

8. Zusammenfassung

Der Einsatz Nicht-Stärke-Polysaccharide (NSP)-hydrolysierender Enzyme gehört seit langer Zeit zur Praxis in der Broilermast. Obwohl eine ganze Kaskade von antinutritiven Effekten der löslichen Nicht-Stärke-Polysaccharide Gegenstand umfangreicher Untersuchungen war und ist, bleibt für einige Aspekte noch immer ein hoher Aufklärungsbedarf. Insbesondere auf die Rolle veränderter mikrobieller Populationen im Verdauungstrakt wird immer wieder verwiesen, ohne dass diese umfassend bekannt ist.

Die vorliegende Arbeit sollte einen Beitrag zum Verständnis von Einflüssen unterschiedlich gestalteter Diäten und einer Xylanase auf mikrobielle Gemeinschaften im Verdauungstrakt von Broilern leisten. Es wurde ein Tierversuch durchgeführt, bei dem durch unterschiedlichen Gehalt der Versuchsdüäten an löslichen NSP und durch den Einsatz eines Xylanasepräparates Veränderungen mikrobieller Gemeinschaften im vorderen Verdauungstrakt provoziert wurden. Es kamen eine auf Mais und Soja basierende Diät mit geringem Gehalt an löslichen NSP und zwei Diäten mit Weizen und Roggen als Hauptkomponenten, welche einen hohen Gehalt an löslichen NSP aufwiesen, zum Einsatz. Eine der beiden Weizen-Roggen-Diäten war mit einer Xylanase ergänzt worden. Alle Diäten enthielten Talg als Fettquelle und waren nahezu isoenergetisch und isonitrogen gestaltet.

Im Rahmen dieses Versuches wurden die zootecnischen Leistungen der Versuchstiere erfasst. Am 7., 14., 21. und 28. Lebenstag wurden Versuchstiere geschlachtet und Digesta aus den Darmabschnitten Duodenum, Jejunum, vorderes und hinteres Ileum, sowie den Caeca gewonnen. Die Proben aus Duodenum, Jejunum, vorderem und hinterem Ileum vom 14., 21. und 28. Lebenstag der Tiere wurden zur Bestimmung intestinaler Enzymaktivitäten verwendet. Für molekularbiologische Untersuchungen wurden die Proben aus Jejunum, vorderem und hinterem Ileum verwendet. Durch Zentrifugation der Proben wurden Überstände gewonnen und damit Agardiffusionsassays zur Bestimmung verschiedener Enzymaktivitäten durchgeführt. Zur molekularbiologischen Untersuchung von RNA-Extrakten aus den Digestaprobe n musste die Spezifität und Sensitivität von Digoxygeninmarkierten Oligonukleotidsonden, welche teilweise der Literatur entnommen und teilweise am Institut für Tierernährung der FU Berlin entwickelt worden waren, überprüft werden. Dabei wurden mögliche Abhängigkeiten der Signalstärken von der jeweils eingesetzten RNA-Menge geprüft. Nur Sonden mit reproduzierbar spezifischen Ergebnissen wurden in weiteren Untersuchungen eingesetzt. Die Gewinnung der Nukleinsäuren aus den Digestaprobe n erfolgte mittels modifizierter Phenol:Chloroform-Extraktion. Die Rohextrakte wurden säulenchromatographisch in DNA und RNA aufgetrennt und gereinigt. Durch Hybridisierung der aus den Proben extrahierten Gesamt-RNA mit 16S und 23S rRNA Oligonukleotidsonden wurde die Menge ribosomaler RNA ausgewählter Bakteriengruppen und -arten in den Extrakten bestimmt. Sofern möglich, wurde eine Umrechnung der jeweiligen Lichtintensitäten in ng spezifische RNA je µg Gesamt-RNA vorgenommen. Zur Auswertung der Ergebnisse wurde das arithmetische Mittel und die Standardabweichung der parallel angelegten Proben berechnet. Zur statistischen Bewertung wurden die Daten aus den einzelnen Darmabschnitten über den gesamten Versuchszeitraum zu einer Datengrundlage zusammengefasst.

Die zootechnischen Leistungen der Versuchstiere lassen die in der Literatur gut belegten antinutritiven Effekte von Getreidesorten mit stark viskositätsbildenden Eigenschaften erkennen.

Mittels Agardiffusionsassays wurden die Aktivitäten der Enzyme zum Abbau von NSP (Xylanase- und 1,3-1,4- β -Glucanaseaktivitäten) bestimmt. Es zeigte sich, dass durch die höhere Konzentration löslicher NSP in der Diät vor allem solche Mikroorganismen gefördert wurden, zu deren Enzymausstattung β -Glucanasen gehören. Die partielle Hydrolyse der Pentosane durch die zugesetzte Xylanase führte zu einer zusätzlichen Förderung solcher Bakterien. Ein stimulierender Einfluss von löslichen NSP und/oder der Xylanase auf xylanspaltende Mikroorganismen konnte in der vorliegenden Untersuchung nicht festgestellt werden. Ebenfalls durch Agardiffusionsassays sollte Hinweisen aus der Literatur auf eine schlechtere Verdauung der Fette bei Diäten mit hohen Gehalten an löslichen NSP nachgegangen werden. Die Ergebnisse der vergleichenden Messung der Gallensäurehydrolase- und Lipaseaktivität in diesem Versuch lassen jedoch eindeutige Relationen zwischen den Aktivitäten dieser Enzyme und der in der Literatur gut belegten schlechteren Verwertung der Nahrungsfette nicht zu. Bei den Lipaseaktivitäten wurden höhere Aktivitäten in der Gruppe mit pentosanarmer Diät erwartet. Der Umstand, dass bei den Gruppen mit pentosanreicher Diät höhere Aktivitäten gemessen wurden, könnte auf eine kompensatorische Regulation und so auf negative Einflüsse löslicher NSP auf die Fettverdauung hindeuten. Höhere Aktivitäten im Duodenum bei der Enzymgruppe gegenüber der Weizen-Roggen-Gruppe weisen auf eine bessere Durchmischung der Digesta mit Verdauungsenzymen hin. Die in der Literatur beschriebene Erhöhung mikrobieller Gallensäurehydrolaseaktivitäten bei hochviskösen Diäten konnte nicht beobachtet werden.

Es wurde versucht, die mikrobiellen Gemeinschaften im Verdauungstrakt mittels Hybridisierung der aus Digestaprobe der Versuchstiere gewonnenen Gesamt-RNA mit spezifischen Oligonukleotidsonden auf der Ebene von Bakteriengruppen und -arten zu charakterisieren. Die Überprüfung von Oligonukleotidsonden, welche der Literatur entnommen oder am Institut für Tierernährung der FU Berlin entwickelt wurden, hinsichtlich ihrer Spezifität zeigte, dass für gruppenspezifische Oligonukleotidsonden durchweg spezifische Hybridisierungsbedingungen zu schaffen waren. Entsprechend konnten die Oligonukleotidsonden S-D-Bact-0338-a-A-18 (bakterielle 16S rRNA), S-G-Bact-0303-a-A-17 (*Bacteroides-Pretovela*-Cluster), S-*-Chis-0150-a-A-23 (*Clostridium histolyticum*-Gruppe), 16E1 (*E.coli* und *Shigella spp.*), S-G-Enc-038-a-A-18 (*Enterococcus spp.*), S-F-Lact-0770-a-A-24 (*Lactobacillus spp.*) und S-G-Bif-1432-a-A-21 (*Bifidobacterium spp.*) zu Untersuchungen der RNA-Extrakte eingesetzt werden. Unter den am Institut für Tierernährung entwickelten Oligonukleotidsonden zum Nachweis von Vertretern der *Enterococcus spp.* konnten lediglich für S-S-Ecaec-0181-a-A-24 (*E.caecorum*), S-S-Efaes-1237-b-A-17 und S-S-Efeas-203-a-A-20 (*E.faecalis*, detektierten auch *E.faecium*), sowie S-S-casflaga-0185-a-A-21 (*E.casseliflavus*, *E.flavescens*, *E.gallinarum*, war nur für *E.gallinarum* spezifisch) spezifische Hybridisierungsbedingungen ermittelt werden. Sondenkandidaten zum Nachweis von *E.asini*, *E.avium/E.raffinosis*, *E.columbae*, *E.faecium* und *E.hirae* konnten wegen mangelnder Spezifität nicht zur Untersuchung der ENA-Extrakte eingesetzt werden. 23S rRNA-Oligonukleotidsonden zum Nachweis von *E.faecium* (DB6), *E.avium*, *E.malodoratus*, *E.pseudoavium* und *E.raffinosis* (DB9), von *E.durans* und *E.hirae* (Eduhi9b), sowie von *E.gallinarum* (Ega9b) zeigten bei Untersuchungen zur Spezifität keinerlei Signale. Die zum Nachweis von Vertretern der *Lactobacillus spp.* eingesetzten Oligo-

nukleotidsonden S-S-Lacet-0061-a-A-25 (*L. acetolerans*), S-S-Lacid-2519-a-A-20 (*L. acidophilus*), S-S-Lamy-0499-a-A-24 (*L. amylophilus*), S-S-Lfer-061-a-A-26 (*L. fermentum*), S-S-Lgas-0054-a-A-24 (*L. gasseri*) und S-S-Lreu-0485-a-A-23 (*L. reuteri*) waren bereits erfolgreich in vorangegangenen Untersuchungen am Institut für Tierernährung der FU Berlin eingesetzt worden.

Bei fast allen Oligonukleotidsonden konnte durch Auftrag der jeweiligen Lichtintensitäten gegen die Mengen der eingesetzten Gesamt-RNA ein Bereich linearer Abhängigkeit dieser beiden Parameter ermittelt werden. Dieser Umstand ermöglichte eine Umrechnung von Signalstärken in den Gehalt der Proben an spezifischer 16S bzw. 23S rRNA/ μg Gesamt-RNA. Bei der Hybridisierung der RNA-Extrakte wies S-S-Lfer-061-a-A-26 eine exponentielle Beziehung zwischen RNA-Menge und Signalstärke auf. Bei Einsatz der Oligonukleotidsonde (16E1) war keine Abhängigkeit zu beobachten.

Die Einordnung der Ergebnisse der Hybridisierungen in die in der Literatur veröffentlichten Erkenntnisse erwies sich als schwierig, da eindeutige Angaben über den Gehalt einzelner Bakterienzellen an ribosomaler RNA in Masseinheiten bislang fehlen und Literaturangaben zu mikrobiellen Gemeinschaften im Verdauungstrakt von Broilern durch Kultivierung erzeugt wurden. Vergleiche mit solchen Untersuchungen können folglich nur unter Vorbehalten durchgeführt werden.

Der Einsatz von Diäten, welche bezüglich ihres Gehaltes an löslichen NSP unterschiedlich gestaltet waren, und der Einsatz einer Xylanase führte zu unterschiedlichen Mengen von ribosomaler RNA der ausgewählten Bakteriengruppen und -arten in den Proben. Während die bakteriellen Gesamtstoffwechselaktivitäten und die Aktivitäten von Enterobakterien und Enterokokken bei der Weizen-Roggen-Diät im Vergleich zur Maisgruppe nach distal verschoben wurden, konnte insgesamt eine Verringerung der Aktivitäten von Laktobazillen beobachtet werden. Der Xylanasezusatz führt zu einer Senkung der Stoffwechselaktivitäten von Enterobakterien gegenüber der nicht supplementierten Gruppe, die Aktivitäten von Laktobazillen stiegen an. Eine Verschiebung der bakteriellen Gesamtaktivitäten gegenüber der Mais-Diät nach distal ist geringer ausgeprägt. Die Untersuchung ausgewählter Arten der Enterokokken und Laktobazillen zeigten, dass qualitative Änderungen innerhalb von Bakteriengruppen bei unterschiedlich gestalteten Diäten stattfinden. So werden vermutlich Enterokokken und Laktobazillen mit der Fähigkeit zum Abbau von β -Glucanen gefördert, wenn NSP in der Diät vermehrt enthalten sind. Der Zusatz einer Xylanase könnte diese Mikroorganismen zusätzlich fördern. Andere Vertreter dieser Bakteriengruppen scheinen durch einen hohen NSP-Gehalt der Diät im Wachstum gehemmt zu werden. Hier kann der Zusatz einer Xylanase zu einer weiteren Hemmung führen.

Weiterführende Untersuchungen zur Diversität der mikrobiellen Gemeinschaften im Verdauungstrakt von Broilern und deren Charakterisierung sind wünschenswert.

9. Summary

Application of rRNA oligonucleotide probes for the detection of nutritional influences on bacterial metabolic activities in the gastrointestinal tract of broilers

Non-starch-polysaccharide(NSP)-hydrolyzing enzymes are commonly used in broiler fattening. The possible mode of action of soluble non-starch-polysaccharides on growth depressing effects and the effect of NSP-hydrolyzing enzymes has been investigated for a long time. However, there is still a lack of knowledge concerning the role of intestinal microbial communities, which is often pointed out even though its role is not known in detail yet.

The aim of this thesis was to contribute to a better knowledge and understanding of microbial communities in the gastrointestinal tract of broiler chickens and their changes due to different diets.

A feeding trial was carried out to provoke changes in intestinal microbial communities by modification of the NSP content in different diets and the use of a xylanase preparation. Birds were fed either a maize based diet with low content of soluble NSP or diets based on wheat and rye with high contents of soluble NSP. One of the wheat and rye based diets was supplemented with a xylanase. Tallow was used as fat source in all diets.

Performance of birds was recorded and animals were killed on day 7, 14, 21, and 28. Digesta were sampled from the duodenum, jejunum, upper and lower part of the ileum and caeca. Samples from the duodenum, jejunum, upper and lower ileum from day 14 to day 28 were used for further examinations. Supernatants of digesta samples were collected by centrifugation and used for agar diffusion assays to examine selected enzyme activities. For molecular studies digoxigenin labeled oligonucleotide probes were tested for specific and sensitive results in hybridization experiments and relations between optical density and amount of used RNA were examined. Only oligonucleotide probes with reproducible specific results were used for further examinations. Oligonucleotide probes were taken from literature references or developed at the Institute of Animal Nutrition, Free University Berlin. Nucleid acids were extracted from digesta samples using a modified phenol:chloroform protocol and raw extractions were divided in RNA and DNA and purified using silica gel columns. The amount of ribosomal RNA of selected bacterial groups and species was determined by hybridization of samples with specific 16S/23S oligonucleotide probes and the achieved optical density was converted in specific RNA in ng per μg total RNA. For statistical interpretation, mean values and standard deviations of triplicate samples were calculated. Statistical analysis was performed by using a data pool based on the total trial period.

The performance of the birds showed antinutritive effects of soluble NSP in broiler diets, which have been well documented in literature.

Xylanase and β -glucanase activities in digesta supernatants were determined by agar diffusion assays. The assays showed that an increasing content of NSP in broiler diets promotes the activity of those bacteria which are able to hydrolyze β -glucans. Partial hydrolysis of NSP by xylanase supplementation led to a further increase. An influence of soluble NSP and/or xylanase supplementa-

tion on xylan degrading microorganisms could not be shown. Suggestions to the negative effect of NSP on digestibility of fat were also elaborated by agar diffusion assays. However, the obtained results of lipase and bile salt hydrolase activity gave no evidence that a relation exists between the activity of these enzymes and the well documented depression in fat digestibility when NSP are added to broiler diets. Higher activities of lipases were expected in samples from birds fed the maize based diet. However, higher activities were observed in animals fed the wheat and rye based diets. This could indicate regulatory processes to compensate inferior fat digestion. Higher activities of lipases in the duodenum of the enzyme supplemented group in comparison to the group with wheat and rye diet indicate a better antiperistaltic movement of digesta. Higher activities of bacterial bile salt hydrolases due to high intestinal viscosity as described in literature could not be observed.

Microbial communities of the digestive tract of broilers were characterized by hybridization of RNA from digesta samples with specific oligonucleotide probes on the level of bacterial groups and species.

Hybridization results of oligonucleotide probes have shown that specific hybridization parameters could be achieved for all of the group specific oligonucleotide probes. According to these results the oligonucleotide probes S-D-Bact-0338-a-A-18 (total bacterial 16S rRNA), S-G-Bact-0303-a-A-17 (*Bacteroides-Prevotella*-cluster), S*-Chis-0150-a-A-23 (*Clostridium histolyticum*-group), 16E1 (*E.coli* and *Shigella spp.*), S-G-Enc-038-a-A-18 (*Enterococcus spp.*), S-F-Lact-0770-a-A-24 (*Lactobacillus spp.*) and S-G-Bif-1432-a-A-21 (*Bifidobacterium spp.*) were used to screen RNA extracts of digesta samples. However, only S-S-Ecaec-0181-a-A-24 (*E.caecorum*), S-S-Efaes-1237-b-A-17, S-S-Efeas-203-a-A-20 (*E.faecalis* and *E.faecium*), and S-S-casflaga-0185-a-A-21 (comprising *E.casseliflavus*, *E.flavescens*, *E.gallinarum*, but specific only for *E.gallinarum*) that were developed at the Institute of Animal Nutrition, Free University Berlin, have shown specific results on species level. Sequence candidates tested for their applicability as oligonucleotide probes to detect *E.asini*, *E.avium/E.raffinosis*, *E.columbae*, *E.faecium* and *E.hirae* could not be used to screen RNA extracts due to their lack of specificity. 23S rRNA oligonucleotide probes taken from literature references to detect *E.faecium* (DB6), *E.avium*, *E.malodoratus*, *E.pseudoavium* and *E.raffinosis* (DB9), *E.durans* and *E.hirae* (Eduhi9b), and *E.gallinarum* (Ega9b) have shown no signals with the tested conditions. S-S-Lacet-0061-a-A-25 (*L.acetolerans*), S-S-Lacid-2519-a-A-20 (*L.acidophilus*), S-S-Lamy-0499-a-A-24 (*L.amylophilus*), S-S-Lfer-061-a-A-26 (*L.fermentum*), S-S-Lgas-0054-a-A-24 (*L.gasseri*) and S-S-Lreu-0485-a-A-23 (*L.reuteri*) had been used successfully in earlier experiments at the Institute of Animal Nutrition, Free University Berlin.

Most of the probes presented a linear relationship between chemiluminescence and amount of RNA. This could be used to calculate the amount of specific RNA in the samples per μg total RNA.

In hybridization experiments using RNA extracts from digesta samples S-S-Lfer-061-a-A-26 showed an exponential relationship between amount of RNA and intensity of signals. No relationship was observed for the enterobacterial probe 16E1.

The lack of information about the content of ribosomal RNA of single bacterial cells made it difficult to compare results of hybridization experiments with data from cultivation methods published in literature.

Diets with different contents of soluble NSP and supplementation of a wheat and rye based diet led to different amounts of ribosomal RNA of selected bacterial groups and species. In comparison to the maize fed broilers total bacterial metabolic activities and metabolic activities of enterobacteria and enterococci were shifted distal parts of small intestine in birds fed the wheat and rye based diet. Furthermore, metabolic activities of lactobacilli decreased. Xylanase supplementation led to lower metabolic activities of enterobacteria and higher activities of lactobacilli than in the unsupplemented group with wheat and rye based diet. The shift of total bacterial activities to the lower parts of the intestine was less pronounced. Hybridization of selected species of enterococci and lactobacilli showed qualitative modifications within bacterial groups according to different diets.

Further examinations are necessary to evaluate and enumerate the microbial diversity in the intestine of broilers.