

4. Material und Methoden

4.1 Versuchsplanung

Um den Einfluss einer auf Weizen und Roggen basierenden Diät und einer xylanasesupplementierten Weizen-Roggen-Diät im Vergleich zu einer auf Mais und Soja basierenden Diät auf die mikrobiellen Gemeinschaften im Verdauungstrakt von wachsenden Broilern zu untersuchen, wurde am Institut für Tierernährung der FU Berlin ein Tierversuch mit insgesamt 201 Broilern durchgeführt. Die Versuchsdauer wurde auf 35 Tage angesetzt, wobei am 7., 14., 21. und 28. Lebenstag der Tiere Proben genommen wurden. Die zootechnischen Leistungen der im Versuch verbliebenen Tiere wurden bis zum 35. Lebenstag registriert. Als zu untersuchende Parameter wurden die zootechnischen Leistungen der Versuchstiere, ausgewählte Enzymaktivitäten in Digestaüberständen und die Menge ribosomaler RNA von Mikroorganismen in RNA-Extrakten bestimmt. Die zootechnischen Leistungen der Versuchstiere wurden ermittelt, um mögliche Zusammenhänge zwischen den mikrobiellen Populationen und diesen Parametern aufzuzeigen. Auch der Anteil der Tiere mit veränderter Kotkonsistenz („sticky droppings“) und die nicht durch versuchsbedingte Tötungen bedingten Abgänge wurden im Rahmen dieser Datenerhebung festgehalten. Es wurden Enzymaktivitäten rein mikrobiellen Ursprungs (Xylanasen, β -Glucanasen und Gallensäurehydrolasen), sowie Lipaseaktivitäten, welche sowohl von Mikroorganismen, als auch vom Wirtstier stammen können, in Digestaüberständen der 3 Versuchsgruppen vergleichend gemessen. Eine Unterscheidung von mikrobiellen Xylanaseaktivitäten und der Aktivität des zugegebenen Enzyms erfolgte dabei nicht. Zum Nachweis ribosomaler RNA ausgewählter Mikroorganismen in RNA-Extrakten aus Dünndarmdigesta wurden zu Beginn der molekularbiologischen Untersuchungen verschiedene Digoxigenin (DIG)-markierte 16S und 23S rRNA-Oligonukleotidsonden optimiert und validiert. Durch Hybridisierung der aus den Digesta der Versuchstiere extrahierten Gesamt-RNA mit spezifischen Oligonukleotidsonden wurden die Auswirkungen unterschiedlicher Diäten auf mikrobielle Gemeinschaften des Darmlumens ermittelt.

Um die durch die jeweiligen Hybridisierungen erzielten Signalstärken in einen Parameter zu überführen, welcher eine vergleichende Einschätzung der in den einzelnen Untersuchungen ermittelten Ergebnissen ermöglicht, wurde eine Umrechnung der in den jeweiligen Hybridisierungen erzielten Lichtintensitäten in ng rRNA je μ g Gesamt-RNA vorgenommen.

4.2 Tiermaterial und Tierversuchsbedingungen

Männlich sortierte Broilerküken der Linie Lohmann Meat B aus einem kommerziellen Aufzuchtbetrieb wurden einen Tag nach dem Schlupf willkürlich in 3 Gruppen unterteilt.

Es wurden gleichmäßig große Gruppen von jeweils 70 Tieren angestrebt. Durch randomisierte Zuordnung der Transportboxen zu den Versuchsgruppen ergab sich aufgrund von Transportverlusten eine tatsächliche Tierzahl von n = 68 Tiere (Gruppe A), n = 69 Tiere (Gruppe B) und n = 64 (Gruppe C).

Die Haltung der Tiergruppen erfolgte in Bodenhaltung auf Weizenstrohhacksel in klimatisierten Stallungen bei 24stündiger Beleuchtung. Futter und Wasser standen allen Tieren *ad libitum* zur Verfügung. Tabelle 8 verdeutlicht die Einteilung der Versuchsgruppen.

Tabelle 8: Einteilung der Versuchsgruppen

	Tierzahl (n)	Mais-Soja-Diät	Weizen-Roggen-Diät	Enzymzusatz
Gruppe A	68	X		
Gruppe B	69		X	
Gruppe C	64		X	X

Gruppe A erhielt während der gesamten Versuchsperiode eine auf Mais und Soja basierende Diät, während die Gruppen B und C im gleichen Zeitraum Weizen-Roggen-Diäten erhielten. Die Weizen-Roggen-Diät der Gruppe C war zusätzlich mit einer Xylanase supplementiert.

4.3 Versuchsdiäten

Über den gesamten Versuchszeitraum wurde für jede Gruppe ein Mischfutter eingesetzt (Universalfütterung). Die Herstellung und Vermahlung der Versuchsdiäten erfolgte in der institutseigenen Anlage. Die Diät der Gruppe A basierte auf Mais (57 %) und Sojaextraktionsschrot (30 %), so dass eine geringe Extrakt- und folglich Digestaviskosität vorausgesetzt werden konnte. Demgegenüber wurde bei den Diäten der Gruppen B und C eine hohe Extrakt- und Digestaviskosität angestrebt. Zu diesem Zweck wurden hier Weizen (50 %) und Roggen (25 %) als Hauptkomponenten eingesetzt. Die Diät der Gruppe C war mit der Diät der Gruppe B identisch, wurde aber mit 0,4 g/kg eines Xylanasepräparates (ZY68, LAH Cuxhaven) supplementiert (Tabelle 9).

Tabelle 9: Zusammensetzung der Versuchsdiäten

Gruppe A		Gruppen B und C ¹	
Inhaltsstoffe	g/kg	Inhaltsstoffe	g/kg
Maisschrot	577,74	Weizenschrot	479,00
Sojaextraktionsschrot	302,00	Roggenschrot	253,01
Fischmehl	40,00	Sojamin 90	167,78
Rindertalg	43,74	Rindertalg	47,00
Calciumcarbonat	12,32	Calciumcarbonat	17,94
Prämix ²	12,00	Prämix ²	12,00
Monocalciumphosphat	9,92	Monocalciumphosphat	19,94
Methionin	1,27	Methionin	2,06
Cystein	0,45	Cystein	0,16
Lysin	0,33	Lysin	1,11
Threonin	0,23		
Gesamtration	1000	Gesamtration	1000

¹supplementiert mit 4 mg/kg ZY68 (Lohmann Animal Health, Cuxhaven)

²Inhaltsstoffe je kg Vormischung: 1.200.000 IE Vit. A, 120.000 IE Vit. D₃, 4 g Vit. E, 0,2 g Vit. B₁, 0,6 g Vit. B₂, 2,5 g Nicotinsäure, 0,4 g Vit. B₆, 4,0 g Vit. B₁₂, 2,0 g Biotin, 1,8 g Pantothensäure, 5,0 g Cholinchlorid; 1,0 g Zn; 7,5 g Fe; 7,5 g Mn; 2,0 g Cu; 150 mg J; 70 mg Co; 40 mg Se; 160 g Na; 50 g Mg

Aus den eingesetzten Inhaltsstoffen ergibt sich, dass die Versuchsdiäten auf Basis der scheinbaren Verdaulichkeit nahezu isoenergetisch und isonitrogen gestaltet waren. Tabelle 10 gibt die berechneten Gehalte an Rohnährstoffen der Diäten wieder.

Tabelle 10: Rohnährstoffgehalte der Versuchsdiäten

	ME _N	Rp	Rfa	Rft	Ca	P	Na	Lys	Met	Cys	Thr	Try
Gruppe A	12,79	217,1	30,94	73,13	10,00	7,00	2,41	12,00	5,00	3,92	7,86	2,43
Gruppe B/C	12,77	217,0	18,48	60,37	10,00	7,00	2,02	12,00	5,00	3,92	7,86	2,47

Angaben in g bzw. MJ bezogen auf ursprüngliche Substanz

4.4 Zootechnische Leistungen

Zur Ermittlung der zootechnischen Leistungen wurden 5 willkürlich bestimmte Versuchstiere jeder Gruppe bei Einstallung und im weiteren Versuchsverlauf unmittelbar vor der Entnahme von Tieren zur Tötung und Probenahme, sowie am Versuchsende gewogen. Außerdem wurde der Futterverzehr durch Rückwaage der den Tieren angebotenen Futtermengen bestimmt. Daneben wurden sowohl Tiere mit kotverschmiertem bzw. -verklebtem Gefieder um die Kloake (veränderte Kotkonsistenz, „sticky droppings“) und die nicht durch Tötung bedingten Abgänge erfasst.

Insgesamt wurden die folgenden Parameter absolut und relativ ermittelt: Tierzahl, Lebendmasse, Lebendmassezunahme, Futterverzehr, Futteraufwand (kg Futter/kg Lebendmassezunahme), Tiere mit veränderter Kotkonsistenz („sticky droppings“) und Abgänge.

4.5 Probengewinnung

Nach einer einwöchigen Adaptationsphase der Versuchstiere wurde mit der Gewinnung von Digesta zur Bestimmung der Stoffwechselaktivitäten ausgewählter Bakteriengruppen und -arten mittels molekularbiologischer Analytik und zur Bestimmung ausgewählter Enzymaktivitäten in Digestaüberständen begonnen. Dabei handelte es sich um Finalproben. Am 7. und 14. Lebenstag wurden jeweils 15 und am 21. und 28. Lebenstag jeweils 9 Tiere jeder Gruppe willkürlich ausgewählt und nach Betäubung durch Dekapitation getötet. Unmittelbar nach der Tötung wurde die Bauchhöhle vorsichtig eröffnet und der Verdauungstrakt am Übergang des Ösophagus zum Proventriculus und am distalen Kolon mittels steriler Arterienklemmen verschlossen. Danach wurde das gesamte Darmkonvolut entnommen und auf steriler Aluminiumfolie auf Eis ebenfalls mittels steriler Arterienklemmen in Duodenum (Ausgang Muskelmagen bis zur Mündung der Gallen- und Pankreasgänge), Jejunum (bis zum Meckelschen Divertikel), Ileum I (doppelte Caecumlänge), Ileum II (bis zur Mündung der Caeca) und Caeca (beide Blindsäcke) unterteilt. Die Digesta der jeweiligen Darmabschnitte wurden in sterile Probengefäße mit einem Fassungsvermögen von 15 ml (Greiner, Frickenhausen) verbracht und bis zu der an die Probenahme unmittelbar anschließenden Zentrifugation auf Eis gelagert.

Am 1. und 2. Probenahmetag wurden die Einzelproben jedes Darmabschnittes von jeweils 5 Tieren einer Gruppe, am 3. und 4. Probenahmetag die Einzelproben jedes Darmabschnittes von jeweils 3 Tieren einer Gruppe vereinigt, die Proben folglich dreifach parallel angelegt.

Zur späteren Durchführung von Agardiffusionsassays wurden durch 10minütige Zentrifugation bei 4000 U/min, 4 °C, (Sorvall RC5B PLUS, Du Pont, Bad Homburg) Digestaüberstände gewonnen. Die Lagerung der Digestaprobe und der Digestaüberstände erfolgte bis zur weiteren Bearbeitung bei -30 °C.

4.6 Agardiffusionsassays

Zur Bestimmung der Aktivitäten ausgewählter Enzyme in Digestaüberständen von Broilern wurden Agardiffusionsassays mit verschiedenen Substraten durchgeführt. Die angewandten Assays wurden am Institut für Tierernährung für diesen Zweck optimiert (HÜBENER, 2001).

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen sollten die Aktivitäten bakterieller Enzyme zum Abbau von NSP (Xylanase- und β -Glucanaseaktivitäten), bakterieller Gallensäurehydrolasen, sowie von Lipasen erfasst werden.

4.6.1 Substratagars

Als Basis für die Agardiffusionsassays wurde Gelrite (Roth, Karlsruhe) eingesetzt, da es sich durch seine völlige Farblosigkeit für diesen Zweck besonders eignet. Die Zusammensetzungen der jeweiligen Substratagars finden sich in Anhang 1.1.2 bis 1.1.5. Nach Lösen des jeweiligen Substrates in 150 ml BIS/TRIS, pH 6,8 (Anhang 1.1.1), wurde die Lösung bis zum Sieden (Mikrowelle, 600 Watt) erhitzt. Anschließend wurden 4,5 g Gelrite (Roth, Karlsruhe), $MgCl_2$ bzw. $CaCl_2$ und BIS/TRIS, pH 6,8 ad 450 ml zugegeben und solange weiter erhitzt, bis eine klare Lösung entstand. Der auf ca. 60 °C abgekühlte Substratagar wurde daraufhin gleichmäßig in 3 dreifach unterteilte Polyacrylschalen (20 x 30 cm) gegossen. Nach vollständigem Erkalten des Agars wurden mittels einer Vakuumstanze (\varnothing 6 mm) 9 Löcher in jedes Drittel einer Polyacrylschale gestanzt.

4.6.2 Probenmaterial und Inkubation

Zur Messung der Aktivitäten von Xylanasen und β -Glucanasen wurden Überstände (50 μ l) aus den Darmabschnitten Jejunum, Ileum I und Ileum II eingesetzt, zur Messung der Aktivitäten der Lipasen und der Gallensäurehydrolasen Überstände (50 μ l) aus den Darmabschnitten Duodenum, Jejunum und Ileum I. Die Polyacrylschalen wurden, durch Abdeckung vor Austrocknung geschützt, bei 40 °C für 36 Stunden (Xylanasen, β -Glucanasen), bzw. für 48 Stunden (Lipasen, Gallensäurehydrolasen) inkubiert.

4.6.3 Nachweis ausgewählter Enzymaktivitäten und Auswertung der Ergebnisse

Nach Inkubation der Substratagars zum Nachweis der Aktivitäten NSP-hydrolysierender Enzyme wurden die im Substratagar enthaltenen hochmolekularen Substanzen mit 0,2%iger Kongorot-Lösung für 25 Minuten gefärbt und anschließend durch 10minütiges Waschen mit 1 M NaCl-Lösung wieder entfärbt. In den Bereichen, in denen ein enzymatischer Abbau der hochmolekularen

Substrate stattgefunden hatte, zeichneten sich kreisrunde und sich gegen den weiterhin dunkelrot gefärbten Hintergrund absetzende, helle Lysezonen ab. Im Lipaseagar entstanden durch Verseifung der Fette mit CaCl_2 weiße Lysezonen. Im Galleagar traten durch enzymatischen Abbau der Hühnergalle helle Lysezonen auf, welche sich gegen den grünlichen Hintergrund absetzten. Jedes Drittel einer Polyacrylschale wurde einzeln bei gleichem Kameraabstand (CCD-Kamera, Raytest, Straubenhardt) und gleicher Kameraeinstellung abfotografiert und die Aufnahmen digital gespeichert. Die Auswertung der Lysezonen erfolgte mittels der Software PCBAS 2.09 (Raytest, Straubenhardt). Dabei wurde die Fläche der Lysezonen in mm^2 als relatives Maß für die jeweilige Enzymaktivität gewertet.

4.7 Referenzkulturen

Zur Überprüfung der Spezifität und Sensitivität von zum Einsatz vorgesehenen Oligonukleotidsonden ist die Verfügbarkeit definierter RNA derjenigen Mikroorganismen zwingend erforderlich, deren Stoffwechselaktivität mittels der angewandten Sondentechnik nachgewiesen werden soll.

Zur Gewinnung von RNA standen die in Tabelle 11 aufgeführten Mikroorganismen zur Verfügung.

Tabelle 11: In dieser Arbeit verwendete Mikroorganismen

1.) <i>Enterococcus spp.</i>					
Stamm	Herkunft	Stamm	Herkunft	Stamm	Herkunft
<i>E.asini</i>	DSM 11492	<i>E.dispar</i>	DSM 6630	<i>E.gallinarum</i>	DSM 20628
<i>E.avium</i>	DSM 20678	<i>E.durans</i>	DSM 20633	<i>E.malodoratus</i>	DSM 20681
<i>E.casseliflavus</i>	DSM 20680	<i>E.hirae</i>	DSM 20160	<i>E.mundtii</i>	DSM 4838
<i>E.caecorum</i>	DSM 20682	<i>E.faecalis</i>	DSM 20478	<i>E.saccharolyticus</i>	DSM 20726
<i>E.columbae</i>	DSM 7374	<i>E.faecium</i>	DSM 2918	<i>E.sulfureus</i>	DSM 6905
2.) <i>Lactobacillus spp.</i>					
Stamm	Herkunft	Stamm	Herkunft	Stamm	Herkunft
<i>L.acetolerans</i>	DSM 20749	<i>L.casei</i>	DSM 20011	<i>L.paracasei</i>	DSM 20020
<i>L.acidophilus</i>	DSM 20079	<i>L.crispatus</i>	DSM 20584	<i>L.plantarum</i>	DSM 20174
<i>L.amylophilus</i>	DSM 20533	<i>L.fermentum</i>	DSM 20052	<i>L.reuteri</i>	DSM 20016
<i>L.amylovorus</i>	DSM 20531	<i>L.gallinarum</i>	LMG 9435	<i>L.rhamnosus</i>	DSM 20021
<i>L.animalis</i>	DSM 20602	<i>L.gasseri</i>	DSM 20604	<i>L.zae</i>	DSM 20178
<i>L.aviarius</i>	DSM 20655	<i>L.johnsonii</i>	DSM 20533		
<i>L.brevis</i>	DSM 20054	<i>L.murinus</i>	DSM 20452		
3.) <i>Bifidobacterium spp.</i>					
Stamm	Herkunft	Stamm	Herkunft	Stamm	Herkunft
<i>B.adolescentis</i>	DSM 20083	<i>B.longum</i>	DSM 20219	<i>B.thermophilum</i>	DSM 20210
<i>B.bifidum</i>	DSM 20456	<i>B.suis</i>	DSM 20211		
4.) <i>E.coli</i>					
Stamm	Herkunft	Stamm	Herkunft	Stamm	Herkunft
<i>EcoA1a</i>	Isolat (Legehennen)	<i>EcoA2</i>	Isolat (Broiler)	<i>EcoA4</i>	Isolat (Broiler)
<i>EcoA1b</i>	Isolat (Broiler)	<i>EcoA3</i>	Isolat (Broiler)	<i>EcoA5</i>	Isolat (Broiler)
5.) <i>Clostridium spp.</i>		6.) <i>Bacteroides spp.</i>			
Stamm	Herkunft	Stamm	Herkunft		
<i>C.b</i>	Isolat (Broiler)	<i>BacL</i>	Isolat (Broiler)		

Diese Bakterienstämme waren zum großen Teil von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig) bezogen worden. Daneben standen Bakterienisolate zur Verfügung, die in vorangegangenen Untersuchungen am Institut für Tierernährung der FU Berlin aus dem Verdauungstrakt von Broilern oder Legehennen isoliert worden waren. Aus diesen Bakterienstämmen wurde die Gesamt-RNA gewonnen und in den nachfolgenden methodischen Untersuchungen als Positiv- bzw. Negativkontrolle eingesetzt.

4.8 RNA-Extraktion aus Referenzkulturen

Von den Referenzkulturen wurde zunächst Zellmasse produziert. Zu diesem Zweck wurde von den bei -30 °C gelagerten Ausgangskulturen ein Impfösenabstrich in 50 ml Probenröhrchen (Greiner, Frickenhausen) mit 45 ml eines entsprechenden Kultivierungsmediums (Zusammensetzung siehe Anhang 1.2) verbracht und bei 37 °C im Schüttelinkubator (New Brunswick, Nürtingen) bei 90 Bewegungen/Minute für 12 Stunden inkubiert. Abweichend davon wurden *L.plantarum* und *L.amylophilus* bei 30 °C inkubiert. Dabei wurden die Vertreter der *Enterococcus spp.* und der *E.coli* aerob und die Vertreter der *Lactobacillus spp.* unter sauerstoffreduzierten Bedingungen durch Verwendung von Anaerocult C (Merck, Darmstadt) angezchtet. Für *L.crispatus*, *L.aviarius*, die *Clostridium*- und *Bacteroides*-Isolate und die Vertreter der *Bifidobacterium spp.* wurden durch Verwendung von Anaerocult A (Merck, Darmstadt) anaerobe Bedingungen geschaffen. Nach mikroskopischer Kontrolle auf Reinkultur wurde die Zellmasse bei 4 °C für 10 Minuten bei 4.000 U/min abzentrifugiert (Sorvall RC5B PLUS, Du Pont, Bad Homburg) und der Überstand an Medium dekantiert. Die Isolierung der RNA aus den Referenzstämmen erfolgte mittels RNeasy-Kit (Qiagen, Hilden) gemäß den Angaben des Herstellers. Der RNA-Gehalt wurde mittels photometrischer Messung (Ultraspec 2000, Pharmacia, Uppsala/Schweden) bei 260 nm quantifiziert.

4.9 Nukleinsäureextraktion aus den Digestproben

Zur Gewinnung der Nukleinsäuren aus den Digestproben wurde eine dreiphasige Zell-Lyse mit anschließender Phenolextraktion und Alkoholfällung der Nukleinsäuren entwickelt. Die Zusammensetzung der eingesetzten Puffer und Lösungen findet sich in Anhang 1.3.

Die bei der Extraktion verwendeten Gefäße und Lösungen wurden mittels 0,1%igem DMPC-H₂O (Anhang 1.3.1) über Nacht behandelt bzw. angesetzt und anschließend autoklaviert, um einen Abbau von RNA durch RNasen zu verhindern.

4.9.1 Zellaufschluss

Zur Zell-Lyse wurden zunächst jeweils 0,5 g der aufgetauten Proben (gesamter Probenumfang) in 50 ml Zentrifugenröhrchen (Nalgene, Rochester/USA) eingewogen. In einer weiteren Untersuchung zur Nukleinsäureextraktion wurde die Einwaage der Digestproben auf 1 g erhöht, da die RNA-Ausbeute aus 0,5 g Probenmaterial als zu gering erschien. Es wurden hier Proben aus Jejunum, Ileum I und Ileum II vom 14., 21. und 28. Lebenstag der Tiere verwendet.

Die Digestaproben wurden zur Andauung der Zellwand mit 3 ml Lysepuffer (Anhang 1.3.2) versetzt und bis zur völligen Homogenität gemischt. Zur Senkung der Oberflächenspannung war dem Lysepuffer Antifoam A (Sigma, Aldenhofen) zugesetzt. Alle Mischvorgänge erfolgten mittels Minishaker (IKA-Labortechnik, Staufen). Nach 45minütiger Inkubation in Lysepuffer bei 37 °C im Schüttelwasserbad (Julabo, Seelbach) wurden jeder Probe zur mechanischen Zerstörung der Bakterienzellen 2 g glass-beads mit einer Größe von 106 µm und feiner (Sigma, Deisenhofen) zugesetzt. Durch Zugabe von 12 ml 4 M GITC (Guanidinthiocyanat)-Lösung (Anhang 1.3.3), welche bei der zweiten Extraktion zuvor auf 60 °C erhitzt wurde, sollte zudem eine chemische Zellwandlyse erreicht werden. Um eine möglichst hohe Scherung der Bakterienzellen mit den glass-beads und eine gute Durchmischung mit der GITC-Lösung zu erreichen, wurden die einzelnen Proben sofort nach Zugabe der GITC-Lösung für 30 Sekunden gemischt. Daran schloss sich ein erneutes Mischen in einem Durchlauf für 30 Sekunden und ein 10maliges Pulsmischen an.

Bei der zweiten Extraktion mit 1 g Einwaage erfolgte zur optimalen chemischen Lyse eine 15minütige Inkubation der Proben bei 60 °C. Daraufhin wurden die oben beschriebenen Mischungsvorgänge wiederholt.

4.9.2 Phenolextraktion

Zur Trennung der lipophilen von der nukleinsäurehaltigen hydrophilen Phase wurden 16 ml Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol im Verhältnis 25:24:1 (v:v:v), gesättigt mit Tris/Cl, pH 7,5-8,01 (Rotiphenol, Roth, Karlsruhe) zugegeben und die Proben nach 10maligem Pulsmischen für 10 Minuten bei 10.000 U/min, 4 °C, zentrifugiert (Sorvall RC5B PLUS, Du Pont, Bad Homburg). Die wässrige Phase (15 ml) wurde in neue 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt, mit 15 ml Chloroform:Isoamylalkohol im Verhältnis 24:1 (v:v) versetzt und nach erneut 10maligem Pulsmischen bei 10.000 U/min und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert.

4.9.3 Fällung und Reinigung der Nukleinsäuren

Die wässrige Phase (12 ml) wurde in neue 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und mit 30 ml eiskaltem Isopropanol (96 %) versetzt. Nach Fällung der Nukleinsäuren über Nacht bei -30 °C erfolgte eine Zentrifugation bei 20.000 U/min, 4 °C, für 30 Minuten. Zu den hierdurch entstandenen Zentrifugaten wurden nach Dekantieren des Isopropanols 40 ml eiskalter Ethanol (70 %) gegeben. Nach erneuter 30minütiger Zentrifugation bei 20.000 U/min, 4 °C und Dekantieren des Ethanols wurden die Zentrifugate im Trockenschrank (Memmert, Schwalbach) bei 40 °C für 10 Minuten getrocknet. Es wurde versucht, die Zentrifugate der ersten Extraktion in 500 µl Aqua bidest., 1,5 ml TE-Puffer, pH 8,0 (Anhang 1.3.5) bzw. 500 µl Formamid zu lösen. Die Zentrifugate der zweiten Extraktion wurden unmittelbar nach dem Trocknungsvorgang einer säulenchromatographischen Aufreinigung zugeführt.

4.9.4 Säulenchromatographische Aufreinigung der Nukleinsäuren

Die säulenchromatographische Aufreinigung der Nukleinsäureextrakte erfolgte nach dem Prinzip des Anionenaustausches. Es wurden RNA/DNAeasy MidiKits (Qiagen, Hilden) verwendet. Abweichend von den Arbeitsvorschriften des Herstellers wurden jedoch keine Zellsuspensionen, sondern die im vorangegangenen Arbeitsschritt gewonnenen Zentrifugate eingesetzt.

4.9.5 Bestimmung des Nukleinsäuregehaltes

Die Bestimmung des Nukleinsäuregehaltes der Extrakte erfolgte mittels spektralphotometrischer Messung (Ultrospec 2000, Pharmacia, Uppsala/Schweden) bei 260 nm. Im Falle der RNA entspricht eine Absorption von 1 einer Konzentration von 40 µg RNA je ml. Durch Multiplikation des abgelesenen Wertes mit 40 lässt sich folglich der Gehalt der Lösung an RNA in µg/ml errechnen. Bei gleichzeitiger Messung der Absorption bei 280 nm, bei der Proteine absorbieren, wird durch das Verhältnis 260 nm/280 nm die Reinheit der Extrakte bestimmt. Optimale Werte liegen bei 1,8-2,0 und verringern sich bei zunehmender Verunreinigung der Nukleinsäureextrakte mit Proteinen.

4.9.6 Verdünnung und Lagerung der Nukleinsäuren

Die Nukleinsäure-Extrakte (Stammlösungen) wurden in 2 ml Reaktionsgefäßen (Eppendorf, Hamburg) bei -30 °C gelagert. Für die molekularbiologischen Untersuchungen wurden Verdünnungen mit einer Konzentration von 5 µg RNA/ml in sterilem Aqua bidest. hergestellt und bis zum Gebrauch bei -30 °C in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen gelagert. Die Gebrauchslösungen wurden vor ihrer Verwendung bei 4 °C aufgetaut.

4.10 Hybridisierung und Detektion

Beim Umgang mit den RNA-Extrakten wurde stets eine möglichst RNase-freie Umgebung geschaffen. Dazu wurden sämtliche Utensilien mit 0,1 % DMPC-H₂O (Anhang 1.3.1) behandelt und anschließend autoklaviert. Zur Herstellung von Puffern und Lösungen wurde autoklaviertes 0,1%iges DMPC-H₂O verwendet. Materialien, welche durch Autoklavieren beschädigt oder zerstört werden könnten, wurden mit RNase-away (Roth, Karlsruhe) behandelt. Mengen- und Konzentrationsangaben im Rahmen der Hybridisierung beziehen sich jeweils auf eine Membrangröße von 100 cm².

4.10.1 Hybridisierung

Die RNA-Extrakte wurden aufgetaut, auf Eis gelagert und in Verdünnung mittels Blotting-Apparatur (Biometra, Göttingen) in einem Volumen von 100 µl auf positiv geladener Nylonmembran (Roche, Mannheim) fixiert. Die Membran wurde zuvor mit 2 x SSC, welches aus einer 20-fachen Stammlösung (Anhang 1.4.1) hergestellt wurde, gut befeuchtet. Nach 30minütigem Backen bei 120 °C im Trockenschrank (Memmert, Schwalbach) wurde die Membran in 150 ml Hybridisie-

rungsflaschen (Biometra, Göttingen) verbracht und für 45 Minuten mit 20 ml Hybridisierungspuffer (Anhang 1.4.3) im Hybridisierungssofen (Biometra, Göttingen) bei der für die jeweilige Oligonukleotidsonde spezifischen Hybridisierungstemperatur prähybridisiert. Im Anschluss an die Prähybridisierung wurde der Hybridisierungspuffer durch Sondenlösung ersetzt. Diese bestand aus 20 ml des Hybridisierungspuffers und 20-500 pM der jeweiligen Sonde. Nach 6-16stündiger Hybridisierung wurden unspezifisch gebundene Sondenmoleküle mittels 2 Waschschritten von 10 Minuten mit 2 x SSC, 0,1 % SDS (Anhang 1.4.2) bei Raumtemperatur und einem Waschschriff von 10 Minuten mit 2 x SSC, 0,1 % SDS bei der jeweiligen Hybridisierungstemperatur von der Membran entfernt. Daran schloss sich eine 2minütige Waschung in 30 ml Waschpuffer (Anhang 1.4.5) an.

4.10.2 Detektion

Zur Detektion der an die Zielsequenz gebundenen Oligonukleotidsonden wurde eine 30minütige Vorinkubation in 20 ml Block-Puffer (Anhang 1.4.6) und anschließend eine 30minütiger Inkubation in 20 ml AntiDIG-AP Lösung (Anhang 1.4.7) bei Raumtemperatur durchgeführt.

Nach 2 Waschschriffen in 30 ml Waschpuffer (Anhang 1.4.5) für jeweils 15 Minuten wurde die Membran für 5 Minuten in 30 ml Detektionspuffer (Anhang 1.4.8) äquilibriert. Daraufhin wurde die Membran auf Frischhaltefolie (Dow Chemical Company, USA) verbracht, mit 2 ml Substratlösung (Anhang 1.4.9) versetzt und mit Frischhaltefolie blasenfrei bedeckt. Nach 5minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Substrat durch Abtropfen entfernt. Die Dokumentation der Chemilumineszenz erfolgte durch Aufnahme mittels CCD-Kamera (Raytest, Straubenhardt) im Dunkelzelt.

4.10.3 Standardbedingungen

Der im weiteren in Verbindung mit den Hybridisierungen verwendete Begriff Standardbedingungen beruht auf den folgenden einheitlich gehandhabten Parametern:

Prähybridisierung:	45 min bei Hybridisierungstemperatur
Waschschriff 1:	2 x 10 min mit 2 x SSC, 0,1 % SDS, Raumtemperatur
Waschschriff 2:	1 x 10 min mit 2 x SSC, 0,1 % SDS, Hybridisierungstemperatur
Detektion:	wie unter 4.10.2 beschrieben

4.10.4 Auswertung der Ergebnisse

Die digital gespeicherten Aufnahmen der Membranen nach Hybridisierung wurden mittels der Software PCBAS 2.09 (Raytest, Straubenhardt) ausgewertet. Dabei wurde um das stärkste Signal eine kreisförmige Region bestimmt und um diese Region ein ebenfalls kreisrunder Bereich mit einer Rahmenweite von 1 cm als lokaler Hintergrund definiert. Diese Region wurde um jedes Signal gezogen. Die Chemilumineszenzen wurden als OD (optische Dichte) pro mm² erfasst und der lokale Hintergrund von diesem Wert abgezogen. Für die Auswertung der Ergebnisse wurde der so errechnete Wert [(OD – BG)/mm²] verwendet.

4.11 Oligonukleotidsonden

Neben der Literatur entnommenen 16S/23S rRNA-Oligonukleotidsonden wurden in dieser Arbeit am Institut für Tierernährung der FU Berlin entwickelte Sonden eingesetzt (Tabellen 14 und 15). Die Entwicklung dieser Sonden erfolgte mittels den unter „<http://rdp.cme.msu.edu/html/analysis.html>“, „<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>“ und „http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi“ verfügbaren Datenbanken und Programmen. Die Synthese der Sonden und die Markierung mit DIG am 3'-Ende des Nukleotids erfolgte durch die Firma MWG Biotech, Ebersberg.

4.11.1 16S/23S rRNA-Oligonukleotidsonden zum Nachweis ausgewählter Bakteriengruppen

Zur molekularbiologischen Identifikation ausgewählter Bakteriengruppen waren 7 16S und 23S rRNA-Oligonukleotidsonden vorgesehen (Tabelle 12).

Weitere Angaben zu den Oligonukleotidsonden (Basensequenzen, Menge der Basen, Anteil an Adenin und Thymin sowie Guanin und Cytosin, prozentualer Anteil an Guanin und Cytosin, Schmelztemperatur und theoretische Hybridisierungstemperatur) sind in Anhang 1.5.1 und 1.6.1 wiedergegeben.

Tabelle 12: 16S/23S rRNA-Oligonukleotidsonden (Gruppensonden)

Sonde	zum Nachweis von	Ziel-RNA	Literaturstelle
S-G-Bac-0303-a-A-17 ¹	Bacteroides-Prevotella-Cluster	16S rRNA	MANZ <i>et al.</i> , 1996
S-*-Chis-0150-a-A-23	<i>C.histolyticum</i> -Gruppe	16S rRNA	FRANKS <i>et al.</i> , 1998
16E1	<i>E.coli/Shigella spp.</i>	16S rRNA	TSEN <i>et al.</i> , 1998
S-G-Enc-038-a-A-18 ¹	<i>Enterococcus spp.</i>	23S rRNA	FRAHM <i>et al.</i> , 1998
S-D-Bact-0338-a-A-18 ¹	bakterielle 16S rRNA	16S rRNA	AMANN <i>et al.</i> , 1990
S-F-Lact-0770-a-A-24 ¹	thermophile <i>Lactobacillus spp.</i>	16S rRNA	
S-G-Bif-1432-a-A-21 ¹	<i>Bifidobacterium spp.</i>	16S rRNA	KAUFMANN <i>et al.</i> , 1997

¹: In vorangegangenen Untersuchungen am Institut für Tierernährung der FU Berlin validiert und optimiert.

4.11.2 16S/23S rRNA-Oligonukleotidsonden zum Nachweis ausgewählter Bakterienarten

Zum Nachweis der Stoffwechselaktivitäten ausgewählter Bakterienarten wurden die in Tabelle 13 wiedergegebenen 16S rRNA-Oligonukleotidsonden auf ihre Spezifität und Sensitivität überprüft. Weitere Angaben zu diesen Oligonukleotidsonden finden sich in Anhang 1.5.1 und 1.6.1.

Tabelle 13: 16S/23S rRNA-Oligonukleotidsonden (Artensonden)

Sonde	zum Nachweis von	Ziel-RNA	Literaturstelle
S-S-Eas-0187-a-A-20	<i>E. asini</i>	16S rRNA	
S-S-Eaviraf-0473-a-A-20	<i>E. avium</i> / <i>E. raffinosus</i>	16S rRNA	
S-S-Ecae-0181-a-A-24	<i>E. caecorum</i>	16S rRNA	
S-S-Eclb-0026-a-A-26	<i>E. columbae</i>	16S rRNA	
S-S-Efaes-203-a-A-20	<i>E. faecalis</i>	16S rRNA	
S-S-Efaes-1237-b-A-17	<i>E. faecalis</i>	16S rRNA	
S-S-Efaes-0099-c-A-18	<i>E. faecalis</i>	16S rRNA	
S-S-Efaem-0141-a-A-20	<i>E. faecium</i>	23S rRNA	
S-S-Ehir-0278-a-A-20	<i>E. hirae</i>	16S rRNA	
S-S-Ecasflaga-0185-a-A-21	<i>E. casseliflavus</i> / <i>E. flavescens</i> / <i>E. gallinarum</i>	16S rRNA	
DB6	<i>E. faecium</i>	23S rRNA	FRAHM <i>et al.</i> , 1998
DB9	<i>E. avium</i> / <i>E. malodoratus</i> / <i>E. pseudoavium</i> / <i>E. raffinosus</i>	23S rRNA	FRAHM <i>et al.</i> , 1998
Ecaf19b	<i>E. casseliflavus</i> / <i>E. flavescens</i>	23S rRNA	FRAHM <i>et al.</i> , 1998
Eduhi9b	<i>E. durans</i> / <i>E. hirae</i>	23S rRNA	FRAHM <i>et al.</i> , 1998
Ega9b	<i>E. gallinarum</i>	23S rRNA	FRAHM <i>et al.</i> , 1998
S-S-Lacet-0061-a-A-25 ¹	<i>L. acetolerans</i>	16S rRNA	
S-S-Lacid-2519-a-A-20 ¹	<i>L. acidophilus</i>	16S rRNA	GOLDBERG, 2002
S-S-Lamy-0499-a-A-24 ¹	<i>L. amylophilus</i>	16S rRNA	
S-S-Lfer-061-a-A-26 ¹	<i>L. fermentum</i>	16S rRNA	
S-S-Lgas-0054-a-A-24 ¹	<i>L. gasseri</i>	16S rRNA	
S-S-Lreu-0485-a-A-23 ¹	<i>L. reuteri</i>	16S rRNA	

¹: In vorangegangenen Untersuchungen am Institut für Tierernährung der FU Berlin validiert und optimiert.

4.12 Validierung der 16S/23S rRNA-Oligonukleotidsonden zum Nachweis ausgewählter Bakteriengruppen

4.12.1 S-G-Enc-038-a-A-18 zum Nachweis von Vertretern der *Enterococcus spp.*

S-G-Enc-038-a-A-18 war in vorangegangenen Untersuchungen am Institut für Tierernährung der FU Berlin als spezifisch für Vertreter der *Enterococcus spp.* erachtet worden. Da bei diesen früheren Untersuchungen ein kommerziell erhältlicher Hybridisierungspuffer verwendet worden war, wurde eine Optimierung für den in der vorliegenden Untersuchung verwendeten Hybridisierungspuffer vorgenommen. Dazu wurden ein Gemisch der Gesamt-RNA aller in der Sammlung des Institutes vorliegenden *Enterococcus spp.* zu gleichen Teilen in einer Menge von 10 ng, 20 ng, 30 ng und 40 ng (Hybridisierung 1) bzw. 0,1 ng, 0,5 ng, 1 ng, 5 ng, 10 ng, 20 ng, 30 ng und 40 ng

(Hybridisierung 2) auf Membran fixiert. Als Negativkontrolle diente ein Gemisch der Gesamt-RNA aller in der Stammsammlung vorhandenen *Lactobacillus spp.* (siehe Tabelle 13) in Konzentrationen von 500 ng, 100 ng und 50 ng. Die Hybridisierungen wurden bei Temperaturen von 50 °C (Hybridisierung 1) und 52 °C (Hybridisierung 2) unter den als Standard festgelegten Bedingungen bei einer Sondenkonzentration von 50 pM/100 cm² Membranfläche für jeweils 16 Stunden durchgeführt.

4.12.2 16E1 zum Nachweis von Vertretern der *E.coli* und *Shigella spp.*

Da die Oligonukleotidsonde 16E1 in vorangegangenen Versuchen am Institut für Tierernährung der FU Berlin zum Nachweis der Stoffwechselaktivitäten von *E.coli* im Verdauungstrakt des Schweines verwendet wurde, erfolgte eine Überprüfung der Spezifität und Sensitivität von 16E1 für geflügel-spezifische Vertreter dieser Keimgruppe. Zu diesem Zweck wurden neben der kommerziell erhältlichen 16S rRNA von *E.coli* (Boehringer, Mannheim) in Verdünnungen von 0,5 ng, 1 ng, 5 ng und 10 ng auch die RNA-Extrakte der aus dem Verdauungstrakt von Broilern und Legehennen (siehe Tabelle 11) isolierten Vertretern dieser Keimgruppe in einer Konzentration von jeweils 100 ng und 50 ng eingesetzt. In einer weiteren Testhybridisierung wurde ein Gemisch der aus dem Verdauungstrakt von Broilern und Legehennen extrahierten RNA zu gleichen Anteilen in einer Konzentration von 1 ng, 5 ng, 10 ng, 20 ng, 30 ng, 40 ng, 50 ng und 100 ng auf positiv geladener Nylonmembran fixiert und mit 16E1 hybridisiert. Die Testhybridisierungen und Detektionen wurden mit einer Sondenkonzentration von 20 pM bei einer Temperatur von 55 °C für 6 Stunden unter Standardbedingungen durchgeführt.

4.12.3 S^{*}-Chis-0150-a-A-23 zum Nachweis von Vertretern der *Clostridium spp.*

Die Überprüfung der Spezifität und Sensitivität von S^{*}-Chis-0150-a-A-23 erfolgte bei einer Hybridisierungstemperatur von 50 °C mit einer Sondenkonzentration von 20 pM/100 cm² Membranfläche für 16 Stunden unter Standardbedingungen. Die Gesamt-RNA von folgenden Referenzstämmen wurde eingesetzt (Tabelle 14):

Tabelle 14: Zur Überprüfung von S^{*}-Chis-0150-a-A-23 eingesetzte RNA

Referenzstamm	Herkunft	eingesetzte RNA (ng)
Isolat C.b (<i>Clostridium sp.</i>)	Isolat Broiler	100, 70, 50, 30, 20, 10, 5, 1
<i>L.acidophilus</i>	DSM 20079	100
<i>B.adolescentis</i>	DSM 20083	100
<i>B.bifidum</i>	DSM 20456	100
<i>E.coli</i>	Isolat Broiler	100
<i>Bacteroides sp.</i>	Isolat Broiler	100
bakterielles RNA-Gemisch ¹	Tierversuch	100
<i>Enterococcus spp.</i> -Gemisch ²	DSM-Stämme	100

¹ RNA aus allen Proben zu gleichen Anteilen.

² RNA aller *Enterococcus spp.*-Referenzstämmen zu gleichen Anteilen.

4.13 Validierung der 16s rRNA-Oligonukleotidsonden zum Nachweis der Stoffwechselaktivitäten ausgewählter *Enterococcus* spp.

Um die Spezifität und Sensitivität der 15 *Enterococcus*-Sonden zu überprüfen, wurde die zuvor aus den Referenzstämmen extrahierte Gesamt-RNA des entsprechenden Vertreters dieser Bakteriengruppe in einer Menge von 100 ng, 50 ng, 10 ng, 5 ng und 1 ng in einem Volumen von 100 µl sterilem Aqua bidest. (DMPC behandelt) auf jeweils einer Membran fixiert. Die Referenz-RNA der übrigen Vertreter der *Enterococcus*-Stammsammlung wurde in einer einheitlichen Menge von jeweils 100 ng eingesetzt.

Um für jede Sonde die spezifische Hybridisierungstemperatur zu ermitteln, wurde zunächst mit einer Hybridisierung begonnen, bei der die Temperatur 10 °C unterhalb des durch die Formel $T_M = 2 AT + 4 GC$ berechneten Schmelzpunktes des entsprechenden Oligonukleotids lag. Abhängig von der Anzahl und Stärke der hierbei erzielten spezifischen und/oder unspezifischen Signale, wurde die Hybridisierungstemperatur in Schritten von 5° C nach oben oder unten korrigiert. Die Feinabstimmung der Hybridisierungstemperatur erfolgte in Schritten von 1° C. Als spezifisch wurden nur diejenigen Sonden gewertet, bei denen in mehreren Wiederholungen der Testhybridisierungen deutliche spezifische und keinerlei unspezifische Signale auftraten.

4.14 Nachweis der Stoffwechselaktivität ausgewählter Mikroorganismen im Probenmaterial

Die aus den Digestproben extrahierte RNA wurde in einer Menge von 100 ng bis 1 µg, im Regelfall in einer Menge von 500 ng, nach oben beschriebener Verfahrensweise auf einer Membran fixiert. Entsprechend der eingesetzten Sonde, wurde eine Verdünnungsreihe eines Gemisches der RNA aller jeweiliger Referenzstämmen zu gleichen Anteilen (Gruppensonden) oder des einzelnen Referenzstammes (Artensonden) zur Kontrolle und als Referenzreihe mitgeführt. Die anschließende Hybridisierung und Detektion erfolgte unter den zuvor optimierten Bedingungen.

4.15 Berechnung der Gehalte an ribosomaler RNA je µg Gesamt-RNA

Die Signalstärken der einzelnen Proben und der Referenzreihen wurden von der Software PCBAS 2.09 (Raytest, Straubenhardt) erfasst und als $(OD - BG)/mm^2$ ausgegeben.

Die für die Verdünnungsstufen der Referenzreihen ermittelten Werte wurden in das Programm SigmaPlot 5.0 (SPSS Inc, Chicago/USA) übertragen und gegen die dazugehörige RNA-Menge als Streudiagramm aufgetragen. Durch Anlegen einer linearen Regression ($y = b_{(0)} + X \cdot b_{(1)}$) wurde eine mögliche lineare Abhängigkeit dieser beiden Parameter geprüft.

Unter der Voraussetzung, dass bei einem RNA-Auftrag von 0 ng ein Wert von 0 $(OD - BG)/mm^2$ zu messen ist, wurde die Regressionsgerade durch den Schnittpunkt der Achsen des Koordinatensystems gezwungen. Die Gleichung der linearen Regression wurde so umgeformt, dass anhand der Signalstärken eine Berechnung der Gehalte an jeweiliger 16S/23S rRNA in den Proben möglich wurde [$X = (y - b_{(0)}) / b_{(1)}$]. Dabei waren y als $(OD - BG) / mm^2$ und $b_{(0)}$ als Schnittpunkt der Reg-

ressionsgeraden mit der y-Achse (hier immer 0), sowie $b_{(1)}$ als Steigung der Regressionsgerade gegeben. Unter Berücksichtigung der in den jeweiligen Hybridisierungen eingesetzten Mengen an Proben-RNA wurde dieser Wert auf ng spezifische 16S rRNA/ μ g Gesamt-RNA hochgerechnet.

4.16 Statistisch-mathematische Auswertung

Die statistische Auswertung der durch Agardiffusionsassays und Hybridisierungen ermittelten Werte erfolgte mittels des Statistikprogrammes SPSS 10.0 (SPSS Inc., Chicago/USA). Zunächst wurde das arithmetische Mittel und die Standardabweichung der Rohdaten der dreifach parallel angelegten Proben ermittelt. Diese Werte wurden mittels SigmaPlot 5.0 (SPSS Inc., Chicago/USA) für die einzelnen Darmabschnitte und Lebensalter zur graphischen Darstellung aufgetragen. Zur weitergehenden statistischen Auswertung wurde aufgrund der für die einzelnen Parameter geringen Datenmengen ein Cofaktor einbezogen, um so die Datengrundlage zu vergrößern. Da die Auswirkungen der verschiedenen Diäten auf die untersuchten Parameter für die einzelnen Darmabschnitte statistisch geprüft werden sollten, wurden die über den gesamten Versuchszeitraum erhobenen Daten zu einer Datengrundlage zusammengefasst. Anhand dieser Datengrundlage konnten auch Effekte der jeweiligen Diäten für die einzelnen Darmabschnitte innerhalb der Versuchsgruppen überprüft werden. Mögliche Einflüsse der verschieden gestalteten Diäten auf die Messdaten in Abhängigkeit vom jeweiligen Darmabschnitt wurden mittels zweifaktorieller Varianzanalyse untersucht. Dabei wurde eine symmetrische Verteilung der Messergebnisse vorausgesetzt.

Nach Ablehnung der globalen Nullhypothese in der einfachen Varianzanalyse wurden paarweise Vergleiche nach Scheffé durchgeführt.

Als Signifikanzgrenzen wurde festgelegt:

nicht signifikant	$p > 0,05$
signifikant	$p < 0,05$