

1. Literaturübersicht

1.1. Einleitung

Der Verdauungstrakt ist für die Lebensfähigkeit und Leistungsfähigkeit höherer Organismen von zentraler Bedeutung. Er ist nicht nur für die Aufnahme und Bereitstellung von Energie, Nährstoffen und Wasser sowie für die Ausscheidung unerwünschter oder schädlicher Stoffe zuständig, sondern auch wesentlich für die Funktion und Leistungsfähigkeit des Immunsystems verantwortlich (Cebra 1999; McCracken 1999; Erickson und Hubbard 2000). Als Konsequenz daraus hat sich der Verdauungstrakt bei Säugetieren und Vögeln zu einem äußerst komplexen Organsystem entwickelt, um den vielfältigen Anforderungen gerecht werden zu können.

Die Funktionsfähigkeit des Verdauungsapparates ist durch das komplexe Zusammenspiel vieler Einzelkomponenten gewährleistet. Aufgenommene Nahrung wird mechanisch, chemisch und enzymatisch aufbereitet und so dem Organismus zugänglich gemacht. Die intestinalen Mikroorganismen sind an der Bereitstellung von Nährstoffen je nach Tierart unterschiedlich stark beteiligt, teilweise sogar essentiell für deren Ernährung zuständig, wie z.B. bei Wiederkäuern oder bestimmten Insektenarten (Savage 1986). Je nachdem kann man sie als Symbionten oder Kommensalen betrachten. Man kann sogar sagen, dass der Säugetierorganismus als Ganzes mehr pro als eukaryotisch ist: schätzungsweise 90 % der in unserem Körper vorhandenen Zellen sind mikrobiellen Ursprungs (Hooper et al. 2002). Eine weitere wesentliche Funktion übernehmen diese Bakterien auch im Sinne einer Schadensabwehr gegenüber Noxen, welche auf den Wirt einwirken, wie z.B. toxische Substanzen, vor allem aber Krankheitserreger (Cummings und Macfarlane 1991; Hooper und Gordon 2001).

Die Mikroorganismen des Verdauungstrakts bilden im Wirt ein komplexes Ökosystem, welches sich im Idealfall, also im gesunden Tier, in einem stabilen Fließgleichgewicht befindet. Dieses bildet zusammen mit dem tierischen Organismus eine komplexe, interaktive organische Einheit von in der Regel gegenseitigem Nutzen (Savage 1977, 1986). Wie aus der Ökologie hinlänglich bekannt ist, führen Veränderungen eines Lebensraumes, insbesondere des Nahrungsangebotes, zu mehr oder weniger tief greifenden Veränderungen im Spektrum vorhandener Organismen. Je nach Spezialisierung verschwinden bestimmte Arten bzw. werden durch andere verdrängt, oder es erfolgt eine Anpassung.

Dieser Problematik sieht sich der Tierorganismus vor allem unserer landwirtschaftlichen Nutztiere an zwei Lebensabschnitten ausgesetzt: kurz nach der Geburt und während des Absetzens.

Bei der Geburt erfolgt die Besiedlung des zuvor sterilen Verdauungstrakts mit den Organismen, welche das Tier von der Scheide, der Haut und der Umgebung

aufnimmt. (Sinkovics und Juhasz 1974; Savage 1977; Sansom und Glead 1981; Mackie et al. 1999; Favier et al. 2002; Hooper et al. 2002; Lenoir-Wijnkoop und Hopkins 2003; Tannock 2004; Inoue, Otsuka et al. 2005; Inoue, Tsukahara et al. 2005). Immunogene Faktoren der Muttermilch (Kollostrum) schützen kurz nach der Geburt die Saugferkel vor Krankheitserregern (Salmon 1999), trotzdem ist es in dieser ersten Phase der Etablierung einer angepassten Mikrobiota für pathogene Organismen leichter, sich im Wirt anzuheften und zu vermehren, da noch nicht alle ökologischen Nischen im Verdauungstrakt besetzt sind (Vanbelle et al. 1990).

Die Phase des Absetzens von der Mutter bedeutet besonders in der konventionellen Landwirtschaft eine tief greifende Veränderung für das Jungtier. Durch die abrupte Umstellung von Muttermilch auf ein Aufzuchtfutter auf Getreidebasis sowie die plötzliche Trennung vom Muttertier ist das Tier erheblichem physischem und psychischem Stress unterworfen. Die Tiere verweigern in der Regel am ersten Tag die Futtaufnahme und beginnen in den folgenden Tagen erst zögerlich zu fressen. Im Darm kommt es zu erheblichen Umbauvorgängen und entzündlichen Reaktionen an der Mucosa mit der Folge, dass die Barrierefunktion des Epithels deutlich gestört ist (McCracken et al. 1999; Spreuvenberg et al. 2001). Die zu diesem Zeitpunkt vom Tier gebildeten Verdauungsenzyme sind noch nicht für feste, faserreiche Nahrung geeignet. Für die bis dahin residenten, an Milchnahrung angepassten Mikroorganismen insbesondere in den hinteren Darmabschnitten bedeutet dies eine dramatische Veränderung ihrer Umweltbedingungen. Durch das völlig veränderte Nahrungsangebot vor allem mit fermentierbaren Nährstoffen (Kohlehydraten) verändert sich auch die Stoffwechselaktivität der Mikroorganismen. Teile der bisherigen Mikrobiota werden zurückgedrängt und durch besser angepasste Mikroorganismen ersetzt (Savage 1977; Inoue, Tsukahara et al. 2005). Auch in dieser Phase, die zudem noch das noch nicht angepasste Immunsystem belastet, ist die Ansiedlung von Krankheitserregern und die Entstehung von Durchfällen und Enterotoxämien begünstigt.

In der vorliegenden Arbeit werden in einem breit angelegten Versuchsansatz die Auswirkungen der Zufütterung eines probiotischen *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 - Präparates auf die intestinale Mikrobiota sowie Gesundheits- und Leistungsparameter von Saug- und Absetzferkel und ihrer Muttertiere im Vergleich mit einer unbehandelten Kontrollgruppe untersucht. Es soll dabei überprüft werden, ob die in der Literatur vielfach beschriebenen positiven Auswirkungen auf Tiergesundheit und Leistung sich bestätigen und durch meßbare Veränderungen der Zusammensetzung und Stoffwechselaktivität der intestinalen Mikrobiota erklärt werden können.

1.2 Das intestinale Ökosystem

1.2.1 Methodische Ansätze zur Charakterisierung intestinaler Bakteriengemeinschaften

Die übliche Vorgehensweise bei der Charakterisierung der bakteriellen Zusammensetzung und Funktion im Verdauungstrakt war lange Zeit die Kultivierung bekannter bakterieller Gruppen mit Hilfe fester oder flüssiger sogenannter Selektivnährmedien, die Bestimmung der Zellzahl durch mikroskopische Zählungen in Zählkammern sowie die Auszählung von Kolonie- bildenden Einheiten (KbE) auf festen Nährböden. Da die überwiegende Anzahl der intestinalen Bakterien strikt anaerobe Bedingungen benötigt (Savage 1977), wurden Nährmedien unter künstlich hergestellten, anaeroben Bedingungen bebrütet und damit die entsprechende Zellzahl ermittelt (Ricke und Pillai 1999). Weitere Identifikationen erfolgten dann über biochemische Merkmale und über Protein- Gelelektrophorese- Muster. Um die Zahl der Gesamt-Bakterien zu erfassen, wurden verschiedene, sogenannte universelle Medien entwickelt und die damit ermittelte Zellzahl als „Gesamt- Anaerobier“ bezeichnet (Salanitro et al. 1977; Allison et al. 1979; Robinson et al. 1984; Varel et al. 1984; Moore et al. 1987; Butine und Leedle 1989). Bemerkenswert ist jedoch, dass bereits damals mikroskopische Zählungen in Zählkammern zum Teil erheblich höhere Zellzahlen vermuten ließen als durch Kultivierung dargestellt wurde (Savage 1977; Moore et al. 1987).

Immunologische Methoden wurden ebenfalls zur Charakterisierung und Identifizierung von Bakterien aus verschiedenen Ökosystemen genutzt. Insbesondere ELISA-Verfahren mit monoklonalen Antikörpern wurden verwendet, um bestimmte Bakterien bzw. deren Antigene in Mischkulturen wie auch in Digesta zu identifizieren. Hierbei konnte aber nicht zwischen lebenden und abgestorbenen Organismen unterschieden werden, ferner sind diese Systeme auf konstante Expression der entsprechenden Antigene auf den Mikroorganismen angewiesen (Ricke et al. 1988; Brooker und Stokes 1990; Ricke und Schaefer 1990; Durant et al. 1997; Ricke und Pillai 1999).

Eine eindeutige Identifizierung einzelner Bakterienspezies oder Gruppen aus Bakterienkulturen anhand bekannter, spezifischer DNA- oder RNA- Sequenzen wurde durch die Entwicklung der Koloniehybridisierung möglich. Damit war es möglich, aus Mischkulturen, die auf einem Festmedium wuchsen, genaue Zellzahlen des gesuchten Bakteriums mittels einer spezifischen Oligonukleotid-Sonde zu bestimmen (Datta et al. 1987; Buluwela et al. 1989; Betzl et al. 1990; Lynch et al. 2002; Radhika et al. 2002; Zoetendal et al. 2004).

Konkretere Quantifizierung intestinaler Bakterien auf Genus- und Speziesebene ohne Notwendigkeit der Kultivierung ist erst durch die Entwicklung spezieller

molekularbiologischer Anwendungen wie quantitativer Real-time-PCR und Fluoreszenz- in situ- Hybridisierung (FISH) – auf Basis von 16s rRNA-Gensequenzen - möglich geworden. Real-Time-PCR mit spezifischen Primern ist eine sensitive Methode, um indirekt Zellzahlen anhand der Menge vorhandener spezifischer DNA nachzuweisen (Huijsdens et al. 2002; Malinen et al. 2003) und wurde bereits zur Quantifizierung intestinaler Bakterienpopulationen eingesetzt (Ott, Musfeldt, Ullmann et al. 2004). Beim Menschen und verschiedenen Haustieren konnten 12 der als vorherrschend im Colon vorkommenden, obligat anaeroben Bakteriengenera (hier *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Fusobacterium*, *Ruminococcus*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*) durch quantitative PCR mit vergleichbaren Ergebnissen wie bei klassischer Kultivierung nachgewiesen werden (Wang et al. 1996). Allerdings muss erwähnt werden, dass gerade die wichtigen, mit *Eubacterium* und *Bacteroides* eng verwandten Spezies bei der anaeroben Kultivierung häufig nicht einzeln erfasst werden konnten und nur als „Gesamt- Anaerobier“ beschrieben wurden (Allison et al. 1979; Franklin et al. 2002). Die Identifizierung erfolgte bei WANG et al. (1996) durch PCR aus Koloniematerial. FISH beruht auf der Hybridisierung von markierten Oligonucleotid- Sonden mit dem Erbgut von fixierten Bakterienzellen und direkter Auszählung der so sichtbar gemachten Zellen aus der Probe (Amann et al. 2001; Harmsen und Welling 2002). Die zeitaufwändige mikroskopische Zellzählung konnte durch Kombination der FISH mit automatisierter Durchflußzytometrie ersetzt werden und somit große Probenmengen in kurzer Zeit verarbeitet werden (Amann et al. 1990). Mit der ständig wachsenden Anzahl verfügbarer DNA-Sondensequenzen sind bereits eine Vielzahl an Untersuchungen zur Zusammensetzung und Dynamik der Darm- und Kotmikrobiota von Mensch und Tier veröffentlicht worden (Franks et al. 1998; Suau et al. 1999; Harmsen et al. 2000; Konstantinov et al. 2004; Ott, Musfeldt, Ullmann et al. 2004). Beim Schwein konnte kürzlich durch Anwendung der FISH neue Erkenntnisse über das Vorkommen bestimmter bakterieller Gruppen im hinteren Verdauungstrakt gewonnen werden (Mountzouris et al. 2006).

In jüngerer Zeit hat die sogenannte phylogenetische Analyse von komplexen Bakteriengemeinschaften, basierend auf Unterschieden im bakteriellen 16s-ribosomalen Gen, grundlegend neue Erkenntnisse über die Zusammensetzung intestinaler Bakteriengemeinschaften erbracht (Suau et al. 1999). Die 16s rDNA-Sequenz eignet sich insofern besonders für die Klassifizierung von Mikroorganismen, da sie in allen prokaryotischen Organismen vorkommt. Wegen ihrer essentiellen Bedeutung für die Funktion dieser Organismen ist sie phylogenetisch hochgradig konserviert. Unterschiede in den Sequenzen lassen sich so zur Darstellung evolutionärer Verwandtschaften verwenden (Woese 1987; Lenoir-

Wijnkoop und Hopkins 2003; Zoetendal et al. 2004). 16s-rDNA-Sequenzen sind deshalb ideale Zielsequenzen für Hybridisierungs- Studien (Ricke und Pillai 1999). Die Phylogenetische Analyse wird benutzt, um die Verwandtschaft unidentifizierter aber auch bekannter Bakterien zu anderen bekannten Bakterien zu bestimmen. PRYDE *et al.* (1999) untersuchten erstmals die mikrobielle Diversität von Colon und Caecum von Mastschweinen durch sogenanntes Random-cloning von universell amplifizierten 16s rRNA- Genen aus Coloninhalt und – Mucosa. Dabei wurde deutlich, dass eine bedeutende Fraktion der bakteriellen Diversität nur entfernt verwandt ist mit kultivierbaren Bakterien bzw. mit deren in Datenbanken verfügbaren 16s rDNA- Sequenzen. Ähnliche Ergebnisse liegen auch aus Studien in der Humanernährung vor (Suau et al. 1999). Vor diesem Hintergrund sind die Ergebnisse der klassischen Mikrobiologie bezüglich der qualitativen Zusammensetzung der Mikrobiota, insbesondere der Diversität, vorsichtiger zu bewerten.

LESER *et al.* (2002) untersuchten mit derselben Methode eine wesentlich höhere Anzahl von Klonen aus dem Colon von Schweinen und konnten damit ein neues und umfassenderes Bild der bakteriellen Diversität dieses Darmabschnittes zeichnen. Aus diesen Ergebnissen konnte geschlossen werden, dass, wie auch schon beim Menschen gezeigt wurde, bis jetzt der überwiegende Teil der intestinalen Mikrobiota völlig unbekannt ist und nicht durch klassische Kultivierung erfasst werden kann (Suau et al. 1999).

Aufgrund der Existenz vieler unbekannter Spezies sind diesen molekularbiologischen Methoden insofern Limitierungen gesetzt, als dass die direkte Identifikation von Bakterien immer die Kenntnis einer spezifischen Zielsequenz voraussetzt, d.h. der gesuchte Organismus muss isoliert und identifiziert worden sein. DNA-Fingerprint- Techniken wie die Denaturierende Gradienten Gel-Elektrophorese (DGGE) bzw. Temperatur- Gradienten Gel- Elektrophorese (TGGE) oder Terminaler Restriktions- Fragment- Längen- Polymorphismus (T-RFLP) umgehen weitgehend dieses Problem, da hier theoretisch alle 16s- rDNA- Gene durch universelle Primer amplifiziert werden. Bei der DGGE/TGGE werden unterschiedliche Spezies durch ihren unterschiedlichen GC-Gehalt im PCR-Amplifikat dargestellt. Jede Bande entspricht theoretisch einer Spezies. Diese Methoden lassen sich so zur Analyse komplexer Populationen einsetzen (Muyzer et al. 1993; Muyzer 1999). Die Banden lassen sich ausschneiden, sequenz- analysieren und mit entsprechenden Datenbanken abgleichen (Tab. 1).

Tab. 1: ausgewählte Datenbanken für Nukleotidsequenzen

Datenbank	Website
EMBL Nucleotide Sequence Database, European Molecular Biology Laboratory – European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI)	http://www.ebi.ac.uk/embl/
National Center for Biotechnology Information (NCBI), US National Library of Medicine	http://www.ncbi.nlm.nih.gov
DNA Data Bank of Japan	http://www.ddbj.nig.ac.jp/
Ribosomal Database Project II, Michigan State University, USA (spez. ribosomale Sequenzen)	http://rdp.cme.msu.edu/
ARB-Silva, Technische Universität München (spez. ribosomale Sequenzen)	http://www.arb-silva.de

Möglich ist auch eine sogenannte Southern-Hybridisierung mit spezifischen DNA-Sonden. Die Komplexität der Profile bzw. Bandenmuster, die Intensität der Banden und viele andere Parameter lassen Clusteranalysen verschiedener Proben zueinander oder auch die Erstellung verschiedener Ähnlichkeits- und Diversitätsindizes zu, mit denen Proben untereinander verglichen werden können (Konstantinov et al. 2002).

SIMPSON *et al.* (1999, 2000, 2002) untersuchten erstmals verschiedene Darmabschnitte und Fäzes des Schweins mit Hilfe der DGGE. Bei der computergestützten Auswertung der Bandenmuster konnten sowohl Unterschiede zwischen den Darmabschnitten als auch zwischen verschiedenen Tieren aufgezeigt werden (Simpson et al. 1999; Simpson et al. 2000; Simpson et al. 2002).

Das Verständnis der Funktion der Mikrobiota bzw. ihrer einzelnen Komponenten sowie die Aufklärung der vielfältigen Interaktionen und ihrer Bedeutung zwischen Wirt und Mikrobiota ist nach dem Wissen über die qualitative Zusammensetzung das nächst hochrangigere Ziel bei der Erforschung des Verdauungstraktes.

Zur Einschätzung der Funktionalität, also Aktivität bzw. Stoffwechsellistung, sind in der Vergangenheit eine Reihe von Parametern herangezogen worden. Im Dickdarm werden die Umweltbedingungen in hohem Maße von den gebildeten Stoffwechselprodukten der Mikrobiota, insbesondere den flüchtigen Fettsäuren (FFS) sowie Laktat und Ammoniak, geprägt. Die Gehalte an kurzkettigen flüchtigen Fettsäuren (FFS), Laktat und Ammoniak, die als Stoffwechselprodukte vieler intestinaler Bakterien anfallen, wurden deshalb häufig als Parameter der mikrobiellen Stoffwechselaktivität untersucht (Imoto und Namioka 1978; Cummings und Macfarlane 1991). Die Messung dieser Substanzen erfolgt in der Regel mit etablierten gaschromatographischen und enzymatischen Methoden. Auch die Menge

an gebildetem Adenosin-tri-phosphat (ATP) als energiereiches Endprodukt aller Stoffwechselwege wurde zur Aktivitätsbestimmung der Mikrobiota herangezogen (Bach Knudsen et al. 1991; Hojberg et al. 2005). Aus der Menge und dem Verhältnis der hauptsächlich vorkommenden Säuren Acetat, Propionat und Butyrat lassen sich allerdings kaum konkrete Rückschlüsse auf die Aktivität bestimmter Bakterienspezies ziehen, da die meisten Bakterien heterofermentativen Stoffwechsel betreiben und damit nicht nur eine der vielen FFS bilden. Allerdings läßt sich zeigen, dass sich bei entsprechendem Substratangebot sowie auch mit verschiedenen Umweltbedingungen, in denen das Wirtstier lebt, sowohl die Menge und Komposition der FFS als auch die Mikrobiota erheblich beeinflussen lassen (Finegold et al. 1977; Ehle et al. 1982; Cummings und Macfarlane 1991; Bird et al. 2000; Collinder et al. 2002; Konstantinov et al. 2004; Hojberg et al. 2005). Ebenso verändern Hungerperioden die bakterielle Zusammensetzung und das FFS- Muster, wie bei Schweinen gezeigt wurde (Savage 1977).

Ausgehend davon, dass intestinale Bakterien unterschiedliche Substrate zur Energiegewinnung nutzen, wurden auf Grundlage der klassischen Mikrobiologie entsprechende Nährmedien entwickelt und durch Kultivierung auf diesen Medien diese Bakterien in entsprechend Gruppen eingeteilt (Allison et al. 1979; Varel et al. 1984; Butine und Leedle 1989). KATOULI *et al.* (1995; 1997a, b) nutzten diese Eigenschaften, um mit einem automatisierbaren Ansatz aus bis zu 48 Substraten „metabolische Fingerprints“ der komplexen Bakteriengemeinschaft im Kot zu erstellen.

Molekularbiologische Ansätze zur Bestimmung der metabolischen Aktivität und Funktion bestimmter Bakteriengruppen oder auch –spezies beruhen auf der quantitativen oder semiquantitativen Analyse der ribosomalen RNA (rRNA). Grundlage dafür ist die Tatsache, dass die Stoffwechselaktivität in direktem Zusammenhang mit der Anzahl der bakteriellen Ribosomen zusammenhängt, da hier die zelluläre Proteinsynthese abläuft. Die Menge vorhandener rRNA kann beispielsweise über Hybridisierung mit spezifischen RNA-Sonden im Dot-Blot-Verfahren oder in Zukunft über quantitative Real-time-PCR bestimmt werden (Zheng et al. 1996; Amann und Ludwig 2000; Vahjen et al. 2002).

Weiterhin sind Methoden zur Bestimmung bakterieller Aktivität durch Messung der messenger RNA (mRNA) etabliert worden. Die Menge der mRNA entspricht dabei der Transkriptionsaktivität. Die Bestimmung der bakteriellen mRNA erfolgt hier durch reverse- Transkriptase- PCR (RT-PCR). Mit dieser Methodik ist z.B. auch die bakteriell induzierte Zytokin- Synthese im intestinalen Epithel des Wirtstieres über Messung der eukaryotischen mRNA messbar (Stokes et al. 2003). Untersuchungen umfangreicher Expressionsmuster bakterieller wie auch epithelialer Funktionsgene

mit Hilfe der Microarray- Technologie werden in Zukunft erhebliche Bedeutung erringen (Konstantinov et al. 2002; Rhee, Liu et al. 2004; Zoetendal et al. 2004).

1.2.2 Die Mikrobiota des Verdauungstrakts

Die mikrobielle Zusammensetzung des Verdauungstrakts ist seit vielen Jahrzehnten Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen. Seitdem immer deutlicher wird, welchen großen Einfluß die Mikrobiota auf Gesundheit und Leistungsfähigkeit hat und wie eng das wechselseitige Zusammenspiel zwischen Wirt und Darmökosystem ist, sind die Bemühungen, Licht in diese komplexen Zusammenhänge zu bringen, intensiviert worden (Savage 1977; Hooper und Gordon 2001; McCracken und Lorenz 2001; Hooper et al. 2002; Lenoir-Wijnkoop und Hopkins 2003; Stokes et al. 2003).

Das Wissen über Zusammensetzung und Funktion der intestinalen Mikroorganismengemeinschaften bei Mensch und Tier hat besonders in den letzten Jahren durch die Anwendung molekularbiologischer Methoden und sensitiverer biochemischer Analytik einen bedeutenden Fortschritt erfahren. Dennoch werden mikrobiologische Untersuchungsmethoden, die auf Kultivierung basieren, immer noch häufig eingesetzt, um beispielsweise metabolische Aktivitäten intestinaler Bakterien genauer charakterisieren zu können.

Wie bereits bei Mensch und Tier gezeigt werden konnte, ist die hochkomplexe Mikrobiota ein System, welches sich in ihrer Zusammensetzung und Funktion nicht nur innerhalb des Wirtsorganismus je nach Lokalisation unterscheidet (Pryde et al. 1999; Simpson et al. 1999; Zoetendal et al. 2002; Dixit et al. 2004), auch die Mikrobiota zweier Individuen, ob aus gleichem Kulturkreis oder derselben Familie, ist grundlegend verschieden voneinander (Hooper et al. 2002; Simpson et al. 2002). Diese individuelle Entwicklung beginnt schon bald nach der Geburt und konnte sowohl durch phylogenetische Analysen (Zoetendal et al. 1998; Simpson et al. 1999; Simpson et al. 2000; Favier et al. 2002) wie auch durch den Nachweis unterschiedlicher metabolische Funktionsmuster gezeigt werden (Katouli et al. 1995; Katouli, Foo et al. 1997; Katouli, Lund et al. 1997). Dass auch der Genotyp des Wirts auf die Zusammensetzung seiner Mikroorganismen- Gemeinschaft erheblichen Einfluß hat, läßt die Tatsache vermuten, dass sich die Mikrobiota eineiiger Zwillinge wesentlich mehr ähnelt als die normaler Geschwister (Zoetendal 2001).

Grundsätzlich aufgeteilt werden kann die Mikrobiota des Verdauungstraktes nach SAVAGE *et al.* (1977; 1986) in autochtone oder residente Mikroorganismen, welche im Darm entsprechende ökologische Nischen besetzen, und allochtone oder transiente Mikroorganismen, die, über die Nahrung aufgenommen, kein geeignetes Milieu vorfinden und somit nicht im Verdauungstrakt verweilen können.

Die geschätzte Gesamtzahl der den Verdauungstrakt besiedelnden Bakterien wird, bei einer vermuteten Anzahl von 400-500 verschiedenen Spezies, in der Literatur mit 10^{14} Zellen angegeben (Moore und Holdeman 1974; Savage 1977; Holzapfel et al. 1998; Hooper et al. 2002). Dabei muss betont werden, dass es sich hierbei um Schätzungen auf Basis von Kultivierungen handelt.

Die Zusammensetzung der Mikrobiota wie auch die Zellzahl variieren zum Teil erheblich zwischen den verschiedenen Habitaten, die von den verschiedenen Mikroorganismen- Gemeinschaften besetzt werden können (Savage 1977; Robinson et al. 1984; Kelly 1998; Hooper et al. 2002). Es existieren eine Vielzahl dieser mikrobiellen Gemeinschaften in den verschiedenen Darmabschnitten und dort besonders im Darmlumen, der Schleimhautoberfläche und in den mucosalen Krypten (Savage 1986). Diese Mikrohabitate lassen sich noch weiter unterteilen, abhängig von den Gegebenheiten des jeweiligen Darmabschnittes. Zellzahl und Zusammensetzung solcher lokal assoziierter Populationen unterscheiden sich dabei in erheblichen Maße (Allison et al. 1979; Robinson et al. 1984; Pryde et al. 1999). Beim Schwein konnte am Beispiel von *E. coli* gezeigt werden, dass die Populationen in Duodenum und Ileum einander genetisch sehr ähnlich sind, sich dagegen aber deutlich von denen im Colon unterscheiden (Dixit et al. 2004).

Insgesamt bleiben diese Populationen als „climax communities“ in einem dynamischen Zustand der „funktionellen Stabilität“ und stehen in vielfältigen symbiotischen und kommensalen Wechselwirkungen mit dem Wirtsorganismus (Savage 1977; Falk et al. 1998; Hooper et al. 2002).

1.2.3 Wechselbeziehungen zwischen Wirt und Mikrobiota

Die ersten und zugleich wichtigsten Wechselwirkungen zwischen Wirt und Mikrobiota sind die Entwicklungsvorgänge, die das immature Immunsystem des neugeborenen Wirtstieres im Zusammenspiel mit der sich entwickelnden Mikrobiota durchläuft. Mittlerweile sind Wirkmechanismen vieler einzelner Bakterien bekannt, die maßgeblich für die Differenzierung des Schleimhaut- Immunsystems (GALT) verantwortlich sind (Talham et al. 1999; Umesaki et al. 1999; Rhee, Sethupathi et al. 2004). Auch die Reifung und Differenzierung des Darmes wird nachhaltig durch die Besiedlung mit bestimmten Mikroorganismen beeinflusst, überschießende Immunreaktionen und Entzündungen werden unterbunden (Falk et al. 1998; Hooper und Gordon 2001; Schiffrin und Blum 2002; Rhee, Sethupathi et al. 2004; Shirkey et al. 2006).

Wirtsseitig ist der Verdauungstrakt ein offenes System mit konstanter Temperatur, anaerobem Milieu und niedrigem Redoxpotential (Savage 1986). Sezernierte und epitheliale Enzyme, Gallensäuren, Muzine, sonstige Sekrete (Elektrolyte, Bicarbonat

usw.) sowie epithelialer Zelldebris prägen die Umweltbedingungen für die intestinalen Mikroorganismen von Seiten des Wirtstieres.

Wirt und Mikrobiota treten also an den mucosalen Grenzschichten, besonders an der Epithelzelle, aber auch an darmassoziierten, lymphatischen Gewebe in intensiven wechselseitigen Kontakt und beeinflussen sich gegenseitig (Hooper und Gordon 2001; McCracken und Lorenz 2001; Zoetendal 2001; Stokes et al. 2003). Die Mikroorganismen nutzen dabei unter anderem verschiedene Substanzen der Glykokalix der epithelialen Bürstensaummembran, um sich anzuheften und sich in ihrer Nische zu behaupten (Karlsson 1989).

Schon lange ist bekannt, dass die epitheliale Erneuerungsrate bei keimfreien Tieren nur halb so hoch ist wie bei Normalen (Savage et al. 1981; Savage 1986). Die enzymatische Aktivität der Enterozyten wird ebenfalls deutlich beeinflusst (Savage 1986). Eine Reihe von intestinalen Bakterienstämmen wie *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* und *Ruminococcus* nutzen z.B. Substanzen aus der mucosalen Schleimschicht (allgemein Glycokonjugate oder Glykane genannt) und der Epitheloberfläche (z.B. Glycosphingolipide) zur Energiegewinnung und sind damit bis zu einem gewissen Grade unabhängig von extern zugeführter Digesta. Anhand des Bakteriums *Bacteroides thetaiotaomicron*, welches normalerweise im Darm von Menschen und Mäusen vorkommt, konnte unter anderem gezeigt werden, dass bestimmte Bakterien die Bildung spezieller Glykane in den Epithelzellen des Wirts induzieren und damit ihren Bedarf mit Nährstoffen sichern (Hooper und Gordon 2001; Hooper et al. 2002).

Die aufgenommene Nahrung ist sowohl für den Wirt als auch die Mikrobiota Energiequelle, wobei zusätzlich ein vielfältiger Austausch von Nährstoffen zwischen Wirt und Mikroorganismen meist mit beiderseitigem Nutzen stattfindet (Hooper et al. 2002). Diese symbiontische Beziehung zeigt sich z.B. daran, dass keimfreie Versuchstiere 30% mehr Energie für ihren Grundumsatz benötigen als konventionell aufgezogene Tiere [(Wostmann et al. 1983), zitiert bei (Hooper et al. 2002)].

Kohlehydrate sind der Hauptbestandteil der Diäten der meisten Säugetiere und auch wichtigste Energiequelle sowohl des Wirtes als auch der Mikrobiota. Im vorderen Verdauungstrakt entsteht dadurch bezüglich leicht verdaulicher Kohlehydrate eine Konkurrenzsituation um Nährstoffe. Die Besiedlung dieses Bereiches mit Bakterien wird aber als verhältnismäßig gering angesehen (Hooper et al. 2002), dennoch wird die Bedeutung dieser Nährstoffverluste gegenüber den Mikroorganismen dabei unterschiedlich bewertet (Savage 1986; Collier et al. 2003; Hojberg et al. 2005).

Im hinteren Verdauungstrakt profitiert der Wirtsorganismus dagegen von der Tatsache, dass die von ihm nicht verdaulichen komplexen Kohlehydrate von mikrobiellen Enzymen gespalten und verwertet werden. Die Endprodukte dieses allgemein als Fermentation bezeichneten Abbaus können vom Wirt aufgenommen

und als Energiequelle genutzt werden. Bei diesen bakteriellen Metaboliten handelt es sich hauptsächlich um sogenannte flüchtige Fettsäuren (FFS), Laktat und Ethanol. FFS wie Acetat, Propionat, Butyrat und Valeriat enthalten noch mehr als 60% der Energie aus den für den Wirt nicht verdaulichen KH und stehen dem Wirt so wieder zur Verfügung (Bergman 1990). Acetat gelangt über das Blut in die peripheren Gewebe und wird dort über Acetyl-CoA direkt in den Fettstoffwechsel eingespeißt. Propionat wird über die Pfortader zur Leber transportiert, über Propionyl-CoA – Methylmalonyl-CoA – Succinyl-CoA der Gluconeogenese zugeführt und weiter metabolisiert (Bergman 1990; Cummings und Macfarlane 1997; Stryer 2003). Butyrat wird dabei hauptsächlich im intestinalen Epithel verwertet, obwohl diese FFS auch im peripheren Blutkreislauf nachgewiesen wurde (Imoto und Namioka 1978; Bach Knudsen et al. 2003; Roy et al. 2006). Laktat und Ethanol werden im Organismus in mehreren Organen über die Gluconeogenese metabolisiert, im Darm sind sie unter anderem für die Resorption von Calcium-Ionen erforderlich (Koolman und Röhm 1994).

Milchsäurebakterien und das von ihnen produzierte Laktat spielen vor allem im vorderen Verdauungstrakt eine Rolle, insbesondere der pH des Dünndarms wird durch sie geprägt (Sakata et al. 1999). Die Laktatbildung ist vor allem abhängig vom Nahrungsangebot. Die Zahl der Laktobazillen und die Menge an gebildetem Laktat hängen direkt vom Angebot an fermentierbaren Kohlehydraten ab (Williams 2003).

FFS sind die dominierenden Anionen im Chymus von Caecum und Colon (Cummings und Macfarlane 1991; Roy et al. 2006). Höchste Konzentrationen an FFS werden in Caecum und proximalen Colon mit 100-140 mmol/l gemessen, die dann wieder bis auf 40-80 mmol/l im distalen Colon abfallen (Bach Knudsen et al. 1991). Sie beeinflussen wesentlich den pH-Wert dieser Abschnitte sowie die Wasser und Elektrolyt-Resorption im Dickdarm (Savage 1986; Murray et al. 1989; Roy et al. 2006). Propionat und n-Butyrat hemmen die propulsive Darmmotorik (Bach Knudsen et al. 1991; Sakata et al. 1999), Butyrat induziert zudem auch die Zellteilung in den Krypten des Colonepithels (Sakata et al. 1995). Die Durchblutung des Darms wird ebenso beeinflusst (Mortensen et al. 1990). Weitere Untersuchungen zeigen sogar durch Butyrat und andere FFS direkt induzierte Genexpression in den Enterozyten (Basson et al. 2000) und auch die beschriebenen antikarzinogenen Eigenschaften dieser Fettsäure scheinen darauf zu basieren (Emenaker et al. 2001).

Einige der im Verdauungstrakt entstehenden Substanzen können sich aber auch negativ auf das Wirtstier auswirken. Für die oben genannten FFS wurde *in vitro* gezeigt, dass sie auch zytotoxische Auswirkungen auf Epithelzellen haben können (Sakurazawa und Ohkusa 2005). Ammoniak und biogene Amine, die durch den mikrobiellen Abbau von Proteinen durch Desaminierung und Decarboxylierung entstehen, haben ebenfalls toxische und teilweise mutagene Eigenschaften (Nyachoti

et al. 2006). Auch die durch mikrobielle Degradation von Gallensäuren entstehenden sekundären Gallensäuresalze sind nachweislich für das Entstehen von Darmkrebs beim Menschen verantwortlich (De Boever et al. 2000).

1.2.4 Die bakterielle Zusammensetzung im Verdauungstrakt des Schweines

Ferkel nehmen bereits während der Geburt an eine Vielzahl von Mikroorganismen aus ihrer Umwelt auf, die maßgeblich an der Entstehung der individuellen Mikrobiota beteiligt sind (Savage 1977). Diese direkte Übertragung von der Mutter auf das Neugeborene wurde anhand von einzelnen Bakterien sowohl beim Menschen als auch beim Tier beobachtet (Macha et al. 2004; Tannock 2004; Taras et al. 2005). Erster Kontakt erfolgt über die Vaginalflora des Muttertiers, hinzu kommen Bakterien der Haut, aus dem Kot des Muttertieres und der Umgebung (Sansom und Gleed 1981). Während der Verdauungstrakt unmittelbar nach der Geburt noch steril ist, sind bereits 12 Stunden nach der Geburt im Colon von Saugferkeln Keimzahlen von 10^9 bis 10^{10} /g Inhalt messbar (Sinkovics und Juhasz 1974; Savage 1977). Es handelt sich dabei um hauptsächlich fakultativ anaerobe Bakterien, vor allem Coliforme, die aber innerhalb von 48h durch obligat anaerobe Bakterien, vor allem *Bacteroides* spp., ersetzt werden (Swords et al. 1993; Inoue, Tsukahara et al. 2005). SINKOVICS *et al.* (1974) beschrieb die bakterielle Zusammensetzung des Darminhaltes neugeborener Ferkel dagegen als von Laktobazillen dominiert, gefolgt von Steptokokken und Coliformen.

INOUE *et al.* (2005) beschrieben die Entwicklung der Mikrobiota bei Saugferkeln mithilfe der TGGE. Wie auch an menschlichen Neugeborenen mittels DGGE und 16s rDNA-Sequenzanalyse gezeigt wurde, wird die junge Mikrobiota wie auch bei Schweinen zuerst von wenigen Genera dominiert (Favier et al. 2002; Inoue, Tsukahara et al. 2005). Es konnte gezeigt werden, dass die Entwicklung der Mikrobiota ein gradueller, sequenzieller Prozess ist, der offensichtlich parallel mit der morphologischen und immunologischen Entwicklung des Verdauungstraktes verläuft (Inoue, Tsukahara et al. 2005).

Bei heranwachsenden Tieren nimmt die die Zahl der kultivierbaren Bakterien pro Gramm Coloninhalt weiter zu. Schätzungen gehen von 10^8 bis 10^{10} pro g Feuchtmasse im Ileum (Savage 1977; Franklin et al. 2002; Collier et al. 2003) bis hin zu 10^{11} bis 10^{12} im Colon bzw. Caecum bei adulten Tieren aus (Allison et al. 1979; Moore et al. 1987; Butine und Leedle 1989; Wang et al. 1996; Huijsdens et al. 2002). In der Vergangenheit sind zur Bestimmung der bakteriellen Zusammensetzung im Darm adulter Schweine eine Reihe von aufwändigen Untersuchungen auf Basis klassischer Kultivierungsansätze durchgeführt worden. Diese führten bei ähnlicher Methodik zu mehr oder weniger unterschiedlichen Ergebnissen. Allerdings stammten die untersuchten Proben meist auch aus unterschiedliche Darmabschnitten (meist

Colon, Caecum oder Faezes), teilweise wurde auch versucht, Mucosa- assoziierte Bakteriengemeinschaften zu charakterisieren (Robinson et al. 1984; Pryde et al. 1999). ROBINSON *et al.* (1984) zeigte auch, dass sich die bakterielle Zusammensetzung im Lumen und auf der Mucosa erheblich unterscheidet. Diese Unterschiede, wie auch die zwischen den verschiedenen Darmabschnitten, wurden später auch durch die Ergebnisse molekularbiologischer Untersuchungen sowohl bei Mensch als auch beim Schwein bestätigt und betont (Pryde et al. 1999; Simpson et al. 1999; Zoetendal et al. 2002).

Als dominierender Bakteriengenus wurde in den meisten älteren Untersuchungen des hinteren Verdauungstrakts der Genus *Streptococcus* vermutet (Salanitro et al. 1977; Robinson et al. 1984; Moore et al. 1987). Je nach Darmabschnitt sind dann von den verschiedenen Autoren Rangfolgen vorherrschender Bakteriengruppen erstellt worden. Dabei wurden Genera wie *Lactobacillus*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Peptostreptococcus*, *Bacteroides*, *Acetivibrio* und *Selenomonas* isoliert. *Bacteroides* wurde dabei als größte gram- negative Fraktion im Darm gefunden (Robinson et al. 1984; Moore et al. 1987), was später auch mit molekularbiologischen Versuchsansätzen bestätigt werden konnte (Pryde et al. 1999; Leser et al. 2002).

Seitdem neue molekularbiologische Methoden zur Charakterisierung der intestinalen Bakteriengemeinschaften beim Schwein Anwendung gefunden haben, mussten viele vorherige Ergebnisse bezüglich Diversität und vor allem Bekanntheitsgrad der Mikrobiota neu bewertet werden (Pryde et al. 1999; Leser et al. 2000; Leser et al. 2002; Inoue, Tsukahara et al. 2005; Mountzouris et al. 2006). Generell kann aber als bestätigt angesehen werden, dass, unabhängig ob Darm oder Faeces, die intestinale Bakteriengemeinschaft des Schweines von gram-positiven Bakterien dominiert wird, wenn auch die Ansichten über den Anteil an der Mikrobiota von 66-90% variieren (Salanitro et al. 1977; Robinson et al. 1984; Moore et al. 1987; Leser et al. 2002).

Auch bei den Untersuchungen von LESER *et al.* (2002), in denen neue, umfangreiche Erkenntnisse über die bakterielle Zusammensetzung im Ileum, Caecum und Colon von Schweinen mittels 16s-rDNA-Analyse gewonnen werden konnten, waren die *Streptococcus alactolyticus*- Klone die insgesamt häufigsten, gefolgt von *E. coli*- und *Lactobacillus amylovorus*- Klonen, ohne jedoch bei weitem diese hohen Anteile wie in der klassischen Mikrobiologie zu erreichen. Im Detail wurden über 4000 Klone aus Dünn- und Dickdarm sequenziert und damit neue umfangreiche Erkenntnisse über die Zusammensetzung der intestinalen Bakteriengemeinschaft präsentiert. Die ermittelten Sequenzen wurden mit denen der Datenbank des Ribosomal Database Project -RDP- (Larsen et al. 1993; Maidak et al. 2000) abgeglichen und eine neue Datenbank für Schweine erstellt. Dabei wurden 375 verschiedene operational taxonomical units (OTUs), auch Phylotypen genannt, gefunden, die 13 Abstammungsgruppen nach RDP zugeordnet wurden. 125 davon

waren am ehesten mit der *Eubacterium*- Gruppe verwandt, 109 mit *Clostridium* und Verwandten, 46 mit der *Bacillus-Lactobacillus-Streptococcus*-Unterabteilung, 42 mit der *Flexibacter-Cytophaga-Bacteroides*-Gruppe, 20 mit *Proteobacteria* und 15 mit *Sporomusa* und Verwandten. Die *Bacteroides-Prevotella*- Gruppe bildet damit die größte Fraktion gram-negativer Bakterien im Schweinedarm, was schon nach früheren Untersuchungen vermutet wurde (Robinson et al. 1984; Moore et al. 1987). Mehrere Phylotypen der *Eubacterium*- Gruppe wurden von den am häufigsten im Dickdarm der Tiere isolierten Klonen gebildet. Dazu gehörten in erster Linie mit *Eubacterium rectale*, *Ruminococcus obeum* und *Eubacterium ramulus* eng verwandte Klone.

In der *Bacillus-Lactobacillus-Streptococcus*- Gruppe konnten mit über 99% Sequenzhomologie Speziesidentifikationen ausgesprochen werden. Wie bereits erwähnt, wurde mit Abstand am häufigsten *Streptococcus alactolyticus* gefunden, ferner noch *Streptococcus dysgalctiae*, *Sc. hyointestinalis*, *Sc. gallolyticus* und *Sc. suis*. Bei Enterokokken wurden vereinzelt *E. faecium* und *E. hirae* gefunden. 22 bekannte *Lactobacillus* spp. konnten gefunden werden, drei davon, *L. amylovorus*, *L. johnsonii*, *L. reuteri*, gehörten zu den häufigsten Klonen dieser OTUs.

PRYDE *et al.* (1999) hatten bereits vor Jahren betont, dass nach den neuen phylogenetischen Analysen die Bedeutung bestimmter Bakteriengruppen wie Streptokokken, Laktobazillen und auch *Selenomonas* spp. bisher deutlich überschätzt wurde.

MOUNTZOURIS *et al.* (2006) untersuchten kürzlich quantitativ das Vorkommen bestimmter Bakteriengruppen in Proben aus dem Caecum, Colon und Rectum von Schweinen mithilfe der FISH. Es konnte gezeigt werden, dass die bakterielle Gesamt- Zellzahl wie auch die Zahl der *Bacteroides* spp., *Eubacterium* spp., *Clostridium* spp. und *Bifidobacterium* spp. vom Caecum zum Rektum hin abnahmen und weitgehend unabhängig von der Futterzusammensetzung verblieben. *Lactobacillus* spp., *Enterococcus* spp. und *E. coli* traten im gesamten hinteren Verdauungstrakt dagegen weitgehend in gleichbleibenden Zellzahlen auf. Insgesamt machten die oben erwähnten Bakteriengruppen aber nur zwischen 10,3% und 21,8% der durch DAPI-Färbung dargestellten bakteriellen Gesamt- Zellzahl aus. Wie auch bei LESER *et al.* (2002) wird hier deutlich, dass neben den bekannten bakteriellen Gruppen eine große Fraktion intestinaler Mikroorganismen mit bisher unbekannter Diversität im Schweinedarm existiert. Die überwältigende Vielfalt allein innerhalb der Gruppe der gram-positiven Bakterien ist mit kulturellen Methoden bis heute nicht sichtbar geworden und zeigt, dass die Bemühungen, die Zusammensetzung wie auch Zusammenspiel und Funktion der intestinalen Mikrobiota des Schweines zu ergründen, noch am Anfang stehen.

1.3 Probiotika

1.3.1 Definitionen

Mikroorganismen, welche sich positiv auf die Gesundheit auswirken, standen in den letzten Jahrzehnten in zunehmendem Interesse der Ernährungswissenschaft. Günstige Auswirkungen solcher Bakterien und Hefen wurden bereits vor 100 Jahren wissenschaftlich erwähnt (Metchnikoff 1907). Der Ausdruck „Probiotika“ wurde erst später in einem wesentlich speziellerem Zusammenhang geprägt. Hierbei war zunächst eine Substanz gemeint, die das Wachstum anderer Mikroorganismen stimulieren kann (Lilly und Stillwell 1965). Später wurden Probiotika als lebensfähige Mikroorganismen bezeichnet, die nach ausreichender Aufnahme gesundheitsfördernde Effekte bewirkten (Sanders 2000).

Die in der Tierernährung gebräuchlichste Definition stammt von FULLER (1989): Demnach handelt es sich bei Probiotika um Nahrungszusätze aus lebensfähigen Mikroorganismen, die sich günstig auf die Gesundheit des Wirtsorganismus auswirken, indem sie das intestinale mikrobielle Gleichgewicht verbessern (Fuller 1989).

Abzugrenzen von den Probiotika sind Prebiotika und Synbiotika. Ein Prebiotikum ist eine Substanz, deren Verabreichung bestimmte erwünschte Mikroorganismen- Gruppen zu Lasten pathogener Keime fördern soll. Synbiotika setzen sich aus Mikroorganismen und von diesen verwertbaren Substraten zusammen und stellen somit eine Kombination aus Prebiotikum und Probiotikum dar (Collins und Gibson 1999; Schrezenmeir und de Vrese 2001).

1.3.2 Einsatzgebiete von Probiotika

Abgesehen von den Anwendungsbereichen in der Lebensmitteltechnologie (Franz et al. 1999; Reuter 2001) lag der Schwerpunkt der Einsatzgebiete in der Vergangenheit zunächst im therapeutischen Bereich von Darmerkrankungen in der Humanmedizin. Neben der Behandlung von Antibiotika- assoziierter Diarrhöe wurde auch über protektive Effekte von Probiotika bezüglich des Auftretens von Dickdarm-Krebs sowie Cholesterin- senkende Effekte und klinische Verbesserungen beim Lactose- Malabsorptions- Syndrom berichtet (Wunderlich et al. 1989; Collins und Gibson 1999; Marteau et al. 2001; O'Sullivan 2001; Wollowski et al. 2001; Marteau und Boutron-Ruault 2002; Rafter 2003; Styriak et al. 2003). Insgesamt stehen beim Menschen bei Anwendung in der Ernährung die Stabilisierung der Gesundheit und langfristige lebensverlängernde Wirkungen im Vordergrund (Simon 2005).

Anders als in der Humanernährung sind in der Ernährung landwirtschaftlicher Nutztiere kurzfristige ökonomische Fragestellungen von größerem Interesse

(Simon 2005). Hier geht es im Wesentlichen um Leistungsverbesserungen und/oder Verhinderung von krankheitsbedingten Leistungseinbußen insbesondere bei Jungtieren während der Neugeborenen- und Absetzphase. Dies hat in jüngerer Zeit auch vor dem Hintergrund der kritischen Überlegungen zum Einsatz von therapeutischen und des Verbots prophylaktischer Antibiotika und Chemotherapeutika (sog. Leistungsförderer) in der Nutztierhaltung zunehmende Bedeutung erlangt (Kamphues 1999; Reuter 2001; Verstegen und Williams 2002). In einer Vielzahl von Untersuchungen wurden probiotische Bakterienstämme und Hefen meist als dauerhaft zugeführter Zusatzstoff über die Fütterung verabreicht, vereinzelt wurden aber auch Zellsuspensionen direkt oral eingegeben (Männer und Spieler 1997; Zeyner und Boldt 2006). Die meisten Versuche wurden bei Geflügel und Schweinen durchgeführt, aber auch bei Kälbern und Hunden sind Anwendungen beschrieben (Vanbelle et al. 1990; Abe et al. 1995; Mathew, Chattin et al. 1998; Zentek et al. 1998; Benyacoub et al. 2003; Paulicks und Roth-Maier 2003; Vahjen und Manner 2003; Baillon et al. 2004).

1.3.3 Anforderungen an Probiotika

Potentiell probiotische Mikroorganismen müssen eine Reihe von Eigenschaften aufweisen, um als Probiotika eingesetzt werden zu können. Neben Apathogenität und Sicherheit bei Umgang und Anwendung der Präparate, insbesondere auch der Verhinderung möglicher Übertragung von Antibiotika-Resistenzen, müssen die Bakterien und Hefen die technische Verarbeitung in Nahrungs- bzw. Futtermitteln überstehen können und ihre Lebensfähigkeit während der Lagerung bewahren (Saarela et al. 2000; Ishibashi und Yamazaki 2001; Simon 2003; Lahtinen et al. 2005; Simon 2005). Dabei unterscheiden sich die Anforderungen je nach Einsatzgebiet. Für humanmedizinische Anwendungen werden als Voraussetzungen Mucosa-Adhäsion, Persistenz und Vermehrung im Verdauungstrakt, Produktion spezieller Metaboliten und Substanzen wie z.B. Bacteriocine, Verdrängung pathogener Mikroorganismen und Förderung der Widerstandsfähigkeit gegenüber Infektionen angegeben (Reid 1999). Zusätzlich sind Wirkungen wie Tumorsuppression im Colon wie auch Senkung des Serum-Cholesterolspiegels, bessere Lactose-Verdaulichkeit und Immunstimulation erwünscht (Collins und Gibson 1999).

In der Tierernährung werden in Bezug auf die Effizienz eines Probiotikums folgende Anforderungen allgemein formuliert: verbesserte zootechnische Leistungen und Futteraufwand, reduzierte Morbidität und Mortalität sowie günstige Auswirkungen auf die Produktqualität der Lebensmittel tierischen Ursprungs (Anadon et al. 2006). Ferner kommt der Verarbeitungsstabilität bei der Einbringung in Futtermittel neben gesundheitsfördernden Effekten besondere Bedeutung zu. Insbesondere

Enterokokken, Laktobazillen und Hefen reagieren auf Hitze, wie sie z.B. beim Pelletieren entsteht, besonders empfindlich, so dass es zu einer erheblichen Abnahme lebensfähiger Bakterien nach der Verarbeitung kommen kann. Weitere Verluste können zudem bei der Lagerung der Futtermittel entstehen (Simon 2005). Ursprünglich meinte man, Probiotika müssten sich, wie für die Anwendung beim Menschen beschrieben, im Verdauungstrakt fest etablieren und vermehren. Da dies bei den meisten Untersuchungen nicht der Fall war, eine dauerhafte Zufütterung jedoch messbare Effekte bewirken konnte, scheint diese Prämisse nicht unbedingt für eine Wirksamkeit maßgeblich zu sein (Vanbelle et al. 1990).

Die gesetzlichen Grundlagen für die Anwendung von Probiotika in der Tierernährung sind im EU-Recht verankert (Anadon et al. 2006). Demnach müssen Probiotika entsprechend der Verordnung (EC) 1831/2003 „über Zusatzstoffe zur Verwendung in der Tierernährung“ nach vorgeschriebenen Kriterien geprüft und zugelassen werden. Der Begriff Probiotikum wird dort nicht verwendet, sondern Probiotika allgemein unter dem Oberbegriff „zootechnische Additive“ bzw. „Gut flora stabilizers“ als „Microorganisms“ aufgeführt (Anonym 2003, 2003). Die zugelassenen Produkte sind im „Community register of feed additive“ zusammengefasst, welches regelmäßig aktualisiert wird und werden dort entsprechend dem Annex I-k (Microorganisms) der Verordnung (EC) 1831/2003 aufgeführt.

1.3.4 Vermutete und bestätigte Wirkmechanismen von Probiotika

Obwohl positive Effekte von Probiotika auf die Gesundheit weitgehend unbestritten sind, herrscht über die meisten Wirkmechanismen im Detail meist noch Unklarheit. Eine Reihe von potentiellen Wirkungsweisen sind für Probiotika beschrieben und in Literaturübersichten zusammengefasst worden (Vanbelle et al. 1990; Görke 2000; Reuter 2001; Bollmann 2002; Reid und Friendship 2002; van Briel 2002; Verstegen und Williams 2002; Simon 2003).

1.3.4.1 Auswirkungen auf Mikrobiota und pathogene Mikroorganismen

Die Schutzfunktion der residenten, intakten Bakteriengemeinschaft im Verdauungstrakt gegenüber von außen eindringenden Krankheitserregern wurde in der Vergangenheit mit der Bezeichnung „competitive exclusion“ beschrieben und auch in Versuchen mit Schweinen demonstriert (Fedorka-Cray et al. 1999; Fuller 1999; Genovese et al. 2000; Reuter 2001). Es wurde zunächst vermutet, dass bei etablierter und intakter Mikrobiota die dauerhafte Besiedlung mit exogenen Bakterien, seien es pathogene oder probiotische, nicht möglich ist. Nur bei Neugeborenen und mit prinzipiell zur normalen Mikrobiota gehörenden Bakterien könne dies gelin-

gen. Da in vielen Untersuchungen besonders auch bei späterer regelmäßiger Zuführung von probiotischen Bakterien positive Effekte messbar waren, wird die dauerhafte Besiedlung nicht mehr als Prämisse für die Wirksamkeit eines Probiotikums angesehen (Vanbelle et al. 1990; O'Sullivan 2001).

Im Detail konnte bereits für einige Darmbakterien, die teilweise auch als Probiotika genutzt werden, vorwiegend *in vitro* spezielle Wirkmechanismen gegen pathogene Bakterien auf zellulärer Ebene aufgeklärt werden. So wurde mehrfach gezeigt, dass Laktobazillen unter anderem die Adhäsion pathogener Mikroorganismen an Mucosa-Zellen unterbinden können (Klein et al. 1998; Mack et al. 1999; Tuomola et al. 1999, 1999; Lee et al. 2000; Styriak et al. 2003; Collado, Gueimonde et al. 2005; Johnson-Henry et al. 2006). Weitere, für einzelne Probiotika aufgeklärte Wirkmechanismen stellen von diesen Mikroorganismen synthetisierte und sezernierte, speziell antimikrobiell wirksame Substanzen dar (Chaveerach et al. 2004; Collado, Gonzalez et al. 2005). Diese können ebenfalls die Adhäsion von pathogenen Mikroorganismen hemmen, wie mit einem *E. faecium*-Probiotikum gezeigt wurde (Jin et al. 2000). Sporen-spezifische Dipicolinsäure von *Bacillus cereus* var. *toyoi* hemmte *in vitro* das Wachstum von Enterobakterien und Enterokokken (Jadamus 2001). Mit einigen aus Geflügel und Schweinen isolierten *Bacillus* spp. konnte im Agardiffusionstest eine Hemmung des Wachstums von *E. coli* K88,K99, *Salmonella enterica* ssp. *typhimurium* und *Staphylococcus aureus* beobachtet werden (Guo et al. 2006). Mit *E. coli*- und *E. faecium* - Probiotika konnte ferner die Invasion von Salmonellen und invasiven *E. coli* in Darmzell-Kulturen vermindert werden (Altenhoefer et al. 2004; Kleta et al. 2006; Schierack, Steinruck et al. 2006). Keine dieser Substanzen ist zur Zeit auf molekularer Ebene identifiziert.

Seit längerem ist bekannt, dass Enterokokken, Laktobazillen und auch Bifidobakterien antimikrobielle Substanzen (Bacteriocine) produzieren, welche teilweise hochspezifisch gegen bestimmte andere, meist näher verwandte bakterielle Spezies wirksam sind und deren Wachstum hemmen können (du Toit et al. 2000; De Vuyst et al. 2003; Foulquie Moreno et al. 2003; Park et al. 2003; Rodriguez et al. 2003; Collado, Hernandez et al. 2005). Die konservierenden Eigenschaften solcher Bakterienstämme in Lebensmitteln werden darauf zurückgeführt (Cleveland et al. 2001). Inwieweit diese Eigenschaften bei den Wirkungsweisen probiotischer Bakterien *in vivo* eine Rolle spielen, ist zur Zeit noch unbekannt.

Weitere antimikrobiell wirkende Effekte sollen durch Stoffwechsel-Endprodukte der residenten fermentativen Bakterien hervorgerufen werden. Insbesondere Laktat soll neben pH-Wert-senkenden Eigenschaften, welche sich hemmend auf das Wachstum pathogener Keime auswirken können, direkt antimikrobielle Wirksamkeit besitzen (Nousiainen 1993; Sakata et al. 1999; Rolfe 2000). Da viele Probiotika zu den Milchsäurebakterien gehören, wurden positive Effekte dieser Präparate

unter anderem auch auf das von ihnen produzierte Laktat zurückgeführt (Rolfe 2000).

Andere Autoren vermuten eine Begünstigung oder Aktivierung der fermentativen intestinalen Bakterien durch Probiotika und damit eine Erhöhung unter anderem der Laktat- Produktion (Macfarlane und Macfarlane 2003; Simon 2003). Bei Puten konnte ein Anstieg der Laktat- Konzentrationen sowie erhöhte Stoffwechselaktivität von Laktobazillen im Darm, gemessen durch *Lactobacillus*- spezifischer rRNA, bei Zufütterung von *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 beobachtet werden (Vahjen et al. 2002).

Deutlichere Auswirkungen auf erhöhte bakterielle Aktivität im Sinne von erhöhten Laktat- Konzentrationen sowie Konzentrationen anderer flüchtiger Fettsäuren wurden bei Schweinen jedoch meist durch Zuführung entsprechender Substrate erzielt, wie es zum Beispiel nach dem Absetzen mit der Umstellung auf Getreidefutter mit enthaltenen NDOs erfolgt (Mathew et al. 1997; Mathew, Upchurch et al. 1998; Canibe et al. 2001; Franklin et al. 2002; Scholten et al. 2002).

1.3.4.2 Auswirkungen auf das Immunsystem

Die Schleimhaut des Verdauungstraktes stellt mit seinem enthaltenen lymphatischen Gewebe die größte direkte Kontaktfläche des Immunsystems mit der Umwelt dar (Simon 2003). Wie bereits erwähnt, erfolgen wesentliche, prägende Entwicklungsvorgänge des jungen Immunsystems an den mucosalen Oberflächen des Darmes (Cebra 1999; Hooper und Gordon 2001; Rhee, Sethupathi et al. 2004). Für die Auswirkungen von Probiotika auf das Immunsystem wurden verschiedene Wirkmechanismen vermutet (Erickson und Hubbard 2000). Immunstimulatorische Effekte wurden beim Einsatz von *Bifidobacterium* spp. *in vitro* beobachtet. Hier konnte eine Induktion der Zytokin- Produktion in Makrophagen gemessen werden (Marin et al. 1997). Insbesondere Immunmodulation im Sinne von Induktion einer angepassten Immunantwort auf Antigene wurde an gnotobiotischen Tiermodellen mit einzelnen inokulierten Bakterien nachgewiesen (Falk et al. 1998; Scharek et al. 2000; Hooper und Gordon 2001). Es wurde gezeigt, dass Probiotika die intestinale IgA-Sekretion stimulieren können und für eine ausbalancierte T_H - Lymphozyten-Antwort verantwortlich sind. Inadäquate, überschießende T_H - Zell-Reaktionen werden in der Humanmedizin typischerweise bei Atopie und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen beobachtet (Takahashi et al. 1998; Kirjavainen et al. 1999; Kirjavainen und Gibson 1999; Forchielli und Walker 2005; Isolauri et al. 2005). In Zusammenhang mit den Auswirkungen darmpathogener Bakterien konnten anti- inflammatorische Effekte diverser Probiotika nachgewiesen werden, so z.B. die Hemmung der IL-8 Synthese in Enterozyten, die durch proinflammato-

rische Zytokine darmpathogener Krankheitserreger wie Salmonellen oder EHEC bewirkt wird (Dahan et al. 2003; Bai et al. 2004; Nemeth et al. 2006).

Das Phänomen der Entwicklung einer Immuntoleranz im Sinne einer adäquaten Immunantwort auf Futterantigene und kommensale Bakterien und die Fähigkeit zur Differenzierung dieser Bakterien von pathogenen konnte auch bei heranwachsenden Ferkeln beobachtet werden. Dieser Vorgang benötigt längere Zeit und erklärt somit die erhöhte Empfänglichkeit für pathogene Mikroorganismen während der Absatzphase, in der durch die abrupte Nahrungsumstellung diese Entwicklung gestört werden kann (Bailey et al. 2001; Vega-Lopez et al. 2001; Stokes et al. 2003).

Beim Einsatz von Probiotika bei Nutztieren konnten je nach eingesetztem Mikroorganismus unterschiedliche Auswirkungen beobachtet werden. Die Anwendung von *Bacillus cereus* var. *toyoi* und *Saccharomyces boulardii* führte zu einem Anstieg verschiedener Lymphozytenpopulation im Darm von Mastschweinen (van Briel 2002). Dagegen wurde in der Mucosa der Ferkel, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit mit *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 behandelt wurden, reduzierte CD8+ - Lymphozytenzahlen und weitgehend unbeeinflusste fäkale IgA sowie erniedrigte Serum- IgG- Konzentrationen gemessen (Scharek et al. 2005). Ähnliche Untersuchungen zeigten ebenfalls tendenziell erniedrigte Serum- IgG- Spiegel bei Ferkeln (Broom et al. 2006). Bei Zufütterung des probiotischen *E. coli* NISSLE wurde bei detaillierten Untersuchungen des Schleimhaut-Immunsystems aus verschiedenen Darmsegmenten von Schweinen kaum Auswirkungen auf die einzelnen Lymphozytenpopulationen gefunden (Duncker et al. 2006). Mit einem *Bifidobacterium lactis* HN019- Probiotikum konnten hingegen erhöhte T-Zell-Proliferation und phagozytotische Aktivität weiterer Blutzellen neben verringerten Durchfallsymptomen beobachtet werden (Shu et al. 2001).

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Auswirkungen auf das Immunsystem sehr vielfältig sind und je nach verwendetem Mikroorganismus entweder stimulierend oder modulierend bzw. hemmend ausfallen können.

1.3.4.3 Andere Effekte von Probiotika

Auswirkungen von Probiotika auf verschiedene andere Bereiche des Verdauungstrakts und damit auf das Wirtstier sind in der Vergangenheit ebenfalls Gegenstand detaillierter Untersuchung gewesen. So sind Beeinflussungen der intestinalen Schleimhaut- Morphologie und Funktion und der Belastung mit toxischen Metaboliten beschrieben worden.

Nach Anwendung von *Bacillus cereus* var. *toyoi* konnten z.B. signifikant längere Mikrovilli im Jejunum von Schweinen gemessen werden (Görke 2000). Die künstlich stimulierte Chlorid- Sekretion in Dünndarm- Epithelien von Schweinen war bei mit *Bacillus cereus* var. *toyoi*, *Bacillus cereus* var. *caron* und *Saccharomy-*

ces boulardii vorbehandelten Tieren deutlich reduziert (Winckler et al. 1998). Auch die Natrium- abhängige Glucose- Absorption in isolierter Dünndarmschleimhaut wurde ebenfalls durch *Bacillus cereus* var. *toyoi* und *Saccharomyces boulardii* stimuliert (Breves et al. 2000). Beide Vorgänge haben direkten Einfluss auf die Resorption von Wasser aus der Digesta und können somit bei der Reduktion von Durchfällen eine Rolle spielen.

Im Rattenmodell konnte die durch pathogene *E. coli* hervorgerufene erhöhte intestinale Permeabilität durch *Lactobacillus plantarum* 299v verhindert werden (Mangell et al. 2002). Auch die Streß- induzierte gestörte Barrierefunktion des Darmes bei Ratten, wie sie auch bei Ferkeln um den Absetz- Zeitpunkt herum auftritt, konnte durch *Lactobacillus helveticus* und *L.rhamnosus* stabilisiert werden (Spreeuwenberg et al. 2001; Zareie et al. 2006). Der probiotische *E. coli* NISSLE unterdrückte die Entwicklung sekretorischer Diarrhöe bei Ferkeln nach künstlicher Infektion mit ETEC *in vivo* und nachweislich auch auf zellulärer Ebene (Schroeder et al. 2006). Für zwei *Lactobacillus* spp. konnte die Induktion der Genexpression für Muzine in Epithelzellen gezeigt werden. Die Adhäsion pathogener *E. coli* erschien dadurch behindert (Mack et al. 1999).

Die Fähigkeit einiger intestinaler Bakterien und Probiotika zur Hydrolyse von Gallensäuren wird je nach Einsatzgebiet unterschiedlich beurteilt. Für Anwendungen in der Humanernährung werden Mikroorganismen mit erhöhter Gallensäurehydrolase- Aktivität als günstig angesehen, sofern sie nicht an der Entstehung von karzinogen wirkenden sekundären Gallensalzen beteiligt sind (De Boever et al. 2000). Es wurde gezeigt, dass mit *Lactobacillus reuteri* der Serum- Cholesterol- Spiegel von Probanden gesenkt werden konnte und führte das auf erhöhte Gallensäurehydrolyse und damit Entzug der Substanzen aus dem enterohepatischen Kreislauf zurück (De Smet et al. 1998). Für die Anwendung bei Nutztieren werden solche Eigenschaften eher kritisch gesehen, da durch verringerte luminale Gallensäurekonzentrationen theoretisch die Fettverdaulichkeit gesenkt werden könnte (Feighner und Dashkevich 1987; Tannock et al. 1994; Simon 2003). Deshalb wurde die von *Bacillus cereus* var. *toyoi* bei Ferkeln verursachte erniedrigte Hydrolase- Aktivität im Darm im Zusammenhang mit den weiteren Ergebnissen als günstig beurteilt (Jadamus 2001).

Weitere, im Zusammenhang mit der Anwendung von Probiotika beobachtete oder vermutete Effekte sind beispielsweise die Reduktion von Ammoniak im Verdauungstrakt. Da Ammoniak beim Schwein bereits im distalen Dünndarm in größeren Mengen entsteht und resorbiert wird (Bolduan et al. 1986), könnte eine Reduktion dieses toxischen Metaboliten die Belastung für das Wirtstier senken und somit möglicherweise gesundheitsfördernd wirken. Im Detail wurde bereits gezeigt, dass Ammoniak die Aufnahme von energiereicher Substrate in

Enterozyten hemmen kann (Darcy-Vrillon et al. 1996). Beim Menschen werden die antikarzinogenen Eigenschaften von Probiotika unter anderem auf die Detoxifizierung mutagen wirkender bakterieller Stoffwechselprodukte zurückgeführt (De Boever et al. 2000; Wollowski et al. 2001; Rafter 2003).

In vitro konnte bei Anwendung von Probiotika die Ammoniak- Entstehung in Caecum- Inhalt vom Schwein reduziert werden (Sakata et al. 2003). Der Einsatz eines *Bacillus*- Probiotikums führte bei Schweinen zu besserer Stickstoffretention bei niedrigeren Ammoniak- Konzentrationen im Blut (Scheuermann 1993).

1.3.5 Das Probiotikum *Enterococcus faecium* NCIMB 10415

Enterococcus faecium NCIMB 10415 (DSM 10663), in der Vergangenheit meist als *Enterococcus faecium* SF 68 bezeichnet, wurde bereits in der Humanmedizin wie auch in der Tiermedizin mehrfach zu therapeutischen wie auch prophylaktischen Zwecken eingesetzt (Wunderlich et al. 1989; Buydens und Debeuckelaere 1996; Marteau et al. 2001; Vahjen et al. 2002; Broom et al. 2006; Zeyner und Boldt 2006). Das Bakterium ist ein typischer Vertreter des Genus *Enterococcus*; lichtmikroskopisch erscheint er als gram- positives, unbewegliches, ovoides Kokkenbakterium, welches einzeln, paarweise oder in Ketten zusammengelagert auftritt. Der Metabolismus ist fakultativ anaerob, die Energiegewinnung erfolgt homofermentativ entsprechend dem Emden-Meyerhof-Parnas-Weg. Als Stoffwechsel- Endprodukt wird vornehmlich das L(+)-Enantiomer von Laktat produziert (Holt et al. 1994). Galle in Nährmedien wird in der Regel toleriert (Franz, Specht et al. 2001; Linaje et al. 2004). Wie alle Vertreter dieses Stammes ist das natürliche Habitat von *Enterococcus faecium* der Darm von Säugetieren. Beim Schwein kommt *E. faecium* am häufigsten vor, gefolgt von *E. faecalis*, *E. hirae* und *E. cecorum*. In einer anderen Untersuchung wurde bei Mastschweinen dagegen neben *E. faecalis* als häufigstem Keim auch *E. gallinarum* isoliert (Hultqvist 2003). Es werden jedoch auch regelmäßig Enterokokken in anderen Bereichen der Nahrungskette gefunden, die mit tierischen Organismen in Zusammenhang stehen, so z.B. Schlachtkörper, gedüngter Boden und darauf wachsendes Getreide, Oberflächenwasser usw. (Devriese et al. 1994; Kuhn et al. 2003).

Die meisten probiotischen *Enterococcus faecium* spp. besitzen das Adhesin efaAfm. Weder hämolytische Aktivität noch *gelE*- Gelatinase-Aktivität konnte bei solchen Stämmen bisher beobachtet werden, obwohl das Gen für die Gelatinase oft nachgewiesen wurde. Ferner wurden keine *agg*- und *cyl*- Gene für Adhäsion und Zytotoxizität wie auch *sexpheromon*- Gene gefunden, welche unter Umständen den potentiellen Erwerb von Pathogenitätsgenen ermöglichen (Eaton und Gasson 2001). Auch *E. faecium* NCIMB 10415 weist nach PCR- Ergebnissen des Instituts für Tier-

ernährung der FU Berlin bis auf das efaAfm- Gen keine der typischen *Enterococcus* - relevanten Pathogenitätsfaktoren auf (Anonym 2002, 2003; Vahjen 2007).

Dennoch konnte in einem conjugation assay der für die Vancomycin- Resistenz verantwortliche vanA-gene-cluster von *E. faecium*- Donorstämmen auf *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 übertragen werden (Lund und Edlund 2001). Dies muss prinzipiell als Problem angesehen werden, da in letzter Zeit zunehmend resistente Bakterien in Lebensmitteln tierischen Ursprungs gefunden wurden (Domig 2005). Zudem spielen multiresistente *Enterococcus faecium* nach *Enterococcus faecalis* häufiger bei nosokomialen Infektionen eine Rolle (Franz et al. 1999; Peters 2003). Auch HULTQVIST (2003) berichtete von mehrfachen Vorkommen multiresistenter *E. faecium*- Isolate bei verschiedenen Nutztierarten, ebenso konnte die wechselseitige Übertragung resistenter Enterokokken zwischen Mensch und Umwelt nachgewiesen werden (Iversen et al. 2004). Deshalb werden Probiotika, die Enterokokken enthalten, in letzter Zeit kritischer betrachtet (Anonym 2003; Anadon et al. 2006). Generell gilt *E. faecium* jedoch zur Zeit in Bezug auf Verbreitung von Antibiotika- Resistenzen, insbesondere der Vancomycin- Resistenz, als relativ sicher. Der überwiegende Anteil der Isolate war bisher Vancomycin- und Teicoplanin-sensibel und schien eine geringere Gentransfer- Rate aufzuweisen als *Enterococcus faecalis* (Klein et al. 1998; Eaton und Gasson 2001; Franz, Muscholl-Silberhorn et al. 2001).

Viele Enterokokken produzieren bekanntermaßen eine Reihe von Bacteriocinen gegen meist enger verwandte Spezies, aber auch gegen Listerien und Clostridien, was unter anderem als positiver Effekt bei der Herstellung von Rohmilch- und Rohwurstprodukten angesehen wird (Franz et al. 1999; du Toit et al. 2000; De Vuyst et al. 2003; Park et al. 2003; Peters 2003). Für *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 konnte keines der bekannten Bacteriocin- Gene nachgewiesen werden, es wurde jedoch ein 4488,4 dalton großes Enterocin- ähnliches Peptid gefunden, dessen Aminosäure- Sequenz aber noch nicht entschlüsselt werden konnte (Foulquie Moreno et al. 2003).