

6. Diskussion

6.1 Einfluss unterschiedlicher Diäten und der Xylanase auf die Leistungsparameter der Versuchstiere

Obwohl der im Rahmen dieser Untersuchung durchgeführte Versuch nicht darauf ausgelegt war, die Einflüsse von NSP und NSP-hydrolysierenden Enzymen auf die wirtschaftlich bedeutsamen Leistungsparameter zu bestimmen, waren die Lebendmassen und Lebendmassezunahmen der Versuchstiere, sowie der Futtermittelverzehr und der Futteraufwand in kg Futter/kg Lebendmassezunahme erfasst und ausgewertet worden.

Die Einbußen bei diesen Parametern, mit Ausnahme des Futtermittelverzehrs in der 2. Lebenswoche, bei den Tieren mit Weizen-Roggen-Diät gegenüber der Gruppe mit Mais-Soja-Diät bestätigten die leistungsmindernden Eigenschaften löslicher NSP, welche in zahlreichen Untersuchungen beschrieben wurden (CHOCT und ANNISON, 1992a und b, BEDFORD und CLASSEN, 1992, DÄNICKE *et al.*, 1999b). Durch Zugabe der Xylanase wurden die antinutritiven Eigenschaften der NSP weitgehend aufgehoben. In der Phase von der 1. bis zur 4. Lebenswoche war die Lebendmasse in der Gruppe mit Enzymzusatz um 2 % bis 7 % und die Lebendmassezunahme um 1 % bis 9 % verbessert. Diese Werte bewegen sich im Rahmen der in anderen Untersuchungen ermittelten Ergebnisse (JACKISCH und JEROCH, 1990, PETTERSON und ÅMAN, 1989). Auch der Futtermittelverzehr der Tiere, deren Diät mit dem Xylanasepräparat ergänzt worden war, war zwischen der 1. und 3. Lebenswoche der Tiere geringfügig höher. Die höhere Aufnahme von Futter in einer Größenordnung von 2 % bis 23 % in dieser Zeit entspricht ebenfalls den in früheren Untersuchungen ermittelten Werten (PETTERSON und ÅMAN, 1989, VELDMANN und VAHL, 1994). Dabei ist die in der 1. Lebenswoche ermittelte um 23 % höhere Futteraufnahme als vergleichsweise deutlich zu werten. Eine Verbesserung des Futteraufwandes um 3 % bis 6 % konnte nur zwischen der 2. und 4. Lebenswoche festgestellt werden. Diese Werte bewegen sich ebenfalls im Rahmen der oben aufgeführten Untersuchungen. In der 5. Lebenswoche der Tiere sind die Entwicklung der Lebendmasse bei den Tieren mit Enzymzusatz um 3 % und die der Lebendmassezunahme um 23 % schlechter. Der Futtermittelverzehr ist um 4 % geringer und der Futteraufwand um nahezu 40 % höher. Obwohl augenscheinlich keinerlei gesundheitliche Beeinflussung der Versuchstiere vorgelegen hat, kann dieses nicht auf physiologische Prozesse zurückgeführt werden, zumal hohe Abweichungen der einzelnen Tiere vom Mittelwert einen individuellen Grund annehmen lassen.

Ein Zusammenhang zwischen Pentosengehalt der Diät und „sticky droppings“ lässt sich anhand höherer Anteile der Tiere mit veränderter Kotkonsistenz in der Gruppe mit Weizen-Roggen-Diät gegenüber den Tieren mit Mai-Soja-Diät ableiten. Durch den Einsatz der Xylanase ließ sich mit Ausnahme der 2. Lebenswoche das Vorkommen von Tieren mit veränderter Kotkonsistenz senken. Solche Beobachtungen machten auch ELWINGER und TEGELÖF (1991), die den Anteil solcher Tiere mit Zusatz eines Multienzympräparates ebenfalls senken konnten. In der 2. Lebenswoche fällt in allen Gruppen ein hoher Anteil an Tieren mit „sticky droppings“ auf. Die Ursache dafür könnte der Federwechsel sein, der in dieser Zeit bei den Tieren aller 3 Gruppen stattgefunden hat. Ein solcher

Federwechsel stellt für das junge und schnell wachsende Tier eine besondere Belastung dar. Geht man von einem Gehalt von über 90 % Rohprotein (Trockensubstanz) bei Federmehl aus (JEROCH *et al.*, 1999), so wird deutlich, welche großen Proteinemengen das Tier bei einem vollständigen Wechsel des Gefieders aufwenden muss. Hinzu kommt der hohe Energieaufwand zur Proteinsynthese. Bei Legehennen ist eine Herabsetzung des Immunstatus während der Mauser zu beobachten (z.B. ALODAN und MASHALY, 1999). Allerdings ist es fraglich, ob sich solche Beobachtungen auf das Mastgeflügel übertragen lassen. Die Mauser wird bei Legehennen durch Änderungen in der Futterzusammensetzung und/oder des Beleuchtungsregimes induziert. Hierdurch ergeben sich mögliche zusätzliche Stressfaktoren auf das Immunsystem, die beim Mastgeflügel nicht gegeben sind.

Der Umstand, dass auch in der Gruppe mit der auf Mais basierenden Diät hohe und häufig höhere Anteile an „sticky droppings“ als in der enzymsupplementierten Gruppe auftraten, lässt den Schluss zu, dass „sticky droppings“ nicht generell als ein Indiz für leistungsmindernde Einflüsse der Diät zu werten sind.

Die Mortalität der Versuchstiere ist insgesamt als gering anzusehen. Die Bewertung der nicht durch Tötung bedingten Abgänge zeigt eine Mortalität von 10 % bei der auf Weizen und Roggen basierenden Diät und von 5 % bei Enzymzusatz. ELWINGER und TEGLÖF (1991) beobachteten Abgänge von insgesamt rund 8 % bei NSP-reicher Diät und 2,7-3,5 % bei Enzymzusatz bei vergleichbaren Haltungsbedingungen.

Insgesamt scheinen die Tiere mit pentosanreicher Diät den Federwechsel in der 2. Lebenswoche schlechter überstanden zu haben als die der Maisgruppe. Es traten in beiden Gruppen erheblich mehr Tiere mit „sticky droppings“ als in der Gruppe mit Maisdiät auf, zusätzlich fallen 5 Abgänge in der nicht supplementierten Gruppe auf, die nicht durch versuchsbedingte Tötungen verursacht wurden.

6.2 Einfluss unterschiedlicher Diäten und der Xylanase auf ausgewählte Enzymaktivitäten in Digestaüberständen

6.2.1 Aktivitäten NSP-hydrolysierender Enzyme in Digestaüberständen

Die in den Digestaüberständen der Tiere mit Enzymzusatz gemessenen Xylanaseaktivitäten lassen sich auf die Aktivität des zugegebenen Enzympräparates und auf mikrobielle Xylanasen zurückführen. Eine Differenzierung mit der gewählten Technik des Agardiffusionsassays ist nicht möglich. Demgegenüber sind die in den Proben der beiden übrigen Gruppen ermittelten Aktivitäten dieses Enzyms und die 1,3-1,4- β -Glucanaseaktivitäten in allen Proben rein mikrobiellen Ursprungs.

In den Proben der Tiere mit Enzymzusatz konnte eine geringfügige Zunahme der Xylanaseaktivitäten im Verlauf des Verdauungstraktes festgestellt werden. Es ist jedoch nicht anzunehmen, dass diese Beobachtung auf eine vermehrte Aktivität mikrobieller Enzyme zurückzuführen ist. VAHJEN und SIMON (1999) überprüften die Stabilität verschiedener NSP-hydrolysierender Enzyme *in vitro*. Dabei wurde für das in der vorliegenden Untersuchung verwendete Enzympräparat nach 30minütiger Inkubation in Digesta bei 40 °C eine Restaktivität von 95,5 % für das Duodenum,

92,9 % für das Jejunum und 97 % für das Ileum nachgewiesen. Diese hohe proteolytische Stabilität ermöglicht eine hohe Aktivität in allen Teilen des Dünndarmes, so dass auch im terminalen Ileum noch Pentosane vom zugegebenen Enzym abgebaut werden. Hinzu kommt ein zunehmender Wasserentzug aus den Digesta im Verlauf des Verdauungstraktes. Dadurch ergibt sich eine zunehmende Aufkonzentrierung des Enzyms, welche bei nahezu gleichbleibender Aktivität des Xylanasepräparates zu den scheinbar höheren Aktivitäten in den Digestaüberständen aus den hinteren Teilen des Verdauungstraktes führt. Bei der Betrachtung der in den Digestaüberständen der Tiere mit Weizen-Roggen-Diät ohne Enzymzusatz und der Tiere der Maisgruppe gemessenen Werte fällt auf, dass an allen Probenahmetagen im Jejunum und an den ersten beiden Probenahmetagen meist auch im Ileum höhere Xylanaseaktivitäten bei den Tieren mit pentosanarmer Diät festzustellen waren. Solche Beobachtungen machten auch HÜBENER *et al.* (2002) für das Jejunum bei 28 Tage alten Broilern. Die höheren Xylanaseaktivitäten bei den Tieren mit pentosanarmer Diät korrelieren mit höheren bakteriellen Stoffwechselaktivitäten, die in der vorliegenden Untersuchung nachgewiesen wurden. Es ist also möglich, dass hier ein rein quantitativer Vorgang mit erhöhten Stoffwechselaktivitäten von Mikroorganismen bei den Tieren mit pentosanarmer Diät vorgelegen hat.

Insgesamt dürfte der Abbau von NSP vorrangig in den Caeca stattfinden (CARRÉ *et al.*, 1990, CHOCT und ANNISON, 1990, JØRGENSEN *et al.*, 1996). Diese Feststellung könnte vor allem für Pentosane zutreffen. Bakterielle Xylanasen scheinen oft zu einem Enzymkomplex zu gehören, welcher auch andere NSP oder deren Fragmente abbauen kann. So ist für Vertreter der *Clostridium spp.* ein Multienzymkomplex mit Cellulase-, Xylanase- und Pectinaseaktivität nachgewiesen: das Cellulosom (z.B. KOSUGI *et al.*, 2001, MOHAND-OUSSAID, 1999). Die in den Caeca herrschenden strikt anaeroben Bedingungen könnten ein geeignetes Milieu für solche Mikroorganismen bieten, die solch komplexe Enzymstrukturen besitzen. Ein deutlicher Anstieg der Xylanaseaktivitäten in den Caeca konnte entsprechend für alle Gruppen bei vergleichbaren Diäten im Vergleich zu den im Dünndarm gemessenen Werten von HÜBENER *et al.* (2002) beobachtet werden. Zusammenfassend ist festzustellen, dass in der vorliegenden Arbeit kein Einfluss der Pentosane und der Xylanase auf Mikroorganismen mit der Fähigkeit zum Abbau von Xylanen festzustellen war.

Die Präsenz löslicher NSP führte in der Weizen-Roggen-Gruppe gegenüber der Maisgruppe zu erhöhten mikrobiellen β -Glucanaseaktivitäten im gesamten Dünndarm. Aus dem Dünndarm von Broilern wurden von BECKMANN *et al.* (2000b) Vertreter der *Enterococcus spp.*, *Streptococcus spp.* und *Bacteroides spp.* isoliert, welche die Fähigkeit zum Abbau von β -Glucanen besitzen. Auf Artenebene konnten *Streptococcus bovis* (EKINCI *et al.*, 1997) und *Enterococcus faecium* (BECKMANN *et al.*, 2000a) differenziert werden. Durch bisher nicht veröffentlichte Untersuchungen am Institut für Tierernährung der FU Berlin konnte gezeigt werden, dass vermutlich *E.faecium* beim Broiler den dominanten Vertreter der *Enterococcus spp.* mit der Fähigkeit zum Abbau von β -Glucanen darstellt (siehe auch SIMON *et al.*, 2002). In der vorliegenden Untersuchung wurde festgestellt, dass die Stoffwechselaktivitäten von *E.faecium* und/oder *E.faecalis* im Verdauungstrakt der Tiere mit pentosanreicher Diät im Vergleich zu den Tieren mit Maisdiät erhöht wurde. Dadurch ergibt sich ein Hinweis auf eine mögliche Förderung von *E.faecium*-Stämmen mit β -Glucanasen durch die Präsenz löslicher β -Glucane. Da der Unterschied in den Stoffwechselaktivitäten im terminalen Ileum besonders deutlich wird, ist anzunehmen, dass *E.faecium* bei pentosanreichen Diäten vermehrt im termi-

nalnen Ileum vorkommt. Bei der Untersuchung der Tiere aus dem selben Versuch konnte BECKMANN (1999) mittels mikrobiologischer Methoden zeigen, dass mehr β -Glucan-spaltende Enterokokken in allen Abschnitten des Dünndarmes bei der pentosanreichen Diät nachzuweisen waren.

Der Zusatz der Xylanase zur Weizen-Roggen-Diät führte zu einer Erhöhung der Aktivitäten mikrobieller β -Glucanasen gegenüber den beiden anderen Gruppen. Ähnliche Beobachtungen machten auch HÜBENER *et al.* (2002) bei vergleichbaren Diäten. Die Autoren prüften außerdem *in vitro* das Wachstumsvermögen von Mikroorganismen aus dem Verdauungstrakt von Broilern in Gegenwart verschiedener Kohlenstoffquellen. Dabei zeigte sich, dass in den vorderen Abschnitten des Dünndarmes die Wachstumskapazitäten in Gegenwart verschiedener NSP höher waren, wenn der Diät eine Xylanase zugesetzt worden war.

In wie weit die höheren β -Glucanaseaktivitäten bei der Xylanasegruppe auf vermehrte Stoffwechselaktivitäten von *E.faecium* zurückgehen, konnte in der vorliegenden Untersuchung nicht geklärt werden. Mittels der Oligonukleotidsonde S-S-Efaes-1237-b-A-17 wurde sowohl die 16S rRNA von *E.faecium* als auch von *E.faecalis* nachgewiesen. Es besteht also die Möglichkeit, dass tatsächlich *E.faecium* durch die Xylanaseergänzung gefördert wurde und bei der Gruppe ohne Enzym *E.faecalis* einen höheren Anteil an diesen beiden Vertretern der *Enterococcus spp.* ausmacht. Die mikrobiologischen Untersuchungen der Proben durch BECKMANN (1999) weisen deutlich auf einen solchen Umstand hin. Andererseits könnten aber auch andere Bakterien mit der Fähigkeit zum Abbau von β -Glucanen gefördert worden sein. Dazu könnten Vertreter der *Lactobacillus spp.* und *Bifidobacterium spp.* gehören. JASKARI *et al.* (1998) gewannen Oligomere durch Abbau von Xylanen und β -Glucanen mit einer Xylanase und einer β -Glucanase und stellten diese Oligosaccharide verschiedenen Mikroorganismen als Substrat zur Verfügung. Es zeigte sich, dass Vertreter der oben genannten Bakteriengruppen diese Substrate nutzen konnten. Da Laktobazillen und Bifidobakterien zu den Mikroorganismen mit gemeinhin förderlichen Effekten auf den Wirtsorganismus gehören, besteht die Möglichkeit eines präbiotischen Effektes der durch exogene Enzyme entstandenen Oligomere.

Die fördernde Wirkung der exogenen Xylanase auf β -Glucan-spaltende Mikroorganismen könnte auf Solubisierung vorher unlöslicher NSP zurückzuführen sein. PETERSON und ÅMAN (1998) zeigten in ihrer Untersuchung, dass durch den Zusatz einer Xylanase zu einer Roggen-Weizen-Diät bisher unlösliche Pentosane in eine lösliche Form überführt werden. Diese löslichen Bestandteile der Makromoleküle könnten für einen mikrobiellen Abbau besser zugänglich sein als unlösliche Fraktionen. Bei der bereits erwähnten Untersuchung von Wachstumskapazitäten intestinaler Mikroorganismen durch HÜBENER *et al.* (2002) konnten im Ileum höhere Kapazitäten NSP-abbauender Bakterien in einer Weizen-Roggen-Gruppe und in einer Maisgruppe gegenüber einer xylanasesupplementierten Gruppe festgestellt werden. Diese Entwicklung setzte sich im Caecum fort. Dort waren die Wachstumskapazitäten von NSP-abbauenden Mikroorganismen bei der pentosanarmen Diät am höchsten. Diese Beobachtungen wurden auf höhere Konzentrationen löslicher NSP in den vorderen Anteilen des Dünndarmes bei Enzymzusatz zur pentosanreichen Diät zurückgeführt.

Beim Abbau von NSP im Verdauungstrakt ist auch ein möglicher Synergismus zwischen NSP-abbauenden Mikroorganismen denkbar. Durch mikrobielle Abbauvorgänge an den Makromolekülen könnten neue Ansatzstellen für Enzyme entstehen, die bis dahin nicht geeignet waren, das Sub-

strat anzugreifen. So besitzt *E.faecium* keine Xylanasen, nimmt aber bei pentosanreichen Diäten an Bedeutung zu (BECKMANN, 1999). Im Pansen von Wiederkäuern sind synergistische Effekte zwischen Protozoen, Pilzen und Bakterien bekannt (LEE *et al.*, 2000). Aber auch starke synergistische Vorgänge zwischen verschiedenen Bakterienarten, vor allem beim Abbau von Hemicellulosen, konnten festgestellt werden (DEHORTY, 1991). Ähnliches ist für die Caeca beim Huhn anzunehmen. Solche Vorgänge könnten besonders bei pentosanreichen Diäten auch im Dünndarm zu einer besseren mikrobiellen Verwertung von NSP führen.

6.2.2 Aktivitäten von Lipasen in Digestaüberständen

In Verbindung mit der altersabhängig im Vergleich zu den übrigen Pankreasenzymen nur langsam steigenden Lipaseproduktion (NOY und SKLAN, 1995) ist ein negativer Einfluss auf die Aktivität dieser Enzyme als ein bedeutsamer Faktor für schlechtere Lebendmassezunahmen in der Mast zu werten.

In beiden Gruppen mit pentosanreichen Diäten waren insgesamt höhere Lipaseaktivitäten als bei der Gruppe mit Mais-Soja-Diät zu beobachten. Die in den Digestaüberständen der Maisgruppe gemessenen Aktivitäten können folglich als ausreichend angesehen werden, um die in der Diät enthaltenen Fette zu verwerten. Wäre die Verdauung dieser Energieträger bei den geringeren Lipaseaktivitäten eingeschränkt, so hätten die Tiere dieser Gruppe Einbußen bei den Leistungsparametern in der Mast gegenüber den anderen Gruppen gezeigt. Die Zugabe der Xylanase führte am 21. und 28. Lebenstag zu einer weiteren Erhöhung der Lipaseaktivitäten im Duodenum und vorderen Ileum gegenüber der ungesupplementierten Gruppe, während im Jejunum die Gruppe ohne Enzymzulage höhere Werte aufwies. DÄNICKE *et al.* (1999a) stellten in ihren Untersuchungen ebenfalls fest, dass die Lipaseaktivitäten im Jejunum 28 Tage alter Broiler bei einer Diät mit hohem Gehalt an löslichen NSP erhöht sind und durch Zusatz einer Xylanase gesenkt werden. ALMIRALL *et al.* (1995) konnten demgegenüber bei Broilern bei einer auf Gerste basierenden Diät im Vergleich zu einer Maisdiät geringere Aktivitäten der Lipasen im vorderen Verdauungstrakt feststellen. Die Zugabe einer β -Glucanase führte in dieser Untersuchung ebenfalls zu einer Erhöhung gegenüber der nicht supplementierten Gruppe.

Als Ursache für die höheren Lipaseaktivitäten bei den Gruppen mit pentosanreicher Diät ist die gesteigerte Digestaviskosität anzunehmen. Wegen der schlechteren Durchmischung der Digesta mit Verdauungsenzymen und einer Herabsetzung deren Aktivität (CHOCT und ANNISON, 1992b, CHOCT *et al.*, 1996) könnte es zu einer kompensatorischen Mehrausschüttung kommen, um eine möglichst hohe Verwertung der Nahrungsfette zu gewährleisten. Die bei allen Gruppen hohe Lipaseaktivität im Duodenum scheint verwunderlich, da dieses Enzym erst am Übergang dieses Darmabschnittes in das Jejunum sezerniert wird. HÜBENER (2001) konnte ebenfalls bei Diäten mit unterschiedlicher Viskosität stets die höchsten Aktivitäten bei 15 Tage alten Broilern im Duodenum feststellen und führte dies auf die beim Huhn ausgeprägte Antiperistaltik (SKLAN *et al.*, 1978, ANTONIOU und MARQUARDT, 1981) zurück. Dabei werden die Digesta, und mit ihnen die in das proximale Jejunum sezernierten Pankreasenzyme, in kontinuierlichen Wellen in das Duodenum befördert. Diese antiperistaltischen Bewegungen werden bei hohen Digestaviskositäten gestört (SMULIKOWSKA, 1998).

Dies erklärt die tendenziell höheren Lipaseaktivitäten im Duodenum bei den Tieren mit Xylanase-zulage gegenüber der nicht supplementierten Gruppe. Steht im Duodenum mehr Lipase zur Verfügung, kann dort eine stärkere Verdauung der Futterfette stattfinden. Die frei werdenden Fettsäuren können früher im Darm resorbiert werden, und die effektive Kontaktzeit der Enzyme mit den Substraten verlängert sich. Man kann zwar vermuten, dass sich die Kontaktzeit der Enzyme bei hochviskösen Digesta weiter verlängert, doch könnte wegen einer schlechteren Durchmischung die Häufigkeit der Kontakte zwischen Enzymen und Substraten herabgesetzt sein.

6.2.3 Aktivitäten von Gallensäurehydrolasen in Digestaüberständen

Der Einfluss löslicher NSP und der Xylanase auf bakterielle Gallensäurehydrolasen war in der vorliegenden Untersuchung insgesamt nur sehr gering ausgeprägt. Am 14. und 21. Lebenstag der Tiere waren im gesamten Verdauungstrakt die höchsten Aktivitäten in der Gruppe mit pentosanarmer Diät und am 28. Lebenstag in der Gruppe mit pentosanreicher Diät und Enzymzusatz festzustellen. Diese Ergebnisse widersprechen Angaben aus der Literatur. Ein deutlicher Einfluss einer getreide-reichen Diät auf die Aktivität mikrobieller Gallensäurehydrolasen im Vergleich zu einer Maisdiät konnte von FEIGNER und DASHKEVICZ (1988) und HÜBENER *et al.* (2002) belegt werden.

In der vorliegenden Untersuchung könnten aber bei den hochviskösen Diäten geringere Gallensäurekonzentrationen in den Dünndarmdigesta vorgelegen haben. SMITS *et al.* (1998) stellten fest, dass bei Zulage von hochvisköser CMC die Gallensäurekonzentrationen in Dünndarmdigesta abnahmen. Die Autoren führten dieses auf eine Verdünnung durch erhöhte Wasseraufnahme der Tiere bei hochvisköser Diät zurück, da in der Trockenmasse keine Unterschiede zu einer niedrigviskösen Kontrolldiät festgestellt wurden. Außerdem wurde eine höhere Ausscheidung von Gallensäuren über die Exkrete bei hochviskösen Diäten festgestellt. Sollten in der Feuchtmasse der Dünndarmdigesta bei den hochviskösen Diäten in der vorliegenden Untersuchung ebenfalls geringere Gallensäurekonzentrationen als in der Maisgruppe vorgelegen haben, könnten vergleichbare Aktivitäten von Gallensäurehydrolasen zu einem stärkeren Abbau der vorhandenen Gallensäuren geführt haben. Es ist zudem anzunehmen, dass Mikroorganismen Enzyme nur in einem Maße produzieren, welches ihnen einen Vorteil zum Überleben im Verdauungstrakt bietet. Eine geringere Konzentration der Gallensäuren könnte so trotz eines höheren Anteils von Gallensäurehydrolaseproduzenten an den mikrobiellen Populationen zu unveränderten Aktivitäten der entsprechenden Hydrolasen in Digestaüberständen führen. Es ist also möglich, dass weniger die absolut gemessenen Konzentrationen der Gallensäurehydrolasen, sondern vielmehr das Verhältnis dieser Enzyme zu den vorhandenen Gallensäuren eine Rolle spielt. Leider bestand im Rahmen dieser Untersuchung keine Möglichkeit zum Nachweis von Gallensäuren in Digestaprobe. Ein solcher Nachweis, idealerweise getrennt nach konjugierten und dekonjugierten Gallensäuren, hätte die Beurteilung der festgestellten Gallensäurehydrolaseaktivitäten erheblich vereinfacht. Um diese Erklärungsansätze zu überprüfen sind weiterführende Untersuchungen nötig. Dabei sind vor allem die Konzentrationen konjugierter und dekonjugierter Gallensäuren in Abhängigkeit von der Digestaviskosität von Interesse.

6.3 Extraktion von Nukleinsäuren aus Digestaproben von Broilern

Für aussagefähige Ergebnisse molekularbiologischer Untersuchungen ist eine möglichst vollständige Gewinnung der Nukleinsäuren aus dem Probenmaterial unabdingbar (OGRAM *et al.*, 1995). Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Untersuchung eine mikroskopische Kontrolle der Zell-Lyse in der Extraktion durchgeführt und das Extraktionsprotokoll entsprechend modifiziert, um eine vollständige Lyse aller Bakterienzellen zu erreichen.

Die in der ersten Extraktion gewonnenen Nukleinsäureextrakte waren verworfen worden, nachdem im Anschluss an eine säulenchromatische Aufreinigung nur noch äußerst geringe Nukleinsäuregehalte messbar waren.

Die in der zweiten Extraktion gewonnenen Extrakte wiesen nach der Reinigung RNA-Gehalte zwischen ca. 70 µg/ml und ca. 300 µg/ml (Mittelwerte der Parallelproben) auf. Die durchschnittliche Ausbeute aus allen Proben betrug 190 µg/ml. Diese Ausbeuten bewegen sich im Rahmen der Ergebnisse von STAHL *et al.* (1988), die aus 1 ml Pansenflüssigkeit durchschnittlich 233 µg/ml (84-408 µg/ml) RNA gewinnen konnten.

Die bei der Extraktion entstandenen Nukleinsäure-Zentrifugate waren von gelartiger Konsistenz, besaßen einen braunen Kern und einen weißen Rand von körniger Konsistenz. Die bräunliche Substanz ist auf Huminsäuren zurückzuführen (ALM *et al.*, 2000), welche in den pflanzlichen Bestandteilen der Diäten enthalten sind. Huminsäuren können die Hybridisierung der ribosomalen RNA mit Oligonukleotidsonden stören (ALM und STAHL, 2000). Die weißliche Substanz wurde nicht näher charakterisiert. Da die Substanz in Ethanol fällbar war, könnte es sich um Salze handeln. Es ist anzunehmen, dass der üblicherweise höhere Gehalt an Mengenelementen von Broilerdiäten und/oder ein höherer Salzgehalt der Digesta beim Broiler zu einem hohen Salzgehalt der Zentrifugate geführt hat. Durch die säulenchromatographische Auftrennung der Nukleinsäuren konnte eine Entfernung beider Substanzen erreicht werden.

6.4 Einfluss unterschiedlicher Diäten und der Xylanase auf die Ausbeute an Nukleinsäuren aus Digestaproben von Broilern

Die Ausbeute an Gesamt-RNA war bei allen Proben aus der Gruppe mit Mais-Soja-Diät höher als bei den beiden übrigen Gruppen. Aus den Proben der Tiere, deren Diät mit einer Xylanase ergänzt worden war, konnte insgesamt mehr Gesamt-RNA gewonnen werden als bei den Tieren ohne Enzymzusatz. Dieses bestätigt sich tendenziell auch bei Betrachtung der aus den Werten der Parallelproben für die einzelnen Lebensstage und Darmabschnitte berechneten Mittelwerte.

Da es sich bei der extrahierten RNA sowohl um Bakterien- als auch um Wirts-RNA handelt, ist nicht auszuschließen, dass bei höheren Digestaviskositäten weniger Wirts-RNA im Darmlumen vorliegt. IJI *et al.* (2001) konnten bei Zusatz verschiedener viskositätssteigerender Substanzen eine Verringerung des RNA-Gehaltes der Ileummucosa feststellen. Allerdings wiesen DÄNICKE *et al.* (2000a) bei Enzymzusatz zu einer Roggen-Talg-Diät in der Mucosa aller Darmabschnitte des Dünndarmes geringere RNA-Konzentrationen als in der ungesupplementierten Gruppe nach. In Verbindung mit einer höheren Erneuerungsrate der Dünndarmepithelien bei hochviskösen Diäten wäre also eine höhere Menge an Wirts-RNA bei der Gruppe mit Weizen-Roggen-Diät zu erwarten.

Es ist auch möglich, dass die Viskosität der Digesta und somit des Probenmaterials einen Einfluss auf die Effizienz der RNA-Extraktion aus diesen komplexen Matrices hat. Als Ursache sind eine schlechtere Durchmischung des Probenmaterials mit den zum Zellaufschluss zugegebenen Lösungen, eine herabgesetzte Kollisionsrate der Bakterienzellen mit den glass-beads und eine Bindung freier Nukleinsäuren an komplexe Kohlenhydrate denkbar. Hier sind weiterführende Untersuchungen nötig, die eine mögliche Beeinflussung der RNA-Ausbeute durch die Probenviskosität prüfen.

6.5 Oligonukleotidsonden zum Nachweis von Mikroorganismen im Probenmaterial

Bevor aus der Literatur bezogene SONDENSEQUENZEN oder selbst entwickelte Oligonukleotidsonden zur vergleichenden Untersuchung von Stoffwechselaktivitäten eingesetzt werden, ist deren Überprüfung unter den vorgesehenen Hybridisierungsbedingungen unabdingbar. Nur so können falsch positive oder falsch negative Ergebnisse so weit wie möglich vermieden werden. Die Ergebnisse der Validierung und Optimierung der Oligonukleotidsonden in dieser Arbeit zeigen, dass eine Kontrolle der SONDENSEQUENZEN als alleiniges Merkmal für ihre Spezifität nicht ausreicht. Die Möglichkeit unspezifischer Bindungen oder unzureichender Entfernung unspezifisch gebundener SONDENRESTE kann zu einer Fehlinterpretation der ermittelten Ergebnisse führen.

Die zum Nachweis von Bakteriengruppen bestimmten Sonden zeigten unter den getesteten Bedingungen stets eine gute Spezifität mit ausreichenden Möglichkeiten für eine Optimierung der Sensitivität. Die Optimierung der Hybridisierungsbedingungen für die Artensonden war stärker durch das Erreichen oder Erhalten der Spezifität geprägt. Da sich die ribosomale RNA im Laufe der Evolution als sehr konservativ erwiesen hat (FOX *et al.*, 1992), werden die variablen Regionen weniger, und so die Unterschiede in den Sequenzen umso kleiner, je enger der Verwandtschaftsgrad zwischen zwei Bakterienarten ist. Zwischen Bakteriengruppen sind diese Unterschiede entsprechend größer, so dass häufig auch „wobble-Nukleotide“ (Basenanaloga, die mit unterschiedlichen Basen paaren können) oder Fehlbindungsstellen (sog. „mismatches“) bei der Entwicklung geeigneter Sonden akzeptiert werden. Die Notwendigkeit einer intensiven Überprüfung von Oligonukleotidsonden lässt sich auch bei der Validierung aus der Literatur übernommener Oligonukleotidsonden für die in dieser Arbeit vorgesehenen Hybridisierungsbedingungen nachvollziehen. S-G-Enc-038-a-A-18 wurde als gruppenspezifische Oligonukleotidsonde zum Nachweis der 23S rRNA von *Enterococcus spp.* von FRAHM *et al.* 1998 erstmals publiziert. Die Überprüfung dieser Sonde unter den für die vorliegende Untersuchung relevanten Bedingungen zeigte, dass für diese Sonde spezifische Bedingungen zu schaffen waren. Andererseits waren für die in der genannten Arbeit erstmals veröffentlichten 23S rRNA Sonden zum Nachweis einzelner Vertreter der *Enterococcus spp.* keinerlei Signale unter den getesteten Bedingungen zu erzielen. Auch für die in der vorliegenden Arbeit zum Nachweis ausgewählter Vertreter der *Enterococcus spp.* vorgesehenen Sondenkandidaten konnten zum größten Teil keine spezifischen Hybridisierungsbedingungen ermittelt werden. Weiterhin besteht das Problem, dass in Untersuchungen mittels Sondentechnik nur bereits bekannte rRNA-Sequenzen einbezogen werden können. Eine Spezifität der eingesetzten Oligonukleotidsonde für Mikroorganismen, deren rRNA-Sequenz bisher nicht in den entsprechenden Datenbanken aufgeführt wurde, ist möglich

(AMANN und LUDWIG, 2000). Dieses könnte ebenfalls zu einer Fehldeutung von Signalen führen. Bei Hybridisierungen der RNA-Extrakte aus dem Probenmaterial mit gruppen- oder artenspezifischen Oligonukleotidsonden wurden unterschiedlich starke Signale je nach Gehalt an spezifischer rRNA ermittelt. Um diese unterschiedlich starken Signale mit einer entsprechenden RNA-Menge korrelieren zu können, wurden bei jeder Hybridisierung Referenzreihen mitgeführt. Diese Referenzreihen bestanden aus bekannten Verdünnungsstufen definierter Kultur-RNA. Bei der Ermittlung der Kopiezahl der ribosomalen Gene fanden FOGEL *et al.* (1999) eine mögliche Fehlerquelle in der Verwendung von kultivierten Mikroorganismen. Die Autoren vermuteten bei diesen Mikroorganismen eine höhere Teilungsrate als bei nativen Populationen und folglich höhere Mengen ribosomaler Gene. Sollte diese Vermutung richtig sein, so würden die Verwendung von Kultur-RNA als Referenz zu einer Fehlinterpretation der Gehalte an spezifischer RNA führen. Für die Gruppensonden wurde ein Gemisch der Gesamt-RNA aller verfügbaren Vertreter einer Bakteriengruppe eingesetzt, für die Artensonden die Gesamt-RNA des jeweiligen Vertreters der Bakteriengruppe. Solche Referenzreihen für gruppenspezifische Oligonukleotidsonden haben den Nachteil, dass eine gleichmäßige Hybridisierung der einzelnen Vertreter einer Bakteriengruppe nicht immer gegeben sein muss und je nach Diversität des jeweiligen Habitats unterschiedliche Signalstärken die Folge sein können. So konnten bei der Validierung der Oligonukleotidsonde S-G-Bif-1432-a-A-21 durch KAUFMANN *et al.* (1997) unterschiedliche Signalstärken bei verschiedenen Vertretern der *Bifidobacterium spp.* beobachtet werden. Im Falle der Sonde S-G-Bac-0303-a-A-17 ist wegen ihrer theoretischen Spezifität für alle Bakterien eine solche Referenzreihe nicht herzustellen. Stattdessen wurde ein Gemisch der Gesamt-RNA aller Proben zu gleichen Teilen als Standard herangezogen. Solche standardisierten Mischproben dürften die geeignetste Näherung darstellen. Sie vermeiden eine Verzerrung der Ergebnisse, die sich durch die Verwendung von Kultur-RNA ergeben könnten. Außerdem sind solche Extrakt-Gemische gleichen Extraktionsbedingungen unterworfen wie das Probenmaterial.

Da an den Ribosomen die Proteinbiosynthese stattfindet, dürfte die Menge der Ribosomen mit der Stoffwechselaktivität von Mikroorganismen korrelieren. So konnten bereits SCHAECHTER *et al.* (1958) einen unmittelbaren Zusammenhang zwischen Wachstumsrate und RNA-Gehalt bei *Salmonella typhimurium* nachweisen. FOGEL *et al.* (1999) verglichen die Zahl ribosomaler Gene von über 300 Prokaryoten und vermuteten eine Abhängigkeit der Anzahl dieser Gene vom Wachstumsvermögen der Mikroorganismen *in vitro*. Ein solcher Zusammenhang kann in vergleichenden Untersuchungen die Möglichkeit zum Nachweis der Stoffwechselaktivität ausgewählter Gruppen oder Arten von Mikroorganismen mittels Hybridisierung der ribosomalen RNA bieten (STAHL *et al.*, 1988). Anhand der Referenzreihen und der Umrechnung der Signalstärken in ng spezifische RNA/ μ g Gesamt-RNA wurden in der vorliegenden Untersuchung die Abhängigkeit der Stoffwechselaktivitäten ausgewählter Bakteriengruppen und -arten von verschiedenen Diäten und einer Xylanase vergleichend ermittelt. Es könnte sogar eine Berechnung der Zellzahlen, welche im Probenmaterial enthalten waren, erfolgen. Leider fehlen in der Literatur Angaben zum rRNA-Gehalt von Einzelzellen der hier untersuchten Bakteriengruppen und -arten. Anhaltspunkte ergeben sich jedoch aus den Angaben der Firma Qiagen (Hilden) zur Extraktionseffizienz ihres Qiagen RNeasy Kits. Der Hersteller gibt eine mittlere Ausbeute von 33 μ g Gesamt-RNA aus 5×10^8 *E.coli*-Zellen an. Dies würde, eine

vollständige RNA-Ausbeute vorausgesetzt, einen Gehalt von ca. 66 fg RNA je Einzelzelle bedeuten. Daraus ergäben sich Zellzahlen von 10^4 bis 10^5 bei 1 ng Kultur-RNA und von ca. 5×10^6 bis 5×10^7 bei 500 ng Kultur-RNA in der Referenzreihe. Die geringen oder fehlenden Signale bei der Hybridisierung der RNA-Extrakte, vor allem bei Verwendung der Artensonden, könnten also darauf zurückzuführen sein, dass die theoretische Nachweisgrenze der jeweiligen Oligonukleotidsonde unter den vorliegenden Bedingungen erreicht oder unterschritten war. Dabei ist zu beachten, dass die eingesetzten Oligonukleotidsonden nicht mit der Gesamt-RNA hybridisieren, sondern entweder mit der 16S oder der 23S rRNA. Die Nachweisgrenzen anderer molekularbiologischer Methoden sind teilweise deutlich niedriger anzusetzen. So reicht zum Nachweis von Mikroorganismen mittels PCR oder rTPCR (reverse Transkriptase PCR) theoretisch eine einzige Kopie eines ausgewählten Gens. Allerdings kann eine Quantifizierung von Mikroorganismen mittels dieser Techniken mit Problemen behaftet sein (BECKER *et al.*, 2000). Semiquantitative Untersuchungen der ribosomalen DNA oder RNA mittels DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) setzen eine Mindestzellzahl von ca. 10^5 bis 10^7 voraus (ZOETENDAL *et al.*, 2002). Die Hybridisierung der ribosomalen RNA mit Oligonukleotidsonden war in der vorliegenden Arbeit also teilweise sensitiver als es für die Technik der DGGE beschrieben wird, kann aber selbstverständlich die hohe Sensitivität der PCR nicht erreichen.

Die möglichen Fehlerquellen bei der Korrelation von Signalstärken in der Hybridisierung mit Gehalten einer Probe an spezifischer ribosomaler RNA und damit der Stoffwechselaktivität von Mikroorganismen lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. ungleichmäßige Extraktion der Gesamt-RNA aus dem Probenmaterial (siehe Kapitel 6.5);
2. unzureichende Spezifität der Oligonukleotidsonde;
3. Fehlinterpretationen aufgrund der Hybridisierung spezifischer rRNA-Sequenzen von bisher nicht in den entsprechenden Datenbanken aufgeführten Mikroorganismen;
4. limitierte Möglichkeiten zur Schaffung geeigneter Referenzreihen;
5. Unterschiede bei Mikroorganismen in Wachstumsverhalten und Stoffwechselaktivitäten zwischen Laborstämmen und „Wildtypen“.

Trotz dieser Fehlerquellen bietet die Hybridisierung von RNA-Extrakten aus dem Verdauungstrakt zumindest die Möglichkeit zum relativen Vergleich von Versuchsgruppen. Diese Technik ist weniger zeitaufwendig als mikrobiologische Methoden und ermöglicht so die Differenzierung vieler Gruppen und Arten von Mikroorganismen bei großem Probenumfang. Darüber hinaus erlaubt sie eine genaue Einordnung der nachgewiesenen Mikroorganismen in die entsprechende phylogenetische Gruppe (AMANN und LUDWIG, 2000). Die in der vorliegenden Untersuchung festgestellten Nachweisgrenzen reichen dabei aus, die Hauptvertreter mikrobieller Gemeinschaften im Verdauungstrakt und einen Teil der Begleitflora zu erfassen.

6.6 Einfluss unterschiedlicher Diäten und der Xylanase auf mikrobielle Gemeinschaften im Verdauungstrakt von Broilern

6.6.1 Nachweis bakterieller Stoffwechselaktivitäten

Für die Gruppe mit Weizen-Roggen-Diät waren im Jejunum und vorderen Ileum insgesamt geringere bakterielle Stoffwechselaktivitäten nachzuweisen als für die Gruppe mit Mais-Soja-Diät. Im terminalen Ileum waren hingegen etwas höhere Aktivitäten zu messen als in den Proben der Maisgruppe. Durch die Ergänzung der hochviskösen Diät mit der Xylanase wurden die Stoffwechselaktivitäten im Jejunum gegenüber der nicht supplementierten Gruppe erhöht und in beiden Teilen des Ileums tendenziell gesenkt. In allen Darmabschnitten lagen die für die Enzymgruppe bestimmten Werte unterhalb denen der Maisgruppe. BECKMANN (1999) untersuchte die gleichen Tiere, welche auch in der vorliegenden Untersuchung verwendet wurden, mittels mikrobiologischer Methoden und konnte anaerobe Gesamtkeimzahlen feststellen, die mit den hier beschriebenen Ergebnissen korrelieren. Diese Befunde stehen teilweise im Widerspruch zu den in der Literatur beschriebenen Ergebnissen, die eine stärkere mikrobielle Proliferation und folglich höhere Stoffwechselaktivitäten bei Einsatz hoch- gegenüber niedrigviskösen Diäten feststellen. Eine Erhöhung der Keimzahlen der Anaerobier im Ileum um 2 bis 3 Zehnerpotenzen und der Sporenbildner um 6 bis 7 Zehnerpotenzen im Ileum, wie sie von WAGNER und THOMAS (1978) beschrieben wurde, kann nicht ohne Auswirkung auf die nachweisbare Menge bakterieller 16S rRNA bleiben. Allerdings sind solche drastischen Zunahmen der Sporenbildner unter Umständen auf methodische Probleme in der klassischen Mikrobiologie zurückzuführen. LANGHOUT *et al.* (1999) wiesen im Ileum von Tieren, die mit einer Weizen-Roggen-Diät gefüttert wurden, signifikant höhere KbE der Gesamtanaerobier als bei einer Maisdiät nach. Tendenziell wird eine solche Entwicklung durch die höheren Stoffwechselaktivitäten im terminalen Ileum bei den Tieren mit pentosanreicher Diät ohne Enzymzusatz gegenüber der Maisgruppe bestätigt. Da die bakteriellen Stoffwechselaktivitäten im vorderen Ileum durch die pentosanreiche Diät nicht anstiegen, ist der Einfluss der löslichen NSP auf die mikrobiellen Stoffwechselaktivitäten in diesem Darmabschnitt in der vorliegenden Untersuchung weniger ausgeprägt. Die in der Literatur häufig beschriebene Senkung der anaeroben Gesamtkeimzahlen im Dünndarm durch Zusatz NSP-hydrolysierender Enzyme zu hochviskösen Diäten (GRAHAM, 1996, JAMROZ *et al.*, 1998b, DÄNICKE *et al.*, 1999e) konnte durch Nachweis der bakteriellen Stoffwechselaktivitäten für das Ileum weitgehend bestätigt werden. Allerdings fallen höhere Stoffwechselaktivitäten im Jejunum bei den Tieren mit Xylanaseergänzung auf. Dies ist ein Hinweis darauf, dass getreidereiche Diäten nicht *per se* zu einer Erhöhung der Bakteriendichte im Dünndarm führen. Neben unterschiedlichen Untersuchungsmethoden dürfte auch die Herkunft des Tiermaterials eine Rolle spielen. Auf die Bedeutung der hygienischen Bedingungen in den Aufzuchtbetrieben für die mikrobielle Besiedlung des Verdauungstraktes wurde in Kapitel 2.3 hingewiesen. Hinzu kommt, dass häufig unterschiedliche Haltungs- und Fütterungsmethoden angewendet werden. So wurden beispielsweise die Versuchstiere in den Untersuchungen von WAGNER und THOMAS (1978) zu 8 Tieren in Käfighaltung gehalten, während bei der vorliegenden Untersuchung größere Tiergruppen in Bodenhaltung auf Weizenstrohhäcksel eingestallt wurden. Dadurch war eine Reinfizierung der Tiere mit den

Mikroorganismen aus dem Kot möglich, was zur Ausbildung von quantitativ und qualitativ verschiedenen mikrobiellen Gemeinschaften gegenüber der Käfighaltung führen könnte.

Die höheren Stoffwechselaktivitäten in den vorderen Abschnitten des Dünndarmes bei der Maisgruppe und bei den Tieren mit Xylanasezusatz weisen auf eine Verschiebung der mikrobiellen Aktivitäten nach distal bei der nicht supplementierten Weizen-Roggen-Diät hin. Bei Einsatz der Mais-Soja-Diät könnten im Jejunum leicht verfügbare Substrate für Mikroorganismen vorhanden sein, so dass diese dort bessere Wachstumsbedingungen vorfinden als bei Weizen-Roggen-Diäten. Da die Nährstoffe auch für den Wirt gut verdaulich sind, dürfte das Substratangebot zum Ileum stark abnehmen, was dort in der Konsequenz zu geringeren mikrobiellen Stoffwechselaktivitäten führt. Die Xylanaseergänzung der pentosanreichen Diät könnte durch eine partielle Hydrolyse der Arabinoxylane zu einer Freisetzung leichter verwertbarer Substrate für Mikroorganismen im Jejunum führen (SIMON, 1998). Auch hier könnte eine höhere Resorption von Nährstoffen durch das Wirtstier oder eine Verlagerung der Resorption in proximal gelegene Abschnitte des Dünndarmes weniger Substrat für eine mikrobielle Fermentation im Ileum bedeuten.

6.6.2 Nachweis von *E.coli* und *Shigella spp.*

Die Stoffwechselaktivitäten von Vertretern der *E.coli* und *Shigella spp.* waren in beiden Teilen des Ileums bei der Gruppe mit Weizen-Roggen-Diät ohne Enzymzusatz höher als in der Gruppe mit pentosanarmer Diät. Wird bei der Maisgruppe ein für das Jejunum ermittelter extrem hoher Einzelwert aus der Betrachtung herausgenommen, so sind auch im Jejunum höhere Werte in der Weizen-Roggen-Gruppe festzustellen. Die Ergänzung der pentosanreichen Diät mit der Xylanase führte zu einer Senkung der Stoffwechselaktivitäten gegenüber der unsupplementierten Gruppe. Im Jejunum (auch ohne Korrektur um den erwähnten Extremwert) waren die Stoffwechselaktivitäten dieser Vertreter der *Enterobacteriaceae* geringer als in der Maisgruppe. Diese Befunde stimmen mit den Angaben in der Literatur (GRAHAM, 1996, HOCK *et al.*, 1997b, DÄNICKE *et al.*, 1999e) hinsichtlich der Keimzahlen von Enterobakterien, respektive coliformen Keimen, überein. VAHJEN *et al.* (1998) stellten Veränderungen bei weizenbetonter Diät und Xylanasezusatz insbesondere bei Tieren im Alter von 4 bis 7 Tagen fest. Ihre Untersuchungen von 14 bis 28 Tage alten Broilern zeigten hingegen keine Veränderungen bezüglich luminaler Enterobakterien.

Viele Vertreter der Enterobakterien sind sehr beweglich. Es könnte daher ein direkter Einfluss der erhöhten Digestaviskosität auf die Stoffwechselaktivitäten dieser Keimgruppe vorliegen. Die hohe Beweglichkeit ermöglicht es Vertretern dieser Keimgruppe dem Digestafluss entgegenzuwirken und so das Darmlumen trotz der hohen Passagegeschwindigkeit der Digesta beim Broiler als Lebensraum zu nutzen. Eine ausgeprägte Motilität dürfte insbesondere bei hochviskösen Diäten einen Selektionsvorteil bedeuten, da Vertreter der *Enterobacteriaceae* erst bei Viskositäten von 60 mPas immobilisiert werden (GREENBERG und CANALE-PAROLA, 1977). Es ist möglich, dass bewegliche *Enterobacteriaceae* Orte im Darm mit geeigneten Nährstoffen aktiv aufsuchen können und so eine schlechtere passive Durchmischung mit dem Nahrungsbrei ausgleichen. Obwohl diese Bakteriengruppe zur physiologischen Darmflora gehört, sind pathogene Vertreter allgemein für wirtschaftlich bedeutsame Verluste in der Nutztierhaltung verantwortlich. Dabei sind in erster Linie Jungtiere be-

troffen. Geflügelpathogene *E.coli* (APEC) verursachen Embryonentod und Frühsterblichkeit der Küken, Coliseptikämie und, in erster Linie bei älteren Tieren, die Coligranulomatose. Daneben sind sie für Luftsackentzündungen, Polyserositis und andere, vor allem außerhalb des Verdauungstraktes lokalisierte, Erkrankungen verantwortlich. Enterotoxische *E.coli*, welche durch die Produktion von hitzelabilem (LT) und/oder hitzstabilem Enterotoxin (ST) für Durchfallerkrankungen verantwortlich sind, wurden ebenfalls nachgewiesen (JOYA *et al.*, 1990). APEC lassen sich auch im Verdauungstrakt klinisch gesunder Tiere nachweisen. Ihre Pathogenität für das Einzeltier scheint von wirts- und umweltspezifischen Faktoren abhängig zu sein (DHO-MOULIN und FAIRBROTHER, 1999). Eine Senkung der Stoffwechselaktivitäten von *E.coli* insgesamt bedeutet, dass die Belastung der Tiere mit potentiellen Krankheitserregern herabgesetzt wird. Dies hat für die Aufrechterhaltung eines gesunden Tierbestandes große Bedeutung, da nicht nur die tierindividuelle Belastung abnimmt, sondern auch die Ausbreitung unter den Tieren über Kot und Einstreu.

In der vorliegenden Untersuchung waren teilweise ganz erhebliche tierindividuelle Unterschiede bei den Stoffwechselaktivitäten der untersuchten *Enterobacteriaceae* zu beobachten. Alle zur Probengewinnung getöteten Tiere wiesen jedoch augenscheinlich weder äußere noch innere Anzeichen für ein Infektionsgeschehen auf. Es lässt sich auch kein Zusammenhang zwischen hohen Stoffwechselaktivitäten der *E.coli*- und *Shigella*-Vertreter und erhöhter Mortalität der Versuchstiere anhand der dokumentierten Abgänge feststellen. Eine Unterscheidung zwischen den Stoffwechselaktivitäten apathogener *E.coli* und APEC, sowie zwischen *E.coli* und Vertretern der *Shigella spp.* ist bei Einsatz der Sonde 16E1 nicht möglich. Weitere molekularbiologische Untersuchungen, z.B. der Nachweis von Pathogenitätsfaktoren mittels PCR, könnten Erkenntnisse über eine möglicherweise selektive Wirkung pentosanreicher Diäten und der Xylanaseergänzung auf Vertreter der *E.coli* erbringen.

6.6.3 Nachweis von *Enterococcus spp.*

Eine Erhöhung des Anteils der Vertreter der *Enterococcus spp.* an den mikrobiellen Gesamtpopulationen im Verdauungstrakt durch Erhöhung der Digestivviskosität, wie sie durch UNTAWALE und MCGINNIS (1979) und SMITS *et al.* (1998) beschrieben wurde, konnte nur teilweise beobachtet werden. Zwar wurden bei der Gruppe mit Weizen-Roggen-Diät am 14. und 21. Lebenstag der Tiere für den gesamten Dünndarm in der Summe höhere Stoffwechselaktivitäten als bei der Maisgruppe bestimmt, doch lässt sich dieses bei Bewertung der für die einzelnen Darmabschnitte erhobenen Daten nur noch im terminalen Ileum feststellen. Auch eine Verringerung der *Enterococcus spp.* durch Zugabe der Xylanase zur pentosanreichen Diät gegenüber der nicht supplementierten Diät, wie sie in der Literatur beschrieben wird (GRAHAM, 1996), kann nicht uneingeschränkt bestätigt werden. Im Jejunum waren eher höhere Stoffwechselaktivitäten zu beobachten. In beiden Teilen des Ileums konnten aber tendenzielle Verringerungen der Stoffwechselaktivitäten festgestellt werden. Dies weist auf eine pentosanabhängige Verschiebung der Aktivitäten von Vertretern der *Enterococcus spp.* im Verdauungstrakt nach distal hin, wie sie auch für die bakteriellen Stoffwechselaktivitäten beobachtet wurde. Auch bei diesen Beobachtungen ist zu beachten, dass unterschiedliche Ausgangsbedingungen bei den Versuchstieren und verschiedene methodische Ansätze die Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen aus der Literatur einschränken.

Der Nachweis der Stoffwechselaktivitäten von *E.faecalis* und *E.faecium* zeigt, dass sich Veränderungen im Artenspektrum einer Bakteriengruppe durch unterschiedliche Diäten ergeben. Über den gesamten Versuchszeitraum betrachtet, waren die Gesamtaktivitäten der Enterokokken im Jejunum und vorderen Ileum bei den Tieren mit Maisdiät höher als bei den Tieren mit pentosanreicher Diät ohne Enzymzulage. Demgegenüber konnten in diesen Darmabschnitten höhere Stoffwechselaktivitäten von *E.faecalis* und/oder *E.faecium* bei der Gruppe mit pentosanreicher Diät festgestellt werden. Im terminalen Ileum wurden geringere Gesamtaktivitäten der Enterokokken und geringere Stoffwechselaktivitäten von *E.faecalis* und/oder *E.faecium* bei der Maisgruppe beobachtet. Diese Beobachtung lässt den Schluss zu, dass einzelne Vertreter der *Enterococcus spp.* in den unterschiedlichen Darmabschnitten selektiv auf Kosten anderer Vertreter durch ein verändertes Substratangebot gefördert werden. Der im Vergleich zu Mais hohe Gehalt von Weizen und Roggen an löslichen NSP könnte Mikroorganismen fördern, die diese Substrate abbauen können. Andere Vertreter dieser Bakteriengruppe, welche NSP nicht nutzen können, scheinen zurückgedrängt zu werden. Der Einsatz der Xylanase führte bei Betrachtung des gesamten Versuchszeitraums zu höheren Stoffwechselaktivitäten von *E.faecalis* und/oder *E.faecium* im Jejunum gegenüber der Gruppe mit pentosanreicher Diät ohne Xylanasezusatz. Im vorderen Ileum waren die Aktivitäten hingegen geringer. Wird der für das terminale Ileum berechnete Mittelwert um einen extrem hohen Einzelwert in der Gruppe mit Xylanasezusatz korrigiert, ergeben sich auch in diesem Darmabschnitt geringere Stoffwechselaktivitäten. Diese Beobachtung korreliert mit den Gesamtaktivitäten der *Enterococcus spp.* im Verdauungstrakt der Tiere dieser beiden Gruppen. Es ist möglich, dass die partielle Hydrolyse von Arabinoxylanen durch die Xylanase im vorderen Teil des Verdauungstraktes zu höheren Stoffwechselaktivitäten geführt hat und in den hinteren Teilen des Dünndarmes hingegen wegen mangelnder Substrate weniger Vertreter dieser Art vorkamen. Die Ergebnisse des Agardiffusionsassays zum Nachweis der β -Glucanasen weisen aber darauf hin, dass in allen Abschnitten des Dünndarmes der Anteil NSP-abbauender Mikroorganismen durch die Xylanase erhöht wird. Wie bereits aufgeführt, könnte es sich dabei um andere Vertreter der *Enterococcus spp.* oder um Vertreter der *Streptococcus spp.* oder *Bacteroides spp.* handeln (BECKMANN *et al.*, 2000b). *E.faecalis* und *E.faecium* wurden aus dem Verdauungstrakt gesunder Hühner isoliert und scheinen zu den zahlenmäßig bedeutsamsten Vertretern dieser Spezies im Verdauungstrakt zu gehören (DEVRIESE *et al.*, 1991, KAUKAS *et al.*, 1988). Allerdings wird diesen beiden Vertretern auch eine Rolle bei der Entstehung von Krankheiten zugeschrieben. Dabei handelt es sich jedoch in der Regel um Fälle, bei denen diese Enterokokken aus dem Darm in den Organismus übergetreten sind (z.B. Endocarditis, intraabdominale Infektionen). Vor allem für Isolate von *E.faecalis* sind mehrere Virulenzfaktoren nachgewiesen (EATON und GASSON, 2001). Die Autoren stellten in ihrer Untersuchung fest, dass die untersuchten *E.faecium*-Isolate grundsätzlich frei von Virulenzfaktoren sind, konnten diese jedoch bei einzelnen klinischen Isolaten nachweisen. In seinem natürlichen Habitat scheinen Vertreter der Art *E.faecium* jedoch eine protektive Wirkung für den Wirt zu besitzen und finden auch Anwendungen in probiotischen Formulierungen in der Tierernährung. Ein antagonistischer Effekt eines *E.faecium*-Stammes auf die Besiedlung des Darmes mit geflügelpathogenen Salmonellen wurde nachgewiesen (AUDISIO *et al.*, 1999).

Es ist als bedauerlich einzuschätzen, dass es in der vorliegenden Untersuchung nicht gelungen ist, eine Differenzierung der 16S rRNA von *E.faecalis* und *E.faecium* vorzunehmen. Auch der Versuch, die Stoffwechselaktivitäten dieser beiden Vertreter der *Enterococcus spp.* über den Nachweis der 23S rRNA mittels der Oligonukleotidsonden S-S-Efaem-0141-a-A-20 und DB6 voneinander zu unterscheiden, führte nicht zum erwünschten Ergebnis. Ein Lösungsansatz für dieses Problem könnte in der Nutzung der „intergenic spacer region“, einer Region zwischen den Genen, welche die 16S und 23S rRNA codieren, liegen. Eine solche Technik wurde beispielsweise von BARRY *et al.* (1991) zur Differenzierung von Vertretern der *Clostridium spp.* angewendet.

Ein Nachweis der Stoffwechselaktivitäten weiterer Vertreter der *Enterococcus spp.* wäre ebenfalls wünschenswert gewesen. Für den größten Teil der Artensonden für diese Bakteriengruppe waren jedoch keine spezifischen Hybridisierungsbedingungen zu ermitteln. Die Sonden S-S-Ecae-0181-a-A-24 und S-S-Ecasflaga-0185-a-A-21 konnten zwar eingesetzt werden, bei der Hybridisierung waren aber keine Signale erzielt worden. Dies ist zunächst erstaunlich, da *E.caecorum* und *E.gallinarum* als wichtige Vertreter der Enterokokken im Verdauungstrakt von Hühnern gelten (DEVRIESE *et al.*, 1991, KAUKAS *et al.*, 1988). *E.caecorum* war von DEVRIESE *et al.* (1991) bei einer großen Zahl von Versuchstieren einer vergleichbaren Altersgruppe bereits in Kropf und Dünndarm festgestellt worden, seltener hingegen im Caecum. Hier wäre in der vorliegenden Untersuchung also ein Nachweis zu erwarten gewesen. KAUKAS *et al.* (1988) untersuchten hingegen die faecalen *Enterococcus*-Populationen, so dass nicht auszuschließen ist, dass *E.gallinarum* vor allem die Caeca besiedelt. Es besteht aber die Möglichkeit, dass die Nachweisgrenzen von S-S-Ecae-0181-a-A-24 und S-S-Ecasflaga-0185-a-A-21 unter den gegebenen Bedingungen unzureichend waren, um möglicherweise geringe Stoffwechselaktivitäten von weniger dominanten Vertretern der *Enterococcus spp.* nachzuweisen.

6.6.4 Nachweis von *Lactobacillus spp.*

Den Keimzahlen der Vertreter der *Lactobacillus spp.* in Abhängigkeit von der Diät wird stets eine besondere Aufmerksamkeit gewidmet. Sie gelten gemeinhin uneingeschränkt als wünschens- und förderungswerte Besiedler des Darmes und finden vielfach in der Humanernährung Anwendung als probiotisch wirksame Mikroorganismen.

Durch die Weizen-Roggen-Diät wurden die Stoffwechselaktivitäten der thermophilen *Lactobacillus spp.* gegenüber der Mais-Soja-Diät deutlich gesenkt. Auch hier muss den Aussagen von UNTAWALE und MCGINNIS (1979) widersprochen werden, die, wie auch für die *Enterococcus spp.* gegenüber einer Kontrollgruppe eine Erhöhung der Keimzahlen von Vertretern der *Lactobacillus spp.* bei Einsatz einer Roggen-Diät feststellten. Auch ein völlig fehlender Einfluss auf die *Lactobacillus spp.*-Populationen bei hochviskösen Diäten (LANGHOUT *et al.*, 1999) kann nicht bestätigt werden. Hier könnten aber unterschiedliche Versuchsbedingungen zu unterschiedlichen Ergebnissen führen. Während die Versuchsdiät bei den Untersuchungen von UNTAWALE und MCGINNIS (1979) auf Roggen basierte, und die Erhöhung der Viskosität bei LANGHOUT *et al.* (1999) durch Zitruspektin realisiert wurde, kam in der vorliegenden Untersuchung eine sehr weizenreiche Diät zum Einsatz.

Der Xylanasezusatz zu der pentosanreichen Diät führte über den gesamten Versuchszeitraum betrachtet in allen Darmabschnitten zu höheren Stoffwechselaktivitäten der Laktobazillen gegenüber der nicht supplementierten Gruppe. Dieses Ergebnis ist vor allem auf besonders hohe Stoffwechselaktivitäten am 21. Lebenstag zurückzuführen. An den übrigen Lebenstagen waren insgesamt geringere Aktivitäten zu beobachten. GRAHAM (1996) und HOCK *et al.* (1997b) konnten in ihren Untersuchungen weniger Laktobazillen bei Weizendiäten mit Xylanasezusatz im Vergleich zu einer nicht supplementierten Gruppe nachweisen. Allerdings beziehen sich diese Angaben bei GRAHAM (1996) auf 21 Tage alte Broiler, bei denen in der vorliegenden Untersuchung höhere Stoffwechselaktivitäten nachgewiesen wurden. VAHJEN *et al.* (1998) stellten bei Broilern im vergleichbaren Altersabschnitt nur für den 28. Lebenstag der Tiere im Ileum eine Verringerung der luminalen *Lactobacillus*-Populationen bei einer Weizendiät mit Xylanase fest, ansonsten blieben die Populationen unbeeinflusst. Die Autoren verweisen darauf, dass zum Nachweis der Vertreter der *Lactobacillus spp.* mit üblichen „Selektivmedien“ eine zusätzliche mikroskopische Kontrolle der Zellformen nötig ist. Auf MRS-Agar (De Man, Rogosa und Sharpe-Agar) kann auch Wachstum kokkenförmiger Bakterien und, bei anaerober Inkubation, von Bifidobakterien beobachtet werden. Dadurch ergeben sich unterschiedliche Ergebnisse bei Anwendung unterschiedlicher Methoden. Zusätzlich scheinen die Laktobazillen oder Vertreter einzelner Arten der *Lactobacillus spp.* variabel auf diätbedingte Einflüsse zu reagieren (HÜBENER *et al.*, 2002), was ebenfalls zu den verschiedenen Ergebnissen der einzelnen Untersuchungen führen könnte. Eine Erklärung, warum es in der vorliegenden Untersuchung in der Enzymgruppe zu einem solch starken Anstieg der Stoffwechselaktivitäten zum 21. Lebenstag gekommen ist, kann nicht gegeben werden, zumal für den 28. Lebenstag der Tiere wieder geringere Aktivitäten beobachtet wurden. Mögliche Verschiebungen innerhalb des Artenspektrums innerhalb der thermophilen Vertreter der *Lactobacillus spp.* durch diätbedingte Milieuänderungen im Verdauungstrakt des Broilers sind bislang nicht eingehend untersucht worden. In dieser Untersuchung wurden Oligonukleotidsonden zum Nachweis der 16S rRNA von *L. acetolerans*, *L. acidophilus*, *L. amylophilus*, *L. fermentum*, *L. gasseri* und *L. reuteri* eingesetzt. Die 16S rRNA von *L. fermentum*, *L. gasseri* und *L. reuteri* konnte in den Proben der Versuchstiere nachgewiesen werden. Dabei war eine sehr einheitliche Stoffwechselaktivität von *L. fermentum* in den Proben aller 3 Gruppen festgestellt worden. Die Unterschiede waren sowohl zwischen den als auch tierindividuell innerhalb der Gruppen sehr gering. Es scheint aber eine Verschiebung der Aktivitäten im Verdauungstrakt nach distal bei pentosanreichen Diäten stattzufinden. Auch die Stoffwechselaktivitäten von *L. reuteri* scheinen durch den Pentosangehalt der Diät beeinflusst zu werden. Es war insgesamt eine Verschiebung der Aktivitäten nach distal bei den Tieren mit Weizen-Roggen-Diät gegenüber der Maisgruppe zu beobachten. Allerdings ist auch ein deutlicher Einfluss des Alters der Tiere auf die gemessenen Aktivitäten zu beobachten. Bei der Betrachtung der Mittelwerte für die einzelnen Lebenstage zeigt sich, dass die Tiere der Maisgruppe am 28. Lebenstag in allen Darmabschnitten die höchsten Werte aufwiesen, während bei den beiden Gruppen mit pentosanreicher Diät teilweise signifikante Verringerungen mit steigendem Alter zu beobachten waren. Welche Faktoren hier eine Rolle spielen, konnte in der vorliegenden Untersuchung nicht geklärt werden. Für *L. gasseri* war insgesamt eine Verringerung der Aktivitäten durch die pentosanreiche Diät gegenüber der Maisdiät zu beobachten. Durch den Einsatz der Xylanase waren gegenüber der Gruppe ohne Enzymzusatz

die Aktivitäten im Jejunum weiter gesenkt, im Ileum waren in der Summe höhere Aktivitäten zu beobachten. Dieser Vertreter der *Lactobacillus spp.* könnte durch lösliche Fragmente der NSP gehemmt werden. Ein höherer Gehalt dieser Fragmente führte so zu einer Verringerung der gemessenen Aktivitäten bei der Weizen-Roggen-Gruppe gegenüber der Maisgruppe. Durch den Zusatz der Xylanase könnten mehr lösliche Abbauprodukte entstanden sein, die zu einer weiteren Hemmung von *L.gasseri* geführt haben könnten.

L.acidophilus wurde von MORISHITA *et al.* (1971) als einer der Hauptvertreter der *Lactobacillus spp.* im Verdauungstrakt des Huhns beschrieben und konnte auch von RUBIO *et al.* (1998) im Verdauungstrakt von Broilern nachgewiesen werden. Trotzdem konnte die 16S rRNA dieses Vertreters in der vorliegenden Untersuchung nicht nachgewiesen werden. Man kann vermuten, dass die Nachweisgrenze der entsprechenden Oligonukleotidsonde für die im Darmlumen vorhandene ribosomale 16S RNA von *L.acidophilus* unterschritten wurde. Literaturangaben über das Vorkommen von *L.amylophilus* und *L.acetolerans* im Dünndarm des Broilers liegen nicht vor. Es besteht also entweder die Möglichkeit, dass diese beiden Vertreter im Dünndarm des Broilers nicht oder nur in geringen Mengen vorhanden sind, so dass auch hier die Nachweisgrenzen der entsprechenden Oligonukleotidsonden unterschritten wurden.