faecium* SF68 bezeichnet, wurde zum ersten Mal aus dem humanen Magen-Darm-Trakt der Säuglinge isoliert und zeigte dabei eine inhibierende Aktivität gegen enteropathogene *E. coli*, Salmonellen, Shigellen und Clostridien (LEWENSTEIN et al., 1979).

Taxonomisch gehört die Gattung *Enterococcus* zusammen mit *Melissococcus*, *Tetragenococcus* und *Vagococcus* zur Familie der *Enterococcaceae* (FRANZ et al., 2003). Alle Enterokokken sind fakultativ aerobe Chemo-Organotrophen mit homofermentativem Metabolismus; bei der Hexosen-Fermentation wird als Hauptprodukt vor allem L(+)-Laktat gebildet (FRANZ & HOLZAPFEL, 2004). Es handelt sich um Gram-positive, Catalase-negative Kokken, die teilweise kurze Ketten bilden können (WIESNER et al., 2000). Ihr Wachstum ist auch in 40%iger Galle möglich (FRANZ & HOLZAPFEL, 2004). Viele Enterokokken sind zur Synthese von Bakteriozinen (Enterozine) fähig, die bakterizid oder bakteriostatisch auf viele Bakterien (unter anderem pathogene *Listeria spp.*, *Clostridium spp.*, *Bacillus spp.*, *Staphylococcus spp.*) wirken (FOULQUIE MORENO et al., 2003). Auch für *E. faecium* NCIMB 10415 wurde eine Synthese eines enterozin-ähnlichen Peptides mit einer Molekularmasse von 4488 Dalton registriert (FOULQUIE MORENO et al., 2003).

Hinsichtlich des Einflusses des probiotischen *E. faecium* NCIMB 10415 auf die mikrobielle Besiedlung des Magen-Darm-Traktes des Tiers konnten VAHJEN et al. (2002) zeigen, dass im Dünndarm der mit dem Probiotikum gefütterten Puten die Laktat-Konzentration und die Population von Laktobazillen erhöht waren. Es wurde vermutet, dass dies eine „gesundheitsfördernde“ Wirkung von *E. faecium* NCIMB 10415 ist. In den Arbeiten von SCHIERACK et al. (2003) und MACHA (2007) konnte nachgewiesen werden, dass das probiotische *E. faecium* NCIMB 10415 zur Verringerung der Nachweishäufigkeit von *E. coli* Serovar O141 und *E. coli* mit Pathogenitätsgenen (z.B. *est2/stx2e* und *est2/est1b*) bei den Ferkeln führte. POLLMANN et al. (2005) stellten bei mit *E. faecium* NCIMB 10415 supplementierten Muttersauen eine um 50% reduzierte Übertragung von *Chlamydia suis* auf die Ferkel fest. MACHA (2007) zeigte, dass die bakterielle Besiedlung im Kot von Probiotikum-Ferkeln diverser und unter-

einander ähnlicher war, als die bei den Kontrollferkeln. Dabei konnte eine Übertragung von *E. faecium* NCIMB 10415 von der Muttersau auf ihre Ferkel registriert werden. In der Studie von SCHIERACK et al. (2007) wurde allerdings kein Einfluss des probiotischen *E. faecium* NCIMB 10415 auf die mukosa-assoziierte *Enterobacteriaceae*-Population festgestellt.

Auch einige Auswirkungen von *E. faecium* NCIMB 10415 auf das Immunsystem konnten dokumentiert werden: Ein signifikant niedrigerer Anteil von zytotoxischen T-Zellen (CD8+) im jejunalen Epithelium probiotika-behandelter Ferkel wurde in der Studie von SCHAREK et al. (2005) registriert. BENYACOUB et al. (2003) fanden, dass die Supplementierung von Hunde-Welpen mit *E. faecium* NCIMB 10415 zur erhöhten Zirkulierung der IgG und IgA sowie einer größeren Population von CD21+Zellen führte.

Die Anwendung von Enterokokken als Probiotika bleibt immer noch umstritten. Es ist bekannt geworden, dass manche Enterokokken zahlreiche Gene besitzen, die für die Entwicklung von Resistenzen gegen klinisch relevante Antibiotika verantwortlich sind. Multiresistente *Enterococcus faecium* und *Enterococcus faecalis* können bei nosokomialen Infektionen eine Rolle spielen (FRANZ et al., 1999; PETERS, 2003). Da die Enterokokken verschiedene Mechanismen des Gentransfers (pheromon-responsive Plasmide, konjugative und nicht konjugative Plasmide, Transposons) besitzen, besteht eine direkte Möglichkeit der Verbreitung von Antibiotika-Resistenz-Genen sowie anderen Virulenz-Faktoren innerhalb der Enterokokken-Population und auf probiotische Enterokokken-Stämme (MURRAY, 1990; CLEWELL, 1990; LANDMAN & QUALE, 1997; LECLERCQ, 1997). Der Gentransfer ist laut FRANZ & HOLZAPFEL (2004) besonders bei *E. faecalis*, der pheromon-responsive Plasmide besitzt, ausgeprägt, obwohl aufgrund der Anwesenheit des sex-pheromonen Plasmids bei *E. faecium* auch bei dieser Spezies eine solche Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden kann. In einem *conjugation assay* wurde allerdings gezeigt, dass auch für die Vancomycin-Resistenz verantwortliche *vanA*-Gene von *E. faecium*-Donorstämmen auf *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 übertragbar waren (LUND & EDLUND, 2001).

2. MATERIALIEN UND METHODEN

2.1 Fütterungsversuch

Der Fütterungsversuch mit dem Probiotikum *Enterococcus faecium* (NCIMB 10415) wurde im Rahmen des DFG-Forschungsprojekts 438 mit dem Titel „Integrative Analyse der Wirkungsmechanismen von Probiotika beim Schwein“ im Jahr 2005 durchgeführt. Für den Versuch wurden Tiere aus dem Institut für Tierernährung der Freien Universität Berlin eingesetzt. Die Unterbringung der Tiere erfolgte in den Versuchställen des Instituts, und die Umstände der Tierhaltung und der Tierversuche erfüllten die Vorgaben des Landesamtes für Arbeitsschutz, Gesundheit und technische Sicherheit Berlin (LAGetSi).

2.1.1 Tiere und Tierhaltung

Für den Versuchsvorgang wurden Sauen der Rasse Deutsche Landrasse x Duroc und ihre Nachkommen in zwei Fütterungsgruppen – Kontroll- und Probiotikumgruppe – eingeteilt. Dabei bestand jede Gruppe aus fünf tragenden Sauen und ihren Würfen, die als Ausschlusskriterium mindestens neun lebend geborene Ferkel umfassen mussten. Die Ferkel wurden in den Abferkelbuchten mit Betonboden und Stroheinstreu geboren und dort bis zum 28. Lebenstag aufgezogen. Dabei standen laktierende Sauen in den Kastenständen innerhalb der Buchten, und die Ferkel konnten sich frei bewegen. Männliche Ferkel wurden im Alter von knapp zwei Wochen kastriert. Abgesetzte Ferkel wurden in Flatdecks-Aufzuchtsbuchten mit 2-3 Tieren aufgezogen. In jeder Aufzuchtbox stand auch Beschäftigungsmaterial (Bälle) für die Ferkel zur Verfügung. Das Beleuchtungsprogramm umfasste eine 16-stündige Licht- (mind. 80 Lux) und eine 8-stündige Dunkelperiode. Die Stalltemperatur lag bei 21,5°C für die Saugferkel (Liegeplätze wurden zusätzlich mit einer Infrarotlampe (ca. 30 °C) erwärmt) und bei 26°C für abgesetzte Ferkel (mit zunehmendem Alter wurde die eingestellte Temperatur wieder reduziert). Alle Tiere hatten während der gesamten Zeit freien Zugang zu Wasser.

2.1.2 Fütterung

Grundsätzlich waren die Fütterungsregime in beiden Gruppen identisch. So hatten Saugferkel (1.-28. Lebenstag) Zugang zu Sauenmilch. Ab dem 14.Tag wurde ihre Ration mit einem Prästarter-Futter ergänzt und nach dem Absetzen (28.-56. Lebenstag) auf Starterfutter für Aufzuchtferkel umgestellt. Das Futter für die tragenden und laktierenden Sauen basierte auf Gerste und Weizen, während im Futter der gesäugten und abgesetzten Ferkel Weizen und Sojaextraktionsschrot die Hauptkomponenten bildeten. Die Diät der Sauen in beiden Gruppen sowie das Futter der Kontrollferkel enthielt kein Probiotikum. Die Zusammensetzung des Ferkel- und Sauenfutters ist in Tabelle 5 abgebildet.

Tab. 5: Zusammensetzung des Sauen- und Ferkelfutters

Rohstoffe, %	Tragende Sauen (91-0d a.p.)	Laktierende Sauen (0-28d p.p.)	Saugferkel (15-28 d.)	Aufzuchtferkel (29-56 d.)
Weizenkleie	37,60	17,70	-	-
Gerste	17,60	20,50	-	13,00
Weizen	13,00	15,00	45,47	64,00
Haferflocken			10,00	-
Triticale	10,00	10,00	-	-
Mais	-	10,00	-	-
Sonnenblumenschrot	8,20	-	-	-
Sojaschrot	-	16,40	27,40	16,56
Roggen	5,00	-	-	-
Erbsen	4,00	5,00	-	-
Melasse	2,00	-	-	-
Magermilchpulver	-	-	12,00	-
Monokalziumphosphat	-	0,75	1,30	1,56
Kalziumkarbonat	1,39	1,50	1,10	1,48
Pflanzenfett	0,25	2,00	-	-
Sojaöl	-	-	1,00	1,30
Natriumchlorid	0,13	0,03	-	-
Lysin	0,08	0,07	0,30	0,35
Metyonin	-	0,05	0,16	0,06
Tryptophan	-	-	0,07	0,04
Threonin	-	-	-	0,09
Prämix*	0,75	1,00	1,20	1,20
ME (kJ/kg)	10,6	13,0	13,8	13,1
Lysin g/kg	6,0	10,0	16,3	8,9

* Zur Zusammensetzung des Prämixes vgl. Tab. A1 im Anhang

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Probiotikum handelt es sich um Cylactin®LBC ME10 (Cernivet) von CERBIOS FARMA SA (Barbengo, Schweiz). Das Produkt Cylactin® enthält ein Konzentrat aus getrockneten, lebensfähigen *Enterococcus faecium*-Bakterien vom Stamm NCIMB 10415 in mikroverkapselter Form. Laut Hersteller kann Cylactin® aufgrund spezieller Schutzhüllen der Mikrokapseln Pelletierbedingungen ertragen und nach dem Pelletieren stabil und damit biologisch aktiv bleiben. Die im Institut für Tierernährung, FU Berlin, durchgeführten Versuche zeigten allerdings, dass die Wiederauffindung lebendiger probiotischer Zellen von der Pelletierungstemperatur abhängig ist: So waren bei 50°C 100%, bei 70 und 80°C dagegen nur noch 50 bzw. 35% der probiotischen Zellen lebendig (SIMON, 2005). Die Keimkonzentration pro Gramm probiotischen Konzentrats beträgt laut Hersteller mindestens 1×10^{10} lebensfähige Zellen.

Die Supplementierung der Ferkel der Probiotikumgruppe mit dem Probiotikum begann am ersten Tag und dauerte bis zum 56. Lebenstag. In der Saugperiode wurden Ferkel mit dem Probiotikum ab dem 1. bis zum 14. Tag in Form eines Inokulums und ab dem 14. bis zum 28. Tag durch Inokulum und Beimischung zum Prästarter-Futter versorgt. Aufgrund der niedrigen Futteraufnahme wurde die Inokulierung der Ferkel mit Probiotikum auch nach dem Absetzen

fortgesetzt. Ab dem 35. Lebenstag erfolgte die Gabe des Probiotikums ausschließlich als Beimischung zum Starter-Futter (vgl. Tabelle 6).

Tab. 6: Fütterungsvarianten hinsichtlich des Probiotikagehalts

	Kontrollgruppe	Probiotikumgruppe	Form der Probiotikumgabe
Sau	Nein	Nein	-
Saugferkel 1.-14.d	Nein	Ja	Inokulierung <i>per os</i>
Saugferkel 14.-28.d	Nein	Ja	Inokulierung <i>per os</i> + Beimischung zum Prästarter-Futter
Aufzuchtsferkel 28.-35.d	Nein	Ja	Inokulierung <i>per os</i> + Beimischung zum Starter-Futter
Aufzuchtsferkel 35.-56.d	Nein	Ja	Beimischung zu dem Starter-Futter

Als Inokulum diente eine Lösung aus 100 mg Cylactin® (Chargen-Nr. ED 0231) in 1,0 ml Reinstwasser. Die Inokulierung der Tiere erfolgte mit einer Spritze *per os*. Beigemischt zum Prästarter- und Starter-Futter wurde Cylactin® im Umfang von 100 mg/kg Futter. Die Konzentration des *Enterococcus faecium* (NCIMB 10415) im Cylactin®-haltigen Inokulum und Futter wurde mit Hilfe der Kolonie-Hybridisierung bestimmt und ist in Tabelle 7 erfasst.

Tab. 7: Cylactin®-Dosierung und entsprechende Konzentrationen des *Enterococcus faecium* NCIMB 10415

	Inokulum, mg/ml	Inokulum, KBE/ml	Beimischung, mg/kg Futter	Beimischung, KBE/g Futter
Saugferkel 1.-14.d	100,0	4,8x10 ⁹ (±0,46x10 ⁹)	-	-
Saugferkel 14.-28.d	100,0		100,0	1,6x10 ⁷ (±0,3x10 ⁷)
Aufzuchtsferkel 28.-35.d	100,0		100,0	4,1x10 ⁶ (±3,9x10 ⁶)
Aufzuchtsferkel 35.-56.d			100,0	

Die Konzentration des probiotischen *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 im gastrointestinalen Trakt der Ferkel wurde in der Folge mittels Real-Time PCR durch Nachweis einer spezifischen Plasmidsequenz bestimmt (vgl. Punkt 3.2).

2.1.3 Probenentnahme

Um die Entwicklung der untersuchten Parameter zu verschiedenen Zeitpunkten der Zuchtphase charakterisieren zu können, fanden Probenentnahmen am 7., 14., 28., 31., 35. und 56. Lebenstag statt. Aus jedem Wurf wurde jeweils ein Ferkel aus der entsprechenden Altersgruppe ausgewählt.

Die Tiere wurden nach einer tiefen Narkose euthanasiert. Die Sedierung wurde intramuskulär mit Ketamin (10% Ursotamin, SERUMWERG BERNBURG, Bernburg,) in einer Dosierung von 0,2 ml/kg und Azaperon (Stresnil®, Janssen-Cilag, Neuss) in einer Dosierung von

0,1ml/kg vorgenommen. Die Narkose erfolgte durch eine intraperitoneale Injektion von Pentobarbital (Eutha 77, ESSEX, München) in einer Dosierung von $0,9\pm 0,2$ ml/kg (altersabhängig). Das Tier wurde dann durch die intrakardiale Injektion einer Überdosis Pentobarbital ($1,0\pm 0,4$ ml/kg, altersabhängig) getötet.

Die Öffnung der Bauchhöhle wurde entlang der *Linea alba* und durch zwei Entlastungsschnitte entlang des Rippenbogens durchgeführt. Nach dem Öffnen wurden einzelne Abschnitte des gastrointestinalen Trakts mittels chirurgischer Arterienklemmen abgeklemmt und präpariert. Die Inhalte von Magen, distalem *Jejunum* (ca. 100 cm proximal der *Plica ileocecalis*) und *Colon ascendens* (ca. 100 cm distal des *Ostium caecocolicum*s) wurden in sterile 50 ml-Gefäße überführt und in einzelne 2,0 ml-Eppendorf-Gefäße aliquotiert. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -80°C .

2.2 Bestimmung und Optimierung der analytischen Auflösung der Real-Time PCR-

Assays

Um eine möglichst präzise Messung von Umfang und Dynamik des potentiellen probiotischen Einflusses zu erreichen, wurden zahlreiche Schritte unternommen, um die analytische Auflösung der Real-Time PCR und damit die Detektierung der vorhandenen Milchsäurebakterien auf gruppen- und speziesspezifischer Ebene zu verbessern. Spezifität¹ und Sensitivität² der einzelnen PCR-Assays dienten dabei als Grundkriterien, anhand derer die analytische Auflösung der Real-Time PCR bewertet und optimiert wurde.

Spezifität und Sensitivität der verwendeten Primer und PCR-Bedingungen wurden in der Reaktion mit den DNA-Extrakten der einzelnen Referenzstämme und einem Quantifizierungsstandard bestimmt. Zur Ermittlung der optimalen Reaktionsbedingungen wurden die Parameter Annealingtemperatur und Annealingzeit variiert. Im Einzelnen wurden folgende Arbeitsschritte durchgeführt, die zur Optimierung der Real-Time PCR gehören:

- Herstellung des Quantifizierungsstandards für die Real-Time PCR;
- Durchführung der Real-Time PCR nach dem Standardprotokoll und Bewertung ihrer analytischen Auflösung;
- Validierung der Real-Time PCR-Assays anhand von Spezifität und Sensitivität

¹ Die *analytische Spezifität* ist ein Maß dafür, inwieweit ein verwendetes Verfahren nur die zu untersuchenden Substanzen erfasst (Becker, 1987).

² Die *analytische Sensitivität* ist ein Maß für die kleinste nachweisbare Konzentration der zu untersuchenden Substanz (Becker, 1987).

2.2.1 Herstellung des Quantifizierungsstandards

Die Real-Time PCR-Quantifizierung von Bakterien in klinischen oder Umwelt-Proben basiert auf dem Nachweis spezifischer 16S rDNA-Fragmente oder ihrer funktionalen Gene und wird über einen Vergleich mit einem externen Standard durchgeführt, der die spezifischen DNA-Sequenzen in einer definierten Menge enthält. Als Quellen der spezifischen DNA-Sequenzen dienen DNA-Extrakte der Referenz-Kulturen oder Plasmide und – bei synthetisierten DNA-Oligomeren – ihre PCR-Produkte. Die Menge der spezifischen DNA-Sequenzen (bzw. Bakterien-Zellzahl) in diesen DNA-Extrakten wird entweder durch koloniebildende Einheiten und reine Zellzahl der Bakterien im Ausgangsmaterial oder durch die DNA-Konzentration des Extrakts definiert (ZHANG & FANG, 2006). Dafür werden entsprechende kulturelle, mikroskopische oder spektrophotometrische Messungen durchgeführt. Dekadische Verdünnungen solcherart standardisierten DNA-Extrakts werden als Quantifizierungsstandards in der Real-Time PCR eingesetzt.

Um die inhibitorischen Effekte der Proben-Matrix bei der Real-Time PCR-Quantifizierung adäquat zu berücksichtigen und damit eine Identität der Amplifikationsbedingungen bei den Standard- und Versuchsproben zu erreichen, wurden in dieser Studie als Quantifizierungsstandards DNA-Extrakte aus künstlich inokulierten Faeces-Proben benutzt. Die Standardisierung dieser DNA-Extrakte erfolgte durch die mikroskopische und kulturelle Bestimmung der Anzahl inokulierter Bakterien (Zellzahl/g oder KbE/g Probe).

Die Herstellung des Quantifizierungsstandards umfasste folgende Arbeitsschritte:

- Kultivierung der Referenzstämme;
- Beimpfung der Faeces-Proben;
- Überprüfung der Quantifizierungsstandards auf koloniebildende Einheiten;
- Gewinnung bakterieller DNA aus Standard-Proben

Materialien und Lösungen, die bei der Herstellung der Quantifizierungsstandards eingesetzt wurden, sind in der Tabelle **A2** im Anhang aufgelistet.

2.2.1.1 Kultivierung der Referenzstämme

Die Referenzstämme umfassten 59 bakterielle Spezies, die laut Literatur (LESER et al., 2002) beim Schwein nachgewiesen werden können. Dabei wurden 31 *Lactobacillus*-, fünf *Bifidobacterium*-, zehn *Streptococcus*-, sechs *Enterococcus*-, zwei *Weissella*-Spezies, vier *E. coli*-Stämme sowie *Acetomicrobium faecale* kultiviert und für die Beimpfung der Kotproben benutzt. Informationen zur Herkunft der Referenzstämme und zu den Wachstumsbedingungen können den Tabellen **A3** und **A4** im Anhang entnommen werden. Die Zellmasse der Referenz-

renzstämmen entstand aus den entsprechenden Lyophilisaten oder Kryokulturen, die in geeigneten Flüssigmedien (s. unten) unter speziesspezifischen Wachstumsbedingungen kultiviert wurden. Die Anreicherung der Zellmasse verlief nach folgendem Schema:

- 24-stündiges Vorinkubieren des Lyophilisats (eine Impföse) von jedem Stamm in 1 ml speziesspezifischem Nährmedium (1,5 ml Eppendorfgefäß);
- Zentrifugieren der Zellmasse (10 min, 13000 UpM);
- Auffüllen der 15 ml Röhren mit 10 ml frischem Medium;
- Suspendieren des Zentrifugats in 1 ml frischem Medium und Überführung in 15 ml Röhren;
- Erneute 24- bis 48-stündige Inkubierung;
- Abzentrifugieren der Zellmasse (10 min, 3000 g);
- Suspendieren des Zentrifugats in 500-1000 µl 1% Peptonwasser;
- Zellzählung mit der Thoma-Zellkammer

Da die Konzentration bei jedem Stamm mindestens 10^{10} Zellen/ml betragen sollte, wurden einige Stämme mit niedrigeren Konzentrationen weiter kultiviert und solche mit höheren entsprechend verdünnt. Die Lagerung der Zellmasse erfolgte bei -30°C .

2.2.1.2 Beimpfung der Faeces-Proben

Für die Beimpfung wurden autoklavierte (121°C , 20 min) Rektalproben von Sauen verwendet. Als Inokulum dienten Referenzstämmen in der Konzentration 2×10^{10} Zellen/ml. Die Inokulierung erfolgte nach folgendem Schema:

- Einstellung aller Referenz-Stämme auf die Konzentration 2×10^{10} Zellen/ml mit 1% Peptonwasser;
- Vereinigung aller Stämme zu einer Lösung (1 ml von jedem Stamm = 59 ml Bakterien-Inokulum);
- Anlegen der dekadischen Verdünnungen des Bakterien-Inokulums mit den Endkonzentrationen $10^{10}/10^9/10^8/10^7/10^6/10^5/10^4/10^3/10^2$ Zellen/ml;
- Hinzugeben der dekadischen Verdünnungen des Bakterien-Inokulums zu den Kotproben (500 µl Bakterien-Inokulum + 5 g autoklavierten Sauenkot);
- Homogenisieren der inokulierten Proben

Nach dem Homogenisieren wurden inokulierte Proben auf verschiedene Weise für die weitere Analyse vorbereitet. Ein Teil des inokulierten Materials wurde bei -30°C eingefroren und am nächsten Tag für die Gewinnung bakterieller DNA benutzt. Ein anderer Teil wurde sofort nach der Erstellung für den Test auf koloniebildende Einheiten verwendet. Die verbleibende Probenmenge wurden bei -80°C eingefroren.

2.2.1.3 Überprüfung des Quantifizierungsstandards auf koloniebildende Einheiten

Um Differenzen zwischen den Nachweisgrenzen konventioneller und molekularbiologischer Methoden (Real-Time PCR) zu bestimmen, wurden Milchsäurebakterien in den inokulierten Proben auf klassischem kulturellem Wege durch die Ermittlung der koloniebildenden Einheiten (KbE) quantifiziert. Für die inokulierten Standard-Proben wurden selektive Medien für Laktobazillen (LAS-Agar), Enterobakterien (*E. coli*) (DEV-Endo-Agar) und Enterokokken (S&B-Agar) verwendet¹. Die Gesamtzahl der inokulierten Bakterien wurde auf einem BHI-Agar mit 1% Blut bestimmt. Im Einzelnen wurde die Bestimmung der koloniebildenden Einheiten der inokulierten Bakterien nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- Aufnahme von 500 mg jeder inokulierten Standard-Probe (insgesamt 8 Proben) in 5 ml Ringerlösung;
- Mischen der Probe-Lösung durch Schwenken;
- Ausplattieren von 100 µl jeder Probe (3 Parallelen) auf selektiven Medien (DEV-Endo, LAS, BHI+1%Blut, SB);
- Inkubation der Agarplatten unter entsprechenden Bedingungen bei 37°C;
- Zählung der Kolonien und statistische Auswertung

2.2.1.4 Gewinnung bakterieller DNA aus den Standard-Proben

Die Gewinnung bakterieller DNA aus dem biologischen Material basiert auf der Lyse der Bakterien und der Isolierung und Reinigung der DNA. Die Präparation der bakteriellen DNA aus den inokulierten Standard-Proben wurde nach dem Protokoll von KRAATZ et al. (2006) durchgeführt. Das Protokoll beinhaltet die Lyse der bakteriellen Zellwand durch ihre chemisch-mechanische Zerstörung mittels Glasperlen und Guanidinium-Thiocyanat-Lösung, die Isolierung der gesamten bakteriellen Nukleinsäuren aus dem Zelllysat durch Phenol/Chloroform-Extraktion und die Reinigung der DNA auf Silizium-Säulen des NucleoSpin® Tissue Kit.

Vor der Durchführung der DNA-Präparation wurden zunächst alle benötigten Lösungen (GITC, Chloroform/Isoamylalkohol) angesetzt², 50 ml Oak-Ridge®-Zentrifugenröhrchen (3 Stück pro Probe) mit DMPC-Wasser behandelt und autoklaviert sowie Scintillationsröhrchen für die Retsch-Mühle mit 3 g sterilen Glasperlen gefüllt. Das Probenmaterial wurde im Wasser-Eisbad aufgetaut und 1 g davon in das Scintillationsröhrchen für die Retsch-Mühle (mit Glasperlen) gegeben. Vorbereitete Proben wurden auf Eis gelagert. Die weitere Durchführung der DNA-Präparation erfolgte nach folgendem Schema:

¹ Rezeptur sowie Inkubation-Bedingungen für die selektiven Medien sind in Tabelle A5 im Anhang zu finden.

² Vgl. Tabelle A6 im Anhang.

a) Lyse der bakteriellen Zellwand

- Auflösung des Probenmaterials in GITC-Lösung (10 ml, 60°C warm);
- Inkubation der Probenlösung im Wasserbad (5 min, 60 °C) mit regelmäßigem kurzem Schütteln (alle 60 sec);
- Mahlen der Probenlösung in der Retsch-Mühle (2 min, max. Schüttelfrequenz);
- Übertragung der Probelösung auf Eis für das Sedimentieren der Feststoffe;
- Überführung des Überstands (etwa 7 – 7,5 ml bei 1g Probe) in Oak Ridge-Röhrchen;
- Erneutes Versetzen des Sediments mit GITC-Lösung (7 ml, 60 °C warm);
- Erneutes Mahlen der Probelösung in der Retsch-Mühle (2 min, max. Schüttelfrequenz);
- Überführung des gesamten Inhalt des Scintillationsröhrchen in Oak Ridge-Röhrchen;

b) Nukleinsäure-Extraktion

Heraustrennung der Nukleinsäure aus dem proteinhaltigen Zelllysate

- Zugabe zur Probelösung Phenol/Chloroform (20 ml, pH 8.0) (mehrfach schwenken, auf Eis lagern);
- Zentrifugieren der Probelösung mit ausgeschalteter Bremse (5 min, 15000 UpM, 4°C);
- Abnehmen der wässrigen Phase (ohne Protein-Interphase, 13 ml) mit sterilen Spritzen und Kanülen in das neue Zentrifugenröhrchen;

Entfernung der Phenol/Chloroform-Reste aus dem Nukleinsäure-Extrakt

- Mischen der wässrigen Phase mit 1 Volumen (13 ml) Chloroform/Isoamylalkohol (5 sec. vortexen, auf Eis lagern);
- Zentrifugieren der Probelösung mit ausgeschalteter Bremse (5 min, 15000 UpM, 4°C);
- Abnehmen der wässrigen Phase (ohne Protein-Interphase, 7 ml) mit den sterilen Spritzen und Kanülen in das neue Zentrifugenröhrchen;

Aufkonzentrieren und Fällung der DNA

- Mischen der wässrigen Phase mit 6 ml eiskaltem Isopropanol;
- Inkubieren der Probenlösung über Nacht bei - 30 °C;
- Zentrifugieren der Probenlösung (30 min, 18000 UpM, 4 °C);
- Sorgfältige Entfernung des Überstands (Pellet beobachten, falls sichtbar);
- Präzipitation der DNA durch Zugabe von 40 ml eiskaltem Ethanol (70 %) und Zentrifugieren (30 min bei 18000 UpM, 4 °C);
- Sorgfältige Entfernung des Überstands (Pellet beobachten, falls sichtbar);
- Abtropfen der Ethanol-Reste;
- Übertragung des Pellets in 2 ml Eppendorf-Gefäß

Die weitere Reinigung der bakteriellen DNA wurde unter Verwendung des MACHERY-NAGEL Nucleo-Spin® Tissue Kit (Düren, Deutschland) und nach Angaben des Herstellers

durchgeführt (als Proben wurden oben beschriebene Extrakte aus den inokulierten Rektalproben von Sauen verwendet). Gereinigte DNA-Extrakte wurden bei -20°C gelagert. Die DNA-Konzentrationen der Standard DNA-Extrakte wurden fluorometrisch mit Hilfe des VersaFluor™ Fluorometer System und Fluorescent DNA Quantifikation Kit bestimmt.

2.2.2 Durchführung der Real-Time PCR

Die analytische Auflösung (Spezifität und Sensitivität) der Real-Time PCR für die Quantifizierung der Milchsäurebakterien wurde an den DNA-Extrakten aus Referenzkulturen und inokulierten Standard-Proben getestet. Für die Detektion der spezifischen bakteriellen DNA wurden sowohl bereits veröffentlichte gruppen- und speziesspezifische als auch selbst entwickelte Primer verwendet (s. unten). Angewendete Materialien und Lösungen für die Durchführung der Real-Time PCR sind in Tabelle A7 im Anhang aufgelistet.

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Real-Time PCR-Gerät handelt es sich um das Mx3000P QPCR System von STRATAGENE (Amsterdam, Niederlande).

2.2.2.1 Verwendete Primer

Ursprünglich wurden gruppen- und speziesspezifische Oligonukleotide für den Nachweis der Milchsäurebakterien aus bereits erschienenen wissenschaftlichen Beiträgen übernommen. Bei der Auswahl der Zielgene für Real-Time PCRs für den Nachweis der gewünschten Bakterien wurden sowohl 16S rDNA, die eine kleine Untereinheit der bakteriellen Ribosomen kodiert, als auch Gene, die für bestimmte spezifische metabolische oder physiologische Funktionen verantwortlich sind, einbezogen.

Für die Spezies *L. amylovorus*, *L. mucosae* und *L. reuteri* wurden spezifische Primer selbst konstruiert. Bei der Auswahl des Zielgens wurde nur die 16S rDNA einbezogen, da im online verfügbaren RIBOSOMAL DATABASE PROJECT II (<http://rdp.cme.msu.edu>) ausreichende Sequenzinformationen für diese Stämme verfügbar waren. Für jede Zielsequenz wurden, soweit möglich, mehrere miteinander kompatible Primer für den kodierenden und nicht kodierenden DNA-Strang gewählt.

Da bei jeder PCR die Reaktionsparameter an die lokalen Laborbedingungen angepasst werden müssen, um ein optimales Gelingen zu gewährleisten, wurde die Spezifität der ausgesuchten Primer und ihrer Kombinationen zuerst nach einem Standard-Protokoll und mit den eigenen Referenzstämmen getestet. Oligonukleotid-Sequenzen, die nach der Validierung spezifisch und sensitiv gewünschte Ziel-DNA detektierten, sind in Tabelle 8 dargestellt.

Tab. 8: Gruppen und speziesspezifische Oligonukleotide für Detektion der ausgewählten Bakterien

Detektierte Bakterien	Primer/Sonden	Primer-, Sondensequenz (5'→3')	Produktgröße, bp	Zielgene	Literatur
Bakterielle Gesamtheit	785 (f) ¹ 1512 (r) ² T-1400 (r) ³	GGA TTA GAT ACC CTG GTA GTC TAC CTT GTT ACG ACT T TGA CCG GCG GTG TGT ACA AGG C	727	16S rDNA	Lyons et al. (2000)
Lactobazillen	LacI (f) Lac2 (r)	AGC AGT AGG GAA TCT TCC A ATT (CT)CA CCG CTA CAC ATG	340	16S rDNA	Walter et al. (2001)
Enterokokken	Ent1 (f) Ent2 (r)	TAC TGA CAA ACC ATT CAT GAT AAC TTC GTC ACC AAC GCG AAC	112	<i>tuf</i>	Ke et al. (1999)
Bifidobakterien	gBifd (f) gBifd (r)	CTCCTGGAACAACGGGTGG GGTGTTCCTTCCCGATATCTACA	243	16S rDNA	Rinttilä et al. (2004)
Enterobakterien	Entero (f) Entero (r) Entero FAM	GTTAATACCTTTGCTCATTTGA ACCAGGGTATCTAATCCTGTT CGTGCCAGCAGCCCGGTA	340	16S rDNA	Mainen et al. (2004)
<i>E. faecium</i> NCMB10415 <i>Cylactin</i>	Cyl1 Ia ² Cyl1 Ib	TCG GAA TTT GCC AGA AGA AC CTG GTG AAG CAG GGT TTC AT	208		
<i>E. faecium</i>	efa Afm1 efa Afm2	CTTATGATTTGGCCAGCAGCA TGGATTGTTTCGATGTTCCA	244	<i>efa Afm</i>	Eaton and Gasson (2001)
<i>E. faecalis</i>	efa Afs 1 efa Afs 2	TTCACCTGGCTACCTGCTGTG AACGCGCCAATTTGTTTTAC	157	<i>efa Afs</i>	Eaton and Gasson (2001)
<i>L. acidophilus</i>	L.aci I ² L.aci II	AGCTGAACCCAACAGATTCACACTAC- CAGGGTATCTAATCC	200	16S rDNA	Walter et al. (2000)
<i>L. johnsonii</i>	L.joh I L.joh II	GAGCTTGGCTAGATGATTTA ACTACCAGGGTATCTAATCC	200	16S rDNA	Walter et al. (2000)
<i>L. amylovorus</i>	L.amyl1 2a L.amyl1 2b	GCCGAAACCAACAGATTTACTT GTTTCCAAATGGTATATCCACAGACTT	106	16S rDNA	Entwickelt im Institut für Tierer- nährung, FU Berlin
<i>L. reuteri</i>	L.reu 1 L.reu 2 L.reu OTU173	CCC AAC TGA TTG ATG GTG CT GGG CAG GTT ACC TAC GTG TT CCATCGTCAATCAGGTGC		16S rDNA	Entwickelt im Institut für Tierer- nährung, FU Berlin Konstantinov et al. (2004)
<i>L. mucosae</i>	L.muc 2a L.muc 2b	GGCTATCAGCTTGGGATGGA ATGGACCCGTGCTCAGTTCC	124	16S rDNA	Entwickelt im Institut für Tierer- nährung, FU Berlin

¹ 785, 1512: Primer-Positionen bezogen auf die *E. coli*-Sequenz.

² (f), (l), (D), (a): Vorwärts-Primer, bindet an den (-) DNA-Strang; (r), (2), (II), (b): Rückwärts-Primer, bindet an den (+) DNA-Strang.

³ Die Sonden hatten am 5'-Ende den Reporter-Fluoreszenzfarbstoff 6-Carboxy-Fluorescein (6-FAM) und am 3'-Ende den Quencher 4-Dimethylaminophenylbenzoesäure (Dabcy1).

2.2.2.2 Reaktionsbedingungen

Da in den durchgeführten Real-Time PCRs die produktabhängige Fluoreszenz entweder mittels des Fluoreszenzfarbstoffs SYBRGreen oder mittels fluorophormarkierter Oligonukleotide (TaqMan-Sonde) generiert wurde, wurden entsprechende kommerzielle Master-Mixe¹ – Brilliant® SYBR® Green QPCR Master Mix von STRATAGENE oder HotStarTaq Master Mix von QIAGEN – benutzt. Die Komponenten und ihre Konzentrationen sind in den kommerziellen Master-Mixen vom Hersteller optimal balanciert, so dass die Amplifikation unspezifischer Produkte sowie die Bildung von Primer-Dimern verhindert werden. Die Komponenten der verwendeten kommerziellen Master-Mixe und ihre Konzentrationen sind in Tabelle 9 wiedergegeben:

Tab. 9: Zusammensetzung verwendeter kommerzieller Master-Mixe

Komponente	Brilliant® SYBR® Green QPCR Master Mix	HotStarTaq Master Mix
DNA-Polymerase	SureStart® <i>Taq</i>	HotStar® <i>Taq</i>
Magnesium Chloride	2,5 mM	3,0 mM
dNTPs	Keine Angaben über Konzentration	400 µM von jedem dNTP
Fluoreszenzfarbstoffe	SYBR Green I	-

Brilliant® SYBR® Green QPCR Master-Mix und HotStarTaq Master-Mix wurden bis zur Anwendung unter Lichtschutz bei -20°C gelagert.

Die in 2.2.2.1 aufgeführten Primer wurden mit Reinstwasser auf eine Konzentration von 10 pmol/µl und die lichtempfindlichen TaqMan-Hybridisierungssonden unter Lichtschutz auf 2 pmol/µl eingestellt und aliquotiert. Die Lagerung der aliquotierten Primer und Hybridisierungssonde erfolgte bei -20°C.

Um störende Fluktuationen² der Fluoreszenz während der Reaktion auszugleichen, wurde zu jedem PCR-Ansatz auch ein passiver Referenzfarbstoff ROX (6-carboxy-X-Rhodamine) in der Konzentration von 30 nM (1:500 der Originallösung) zugegeben. Frisch angesetzte Lösungen des Referenzfarbstoffs ROX wurden unter Lichtschutz bei +4°C aufbewahrt und innerhalb von einem Tage aufgebraucht. Während der Reaktion gemessene Fluoreszenzsignale

¹ Der Master-Mix ist eine fertige Mischung aus Taq DNA Polymerase, dNTPs (2'-Desoxynukleosid-5'-Triphosphat-Gemisch), MgCl₂ und Reaktionspuffer.

² Störende Fluktuationen der Fluoreszenz können aufgrund unterschiedlicher Volumina (Pipettierfehler) in den einzelnen Reaktionsgefäßen sowie Differenzen in der Transparenz des verwendeten Plastikzubehörs (PCR-Tubes, Deckel) auftreten.

(Fluoreszenzintensität) wurden anhand der Fluoreszenzintensität des Referenzfarbstoffs automatisch normalisiert¹.

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Reaktionskomponenten (MasterMix, Primer, ROX) nach dem in Tabelle 10 ausgewiesenen Muster pipettiert und in einem Umfang von Aliquots für 10-100 Reaktionen in einem 1,5- oder 2,0 ml - Eppendorf-Gefäß vereinigt.

Tab. 10: Pipettierschemata der Real-Time PCR-Ansätze

Reaktionsansatz mit SYBR Green I		Reaktionsansatz mit TaqMan-Hybridisierungssonde	
Brilliant® SYBR® GreenQPCR Master Mix	12,5 µl	HotStarTaq Master Mix	12,5 µl
Forward-Primer (10 pmol/µl)	0,5 µl	Forward-Primer (10 pmol/µl)	1,0 µl
Reverse-Primer (10 pmol/µl)	0,5 µl	Reverse-Primer (10 pmol/µl)	1,0 µl
Referenzfarbstoff ROX (30 nM)	0,75 µl	Hybridisierungssonde (2 pmol/µl)	1,0 µl
H ₂ O (DNase/RNase frei)	10,75 µl	Referenzfarbstoff ROX (30 nM)	0,75 µl
		H ₂ O(DNase/RNase frei)	8,75 µl
Gesamtvolumen		Gesamtvolumen	
	25 µl		25 µl

Zur Amplifikation wurden Reaktionsansätze unter Vermeidung von Luftblasen zu je 25 µl in Real-Time PCR-Gefäße aliquotiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1,0 µl des untersuchten DNA-Extrakts. Dabei wurden DNA-Extrakte aus den Referenzstämmen² zur Bestimmung der Spezifität und Quantifizierungsstandards zur Bestimmung der Sensitivität der ausgewählten Primer benutzt. Bei jedem Real-Time PCR-Lauf wurde außerdem eine *Non Template Control* (NTC) (alle Reagenzien + 1µl H₂O_(DNase/RNase frei)) mitgeführt. Als Standard-Amplifikationprotokoll wurde das in Tabelle 11 dokumentierte Temperaturprogramm verwendet:

Tab. 11: Standard-Temperaturprogramm einer Real-Time PCR

Phase	Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
Initialisation	95°C	15 min	x1
Denaturierung	95°C	15 sec	
Anlagerung	55-60°C	30-60 sec	x40
Elongation	72°C	30-60 sec	

¹ Die Normalisierung erfolgt durch Division der Rohfluoreszenz des Amplifikationsprodukts durch die Fluoreszenz der Referenzfarbe. Normalisiert werden Fluoreszenzsignale in jedem Ansatz (in jedem Tube) und in jedem Zyklus.

² Referenzstämme sind in Tabelle A3 im Anhang aufgelistet.

Alle Real-Time PCR-Experimente wurden mit dem MxPro QPCR-Programm durchgeführt. Als analytische Methode wurde die Funktion „SYBRGreen with Dissociation Curve“ gewählt. Analytische Algorithmen dieser Methode sind speziell für SYBRGreen-Assays optimiert. Für die Detektion unspezifischer Produkte wird bei dieser Methode zum Standard-Temperaturprogramm noch ein Dissoziations-Segment hinzugefügt.

2.2.2.3 Auswertung

Die Auswertung der Real-Time PCR erfolgte über die ermittelten Fluoreszenzdaten. Diese werden von den PCR-Zyklen der linearen Amplifikationsphase erfasst, wenn die Reaktionsbedingungen optimal sind und die Fluoreszenz proportional zum Amplikon ansteigt.

Bei der Bestimmung der Spezifität verwendeter Primer wurden sowohl Ct-Werte und entsprechende Amplifikationskurven als auch Schmelztemperaturen mit entsprechenden Schmelzkurven von einzelnen getesteten positiven und negativen Referenzstämmen¹ analysiert.

Die Sensitivität der verwendeten Primer wurde anhand der Fluoreszenzdaten des Quantifizierungsstandards bestimmt. Mithilfe der in das MxPro-Programm integrierten mathematischen Algorithmen wurde eine Kurve aus den Fluoreszenzsignalen jeder Verdünnungsstufe des Quantifizierungsstandards und den dazugehörigen Ct-Werten hergestellt. Die Analyse dieser Kurve lässt Aussagen über die Sensitivität der verwendeten Primer zu.

2.2.3 Optimierungsstrategie

Die Parameter der Real-Time PCRs wurden so optimiert, dass bei maximaler Spezifität eine möglichst hohe Sensitivität (Effizienz der Amplifikation bzw. Signalbildung) erreicht wurde. Dabei wurden zunächst die Ergebnisse der durchgeführten Standard-Protokoll-Real-Time PCRs analysiert. Das Primerpaar, welches nach diesem Protokoll bei maximaler Spezifität die größten Produktmengen lieferte bzw. die größte Amplifikationseffizienz aufwies, wurde weiterverwendet. Für die Primerpaare, bei denen falsch positive und falsch negative Ergebnisse registriert wurden, wurden Anlagerungstemperatur und Elongationszeit validiert. Dabei sollte die Erhöhung der Anlagerungstemperatur die Bildung unerwünschter Produkte vermeiden und die Erhöhung der Elongationszeit die Sensitivität der Reaktion verbessern. Konzentrationen der Primer und Hybridisierungs sondens sowie die Zusammensetzung des Master-Mixes und die Anzahl der Zyklen blieben während der Optimierung konstant.

¹ Positive Stämme sind Stämme, die für die verwendeten Primer Ziel-DNA enthalten; negative Stämme sind Stämme, die für die verwendeten Primer negativ sind bzw. keine Ziel-DNA erhalten.

2.3 Untersuchung der gastrointestinalen Proben von Versuchstieren

Um fütterungsbedingte Unterschiede in der qualitativen und quantitativen Zusammensetzung der Milchsäurebakterien-Populationen sowie ihre Dynamik bei den Versuchs- und Kontrolltieren zu erkennen, wurden gastrointestinale Proben mittels validierter Real-Time PCR (s. Punkt 3.2) und DGGE (denaturierende Gradientengelelektrophorese) untersucht. Die Stoffwechselaktivität der gastrointestinalen Bakterien wurde über die Messung von Laktat, Ammoniak und flüchtigen Fettsäuren bestimmt. Im Einzelnen bestand die Untersuchung der gewonnenen Proben aus folgenden Punkten:

- Vorbereitung der Proben für die DNA-basierte Analyse;
- Quantifizierung der Milchsäurebakterien mittels validierter Real-Time PCR;
- Bestimmung bakterieller Diversität mittels DGGE;
- Bestimmung bakterieller Metaboliten

2.3.1 Vorbereitung der Proben für die DNA-basierte Analyse

2.3.1.1 Gewinnung bakterieller DNA

Da die geplanten Untersuchungen der gastrointestinalen Mikrobiota auf dem Nachweis spezifischer Fragmente bakterieller DNA beruhen, wurde zu Beginn aus dem bei -80°C eingefrorenen Inhalt von Magen, distalem *Jejunum* und *Colon ascendens* der Versuchstiere bakterielle DNA gewonnen. Die DNA-Präparation lief nach dem in Punkt 2.2.1.4 (S. 42f.) beschriebenen Protokoll für Quantifizierungsstandards ab. Da nach der Ethanol-Fällung bakterieller DNA von Magen-Proben auch viele störende Proteine auffielen, wurde die Aufreinigung dieser Proben durch eine Behandlung mit $50\ \mu\text{l}$ der Proteinase K ergänzt. Aufgereinigte DNA-Extrakte wurden bei -80°C gelagert.

2.3.1.2 Bestimmung der DNA-Konzentration

Obwohl bakterielle DNA aus allen Proben nach dem gleichen Protokoll extrahiert wurde, variierte die Effizienz der DNA-Extraktion oft von Probe zu Probe. Der Grund sind individuelle physiologische Zustände und Stoffwechselaktivitäten des Tieres, die nicht nur die Zusammensetzung des untersuchten Materials, sondern auch das Vorhandensein der Extraktionsinhibitoren beeinflussen. Die für die Analyse verwendeten Real-Time PCR und DGGE basieren auf der Amplifikation der spezifischen DNA-Regionen, deren Effizienz direkt von der Menge der eingesetzten Ziel-DNA abhängt, wodurch die Präzision der Ergebnisse beeinflusst wird. Um die Amplifikationsbedingungen für alle Proben zu standardisieren, wurden die DNA-Mengen in den aufgereinigten Extrakten gemessen und anschließend auf eine identische Konzentration verdünnt.

Die Bestimmung der DNA-Konzentration in den untersuchten DNA-Extrakten wurde mithilfe des DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoff SYBRGreen und dem Real-Time PCR-Cycler Mx3000P durchgeführt. Die Bestimmung erfolgte nach folgendem Schema:

a) Vorbereitung der DNA-Proben und des Standards

Eine Standardreihe wurde durch Verdünnung der kommerziellen Standard-Kalbtymus-DNA hergestellt. Die Endkonzentrationen sollten 100 pg/μl; 50 pg/μl; 25 pg/μl; 12,5 pg/μl und 6,25 pg/μl betragen. Da die unbekanntes Proben auch DNA-Konzentrationen außerhalb dieser Reihe enthalten konnten, wurden sie in Mikrotiterplatten unter Verwendung einer 8-Kanal-Pipette auf 1:10; 1:100; 1:1000 und 1:10000 verdünnt.

b) Ansetzen des Master-Mixes

Als erstes wurde der Fluoreszenzfarbstoff SYBRGreen unter Lichtschutz auf eine Konzentration von 1:2500 verdünnt. Danach erfolgte das Ansetzen des Master-Mixes, der überdies aus dem PCR-Puffer, der Referenzfarbe ROX und DNase/RNase-freiem Wasser bestand (Tabelle 12).

Tab. 12: Zusammensetzung des Master-Mixes für die Bestimmung der DNA-Konzentration (berechnet für 48 Proben)

SYBRGreen 1:2500	250 μl
PCR-Puffer (10x TEN)	250 μl
Referenzfarbstoff ROX (30 nM)	37,5 μl
H ₂ O (DNase/RNase frei)	712,5 μl
Gesamtvolumen	1250,0 μl

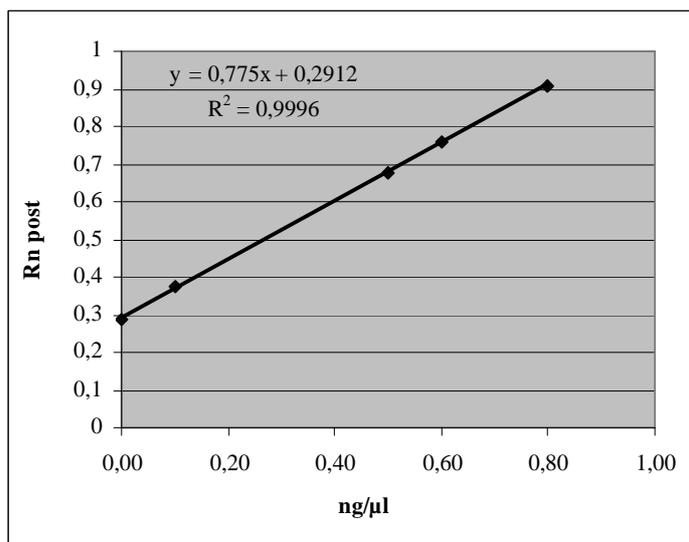
Je 25 μl des Master-Mixes wurden in die Real-Time PCR-Gefäße aliquotiert und vorsichtig mit den 25 μl der analysierten Probe gemischt. Das Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes betrug also 50 μl.

c) Messung

Nach der Vorwärmung der Lampe des Mx3000P-Geräts wurde in der MxPro-Software die Funktion *Quantitative Plate Read* ausgewählt. Im Anschluss an die Beschriftung der einzelnen Proben und die Markierung des Standards wurden *Set Read Properties* auf 25°C und 3 reads eingestellt. Danach wurde die Messung gestartet. Für die Auswertung wurden die normalisierten Werte der Endfluoreszenz (→*Post Read*) benutzt.

d) Auswertung

Im *Analysis*-Menü des MxPro-Programms wird zunächst der Verlauf der Standardreihe ermittelt. Bei ausreichend hoher Linearität der erhaltenen Standardreihe kann die unbekannte DNA-Konzentration in den untersuchten Proben im Anschluss durch Einsetzen der gemessenen Fluoreszenzwerte (Rn_{post}) der Proben in die Geradengleichung der Standardreihe in Microsoft Excel errechnet werden (Bsp. s. Abb. 1).



Erstellung der Geradengleichung für die Standardreihe

Eingesetzte Menge der DNA, ng/µl	Gemessene Fluoreszenz, Rnpost	Errechnete Menge DNA nach der Geradengleichung, ng/µl
0,8	0,91	0,8
0,6	0,758	0,6
0,5	0,677	0,5
0,1	0,376	0,1
0	0,285	0

Berechnung der DNA-Konzentration in den Proben

Gemessene Fluoreszenz, Rnpost	Errechnete Menge DNA (ng/µl) nach der Geradengleichung $y=0,775x + 0,2912$
0,630	0,437
0,599	0,397
0,591	0,387

Abb. 1: Auswertung des Quantitative Plate Read-Experiment und Berechnung der DNA-Konzentration

Bei der Berechnung der Werte der unbekanntenen Proben muss immer auf den Verdünnungsfaktor geachtet werden. Proben, deren Werte außerhalb der Standardreihe liegen, müssen anhand anderer (höherer bzw. niedrigerer) Verdünnungen gemessen werden.

Nach der Bestimmung der DNA-Konzentration wurden DNA-Extrakte auf folgende Konzentrationen eingestellt: Magen-Extrakte auf 50 ng/µl, *Jejunum* und *Colon* auf 100 ng/µl.

2.3.2 Quantifizierung der Bakterien mittels validierter Real-Time PCR

2.3.2.1 Primer und Reaktionsbedingungen

Für die qualitative und quantitative Analyse der Milchsäurebakterien bei Kontroll- und Probiotikumferkeln wurden die in Punkt 2.2.21 aufgeführten Primer verwendet. Nach der Bestimmung der Spezifität und Sensitivität der Primer wurden die in Tabelle 13 aufgeführten Reaktionsbedingungen ermittelt.

Tab. 13: Primer und Reaktionsbedingungen

Ziel	Detektionssystem	Annealing (Temperatur/Zeit)	Elongation (Temperatur/Zeit)	Dissoziations- segment
Eubakterien	TaqMan	50°C/30 s	72°C/30 s	-
Laktobazillen	SYBRGreen	55°C/30 s	72°C/30 s	+
Enterokokken	SYBRGreen	55°C/30 s	72°C/30 s	+
Bifidobakterien	SYBRGreen	55°C/30 s	72°C/30 s	+
Enterobacteriaceae	TaqMan	50°C/30 s	72°C/30 s	-
<i>L.acidophilus</i>	SYBRGreen	55°C/60 s	72°C/60 s	+
<i>L.amylovorus</i>	SYBRGreen	58°C/30 s	72°C/30 s	+
<i>L.johnsonii</i>	SYBRGreen	50°C/60 s	72°C/60 s	+
<i>L.mucosae</i>	SYBRGreen	58°C/30 s	72°C/30 s	+
<i>L.reuteri</i>	TaqMan	55°C/60 s	72°C/60 s	-
<i>E.faecium</i> (<i>Cylactin</i>)	SYBRGreen	60°C/30 s	72°C/30 s	+
<i>E.faecium</i>	SYBRGreen	55°C/30 s	72°C/30 s	+
<i>E.faecalis</i>	SYBRGreen	55°C/30 s	72°C/30 s	+

Die Initialisierung der Reaktion erfolgte in allen Fällen bei 95°C/15 min und die Denaturierung der DNA bei 95°C/15 sec. Die Ziel-DNA wurde in allen Assays über 40 Zyklen amplifiziert. Bei der Verwendung des SYBRGreen-Detektionssystems wurde zum Amplifikationsprogramm ein Dissoziations-Segment zugefügt. Die Zusammensetzung der PCR-Ansätze ist in Punkt 2.2.2.2 beschrieben. Die Real-Time-Reaktion wurden mit Magen-, *Jejunum*- und *Colon*-Proben in Konzentrationen von 50 ng/µl und 100 ng/µl durchgeführt. Zu jeder Reaktion wurden dabei auch entsprechende Quantifizierungsstandards eingesetzt.

2.3.2.2 Auswertung

Die Quantifizierung der Bakterien in den Versuchsproben wurde durch Vergleich mit den Ct-Werten des Quantifizierungsstandards (inokulierte Proben) durchgeführt. Die Software MxPro liefert eine Standardkurve, mittels derer sich von einem Ct-Wert auf die Konzentration der Bakterien in der Probe schließen lässt. Die Bildung unspezifischer Produkte wurde durch Analyse der Schmelzkurven kontrolliert. In Fällen, in denen die in den Reaktionen eingesetzten DNA-Extrakte zuvor auf eine bestimmte Konzentration eingestellt worden waren, mussten die von MxPro errechneten Werte anschließend mit dem jeweils verwendeten Verdünnungsfaktor multipliziert werden.

2.3.3 Bestimmung bakterieller Diversität mittels DGGE

2.3.3.1 Durchführung der DGGE

Um die gastrointestinalen bakteriellen Populationen qualitativ zu charakterisieren, macht man sich die Eigenschaft der DNA zunutze, dass sie bei der DGGE nicht auf einen Schlag, son-

den in „Schmelzdomänen“ mit unterschiedlichen Schmelztemperaturen denaturiert, so dass DNA-Fragmente unterschiedlicher Sequenz zu einem Bandenmuster geordnet werden können, das der Zusammensetzung der Mikroflora in der Probe entspricht. Diese „bakteriellen Fingerabdrücke“ können dann mit Ergebnissen anderer Proben auf Ähnlichkeit verglichen werden. Die Herstellung der bakteriellen 16S rDNA-Fingerabdrücke der untersuchten Proben beinhaltet folgende Punkte:

- Gewinnung der bakteriellen DNA aus dem Proben-Material
- Amplifikation der 16S rDNA-Fragmente
- Vorbereitung der DGGE-Apparatur für die Elektrophorese
- Herstellung des Polyacrilamid-Gels
- Beladung des Gels
- Elektrophorese
- Färbung und Konservierung des Gels
- Auswertung

Verwendete Materialien und Lösungen sind in den Tabellen **A8** und **A9** im Anhang aufgelistet.

Amplifikation der 16S rDNA-Fragmente

Um bakterielle 16S rDNA-Fragmente zu vervielfältigen und zudem mittels einer GC-Klammer eine Domäne mit einem Schmelzpunkt bei höheren Temperaturen zu inkorporieren, wurden bereits veröffentlichte Primer von NÜBEL et al. (1996) und das PCR-Programm von ZOETENDAL et al. (1998) in der Modifikation von KRAATZ et al. (2006) verwendet.

Primer

Sequenz (5' → 3')

F-968-GC	CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAA CGC GAA GAA CCT TAC
R-1401	GCG TGT GTA CAA GAC CC

Die Oligonukleotidprimer wurden mit RNase-freiem Wasser auf die Arbeitskonzentration von 4 pmol/μl verdünnt.

Zusammensetzung des PCR-Master-Mixes

15μl	HotStarTaq MasterMix
2 μl	Primer F-0968-GC (4 pmol/μl)
2 μl	Primer R-1401(4 pmol/μl)
11μl	RNA-se freies Wasser
1 μl	DNA-Extrakt (50 pmol/μl für Magen-Proben und 100 pmol/μl <i>Jejunum</i> -, <i>Colon</i> - und Kot-Proben)

Alle Reaktionskomponenten (außer dem DNA-Extrakt) wurden zu einer Lösung vereinigt und je 30 µl in die PCR-Gefäße aliquotiert. Anschließend wurden DNA-Extrakte von untersuchten Proben sowie eine Kontaminationskontrolle (ohne Zugabe von DNA) pipettiert. Die Amplifikation erfolgte nach folgendem auf dem T1 Thermocycler programmierten Temperaturprofil:

PCR-Programm

Phase	Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
Initialisation	95°C	15 min	x1
Denaturierung	94°C	60 sec	
Annealing	65°C	90 sec	x21
Elongation	72°C	90 sec	
Denaturierung	94°C	60 sec	
Annealing	58°C	90 sec	x14
Elongation	72°C	90 sec	
Finale Elongation	72°C	10 min	x1

Gesamtzeit der Amplifikation 3h 47min

Amplifizierte PCR-Produkte (Denaturierungsstammlösungen) wurden bis zum Zeitpunkt der Gel-Beladung bei +4°C gelagert.

Vorbereitung der DGGE-Apparatur für Elektrophorese

Die Vorbereitung der DGGE-Apparatur begann mit der Herstellung der Elektrophorese-Puffer und der Füllung der Puffer-Kammer des INGENYphorU-2-Systems. Nach der Herstellung des Elektrophorese-Puffers erfolgte der Zusammenbau der Gel-Kammer. Je nach Bedarf können in der Gel-Kammer zwei Gele parallel laufen. Für jedes Gel sollte eine Gel-Kassette konstruiert werden, die aus zwei Glasplatten mit dazwischen liegendem Spacer sowie dem Gel-Kamm besteht. Für den Zusammenbau einer Gel-Kassette wurden zunächst beide Glasplatten mit Geschirrspülmittel und bidestilliertem Wasser gewaschen und anschließend mit Ethanol (70%) gesäubert. Die Glasplatte mit den kleinen „Zungen“ wurde nach der Reinigung zusätzlich mit bidestilliertem Wasser bewässert und mit GelBond® PAG-Folie¹ (hydrophobe Seite nach unten) verbunden. GelBond® PAG-Folie sollte auf der Platte so fest liegen, dass man zwischen beiden Newton'schen Ringe sehen kann. Durch Auflage der zweiten Glasplatte mit dem dazwischen liegenden Spacer entsteht eine Gel-Kassette. Jede Gel-

¹ Die GelBond® PAG-Folie ist eine Trägerfolie für Agarose- beziehungsweise Polyacrylamidgele. Die Gele verbinden sich bei ihrer Herstellung kovalent mit der Folie und können nach der Elektrophorese problemlos für Silberfärbung eingesetzt werden. Auf GelBond-Folie getrocknete Gele behalten ihre ursprüngliche Größe und eignen sich für die langfristige Dokumentation.

Kassette wurde in der Gel-Kammer vertikal aufgestellt und durch Festziehen der speziellen Schrauben befestigt. Abschließend wurde der Kamm (mit 32 oder 48 Taschen) in die Gel-Kassette eingesetzt. Da die Befüllung der Gel-Kassetten erst nach Herstellung des Gradienten-Gels erfolgt, sollten zusammengebaute Gel-Kassetten bzw. Gel-Kammern wegen der UV-Licht-Empfindlichkeit der GelBond® PAG-Folie im Dunklen aufbewahrt werden.

Herstellung des Polyacrylamid-Gels

Die Herstellung des Polyacrylamid-Gels begann mit dem Ansetzen von 100% und 0% denaturierenden Polyacrylamid-Lösungen. Durch Mischen dieser Polyacrylamid-Stammlösungen wurden isovertikale Gradienten von 30% bis 55% Harnstoff hergestellt und in 50 ml Greiner-Röhrchen vorgehalten (Tabelle 14).

Tab. 14: Erstellung der denaturierenden Gradienten

Gewünschte Harnstoff-Konzentration (%)	Komponenten der Gradienten			
	Polyacrilamid-Stammlösungen, ml		Polymerisierungskatalysator, µl	
	0%	100%	TEMED	10% APS
30	15,4	6,6	28,6	66,0
55	9,9	12,1	28,6	66,0
0	12,0	-	20,0	50,0

Da die Polymerisation von Acrylamid durch Zugabe von N, N, N', N'- Tetramethylethylen-diamin (TEMED) und Ammoniumpersulfat (APS) katalysiert wird, wurden 30% und 55% Gradienten-Lösungen mit diesen Katalysatoren ergänzt und anschließend in die entsprechende Kammer des Gradientenmischers überführt. Danach wurde die Peristaltikpumpe eingeschaltet, die mit dem Gradientenmischer verbunden ist, und die Gel-Apparatur wurde gleichmäßig befüllt. Anschließend wurde Gradienten-Gel mit 12 ml der 0 %-igen Polyacrylamid-Lösung, die als Sammelgel diente und den Taschenbildungskamm aufnahm, überschichtet. Da die Bestandteile der Gradientenmischer und der Peristaltikpumpe durch Reste der Polyacrylamid-Lösungen verstopft werden können, erfolgte nach der Befüllung der Gel-Kassette eine gründliche Spülung des Gradientenmischers. Die Gele wurden zur Polymerisierung für 1,5-2 Stunden in einem abgedunkelten Raum gelassen.

Beladen des Gels

Das Beladen des Gels erfolgte in der Elektrophorese-Kammer des INGENYphorU-2-System, die auf 60°C vorgewärmten Elektrophoresepuffer enthält. Zusammengebaute Gel-Kassetten (mit dem polymerisierten Gel) wurden in den Puffer gestellt und an die entsprechenden Elektroden angeschlossen.

Um die Dichte der DNA-Proben zu erhöhen und damit zu gewährleisten, dass sie sich gleichmäßig am Boden der Geltasche verteilen, wurden 8 µl jeder DNA-Probe (PCR-Produkt) mit 2 µl Roti®-Load DNA-Puffer gemischt. Das Mischen erfolgte mithilfe der 8-Kanal-Pipette in einer Mikrotiterplatte. Sobald alle Proben mit dem Auftragspuffer gemischt waren, wurde die Elektrophorese-Kammer auf „Low Voltage“ eingestellt und jede Probe sorgfältig auf das Gel aufgetragen.

Elektrophorese

Nach dem Beladen des Gels wurde die Elektrophorese-Kammer des INGENYphorU-2-System auf „High Voltage“ umgestellt und 5 min bei 200 V laufen gelassen. Danach lief die Elektrophorese bei konstanter Spannung von 120 V und einer Temperatur von 60°C im abgedunkelten Raum für 16 Stunden (MUYZER et al., 1993).

Färbung und Konservierung des Gels

Nach Ablauf der Elektrophorese-Zeit wurde die Gel-Kammer aus der Puffer-Kammer entnommen, die Gel-Kassetten auseinandergebaut und die GelBond® PAG-Folie mit dem aufliegenden Gel vorsichtig von der Glasplatte entfernt. Das Gel wurde für 3 min in eine Plastikschale mit 800 ml Fixierlösung übertragen. Durch die Behandlung mit dieser Lösung wird DNA im Gel fixiert und ihr weiteres Wandern verhindert. Um die fixierte DNA mit dem Silber zu verbinden, wurde die Fixierlösung gegen Silberlösung ausgetauscht und 10 min einwirken gelassen. Die überschüssigen Silberreste wurden nach der Silberreaktion durch das Waschen des Gels mit bidestilliertem Wasser (2x à 5 min) entfernt. Die Entwicklung des Gels erfolgte durch Zugabe von 800 ml Entwicklerlösung, deren alkalisches Formaldehyd Ag⁺-Ionen zu elementarem Ag reduziert und dadurch alle Stellen, an denen DNA vorhanden ist, schwarz färbt. Diese Entwicklung des Gels dauert ca. 20-30 min. Sobald alle Banden auf dem Gel sichtbar waren, wurde das Gel aus der Entwickler-Lösung entnommen und für weitere 5 min in die Fixierlösung übertragen. Anschließend wurde es mit bidestilliertem Wasser 2 min gespült und anschließend 7 min in einer Aufbewahrungslösung konserviert. Danach wurde das Gel mit einer Zellophanmembran bedeckt und bei 60°C für 12-14 Stunden getrocknet.

2.3.3.2 Densitometrische Auswertung des Gels

Die Auswertung der Gele erfolgte mit dem Programm Phoretix 1D v2003.02 (Nonlinear Dynamics, Großbritannien). Das Programm beruht auf der densitometrischen¹ quantitativen Analyse des Gel-Bilds, der 16S rDNA-Fingerabdrücke der untersuchten Proben.

¹ Densitometrie ist die quantitative Messung der Farbdichte (Volltondichte), d.h. der Farbmenge pro Flächeneinheit.

Als erstes wurden alle Gele mit der Auflösung 400 dpi (Grau-Stufen) gescannt und im TIFF-Format auf einem PC gespeichert. Die Analyse des gespeicherten Bilds mittels Phoretix 1D v2003.02 beinhaltet folgende Arbeitsschritte:

a) Bestimmung der zu analysierenden Bereiche (*Lane creation*)

Auf dem gescannten Bild wurden Formen und Grenzen der einzelnen Spuren (Lanes) bestimmt.

b) Definition des Bildhintergrunds (*Background subtraction*)

Da das Gel-Material eine eigene Farbe hat und bei der Bestimmung der wahren Intensität der 16S rDNA-Fingerabdrücke stören kann, muss die Intensität des Hintergrunds definiert werden. Für diesen Zweck stehen im Phoretix 1D verschiedene Methoden zur Verfügung. In dieser Arbeit wurde die *Rolling Ball*-Methode benutzt. Bei dieser Methode wird der Hintergrund als der niedrigste Grauwert berechnet, der unter dem Intensitätsmuster der Probe rollt.

c) Identifikation der einzelnen Banden der Lanes (*Band detection*)

Die Identifizierung der Banden basiert auf der Bestimmung der Punkte auf dem Bild, deren Farbdichte höher ist als der Hintergrund. Es werden sowohl die Intensität als auch die Grenzen dieser Punkte erkannt. Da aber während der Fertigung des Gels (Färben, Trocken) auch mögliche Schädigungen (Flecken, Risse usw.) auftreten und als Banden identifiziert werden können, muss nach der automatischen Identifizierung von Hand eine Nachbearbeitung des Bilds erfolgen. Mit Hilfe der manuellen Korrektur werden „falsche“ Banden entfernt oder zusätzliche eingefügt.

Sobald die Bandendetektion abgeschlossen ist, werden im Menü *Measurements/All Lanes* verschiedene Werte verfügbar, die für die Charakterisierung der untersuchten Proben verwendet werden können. Für die vorliegende Arbeit wurden folgende Messparameter ausgewählt:

Richness – Anzahl der detektierten Banden in der jeweiligen Spur (Lane);

Band Percentage – Prozentanteil des Volumens der einzelnen Bande am Gesamtvolumen aller detektierten Banden in der Spur;

Volume – Gesamtzahl der Pixel, aus denen jede einzelne Bande besteht

Die oben genannten Messwerte wurden direkt aus Phoretix 1D nach Microsoft Excel exportiert und für die Berechnungen der Diversitätsindizes (nach Shannon und Simpson) verwendet, die untersuchte 16S rDNA-Arten-Gemeinschaften hinsichtlich ihrer Zusammensetzung beschreiben.

Für die Beschreibung der Ähnlichkeit der 16S rDNA-Arten-Gemeinschaften werden aber weitere Daten, etwa die „Zahl der gemeinsamen Arten“, benötigt. Um diese Daten zu erhalten, müssen weitere Phoretix-Prozeduren durchgeführt werden.

d) Definition der Positionen der einzelnen Banden (*Rf-Calibration*)

Phoretix 1D verfügt über verschiedene Algorithmen, die Ähnlichkeiten bzw. Unterschiede zwischen den untersuchten Proben berechnen können. Dabei werden einzelne Banden (sowohl nach Anzahl als auch nach Volumen) verglichen, aus denen der 16S rDNA-Fingerabdruck jeder Probe besteht. Der Vergleich kann aber nur durchgeführt werden, wenn alle detektierten Banden zugeordnet sind, was voraussetzt, dass die Banden die gleichen Positionen im Gel haben. Wenn Proben unebenmäßig in das Gel laufen, wird der Vergleich ihrer Banden-Muster mit anderen Proben erschwert. Um solche Ungenauigkeiten im Verlauf der Spuren und Banden auszugleichen, wird automatisch ein *Retardation Factor (Rf)* errechnet, der die Positionen einzelner Banden in der Lane bestimmt. Durch Markierung der einzelnen, gut sichtbaren und starken Banden, werden *Rf-Linien* hergestellt. Mit Hilfe von Inter- und Extrapolation werden *Rf-Werte* (bzw. Positionen) auch für andere Banden, die sich außerhalb dieser Linien befinden, bestimmt.

e) Zuordnung vergleichbarer Banden (*Band Matching*)

Die Zuordnung vergleichbarer Banden basiert auf dem Vergleich mit einer oder mehreren *Referenz-Lanes* (Standards). Je nach Ziel der Untersuchung können als Standards Proben mit definierter Zusammensetzung oder definierter Menge des untersuchten Materials verwendet werden. Banden, aus denen die 16S rDNA-Fingerabdrücke der untersuchten Proben bestehen, werden dem Banden-Muster der Referenz-Lane zugeordnet. Für diese Dissertation wurde der *Rf-Wert* als Basis für den Vergleich festgelegt, d.h. zugeordnet werden konnten nur solche Banden, die gleiche Positionen (*Rf*) im Gel hatten. In Fällen, in denen Banden im Bild nicht in der Referenz-Lane lagen, wurde über die horizontale Summe der Pixelgrauwerte aller Lanes eine *Synthetic Lane* gebildet. Das Band Matching kann sowohl automatisch als auch manuell durchgeführt werden – in dieser Arbeit aber wurde manuelle Prozedur verwendet.

Nach erfolgter Zuordnung der Banden stehen im Menü *Mesurements/Comparison* und *Matching Information* verschiedene Messwerte zur Verfügung, die für die Beschreibung der Ähnlichkeit der 16S rDNA-Fingerabdrücke der untersuchten Proben notwendig sind. Für die Berechnungen der Ähnlichkeit-Indizes wurden folgende Messwerte benutzt:

Band Sharing Index – Index, der die Zahl der gemeinsamen Arten berücksichtigt und als

Matrix im Menü *Matching Information/All Lanes* zu finden ist;

Band Percentage – Prozentanteil des Volumens der einzelnen Bande am Gesamtumfang aller detektierten Banden in der Spur (*Mesurements/Comparison*);

Volume – Gesamtzahl der Pixel, aus denen jede einzelne Bande besteht (*Mesurements/Comparison*).

Die oben genannten Messwerte wurden aus Phoretix 1D wiederum nach Microsoft Excel exportiert und für Berechnungen der Ähnlichkeit der untersuchten 16S rDNA-Arten-Gemeinschaften (nach Sørensen, Renkonen und Morisita) verwendet.

2.3.3.3 Berechnung ökologischer Indizes

Für die Bewertung der Biodiversität (Artenvielfalt) von Ökosystemen wurden verschiedenste mathematische Verfahren entwickelt, es gibt aber bisher keine universelle Methodologie, die alle Aspekte der Biodiversität berücksichtigt (LEVEQUE & MOUNOLOU, 2003). Am häufigsten werden Biodiversitätsmaße benutzt, die die Artenvielfalt eines Ökosystems durch eine einzige Zahl (Index) charakterisieren. Für die Bewertung des ökologischen Systems wird in der Regel eine Kombination aus mehreren Biodiversitätsmaßen verwendet. Die verschiedenen Maße unterscheiden sich dahingehend, welche Informationen über den Ökosystemzustand sie berücksichtigen und wie sie diese Informationen zu einem Index aggregieren (BAUMGÄRTNER, 2003).

Um die fütterungsabhängigen Unterschiede in der bakteriellen Ökosysteme der untersuchten Tiere festzustellen, wurden über die DGGE erhaltende bakterielle 16S rDNA-Fingerabdrücke durch folgende Parameter beschrieben:

- Zusammensetzung der 16S rDNA-bakteriellen Gemeinschaft der Versuchs- und Kontrolltiere (Diversitätsindizes);
- Übereinstimmung der 16S rDNA-bakteriellen Gemeinschaften bei den Tieren (Ähnlichkeitsindizes).

Berechnung der Diversitätsindizes

In der Populationsstatistik werden bei der Berechnung der Diversitätsindizes i.d.R. Begriffe wie „Individuum“, „Individuenzahl pro Fläche“, „Gesamtindividuenzahl pro Fläche“, „Anzahl der Arten pro Fläche“ u.ä. benutzt. Da es aber bei der DGGE um die densitometrische Auswertung des Gels geht, bei der keine einzelnen Individuen gezählt werden können, werden Diversitätsindizes mit Hilfe von *Phoretix*-Äquivalenten errechnet. Tabelle 15 bietet eine Übersicht über Begriffe der Populationsstatistik und Äquivalente in *Phoretix*.

Tab. 15: Begriffe der Populationstatistik und entsprechende Phoretix-Äquivalente für die Berechnung der Diversitätsindizes

Begriff der Populationstatistik	DGGE-Phoretix-Äquivalent	Erläuterung (Phoretix)
Individuum	-	
Arten/Spezies	<i>Detektierte Banden in der Lane</i>	
Anzahl der Arten	<i>Anzahl aller Banden der Lane</i>	
Individuenzahl der Art i	<i>Volumen einer einzelnen Bande</i>	Summe der Pixel-Intensitäten des einzelnen Bands
Gesamtindividuenzahl	<i>Volumen aller detektierten Banden der Lane</i>	Summe der Pixel-Intensitäten aller Banden der Lane
Relative Häufigkeit der i-ten Art von der Gesamtindividuenzahl	<i>Band Percentage</i>	Prozentualer Anteil des Volumens der einzelnen Bande (i-te Spezies) am Gesamtvolumen aller detektierten Banden in der Lane

a) Berechnung der Diversitätsindizes hinsichtlich der Vielfalt der bakteriellen Gesellschaft

Das einfachste Maß, das die Diversität eines Systems beschreibt, ist die **Richness** (Reichhaltigkeit) – die Anzahl unterschiedlicher Arten (16S rDNA-Spezies) in dem betrachteten System. In Phoretix entspricht dies der Anzahl der detektierten Banden pro Spur (= pro Probe).

b) Berechnung der Diversitätsindizes hinsichtlich der quantitativen Verhältnisse der einzelnen Spezies innerhalb der mikrobiellen Gemeinschaft

Der **Simpson-Index (Dominanz-Index)** berechnet die Biodiversität unter Berücksichtigung des Anteils jeder Art (Spezies) an der gesamten Population der untersuchten Probe. Dieser Index repräsentiert die Wahrscheinlichkeit, mit der zwei zufällig aus einem unendlich großen Ökosystem gezogene Individuen zur selben Art (Spezies) gehören (Baumgärtner, 2003). Mathematisch ist er wie folgt definiert:

$$D = \sum_{i=1}^s n_i(n_i - 1) / N(N - 1)$$

n_i = Individuenzahl der Art i (*Phoretix-Daten*: Volumen eines einzelnen Bands in einer Spur)

N = Gesamtindividuenzahl (*Phoretix-Daten*: Gesamtvolumen aller Banden der Spur)

s = Gesamtzahl der Arten (*Phoretix-Daten*: Anzahl der detektierten Banden pro Spur)

Interpretation: Je größer der prozentuale Anteil einer bestimmten bakteriellen Art an der gesamten bakteriellen Population (seine Dominanz), desto höher der Wert des Simpson-Index (0,0 zu 1,0) und entsprechend desto weniger Diversität.

Der **Shannon-Weaver Index (od. Shannon-Wiener-Index)** basiert auf der Informationstheorie und berechnet die bakterielle Diversität unter Berücksichtigung der Anzahl der Arten und

des Anteils jeder Art (Spezies) an der Artengemeinschaft (KWAK & PETERSON, 2007). Mathematisch wird er folgendermaßen errechnet:

$$H' = -\sum_{i=1}^s p_i \cdot \ln p_i$$

s = Gesamtzahl der Arten (*Phoretix-Daten*: Anzahl der detektierten Banden pro Spur)

p_i = Wahrscheinlichkeit des Auftretens der Art i oder relative Häufigkeit der i -ten Art in der Gesamtindividuenzahl, gemessen von 0,0 bis 1,0 (*Phoretix-Daten*: *Band Percentage*)

Interpretation: „Eine maximale Diversität nach dem Shannon-Index wäre gegeben, wenn in einer s Arten enthaltenden Gemeinschaft alle Arten im gleichen quantitativen Verhältnis vorhanden sind.“ (UNTERSTEINER, 2005)

c) Berechnung der Diversität-Indizes hinsichtlich Verteilung der einzelnen Spezies innerhalb der mikrobiellen Gemeinschaft

Evenness – „Relation des Shannon-Index zu dem maximal möglichen Diversitätswert, der sich bei gleicher Artenzahl, aber unter größtmöglicher Gleichverteilung der Individuen auf die bestehenden Arten ergeben würde“ (UNTERSTEINER, 2005). Mathematisch ist Evenness wie folgt definiert:

$$E = H' / \ln S$$

H' = Shannon-Index

S = Gesamtzahl der Arten (*Phoretix-Daten*: Anzahl der detektierten Banden pro Lane (16S rDNA-Spezies))

Interpretation: Je ungleicher die einzelnen Arten/Spezies in der Population verteilt sind, desto geringer ist der E -Wert (0,0 bis 1,0) und desto instabiler (unhomogener) die Struktur des betrachteten Systems.

Berechnung der Ähnlichkeitsindizes

Um Übereinstimmungen im Arteninventar zweier Artengemeinschaften (Proben) festzustellen, wurden ökologische Indizes entwickelt, die wie Diversitätsindizes unter Berücksichtigung der verschiedenen strukturellen Merkmale der einzelnen Artgemeinschaften errechnet werden. Die paarweise Übereinstimmung (Ähnlichkeitsindizes) der Artengemeinschaften (untersuchte Proben) wurde im Bezug auf die Anzahl der gemeinsamen Arten berechnet. Als gemeinsame Arten zweier Gemeinschaften (Proben) werden auf dem DGGE-Gel Banden (16S rDNA-Spezies) mit den gleichen R_f -Werten (Position im Gel) bezeichnet.

Der **Sørensen-Quotient (QS)** dient dem einfachen Vergleich von Artengemeinschaften und berücksichtigt die Anzahl der gemeinsam in zwei Habitaten vorkommenden Arten und die jeweilige Anzahl der Arten in den zu vergleichenden Habitaten. Er wird wie folgt berechnet:

$$QS = 2 \cdot G / S_A + S_B$$

G = Zahl der in beiden Habitaten gemeinsam vorkommenden Arten (*Phoretix-Daten*: Zahl der in beiden Habitaten vorkommenden Banden, die die gleichen Rf-Werte haben)

S_A, S_B = Zahl der Arten in Habitat A bzw. B (*Phoretix-Daten*: Anzahl der Banden pro Lane)

Interpretation: Der *Sørensen-Quotient* liegt zwischen 0% und 100%. Je höher der Quotient, desto größer ist die Ähnlichkeit in der Artenzusammensetzung. Der *Sørensen-Quotient* entspricht dem *Band Sharing Index*, den Phoretix 1D automatisch berechnet und als Matrix im Menü *Matching Information/All Lanes* darstellt.

Da die Ähnlichkeitsindizes für alle auf dem Gel eingetragenen Proben berechnet werden, lässt sich vergleichen, wie ähnlich bakterielle Gemeinschaften bei Versuchstieren innerhalb einer Versuchsgruppe (Kontroll- bzw. Probiotikumgruppe) und bei Tieren aus den beiden verschiedenen Gruppen sind. Die Sortierung der Ähnlichkeitsindizes wurde durch Herstellung einer Matrix erreicht. Werte jeder Ähnlichkeitsgruppe wurden danach statistisch bearbeitet und in Form eines Balken-Diagramms dargestellt. Um die Ähnlichkeit zwischen einzelnen Tiere und Ähnlichkeits-Gruppen (Cluster) besser zu verdeutlichen, wurden auch von Phoretix 1D automatisch erstellte UPGMA-Dendrogramme (*Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic Average*) benutzt.

2.3.4 Bestimmung mikrobieller Metaboliten

Um eine durch Zugabe des Probiotikums hervorgerufene Nettozunahme bzw. Abnahme der bakteriellen Stoffwechselprodukte zu evaluieren, wurde Laktat, Ammoniak und flüchtige Fettsäuren in dem *Magen*-, *Jejunum*- und *Colon ascendens*-Inhalt gemessen.

2.3.4.1 Laktat

Die Ermittlung des Milchsäuregehalts der untersuchten Probe erfolgte fluorometrisch mit Hilfe eines kommerziellen enzymatischen Laktat-Test Kits (Fa. Boehringer, Mannheim, Deutschland) nach Angaben des Herstellers. Zur photometrischen Messung wurde das Programm Swift Quantification II (Biochrom, Cambridge, Großbritannien) verwendet. Nach der fluorometrischen Bestimmung des Milchsäuregehalts erfolgte die Berechnung der Laktatgehalte (L- und D- Isomere).

2.3.4.2 Ammoniak

Die Ammoniakmessung wurde mit einer ionenselektiven Elektrode (Mettler Toledo Electrode, Type No. 51340910) und einem daran angeschlossenen pH-Meter als Messgerät durchgeführt. Vor der Messung der untersuchten Proben wurde die ionenselektive Elektrode mit NH₄Cl kalibriert. Nach der Kalibrierung wurden die auf Eis aufgetauten Proben 10 min bei

13000 UpM und 4°C zentrifugiert. Zu den 500 µl Überstand wurden 500 µl 1M NaOH, 200 µl Ammoniumsulfat-Lösung (ISA-Lösung 0,9 mol/L, Fa. Mettler, Toledo, USA) und 9,0 ml Reinstwasser hinzugegeben. Nach dem Homogenisieren der Proben-Lösung erfolgte ihre Messung. Die Ergebnisse wurden in ppm (*parts per million*, 1 mg/L) abgelesen und anschließend in mmol/L umgerechnet.

2.3.4.3 Flüchtige Fettsäuren

Die Digestaprobe wurden mit Oxalsäure (0,1 mol/L), Natriumazid (40 mmol/L) und Capronsäure (0,1 mmol/L) als internem Standard versetzt und homogenisiert. Die Gehalte von Essigsäure, Propionsäure, Buttersäure und Valeriansäure wurden nach einer Methode von Schäfer (1995) aus den Überständen nach Zentrifugation gaschromatographisch bestimmt. Dabei wurde ein Gaschromatograph mit einem Flammenionisationsdetektor der Firma Agilent 6890 (Waldbronn, Deutschland) mit einer Kapillarsäule Innovax 30m x 530µm x 0.1µm der Firma Agilent verwendet. Trägergas war Wasserstoff.

2.4 Datenverarbeitung und Statistik

Die statistischen Auswertungen und die graphischen Darstellungen wurden mit der Software SPSS 12.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) erstellt.

Quantitativ wurden Digestaprobe mittels Real-Time PCR in „Zellzahl/Gramm Feuchtmasse“ gemessen und bakterielle Stoffwechselprodukte in „mmol/L“ und „mg/g“. Zur Analyse wurden dabei nur die Proben herangezogen, die während der Reaktion positive Signale (Amplifikation) aufwiesen. In jeder Versuchsgruppe wurden die absoluten bakterielle Zellzahlen sowie die Anteile einzelner Bakteriengruppen an der gesamten Zahl der Eubakterien und die Anteile einzelner Bakterienspezies an der Gesamtzahl der Laktobazillen oder Enterokokken für jedes Versuchstier ermittelt. Danach folgte die Prüfung dieser Daten auf Normalverteilung mit dem nicht-parametrischen Kolmogorov-Smirnov-Test mit Signifikanzkorrektur nach Lilliefors. Da die Werte nicht normal verteilt waren, wurden die erworbenen Daten in den erstellten Graphiken als Median mit einer Punktwolke von Einzelwerten angegeben, welche die tatsächliche Messwertverteilung darstellt. In den Tabellen sind der Median, der maximale und der minimale Wert sowie die Anzahl der Proben mit positivem Signal aufgelistet. Um einen Gruppenvergleich durchzuführen, wurde der Mann-Whitney-Test (U-Test) angewendet. Lag der Wert für die asymptotische Signifikanz unter oder genau bei 0,05, wurde ein Gruppenunterschied als signifikant bewertet. Als Tendenz wurde ein p-Wert von kleiner oder gleich 0,1 bezeichnet. Die p-Werte sind sowohl in den Graphiken als auch in den

Tabellen zu finden. Nach dem gleichen Muster wurden auch die Daten aus der Bestimmung der bakteriellen Stoffwechselprodukte (Laktat, Ammonium, flüchtige Fettsäuren) bearbeitet.

Bei der Bestimmung der Persistenz des probiotischen *E. faecium* NCIMB 10415 im gastrointestinalen Trakt der Ferkel der Probiotikumgruppe wurden die erworbenen Daten wie oben beschrieben mit der Angabe des Medianwerts zusammengefasst. Da in der Graphik die Zellzahlen in allen drei untersuchten Lokalisationen dargestellt werden sollten, wurde auf die Einfügung der Einzelwerte (Punktwolke) verzichtet. Um einen Vergleich der probiotischen Zellzahlen zwischen den untersuchten Lokalisationen zu ermitteln, wurde der Wilcoxon-Test für Paarunterschiede verwendet. Es wurden dabei Werte aus dem Magen und *Jejunum* (Paar *a*), Magen und *Colon* (Paar *b*) und *Jejunum* und *Colon* (Paar *c*) verglichen. War der Wert für die Signifikanz kleiner oder gleich 0,05, wurde ein Unterschied als signifikant bewertet.

Bei der Bearbeitung der DGGE-Ergebnisse wurden Daten der densitometrischen Analyse des Gels verwendet (s. S. 56ff.). Für jedes Tier wurden die Anzahl der Banden pro Spur (Probe), das Volumen der einzelnen Banden sowie der prozentuale Anteil des Volumens jedes einzelnen Bandes am Gesamtvolumen aller detektierten Banden in der Spur ermittelt. Danach erfolgte die Berechnung der *Richness*-, *Evenness*-, *Shannon*- und *Simson*-Diversitätsindizes. Die erworbenen Daten wurden anschließend zum Median zusammengefasst und graphisch und tabellarisch analog zu den Ergebnissen der Real-Time PCR und der Bestimmung bakterieller Metabolite dargestellt.

Um Übereinstimmungen in der Artenvielfalt festzustellen, wurde der von dem Auswertungsprogramm Phoretix 1D automatisch errechnete Ähnlichkeitsindex „Sörensen-Quotient“ verwendet. Da der Sörensen-Quotient für alle auf dem Gel eingetragenen Proben berechnet wird, lässt sich vergleichen, wie ähnlich die bakteriellen Gemeinschaften bei Versuchstieren innerhalb einer Versuchsgruppe (Kontroll- bzw. Probiotikumgruppe) sowie bei Tieren aus den beiden verschiedenen Gruppen sind. Die Sortierung der Ähnlichkeitsindizes wurde über die Herstellung einer Matrix erreicht. Die Werte jeder Ähnlichkeitsgruppe wurden danach mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test (Signifikanzkorrektur nach Lilliefors) auf Normalverteilung überprüft. Da sich die Werte nicht normal verteilt waren, wurde der Mann-Whitney-Test durchgeführt. Die graphische Darstellung erfolgte mittels Boxplots, die durch die 25 %- bzw. 75%- Perzentile begrenzt sind. Die darin enthaltene schwarze Linie stellt den Median (50%-Perzentil) dar. Die dünnen Querstriche ober- und unterhalb der Box geben den größten bzw. kleinsten Wert aus der jeweiligen Stichprobe an, der noch keinen Ausreißer- oder Extremwert darstellt.

3. ERGEBNISSE

3.1 Analytische Charakteristika der Real-Time PCR-Assays

3.1.1 Zusammensetzung der Kalibrier-Proben

Die Bestimmung der Sensitivität der Real-Time PCR beruhte auf dem Nachweis der Milchsäurebakterien im Quantifizierungsstandard (od. Kalibrier-Proben, s. S. 40ff.). Tabelle 16 zeigt die Zusammensetzung der Standardproben.

Tab. 16: Zusammensetzung der Standard-Proben

Inokulierte Bakterien	Anzahl der Stämme	Inokulierte Zellzahl/g Faeces
<i>Lactobacillus spp.</i>	31	1,26x10 ⁹
<i>Streptococcus spp</i>	10	4,07x10 ⁸
<i>Enterococcus spp.</i>	6	2,44x10 ⁸
<i>Bifidobacterium spp.</i>	5	2,03x10 ⁸
<i>E.coli</i>	4	1,63x10 ⁸
<i>Weissella spp</i>	2	8,14x10 ⁷
<i>Acetomicrobium faecale</i>	1	4,07x10 ⁷
Insgesamt*	59	2,4x10⁹

* *Acetomicrobium faecale* DSM 20678, *Bifidobacterium adolescentis* DSM 2008, *B. bifidum* DSM 20456, *B. longum* DSM 20219, *B. suis* DSM 20211, *B. thermophilum* DSM 20210, *Escherichia coli* DSM 2840, *E. coli* PS37, *E. coli* PS79, *E. coli* PS90, *Enterococcus cecorum* DSM 20682, *E. durans* DSM 20633, *E. faecalis* DSM 13591, *E. faecium* (Cylactin) NCIMB 10415, *E. hirae* DSM 20160, *E. villorum* DSM 15688, *Lactobacillus acetotolerans* DSM 20749, *L. acidophilus* DSM 20079, *L. alimentarius* DSM 20249, *L. amylovorus* DSM 20531, *L. animalis* DSM 20602, *L. bifementans* DSM 20003, *L. bifidus* DSM 20100, *L. brevis* DSM 20054, *L. delbrueckii s. bulgaricus* DSM 20081, *L. casei* DSM 20011, *L. crispatus* DSM 20584, *L. delbrueckii* DSM 20711, *L. farciminis* DSM 20184, *L. fermentum* DSM 20052, *L. gallinarum* DSM 10532, *L. gasserii* DSM 20243, *L. jensenii* DSM 20557, *L. johnsonii* DSM 10533, *L. mucosae* DSM 13345, *L. murinus* DSM 20452, *L. panis* DSM 6035, *L. paracasei* DSM 20020, *L. plantarum* DSM 20174, *L. pontis* DSM 8475, *L. reuteri* DSM 20016, *L. rhamnosus* DSM 20021, *L. sharpeae* DSM 20505, *L. vaginalis* DSM 5837, *L. salivarius subsp. Salivarius* DSM 20555, *L. zaeae* DSM 20178, *Lactococcus lactis subsp. Lactis* DSM 20481, *Streptococcus alactolyticus* DSM 20728, *S. bovis* DSM 20480, *S. infantis* DSM 12492, *S. mutans* DSM 20523, *S. porcinus* DSM 20725, *S. salivarius* DSM 20560, *S. suis* DSM 9682, *S. dysgalactiae subsp. Dysgalactiae* DSM 20662, *S. hyointestinalis* DSM 20770, *S. gallolyticus* DSM 13808, *Weissella confusa* DSM 20196, *W. hellenica* DSM 7378

3.1.2 Überprüfung der Kalibrier-Proben auf koloniebildende Einheiten

Da der Nachweis der bakteriellen Zellen durch die Detektion der spezifischen DNA-Fragmente (Real-Time PCR) von vielen Faktoren (z.B. dem physiologischen Zustand der Zelle, der Komplexität der Probenmatrix, den PCR-Inhibitoren u.a.) beeinflusst wird, müssen zunächst die Sensitivität der Real-Time PCRs und die der klassischen kulturellen Nachweismethode verglichen und dadurch Differenzen sowie Übereinstimmungen beider Methoden festgestellt werden.

Die Sensitivität der klassischen Kultivierung wurde anhand der Breite des Messbereiches¹ und der in der Folge ermittelten Linearität sowie der Differenz zwischen der Anzahl der inokulierten Bakterien und der Anzahl der detektierten koloniebildenden Einheiten bewertet. Es stellte sich heraus, dass die ursprüngliche Konzentration der ausgewählten bakteriellen Gruppen in den untersuchten Kalibrier(Standard)-Proben im Bereich von drei (*E. coli*, *Lactobacillus spp.*) bis vier (alle Bakterien, *Enterococcus spp.*) Verdünnungsstufen errechnet werden kann. Die Linearitätswerte (r^2) lagen dabei zwischen 0,930 und 0,978.

Da die in dieser Arbeit untersuchten Standard-Proben eine vorher definierte Menge Bakterien enthielten, konnten Differenzen zwischen der Zahl der inokulierten und der gewachsenen Kolonien festgestellt werden, die auch als Wiederfindungsrate dieser Methode betrachtet werden können. Tabelle 17 gibt ein Überblick über die gewonnenen Ergebnisse.

Tab. 17: Wiederfindungsraten bei der klassischen Kultivierung

Inokulierte Bakterien	Anzahl inokulierter Zellen pro g Faeces	Soll-Wert [KbE/g Faeces]	Ist-Wert [KbE/g Faeces]	Wiederfindung [%]
<i>Lactobacillus spp.</i> (31 Stämme)	1,26x10 ⁹	1,26x10 ⁷	9,64 x10 ⁵	7,65
<i>Enterococcus spp.</i> (6 Stämme)	2,44 x10 ⁸	2,44 x10 ⁶	1,32 x10 ⁶	53,89
<i>E.coli</i> (4 Stämme)	1,62 x10 ⁸	1,62 x10 ⁶	3,48 x10 ⁵	21,32
Gesamtzellzahl (59 Stämme)	2,40 x10 ⁹	2,40 x10 ⁷	1,11 x10 ⁶	4,70

Die Anzahl der auf selektiven Medien gewachsenen Kolonien war für alle detektierten bakteriellen Gruppen niedriger als die Anzahl der inokulierten Bakterien. Die größte Differenz wurde für die Gesamtzahl der inokulierten Bakterien registriert – von 2,40x10⁹ inokulierten Zellen/g Faeces wurden auf dem BHI-Agar mit 1% Blut 1,11x10⁶ KbE oder 4,70% der Zellen wiedergefunden. Hohe individuelle Wachstumsraten ergaben sich für die Bakteriengattung *Enterococcus* – 2,44 x10⁸ inokulierte Zellen/g Faeces lieferten 1,32x10⁶ KbE oder 53,89% auf dem Slanetz&Bartley-Agar. Bei *Lactobacillus* wurden von 1,26x10⁹ inokulierten Zellen/g Faeces auf dem LAS-Agar 9,64x10⁵ KbE oder 7,65% wiedergefunden. Von 1,62x10⁸ inokulierten Zellen/g Faeces von *Escherichia spp.* waren 3,48x10⁵ KbE (21,32%) auf dem DEV-Endo-Agar wachstumsfähig.

3.1.3 Optimierung der PCR-Bedingungen

Die analytische Auflösung der Real-Time PCR wurde unter Standard-Amplifikationsbedingungen (s. S. 47f.) bestimmt und im Weiteren so optimiert, dass bei maximaler Spezifi-

¹ Verdünnungsstufen der Standardreihe, bei denen die Zählung einzelner Kolonien möglich war.

tät eine möglichst hohe Sensitivität (Effizienz der Amplifikation bzw. Signalbildung) erreicht wurde. Für die Primerpaare, bei denen nach dem Standard-Protokoll falsch-positive und falsch-negative Ergebnisse registriert wurden, wurden Anlagerungstemperatur und Anlagerungszeit optimiert.

Die gruppenspezifischen Primer für Laktobazillen, Enterokokken, Bifidobakterien sowie die speziesspezifischen Primer für *E. faecium* und *E. faecalis* waren unter Standard-Amplifikationsbedingungen spezifisch und sensitiv. *L. acidophilus*- und *L.reuteri*-Primer waren schon bei der Verwendung der Standard-Bedingungen spezifisch, aber nicht ausreichend sensitiv. Für diese Primer wurde deshalb die Anlagerungszeit auf 60 sec verlängert. Bei anderen Primern (z.B. für *L. amylovorus*, *L. mucosae*, *E. faecium* NCIMB 10415) wurden Spezifität und Sensitivität durch eine Erhöhung der Anlagerungstemperatur bei unveränderter Anlagerungszeit erreicht. Die endgültigen optimierten bzw. spezifischen und sensitiven Real-Time PCR-Bedingungen sind in Tabelle 13 (S. 52) dargestellt.

3.1.3.1 Spezifität der Real-Time PCR Assays

Da die verwendeten gruppen- und einige speziesspezifische Primer aus bereits publizierten wissenschaftlichen Beiträgen (vgl. Tab. 8, S. 45) übernommen wurden, sei für genauere Angaben zu ihrer Spezifität auf diese Beiträge verwiesen. Unter Institutsbedingungen wurde die Spezifität dieser Oligonukleotide noch einmal im Hinblick auf die in Tabelle A3 im Anhang aufgelisteten Referenzstämme überprüft. Im Ganzen lieferten die verwendeten gruppen- und speziesspezifischen Primer unter optimalen PCR-Bedingungen positive Ergebnisse für die entsprechenden positiven Referenzstämme und negative bei den negativen Kontrollen (negative Referenzstämme und *non template control*). Ein Überblick über die Spezifität der unter optimierten PCR-Bedingungen verwendeten gruppen- und speziesspezifischen Oligonukleotide findet sich in Tabelle 18.

ERGEBNISSE

Tab. 18: Spezifität der gruppenspezifischen Real-Time PCR-Assays für die Referenzstämme

Ziel-DNA	Getestete Stämme					
	Positive Kontrolle	<i>n</i> ^a	Ergebnis	Negative Kontrolle	<i>n</i>	Ergebnis
<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Lactobacillus</i> spp.	31	positiv	<i>Lactococcus lactis</i>	1	f/positiv ^b
				<i>Weissella</i> spp.	2	f/positiv
				<i>Enterococcus</i> spp.	6	negativ
				<i>Bifidobacterium</i> spp.	5	negativ
				<i>Streptococcus</i> spp.	10	negativ
				<i>E.coli</i>	4	negativ
<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Enterococcus</i> spp.	17	positiv	<i>Lactobacillus</i> spp.	31	negativ
				<i>Bifidobacterium</i> spp.	5	negativ
				<i>Streptococcus</i> spp.	10	negativ
				<i>E.coli</i>	4	negativ
<i>Escherichia</i> spp.	<i>E.coli</i>	4	positiv	<i>Enterococcus</i> spp.	10	negativ
				<i>Lactobacillus</i> spp.	6	negativ
				<i>Bifidobacterium</i> spp.	5	negativ
				<i>Streptococcus</i> spp.	2	negativ
<i>Bifidobacterium</i> spp.	<i>Bifidobacterium</i> spp.	5	positiv	<i>Enterococcus</i> spp.	6	negativ
				<i>Lactobacillus</i> spp.	31	negativ
				<i>Streptococcus</i> spp.	2	negativ
				<i>E.coli</i>	4	negativ
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. acidophilus</i>	1	positiv	<i>Lactobacillus</i> spp.	30	negativ
				<i>Enterococcus</i> spp.	6	negativ
				<i>Bifidobacterium</i> spp.	5	negativ
				<i>Streptococcus</i> spp.	10	negativ
<i>L. amylovorus</i>	<i>L. amylovorus</i>	1	positiv	<i>Lactobacillus</i> spp.	30	negativ
				<i>Weissella</i> spp.	2	negativ
				<i>Lactococcus lactis</i>	1	negativ
				<i>Enterococcus</i> spp.	6	negativ
				<i>Bifidobacterium</i> spp.	5	negativ
<i>L. johnsonii</i>	<i>L. johnsonii</i>	1	positiv	<i>Lactobacillus</i> spp.	30	negativ
				<i>Weissella</i> spp.	2	negativ
				<i>Lactococcus lactis</i>	1	negativ
				<i>Enterococcus</i> spp.	6	negativ
				<i>Bifidobacterium</i> spp.	5	negativ
<i>L. mucosae</i>	<i>L. mucosae</i>	1	positiv	<i>Lactobacillus</i> spp.	30	1 f/positiv ^c
				<i>Weissella</i> spp.	2	negativ
				<i>Lactococcus lactis</i>	1	negativ
				<i>Enterococcus</i> spp.	6	negativ
				<i>Bifidobacterium</i> spp.	5	negativ
<i>L. reuteri</i>	<i>L. reuteri</i>	1	positiv	<i>Lactobacillus</i> spp.	30	negativ
				<i>Weissella</i> spp.	2	negativ
				<i>Lactococcus lactis</i>	1	negativ
				<i>Enterococcus</i> spp.	6	negativ
				<i>Bifidobacterium</i> spp.	5	negativ

a - Anzahl der getesteten Stämme; b - falsch-positive Ergebnisse; c - *L. panis*

3.1.3.2 Sensitivität der Real-Time PCR Assays

Gruppenspezifische Real-Time PCR Assays

Die analytische Sensitivität der einzelnen gruppen- und speziesspezifischen Real-Time PCRs wurde anhand von Fluoreszenzdaten der Standard-Proben (Quantifizierungsstandard) bewertet. Da die verwendeten Standard-Proben eine echte Probe vom Tier simulierten, konnte durch gewonnene Fluoreszenzdaten (Ct-Werte, R^2) die Präzision der Quantifizierung bzw. der Einfluss von Probenmatrix und PCR-Inhibitoren bewertet werden. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 19 und 20 zusammengefasst.

Tab. 19: Sensitivitätsparameter der gruppenspezifischen Real-Time PCRs für die Standard-Proben

Anzahl inokulierten Zellen/g Faeces	Ct-Werte (Mittelwert±Standardabweichung)				
	Alle Bakt. (n=4) ^c	<i>Lactob. spp.</i> (n=4)	<i>Enteroc. spp.</i> (n=4)	<i>Escher. spp.</i> (n=4)	<i>Bifid. spp.</i> (n=4)
10^8 ^(a) / 10^9 ^(b)	18,07 (±2,96)	11,14 (±0,70)	15,16 (±0,55)	22,44 (±1,64)	21,30 (±0,67)
$10^7/10^8$	19,56 (±1,95)	13,00 (±0,24)	17,87 (±0,55)	25,54 (±2,97)	25,78 (±0,67)
$10^6/10^7$	25,28 (±2,54)	17,32 (±0,38)	22,06 (±0,75)	29,64 (±2,71)	29,44 (±1,18)
$10^5/10^6$	29,78 (±3,59)	20,70 (±0,19)	25,67 (±0,58)	33,93 (±1,98)	35,10 (±1,09)
$10^4/10^5$	32,73 (±1,55)	24,95 (±0,63)	29,81 (±0,86)	38,18 (±0,06)	38,43 (±0,00)
$10^3/10^4$	36,65 (±1,58)	28,45 (±0,43)	33,24 (±0,78)	-	-
$10^2/10^3$	-	-	-	-	-
Detektionssystem	TaqMan	SYBRGreen	SYBRGreen	TaqMan	SYBRGreen
R^2 (Rsq)	0,965 (±0,05)	0,989 (±0,005)	0,995 (±0,002)	0,980 (±0,01)	0,982 (±0,02)

a - Ausgangskonzentration der Enterokokken, Bifidobakterien und *E.coli*; b - Ausgangskonzentration der Laktobazillen sowie Konzentration der gesamten Bakterien (für genaue Angaben zu Konzentrationen jeder Gruppe vgl. Tab. 16); c - Anzahl der durchgeführten PCRs (Wiederholungen); d - Amplifikationseffizienz und R^2 -Werte wurden für jede Reaktion nach den mathematischen Algorithmen des Mx-Pro-Programms automatisch errechnet

Mit Hilfe der gruppenspezifischen PCRs konnten ausgewählte bakterielle Gruppen im Bereich von 10^4 - 10^9 (*Lactobacillus spp.* und alle Bakterien), von 10^3 - 10^8 (*Enterococcus spp.*) und 10^4 - 10^8 Zellen/g Feces (*Bifidobacterium spp.*, *Escherichia spp.*) quantifiziert werden. Dabei lagen die Messbereiche für die Gesamtzahl der Bakterien, für *Lactobacillus spp.* und *Enterococcus spp.* eine Zehnerpotenz niedriger als jene bei *Bifidobacterium spp.* und *Escherichia spp.* Für die Kalibrier-Proben mit 10^2 - 10^3 inokulierten Zellen/g Faeces wurden keine positiven Fluoreszenzsignale gemessen.

Durch die Homogenität der registrierten Ct-Werte und ihre hohe Linearität (R^2 -Werte von $0,965\pm 0,05$ bis $0,995\pm 0,002$) konnte eine präzise Quantifizierung der ausgewählten bakteriellen Gruppen erreicht werden.

ERGEBNISSE

Tab. 20: Sensitivität der speziesspezifischen Real-Time PCRs für die Standard-Proben

Standard Proben / Anzahl inokulieren Zellen	Ct-Werte (Mittelwert±Standardabweichung)							
	<i>L.acidophilus</i> (n=4) ^a	<i>L.amylovorvus</i> (n=4)	<i>L.johnsonii</i> (n=4)	<i>L.mucosae</i> (n=4)	<i>L.reuteri</i> (n=4)	<i>E.faecium</i> NCIMB 10415	<i>E.faecalis</i>	<i>E.faecium</i>
4,07x10 ⁷	17,05 (±0,22)	14,54 (±0,35)	16,21 (±0,84)	14,98 (±0,45)	22,56 (±1,12)	14,02 (±1,10)	21,39 (±0,20)	15,40(±0,79)
4,07x10 ⁶	19,43 (±0,30)	17,22 (±0,23)	18,72 (±0,92)	17,59 (±0,35)	26,25 (±3,35)	16,12(± 0,24)	24,57 (±2,32)	18,12(±0,42)
4,07x10 ⁵	24,18 (±0,61)	21,13 (±0,32)	23,46 (±0,05)	21,49 (±0,45)	30,27 (±0,81)	19,78(±0,53)	29,63 (±2,409)	22,00(±0,37)
4,07x10 ⁴	27,22 (±0,22)	24,89 (±0,27)	26,53 (±1,71)	25,18 (±0,32)	33,55 (±0,30)	23,38(±0,31)	34,52 (±2,409)	25,89(±0,32)
4,07x10 ³	30,52 (±0,87)	29,09 (±0,55)	31,64 (±0,14)	28,06 (±0,71)	35,56 (±2,25)	28,51(±1,09)	38,24 (±1,66)	31,45(±1,72)
4,07x10 ²	-	32,16 (±0,26)	-	31,87 (±1,10)	39,38 (±0,71)	31,40(±0,84)	-	32,99(±0,28)
4,07x10 ¹	-	-	-	-	-	-	-	-
Detektionssystem	SYBRGreen	SYBRGreen	SYBRGreen	SYBRGreen	TaqMan	SYBRGreen	SYBRGreen	SYBRGreen
R ² (Rsq)	0,99(±0,00)	0,99 (±0,00)	0,97 (±0,04)	1,00 (±0,00)	0,97 (±0,01)	0,98(±0,01)	0,98 (±0,01)	0,99(±0,019)

a - Anzahl der durchgeführten PCRs (Wiederholungen)

Speziesspezifische Real-Time PCR Assays

Einzelne bakterielle Spezies konnten in den Standard-Proben mittels speziesspezifischer PCRs im Bereich von 10^2 - 10^7 (*L. amylovorus*, *L. mucosae*, *L.reuteri*, probiotischer *E.faecium* NCIMB 10415, *E. faecalis*) und 10^3 - 10^7 (*L. acidophilus*, *L. johnsonii*, *E. faecium*) Zellen/g Faeces quantifiziert werden. Mit 10^1 Zellen/g Faeces inokulierte Proben lieferten keine positiven Fluoreszenzsignale.

Aufgrund der Homogenität der Ct-Werte und der gemessenen Linearität (R^2 -Werte von $0,965 \pm 0,05$ bis $0,995 \pm 0,002$) konnten die entsprechenden speziesspezifischen PCR-Assays als sensitiv und präzise bezeichnet werden.

3.1.4 Vergleich von Real-Time PCR und klassischer Kultivierung

Um den Grad der Übereinstimmung beider Methoden zu ermitteln, wurde für den in beiden Ansätzen abgedeckten Messbereich ein Korrelationskoeffizient (r^2) berechnet. Dabei wurde ein starker positiver linearer Zusammenhang zwischen der Anzahl der auf selektiven Agar-Medien gewachsenen Kolonien und der Anzahl der amplifizierten DNA-Fragmente ermittelt. Für die detektierten *Lactobacillus spp.* und *Enterococcus spp.* wurde eine Übereinstimmung beider Methoden auf dem Niveau von 0,966 bzw. 0,916 (r^2 -Wert) registriert. Kleinere Werte - 0,807 und 0,583 - ergaben sich bei der Detektion der gesamten Bakterien und *Escherichia spp.*

3.1.5 Zusammenfassung zur Optimierung der Real-Time PCR Assays

- Die Real-Time PCR weist im Vergleich zur Kultivierung eine bessere Sensitivität und eine höhere Spezifität auf. Die Anzahl der amplifizierten DNA-Fragmente in den Kalibrier-Proben korreliert in den meisten Assays stark positiv mit der Anzahl der koloniebildenden Einheiten ($r^2 = 0,583-0,966$);
- Individuelle Spezies werden in den Standard-Proben mittels Real-Time PCR präziser quantifiziert als die einzelnen Gruppen. Von den SYBRGreen-Assays gelieferte Werte waren homogener als solche aus TaqMan-Assays.

3.2 Quantifizierung des probiotischen *E. faecium* NCIMB 10415 im Magen-Darm-Trakt der Ferkel

Die Kolonisierung des GIT der Versuchsferkel mit dem probiotischen *E. faecium* NCIMB 10415 wurde anhand des Nachweises seiner spezifischen Plasmidesequenz (Real-Time PCR) im Magen-, distalen *Jejunum*- und *Colon acedendens*-Inhalt untersucht. Die Ergebnisse sind graphisch in Abbildung 2 dargestellt. Bei der Bewertung der Ergebnisse wurden sowohl räumliche Differenzen in der Kolonisierung einzelner Abschnitte des GIT als auch zeitabhängige Unterschiede der Kolonisierung der GIT-Abschnitte berücksichtigt.

Hinsichtlich der zeitlichen Entwicklung konnte festgestellt werden, dass die maximale Kolonisierung des GIT der Ferkel durch *E. faecium* NCIMB 10415 in der Saugperiode (7., 14. Tag) erreicht wurde, und in der Folge eine Abnahme zu verzeichnen war (**Abb. 2A**). So folgte nach der Gabe des Ergänzungsfutters (Prästarter, 28. Tag) eine drastische Abnahme der probiotischen Zellzahl. Nach dem Absetzen bzw. nach dem Übergang zum Starter-Futter (31., 35., 56. Tag), lag die Zellzahl höher als am 28. Tag, im Ganzen aber niedriger als in der Saugperiode.

Betrachtet man die prozentualen Anteile von *E. faecium* NCIMB 10415 an der gesamten eubakteriellen Population (**Abb. 2C**), stellt man fest, dass diese Werte im Magen und *Jejunum* nach dem Absetzen höher ausfielen als in der Saugperiode. Im *Colon* hingegen waren die relativen Anteile des probiotischen Bakteriums in der Saugperiode höher als nach dem Absetzen. Mit Blick auf die prozentualen Anteile von *E. faecium* NCIMB 10415 an der gesamten Enterokokken-Population konnte keine Veränderung über die Zeit festgestellt werden (**Abb. 2B**).

Bezüglich der quantitativen Unterschiede in der Kolonisierung einzelner Lokalisationen – Magen vs. *Jejunum*; Magen vs. *Colon* und *Colon* vs. *Jejunum* – sind folgende Anmerkungen zu machen (vgl. auch die Angaben in **Tab. A10**):

- (i) Während der maximalen Kolonisierung des GIT der Ferkel mit dem Probiotikum (7., 14. Tag) war das *Jejunum* am geringsten besiedelt, gefolgt von Magen und *Colon* ($p=0,04$; $0,06$). Die gleiche Reihenfolge ergibt sich auch für die Unterschiede der prozentualen Anteile von *E. faecium* NCIMB 10415 an der jeweiligen gesamten eubakteriellen Population: Höhere Prozentanteile als in Magen und *Jejunum* wurden im *Colon* gemessen ($p=0,04$; $0,08$), und im Magen lagen sie wiederum höher als im *Jejunum* ($p=0,06$).

Die Unterschiede zwischen den gemessenen absoluten Werte (Log Zellzahl/g Inhalt) lagen im Bereich von einer (Magen-*Jejunum*) bis zu zwei log₁₀-Einheiten (Magen-*Colon*,

Jejunum-Colon). Die Unterschiede der Anteile (im Bereich von 1,26% bis 7,55%) des probiotischen *E. faecium* an der Enterokokken-Population in den untersuchten Teilen des GIT waren für die Saugperiode nicht signifikant. Die Unterschiede der Anteile von *E. faecium* an der gesamten eubakteriellen Population zwischen den einzelnen Lokalisationen erwiesen sich nur im Vergleich von Magen und *Jejunum* als signifikant.

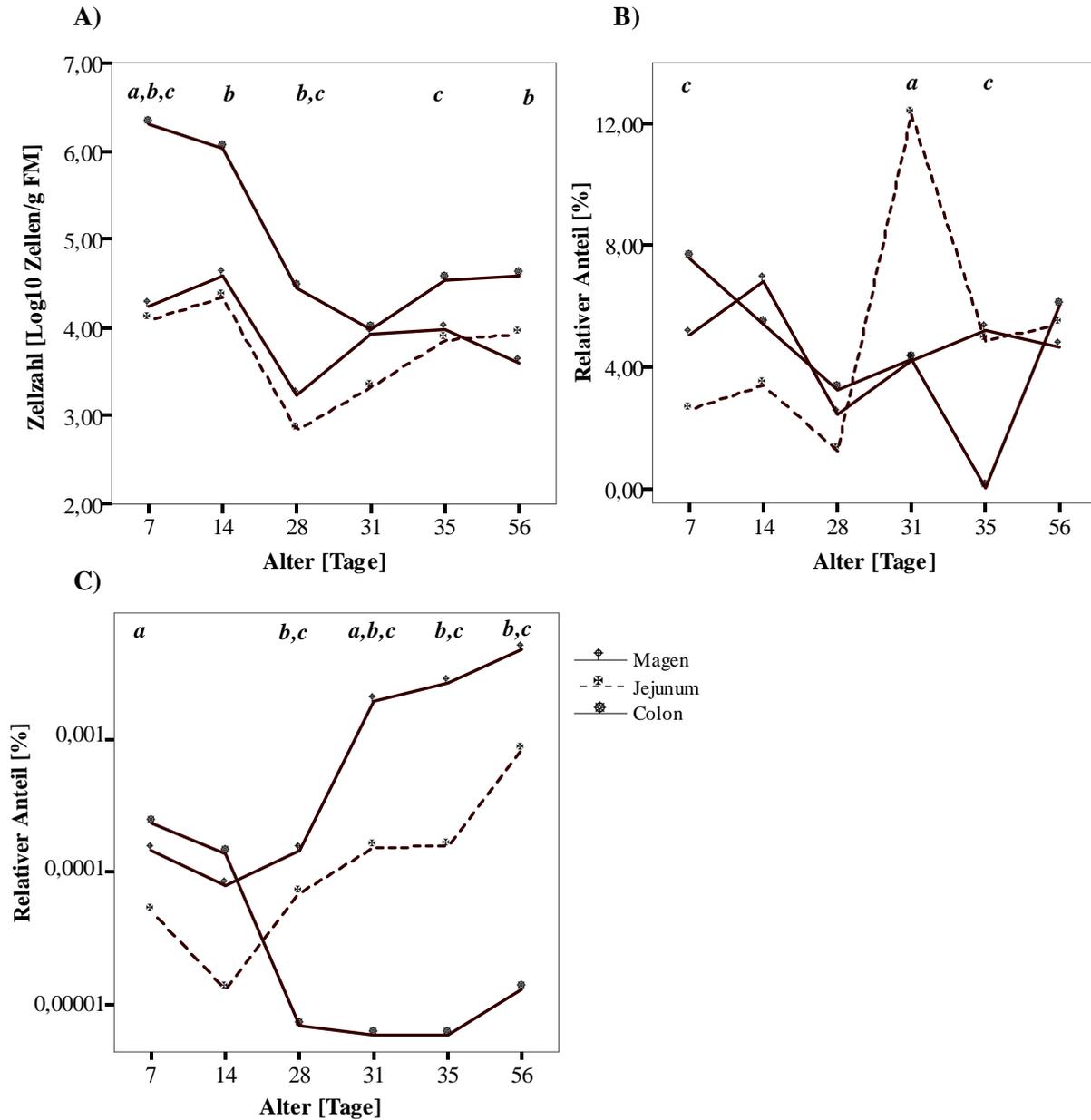


Abb. 2: Quantifizierung des probiotischen *E. faecium* NCIMB 10415 im Magen, distalen *Jejunum* und *Colon ascendens* von Ferkeln der Probiotikum-Gruppe

(Medianwerte; **A** - absolute Zellzahl von *E. faecium* NCIMB 10415 pro g Darminhalt (Feuchtmasse); **B** - prozentualer Anteil an der gesamten Enterokokken-Population; **C** - prozentualer Anteil an der gesamten eubakteriellen 16S rDNA-Population; a,b,c - Signifikanzen ($0,01 \leq p \leq 0,05$) für Paarunterschiede nach Wilcoxon-Test: a - Magen-Jejunum; b - Magen-Colon; c - Jejunum-Colon)

(ii) Nach der Einführung des Prästarter-Futters, dem Übergang zum Starter-Futter und dem Absetzen änderte sich das Ausmaß der Kolonisierung des GIT mit Blick auf die absoluten Zellzahlen nur quantitativ: Magen und *Jejunum* wiesen, wie in der Saugperiode, eine geringere Kolonisierung auf als das Colon ($p=0,04$). Im Vergleich zur Saugperiode wurden absolute Zellzahlen auf niedrigerem Niveau (von 3,60 bis 4,58 Lg Zellzahl/ g Inhalt) sowie kleinere Differenzen (innerhalb einer Zehnerpotenz) beobachtet.

Mit Blick auf die relativen Zellzahlen des probiotischen *E. faecium* NCIMB 10415 wurden allerdings im Vergleich zur Saugperiode Unterschiede beobachtet: Die prozentualen Anteile an der gesamten eubakteriellen Population waren im Magen und *Jejunum* signifikant höher als im *Colon* ($p=0,04$). Hinsichtlich der Anteile des Probiotikums an der Enterokokken-Population konnten kaum signifikante Unterschiede ermittelt werden. Der Anteil an der gesamten eubakteriellen Population dagegen wies zwischen den untersuchten Lokalisationen sowohl am 31. und 35. Tag als auch am 56. Tag signifikante Differenzen auf (**Tab. A10**).

3.3 Einfluss des probiotischen *E. faecium* NCIMB 10415 auf die mikrobielle Besiedlung des Magens der Ferkel

3.3.1 Gesamte eubakterielle Zellzahlen

Quantitativ wurde die mikrobielle Besiedlung des Magens anhand der gesamten extrahierten bakteriellen DNA und der eubakteriellen 16S rDNA bewertet.

Es wurde festgestellt, dass der Gehalt der extrahierten DNA in der Probiotikum-Gruppe während der gesamten Beobachtungsperiode vom 7. bis zum 56. Tag abnahm. Dabei wurde in der Saugperiode bei den Probiotikum-Tieren mehr DNA extrahiert als nach dem Absetzen, in der Kontrollgruppe hingegen wurden keine starken Abweichungen der Werte zu verschiedenen Untersuchungszeitpunkten beobachtet (**Abb. 3A**).

Betrachtet man die fütterungsabhängigen Unterschiede, so stellt man fest, dass am 7., 14. und 31. Tag aus dem Magen-Inhalt der Probiotikum-Tiere jeweils mehr DNA extrahiert wurde als in der Kontrollgruppe. Die Unterschiede zwischen beiden Fütterungsgruppen waren aber statistisch nicht signifikant (**Tab. A11** im Anhang).

Die maximale Besiedlung des Magens durch Eubakterien wurde in beiden Gruppen in der Saugperiode erreicht. In der Folge ergab sich hinsichtlich der eubakteriellen Zellzahlen eine Abnahme. In der Probiotikumgruppe wurde mit der Gabe des Prästarters (14 vs. 28 Tag) ein drastischer Rückgang verzeichnet. In der Kontrollgruppe dagegen wurde dieser Rückgang nach dem Absetzen und dem Übergang zum Starter-Futter (28. vs. 31. Tag) beobachtet (**Abb. 3B**).

Sowohl in der Saugperiode (7., 14. Tag) als auch nach dem Absetzen (31., 35., 56. Tag) lag die Anzahl der eubakteriellen 16S rDNA in den untersuchten DNA-Extrakten in der Probiotikum-Gruppe höher als bei den Kontrolltieren. Statistisch signifikant waren die Unterschiede zwischen beiden Gruppen allerdings nur am 56. Tag ($p=0,04$). Nach der Gabe des Ergänzungsfutters (Prästarter, 28. Tag) hatten die Probiotikum-Tiere signifikant niedrigere Werte als die Kontrollferkel ($p=0,05$) (**Tab. A11** im Anhang).

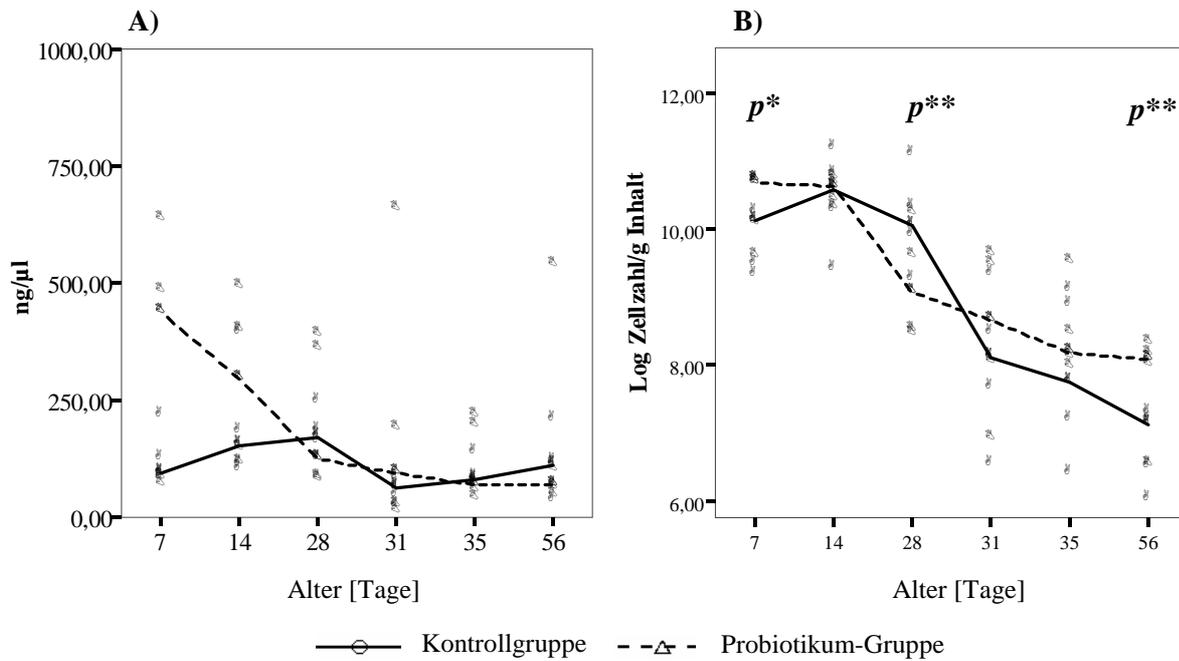


Abb. 3: Gehalt (A) der extrahierten DNA und (B) der eubakteriellen 16S rDNA im Magen der Versuchsferkel

(Mediane und einzelne Werte; p -Signifikanzen nach Mann-Whitney-Test: $p^* \leq 0,1$; $p^{**} \leq 0,05$)

3.3.2 Diversität der gesamten bakteriellen 16S rDNA-Population

Die Diversität der eubakteriellen Population im Magen wurde anhand von durch DGGE erworbenen Daten und unter Berücksichtigung des Speziesreichtums (*Richness*), der Gleichverteilung der einzelnen bakteriellen Zellen innerhalb von Populationen eines Spezies (*Evenness*), der Gleichverteilung individueller Spezies innerhalb der gesamten bakteriellen Population (*Shannon-Index*) sowie der Dominanzverhältnisse der verschiedenen Spezies in der Gesamtpopulation (*Simpson-Index*) bewertet. Einer höheren Diversität und Homogenität der bakteriellen Population entsprachen dabei höhere Werte von *Richness*, *Evenness* und *Shannon-Index* sowie niedrigere beim *Simpson-Index*.

Unter Berücksichtigung aller errechneter ökologischer Indizes war die bakterielle Besiedlung des Magens der Probiotikum-Tiere in der Saugperiode – Messungen am 7. und 14. Tag – und nach dem Absetzen – am 31., 35. und 56. Tag – diverser und homogener als die der Kontrollgruppe. Die ermittelten Unterschiede waren allerdings mit Ausnahme der *Evenness* (am 14. Tag, $p=0,05$), des *Shannon-Index* (am 14. Tag, $p=0,05$) und *Simpson-Index* (am 35. Tag, $p=0,03$) statistisch nicht signifikant (**Abb. 4A, B, C, D**).

Die Ergänzung der Milchdiät um Prästarter (28. Tag) führte zu drastischen Veränderungen in der Zusammensetzung der eubakteriellen Besiedlung in der Probiotikum-Gruppe – danach waren sowohl der Speziesreichtum als auch die entsprechenden Homogenitätsparameter in der Kontrollgruppe größer als in der Probiotikum-Gruppe. Signifikant unterschiedlich waren

dabei die Werte für *Evenness* ($p=0,01$) und den *Simpson-Index* ($p=0,03$) (Abb. 4B, D). Tabellarisch sind alle errechneten Diversitäts-Indizes in Tab. A12 im Anhang zusammengefasst.

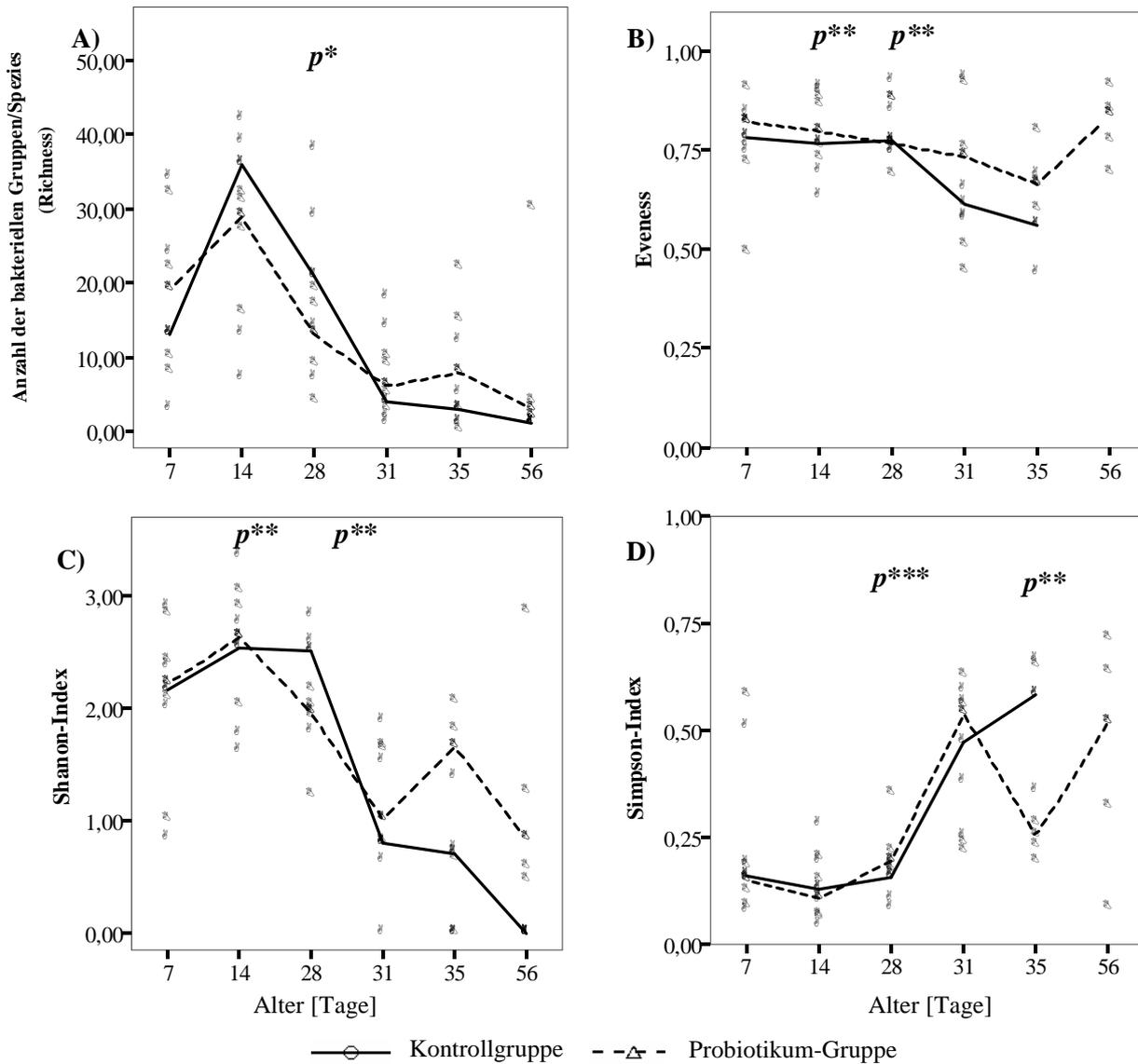


Abb. 4: Diversität der bakteriellen 16S rDNA-Populationen im Magen der Versuchsferkel

(Mediane und einzelne Werte; **A**– Artenreichtum od. *Richness*; **B** – *Evenness*; **C** – *Shannon-Index*; **D** – *Simpson-Index*, *p* – Signifikanzen nach Mann-Whitney-Test: $p^* \leq 0,1$; $p^{**} \leq 0,05$)

3.3.3 Ähnlichkeit der gesamten bakteriellen 16S rDNA-Population

Die Ähnlichkeit der 16S rDNA-Profile wurde anhand der Anzahl der gemeinsamen Spezies (*Sørensen-Quotient*) bewertet. Es wurden Übereinstimmungen der bakteriellen Besiedlung sowohl zwischen den einzelnen Tieren innerhalb einer Fütterungsgruppe (Probiotikum bzw. Kontrolle) als auch zwischen den Tieren aus verschiedenen Fütterungsgruppen (Probiotikum vs. Kontrolle) ermittelt. Es wurde festgestellt, dass die Magen-Mikrobiota der einzelnen Tiere in der Probiotikum-Gruppe am 7., 14., 28. und 31., 35. und 56. Tag signifikant ähnlicher als in der Kontrollgruppe ($p=0,001-0,10$) war (Abb. 5A). Dabei waren die 16S rDNA-Profile im

Magen der einzelnen Probiotikum-Tiere (innerhalb einer Gruppe) in der Saugperiode ähnlicher als nach dem Absetzen. Die Ähnlichkeit der 16S rDNA-Profile zwischen beiden Gruppen war in der Saugperiode geringer und nahm mit dem Alter zu, am unterschiedlichsten waren dabei die beiden Fütterungsgruppen am 28. Tag (**Abb. 5B**). Eine tabellarische Übersicht über die errechneten Sörensen-Werte findet sich in **Tab. A13** im Anhang.

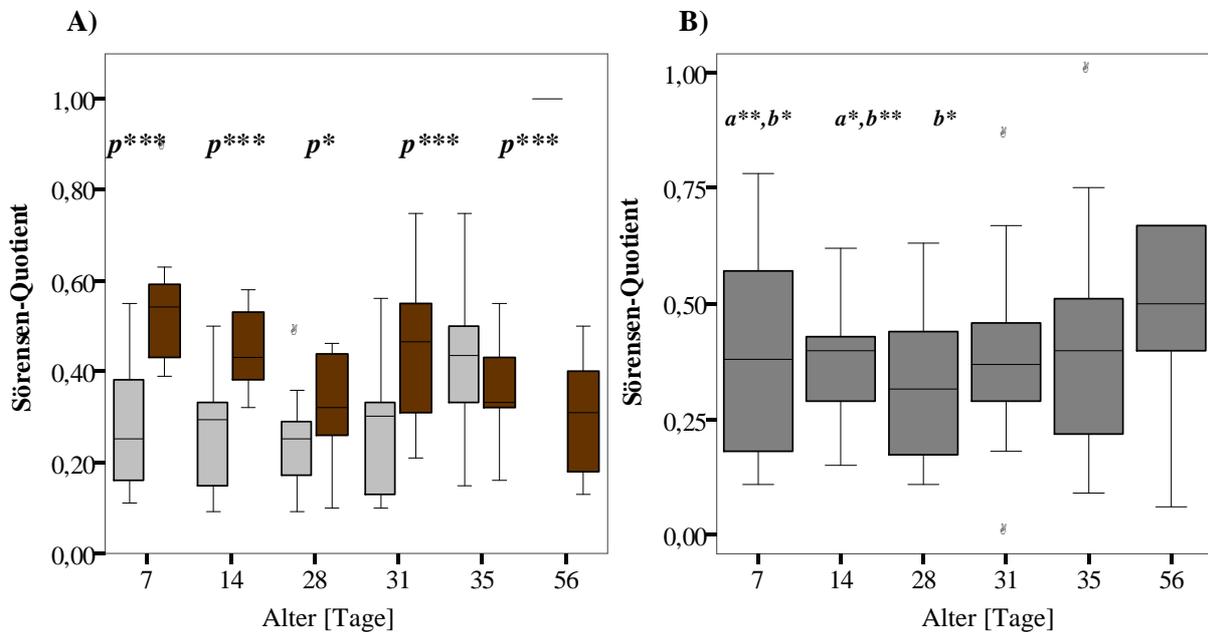


Abb. 5: Sörensen-Ähnlichkeitswerte der bakteriellen 16S rDNA-Populationen im Magen der Versuchsferkel, innerhalb (**A**) und zwischen (**B**) den Fütterungsgruppen

(**A:** dunkle Boxplots – Probiotikum-Gruppe, helle Boxplots – Kontrollgruppe, p-Signifikanzen nach Mann-Whitney-Test: $p^* \leq 0,1$; $p^{***} \leq 0,005$; **B:** a – signifikante Unterschiede gemessen gegenüber der Probiotikum-Gruppe, b - signifikante Unterschiede gemessen gegenüber der Kontrollgruppe, ○ - Ausreißerwerte)

3.3.4 Quantität der dominanten bakteriellen Gruppen

Um den Einfluss des probiotischen *E. faecium* NCIMB 10415 auf die Kolonisierung des Magens durch einzelne bakterielle Populationen zu untersuchen, wurden *Lactobacillus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Bifidobacterium spp.* und *Escherichia spp.* im Magen-Inhalt der Versuchstiere mittels gruppenspezifischer Primer quantifiziert. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 6 und 7 graphisch aufbereitet und im Anhang tabellarisch zusammengefasst (**Tab. A14, A15**)

Die Ergebnisse der Quantifizierung der *Lactobacillus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Bifidobacterium spp.* und *Escherichia spp.* zeigen, unabhängig von der Fütterungsvariante, eine ähnliche zeitliche Entwicklung wie die Ergebnisse der DGGE: Die maximale Kolonisierung wurde in beiden Gruppen in der Saugperiode erreicht, während die weitere Entwicklung der bakteriellen Populationen durch eine Abnahme der Anzahl der Bakterien und einen gleichzeitigen Anstieg ihrer relativen Anteile an der gesamten eubakteriellen Population charakterisiert ist.

Lactobacillus spp.

Die Mägen der Probiotikum-Tiere wurden am 7., 14., 31. und 56. Tag im Vergleich zur Kontrollgruppe stärker mit *Lactobacillus spp.* besiedelt (**Abb. 6-1A**). Gemessen an den prozentualen Anteilen an der gesamten eubakteriellen Population war die *Lactobacillus spp.*-Population der Probiotikum-Gruppe am 14., 31. und 56. ebenfalls größer als die der Kontrollgruppe (**Abb. 6-1B**). Anhand der statistischen Signifikanz sind Unterschiede zwischen den beiden Gruppen als nicht signifikant zu bezeichnen (Ausnahme 28. Tag 9,07 vs. 10,04 Lg Zellzahl/g Feuchtmasse, $p=0,05$).

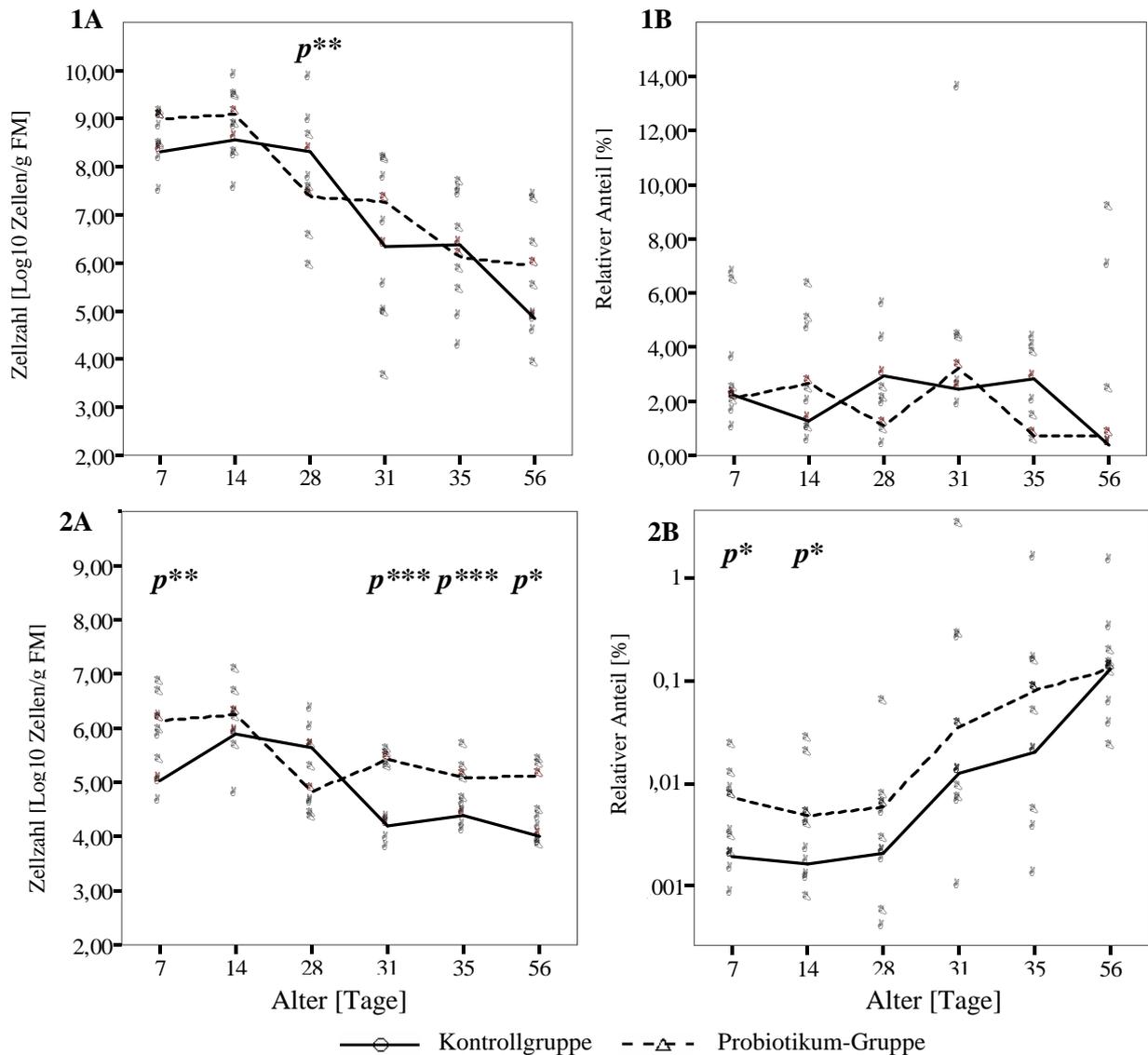


Abb. 6: Populationen von *Lactobacillus spp.* (1) und *Enterococcus spp.* (2) im Magen der Versuchsferkel

(Mediane und einzelne Werte; Reihe **A** – Zellzahl/g Inhalt (Feuchtmasse); Reihe **B** – prozentuale Anteile der bakteriellen Gruppe an der gesamten eubakteriellen Population; p -Signifikanzen nach Mann-Whitney-Test: $p^* \leq 0,1$; $p^{**} \leq 0,05$; $p^{***} \leq 0,005$)

Enterococcus spp.

Die Dynamik der Enterokokken-Population im Magen der Versuchstiere wies während der gesamten Beobachtungsperiode eine Abnahme der absoluten Zellzahl und einen Anstieg ihrer prozentualen Anteile an der gesamten eubakteriellen Population auf. Dabei waren die absoluten Zellzahlen signifikant und die prozentualen Anteile von *Enterococcus spp.* in der Probiotikum-Gruppe an allen Beobachtungstagen außer dem 28. Tag tendenziell höher als jene in der Kontrolle (**Abb. 6-2A, B**).

Escherichia spp.

Quantitativ wurden anhand der absoluten Zellzahlen keine statistisch signifikanten gruppenabhängigen Unterschiede ermittelt, die Werte der Probiotikum-Gruppe waren aber ab dem 14. Tag niedriger als in der Kontrolle (**Abb. 7-1A**). Die prozentualen Anteile von *Escherichia spp.* an der gesamten eubakteriellen Population im Magen der Probiotikum-Tiere waren insgesamt geringer als bei den Kontrollferkeln. Am 31. und 35. Tag waren diese Werte in der Probiotikum-Gruppe allerdings tendenziell höher als in der Kontrolle ($p=0,11$). In der Saugperiode, am 7. Tag, waren sowohl absolute wie relative Werte in der Probiotikum-Gruppe höher als in der Kontrollgruppe (**Abb. 7-1B**).

Bifidobacterium spp.

Die Kolonisierung des Magens durch *Bifidobacterium spp.* wurde nur für die Saugperiode ermittelt. Die Untersuchung der DNA-Extrakte vom 31., 35. und 56. Tag ergab keine Werte und wurden deshalb nicht in die Analyse miteinbezogen. Für die gemessenen Daten konnten allerdings keine statistischen Unterschiede festgestellt werden; die absolute Zellzahl war aber in der Probiotikum-Gruppe am 7. und 14. Tag höher und am 28. Tag niedriger als in der Kontrolle (**Abb. 7-2A**). Der prozentuale Anteil von *Bifidobacterium spp.* an der gesamten 16S rDNA-Population war in der Probiotikum-Gruppe am 14. und 28. Tag höher als in der Kontrollgruppe (**Abb. 7-2B**).

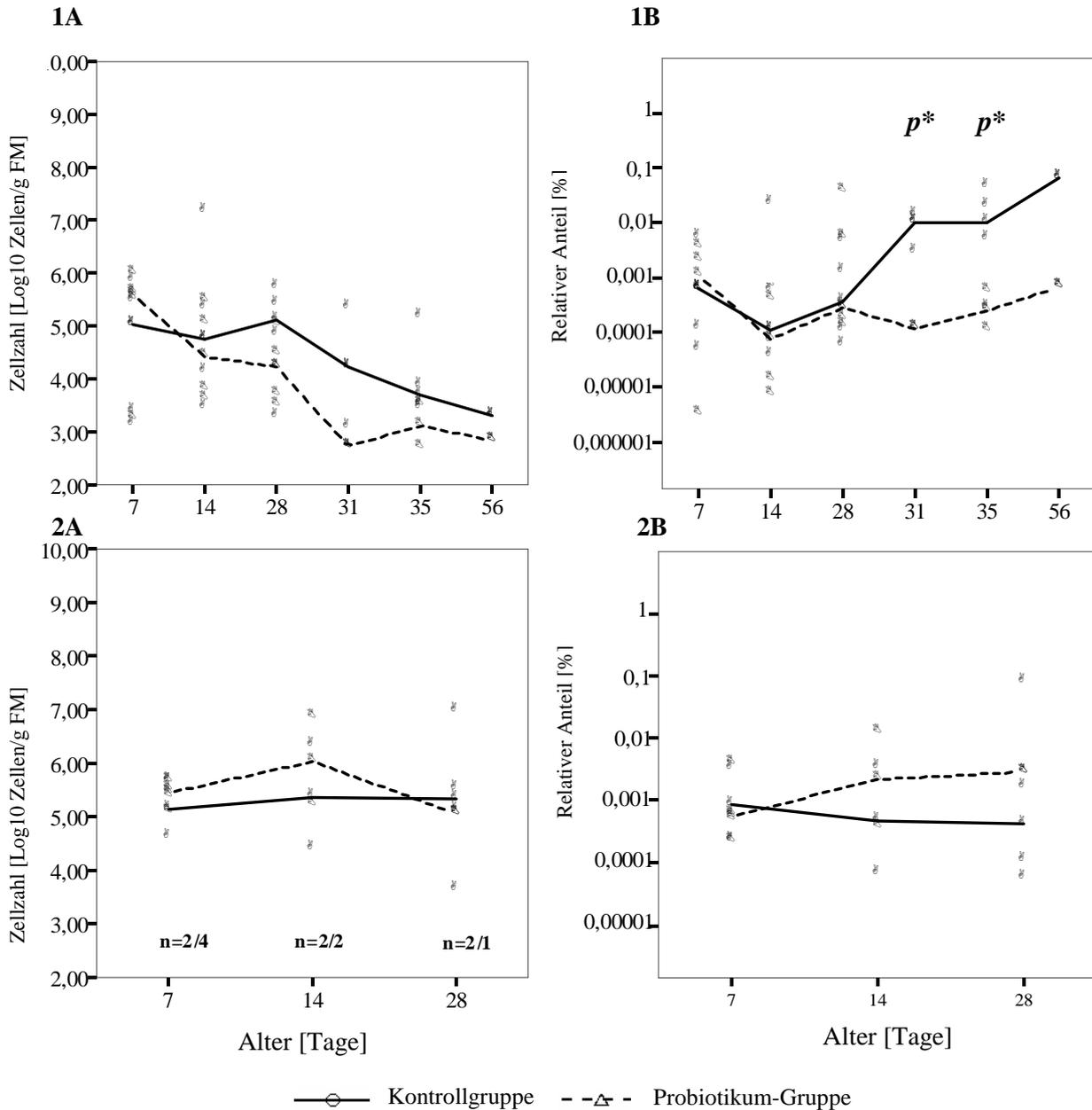


Abb. 7: Populationen von *Escherichia* spp. (1) und *Bifidobacterium* spp. (2) im Magen der Versuchsferkel

(Mediane und einzelne Werte; Reihe **A** – Zellzahl/g Inhalt (Feuchtmasse); Reihe **B** – prozentuale Anteile der bakteriellen Gruppe an der gesamten eubakteriellen Population; *p*-Signifikanzen nach Mann-Whitney-Test: $p^* \leq 0,1$; $p^{**} \leq 0,05$; $p^{***} \leq 0,005$)

3.3.5 Quantität der einzelnen Stämme

Um den möglichen Einfluss des probiotischen *E. faecium* NCIMB 10414 auf einzelne Stämme zu untersuchen, wurden sowohl die phylogenetisch nahverwandten *E. faecium* und *E. faecalis* als auch im Ferkel dominante Laktobazillen-Stämme quantifiziert. Hinsichtlich der zeitlichen Entwicklung der Populationen einzelner Spezies entsprachen die ermittelten Daten den Ergebnissen der DGGE und der Quantifizierung der bakteriellen Gruppen: Die maximale Kolonisierung des Magens mit einzelnen Stämmen wurde in der Saugperiode registriert (7., 14.

Tag, alle getesteten Stämme) und nahm im Weiteren (31., 35. und 56. Tag) tendenziell ab; die prozentualen Anteile (bzw. die Aktivität) stiegen mit zunehmendem Alter für *L. johnsonii*, *L. mucosae* und *L. reuteri* an.

L. acidophilus

Der Nachweis der spezifischen 16S rDNA-Sequenz von *L. acidophilus* ergab keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen. Insgesamt waren nur wenige Proben (in der Probiotikum- wie in der Kontrollgruppe) *L. acidophilus*-positiv. Rein numerisch waren die Zellzahl von *L. acidophilus* sowie der relative Anteil an der gesamten Laktobazillen-Population in der Probiotikum-Gruppe am 7., 14. und 56. Tag höher als in der Kontrolle (**Tab. A16** im Anhang).

L. amylovorus/L.sobrius

Die Quantifizierung von *L. amylovorus* zeigte, dass am 7. und 56. Tag die *L. amylovorus*-Population im Magen der Probiotikum-Tiere größer war als in der Kontrollgruppe. Am 28., 31. und 35. Tag dagegen waren die entsprechenden Werte in der Probiotikum-Gruppe niedriger als in der Kontrolle. Die Unterschiede zwischen den Werten sind aber nur als numerisch oder tendenziell zu bezeichnen (**Abb. 8-1A**). Bezüglich der relativen Werte von *L. amylovorus* (prozentuale Anteile an der gesamten Laktobazillen-Population) waren ebenso keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen beiden Fütterungsgruppen zu konstatieren. Rein numerisch waren dabei diese Werte im Magen der Probiotikum-Ferkel kleiner als bei den Kontrolltieren. Die Messwerte lagen im Bereich von 0,48% bis 16,05% (**Abb. 8-1B** und **Tab. A16** im Anhang).

L. johnsonii

Die Besiedlung des Magens mit *L. johnsonii* war in der Saugperiode (7., 14. Tag) wie auch nach dem Absetzen (31., 35., 56. Tag) in der Probiotikum-Gruppe höher als in der Kontrolle. Statistisch signifikante Abweichungen konnten für den 14. und 56. Tag festgestellt werden ($p=0,05$; $p=0,02$) (**Abb. 8-2A**). Dabei waren auch die prozentualen Anteile von *L. johnsonii* an der gesamten Laktobazillen-Population bei den Probiotikum-Ferkeln signifikant höher als bei den Kontrolltieren (14. Tag $p=0,05$, 28. Tag $p=0,03$) (**Abb. 8-2B**). Tabellarisch sind die *L. johnsonii*-Werte in **Tabelle A16** im Anhang dargestellt.

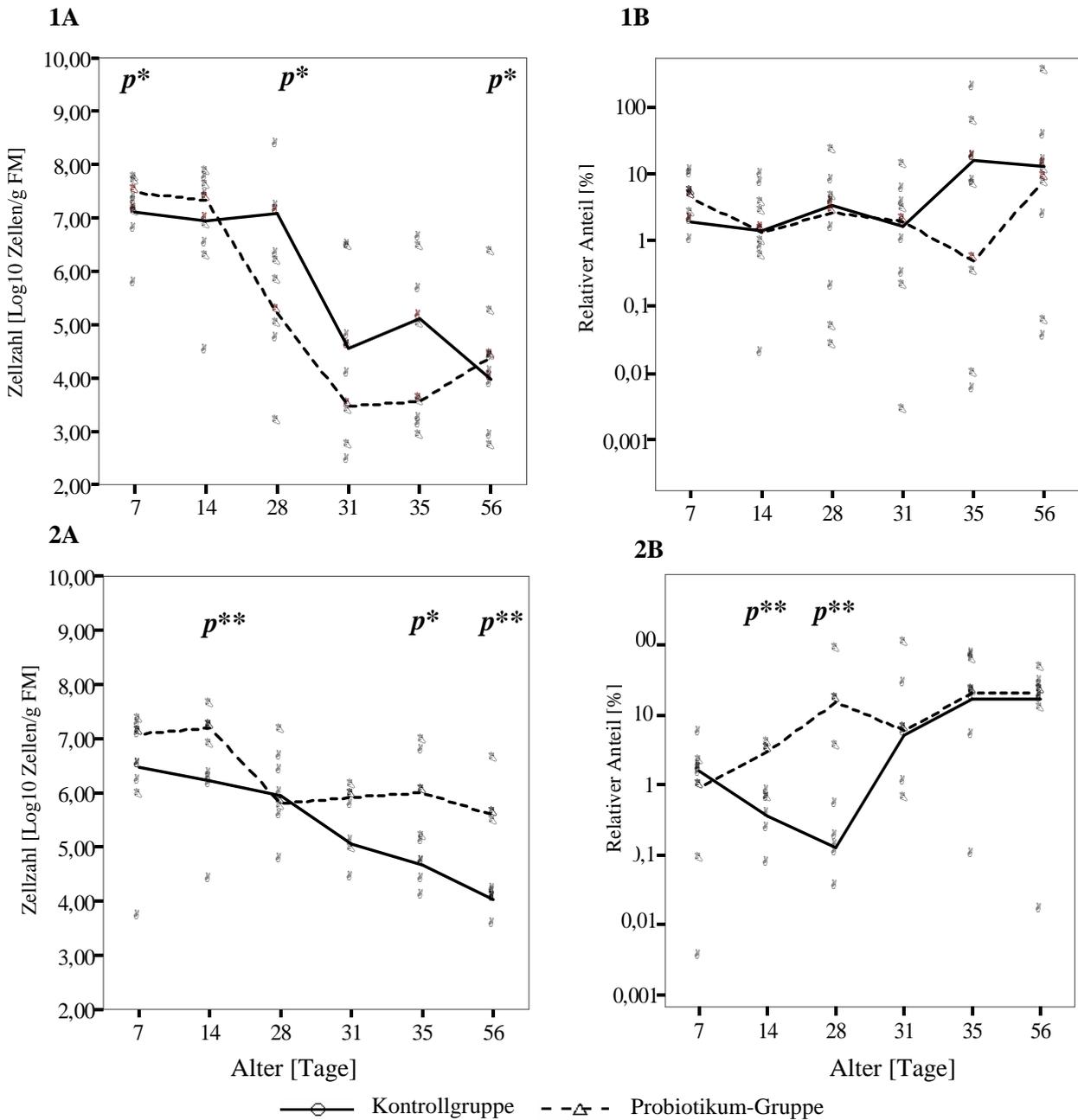


Abb. 8: Populationen von *L. amylovorus* (1) und *L. johnsonii* (2) im Magen der Versuchsferkel (Mediane und einzelne Werte; Reihe A – Zellzahl/g Inhalt (FM); Reihe B – prozentuale Anteile der bakteriellen Gruppe an der gesamten Laktobazillen-Population; *p*-Signifikanzen nach Mann-Whitney-Test: $p^* \leq 0,1$; $p^{**} \leq 0,05$;))

L. mucosae

Der Nachweis von *L. mucosae* zeigte, dass die Mägen der Kontrolltiere insgesamt mehr als jene der Probiotikum-Ferkel von dieser Spezies kolonisiert wurden. Wie im Fall von *L. acidophilus* waren aber in beiden Gruppen nur wenige Proben *L. mucosae*-positiv. Die Unterschiede zwischen beiden Gruppen waren – mit Ausnahme des 28. Tag (Probiotikum/Kontrolle: 5,99 vs. 6,97 Lg Zellzahl/g Feuchtmasse; $p=0,10$) – nicht signifikant (Abb. 9-1A und Tab. A17 Anhang). Rein numerisch waren die relativen Anteile von *L. mucosae* an

der gesamten Laktobazillen-Population in der Probiotikum-Gruppe am 28. und 31. Tag höher als in der Kontrolle (Abb. 9-1B).

L. reuteri

Die Population von *L. reuteri* im Magen der Probiotikum-Ferkel lag am 14., 31. und am 56. Tag höher als in der Kontrolle. Als signifikant erwiesen sich die Unterschiede allerdings nur am 56. Tag ($p=0,05$) (Abb. 9-2A und Tab. A17 im Anhang). Die prozentualen Anteile von *L. reuteri* an der gesamten Laktobazillen-Population in der Probiotikum-Gruppe lagen analog zu *L. mucosae* am 28. und 31. Tag rein numerisch höher und am 7., 14. und 35. Tag niedriger als in der Kontrollgruppe (Abb. 9-2B).

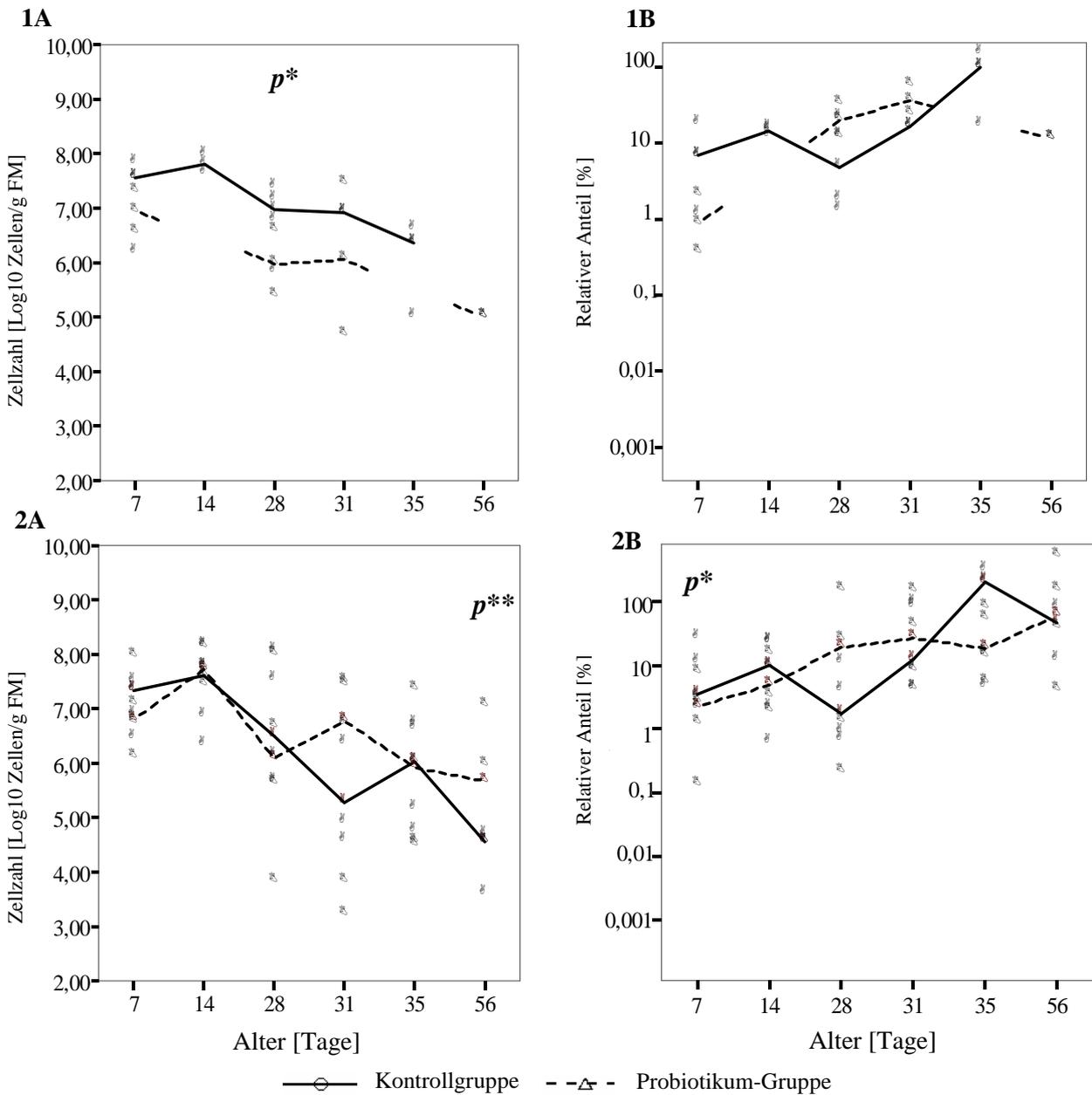


Abb. 9: Populationen von *L. mucosae* (1) und *L. reuteri* (2) im Magen der Versuchsferkel

(Mediane und einzelne Werte; Reihe A – Zellzahl/g Inhalt (Feuchtmasse); Reihe B – prozentuale Anteile der Spezies an der gesamten Laktobazillen-Population; p -Signifikanzen nach Mann-Whitney-Test: $p^* \leq 0,1$; $p^{**} \leq 0,05$)

E. faecium

Die Population von *E. faecium* im Magen der Probiotikum-Ferkel war insgesamt zahlreicher als die der Kontrolltiere. Dabei waren Proben der Probiotikum-Gruppe häufiger *E. faecium*-positiv als solche der Kontrolle. Signifikant unterschiedlich waren die absoluten Werte beider Gruppen allerdings nur für den 7. Tag. Die prozentualen Anteile von *E. faecium* an der gesamten Enterokokken-Population in der Probiotikum-Gruppe lagen nur am 7. und 31. über jenen in der Kontrolle. Am 14., 35. und 56. Tag waren die entsprechenden Werte in der Kontrolle höher. Diese relativen Zahlen von *E. faecium* waren in beiden Gruppen nicht signifikant unterschiedlich (Tab. 21).

Tab. 21: Zelldichte der *E. faecium*- und *E. faecalis*-Population im Magen der Versuchsferkel

Alter	Zellzahl [Log10 Zellen/g Feuchtmasse]				Anteil an der gesamten Enterokokken-Population [%]			
	Kontrolle (N=5)	Probiotikum ^a (N=5) ^b	N ^c	P ^d	Kontrolle (N=5)	Probiotikum (N=5)	n	P
<i>E. faecium</i>								
7	3,4^e (3,15-3,64)	4,53 (3,74-6,47)	3/5	0,02	0,39 (0,10-10,99)	4,02 (0,24-46,66)	3/5	0,45
14	4,39 (3,62-5,16)	5,16 (4,13-5,75)	2/5	0,32	18,63	14,24 (0,89-35,86)	2/5	0,7
28	3,19	3,77 (3,77-3,77)	1/2	0,15	0,36	4,91 (1,33-8,48)	1/2	0,22
31	2,71	3,74 (3,67-3,81)	1/2	0,22	2,82	3,18 (2,42-3,94)	1/2	1
35	3,17	3,46 (2,97-3,82)	1/3	0,65	6,01	2,77 (2,21-5,49)	1/3	0,18
56	3,48	3,96 (3,75-4,07)	1/3	0,18	14,86	4,60 (4,42-5,06)	1/3	0,18
<i>E. faecalis</i>								
7	3,13 (2,98-3,33)	3,86 (3,04-3,9)	4/3	0,28	0,78 (0,07-4,03)	0,11 (0,07-0,20)	4/3	0,28
14	2,78 (2,69-4,99)	2,71 (2,56-2,86)	3/2	0,56	7,23 (1,08-13,38)	0,02 (0,003-0,053)	3/2	0,12
28	3,42 (3,07-3,77)	3,12	2/1	-	0,28 (0,00-0,30)	0,77	2/1	0,22
31	2,45 (2,34-2,73)	3,34 (2,89-3,79)	5/2	0,05	1,47 (1,38-9,66)	1,31 (0,48-2,15)	5/2	0,43
35	2,85 (2,04-3,3)	2,97 (2,46-3,54)	4/4	0,77	3,91 (0,72-7,47)	1,09 (0,24-1,42)	4/4	0,14
56	2,89 (2,39-3,41)	3,09 (3,0-3,1)	3/3	0,51	7,78 (3,50-12,51)	0,63 (0,42-0,96)	3/3	0,05

a - Fütterungsgruppe; b - Anzahl der untersuchten Proben; c - Anzahl der positiven Ergebnisse von jeweils fünf untersuchten Proben (Kontrollgruppe/Probiotikum-Gruppe); d - Signifikanz nach Mann-Whitney-Test; e - Median (minimaler Wert-maximaler Wert)

E. faecalis

Die Kolonisierung des Magens mit *E. faecalis* wurde analog zur *E. faecium*-Population anhand von nur wenigen *E. faecalis*-positiven Proben bewertet. Dabei war am 7., 31., 35. und 56. Tag die *E. faecalis*-Population in der Probiotikum-Gruppe zahlreicher als in der Kontrolle.

Signifikant waren die Unterschiede zwischen beiden Gruppen lediglich am 31. Tag ($p=0,05$). Gemessen an den prozentualen Anteilen von *E. faecalis* an der gesamten Enterokokken-Population war aber die *E. faecalis*-Population der Kontrollgruppe größer als die der Probiotikumgruppe, mit einem signifikanten Unterschied am 56. Tag: 0,63% vs. 7,78%, $p=0,05$ (**Tab. 22**).

3.3.6 Laktat

Als Maß der metabolischen Aktivität der Milchsäurebakterien in der bakteriellen Populationen des Magens wurden die Konzentrationen von D(-)- und L(+)-Isomeren der Milchsäure sowie ihre Summe verwendet.

Die Analyse der Dynamik des Laktats zeigte, dass im Magen der Versuchstiere in beiden Gruppen mit dem zunehmenden Alter immer weniger Milchsäure entstand (**Abb. 10A, Tab. A18 im Anhang**). Im Vergleich bildete sich am 7. und 14. Tag numerisch und am 56. Tag tendenziell ($p=0,10$) mehr Laktat im Magen der Probiotikum-Tiere als bei den Kontrollferkeln. Am 28., 31. und 35. Tag lagen dagegen die entsprechenden Werte in der Kontrollgruppe (insignifikant) höher.

Dieser Tendenz entsprach auch die Dynamik der Konzentration von D(-)- und L(+)-Isomeren der Milchsäure. Quantitativ war der Gehalt sowohl von D(-)- als auch von L (+)-Isomeren in der Probiotikum-Gruppe am 7. und 14. Tag numerisch und am 56. Tag signifikant höher als bei den Kontrollferkeln. Am 28., 31. und 35. Tag lagen die entsprechenden Werte in der Kontrolle höher (**Tab. A19**).

Im Hinblick auf die prozentualen Anteile der beiden Isomere am gesamten Milchsäuregehalt wurde festgestellt, dass mit dem zunehmenden Alter immer weniger D(-)- und immer mehr L(+)-Isomere entstanden. Dabei wurden in der Probiotikum-Gruppe am 7., 14. und 56. ($p=0,01$) Tag im Vergleich zu der Kontrolle höhere Gehalte von D (-) Isomeren, am 28. ($p=0,07$), 31. und 35. dagegen höhere Gehalte von L(+)-Isomeren registriert (**Tab. A19**). Ein graphischer Überblick über die Dynamik der L(+) und D(-)Isomere des Laktats ist in Form des Verhältnisses von L-Laktat zu D-Laktat in Abbildung **10B** dargestellt.

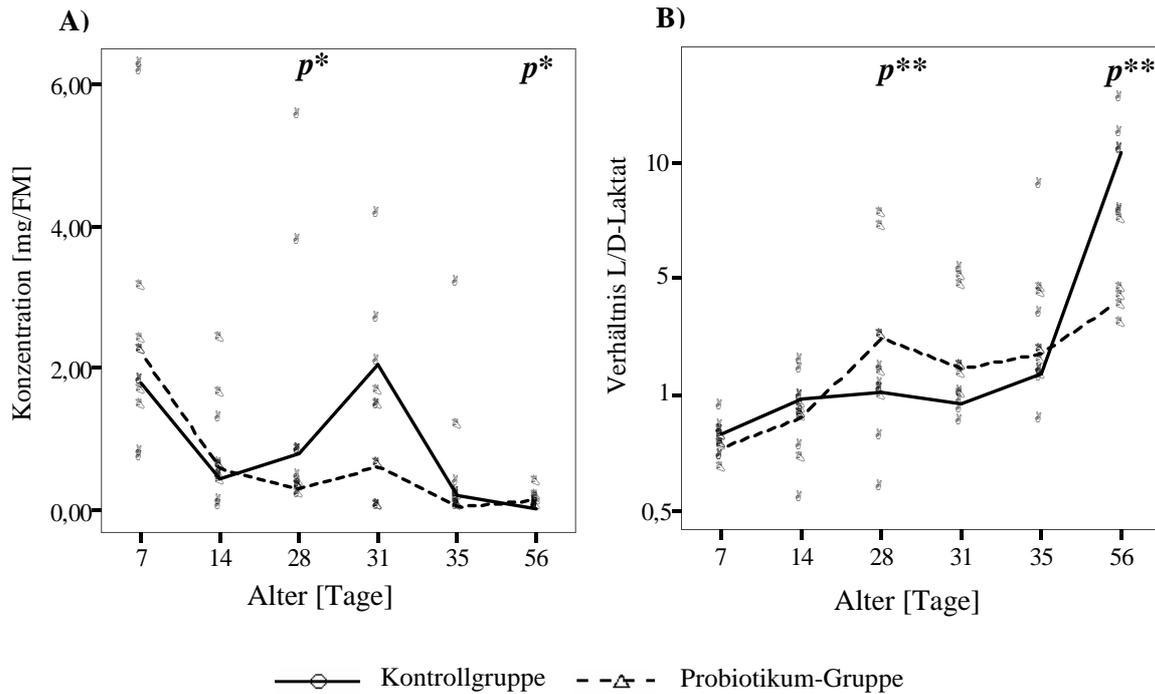


Abb. 10: Laktat im Magen der Versuchsferkel

(Mediane und einzelne Werte; **A** – Gesamt-Laktat; **B** - Verhältnis L/D-Laktat; *p*-Signifikanzen nach Mann-Whitney-Test: $p^* \leq 0,1$, $p^{**} \leq 0,05$)

3.3.7 Zusammenfassung Magen

Hinsichtlich der Dynamik aus der DGGE- und Real-Time PCR-Analyse der Magen-Mikrobiota wurden weitgehend identische Tendenzen festgestellt: Die Magen-Mikrobiota war in beiden Fütterungsgruppen in der Saugperiode (7., 14. Tag) diverser, homogener und metabolisch aktiver (Laktat) als nach dem Absetzen (31., 35., 56. Tag). Nach dem Absetzen änderte sich die Größe der bakteriellen Population nicht, es stiegen aber die prozentualen Anteile von einzelnen untersuchten Gruppen und Spezies.

Die mittels DGGE gemessene Diversität der Magen-Mikrobiota wies nur teilweise statistisch signifikante Ergebnisse auf. Anhand der Ähnlichkeitsindizes allerdings wurden stark signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen festgestellt: Bakterielle Gemeinschaften der Probiotikum-Gruppe waren homogener bzw. zwischen einander ähnlicher als solche der Kontrollgruppe.

Während der Saugperiode (7., 14. Tag) wies das probiotische *E. faecium* NCIMB 10415 eine fördernde Wirkung auf die bakteriellen Populationen von *Lactobacillus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Bifidobacterium spp.*, das nahverwandte *E. faecium* sowie die homofermentativen *L. acidophilus*, *L. amylovorus* und *L. johnsonii* auf. Auf *Escherichia spp.*, *L. mucosae* und *L. reuteri* wies der untersuchte probiotische Stamm in dieser Phase eine hemmende Wirkung auf, statistisch signifikant waren die Unterschiede allerdings nur für *L. reuteri*. Die Magen-

Mikrobiota der Probiotikum-Tiere produzierte auch mehr Laktat, darunter mehr D(-)- als L(+)-Isomere.

Der Übergang zum Festfutter bzw. die Verfütterung des Probiotikums in der Form der Beimischung zum Prästarter-Futter führte in der Probiotikum-Gruppe zur Verringerung der Zellzahl sowohl auf der Gruppen- als auch auf der Spezies-Ebene. Die prozentualen Anteile der untersuchten bakteriellen Gruppen und Spezies blieben aber in der Probiotikumgruppe höher als in der Kontrolle: Es wurden hohe prozentuale Anteile von *Enterococcus spp.*, von heterofermentativen *L. reuteri* und *L. mucosae* und von homofermentativen *L. johnsonii* und *L. acidophilus* registriert. Die Laktat-Konzentration verringerte sich, dabei gab es in der Probiotikum-Gruppe mehr L(+)-Isomere.

Das Absetzen und der Übergang zum Starterfutter bzw. zur Verfütterung des Probiotikums in Form der Beimischung zum Starter-Futter beeinflussten die bakteriellen Gemeinschaften des Magens, was sich insbesondere in größeren Populationen von *Lactobacillus spp.*, *Enterococcus spp.*, *L. johnsonii* und *L. reuteri* äußerte. Die relativen Anteile der untersuchten bakteriellen Gruppen und Spezies waren in der Probiotikum-Gruppe – wenngleich nicht statistisch signifikant – höher als in der Kontrolle. Die metabolische Aktivität der Magen-Mikrobiota, gemessen anhand der Laktat-Konzentration, war in der Kontroll-Gruppe rein numerisch höher als bei den Probiotikum-Tieren, die aber ihrerseits höhere Konzentrationen von L-Laktat aufwiesen.

Im Alter von 56. Tagen war bei den Tieren der Probiotikum-Gruppe eine förderliche Wirkung von *E. faecium* NCIMB 10415 in Gestalt einer Zunahme der Populationen von *Lactobacillus spp.*, *Enterococcus spp.*, *L. johnsonii*, *L. reuteri* und *L. mucosae* zu beobachten. Auch die prozentualen Anteile dieser Gruppen und Spezies waren in der Probiotikum-Gruppe höher als in der Kontrolle. Ebenso wie an anderen Untersuchungszeitpunkten wurde hinsichtlich der *Escherichia spp.* eine hemmende Wirkung des untersuchten probiotischen Stamm festgestellt, die Werte waren jedoch statistisch insignifikant.

3.4 Einfluss des probiotischen *E. faecium* NCIMB 10415 auf die mikrobielle Besiedlung des distalen *Jejunums* der Ferkel

3.4.1 Gesamte eubakterielle Zellzahlen

Die mikrobielle Besiedlung des *Jejunums* wurde analog zum Magen anhand (i) der gesamten extrahierten DNA und (ii) der eubakteriellen 16S rDNA bewertet.

(i) Insgesamt entsprach die Dynamik der DNA-Konzentration im *Jejunum* der im Magen: In der Saugperiode wurde bei den Probiotikum-Tieren mehr DNA extrahiert als nach dem Absetzen. Es wurde während der gesamten Beobachtungsperiode aus den Proben der Probiotikum-Gruppe mehr DNA extrahiert als aus den Proben der Kontrollgruppe.

Für den 14. und 28. Tag sind die Unterschiede zwischen beiden Gruppen signifikant – $p=0,03$ und $p=0,04$ (**Abb. 11A**). Dabei entwickelte sich die DNA-Konzentration in der Probiotikum-Gruppe dynamischer als in der Kontrolle: So wurde in der Saugperiode bei der Probiotikum-Tieren mehr DNA extrahiert (368,4-781,9 ng/ μ l) als nach dem Absetzen (136,6-422,1 ng/ μ l). In der Kontrollgruppe hingegen wurden während der gesamten Beobachtungsperiode in etwa die gleichen Mengen DNA gewonnen – 122,1-173,1 ng/ μ l (vgl. **Tab. A20** im Anhang).

(ii) Bei der Analyse der zeitlichen Entwicklung der 16S rDNA-Population für beide Gruppen galt, dass in der Saugperiode (7., 14., 28. Tag) die Populationen zahlreicher waren als nach dem Absetzen. Dabei wurde in der PG bereits vor dem Absetzen, nach Beginn der Gabe des Prästarters (28. Tag) eine deutliche Abnahme beobachtet, in der Kontrollgruppe hingegen erst nach dem Absetzen (31. Tag) (**Abb. 11B**). Die Anzahl der eubakteriellen 16S rDNA in beiden Gruppen ist nicht signifikant unterschiedlich. Rein zahlenmäßig war in der Probiotikum-Gruppe am 14. und 56. Tag die bakterielle 16S rDNA-Population größer als in der Kontrollgruppe.

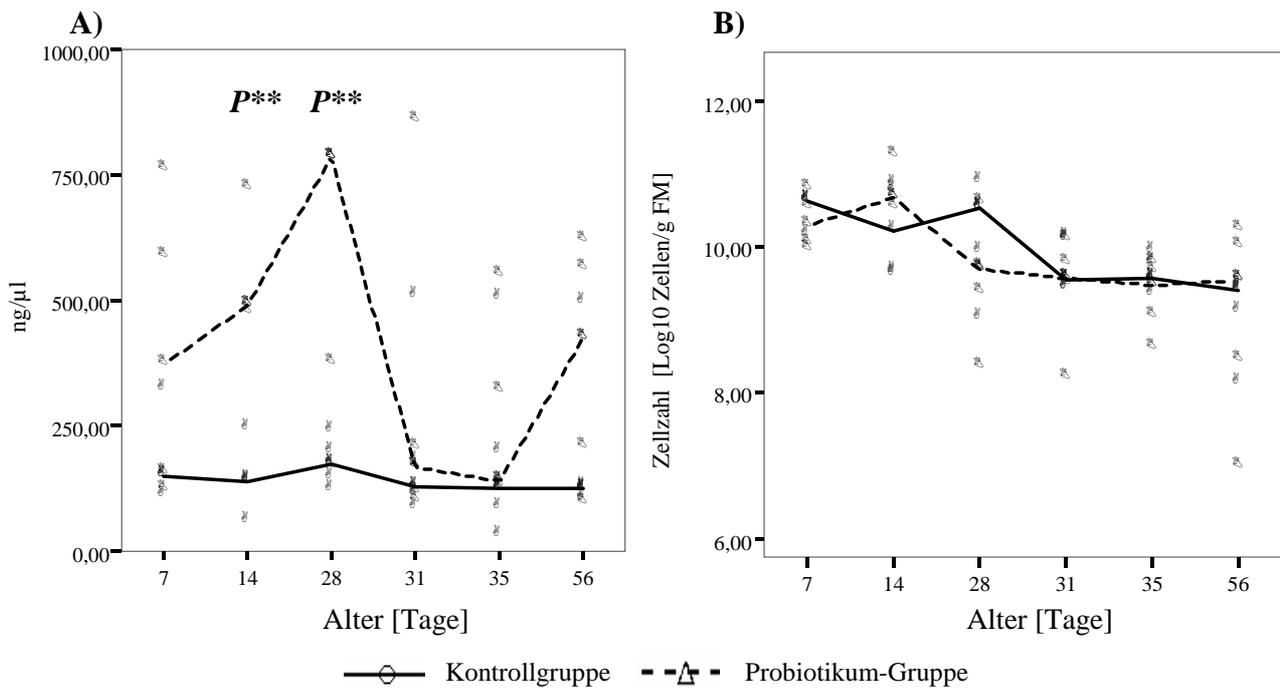


Abb. 11: Gehalt (A) der extrahierten DNA und (B) der eubakteriellen 16S rDNA im distalen *Jejunum* der Versuchsferkel

(Mediane und einzelne Werte; *p*-Signifikanzen nach Mann-Whitney-Test: $p^{**} \leq 0,05$)

3.4.2 Diversität der eubakteriellen 16S rDNA-Population im distalen *Jejunum* der Ferkel

Wiederum analog zum Magen wurde die Diversität der bakteriellen 16S rDNA-Population im *Jejunum* unter Berücksichtigung des Speziesreichtum (*Richness*), der Gleichverteilung der einzelnen bakteriellen Zellen innerhalb der Population einer Spezies (*Evenness*), der Gleichverteilung individueller Spezies innerhalb der gesamten bakteriellen Population (*Shannon-Index*) und der Dominanzverhältnisse dieser einzelnen Spezies mit Blick auf die Gesamtpopulation (*Simpson-Index*) bewertet. Einer höheren Diversität und Homogenität der bakteriellen Population entsprachen dabei höhere Werte von *Richness*, *Evenness* und *Shannon-Index* sowie niedrigere beim *Simpson-Index*.

Es stellte sich heraus, dass die *Jejunum*-Mikrobiota der Probiotikum-Tiere nur am 14. und 56. Tag diverser und homogener als jene der Kontrollgruppe war. Am 7. Tag waren Diversität und Homogenität der bakteriellen 16S rDNA-Population in der Probiotikum-Gruppe niedriger als in der Kontrolle. Die Ergänzung der Milchdiät um Prästarter (28. Tag) sowie das Absetzen und der Übergang zum Starter-Futter (31., 35. Tag) führten, wie im Magen, zur Veränderung der Zusammensetzung der *Jejunum*-Mikrobiota in beiden Fütterungsgruppen: Der Speziesreichtum in der Probiotikum-Gruppe lag höher als in der Kontrolle (**Abb. 12A**), aber die Homogenität der Populationen einzelner Spezies (*Evenness* 31. Tag, $p=0,04$), sowie die Dominanz (*Simpson-Index*, $p=0,04$) und Gleichverteilung innerhalb der Gesamtpopulation

(Shannon-Index) waren kleiner als bei den Kontrolltieren (Abb. 12B, C, D). Alle errechneten Diversitätsindizes sind in Tab. A21 im Anhang aufgeführt.

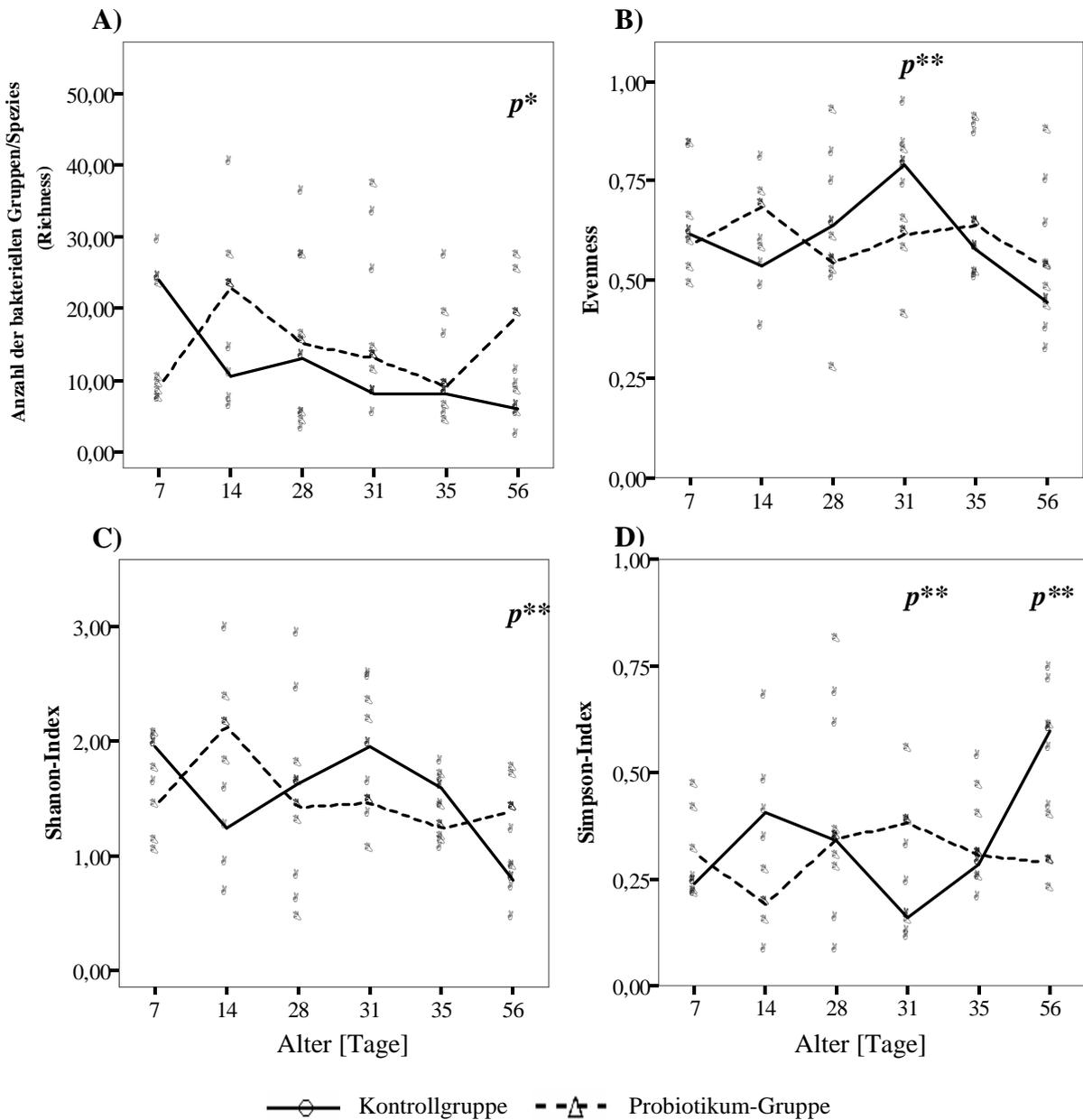


Abb. 12: Diversität der bakteriellen 16S rDNA-Populationen im distalen *Jejunum* der Versuchsferkel

(Mediane und einzelne Werte; **A** - Artenreichtum od. *Richness*; **B** - *Evenness*; **C** - *Shannon-Index*; **D** - *Simpson-Index*, *p* - Signifikanzen nach Mann-Whitney-Test: $p^* \leq 0,1$; $p^{**} \leq 0,05$)

3.4.3 Ähnlichkeit der gesamten bakteriellen 16S rDNA-Population im distalen *Jejunum* der Ferkel

Die Ähnlichkeit der 16S rDNA-Profile wurde wiederum anhand der Anzahl gemeinsamer Spezies (*Sørensen-Quotient*) bewertet. Es wurden Übereinstimmungen der Mikrobiota zwischen den einzelnen Tieren innerhalb einer Fütterungsgruppe (Probiotikum- oder Kontrollgruppe) sowie zwischen einzelnen Tieren der verschiedenen Fütterungsgruppen (Probiotikum- vs. Kontrollgruppe) ermittelt.

Insgesamt waren sich die bakterielle Gemeinschaften im distalen *Jejunum* der einzelnen Tiere in der Probiotikum-Gruppe am 7., 14., 28. und 31. Tag signifikant ähnlicher als jene der Kontrolle ($p=0,005-0,05$). Für den 35. Tag lag der *Sørensen-Quotient* in der Probiotikum-Gruppe niedriger als in der Kontrolle (**Abb. 13A**). Die 16S rDNA-Profile der einzelnen Tiere (innerhalb einer Gruppe) waren in der Probiotikum-Gruppe in der Saugperiode ähnlicher, in der Kontrollgruppe dagegen nach dem Absetzen (35., 56. Tag). Am unterschiedlichsten stellten sich die *Jejunum*-Mikrobiota beider Gruppen nach dem Absetzen am 35. Tag dar (**Abb. 13B**). In tabellarischer Form sind die errechneten *Sørensen*-Werte in **Tab. A22** im Anhang zusammengefasst.

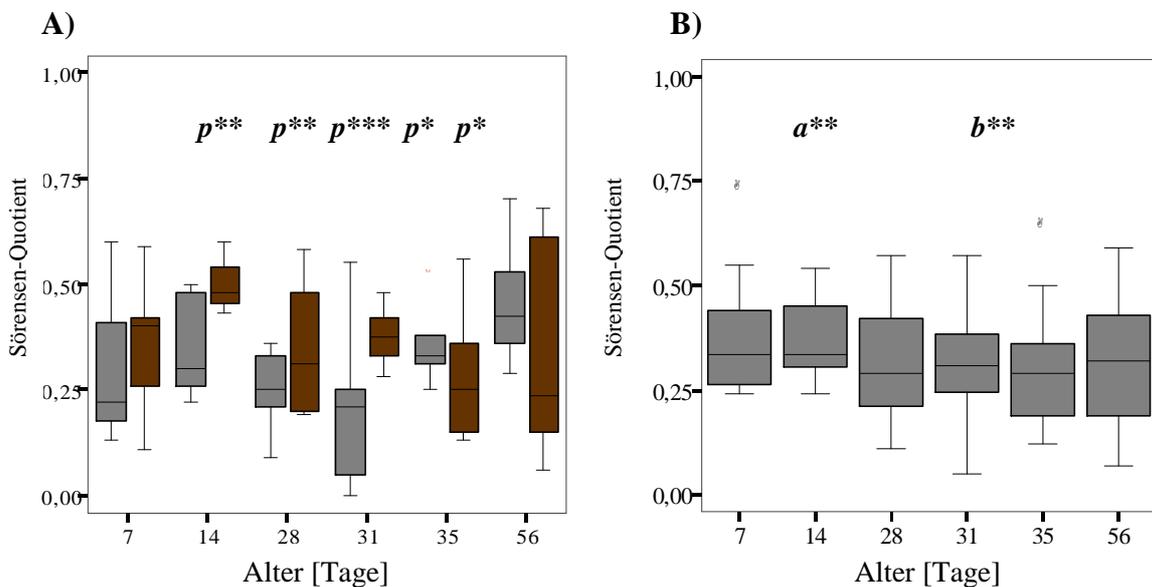


Abb. 13: Sørensen-Ähnlichkeitswerte der bakteriellen 16S rDNA-Populationen im distalen *Jejunum* der Versuchsferkel **(A)** innerhalb und **(B)** zwischen den Fütterungsgruppen

(A): dunkle Boxplots – Probiotikum-Gruppe, helle Boxplots – Kontrollgruppe, p -Signifikanzen nach Mann-Whitney-Test: $p^* \leq 0,1$; $p^{**} \leq 0,05$; $p^{***} \leq 0,005$; **B):** a – signifikante Unterschiede gemessen gegenüber der Probiotikum-Gruppe, b – signifikante Unterschiede gemessen gegenüber der Kontrollgruppe)

3.4.4 Quantität der dominanten bakteriellen Gruppen

Der Einfluss des probiotischen *E. faecium* NCIMB 10415 auf die Kolonisierung des *Jejunums* der Versuchstiere mit einzelnen bakteriellen Populationen (*Lactobacillus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Bifidobacterium spp.* und *Escherichia spp.*) wurde analog zum Magen mittels gruppenspezifischer Primer untersucht. Die Ergebnisse sind in den folgenden Abschnitten graphisch (**Abb. 14, 15**) und im Anhang tabellarisch dargestellt (**Tab. A23, A24**).

Lactobacillus spp.

Die Dynamik der Population der Laktobazillen im distalen *Jejunum* entsprach überwiegend jener im Magen: So wurde das *Jejunum* der Versuchstiere in der Saugperiode (7., 14., 28. Tag) insgesamt stärker von Laktobazillen besiedelt als nach dem Absetzen (31., 35., 56. Tag). Dabei waren die fütterungsabhängigen Effekte von *E. faecium* NCIMB 10415 im Magen und *Jejunum* weitgehend identisch. Entsprechend war am 14. Tag die Population der Laktobazillen im *Jejunum* der Probiotikum-Tiere nicht nur umfangreicher ($p=0,04$), sondern auch ihre prozentualen Anteile waren höher ($p=0,10$) als in der Kontrolle (**Abb. 14 -1A, 1B**). Nach Beginn der Gabe des Prästarters (28. Tag) und nach dem Absetzen (31., 35. Tag) erfolgte eine Verringerung der Zellzahl und der prozentualen Anteile der Laktobazillen im *Jejunum* der Probiotikum-Tiere. Die Unterschiede konnten allerdings nur als tendenziell bezeichnet werden ($p=0,11$). Vier Wochen nach dem Absetzen (56. Tag) war die Population der Laktobazillen im *Jejunum* der Probiotikum-Gruppe wieder zahlreicher als in der Kontrollgruppe, die Unterschiede sind aber nur für relative Zahlen signifikant (0,44% vs. 0,02%, $p=0,04$).

Enterococcus spp.

Die Enterokokken-Population im distalen *Jejunum* der Tiere beider Gruppen entwickelte sich ebenfalls weitgehend analog zur Entwicklung im Magen: In der Saugperiode (7., 14. Tag) wurde das *Jejunum* stärker mit den Enterokokken besiedelt als nach dem Absetzen (35., 56. Tag). Dabei war die Enterokokken-Population der Probiotikum-Tiere wiederum signifikant zahlreicher und ihre prozentualen Anteile lagen höher als die bei den Kontrolltieren (**Abb. 14-2A, 2B**). Die relativen Zahlen der Enterokokken-Population in der Probiotikum-Gruppe fielen nach dem Absetzen (31., 35., 56. Tag) höher aus als in der Saugperiode (7., 14., 28. Tag), in der Kontrollgruppe hingegen waren die prozentualen Anteile dieser Bakterien in der Saugperiode größer als nach dem Absetzen (**Abb. 14-2B**).

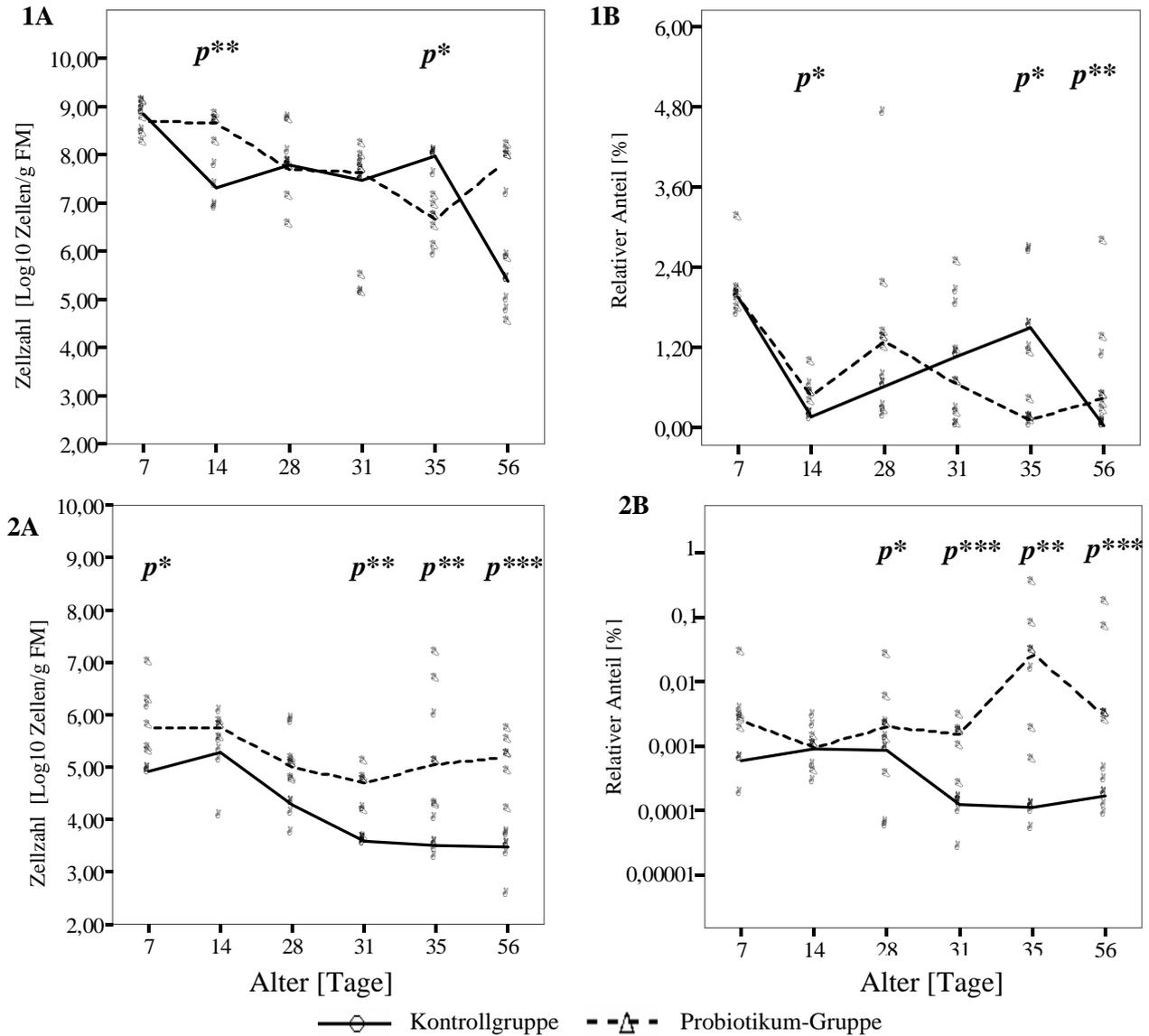


Abb. 14: Populationen von *Lactobacillus spp.*(1) und *Enterococcus spp.*(2) im distalen *Jejunum* der Versuchsferkel

(Mediane und einzelne Werte; Reihe **A** - Zellzahl/g Inhalt (Feuchtamasse); Reihe **B** - prozentuale Anteile der bakteriellen Gruppe an der gesamten eubakteriellen Population; *p* - Signifikanzen nach Mann-Whitney-Test: $p^* \leq 0,1$; $p^{**} \leq 0,05$; $p^{***} \leq 0,005$)

Escherichia spp.

Die Besiedlung des *Jejunums* der Versuchstiere mit *Escherichia spp.* verlief anders als im Magen. Es galt aber, dass in der Saugperiode das *Jejunum* bei beiden Gruppen stärker mit den *Escherichia spp.* kolonisiert wurde als nach dem Absetzen. Dabei konnten am 7., 31. und 56. Tag in der Probiotikum-Gruppe mehr *Escherichia spp.* nachgewiesen werden als in der Kontrolle (**Abb. 15-1A**). Auch die prozentualen Anteile dieser Bakterien waren bei den Probiotikum-Ferkeln am 7. und 31. Tag höher als bei den Kontrolltieren (**Abb. 15-1B**). Wie im Falle des Magens wurden anhand der absoluten Zellzahlen allerdings keine statistischen Unter-

schiede festgestellt; die prozentualen Anteile waren lediglich am 14. Tag statistisch als Trend zu bezeichnen ($p=0,10$).

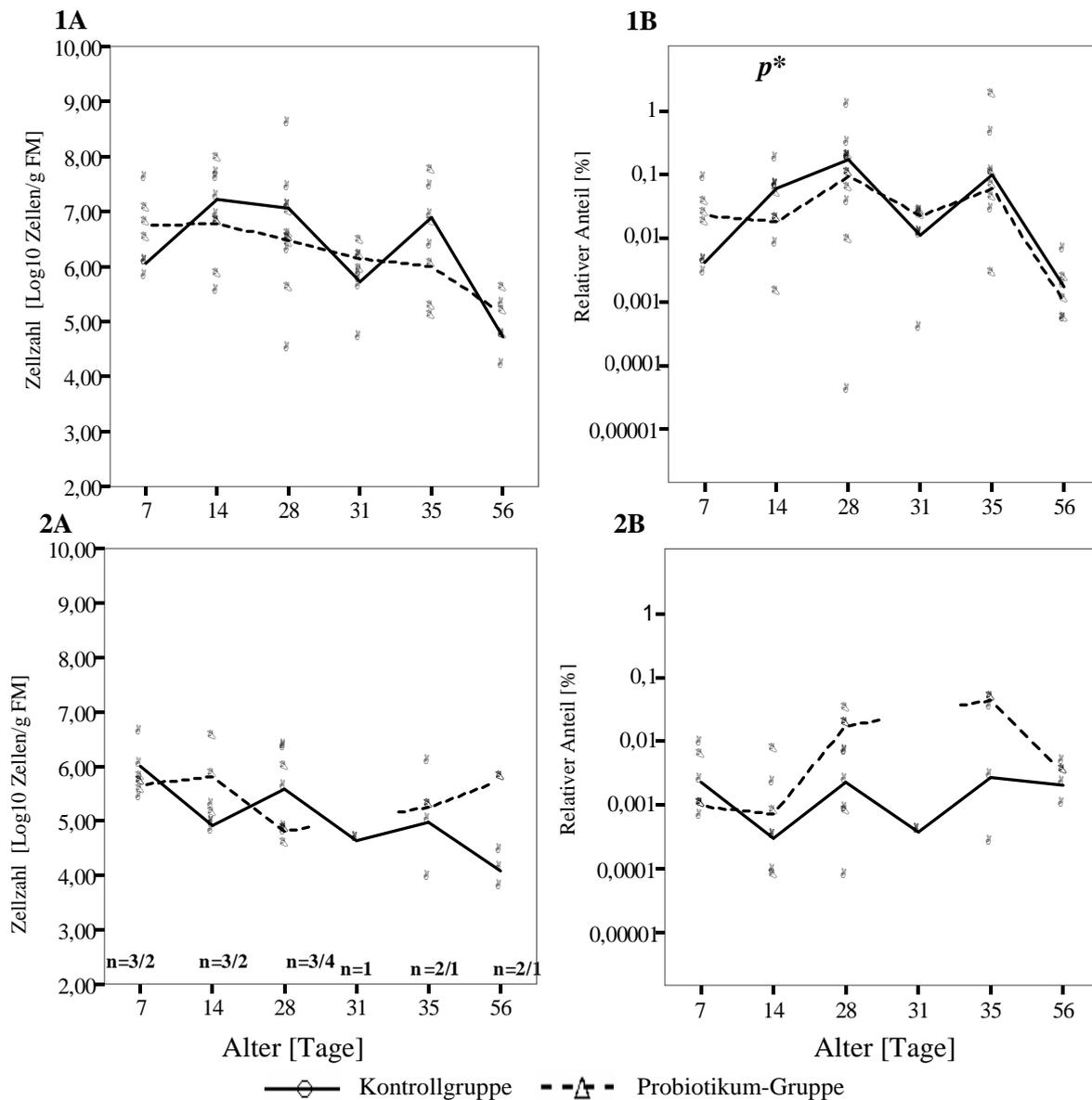


Abb. 15: Populationen von *Escherichia spp.* (1) und *Bifidobacterium spp.* (2) im distalen *Jejunum* der Versuchsferkel

(Mediane und einzelne Werte; Reihe **A** - Zellzahl/g Inhalt (Feuchtmasse); Reihe **B** - prozentuale Anteile der bakteriellen Gruppe an der gesamten eubakteriellen Population; **n** – Anzahl der Proben mit positiver Amplifikation (Kontrolle/Probiotikum); **p** - Signifikanzen nach Mann-Whitney-Test: $p^* \leq 0,1$; $p^{**} \leq 0,05$; $p^{***} \leq 0,005$)

Bifidobacterium spp.

Die Quantifizierung der spezifischen 16S rDNA-Sequenz von Bifidobakterien ergab analog zum Magen keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen beiden Fütterungsgruppen. Die zeitliche Entwicklung entsprach der Dynamik von anderen untersuchten Gruppen: In der Saugperiode wurde das *Jejunum* stärker von Bifidobakterien kolonisiert als nach dem Absetzen. Rein zahlenmäßig war die Population der Bifidobakterien in der Probiotikum-Gruppe am 14., 35. und 56. Tag größer jene der Kontrollgruppe (**Abb. 15-2A, 2B**).

3.4.5 Quantität von *Lactobacillus* spp.- und *Enterococcus* spp.-Arten

Der Einfluss des probiotischen *E. faecium* NCIMB 10415 auf individuelle bakterielle Populationen der einzelnen Stämme im *Jejunum* der Versuchstiere wurde wie im Magen anhand der *E. faecium*- und *E. faecalis*- sowie einzelner Laktobazillen-Stämme – *L. acidophilus*, *L. amylovorus*, *L. johnsonii*, *L. mucosae* und *L. reuteri* – untersucht.

L. acidophilus

Der 16S rDNA-Nachweis von *L. acidophilus* wies analog zum Magen keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Fütterungsgruppen auf. Es waren wie im Falle des Magens nur wenige Proben *L. acidophilus*-positiv. An Tagen, an denen in beiden Gruppen positive Werte gemessen wurden, war die Population von *L. acidophilus* am 14. und 56. Tag in der Probiotikum-Gruppe zahlenmäßig umfangreicher als in der Kontrollgruppe. Allerdings lagen die prozentualen Anteile von *L. acidophilus* an der gesamten Laktobazillen-Population bei den Kontroll- höher als bei den Probiotikum-Tieren (7., 14. Tag) (**Tab. A25** im Anhang).

L. amylovorus / *L. sobrius*

Die Bestimmung der spezifischen 16S rDNA-Sequenz von *L. amylovorus/L. sobrius* in den untersuchten Proben zeigte, dass am 14. und 56. Tag die *L. amylovorus/L. sobrius*-Populationen bei den Tieren der Probiotikum-Gruppe im Vergleich zur Kontrolle größer waren. Am 7., 31. und 35. Tag dagegen lagen die entsprechenden Werte in der Probiotikum-Gruppe numerisch und am 28. Tag auch statistisch signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe ($p=0,05$) (**Abb. 16-1A** und **Tab. A25** im Anhang). Die relativen Anteile von *L. amylovorus/L. sobrius* an der gesamten Laktobazillen-Population in beiden Gruppen waren im Unterschied zum Magen in der Saugperiode insgesamt niedriger als nach dem Absetzen. Dabei waren die relativen Zahlen von *L. amylovorus* der Probiotikum-Gruppe kleiner als jene der Kontrollgruppe (**Abb. 16-1B**).

L. johnsonii

Die Besiedlung des *Jejunums* mit *L. johnsonii* wies für den 7., 14., 28., 31. und 56. Tag für die Probiotikum-Gruppe höhere Werte aus als für die Kontrolle, die Unterschiede waren aber statistisch nicht signifikant (mit Ausnahme von relativen Zahlen am 28. Tag) (**Abb. 16-2A, 2B**). Analog zum Magen waren die prozentualen Anteile von *L. johnsonii* in beiden Gruppen in der Saugperiode kleiner als nach dem Absetzen. Tabellarisch sind die *L. johnsonii*-Werte in **Tab. A25** im Anhang zusammengefasst.

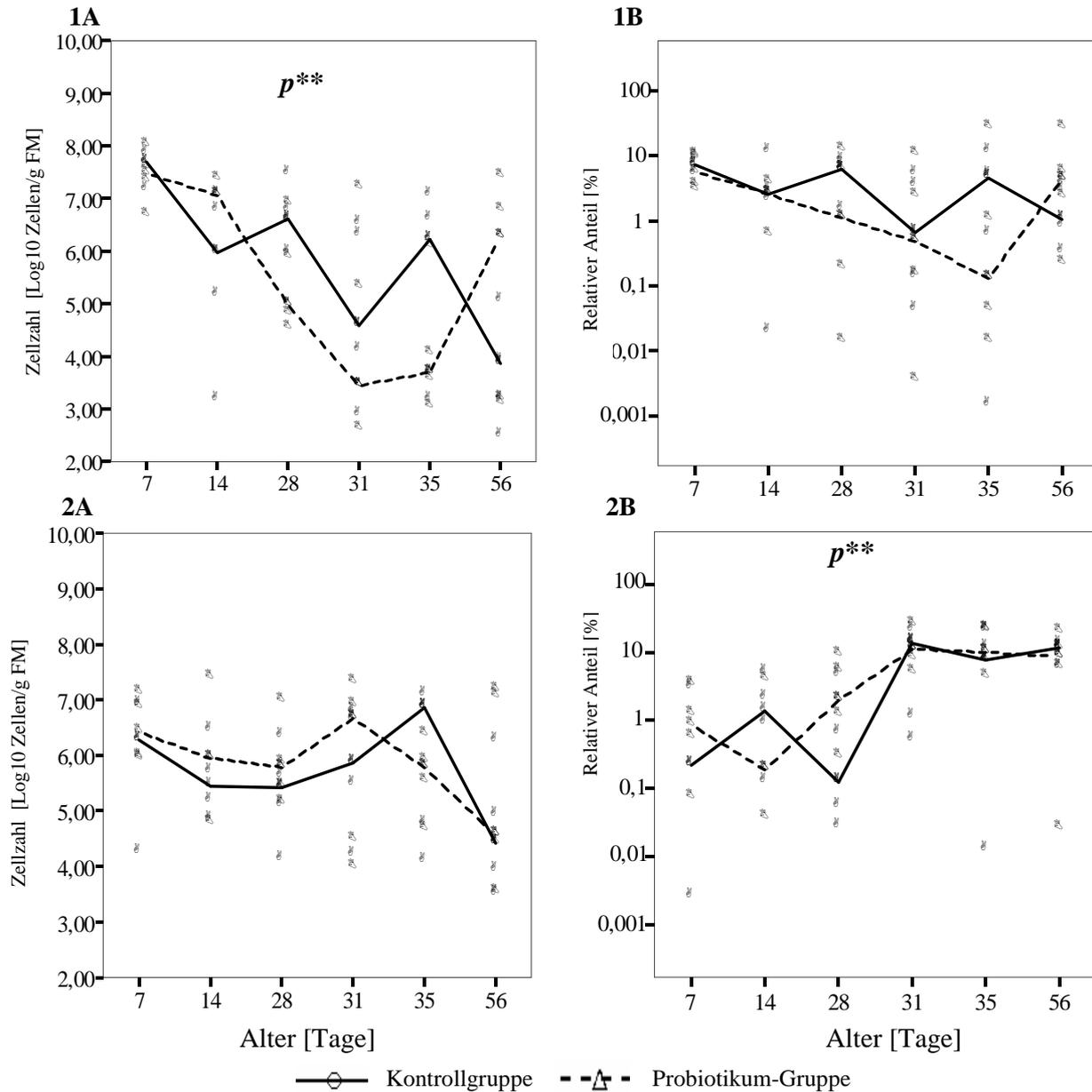


Abb. 16: Populationen von *L. amylovorus* (1) und *L. johnsonii* (2) im distalen *Jejunum* der Versuchsferkel

(Mediane und einzelne Werte; Reihe A - Zellzahl/g Inhalt (FM); Reihe B - prozentuale Anteile der bakteriellen Gruppe an der gesamten Laktobazillen-Population; *p* - Signifikanzen nach Mann-Whitney-Test: $p^{**} \leq 0,05$)

L. mucosae

Der Nachweis der spezifischen 16S rDNA-Sequenz von *L. mucosae* zeigte analog zum Magen, dass das *Jejunum* der Probiotikum-Gruppe insgesamt weniger als das *Jejunum* der Kontrollgruppe mit dieser Spezies besiedelt wurde. Im Unterschied zum Magen war eine größere Zahl der *Jejunum*-Proben *L. mucosae*-positiv, und die Werte dieser positiven Proben ergaben statistisch signifikante Unterschiede am 28. Tag ($p=0,05$). Am 7., 35. und 56. Tag sind sie als deutlicher Trend zu bezeichnen ($p=0,10$) (Abb. 17-1A und Tab. A26 im Anhang). Auch die prozentualen Anteile von *L. mucosae* im *Jejunum* der Probiotikum-Tiere waren während der

gesamten Beobachtungsperiode kleiner, signifikante Unterschiede wurden allerdings nur am 7.Tag registriert (0,87% vs. 2,28%, $p=0,04$) (**Abb. 17-1B**).

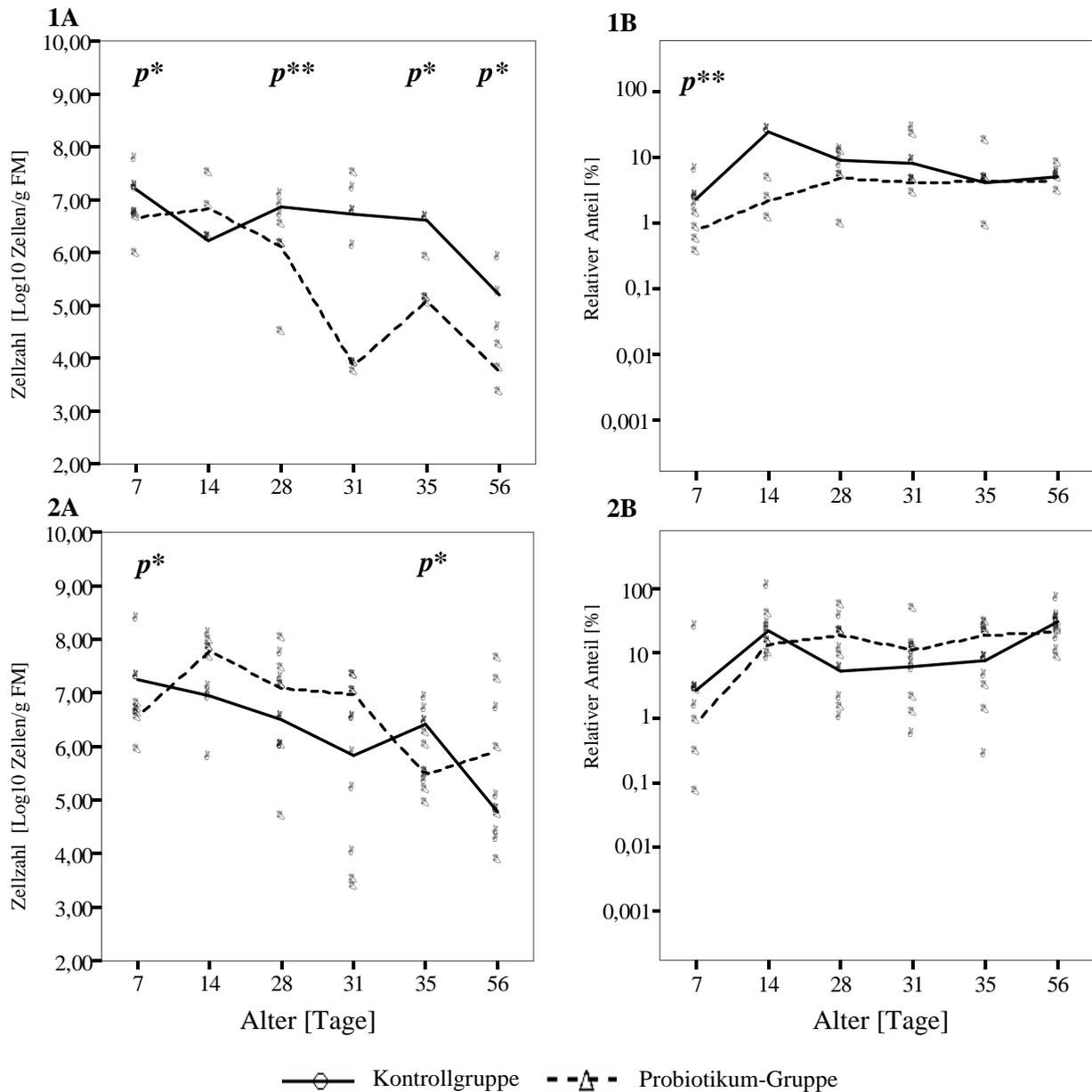


Abb. 17: Populationen von *L. mucosae* (1) und *L. reuteri* (2) im distalen *Jejunum* der Versuchsferkel

(Mediane und einzelne Werte; Reihe **A** – Zellzahl/g Inhalt (Feuchtmasse); Reihe **B** - prozentuale Anteile der Spezies an der gesamten Laktobazillen-Population; p - Signifikanzen nach Mann-Whitney-Test: $p^* \leq 0,1$; $p^{**} \leq 0,05$)

L. reuteri

Die zeitliche Entwicklung der Population von *L. reuteri* entsprach im Großen und Ganzen jener im Magen: Die maximale Kolonisierung des *Jejunums* fand in der Saugperiode statt und nahm nach dem Absetzen und nach Beginn der Gabe des Festfutters tendenziell ab. Wie im Magen war die Population am 7. und 35. Tag in der Probiotikum-Gruppe kleiner als in der Kontrolle ($p=0,08$; $p=0,10$). Am 14., 28., 31. und 56. Tag lagen die entsprechenden Werte in

der Probiotikum-Gruppe dagegen höher als bei den Kontrolltieren (**Abb. 17-2A** und **Tab. A26** im Anhang). Hinsichtlich der prozentualen Anteile von *L. reuteri* konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede ermittelt werden. Rein numerisch waren die relativen Werte von *L. reuteri* in der Probiotikum-Gruppe am 28., 31. und 35. Tag aber höher als die der Kontrolle (**Abb. 17-2B**).

E. faecium

Der 16S rDNA-Nachweis von *E. faecium* lieferte im Unterschied zum Magen keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen. Es waren, wie im Fall von *L. acidophilus* und *L. mucosae*, nur wenige *Jejunum*-Proben *E. faecium*-positiv. Am 7., 35. und 56. Tag waren nur *Jejunum*-Proben der Probiotikum-Tiere *E. faecium*-positiv, am 14., 28. Tag nur solche bei den Kontrollferkeln. Am 31. Tag wurden in keiner der Gruppen *E. faecium*-positive Proben registriert (**Tab. 22**).

Tab. 22: Zelldichte der *E. faecium*- und *E. faecalis*-Population im distalen *Jejunum* der Versuchsferkel

Alter	Zellzahl [Log10 Zellen/g Feuchtmasse]				Anteil an der gesamten Enterokokken- Population [%]			
	Kontrolle (N=5) ^b	Probiotikum ^a (N=5)	n ^c	P ^d	Kontrolle (N=5)	Probiotikum (N=5)	n	P
<i>E. faecium</i>								
7	ND ^e	4,95^f (4,42-5,55)	0/2	-	ND	2,86 (1,61-4,11)	0/2	-
14	4,66	ND	1/0	-	4,22	ND	1/2	-
28	4,56	ND	1/	-	5,00	ND	1/2	-
31	ND	ND	0/0	-	ND	ND	0/0	-
35	ND	5,38	0/1	-	ND	5,52	0/1	-
56	ND	4,72	0/1	-	ND	10,83	0/1	-
<i>E. faecalis</i>								
7	ND	3,27 (3,21-3,33)	0/2	-	ND	0,51 (0,13-0,89)	0/2	-
14	2,99 (2,94-3,04)	3,05	2/1	0,22	0,22 (0,08-0,36)	0,17	2/1	-
28	2,98 (2,83-3,47)	ND	3/0	-	0,15 (0,09-23,15)	ND	3/0	-
31	ND	3,55	0/1	-	ND	6,19	0/1	-
35	3,17	2,64	1/1	0,31	0,17	0,003	1/1	0,31
56	3,10 (3,06-3,15)	3,65 (3,16-4,08)	2/3	0,08	41,89 (29,29-54,48)	5,90 (0,49-7,35)	2/3	0,08

a -Fütterungsgruppe; b - Anzahl der untersuchten Proben; c - Anzahl der positiven Ergebnisse von jeweils fünf untersuchten Proben (Kontrollgruppe/Probiotikum-Gruppe); d - Signifikanz nach Mann-Whitney-Test; e – Proben mit negativer Amplifikation; f - Median (minimaler Wert-maximaler Wert)

E. faecalis

Die Kolonisierung des *Jejunums* mit *E. faecalis* wurde, wie im Fall von *L. acidophilus*, *L. mucosae* und *E. faecium*, anhand von nur wenigen *E. faecalis*-positiven Proben bewertet. Dabei waren am 7., 14., 28. und 56. Tag in der Probiotikum-Gruppe mehr *E. faecalis*-positive Proben zu finden als in der Kontrolle. Die erfassten Werte sind in **Tab. 23** zusammengefasst.

3.4.6 Laktat

Die metabolische Aktivität der Milchsäurebakterien der *Jejunum*-Mikrobiota wurde, analog zum Magen, anhand der Konzentrationen von L(+)- und D(-)-Isomeren des Laktats ermittelt. Da vom 7. und 14. Tag keine Proben zur Verfügung standen, wurden für die weitere Analyse nur Proben vom 28., 31., 35. und 56. Tag einbezogen.

Es konnte festgestellt werden, dass im Jejunum der Versuchstiere nach der Gabe des Festfutters und dem danach folgenden Absetzen (31. Tag) im Vergleich zum Magen insgesamt mehr Milchsäure gebildet wurde (Magen vs. Jejunum: 0,04-2,06 vs. 0,71-3,42 mg/g FM). Dabei entstand am 31. Tag in der Probiotikum-Gruppe rein numerisch mehr Laktat als in der Kontrollgruppe. Auch am 56. Tag war die Laktat-Konzentration, wie im Magen auch, signifikant höher als bei den Kontrolltieren ($p=0,05$) (**Abb. 18A**, **Tab. A27** im Anhang).

Die Dynamik der Konzentration von L(+)- und D(-)-Isomeren der Milchsäure entsprach weitgehend der Dynamik des Gesamtgehaltes an Milchsäure. Quantitativ war im Vergleich zur Kontrollgruppe der Gehalt an L(+)- und D(-)-Isomeren am 31. Tag numerisch und am 56. Tag in der Probiotikum-Gruppe signifikant höher (L-Isomer: 1,24 vs. 0,78 mg/g FM, $p=0,05$) als bei der Kontrollgruppe. Am 28. und 35. Tag lagen die entsprechenden Werte in der Kontrollgruppe (insignifikant) höher (**Tab. A28** im Anhang).

Mit Blick auf die prozentualen Anteile jedes Isomers am Gesamtgehalt der Milchsäure konnte festgestellt werden, dass mit zunehmendem Alter die *Jejunum*-Mikrobiota (analog zur Magen-Mikrobiota) immer weniger D(-)- und immer mehr L(+)-Isomere produziert. Dabei wurde fast an allen geprüften Tagen (28., 31., 35. Tag) – wie auch schon für den Magen – im *Jejunum* der Probiotikum-Gruppe ein größerer Anteil an L(+)-Isomeren beobachtet als in der Kontrolle, wobei die Unterschiede allerdings statistisch nicht signifikant waren. Nur am 56. Tag war in der Probiotikum-Gruppe, ebenfalls wie im Magen, der Anteil von D(-)-Isomeren am Gesamt-Laktat höher als der Gehalt von L(+)-Isomeren (**Tab. A28**). Einen graphischen Überblick über die Dynamik der L(+)- und D(-)-Isomere des Laktats liefert **Abb. 18B**.

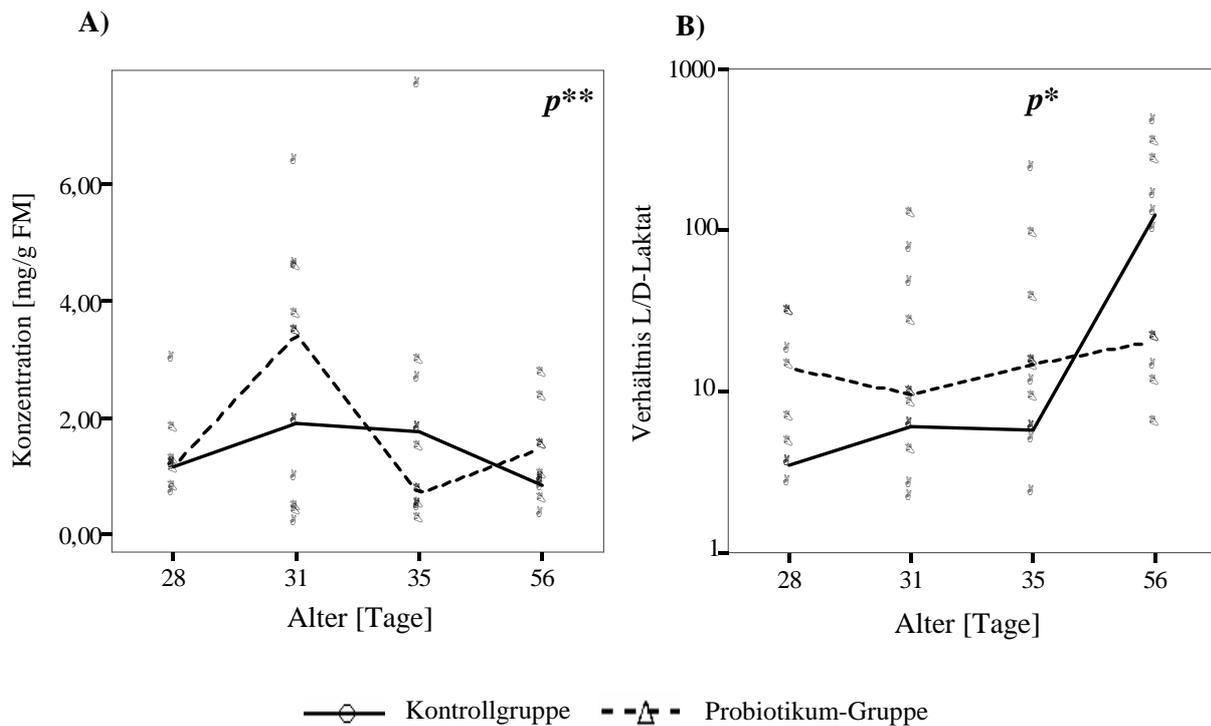


Abb. 18: Laktat im distalen *Jejunum* der Versuchsferkel

(Mediane und einzelne Werte; **A** – Gesamt-Laktat; **B** - Verhältnis L/D-Laktat; *p*-Signifikanzen nach Mann-Whitney-Test: $p^* \leq 0,1$, $p^{**} \leq 0,05$)

3.4.7 Ammoniumionen-Konzentration

Die proteolytische Aktivität der *Jejunum*-Mikrobiota wurde auf Basis der Ammoniumionen-Konzentration bewertet. Dabei stellte sich heraus, dass im *Jejunum* der Versuchstiere beider Gruppen mit zunehmendem Alter immer weniger Ammoniak nachzuweisen war (**Abb. 19, Tab. A29** im Anhang). Wie im Fall der Milchsäure standen für den 7. und 14. Tag keine Proben zur Verfügung, weshalb diese Beobachtungszeitpunkte in die Analyse nicht einbezogen werden konnten.

Die bei der Ammoniak-Messung ermittelten Werte für den 28. und 31. Tag zeigen, dass die Ammoniak-Konzentrationen in den Proben der Probiotikum-Tiere niedriger lagen als in der Kontrollgruppe. Am 35. Tag waren die Werte im Durchschnitt der Beobachtungen gleich groß. Nur am 56. Tag war die Ammoniak-Konzentration bei der Probiotikum-Gruppe höher. Die Unterschiede genügen aber in keinem der beiden Fälle den Anforderungen für statistische Signifikanz.

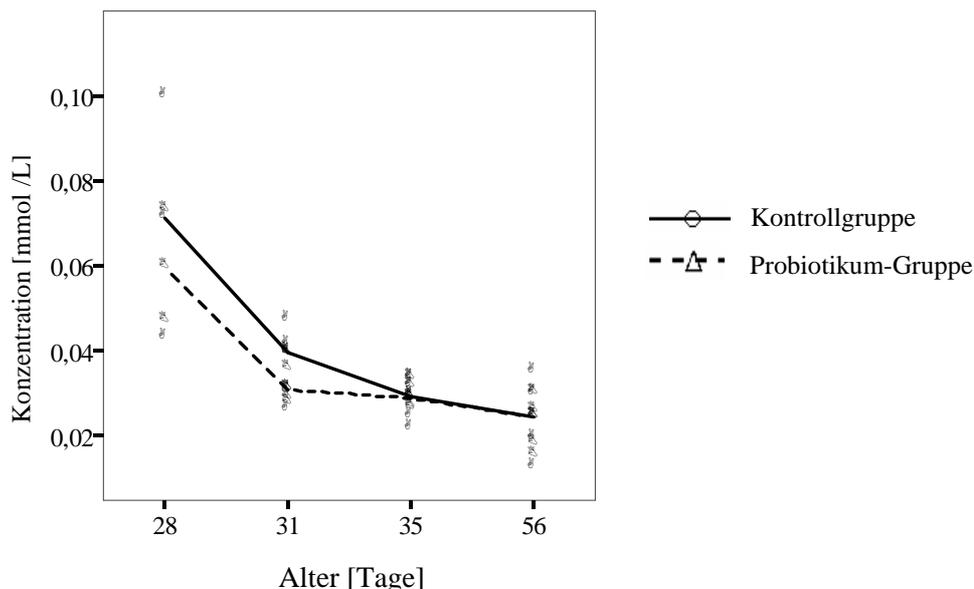


Abb. 19: Ammoniumionen-Gehalt im distalen *Jejunum* der Versuchsferkel (dargestellt sind Mediane und einzelne Werte; *p*-Signifikanzen nach Mann-Whitney-Test)

3.4.8 Flüchtige Fettsäuren

Um die metabolische Aktivität der gesamten *Jejunum*-Mikrobiota zu bewerten, wurden auch die Gehalte an Essig-, Propion-, *i,n* Butter- und *i,n* Valeriansäure sowie ihre Summe ermittelt.

Gesamtazidität und Essigsäure

Es wurde festgestellt, dass nach der Ergänzung des Futters um Prästarter (28. Tag) und eine Woche nach dem Absetzen (35. Tag) im *Jejunum* der Probiotikum-Gruppe im Vergleich zur Kontrolle insgesamt mehr Fettsäuren produziert wurden (**Abb. 20**). In keinem der Fälle waren die ermittelten Werte in den Gruppen statistisch signifikant unterschiedlich.

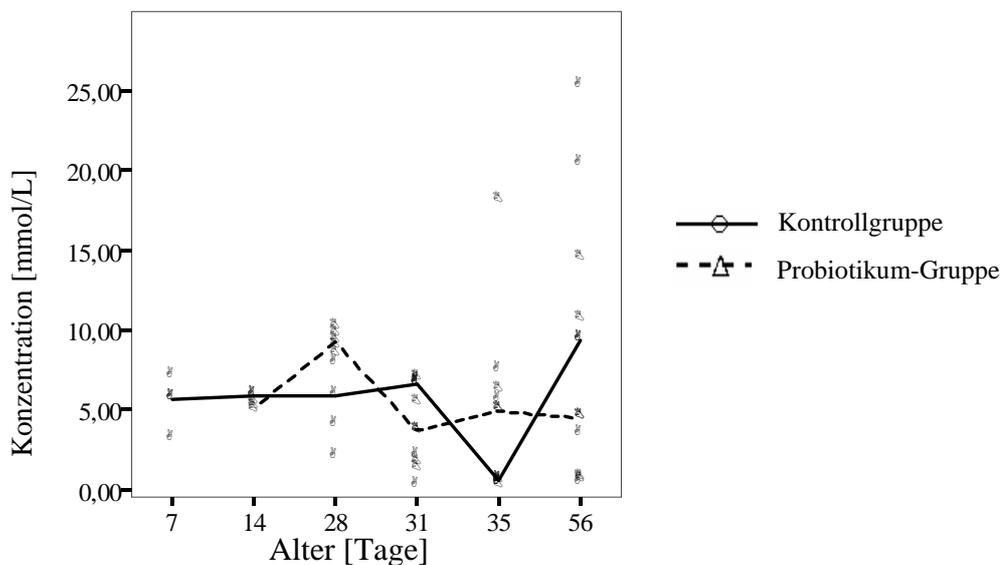


Abb. 20: Gehalt von flüchtigen Fettsäuren (Summe aller gemessenen Fettsäuren) im distalen *Jejunum* der Versuchsferkel (Mediane und einzelne Werte)

ERGEBNISSE

So wurde an den oben genannten Tagen bei den Probiotikum-Tieren auch mehr Essigsäure gemessen. Die Unterschiede zwischen beiden Fütterungsgruppen waren allerdings nicht signifikant. Die prozentualen Anteile der Essigsäure zeigen, dass ihr Gehalt nach dem Absetzen (31., 35. und 56. Tag) höher lag als in der Saugperiode (14., 28. Tag; vgl. **Tab. 23**).

Tab. 23: Essigsäure-Gehalt im distalen *Jejunum* der Versuchsferkel

Alter	Konzentration [mmol/L]				Relativer Anteil [in % der Summe aller gemessenen flüchtigen Säuren]		
	Kontrolle	Probiotikum ^a	n ^b	P ^c	Kontrolle	Probiotikum	P
7	4,96^d (2,81-6,26)		3/0		88,16 (87,52-90,23)		
14	5,08	4,12 (3,42-4,81)	1/2	0,22	85,83	78,62 (68,68-88,57)	1,00
28	4,97 (1,63-34,80)	8,16 (6,92-8,75)	4/4	0,25	80,41 (44,86-85,91)	84,19 (81,74-93,89)	0,08
31	6,15 (1,34-6,22)	4,19 (1,29-6,15)	4/4	0,25	91,34 (62,96-93,35)	90,38 (79,4-92,69)	1,00
35	5,02 (0,59-5,12)	5,96 (4,29-17,73)	3/3	0,28	89,71 (66,81-91,96)	95,72 (86,13-98,34)	0,28
56	14,31 (3,04-23,63)	9,88 (4,42-13,49)	4/3	0,72	93,72 (88,51-97,25)	93,34 (92,42-96,84)	0,72

a - Fütterungsgruppe; b - Anzahl der untersuchten Proben; c - Signifikanz nach Mann-Whitney-Test; d - Median (minimaler Wert-maximaler Wert)

Propionsäure

Die Konzentration der Propionsäure war insgesamt in der Probiotikum-Gruppe höher als in der Kontrolle. Am 14., 31. und 56. Tag lagen auch die prozentualen Anteile der Propionsäure an den gesamten Fettsäuren in der Probiotikum-Gruppe höher als bei den Kontrolltieren. Mit Blick auf die zeitliche Entwicklung gilt für die Propionsäure, dass ihre Anteile in der Saugperiode (14., 28. Tag) höher lagen als nach dem Absetzen (31., 35. und 56. Tag). Unterschiede zwischen beiden Fütterungsgruppen waren nicht signifikant (**Tab. 24**).

Tab. 24: Propionsäure-Gehalt im distalen *Jejunum* der Versuchsferkel

Alter	Konzentration [mmol/L]				Relativer Anteil [in % der Summe aller gemessenen flüchtigen Säuren]		
	Kontrolle	Probiotikum ^a	n ^b	P ^c	Kontrolle	Probiotikum	P
7	0,26^d (0,18-0,35)		2/0		3,99 (3,09-4,9)		
14	0,38	0,52 (0,37-0,68)	1/2	1,00	6,49	10,21 (6,76-13,68)	0,22
28	0,30 (0,17-18,47)	0,49 (0,42-0,80)	4/3	0,29	6,82 (4,83-23,8)	4,85 (4,39-9,51)	0,48
31	0,24 (0,11-0,36)	0,29 (0,14-0,37)	4/3	0,72	3,76 (1,65-15,6)	8,69 (4,21-29,16)	0,29
35	0,31 (0,17-2,38)	0,21 (0,11-0,21)	4/3	0,16	35,75 (5,32-80)	1,78 (1,17-42,94)	0,29
56	0,25 (0,13-0,40)	0,33 (0,16-0,48)	4/4	0,56	2,80 (0,8-32,65)	14,04 (2,41-42,92)	0,25

a - Fütterungsgruppe; b - Anzahl der untersuchten Proben; c - Signifikanz nach Mann-Whitney-Test; d - Median (minimaler Wert-maximaler Wert)

***n*-Buttersäure**

Bei der Bestimmung der *n*-Buttersäure ergaben sich für den 7. und 14. Tag im *Jejunum* der Probiotikum-Tiere keine Messwerte. Rein numerisch waren die Konzentration der *n*-Buttersäure sowie ihre prozentualen Anteile am 28., 31. und 35. Tag in der Probiotikum-Gruppe höher und am 56. Tag niedriger als in der Kontrollgruppe (**Tab. 25**).

Tab. 25: *n*-Buttersäure-Gehalt im distalen *Jejunum* der Versuchsferkel

Alter	Konzentration [mmol/L]				Relativer Anteil [in % der Summe aller gemessenen flüchtigen Säuren]		
	Kontrolle	Probiotikum ^a	<i>n</i> ^b	<i>P</i> ^c	Kontrolle	Probiotikum	<i>P</i>
7	0,09^d (0,05-0,14)		3/0		1,24 (0,92-4,43)		
14	0,12		1/0		2,08		
28	0,09 (0,00-11,66)	0,12 (0,10-0,13)	4/4	0,25	1,70 (0,00-15,03)	1,31 (1,01-1,41)	0,77
31	0,10 (0,08-0,26)	0,24 (0,08-0,47)	5/5	0,35	3,94 (1,15-38,36)	4,42 (2,43-37,37)	0,60
35	0,07	0,15 (0,07-0,54)	1/3	0,35	1,29	10,80 (1,16-29,84)	0,66
56	0,12 (0,07-0,86)	0,10 (0,08-0,33)	5/5	0,60	3,38 (0,72-18,62)	2,29 (0,95-15,52)	0,92

a -Fütterungsgruppe; b - Anzahl der untersuchten Proben; c - Signifikanz nach Mann-Whitney-Test; d - Median (minimaler Wert-maximaler Wert)

***n*-Valeriansäure**

Die Messwerte der *n*-Valeriansäure lagen in den *Jejunum*-Proben beider Gruppen vom 7. und vom 14. Tag weit unter der Nachweisgrenze und wurden nicht einbezogen. Am 28. und am 31. Tag lag die Konzentration der *n*-Valeriansäure in der Probiotikum-Gruppe numerisch und am 56. Tag signifikant höher als in der Kontrollgruppe ($p=0,04$) (**Tab. 26**).

Tab. 26: *n*-Valeriansäure-Gehalt im *Jejunum* der Versuchsferkel

Alter	Konzentration [mmol/L]				Relativer Anteil [in % der Summe aller gemessenen flüchtigen Säuren]		
	Kontrolle	Probiotikum ^a	<i>n</i> ^b	<i>P</i> ^c	Kontrolle	Probiotikum	<i>P</i>
28	0,11^d (0,00-3,39)	0,11 (0,10-0,13)	3/2	1,00	1,41 (0,00-4,36)	1,20 (0,95-1,45)	1,00
31	0,08 (0,07-0,09)	0,11	2/1	0,22	2,28 (1,36-3,20)	1,51	1,00
35	0,13	0,10	1/1	0,32	31,40	52,17	0,32
56	0,09 (0,08-0,10)	0,16 (0,13-0,18)	4/2	0,04	1,63 (0,33-25,26)	22,58 (17,85-27,31)	0,17

a -Fütterungsgruppe; b - Anzahl der untersuchten Proben; c - Signifikanz nach Mann-Whitney-Test; d - Median (minimaler Wert-maximaler Wert)

***i*-Buttersäure**

Werte für die *i*-Buttersäure im *Jejunum* konnte im Fall der Probiotikum-Tiere nur für den 14., 28. und 56. Tag ermittelt werden und für die Kontrollgruppe lediglich für den 7., 14., 28. und 56. Tag. Dabei lagen die absoluten Werte der Probiotikum-Gruppe numerisch niedriger als jene der Kontrollgruppe. Die Prozentanteile der *i*-Buttersäure an den gesamten Fettsäuren

ERGEBNISSE

waren in der Probiotikumgruppe am 14. und 28. Tag kleiner und am 56. Tag signifikant höher als in der Kontrolle (1,00% vs. 0,38%, $p=0,05$) (**Tab. 27**). Da am 31. und 35. Tag die Konzentration von *i*-Buttersäure unterhalb der Nachweisgrenze lag, wurden diese Werte in die Analyse nicht einbezogen. Die Entwicklung über die beobachteten Zeitpunkte zeigt allerdings, dass in der Saugperiode die Konzentration von *i*-Buttersäure etwas höher war als nach dem Absetzen.

Tab. 27: *i*-Buttersäure-Gehalt im distalen *Jejunum* der Versuchsferkel

Alter	Konzentration [mmol/L]				Relativer Anteil [in % der Summe aller gemessenen flüchtigen Säuren]		
	Kontrolle	Probiotikum ^a	<i>n</i> ^b	<i>P</i> ^c	Kontrolle	Probiotikum	<i>P</i>
7	0,12^d (0,10-0,21)		3/0		3,05 (1,73-3,64)		
14	0,17	0,13 (0,12-0,13)	1/2	0,22	2,85	2,41 (2,17-2,65)	0,22
28	0,32 (0,00-3,33)	0,31 (0,11-0,73)	4/4	1,00	3,65 (0-10,05)	3,32 (1,18-7,56)	1,00
56	0,09	0,09 (0,08-0,11)	2/3	0,56	0,38 (0,34-0,43)	1,00 (0,52-13,28)	0,05

a -Fütterungsgruppe; b - Anzahl der untersuchten Proben; c - Signifikanz nach Mann-Whitney-Test; d - Median (minimaler Wert-maximaler Wert)

***i*-Valeriansäure**

Die Konzentration der *i*-Valeriansäure im *Jejunum* der Probiotikum-Tiere lag, wie im Fall der Propionsäure, in der Saugperiode höher als nach dem Absetzen. Am 7., 28., 35. und 56. Tag war Gehalt von der *i*-Valeriansäure im *Jejunum* der Probiotikum-Ferkel höher als in der Kontrollgruppe. Die entsprechenden Prozentanteile lagen am 14., 31. und 56. Tag in der Probiotikum-Gruppe höher als in der Kontrolle (**Tab. 28**).

Tab. 28: *i*-Valeriansäure-Gehalt im distalen *Jejunum* der Versuchsferkel

Alter	Konzentration [mmol/L]				Relativer Anteil [in % der Summe aller gemessenen flüchtigen Säuren]		
	Kontrolle	Probiotikum ^a	<i>n</i> ^b	<i>P</i> ^c	Kontrolle	Probiotikum	<i>P</i>
7	0,27^d (0,07-0,28)		3/0		3,96 (2,28-4,84)		
14	0,16	0,44 (0,14-0,75)	1/2	1,00	2,73	8,75 (2,52-14,99)	1,00
28	0,23 (0,14-5,94)	0,33 (0,19-0,48)	4/4	0,56	5,60 (3,37-9,93)	3,56 (2,14-5,02)	0,39
31	0,16 (0,10-0,23)	0,15 (0,11-0,42)	5/5	0,92	2,89 (1,56-62,1)	5,12 (1,75-33,47)	0,92
35	0,08 (0,07-0,12)	0,09 (0,08-0,15)	5/5	0,18	10,13 (1,42-28,74)	3,05 (0,49-47,28)	0,75
56	0,10 (0,08-0,19)	0,14 (0,07-0,21)	5/5	0,47	1,07 (0,37-23,21)	1,46 (1,1-28,07)	0,25

a -Fütterungsgruppe; b - Anzahl der untersuchten Proben; c - Signifikanz nach Mann-Whitney-Test; d - Median (minimaler Wert-maximaler Wert)

3.4.9 Zusammenfassung Jejunum

Während der Saugperiode (14. Tag) wies das probiotische *E. faecium* NCIMB 10415 eine fördernde Wirkung auf bakterielle Populationen von *Lactobacillus spp.*^{*1}, *Enterococcus spp.* und *Bifidobacterium spp.* auf. Es konnte auch eine fördernde Wirkung für die übrigen getesteten Spezies beobachtet werden – die relativen Werte dieser bakteriellen Gruppen waren aber in der Kontrollgruppe höher. Wie bereits im Magen konnte eine hemmende Wirkung des untersuchten probiotischen Stamms bezüglich *Escherichia spp.* festgestellt werden. Die gemessenen Werte waren allerdings statistisch nicht signifikant. Metabolisch war die Jejunum-Mikrobiota der Probiotikum-Tiere in dieser Phase weniger aktiv als die der Kontrollgruppe: Der Gesamtgehalt an flüchtigen Fettsäuren war geringer, wobei die relativen Anteile von Propion- und i-Valeriansäure am 14. Tag höher lagen als in der Kontrollgruppe. Die Konzentrationen von Laktat und Ammoniak konnten für diesen Beobachtungszeitpunkt nicht ermittelt werden.

Der Übergang zum Festfutter bzw. zur Verfütterung des Probiotikums in Form einer Beimischung zum Starterfutter führte, analog zum Magen, zur Verringerung der Zellzahlen von *Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *L. amylovorus* und *L. mucosae*. Eine fördernde Wirkung ergab sich aber für *Enterococcus spp.*, *L. johnsonii* und *L. reuteri*. Prozentuale Anteile der erfassten bakteriellen Gruppen und Spezies lagen, analog zum Magen, höher als in der Kontrollgruppe. Die Population der *Escherichia spp.* war sowohl absolut wie relativ kleiner als in der Kontrolle. Die Konzentrationen von Laktat (darunter vor allem L(+)-Isomere) und von Fettsäuren – Essig-, Propion-, n-Buttersäure, n- und i-Valeriansäure – waren in der Probiotikum-Gruppe höher als bei den Kontrolltieren. Der Ammoniumionen-Gehalt war dagegen in der Kontrollgruppe höher als in der Probiotikum-Gruppe. Die Unterschiede zwischen den ermittelten Metaboliten-Werten beider Fütterungsgruppen erwiesen sich allerdings nicht als statistisch signifikant.

Kurz nach dem Absetzen, am 31. Tag, war eine fördernde Wirkung des probiotischen *E. faecium* NCIMB 10415 auf Populationen von *Lactobacillus spp.*, *Enterococcus spp.*, *L. johnsonii*^{*} und *L. reuteri* zu beobachten. Auch mit Blick auf *Escherichia spp.* wurden an diesem Tag in der Probiotikum-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe höhere Werte registriert. Die Konzentrationen des gesamten Laktats sowie der flüchtigen Fettsäuren waren in der Probiotikum-Gruppe geringer als in der Kontrolle. Darunter waren die Gehalte von L-Laktat, Propion-, n-Butter, und n-Valeriansäure höher in der Probiotikum-Gruppe als in der Kontrolle. Etwas

¹ (*) bezeichnet – analog zur Diskussion für den Magen im vorigen Abschnitt – Werte, für die die Unterschiede zwischen beiden untersuchten Gruppen mindestens auf dem 10%-Niveau statistisch signifikant waren.

später, eine Woche nach dem Absetzen (35. Tag), zeigte sich eine fördernde Wirkung von *E. faecium* NCIMB 10415 auf Populationen von *Enterococcus spp.* und *Bifidobacterium spp.* Hinsichtlich aller anderen Stämme wurden in der Probiotikum-Gruppe an diesem Zeitpunkt kleinere Werte registriert als in der Kontrollgruppe. Absolute und relative Populationen von *Escherichia spp.* waren in der Probiotikum-Gruppe geringer als in der Kontrolle. Die Gesamtlaktatkonzentration war bei den Probiotikum-Ferkeln – ebenso wie am 31. Tag – geringer, die L-Isomer-Konzentration dagegen höher als in der Kontrollgruppe. Der Fettsäure-Gehalt war an diesem Messungstag in der Probiotikum-Gruppe größer als in der Kontrolle, dabei waren höhere Konzentrationen von Essig-, n-Butter- und i-Valeriansäure zu verzeichnen. Die Mehrzahl der am 31. und 35. Tag ermittelten Metabolitenwerte ergab keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen beiden Fütterungsgruppen.

Im Alter von 56. Tag ließ sich, analog zum Magen, bei den Tieren der Probiotikum-Gruppe eine deutlich fördernde Wirkung von *E. faecium* NCIMB 10415 auf Populationen von *Lactobacillus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Bifidobacterium spp.* und *L. amylovorus* feststellen. Die prozentualen Anteile dieser Gruppen und Spezies waren in der Probiotikum-Gruppe ebenfalls höher als in der Kontrolle. Auch wurde in der Probiotikum-Gruppe eine höhere Konzentration von Laktaten allgemein und L(+)-Isomeren im Besonderen gemessen. Die Konzentration von Fettsäuren war insgesamt geringer als in der Kontrolle, die Konzentrationen von Propion-, n-Valerian und i-Valeriansäure dagegen höher.

3.5 Einfluss des probiotischen *E. faecium* NCIMB 10415 auf die mikrobielle Besiedlung des *Colon ascendens* der Ferkel

3.5.1 Gesamte eubakterielle Zellzahlen

Quantitativ wurde die gesamte mikrobielle Besiedlung des *Colon ascendens* analog zum Magen und distalen *Jejunum* anhand der gesamten extrahierten DNA und der eubakteriellen 16S rDNA bewertet. Eingangs ist dabei festzuhalten, dass aus den *Colon*-Proben insgesamt mehr DNA extrahiert wurde als aus dem Magen- und *Jejunum*-Inhalt. Dabei wurde an allen Beobachtungstagen mit Ausnahme des 7. Tages aus den *Colon*-Proben der Probiotikum-Gruppe – im Unterschied zu Magen und distalen *Jejunum* – weniger DNA extrahiert als aus den Proben der Kontrollgruppe. Statistisch waren aber diese Unterschiede nicht signifikant (**Abb. 21A**). Die zeitliche Entwicklung der Konzentration der DNA änderte sich, wiederum im Gegensatz zu Magen und *Jejunum*, während der Beobachtungsperiode kaum: In der Saugperiode (7., 14. Tag) wurde im Schnitt etwas mehr DNA extrahiert als nach dem Absetzen.

Hinsichtlich der zeitlichen Entwicklung der 16S rDNA-Population im *Colon ascendens* waren in den beiden Gruppen keine großen Abweichungen zwischen den einzelnen Beobachtungszeitpunkten zu beobachten. Sowohl in der Probiotikum-Gruppe als auch in der Kontrolle blieb die Größe der 16S rDNA-Population im *Colon* weitgehend konstant (**Abb. 21B**). Dabei waren die eubakterielle Zellzahlen in der Probiotikum-Gruppe signifikant höher als in der Kontrollgruppe (vgl. auch **Tab. A30** im Anhang).

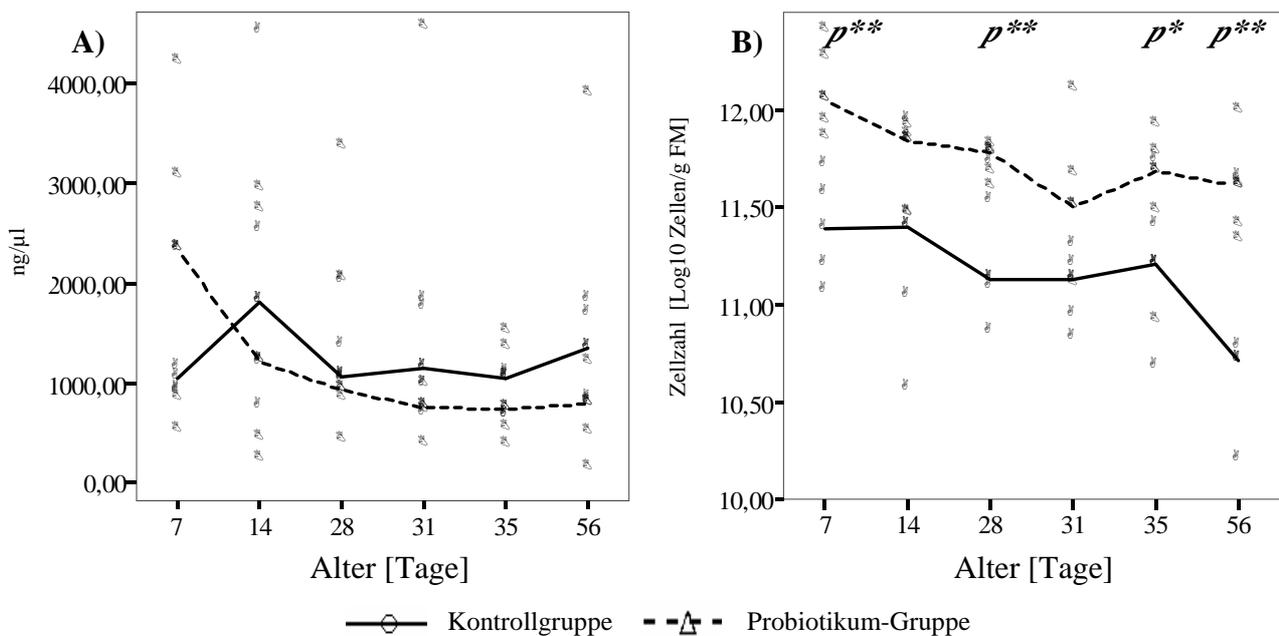


Abb. 21: Gehalt (A) der extrahierten DNA und (B) der eubakteriellen 16S rDNA im *Colon ascendens* der Versuchsferkel

(Mediane und einzelne Werte; *p*-Signifikanzen nach Mann-Whitney-Test: $p^* \leq 0,1$; $p^{**} \leq 0,05$)

3.5.2 Diversität der gesamten bakteriellen 16S rDNA-Population im *Colon ascendens* der Ferkel

Analog zum Magen und distalen *Jejunum* wurde die Diversität der bakteriellen 16S rDNA-Population im *Colon ascendens* unter Berücksichtigung der folgenden Parameter bewertet: Speziesreichtum (*Richness*), Gleichverteilung der einzelnen bakteriellen Zellen innerhalb von Population eines Spezies (*Evenness*), Gleichverteilung der einzelnen Spezies in der gesamten bakteriellen Population (*Shannon-Index*) und Dominanzverhältnisse dieser einzelnen Spezies innerhalb der gesamten Population (*Simpson-Index*). Es galt analog zur Untersuchung von Magen und *Jejunum*, dass einer höhere Diversität bzw. Homogenität der bakteriellen Population höhere Werten von *Richness*, *Evenness*, und *Shannon-Index* und niedrigeren beim *Simpson-Index* entsprachen.

Insgesamt war nach den genannten Maßen nur nach dem Absetzen – am 31. und 56. Tag – die *Colon*-Mikrobiota der Probiotikum-Tiere homogener und diverser als die der Kontrolltiere. Am 7. Tag lagen Diversität und Homogenität der bakteriellen 16S rDNA-Population in der Probiotikum-Gruppe niedriger als in der Kontrolle (*Evenness*, *Shannon-Index* $p=0,14$, *Simpson-Index*) (**Abb. 22B, C, D**). Am 14. Tag, nach zweiwöchiger Supplementierung der Tiere mit dem Probiotikum, wurden im Unterschied zur Untersuchung von Magen und *Jejunum* keine deutlichen Differenzen in der Diversität und Homogenität der Mikrobiota beider Fütterungsgruppen festgestellt. Die Ergänzung der Milchdiät um Prästarter (28. Tag) führte, ähnlich wie bei Magen und *Jejunum*, zur Verringerung der Diversität und Homogenität der *Colon*-Mikrobiota in der Probiotikum-Gruppe. Am 35. Tag war die 16S rDNA-Population in der Probiotikum-Gruppe hinsichtlich des Speziesreichtums diverser (**Abb. 22A**), im Vergleich zur Kontrollgruppe aber weniger homogen (*Evenness* $p=0,10$, *Shannon-Index*, **Abb. 22B, C**). In Tabelle **A31** im Anhang sind die errechneten Diversitätsindizes übersichtsartig zusammengefasst.

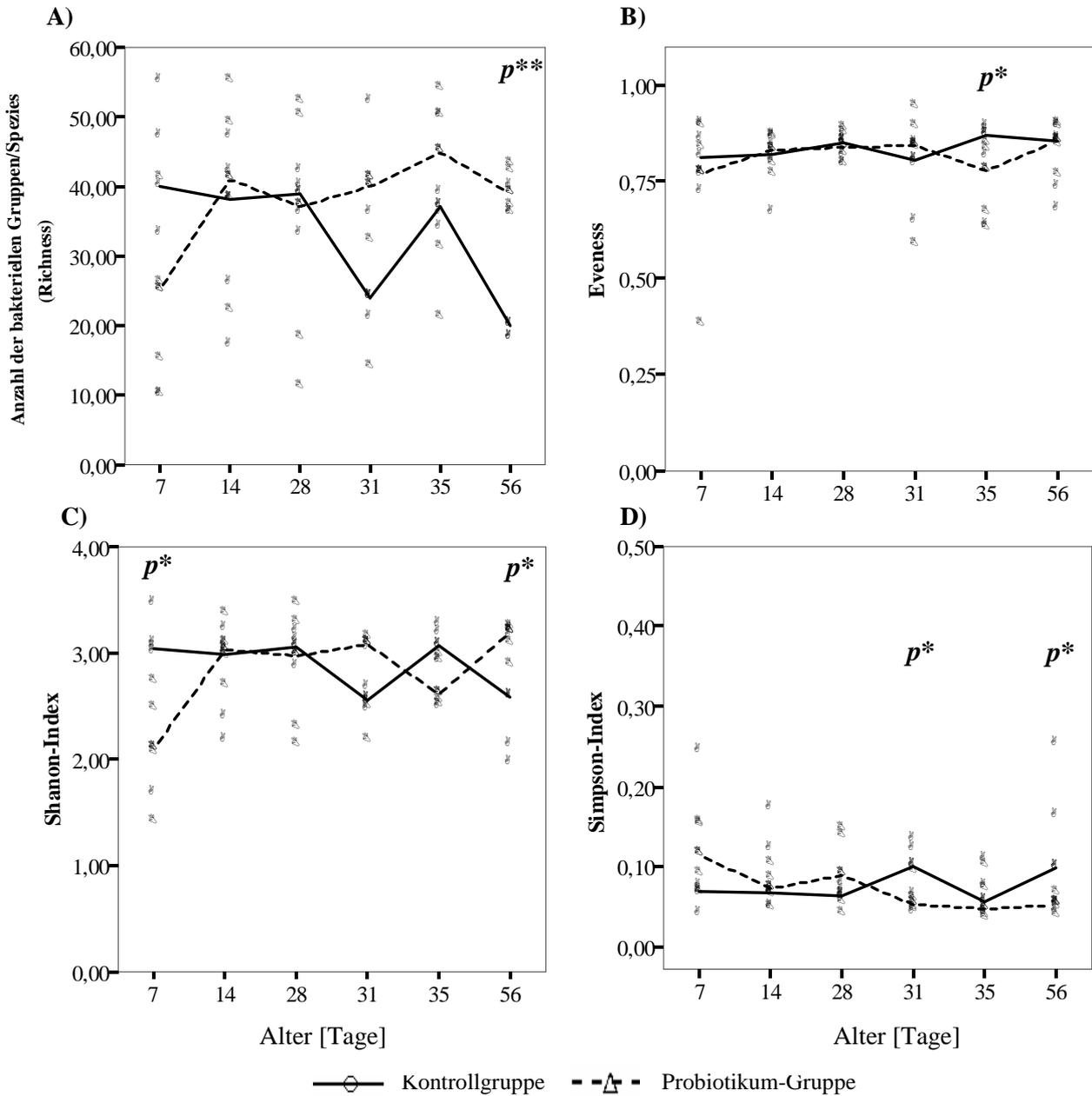


Abb. 22: Diversität der bakteriellen 16S rDNA-Populationen im *Colon ascendens* der Versuchsferkel

(Mediane und einzelne Werte; **A** - Artenreichtum od. *Richness*; **B** - *Evenness*; **C** - *Shannon-Index*; **D** - *Simpson-Index*, *p*-Signifikanzen nach Mann-Whitney-Test: $p^* \leq 0,1$; $p^{**} \leq 0,05$)

3.5.3 Ähnlichkeit der gesamten bakteriellen 16S rDNA-Population im *Colon ascendens* der Ferkel

Die Ähnlichkeit der 16S rDNA-Profile wurde wie bei Magen und *Jejunum* anhand der Anzahl der gemeinsamen Spezies (*Sørensen-Quotient*) bewertet. Es wurden sowohl Übereinstimmungen der *Colon*-Mikrobiota zwischen den einzelnen Tieren innerhalb einer Fütterungsgruppe als auch zwischen individuellen Tieren innerhalb der beiden Fütterungsgruppen ermittelt.

Wie im Fall der Magen- und *Jejunum*-Mikrobiota waren auch die 16S rDNA-Profile der *Colon*-Mikrobiota der einzelnen Tiere aus der Probiotikum-Gruppe am 7., 14., 31. und auch am 56. Tag signifikant ähnlicher als die der Kontrollgruppe (Abb. 23A). Am 28. und 35. Tag dagegen lagen die errechneten Ähnlichkeitsindizes in der Probiotikum-Gruppe signifikant niedriger als in der Kontrolle. Am unterschiedlichsten waren die Colon-Mikrobiota, analog zum Jejunum, nach dem Absetzen, am 31. Tag (Abb. 23B). Tabellarisch sind die errechneten Sörensen-Werte im Anhang zusammengefasst (Tab. A32 im Anhang).

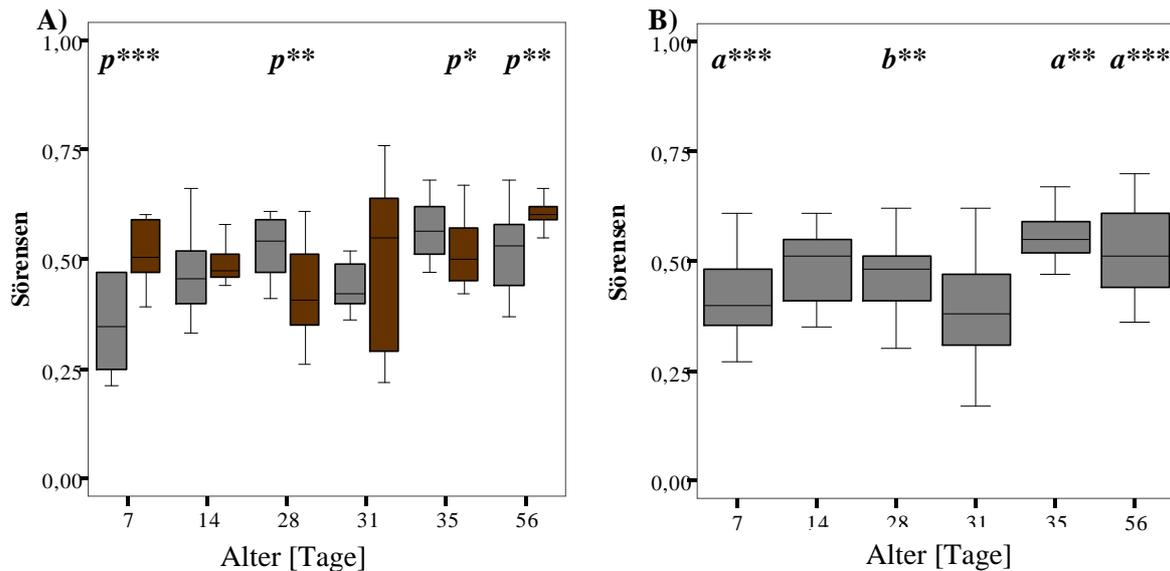


Abb. 23: Sörensen-Ähnlichkeitswerte der bakteriellen 16S rDNA-Populationen im *Colon ascendens* der Versuchsferkel (A) innerhalb und (B) zwischen den Fütterungsgruppen

(A: dunkle Boxplots – Probiotikum-Gruppe, helle Boxplots – Kontrollgruppe, p -Signifikanzen nach Mann-Whitney-Test: $p^* \leq 0,1$; $p^{**} \leq 0,05$; $p^{***} \leq 0,005$; B: a – signifikante Unterschiede gemessen gegenüber der Probiotikum-Gruppe, b – signifikante Unterschiede gemessen gegenüber der Kontrollgruppe)

3.5.4 Quantität der dominanten bakteriellen Gruppen

Der Einfluss des probiotischen *E. faecium* NCIMB 10415 auf die Kolonisierung des *Colons* mit einzelnen bakteriellen Populationen wurde analog zum Magen und *Jejunum* mit Blick auf die Entwicklung der Populationen von *Lactobacillus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Bifidobacterium spp.* und *Escherichia spp.* bei den Versuchstieren mittels gruppenspezifischer Primer untersucht. Die Ergebnisse sind – analog zur Darstellungsweise für die bereits beschriebenen GIT-Lokalisationen – graphisch dargestellt (Abb. 24, 25) und im Anhang tabellarisch zusammengefasst (Tab. A33 und A34).

Lactobacillus spp.

Die dynamische Entwicklung der Population der Laktobazillen im *Colon ascendens* der Versuchstiere beider Gruppen entsprach der in Magen und im *Jejunum*: In der Saugperiode (7.,

ERGEBNISSE

14., 28. Tag) wurde das *Colon* etwas stärker kolonisiert als nach dem Absetzen (31., 35., 56. Tag). Am 28. Tag waren die entsprechenden Werte in der Probiotikum-Gruppe tendenziell geringer als in der Kontrolle ($p=0,10$) (Abb. 24-1A). Die prozentualen Anteile von *Lactobacillus spp.* an der gesamten eubakteriellen Population waren während der gesamten Beobachtungsperiode niedriger als in der Kontrollgruppe. Statistisch signifikante Unterschiede konnten dabei für den 14., 28. und 35. Tag ermittelt werden ($p=0,009-0,05$) (Abb. 24-1B).

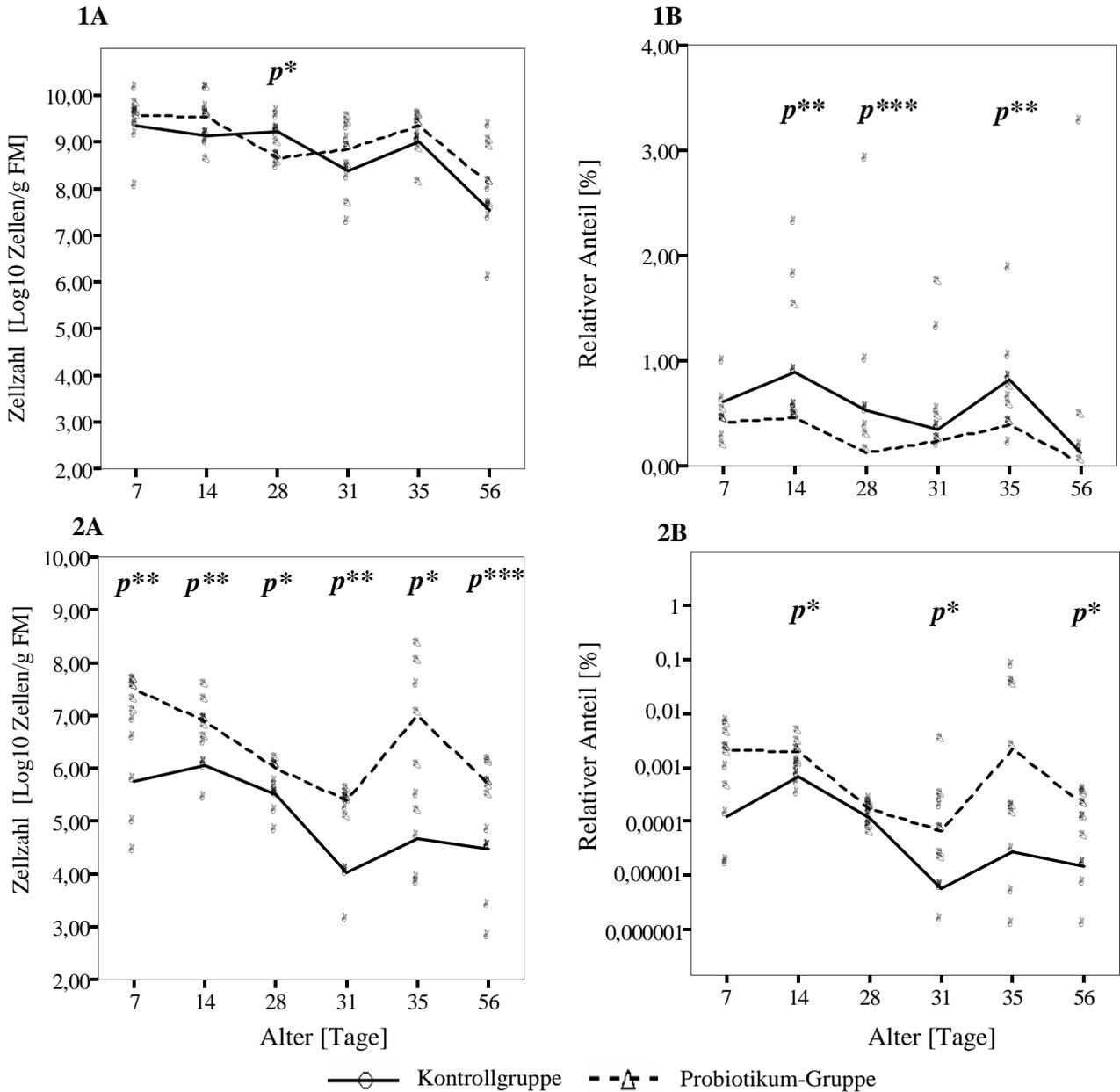


Abb. 24: Populationen von *Lactobacillus spp.* (1) und *Enterococcus spp.* (2) im *Colon ascendens* der Versuchsferkel

(Mediane und einzelne Werte; Reihe A - Zellzahl/g Inhalt (Feuchtmasse); Reihe B - prozentuale Anteile der bakteriellen Gruppe an der gesamten eubakteriellen Population; p - Signifikanzen nach Mann-Whitney-Test: $p^* \leq 0,1$; $p^{**} \leq 0,05$; $p^{***} \leq 0,005$)

Enterococcus spp.

Die Enterokokken-Population im *Colon ascendens* der Tiere beider Gruppen wies eine ähnliche Dynamik auf wie im Magen und im *Jejunum*. Zahlenmäßig war sie in der Saugperiode (7., 14. Tag) größer als nach dem Absetzen (31., 35., 56. Tag) (**Abb. 24-2A**), wohingegen ihre relativen Anteile im Unterschied zum Magen und *Jejunum* in der Saugperiode höher lagen als nach dem Absetzen (**Abb. 24-2B**). Wiederum analog zu Magen und *Jejunum* waren die ermittelten Werte in der Probiotikum-Gruppe signifikant höher als in der Kontrolle.

Escherichia spp.

Die Population von *Escherichia spp.* war an allen Beobachtungstagen im *Colon ascendens* der Probiotikum-Ferkel kleiner als in der Kontrollgruppe (**Abb. 25-1A**), wobei am 28., 31. und 56. Tag in den Proben der Probiotikum-Gruppe keine Amplifikationen registriert werden konnten. Gemessen an den absoluten Zellzahlen waren die Unterschiede zwischen beiden Gruppen nicht signifikant. Mit Blick auf die prozentualen Anteile von *Escherichia spp.* an der gesamten eubakteriellen Population ergaben sich hingegen am 7. und 35. Tag signifikante Unterschiede ($p=0,05$; $p=0,10$) (**Abb. 25-2A**).

Bifidobacterium spp.

Die *Colon*-Proben der Tiere beider Gruppen waren häufiger *Bifidobacterium spp.*-positiv als die entsprechenden Magen- und *Jejunum*-Proben. Die ermittelten Werte waren aber wiederum zumeist statistisch nicht signifikant. Wie in Magen und *Jejunum* war am 28. Tag die Bifidobakterien-Population im *Colon ascendens* der Probiotikum-Gruppe weniger zahlreich als jene der Kontrollgruppe ($p=0,11$) (**Abb. 25-2A**). Rein numerisch war der Anteil von Bifidobakterien an der gesamten eubakteriellen Population – wie bei den Laktobazillen – in der Kontrollgruppe höher als bei den Probiotikum-Tieren (**Abb. 25-2B**).

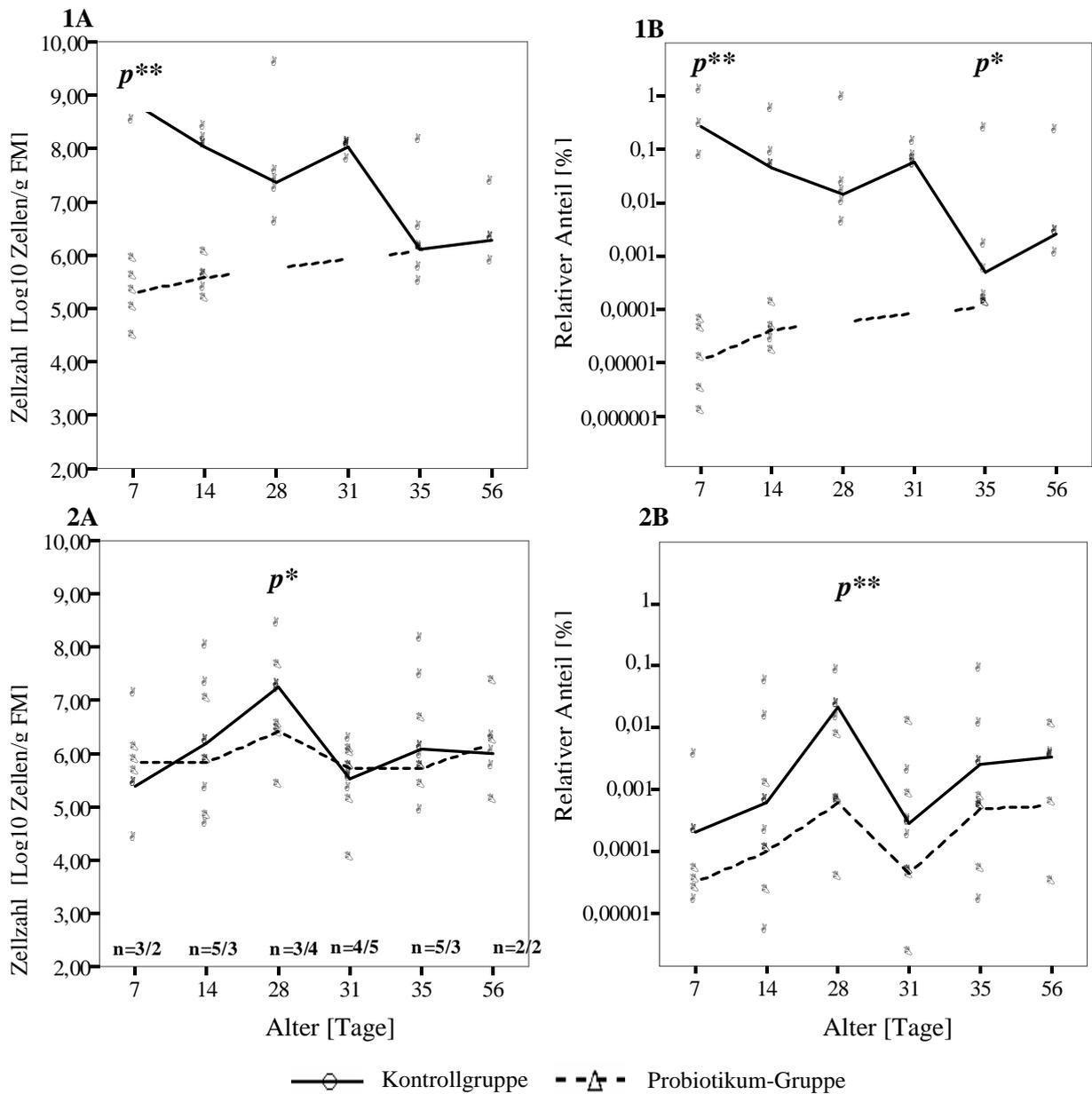


Abb. 25: Populationen von *Escherichia spp.* (1) und *Bifidobacterium spp.* (2) im *Colon ascendens* der Versuchsferkel

(Mediane und einzelne Werte; Reihe A – Zellzahl/g Inhalt (Feuchtmasse); Reihe B – prozentuale Anteile der bakteriellen Gruppe an der gesamten eubakteriellen Population; *p*-Signifikanzen nach Mann-Whitney-Test: *p**≤0,1; *p***≤0,05)

3.5.5 Quantität von *Lactobacillus spp.*- und *Enterococcus spp.*-Arten

Der Einfluss des probiotischen *E. faecium* NCIMB 10415 auf bakterielle Populationen einzelner Stämme im *Colon* der Versuchstiere wurde wie im Magen und im *Jejunum* anhand der phylogenetisch nahverwandten *E. faecium* und *E. faecalis* sowie einzelner Laktobazillen-Stämme (*L. acidophilus*, *L. amylovorus*, *L. johnsonii*, *L. mucosae* und *L. reuteri*) untersucht.

L. acidophilus

Die Quantifizierung der spezifischen 16S rDNA-Sequenz von *L. acidophilus* im *Colon* der Versuchstiere zeigte die gleiche Tendenz wie in Magen und *Jejunum*: Sowohl in der Probiotikum-Gruppe als auch in der Kontrolle waren insgesamt nur wenige Proben *L. acidophilus*-positiv. Rein numerisch war am 7. Tag in der Probiotikum-Gruppe die *L. acidophilus*-Population zahlreicher als die der Kontrollgruppe. Analog zum Magen und zum distalen *Jejunum* wurden in den *Colon*-Proben der Kontrollgruppe am 56. Tag keine *L. acidophilus*-positiven Signale registriert (**Tab. A35** im Anhang).

L. amylovorus* / *L. sobrius

Die Bestimmung der spezifischen 16S rDNA-Sequenz von *L. amylovorus/L. sobrius* wies teilweise gleiche Tendenzen wie im Magen und im *Jejunum* auf: In der Saugperiode (7., 14. Tag) und nach dem Absetzen (56. Tag) war die *L. amylovorus/L. sobrius*-Population in der Probiotikum-Gruppe größer als die der Kontrollgruppe, wobei die Unterschiede zwischen beiden Fütterungsgruppen am 7. und 56. Tag statistisch nur als Trend zu bezeichnen waren ($p=0,10$, $p=0,07$, vgl. **Tab. A35** im Anhang). Die Gabe des Prästarters führte in der Probiotikum-Gruppe zur Abnahme der Zellzahl von *L. amylovorus* – die Werte der Kontrollgruppe lagen entsprechend höher als bei den Probiotikum-Tieren (**Abb. 26-1A**). Die Anteile von *L. amylovorus* an der gesamten Laktobazillen-Population betreffend wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede registriert. Rein numerisch waren diese Werte in der Saugperiode am 7., 14. Tag und nach dem Absetzen am 56. Tag höher als in der Kontrollgruppe (**Abb. 26-1B**).

L. johnsonii

Bei der Besiedlung des *Colon ascendens* mit *L. johnsonii* sind sowohl in der Saugperiode als auch nach dem Absetzen in der Probiotikum-Gruppe höhere Werte zu verzeichnen als in der Kontrollgruppe ($p=0,02-0,10$) (**Abb. 26-2A**). Auch hinsichtlich der prozentualen Anteile waren die Werte der Probiotikum-Gruppe signifikant höher als in der Kontrolle ($p=0,01-0,10$) (**Abb. 26-2B**). Die Entwicklung der *L. johnsonii*-Population über die Zeit entsprach im Großen und Ganzen der im *Jejunum*: Nach dem Absetzen wurde das *Colon ascendens* der Versuchstiere stärker von *L. johnsonii* besiedelt als in der Saugperiode. Die *L. johnsonii*-Werte sind tabellarisch im Anhang zusammengefasst (**Tab. A35**).

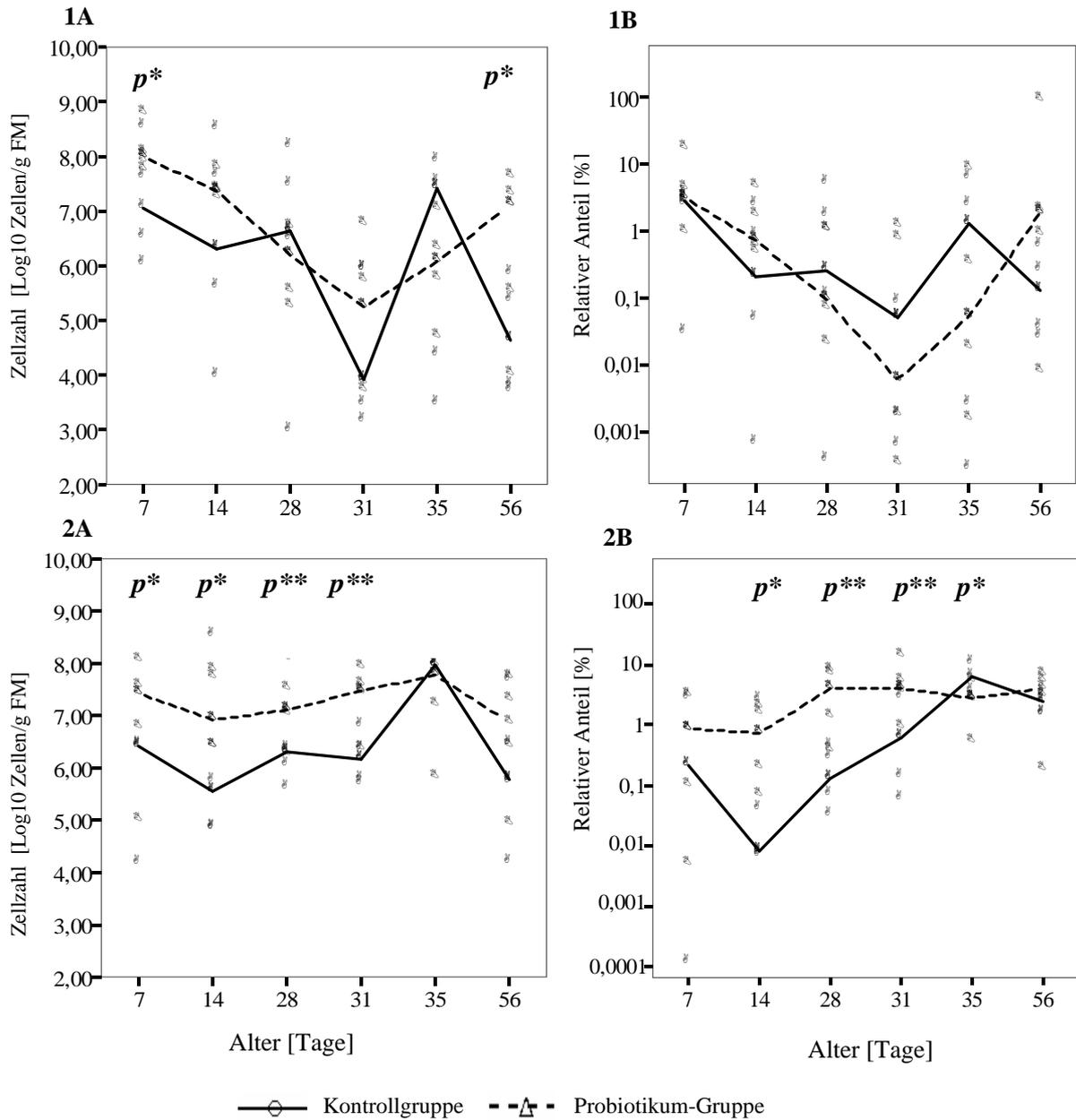


Abb. 26: Populationen von *L. amylovorus* (1) und *L. johnsonii* (2) im *Colon ascendens* der Versuchsferkel

(Mediane und einzelne Werte; Reihe A - Zellzahl/g Inhalt (Feuchtmasse); Reihe B - prozentuale Anteile der bakteriellen Gruppe an der gesamten Laktobazillen-Population; *p*-Signifikanzen nach Mann-Whitney-Test: $p^* \leq 0,1$; $p^{**} \leq 0,05$)

L. mucosae

Die Quantifizierung der spezifischen 16S rDNA-Sequenz von *L. mucosae* zeigte, dass am 7., 14., 35. und 56. Tag die *L. mucosae*-Population der Probiotikum-Gruppe zahlenmäßig größer war als die der Kontrollgruppe (7. Tag $p=0,10$) (Abb. 27-1A und Tab. A36 im Anhang). Am 7., 14., 28. und 31. Tag übertrafen auch die prozentualen Anteile von *L. mucosae* an der gesamten Laktobazillen-Population in der Probiotikum-Gruppe jene in der Kontrolle (28. Tag $p=0,11$) (Abb. 27-1B).

L. reuteri

Die Dynamik der *L. reuteri*-Population im *Colon ascendens* der Versuchstiere entsprach im Großen und Ganzen der in Magen und *Jejunum*: In der Saugperiode (7., 14., 28. Tag) wurde das *Colon* stärker von *L. reuteri* besiedelt als nach dem Absetzen (35., 56. Tag). In der Saugperiode (7. Tag) und nach dem Absetzen (31., 35. und 56. Tag) war die *L. reuteri*-Population in der Probiotikum-Gruppe größer als in der Kontrollgruppe. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen beiden Fütterungsgruppen konnten jedoch nur für am 56. Tag ermittelt werden ($p=0,04$) (Abb. 27-2A, Tab. A36 im Anhang). Die prozentualen Anteile an der gesamten Laktobazillen-Population waren in der Gruppe der Probiotikum-Ferkel am 7., 28., 31., 35. und 56. Tag höher als in der Kontrollgruppe. Die Unterschiede waren aber, wie bei den absoluten Zellzahlen, nur am 56. Tag statistisch signifikant ($p=0,02$) (Abb. 27-2B).

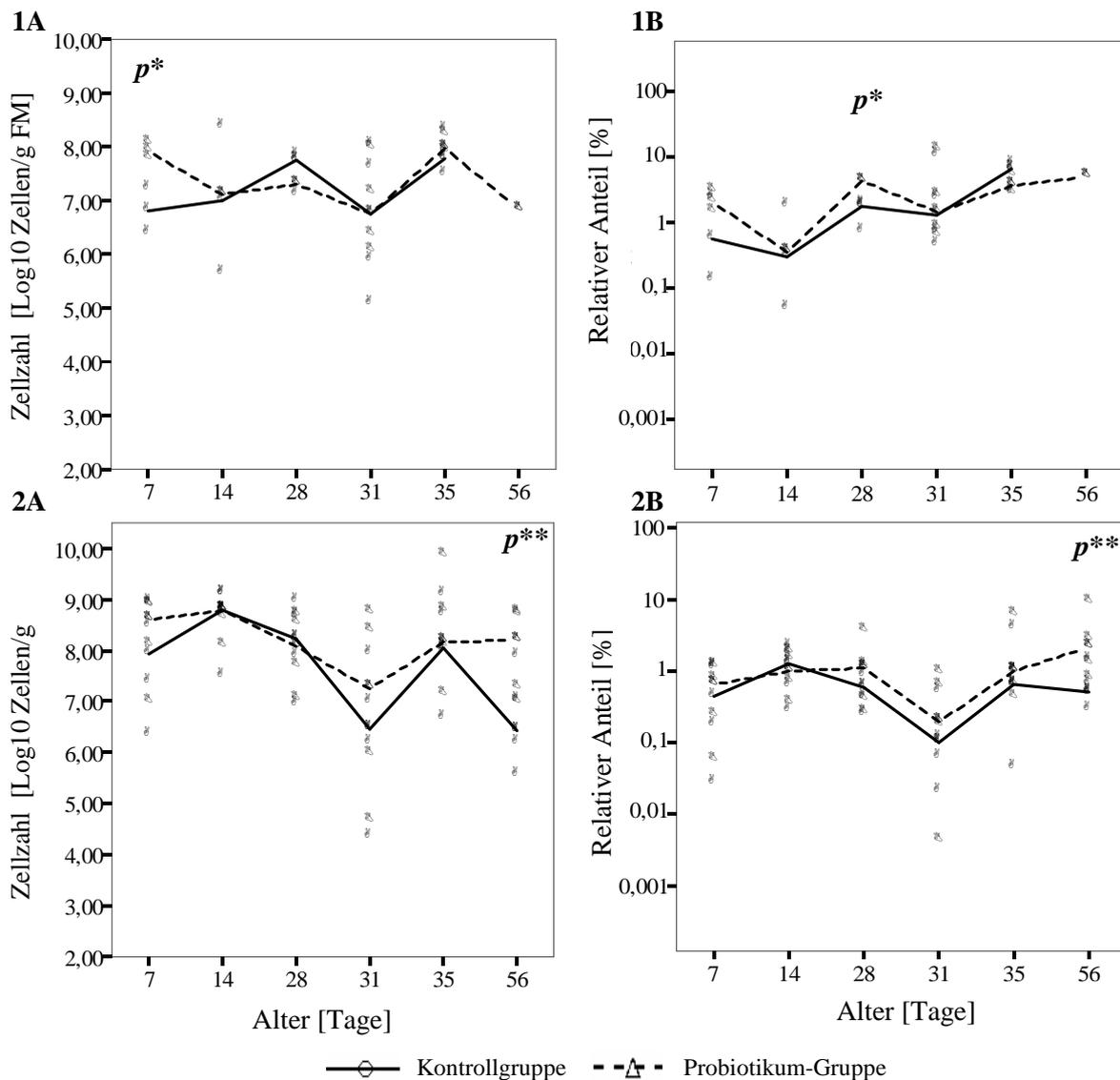


Abb. 27: Populationen von *L. mucosae* (1) und *L. reuteri* (2) im *Colon ascendens* der Versuchsferkel

(Mediane und einzelne Werte; Reihe A - Zellzahl/g Inhalt (Feuchtmasse); Reihe B - prozentuale Anteile der Spezies an der gesamten Laktobazillen-Population; p -Signifikanzen nach Mann-Whitney-Test: $p^* \leq 0,1$; $p^{**} \leq 0,05$)

E. faecium

Wie beim *Jejunum*, so waren auch bei den *Colon ascendens*-Proben der Versuchstiere nur einige *E. faecium*-positiv. Dabei waren in der Probiotikum-Gruppe mehr positive Proben zu konstatieren als in der Kontrollgruppe. Gemessen an der Zahl positiver Proben wurde das *Colon* der Probiotikum-Tiere in der Saugperiode (7., 14. Tag) stärker mit *E. faecium* besiedelt als nach dem Absetzen (28., 35., 56. Tag). Die prozentualen Anteile von *E. faecium* an der gesamten Enterokokken-Population in der Probiotikum-Gruppe lagen im Bereich von 6,10-35,32%, was deutlich die für Magen und *Jejunum* gemessenen Werte übertrifft (**Tab. 29**).

E. faecalis

E. faecalis-positive *Colon*-Proben konnten, wie bereits bei Magen und *Jejunum*, nur vereinzelt beobachtet werden. Am 7. und 31. Tag war die *E. faecalis*-Population in der Probiotikum-Gruppe größer, am 14. und 28. Tag dagegen in der Kontrollgruppe. Nach dem Absetzen (35. und 56. Tag) war in der Probiotikum-Gruppe keine *E. faecalis*-positive Amplifikation zu ermitteln. Bei den relativen Anteilen waren die Werte der Kontrolltiere höher als die der Probiotikum-Ferkel.

Tab. 29: Zelldichte der *E. faecium*-/*E. faecalis*-Population im *Colon ascendens* der Versuchsferkel

Alter	Zellzahl [Log 10 Zellen/g FM]				Anteil an der gesamten Enterokokken-Population [%]			
	Kontrolle (N=5) ^b	Probiotikum ^a (N=5)	n ^c	P ^d	Kontrolle (N=5)	Probiotikum (N=5)	n	P
<i>E. faecium</i>								
7	ND ^e	6,98^f (6,84-7,53)	0/4	-	ND	35,32 (22,44-79,75)	0/4	-
14	5,94	6,37 (5,12-7,31)	1/4	0,48	12,16	17,19 (3,80-114,10)	1/4	0,48
28	ND	4,58	0/1	-	ND	2,77	0/1	-
31	ND	ND	0/0	-	ND	ND	0/0	-
35	ND	5,48	0/1	-	ND	29,70	0/1	-
56	ND	4,46	0/1	-	ND	6,10	0/1	-
<i>E. faecalis</i>								
7	3,94	4,58 (4,34-5,53)	1/4	0,15	0,12	0,19 (0,06-0,76)	1/4	0,62
14	4,42 (4,26-4,98)	3,65 (2,64-4,47)	3/3	0,27	1,56 (0,97-38,39)	0,05 (0,01-0,16)	3/3	0,05
28	3,88 (3,55-4,22)	2,67	2/1	0,22	4,90 (3,99-5,81)	0,03	2/1	0,22
31	3,57	3,77 (3,47-4,08)	1/2	-	2,36	3,90 (2,77-5,03)	1/2	0,22
35	ND	ND	0/0	-	ND	ND	0/0	-
56	3,49	ND	1/0	-	10,93	ND	1/0	-

a -Fütterungsgruppe; b - Anzahl der untersuchten Proben; c - Anzahl der positiven Ergebnisse von jeweils fünf untersuchten Proben (Kontrollgruppe/Probiotikum-Gruppe); d - Signifikanz nach Mann-Whitney-Test; e – Proben mit negativer Amplifikation; f - Median (minimaler Wert-maximaler Wert)

3.5.6 Laktat

Wie im Falle von Magen und *Jejunum* wurde die metabolische Aktivität der *Colon ascendens*-Mikrobiota anhand der Konzentrationen von L(+)- und D(-)-Isomeren begutachtet. Dabei ist zunächst festzuhalten, dass im *Colon ascendens* weniger Laktat gemessen wurde als im Magen und im *Jejunum*. Die Entwicklung des Gesamtlaktatgehalts entsprach in etwa der im Magen und teilweise im *Jejunum*: In der Saugperiode wurde mehr Laktat als nach dem Absetzen gemessen, wobei qualitativ an allen Beobachtungstagen außer dem 28. Tag im *Colon* der Probiotikum-Gruppe mehr Laktat gemessen wurde als in der Kontrolle. Dabei ergaben sich am 31., 35. und 56. Tag teilweise statistisch signifikante Unterschiede zwischen beiden Fütterungsgruppen ($p=0,04-0,11$) (**Abb. 28A, Tab. A37**).

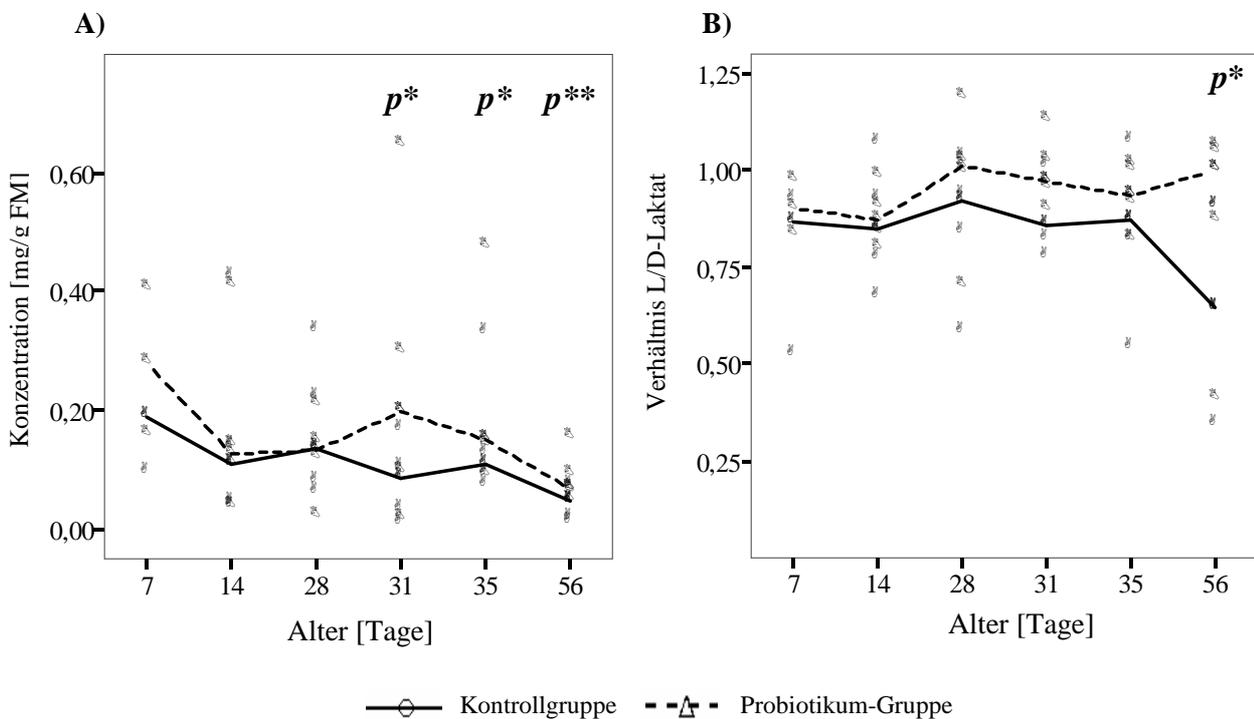


Abb. 28: Laktat im *Colon ascendens* der Versuchsferkel

(Mediane und einzelne Werte; **A** – Gesamtlaktat; **B** - Verhältnis L/D-Laktat; p -Signifikanzen nach Mann-Whitney-Test: $p^* \leq 0,1$, $p^{**} \leq 0,05$)

Bei der Untersuchung der prozentualen Anteile jedes Isomers am Gesamtmilchsäuregehalt zeigte sich, dass mit zunehmendem Alter das Verhältnis von L- zu D-Laktat weitgehend auf gleichem Niveau blieb. Dabei war der Anteil der D(-)-Isomere höher als der der L(+)-Isomere. Die relativen Werte für die L(+)-Isomere lagen in der Probiotikum-Gruppe zu allen Messzeitpunkten höher als in der Kontrolle. Die gruppenabhängigen Unterschiede erwiesen sich aber nur für den 56. Tag als statistisch signifikant ($p=0,10$) (**Tab. A38**).

Einen Überblick zur Dynamik der L(+) und D(-)Isomere des Laktats in Form des Verhältnisses von L- zu D-Laktat liefert **Abb. 28B**.

3.5.7 Ammoniumionen-Konzentration

Die proteolytische Aktivität der *Colon ascendens*-Mikrobiota wurde, analog zur Vorgehensweise beim *Jejunum*, anhand der Ammoniumionen-Konzentration bewertet. Dabei waren die gemessenen Werte insgesamt höher als im *Jejunum*, wobei im *Colon ascendens*, ebenfalls wie im *Jejunum*, mit zunehmendem Alter immer weniger Ammoniumionen nachgewiesen wurden (**Abb. 29, Tab. A39**). Die bei der Ammoniumionen-Messung ermittelten Werte zeigten die gleiche Tendenz wie im *Jejunum*: Die NH_3 -Konzentration in den Proben der Probiotikum-Tiere war niedriger als bei der Kontrollgruppe, mit Ausnahme des 56. Tags. Wiederum wie schon beim *Jejunum* war der Unterschied statistisch insignifikant.

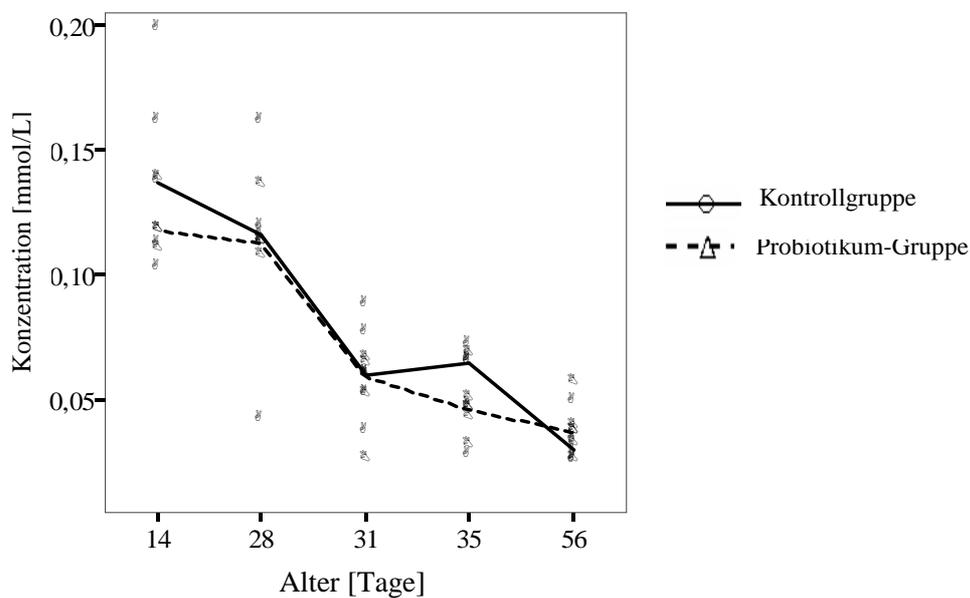


Abb. 29: Ammoniumionen-Gehalt im *Colon ascendens* der Versuchsferkel (Mediane und einzelne Werte)

3.5.8 Konzentration von flüchtigen Fettsäuren im *Colon ascendens*

Um die metabolische Aktivität der gesamten *Colon*-Mikrobiota zu bewerten, wurden, analog zum *Jejunum*, die Gehalte von Essig-, Propion-, *i,n* Butter- und *i,n* Valeriansäure sowie ihre Summe ermittelt.

Gesamtazidität und Essigsäure

Eingangs ist zu bemerken, dass sich im *Colon* beider Gruppen im Vergleich zum *Jejunum* deutlich mehr flüchtige Fettsäuren fanden. Dabei lag die Summe aller gemessenen Fettsäuren am 7., 31. und 56. Tag in der Probiotikum-Gruppe höher als in der Kontrollgruppe (**Abb. 30**).

ERGEBNISSE

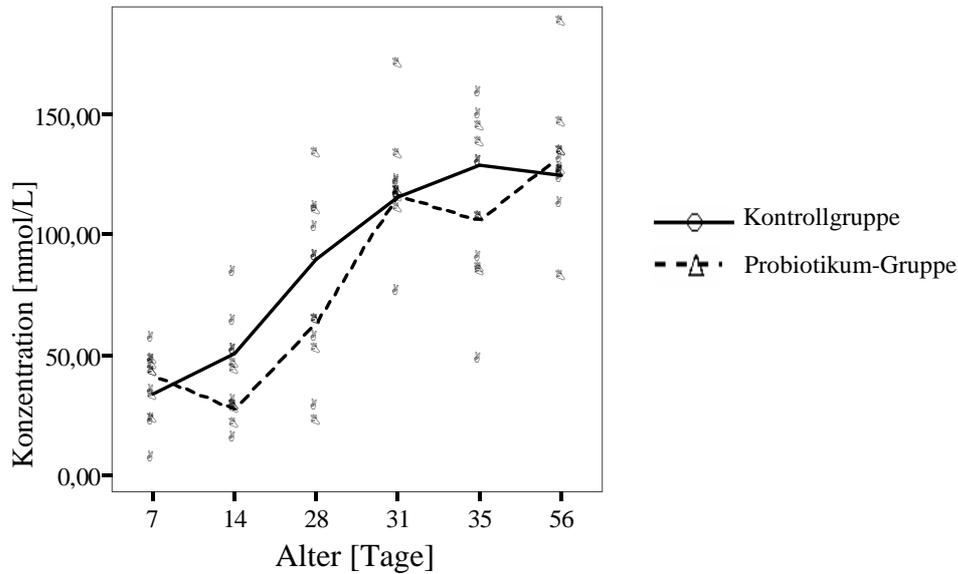


Abb. 30: Gehalt von flüchtigen Fettsäuren (Summe aller gemessenen Fettsäuren, mmol/L) im *Colon ascendens* der Versuchsferkel (Mediane und einzelne Werte)

In der Probiotikum-Gruppe war an diesen Tagen auch die Essigsäurekonzentration höher als in der Kontrolle, ohne dass statistisch signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen zu verzeichnen gewesen wären (**Tab. 30**). Mit Blick auf die zeitliche Entwicklung bei der Essigsäure in beiden Gruppen zeigte sich analog zum *Jejunum*, dass die Konzentration (in absoluten Werten wie in prozentualen Anteilen) nach Beginn der Gabe von Festfutter und nach dem Absetzen (31., 35., 56. Tag) insgesamt höher war als in der Saugperiode. Die Prozentanteile der Essigsäure an allen Fettsäuren waren in der Probiotikum-Gruppe an allen Tagen mit Ausnahme des 7. Tag höher und teilweise tendenziell größer als in der Kontrollgruppe.

Tab. 30: Essigsäure-Gehalt im *Colon ascendens* der Versuchsferkel

	Konzentration [mmol/L]				Relativer Anteil [in % der Summe aller gemessenen flüchtigen Säuren]		
	Kontrolle	Probiotikum ^a	<i>n</i> ^b	<i>P</i> ^c	Kontrolle	Probiotikum	<i>P</i>
7	22,45^d (3,43-33,15)	23,85 (13,34-26,59)	4/5	1,00	62,04 (57,21-71,22)	58,05 (55,91-60,71)	0,10
14	24,58 (7,79-47,73)	23,43 (14,63-25,75)	5/5	0,75	56,31 (39,59-59,3)	61,63 (55,21-119,8)	0,10
28	50,09 (16,85-68,37)	40,91 (11,67-82,33)	5/5	0,92	60,79 (49,37-62,14)	62,19 (54,63-65,44)	0,35
31	66,89 (46,17-73,70)	77,51 (61,10-112,6)	5/5	0,18	60,23 (55,14-61,51)	65,55 (55,88-66,72)	0,11
35	80,36 (27,43-106,2)	64,31 (49,30-92,77)	5/5	0,75	62,23 (58,5-67,31)	63,86 (58,12-64,54)	0,75
56	70,89 (65,65-86,94)	81,70 (48,98-126,3)	5/5	0,47	58,82 (56,24-69,87)	63,40 (55,43-67,55)	0,75

a - Fütterungsgruppe; b - Anzahl der untersuchten Proben; c - Signifikanz nach Mann-Whitney-Test; d - Median (minimaler Wert-maximaler Wert)

Propionsäure

Die Konzentration der Propionsäure lag in der Probiotikum-Gruppe, wie schon beim *Jejunum*, während der Milchdiät (7., 14. Tag) und am 56. Tag höher als in der Kontrollgruppe, nach Gabe des Prästarters (28. Tag) und nach dem Absetzen (31., 35. Tag) hingegen niedriger. Statistisch signifikante Unterschiede ergaben sich nur bezüglich der prozentualen Verhältnisse am 28. Tag ($p=0,009$) (**Tab. 31**). Wie bei der Essigsäure lag die Konzentration der Propionsäure in beiden Gruppen in der Saugperiode niedriger als nach dem Absetzen, die Anteile am gesamten Säuregehalt dagegen im Gegensatz zur Essigsäure in der Saugperiode höher.

Tab. 31: Propionsäure-Gehalt im *Colon ascendens* der Versuchsferkel

Alter	Konzentration [mmol/L]				Relativer Anteil [in % der Summe aller gemessenen flüchtigen Säuren]		
	Kontrolle	Probiotikum ^a	<i>n</i> ^b	<i>P</i> ^c	Kontrolle	Probiotikum	<i>P</i>
7	5,52^d (0,94-16,94)	9,80 (5,58-14,07)	4/5	0,33	20,69 (12,69-30,46)	26,76 (21,19-31,36)	0,22
14	8,37 (4,22-18,49)	9,62 (0,91-12,22)	5/5	0,92	22,31 (8,36-30,52)	25,62 (3,36-49,24)	0,75
28	18,22 (5,88-27,96)	10,19 (3,90-24,69)	5/5	0,35	21,56 (19,79-28,39)	16,90 (16,09-18,65)	0,009
31	29,83 (17,08-33,57)	26,00 (20,52-35,24)	5/5	0,75	24,80 (22,75-27,68)	20,77 (17,66-28,73)	0,11
35	25,21 (7,87-32,06)	20,71 (17,40-29,90)	5/5	0,92	19,74 (15,98-22,51)	20,80 (18,71-24,42)	0,60
56	24,88 (19,28-28,96)	26,18 (17,70-31,93)	5/5	0,75	19,88 (15,5-25,32)	18,90 (16,04-24,01)	0,60

a -Fütterungsgruppe; b - Anzahl der untersuchten Proben; c - Signifikanz nach Mann-Whitney-Test; d - Median (minimaler Wert-maximaler Wert)

***n*-Buttersäure**

Der *n*-Buttersäure-Gehalt im *Colon ascendens* der Probiotikum-Tiere war wie im *Jejunum* nach dem Absetzen (31., 35. und 56. Tag) höher als in der Kontrollgruppe. In der Saugperiode, mit Ausnahme des 7. Tag, lagen hingegen die entsprechenden Werte in der Probiotikum-Gruppe niedriger als in der Kontrolle (**Tab. 32**). Im Unterschied zum *Jejunum* zeigte die Entwicklung über die Zeit bei der *n*-Buttersäure eine Tendenz: Nach dem Absetzen ergaben sich sowohl absolut als auch relativ höhere Werte der *n*-Buttersäure als in der Saugperiode. Als tendenziell signifikant erwies sich allerdings nur ein Unterschied bei den prozentualen Anteilen (28. Tag, $p=0,11$).

ERGEBNISSE

Tab. 32: n-Buttersäure-Gehalt im *Colon ascendens* der Versuchsferkel

	Konzentration [mmol/L]				Relativer Anteil [in % der Summe aller gemessenen flüchtigen Säuren]		
	Kontrolle	Probiotikum ^a	n ^b	P ^c	Kontrolle	Probiotikum	P
7	2,10^d (0,41-6,13)	3,48 (1,86-3,79)	4/5	0,46	7,32 (4,83-13,17)	8,47 (5,96-9,23)	0,46
14	8,58 (0,94-15,31)	2,81 (1,33-4,19)	5/5	0,25	10,97 (6,77-24,66)	6,94 (4,91-21,43)	0,25
28	10,17 (2,06-13,06)	5,98 (3,52-17,49)	5/5	0,75	9,32 (7,36-12,87)	11,99 (9,43-16,50)	0,11
31	10,44 (7,10-17,32)	12,59 (12,36-15,38)	5/5	0,47	9,46 (8,01-15,01)	10,72 (9,06-11,51)	0,75
35	14,94 (5,25-18,33)	15,45 (8,57-19,13)	5/5	0,75	11,19 (9,47-13,09)	11,94 (10,27-14,64)	0,25
56	17,47 (13,99-20,66)	21,06 (10,29-22,31)	5/5	0,60	13,86 (11,24-16,99)	12,71 (10,54-15,84)	0,60

a - Fütterungsgruppe; b - Anzahl der untersuchten Proben; c - Signifikanz nach Mann-Whitney-Test; d - Median (minimaler Wert-maximaler Wert)

n-Valeriansäure

Der Gehalt von *n-Valeriansäure* im *Colon ascendens* der Probiotikum-Ferkel war absolut wie relativ am 7. und 56. Tag höher und am 14., 28., 31. und 35. Tag niedriger als in der Kontrolle. Tendenzielle Unterschiede zwischen den Gruppen konnten allerdings erneut nur bei einigen prozentualen Anteilen registriert werden (7. Tag, $p=0,09$; 31. Tag, $p=0,11$) (**Tab. 33**). Wie bei der Essig- und *n-Buttersäure* wurde auch von der *n-Valeriansäure* in der Saugperiode insgesamt weniger gebildet als nach dem Absetzen.

Tab. 33: n-Valeriansäure-Gehalt im *Colon ascendens* der Versuchsferkel

Alter	Konzentration [mmol/L]				Relativer Anteil [in % der Summe aller gemessenen flüchtigen Säuren]		
	Kontrolle	Probiotikum ^a	n ^b	P ^c	Kontrolle	Probiotikum	P
7	0,25^d (0,22-0,30)	0,35 (0,16-1,48)	3/5	0,09	0,54 (0,53-1,04)	0,96 (0,74-3,34)	0,18
14	1,37 (0,36-2,61)	0,91 (0,30-1,50)	4/5	0,33	1,95 (1,03-4,20)	2,18 (1,17-6,10)	0,62
28	2,35 (0,62-3,89)	1,66 (0,93-2,74)	5/5	0,92	2,62 (1,16-3,53)	2,52 (1,99-4,34)	0,92
31	2,90 (1,31-3,37)	2,47 (1,79-3,04)	5/5	0,60	2,41 (1,74-2,92)	2,05 (1,46-2,66)	0,11
35	3,44 (1,56-6,11)	1,90 (1,58-4,43)	5/5	0,35	3,19 (2,18-4,12)	2,27 (1,15-4,20)	0,47
56	2,54 (1,40-6,80)	4,88 (1,50-5,52)	5/5	0,35	2,28 (1,07-5,39)	3,60 (1,04-3,93)	0,47

a - Fütterungsgruppe; b - Anzahl der untersuchten Proben; c - Signifikanz nach Mann-Whitney-Test; d - Median (minimaler Wert-maximaler Wert)

i-Buttersäure

Die absolute Produktion von *i-Buttersäure* im *Colon ascendens* der Probiotikum-Tiere war am 14. und 35. Tag geringer als in der Kontrollgruppe. Gemessen am Prozentanteil an allen Fettsäuren lag der Gehalt der *i-Buttersäure* in der Probiotikum-Gruppe am 14., 28., 31. und 35. Tag niedriger als in der Kontrollgruppe. Am 7. und 56. Tag dagegen lagen sowohl die absolu-

ERGEBNISSE

ten Werte als auch die relativen Anteile der *i*-Buttersäure im *Colon* der Probiotikum-Ferkel höher als bei der Kontrolltiere (56. Tag $p=0,11$) (**Tab. 34**). Im Unterschied zum *Jejunum* wurde in der Saugperiode insgesamt mehr *i*-Buttersäure produziert als nach dem Absetzen.

Tab. 34: *i*-Buttersäure-Gehalt im *Colon ascendens* der Versuchsferkel

Alter	Konzentration [mmol/L]				Relativer Anteil [in % der Summe aller gemessenen flüchtigen Säuren]		
	Kontrolle	Probiotikum ^a	<i>n</i> ^b	<i>P</i> ^c	Kontrolle	Probiotikum	<i>P</i>
7	0,43^d (0,21-1,40)	0,63 (0,28-0,90)	3/5	0,88	0,98 (0,92-2,51)	1,38 (1,26-2,04)	0,46
14	1,66 (0,19-5,38)	0,78 (0,41-1,22)	5/5	0,35	2,74 (1,34-8,66)	1,89 (1,51-3,98)	0,47
28	1,54 (0,61-2,85)	1,75 (0,30-2,26)	5/5	0,92	2,03 (1,22-2,81)	1,61 (1,4-4,44)	0,92
31	1,42 (1,05-1,59)	1,65 (1,06-1,98)	5/5	0,25	1,31 (0,87-1,89)	1,08 (0,81-1,73)	0,92
35	1,13 (0,76-3,98)	0,91 (0,48-1,52)	5/5	0,47	1,02 (0,59-3,62)	0,98 (0,45-1,4)	0,47
56	0,44 (0,23-0,97)	1,18 (0,29-1,92)	5/5	0,18	0,35 (0,17-0,77)	0,94 (0,24-1,03)	0,12

a - Fütterungsgruppe; b - Anzahl der untersuchten Proben; c - Signifikanz nach Mann-Whitney-Test; d - Median (minimaler Wert-maximaler Wert)

***i*-Valeriansäure**

Die Konzentration der *i*-Valeriansäure im *Colon ascendens* lag in der Probiotikum-Gruppe sowohl hinsichtlich der absoluten Werte als auch mit Blick auf die Prozentanteile niedriger als in der Kontrolle (signifikant am 56. Tag, $p=0,04$) (**Tab. 35**). In der Saugperiode (7., 14. und 28. Tag) lag bei den Probiotikum-Ferkeln auf Basis der absoluten Werte die *i*-Valeriansäure-Konzentration höher, die prozentualen Anteile hingegen niedriger als in der Kontrollgruppe. Wie bei der *i*-Buttersäure nahm die Konzentration der *i*-Valeriansäure nach dem Absetzen im Vergleich zur Saugperiode stark ab.

Tab. 35: *i*-Valeriansäure-Gehalt im *Colon ascendens* der Versuchsferkel

Alter	Konzentration [mmol/L]				Relativer Anteil [in % der Summe aller gemessenen flüchtigen Säuren]		
	Kontrolle	Probiotikum ^a	<i>n</i> ^b	<i>P</i> ^c	Kontrolle	Probiotikum	<i>P</i>
7	0,82^d (0,68-2,47)	1,74 (0,58-2,15)	4/5	0,81	4,34 (1,47-13,62)	4,00 (2,54-4,86)	0,46
14	1,54 (0,08-9,02)	1,56 (1,04-2,01)	5/5	0,92	5,06 (0,16-14,53)	4,40 (3,97-7,97)	0,92
28	2,93 (1,27-4,13)	3,03 (1,04-3,67)	5/5	0,92	3,25 (2,84-4,65)	4,78 (2,27-7,21)	0,60
31	1,81 (1,20-2,23)	2,05 (0,89-2,45)	5/5	0,47	1,50 (1,04-2,65)	1,20 (0,81-2,14)	0,75
35	1,51 (1,46-4,00)	1,13 (1,06-1,54)	5/5	0,05	1,69 (0,98-6,56)	1,06 (0,78-1,82)	0,25
56	1,30 (0,66-2,41)	0,82 (0,73-1,82)	5/5	0,47	0,99 (0,59-1,98)	0,97 (0,55-1,03)	0,35

a - Fütterungsgruppe; b - Anzahl der untersuchten Proben; c - Signifikanz nach Mann-Whitney-Test; d - Median (minimaler Wert-maximaler Wert)

3.5.9 Zusammenfassung *Colon ascendens*

Während der Saugphase (7., 14. Tag) wies das probiotische *E. faecium* NCIMB 10415 eine fördernde Wirkung auf *Lactobacillus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Bifidobacterium spp.* und auf alle getesteten Spezies auf. Wie bereits im Magen, so lagen auch im *Colon ascendens* die prozentualen Anteile dieser bakteriellen Gruppen in der Probiotikum-Gruppe höher als in der Kontrollgruppe – statistisch signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen ergaben sich allerdings nur für *Enterococcus spp.* und *L. johnsonii*. Analog zu Magen und *Jejunum* wurde eine hemmende Wirkung des untersuchten probiotischen Stamms auf *Escherichia spp.* beobachtet. In der Saugphase war außerdem – erneut wie schon im Magen – im *Colon ascendens* der Probiotikum-Gruppe eine relativ höhere Laktat-Konzentration (darunter insbesondere L(+)-Isomere) zu verzeichnen, wobei die Differenzen zwischen beiden Fütterungsgruppen wiederum statistisch nicht signifikant waren. Gleiches gilt für die Fettsäuren, wenngleich die prozentualen Anteile von Propion-, n-Butter und n-Valeriansäure bei den Probiotikum-Tieren höher lagen als in der Kontrolle.

Der Übergang zum Festfutter bzw. zur Verfütterung des Probiotikums in Form der Beimischung zum Starterfutter führte, analog zu Magen und *Jejunum*, zur Verringerung der Zellzahlen bei *Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *L. amylovorus*, *L. mucosae* und *L. reuteri*. Die prozentualen Anteile von *Enterococcus spp.*, *L. johnsonii*, *L. mucosae* und *L. reuteri* lagen allerdings in der Probiotikum-Gruppe höher als in der Kontrollgruppe, wohingegen die Population der *Escherichia spp.* sowohl absolut als auch relativ kleiner war als in der Kontrolle. Wie am 7. und 14. Tag wurden weiterhin in der Probiotikum-Gruppe höhere Laktat-Werte gemessen. Die Konzentration der flüchtigen Fettsäuren in beiden Gruppen zeigte keine statistisch signifikanten Unterschiede. Rein numerisch waren allerdings Konzentrationen von Essig- und n-Buttersäure in der Probiotikum-Gruppe höher als in der Kontrollgruppe.

Kurz nach dem Absetzen, am 31. Tag, war eine fördernde Wirkung von dem *E. faecium* NCIMB 10415 auf Populationen von *Lactobacillus spp.*, *Enterococcus spp.*, *L. amylovorus*, *L. johnsonii* und *L. reuteri* zu beobachten. Auch die prozentualen Anteile von *Enterococcus spp.*, *L. johnsonii* und *L. reuteri* waren in der Probiotikum-Gruppe höher als in der Kontrolle. Im Weiteren, am 35. Tag bzw. eine Woche nach dem Absetzen, wies der untersuchte probiotische Stamm eine fördernde Wirkung auf Populationen von *Enterococcus spp.* und *Lactobacillus spp.* auf. Ebenso wie am 31. Tag waren die prozentualen Anteile von *Enterococcus spp.* und *L. reuteri* in der Probiotikum-Gruppe größer. Sowohl am 31. Tag als auch am 35. Tag wurden in der Probiotikum-Gruppe höhere Laktat-Konzentrationen (L-Isomere) beobachtet. Bei den Konzentrationen von flüchtigen Fettsäuren ergaben sich insgesamt keine statistisch

signifikanten Unterschiede. Zahlenmäßig waren die Konzentrationen von Essig- und n-Buttersäure in der Probiotikum-Gruppe aber höher als in der Kontrolle.

Zum letzten Messzeitpunkt – vier Wochen nach dem Absetzen od. am 56. Tag – ließ sich wie bei Magen und *Jejunum* eine fördernde Wirkung von *E. faecium* NCIMB 10415 auf die Populationen von *Lactobacillus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Bifidobacterium spp.*, sowie alle gestesteten Laktobazillen-Stämme beobachten. Dabei lagen auch die prozentualen Anteile von *Enterococcus spp.* sowie sämtlicher Laktobazillen-Stämme (*L. reuteri*, *L. amylovorus*) in der Probiotikum-Gruppe höher als in der Kontrollgruppe. Analog zu den anderen Messlokalisationen wurden im *Colon ascendens* an diesem Tag bei den Probiotikum-Ferkeln höhere Laktatkonzentrationen gemessen. Ferner konnten höhere Gehalte flüchtiger Fettsäuren festgestellt werden: So waren bei den Probiotikum-Tieren die Konzentrationen von Essig-, Propion-, n-Butter, i-Butter und n-Valeriansäure höher als in der Kontrollgruppe.

4. DISKUSSION

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss des Probiotikums *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 auf die Mikrobiota des gastrointestinalen Traktes von Ferkeln unter Rückgriff auf molekularbiologische Methoden (Real-Time PCR, DGGE) zu untersuchen. Die Analyse sollte Aufschluss darüber geben, ob durch frühzeitigen Probiotikaeinsatz – ab dem 1. Lebens- tag – die gastrointestinale Mikroflora (vor allem *Lactobacillus spp.*) von Ferkeln quantitativ und qualitativ modifiziert werden kann. Dies und die Analyse der bakteriellen Stoffwechsel- aktivität sollten zeigen, ob die Widerstandsfähigkeit der Mikrobiota gegen Krankheitserreger an kritischen Lebenspunkten (Wechsel der Diät, Absetzen) durch Probiotikagabe erhöht wird. Weiterhin wurde mit dieser Forschungsstudie der Verbleib des zugeführten Stammes im gastrointestinalen Trakt der Ferkel untersucht und überprüft, ob die für die Analyse ausge- wählten Laktobazillen-Spezies einem probiotisch bedingten Einfluss unterliegen.

4.1 Methodenkritik

Der Einfluss des probiotischen *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 auf die gastrointestinale bakterielle Besiedlung der Ferkel wurde mithilfe der quantitativen Real-Time PCR untersucht. Durch Anwendung spezifischer Primer wurden in den untersuchten Proben sowohl die Quan- tität einzelner bakterieller Gruppen (*Enterococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Escherichia spp.*) als auch die Quantität der einzelnen Spezies (*Lactobacillus acidophi- lus*, *L. amylovorus/L. sobrius*, *L. johnsonii*, *L. mucosae*, *L. reuteri* sowie *Enterococcus faeci- um* und *Enterococcus faecalis*) erfasst. In einer Reihe von Vorversuchen wurden dabei einige analytische Charakteristika der Real-Time PCR im Vergleich zur klassischen Kultivierung ermittelt.

Es muss hervorgehoben werden, dass die Genauigkeit der Quantifizierung einzelner bakteriel- ler Gruppen und Spezies mittels des Nachweises spezifischer bakterieller Nukleinsäurese- quenzen (z.B. 16S od. 23S rDNA) bzw. mithilfe von RealTime-PCR von vielen Faktoren ab- hängt. Zu den wichtigsten zählt die Einwirkung verschiedener PCR-Inhibitoren. Die Einflussfaktoren (Inhibitoren) können sowohl Einfluss auf die Zelllyse während der DNA- Extraktion nehmen als auch die Nukleinsäure degradieren und die Aktivität der *Taq* DNA- Polymerase hemmen (KONTANIS & REED, 2006). Während der Durchführung der RealTi- me-PCR können die Inhibitoren auch die Aktivität der DNA-bindenden Farbe (z.B. SYBR Green I) schwächen, was eine Reduzierung der Farbmoleküle, die sich mit der doppelsträngi- gen DNA verbinden, bewirken, und auf diese Weise zu einer Blockierung der Fluoreszenz- signale und zu unkorrekten Ergebnissen führen kann (AL-SOUD & RÅDSTRÖM, 2000; MONIS et al., 2005).

Eine Reihe von Substanzen der Probenmatrix (z.B. Hämoglobin, Urin, Heparin, Glykogen, Fett, Ca²⁺, Phenol-Reste, Huminsäure, Schwermetalle) können als PCR-Inhibitoren bei der Durchführung der PCRs auftreten und zu einer deutlichen Verringerung der Effizienz der Reaktion führen (WILDE, 1990; WILSON, 1997; MONTEIRO et al., 1997). Auch Bakterien können inhibitorische extrazelluläre Substanzen (z.B. Polysacharide) produzieren, die zusammen mit anderen Inhibitoren nichtbakterieller Herkunft den Nachweis und die Quantifizierung der Zielsequenz einzelner Spezies in klinischen- oder Umwelt-Proben deutlich erschweren können (MONTEIRO et al., 1997; PIRNAY et al., 2000; KUBISTA et al., 2006). Um mögliche Komplikationen bei der Analyse zu verringern und die bestmögliche Präzision der Quantifizierung spezifischer DNA zu erreichen, wurden verschiedene Methoden entwickelt, welche die Gewinnung der DNA aus biologischem Material maximieren und die Zielsequenz vor PCR-Inhibitoren schützen. Infolge der raschen Entwicklung der molekularbiologischen DNA-Analytik, die vorwiegend auf der Amplifikation gewünschter Sequenzen basiert, wird allerdings regelmäßig von neuen möglichen PCR-Inhibitoren berichtet, so dass die Frage nach der Genauigkeit der Quantifizierung der spezifischen Sequenzen nicht abschließend beantwortet werden kann.

Die Berücksichtigung der inhibitorischen Effekte der Proben-Matrix sowie die Wirkung aller anderen möglichen Inhibitoren wurde bei der hier vorgestellten Real-Time PCR-Quantifizierung durch die Anwendung eines Standards, bestehend aus einer Kalibrierreihe aus DNA-Extrakten künstlich inokulierter Faeces-Proben, gewährleistet. Damit wurde auch die Vergleichbarkeit der Amplifikationsbedingungen bei den Standard- und Versuchsproben erreicht bzw. die Auswirkung möglichen Inhibitoren beachtet, um systematische Fehler bei der Durchführung der DNA-Extraktion und der darauf folgenden PCR auszuschließen.

Die Entscheidung für Faeces als Proben-Matrix erfolgte aufgrund seiner Komplexität und der Präsenz zahlreicher bekannter PCR-Inhibitoren. Zu diesen zählen sowohl komplexe und zellzahlreiche Bakterien als auch verschiedene Substanzen, die mit der Verdauung des Futters verbunden sind oder unverdauliche Reste des Futters darstellen (z.B. Gallensäure, Bilirubin, Lignine diätischer Fasern) (WILSON, 1997; MONTEIRO et al., 1997). Weiterhin wurde bei der Anwendung des Standards aus künstlich beimpften Proben die Tatsache berücksichtigt, dass für die Quantifizierung der Ziel-DNA mithilfe von Real-Time PCR vorwiegend Standards aus reinen bakteriellen Kulturen bzw. ihre dekadischen Verdünnungen verwendet werden, was allerdings ungenaue Ergebnisse bei der Quantifizierung der Bakterien in klinischen Proben zeitigen kann. In einer Reihe von Studien konnte mittels Real-Time PCR nachgewiesen werden, dass in solchen Standard-Proben die ermittelten Zellzahlen höher lagen als die

ursprüngliche Zellkonzentration, die für die Herstellung der Kalibrierreihe verwendet wurden (HE & JIANG, 2005; LAHTINEN et al., 2006; FU et al., 2006). Dies wird sowohl mit dem Fehlen inhibitorischer Effekte der Proben-Matrix als auch mit der Natur der 16S rRNA-Gene erklärt, die intensiv als Zielsequenz für die Detektierung einzelner Bakterien verwendet werden. Seit einigen Jahren ist bekannt, dass in genomischer DNA mehrere 16S rDNA-Operone existieren können (COLE & GIRON, 1994; FARELLY et al., 1995). Dabei kann die Anzahl der 16S rDNA-Operone pro bakterieller Zelle zwischen eins und 15 (bei *Clostridium paradoxum*) variiert (SHARMA et al., 2007). Entsprechend können verschiedene Sequenzen häufig auch mit unterschiedlicher Effizienz amplifiziert werden, was zur Unter- oder Überschätzung der Ausgangsmengen der detektierten Bakterien führen kann (MEIJERINK et al., 2001; TICHOPAD et al., 2003). Die Anwendung des *spiked-matrix*-Standards schließt dieses Problem nicht aus, das entsprechend bei der Interpretation der Ergebnisse beachtet werden muss. So zeigen SELIM et al. (2005), dass die mithilfe von Real-Time PCR und 16S rDNA-Primern detektierte Zellzahl von *Lactobacillus thermotolerans* in künstlich beimpften Faeces-Proben größer war als ihre ursprüngliche Konzentration im Inokulum (Reinkultur von *L. thermotolerans*).

Betrachtet man die Ergebnisse der Quantifizierung mit 16S rRNA-Primern, sollte zudem die Sequenz-Heterogenität der einzelnen 16S rDNA-Operone berücksichtigt werden, die innerhalb einer Spezies beobachtet werden kann. CARBON et al. konnten bereits 1979 nachweisen, dass sieben Gene, welche die 16S rDNA von *E. coli* kodieren, 16 variable Bereiche enthalten. Analoges wurde für *Paenibacillus polymixa* (NÜBEL et al., 1996), *Bacillus subtilis* (OGASAWARA et al., 1994), *Haemophilus influenzae* (FLEISCHMANN et al., 1995) und einige andere Spezies festgestellt.

Festgehalten werden muss weiter, dass die einzelnen bakteriellen Gruppen und Spezies für die vorliegende Arbeit ebenso anhand ihrer 16S rRNA-Gene quantifiziert wurden. Das Ziel bestand in der Quantifizierung der Populationen einzelner bakterieller Spezies, deren metabolische Aktivität indirekt anhand der Milchsäure-, Ammoniak- und flüchtige Fettsäurenkonzentrationen bewertet werden sollte. Aus diesem Grund wurden funktionelle Gene, die alternativ für die Detektion von Bakterien verwendet werden können und in einigen Fällen mehr Information (vor allem über die metabolische Aktivität) liefern als 16S rRNA-Gene, bei der Auswahl der Zielsequenzen (Primer) nicht berücksichtigt. Der Mangel an gesicherten Erkenntnissen über das Vorhandensein bestimmter funktioneller Gene bei für die Arbeit ausgewählten Spezies im Vergleich zu den umfassenden Sequenzinformationen für 16S rRNA-Gene (z.B. im online verfügbaren RIBOSOMAL DATABASE PROJECT II,

<http://rdp.cme.msu.edu/>) sowie die Verfügbarkeit entsprechend validierter Primer in bereits veröffentlichten Studien führten zur Wahl der 16S rRNA-Gene als Zielsequenz bei der Durchführung der hier vorgestellten Analyse.

Die Präzision der Quantifizierung (Spezifität und Sensitivität) der Real-Time PCR-Assays wurde anhand der Übereinstimmung der PCR-Ergebnisse mit Resultaten der klassischen Kultivierung bewertet. Aufgrund gewisser Komplikationen bei der Bestimmung einzelner Spezies bzw. Stämme bei der Verwendung der klassischen Kultivierung wurden die Ergebnisse beider Methoden nur mit Blick auf bakterielle Gruppen verglichen.

Es wurden Differenzen zwischen der Anzahl beimpfter Bakterien und den in selektiven Medien gewachsenen Kolonien festgestellt. Die errechneten Wiederfindungsraten erreichten Werte zwischen 4,3 und 53,9%. Die größten Unterschiede zwischen beimpften und später wiedergefundenen Zellzahlen (4,3%) wurden auf dem Medium BHI+1%Blut registriert, das für das Wachstum aller möglichen Bakterien geeignet sein soll. Dies scheint aber mit der Zusammensetzung des Inokulums zusammenzuhängen, das zu mehr als der Hälfte aus Bakterien der Gattung *Lactobacillus* bestand, die i.d.R. nur auf speziellen Medien wachsen können. Die Wiederfindungsrate der Laktobazillen betrug allerdings auch auf dem selektiven LAS-Agar nur 8,4%, was ebenfalls mit der Zusammensetzung des Inokulums erklärt werden muss: Die einzelnen Spezies wuchsen teilweise auch unter speziellen Bedingungen in dem flüssigen Medium sehr schlecht und waren möglicherweise auf dem allgemein für Laktobazillen entwickelten LAS-Agar nicht zum Wachstum fähig. Eine weitere Erklärung für die niedrigen Wiederfindungsraten auf selektiven Medien könnte mit dem physiologischen Zustand der bakteriellen Zelle verbunden sein. Es ist bereits bekannt, dass sowohl ungünstige Kultivierungsbedingungen (Temperatur, Sauerstoffkonzentration) als auch einzelne Komponente des Wachstumsmediums und der Probenmatrix die bakteriellen Zellen in einen lebendigen, aber nicht kultivierbaren (*viable but non-culturable*, VBNC) Zustand versetzen können (KELL et al., 1998; YAMAMOTO, 2000). Der Anteil unkultivierbarer Zellen kann dabei von einem Drittel bis zu 50% der gesamten bakteriellen Population betragen (APAJALAHTI et al., 2003; BEN-AMOR et al., 2005).

Bei Betrachtung der Sensitivität beider Methoden müssen auch die Messbereiche berücksichtigt werden, in welchen die Berechnung der ursprünglichen Konzentration möglich war. Bei der klassischen Kultivierung kann die Ausgangskonzentration des Probenmaterials normalerweise im Bereich von zwei bis drei Verdünnungsstufen ermittelt werden, während bei der Real-Time PCR spezifische DNA-Sequenzen sowohl in niedrigen als auch in hohen Konzentrationen akkurat zu ermitteln sind und der Messbereich 8-10 Verdünnungsstufen umfassen

kann. Die untere Nachweisgrenze der hier durchgeführten gruppenspezifischen Real-Time PCR-Assays lag im Bereich von 10^3 – für alle Eubakterien, Laktobazillen und Enterokokken – bis 10^4 bei *Escherichia spp.* Das Fehlen von Signalen bei Proben mit 10^1 - 10^2 inokulierten Zellen kann durch die unvollständige Homogenisierung des Inokulums in der Proben-Matrix bei der Herstellung der Standard-Proben und durch die mäßige Rückgewinnung bakterieller DNA in Proben mit niedrigeren Zellzahlen erklärt werden. Die ermittelten Nachweisgrenzen für die gruppenspezifischen Primer entsprechen im Ganzen den Ergebnissen einer Reihe weiterer Studien in diesem Bereich.

Abgesehen von den analytischen Nachteilen jeder Methode wurde festgestellt, dass zwischen den Ergebnissen der klassischen Kultivierung (gewachsene Kolonien) und der Real-Time PCR (Anzahl der amplifizierten DNA-Fragmente) ein positiver linearer Zusammenhang besteht: Der Korrelationskoeffizient (r^2) für *Lactobacillus spp.* und *Enterococcus spp.* lag bei 0,966 bzw. 0,916 und für die gesamten Eubakterien bei 0,807. Diese Ergebnisse korrespondieren mit jenen in vergleichbaren Arbeiten: Hohe Korrelationen zwischen bakteriellen Zellzahlen, die mittels klassischer Kultivierung und mittels Real-Time PCR detektiert wurden, werden in den Studien von FURET et al. (2002), JERVØE-STORM et al. (2005) und FU et al. (2006) ausgewiesen. Die im Vergleich zur Kultivierung größere Präzision der Ergebnisse der Real-Time PCR sowie die Einsparungen bei der Untersuchungszeit und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse machen die Real-Time PCR dabei gegenüber der gruppenspezifischen Quantifizierung von Bakterien zu einer attraktiven Alternative.

Als noch attraktiver stellt sich die Anwendung von Real-Time PCR für die Quantifizierung einzelner Spezies oder Stämme dar. Wie die gruppenspezifische weisen auch die speziesspezifischen Real-Time PCR-Assays eine hohe Sensitivität bei der Quantifizierung bakterieller Zellzahlen auf. So konnten einzelne Spezies im Bereich von 10^2 - 10^7 Zellen/g Darminhalt quantifiziert werden. Die errechneten Werte waren ebenso wie bei den gruppenspezifischen Assays hochlinear – die entsprechenden r^2 -Werte lagen im Bereich von 0,97-0,99, und die errechnete Effizienz betrug 82,0-98,83%, was wiederum den in der Literatur zu findenden Werten nahe kommt. KUBISTA et al. (2006) berichten in einer umfangreichen Studie, dass ein Wert von 90% eine typische Amplifikationseffizienz bei der Detektion von Bakterien in klinischen Proben darstellt.

Betrachtet man weitere Aspekte der Real-Time PCR, sollte erwähnt werden, dass die angewendeten Detektionssysteme (SYBR Green I und TaqMan-Hybridisierungsprobe) ebenfalls die Präzision der Quantifizierung der Ziel-DNA beeinflussen können. Dadurch dass SYBR Green I jede doppelsträngige DNA erkennt, zählt dieses System im Vergleich zu TaqMan-

Hybridisierungsproben zu den weniger spezifischen Detektionsmethoden (VALASEK & REPA, 2005; MONIS et al., 2005). Es wird auch berichtet, dass sowohl SYBR Green I selbst (in bestimmten Konzentrationen) als auch seine Degradationsprodukte als PCR-Inhibitoren wirken können (WITTEWERT et al. 1997; NATH et al., 2000; KARSAI et al., 2002). Da aber SYBR Green I (i) mit allen Primern kompatibel ist, (ii) im Falle unerwünschter Resultate die gesamte Reaktion meist nur eine Optimierung der PCR-Bedingungen und nicht des Primer-Designs benötigt und (iii) kostengünstiger ist als die TaqMan-Hybridisierungsprobe, bleibt die Anwendung des darauf basierenden Detektionssystems unter Forschern weltweit sehr verbreitet (MONIS et al. 2005, ZHANG & FANG, 2006). Aufgrund dieser Vorteile und der Möglichkeit, falsch-positive Ergebnisse mit der Real-Time PCR-Software mittels einer Schmelz-Kurven-Analyse der Amplifikationsprodukte zu kontrollieren, wurde SYBR Green I als Detektionssystem auch in den hier beschriebenen Real-Time PCR-Assays verwendet und erwies sich in durchgeführten Validierungen als spezifisch und sensitiv. Die gesamte eubakterielle Population, *Escherichia spp.* und *L. reuteri* wurden in der vorliegenden Arbeit allerdings mithilfe spezifischer TaqMan-Hybridisierungsproben detektiert, wobei die entsprechenden Assays variabelere und weniger homogene Werte (Ct-Werte, Effizienz) aufwiesen als die SYBR Green I-Assays. Abschließend muss erwähnt werden, dass weder die Ergebnisse der Quantifizierung spezifischer Sequenzen mithilfe von TaqMan-Proben noch anhand von SYBR Green I-Assays Schlussfolgerungen über den physiologischen Zustand der Zelle zu geben vermögen. Es werden spezifische DNA-Fragmente sowohl lebender als auch toter, beschädigter oder VNBC-Zellen amplifiziert bzw. quantifiziert (VALASEK & REPA, 2005).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass mithilfe der angewandten Real-Time PCR-Assays (im Vergleich zur Kultivierung) die ausgewählten bakteriellen Gruppen und Spezies spezifisch und sensitiv sowie mit großer zeitlicher Ersparnis und hoher Reproduzierbarkeit der Ergebnisse detektiert und quantifiziert werden können. Die Anwendung der Standards aus beimpften Proben berücksichtigt die Wirkung der mit der Proben-Matrix verbundenen PCR-Inhibitoren und garantiert dadurch die Präzision der Quantifizierung. Bei der Interpretation der Ergebnisse müssen aber sowohl die Natur der detektierten Sequenzen (besonders im Falle von 16S rRNA) als auch die Eigenschaften des angewandten Detektionssystems (SYBR Green I, TaqMan) beachtet werden. Auf Schlussfolgerungen hinsichtlich des physiologischen Zustands der bakteriellen Zellen bzw. ihrer metabolischen Aktivität sollte bei der Betrachtung der Real-Time PCR-Resultate daher verzichtet werden.

4.2 *E. faecium* NCIMB 10415 im Magen-Darm-Trakt der Ferkel

Für eine umfassende Darstellung des Einflusses des probiotischen *E. faecium* NCIMB 10415 auf die ausgewählten Parameter der gastrointestinalen Mikrobiota der Ferkel war es wichtig zu wissen, ob der verfütterte Stamm die verschiedenen Passagen im Darm übersteht und in welchem Umfang probiotischen Zellen wiederzufinden sind. Der probiotische Stamm wurde dabei quantitativ über eine SYBR-Green Real-Time PCR mit Primern detektiert, die spezifische Sequenzen der einzigartigen *Enterococcus faecium* NCIMB 10415-Plasmide enthalten.

Der Literatur zufolge kann ein probiotischer Stamm bakterielle Gemeinschaften nur beeinflussen, wenn er eine Konzentration von mindestens 10^6 - 10^8 koloniebildenden Einheiten (KbE) pro Gramm intestinalem Inhalt (Digesta) aufweist (FUJIWARA et al., 2001). Die Dosierung sollte dabei nach JONSSON & CONWAY (1992) täglich 10^9 - 10^{12} probiotische Zellen pro Tier oder 10^6 - 10^7 Zellen pro Gramm Futter betragen. Mit Blick auf die Zellzahlen pro Gramm intestinalem Inhalt muss auch erwähnt werden, dass es nur wenige Studien gibt, welche die Wiederfindungsraten verfütterter Bakterien bestimmt haben, und dass die Mehrzahl dieser Studien die probiotischen Bakterien mittels Kultivierung bestimmt haben. In Anbetracht des derzeitigen Kenntnisstandes bezüglich Physiologie und Lebenszyklus bakterieller Zellen und der Möglichkeiten präziser Detektierung von Bakterien auf molekularem Niveau sollten diese Resultate mit Bedacht betrachtet werden.

In der hier vorliegenden Analyse war die höchste Konzentration der probiotischen *E. faecium* NCIMB 10415-Zellen, unabhängig von der Dosierung, mit ca. 10^4 - 10^6 Zellen/g Feuchtmasse an allen Beobachtungstagen im *Colon ascendens* zu beobachten. Der Magen und das distale *Jejunum* waren signifikant weniger stark (ca. 10^2 - 10^4 Zellen/g FM) als das *Colon ascendens* mit dem probiotischen Stamm besiedelt, wobei im Magen wiederum signifikant höhere Zellzahlen registriert werden konnten als im *Jejunum*. Die hohen Zellzahlen im *Colon ascendens* weisen dabei auf die Fähigkeit der verfütterten probiotischen Zellen hin, den Transit durch Magen und Dünndarm in einem vermehrungsfähigen und hypothetisch auch metabolisch aktiven Zustand zu überleben. Des Weiteren können die verschiedenen Konzentrationen durch unterschiedliche Transitzeiten der Digesta bzw. Persistenzzeiten der probiotischen Zellen in den genannten Lokalisationen (FRETER, 1992) erklärt werden. NOUSIAINEN et al. (2004) vermuten, dass auch unterschiedliche physiologische und morphologische Bedingungen, die Anwesenheit bzw. das Fehlen spezifischer Adhäsionsrezeptoren oder eine mögliche Produktion inhibierender Substanzen durch indigene Stämme und Spezies die Konzentration und die Persistenzdauer probiotischer Bakterien beeinflussen können. Mit Ausnahme der absoluten

Zellzahlen¹ spiegeln die vorgelegten Ergebnisse die Resultate weiterer Studien zum Thema wider: MACHA et al. (2004) und STROMPFOVA et al. (2006) stellten bei der Detektion probiotischer Enterokokken im Magen-Darm-Trakt von Ferkeln ebenso fest, dass die proximalen Abschnitte des gastrointestinalen Traktes (Magen, Dünndarm) geringere probiotische Zellzahlen aufwiesen als die distalen (Dickdarm und *Rectum*).

Beim Vergleich der hier vorgestellten Ergebnisse mit den Resultaten anderer Studien müssen Unterschiede in den Messeinheiten – Zellzahl/g Feuchtmasse bzw. Zellzahl/g Trockenmasse – berücksichtigt werden. Da eine gewisse Massedifferenz zwischen Feucht- und Trockensubstanz besteht, liegen pro Gramm Trockensubstanz berechnete bakterielle Zellzahlen höher als Zellzahlen, die pro Gramm Feuchtmasse ermittelt werden. Auch die lokalen Differenzen (Magen, *Jejunum*, *Colon*) des Verhältnisses von Feucht- zu Trockenmasse müssen bedacht werden: Das Verhältnis beträgt im Magen 1:10, im *Jejunum* 1:6 und im *Colon* 1:2 (VAHJEN, 2007). Allerdings wurden in der vorliegenden Arbeit ebenso wie in den Studien von MACHA et al. (2004) und STROMPFOVA et al. (2006), mit denen die Ergebnisse primär verglichen werden, die Berechnungen im Hinblick auf die Feuchtmasse durchgeführt.

Hinsichtlich der zeitlichen Dynamik lässt sich festhalten, dass die stärkste Besiedlung des gastrointestinalen Traktes mit *E. faecium* NCIMB 10415-Zellen während der Saugphase bzw. während der Supplementierung des Probiotikums in Form des Inokulums mit $4,8 \times 10^9 (\pm 0,46 \times 10^9)$ KbE/ml pro Tag erfolgte. Detektiert wurden dabei Werte von 4,07 bis 6,31 (log Zellzahl/g Feuchtmasse). Mit Beginn der Gabe des Prästarters (ab dem 14. LT) erhielten die Tiere eine höhere Probiotikum-Dosierung von $4,8 \times 10^9 (\pm 0,46 \times 10^9)$ KbE/ml als Inokulum und $1,6 \times 10^7 (\pm 0,3 \times 10^7)$ KbE/g Futter als Beimischung. Die Konzentration der probiotischen Bakterien erhöhte sich aber in keiner der untersuchten Lokalisationen. Nach dem Absetzen und der Verringerung der probiotischen Dosis im Starterfutter (auf $4,1 \times 10^6 (\pm 3,9 \times 10^6)$ KbE/g) lagen die probiotischen Zellzahlen mit 3,31 bis 4,58 (log Zellzahl/g FM) niedriger als in der Saugphase. Abgesehen von den absoluten Zellzahlen entsprechen auch diese Ergebnisse jenen der bereits genannten Studien von MACHA et al. (2004), STROMPFOVA et al. (2006) und FUJIWARA (2001): Die maximale Wiederfindungsrate der probiotischen *E. faecium* NCIMB 10415, *E. faecium* EK 13 bzw. *Bifidobacterium longum* SBT 2928 wurde von den Autoren jeweils nach etwa einer Woche ab Beginn der Probiotikum-Supplementierung verzeichnet. Zu späteren Beobachtungspunkten bzw. nach weiterer Verfütterung des Probiotikums lagen die probiotischen Zellzahlen niedriger als vorher.

¹ Da die Detektion der probiotischen Bakterien in den analysierten veröffentlichten Studien mithilfe verschiedenen Methoden (Kultivierung auf dem Selektivmedium, RAPD-PCR, Kolonie-Hybridisierung) durchgeführt wurde, können die absoluten Zellzahlen aufgrund der divergierenden analytischen Möglichkeiten jeder angewandten Methode nur unter Berücksichtigung der Nach- und Vorteile jeder Methode verglichen werden.

Die Unfähigkeit der überschüssigen Mengen an probiotischen Zellen, ihre Kolonisierung im gastrointestinalen Trakt zu erhöhen, kann mit der Wirkung verschiedener Mechanismen erklärt werden, mit denen der Wirtsorganismus das Populationsniveau indigener und exogener Bakterien kontrolliert und in einem Gleichgewichtszustand hält. Dazu zählen spezifische Bedingungen des Magen-Darm-Traktes (pH, Sauerstoff, Gallensäuren), die Darm-Morphologie und Peristaltik, die Existenz der mukosalen Barriere und die Immunantwort des lokalen (Darm-)Immunsystems (z.B. TLRs, NLRs) (FRETER, 1992; BERG 1996; VAN KESSEL et al., 2004; FALK et al., 1998; HOOPER & GORDON, 2001; MAGALHAES et al., 2007). Auch Interaktionen probiotischer Bakterien mit anderen Mitgliedern der intestinalen Mikrobiota – sowohl durch Reaktionen auf antimikrobielle Komponenten (Bakteriozine) anderer Spezies und ihre metabolische Produkte (flüchtige Fettsäuren, Wasserstoffperoxid) als auch durch die Wirkung spezifischer Bakteriophagen – können auf verschiedene Weisen die probiotische Kolonisierung des Magen-Darm-Traktes negativ beeinflussen (DU TOIT et al., 2000; DE VUYST et al., 2003; RODRIGES et al., 2003; OUWEHAND & VESTERLUND 2004; COLLADO et al., 2005). Die genannten Gründe können so auch zur Erklärung der niedrigen Wiederauffindungen probiotischer Bakterien im gastrointestinalen Trakt beitragen. Je nach verwendetem Stamm (vorwiegend sind Daten über die probiotischen Laktobazillen und Bifidobakterien verfügbar) und angewandter Detektierungsmethode wird auch in der Literatur berichtet, dass die Wiederfindungsraten für probiotische Bakterien im Magen-Trakt-Trakt von 0,1 bis ca. 38% betragen können (POCHART et al., 1992; MARTEAU et al., 1993; FUJIWARA et al., 2001; ROCHET et al., 2008). Angesichts der Tatsache, dass die niedrigen probiotischen Zellzahlen, die in den unteren Abschnitten des Magen-Darm-Traktes detektiert werden, ein Ergebnis ihrer Übertragung aus den höherliegenden Abschnitte sind, muss vor allem dem Überleben bzw. den Mechanismen der Inhibierung der probiotischen Zellen in den proximalen Abschnitten des Magen-Darm-Traktes besonderes Augenmerk gelten (RAMBAUD et al., 1993).

Ein anderer Blickwinkel bei der Beurteilung der Kolonisierung des Magen-Darms-Traktes mit probiotischen Bakterien betrifft ihren Anteil an der gesamten bakteriellen Population sowie das Verhältnis zur Zellzahl von Bakterien derselben Gattung oder Gruppe. Auch hier sind nur wenige bereits veröffentlichte Arbeiten für einen Vergleich verfügbar. In der Studie von MACHA et al. (2004) etwa beträgt der Anteil des probiotischen *E. faecium* NCIMB 10415 an der gesamten Enterokokken-Population 0,03 bis 50% (bestimmt mittels Kolonie-Hybridisierung). Die Analyse derselben Proben mittels Real-Time PCR in VAHJEN et al. (2007) ergab Werte von 0,1-0,7%. Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Werte schwanken zwischen 0,03-12,28%. Zusätzlich wurde in dieser Studie der Anteil von *E. faecium* NCIMB 10415 an der

gesamten eubakteriellen Population ermittelt. Die entsprechenden Werte liegen zwischen 5×10^{-6} und 0,004% und sind mit Ergebnissen anderer Autoren vergleichbar. So vermelden SELIM et. al. (2005), dass die Anteile des probiotischen *Lactobacillus thermotolerans* an der gesamten eubakteriellen Population im Faeces von Küken (im Alter von 4-27 Tagen) im Bereich von 10^{-6} bis 0,1% lagen. Im Ganzen zeigen die dargestellten Werte, dass der untersuchte probiotische Stamm weder innerhalb der Enterokokken-Population noch in der gesamten eubakteriellen Population eine dominierende Rolle spielte. Dies deckt sich mit der „climax community“-Theorie von SAVAGE (1977), laut der jede Spezies oder jeder Stamm nur auf einem bestimmten Niveau etabliert werden kann (in diesem Fall unter 10% aller Enterokokken), und eine überschüssige Zellzahl durch verschiedene Wirtsfaktoren (s. oben) eliminiert wird. Auch nach FRETER (1992) hat der einzelne probiotische Stamm nur geringe Chancen, in höherem Maße die Diversität der Magen-Darm-Mikrobiota zu beeinflussen.

Betrachtet man die Dynamik der prozentualen Anteile des probiotischen *E. faecium* NCIMB 10415 an der Enterokokken- und der gesamten eubakteriellen Population, so findet man, dass die relativen Zahlen mit zunehmendem Alter der Versuchstiere tendenziell steigen. Besonders deutlich ist dies für die prozentualen Anteile des probiotischen *E. faecium* NCIMB 10415 an der gesamten eubakteriellen Population im Magen und im *Jejunum* zu beobachten: Die während der Saugphase ermittelten Werte erhöhten sich nach dem Absetzen durchschnittlich um eine Zehnerpotenz. Im *Colon ascendens* dagegen nahmen die relativen Werte eine gegensätzliche Entwicklung – die prozentualen Anteile des untersuchten probiotischen Stamms waren in der Saugphase höher als nach dem Absetzen. Eine mögliche Erklärung dieses Effekts findet sich in einer Übersichtsarbeit von KATOULI & WALLGREN (2005). Die Autoren nennen eine Reihe von Studien, denen zufolge mit zunehmendem Alter die Diversität und die Populationsgröße der porcinen Mikrobiota sinkt (zumindest innerhalb einer Gattung, z.B. *Escherichia spp.* – die höchste Diversität ist dabei für die Saugphase zu beobachten), was direkt mit der Proliferation der Populationen einzelner Stämme und Spezies verbunden sein kann. Daraus folgt, dass die Zusammensetzung der Mikrobiota in der Saugperiode ihre Entwicklung (Zusammensetzung und metabolische Aktivität) in späteren Lebensphasen bestimmt. In dieser Hinsicht zeigten die hier vorgelegten Ergebnisse, dass Magen und distales *Jejunum* nach dem Absetzen vom untersuchten probiotischen Stamm erfolgreicher kolonisiert wurden als *Colon ascendens*. Es muss dabei erwähnt werden, dass die probiotischen Zellen – zumindest in fertigen Produkten aufgrund der langen Lagerung – in ein inaktiven Zustand übergehen können, was ihre Populationsgröße jedoch nicht beeinflussen wird (LAHTINEN et al., 2005). Auch verschiedene Umgebungsfaktoren (z.B. Morphologie, Entwicklung des lokalen Immunsystems) jedes Habitats (Magen, Dünn-, Dickdarm), in dem sich die probiotischen Zellen befin-

den, müssen bei der Interpretation der entsprechenden Ergebnisse berücksichtigt werden (FRETER, 1992; PERDIGON et al., 2005).

Da die vorliegende Arbeit eine Fortführung von Studien darstellt, die am Institut für Tierernährung seit 2001 zum Einfluss probiotischer Bakterien in der Schweinernährung durchgeführt werden, können die hier vorgelegten Ergebnisse zum Teil mit einigen früheren Resultaten verglichen werden. In diesem Teil der Diskussion ist dabei vor allem interessant zu ergründen, in welchem Maße der Ausgangszeitpunkt der Supplementierung des probiotischen *E. faecium* NCIMB 10415 die Wiederfindungsrate der entsprechenden probiotischen Zellen bzw. den Grad ihrer Kolonisierung und ihre Persistenz im Magen-Darm-Trakt beeinflusst.

Die Ergebnisse der Bestimmung der probiotischen Zellzahlen auf Basis der Koloniehybridisierung sind in der Arbeit von TARAS et al. (2007) zusammengefasst. Darin wird deutlich, dass die intensivere Supplementierung der Ferkel ab dem 1. Lebenstag mit dem Probiotikum („Inokulation“-Versuch) im Vergleich zum vorherigen Fütterungsversuch – bei dem das Probiotikum anfänglich an die Muttersauen und erst ab dem 14. Lebenstag an ihre Ferkel verfüttert wurde – zu einer erhöhten Wiederfindungsrate bei den probiotischen Zellzahlen führte. So wurden am 56. Lebenstag im *Colon ascendens* im Fütterungsversuch 2×10^4 , im „Inokulation“-Versuch hingegen 7×10^7 KbE/g Feuchtmasse detektiert.

Die Ergebnisse der Quantifizierung der probiotischen Zellen mithilfe von Real-Time PCR zeigen aber auch, dass die frühzeitige Supplementierung des probiotischen *E. faecium* NCIMB 10415 (ab dem 1. Lebenstag) mit Blick auf die Kolonisierung des Magen-Darm-Traktes weniger erfolgreich war als die Verfütterung des Probiotikums an die Muttersauen und ab dem 14. Tag an ihre Ferkel. Die probiotischen Zellzahlen aus dem Fütterungsversuch, die in der Arbeit von VAHJEN et al. (2007) dargestellt sind, sind insgesamt höher als die hier ermittelten Werte. So lag die Konzentration des probiotischen *E. faecium* NCIMB 10415 am 56. Lebenstag bei VAHJEN et al. (2007) in Magen, *Jejunum* und *Colon* im Fütterungsversuch im Bereich von ca. 5 (Log Zellen/g Feuchtmasse), in der vorliegenden Studie dagegen nur bei 3,60 bis 4,58. Auch die am 28. Lebenstag (eine Woche nach der Gabe des Probiotikums in der Form des Prästarters)¹ gemessenen Zellzahlen lagen niedriger als in der Arbeit von VAHJEN et al. (2007) – 2,83-4,44 Log Zellzahl/g FM gegenüber 10^4 - 10^6 Zellzahlen/g FM.

Bei der Bewertung der dargestellten Ergebnisse muss erwähnt werden, dass die in der Arbeit von TARAS et al. (2007) erzielten Resultate unter Berücksichtigung der analytischen Nachteile der Kolonie-Hybridisierungsmethode zu betrachten sind. Da bei der Kolonie-Hybridisierung ein selektives Medium für Enterokokken verwendet wird, auf dem auch das

¹ In dieser Arbeit entspricht dies der dritten Woche der Probiotikum-Supplementierung.

Wachstum anderer Enterokokken möglich ist, kann die Fixierung der spezifischen DNA-Probe erschwert werden, was anschließend zu unkorrekten Ergebnissen führen kann. Vergleicht man die Ergebnisse der Real-Time PCR-Detektierung des probiotischen *E. faecium* NCIMB 10415, müssen hingegen die analytischen Charakteristika der durchgeführten Real-Time PCRs (Effizienz, Sensitivität) und die Zusammensetzung der angewandten Quantifizierungsstandards berücksichtigt werden. Aufgrund der unterschiedlichen analytischen Auflösung – bei der Koloniehybridisierung werden nur wachstumsfähige Zellen quantifiziert, bei der Real-Time PCR hingegen die 16S rDNA aller (auch toter, VBNC- oder ABNC-) Zellen, können die Ergebnisse nur teilweise miteinander verglichen werden.

Die Tatsache, dass laut Real-Time PCR-Ergebnissen die Probiotikum-Kolonisierung des Magen-Darm-Traktes nach der Supplementierung ab dem 14. Lebenstag erfolgreicher als ihre Gabe ab dem 1. Lebenstag zu sein scheint, können auch beobachtete Werte wie die Reduzierung der Inzidenz von Durchfällen nach dem Absetzen bestätigen. Bei TARAS et al. (2007) findet sich der Vermerk, dass bei Gabe des Probiotikums ab dem 14. Lebenstag (bei gleichzeitiger Supplementierung der Sauen) die Reduzierung der Durchfall-Inzidenz 45% betrug, im zweiten Fall (Supplementierung ab dem 1. Lebenstag) lag sie bei den Probiotikum-Tieren bei 39%. Statistisch signifikant waren dabei die Unterschiede zwischen den Probiotikum- und Kontrolltieren nur im ersten Fall (Gabe des Probiotikums ab dem 14. Lebenstag). Möglicherweise ist der Grund der niedrigeren Durchfall-Inzidenz im ersten Versuch in der Adaption der supplementierten probiotischen Stämme an den Magen-Darm-Trakt der Ferkel zu suchen. Da im genannten Fall probiotische Zellen auch aus dem Kot der Sauen in den Verdauungstrakt der Ferkel gelangen (s. MACHA et al., 2004; MACHA, 2007), konnten sich diese Zellen theoretisch schon an die Bedingungen für das Wachstum und die metabolische Aktivität im Magen-Darm-Trakt anpassen. Im zweiten Versuch wurden die Ferkel mit dem „reinen“ Produkt (getrocknete lebendige Zellen) inokuliert, d.h. probiotische Bakterien müssen sich an das neue Habitat anpassen und können eventuell erst danach ihre metabolischen Aktivitäten ausprägen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass der untersuchte probiotische Stamm *E. faecium* NCIMB 10415 den Transit durch Magen und Dünndarm der Ferkel überlebt und in einem vermehrungsfähigen Zustand das *Colon ascendens* erreicht. Die höchsten Konzentrationen des Probiotikums in Magen, distalem *Jejunum* und *Colon ascendens* wurden nach zweiwöchiger Supplementierung erreicht, eine weitere Inokulation führte zu keiner Erhöhung der Populationsgröße mehr. Die errechneten prozentualen Anteile von *E. faecium* NCIMB 10415 an der gesamten bakteriellen Population und an der Population von Enterokokken zeigen, dass der untersuchte Stamm nur eine untergeordnete Rolle in der gastrointestinalen bakteriellen

Gemeinschaft spielt. Die nach dem Absetzen deutlich steigenden prozentualen Anteile des Probiotikums an der gesamten bakteriellen Population im Magen und im distalen *Jejunum* könnten darauf hindeuten, dass zumindest in diesen Lokalisationen die frühzeitige Supplementierung des *E. faecium* NCIMB 10415 die weitere Zusammensetzung der Mikrobiota beeinflussen kann.

4.3 Einfluss des probiotischen *E. faecium* NCIMB 10415 auf die Zusammensetzung der Magen-Darm-Mikrobiota der Ferkel

Diversität

Der Einfluss des probiotischen *E. faecium* NCIMB 10415 auf die Diversität der Magen-, *Jejunum*- und *Colon ascendens*-Mikrobiota wurde mittels der denaturierenden Gradientengelelektrophorese (DGGE) untersucht. Die 16S rRNA-Profile der bakteriellen Populationen, die mithilfe der DGGE hergestellt werden, ermöglichen sowohl eine schnelle Einschätzung der Diversität als auch die gleichzeitige Analyse mehrerer Proben, was ebenso die Bewertung der Ähnlichkeit der Mikrobiota einzelner Tiere innerhalb wie zwischen den Versuchsgruppen erlaubt. Das Hauptelement der DGGE besteht dabei in der Trennung der durch PCR amplifizierten 16S rRNA-Gene nach ihrer chemischen Stabilität oder ihrer Schmelztemperatur. Diese Trennung findet in einem Polyacrylamidgel statt, das einen aus Harnstoff und Formamid gebildeten linearen denaturierenden Gradienten enthält (ZOETENDAL et al., 1998; MUYZER, 1999). Die Auswertung der erstellten Gele kann entweder manuell oder densitometrisch mithilfe spezieller Software erfolgen.

Die berechneten Diversitätsindizes zeigten im Ganzen sowohl im Magen als auch im *Jejunum* und *Colon ascendens* nur wenige signifikante Unterschiede zwischen den Tieren der beiden Gruppen. Vor allem nach dem Absetzen allerdings wurden mehr signifikante Unterschiede registriert als in der Saugphase: Berücksichtigt man die Anzahl der detektierten Banden (Richness), so waren die Magen-, *Jejunum*- und *Colon*-Mikrobioten der Probiotikum-Ferkel diverser als die der Kontrolltiere. Die errechneten Evenness-, Shannon- und Simpson-Indizes, die strukturelle Änderungen der untersuchten Gemeinschaften bewerten, bestätigen ebenso die Veränderungen der Zusammensetzung der bakteriellen Populationen. Der Simpson-Index für das *Colon ascendens* der Probiotikum-Tiere etwa war nach dem Absetzen geringer als der für die Kontrollgruppe. Da dieser Index die prozentualen Anteile jeder Art/Spezies an der gesamten Population berücksichtigt (je größer der Index, desto höher die Dominanz einzelner Spezies bzw. desto niedriger die Diversität), kann gefolgert werden, dass die *Colon*-Mikrobiota unter dem Einfluss des Probiotikums auch nach dem Absetzen diverser bleibt. Dabei ist allerdings erneut zu erwähnen, dass sowohl die Richness- als auch die Evenness-,

Shannon- und Simpson-Indizes nur in wenigen Fällen auf statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Fütterungsgruppen verwiesen. Die ermittelten Werte sind dabei schwer mit den Ergebnissen anderer Studien zu vergleichen: In keiner der analysierten Studien wurde eine explizite Untersuchung der Entwicklung der bakteriellen Diversität im Magen der Ferkel mittels DGGE vorgenommen.

Die registrierten altersabhängigen Fluktuationen in der Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaften, die mit den einzelnen Produktionsphasen der Schweinezucht (Saugphase, Gabe des Prästarters, Absetzen) verbunden sind, entsprachen dagegen den Ergebnissen anderer Arbeiten. So berichten SIMPSON et al. (1999), FAVIER et al. (2002), KONSTANTINOV et al. (2006) und INOUE et al. (2005) ebenfalls über altersabhängige Änderungen der Diversität der intestinalen Mikrobiota. Auch die lokalisationsabhängigen Unterschiede zwischen bakteriellen Gemeinschaften waren mit den Ergebnissen einiger anderer Studien vergleichbar. Obwohl keine statistischen Tests auf die Signifikanz der Unterschiede zwischen der Diversität in Magen, *Jejunum* und *Colon ascendens* durchgeführt wurden, war deutlich zu sehen, dass die Mikrobiota des *Colon ascendens* diverser war als die im Magen und im *Jejunum*. KONSTANTINOV et al. (2004) berichten, dass die Diversität der Mikrobiota des Ileums der Ferkel geringer ausfällt als im *Colon*. ZOETENDAL et al. (2002) verweisen auf signifikante Unterschiede der Diversität der Faeces- und der luminalen Mikrobiota des *Colons*.

Im Hinblick auf die mittels DGGE detektierten Diversität der bakteriellen Gemeinschaften sollte angemerkt werden, dass diese Methode neben einer Reihe von Vorteilen auch Nachteile aufweist. Laut MUYZER et al. (1993) und ZOETENDAL et al. (1998) können durch DGGE nur solche bakterielle Populationen detektiert werden, deren Anteil an der gesamten bakteriellen Vielfalt mehr als 1% beträgt. Zahlreiche gastrointestinale Populationen sind dagegen in niedrigeren Konzentrationen vorhanden und können daher über die DGGE nicht erfasst werden. Von der DNA-Extraktionsmethode abhängig werden bakterielle Gattungen, Spezies oder Gruppen in Konzentrationen von insgesamt weniger als 10^8 Zellen/g Probenmaterial nur mit geringer Wahrscheinlichkeit durch DGGE detektiert (MUYZER & SMALLA, 1998; SIMPSON et al., 1999).¹ Als weiterer Nachteil wird die Tendenz einzelner heterogener und auch nicht phylogenetisch verbundener Sequenzen genannt, im Gel auf die gleiche Weise zu migrieren bzw. Banden auf dem gleichen Niveau zu besetzen (MUYZER, 1999). Eine noch wesentlichere Beeinträchtigung besteht in der Detektion verschiedener 16S rDNA-Operone einer Spezies (NÜBEL et al., 1996; SATOKARI et al., 2001; SCHMALENBERGER & TEBBE, 2003), welche die Bildung von mehreren Banden in einem Gel verursachen können.

¹ In der Arbeit von MACHA (2007), in der das gleiche DGGE-Protokoll wie in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde, wird allerdings als niedrigste Detektionsgrenze der DGGE 10^5 genannt.

Auch die schwache Sensitivität einiger Spezies kann die Anwendung der DGGE für die Diversitätsanalyse beeinträchtigen.

Unter Berücksichtigung der genannten analytischen Beschränkungen der DGGE scheinen die – im Vergleich zur Kontrollgruppe – registrierten höheren bzw. niedrigeren Diversitätsindizes nicht übermäßig aussagekräftig zu sein: Ohne zusätzliche Untersuchungen (Sequenzierung) kann nicht gesagt werden, ob im Fall der erhöhten Diversität für den Organismus günstige oder weniger wichtigere (bzw. sogar pathogene) Spezies proliferieren. Die Eigenschaft der Probiotika, die bakterielle Diversität zu erhöhen, wird allerdings in humanmedizinischen Studien vielfach als gesundheitsfördernde Leistung betrachtet (MANICHANH et al., 2006; KUHACHER, 2006). In den Studien von LESER et al. (2000), SIMPSON et al. (2000) und KONSTANTINOV et al. (2004) wurde gezeigt, dass die Verfütterung präbiotischer Oligosaccharide und des probiotischen *L. reuteri* MM53 an Ferkel ebenso zur Erhöhung der bakteriellen Diversität führten. Es wird dabei vermutet, dass bakterielle Gemeinschaften mit hoher Diversität besser äußeren Einflüssen wie der Invasion pathogener Spezies widerstehen können.

Hinsichtlich der Stabilität der gastrointestinalen Mikrobiota innerhalb der Fütterungsgruppe, die durch den Vergleich der 16S rDNA-Profile der Proben einzelner Tiere und durch die Berechnung der entsprechenden Ähnlichkeitsindizes bewertet werden kann, wurde ein klarer signifikanter Einfluss des verfütterten Probiotikums festgestellt. Sowohl die Magen- als auch die *Jejunum*- und *Colon ascendens*-Mikrobioten zwischen Tieren der Probiotikum-Gruppe waren im Vergleich zur Kontrollgruppe an fast allen Beobachtungszeitpunkten signifikant ähnlicher. Bei der Untersuchung desselben probiotischen Stamms auf die fäkale Mikrobiota der Ferkel stellte MACHA (2007) ebenso eine Zunahme der Ähnlichkeit der 16S rRNA-Profile fest, was als fördernde Wirkung auf die Stabilität der bakteriellen Populationen betrachtet werden kann.

Abschließend soll angemerkt werden, dass die Ergebnisse einzelner Studien, die die DGGE als Methode zur Untersuchung der bakteriellen Diversität verwendet haben, nur unter Vorbehalt miteinander verglichen werden können. Abgesehen von den bereits erwähnten Nachteilen der Methode, können auch die Herstellung und die weitere Analyse des fertigen Gels die Resultate beeinflussen. Besonders müssen von einem Labor zum anderen divergierende Faktoren wie die Färbungstechnik des fertigen Gels und die Ausstattung für das Fotografieren bzw. Scannen des Gels berücksichtigt werden (SIMPSON et al., 1999). Ein weiteres Problem stellen Werte dar, die nach der densitometrischen Auswertung des Gels für die Berechnung der ökologischen Indizes verwendet werden. Da die mittels einer Software realisierten Algorithmen

men der automatischen Erkennung der Banden fast immer eine manuelle Nachkontrolle benötigen, können die Ergebnisse gleicher Proben, die von verschiedenen Personen ausgewertet wurden, deutliche Abweichungen aufzeigen. Besonders treten solche Abweichungen bei der Detektierung einzelner Banden und ihrer Zuordnung (*Band Matching*) auf. Auch die densitometrischen Werte selbst, wie z.B. die Intensität einzelner Banden oder die Summe der Intensität aller Banden in der Spur, die der Individuenzahl bzw. die Größe der Population entsprechen sollen, scheinen nur begrenzt für die Berechnung ökologischer Indizes geeignet zu sein. Die Mehrheit der Diversitätsindizes wurde für die Bewertung von Populationen in der Natur entwickelt, wo einzelne Individuen sicht- und zählbar sind, was auf die densitometrischen Werte nicht zutrifft.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass hinsichtlich der bakteriellen Diversität nur einzelne statistisch signifikante Unterschiede zwischen den beiden Fütterungsgruppen ermittelt wurden. Nach dem Absetzen waren die Magen-, *Jejunum*- und *Colon ascendens*-Mikrobioten der Probiotikum-Ferkel signifikant diverser, d.h. die Stabilität (z.B. gegenüber pathogenen Mikroorganismen), Funktionsfähigkeit und metabolische Aktivität der gastrointestinalen Mikroökosysteme waren höher als die der Kontrolltiere. Die Werte geben allerdings keinen eindeutigen Aufschluss darüber, ob der höheren Diversität auch die Proliferation für den Organismus „günstiger“ Stämme (z.B. milchsäurebildender Bakterien) entsprach. Zur Beantwortung dieser Frage müssen weitere Untersuchungen (Sequenzierung einzelner Banden) durchgeführt werden. Im Hinblick auf die Ähnlichkeit der Mikrobiota zwischen einzelnen Tieren (bzw. auf Homogenität und Stabilität) konnte dagegen eine deutliche Wirkung des untersuchten probiotischen Stamms registriert werden: In allen Lokalisationen und zu fast allen Beobachtungszeitpunkten lagen die errechneten Ähnlichkeitsindex-Werte in der Probiotikum-Gruppe signifikant höher als in der Kontrollgruppe. Da der verwendete Ähnlichkeitsindex (der Sørensen-Quotient) unter Berücksichtigung der Anzahl gleicher Arten berechnet wurde, können höhere Ähnlichkeitswerte durch die Anwesenheit sowohl des probiotischen Stamms als auch der durch Probiotika geförderten Spezies in der gastrointestinalen Population erklärt werden.

Lactobacillus spp.

Da Milchsäurebakterien (besonders Laktobazillen) einen wichtigen Bestandteil der „gesunden“ gastrointestinalen Mikroflora des Schweins darstellen und gesundheitsfördernde Funktionen erfüllen können, wurden in jüngerer Zeit vornehmlich die Zusammensetzung und Funktionen ihrer Populationen untersucht. So konnte gezeigt werden, dass Zusammensetzung und Zellzahl der Milchsäurebakterien vom Alter des Tieres und vom jeweiligen Abschnitt des GIT abhängen (BATEUP et al., 1998; NAITO et al., 1995; KATOULI & WALLGREN, 2005). Eine der dominanten bakteriellen Gruppen der Milchsäurebakterien des porcinen GIT sind die Laktobazillen (PRYDE et al., 1999; AL JASSIM, 2003; DU TOIT et al., 2001). LESER et al. (2002) haben in einer umfangreichen, auf 16S rRNA-Detektion basierenden Studie nachgewiesen, dass die phylogenetische *Bacillus-Lactobacillus-Streptococcus*-Gruppe die drittgrößte Gruppe der gesamten intestinalen Mikrobiota ist und eine komplexe Struktur aufweist. Innerhalb dieser phylogenetischen Gruppe wurden verschiedene Spezies detektiert, unter anderem auch *E. faecium*, was auf dessen potenziellen Einfluss auf die Etablierung der Laktobazillen-Mikrobiota hindeutet. Hinsichtlich des Einflusses von Enterokokken als Probiotika auf die Population von Laktobazillen im Magen-Darm-Trakt der Ferkel stehen dagegen nur sehr begrenzte und dabei sehr divergierende Daten zur Verfügung. Am häufigsten wurde die Gesamtzahl der Laktobazillen ermittelt. So zeigen VAHJEN et al. (2002) und SAMLI et al. (2007), dass die Verfütterung des auch in dieser Arbeit verwendeten probiotischen *E. faecium* NCIMB 10415 an Puten und Hühner zu einer Erhöhung der Anzahl der Laktobazillen führte. In der Arbeit von MACHA (2007) beeinflusste *E. faecium* NCIMB 10415 hingegen die Laktobazillus-Populationen im intestinalen Trakt der Ferkel nicht. Auch andere verfütterte Enterokokken-Stämme weisen variable Effekte auf: Nach der Gabe des probiotischen *E. faecium* 7134 an Welpen registrierte WEIß (2003) im Kot erhöhte Zellzahlen von Laktobazillen; STROMPFOVA et al. (2006) fanden nach Supplementierung des probiotischen *E. faecium* EK 13 an Saugferkel dagegen keine Erhöhung der Populationsgröße bei den Laktobazillen.

Die hier vorgelegten Ergebnisse zeigen, dass die Verfütterung von *E. faecium* NCIMB 10415 nur zu wenigen statistisch signifikanten Unterschieden zwischen beiden Versuchsgruppen führte. Allerdings waren die Laktobazillus-Populationen sowohl im Magen als auch im *Colon ascendens* der Probiotikum-Tiere in der Saugperiode und nach dem Absetzen größer als in der Kontrollgruppe. Betrachtet man die prozentualen Anteile von Laktobazillen an der gesamten eubakteriellen Population, waren für Magen und *Jejunum* ebenfalls keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen zu messen, wohingegen im *Colon ascendens* diese Werte in der Probiotikum-Gruppe an allen Beobachtungstagen (teilweise signifikant) niedriger lagen als in der Kontrollgruppe. Da in der analysierten Literatur die positive Wir-

kung probiotischer Enterokokken auf Laktobazillen entweder *in vitro* oder im Organismus anderer Tierarten (nicht für Schweine) nachgewiesen wurde, sollten offensichtlich auch der Einfluss spezifischer Habitats sowie Eigenheiten der Interaktionen verfütterter probiotischer Stämme mit der wirtsspezifischen *Lactobacillus*-Spezies berücksichtigt werden.

Enterococcus spp.

Da der verfütterte Stamm zur Gattung *Enterococcus spp.* zählt, wurde in den untersuchten Proben auch die Konzentration dieser Bakteriengattung bestimmt. Dabei konnte zu allen Beobachtungszeitpunkten eine deutliche fördernde Wirkung von *E. faecium* NCIMB 10415 auf die *Enterococcus*-Population festgestellt werden: Sowohl im Magen als auch im *Jejunum* und im *Colon ascendens* waren die Enterokokken-Zellzahlen und ihre prozentualen Anteile an der gesamten eubakteriellen Population in der Probiotikum-Gruppe signifikant höher als in der Kontrollgruppe. Eine fördernde Wirkung probiotischer Enterokokken-Stämme auf die Größe der Enterokokken-Population wurde ebenso in Studien von MOLITOR (1996), VAHJEN et al. (2002), HEINRICHS (2005) und STROMPFOVA et al. (2006) beobachtet.

Bei der Interpretation der erhöhten absoluten Zellzahlen sollte angemerkt werden, dass die indigenen Enterokokken laut neueren molekularbiologischen Untersuchungen nur eine untergeordnete Rolle in der intestinalen Mikrobiota spielen: Von den 4270 von LESER et al. (2002) untersuchten Sequenzen (aus intestinalen Proben von Schweinen) gehörten nur zwei der Gattung *Enterococcus* an. Auch in der vorliegenden Untersuchung lag Anteil der Enterokokken an der gesamten eubakteriellen Population zwischen 0,00001 und 0,1%. Aus diesem Grund ist die Möglichkeit eines wesentlichen Einflusses auf die Mikrobiota unter Vorbehalt zu bewerten.

Bei der Betrachtung der erhöhten Zellzahlen von Enterokokken müssen ferner noch weitere Aspekte berücksichtigt werden: Die Enterokokken gehören zu der Gruppe der homofermentativen Milchsäurebakterien, die bei Fermentation von Hexosen L(+)-Isomere der Milchsäure produzieren (FRANZ & HOLZAPFEL, 2004). Wie bereits in der Literaturübersicht ausgeführt (s. S. 16), kann Milchsäure antimikrobiell auf pathogene Spezies wirken und an der Etablierung der Säure-Milieus bei Saugferkeln beteiligt sein (CRANWELL et al., 1976). Von Enterokokken produzierte L(+)-Isomere der Milchsäure können außerdem vom Wirtsorganismus schneller als D(-)-Isomere verstoffwechselt werden und werden deshalb als „physiologische Isomere“ betrachtet (GIESECKE et al., 1985; PANG & BOYSEN, 2007). Allerdings ist anzumerken, dass Enterokokken viel weniger Laktat als z.B. homofermentative Laktobazillen bilden (AXELSSON 2004).

Die Fähigkeit von Enterokokken, zahlreiche Bakteriozine (Enterozine) zu produzieren, die bakterizid oder bakteriostatisch vor allem auf Gram-positive Bakterien (*Listeria spp.*, *Clostridium spp.*, *Bacillus spp.*, *Staphylococcus spp.*) wirken, wird ebenso als mögliche probiotische Wirkung betrachtet (FOULQUIE MORENO et al., 2006). Auf der anderen Seite sind auch mögliche Risiken der Präsenz von Enterokokken in hohen Zellzahlen zu berücksichtigen. So können einzelne Enterokokken-Stämme Bakteriozine gegen potenziell für den Organismus günstige Bakterien – wie etwa *Lactobacillus spp.* – produzieren. Hierzu zählen z.B. Munditocin KS von *E. mundtii*, Enterocin L50 von *E. faecium* L50 und 6T1a, Enterocin P von *E. faecium* P13, Enterolysin A von *E. faecalis* LMG 2333, sowie Enterocin B von *E. faecium* CTC492, T136 und BFE 900 (FRANZ & HOLZAPFEL, 2004). Weiterhin wurde bereits in den 90er Jahren entdeckt, dass die Enterokokken zahlreiche Gene besitzen, die für die Entwicklung von Resistenzen gegen klinisch relevante Antibiotika verantwortlich sind. Dabei können Enterokokken über verschiedene Mechanismen des Gentransfers (pheromon-responsive Plasmide, konjugative und nicht-konjugative Plasmide, Transposons) einer Spezies, die frei von Antibiotika-Resistenz-Genen ist, sowohl solche als auch Adhäsionsgene von anderen – auch pathogenen – Spezies beschaffen (MURRAY, 1990; CLEWEL, 1990; LANDMAN & QUALE, 1997; LECLERCQ, 1997).

Bifidobacterium spp.

Nach Erkenntnissen aktueller Studien sind auch Bifidobakterien nur in sehr geringem Maße in der intestinalen Mikrobiota des Schweins vertreten. Keiner der porcinen intestinalen Klone aus der 16S rRNA-Sammlung in der Studie von LESER et al. (2002) weist eine phylogenetische Ähnlichkeit mit Vertretern der Gattung *Bifidobacterium* auf. In den Arbeiten von MIKKELSEN et al. (2003) und MOURA et al. (2007), die auf der Detektion von 16S rRNA der Bifidobakterien basierten, waren nur wenige *Ileum*-, *Caecum*-, *Colon*- und *Faeces*-Proben von saug- und abgesetzten Ferkeln *Bifidobacterium*-positiv. MIKKELSEN et al. (2003) berichten außerdem, dass der Anteil der Bifidobakterien an der gesamten bakteriellen Population bei Saugferkeln weniger als 1% betrug. Die eigenen Ergebnisse stimmen mit diesen Beobachtungen weitgehend überein. Unabhängig von der Fütterungsvariante waren nur wenige Proben im Magen, *Jejunum* oder *Colon ascendens* *Bifidobacterium*-positiv. An den Tagen 31, 35 und 56 gaben die untersuchten Proben sowohl der Probiotikum- als auch der Kontrolltiere nur negative Signale bei der Reaktion mit dem *Bifidobacterium*-Primer. Im Fall positiver Ergebnisse wurde festgestellt, dass die Anteile der Bifidobakterien an der gesamten eubakteriellen Population im Bereich von 0,0001 bis 0,01% lagen, was 10^5 - 10^6 Zellen/g FM entsprach.

Mit Blick auf den Einfluss des verfütterten Probiotikums in dieser Studie wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Größe der Bifidobakterien-Population zwischen den beiden Fütterungsgruppen festgestellt. Im *Colon ascendens* waren die prozentualen Anteile der Bifidobakterien an der gesamten bakteriellen Population in der Probiotikum-Gruppe an allen Tagen niedriger als in der Kontrolle, die Unterschiede erwiesen sich dabei (mit Ausnahme des 28. Tags) als nicht statistisch signifikant.

Escherichia spp.

Die Wirkung probiotischer Stämme auf die Populationen koliformer Bakterien wird in der Literatur meist als hemmend beschrieben. So konnte in den Studien von SCHAREK et al. (2005) und MACHA (2007) gezeigt werden, dass *E. faecium* NCIMB 10415 zur Reduzierung der Nachweishäufigkeit des *E. coli* Serovars O141 und zur Verringerung von *E. coli* mit nachgewiesenen Pathogenitätsgenen bei den untersuchten Ferkeln führte. Auch in der Arbeit von STROMPFOVA et al. (2006) wurde eine deutliche Reduzierung von *E. coli* nach der Verfütterung des probiotischen *E. faecium* EK13 beobachtet. In einer Reihe anderer Studien wurde dagegen kein Einfluss des supplementierten Probiotikums auf die *E. coli*-Populationen beobachtet: So beeinflusste der probiotische Stamm *E. faecium* DSM 7134 in den Studien von HEINRICHS (2005) und BÖHMER et al. (2006) die Populationen koliformer Bakterien nicht.

Die Resultate der hier beschriebenen Untersuchungen haben die hemmende Wirkung des probiotischen *E. faecium* NCIMB 10415 auf Populationen von *Escherichia spp.*, die auch in den Arbeiten von SCHAREK et al. (2005) und MACHA (2004, 2007) verzeichnet wurde, bestätigt. Sowohl im Magen als auch im *Jejunum* und im *Colon ascendens* waren die Zellzahlen von *Escherichia spp.* und ihre prozentualen Anteile an der gesamten eubakteriellen Population in der Probiotikumgruppe numerisch geringer als in der Kontrollgruppe. Die statistische Analyse der Werte beider Fütterungsgruppen förderte allerdings nur vereinzelt signifikante Unterschiede zutage.

Die hemmende Wirkung probiotischer Bakterien auf pathogene Enterobakterien wird zumeist unter Rückgriff auf die „*competitive exclusion*“-Theorie beschrieben. Mehrfach wurde dabei eine Verhinderung der Adhäsion koliformer Bakterien bei Anwesenheit probiotischer Zellen beschrieben (KIRJAVAINEN et al., 1998; MACK et al., 1999; SERVIN & COCONNIER, 2003; COLLADO et al., 2007). Dabei können probiotische Bakterien im Darm sowohl die Mucin-Expression induzieren als auch selbst die Adhäsionsrezeptoren, die auch für Enterobakterien geeignet sind, besiedeln (MACK et al., 1999; HOOPER & GORDON, 2001; SERVIN & COCONNIER, 2003). Einige probiotische Bakterien sind auch in der Lage, mit ente-

ropathogenen Stämmen zu koaggregieren, was z.B. für Laktobazillen und *E. coli* K88 beschrieben wurde (SPENCER & CHESSON, 1994). RINKINEN et al. (2003) bemerken dabei, dass die Koaggregation besonders effektiv ist, wenn die probiotischen Spezies Bakteriozine produzieren können, die in engem Kontakt mit pathogenen Bakterien besonders effektiv auf diese wirken. Für manche Bakteriozine, die probiotische Enterokokken synthetisieren können, wurde tatsächlich eine inhibitorische Aktivität gegen einige enteropathogene Bakterien beschrieben: In der Studie von LAUKOVA et al. (2003) etwa wirkte Enterozin A von *E. faecium* EK 13 hemmend auf *Salmonella enterica* serovar *Düsseldorf*. FOULQUIE MORENO et al. (2003) dagegen fanden bei der Untersuchung der inhibitorischen Aktivität der Bakteriozinen von sieben probiotischen *E. faecium*-Stämmen (unter anderem *E. faecium* NCIMB 10415) keine Wirkung auf den geprüften *Escherichia coli* LMG 2092-Stamm. Allerdings wurde die Existenz eines enterozin-ähnlichen Peptides von *E. faecium* NCIMB 10415 mit einer Molekularmasse von ca. 4,5 kDa nachgewiesen, dessen Eigenschaften bislang noch nicht weiter untersucht worden sind.

Eine indirekte Wirkung probiotischer Bakterien auf koliforme Bakterien wird in der Literatur ebenfalls beschrieben. Sowohl Milchsäure als auch erhöhte Konzentrationen flüchtiger Fettsäuren (SAKATA et al., 1999, 2003; NOUSIANEN et al., 2004), die bei der Anwesenheit probiotischer Bakterien beobachtet wurden, können antimikrobiell auf pathogene Enterobakterien wirken (BLOM & MØRTVEDT, 1991; SUOMALAINEN & MÄYRÄ-MÄKINEN, 1999; OUWEHAND, 2004).

L. acidophilus*, *L. amylovorus*, *L. johnsonii*, *L. mucosae* und *L. reuteri

Um den Einfluss des untersuchten *E. faecium* NCIMB 10415 auf einzelne Vertreter der dominanten bakteriellen Gruppe des porcinen Magen-Darm-Trakts – *Lactobacillus* spp. – zu überprüfen, wurden die dominanten Spezies dieser Gruppe quantifiziert. Innerhalb der *Lactobacillus*-Gruppe im GIT des Schweins werden allerdings von verschiedenen Forschern unterschiedliche Spezies wie *L. amylovorus*, *L. acidophilus*, *L. crispatus*, *L. reuteri* und *L. ruminis* als dominant erachtet (PRYDE et al., 1999; DU TOIT et al., 2001; AL JASSIM, 2003; SIMPSON et al. 2000; LESER et al., 2002; KONSTANTINOV et al., 2004). Als Ergebnis von 16S rRNA-Analysen allerdings werden lediglich *L. amylovorus*, *L. johnsonii* und *L. reuteri* als dominante Vertreter der porcinen intestinalen Mikrobiota genannt (LESER et al., 2002; PRYDE et al., 1999; KONSTANTINOV et al., 2004). Diese und ihre zahlreichen nachgewiesenen antimikrobiellen Mechanismen gegen pathogene Spezies wurden als mögliche Elemente des probiotischen Einflusses angenommen und daher in der vorliegenden Arbeit untersucht. Die Spezies *L. acidophilus* und *L. mucosae*, die nicht so zahlreich sind wie die

oben genannten Stämme, aber im porcinen Magen-Darm-Trakt häufig vorkommen, wurden ebenso in den Versuchsproben quantifiziert.

Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigen, dass sowohl im Magen als auch in *Jejunum* und *Colon ascendens* nur vereinzelte Proben *L. acidophilus*-positiv waren. Unabhängig von der Fütterungsvariante lagen die absoluten Zellzahlen im Bereich von 10^2 - 10^5 Zellen/g Feuchtmasse und der Anteil der Spezies an der gesamten *Lactobacillus*-Population bei ca. 0,0009-0,07%. Dabei waren in der Saugperiode mehr Proben positiv als nach dem Absetzen. Was den Einfluss des verfütterten Probiotikums betrifft, so konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen festgestellt werden. Auf Grundlage der ermittelten Werte kann vermutet werden, dass *L. acidophilus* zur Begleitflora im Magen-Darm-Trakt gehören kann, und abgesehen von der in der Literatur nachgewiesenen Bakteriozine-Produktion nur in geringem Maße für die intestinale Gesundheit des Schweins (zumindest unter institutseigenen Bedingungen) bedeutsam ist.

Im Gegensatz dazu wurde für *L. johnsonii* eine deutliche Wirkung durch *E. faecium* NCIMB 10415 beobachtet. Die *L. johnsonii*-Populationen in Magen, *Jejunum* und *Colon ascendens* der Probiotikumferkel lag höher als bei den Kontrolltieren. Die absoluten und relativen Unterschiede zwischen beiden Gruppen waren überwiegend statistisch signifikant – die absoluten Werte lagen dabei im Bereich von 10^4 - 10^7 Zellen/g Feuchtmasse, die prozentualen Anteile an der gesamten *Lactobacillus*-Population im Bereich von 0,9 bis 20,5%.

Bei der Betrachtung dieser Ergebnisse ist zu berücksichtigen, dass *L. johnsonii* antimikrobiell auf eine Reihe von pathogenen Enterobakterien wirken kann. Es wurde nachgewiesen, dass das Lactocin F Bakteriozin von *L. johnsonii* auf *Enterococcus faecalis* und *Clostridium perfringens* bakterizid wirkt (ABEE et al., 1994; DU TOIT, 1998). SERVIN & COCONNIER (2003) berichten zudem, dass der Stamm *L. johnsonii* LaI die Adhäsion enteropathogener *E. coli* und *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* auf intestinale Caco-2-Epithellzellen inhibieren kann. Mit Blick auf den möglichen antimikrobiellen Wirkungsmechanismus von *L. johnsonii* haben SERVIN & COCONNIER (2003) vermutet, dass aufgrund des Fehlens spezifischer pathogen-adhäsiver Faktoren bei *L. johnsonii* der Stamm die Adhäsion pathogener Spezies durch eine sterische Hinderung inhibiert. NEESER et al. (2000) haben nachgewiesen, dass *L. johnsonii* zur Expression spezifischer Substanzen (O-glycosylated Mannoprotein und asialo-GM1 Glykolipid) fähig ist, die seine Adhäsion (bzw. Bindung mit spezifischen Rezeptoren) an der Epithelzelle ermöglichen. Einige pathogene Spezies (*E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) synthetisieren dieselben Substanzen, um mit ihrer Hilfe an der Epithelzelle anhaften

zu können. Dadurch entsteht laut NEESER et al. (2000) eine direkte Konkurrenz zwischen *L. johnsonii* und pathogenen Spezies um dieselben Rezeptoren an der Epithelzelle.

Beim Einfluss des probiotischen *E. faecium* NCIM 10415 auf *L. amylovorus*/*L. sobrius* wurden überwiegend nicht signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt. Allerdings waren die *L. amylovorus*-Populationen in der Probiotikumgruppe zumindest rein numerisch sowohl im Magen als auch im *Jejunum* und im *Colon ascendens* stärker vertreten als in der Kontrolle. Absolute Zellzahlen wurden dabei auf dem Niveau von 10^3 bis 10^8 registriert, was zu den Ergebnissen von KONSTANTINOV et al. (2004) passt. Die prozentualen Anteile von *L. amylovorus* an der gesamten Laktobazillus-Population lagen im Bereich von 0,006 bis 8,2%. Wie bereits bei den anderen Stämmen waren die größten prozentualen Anteile im Magen und die geringsten im *Colon ascendens* festzustellen. Wie die anderen in dieser Arbeit untersuchten *Lactobacillus*-Stämme (*L. acidophilus*, *L. johnsonii*, *L. reuteri*) kann *L. amylovorus* antimikrobiell wirkende Substanzen synthetisieren. Die Bakteriozine Lactobin A und Amylovorin L471 können dabei, zumindest *in vitro*, bakterizid auf einige *Clostridium spp.* und *Listeria spp.* wirken (CALLEWAERT et al. 1999), was als gesundheitsfördernde Wirkung dieser Spezies betrachtet werden kann, die allerdings – in Anbetracht der hier ermittelten Ergebnisse – offenbar durch Gabe des untersuchten Probiotikums nicht verstärkt nutzbar zu machen ist.

Zur Untersuchung von *L. reuteri* muss eingangs festgehalten werden, dass unabhängig von der Fütterungsvariante diese Spezies in den untersuchten Proben eine dominierende Rolle innerhalb der *Lactobacillus*-Population sowohl im Magen als auch in *Jejunum* und *Colon ascendens* der untersuchten Tiere spielt. Die prozentualen Anteile von *L. reuteri* an der gesamten *Lactobacillus*-Population lagen dabei im Bereich zwischen 0,97 und 60,98%, die absoluten Zellzahlen bei 10^4 bis 10^8 Zellen/g Feuchtmasse. Wie im Fall von detektierten *L. acidophilus* und *L. amylovorus* wurden zwar nur einige statistisch signifikante Unterschiede zwischen beiden Fütterungsgruppen festgestellt, sowohl im *Jejunum* als auch im *Colon ascendens* waren allerdings die prozentualen Anteile von *L. reuteri* an der gesamten *Lactobacillus*-Population in der Probiotikum-Gruppe höher als in der Kontrolle, was auf eine mögliche fördernde Wirkung des probiotischen *E. faecium* NCIMB 10415 hindeutet. Dies kann bedeutsam sein, wenn man die potenziell antimikrobiellen Eigenschaften von *L. reuteri* berücksichtigt. Mithilfe seiner antimikrobiellen Komponenten – Reuterin und Reutericyclin – kann *L. reuteri* nicht nur bakterizid auf enteropathogene Bakterien, sondern auch auf Pilze, einige Protozoen und auf Viren (z.B. Rotavirus) wirken (OUWEHAND & VESTERLUND, 2004). ROOS et al. (1996) haben außerdem gezeigt, dass *L. reuteri* ein collagen-bindendes Protein

synthetisiert, das die Hemmung der Adhäsion pathogener Spezies an den Epithelzellen begünstigen kann. Auch eine Autoaggregation (Bildung multizellulärer Aggregate bestehend aus Zellen einer Spezies) und die anschließende Bildung eines Biofilms auf dem Darm-Epithelium wurden für *L. reuteri* beschrieben (ROOS et al., 1999). Offensichtlich kann im Fall erhöhter Konzentrationen von *L. reuteri* bzw. durch die Ausprägung dieser Eigenschaften der Magen-Darm-Trakt der Ferkel in beträchtlichem Umfang gegen pathogene Spezies geschützt werden. Dass das untersuchte Probiotikum hierzu wesentlich beitragen kann, ist auf Grundlage der aufgelisteten Ergebnisse allerdings nicht gesichert.

Lactobacillus mucosae ist eine phylogenetisch nah mit *L. reuteri* verwandte Spezies, für die – im Unterschied zu *L. reuteri* – auch die Fähigkeit der direkten Adhäsion am Mucus nachgewiesen wurde (ROOS et al., 2000). Nach den Ergebnissen der Quantifizierung war die *L. mucosae*-Population sowohl im Magen als auch im *Jejunum* und im *Colon ascendens* der Versuchstiere die zweitgrößte Gruppe der Laktobazillen. Die Zellzahlen lagen im Bereich von 10^3 bis 10^8 Zellen/g Feuchtmasse, die relativen Anteile an der gesamten *Lactobacillus*-Population bewegten sich im Bereich von 0,3 bis 40,19%. Statistisch signifikante Unterschiede wurden für Magen und *Colon ascendens* kaum festgestellt. Im *Jejunum* dagegen war die *L. mucosae*-Population in der Probiotikumgruppe an allen Tagen (außer dem 14.) signifikant niedriger als in der Kontrolle (sowohl absolute als auch relative Zellzahlen). Im Magen waren die *L. mucosae*-Zellzahlen in der Probiotikumgruppe rein numerisch ebenfalls niedriger als bei den Kontrolltieren, was sich als für den Organismus günstig erweisen kann: Dadurch dass Zellen dieser Spezies mit dem Mucus verbunden sind, kann eine Verringerung ihrer Zahl auf eine verminderte Abschilferung der Epithelzellen im Darmlumen hindeuten. *L. mucosae* ist bislang nur selten in Studien untersucht worden. Mit den hier vorgestellten weitgehend übereinstimmende Ergebnisse sind allerdings bei HIRSCH (2005) dokumentiert, die den Einfluss der Zufütterung von Xylanase auf die bakterielle Besiedlung des Darms bei Ferkeln mithilfe spezifischer 16S rRNA-Sonden untersuchte.

Abschließend bleibt festzuhalten, dass *E. faecium* NCIMB 10415 nur auf *L. johnsonii* in Magen, *Jejunum* und *Colon ascendens* eine signifikant fördernde Wirkung aufwies. Die im Vergleich zur Kontrollgruppe höheren absoluten und relativen Zellzahlen von *L. johnsonii* bei den Probiotikum-Tieren wurden sowohl in der Saugphase als auch in der Zeit um das Absetzen registriert. Es wurde keine statistisch signifikante probiotische Wirkung auf die in den untersuchten Proben für dominant befundene Laktobazillus-Spezies – *L. reuteri* – festgestellt. Rein numerisch waren aber die prozentualen Anteile von *L. reuteri* an der gesamten Laktobazillen-Population im distalen *Jejunum* und *Colon ascendens* in der Probiotikum-Gruppe, vor

allem nach dem Absetzen, höher als in der Kontrolle. Ebenso rein numerisch war die *L. amylovorus*-Population bei den Probiotikum-Ferkeln stärker vertreten als bei den Kontrolltieren. Die einzigen signifikanten fütterungsabhängigen Unterschiede von *L. reuteri*- und *L. amylovorus*-Zellzahlen wurden dabei am 56. Tag registriert.

Die Ergebnisse der Detektierung der 16S rDNA von *L. acidophilus* in den untersuchten Digesta-Proben waren zumeist negativ. Die positiven Befunde wiesen auf eine nur untergeordnete Rolle dieser Spezies in der gastrointestinalen Mikrobiota der Versuchsferkel hin. Auf Grundlage der detektierten Zellzahlen kann *L. acidophilus* als Begleitart in den untersuchten Lokalisationen des Magen-Darm-Traktes aufgefasst werden, die keiner statistisch signifikanten probiotischen Wirkung unterlag. Die positiven Signale der untersuchten Proben mit dem *L. mucosae*-Primer zeigen unabhängig von der Fütterungsvariante, dass nicht allein die Darmmukosa das Haupthabitat dieser Spezies ist: Auch im *Lumen* können diese Bakterien (zumindest gemessen an der 16S rDNA) vertreten sein. Im distalen *Jejunum* der Probiotikum-Tiere war die *L. mucosae*-Population signifikant kleiner als in der Kontrolle. Auch im Magen und *Colon ascendens* konnte dieser Trend beobachtet werden. Rein numerisch waren die absoluten und relativen Zellzahlen von *L. mucosa* in diesen Lokalisationen der Probiotikumtiere niedriger als in der Kontrolle, was auf eine mögliche Verringerung der abgeschilferten Epithelzellen im *Lumen* hinweisen könnte. Die nicht signifikanten Unterschiede im Fall von *L. acidophilus*, *L. amylovorus*, *L. reuteri* sowie teilweise von *L. mucosae* können sowohl mit dem Fehlen probiotischer Effekte auf diese Spezies als auch durch spezifische Interaktionen innerhalb der *Lactobacillus*-Population erklärt werden. Viele Laktobazillen können Bakteriozine gegen nahverwandte Spezies synthetisieren, so dass überschüssige Mengen oder die gesamte Population eliminiert werden kann.

E. faecium* und *E. faecalis

Der Einfluss des probiotischen *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 auf die phylogenetisch nahverwandten aber potenziell pathogenen *Enterococcus faecium* und *Enterococcus faecalis* wurde mit Hilfe spezifischer Primer von EATON und GASSON (2001) untersucht, die die Stämme anhand ihrer Adhäsionsgene (*EfaAfm* und *EfaAfs*) identifizieren können. Nur wenige Proben (in der Probiotikum- wie in der Kontrollgruppe) wiesen mit diesen Primern positive Ergebnisse auf, und die Unterschiede zwischen den beiden Fütterungsgruppen waren statistisch nicht signifikant. Bei der Interpretation dieser Resultate ist zu überlegen, ob die detektierten Sequenzen bei den porcinen *E. faecium*- und *E. faecalis*-Stämmen überhaupt vorkommen und ob in den eigenen Institutsbeständen solche Spezies zum Zeitpunkt der Probenentnahme persistierten. Des Weiteren sollten auch mögliche „technische“ Schwierig-

keiten, wie z.B. Extraktionseffizienz, Qualität der angewendeten Reagenzien (Primer), etc. berücksichtigt werden.

4.4 Einfluss des probiotischen *E. faecium* NCIMB 10415 auf die bakterielle Stoffwechselaktivität der Magen-Darm-Mikrobiota der Ferkel

Lactat

Da der verfütterte Stamm *E. faecium* NCIMB 10415 zur Gruppe der Milchsäurebakterien gehört, war es von besonderem Interesse, die Konzentration der Milchsäure, die mit der mikrobiellen Aktivität des probiotischen Stamms eventuell in Verbindung stehen könnte, zu ermitteln. Dabei wurde festgestellt, dass in der Saugphase sowohl im Magen als auch im *Colon ascendens* die Konzentration der Milchsäure bei den Probiotikum-Tieren nur numerisch höher war als in der Kontrolle. Nach dem Absetzen waren die Unterschiede im *Colon ascendens* zu drei Beobachtungszeitpunkten allerdings statistisch signifikant, und am 56. Tag galt dies auch für *Jejunum* und Magen der Probiotikum-Ferkel. Diese Ergebnisse decken sich nur teilweise mit jenen anderer Studien, die ebenso höhere Laktat-Gehalte bei der Zufütterung des probiotischen *E. faecium* NCIMB 10415 registrierten: MÄNNER et al. (2002) und VAHJEN et al. (2002) vermelden erhöhte Laktat-Gehalte bei Puten, vor allem aber im Dünndarm. Dagegen registrierte MACHA (2007) nach der Verfütterung desselben probiotischen Stamms an Ferkel keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Laktat-Mengen in den Proben von Probiotikum- und Kontrolltieren (mit Ausnahme des *Jejunums* am 56. Tag, wie in der vorliegenden Arbeit). WEIß (2003) und HEINRICHS (2005) stellten nach der Verfütterung des probiotischen *E. faecium* 7134 an Welpen und Broiler ebenfalls keine Erhöhung des Laktat-Gehaltes fest.

Die ermittelten statistischen Signifikanzen (alle Lokalisationen am 56. Tag und *Colon ascendens* am 31., 35. und 56. Tag) wurden auch bei der Bewertung der Konzentrationen einzelner L(+)- und D(-)-Isomere festgestellt. Dabei war die Konzentration von L(+)-Laktat in der Probiotikumgruppe höher als in der Kontrolle, was auf einen möglichen Einfluss der Enterokokken hindeutet, bei denen dieses Isomer am Ende der Kohlenhydratfermentation entsteht. Für die Überprüfung dieser Hypothese wurde eine Korrelationsanalyse durchgeführt und der Grad der Übereinstimmung der detektierten Bakterien-Zellzahlen und der gemessenen Konzentrationen von L(+)- und D(-)-Laktat ermittelt.

DISKUSSION

Tab. 36: Korrelation von L(+) und D(-)-Laktat in Magen, *Jejunum* und *Colon ascendens*

	Magen		Jejunum		Colon	
	L	D	L	D	L	D
<i>E. faecium</i> NCIMB 10415	,427(*)	,542(**)	,468(*)	-	-	-
Gesamt Eubacteria	,683(**)	,833(**)	,721(**)	,644(**)	,473(*)	,491(*)
<i>Lactobacillus</i> spp.	,703(**)	,853(**)	,649(**)	,774(**)	,510(**)	,519(**)
<i>Enterococcus</i> spp.	,398(*)	,561(**)	-	-	-	-
<i>Bifidobacterium</i> spp. spp.spp.	,821(*)	,857(*)	-	-	-	-
<i>Enterobacteriaceae</i>	-	-	-	-	-	-
<i>E. faecium</i>	-	,530(*)	-	-	-	-
<i>E. faecalis</i>	-	-	-	-	-	-
<i>L. acidophilus</i>	-	-	-	-	-	-
<i>L. amylovorus</i>	,607(**)	,779(**)	-	,563(*)	-	-
<i>L. johnsonii</i>	,517(*)	,709(**)	,696(**)	,742(**)	,450(*)	-
<i>L. mucosae</i>	,821(*)	-	,618(*)	,745(**)	-	-
<i>L. reuteri</i>	,632(**)	,737(**)	,591(**)	,669(**)	,414(*)	,412(*)

* p≤0,01; ** p≤0,001

Tabelle 36 zeigt, dass zwischen der Enterokokken-Zellzahl und dem Laktat (sowohl L(+)- als auch D(-)-Isomere) statistisch keine bedeutsame Korrelation besteht. Die höchsten r^2 -Werte wurden für die Magen-Proben errechnet. Aber auch hier korrelierten eher *Lactobacillus* spp. und andere Laktobazillen-Spezies mit dem Laktat-Gehalt als die Enterokokken und *E. faecium* NCIMB 10415. Da eine fördernde Wirkung des untersuchten Stamms auf *L. johnsonii* festgestellt wurde, dessen Zellzahlen sowohl im Magen als auch im *Jejunum* mit dem Laktat-Gehalt korrelierten, lässt sich schlussfolgern, dass *E. faecium* NCIMB 10415 indirekt zur Erhöhung des Laktat-Gehaltes beiträgt, zumal das Probiotikum auch andere, in dieser Arbeit nicht untersuchte Laktobazillen fördern könnte, die wie *L. johnsonii* Laktat produzieren.

Betrachtet man die Dynamik des Laktats insgesamt sowie nach L(+)- und D(-)-Form getrennt, so lässt sich zunächst ein deutlicher Rückgang der Gesamtkonzentration im Magen und im *Jejunum* vom 7. bis zum 56. Tag konstatieren, was offensichtlich den Einfluss des Diät-Wechsels widerspiegelt. Hinsichtlich des Verhältnisses von L- und D-Laktat war mit zunehmendem Alter eine tendenzielle Erhöhung der Konzentration (mmol/L) an L-Laktat im Magen und im *Jejunum* zu beobachten; entsprechend ging der relative D-Isomer-Anteil zunehmend zurück. Da es sich bei D-Laktat vor allem um mikrobielles Laktat handelt, passt diese Beobachtung zum Rückgang der Zellzahlen fast aller in Magen und *Jejunum* detektierten bakteriellen Gruppen und Spezies. Die altersabhängige relative Zunahme von L(+)-Laktat in Magen und *Jejunum* könnte durch mehrere Faktoren beeinflusst werden: einerseits ein Substratwechsel und als Folge eine erhöhte L(+)-Laktat-Produktion von Stämmen, die in der Saugperiode nicht vorhanden waren oder nur eine untergeordnete Rolle spielten, andererseits

eine im Vergleich zur Saugperiode intensivere Glycolyse, bei der physiologisches Laktat entsteht. Insgesamt deutet alles darauf hin, dass die gemessenen Laktat-Konzentrationen nicht direkt mit der Anwesenheit der probiotischen Bakterien begründet werden kann.

Ammonium

Die in *Jejunum*- und *Colon ascendens* der Versuchstiere gemessenen Ammoniumionen-Konzentrationen können theoretisch Rückschluss auf die proteolytische Aktivität der intestinalen Mikrobiota geben. Ammonium, Amine und Amide, die nach der Proteolyse entstehen, werden für den Wirt als toxisch und mutagen betrachtet (MACFARLANE & MACFARLANE, 1995; NYACHOTI et al., 2006). Verschiedene Autoren nehmen an, dass Probiotika bzw. einzelne bakterielle Spezies (*Bacteroides spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Streptococcus spp.*) den Stoffwechsel des Wirtsorganismus von solchen giftigen Substanzen entlasten können (MACFARLANE & MACFARLANE, 1995).

Für die gemessenen Konzentrationen von Ammoniumionen in *Jejunum* und *Colon ascendens* wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen beiden Fütterungsgruppen festgestellt. Tendenziell lagen aber die Werte der Kontrollgruppe sowohl im *Jejunum* als auch im *Colon ascendens* zu allen Beobachtungszeitpunkten höher als bei den Probiotikumtieren. Analoges haben auch MACHA (2007) berichtet, was für eine ammonium-reduzierende Wirkung von *E. faecium* NCIMB 10415 spricht. Betrachtet man die Dynamik der Ammoniumionen unabhängig von der Fütterungsvariante, so lässt sich, wie im Fall des Laktats, ein klarer Rückgang der Konzentration in beiden Darmabschnitten beobachten. Dies entspricht wiederum den Ergebnissen anderer Studien: KONSTANTINOV et al. (2004) vermuten, dass der Rückgang des Ammoniumgehalts durch die schnelle Proliferation der intestinalen Bakterien nach dem Absetzen erklärt werden kann. Die im luminalen Inhalt gemessene Konzentration der Ammoniumionen gestattet allerdings keine eindeutige Aussage über ihre tatsächliche Freisetzung, ihre Absorption oder bakterielle Fixierung, da diese Ereignisse vor allem in der mukosalen Schicht bzw. auf der Oberfläche der Epithelzellen passieren.

Flüchtige Fettsäuren

Die flüchtigen Fettsäuren sind Endprodukte der mikrobiellen Fermentation von Kohlenhydraten (BACH-KNUDSEN et al., 1991). Sie sind für den Darm in mehrfacher Hinsicht bedeutsam. Einzelne kurzkettige Fettsäuren können eine antimikrobielle Wirkung gegen pathogene Bakterien aufweisen, und ihre Anwesenheit im Darm wird als gesundheitsförderlich erachtet (ROLFE, 2000). Andere Fettsäuren, wie z.B. iso-Valeriansäure und iso-Buttersäure, gelten hingegen als potenziell toxische Substanzen und als peptidolytische Abbauprodukte (TOPPING & CLIFTON, 2001).

Von besonderer Bedeutung ist die Beteiligung kurzkettiger Fettsäuren an verschiedenen metabolischen Reaktionen des Wirtsorganismus: Essigsäure kann über das Blut in die peripheren Gewebe gelangen und zum Beispiel als Energiequelle für Myozyten dienen (BERGMAN, 1990), Propionsäure nimmt an der Glukoneogenese in der Leber teil (MONTAGNE et al., 2003) und n-Buttersäure ist eine wichtige Energiequelle für Kolonozyten (WANG & FRIEDMAN, 1998; TOPPING & CLIFTON, 2001). Doch die Präsenz kurzkettiger Fettsäuren (wie auch der Milchsäure) im luminalen Inhalt spiegelt nicht unbedingt den Umfang der bakteriellen Produktion dieser Substanzen durch bestimmte Spezies wider. So könnten Anteile der Milchsäure bzw. der flüchtigen Fettsäuren zum Zeitpunkt der Messung bereits von anderen Mikroorganismen metabolisiert oder vom Darm absorbiert worden sein. Auch der physiologische Zustand der bakteriellen Zellen in den Populationen muss in Betracht gezogen werden: Bakterielle Populationen können sowohl metabolisch aktive Zellen (unter anderem *viable but non-culturable*, VBNC und *active but non-culturable*, ABNC) als auch beschädigte und tote Zellen enthalten (YAMAMOTO, 2000).

Die Bestimmung der Konzentrationen flüchtiger Fettsäuren im *Jejunum* und *Colon ascendens* in beiden Versuchsgruppen förderte nur wenige statistisch signifikante Unterschiede zutage. Tendenziell lag der Gehalt flüchtiger Fettsäuren vor dem Absetzen in der Probiotikumgruppe höher als in der Kontrollgruppe. In der Zeit um das Absetzen (28.-35. Tag) wurden dagegen im *Colon ascendens* der Probiotikumtiere weniger flüchtige Fettsäuren gemessen als bei den Kontrolltieren. Dies lässt sich möglicherweise mit der unterschiedlichen Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota beider Fütterungsgruppen sowie der potentiell erhöhten Absorption flüchtiger Fettsäuren bei den Probiotikumtieren erklären. Mit Blick auf die Dynamik der gemessenen Mengen flüchtiger Fettsäuren ist der deutliche alters- bzw. diätabhängige Anstieg (vor allem im *Colon ascendens*) zu erwähnen, der sowohl für Essig-, als auch für Propion-, n-Butter- und n-Valeriansäure registriert wurde. Bei i-Butter- und i-Valeriansäure wurde mit zunehmendem Alter ein tendenzieller Rückgang der Konzentration beobachtet.

Mit Blick auf die relative Entwicklung bei einzelnen Säurearten konnten nur hinsichtlich der Essig- und der n-Buttersäure deutliche Tendenzen ermittelt werden: Ihr Gehalt lag nach dem Absetzen bei den Probiotikumtieren sowohl im *Jejunum* als auch im *Colon ascendens* höher als in der Kontrollgruppe. Nach dem Absetzen erhöhte Mengen von Acetat wurden auch in der Arbeit von MACHA (2007) beobachtet. JADAMUS et al. (2002) stellten nach Verfütterung des probiotischen *Bacillus cereus* var. *toyoi* ebenso erhöhte Mengen von n-Buttersäure fest. Angesichts der antimikrobiellen Wirkung von Essigsäure und der Rolle der Buttersäure als Energiequelle für Enterozyten lässt sich hieraus auf eine positive Wirkung von Probiotika, unter anderem *E. faecium* NCIMB 10415, schließen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Klär, Irina: „Einfluss der Verfütterung des Probiotikums *E. faecium* (NCIMB 10415) im frühen postnatalen Stadium auf die Zusammensetzung und Stoffwechselaktivität der gastrointestinalen Mikrobiota bei Ferkeln“

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss der frühzeitigen Gabe des Probiotikums *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 (ab dem 1. Lebenstag) auf die Mikrobiota des gastrointestinalen Traktes von Ferkeln zu untersuchen. Es sollten sowohl der Verbleib des zugeführten Stammes im Magen-Darm-Trakt der Ferkel als auch die bakterielle Zusammensetzung der Mikrobiota des Magens, distalen *Jejunums* und *Colon ascendens* der Ferkel in allen wichtigen Produktionsphasen (Saugperiode, Übergang zum Festfutter, Absetzen) auf der Gattung- und Spezies-Ebene qualitativ und quantitativ mithilfe von Real-Time PCR untersucht werden. Ausgehend von der Hypothese, dass artverwandte bzw. das gleiche Habitat besiedelnde Bakterien am ehesten Kandidaten für einen probiotischen Einfluss sind, galt ein besonderes Augenmerk den gastrointestinalen Populationen der Laktobazillen. Die Arbeit wurde im Rahmen des DFG-Forschungsprojekts 438 „Integrative Analyse der Wirkungsmechanismen von Probiotika beim Schwein“ zwischen 2005 und 2007 durchgeführt.

Für den Versuch wurden Sauen der Rasse Deutsche Landrasse x Duroc und ihre Nachkommen in zwei Fütterungsgruppen – Kontroll- und Probiotikumgruppe – eingeteilt und räumlich getrennt gehalten. Die Saugferkel wurden am 28. Lebenstag von der Muttersau abgesetzt. Die Supplementierung der Ferkel der Probiotikumgruppe mit dem Probiotikum begann am ersten Tag und dauerte bis zum 56. Lebenstag. In der Saugperiode wurden Ferkel mit dem Probiotikum ab dem 1. bis zum 14. Tag in Form eines Inokulums ($4,8 \times 10^9$ KBE/ml) und ab dem 14. bis zum 34. Tag durch Inokulum und Beimischung zum Prästarter-Futter ($1,6 \times 10^7$ KBE/g) versorgt. Ab dem 35. Lebenstag erfolgte die Gabe des Probiotikums ausschließlich als Beimischung zum Starter-Futter ($4,1 \times 10^6$ KBE/g). Das Futter der Sauen sowie der Kontrollferkel enthielt kein Probiotikum. Je fünf Ferkel pro Gruppe wurden am 7., 14., 28., 35. und 56. Tag getötet, und es wurden Digestaprobe aus Magen, distalem *Jejunum* und *Colon ascendens* entnommen.

Der spezifische Nachweis und die Quantifizierung des probiotischen *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 in den Digestaprobe wurde über eine SYBR-Green Real-Time PCR mit dem *spiked-matrix*-Standard durchgeführt. Qualitative Veränderungen der gesamten bakteriellen Zusammensetzung in den untersuchten Proben wurden mithilfe der denaturierenden Gradienten-Gelelektrophorese (DGGE) dargestellt. Die Modifizierung der Mikroflora auf der Gattungsebene wurde quantitativ über SYBRGreen- und TaqMan-Real-Time PCR-Assays ebenso

mit einem *spiked-matrix*-Standard und den Primern für *Lactobacillus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Bifidobacterium spp.* und *Escherichia spp.* ermittelt. Auf der Spezies-Ebene wurden *Lactobacillus acidophilus*, *L. amylovorus*, *L. johnsonii*, *L. mucosae*, *L. reuteri* sowie die mit dem verfütterten probiotischen Stamm eng verwandten *E. faecium* und *E. faecalis* quantifiziert. Die Bestimmung der bakteriellen Stoffwechselaktivität erfolgte durch Messung der Konzentrationen von Laktat, Ammoniumionen und flüchtigen Fettsäuren in den untersuchten Digestproben.

Der untersuchte probiotische Stamm *E. faecium* NCIMB 10415 kann den Transit durch Magen und Dünndarm der Ferkel überleben und in einem vermehrungsfähigen Zustand das *Colon ascendens* erreichen. Die höchsten Konzentrationen des Probiotikums in Magen, distalem *Jejunum* und *Colon ascendens* wurden nach zweiwöchiger Supplementierung gemessen, eine weitere Verfütterung führte zu keiner Erhöhung der Populationsgröße mehr. Die errechneten prozentualen Anteile von *E. faecium* NCIMB 10415 an der gesamten bakteriellen Population lassen die Schlussfolgerung zu, dass der untersuchte Stamm nur eine untergeordnete Rolle in der gastrointestinalen bakteriellen Gemeinschaft spielt. Die nach dem Absetzen steigenden prozentualen Anteile des Probiotikums an der gesamten bakteriellen Population im Magen und im distalen *Jejunum* könnten darauf hindeuten, dass zumindest in diesen Lokalisationen die frühzeitige Supplementierung mit *E. faecium* NCIMB 10415 die weitere Zusammensetzung der Mikrobiota beeinflussen kann.

Hinsichtlich der mittels DGGE ermittelten Zusammensetzung der eubakteriellen Populationen konnten in der Saugperiode nur vereinzelt statistisch signifikante Unterschiede zwischen den beiden Fütterungsgruppen ermittelt werden. Nach dem Absetzen (31., 35. und 56. Tag) jedoch waren die Magen-, *Jejunum*- und *Colon ascendens*-Mikrobioten der Probiotikum-Ferkel signifikant diverser als die der Kontrolltiere. Die bakteriellen Populationen waren zwischen den Tieren der Probiotikum-Gruppe in allen Lokalisationen und zu fast allen Beobachtungszeitpunkten ähnlicher als in der Kontrollgruppe, was ebenfalls auf eine höhere Stabilität und Homogenität der gastrointestinalen Mikrobiota in der Probiotikum-Gruppe hindeutet.

Auf der Gruppen-Ebene (*Lactobacillus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Escherichia spp.*) zeigte der probiotische Stamm *E. faecium* NCIMB 10415 nur auf *Enterococcus spp.* in Magen, *Jejunum* und *Colon ascendens* an allen Beobachtungszeitpunkten eine statistisch signifikant fördernde Wirkung. Die Zahl der für den Organismus potenziell günstigen Laktobazillen erhöhte sich im Magen und *Colon ascendens* in der Probiotikum-Gruppe nur tendenziell in der Saugphase und nach dem Absetzen. Für die Bifidobakterien wurde kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen beiden Fütterungsgruppen ermittelt. Die Belas-

tung des Magen-Darm-Traktes mit *Escherichia spp.* war in der Probiotikumgruppe nur geringfügig geringer als in der Kontrollgruppe.

Betrachtet man die Ergebnisse der Analyse der gastrointestinalen Laktobazillen-Populationen, so lässt sich mit Blick auf *L. johnsonii* eine fördernde Wirkung von *E. faecium* NCIMB 10415 feststellen. Die Zellzahlen dieser Spezies waren in der Probiotikum-Gruppe sowohl im Magen als auch im distalen *Jejunum* und im *Colon ascendens* vor und nach dem Absetzen signifikant höher als in der Kontrollgruppe. Der unter den untersuchten Laktobazillen-Population fast in allen untersuchten Lokalisationen und an allen Beobachtungstagen dominante Stamm – *L. reuteri* – unterlag dagegen keinem statistisch signifikanten probiotischen Einfluss. Nur tendenziell waren Zellzahlen von *L. reuteri* und *L. amylovorus* bei den Probiotikum-Tieren, vorwiegend nach dem Absetzen, höher als jene in der Kontrollgruppe. Obwohl nur wenige untersuchte Proben *L. mucosae*-positiv waren, war eine statistisch signifikante Wirkung des verfütterten probiotischen Stamms auf diese Spezies im distalen *Jejunum* festzustellen – fast an allen Beobachtungstagen waren sowohl die absoluten als auch die relativen Zellzahlen in der Probiotikum-Gruppe kleiner als in der Kontrolle, was mit einer möglichen verminderten Abschilferung der Epithelzellen in das Darmlumen verbunden sein könnte. *L. acidophilus* wurde unter den untersuchten Laktobazillen-Populationen zu den Begleitspezies gezählt; der Stamm wurde an keinem Beobachtungstag und an keiner der untersuchten Lokalisationen von *E. faecium* NCIMB 10415 nachweislich beeinflusst.

Hinsichtlich der Verbesserung der Mikrobiota durch die Produktion von Laktat waren nur wenige statistisch signifikante Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen zu registrieren. Tendenziell war die Konzentration an L(+)-Laktat in der Probiotikum-Gruppe sowohl im *Jejunum* als auch im *Colon* an fast allen Beobachtungstagen höher als in der Kontrolle. Jedoch bestand keine Korrelation zwischen den Zellzahlen von *E. faecium* NCIMB 10415 bzw. Enterokokken und dem gemessenen Laktat. Dagegen konnte eine solche Korrelation für Zellzahlen von *Lactobacillus spp.* und einzelne andere *Lactobacillus*-Spezies festgestellt werden. Dies, ebenso wie die erhöhten *L. johnsonii*-Zellzahlen, die tendenzielle Reduzierung von *Escherichia spp.* sowie niedrigere Ammoniak-Konzentrationen an allen Beobachtungszeitpunkten und erhöhte Essig- und n-Buttersäure-Mengen nach dem Absetzen in der Probiotikum-Gruppe deuten darauf hin, dass *E. faecium* NCIMB 10415 eine zumindest indirekte Wirkung auf die intestinale Mikrobiota der Ferkel aufweist.

6. SUMMARY

Klär, Irina: „Effect of the probiotic *E. faecium* (NCIMB 10415) as a diet supplement in the early post-natal period on the composition and the metabolic activity of the gastrointestinal microbiota of piglets“

This study examined the effects of the probiotic *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 as a diet supplement (administered from the 1st day post natum) on the intestinal microbiota of piglets. Using different PCR methods, we investigated (both qualitatively and quantitatively) the bacterial composition of the microbiota in the stomach, distal *jejunum*, and *colon ascendens* of piglets throughout the suckling period, the transition to solid food, and the weaning period, thereby keeping track of the applied probiotic within the gastrointestinal tract. Based on the expectation that similar bacteria and those occupying the same habitat are the most likely candidates for a probiotic influence, the main focus was on the gastrointestinal populations of lactobacilli.

For the trial, sows (Landrace x Duroc) and their litter were divided into a probiotic- and a control group and were kept separately. Piglets were weaned on the 28th day of life. The supplementation of piglets in the probiotic group began on day 1 and lasted until the 56th day of life. During the suckling period, from day 1 to 14, piglets received the probiotic via inoculum ($4,8 \times 10^9$ CFU/ml) and via supplement to the pre-starter diet ($1,6 \times 10^7$ CFU/g) from day 14 to 34. Starting on day 35, the probiotic was administered along with the starter diet ($4,1 \times 10^6$ CFU/g). The sow and piglet diet of the control group contained no probiotic. Five piglets per group were euthanised on day 7, 14, 35, and 56, respectively, and digesta samples were removed from the stomach, distal *jejunum* and *colon ascendens*.

SYBR-Green real time PCR with spiked matrix standards was applied for the specific detection and quantification of the probiotic *E. faecium* NCIMB 10415 in the digesta samples. Qualitative changes of the overall bacterial composition in the samples under examination were identified using the denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) method. Quantitative modifications to the microbiota on the genus level were examined by SYBR-Green and TaqMan real time PCR assays, using spiked matrix standards and primers for *Lactobacillus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Bifidobacterium spp.*, and *Escherichia spp.* On the species level, *Lactobacillus acidophilus*, *L. amylovorus*, *L. johnsonii*, *L. mucosae*, and *L. reuteri*, as well as *E. faecium* und *E. faecalis* were quantified. Concentrations of lactate, ammonium ions and short chain fatty acids were measured in order to evaluate the degree of metabolic activity.

E. faecium NCIMB 10415 survived the transit through the stomach and small intestine of the piglets and was found in the *colon ascendens* in high cell numbers. The highest concentration

of the examined probiotic in the gastrointestinal tract was measured two weeks into the trial – subsequent supplementation led to no further increase in the size of the population. The ratio of *E. faecium* NCIMB 10415 within the overall bacterial population suggested that the examined strain plays a subordinate role in the gastrointestinal bacterial community. However, increasing ratios of the probiotic regarding the total bacterial population in stomach and distal jejunum samples after weaning may point to modifying effects on the composition of the microbiota in these localisations, which resulted from an early supplementation with *E. faecium* NCIMB 10415.

Regarding the eubacterial composition, only sporadic statistically significant differences between the two trial groups became visible before weaning. After weaning (days 31, 35, and 56), however, the microbiota of the stomach, distal jejunum and colon ascendens of the probiotic piglets was significantly more diverse than that of the control piglets. At the same time, bacterial populations were more similar between animals of the probiotics group in all localisations and at almost all points of observation, which also indicates a higher consistency and homogeneity of the gastrointestinal microbiota within that group.

On the bacterial group level (*Lactobacillus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Escherichia spp.*), the probiotic strain showed a significant beneficial effect only on *Enterococcus spp.* in all locations and at all points of observations. The number of potentially beneficial lactobacilli tended to increase in the stomach and *colon ascendens* of probiotic piglets in both the suckling and the post-weaning period. As for bifidobacteria, no statistically significant difference could be found. The number of harmful *Escherichia spp.* was slightly lower in the probiotics group compared to the control group.

Concerning the results of the analysis of gastrointestinal lactobacilli, an effect of *E. faecium* NCIMB 10415 on *Lactobacillus johnsonii* could clearly be discerned. The cell numbers of this species were significantly higher in the probiotics group in all three locations and both before and after weaning. The dominant lactobacillus strain – *L. reuteri* – was, however, not significantly affected by the administered probiotic. Cell numbers of *L. reuteri* and *L. amylovorus* tended to be higher in the probiotics group, but not by a significant margin. For *L. mucosae*, despite reduced presence in sample extracts (it is being detected in only a few samples), a statistically significant effect was detected: on almost all days of observation, both absolute and relative cell numbers of *L. mucosae* were smaller in the probiotic group compared to the control group. As this strain is known to adhere to intestinal mucus, this may be connected to a reduced cell turnover of intestinal epithelium. *L. acidophilus* was counted among the accompanying species within the examined population of lactobacilli – at no point

in time and in none of the localisation was it demonstrably affected by *E. faecium* NCIMB 10415.

With a view to the possible improvement of the microbiota through augmented production of lactate, only isolated significant differences between the two trial groups were registered. On almost all days of observation, there was a tendency for the concentration of l-lactate to be higher in the probiotics group, both in the *jejunum* and in the *colon ascendens*. There was, however, no correlation between the cell numbers of *E. faecium* NCIMB 10415 – or enterococci, respectively – and the amount of lactate registered. Yet such a correlation was detected between the cell numbers for *Lactobacillus spp.* and single other *lactobacillus* species. This observation, along with the increase in cell numbers for *L. johnsonii*, the tendency towards a reduction of *Escherichia spp.*, a lower concentration of ammonia at all points in time, and a quantitative increase of acetic and n-butyric acid after weaning in the probiotics group, suggests that *E. faecium* NCIMB 10415 does exert an indirect effect on the composition and activity of the intestinal microbiota of piglets.

LITERATUR

- Abee, T., I. Todd, R. Klaenhammer, L. Letellier (1994): "Kinetic studies of the action of lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus johnsonii* that forms poration complexes in the cytoplasmic membrane." Appl. Environ. Microbiol. **60**(3), S. 1006-1013.
- Adams, B.L., T.C. Bates, J.D. Oliver (2003): "Survival of *Helicobacter pylori* in a natural freshwater environment." Appl. Environ. Microbiol. **69**(12), S. 7462-7466.
- Al Jassim, R.A. (2003): "*Lactobacillus ruminis* is a predominant lactic acid producing bacterium in the caecum and rectum of the pig." Lett. Appl. Microbiol. **37**(3), S. 213-217
- Alam, M.T., T. Midtvedt, A. Uribe (1994): "Differential cell-kinetics in the ileum and colon of germ-free rats." Scand. J. Gastroenterol. **29**(5), S. 445-451.
- Al-Soud, W.A., P. Rådström (2000): "Effects of amplification facilitators on diagnostic PCR in the presence of blood, feces, and meat." J. Clin. Microbiol. **38**(12), S. 4463-4470.
- Apajalahti, J.H., A. Kettunen, P.H. Nurminen, H. Jatila et al. (2003): "Selective plating underestimates abundance and shows differential recovery of bifidobacterial species from human feces." Appl. Environ. Microbiol. **69**(9), S. 5731-5735.
- Apajalahti, J.H., L.K. Särkilahti, B.R. Mäki (1998): "Effective recovery of bacterial DNA and percent-guanine-plus-cytisine-based analysis of community structure in the gastrointestinal tract of broiler chickens." Appl. Environ. Microbiol. **64**(10), S. 4084-4088.
- Asai, S., Y. Nakamura, M. Yamamura, H. Ikezawa et al. (1991): "Quantitative analysis of the Epstein-Barr virus-inducing properties of short-chain fatty acids present in the culture fluids of oral bacteria." Arch. Virol. **119**(3-4), S. 291-296.
- Axelsson, L. (2004): "Lactic acid bacteria: classification and physiology". In: S. Salminen, A. Wright, A. Ouwehand (Hrsg.): Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects. Marcel Dekker, New York, Basel, S. 1-67.
- Bach-Knudsen, K.E., B.B. Jensen, J.O. Andersen, I. Hansen (1991): "Gastrointestinal implications in pigs of wheat and oat fractions. 2. Microbial activity in the gastrointestinal tract." Br. J. Nutr. **65**(2), S. 233-248.
- Bäckhed, F., H. Ding, T. Wang, L.V. Hooper et al. (2004): "The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **101**(44), S. 15718-15723.
- Bäckhed, F., R.E. Ley, J.L. Sonnenburg, D.A. Peterson et al. (2005): "Host-bacterial mutualism in the human intestine." Science **307**(5717), S. 1915-1920.
- Barnard, J.A., J.A. Delzell, N.M. Bulus (1997): "Short chain fatty acid regulation of intestinal gene expression." Adv. Exp. Med. Biol. **422**, S. 137-144.
- Baron, S.F., P.B. Hylemon (1997): "Biotransformation of bile acids, cholesterol, and steroid hormones". In: R.I. Mackie, B.A. White (Hrsg.): Gastrointestinal Microbiology, Vol. I: Gastrointestinal Ecosystems and Fermentations. International Thomson Publishing, New York, S. 470-510.
- Barrow, P.A., B.E. Brooker, R. Fuller, M.J. Newport (1980): "The attachment of bacteria to the gastric epithelium of the pig and its importance in the microecology of the intestine." J. Appl. Bacteriol. **48**(1), S. 147-154.

- Barrow, P.A., R. Fuller, M.J. Newport (1977): "Changes in the Microflora and Physiology of the Anterior Intestinal Tract of Pigs Weaned at 2 Days, with Special Reference to the Pathogenesis of Diarrhea." Infect. Immun. **18**(3), S. 586–595.
- Basson, M.D., Y.W. Liu, A.M. Hanly, N.J. Emenaker et al. (2000): "Identification and comparative analysis of human colonocyte short-chain fatty acid response genes." J. Gastrointest. Surg. **4**(5), S. 501-512.
- Bauer, E., B.A. Williams, H. Smidt, R. Mosenthin et al. (2006): "Influence of dietary components on development of the microbiota in single-stomached species." Nutr. Res. Rev. **19**(1), S. 63-78.
- Baumgärtner, S. (2003): "Warum Messung und Bewertung biologischer Vielfalt nicht unabhängig voneinander möglich sind". In: J. Weimann, A. Hoffmann, S. Hoffmann (Hrsg.): Messung und ökonomische Bewertung von Biodiversität: Mission impossible? Metropolis, Marburg, S.
- Becker, D. (1987): "Vademecum Labordiagnostik". Verlag Volk und Gesundheit, Berlin.
- Ben-Amor, K., H. Heilig, H. Smidt, E.E. Vaughan et al. (2005): "Genetic diversity of viable, injured, and dead fecal bacteria assessed by fluorescence-activated cell sorting and 16S rRNA gene analysis." Appl. Environ. Microbiol. **71**(8), S. 4679-4689.
- Benyacoub, J., G.L. Czarnecki-Maulden, C. Cavadini, T. Sauthier et al. (2003): "Supplementation of food with *Enterococcus faecium* (SF68) stimulates immune functions in young dogs." J. Nutr. **133**(4), S. 1158-1162.
- Berg, R.D. (1996): "The indigenous gastrointestinal microflora." Trends Microbiol. **4**(11), S. 430-435.
- Bergman, E.N. (1990): "Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species." Physiol. Rev. **70**(2), S. 567-590.
- Bertschinger, H.U. (1999): "Postweaning Escherichia coli diarrhea and edema disease". In: B.E. Straw, S. D'Allaire, W.L. Mengeling, D.J. Taylor (Hrsg.): Diseases of Swine. Iowa State University Press, Ames, S. 441-454.
- Beumer, R.R., J.d. Vries, F.M. Rombouts (1992): "*Campylobacter jejuni* non-culturable coccoid cells." Intern. J. Food Microbiol. **15**(1-2), S. 153-163.
- Bezirtzoglou, E. (1997): "The intestinal flora during the first weeks of life." Anaerobe **3**(2-3), S. 173-177.
- Blom, H., C. Mørtvedt (1991): "Anti-microbial substances produced by food associated microorganisms." Biochem. Soc. Trans. **19**, S. 694-698.
- Blomberg, L., A. Henriksson, P.L. Conway (1993): "Inhibition of adhesion of *Escherichia coli* K88 to piglet ileal mucus by *Lactobacillus spp.*" Appl. Env. Microbiol. **59**(1), S. 34-39.
- Böhmer, B.M., W. Kramer, D.A. Roth-Maier (2006): "Dietary probiotic supplementation and resulting effects on performance, health status, and microbial characteristics of primiparous sows." J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. **90**(7-8), S. 309-315.
- Böhmig, G.A., P.M. Krieger, M.D. Säemann, C. Wenhardt et al. (1997): "n-butyrate down-regulates the stimulatory function of peripheral blood-derived antigen-presenting cells: a potential mechanism for modulating T-cell responses by short-chain fatty acids." Immunology **92**(2), S. 234-243.

- Boukhliq, R., G.B.Martin (1997): "Administration of fatty acids and gonadotrophin secretion in the mature ram." Anim. Reprod. Sci. **49**(2-3), S. 143-159.
- Brooks, P.H., C.A. Moran, J.D. Beal, V. Demecková et al. (2001): "Liquid feeding for the young piglet". In: M.A. Varley, J. Wiseman (Hrsg.): *The Weaner Pig: Nutrition and Management*. Oxon: CAB International, Wallingford, S. 153-178.
- Bruininx, E.M., G.P. Binnendijk, C.M.v.d. Peet-Schwering, J.W. Schrama et al. (2002): "Effect of creep feed consumption on individual feed intake characteristics and performance of group-housed weanling pigs." J. Anim. Sci. **80**(6), S. 1413-1418.
- Bry, L., P.G. Falk, T. Midtvedt, J.I. Gordon (1996): "A model of host-microbial interactions in an open mammalian ecosystem." Science **273**(5280), S. 1380-1383.
- Callewaert, R., H. Holo, B. Devreese, J.v. Beeumen et al. (1999): "Characterization and production of amylovorin L471, a bacteriocin purified from *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 by a novel three-step method." Microbiology **145**(9), S. 2559-2568.
- Canh, T.T., A.L. Sutton, A.J. Aarnink, M.W. Verstegen et al. (1998): "Dietary carbohydrates alter the fecal composition and pH and the ammonia emission from slurry of growing pigs." J. Anim. Sci. **76**(7), S. 1887-1895.
- Carbon, P., C. Ehresmann, B. Ehresmann, J.P. Ebel (1979): "The complete nucleotide sequence of the ribosomal 16S RNA from *Escherichia coli*." Eur. J. Biochem. **100**(2), S. 399-410.
- Carstensen, L., A.K. Ersbøll, K.H. Jensen, P. Nielsen (2005): "*Escherichia coli* post-weaning diarrhoea occurrence in piglets with monitored exposure to creep feed." Vet. Microbiol. **10**(1-2), S. 113-123.
- Castillo, M., S.M. Martín-Orúe, M. Nofrarias, E.G. Manzanilla et al. (2007): "Changes in cecal microbiota and mucosal morphology of weaning pigs." Vet. Microbiol. **124**(3-4), S. 239-247.
- Cherbut, C., A.C. Aubé, H.M. Blottière, J.P. Galmiche (1997): "Effects of short-chain fatty acids on gastrointestinal motility." Scand. J. Gastroenterol. **222**(Suppl.), S. 58-61.
- Cherrington, C.A., M. Hinton, G.R. Pearson, I. Chopra (1991): "Short-chain organic acids at pH 5.0 kill *Escherichia coli* and *Salmonella spp.* without causing membrane perturbation." J. Appl. Bacteriol. **70**(2), S. 161-165.
- Clewell, D.B. (1990): "Movable genetic elements and antibiotic resistance in enterococci." Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **9**(2), S. 90-102.
- Cole, S.T., I.S. Giron (1994): "Bacterial genomics." FEMS Microbiol. Rev. **14**(2), S. 139-160.
- Collado, M.C., Ł. Grześkowiak, S. Salminen (2007): "Probiotic strains and their combination inhibit in vitro adhesion of pathogens to pigs intestinal mucosa." Curr. Microbiol. **55**(3), S. 260-265.
- Collado, M.C., M. Hernández, Y. Sanz (2005): "Production of bacteriocin-like inhibitory compounds by human fecal Bifidobacterium strains." J. Food Prot. **68**(5), S. 1034-1040.

- Colwell, R.R., P.R. Brayton, D.J. Grimes, D.R. Roszak et al. (1985): "Viable but Non-Culturable *Vibrio cholerae* and Related Pathogens in the Environment: Implications for Release of Genetically Engineered Microorganisms." Bio/Technology **3**, S. 817-820.
- Cooperstock, M.S., A.J. Zedd (1983): "Intestinal flora of infants". In: D.J. Hentges (Hrsg.): Human intestinal microflora in health and disease. Academic Press, New York, S. 79-99.
- Cranwell, P.D., D.E. Noakes, K.J. Hill (1976): "Gastric secretion and fermentation in the suckling pig." Br. J. Nutr. **36**(1), S. 71.
- De Vuyst, L., M.R. Foulquié Moreno, H. Revets (2003): "Screening for enterocins and detection of hemolysin and vancomycin resistance in enterococci of different origins." Int. J. Food. Microbiol. **84**(3), S. 299-318.
- Demecková, V., D. Kelly, A.G. Coutts, P.H. Brooks et al. (2002): "The effect of fermented liquid feeding on the faecal microbiology and colostrums quality of farrowing sows." Int. J. Food Microbiol. **79**(1-2), S. 85-97.
- Dethlefsen, L., M. McFall-Ngai, D.A. Relman (2007): "An ecological and evolutionary perspective on human-microbe mutualism and disease." Nature **449**(7164), S. 811-818.
- Devlieghere, F., J. Debevere (2000): "Influence of dissolved carbon dioxide on the growth of spoilage bacteria." Lebensm. Wiss. Technol. **33**(8), S. 531-537.
- Devriese, L.A., J. Hommeez, B. Pot, F. Haesebrouck (1994): "Identification and composition of the streptococcal and enterococcal flora of tonsils, intestines and faeces of pigs." J. Appl. Bacteriol. **77**(1), S. 31-36.
- du Toit, M., C.M. Franz, L.M. Dicks, U.S.e. al (1998): "Characterisation and selection of probiotic lactobacilli for a preliminary minipig feeding trial and their effect on serum cholesterol levels, faeces pH and faeces moisture content." Int. J. Food Microbiol. **40**(1-2), S. 93-104.
- du Toit, M., C.M. Franz, L.M. Dicks, W.H. Holzapfel (2000): "Preliminary characterization of bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolated from pig faeces." J. Appl. Microbiol. **88**(3), S. 482-494.
- Eaton, T.J. & M.J. Gasson (2001): "Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates." Appl. Environ. Microbiol. **67**(4), S. 1628-1635.
- Eckburg, P.B., E.M. Bik, C.N. Bernstein, E. Purdom et al. (2005): "Diversity of the human intestinal microbial flora." Science **308**(5728), S. 1635-1638.
- Egert, M., A.d. Graaf, H. Smidt, W.M.d. Vos et al. (2006): "Beyond diversity: functional microbiomics of the human colon." Trends Microbiol. **14**(2), S. 86-91.
- Eich, K.-O., U. Schmidt (1998): "Handbuch Schweinekrankheiten". Landwirtschaftsverlag, Münster.
- Fairbrother, J.M. (1999): "Neonatal *Escherichia coli* diarrhea". In: B.E. Straw, S. D'Allaire, W.L. Mengeling, D.J. Taylor (Hrsg.): Diseases of Swine. Iowa State University Press, Ames, S. 433-441.

- Falk, P.G., L.V. Hooper, T. Midtvedt, J.I. Gordon (1998): "Creating and maintaining the gastrointestinal system: what we know and need to know from gnotobiology." Microbiol. Mol. Biol. Rev. **62**(4), S. 1157-1170.
- Farrelly, V., F.A. Rainey, E. Stackebrandt (1995): "Effect of genome size and *rrn* gene copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species." Appl. Environ. Microbiol. **61**(7), S. 2798-2801.
- Favier, C.F., E.E. Vaughan, W.M.d. Vos, A.D. Akkermans (2002): "Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates." Appl. Environ. Microbiol. **68**(1), S. 219-226.
- Federighi, M., J.L. Tholozan, J.M. Cappelier, J.P. Tissier et al. (1998): "Evidence of non coccoid viable but non culturable *Campylobacter jejuni* cells in microcosm water by direct viable count, CTC-DAPI double staining and scanning electron microscopy." Food Microbiol. **15**(5), S. 539-550.
- Fleischmann, R.D., M.D. Adams, O. White, R.A. Clayton et al. (1995): "Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd." Science **269**(5223), S. 496-512.
- Fontaine, E.A., E. Claydon, D. Tayler-Robinson (1996): "Lactobacilli from women with or without bacterial vaginosis and observations on the significance of hydrogen peroxide." Microb. Ecol. Health Dis. **9**, S. 135-141.
- Foulquié Moreno, M.R., R. Callewaert, B. Devreese, J.v. Beeumen et al. (2003): "Isolation and biochemical characterisation of enterocins produced by enterococci from different sources." J. Appl. Microbiol. **94**(2), S. 214-229.
- Franklin, M.A., A.G. Mathew, J.R. Vickers, R.A. Clift (2002): "Characterization of microbial populations and volatile fatty acid concentrations in the jejunum, ileum, and cecum of pigs weaned at 17 vs 24 days of age." J. Anim. Sci. **80**(11), S. 2904-2910.
- Franz, C.M., W.H. Holzapfel (2004): "The genus *Enterococcus*: biotechnological and safety issues." In: S. Salminen, A. Wright, A. Ouwehand (Hrsg.): *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*. Marcel Dekker, New York, Basel, S. 199-249.
- Franz, C.M., W.H. Holzapfel, M.E. Stiles (1999): "Enterococci at the crossroads of food safety?" Int. J. Food Microbiol. **47**(1-2), S. 1-24.
- Freter, R. (1992): "Factors affecting the microecology of the gut". In: R. Fuller (Hrsg.): *Probiotics - The Scientific Basis*. Chapman & Hall, London, S. 111-144.
- Freter, R., H. Brickner, M. Botney (1983): "Mechanisms that control bacterial populations in continuous-flow culture models of mouse large intestinal flora." Infect. Immun. **39**(2), S. 676-685.
- Fritz, J.H., S.E. Girardin, C. Fitting, C. Werts (2005): "Synergistic stimulation of human monocytes and dendritic cells by Toll-like receptor 4 and NOD1- and NOD2-activating agonists." Eur. J. Immunol. **35**(8), S. 2459-2470.
- Fu, C.J., J.N. Carter, Y. Li, J.H. Porter et al. (2006): "Comparison of agar plate and real-time PCR an enumeration of *Lactobacillus*, *Clostridium perfringens* and total anaerobic bacteria in dog faeces." Let. Appl. Microbiol. **42**(5), S. 490-494.

- Fujiwara, S., Y. Seto, A. Kimura, H. Hashiba (2001): "Intestinal transit of an orally administered streptomycin-rifampicin-resistant variant of *Bifidobacterium longum* SBT2928: its long-term survival and effect on the intestinal microflora and metabolism." J. Appl. Microbiol. **90**(1), S. 43-52.
- Fuller, R. (1989): "Probiotics in man and animals." J. Appl. Bacteriol. **66**(5), S. 365-378.
- Fuller, R. (1999): "Probiotics for farm animals". In: G.W. Tannock (Hrsg.): Probiotics - A Critical Review. Horizon Scientific Press, Wymondham, S. 15-22.
- Furet, J.P., P. Quenee, P. Tailliez (2002): "Identification and quantification of lactic acid bacteria by real time quantitative PCR assay." Sci. Aliments **22**, S. 33-44.
- García-Lafuente, A., M. Antolín, F. Guarner, E. Crespo et al. (2001): "Modulation of colonic barrier function by the composition of the commensal flora in the rat." Gut **48**(4), S. 503-507.
- Garvie, E.I. (1980): "Bacterial lactate dehydrogenases." Microbiol. Rev. **44**(1), S. 106-39.
- Gavin, A., K. Ostovar (1977): "Microbiological characterization of human milk." J. Food Protec. **40**, S. 614-616.
- Genovese, K.J., R.C. Anderson, R.B. Harvey, D.J. Nisbet (2000): "Competitive exclusion treatment reduces the mortality and fecal shedding associated with enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in nursery-raised neonatal pigs." Can. J. Vet. Res. **64**(4), S. 204-207.
- Giesecke, D., M. Stangassinger, K. Henle (1985): "D(-)Milchsäure - ein Stoffwechselproblem." Z. Ernährungswissenschaft **24**, S. 172-186.
- Hampson, D.J. (1986): "Alterations in piglet small intestinal structure at weaning." Res. Vet. Sci **40**(1), S. 32-40.
- He, J.W., S. Jiang (2005): "Quantification of Enterococci and human Adenoviruses in environmental samples by real-time PCR." Appl. Environ. Microbiol. **71**(5), S. 2250-2255.
- Heinemann, C., J.E.v.H. Vlieg, D.B. Janssen, H.J. Busscher et al. (2000): "Purification and characterization of a surface-binding protein from *Lactobacillus fermentum* RC-14 that inhibits adhesion of *Enterococcus faecalis* 1131." FEMS Microbiol. Lett. **190**(1), S. 177-180.
- Heinrichs, M. (2005): "Auswirkungen von *Enterococcus faecium* als Futterzusatzstoff auf die Keimflora und Zusammensetzung des Darminhalts sowie auf die Leistung von Broilern bei gleichzeitigem Einsatz eines Kokzidiostatikums." Vet. med. Diss., Tierärztliche Hochschule Hannover.
- Hentges, D.J. (1992): "Gut flora and disease resistance". In: R. Fuller (Hrsg.): Probiotics - The Scientific Basis. Chapman & Hall, London, S. 87-107.
- Heyman, M., S. Menard (2002): "Probiotic microorganisms: how they affect intestinal pathophysiology." Cell Mol. Life Sci. **59**(7), S. 1151-1165.
- Hirsch, K. (2005): "Untersuchungen zur Beeinflussung der Mikrobiota im Dünndarm von Ferkeln nach Verfütterung einer enzysupplementierten Getreidediät unter Anwendung 16S rDNA-Sondenhybridisierung". Vet. med. Diss., Institut für Tierernährung, Freie Universität Berlin.

- Hooper, L.V. (2004): "Bacterial contributions to mammalian gut development." Trends Microbiol. **12**(3), S. 129-134.
- Hooper, L.V., J.I. Gordon (2001): "Glucans as legislators of host-microbial interactions: spanning spectrum from symbiosis to pathogenicity." Glycobiology **11**(2), S. 1-10.
- Ichikawa, H., T. Kuroiwa, A. Inagaki, R. Shineha et al. (1999): "Probiotic bacteria stimulate gut epithelial cell proliferation in rat." Dig. Dis. Sci. **44**(10), S. 2119-2123.
- Inoue, R., T. Tsukahara, N. Nakanishi, K. Ushida (2005): "Development of the intestinal microbiota in the piglet." J. Gen. Appl. Microbiol. **51**(4), S. 257-265.
- Jadamus, A., W. Vahjen, K. Schäfer, O. Simon (2002): "Influence of the probiotic strain *Bacillus cereus* var. *toyoi* on the development of enterobacterial growth and on selected parameters of bacterial metabolism in digesta samples of piglets." J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.) **86**(1-2), S. 42-54.
- Jadamus, A., W. Vahjen, O. Simon (2001): "Growth behaviour of a spore forming probiotic strain in the gastrointestinal tract of broiler chicken and piglets." Arch. Anim. Nutr. **54**(1), S. 1-17.
- Jensen, B.B. (1998): "The impact of feed additives on the microbial ecology of the gut in young pigs." J. Anim. Feed Sci. **89**, S. 175-188.
- Jeroch, H., W. Drochner, O. Simon (1999): "Ernährung landwirtschaftlicher Nutztiere". Ulmer, Stuttgart.
- Jervøe-Storm, P.M., M. Koltzsch, W. Falk, A. Dörfler et al. (2005): "Comparison of culture and real-time PCR for detection and quantification of five putative periodontopathogenic bacteria in subgingival plaque samples." J. Clin. Periodont. **32**(7), S. 778-783.
- Jones, D.M., E.M. Sutcliffe, A. Curry (1991): "Recovery of viable but non-culturable *Campylobacter jejuni*." J. Gen. Microbiol. **137**(10), S. 2477-2482.
- Jonsson, E., P. Conway (1992): "Probiotic for pigs". In: R. Fuller (Hrsg.): Probiotics - The Scientific Basis. Chapman & Hall, London, S. 260-303.
- Karsai, A., S. Müller, S. Platz, M.T. Hauser (2002): "Evaluation of a homemade SYBR Green I reaction mixture for real-time PCR quantification of gene-expression." Biotechniques **32**(4), S. 790-796.
- Kassen, R., P.B. Rainey (2004): "The ecology and genetics of microbial diversity." Annu. Rev. Microbiol. **58**, S. 207-231.
- Katayama, K., K. Wada, A. Nakajima, H. Mizuguchi et al. (2003): "A novel PPAR gamma gene therapy to control inflammation associated with inflammatory bowel disease in a murine model." Gastroenterology **124**(5), S. 1315-1324.
- Katouli, M., A. Lund, P. Wallgren, I.K.e. al. (1995): "Phenotypic characterization of intestinal *Escherichia coli* of pigs during suckling, postweaning, and fattening periods." Appl. Environ. Microbiol. **61**(2), S. 778-783.
- Katouli, M., A.L. Wallgren, I. Kühn, e. al. (1997): "Metabolic fingerprinting and fermentative capacity of the intestinal flora of pigs during pre- and post-weaning periods." J. Appl. Microbiol. **83**(2), S. 147-154.

- Katouli, M., P. Wallgren (2005): "Metabolism and population dynamic of the intestinal microflora in the growing pig". In: W.H. Holzapfel, P.J. Naughton (Hrsg.): *Biology of growing animals series: Volume 2: Microbial ecology in growing animals*. Elsevier, S. 21-53.
- Ke, D., J.F. Picard, F. Martineau, C. Ménard et al. (1999): "Development of a PCR Assay for rapid detection of Enterococci " *J. Clin. Microbiol.* **37**(11), S. 3497-3503.
- Kell, D.B., A.S. Kaprelyants, D.H. Weichart, C.R. Harwood et al. (1998): "Viability and activity in readily culturable bacteria: a review and discussion of the practical issues." *Antonie van Leeuwenhoek* **73**(2), S. 169-187.
- Kelly, D., J.I. Campbell, T.P. King, G. Grant et al. (2004): "Commensal anaerobic gut bacteria attenuate inflammation by regulating nuclear-cytoplasmic shuttling of PPAR-gamma and RelA." *Nat. Immunol.* **5**(1), S. 104-112.
- Kelly, D., T. King, R. Aminov (2007): "Importance of microbial colonization of the gut in early life to the development of immunity." *Mutat. Res.* **622**(1-2), S. 58-69.
- Kirjavainen, P.V., A.C. Ouwehand, E. Isolauri, S.J. Salminen (1998): "The ability of probiotic bacteria to bind to human intestinal mucus." *FEMS Microbiol. Lett.* **167**(2), S. 185-189.
- Konstantinov, S.R., A. Awati, H. Smidt, B.A.W.e. al. (2004): "Specific response of a novel and abundant *Lactobacillus amylovorus*-like phylotype to dietary prebiotics in the guts of weaning piglets." *Appl. Environ. Microbiol.* **70**(7), S. 3821-3830.
- Konstantinov, S.R., A.A. Awati, B.A. Williams, B.G. Miller et al. (2006): "Post-natal development of the porcine microbiota composition and activities." *Environ. Microbiol.* **8**(7), S. 1191-1199.
- Kontanis, E.J., F.A. Reed (2006): "Evaluation of Real-Time PCR amplification efficiencies to detect PCR inhibitors." *J. Forensic. Sci.* **51**(4), S. 795-804.
- Koolman, J., K.-H. Röhm (2003): "Taschenatlas der Biochemie". Thieme, Stuttgart.
- Kraatz, M., D. Taras, K. Männer, O. Simon (2006): "Weaning pig performance and faecal microbiota with and without in-feed addition of rare earth elements." *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl)* **90**(9-10), S. 361-368.
- Kubista, M., J.M. Andrade, M. Bengtsson, A. Forootan et al. (2006): "The real-time polymerase chain reaction." *Mol. Aspects Med.* **27**(2-3), S. 95-125.
- Kuhbacher, T., S.J. Ott, U. Helwig, T. Mimura et al. (2006): "Bacterial and fungal microbiota in relation to probiotic therapy (VSL#3) in pouchitis." *Gut* **55**(6), S. 833-841.
- Kurita-Ochiai, T., K. Fukushima, K. Ochiai (1995): "Volatile fatty acids, metabolic by-products of periodontopathic bacteria, inhibit lymphocyte proliferation and cytokine production." *J. Dent. Res.* **74**(7), S. 1367-1373.
- Kwak, T.J., D.A. Peterson (2007): "Community indices, parameters, and comparisons". In: M. Brown, C. Guy (Hrsg.): *Analysis and interpretation of freshwater fisheries data*, S. 677-763.
- Lahtinen, S.J., M. Gueimonde, A.C. Ouwehand, J.P.R.e. al. (2005): "Probiotic bacteria may become dormant during storage." *Appl. Environ. Microbiol.* **71**(3), S. 1662-1663.

- Lahtinen, S.J., M.G.C. Ouwehand, J.P. Reinikainen, et al. (2006): "Comparison of four methods to enumerate probiotic bifidobacteria in a fermented food product." Food Microbiol. **23**(6), S. 571-577.
- Lallès, J.-P., G. Boudry, C. Favier, N.L. Floc'h et al. (2004): "Gut function and dysfunction in young pigs: physiology." Anim. Res. **53**(4), S. 301-316.
- Landman, D., J.M. Quale (1997): "Management of infections due to resistant enterococci: a review of therapeutic options." J. Antimicrob. Chemother. **40**(2), S. 61-170.
- Lauková, A., P. Guba, R. Nemcová, Z. Vasilková (2003): "Reduction of Salmonella in gnotobiotic Japanese quails caused by the enterocin A-producing EK13 strain of *Enterococcus faecium*." Vet. Res. Comm. **27**(4), S. 275-280.
- Le Dividich, J., B. Sève (2000): "Effects of underfeeding during the weaning period on growth, metabolism, and hormonal adjustments in the piglet." Dom. Anim. Endocrinol. **19**(2), S. 63-74.
- Leclerc, H., L.A. Devriese, D.A. Mossel (1996): "Taxonomical changes in intestinal (faecal) enterococci and streptococci: consequences on their use as indicators of faecal contamination in drinking water." J. Appl. Bacteriol. **81**(5), S. 459-466.
- Leclercq, R. (1997): "Enterococci acquire new kinds of resistance." Clin. Infect. Dis. **24**(Suppl. 1), S. 80-84.
- LeLeiko, N.S., M.J. Walsh (1996): "The role of glutamine, short-chain fatty acids, and nucleotides in intestinal adaptation to gastrointestinal disease." Pediatr. Clin. North. Am. **43**(2), S. 451-470.
- Leser, T.D., J.Z. Amenuvor, T.K. Jensen, R.H. Lindecrona et al. (2002): "Culture-independent analysis of gut bacteria: the pig gastrointestinal tract microbiota revisited." Appl. Environ. Microbiol. **68**(2), S. 673-690.
- Leser, T.D., R.H. Lindecrona, T.K. Jensen, B.B. Jensen et al. (2000): "Changes in the colon of pigs fed different experimental diet and after infection with *Brachyspira hyodysenteriae*." Appl. Environ. Microbiol. **66**(8), S. 3290-3296.
- Lévêque, C., J.-C. Mounolou (2004): "Biodiversity". Wiley, New York.
- Lewenstein, A., G. Frigerio, M. Moroni (1979): "Biological properties of SF 68, a new approach for the treatment of diarrheal diseases." Curr. Ther. Res. **26**, S. 967-981.
- Ley, R.E., F. Bäckhed, P. Turnbaugh, C.A.L.e. et al. (2005): "Obesity alters gut microbial ecology." PNAS **102**(31), S. 11070-11075.
- Ley, R.E., D.A. Peterson, J.I. Gordon (2006): "Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestines." Cell **124**(4), S. 837-848.
- Lilly, D.M., R.H. Stillwell (1965): "Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms." Science **147**, S. 747-748.
- Lindermayer, H., G. Propstmeier, K. Straub (1994): "Fütterungsberater Schwein". Ulmer, Stuttgart.
- Lindgren, S.E., W.J. Dobrogosz (1990): "Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations." FEMS Microbiol. Rev. **7**(1-2), S. 149-163.

- Lorenz, I. (2004): "Influence of D- lactate on metabolic acidosis and on prognosis in neonatal calves with diarrhoea." J. Vet. Med. **51**(9-10), S. 425-428.
- Lorenz, I., A. Gentile, W. Klee (2005): "Investigations of D-lactate metabolism and the clinical signs of D-lactataemia in calves." Vet. Res. **156**(25), S. 412-415.
- Lotz, M., D. Gutle, S. Walther, S. Menard et al. (2006): "Postnatal acquisition of endotoxin tolerance in intestinal epithelial cells." J. Exp. Med. **203**(4), S. 973-984.
- Lund, B., C. Edlund (2001): "Probiotic *Enterococcus faecium* strain is a possible recipient of the vanA gene cluster." Clin. Infect. Dis. **32**(9), S. 1384-1385.
- Lyons, S.R., A.L. Griffen, E.J. Leys (2000): "Quantitative real-time PCR for *Porphyromonas gingivalis* and total bacteria." J. Clin. Microbiol. **38**(6), S. 2362-2365.
- Macfarlane, G.T., G.R. Gibson, J.H. Cummings (1992): "Comparison of fermentation reactions in different regions of the human colon." J. Appl. Bacteriol. **72**(1), S. 57-64.
- Macfarlane, S., J.F. Dillon (2007): "Microbial biofilms in the human intestinal tract." J. Appl. Microbiol. **102**(5), S. 1187-1196.
- Macfarlane, S., G.T. Macfarlane (2003): "Regulation of short-chain fatty acid production." Proc. Nutr. Soc. **62**(1), S. 67-72.
- Macha, M. (2007): "Auswirkungen eines *Enterococcus faecium*-Probiotikums auf Leistungsdaten und ausgewählte Parameter der intestinalen Mikrobiota beim Schwein". *Vet. med. Diss.*, Institut für Tierernährung, Freie Universität Berlin.
- Macha, M., D.Taras, W. Vahjen, A. Arini et al. (2004): "Specific enumeration of the probiotic strain *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 in the intestinal tract and in faeces of piglets and sows." Arch. Anim. Nutr. **58**(6), S. 443-452.
- Mack, D.R., S. Michail, S. Wei, L. McDougall et al. (1999): "Probiotics inhibit enteropathogenic *E. coli* adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression." Am. J. Physiol. **276**(4), S. 941-950.
- Mackie, R.I., A. Sghir, H.R. Gaskins (1999): "Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract." Am. J. Clin. Nutr. **69**(5), S. 1035-1045.
- Magalhaes, J.G., D.J. Philpott, M.A. Nahori, M.J.e. al. (2005): "Murine Nod1 but not its human orthologue mediates innate immune detection of tracheal cytotoxin." EMBO Rep. **6**(12), S. 1201-1207.
- Magalhaes, J.G., I. Tattoli, S.E. Girardin (2007): "The intestinal epithelial barrier: how to distinguish between the microbial flora and pathogens." Semin. Immunol. **19**(2), S. 106-115.
- Malinen, E., A. Kassinen, T. Rinttilä, A. Palva (2004): "Comparison of real-time PCR with SYBR Green I or 5'-nuclease assays and dot-blot hybridization with rDNA-targeted oligonucleotide probes in quantification of selected faecal bacteria." Microbiology **149**(1), S. 269-277.
- Manichanh, C., L. Rigottier-Gois, E. Bonnaud, K. Gloux et al. (2006): "Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach." Gut **55**(2), S. 205-211.

- Männer, K., A. Jadamus, W. Vahjen, U. Frackenpohl et al. (2002): "Effekte probiotischer Zusätze bei Puten auf Leistungsmerkmale und intestinale Mikroflora". In: M. Rodehutschcord (Hrsg.): 7. Tagung Schweine- und Geflügelernährung. Universitätsdruckerei Halle (Saale), S. 78-80.
- Marteau, P., P. Pochart, Y. Bouhnik, J.C. Rambaud (1993): "The fate and effects of transiting, nonpathogenic microorganisms in the human intestine." World Rev. Nutr. Diet. **74**, S. 1-21.
- Mathew, A.G., T. Jones, M.A. Franklin (1994): "Effect of creep feeding on selected microflora and short-chain fatty acids in the ileum of weanling pigs." J. Anim. Sci. **72**(12), S. 3163-3168.
- Matsumiya, Y., N. Kato, K. Watanabe, H. Kato (2002): "Molecular epidemiological study of vertical transmission of vaginal Lactobacillus species from mothers to newborn infants in Japan, by arbitrarily primed polymerase chain reaction." J. Infect. Chemother. **8**(1), S. 43-49.
- Matsunaga, N., M. Wakiya, S.G. Roh, M. Hirota et al. (1998): "Effect of cholinergic blockade on inhibited GH secretion by feeding and intraruminal SCFA infusion in sheep." Am. J. Physiol. **274** (1), S. 45-51.
- McRoberts, J.A., N.E. Riley (1994): "Modulation of growth factor and cytokine-induced increases in T84 cell monolayer permeability by media components." Am. J. Physiol. **267**(2), S. 537-543.
- Meijerink, J., C. Mandigers, L.v.d. Locht, E. Tönissen et al. (2001): "A novel method to compensate for different amplification efficiencies between patient DNA samples in quantitative real-time PCR." J. Mol. Diagn. **3**(4), S. 55-61.
- Melin, L., M. Jensen-Waern, A. Johannisson, M.E.e. al. (1997): "Development of selected faecal microfloras and of phagocytic and killing capacity of neutrophils in young pigs." Vet. Microbiol. **54**(3-4), S. 287-300.
- Melin, L., M. Katouli, A. Linberg, C. Fossum et al. (2000): "Weaning of piglets. Effects of an exposure to a pathogenic strain of *Escherichia coli*." J. Vet. Med. **47**(9), S. 663-675.
- Mikelsaar, M., R. Mändar, E. Sepp, H. Annuk (2004): "Human lactic acid bacteria and its role in the welfare of the host". In: S. Salminen, A. Wright, A. Ouwehand (Hrsg.): Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects. Marcel Dekker, New York, Basel, S. 453-507.
- Mikkelsen, L.L., C. Bendixen, M. Jakobsen, B.B. Jensen (2003): "Enumeration of Bifidobacteria in gastrointestinal samples from piglets." Appl. Environ. Microbiol. **69**(1), S. 654-658.
- Miller, B.G., P.S. James, M.W. Smith, F.J. Bourne (1986): "Effect of weaning on the capacity of pig intestinal villi to digest and absorb nutrients." J. Agric. Sci. Camb. **107**, S. 579-585.
- Molitor, D. (1996): "*In vitro*- und *in vivo*-Effekte eines Probiotikums (*Enterococcus faecium*) als Futterzusatz bei Hunden". Vet. med. Diss., Tierärztliche Hochschule Hannover.
- Monis, P.T., S. Giglio, C.P. Saint (2005): "Comparison of SYTO9 and SYBR Green I for real-time polymerase chain reaction and investigation of the effect of dye concentration on amplification and DNA melting curve analysis." Anal. Biochem. **340**(1), S. 24-34.

- Monteiro, L., D. Bonnemaïson, A. Vekris, K.G. Petry et al. (1997): "Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: *Helicobacter pylori* model." J. Clin. Microbiol. **35**(4), S. 995-998.
- Montagne, L., J.R. Pluske, D.J. Hampson (2003): "A review of interactions between dietary fibre and the intestinal mucosa, and their consequences on digestive health in young non-ruminant animals." Anim. Feed Sci. Tech. **108**(1), S. 95-117.
- Mosenthin, R., W.C. Sauer, F. Ahrens (1994): "Dietary pectin's effect on ileal and fecal amino acid digestibility and exocrine pancreatic secretions in growing pigs." J. Nutr. **124**, S. 1222-1229.
- Moura, P., F. Simões, F. Gírio, M.C. Loureiro-Dias et al. (2007): "PCR monitoring of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* dynamics in fermentations by piglet intestinal microbiota." J. Basic Microbiol. **47**(2), S. 148-157.
- Müllhard, C. (2003): "Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics". Spektrum Akademischer Verlag, München.
- Murray, B.E. (1990): "The life and times of the *Enterococcus*." Clin. Microbiol. Rev. **3**(1), S. 46-65.
- Murray, R.D., H.J. McClung, B.U. Li, A. Ailabouni (1987): "Short chain fatty acid profile in the colon of newborn piglets using fecal water analysis." Pediatr. Res. **22**(6), S. 720-724.
- Muyzer, G. (1999): "DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems." Curr. Op. Microbiol. **2**(3), S. 317-322.
- Muyzer, G., K. Smalla (1998): "Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology." Antonie van Leeuwenhoek **73**(1), S. 127-141.
- Muyzer, G., E.C.d. Waal, A.G. Uitterlinden (1993): "Profiling of complex microbial populations by DGGE analysis of PCR amplified genes coding for 16S rRNA." Appl. Environ. Microbiol. **59**(3), S. 695-700.
- Naito, S., H. Hayashidani, K. Kaneko, M. Ogawa et al. (1995): "Development of intestinal lactobacilli in normal piglets." J. Appl. Bacteriol. **79**(2), S. 230-236.
- Nath, K., J.W. Sarosy, J. Hahn, C.J.D. Como (2000): "Effects of ethidium bromide and SYBR Green I on different polymerase chain reaction systems." J. Biochem. Biophys. Methods **42**(1-2), S. 15-29.
- Neeser, J.R., D. Granato, M. Rouvet, A. Servin et al. (2000): "*Lactobacillus johnsonii* shares carbohydrate-binding specificities with several enteropathogenic bacteria." Glycobiology **10**(11), S. 1193-1199.
- Neish, A.S., A.T. Gewirtz, H. Zeng, A.N. Young et al. (2000): "Prokaryotic regulation of epithelial responses by inhibition of IkappaB-alpha ubiquitination." Science **289**(5484), S. 1560-1563.
- Nousiainen, J., P. Javanainen, J. Setälä, A.v. Wright (2004): "Lactic acid bacteria as animal probiotic". In: S. Salminen, A. Wright, A. Ouwehand (Hrsg.): Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects. Marcel Dekker, New York, Basel, S. 547-581.

- Nübel, U., B. Engelen, A. Felske, J. Snaidr et al. (1996): "Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis." J. Bacteriol. **178**(19), S. 5636-5643.
- Nyachoti, C.M., F.O. Omogbenigun, M. Rademacher, G. Blank (2006): "Performance responses and indicators of gastrointestinal health in early-weaned pigs fed low protein amino acid-supplemented diets." J. Anim. Sci. **84**(1), S. 125-134.
- Omole, O.O., G. Nappert, J.M. Naylor, G.A. Zello (2001): "Both L- and D- lactate contribute to metabolic acidosis in diarrheic calves." J. Nutr. **131**(8), S. 2128-2131.
- Ouwehand, A.C., P.L. Conway (1996): "Purification and characterization of a component produced by *Lactobacillus fermentum* that inhibits the adhesion of K88 expressing *Escherichia coli* to porcine ileal mucus." J. Appl. Bact. **80**(3), S. 311-318.
- Ouwehand, A.C., P.L. Conway (2004): "The probiotic potential of Propionibacteria". In: S. Salminen, A. Wright, A. Ouwehand (Hrsg.): Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects. Marcel Dekker, New York, Basel, S. 159-175.
- Ouwehand, A.C., S. Vesterlund (2004): "Antimicrobial components from lactic acid bacteria". In: S. Salminen, A. Wright, A. Ouwehand (Hrsg.): Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects. Marcel Dekker, New York, Basel, S. 375-397.
- Pamer, E.G. (2007): "Immune responses to commensal and environmental microbes." Nat. Immunol. **8**(11), S. 1173-1178.
- Pang, D.S., S. Boysen (2007): "Lactate in veterinary critical care: pathophysiology and management." J. Am. Hosp. Assoc. **43**(5), S. 270-279.
- Pasare, C., R. Medzhitov (2004): "Toll-like receptors and acquired immunity." Semin. Immunol. **16**(1), S. 23-26.
- Pasare, C., R. Medzhitov (2005): "Control of B-cell responses by Toll-like receptors." Nature **438**(7066), S. 364-368.
- Pedersen, K., G.W. Christensen, M. Steffensen, P. Schyum et al. (1992): "Transfer of lactic acid bacterial strains from the feed to the sow, the environment, and the piglets." Acta Vet. Scand. **33**(4), S. 297-303.
- Penders, J., C. Thijs, C. Vink, F.F. Stelma et al. (2007): "Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy." Pediatrics **118**(2), S. 511-521.
- Peters, J. (2003): "Antibiotic resistance of enterococci from farm animals and food of animal origin". *Vet. med. Diss.*, Bundesinstitut für Risikobewertung und Institut für Fleischhygiene und -technologie, Freie Universität Berlin Berlin.
- Pirnay, J.P., D.d. Vos, L. Duinslaeger, P. Reper et al. (2000): "Quantitation of *Pseudomonas aeruginosa* in wound biopsy samples: from bacterial culture to rapid 'real-time' polymerase chain reaction." Crit. Care **4**(4), S. 255-261.
- Pluske, J.R., Z. Durmic, H.G. Payne, J. Mansfield et al. (2007): "Microbial diversity in the large intestine of pigs born and reared in different environments." Livestock Science **108**, S. 113-116.
- Pluske, J.R., Z. Durmic, D.W. Pethick, B.P. Mullan et al. (1998): "Confirmation of the role of rapidly fermentable carbohydrates in the expression of swine dysentery in pigs after experimental infection." J. Nutr. **128**(10), S. 1737-1744.

- Pluske, J.R., D.J. Hampson, I.H. William (1997): "Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review." Livest. Prod. Sci. **51**, S. 215-236.
- Pochart, P., P. Marteau, Y. Bouhnik, I. Goderel et al. (1992): "Survival of bifidobacteria ingested via fermented milk during their passage through the human small intestine: an in vivo study using intestinal perfusion." Am. J. Clin. Nutr. **55**(1), S. 78-80.
- Pollmann, M., M. Nordhoff, A. Pospischil, K. Tedin et al. (2005): "Effects of a probiotic strain of *Enterococcus faecium* on the rate of natural chlamydia infection in swine." Infect. Immun. **73**(7), S. 4346-4353.
- Pruzzo, C., R. Tarsi, M.M. Lleò, C. Signoretto et al. (2002): "In vitro adhesion to human cells by viable but nonculturable *Enterococcus faecalis*." Curr. Microbiol. **45**(2), S. 105-110.
- Pryde, S.E., A.J. Richardson, C.S. Stewart, H.J. Flint (1999): "Molecular analysis of the microbial diversity present in the colonic wall, colonic lumen, and cecal lumen of a pig." Appl. Environ. Microbiol. **65**(12), S. 5372-5377.
- Rahman, I., M. Shahamat, M.A. Chowdhury, R.R. Colwell (1996): "Potential virulence of viable but nonculturable *Shigella dysenteriae* Type 1." Appl. Environ. Microbiol. **62**(1), S. 115-120.
- Rambaud, J.C., Y. Bouhnik, P. Marteau, P. Pochart (1993): "Manipulation of the human gut microflora." Proc. Nutr. Soc. **52**(2), S. 357-366.
- Rautava, S. (2007): "Potential uses of probiotics in the neonate." Semin. Fetal Neonatal Med. **12**(1), S. 45-53.
- Rinkinen, M., K. Jalava, E. Westermarck, S. Salminen et al. (2003): "Interaction between probiotic lactic acid bacteria and canine enteric pathogens: a risk factor for intestinal *Enterococcus faecium* colonisation?" Vet. Microbiol. **92**, S. 111-119.
- Rinttilä, T., A. Kassinen, E. Malinen, L. Krogius et al. (2004): "Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR." J. Appl. Microbiol. **97**(6), S. 1166-1177.
- Rochet, V., L. Rigottier-Gois, A. Ledaire, C. Andrieux et al. (2008): "Survival of *Bifidobacterium animalis* DN-173 010 in the faecal microbiota after administration in lyophilised form or in fermented product - a randomised study in healthy adults." J. Mol. Microbiol. Biotechnol. **14**, S. 128-136.
- Rodriguez, E., J.L. Arques, R. Rodriguez, M. Nunez et al. (2003): "Reuterin production by lactobacilli isolated from pig faeces and evaluation of probiotic traits." Lett. Appl. Microbiol. **37**(3), S. 259-263.
- Rolfe, R.D. (2000): "The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health." J. Nutr. **130**, S. 396-402.
- Roos, S., F. Karner, L. Axelsson, H. Jonsson (2000): "*Lactobacillus mucosae* sp. nov., a new species with in vitro mucus-binding activity isolated from pig intestine." Int. J. Syst. Evolut. Microbiol. **50**, S. 251-258.
- Roos, S., P. Aleljung, B. Robert, B.L.e. al. (1996): "A collagen binding protein from *Lactobacillus reuteri* is part of an ABC transporter system?" FEMS Microbiol. Lett. **144**(1), S. 33-38.

- Roos, S., S. Lindgren, H. Jonsson (1999): "Autoaggregation of *Lactobacillus reuteri* is mediated by a putative DEAD-box helicase." Mol. Microbiol. **32**(2), S. 427-436.
- Rowland, I.R. (1992): "Metabolic interactions in the gut". In: R. Fuller (Hrsg.): Probiotics - The Scientific Basis. Chapman & Hall, London, S. 29-53.
- Sakata, T. (1987): "Stimulatory effect of short-chain fatty acids on epithelial cell proliferation in the rat intestine: a possible explanation for trophic effects of fermentable fibre, gut microbes and luminal trophic factors." Br. J. Nutr. **58**(1), S. 95.
- Sakata, T., T. Kojima, M. Fujieda, M.M.e. al (1999): "Probiotic preparations dose-dependently increase net production rates of organic acids and decrease that of ammonia by pig caecal bacteria in bath culture." Dig. Dis. Sci. **44**(7), S. 1485-1493.
- Sakata, T., T. Kojima, M. Fujieda, M. Takahashi et al. (2003): "Influences of probiotic bacteria on organic acid production by pig caecal bacteria in vitro." Proc. Nutr. Soc. **62**(1), S. 73-80.
- Salminen, S., E. Isolauri, E. Salminen (1996): "Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains for future challenges." Antonie van Leeuwenhoek **70**(2-4), S. 347-358.
- Samli, H.E., N. Senkoylu, F. Koc, M. Kanter et al. (2007): "Effects of *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 and dried whey on broiler performance, gut histomorphology and intestinal microbiota." Arch. Anim. Nutr. **61**(1), S. 42-49.
- Sano, H., E. Nakamura, H. Takahashi, Y. Terashima (1995): "Plasma insulin and glucagon responses to acute challenges of acetate, propionate, n-butyrate and glucose in growing gilts (*Sus scrofa*)." Comp. Biochem. Physiol. A. Physiol. **110**(4), S. 375-378.
- Sansom, B.F., P.T. Gleed (1981): "The ingestion of sow's faeces by suckling piglets." Br. J. Nutr. **46**(3), S. 451-456.
- Satokari, R.M., E.E. Vaughan, A.D. Akkermans, M. Saarela et al. (2001): "Bifidobacterial diversity in human feces detected by genus-specific PCR and denaturing gradient gel electrophoresis." Appl. Environ. Microbiol. **67**(2), S. 504-513.
- Savage, D.C. (1977): "Microbial ecology of the gastrointestinal tract." Annu. Rev. Microbiol. **31**, S. 107-133.
- Schäfer, K. (1995): "Analysis of short chain fatty acids from different intestinal samples by capillary gas chromatography." Chromatographia **40**(9-10), S. 550-556.
- Scharek, L., J. Guth, K. Reiter, K.D. Weyrauch et al. (2005): "Influence of a probiotic *Enterococcus faecium* strain on development of the immune system of sows and piglets." Vet. Immunol. Immunopathol. **105**(1-2), S. 151-161.
- Schierack, P., N. Walk, K. Reiter, K.D. Weyrauch et al. (2007): "Composition of intestinal *Enterobacteriaceae* populations of healthy domestic pigs." Microbiology **153**(11), S. 3830-3837.
- Schmalenberger, A., C.C. Tebbe (2003): "Bacterial diversity in maize rhizospheres: conclusions on the use of genetic profiles based on PCR-amplified partial small subunit rRNA genes in ecological studies." Molecular Ecology **12**, S. 251-262.

- Selim, A.S., P. Boonkumklao, T. Sone, A. Assavanig et al. (2005): "Development and assessment of a real-time PCR assay for rapid and sensitive detection of a novel thermo-tolerant bacterium *Lactobacillus thermotolerans* in chicken feces." Appl. Environ. Microbiol. **71**(8), S. 4214-4219.
- Sellin, J.H., R.D. Soignie (1998): "Short-chain fatty acids have polarized effects on sodium transport and intracellular pH in rabbit proximal colon." Gastroenterology **114**(4), S. 737-747.
- Servin, A.L., M.H. Coconnier (2003): "Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens." Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol. **17**(5), S. 741-754.
- Sharma, R., U. Schumacher (1995): "Morphometric analysis of intestinal mucins under different dietary conditions and gut flora in rats." Dig. Dis. Sci. **40**(12), S. 2532-2539.
- Sharma, S., V. Radl, B. Hai, K. Kloos et al. (2007): "Quantification of functional genes from prokaryotes in soil by PCR." J. Microbiol. Meth. **68**, S. 445-452.
- Shimomura, Y., H. Sato (2006): "Fecal D- and L-Lactate, succinate, and volatile fatty acid levels in young dairy calves." J. Vet. Med. Sci. **68**(9), S. 973-977.
- Simon, O. (2005): "Micro-organisms as feed additives - probiotics." Adv. Pork Prod. **16**, S. 161-167.
- Simon, O. (2006): "Möglichkeiten der Einflussnahme auf die Mikroflora im Verdauungstrakt und das Immunsystem beim Schwein." Deutsche Vilomix Tierernährung GmbH. Fachtagung 2006/2007, www.vilomix.com.
- Simpson, J.M., V.J. McCracken, H.R. Gaskins, R.I. Mackie (2000): "Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of 16S ribosomal DNA amplicons to monitor changes in fecal bacterial populations of weaning pigs after introduction of *Lactobacillus reuteri* strain MM53." Appl. Environ. Microbiol. **66**(11), S. 4705-4714.
- Simpson, J.M., V.J. McCracken, B.A. White, H. Gaskins et al. (1999): "Application of denaturant gradient gel electrophoresis for the analysis of the porcine gastrointestinal microbiota." J. Microbiol. Meth. **36**, S. 167-179.
- Specian, R.D., M.G. Oliver (1991): "Functional biology of intestinal goblet cells." Am. J. Physiol. **260**(2), S. 183-193.
- Spencer, R.J., A. Chesson (1994): "The effect of *Lactobacillus spp.* on the attachment of enterotoxigenic *Escherichia coli* to isolated porcine enterocytes." J. Appl. Bacteriol. **77**, S. 215-220.
- Stappenbeck, T.S., L.V. Hooper, J.I. Gordon (2002): "Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **99**(24), S. 15451-15455.
- Stewart, C.S. (1997): "Microorganisms in hindgut fermentors". In: R.I. Mackie, B.A. White, R.E. Isaacson (Hrsg.): *Gastrointestinal Microbiology*. Chapman & Hall, New York, S. 142-186.
- Strompfova, V., M. Marciňáková, M. Simonová, S. Gancarčíková et al. (2006): "*Enterococcus faecium* EK13 - an enterocin A-producing strain with probiotic character and its effect in piglets." Anaerobe **12**(5-6), S. 242-248.

- Suomalainen, T.H., A.M. Mäyrä-Mäkinen (1999): "Propionic acid bacteria as protective cultures in fermented milks and breads." Lait **79**, S. 165-174.
- Swords, W.E., C.C. Wu, F.R. Champlin, R.K. Buddington (1993): "Postnatal changes in selected bacterial groups of the pig colonic microflora." Biol. Neonate **63**(3), S. 191-200.
- Tannock, G.W. (2000): "The intestinal microflora: potentially fertile ground for microbial physiologists." Adv. Microb. Physiol. **42**, S. 25-46.
- Tannock, G.W., R. Fuller, K. Pedersen (1990b): "Lactobacillus succession in the piglet digestive tract demonstrated by plasmid profiling." Appl. Environ. Microbiol. **56**(5), S. 1310-1316.
- Tannock, G.W., R. Fuller, S.L. Smith, M.A. Hall (1990a): "Plasmid profiling of members of the family *Enterobacteriaceae*, lactobacilli, and bifidobacteria to study the transmission of bacteria from mother to infant." J. Clin. Microbiol. **28**(6), S. 1225-1228.
- Tannock, G.W., K. Munro, H.J. Harmsen, G.W. Welling et al. (2000): "Analysis of the fecal microflora of human subjects consuming a probiotic product containing *Lactobacillus rhamnosus* DR20." Appl. Environ. Microbiol. **66**(6), S. 2578-2588.
- Taras, D., W. Vahjen, M. Macha, O. Simon (2005): "Performance, diarrhea incidence, and occurrence of *Escherichia coli* virulence genes during long-term administration of a probiotic *Enterococcus faecium* strain to sows and piglets." J. Anim. Sci. **84**, S. 608-617.
- Taras, D., W. Vahjen, O. Simon (2007): "Probiotic in pigs - modulation of their intestinal distribution and of their impact on health and performance." Livestock Science **108**, S. 229-231.
- Taylor, D.J. (1999): "Clostridial infection". In: B.E. Straw, S. D'Allaire, W.L. Mengeling, D.J. Taylor (Hrsg.): Diseases of Swine. Iowa State University Press, Ames, S. 395-412.
- Thymann, T., K.U. Sørensen, M.S. Hedemann, J. Elnif et al. (2007): "Antimicrobial treatment reduces intestinal microflora and improves protein digestive capacity without changes in villous structure in weanling pigs." Br. J. Nutr. **97**(6), S. 1128-1137.
- Tichopad, A., M. Dilger, G. Schwarz, M.W. Pfaffl (2003): "Standardized determination of real-time PCR efficiency from a single reaction set-up." Nucl. Acids Res. **31**(20), S. Online-Artikel, <http://nar.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/31/20/e122>.
- Tien, M.T., S. Girardin, E. Regnault, B.L. Bourhis et al. (2006): "Anti-inflammatory effect of *Lactobacillus casei* on Shigella-infected human intestinal epithelial cells." J. Immunol. **176**(2), S. 1228-1237.
- Topping, D.L., P.M. Clifton (2001): "Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides." Physiol. Rev. **81**(3), S. 1031-1054.
- Turck, D., A.S. Feste, C.H. Lifschitz (1993): "Age and diet affect the composition of porcine colonic mucins." Pediatr. Res. **33**(6), S. 564-567.
- Turnbaugh, P.J., R.E. Ley, M.A. Mahowald, V. Magrini et al. (2006): "An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest." Nature **444**(7122), S. 1027-1031.

- Untersteiner, H. (2005): "Biostatistik - Datenauswertung mit SPSS und Excel für Naturwissenschaftler und Mediziner". Facultas Universitätsverlag, Wien.
- Vahjen, W., A. Jadamus, O. Simon (2002): "Influence of a probiotic *Enterococcus faecium* strain on selected bacterial groups in the small intestine of growing turkey poultts." Arch. Anim. Nutr. **56**(6), S. 419-429.
- Vahjen, W. (2007): " Das Verhältnis von Feucht- zu Trockenmasse beträgt im Magen 1:10, im *Jejunum* 1:6 und im *Colon* 1:2." Persönliche Mitteilung, Dr. W. Vahjen, Berlin.
- Vahjen, W., D. Taras, O. Simon (2007): "Effect of the probiotic *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 on cell numbers of total *Enterococcus spp.*, *E. faecium* and *E. faecalis* in the intestine of piglets." Curr. Issues Intest. Microbiol. **8**, S. 1-7.
- Valasek, M.A., J.J. Repa (2005): "The power of real-time PCR." Adv. Physiol. Educ. **29**(3), S. 151-159.
- van der Steen, I., J. Rohde, J. Zentek, G. Amtsberg (1997): "Fütterungseinflüsse auf das Vorkommen und die Enterotoxinbildung von *Clostridium perfringens* im Darmkanal des Hundes." Kleintierpraxis **42**, S. 871-886.
- van Hoogmoed, C.G., M.v.d. Kuijl-Booij, H.C.v.d. Mei, H.J. Busscher (2000): "Inhibition of *Streptococcus mutans* NS adhesion to glass with and without salivary conditioning film by biosurfactant-releasing *Streptococcus mitis* strains." Appl. Environ. Microbiol. **66**(2), S. 659-663.
- van Kessel, A., T.W. Shirkey, R.H. Siggers, M.D. Drew et al. (2004): "Commensal bacteria and intestinal development. Studies using gnotobiotic pigs". In: L.A. Tucker, J.A. Taylor-Pickard (Hrsg.): *Interfacing immunity, gut health and performance*. Nottingham University Press, Nottingham, S. 47-59.
- Vanbelle, M., E. Teller, M. Focant (1990): "Probiotics in animal nutrition: a review." Arch. Tierernähr. **40**(7), S. 543-567.
- Ventura, M., C. Canchaya, V. Meylan, T.R. Klaenhammer et al. (2003): "Analysis, characterization, and loci of the *tuf* genes in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species and their direct application for species Identification." Appl. Environ. Microbiol. **69**(11), S. 6908-6922.
- Visek, W.J. (1987): "The mode of growth promotion by antibiotics." J. Anim. Sci. **46**, S. 1447-1469.
- Walter, J. (2005): "The microecology of lactobacilli in the gastrointestinal tract". In: G.W. Tannock (Hrsg.): *Probiotics and Prebiotics - Scientific Aspects*. Caister Academic Press, Norfolk, S. 51-55.
- Walter, J., C. Hertel, G.W. Tannock, C.M. Lis et al. (2001): "Detection of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, and *Weissella* species in human feces by using group-specific PCR primers and denaturing gradient gel electrophoresis." Appl. Environ. Microbiol. **67**(6), S. 2578-2585.
- Walter, J., G.W. Tannock, A. Tilsala-Timisjarvi, S. Rodtong et al. (2000): "Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species specific primers." Appl. Environ. Microbiol. **66**(1), S. 297- 303.

- Wang, J., E.A. Friedman (1998): "Short-chain fatty acids induce cell cycle inhibitors in colonocytes." Gastroenterology **114**(5), S. 940-946.
- Wattanakul, W., C.A. Bulman, H.L. Edge, S.A. Edwards (2005): "The effect of creep feed presentation method on feeding behaviour, intake and performance of suckling piglets." Appl. Anim. Behav. Sci. **92**(1-2), S. 27-36.
- Weiß, M. (2003): "Wirkung von *Enterococcus faecium* auf den Organismus neonataler Welpen". *Vet. med. Diss.*, Tierärztliche Fakultät, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Werts, C., S.E. Girardin, D.J. Philpott (2006): "TIR, CARD and PYRIN: three domains for an antimicrobial triad." Cell Death Differ. **13**(5), S. 798-815.
- West, P.A., J.H. Hewitt, O.M. Murphy (1979): "The influence of methods of collection and storage on the bacteriology of human milk." J. Appl. Bacteriol. **46**, S. 269-277.
- Wiesner, E., R. Ribbeck (2000): "Lexikon der Veterinärmedizin". Hippokrates, Stuttgart.
- Wilde, J., J. Eiden (1990): "Removal of inhibitory substances from human fecal specimens for detection of group A rotaviruses by reverse transcriptase and polymerase chain reactions." J. Clin. Microbiol. **28**(6), S. 1300-1307.
- Wilson, I.G. (1997): "Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification." Appl. Environ. Microbiol. **63**(10), S. 3741-3751.
- Wittwer, C.T., M.G. Herrmann, A.A. Moss, R.P. Rasmussen (1997): "Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification." Biotechniques **22**(1), S. 134-138.
- Wu, Q.H., J. Ascensao, G. Almeida, S.J. Forman et al. (1994): "The effect of short-chain fatty acids on the susceptibility of human umbilical vein endothelial cells to human cytomegalovirus infection." J. Virol. Methods **47**(1-2), S. 37-50.
- Yajima, T. (1985): "Contractile effect of short-chain fatty acids on the isolated colon of the rat." J. Physiol. **368**, S. 667-678.
- Yamamoto, H. (2000): "Viable but not culturable state as a general phenomenon of non-spore forming bacteria, and its modelling." J. Infect. Chemother. **6**, S. 112-114.
- Yaron, S., K.R. Matthews (2002): "A reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for detection of viable *Escherichia coli* O157:H7: investigation of specific target genes." J. Appl. Microbiol. **92**(4), S. 633-640.
- Zentek, J. (1995): "Influence of diet composition on the microbial activity in the gastrointestinal tract of dogs. I. Effects of varying protein intake on the composition of the ileum chyme and the faeces." J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. **74**, S. 43-52.
- Zentek, J. (1995): "Influence of diet composition on the microbial activity in the gastrointestinal tract of dogs. II. Effects on the microflora in the ileum chyme." J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. **74**, S. 53-61.
- Zhang, T., H.H. Fang (2006): "Applications of real-time polymerase chain reaction for quantification of microorganisms in environmental samples." Appl. Microbiol. Biotechnol. **70**(3), S. 281-289.
- Zoetendal, E.G., E.E. Vaughan, W.M. de Vos (2006): "A microbial world within us." Molec. Microbiol. **59**(6), S. 1639-1650.

LITERATUR

- Zoetendal, E.G., A.D. Akkermans, W.M.d. Vos (1998): "Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria." Appl. Environ. Microbiol. **64**(10), S. 3854-3859.
- Zoetendal, E.G., A.v. Wright, T. Vilpponen-Salmela, K. Ben-Amor et al. (2002): "Mucosa-associated bacteria in the human gastrointestinal tract are uniformly distributed along the colon and differ from the community recovered from feces." Appl. Microbiol. Biotechnol. **68**(7), S. 3401-3407.

ANHANG

Tab. A1: Zusammensetzung des Prämixes (pro kg Hauptfutter)

	Tragende Sauen	Laktierende Sauen	Ferkel
Vitamin A, IE	12,000	16,000	4,800
Vitamin D ₃ , IE	1,500	2,000	480
Vitamin E, mg	45,0	60,0	50,4
Vitamin K ₃ , mg	2,6	3,5	2,4
Thiamin, mg	1,5	2,0	2,4
Riboflavin, mg	4,5	6,0	3,0
Vitamin B ₆ , mg	3,0	4,0	4,8
Vitamin B ₁₂ , µg	28,5	38,0	36,0
Nicotinic acid, mg	18,8	25,0	42,0
Biotin, µg	112,5	150,0	240,0
Pantothenic acid, mg	7,5	10,0	18,0
Folic acid, mg	0,9	1,2	1,2
Choline chloride, mg	300,0	400,0	960,0
ZnSO ₄ , mg	75,0	100,0	60,0
FeSO ₄ , mg	150,0	200,0	24,0
MnO, mg	60,0	80,0	60,0
CuSO ₄ , mg	23,3	31,0	14,4
CoSO ₄ , mg	0,6	0,8	480,0
NaSeO ₃ , mg	0,3	0,4	420,0
NaI, mg	1,5	2,0	0,6
NaCl, g	1,5	2,0	1,5
CaCO ₃ , mg	825	1,1 g	-
Mg, g	-	-	0,6

Tab. A2: Materialien für die Herstellung des Real-Time PCR- Quantifizierungsstandards

Materialien und Lösungen	Hersteller
KULTIVIERUNG DER REFERENZSTÄMME	
Referenzstämme (Lyophilisate und Kryokulturen)	DSMZ, Deutschland
Wachstumsmedien für Referenzstämme	Herstellung im Labor
Reagenzienmischung zur Erzeugung eines anaeroben Milieus Anaercult®A,C	MERK, Darmstadt, Deutschland
Anaerobentöpfe	MERK, Darmstadt, Deutschland
Zentrifuge Megafuge 1.0R	HERAEUS, Osterode, Deutschland
Zentrifuge Megafuge 20	HERAEUS, Osterode, Deutschland
Thoma-Zählkammer	
Lichtmikroskop (mit dem 40x Objektiv)	
1% Peptonwasser	
BEIMPUNG DER FECES-PROBEN	
Eppendorf-Gefäße auf 1,5 od. 2,0 ml	EPPENDORF AG, Hamburg, Deutschland
Plastikröhrchen auf 15 und 50 ml	GREINER BIO-ONE GMBH, Frickenhausen, Deutschl.
Autoklavierter Sauenkot	
Kühlschrank (+4°C; -30°C; -80°C)	
ÜBERPRÜFUNG DER QUANTIFIZIERUNGSSTANDARDS AUF K_bE	
Inokulierte Proben	
Ringer-Lösung	Herstellung im Labor
Selektive Agarmedien	Herstellung im Labor
Reagenzienmischung zur Erzeugung eines anaeroben Milieus Anaercult®A,C	MERCK, Darmstadt, Deutschland
Anaerobentöpfe	MERCK, Darmstadt, Deutschland
Drigalski-Spatel	
70% Ethanol	CARL ROTH GMBH, Karlsruhe, Deutschland
GEWINNUNG BAKTERIELLER DNA AUS DEN INOKULIERTEN PROBEN	
Inokulierte Probe	
Scintillationsröhrchen für Retsch-Mühle	
Glasperlen (0,25mm ²)	CARL ROTH GMBH, Karlsruhe, Deutschland
Oak Ridge®-Zentrifugenröhrchen	NALGE COMPANY, USA
Wasserbad	
Retschmühle	F.RETSCH GMBH, Haan, Deutschland
Kühlzentrifuge Sorvall RC 5B	DU PONT de Nemours GMBH, Bad Homburg, Deutschland
Vortex	
Peläus-Ball für Glaspipetten	
Glaspipetten auf 10 und 20 ml	
DMPC-behandeltes Wasser	Herstellung im Labor
GITC-Lösung	Herstellung im Labor
Rotiphenol-Chloroform	CARL ROTH GMBH, Karlsruhe, Deutschland
Chloroform/Isoamylalkohol (24:1)	Herstellung im Labor
2-Propanol (Isopropanol) (eiskalt)	CARL ROTH GMBH, Karlsruhe, Deutschland
70% Ethanol (eiskalt)	CARL ROTH GMBH, Karlsruhe, Deutschland
Zentrifuge Biofuge 13	HERAEUS, Osterode, Deutschland
Nucleo-Spin® Tissue Kit	MACHERY-NAGEL, Düren, Deutschland
Pipetten auf 10, 100 und 1000 µl	EPPENDORF AG, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen auf 10, 100 und 1000 µl	BIOZYM, Hess.Oldendorf, Deutschland

Tab. A3: Referenzstämme und Kultivierungsbedingungen

Stamm/Name	DSM Nummer	Nährmedium	T, ° C	O2
<i>Acetomicrobium faecale</i>	DSM 20678			
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	DSM 20083	BBM	37	-
<i>B. bifidum</i>	DSM 20456	BBM	37	-
<i>B. longum</i>	DSM 20219	BBM	37	-
<i>B. suis</i>	DSM 20211	BBM	37	-
<i>B. thermophilum</i>	DSM 20210	BBM	37	-
<i>Escherichia coli</i>	DSM2840	LB	37	+
<i>E. coli</i> (institutseigene)	PS37	LB	37	
<i>E. coli</i> (institutseigene)	PS79	LB	37	
<i>E. coli</i> (institutseigene)	PS90	LB	37	
<i>Enterococcus cecorum</i>	DSM 20682	LB	37	microaerophilic
<i>E. durans</i>	DSM 20633	LB	37	+
<i>E. faecalis</i>	DSM 13591	LB	37	microaerophilic
<i>E. faecium</i> (<i>Cylactin</i>)	NCIMB 10415	LB		
<i>E. hirae</i>	DSM 20160	LB	37	+
<i>E. villorum</i>	DSM 15688	LB		microaerophilic
<i>Lactobacillus acetotolerans</i>	DSM 20749	LAS	30	+
<i>L. acidophilus</i>	DSM 20079	MRS	37	+
<i>L. alimentarius</i>	DSM 20249	MRS	30	+
<i>L. amylovorus</i>	DSM 20531	MRS	37	+
<i>L. animalis</i>	DSM 20602	MRS	37	+
<i>L. bif fermentans</i>	DSM 20003	MRS	30	+
<i>L. bifidus</i>	DSM 20100	MRS	30	+
<i>L. brevis</i>	DSM 20054	MRS	30	+
<i>L. delbrueckii s. bulgaricus</i>	DSM 20081	MRS	37	+
<i>L. casei</i>	DSM 20011	MRS	30	+
<i>L. crispatus</i>	DSM 20584	LAS	37	-
<i>L. delbrueckii</i>	DSM 20711	LAS	37	
<i>L. farciminis</i>	DSM 20184	MRS	30	+
<i>L. fermentum</i>	DSM 20052	MRS	37	+
<i>L. gallinarum</i>	DSM 10532	MRS	37	+
<i>L. gasserii</i>	DSM 20243	MRS	37	+
<i>L. jensenii</i>	DSM 20557	MRS	37	+
<i>L. johnsonii</i>	DSM 10533	MRS	37	+
<i>L. mucosae</i>	DSM 13345	MRS	37	+
<i>L. murinus</i>	DSM 20452	MRS	37	+
<i>L. panis</i>	DSM 6035	LAS	37	+
<i>L. paracasei</i>	DSM 20020	MRS	30	+
<i>L. plantarum</i>	DSM 20174	MRS	30	+
<i>L. pontis</i>	DSM 8475	LAS	30	+
<i>L. reuteri</i>	DSM 20016	MRS	37	+
<i>L. rhamnosus</i>	DSM 20021	MRS	37	+
<i>L. sharpeae</i>	DSM 20505	LAS	30	+
<i>L. vaginalis</i>	DSM 5837	MRS	37	+
<i>L. salivarius subsp. Salivarius</i>	DSM 20555	MRS	37	+
<i>L. zeae</i>	DSM 20178	MRS	37	+

Tab. A3 (Forts.)				
<i>Lactococcus lactis subsp. Lactis</i>	DSM 20481	LAS	30	+
<i>Streptococcus alactolyticus</i>	DSM 20728	BHI	37	+
<i>S. bovis</i>	DSM 20480	BHI	37	+
<i>S. infantis</i>	DSM 12492	BHI	37	+
<i>S. mutans</i>	DSM 20523	BHI	37	+
<i>S. porcinus</i>	DSM 20725	BHI	37	+
<i>S. salivarius</i>	DSM 20560	BHI	37	+
<i>S. suis</i>	DSM 9682	BHI	37	+
<i>S. dysgalactiae subsp. dysgalactiae</i>	DSM 20662	BHI	37	+
<i>S. hyointestinalis</i>	DSM 20770	BHI	37	+
<i>S. gallolyticus</i>	DSM 13808	BHI	37	+
<i>Weissella confusa</i>	DSM 20196	MRS	30	+
<i>W. hellenica</i>	DSM 7378	MRS	30	+

Tab. A4: Zusammensetzung der Nährmedien für die Kultivierung der Referenzstämme

Medium	Rezeptur	Hersteller der Komponenten	
BBM	10,0 g	Pepton aus Casein	MERCK, Darmstadt, Deutschland
	5,0 g	Hefeextrakt	MERCK, Darmstadt, Deutschland
	5,0 g	Fleischextrakt	MERCK, Darmstadt, Deutschland
	5,0 g	Pepton aus Soja	MERCK, Darmstadt, Deutschland
	10,0 g	Glucose	MERCK, Darmstadt, Deutschland
	2,0 g	K ₂ HPO ₄	CARL ROTH GMBH, Karlsruhe, Deutschland
	0,2 g	MgSO ₄ ·7H ₂ O	CARL ROTH GMBH, Karlsruhe, Deutschland
	0,05 g	MnSO ₄ ·4H ₂ O	CARL ROTH GMBH, Karlsruhe, Deutschland
	1,0 ml	Tween 80	MERCK SCHUCHH. OHG, Hohenbrunn, Deutschland
	5,0 g	NaCl	CARL ROTH GMBH, Karlsruhe, Deutschland
	40,0 ml	Salzlösung	
	950,0 ml	H ₂ O _{bidest}	
		Autoklavieren (121°C, 20 min)	
+ 4,0 ml	Resazurin (25 mg/100ml)		
	pH=6,8		
LAS	10,0 g	Pepton aus Casein	MERCK, Darmstadt, Deutschland
	5,0 g	Hefeextrakt	MERCK, Darmstadt, Deutschland
	10,0 g	Fleischextrakt	MERCK, Darmstadt, Deutschland
	20,0 g	Glucose	MERCK, Darmstadt, Deutschland
	1,0 ml	Tween 80	MERCK SCHUCHH. OHG, Hohenbrunn, Deutschland
	5,0 ml	Natriumacetat, 20%	CARL ROTH GMBH, Karlsruhe, Deutschland
	3,0 g	Natriumcitrat	CARL ROTH GMBH, Karlsruhe, Deutschland
	20,0 ml	1% MgSO ₄ ·7H ₂ O	CARL ROTH GMBH, Karlsruhe, Deutschland
	5,0 ml	1% MnSO ₄ ·4H ₂ O	CARL ROTH GMBH, Karlsruhe, Deutschland
		ad. 1 L H ₂ O _{bidest}	
	Autoklavieren (121°C, 20 min)		
	pH=5,5		
MRS	52,0 g	MRS Bouillon	CARL ROTH GMBH, Karlsruhe, Deutschland
		+ 1 L H ₂ O _{bidest}	
	Autoklavieren (121°C, 12 min)		
	pH=6,2		
LB	10,0 g	Tryptose	MERCK, Darmstadt, Deutschland
	5,0 g	Hefeextrakt	MERCK, Darmstadt, Deutschland
	5,0 g	NaCl	CARL ROTH GMBH, Karlsruhe, Deutschland
	1,0 g	Glucose	MERCK, Darmstadt, Deutschland
		ad. 1 L H ₂ O _{bidest}	
	Autoklavieren (121°C, 20 min)		
	pH=7,0		
	37,0 g	Brain Heart Infusion	CARL ROTH GMBH, Karlsruhe, Deutschland
		+ 1 L H ₂ O _{bidest}	
BHI		Autoklavieren (121°C, 20 min)	
		pH=7,4	

Tab. A5: Zusammensetzung und Zubereitung der Selektivmedien

Medium	Rezeptur	Hersteller der Komponenten
DEV-Endo	<u>39,0 g DEV-Endo Agar</u> + 1 L H ₂ O _{bidest} Autoklavieren (121°C, 15 min) pH=7,4	CARL ROTH GMBH, Karlsruhe, Germany
S&B	<u>42,0 g S&B Agar</u> + 1 L H ₂ O _{bidest} Autoklavieren (110°C, 10 min) pH=7,2	OXOID LTD., Basingstoke, Hants., UK
LAS	10,0 g Pepton aus Casein 5,0 g Hefeextrakt 10,0 g Fleischextrakt 20,0 g Glucose 1,0 ml Tween 80 5,0 ml Natriumacetat, 20% 3,0 g Natriumcitrat 20,0 ml 1% MgSO ₄ x7H ₂ O 5,0 ml 1% MnSO ₄ x4H ₂ O <u>13,0 g Agar-Agar</u> ad. 1 L H ₂ O _{bidest} Autoklavieren (121°C, 20 min) pH=5,5°	MERCK, Darmstadt, Germany MERCK, Darmstadt, Germany MERCK, Darmstadt, Germany MERCK, Darmstadt, Germany MERCK SCHUCHHARDT OHG, Hohenbrunn, Germany CARL ROTH GMBH, Karlsruhe, Germany CARL ROTH GMBH, Karlsruhe, Germany CARL ROTH GMBH, Karlsruhe, Germany CARL ROTH GMBH, Karlsruhe, Germany MERCK, Darmstadt, Germany
BHI+Blut (1%)	<u>52,0 g Brain Heart Infusion Agar</u> + 1 L H ₂ O _{bidest} Autoklavieren (121°C, 20 min) pH=7,4 Nach der Abkühlung des Mediums (40°C) folgt Zugabe 10,0 ml des defibrinierten Blut von Sauen	CARL ROTH GMBH, Karlsruhe, Germany

Tab. A6: Zusammensetzung der GITC- und Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung

Lösung	Rezeptur		Hersteller der Komponenten
DMPC-behandeltes Wasser	1 ml	DMPC	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GMBH, Steinheim, Deutschland
	1000 ml	H ₂ O _{bidest}	
GITC-Lösung	75 ml	GITC	CARL ROTH GMBH, Karlsruhe, Deutschl.
	100 ml	CSB-Puffer (autoklav.)	
CSB-Puffer	3,25 g	tri-Na-Citrat-dihydrat	CARL ROTH GMBH, Karlsruhe, Deutschl. SIGMA-ALDRICH CHEMIE GMBH, Steinheim, Deutschland
	2,075 g	N-Lauryl Sarcosin	
	50 µl	Antifoam A	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GMBH, Steinheim, Deutschland
	100 ml	H ₂ O _{bidest}	
		ad. 250 ml H ₂ O _{bidest}	
		Autoklavieren (121°C, 20 min)	
	50 µl	Mercaptoethanol	
	250 µl	0,1 M DTT	
Chlorophorm/Isoamylalkohol (24:1)	240 ml	Chlorophorm	CARL ROTH GMBH, Karlsruhe, Deutschl.
	10 ml	Isoamylalkohol	CARL ROTH GMBH, Karlsruhe, Deutschl.

Tab. A7: Verwendete Materialien für die Durchführung der Real-Time PCR

Materialien und Lösungen	Hersteller
Gereinigte DNA-Extrakte aus den Referenzkulturen und Quantifizierungsstandard	
Real Time QPCR System Mx3000P®	STRATAGENE, Amsterdam, Niederlande
Gruppen- und spezie-spezifische Oligonukleotide	MWG-Biotech AG, Ebersberg, Deutschland
HotStarTaq Master Mix Kit	QIAGEN GMBH, Hilden, Deutschland
Brilliant® SYBR® Green QPCR Master Mix Kit	STRATAGENE, Amsterdam, Niederlande
Real Time PCR-Gefäße auf 0,2 ml und passende Deckel	STRATAGENE, Amsterdam, Niederlande
Vortex Genie 2	SCIENTIFIC INDUSTRIES, Bohemia, N.Y., USA
Eppendorf-Gefäße auf 1,5 und 2,0 ml	EPPENDORF, Hamburg, Deutschland
Automatische 1-Kanal Transfer-Pipetten	BRAND GMBH, Wertheim, Deutschland
Pipetten-Spitzen auf 10, 100 und 1000 µl	BIOZYM, Hess.Oldendorf, Deutschland

Tab. A8: Verwendete Materialien für die Durchführung der DGGE

Materialien	Hersteller
AMPLIFIKATION DER 16S-rDNA-FRAGMENTE	
Gereinigte DNA-Extrakte	
HotStarTaq Master Mix Kit	QIAGEN, US
Primer F-968-GC und R-1401	MWG-Biotech AG, Ebersberg, Deutschland
DNase/RNase-freies Wasser	
Vortex Genie 2	SCIENTIFIC IDUSTRIES, Bohemia, N.Y., USA
Eppendorf-Gefäße auf 1,5 und 2,0 ml	EPPENDORF, Hamburg, Deutschland
Automatische 1-Kanal Transfer-Pipetten	BRAND GMBH, Wertheim, Deutschland
Pipetten-Spitzen auf 10, 100 und 1000 µl	BIOZYM, Hess.Oldendorf, Deutschland
PCR-Gefäße auf 0,2 ml	BIOZYM, Hess.Oldendorf, Deutschland
T1 Thermocycler	BIOMETRA, Göttingen, Deutschland
VORBEREITUNG DER DGGE-APPARATUR	
Elektrophorese-System INGENYphorU-2	INGENY, Goes, Netherlands
Glasplatten	INGENY, Goes, Netherlands
Spaser	INGENY, Goes, Netherlands
Kamm mit 32 und 48 Taschen	INGENY, Goes, Netherlands
GelBond® PAG Film	BIOZYM, Hess.Oldendorf, Deutschland
Elektrophorese-Puffer	s. Tab. A9
70% Ethanol	CARL ROTH GMBH, Karlsruhe, Deutschland
HERSTELLUNG DES POLYAKRYLAMID-GELS	
Aqua bidest.	
100% denaturierendes Polyacrilamid	
0% denaturierendes Polyacrilamid	
Gradientenmischer	INGENY, Goes, Netherlands
Peristaltikpumpe	RIETSCHLE THOMAS SCHOPFHEIM GMBH, Schopfheim, Deutschland
Plastikröhrchen (50 ml)	GREINER BIO-ONE GMBH, Frickenhausen, Deutschl.
Pipette auf 10 ml	EPPENDORF, Hamburg, Deutschland
Magnetrührer	IKA LABORTECHNIK, Staufen, Deutschland
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)	CARL ROTH GMBH, Karlsruhe, Deutschland
10% APS (Ammoniumpersulfat)	FLUKA CHEMIE GMBH, Buchs, Schweiz
BELADEN DES GELS	
Zusammengebaute Gel-Kassette mit dem Gel	
PCR-Produkte	
Auftragungspuffer Roti®-Load DNA mit Saccharose	CARL ROTH GMBH, Karlsruhe, Deutschland
96-Well-Mikrotiterplatten	GREINER BIO-ONE GMBH, Frickenhausen, Deutschl.
Automatische 8-Kanal Transfer-Pipetten	BRAND GMBH, Wertheim, Deutschland
Pipetten-Spitzen auf 10 und 100 µl	BIOZYM, Hess.Oldendorf, Deutschland
Pipetten-Spitzen für die Beladung des Gels	CARL ROTH GMBH, Karlsruhe, Deutschland
Multi-Flex® 0,5-200 µl ECOFLEX®Tips	
FÄRBUNG DES GELS	
Fixierlösung	s. Tab. A9
Silber-Lösung	s. Tab. A9
Entwickler	s. Tab. A9
Aufbewahrungslösung	s. Tab. A9
Zellophanmembran	BIOSTEP GMBH, Jahnsdorf, Deutschland
Ofen	

Tab. A9: Verwendete Lösungen für die Durchführung der DGGE und der Färbung des fertigen Gels

Lösung	Rezeptur	Hersteller der Komponenten
Elektrophorese-Puffer	170 ml	50x TAE
	16,83 L	H ₂ O _{bidest}
50x TAE	242 g	TRIS
	57,1 ml	Eisessigsäure
	100 ml	0,5 M EDTA
		CARL ROTH GMBH, Karlsruhe, Deutschland FLUKA CHEMIE GMBH, Buchs, Schweiz
Cairn's Fixierlösung (8x)	200,0 ml	96% Ethanol
	12,0 ml	Essigsäure
	38,0 ml	H ₂ O _{bidest}
		CARL ROTH GMBH, Karlsruhe, Deutschl. FLUKA CHEMIE GMBH, Buchs, Schweiz
Cairn's Fixierlösung (1x)	200 ml	Fixierlösung (8x)
	1400 ml	H ₂ O _{bides}
	Aufbereitung in 2 Flaschen	
Silber-Lösung	2,0 g	AgNO ₃
		FLUKA CHEMIE GMBH, Buchs, Schweiz
	800 ml	Fixierlösung (1x)
Entwickler	750 ml	1,5% NaOH
	2250 µl	Formaldehyd
		CARL ROTH GMBH, Karlsruhe, Deutschland FLUKA CHEMIE GMBH, Buchs, Schweiz
	250 ml	96% Ethanol
Aufbewahrungslösung	100 ml	Glycerin
	650 ml	H ₂ O _{bides}
		CARL ROTH GMBH, Karlsruhe, Deutschl. BIOMOL GMBH, Hamburg, Deutschl.

ANHANG

Tab. A10: Kolonisierung des gastrointestinalen Trakts der Ferkel mit dem probiotischen *E. faecium* NCIMB 10415

Alter	Magen		<i>Jejunum</i>		<i>Colon</i>		<i>p</i> *
	Median (min. Wert-max. Wert)	<i>n</i> ^a	Median (min. Wert-max. Wert)	<i>n</i>	Median (min. Wert-max. Wert)	<i>n</i>	
Absolute Zellzahl <i>E. faecium</i> NCIMB 10415, Log Zellzahl/ g FM							
7	4,23^c (3,97-5,89)	5	4,07 (3,65-5,68)	4	6,31 (5,87-6,82)	5	<i>a,b,c</i>
14	4,58 (3,61-5,47)	5	4,34 (2,63-4,65)	3	6,02 (4,67-6,36)	5	<i>b</i>
28	3,23 (2,33-3,88)	5	2,83 (1,94-3,91)	5	4,44 (3,52-4,65)	5	<i>b,c</i>
31	3,93 (2,99-4,26)	5	3,31 (2,39-4,39)	5	3,97 (3,66-4,43)	5	-
35	3,97 (3,08-4,34)	5	3,86 (2,94-5,15)	5	4,54 (4,18-4,63)	4	<i>c</i>
56	3,60 (2,46-4,20)	5	3,93 (2,88-5,16)	5	4,58 (4,45-4,83)	5	<i>b</i>
Anteil des <i>E. faecium</i> NCIMB 10415 an der gesamten Enterokokken-Population, %							
7	5,05 (0,24-12,34)	5	2,61 (1,53-5,54)	4	7,55 (4,27-15,61)	5	<i>c</i>
14	6,80 (0,30-9,32)	5	3,40 (0,13-7,69)	3	5,38 (1,34-13,68)	5	-
28	2,45 (0,71-4,46)	5	1,26 (0,07-7,02)	5	3,23 (1,24-9,40)	5	-
31	4,20 (0,38-5,29)	5	12,28 (4,22-21,92)	5	4,26 (1,67-8,78)	5	<i>a</i>
35	5,22 (2,82-8,75)	5	4,86 (0,05-7,77)	5	0,03 (0,02-3,91)	4	<i>c</i>
56	4,63 (2,02-11,29)	5	5,40 (1,58-29,82)	5	6,00 (3,99-13,78)	5	-
Anteil des <i>E. faecium</i> NCIMB 10415 an der gesamten 16S rDNA-Gemeinschaft, %							
7	1,44x10⁻⁴ (1,70x10 ⁻⁵ -1,45x10 ⁻³)	5	5,13x10⁻⁵ (4,00x10 ⁻⁵ -1,38x10 ⁻³)	4	2,30x10⁻⁴ (2,90x10 ⁻⁵ -9,00x10 ⁻⁴)	5	<i>a</i>
14	7,92x10⁻⁵ (1,50x10 ⁻⁵ -1,40x10 ⁻³)	5	1,26x10⁻⁵ (1,00x10 ⁻⁶ -9,40x10 ⁻⁵)	3	1,39x10⁻⁴ (1,60x10 ⁻⁵ -3,32x10 ⁻⁴)	5	-
28	1,46x10⁻⁴ (6,00x10 ⁻⁶ -2,69x10 ⁻³)	5	1,41x10⁻⁵ (0,00E+00-1,02x10 ⁻³)	5	6,71x10⁻⁶ (1,00x10 ⁻⁶ -7,00x10 ⁻⁶)	5	<i>b,c</i>
31	1,92x10⁻³ (2,35x10 ⁻⁴ -1,23x10 ⁻²)	5	1,53x10⁻⁴ (2,80x10 ⁻⁵ -2,54x10 ⁻⁴)	5	5,98x10⁻⁶ (1,00x10 ⁻⁶ -5,00x10 ⁻⁵)	5	<i>a,b,c</i>
35	2,63x10⁻³ (4,60x10 ⁻⁴ -7,68x10 ⁻³)	5	1,56x10⁻⁴ (3,70x10 ⁻⁵ -2,32x10 ⁻³)	5	4,81x10⁻⁶ (0,00x10 ⁻⁵ -1,00x10 ⁻⁵)	4	<i>b,c</i>
56	4,73x10⁻³ (2,41x10 ⁻³ -8,47x10 ⁻³)	5	8,13 x10⁻⁴ (4,50x10 ⁻⁵ -8,02x10 ⁻³)	5	1,33x10⁻⁵ (3,00x10 ⁻⁶ -1,60x10 ⁻⁵)	5	<i>b,c</i>

a - Anzahl der positiven Ergebnisse von jeweils 5 untersuchten Proben; b - Median (minimaler Wert – maximaler Wert); * - Signifikanztest für Paarunterschiede nach Wilkson. Signifikanzen für die Paare: a - Magen-Jejunum; b - Magen-Colon; c - Jejunum-Colon ergaben Werte auf dem Niveau $0,01 \leq p \leq 0,05$.

Tab. A11: Gehalt der extrahierten DNA und Zelldichte der eubakteriellen 16S rDNA-Population im Magen der Versuchsferkel

Alter	DNA-Konzentration [ng/μl]			Eubakterielle Population [Lg 10 Zellen/g Feuchtmasse]		
	KG ^a (n=5) ^c	PG ^b (n=5)	P ^d	KG (n=5)	PG (n=5)	P
7	92,6^e (82,3-212,6)	437,2 (68,1-634,6)	0,46	10,13 (9,31-10,66)	10,68 (9,58-10,73)	0,17
14	150,7 (100,4-389,4)	293,9 (112-487,5)	0,25	10,57 (9,41-11,17)	10,62 (10,32-10,75)	0,91
28	170,1 (123,6-244,9)	124,9 (79,7-386,8)	0,75	10,04 (9,26-11,08)	9,07 (8,45-10,21)	0,05
31	60,4 (23-81)	92,6 (8,8-653,9)	0,53	8,10 (6,53-9,32)	8,65 (6,9-9,62)	0,34
35	77,2 (63-132,6)	68,1 (37,2-215,2)	0,75	7,74 (6,39-9,08)	8,17 (7,95-9,5)	0,34
56	110,7 (34,6-206,2)	66,8 (42,3-537,8)	0,83	7,11 (6,01-7,28)	8,08 (6,53-8,31)	0,04

a-Kontrollgruppe; b-Probiotikum-Gruppe; c-Anzahl der untersuchten Proben; d-Signifikanz nach Mann-Whitney Test; e-Median (minimaler Wert-maximaler Wert)

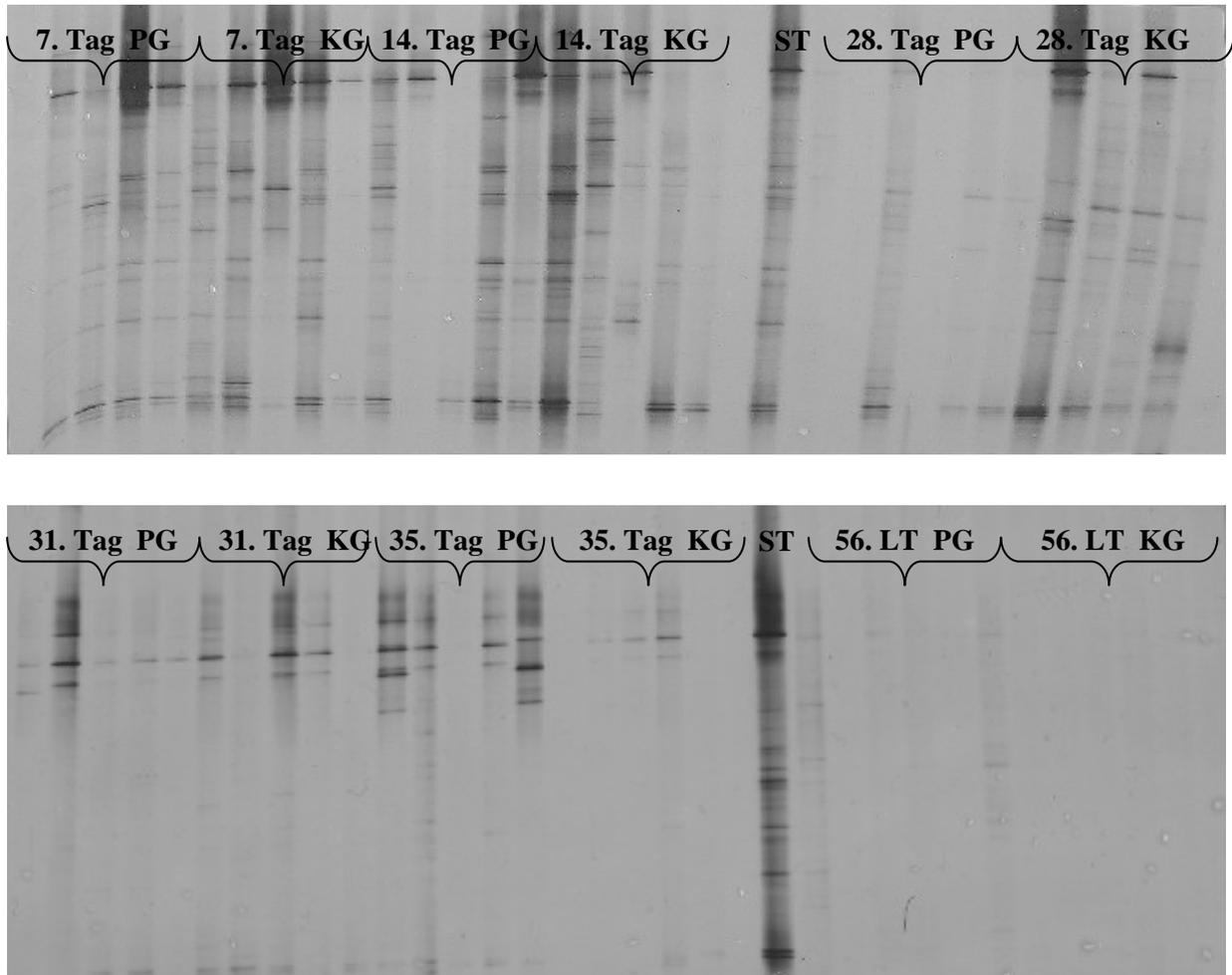


Abb. A1: DGGE-Profile der eubakteriellen 16S rDNA-Populationen im Magen der Versuchsferkel vor- (7., 14., 28. Tag) und nach dem Absetzen (31., 35., 56. Tag) (PG - Probiotikum-Gruppe, KG – Kontrollgruppe, ST – Standard-Probe)

Tab. A12: Diversität der bakteriellen Gemeinschaften (*Richness* und *Evenness*) im Magen der Versuchsferkel (dargestellt sind errechnete Diversität-Indizes)

Alter	<i>Richness</i>			<i>Evenness</i>		
	KG ^a (N=5)	PG ^b (N=5) ^c	<i>P</i> ^d	KG (N=5)	PG (N=5)	<i>P</i>
7	13^e (3-34)	19 (8-32)	0,91	0,78 (0,74-0,84)	0,81 (0,49-0,91)	0,75
14	36 (7-42)	29 (16-32)	0,60	0,76 (0,63-0,91)	0,79 (0,73-0,88)	0,05
28	21 (7-38)	13 (4-19)	0,17	0,77 (0,74-0,92)	0,76 (0,69-0,88)	0,01
31	4 (1-18)	6 (3-10)	0,75	0,61 (0,58-0,93)	0,73 (0,44-0,91)	0,80
35	3 (1-12)	11,5 (3-22)	0,40	0,56 (0,44-0,69)	0,66 (0,6-0,8)	0,28
56	1	3 (2-30)			0,84 (0,69-0,91)	
	<i>Shannon-Index</i>			<i>Simpson-Index</i>		
7	2,16 (0,84-2,89)	2,21 (1,01-2,84)	0,46	0,15 (0,08-0,51)	0,14 (0,09-0,58)	0,75
14	2,53 (1,62-3,35)	2,62 (2,02-3,03)	0,05	0,12 (0,04-0,28)	0,10 (0,06-0,2)	0,75
28	2,50 (1,79-2,81)	1,96 (1,22-2,16)	0,01	0,15 (0,09-0,19)	0,19 (0,16-0,35)	0,05
31	1,16 (0,65-1,88)	1,01 (0,81-1,66)	0,34	0,47 (0,25-0,59)	0,53 (0,21-0,63)	0,34
35	0,75 (0,71-1,39)	1,73 (0,66-2,05)	0,24	0,58 (0,36-0,66)	0,25 (0,19-0,65)	0,03
56		0,84 (0,48-2,86)			0,51 (0,09-0,71)	

a-Kontrollgruppe; b-Probiotikum-Gruppe; c-Anzahl der untersuchten Proben; d-Signifikanz nach Mann-Whitney Test; e-Median (minimaler Wert-maximaler Wert)

Tab. A13: Sörensen-Ähnlichkeitswerte der bakteriellen Gemeinschaften im Magen der Versuchsferkel

Alter	Innerhalb der Fütterungsgruppe			Zwischen den Fütterungsgruppen		
	KG ^a	PG ^b	<i>P</i> ^c	KG vs. PG	<i>P</i>	<i>P</i>
7	0,25^e (0,11-0,55)	0,54 (0,39-0,89)	0,001	0,38 (0,11-0,78)	0,08	0,14
14	0,29 (0,09-0,5)	0,43 (0,32-0,58)	0,002	0,4 (0,15-0,62)	0,10	0,01
28	0,25 (0,09-0,48)	0,32 (0,1-0,46)	0,11	0,31 (0,11-0,63)	0,93	0,19
31	0,3 (0,1-0,56)	0,46 (0,21-0,75)	0,002	0,37 (0-0,86)	0,32	0,21
35	0,43 (0,15-0,75)	0,33 (0,16-0,55)	0,002	0,4 (0,09-1)	0,63	0,78
56		0,31 (0,13-0,5)		0,5 (0,06-0,67)	0,03	

a-Kontrollgruppe; b-Probiotikum-Gruppe; c-Signifikanz nach Mann-Whitney Test; e-Median (minimaler Wert-maximaler Wert)

Tab. A14: Populationen von *Lactobacillus spp.* und *Enterococcus spp.* im Magen der Versuchsferkel

Alter	Zellzahl [Log10 Zellen/g Feuchtmasse]				Anteil an der gesamten eubakteriellen Population [%]			
	KG ^a (N=5)	PG ^b (N=5) ^c	n ^d	P ^e	KG (N=5)	PG (N=5)	n	P
<i>Lactobacillus spp.</i>								
7	8,32^f (7,44-9,01)	9,00 (8,38-9,11)	5/5	0,17	2,24 (0,95-6,66)	2,13 (1,88-6,32)	5/5	0,91
14	8,55 (7,51-9,84)	9,09 (8,26-9,44)	5/5	0,25	1,27 (0,42-4,59)	2,65 (0,87-6,24)	5/5	0,17
28	8,31 (7,44-9,82)	7,37 (5,88-8,59)	5/5	0,05	2,97 (0,34-5,50)	1,12 (0,24-2,38)	5/5	0,17
31	6,35 (4,95-7,71)	7,29 (3,61-8,13)	5/5	0,75	2,44 (0,10-13,51)	3,22 (0,05-4,34)	5/5	0,91
35	6,37 (4,23-7,47)	6,13 (5,37-7,62)	5/5	0,75	2,83 (0,10-4,27)	0,75 (0,15-3,67)	5/5	0,25
56	4,85 (4,52-7,33)	5,95 (3,84-7,26)	5/5	0,46	0,39 (0,25-6,97)	0,73 (0,20-9,04)	5/5	1
<i>Enterococcus spp.</i>								
7	5,04 (4,6-6,16)	6,14 (5,37-6,8)	5/5	0,05	1,9x10⁻³ (8,0x10 ⁻⁴ -8,4x10 ⁻³)	7,3x10⁻³ (1,9x10 ⁻³ -2,2x10 ⁻²)	5/5	0,11
14	5,88 (4,75-6,22)	6,24 (5,61-7,03)	4/5	0,14	1,2x10⁻³ (0-3,92x10 ⁻³)	4,9x10⁻³ (7,2x10 ⁻⁴ -2,5x10 ⁻²)	4/5	0,11
28	5,63 (4,58-6,3)	4,84 (4,31-5,64)	5/5	0,25	2,1x10⁻³ (3,7x10 ⁻⁴ -5,3x10 ⁻³)	5,9x10⁻³ (5,3x10 ⁻⁴ -6,0x10 ⁻²)	5/5	0,17
31	4,20 (3,74-4,31)	5,41 (5,21-5,55)	5/5	0,009	1,2x10⁻² (9,6x10 ⁻⁴ -2,4x10 ⁻¹)	3,6x10⁻² (6,7x10 ⁻³ -3,23)	5/5	0,25
35	4,40 (4,05-4,57)	5,08 (4,63-5,63)	5/5	0,009	2,0x10⁻² (1,2x10 ⁻³ -1,51)	8,1x10⁻² (5,2x10 ⁻³ -1,4x10 ⁻¹)	5/5	0,75
56	4,00 (3,84-4,31)	5,11 (3,79-5,37)	5/5	0,11	1,2x10⁻¹ (3,6x10 ⁻² -1,39)	1,3x10⁻¹ (2,1x10 ⁻² -1,8x10 ⁻¹)	5/5	0,75

a-Kontrollgruppe; b-Probiotikum-Gruppe; c-Anzahl der untersuchten Proben; d-Anzahl der positiven Ergebnisse von jeweils 5 untersuchten Proben (Kontrollgruppe/Probiotikum-Gruppe); e-Signifikanz nach Mann-Whitney Test; f-Median (minimaler Wert-maximaler Wert)

Tab. A15: Populationen von *Escherichia spp.* und *Bifidobacterium spp.* im Magen der Versuchsferkel

Alter	Zellzahl [Log10 Zellen/g Feuchtmasse]				Anteil an der gesamten eubakteriellen Population [%]			
	KG ^a (N=5)	PG ^b (N=5) ^c	<i>n</i> ^d	<i>P</i> ^e	KG (N=5)	PG (N=5)	<i>n</i>	<i>P</i>
<i>Escherichia spp.</i>								
7	5,03^f (3,14-5,85)	5,57 (3,24-6)	5/4	0,32	6,2x10⁻⁴ (5,0x10 ⁻⁵ -5,2x10 ⁻³)	1,3x10⁻³ (0-3,7x10 ⁻³)	5/4	1
14	4,74 (3,43-7,15)	4,42 (3,62-5,47)	5/4	0,80	1,0x10⁻⁴ (4,0x10 ⁻⁵ -2,2x10 ⁻²)	2,0x10⁻⁴ (1,0x10 ⁻⁵ -7,1x10 ⁻⁴)	5/4	0,46
28	5,12 (3,28-5,72)	4,22 (3,5-5,01)	4/5	0,32	6,8x10⁻⁴ (6,0x10 ⁻⁵ -4,7x10 ⁻³)	2,7x10⁻⁴ (1,3x10 ⁻⁴ -3,6x10 ⁻²)	4/5	0,32
31	4,23 (3,09-5,32)	2,71	3/1	0,18	9,7x10⁻³ (2,8x10 ⁻³ -1,3x10 ⁻²)	1,1x10⁻⁴	3/1	0,11
35	3,69 (3,45-5,16)	3,10 (2,68-3,53)	4/2	0,35	1,2x10⁻² (2,7x10 ⁻⁴ -4,5x10 ⁻²)	3,2x10⁻⁴ (1,1x10 ⁻⁴ -5,4x10 ⁻⁴)	4/2	0,11
56	3,3	2,82	1/1	0,31	6,3x10⁻²	6,8x10⁻⁴	1/1	0,31
<i>Bifidobacterium spp.</i>								
7	5,13 (4,61-5,65)	5,44 (5,08-5,67)	2/4	0,64	1,7x10⁻³ (2,4x10 ⁻⁴ -3,2x10 ⁻³)	5,5x10⁻⁴ (2,2x10 ⁻⁴ -3,9x10 ⁻³)	2/4	1
14	5,36 (4,38-6,34)	6,03 (5,21-6,85)	2/2	0,43	1,7x10⁻³ (6,0x10 ⁻⁵ -3,4x10 ⁻³)	6,4x10⁻³ (3,8x10 ⁻⁴ -1,2x10 ⁻²)	2/2	0,43
28	5,31 (3,64-6,96)	5,05	4/1	0,48	8,8x10⁻⁴ (5,0x10 ⁻⁵ -8,3x10 ⁻²)	2,9x10⁻³	4/1	0,48
31	ND ^g	ND			ND	ND		
35	ND	ND			ND	ND		
56	ND	ND			ND	ND		

a-Kontrollgruppe; b-Probiotikum-Gruppe; c-Anzahl der untersuchten Proben; d-Anzahl der positiven Ergebnisse von jeweils 5 untersuchten Proben (Kontrollgruppe/Probiotikum-Gruppe); e-Signifikanz nach Mann-Whitney Test; f-Median (minimaler Wert-maximaler Wert); g-keine Signalbildung während der Real Time PCR

Tab. A16: Populationen von *L. acidophilus*, *L. amylovorus* und *L. johnsonii* im Magen der Versuchsferkel

Alter	Zellzahl [Log10 Zellen/g Feuchtmasse]				Anteil an der gesamten Laktobazillen-Population [%]			
	KG ^a (N=5)	PG ^b (N=5) ^c	<i>n</i> ^d	<i>P</i> ^e	KG (N=5)	PG (N=5)	<i>n</i>	<i>P</i>
<i>L. acidophilus</i>								
7	4,99^f (4,59-5,39)	5,03 (4,85-5,34)	2/3	-	1,53x10⁻² (6,50x10 ⁻³ -2,41x10 ⁻²)	2,95x10⁻² (8,23x10 ⁻³ -8,57x10 ⁻²)	2/3	0,37
14	5,23 (5,02-5,45)	5,30 (4,91-5,7)	2/2	-	4,78x10⁻² (1,70x10 ⁻² -7,86x10 ⁻²)	1,28x10⁻² (6,50x10 ⁻³ -1,91x10 ⁻²)	2/2	0,22
28	5,37 (4,14-6,6)	4,38	2/1	-	4,29x10⁻² (2,52x10 ⁻² -6,07x10 ⁻²)	7,40x10⁻²	2/1	0,22
31	2,13	1,61	1/1	0,31	6,07x10⁻³	2,07x10⁻⁴	1/1	0,31
35	2,18	ND ^g	1/0	-	6,35x10⁻³	ND	1/0	
56	ND	3,34	0/1	-	ND	1,18x10⁻²	0/1	
<i>L. amylovorus</i>								
7	7,11 (5,73-7,33)	7,48 (7,06-7,69)	5/5	0,17	1,92 (0,92-10,03)	4,49 (2,35-4,86)	5/5	0,6
14	6,94 (4,47-7,69)	7,34 (6,21-7,81)	5/5	0,60	1,43 (0,01-9,00)	1,30 (0,52-3,34)	5/5	0,75
28	7,08 (4,7-8,34)	5,21 (3,15-6,13)	5/5	0,07	3,33 (0,18-7,45)	2,62 (0,024-21,43)	5/5	0,75
31	4,56 (2,42-6,45)	3,48 (2,7-6,42)	5/5	0,53	1,61 (0,29-5,48)	1,96 (0,003-12,47)	5/5	0,75
35	5,11 (3,07-6,58)	3,56 (2,85-6,42)	5/5	0,60	16,05 (0,005-186,65)	0,48 (0,009-57,13)	5/5	0,53
56	3,97 (2,87-4,34)	4,39 (2,68-6,3)	5/5	0,11	13,13 (0,03-35,65)	8,21 (0,05-335,05)	5/5	0,46
<i>L. johnsonii</i>								
7	6,45 (3,65-7,21)	7,08 (5,91-7,31)	5/3	0,45	1,59 (0,003-5,23)	0,93 (0,08-2,05)	5/3	0,65
14	6,2 (4,35-7,17)	7,19 (6,82-7,58)	4/3	0,05	0,39 (0,07-0,76)	3,07 (0,60-3,65)	4/3	0,05
28	5,93 (4,72-6,61)	5,8 (5,69-7,1)	4/3	0,48	0,13 (0,03-0,49)	15,41 (3,23-82,47)	4/3	0,03
31	5,04 (4,38-5,71)	5,9 (4,91-6,07)	2/3	0,24	13,98 (0,99-26,97)	6,07 (0,59-101,81)	2/3	1
35	4,66 (4,06-6,7)	5,98 (5,12-6,9)	5/3	0,10	16,99 (0,09-68,39)	20,54 (19,21-56,18)	5/3	0,65
56	4,02 (3,51-4,17)	5,58 (5,42-6,57)	5/3	0,02	16,93 (0,02-28,34)	20,45 (11,44-42,90)	5/3	0,65

a-Kontrollgruppe; b-Probiotikum-Gruppe; c-Anzahl der untersuchten Proben; d-Anzahl der positiven Ergebnisse von jeweils 5 untersuchten Proben (Kontrollgruppe/Probiotikum-Gruppe); e-Signifikanz nach Mann-Whitney Test; f-Median (minimaler Wert-maximaler Wert); g-keine Signalbildung während der Real Time PCR

Tab. A17: Populationen von *L. mucosae* und *L. reuteri* im Magen der Versuchsferkel

Alter	Zellzahl [Log10 Zellen/g Feuchtmasse]				Anteil an der gesamten Laktobazillen- Population [%]			
	KG ^a (N=5)	PG ^b (N=5) ^c	<i>n</i> ^d	<i>P</i> ^e	KG (N=5)	PG (N=5)	<i>n</i>	<i>P</i>
<i>L. mucosae</i>								
7	7,57^f (6,2-7,84)	6,94 (6,56-7,32)	3/2	0,56	6,81 (1,16-17,68)	1,22 (0,37-2,08)	3/2	0,24
14	7,81 (7,65-7,98)	ND ^g	2/0	-	14,08 (12,52-15,64)	ND	2/0	
28	6,97 (5,85-7,39)	5,99 (5,4-6,58)	4/2	0,10	6,98 (1,30-21,50)	22,25 (11,71-32,79)	4/2	0,35
31	6,92	6,05 (4,66-7,45)	1/2	-	16,10	40,19 (23,14-57,25)	1/2	0,22
35	6,37 (5,0-6,62)	ND	3/0	-	97,97 (17,34-145,64)	ND	3/0	
56	ND	5,00	0/1	-	ND	11,21	0/1	
<i>L. reuteri</i>								
7	7,33 (6,47-7,5)	6,8 (6,12-7,98)	5/5	0,46	3,59 (2,15-27,50)	2,21 (0,13-7,42)	5/5	0,11
14	7,60 (6,33-8,16)	7,71 (7,45-8,14)	5/5	0,53	9,90 (0,61-24,60)	5,00 (1,95-15,31)	5/5	0,60
28	6,50 (5,68-8,07)	6,09 (3,84-7,99)	5/5	0,34	1,76 (0,68-11,41)	19,34 (0,22-159,59)	5/5	0,62
31	5,29 (4,58-6,71)	6,78 (3,23-7,5)	5/5	0,60	12,36 (4,34-94,04)	26,15 (4,45-143,38)	5/5	0,62
35	6,03 (4,74-6,72)	5,92 (4,51-7,35)	5/5	0,46	20,42 (4,53-32,69)	17,85 (5,60-78,30)	5/5	0,24
56	4,55 (3,61-4,69)	5,67 (4,56-7,05)	3/5	0,05	46,69 (12,25-79,15)	60,98 (4,10-520,01)	3/5	0,51

a-Kontrollgruppe; b-Probiotikum-Gruppe; c-Anzahl der untersuchten Proben; d-Anzahl der positiven Ergebnisse von jeweils 5 untersuchten Proben (Kontrollgruppe/Probiotikum-Gruppe); e-Signifikanz nach Mann-Whitney Test; f-Median (minimaler Wert-maximaler Wert); g-keine Signalbildung während der Real Time PCR

Tab. A18: Gesamt-Laktat im Magen der Versuchsferkel

Alter	Gesamt-Laktat [mg/g FM]				Verhältnis L/D-Laktat			
	Kontrolle (N=5) ^b	Probiotikum ^a (N=5)	n ^c	P ^d	Kontrolle (N=5)	Probiotikum (N=5)	n	P
7	1,79^e (0,72-6,25)	2,23 (1,43-3,13)	5/5	0,91	0,68 (0,52-0,87)	0,59 (0,47-0,65)	5/5	0,34
14	0,46 (0,02-1,25)	0,60 (0,39-2,39)	5/5	0,34	0,95 (0,35-1,36)	0,79 (0,52-0,89)	5/5	0,46
28	0,80 (0,20-5,54)	0,30 (0,19-0,81)	5/5	0,10	1,02 (0,39-1,27)	1,76 (0,97-5,94)	5/5	0,07
31	2,06 (0,02-4,14)	0,62 (0,02-1,64)	4/5	0,46	0,91 (0,75-3,44)	1,29 (0,98-3,14)	4/5	0,32
35	0,23 (0,02-3,18)	0,06 (0,02-1,16)	5/5	0,46	1,23 (0,75-7,86)	1,51 (1,18-2,78)	5/5	0,46
56	0,04 (0,02-0,05)	0,15 (0,04-0,35)	5/4	0,10	11,09 (6,00-18,75)	2,59 (1,95-5,55)	5/4	0,01

a – Fütterungsgruppe; b - Anzahl der untersuchten Proben; c - Anzahl der Proben mit positiven Werten; d - Signifikanz nach Mann-Whitney Test; e - Median (Minimum-Maximum)

Tab. A19: Gehalt von L(+)- und D(-)-Isomeren des Laktats im Magen der Versuchsferkel

Alter	Konzentration [mg/g FM]				Relativer Anteil [in % des Gesamt-Laktats]			
	Kontrolle (N=5) ^b	Probiotikum ^a (N=5)	n ^c	P ^d	Kontrolle (N=5)	Probiotikum (N=5)	n	P
L(+)- Isomer								
7	0,61^e (0,27-2,58)	0,74 (0,53-1,22)	5/5	0,75	40,50 (34,39-46,60)	37,04 (31,80-39,21)	5/5	0,34
14	0,22 (0,01-0,32)	0,26 (0,17-0,81)	5/5	0,25	48,80 (25,78-57,58)	44,27 (34,00-47,01)	5/5	0,46
28	0,41 (0,11-2,17)	0,17 (0,12-0,68)	5/5	0,34	50,48 (28,00-55,87)	63,74 (49,13-85,59)	5/5	0,07
31	0,93 (0,01-1,89)	0,34 (0,02-0,89)	4/5	0,32	47,67 (42,77-77,46)	56,24 (49,52-75,86)	4/5	0,32
35	0,15 (0,02-1,37)	0,02 (0,01-0,67)	5/5	0,34	55,14 (43,02-88,72)	60,19 (54,08-73,53)	5/5	0,46
56	0,03 (0,02-0,05)	0,10 (0,03-0,24)	5/4	0,14	91,73 (85,71-94,94)	72,04 (66,15-84,73)	5/4	0,01
D(-)- Isomer								
7	1,17 (0,38-3,66)	1,40 (0,91-1,91)	5/5	0,91	59,50 (53,40-65,61)	62,96 (60,79-68,20)	5/5	0,34
14	0,23 (0,01-0,93)	0,34 (0,22-1,58)	5/5	0,34	51,20 (42,42-74,22)	55,73 (52,99-66,00)	5/5	0,46
28	0,38 (0,09-3,37)	0,12 (0,04-0,19)	5/5	0,04	49,52 (44,13-72,00)	36,26 (14,41-50,87)	5/5	0,07
31	1,13 (0,003-2,24)	0,26 (0,01-0,75)	4/5	0,46	52,33 (22,54-57,23)	43,76 (24,14-50,48)	4/5	0,32
35	0,07 (0,002-1,81)	0,02 (0,01-0,49)	5/5	0,34	44,86 (11,28-56,98)	39,81 (26,47-45,92)	5/5	0,46
56	0,003 (0,002-0,004)	0,04 (0,01-0,1)	5/4	0,01	8,27 (5,06-14,29)	27,96 (15,27-33,85)	5/4	0,01

a – Fütterungsgruppe; b - Anzahl der untersuchten Proben; c - Anzahl der Proben mit positiven Werten; d - Signifikanz nach Mann-Whitney Test; e - Median (Minimum-Maximum)

Tab. A20: Gehalt der extrahierten DNA und Zelldichte der eubakteriellen 16S rDNA-Population im distalen *Jejunum* der Versuchsferkel

Alter	DNA-Konzentration [ng/μl]			Eubakterielle Population [Lg 10 Zellen/g Feuchtmasse]		
	KG ^a (n=5) ^c	PG ^b (n=5)	P ^d	KG (n=5)	PG (n=5)	P
7	148,3^e (109-321,6)	368,4 (120,6-760,1)	0,28	10,62 (10,16-10,65)	10,29 (9,96-10,79)	0,48
14	136,6 (59,1-241,5)	489,5 (474,6-719,3)	0,03	10,22 (9,62-10,84)	10,68 (10,52-11,24)	0,48
28	173,1 (119,2-238,6)	781,9 (164,3-812,5)	0,04	10,54 (9,02-10,89)	9,68 (8,35-10,61)	0,24
31	126,4 (84,2-503,7)	164,3 (98,8-857,7)	0,60	9,55 (9,43-10,11)	9,56 (8,2-10,1)	0,91
35	123,5 (30,4-500,8)	136,6 (122,1-546)	0,34	9,57 (9,36-9,94)	9,48 (8,62-9,79)	0,29
56	122,1 (101,7-493,8)	422,1 (95,8-617,3)	0,25	9,41 (8,12-9,47)	9,55 (6,98-10,25)	0,46

a-Kontrollgruppe; b-Probiotikum-Gruppe; c-Anzahl der untersuchten Proben; d-Signifikanz nach Mann-Whitney Test; e-Median (minimaler Wert-maximaler Wert)

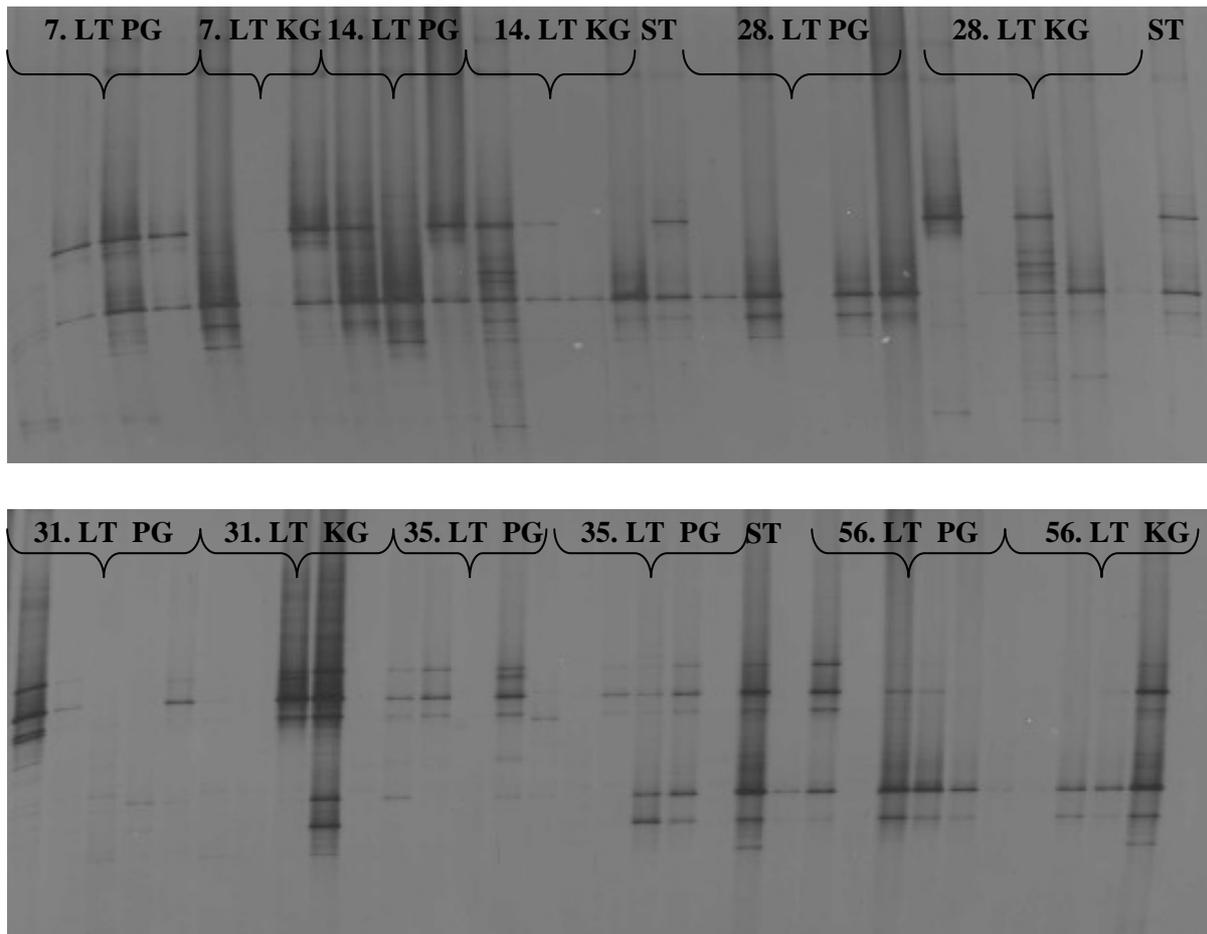


Abb. A2: DGGE-Profile der eubakteriellen 16S rDNA-Populationen im distalen Jejunum der Versuchsferkel vor (7., 14., 28. Tag) und nach dem Absetzen (31., 35., 56. Tag)

(PG - Probiotikum-Gruppe, KG – Kontrollgruppe, ST – Standard-Probe)

Tab. A21: Diversität der bakteriellen Gemeinschaften (*Richness* und *Evenness*) im distalen *Jejunum* der Versuchsferkel (dargestellt sind errechnete Diversität-Indizes)

Alter	<i>Richness</i>			<i>Evenness</i>		
	KG ^a (N=5)	PG ^b (N=5) ^c	<i>P</i> ^d	KG (N=5)	PG (N=5)	<i>P</i>
7	24^e (7-29)	9 (7-23)	0,37	0,61 (0,6-0,83)	0,59 (0,48-0,84)	0,72
14	10,5 (6-40)	23 (23-27)	0,28	0,53 (0,37-0,8)	0,68 (0,57-0,71)	0,48
28	13 (3-36)	15 (4-27)	0,91	0,63 (0,5-0,81)	0,54 (0,27-0,92)	0,46
31	8 (5-33)	13 (11-37)	0,34	0,78 (0,73-0,94)	0,61 (0,40-0,82)	0,04
35	8 (5-27)	9 (4-19)	0,75	0,57 (0,5-0,88)	0,64 (0,51-0,90)	0,60
56	6 (2-11)	19 (5-27)	0,10	0,44 (0,32-0,75)	0,52 (0,42-0,87)	0,46
	<i>Shannon-Index</i>			<i>Simpson-Index</i>		
7	1,95 (1,62-2,01)	1,42 (1,02-2,05)	0,48	0,24 (0,21-0,25)	0,31 (0,21-0,47)	0,72
14	1,24 (0,67-2,96)	2,13 (1,80-2,35)	0,28	0,41 (0,08-0,67)	0,19 (0,14-0,26)	0,28
28	1,63 (0,60-2,92)	1,43 (0,43-1,78)	0,46	0,34 (0,08-0,68)	0,35 (0,27-0,81)	0,60
31	1,96 (1,35-2,56)	1,47 (1,04-2,33)	0,34	0,16 (0,11-0,32)	0,38 (0,14-1,56)	0,04
35	1,60 (1,05-1,79)	1,25 (1,12-1,68)	0,34	0,29 (0,20-0,53)	0,31 (0,25-0,46)	0,46
56	0,79 (0,44-1,20)	1,40 (0,88-1,74)	0,02	0,60 (0,41-0,74)	0,29 (0,22-0,60)	0,04

a-Kontrollgruppe; b-Probiotikum-Gruppe; c-Anzahl der untersuchten Proben; d-Signifikanz nach Mann-Whitney Test; e-Median (minimaler Wert-maximaler Wert)

Tab. A22: Sörensen-Ähnlichkeitswerte der bakteriellen Gemeinschaften im distalen *Jejunum* der Versuchsferkel

Alter	Innerhalb der Fütterungsgruppe			Zwischen den Fütterungsgruppen		
	KG ^a	PG ^b	<i>P</i> ^c	KG vs. PG	<i>P</i>	<i>P</i>
7	0,22^e (0,13-0,6)	0,4 (0,11-0,59)	0,74	0,33 (0,24-0,73)	0,87	0,59
14	0,3 (0,22-0,5)	0,48 (0,43-0,6)	0,05	0,33 (0,24-0,54)	0,05	0,62
28	0,25 (0,09-0,36)	0,31 (0,19-0,58)	0,03	0,29 (0,11-0,57)	0,39	0,21
31	0,24 (0,05-0,55)	0,375 (0,28-0,48)	0,005	0,31 (0,05-0,57)	0,11	0,23
35	0,33 (0,25-0,51)	0,25 (0,13-0,56)	0,10	0,29 (0,12-0,64)	0,64	0,32
56	0,42 (0,29-0,7)	0,23 (0,06-0,68)	0,11	0,32 (0,07-0,59)	1	0,02

a-Kontrollgruppe; b-Probiotikum-Gruppe; c-Anzahl der untersuchten Proben; d-Signifikanz nach Mann-Whitney Test; e-Median (minimaler Wert-maximaler Wert)

Tab. A23: Populationen von *Lactobacillus spp.* und *Enterococcus spp.* im distalen *Jejunum* der Versuchsferkel

Alter	Zellzahl [Log10 Zellen/g Feuchtmasse]				Anteil an der gesamten eubakteriellen Population [%]			
	KG ^a (N=5)	PG ^b (N=5) ^c	<i>n</i> ^d	<i>P</i> ^e	KG (N=5)	PG (N=5)	<i>n</i>	<i>P</i>
<i>Lactobacillus spp.</i>								
7	8,84^f (8,45-8,95)	8,69 (8,2-9,06)	3/4	1	1,95 (1,66-2,00)	1,96 (1,75-3,11)	3/4	0,48
14	7,3 (6,85-8,61)	8,65 (8,2-8,79)	4/3	0,04	0,16 (0,09-0,59)	0,48 (0,35-0,94)	4/3	0,10
28	7,79 (7,68-8,68)	7,70 (6,49-8,67)	5/5	0,40	0,61 (0,13-4,67)	1,30 (0,22-2,12)	5/5	0,34
31	7,47 (5,08-7,81)	7,61 (5,05-8,16)	5/5	0,75	1,07 (0,001-2,01)	0,65 (0,004-2,44)	5/5	0,91
35	7,96 (5,86-8,01)	6,65 (6,04-7,05)	5/5	0,11	1,51 (0,01-2,63)	0,12 (0,06-1,08)	5/5	0,11
56	5,36 (4,71-7,13)	7,90 (4,46-8,12)	5/5	0,25	0,02 (0,002-1,04)	0,44 (0,21-2,75)	5/5	0,04
<i>Enterococcus spp.</i>								
7	4,92 (4,88-6,12)	5,76 (5,26-6,94)	3/4	0,10	5,7x10⁻⁴ (1,6x10 ⁻⁴ -3,2x10 ⁻³)	2,4x10⁻³ (1,6x10 ⁻³ -2,5x10 ⁻²)	3/4	0,28
14	5,28 (4,03-6,03)	5,76 (5,5-5,8)	4/3	0,28	1,1x10⁻³ (2,5x10 ⁻⁴ -2,6x10 ⁻³)	9,6x10⁻⁴ (3,7x10 ⁻⁴ -1,2x10 ⁻³)	4/3	0,72
28	4,27 (3,69-5,86)	5,01 (4,71-5,12)	5/5	0,60	8,23x10⁻⁴ (5,3x10 ⁻⁵ -2,0x10 ⁻³)	1,9x10⁻³ (3,2x10 ⁻⁴ -2,3x10 ⁻²)	5/5	0,10
31	3,58 (3,5-4,17)	4,69 (3,63-5,05)	5/5	0,02	1,2x10⁻⁴ (2,4x10 ⁻⁵ -1,4x10 ⁻⁴)	1,5x10⁻³ (2,2x10 ⁻⁴ -2,6x10 ⁻³)	5/5	0,009
35	3,51 (3,22-5,94)	5,05 (4,22-7,15)	5/5	0,04	1,09x10⁻⁴ (4,7x10 ⁻⁵ -1,4x10 ⁻²)	2,6x10⁻² (5,4x10 ⁻⁴ -3,0x10 ⁻¹)	5/5	0,02
56	3,49 (2,53-3,71)	5,21 (4,15-5,68)	5/5	0,009	1,6x10⁻⁴ (8,1x10 ⁻⁵ -3,9x10 ⁻⁴)	2,8x10⁻³ (2,1x10 ⁻³ -1,4x10 ⁻¹)	5/5	0,009

a-Kontrollgruppe; b-Probiotikum-Gruppe; c-Anzahl der untersuchten Proben; d-Anzahl der positiven Ergebnisse von jeweils 5 untersuchten Proben (Kontrollgruppe/Probiotikum-Gruppe); e-Signifikanz nach Mann-Whitney Test; f-Median (minimaler Wert-maximaler Wert)

Tab. A24: Populationen von *Escherichia spp.* und *Bifidobacterium spp.* im distalen *Jejunum* der Versuchsferkel

Alter	Zellzahl [Log10 Zellen/g Feuchtmasse]				Anteil an der gesamten eubakteriellen Population [%]			
	KG ^a (N=5)	PG ^b (N=5) ^c	<i>n</i> ^d	<i>P</i> ^e	KG (N=5)	PG (N=5)	<i>n</i>	<i>P</i>
<i>Escherichia spp.</i>								
7	6,05^f (5,76-7,55)	6,73 (6,48-6,99)	3/2	0,56	4,0x10⁻³ (2,7x10 ⁻³ -7,9x10 ⁻²)	2,4x10⁻² (1,5x10 ⁻² -3,3x10 ⁻²)	3/2	0,56
14	7,21 (5,49-7,64)	6,76 (5,8-7,9)	4/3	1	6,1x10⁻² (7,4x10 ⁻³ -1,6x10 ⁻¹)	1,7x10⁻² (1,3x10 ⁻³ -4,6x10 ⁻²)	4/3	0,10
28	7,06 (4,47-8,56)	6,46 (5,55-6,93)	5/5	0,46	1,6x10⁻¹ (4,0x10 ⁻² -1,06)	9,5x10⁻² (8,2x10 ⁻³ -1,7x10 ⁻¹)	5/5	0,60
31	5,71 (4,65-6,12)	6,14 (5,88-6,4)	4/2	0,16	1,09x10⁻² (3,4x10 ⁻⁴ -2,4x10 ⁻²)	2,2x10⁻² (2,0x10 ⁻² -2,3x10 ⁻²)	4/2	0,35
35	6,87 (6,33-7,41)	5,98 (5,05-7,7)	2/4	0,64	2,1x10⁻¹ (2,4x10 ⁻² -4,1x10 ⁻¹)	6,5x10⁻² (2,4x10 ⁻³ -1,63)	2/4	1
56	4,70 (4,15-5,26)	5,12 (4,69-5,56)	2/2	0,43	4,9x10⁻⁴ (0x10 ⁻⁶ -1,1x10 ⁻³)	1,2x10⁻³ (4,8x10 ⁻⁴ -2,0x10 ⁻³)	2/2	1
<i>Bifidobacterium spp.</i>								
7	5,99 (5,4-6,58)	5,68 (5,52-5,75)	2/3	1	4,6x10⁻³ (6,1x10 ⁻⁴ -8,5x10 ⁻³)	9,5x10⁻⁴ (9,1x10 ⁻⁴ -5,2x10 ⁻³)	2/3	1
14	4,93 (4,77-5,25)	5,79 (5,08-6,51)	3/2	0,24	3,0x10⁻⁴ (9,0x10 ⁻⁵ -2,0x10 ⁻³)	3,4x10⁻³ (7,0x10 ⁻⁵ -6,7x10 ⁻³)	3/2	1
28	5,57 (4,74-6,34)	4,81 (4,54-5,94)	4/3	0,28	3,3x10⁻³ (7,0x10 ⁻⁵ -6,3x10 ⁻³)	1,6x10⁻² (7,2x10 ⁻⁴ -2,8x10 ⁻²)	4/3	0,28
31	4,64	ND ^g	1/0		3,6x10⁻⁴	ND	1/0	
35	4,98 (3,91-6,06)	5,25	2/1	1	1,5x10⁻² (2,3x10 ⁻⁴ -3,0x10 ⁻²)	4,3x10⁻² (4,3x10 ⁻² -4,3x10 ⁻²)	2/1	0,22
56	4,08 (3,74-4,42)	5,74	2/1	0,22	2,5x10⁻³ (9,1x10 ⁻⁴ -4,2x10 ⁻³)	1,5x10⁻³ (0x10 ⁻³ -3,09x10 ⁻³)	2/1	0,43

a-Kontrollgruppe; b-Probiotikum-Gruppe; c-Anzahl der untersuchten Proben; d-Anzahl der positiven Ergebnisse von jeweils 5 untersuchten Proben (Kontrollgruppe/Probiotikum-Gruppe); e-Signifikanz nach Mann-Whitney Test; f-Median (minimaler Wert-maximaler Wert); g-keine Signalbildung während der Real Time PCR

Tab. A25: Populationen von *L. acidophilus*, *L. amylovorus* und *L. johnsonii* im distalen *Jejunum* der Versuchsferkel

Alter	Zellzahl [Log10 Zellen/g Feuchtmasse]				Anteil an der gesamten Laktobazillen-Population [%]			
	KG ^a (N=5)	PG ^b (N=5) ^c	<i>n</i> ^d	<i>P</i> ^e	KG (N=5)	PG (N=5)	<i>n</i>	<i>P</i>
<i>L. acidophilus</i>								
7	5,47^f (5,41-5,92)	5,06	3/1	0,18	1,0x10⁻¹ (2,8x10 ⁻² -1,2x10 ⁻¹)	7,22 x10⁻²	3/1	0,65
14	4,94 (4,88-5)	5,28 (4,91-5,65)	2/2	0,43	8,2x10⁻² (2,4x10 ⁻² -1,4x10 ⁻¹)	4,5 x10⁻² (1,8x10 ⁻² -7,2x10 ⁻²)	2/2	0,68
28	4,84 (4,17-5,7)	ND	4/0	-	8,5x10⁻² (2,3x10 ⁻² -1,5x10 ⁻¹)	ND	4/0	
31	4,60 (4,43-4,78)	ND	2/0	-	6,9x10⁻² (4,6x10 ⁻² -9,3x10 ⁻²)	ND	2/0	
35	4,86 (4,71-5,02)	ND	2/0	-	8,1x10⁻² (5,5x10 ⁻² -1,0x10 ⁻¹)	ND	2/0	
56	ND	4,72	0/1	-	ND	5,39 x10⁻²	0/1	
<i>L. amylovorus</i>								
7	7,69 (7,16-7,85)	7,46 (6,66-8,0)	3/4	0,72	7,04 (5,12-7,93)	6,31 (2,88-9,63)	3/4	0,91
14	5,97 (3,16-7,09)	7,04 (5,98-7,36)	4/3	0,28	2,53 (0,02-11,17)	2,45 (0,59-3,73)	4/3	0,91
28	6,6 (5,97-7,47)	4,97 (4,53-6,89)	5/5	0,05	6,28 (1,50-8,20)	1,08 (0,01-12,42)	5/5	0,34
31	4,59 (2,88-6,53)	3,45 (2,61-7,18)	5/5	0,60	0,64 (0,04-5,25)	0,48 (0,003-10,45)	5/5	0,91
35	6,23 (3,16-7,05)	3,69 (3,01-6,08)	5/5	0,25	4,43 (0,001-11,48)	0,13 (0,01-26,53)	5/5	0,60
56	3,85 (2,47-5,04)	6,26 (3,11-7,41)	5/5	0,25	1,02 (0,33-3,58)	4,36 (0,22-26,79)	5/5	0,25
<i>L. johnsonii</i>								
7	6,29 (4,26-6,93)	6,41 (5,94-7,12)	3/4	0,72	0,22 (0,003-3,03)	0,90 (0,07-3,29)	3/4	0,48
14	5,43 (4,82-6,45)	5,94 (4,77-7,39)	4/3	0,72	1,50 (0,12-5,19)	0,19 (0,04-4,02)	4/3	0,48
28	5,41 (4,12-6,33)	5,79 (5,15-6,98)	5/5	0,25	0,12 (0,03-4,47)	2,03 (0,28-8,85)	5/5	0,05
31	5,86 (4,2-6,78)	6,66 (3,96-7,31)	5/5	0,60	13,42 (0,52-21,02)	10,97 (5,22-25,02)	5/5	0,91
35	6,85 (4,08-7,08)	5,78 (4,68-6,37)	5/5	0,46	7,93 (0,01-20,31)	9,91 (4,37-21,78)	5/5	0,60
56	4,43 (3,49-6,25)	4,55 (3,52-7,18)	5/5	0,46	11,71 (6,07-13,28)	8,39 (0,03-19,31)	5/5	0,34

a-Kontrollgruppe; b-Probiotikum-Gruppe; c-Anzahl der untersuchten Proben; d-Anzahl der positiven Ergebnisse von jeweils 5 untersuchten Proben (Kontrollgruppe/Probiotikum-Gruppe); e-Signifikanz nach Mann-Whitney Test; f-Median (minimaler Wert-maximaler Wert)

Tab. A26: Populationen von *L. mucosae* und *L. reuteri* im distalen *Jejunum* der Versuchsferkel

Alter	Zellzahl [Log10 Zellen/g Feuchtmasse]				Anteil an der gesamten Laktobazillen- Population [%]			
	KG ^a (N=5)	PG ^b (N=5) ^c	<i>n</i> ^d	<i>P</i> ^e	KG (N=5)	PG (N=5)	<i>n</i>	<i>P</i>
<i>L. mucosae</i>								
7	7,2^f (6,68-7,71)	6,65 (5,92-7,12)	3/4	0,11	2,28 (1,71-5,81)	0,87 (0,34-2,22)	3/4	0,04
14	6,23	6,84 (6,24-7,44)	1/2	0,22	24,32	2,75 (1,08-4,43)	1/2	0,22
28	6,85 (6,65-7,05)	6,11 (4,44-6,48)	2/3	0,05	9,36 (7,11-11,61)	4,86 (0,88-10,98)	2/3	0,24
31	6,71 (6,07-7,17)	3,85 (3,68-7,45)	3/3	0,51	8,03 (4,05-25,43)	4,23 (2,55-19,57)	3/3	0,51
35	6,61	5,09 (4,98-5,85)	1/3	0,10	4,19	4,46 (0,84-15,70)	1/3	0,65
56	5,18 (4,51-5,86)	3,75 (3,31-4,19)	2/2	0,09	5,00 (4,66-5,34)	4,92 (2,67-7,16)	2/2	1
<i>L. reuteri</i>								
7	7,26 (6,6-8,33)	6,55 (5,88-6,75)	3/4	0,08	2,65 (1,41-24,18)	1,37 (0,07-2,75)	3/4	0,28
14	6,95 (5,74-8,04)	7,78 (7,61-7,92)	4/3	0,28	23,46 (7,76-100,00)	13,65 (8,97-37,50)	4/3	0,72
28	6,51 (5,96-7,69)	7,09 (4,63-7,96)	5/5	0,75	5,25 (0,93-33,81)	19,32 (1,36-50,46)	5/5	0,34
31	5,82 (3,98-6,51)	6,97 (3,32-7,27)	4/5	0,62	5,01 (0,00-9,85)	11,56 (1,09-45,95)	4/5	0,32
35	6,42 (5,29-6,86)	5,48 (4,89-6,18)	5/5	0,10	7,62 (0,25-27,07)	19,72 (1,20-28,05)	5/5	0,60
56	4,77 (4,21-6,66)	5,92 (3,82-7,58)	5/4	0,62	31,66 (10,06-66,52)	19,88 (0,00-28,44)	5/4	0,32

a-Kontrollgruppe; b-Probiotikum-Gruppe; c-Anzahl der untersuchten Proben; d-Anzahl der positiven Ergebnisse von jeweils 5 untersuchten Proben (Kontrollgruppe/Probiotikum-Gruppe); e-Signifikanz nach Mann-Whitney Test; f-Median (minimaler Wert-maximaler Wert)

Tab. A27: Gesamt-Laktat im distalen *Jejunum* der Versuchsferkel

Alter	Gesamt-Laktat [mg/g FM]				Verhältnis L/D-Laktat			
	Kontrolle (N=5) ^b	Probiotikum ^a (N=5)	n ^c	P ^d	Kontrolle (N=5)	Probiotikum (N=5)	n	P
28	1,15 (0,68-2,98)	1,15 (0,74-1,76)	3/4	1	1,36 (0,98-9,01)	9,89 (1,92-16,98)	3/4	0,15
31	1,90 (0,16-6,37)	3,42 (0,34-4,55)	5/5	0,75	2,58 (0,75-48,43)	4,38 (1,66-85,43)	5/5	0,46
35	1,76 (0,40-7,67)	0,71 (0,21-2,94)	5/5	0,60	2,49 (0,83-183,97)	7,42 (4,10-62,45)	5/5	0,11
56	0,83 (0,31-0,91)	1,48 (0,55-2,70)	4/5	0,05	91,26 (6,85-404,61)	10,86 (5,20-288,5)	4/5	0,46

a – Fütterungsgruppe; b - Anzahl der untersuchten Proben; c - Anzahl der Proben mit positiven Werten; d - Signifikanz nach Mann-Whitney Test; e - Median (Minimum-Maximum)

Tab. A28: Gehalt von L(+)- und D(-)-Isomeren des Laktats im distalen *Jejunum* der Versuchsferkel

Alter	Konzentration [mg/g FM]				Relativer Anteil [in % des Gesamt-Laktats]			
	Kontrolle (N=5) ^b	Probiotikum ^a (N=5)	n ^c	P ^d	Kontrolle (N=5)	Probiotikum (N=5)	n	P
L(+) Isomer								
28	1,03^e (0,34-1,71)	0,96 (0,7-1,16)	3/4	0,72	57,62 (49,57-90,01)	84,50 (65,76-94,44)	3/4	0,15
31	1,36 (0,15-3,1)	2,13 (0,34-3,58)	5/5	0,60	72,09 (43,02-97,98)	81,42 (62,40-98,84)	5/5	0,46
35	1,18 (0,31-3,48)	0,56 (0,18-2,59)	5/5	0,75	71,32 (45,37-99,46)	88,13 (80,39-98,42)	5/5	0,11
56	0,78 (0,3-0,89)	1,24 (0,54-2,12)	4/5	0,05	98,83 (87,27-99,75)	91,57 (73,01-99,65)	4/5	0,46
D(-) Isomer								
28	0,34^e (0,11-1,26)	0,18 (0,04-0,6)	3/4	0,28	42,39 (9,99-50,43)	15,50 (5,56-34,24)	3/4	0,15
31	0,52 (0,003-3,27)	0,69 (0-1,29)	5/5	0,75	27,91 (2,02-56,98)	18,58 (1,16-37,60)	5/5	0,46
35	0,42 (0,002-4,19)	0,06 (0,01-0,35)	5/5	0,25	28,68 (0,54-54,63)	11,87 (1,58-19,61)	5/5	0,11
56	0,005 (0,002-0,12)	0,19 (0,002-0,73)	4/5	0,46	1,17 (0,25-12,73)	8,43 (0,35-26,99)	4/5	0,46

a – Fütterungsgruppe; b - Anzahl der untersuchten Proben; c - Anzahl der Proben mit positiven Werten; d - Signifikanz nach Mann-Whitney Test; e - Median (Minimum-Maximum)

Tab. A29: Ammoniumionen-Gehalt im distalen *Jejunum* der Versuchsferkel

Alter	Kontrolle (N=5) ^b	Probiotikum ^a (N=5)	n ^c	P ^d
28	0,71 (0,43-1,00)	0,60 (0,47-0,73)	2/2	1
31	0,40 (0,26-0,47)	0,31 (0,28-0,39)	5/5	0,91
35	0,29 (0,22-0,34)	0,29 (0,27-0,34)	5/5	0,34
56	0,24 (0,13-0,35)	0,25 (0,15-0,30)	4/5	0,80

a – Fütterungsgruppe; b - Anzahl der untersuchten Proben; c - Anzahl der Proben mit positiven Werten; d - Signifikanz nach Mann-Whitney Test; e - Median (Minimum-Maximum)

Tab. A30: Gehalt der extrahierten DNA und Zelldichte der eubakteriellen 16S rDNA-Population im *Colon ascendens* der Versuchsferkel

Alter	DNA-Konzentration [ng/μl]			Eubakterielle Population [Lg 10 Zellen/g Feuchtmasse]		
	Kontrolle (n=5)	Probiotikum (n=5)	<i>P</i>	Kontrolle (n=5)	Probiotikum (n=5)	<i>P</i>
7	1035,15 (900-2341,4)	2332,4 (521,6-4197,3)	0,80	11,39 (11,07-11,71)	12,05 (11,86-12,41)	0,01
14	1800,9 (755,9-4503,6)	1206,3 (233,3-2936)	0,60	11,40 (10,57-11,95)	11,84 (11,46-11,91)	0,29
28	1062,2 (1026,1-2008,1)	927,0 (422,5-3350,5)	0,60	11,13 (10,86-11,73)	11,78 (11,6-11,82)	0,02
31	1143,2 (692,8-1818,9)	755,9 (377,5-4539,6)	0,40	11,13 (10,83-11,30)	11,5 (9,98-12,1)	0,34
35	1044,1 (665,8-1089,2)	737,8 (368,5-1503,6)	0,91	11,21 (10,68-11,74)	11,69 (10,91-11,92)	0,10
56	1341,4 (800,9-1818,9)	791,9 (134,2-3873)	0,25	10,71 (9,93-11,65)	11,61 (11,33-11,99)	0,07

a-Kontrollgruppe; b-Probiotikum-Gruppe; c-Anzahl der untersuchten Proben; d-Signifikanz nach Mann-Whitney Test; e-Median (minimaler Wert-maximaler Wert)

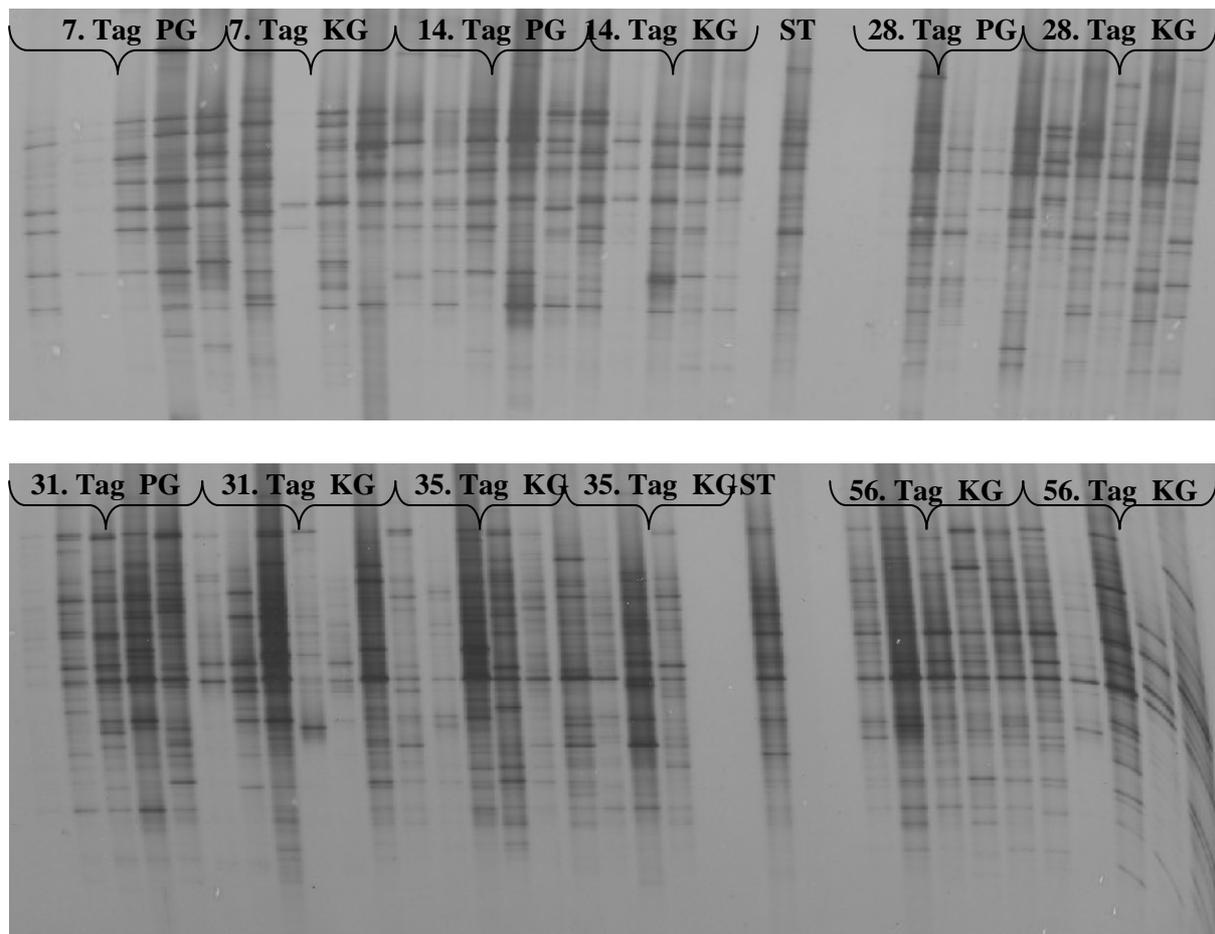


Abb. A3: DGGE-Profile der eubakteriellen 16S rDNA-Populationen im *Colon ascendens* der Versuchsferkel vor (7., 14., 28. Tag) und nach dem Absetzen (31., 35., 56. Tag) (PG - Probiotikum-Gruppe, KG – Kontrollgruppe, ST – Standard-Probe)

Tab. A31: Diversität der bakteriellen Gemeinschaften im *Colon ascendens* der Versuchsferkel (dargestellt sind errechnete Diversität-Indizes)

Alter	<i>Richness</i>			<i>Evenness</i>		
	KG ^a (N=5)	PG ^b (N=5) ^c	<i>P</i> ^d	KG (N=5)	PG (N=5)	<i>P</i>
7	40^e (10-55)	25 (10-41)	0,26	0,81 (0,72-0,9)	0,77 (0,38-0,89)	0,80
14	38 (17-47)	41 (22-55)	0,40	0,81 (0,67-0,86)	0,83 (0,77-0,87)	0,60
28	39 (33-42)	37 (11-52)	0,91	0,85 (0,79-0,86)	0,84 (0,79-0,89)	0,67
31	24 (21-52)	40 (14-41)	0,59	0,80 (0,65-0,85)	0,84 (0,58-0,94)	0,34
35	37 (34-50)	45 (21-54)	0,83	0,87 (0,63-0,89)	0,78 (0,63-0,85)	0,10
56	20 (18-40)	39 (36-43)	0,05	0,85 (0,68-0,89)	0,86 (0,76-0,90)	0,53
	<i>Shannon-Index</i>			<i>Simpson-Index</i>		
7	3,04 (1,66-3,45)	2,09 (1,40-2,72)	0,11	0,07 (0,04-0,24)	0,12 (0,07-0,15)	0,32
14	2,98 (2,17-3,22)	3,03 (2,67-3,36)	0,60	0,07 (0,05-0,17)	0,07 (0,05-0,10)	0,60
28	3,05 (2,86-3,19)	2,97 (2,12-3,45)	0,75	0,06 (0,06-0,08)	0,09 (0,04-0,15)	0,60
31	2,55 (2,45-3,04)	3,08 (2,16-3,13)	0,46	0,10 (0,04-0,13)	0,05 (0,05-0,09)	0,07
35	3,07 (2,48-3,26)	2,61 (2,49-2,96)	0,25	0,06 (0,04-0,11)	0,05 (0,03-0,10)	0,46
56	2,57 (1,95-3,21)	3,19 (2,87-3,23)	0,09	0,10 (0,04-0,25)	0,05 (0,04-0,07)	0,07

a-Kontrollgruppe; b-Probiotikum-Gruppe; c-Anzahl der untersuchten Proben; d-Signifikanz nach Mann-Whitney Test; e-Median (minimaler Wert-maximaler Wert)

Tab. A32: Sörensen-Ähnlichkeitswerte der bakteriellen Gemeinschaften im *Colon ascendens* der Versuchsferkel

Alter	Innerhalb der Fütterungsgruppe			Zwischen den Fütterungsgruppen		
	KG ^a	PG ^b	<i>P</i> ^c	<i>P</i>	<i>P</i>	
7	0,34^e (0,21-0,47)	0,50 (0,39-0,8)	0,006	0,4 (0,27-0,61)	0,004	0,15
14	0,45 (0,33-0,66)	0,47 (0,44-0,58)	0,47	0,51 (0,35-0,61)	0,75	0,64
28	0,54 (0,41-0,61)	0,40 (0,26-0,61)	0,02	0,48 (0,3-0,62)	0,28	0,05
31	0,42 (0,36-0,52)	0,55 (0,22-0,76)	0,40	0,38 (0,17-0,62)	0,12	0,42
35	0,56 (0,47-0,68)	0,5 (0,42-0,67)	0,11	0,55 (0,47-0,67)	0,08	0,62
56	0,53 (0,37-0,68)	0,6 (0,55-0,73)	0,01	0,51 (0,36-0,7)	0,009	0,96

a-Kontrollgruppe; b-Probiotikum-Gruppe; c-Anzahl der untersuchten Proben; d-Signifikanz nach Mann-Whitney Test; e-Median (minimaler Wert-maximaler Wert)

Tab. A33: Populationen von *Lactobacillus spp.* und *Enterococcus spp.* im *Colon ascendens* der Versuchsferkel

Alter	Zellzahl [Log10 Zellen/g Feuchtmasse]				Anteil an der gesamten eubakteriellen Population [%]			
	KG ^a (N=5)	PG ^b (N=5) ^c	<i>n</i> ^d	<i>P</i> ^e	KG (N=5)	PG (N=5)	<i>n</i>	<i>P</i>
<i>Lactobacillus spp.</i>								
7	9,33^f (7,99-10,09)	9,56 (9,3-9,76)	3/5	0,46	0,60 (0,06-10,55)	0,41 (0,10-0,51)	3/5	0,62
14	9,14 (8,93-10,09)	9,52 (8,57-10,09)	5/5	0,91	0,88 (0,55-2,28)	0,45 (0,13-1,49)	5/5	0,04
28	9,22 (8,4-9,59)	8,67 (8,51-9,2)	5/5	0,10	0,53 (0,34-2,88)	0,12 (0,06-0,25)	5/5	0,009
31	8,37 (7,22-9,24)	8,86 (7,63-9,47)	5/5	0,34	0,34 (0,01-1,29)	0,23 (0,09-1,71)	5/5	0,91
35	9,01 (8,95-9,41)	9,33 (8,07-9,52)	5/5	0,75	0,81 (0,18-1,84)	0,38 (0,12-0,71)	5/5	0,05
56	7,52 (6,03-9,29)	8,11 (7,57-8,98)	5/5	0,25	0,12 (0,008-3,24)	0,03 (0,009-0,45)	5/5	0,75
<i>Enterococcus spp.</i>								
7	5,73 (4,39-6,86)	7,49 (7,02-7,65)	4/5	0,01	4,6x10⁻⁴ (1,5x10 ⁻⁵ -6,2x10 ⁻³)	2,0x10⁻³ (4,1x10 ⁻⁴ -5,7x10 ⁻³)	4/5	0,32
14	6,06 (5,4-6,85)	6,88 (6,54-7,54)	5/5	0,02	6,7x10⁻⁴ (3,0x10 ⁻⁴ -1,0x10 ⁻³)	1,8x10⁻³ (1,0x10 ⁻³ -4,2x10 ⁻³)	5/5	0,01
28	5,51 (4,78-5,68)	6,01 (5,43-6,14)	5/5	0,11	1,1x10⁻⁴ (7,6x10 ⁻⁵ -2,3x10 ⁻⁴)	1,6x10⁻⁴ (5,6x10 ⁻⁵ -2,0x10 ⁻⁴)	5/5	0,91
31	4,04 (3,09-5,36)	5,38 (5,03-5,55)	5/5	0,04	5,6x10⁻⁶ (1,4x10 ⁻⁶ -2,3x10 ⁻⁴)	6,8x10⁻⁵ (1,8x10 ⁻⁵ -3,0x10 ⁻³)	5/5	0,09
35	4,65 (3,78-7,52)	6,98 (5,13-8,31)	4/4	0,10	4,4x10⁻⁶ (0x10 ⁻⁶ -6,8x10 ⁻²)	1,6x10⁻⁴ (0-3,4x10 ⁻²)	4/4	0,67
56	4,46 (2,77-4,78)	5,68 (5,44-6,11)	5/5	0,009	1,4x10⁻⁵ (1,1x10 ⁻⁶ -3,3x10 ⁻⁴)	1,9x10⁻⁴ (4,8x10 ⁻⁵ -3,1x10 ⁻⁴)	5/5	0,10

a-Kontrollgruppe; b-Probiotikum-Gruppe; c-Anzahl der untersuchten Proben; d-Anzahl der positiven Ergebnisse von jeweils 5 untersuchten Proben (Kontrollgruppe/Probiotikum-Gruppe); e-Signifikanz nach Mann-Whitney Test; f-Median (minimaler Wert-maximaler Wert)

Tab. A34: Populationen von *Escherichia spp.* und *Bifidobacterium spp.* im *Colon ascendens* der Versuchsferkel

Alter	Zellzahl [Log10 Zellen/g Feuchtmasse]				Anteil an der gesamten eubakteriellen Population [%]			
	KG ^a (N=5)	PG ^b (N=5) ^c	n ^d	P ^e	KG (N=5)	PG (N=5)	n	P
<i>Escherichia spp.</i>								
7	8,85^f (8,48-9,23)	5,26 (4,43-5,89)	2/4	0,04	7,5x10⁻¹ (8,1x10 ⁻² -1,4x10)	2,6x10⁻⁵ (0x10 ⁻⁷ -7,0x10 ⁻⁵)		0,05
14	8,02 (5,34-8,37)	5,57 (5,14-6,0)	5/2	0,24	5,4x10⁻² (3,0x10 ⁻⁵ -6,3x10 ⁻¹)	8,2x10⁻⁵ (2,0x10 ⁻⁵ -1,5x10 ⁻⁴)		0,24
28	7,35 (6,54-9,55)	ND	4/0		1,9x10⁻² (4,8x10 ⁻³ -1,0x10)	ND		
31	8,03 (7,74-8,05)	ND	4/0		7,1x10⁻² (5,6x10 ⁻² -1,5x10 ⁻¹)	ND		
35	6,10 (5,44-8,12)	6,08	4/1	1	1,0x10⁻³ (1,7x10 ⁻⁴ -2,7x10 ⁻¹)	1,4x10⁻⁴ (1,5x10 ⁻⁴ -1,5x10 ⁻⁴)		0,10
56	6,28 (5,82-7,33)	ND	3/0		3,1x10⁻³ (1,2x10 ⁻³ -2,5x10 ⁻¹)	ND		
<i>Bifidobacterium spp.</i>								
7	5,38 (4,36-7,09)	5,84 (5,62-6,06)	3/2	0,56	2,0x10⁻⁴ (1,0x10 ⁻⁵ -3,3x10 ⁻³)	3,3x10⁻⁵ (2,0x10 ⁻⁵ -5,0x10 ⁻⁵)		0,56
14	6,19 (4,65-7,97)	5,84 (4,79-6,96)	5/3	0,65	6,1x10⁻⁴ (0,5,1x10 ⁻²)	9,9x10⁻⁵ (2,0x10 ⁻⁵ -1,1x10 ⁻³)		0,45
28	7,25 (7,18-8,4)	6,415 (5,37-7,61)	3/4	0,11	2,0x10⁻² (1,3x10 ⁻² -7,5x10 ⁻²)	6,0x10⁻⁴ (4,0x10 ⁻⁵ -6,7x10 ⁻³)		0,03
31	5,52 (5,3-6,21)	5,73 (4,01-6,02)	4/5	0,80	2,8x10⁻⁴ (1,6x10 ⁻⁴ -1,8x10 ⁻³)	4,2x10⁻⁵ (0x10 ⁻¹ -1,1x10 ⁻²)		0,46
35	6,09 (4,9-8,11)	5,73 (5,36-6,62)	5/3	0,45	2,5x10⁻³ (1,0x10 ⁻⁵ -7,8x10 ⁻²)	4,9x10⁻⁴ (5,0x10 ⁻⁵ -6,7x10 ⁻⁴)		0,29
56	6,00 (5,73-6,27)	6,2 (5,09-7,31)	2/2	1	3,2x10⁻³ (3,1x10 ⁻³ -3,3x10 ⁻³)	4,8x10⁻³ (3,0x10 ⁻⁵ -9,6x10 ⁻³)		1

a-Kontrollgruppe; b-Probiotikum-Gruppe; c-Anzahl der untersuchten Proben; d-Anzahl der positiven Ergebnisse von jeweils 5 untersuchten Proben (Kontrollgruppe/Probiotikum-Gruppe); e-Signifikanz nach Mann-Whitney Test; f-Median (minimaler Wert-maximaler Wert); g-keine Signalbildung während der Real Time PCR

ANHANG

Tab. A35: Populationen von *L. acidophilus*, *L. amylovorus* und *L. johnsonii* im *Colon ascendens* der Versuchsferkel

Alter	Zellzahl [Log10 Zellen/g Feuchtmasse]				Anteil an der gesamten Laktobazillen-Population [%]			
	KG ^a (N=5)	PG ^b (N=5) ^c	<i>n</i> ^d	<i>P</i> ^e	KG (N=5)	PG (N=5)	<i>n</i>	<i>P</i>
<i>L. acidophilus</i>								
7	3,79^f (2,73-4,85)	4,95 (4,59-6,26)	2/3	0,24	3,6x10⁻² (2,0x10 ⁻⁵ -7,2x10 ⁻²)	1,5x10⁻³ (1,2x10 ⁻³ -4,4x10 ⁻²)	2/3	0,51
14	6,33 (6,33-6,33)	3,53	1/1	0,31	1,7x10⁻²	9,00 x10⁻⁴	1/1	0,31
28	4,47 (3,7-5,25)	4,37	2/1	-	3,2x10⁻³ (4,2x10 ⁻⁴ -6,1x10 ⁻³)	7,2 x10⁻³	2/1	0,48
31	ND	3,35	0/1	-		5,2 x10⁻³	0/1	
35	4,62	5,15	1/1	-	1,61x10⁻³	1,2 x10⁻¹	1/1	0,31
56	ND	4,38 (4,26-4,5)	0/2	0,31		3,3x10⁻³ (1,9x10 ⁻³ -4,7x10 ⁻³)	0/2	
<i>L. amylovorus</i>								
7	7,07 (6,04-8,52)	8,01 (7,75-8,79)	4/5	0,10	2,89 (0,03-3,53)	3,27 (0,97-16,87)	4/5	0,32
14	6,32 (3,96-8,49)	7,36 (7,24-7,78)	5/5	0,46	0,21 (0,001-2,50)	0,73 (0,49-4,70)	5/5	0,25
28	6,65 (2,97-8,17)	6,19 (5,25-6,7)	5/5	0,34	0,25 (0,0004-5,16)	0,09 (0,02-1,08)	5/5	0,46
31	3,93 (3,18-5,95)	5,25 (3,72-6,76)	5/5	0,60	0,05 (0,001-0,08)	0,006 (0,0003-1,21)	5/5	0,74
35	7,41 (3,48-7,93)	6,08 (4,7-7,02)	5/5	0,60	1,32 (0,0003-6,27)	0,05 (0,002-8,82)	5/5	0,91
56	4,65 (3,73-5,87)	7,11 (4,01-7,61)	5/5	0,07	0,13 (0,02-0,61)	1,91 (0,008-92,69)	5/5	0,11
<i>L. johnsonii</i>								
7	6,42 (4,15-6,45)	7,42 (4,99-8,04)	3/5	0,10	0,22 (0,0001-2,69)	0,84 (0,005-3,03)	3/5	0,76
14	5,54 (4,84-8,51)	6,91 (6,42-7,85)	5/5	0,11	0,008 (0,007-2,62)	0,71 (0,07-2,00)	5/5	0,09
28	6,31 (5,6-7,04)	7,12 (6,25-8,09)	5/5	0,05	0,13 (0,03-0,45)	4,03 (0,38-7,84)	5/5	0,01
31	6,16 (5,69-6,79)	7,46 (6,36-7,9)	5/5	0,02	0,63 (0,06-3,85)	3,95 (0,91-13,31)	5/5	0,04
35	7,97	7,78 (5,79-8,23)	2/5	0,24	7,07 (3,63-10,51)	2,80 (0,52-5,34)	2/5	0,10
56	5,78 (4,2-7,67)	6,85 (4,9-7,71)	5/4	0,46	2,43 (1,48-3,38)	4,20 (0,18-6,83)	5/4	0,32

a-Kontrollgruppe; b-Probiotikum-Gruppe; c-Anzahl der untersuchten Proben; d-Anzahl der positiven Ergebnisse von jeweils 5 untersuchten Proben (Kontrollgruppe/Probiotikum-Gruppe); e-Signifikanz nach Mann-Whitney Test; f-Median (minimaler Wert-maximaler Wert)

Tab. A36: Populationen von *L. mucosae* und *L. reuteri* im *Colon ascendens* der Versuchsferkel

Alter	Zellzahl [Log10 Zellen/g Feuchtmasse]				Anteil an der gesamten Laktobazillen- Population [%]			
	KG ^a (N=5)	PG ^b (N=5) ^c	<i>n</i> ^d	<i>P</i> ^e	KG (N=5)	PG (N=5)	<i>n</i>	<i>P</i>
<i>L. mucosae</i>								
7	6,8 (6,38-7,22)	7,91 (7,78-8,04)	2/2	0,10	1,30 (0,13-2,47)	2,23 (1,43-3,02)	2/2	0,43
14	6,98 (5,62-8,35)	7,1	2/1	-	0,93 (0,05-1,81)	0,35	2/1	1
28	7,74 (7,1-7,83)	7,31	3/1	0,65	1,76 (0,75-1,89)	4,39	3/1	0,11
31	6,745 (5,09-8,03)	6,745 (6,04-7,98)	4/4	0,77	1,55 (0,47-10,38)	1,67 (0,62-13,02)	4/4	0,56
35	7,78 (7,46-8,31)	7,97 (7,9-8,22)	3/3	0,51	6,74 (2,80-7,82)	3,71 (2,88-5,28)	3/3	0,51
56	ND	6,83	0/1	-	ND	5,18	0/1	
<i>L. reuteri</i>								
7	7,91 (6,32-8,93)	8,62 (6,97-8,91)	4/5	0,62	12,51 (0,19-24,05)	11,56 (0,47-23,02)	4/5	1
14	8,77 (7,49-9,11)	8,77 (8,07-8,81)	5/5	0,67	26,20 (3,67-54,51)	19,64 (4,90-43,49)	5/5	0,91
28	8,21 (6,91-8,95)	8,08 (7,05-8,69)	5/5	0,75	9,76 (3,25-22,77)	21,57 (3,40-102,89)	5/5	0,46
31	6,45 (4,33-7,94)	7,25 (4,66-8,73)	5/5	0,46	0,97 (0,13-8,49)	2,44 (0,02-18,42)	5/5	0,25
35	8,05 (6,67-9,08)	8,15 (7,12-9,84)	5/5	0,46	11,06 (0,35-118,88)	19,18 (6,55-213,08)	5/5	0,46
56	6,43 (5,53-7,88)	8,19 (6,98-8,71)	5/5	0,04	8,04 (3,95-31,28)	53,26 (14,07-352,73)	5/5	0,02

a-Kontrollgruppe; b-Probiotikum-Gruppe; c-Anzahl der untersuchten Proben; d-Anzahl der positiven Ergebnisse von jeweils 5 untersuchten Proben (Kontrollgruppe/Probiotikum-Gruppe); e-Signifikanz nach Mann-Whitney Test; f-Median (minimaler Wert-maximaler Wert)

Tab. A37: Gesamt-Laktat im *Colon ascendens* der Versuchsferkel

Alter	Gesamt-Laktat [mg/g FM]				Verhältnis L/D-Laktat			
	Kontrolle (N=5) ^b	Probiotikum ^a (N=5)	n ^c	P ^d	Kontrolle (N=5)	Probiotikum (N=5)	n	P
7	0,19 (0,09-0,91)	0,28 (0,16-0,40)	2/3	1	0,86 (0,53-0,93)	0,90 (0,83-0,98)	2/3	0,56
14	0,11 (0,04-0,42)	0,13 (0,04-0,41)	4/5	0,62	0,85 (0,67-1,07)	0,87 (0,80-0,99)	4/5	0,80
28	0,14 (0,06-0,33)	0,13 (0,02-0,21)	4/5	0,62	0,92 (0,58-1,03)	1,01 (0,70-1,19)	4/5	0,32
31	0,09 (0,01-0,17)	0,20 (0,02-0,65)	5/5	0,11	0,86 (0,77-2,02)	0,97 (0,90-1,13)	5/5	0,34
35	0,11 (0,07-0,33)	0,15 (0,09-1,04)	5/5	0,10	0,87 (0,54-1,07)	0,93 (0,82-1,02)	5/5	0,25
56	0,05 (0,01-0,07)	0,07 (0,05-0,15)	5/5	0,04	0,64 (0,34-0,91)	1,00 (0,41-1,06)	5/5	0,10

a – Fütterungsgruppe; b - Anzahl der untersuchten Proben; c - Anzahl der Proben mit positiven Werten; d - Signifikanz nach Mann-Whitney Test; e - Median (Minimum-Maximum)

Tab. A38: Gehalt von L(+)- und D(-)-Isomeren des Laktats im *Colon ascendens* der Versuchsferkel

Alter	Konzentration [mg/g FM]				Relativer Anteil [in % des Gesamt-Laktats]			
	Kontrolle (N=5) ^b	Probiotikum ^a (N=5)	n ^c	P ^d	Kontrolle (N=5)	Probiotikum (N=5)	n	P
L(+) Isomer								
7	0,08 (0,04-0,31)	0,13 (0,08-0,18)	2/3	1	46,38 (34,45-48,09)	47,43 (45,46-49,39)	2/3	0,56
14	0,04 (0,02-0,2)	0,06 (0,02-0,2)	4/5	0,62	45,94 (40,22-51,72)	46,59 (44,39-49,64)	4/5	0,80
28	0,06 (0,03-0,16)	0,07 (0,01-0,11)	4/5	0,62	47,90 (36,88-50,82)	50,30 (41,11-54,28)	4/5	0,32
31	0,03 (0,01-0,07)	0,09 (0,01-0,32)	5/5	0,17	46,17 (43,65-66,87)	49,22 (47,36-53,05)	5/5	0,34
35	0,05 (0,03-0,15)	0,07 (0,04-0,5)	5/5	0,11	46,54 (35,07-51,74)	48,27 (45,15-50,44)	5/5	0,25
56	0,01 (0-0,03)	0,03 (0,01-0,08)	5/5	0,07	39,20 (25,61-47,56)	50,00 (29,04-51,46)	5/5	0,10
D(-) Isomer								
7	0,10 (0,05-0,6)	0,15 (0,08-0,22)	2/3	1	53,62 (51,91-65,55)	52,57 (50,61-54,54)	2/3	0,56
14	0,06 (0,02-0,22)	0,06 (0,02-0,22)	4/5	1	54,06 (48,28-59,78)	53,41 (50,36-55,61)	4/5	0,80
28	0,06 (0,03-0,17)	0,06 (0,01-0,1)	4/5	0,46	52,10 (49,18-63,12)	49,70 (45,72-58,89)	4/5	0,32
31	0,04 (0,003-0,09)	0,10 (0,01-0,33)	5/5	0,17	53,83 (33,13-56,35)	50,78 (46,95-52,64)	5/5	0,34
35	0,05 (0,05-0,18)	0,07 (0,05-0,54)	5/5	0,11	53,46 (48,26-64,93)	51,73 (49,56-54,85)	5/5	0,25
56	0,02 (0,01-0,04)	0,03 (0,03-0,08)	5/5	0,04	60,80 (52,44-74,39)	50,00 (48,54-70,96)	5/5	0,10

a – Fütterungsgruppe; b - Anzahl der untersuchten Proben; c - Anzahl der Proben mit positiven Werten; d - Signifikanz nach Mann-Whitney Test; e - Median (Minimum-Maximum)

Tab. A39: Ammoniumionen-Gehalt im *Colon ascendens* der Versuchsferkel

Alter	Kontrolle (N=5) ^b	Probiotikum ^a (N=5)	n ^c	P ^d
14	1,36^e (1,02-1,98)	1,17 (1,10-1,38)	4/3	0,72
28	1,16 (0,42-1,61)	1,13 (1,07-1,35)	4/4	0,47
31	0,60 (0,37-0,87)	0,59 (0,26-0,66)	5/5	0,33
35	0,65 (0,27-0,72)	0,46 (0,31-0,68)	5/5	0,77
56	0,30 (0,25-0,49)	0,37 (0,26-0,56)	4/5	0,47

a – Fütterungsgruppe; b - Anzahl der untersuchten Proben; c - Anzahl der Proben mit positiven Werten; d - Signifikanz nach Mann-Whitney Test; e - Median (Minimum-Maximum)

DANKSAGUNGEN

Herrn Prof. Dr. Ortwin Simon danke ich ganz herzlich dafür, dass ich die vorliegende Arbeit am Institut für Tierernährung im Rahmen des DFG-Forschungsprojekts anfertigen konnte. Mein besonderer Dank geht zurück ins Jahr 2004, als Prof. Simon die E-Mail von einem für ihn unbekanntem russischen Internetserver nicht gleich in den Spam-Korb verschoben, sondern ohne Besorgnis gelesen hat – damit habe ich Hoffnung auf diese Stelle bekommen.

Der H. Wilhelm Schaumann Stiftung danke ich für die schnelle und bürokratiefreie Aufnahme als Stipendiatin und für die großzügige Finanzierung der vorliegenden Dissertation.

Vielen, vielen, vielen Dank möchte ich Dr. Wilfried Vahjen für die angenehme Zusammenarbeit sagen. Ohne seine hervorragende theoretische und praktische Betreuung im Labor sowie die geduldigen Korrekturen meiner Texte wäre diese Dissertation nie entstanden.

Dr. David Taras danke ich vor allem für die Einführung in die Welt der DGGE und für seine mit Stefan Schön zusammen durchgeführte Aufbereitung der Digesta-Proben, sowie für seine Geduld und Kompetenz bei der Beantwortung meiner vielen Fragen.

Dr. Klaus Schäfer, Marita Eitinger und den zahlreichen Praktikanten und Hilfskräften danke ich für die Bestimmung der Metaboliten. Marita Eitinger gilt mein Dank auch für die Unterstützung im Labor und die vielen praktischen Tipps, die sie mir während meiner Labortätigkeit gegeben hat. Allen anderen Labor- und Mitarbeitern des Hauses in der Königin-Luise-Str. 49 meinen herzlichen Dank für die freundliche Unterstützung während meiner Doktorandenzeit.

Bei Frau Dr. Arndt und den Mitarbeitern des Instituts für Biometrie bedanke ich mich für die statistische Beratung und hilfreiche Tipps zur Datenverarbeitung und -darstellung.

Mein besonderer Dank für die nette Zusammenarbeit geht an meine Kolleginnen Ute Hansen, Tanja Oßwald, Veronika Ölschläger, Katrin Kirsch, Paula Brünig, Mareike Kraatz, Susanne Buchheit, Mascha Sysel und vielen anderen Doktoranden der Jahre 2005-2007. Stefan Schön danke ich auch für die Lösung diverser Probleme mit dem Computer.

Meinen Freunden und Kollegen im fernen Dzerzhinsk und Nizhnij Novgorod in Russland haben meine Dankbarkeit für die schöne seelische Unterstützung per Internet und Telefon.

Meiner Familie und Familie Klär gilt mein Dank für die gefühlsmäßige und finanzielle Unterstützung und Geduld. Die Arbeit ist ihnen allen gewidmet.

Meinem geliebten Erik – geduldig bei den Korrekturen der Dissertation, hilfreich im Haushalt und (bisher ☺) einfach perfekt als Lebenspartner – einen riesengroßen Dank.

SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den. 15.04.2007

Irina Klär (geb. Gordeeva)