

## Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Literaturübersicht</b> .....	1
1.1.	Einleitung.....	1
1.2	Das intestinale Ökosystem.....	3
1.2.1	Methodische Ansätze zur Charakterisierung intestinaler Bakteriengemeinschaften .....	3
1.2.2	Die Mikrobiota des Verdauungstrakts.....	8
1.2.3	Wechselbeziehungen zwischen Wirt und Mikrobiota.....	9
1.2.4	Die bakterielle Zusammensetzung im Verdauungstrakt des Schweines.....	12
1.3	Probiotika.....	15
1.3.1	Definitionen.....	15
1.3.2	Einsatzgebiete von Probiotika.....	15
1.3.3	Anforderungen an Probiotika.....	16
1.3.4	Vermutete und bestätigte Wirkmechanismen von Probiotika.....	17
1.3.4.1	Auswirkungen auf Mikrobiota und pathogene Mikroorganismen .....	17
1.3.4.2	Auswirkungen auf das Immunsystem .....	19
1.3.4.3	Andere Effekte von Probiotika.....	20
1.3.5	Das Probiotikum <i>Enterococcus faecium</i> NCIMB 10415 .....	22
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	24
2.1	Tiere und Haltungsbedingungen .....	24
2.2	Aufteilung der Versuchsgruppen .....	24
2.3	Versuchsdiäten .....	25
2.4	Zootechnische Leistungen.....	26
2.4.1	Leistungsdaten der Sauen.....	26
2.4.2	Lebendmasse, Futteraufnahme und Futtermittelverwertung der Ferkel.....	26
2.4.3	Durchfall / Kotkonsistenz.....	26
2.5	Probengewinnung .....	27
2.5.1	Gewinnung der Futterproben .....	27
2.5.2	Gewinnung der Kotproben.....	27
2.5.3	Gewinnung der Proben aus dem Verdauungstrakt.....	27
2.6	Messung von Stoffwechselprodukten in Digesta.....	28
2.6.1	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -Bestimmung in Digesta mittels Ionen- selektiver Elektrode.....	28
2.6.2	Enzymatische Bestimmung von Laktat.....	28
2.6.3	Gaschromatographische Messung der flüchtigen Fettsäuren (FFS) .....	29
2.6.4	pH- Messung in Mageninhalt.....	29

2.7	Mikrobiologische Methoden .....	30
2.7.1	Bestimmung der Zellzahlen von Enterokokken .....	30
2.7.1.1	Kultivierung von Enterokokken aus Kot, Digesta und Futter .....	30
2.7.1.2	Nachweis des Probiotikums in Futter, Kot und Digesta .....	30
2.7.2	Zellzahlen von Milchsäurebakterien, Coliformen und Gesamt- Anaerobiern .....	31
2.8	Molekularbiologische Methoden .....	32
2.8.1	Herstellung der Ziel- DNA für die Polymerase- Kettenreaktion .....	32
2.8.1.1	Ziel- DNA aus Bakterienkolonien bzw. Kultur .....	32
2.8.1.2	Extraktion der Gesamt-Nukleinsäuren aus Digesta und Kot .....	32
2.8.1.3	DNA-Reinigung der Rohextrakte.....	33
2.8.1.4	Messung des Gesamt-DNA-Gehaltes.....	33
2.8.2	Spezifische Koloniehybridisierung von <i>E. faecium</i> NCIMB 10415 .....	33
2.8.2.1	Herstellung der <i>E. faecium</i> NCIMB 10415- spezifischen DNA-Sonde.....	33
2.8.2.2	Kolonietransfer .....	34
2.8.2.3	DNA-DNA- Hybridisierung.....	35
2.8.2.4	Detektion Chemolumineszenz- positiver Kolonien .....	35
2.8.2.5	Dokumentation der Chemolumineszenzsignale .....	35
2.8.2.6	Darstellung der Daten.....	36
2.8.3	Untersuchung des Versuchstierbestandes auf das Vorkommen pathogener <i>E. coli</i> mittels Multiplex – Polymerase- Kettenreaktion (mPCR).....	36
2.8.3.1	Primersequenzen zum Nachweis von <i>E. coli</i> - Virulenzfaktoren.....	37
2.8.3.2	<i>E. coli</i> - mPCR- Mastermix.....	38
2.8.3.3	PCR Programm für <i>E. coli</i> - mPCR .....	38
2.8.3.4	Agarose- Gelelektrophorese für die mPCR.....	38
2.8.4	Untersuchungen zur fäkalen mikrobiellen Diversität mit Hilfe der denaturierenden Gradienten- Gel- Elektrophorese (DGGE).....	39
2.8.4.1	PCR für die DGGE.....	40
2.8.4.2	Polyacrylamid- Gradienten-Gel für die DGGE.....	41
2.8.4.3	Gelfärbung.....	41
2.8.4.4	Auswertung der Bandenmuster .....	41
2.9	Statistische Untersuchungen .....	43
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	44
3.1	Leistungsparameter .....	44
3.1.1	Lebendmasse, Wurfgröße sowie Ferkelverluste der Sauen .....	44

3.1.2	Leistungsdaten der Ferkel .....	45
3.1.3	Kotkonsistenz / Durchfall.....	45
3.2	Bakterielle Stoffwechselprodukte in Darminhalt.....	46
3.2.1	Ammoniak- Konzentrationen in Digesta.....	46
3.2.2	Konzentrationen von Gesamt- Laktat in Digesta .....	47
3.2.3	Flüchtige Fettsäuren (FFS) in Digesta .....	48
3.2.4	pH-Werte in Mageninhalt von Ferkeln .....	48
3.3	Nachweis bakterieller Gruppen in Digesta durch selektive Kultivierung.....	49
3.4	Spezifische Zellzahlen des Probiotikums in Kot und Digesta .....	49
3.4.1	Kultivierung von Enterokokken .....	49
3.4.2	Spezifische Zellzahlen des Probiotikums im Futter .....	50
3.4.3	Koloniehybridisierung und spezifische Zellzahlen aus Kot.....	51
3.4.4	Koloniehybridisierung und spezifische Zellzahlen aus Digesta .....	52
3.5	Multiplex-Polymerase-Kettenreaktion für <i>E. coli</i> - Pathogenitätsfaktoren .....	53
3.5.1	Zellzahlen der Coliformen in Sauen- und Ferkelkot.....	53
3.5.2	Nachweis ausgewählter Pathogenitätsgene aus fäkalen <i>E. coli</i> - Isolaten .....	54
3.6	Denaturierende Gradienten-Gel- Elektrophorese (DGGE).....	57
3.6.1	Ähnlichkeiten der bakteriellen Zusammensetzung in Ferkelkot.....	57
3.6.1.1	Sörensen- Ähnlichkeitswerte.....	57
3.6.1.2	UPGMA- Dendrogramme .....	60
3.6.2	Bakterielle Diversität im Kot .....	63
<b>4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>64</b>
4.1	Hintergrund und Ziel der Arbeit .....	64
4.2	Leistungsdaten der Versuchstiere .....	65
4.2.1	Lebendmasseentwicklung und Futtermittelverwertung.....	65
4.2.2	Durchfall und Ferkelverluste.....	66
4.3	Bakterielle Zellzahlen und Stoffwechselaktivitäten in Digesta .....	69
4.3.1	Zellzahlen in Digesta und Kot.....	69
4.3.1.1	Nachweis des Probiotikums .....	69
4.3.1.2	Gesamt- Enterokokken und <i>E. faecium</i> NCIMB 10415.....	69
4.3.1.3	Bakterielle Zellzahlen in Digesta .....	71
4.3.2	Bakterielle Stoffwechselaktivität in Digesta .....	73
4.4	Molekularbiologischer Nachweis von <i>E. coli</i> - Pathogenitätsgenen im Kot .....	77
4.5	Diversität und Ähnlichkeit der fäkalen Bakteriengemeinschaft im Gruppenvergleich .....	81

4.6	Schlussfolgerungen .....	83
<b>5.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>85</b>
<b>6.</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>117</b>
6.1	Versuchsrationen.....	117
6.2	Nährmedien für die Mikrobiologie .....	119
6.3	Puffer und Lösungen für die Molekularbiologie .....	120
6.3.1	Lösungen für die Nukleinsäure-Extraktion .....	120
6.3.2	Lösungen für die Gel- Elektrophorese (mPCR, DGGE).....	120
6.3.3	Lösungen für die Koloniehybridisierung .....	122
6.4	Ammoniak- Konzentrationen in Digesta .....	124
6.5	Laktat- Konzentrationen in Digesta .....	125
6.6	Flüchtige Fettsäuren in Digesta.....	126
6.7	Bakterielle Zellzahlen in Digesta.....	128
6.8	Pathogenitätsgene in <i>E. coli</i> - Isolaten aus Ferkelkot .....	130
<b>7.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>131</b>
<b>8.</b>	<b>Summary.....</b>	<b>133</b>
<b>9.</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>135</b>
<b>10.</b>	<b>Selbständigkeitserklärung.....</b>	<b>136</b>