

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

**Anwendung von rRNA-Oligonukleotidsonden zum Nachweis
nutritiver Einflüsse auf bakterielle Stoffwechselaktivitäten
im Verdauungstrakt von Broilern**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Gunnar Loh
Tierarzt aus Bonn-Bad Godesberg

Berlin 2002

Journal-Nr.: 2666

**Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin**

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. M.F.G. Schmidt
Erster Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. O. Simon
Zweiter Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. L.H. Wieler
Dritter Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. Dr. H.M. Hafez

Tag der Promotion: 06.12.2002

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Literaturübersicht	3
2.1 NSP und NSP-hydrolysierende Enzyme	3
2.1.1 Definition der NSP	3
2.1.2 NSP-hydrolysierende Enzyme als Futterzusatzstoffe	5
2.2 Antinutritive Effekte löslicher NSP in der Broilermast	6
2.2.1 Einfluss löslicher NSP und NSP-hydrolysierender Enzyme auf die Fettverdauung	7
2.2.2 Einfluß löslicher NSP und NSP-hydrolysierender Enzyme auf die Verdauung von Stärke und Proteinen	9
2.2.3 Einfluß löslicher NSP und NSP-hydrolysierender Enzyme auf die umsetzbare Energie	10
2.2.4 Einfluss löslicher NSP und NSP-hydrolysierender Enzyme auf die Morphologie des Verdauungstraktes	11
2.3 Mikrobielle Gemeinschaften im Verdauungstrakt von Broilern	12
2.3.1 Die mikrobielle Besiedlung des Verdauungstraktes von Broilern	12
2.3.2 Zusammensetzung mikrobieller Gemeinschaften im Verdauungstrakt von Broilern	13
2.4 Bedeutung intestinaler Mikroorganismen für den Wirt	14
2.4.1 Schutz vor pathogenen/unerwünschten Mikroorganismen	15
2.4.2 Produktion nützlicher Substanzen	15
2.4.3 Produktion unerwünschter Stoffwechselprodukte	17
2.4.4 Einfluss auf die Morphologie des Verdauungstraktes	17
2.4.5 Dekonjugation von Gallensäuren	17
2.5 Auswirkung löslicher NSP auf mikrobielle Gemeinschaften im Verdauungstrakt von Broilern	18
2.5.1 Einfluss erhöhter Digestivviskosität auf mikrobielle Gemeinschaften im Verdauungstrakt von Broilern	18
2.5.2 Einfluss eines veränderten Substratangebotes auf mikrobielle Gemeinschaften im Verdauungstrakt von Broilern	19
2.5.3 Einfluss NSP-hydrolysierender Enzyme auf mikrobielle Gemeinschaften im Verdauungstrakt von Broilern bei NSP-reichen Diäten	19
2.6 Identifizierung und Quantifizierung von Mikroorganismen	20
2.6.1 Mikrobiologische Methoden	20
2.6.2 Molekularbiologische Methoden	21

3. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	23
4. Material und Methoden	25
4.1 Versuchsplanung	25
4.2 Tiermaterial und Tierversuchsbedingungen	25
4.3 Versuchsdiäten	26
4.4 Zootechnische Leistungen	27
4.5 Probengewinnung	27
4.6 Agardiffusionsassays	28
4.6.1 Substratagars	28
4.6.2 Probenmaterial und Inkubation	28
4.6.3 Nachweis ausgewählter Enzymaktivitäten und Auswertung der Ergebnisse	28
4.7 Referenzkulturen	29
4.8 RNA-Extraktion aus den Referenzkulturen	30
4.9 Nukleinsäureextraktion aus den Digestproben	30
4.9.1 Zellaufschluss	30
4.9.2 Phenolextraktion	31
4.9.3 Fällung und Reinigung der Nukleinsäuren	31
4.9.4 Säulenchromatographische Aufreinigung der Nukleinsäuren	32
4.9.5 Bestimmung des Nukleinsäuregehaltes	32
4.9.6 Verdünnung und Lagerung der Nukleinsäuren	32
4.10 Hybridisierung und Detektion	32
4.10.1 Hybridisierung	32
4.10.2 Detektion	33
4.10.3 Standardbedingungen	33
4.10.4 Auswertung der Ergebnisse	33
4.11 Oligonukleotidsonden	34
4.11.1 16S/23S rRNA-Oligonukleotidsonden zum Nachweis ausgewählter Bakteriengruppen	34
4.11.2 16S/23S rRNA-Oligonukleotidsonden zum Nachweis ausgewählter Bakterienarten	35
4.12 Validierung der 16S/23S rRNA-Oligonukleotidsonden zum Nachweis ausgewählter Bakteriengruppen	35
4.12.1 S-G-Enc-038-a-A-18 zum Nachweis von Vertretern der <i>Enterococcus spp.</i>	35

4.12.2	16E1 zum Nachweis von Vertretern der <i>E.coli</i> und <i>Shigella spp.</i>	36
4.12.3	S-*-Chis-0150-a-A-23 zum Nachweis von Vertretern der <i>Clostridium spp.</i>	36
4.13	Validierung der 16S/23S rRNA-Oligonukleotidsonden zum Nachweis ausgewählter Vertreter der <i>Enterococcus spp.</i>	37
4.14	Nachweis ausgewählter Mikroorganismen im Probenmaterial	37
4.15	Berechnung der Gehalte an spezifischer RNA je µg Gesamt-RNA	37
4.16	Statistisch-mathematische Auswertung	38
5.	Ergebnisse	39
5.1	Zootechnische Leistungen	39
5.1.1	Lebendmassezunahme	39
5.1.2	Futtermverzehr	39
5.1.3	Futtermverbrauch	39
5.2	Anteil der Tiere mit veränderter Kotkonsistenz („sticky droppings“) und Abgänge	41
5.3	Agardiffusionsassays	42
5.3.1	Intestinale Xylanaseaktivitäten	42
5.3.2	Intestinale β-Glucanaseaktivitäten	43
5.3.3	Intestinale Lipaseaktivitäten	45
5.3.4	Intestinale Gallensäurehydrolaseaktivitäten	46
5.4	RNA-Extraktion aus Digestaprobe	48
5.4.1	Zellaufschluss	48
5.4.2	Phenolextraktion	48
5.4.3	Fällung der Nucleinsäuren	48
5.4.4	Eigenschaften der Zentrifugate	48
5.4.5	Bestimmung der Nucleinsäuregehalte	49
5.4.6	Nucleinsäuregehalte der für Hybridisierungen verwendeten RNA-Extrakte	49
5.5	Validierung der 16S und 23S rRNA-Oligonukleotidsonden zum Nachweis ausgewählter Bakteriengruppen	51
5.5.1	S-G-Enc-038-a-A-18 zum Nachweis von Vertretern der <i>Enterococcus spp.</i>	51
5.5.2	16E1 zum Nachweis von Vertretern der <i>E.coli</i> und <i>Shigella spp.</i>	51
5.5.3	S-*-Chis-0150-a-A-23 zum Nachweis von Vertretern der <i>Clostridium spp.</i>	52

5.6	Validierung der 16S und 23S rRNA-Oligonukleotidsonden zum Nachweis von Vertretern der <i>Enterococcus spp.</i>	53
5.6.1	S-S-Ecae-0181-a-A-24 zum Nachweis von <i>E.caecorum</i>	53
5.6.2	S-S-Ecsflaga-0185-a-A-21 zum Nachweis von <i>E.casseliflavus</i> , <i>E.flavescens</i> und <i>E.gallinarum</i>	53
5.6.3	S-S-Efaes-203-a-A-20 zum Nachweis von <i>E.faecalis</i>	54
5.6.4	S-S-Efaes-1237-b-A-17 zum Nachweis von <i>E.faecalis</i>	55
5.6.5	Unspezifische Sondenkandidaten	55
5.6.6	Oligonukleotidsonden ohne Signale	55
5.7	Zur Analyse mikrobieller Gemeinschaften eingesetzte 16S und 23S rRNA-Oligonukleotidsonden	56
5.8	Nachweis der 16S und 23S rRNA ausgewählter Bakteriengruppen in RNA-Extrakten aus dem Verdauungstrakt von Broilern	56
5.8.1	Bakterielle 16S rRNA	56
5.8.2	16S rRNA von Vertretern der <i>E. coli</i> und <i>Shigella spp.</i>	58
5.8.3	23S rRNA von Vertretern der <i>Enterococcus spp.</i>	60
5.8.4	16S rRNA von Vertretern der <i>Lactobacillus spp.</i>	62
5.8.5	Nicht nachgewiesene Bakteriengruppen	64
5.9	Nachweis der 16S rRNA ausgewählter Bakterienarten	64
5.9.1	16S rRNA von <i>E.faecium</i> und <i>E.faecalis</i>	64
5.9.2	16S rRNA von <i>L.reuteri</i>	66
5.9.3	16S rRNA von <i>L.gasseri</i>	68
5.9.4	16S rRNA von <i>L.fermentum</i>	70
5.9.5	Nicht nachgewiesene Bakterienarten	72
6.	Diskussion	73
6.1	Einfluss unterschiedlicher Diäten und der Xylanase auf die Leistungsparameter der Versuchstiere	73
6.2	Einfluss unterschiedlicher Diäten und der Xylanase auf ausgewählte Enzymaktivitäten in Digestaüberständen	74
6.2.1	Aktivitäten NSP-hydrolysierender Enzyme in Digestaüberständen	74
6.2.2	Aktivitäten von Lipasen in Digestaüberständen	77
6.2.3	Aktivitäten von Gallensäurehydrolasen in Digestaüberständen	78
6.3	Extraktion von Nukleinsäuren aus Digestaprobe von Broilern	79
6.4	Einfluss unterschiedlicher Diäten und der Xylanase auf die Ausbeute an Nukleinsäuren aus Digestaprobe von Broilern	79

6.5	Oligonukleotidsonden zum Nachweis von Mikroorganismen im Probenmaterial	80
6.6	Einfluss unterschiedlicher Diäten und der Xylanase auf mikrobielle Gemeinschaften im Verdauungstrakt von Broilern	83
6.6.1	Nachweis bakterieller Stoffwechselaktivitäten	83
6.8.2	Nachweis von <i>E.coli</i> und <i>Shigella spp.</i>	84
6.8.3	Nachweis von <i>Enterococcus spp.</i>	85
6.8.4	Nachweis von <i>Lactobacillus spp.</i>	87
7.	Schlussfolgerungen	90
8.	Zusammenfassung	91
9.	Summary	94
10.	Literaturverzeichnis	97
11.	Anhang	115

Abkürzungsverzeichnis

ADF	Acid detergent fibre
AME	Apparent metabolizable energy
AME _N	Apparent metabolizable energy, N-corrected
APEC	Geflügelpathogene <i>E.coli</i>
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
CCD-Kamera	Charge Coupled Densitometric-Kamera
CMC	Carboxymethylcellulose
DGGE	Denaturing gradient gel electrophoresis
DIG	Digoxygenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
E.C.	Enzyme classification
FISH	Fluorescent In Situ Hybridization
FMG	Futtermittelgesetz
Ht _{th}	Theoretische Hybridisierungstemperatur
IgA	Immunglobulin A
KbE	Koloniebildende Einheit(en)
LMBG	Gesetz über den Verkehr mit Lebensmitteln, Tabakerzeugnissen, kosmetischen Mitteln und sonstigen Bedarfsgegenständen
ME	Metabolizable energy
MHC	Major histocompatibility complex
n	Stichprobenumfang
NDF	Neutral detergent fibre
NSP	Nicht-Stärke-Polysaccharide
OD	Optische Dichte
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Rfa	Rohfaser
Rft	Rohfett
RNA	Ribonukleinsäure
RP	Rohprotein
sp.	Spezies (Singular)
spp.	Spezies (Plural)
T _M	Schmelztemperatur
TS	Trockensubstanz
U/min	Umdrehungen pro Minute

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn **Professor Dr. O. Simon** für die Überlassung des interessanten Themas, die Arbeitsmöglichkeiten am Institut für Tierernährung des Fachbereiches Veterinärmedizin der FU Berlin und die intensive wissenschaftliche Betreuung.

Weiterhin möchte ich Herrn **Dr. W. Vahjen** für seine Unterstützung und Beratung bei der Durchführung der Arbeiten danken.

Herrn **Dr. K. Männer** möchte ich für die gewissenhafte Betreuung der Versuchstiere danken.

Frau **S. Weinholz** und Frau **A. Lenke** danke ich für die Unterstützung bei der Durchführung der Untersuchungen.

Ferner danke ich den **Mitarbeitern** und **Doktoranden** des Institutes, ohne die eine zügige Durchführung der Schlachtungen und eine schnelle Weiterbearbeitung des Probenmaterials nicht möglich gewesen wäre.

Für die finanzielle Unterstützung im Rahmen eines Stipendiums über zwei Jahre danke ich der Firma **Lohmann Animal Health, Cuxhaven**.

Mein besonderer Dank gilt meiner Frau **Birte**, die durch die Korrektur von Rechtschreib- und Formatierungsfehlern wesentlich zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen hat. Vor allem aber danke ich ihr für ihr Verständnis und ihre Geduld, die sie während meiner Arbeit für mich aufgebracht hat.

Lebenslauf

Name	Gunnar Loh
Geburtsdatum	05.02.1972
Geburtsort	Bonn-Bad Godesberg
Schulbildung	
1978 – 1982	Grundschule in Stommeln
1982 – 1991	Geschwister-Scholl-Gymnasium in Pulheim
17.06.1991	Allgemeine Hochschulreife
Studium	
1993 – 1994	veterinärmedizinische Fakultät der Szent István Universität, Budapest
1994 – 1999	Fachbereich Veterinärmedizin der FU Berlin
02.07.1999	Dritter Abschnitt der Tierärztlichen Prüfung
16.07.1999	Approbation als Tierarzt
Promotion	
November 1999 bis März 2002	am Institut für Tierernährung des Fachbereiches Veterinärme- dizin der FU Berlin
November 1999 bis Oktober 2001	Stipendium der Fa. Lohmann Animal Health, Cuxhaven
Berufstätigkeit	
November 2001 bis Februar 2002	wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Tierernährung der FU Berlin
seit April 2002	wissenschaftlicher Mitarbeiter am Forschungsinstitut für die Biologie landwirtschaftlicher Nutztiere, Dummerstorf

Wissenschaftliche Veröffentlichung

LOH, G., BECKMANN, L., VAHJEN, W., SIMON, O. (2001).

Effect of non starch polysaccharides from wheat and rye on the development of selected enzyme activities and total bacterial growth in the small intestine of broiler chicken

Proc.Soc.Nutr.Physiol. **10**: 51

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Zuhilfenahme der angegebenen Literatur erstellt zu haben.

Gunnar Loh