

Aus dem Institut für Tierernährung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Die Wirkung organischer Säuren als Futterzusatzstoff
auf Nährstoffumsatz und Bakterienpopulationen im
Verdauungstrakt von Absetzferkeln**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Katrin Kirsch
Tierärztin
aus Berlin

Berlin 2010

Journal-Nr.: 3381

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Leo Brunnberg
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Ortwin Simon
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Lothar H. Wieler
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Holger Martens

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

pigs, piglets, weaning, feed additives, organic acids, benzoic acid, formic acid, citric acid, digestive tract, microbial flora, polymerase chain reaction, electrophoresis, *Escherichia coli*

Tag der Promotion: 28.10.2010

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <<http://dnb.ddb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-86664-878-4

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2010

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2010

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

meinem Nicolás

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	1
1. Literaturübersicht	3
1.1 Organische Säuren	3
1.1.1 Einsatz organischer Säuren in der Tierernährung	4
1.1.2 Einsatz organischer Säuren als Konservierungsmittel in Futtermitteln	4
1.1.3 Die Rolle organischer Säuren in der Ferkelaufzucht	5
1.1.3.1 Absetzen und resultierendes gesundheitliches Risiko der Ferkel	5
1.1.3.1.1 Postweaning Coli Complex (PWCC), Krankheitsbild und Ursache	6
1.1.3.2 Einsatz organischer Säuren in der Ferkelaufzucht	9
1.1.4 Wirkungsweise organischer Säuren	10
1.1.4.1 Wirkung organischer Säuren auf die Mikrobiota im Gastrointestinaltrakt	10
1.1.4.2 Wirkung organischer Säuren auf pH-Wert und Pufferkapazität der Digesta	12
1.1.4.3 Wirkung organischer Säuren auf Enzymaktivitäten und Magenentleerungsrate	13
1.1.4.4 Auswirkungen organischer Säuren auf die Darmmorphologie	14
1.1.4.5 Auswirkungen organischer Säuren auf Leistungsparameter und Verdaulichkeit	14
1.1.5 Kenntnisstand zur spezifischen Wirkung einiger organischer Säuren	15
1.2 Bakterienpopulationen im Verdauungstrakt	23
1.2.1 <i>Escherichia coli</i>	24
1.2.2 Pathogene, Diarrhoe verursachende <i>Escherichia coli</i>	25
1.2.3 Serotypen/Serogruppen von <i>E.coli</i>	24
1.2.4 Pathogenitätsfaktoren und Pathogenitätsgene von <i>E.coli</i>	28
1.2.4.1 Fimbrien-tragende <i>E.coli</i>	30
1.2.4.2 Enterotoxine von <i>E.coli</i>	31
2. Material und Methoden	34
2.1 Tiere und Haltungsbedingungen	34
2.2 Aufteilung der Versuchsgruppen	34
2.3 Versuchsdiäten	35
2.3.1 Fütterung	36

2.4 Zootechnische Leistungen	37
2.5 Kotkonsistenz	37
2.6 Probengewinnung	38
2.7 Futtermittelanalysen	39
2.7.1 Bestimmung der Pufferkapazität des Futters	39
2.7.2 Benzoessäurekonzentrationsbestimmung in Futtermittel und Digesta mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)	40
2.7.3 Ameisensäurekonzentrationsbestimmung in Futtermittel und Digesta mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)	41
2.8 Messungen von Stoffwechselprodukten in Digesta	42
2.8.1 Ammonium-Bestimmung in Digesta mittels ionenselektiver Elektrode	42
2.8.2 Enzymatische Bestimmung von [D(-)- und L(+)]-Laktat	43
2.8.3 Gaschromatographische Messung der kurzkettigen flüchtigen Fettsäuren (FFS)	43
2.8.4 pH-Messung in Digesta und Harn	44
2.8.5 Bestimmung des Markers Chromoxid für die Berechnung der scheinbaren praecaecalen Verdaulichkeit	45
2.8.6 Lyophilisierung der Kot- und Digestaprobe	44
2.8.7 Trockenmassebestimmung aus Kot und Digesta	45
2.8.8 Hippursäurebestimmung aus Harn	45
2.8.9 Weender Analyse, Aminosäuregehaltbestimmung und Berechnung der scheinbaren praecaecalen und scheinbaren Gesamttraktverdaulichkeit	45
2.9 Mikrobiologische Methoden	46
2.9.1 Bestimmung der Koloniebildenden Einheiten (KbE) von <i>Escherichia coli</i>	46
2.10 Molekularbiologische Methoden	47
2.10.1 DNA-Gewinnung aus Bakterienkolonien für die Multiplex-Polymerase- Kettenreaktion (MPCR)	47
2.10.2 Extraktion der Gesamt-Nukleinsäuren aus Digesta	47
2.10.3 Extraktion der Gesamt-Nukleinsäuren aus Kot	49
2.10.4 Messung des Gesamt-DNA-Gehaltes	50
2.10.5 Untersuchung auf das Vorkommen pathogener <i>E.coli</i> mittels MPCR	50
2.10.5.1 Untersuchung des Darminhalts auf das Vorkommen neun schweinetypischer Pathogenitätsgene von <i>E.coli</i>	52
2.10.5.2 Agarose-Gelelektrophorese zur Sichtbarmachung der MPCR-Ergebnisse	53

2.10.6 Untersuchung der mikrobiellen Diversität mittels der Denaturierenden Gradientengelelektrophorese (DGGE)	53
2.10.7 Quantitative Realtime PCR	58
2.11 Datenverarbeitung und statistische Untersuchung	62
3. Ergebnisse	64
3.1 Zootechnische Leistungsdaten	64
3.1.2 Leistungsdaten als Kombination aus beiden Versuchsabschnitten	68
3.2 Ergebnisse der Kotkonsistenzbeurteilung	70
3.3 Futtermitteluntersuchungen	72
3.3.1 Ergebnisse der Pufferkapazitätsbestimmung	72
3.3.2 Ergebnisse der Benzoesäurekonzentrationsbestimmung	72
3.3.2.1 Benzoesäurekonzentrationsbestimmung im Futtermittel	72
3.3.2.2 Benzoesäurekonzentrationsbestimmung in Digesta	73
3.3.3 Ergebnisse der Ameisensäurekonzentrationsbestimmung	73
3.3.3.1 Ameisensäurekonzentrationsbestimmung im Futtermittel	73
3.3.3.2 Ameisensäurekonzentrationsbestimmung in Digesta	74
3.4 Ergebnisse der Stoffwechselprodukte in Digesta	75
3.4.1 Ammoniumkonzentration in Digesta	75
3.4.2 [D(-)- und L(+)]-Laktatgehalte in Digesta	75
3.4.3 Flüchtige Fettsäuren in Digesta	78
3.5 Ergebnisse der pH-Wertmessung in Harn und Digesta	83
3.6 Ergebnisse der Trockenmassebestimmung in Kot und Digesta	84
3.7 Ergebnisse der Hippursäurebestimmung	85
3.8 Ergebnisse der scheinbaren praecaecalen und scheinbaren Gesamttraktverdaulichkeit	85
3.8.1 Ergebnisse zur scheinbaren praecaecalen Verdaulichkeit	85
3.8.1.1 Scheinbare praecaecale Aminosäureverdaulichkeit	86
3.8.2 Ergebnisse zur scheinbaren Gesamttraktverdaulichkeit	88
3.9 Ergebnisse zu den Koloniebildenden Einheiten (KbE) von <i>Escherichia coli</i>	88
3.10 Ergebnisse zur Multiplex-Polymerasekettenreaktion (MPCR)	89
3.11 Ergebnisse zur Denaturierenden Gradientengelelektrophorese (DGGE)	90
3.11.1 Ökologische Indizes im Zeitverlauf	92
3.11.2 Ergebnisse der DGGE-Digestaprobe	100

3.12 Ergebnisse der Realtime-Polymerasekettenreaktion (Realtime-PCR)	101
4. Diskussion	106
4.1 Leistungsparameter	107
4.2 Ameisensäure- und Benzoesäurekonzentration und Einsatz der Säuren	109
4.3 Verdaulichkeit der Rohnährstoffe	110
4.4 Zusammenhänge des pH-Wertes und der Pufferkapazität des Futters auf Effekte im Gastrointestinaltrakt	112
4.5 Harn-pH und Hippursäurebestimmung	114
4.6 Durchfall und Ferkelverluste	115
4.7 Einfluss der verschiedenen organischen Säuren auf die Mikrobiota des Verdauungstraktes von Absetzferkeln	116
4.7.1 Bakterielle Stoffwechselmetaboliten	116
4.7.2 Untersuchungen zum Einfluss auf die <i>E.coli</i> -Population	123
4.7.3 Bakterielle Diversität	127
4.8 Schlussfolgerung und Ausblick	130
5. Zusammenfassung	132
6. Summary	134
7. Literaturverzeichnis	136
Anhang	154
Danksagung	166
Selbstständigkeitserklärung	167

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strukturformel der Ameisensäure	16
Abbildung 2: Strukturformel der Benzoesäure	19
Abbildung 3: Strukturformel der Zitronensäure	21
Abbildung 4: Richnesswerte der Kontroll- und Ameisensäuregruppe im Zeitverlauf vom 5. bis zum 14. Tag nach dem Absetzen	93
Abbildung 5: Richnesswerte der Benzoesäure- und Kombinationspräparategruppe im Zeitverlauf vom 5. bis zum 14. Tag nach dem Absetzen	93
Abbildung 6: Shannon-Indizes der Kontroll- und Ameisensäuregruppe im Zeitverlauf vom 5. bis zum 14. Tag nach dem Absetzen	94
Abbildung 7: Shannon-Indizes der Benzoesäure- und Kombinationspräparategruppe im Zeitverlauf vom 5. bis zum 14. Tag nach dem Absetzen	95
Abbildung 8: Evennesswerte der Kontroll- und Ameisensäuregruppe im Zeitverlauf vom 5. bis zum 14. Tag nach dem Absetzen	96
Abbildung 9: Evennesswerte der Benzoesäure- und Kombinationspräparategruppe im Zeitverlauf vom 5. bis zum 14. Tag nach dem Absetzen	96
Abbildung 10: Simpson-Indizes der Kontroll- und Ameisensäuregruppe im Zeitverlauf vom 5. bis zum 14. Tag nach dem Absetzen	97
Abbildung 11: Simpson-Indizes der Benzoesäure- und Kombinationspräparategruppe im Zeitverlauf vom 5. bis zum 14. Tag nach dem Absetzen	98

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chemische und physikalische Eigenschaften einiger organischer Säuren	3
Tabelle 2: Virulenzgene schweinepathogener <i>E.coli</i>	28
Tabelle 3: Versuchsdesign	34
Tabelle 4: Basisdiät und kalkulierte Energie- sowie Nährstoffgehalte des Alleinfuttermittels für Aufzuchtferkel	35
Tabelle 4a: Am Institut für Tierernährung (FU-Berlin) analysierte Futtermittelgehalte der vier Versuchsgruppen nach VDLUFA (Naumann 1988)	36
Tabelle 5: Bonitieringsschlüssel für die Kotkonsistenz	37
Tabelle 6: Primersequenzen für pathogene <i>E.coli</i> (Bosworth und Casey 1997)	51
Tabelle 7: PCR-Programm für <i>E.coli</i> -MPCR (touchdown PCR)	52
Tabelle 8: PCR-Programm für die DGGE	54

Tabelle 9: Gruppen und speziesspezifische Oligonukleotide für Detektion ausgewählter Bakterienarten und –gruppen	60
Tabelle 10: Standard-Temperaturprogramm der Real-Time PCR	61
Tabelle 11: Effekte von Ameisensäure und Benzoesäure einzeln oder in Kombination auf die zootechnischen Leistungen bei abgesetzten Saugferkeln im Altersabschnitt 23. bis 64. Lebenstag aus dem Leistungsversuch (Angaben je Tier)	64
Tabelle 12: Effekte von Ameisensäure und Benzoesäure einzeln oder in Kombination auf die periodisch zusammengefassten zootechnischen Leistungen bei abgesetzten Saugferkeln im Altersabschnitt 23. bis 64. Lebenstag aus dem Leistungsversuch (Angaben je Tier)	66
Tabelle 13: Effekte von Ameisensäure und Benzoesäure einzeln oder in Kombination auf die zootechnischen Leistungen bei abgesetzten Saugferkeln im Altersabschnitt 23. bis 43. Lebenstag kombiniert aus dem mikrobiologischen- und Leistungsversuch (Angaben je Tier)	68
Tabelle 14: Effekte von Ameisensäure und Benzoesäure einzeln oder in Kombination auf die periodisch zusammengefassten zootechnischen Leistungen bei abgesetzten Saugferkeln im Altersabschnitt 23. bis 43. Lebenstag kombiniert aus dem mikrobiologischen- und Leistungsversuch (Angaben je Tier)	69
Tabelle 15: Kotkonsistenz für die einzelnen Versuchsgruppen (Angaben je Tier)	71
Tabelle 16: Durchfallgeschehen im Gruppenvergleich	71
Tabelle 17: Pufferkapazität β der Versuchsdiäten [mol/l]	72
Tabelle 18: Benzoesäurekonzentrationsbestimmung aus den Futtermitteln der Benzoesäuregruppe (mit und ohne Chrom) und der Kombinations- präparatgruppe (mit und ohne Chrom)	72
Tabelle 19: Konzentration der Benzoesäure in Digesta und Digesta- trockenmasse [mg/kg]	73
Tabelle 19a: Konzentration der Benzoesäure im distalen Jejunum [mg/kg] und scheinbare praecaecale Verdaulichkeit [%] der Benzoesäure	73

Tabelle 20: Ameisensäurekonzentrationsbestimmung aus den Futtermitteln der Ameisensäuregruppe (mit und ohne Chrom) und der Kombinationspräparatgruppe (mit und ohne Chrom)	74
Tabelle 21: Konzentration der Ameisensäure in Digesta und Digesta-trockenmasse [mg/kg]	74
Tabelle 21a: Konzentration der Ameisensäure im distalen Jejunum [mg/kg] und scheinbare praecaecale Verdaulichkeit [%] der Ameisensäure	75
Tabelle 22: Ammoniumgehalte in Digesta für die vier Versuchsgruppen [mmol/l]	75
Tabelle 23: D(-)-Laktatgehalt in Digesta für die vier Versuchsgruppen [mmol/kg]	76
Tabelle 24: L(+)-Laktatgehalt in Digesta für die vier Versuchsgruppen [mmol/kg]	76
Tabelle 25: Gesamtlaktatgehalt in Digesta für die vier Versuchsgruppen [mmol/kg]	77
Tabelle 26: Verhältnis von [L(+) und D(-)]-Laktat zueinander aus den Digestaprobe- der einzelnen Darmabschnitte	78
Tabelle 27: Die Konzentrationen der einzelnen und gesamten freien Fettsäuren aus Magendigesta für die vier Versuchsgruppen [mmol/kg]	79
Tabelle 28: Die Konzentrationen der einzelnen und gesamten freien Fettsäuren aus Jejunaldigesta (proximal) für die vier Versuchsgruppen [mmol/kg]	80
Tabelle 29: Die Konzentrationen der einzelnen und gesamten freien Fettsäuren aus Jejunaldigesta (distal) für die vier Versuchsgruppen [mmol/kg]	81
Tabelle 30: Die Konzentrationen der einzelnen und gesamten freien Fettsäuren aus Colondigesta für die vier Versuchsgruppen [mmol/kg]	82
Tabelle 31: pH-Werte der einzelnen Darmabschnitte für die vier Versuchsgruppen	83
Tabelle 32: pH-Werte des Harns für die vier Versuchsgruppen	83
Tabelle 33: Trockenmassebestimmung des Kots am 5., 9. und 14. Tag nach dem Absetzen für die vier Versuchsgruppen [%]	84
Tabelle 34: Trockenmassebestimmung aus Digesta für die vier Versuchsgruppen [%]	84
Tabelle 35: Hippursäuregehalte im Harn für die Kontrollgruppe, Benzoessäuregruppe und Kombinationspräparatgruppe [mg/l]	85
Tabelle 36: Scheinbare praecaecale Verdaulichkeit der Rohnährstoffe für die vier Versuchsgruppen [%]	86
Tabelle 37: Scheinbare praecaecale Aminosäurenverdaulichkeit für die vier Versuchsgruppen [%]	87
Tabelle 38: Scheinbare Gesamtraktverdaulichkeit der Rohnährstoffe für die vier Versuchsgruppen [%]	88

Tabelle 39: Koloniebildene Einheiten von <i>E.coli</i> für die vier Versuchsgruppen [KbE/g Feuchtgewicht]	89
Tabelle 40: Ergebnisse der MPCR zu Pathogenitätsgenen von <i>E.coli</i>	90
Tabelle 41: Ökologische Indizes im Kot am 5. Tag nach dem Absetzen für die vier Versuchsgruppen (n=7)	91
Tabelle 42: Ökologische Indizes im Kot am 9. Tag nach dem Absetzen für die vier Versuchsgruppen (n=7)	91
Tabelle 43: Ökologische Indizes im Kot am 14. Tag nach dem Absetzen für die vier Versuchsgruppen (n=7)	92
Tabelle 44: Der Sörensen-Quotient im Gruppenvergleich aus Kot am 5., 9. und 14. Tag	99
Tabelle 45: Signifikante und tendenzielle Unterschiede des Sörensen- Quotienten aus den Kotproben am 14. Tag	99
Tabelle 46: Ökologische Indizes der bakteriellen Besiedlung im Colon für die vier Versuchsgruppen	100
Tabelle 47: Sörensen-Quotienten im Gruppenvergleich aus den Colonproben	101
Tabelle 48: Ergebnisse der Realtime-PCR aus Mageninhalt [log10 Zellzahl] und der Verhältnisse [%]	102
Tabelle 49: Ergebnisse der Realtime-PCR aus distalem Jejunuminhalt [log10 Zellzahl] und der Verhältnisse [%]	103
Tabelle 50: Ergebnisse der Realtime-PCR aus Coloninhalt [log10] und der Verhältnisse [%]	104
Tabelle A1 : Verwendete Chemikalien und Geräte zur Benzoessäurekonzentrations- bestimmung	154
Tabelle A2: Für die Ameisensäurekonzentrationsbestimmung verwendete Chemikalien und Geräte	156
Tabelle A3: Verwendete Chemikalien und Geräte zur Ammoniumbestimmung	157
Tabelle A4: Chemikalien und Geräte zur Bestimmung von [L(+) und D(-)]-Laktat	157
Tabelle A5: Verwendete Chemikalien und Geräte zur Bestimmung von FFS	158
Tabelle A6: Chemikalien und Geräte zur Bestimmung des pH-Wertes	158
Tabelle A7: Chemikalien und Geräte zur Ziel-DNA-Gewinnung	159
Tabelle A8: Verwendete Geräte und Chemikalien zur DNA-Extraktion	159
Tabelle A9: Geräte und Chemikalien zur Messung des Gesamt-DNA Gehalts	159
Tabelle A10: Verwendete Geräte und Chemikalien für die Durchführung der MPCR	160

Tabelle A11: Verwendete Chemikalien, Materialien und Geräte für die DGGE	161
Tabelle A12: Herstellungsschema der denaturierenden Gradienten	161
Tabelle A13: Verwendete Geräte und Chemikalien für die Realtime-PCR	163
Tabelle A14: Referenzstämme und Kultivierungsbedingungen	164
Tabelle A15: Verwendete Geräte und Chemikalien für die Erstellung einer Kalibrierreihe	165

Abkürzungsverzeichnis

AIDA	adhesin involved in diffuse adherence
APS	Ammoniumpersulfat
BHA	Butylhydroxytolual
BHI	Brain-Heart Infusion (Medium)
BHT	Butylhydroxyanisol
CSB	Citrat-Sarcosin-Puffer
Ct	Zykluszahl eines Realtime-PCR-Laufs, bei der sich das Fluoreszenzsignal deutlich vom Hintergrund abhebt
DAEC	diffus adhärenente <i>Escherichia coli</i>
DSM/DSMZ	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
EAggEC	enteroaggregative <i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraacetat
EHEC	enterohaemorrhagische <i>Escherichia coli</i>
EIEC	enteroinvasive <i>Escherichia coli</i>
EPEC	enteropathogene <i>Escherichia coli</i>
ETEC	enterotoxische <i>Escherichia coli</i>
GC-clamp	Guanin-Cytosin-Klammer
GITC	Guanidin-Isothiocyanat
HGE	Hemorrhagic Gastroenteritis
LT	hitzelabiles Toxin
mot/min	motion/minute= Bewegungen pro Minute
NCIMB	National Collection of Industrial and Marine Bacteria (Scotland)
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PWCC	Postweaning Coli Complex
PWD	Postweaning Diarrhea
PWW	Postweaning Wasting
ST	hitzestabiles Toxin
STEC	shigatoxinbildende <i>Escherichia coli</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TEMED	N N N',N'-Tetramethylethyldiamin
TGEV	Transmissible Gastroenteritisviren
TGGE	Temperatur Gradientengelelektrophorese

Einleitung

Die Mikrobiota im Verdauungstrakt von Säugetieren ist eine komplexe Gemeinschaft verschiedener Mikroorganismen, die in ihrer Existenz weitgehend abhängig von ihrem Umgebungsmilieu sind. In einem gesunden Tier befindet sich dieses mikrobielle Ökosystem in einem stabilen Fließgleichgewicht (Savage 1977).

In der neonatalen Phase des Säugetiers besteht die Besiedlung des Gastrointestinaltrakts noch aus einer einfachen, labilen Mikrobiota, da sie noch auf einfache Milchnahrung spezialisiert ist. Erweitert sich das Nahrungsangebot, kommt es zur Veränderung der bakteriellen Gemeinschaft hin zu einer komplexen und stabilen Mikrobiota (Mackie et al. 1999; Egert et al. 2006).

In der konventionellen Landwirtschaft werden Ferkel im Alter von drei bis vier Wochen vom Muttertier abgesetzt und damit von der Sauenmilch auf feste Nahrung umgestellt. Durch diesen Absetzvorgang kommt es zur drastischen morphologischen und immunologischen Reifung des Verdauungstraktes, zu einer veränderten Expression von Verdauungsenzymen und vor allem zur Veränderung der bakteriellen Gemeinschaft durch ein verändertes Nährstoffangebot für die Mikroorganismen (Inoue et al. 2005). In dieser Zeit des Umbaus kommt es zu entzündlichen Reaktionen an der Mucosa, sodass die natürliche Barrierefunktion des Epithels gestört wird (McCracken et al. 1999; Spreeuwenberg et al. 2001). Der gesamte Vorgang des Absetzens und der damit veränderten Stoffwechsellage bewirkt bei den Jungtieren Stress, aufgrund dessen es zu einer weiteren Belastung des Immunsystems kommt. Die Anwesenheit pathogener Keime, insbesondere pathogener *Escherichia coli*-Stämme, erhöht die Gefahr einer Erkrankung des betroffenen Tieres. Die Mortalität und Morbidität der Ferkel wird in der Absetzperiode durch diese Faktoren stark erhöht. So erscheinen in der Literatur Durchfallinzidenzen bei Absetzferkeln von bis zu 52% (Jonsson und Conway 1992; Katouli und Wallgren 2005). Korreliert damit haben Ferkel in der Absetzperiode eine zumeist geringe Gewichtsentwicklung und Futteraufnahme (Roth und Etle 2005).

In der Vergangenheit war es üblich die Tiere nach dem Absetzen prophylaktisch mit, als Futtermittelzusatzstoff zugelassenen, Antibiotika zu behandeln, damit den (pathogenen) Keimdruck zu senken und schwerwiegenden Durchfallerkrankungen vorzubeugen. Diese Fütterungspraxis stand jedoch aufgrund des Risikos der Resistenzbildung zooanthropotischer Bakterien unter einer starken öffentlichen Kritik und ist seit dem 01.01.2006 EU-weit nicht mehr zugelassen (Verordnung (EG) Nr. 1831/2003 des

Europäischen Parlamentes und des Rates vom 22. September 2003 über Zusatzstoffe zur Verwendung in der Tierernährung). Um jedoch der oben beschriebenen Absatzproblematik entgegenzuwirken und den Tieren durch fütterungstechnische Möglichkeiten über diese schwierige Phase zu helfen, werden seit einiger Zeit Fütterungsadditiva (Probiotika, Prebiotika, organische Säuren, mittelkettige Fettsäuren, ätherische Öle u.a.) in ihrer Wirksamkeit untersucht.

Im Zuge dieser Entwicklung beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit der Fütterung organischer Säuren als Futterzusatzstoff und ihren Auswirkungen auf die Tiergesundheit und Leistung, sowie messbaren Veränderungen der Zusammensetzung und Stoffwechselaktivität der intestinalen Mikrobiota.

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung verschiedener organischer Säuren und eines Kombinationspräparates auf ihre Wirkungen im Verdauungstrakt von Absetzferkeln. Hierbei gab es mehrere Themenschwerpunkte die in ihrer Gesamtheit ein Bild über die Kondition und Gesunderhaltung der Tiere liefern sollten. Dabei stellten sich die folgenden Fragen:

- Wie verhält sich die Konzentration der eingesetzten Säure nach der Fütterung im Verdauungstrakt?
- Kommt es durch organische Säuren zur Veränderung des pH-Werts in der Digesta?
- Beeinflussen organische Säuren die Pufferkapazität des Futtermittels?
- Wie wirken organische Säuren auf die Bakterienpopulationen im Verdauungstrakt?
- Kommt es durch den Einsatz von organischen Säuren zur Absenkung pathogener *Escherichia coli*?
- Welchen Einfluss haben organische Säuren auf Leistungsparameter und Kotkonsistenz der Absetzferkel? Kann die Durchfallhäufigkeit gesenkt werden und eine Gesunderhaltung der Tiere gefördert werden?
- Beeinflusst die Benzoesäure den Harn-pH-Wert?
- Kommt es durch den Einsatz von Benzoesäure zur Steigerung der Hippursäurekonzentration im Harn der Absetzferkel?
- Durch welche der untersuchten organischen Säuren lassen sich die besten Effekte erzielen?
- Kommt es durch die Kombination verschiedener organischer Säuren zu einer Steigerung der positiven Effekte?

1. Literaturübersicht

1.1 Organische Säuren

Organischen Säuren zeichnen sich durch ihre auf einem Kohlenstoffgerüst basierende Struktur aus. Von Carbonsäuren spricht man, wenn sie außerdem eine an Alkyl gebundene Carboxylgruppe (-COOH) enthalten. Es können zusätzlich auch andere chemische Gruppen gebunden sein. So bezeichnet man z.B. die Benzoesäure als eine aromatische Carbonsäure, da sie aus einem Phenylrest und einer Carboxylgruppe besteht.

Bei den zu Tierernährungszwecken verwendeten organischen Säuren handelt es sich um natürliche Stoffe. Einige der Säuren werden vom tierischen Organismus im Verdauungstrakt oder im intermediären Stoffwechsel gebildet. Sie kommen als Metaboliten im Säugetierorganismus vor und können dort auch abgebaut werden (Kirchgessner und Roth 1988). Andere organische Säuren, wie z.B. die Benzoesäure, werden natürlich in Pflanzen gebildet und können vom tierischen Organismus verstoffwechselt werden.

Tabelle 1 zeigt eine Übersicht der gängigsten, zur Fütterung eingesetzten, organischen Säuren mit ihren chemischen und physikalischen Eigenschaften.

Tabelle 1: Chemische und physikalische Eigenschaften einiger organischer Säuren

org. Säure	Summenformel	Molare Masse [g/mol]	Dichte [g/ml]	Zustand	pKs	Löslichkeit in Wasser
Ameisensäure	HCOOH	46,03	1,22	flüssig	3,75	∞
Essigsäure	CH ₃ COOH	60,05	1,049	flüssig	4,76	∞
Propionsäure	CH ₃ CH ₂ COOH	74,08	0,993	flüssig	4,88	∞
Buttersäure	CH ₃ CH ₂ CH ₂ COOH	88,12	0,958	flüssig	4,82	∞
Milchsäure	CH ₃ CH(OH)COOH	90,08	1,206	flüssig	3,83	v
Sorbinsäure	CH ₃ CH:CHCH:CHCOOH	112,14	1,204	fest	4,76	s
Fumarsäure	COOHCH:CHCOOH	116,07	1,635	fest	3,02	s
					4,38	
Apfelsäure	COOHCH ₂ CH(OH)COOH	134,09	1,6	flüssig	3,4	∞
					5,1	
Weinsäure	COOHCH(OH)CH(OH)COOH	150,09	1,76	flüssig	2,93	v
					4,23	
Zitronensäure	COOHCH ₂ C(OH)(COOH)CH ₂ COOH	192,14	1,665	fest	3,13	v
					4,76	
					6,4	
Benzoessäure	C ₆ H ₅ COOH	122,12	1,27	fest	4,2	v

∞ löslich in allen Zuständen

v gut löslich

s schwer löslich

1.1.1 Einsatz organischer Säuren in der Tierernährung

Die EU-Verordnung über Zusatzstoffe zur Verwendung in der Tierernährung (EG Nr. 1831/2003) regelt den Umgang und den Einsatz organischer Säuren.

So fungieren sie einerseits als Konservierungsstoff zur Haltbarmachung von Futtermitteln und haben andererseits einen direkten Einfluss auf ernährungsphysiologische Vorgänge im Verdauungstrakt.

Noch vor einigen Jahren war der Einsatz von Antibiotika als Leistungssteigerer in der Tierernährung gebräuchlich. Dieser prophylaktische Gebrauch von Antibiotika in subtherapeutischer Dosierung steht jedoch im Verdacht Resistenzbildung von z.B. *Escherichia coli* gegen verschiedene Antibiotikatyphen, wie z. B. Apramycin, Trimethoprim-sulfonamide, Spectinomycin und Neomycin, zu verursachen (Fairbrother 2000; Amezcua 2002; Lanz 2003; Maynard 2003). Aus dieser Annahme begründet sich das EU-weite Verbot (seit 01.01.2006) der Antibiotika als Leistungsförderer (Partanen et al. 2007). Um den in der Ferkelfütterung zur Zeit des Absetzens häufig auftretenden, *E.coli*-verursachten Erkrankungen dennoch vorzubeugen, ist eine dem Alter entsprechende Fütterung, gepaart mit dem Einsatz wirkungsvoller Fütterungsadditiva in der Tierernährung von hohem wissenschaftlichem Interesse.

In der Nutztierernährung werden organische Säuren als Futteradditiva in verschiedenen Bereichen eingesetzt. Ihre überwiegende Anwendung kommt in der Schweine- und Geflügelhaltung zum Tragen. Bezüglich der Schweinefütterung liegt hier ein besonderer Schwerpunkt auf der kritischen Phase des Absetzens. An Mastschweinen werden organische Säuren in geringerem Umfang verfüttert, da diese gegenüber Verdauungsstörungen weniger empfindlich sind als junge Ferkel (Roth und Ettle 2005). Dennoch wurde auch für Mastschweine gezeigt, dass Fumarsäure, Zitronensäure, Propionsäure, Benzoesäure, Ameisensäure sowie Mischungen mit deren Salzen durchaus positive Effekte auf den Zuwachs und die Futtermittelverwertung ausüben (Kirchgessner und Roth 1978; Kirchgessner und Roth 1982; Baustad 1993; Broz 2004). Partanen *et al.* (2007) konnten ebenfalls für die Mastperiode eine gesteigerte Zunahme der Lebendmasse beim Einsatz eines Gemisches aus organischen Säuren (Ameisensäure, Propionsäure, Natriumbenzoat, Kaliumsorbat), im Gegensatz zur Kontrollgruppe zeigen. Auch in der Geflügelmast ist der Einsatz organischer Säuren weit verbreitet. Besonders die positiven Effekte auf die Senkung der Keimzahl von *Salmonella* machen ihren Gebrauch reizvoll (Van Immerseel et al. 2006). Durch die

Reduktion pathogener Keime erhofft man sich eine Steigerung der Leistungsparameter des Geflügels, sowie ein hygienisch hochwertiges Lebensmittel (García 2007).

1.1.2 Einsatz organischer Säuren als Konservierungsmittel in Futtermitteln

Seit Jahrzehnten werden organische Säuren zur Konservierung von Mischfutter oder dessen Einzelkomponenten eingesetzt. Dadurch soll eine optimale Futterqualität erhalten werden.

Solche Maßnahmen sind sinnvoll, da auch unter guten Lagerbedingungen das Futter einen gewissen Befall mit Schimmel, Bakterien und Hefen aufweist, der sich schnell ausweiten kann (Frank 1994).

Spezifische antibakterielle oder schimmelhemmende Eigenschaften sind ein besonderes Merkmal einiger organischer Säuren wie Milchsäure, Propionsäure, Essigsäure und Ameisensäure, die als Konservierungsstoff in Lebens- und Futtermitteln eingesetzt werden. Seit 2003 werden auch die aus dem Lebensmittelbereich bekannten Konservierungsstoffe Sorbin- und Benzoesäure als Futterzusatzstoff verwendet.

Die Effizienz einer organischen Säure zur Hemmung von Mikroorganismen hängt maßgeblich von ihrem pKs-Wert ab. Dieser beschreibt den pH-Wert, bei dem 50% der Säure in dissoziierter Form vorliegen. Organische Säuren mit hohem pKs-Wert sind demzufolge effektivere Konservierungsmittel, da sie schwächere Säuren sind und im Futtermittel in höheren Anteilen als undissoziiertes Säuremolekül vorliegen (Roth und Etle 2005).

Die Wirksamkeit von Konservierungsstoffen wird *in vitro* geprüft. Als Bewertungsparameter für die antibakterielle Wirksamkeit wird die minimale Hemmkonzentration (minimal inhibition concentration = MIC) verwendet. So erfordern z.B. *Staphylococcus aureus* und *E.coli* höhere MIC als andere Keime (Strauss und Hayler 2001), was auf eine Adaptierung der Lebensweise und den Stoffwechsel im Magen zurückgeführt wird.

1.1.3 Die Rolle organischer Säuren in der Ferkelaufzucht

1.1.3.1 Absetzen und resultierendes gesundheitliches Risiko der Ferkel

Das Absetzen der Ferkel vom Muttertier gehört zu den kritischen Perioden der Ferkelaufzucht. Gemäß der Tierhaltungsverordnung dürfen Ferkel erst ab einem Alter von 28 Tagen abgesetzt werden. Zur Verringerung der Gefahr der Übertragung von Krankheitserregern dürfen Ferkel jedoch bis zu sieben Tage früher abgesetzt werden, wenn sie in spezielle Ställe verbracht werden, die von den Ställen der Sauen getrennt, leer,

gründlich gereinigt und desinfiziert sind (Tierhaltungsverordnung, BGBl.II Nr. 485/2004 i.d.F. BGBl.II Nr. 530/2006 Artikel 4 Nr.2).

Die Zeit des Absetzens ist für Ferkel mit verschiedenen Stressfaktoren verbunden. Für gewöhnlich verlassen sie ihre gewohnte Umgebung und werden in einen für sie fremden Stall verbracht, häufig auch zusätzlich in Zusammenhang mit der Durchmischung einzelner Würfe (Tsiloyiannis et al. 2001). Durch das Absetzen von der Sauenmilch kommt es zum Verlust maternaler Antikörper (Jones et al. 2001). Zusätzlich bietet die Futterumstellung einen weiteren Stressfaktor für die Absetzferkel. Häufig kann beobachtet werden, dass 50% der Ferkel Futter erst nach 24 h akzeptieren, während 10% sogar erst nach 48h das erste Futter zu sich nehmen (Brooks 2001). In dieser kritischen Periode der Ferkelaufzucht kommt es häufig durch pathogene Mikroorganismen zu schwerwiegenden Erkrankungen der Tiere, die als Postweaning Coli Complex (PWCC) beschrieben werden. Zwischen 20 und 50% der Absetzferkel erkranken, während die Sterblichkeitsrate bei unkomplizierten Erkrankungen bei 10% liegt. Für gewöhnlich ist die Dauer der Erkrankung nur vorübergehend, aber auch in diesem Fall kommt es zu wirtschaftlichen Verlusten durch die in dieser Zeit sinkenden Wachstums- und Futteraufnahmeleistungen der Ferkel (Bertschinger 1992; Taylor 1995).

1.1.3.1.1 Postweaning Coli Complex (PWCC), Krankheitsbild und Ursache

Die Phase des Absetzens der Ferkel vom Muttertier birgt durch multiple Faktoren ein Risiko für die Gesundheit der Tiere. Durch die Schwächung des Immunsystems unter gleichzeitigem Auftreten pathogener *E.coli* kann es zum Krankheitsbild des so genannten Postweaning Coli Complexes (PWCC) kommen.

Aus klinischer Sicht wird der Postweaning Coli Complex (PWCC) in die folgenden Kategorien eingeteilt:

1. Postweaning Diarrhoea (PWD)
2. Edema Disease (ED)
3. Postweaning Wasting (PWW)
4. Hemorrhagic Gastroenteritis (HGE)

Genauer eingegangen wird hier auf die beiden hauptsächlich auftretenden Krankheitsformen PWD und ED.

Postweaning Diarrhoea (PWD)

Neben verschiedenen Ursachen wie Stress, Fütterungsintensität, Viren (Transmissibles Gastroenteritis-Virus, Rotaviren, Coronaviren) und anderen Krankheitserregern, spielt *E.coli* eine maßgebliche Rolle im Krankheitsverlauf von PWD. Die pathogenen Kolistämme gehören dabei nur zu einigen wenigen Serogruppen (O8, O138, O139, O141, O147, O149, O157) (Nagy et al. 1990). Neugeborene Ferkel sind durch die Aufnahme der Sauenmilch gegen die Kolibazillose durch unspezifische, bakterizid wirkende Faktoren und durch spezifische Antikörper (IgA) geschützt, welche die Proliferation der Kolibakterien verhindern. Zu Beginn der Absetzperiode verfügt das Ferkel nur noch über wenig maternale Antikörper. Begünstigende Faktoren können somit eine Vermehrung der *E.coli* hervorrufen, woraus PWD entstehen kann. PWD tritt daher meist während der ersten 10-20 Tage nach dem Absetzen auf. Die Kotbeschaffenheit variiert mit allen Übergängen zwischen wässrigem bis zu physiologischem (festgeformtem) Kot. Auch die Farbe des Kotes und der Grad der Maldigestion variiert in Abhängigkeit von der Futterqualität. An Perineum und Anus sind Kotreste und verschmierte Hautpartien zu erkennen. Unbehandelte Fälle zeigen rasch eine hochgradige Dehydratation. Die Ferkel verlieren innerhalb weniger Tage bis zu 40% ihres Körpergewichts, bedingt durch den massiven Flüssigkeitsverlust über den Magen-Darmtrakt. Die erkrankten Ferkel zeigen einen atonischen, eingefallenen Bauch, sie sind apathisch, haben eingefallene Augen und weisen eine blasse, graue Haut auf. Die Futteraufnahme geht stark zurück. Durch den infektiösen Kot werden andere Buchtgenossen angesteckt (Bilkei 1996; Heinritzi 2006).

Edema disease (ED)

Nach dem Absetzen kann es beim Ferkel zu einer weiteren Erkrankung kommen, die ebenfalls durch pathogene *E.coli* hervorgerufen wird. Das Krankheitsbild äußert sich in generalisierten Ödemen und zentralnervösen Störungen, die häufig mit blutigen schweren Durchfällen einhergehen. Die so genannte Ödemkrankheit wird von Shigatoxinproduzierenden *E.coli* Stämmen (STEC) verursacht. Diese *E.coli*- Serotypen (O139, O138, O141 und O157) weisen zusätzlich F18 Fimbrien auf, mit denen die Anheftung der Zelle an die Dünndarmschleimhaut erfolgt, woraufhin es zur Ausschüttung des Neurotoxins kommt. Nach starker Vermehrung des Erregers und Resorption des Toxins kommt es zur Gefäßwandschädigung (Ödembildung) mit Gefäßeinengung und nachfolgender Schädigung des Nervengewebes durch Anoxie (Heinritzi 2006).

Zusätzlich soll der plötzliche Wechsel der Futterzusammensetzung beim Absetzen mit *ad libitum* Zugang zu rohfasernarmem, schmackhaftem Futter begünstigend auf den Ausbruch der Erkrankung wirken. In einem Vakkzinationsversuch von Bosworth *et al.* (1996) wurde gezeigt, dass eine proteinreiche Ernährung die Empfänglichkeit für die Ödemkrankheit maßgeblich erhöht.

Des Weiteren sind STEC beteiligt an einer Durchfallerkrankung, die bevorzugt bei Absetzferkeln auftritt und aus diesem Grund mit zum PWD-Komplex gezählt wird. Beide Krankheitsbilder, das der Ödemkrankheit und das der PWD können sich je nach Erregerausstattung mit Pathogenitätsfaktoren überlappen.

Pathogenese von PWD/ED verursachenden E coli

E.coli Bakterien gelangen durch orale Aufnahme (z.B. Nahrungsaufnahme, Kot von anderen Gruppentieren usw.) in den tierischen Organismus und besiedeln dort den Dünndarm. Im Dünndarm binden pathogene *E.coli* mit ihren Fimbrien an die Rezeptoren des Darmepithels oder dem Mucus, der den Darm auskleidet. Die Anheftung an Rezeptoren der wirtseigenen Enterozyten erfolgt über bakterielle Oberflächenstrukturen. Die Bakterien können nun nicht mehr aus dem Darm ausgeschwemmt werden und das optimale Umgebungsmilieu sorgt für eine rasante Proliferation. Hierbei werden im kranken Tier im mittleren Jejunum und im Ileum Größenordnungen von 10^9 KbE (Kolonie bildende Einheiten) pro g Gewebe erreicht. Krankheitsverursachende enterotoxische *E.coli* (ETEC) mit den benannten Fimbrien F5, F6 und F41 kolonisieren meistens das hintere Jejunum und Ileum, während F4 positive ETEC im gesamten Jejunum und Ileum zu finden sind (Fairbrother *et al.* 2005).

Durch die Bildung und Ausschüttung von Toxinen und anderen Pathogenitätsfaktoren kommt es zur Schädigung des Wirtsorganismus und damit zur Erkrankung des Wirts. Das Krankheitsbild ist dabei geprägt von den Pathogenitätsfaktoren von *E.coli* (Bosworth *et al.* 1996).

Es kommt im Darm durch eine gesteigerte Sekretion oder eine Störung der Resorption zur Malabsorption von Wasser und damit zur Entstehung von Durchfall. Physiologischerweise tritt Schweinekot in geballter fester Form auf mit einer Trockensubstanz von 16-23% und ca. 80% Kotwasser. Kot von breiiger Konsistenz hat dagegen nur noch eine Trockenmasse von 15%, während bei einer wässrigen Kotkonsistenz nur noch ein Trockensubstanzanteil von 8% festzustellen ist. Beim Durchfall wird etwa die 2,2fache Menge des Normalkotes abgesetzt. Die Wasseraufnahme und Harnmenge nehmen beim Durchfall hingegen ab (Heinritzi 2006).

Durch steigende Mortalität und sinkende Leistungen ist PWD in der Schweineproduktion einer der Hauptursachen wirtschaftlicher Verluste (Khai 2002). Die Prophylaxe gegen diese Erkrankung ist daher von großem Interesse und Ziel vieler wissenschaftlicher Studien.

1.1.3.1.2 Einsatz organischer Säuren in der Ferkelaufzucht

Die Interaktion zwischen den Tieren und den potentiellen Erregern ist sehr komplex. Die meisten Infektionskrankheiten sind multifaktorielle Geschehen und die bloße Anwesenheit von Pathogenen muss nicht zwangsläufig zur Auslösung einer Erkrankung führen (Jones et al. 2001). Normalerweise ist das wirtseigene Abwehrsystem gut in der Lage, die Effekte des Pathogens zu bekämpfen und das Tier damit gesund zu erhalten. Wohingegen Faktoren, die einen negativen Einfluss auf das Abwehrsystem des Wirts haben oder die Pathogenität des Pathogens erhöhen, die Prädisposition für eine Krankheit steigern. Der Effekt der Stressantwort auf die Immunfunktion ist gut dokumentiert und häufig wird angenommen, dass die stressinduzierte Immunmodulation für die gesteigerte Anfälligkeit für Infektionskrankheiten verantwortlich ist (Jones et al. 2001).

In einer Studie von Jones *et al.* (2001) wurden einzelne Stressfaktoren bezüglich ihres Einflusses auf das Ausscheiden von ETEC (enterotoxische *E.coli*) im Kot von Absetzferkeln untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass Faktoren wie das Absetzen an sich, die Umgebungstemperatur und die Aufstallung mit Ferkeln aus anderen Würfen einen signifikant gesteigerten Einfluss bezüglich des Ausscheidens von ETEC haben.

Um die Tiere gesund zu erhalten sind einige der Faktoren, wie die ungeeignete Umgebungstemperatur oder das Mischen mit wurffremden Tieren zu vermeiden. Andere Stressfaktoren wie der des Absetzens und der veränderten Fütterung können jedoch nicht verhindert werden. Deshalb ist es wichtig, die Tiere durch geeignete Maßnahmen, wie z.B. Fütterungsadditiva, in ihrer Gesunderhaltung zu unterstützen.

Seit Mitte der 1970er Jahre liegen die ersten Versuchsergebnisse bei Absetzferkeln zum Einsatz von organischen Säuren (wie z.B. Zitronensäure, Fumarsäure, Propionsäure) in höheren Dosierungen vor. Die Ergebnisse zeigen, dass die tierischen Leistungen nachweisbar positiv beeinflusst werden können (Kirchgessner und Roth 1988). In den letzten Jahren wurden eine Vielzahl weiterer organischer Säuren und auch deren Salze auf ihre nutritive Wirksamkeit in der Ferkelaufzucht und Schweinemast getestet. Dabei konnten vor allem mit Ameisensäure immer wieder Effekte nachgewiesen werden, die mit großer

Wahrscheinlichkeit auf ihrer starken bakteriziden und bakteriostatischen Wirkung beruhen (Eidelburger 1997).

1.1.4 Wirkungsweise organischer Säuren

Der gesamte Verdauungstrakt monogastrischer Tiere, wie dem Schwein, ist mit Mikroorganismen besiedelt, deren Konzentration im Verlauf des Gastrointestinaltraktes steigt. Es wird davon ausgegangen, dass im Magen eines gesunden Schweins 10^7 bis 10^9 Bakterien pro Gramm Mageninhalt ansässig sind. Dominant sind hier in erster Linie die Lactobacillen. Der Dickdarm dagegen ist mit ca. 10^{12} Bakterien pro Gramm Darminhalt besiedelt, die hauptsächlich anaerob sind (Engelhardt und Breves 2000). Dementsprechend ist auch die Stoffwechselaktivität im Dickdarm höher als im Dünndarm. Nach heutigen vorsichtigen Schätzungen geht man von ca. 400 verschiedenen Bakterienarten aus, wobei viele Arten jedoch noch unbekannt sind (Engelhardt und Breves 2000).

Die organischen Säuren als Futterzusatzstoff sollen durch verschiedene Wirkungen, die im Folgenden kurz erläutert werden, die Populationen der Mikroorganismen im Verdauungstrakt beeinflussen.

Die erfolgreichen Anwendungen der organischen Säuren in Futtermitteln, verlangen nach einem tieferen Verständnis für deren Wirkung im Tier. So gibt es zurzeit verschiedene Hypothesen zu ihrer Wirkung. Eine allumfassende Erklärung ihrer Wirkung ist nach wie vor nicht vollständig gegeben (Partanen und Mroz 1999).

1.1.4.1 Wirkung organischer Säuren auf die Mikrobiota im Gastrointestinaltrakt

Der selektive inhibitorische Effekt organischer Säuren auf die Mikroorganismen im Verdauungstrakt, ist abhängig von der undissoziierten Form der Säuremoleküle. Denn nur in undissoziierter Form sind sie lipophil und gelangen so passiv in die Bakterienzelle (Partanen 2001). Je niedriger der externe pH-Wert ist, desto mehr undissoziierte Säure kann die Membran passieren. Wenn der pH-Wert über dem pKs-Wert der Säure liegt, dissoziiert diese und senkt dadurch den pH-Wert in der Zelle ab. Das sonst alkalische Zytoplasma der Zelle wird sauer. Die Zelle versucht dem entgegen zu wirken, indem sie über ATPase-Pumpen Protonen herausschleust. Für diesen Prozess wird Energie in Form von ATP benötigt. Die in der Zelle verbleibenden Anionen verändern den osmotischen Druck, wodurch die Bakterienzelle toxischen Veränderungen unterworfen ist. Unter anderem kommt es zur Einstellung der Glykolyse und Nucleinsäuresynthese. Enzymreaktionen werden gestört und

das Membrantransportsystem beeinträchtigt. So kommt es letztendlich zum Zelltod (Russell 1992; Jensen 2001). Neuere Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass Bakterien je nach Spezies unterschiedlich auf organische Säuren reagieren. Sie können bei einem Säureangriff ihren intrazellulären pH-Wert senken und damit das vermehrte Eindringen von dissoziierter Säure verhindern (Van Immerseel et al. 2006). Bakterien deren intrazellulärer pH-Wert als neutrophil einzustufen ist, reagieren dagegen sensibler. Somit kann zwar erklärt werden, warum verschiedene Bakterienspezies unterschiedlich auf die organischen Säuren reagieren. Eine Erklärung der unterschiedlichen Wirkung der verschiedenen organischen Säuren ist damit jedoch noch nicht gegeben. Van Immerseel *et al.* (2006) vermuten eine Kombination aus mehreren wirkenden Faktoren, wie der Kettenlänge, dem Aufbau der Seitenketten, den pKs-Werten und der Hydrophobie organischer Säuren.

Es ist bekannt, dass ein niedriger luminaler pH-Wert und ein rascher Digestafluß, einen inhibierenden Effekt auf das Mikroorganismenwachstum entlang des gesamten Gastrointestinaltrakts haben (Maxwell 1995). Ebenso weiß man schon seit längerem, dass eine Säurezugabe das Wachstum säuretoleranter Milchsäurebakterien im Magen begünstigt (Fuller 1977), während die Kolonisation und die Proliferation von *E.coli* inhibiert wird. Durch Blockierung der Adhäsion oder Produktion von Milchsäure und anderen Metaboliten wird der pH-Wert gesenkt und auf diese Weise das *E.coli*-Wachstum inhibiert. So ist es nicht verwunderlich, dass es in vielen Studien durch den Einsatz organischer Säuren zu einer Reduktion der coliformen Keime entlang des Gastrointestinaltrakts kommt (Cole et al. 1968; Scipioni 1978; Thomlinson und Lawrence 1981).

Milchsäurebakterien sind in der Lage bei einem relativ niedrigen pH-Wert zu wachsen, was bedeutet, dass organische Säuren ihr Wachstum eher fördern als andere Bakterienarten. Eine Erklärung für die erhöhte Resistenz der Milchsäurebakterien gegenüber organischen Säuren, könnte darin begründet liegen, dass grampositive Bakterien eine hohe intrazelluläre Kaliumkonzentration aufweisen, die ein Gegengewicht zum Säureanion darstellt (Russell und Diez-Gonzales 1998).

Wichtig bei der Betrachtung der gastrointestinalen Mikrobiota unter dem Einsatz von organischen Säuren ist nicht nur die Frage nach der Qualität der Bakterienpopulation, sondern auch nach der Quantität.

So zeigte eine Studie von Gedek *et al.* (1992), dass in Abschnitten des Dünndarms, bei der Supplementierung von 6-24 g Ameisensäure/kg Futter die Keimzahl von *Lactobacillus/Bifidobacterium*, *Eubacterium* und *Bacteroidaceae* leicht gesenkt wird. Im Caecum und Colon wurden die Keimzahlen von *Lactobacillus/Bifidobacterium* und *E.coli*

($p < 0,05$) unabhängig von der Konzentration an supplementierter Ameisensäure ebenfalls gesenkt. Nach Gedek *et al.* (1992) wird die Keimzahl der *Lactobacillus/Bifidobacterium*, *Eubacterium spp.* und ebenso die Gesamtzahl der Mikrobiota im Duodenum, Jejunum und Ileum, beim Zusatz von 18 g Fumarsäure/kg Futter signifikant reduziert. Ebenso reduziert die Fumarsäure die *Lactobacillus/Bifidobacterium* Keimzahl im Caecum und Colon. Die *E.coli* Keimzahl dagegen wird durch Fumarsäure nur im Jejunum reduziert, jedoch nicht in anderen Abschnitten des Gastrointestinaltrakts.

Im Gegensatz dazu steht eine Untersuchung von Risley *et al.* (1992), bei der 15 g Zitronensäure bzw. Fumarsäure/kg Futter eingesetzt wurden. Darin sind keine Effekte bezüglich der *E.coli* Keimzahl gegenüber der Kontrollgruppe zu verzeichnen. Auch die Keimzahl der Milchsäurebakterien, Clostridien und *E.coli* im Magen, Jejunum, Caecum oder Colon der Ferkel ergab keinen Unterschied zur Kontrollgruppe.

Um verschiedene organische Säuren auf ihren antibakteriellen Effekt im Gastrointestinaltrakt testen zu können, wurde ein künstliches System entworfen, welches die wichtigsten Bedingungen im Magen und proximalen Jejunum nachstellt (Naughton und Jensen 2001; Knarreborg 2002). Die Anwendbarkeit dieser *in vitro*- Methoden wurde in einem typischen Auswahlprüfverfahren getestet. Hierbei wurden verschiedene Konzentrationen unterschiedlicher organischer Säuren eingesetzt und auf ihre Wachstums- und Überlebensrate von Milchsäurebakterien, coliformen Keimen und *Salmonella* getestet.

Eine vergleichende Studie mit sechs organischen Säuren ergab, dass der inhibierende Effekt der Säure deutlich stärker im Magen als im Jejunum war. Die organischen Säuren konnten bezüglich ihres inhibierenden Effekts aufsteigend in ihrer Wirkung wie folgt eingeteilt werden: Propionsäure < Ameisensäure < Buttersäure < Milchsäure < Fumarsäure < Benzoesäure (Knarreborg 2002).

Beim Einsatz von Ameisensäure, kam es hier zu einer Steigerung der Milchsäurebakterien und Absenkung der Kolibakterien. Bei der Untersuchung mittels Benzoesäure wurden jedoch festgestellt, dass sowohl die Milchsäurebakterien wie auch die Kolibakterien an ihrem Wachstum gehindert werden (Knarreborg 2002).

1.1.4.2 Wirkung organischer Säuren auf pH-Wert und Pufferkapazität der Digesta

Organische Säuren entfalten ihre Wirkung sowohl direkt im Futtermittel als auch im Gastrointestinaltrakt der Tiere. Nach Aufnahme der Säuren durch das Tier ist einzig im Magen und proximalen Dünndarm ein proportional geringer werdender Anteil der Säure zu

messen. Schon im distalen Dünndarm ist kaum noch Säure nachzuweisen (Roth und Ettle 2005). Diese Tatsache deckt sich mit den Beobachtungen, dass organische Säuren die besten Effekte auf den pH-Wert der Digesta und die antimikrobielle Aktivität im Magen und Dünndarm haben.

Nach Kidder und Manners (1978) haben Ferkel zum Zeitpunkt des Absetzens eine geringe HCl-Sekretion im Magen, die somit nur eine minimale Barriere gegenüber mit dem Futter aufgenommenen pathogenen Bakterien darstellt. Mit dem Alter steigt die HCl-Sekretion der Tiere langsam, aber stetig an. Der pH-Wert im Magen ist abhängig von der HCl-Sekretion, was bedingt, dass der pH-Wert bei Absetzferkeln höher ist als z.B. bei Mastschweinen. Der im Magen vorherrschende pH-Wert hängt neben der HCl-Sekretion auch von der Pufferkapazität des eingesetzten Futters ab. Dabei wird die Pufferkapazität als die 0,1 N HCl-Menge definiert, die nötig ist, um den pH-Wert in dem jeweiligen Futter auf pH 3 oder pH 4 zu senken (Sommer und Kuhlmann 2006). Durch die organischen Säuren kommt es zu einer Reduzierung der Pufferkapazität, die zu einer pH-Wertabsenkung im Magen beiträgt. Durch diese wiederum kommt es zur Senkung der Proliferation und Kolonisation unerwünschter Keime wie z.B. pathogene *E.coli*, in der gastroilealen Region (Partanen und Mroz 1999).

1.1.4.3 Wirkung organischer Säuren auf Enzymaktivität und Magenentleerungsrate

Ein niedriger pH-Wert im Magen ist essentiell für die Proteinverdaulichkeit. Das dafür zuständige Enzym Pepsin wird bei einem pH-Wert von 2 rasch aktiviert, allerdings nur sehr langsam bei einem erhöhten pH-Wert von 4. Die Umwandlung von Pepsinogen in Pepsin erfordert einen pH-Wert unter 5. Pepsin hat zwei pH-Optima: pH 2 und pH 3,5. Die Aktivität sinkt rapide, sobald der pH über 3,6 steigt und das Enzym wird inaktiv bei einem pH von 6,0 (Kidder und Manners 1978). Das Endprodukt der Pepsinverdauung und der niedrige pH der Digesta sind bei Eintritt in das Duodenum an der Stimulation der pankreatischen Enzym- und Bikarbonatsekretion beteiligt. Ebenso spielen sie eine, wenn auch untergeordnete, Rolle bei der Magenentleerungszeit (Argenzio 1984). Nach Kidder und Manners (1978) sowie Mayer (1994) wird die Magenentleerungszeit hauptsächlich vom Volumen des Mageninhalts bestimmt und nur zu einem kleineren Anteil durch den pH-Wert, der auf die Pylorusregion wirkt.

1.1.4.4 Auswirkungen organischer Säuren auf die Darmmorphologie

Während der Absetzperiode unterliegt der Dünndarm der Ferkel einer Reihe von Veränderungen. So kommt es morphologisch zur Reduktion der Mikrovillihöhe und Steigerung der Kryptentiefe unter gleichzeitiger Senkung der Absorptionskapazität (Cera et al. 1988; Nabuurs 1995; Pluske 1996). Veränderungen der Darmmorphologie sind ein wichtiger Faktor in der Ferkelaufzucht, da durch sie das Wachstum der Tiere reduziert werden kann, wodurch sich die Zeitspanne bis zum Erreichen des Schlachtengewichtes verlängert. So ist gemäß Pluske *et al.* (1996) die Gewichtszunahme der Absetzferkel positiv korreliert mit der Mikrovillihöhe.

Bisher ist noch wenig über die Einflüsse organischer Säuren in Bezug auf die Darmmorphologie bekannt. Gálfi und Bokori (1990) beobachteten, dass die Supplementierung von Natriumbutyrat (Konzentration: 1,7 g/kg Futter) zu einer beträchtlichen Steigerung der Mikrovillianzahl (33,5%) und Mikrovillilänge (30,1%) im Ileum führte.

Weiterhin bekannt ist, dass kurzkettige Fettsäuren (Essigsäure, Propionsäure und n-Buttersäure), die bei der mikrobiellen Fermentation der Kohlenhydrate produziert werden, die Epithelzellproliferation stimulieren (Lupton und Kurtz 1993; Sakata et al. 1995; Marsman 1996). Dabei kann bezüglich des Effekts, nach Sakata (1987) von folgender Reihenfolge ausgegangen werden: n-Buttersäure > Propionsäure > Essigsäure. Da organische Säuren einen Einfluss auf bakterielle Stoffwechselprodukte im Dünndarm haben, kann angenommen werden, dass auch ein indirekter Einfluss auf die Morphologie des Darms besteht (Partanen und Mroz 1999).

1.1.4.5 Auswirkungen organischer Säuren auf Leistungsparameter und Verdaulichkeit

In einer Zusammenfassung der wichtigsten bisher gesammelten Daten, wurde von Partanen und Mroz (1999), festgestellt, dass unterschiedliche organische Säuren auch verschiedenartige Effekte auf die Futteraufnahme haben. Ameisensäure oder Formiate üben einen positiven Effekt auf die Futteraufnahme aus, die Fumarsäure weist dagegen keinen Effekt und Zitronensäure sogar einen negativen Effekt bezüglich der Futteraufnahme bei Absetzferkeln auf. Diese unterschiedlichen Effekte sind, abhängig vom Alter der Tiere, in unterschiedlichem Maße ausgeprägt. Jüngere Ferkel reagieren sensitiver auf die Schmackhaftigkeit ihres Futters als ältere Ferkel (Partanen und Mroz 1999). In einer Studie von Henry *et al.* (1985), wurde den Tieren die Wahl gelassen zwischen einer mit Säuren supplementierten Diät

(Zitronensäure und Fumarsäure) und einem unbehandelten Futter. Die Versuchstiere entschieden sich signifikant häufiger für das un-supplementierte Futter.

Partanen (2001) konnte in einer Meta-Analyse nachweisen, dass in der Ferkelfütterung mit Ameisensäure oder Kaliumdi-format die größten positiven Effekte in der Zunahme, Futteraufnahme und dem Futteraufwand zu erzielen waren.

Untersuchungen mit Schweinen in der Aufzuchtphase haben gezeigt, dass einige organische Säuren, darunter Zitronensäure, Fumarsäure, Ameisensäure, und Propionsäure, einen positiven Einfluss auf die Wachstumsleistung aufwiesen (Partanen und Mroz 1999).

Auch Giesting und Easter (1985) bestätigten in ihren Untersuchungen, dass der Zusatz von organischen Säuren in der Diät von Absetzferkeln die durchschnittliche tägliche Lebendmassezunahme und den Futteraufwand fördert sowie das Auftreten von PWD senkt.

Im Hinblick auf die Verdaulichkeit beobachteten Kirchgessner und Roth (1988) durch den Einsatz organischer Säuren eine Steigerung der Proteolyse im Magen und Erhöhung der Protein- und Aminosäureverdaulichkeit. Zusätzlich bildet das Säureanion einen Komplex mit Kalzium, Phosphor, Magnesium und Zink, wodurch die Verdaulichkeit dieser Mineralstoffe verbessert wird. Desweiteren dienen die organischen Säuren im Intermediärstoffwechsel als Substrate.

Da organische Säuren dem Futter im Prozentbereich zugesetzt werden, ist auch deren Energiebeitrag zu berücksichtigen. Die Bruttoenergie schwankt mit der Art der Verbindung sehr stark und liegt im Bereich zwischen 6 kJ/g (Ameisensäure) und 27 kJ/g (Sorbinsäure). Da organische Säuren physiologische Moleküle sind, können sie in der Regel vollständig metabolisiert werden (Roth und Ertle 2005).

1.1.5 Kenntnisstand zur spezifischen Wirkung einiger organischer Säuren

Ameisensäure

Ameisensäure ist eine farblose, transparente Flüssigkeit mit stechendem Geruch (Partanen und Mroz 1999). Sie zählt zu den gesättigten Carbonsäuren und ist mit der strukturierten Summenformel HCOOH die einfachste Carbonsäure.

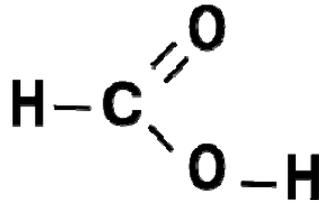


Abb.1: Strukturformel der Ameisensäure

Die Carboxylgruppe (–COOH) bestimmt die Eigenschaften der Ameisensäure. Das Kohlenstoffatom hat eine formale Oxidationsstufe von + 2 und kann deswegen analog zu den Carbonylverbindungen als Hybridüberträger wirken, wodurch sich die reduzierende Wirkung der Ameisensäure erklären lässt. Aufgrund der stark polaren Carboxylgruppe ist Ameisensäure in jedem Verhältnis mit Wasser mischbar. Die Salze der Ameisensäure heißen Methanoate (Trivialname Formiate) und werden ebenfalls häufig als Futterzusatzstoff verwendet, wobei sie als Silierhilfsmittel für Grünfutter dienen. Ameisensäure (E 236) dient in der Lebensmittelindustrie als Konservierungsstoff für Sauerkonserven und Fruchtsäfte. Im Tierfutter ist Ameisensäure als Futtermittelzusatzstoff bei allen Tierarten und ohne Mindest- oder Höchstgehalt zugelassen (Anhang II der Richtlinie 70/524/EWG 1). Da Ameisensäure eine flüchtige lösliche Säure mit scharf stechendem Geruch ist, ist ihre Verarbeitung in Futtermühlen schwierig. Zusätzlich zeigt angesäuertes Futter korrosive Wirkung auf Zement und galvanisierten Stahl in den Schweinestallungen und Futtermittelherstellungsbetrieben. Die Handhabung der Ameisensäure wird vereinfacht, wenn eine Trägersubstanz, wie z.B. Kieselgur dazugegeben wird. Kieselgur ist nahezu reines Siliziumoxid, welches aus fossilen Kieselalgen (Korunic 1998) entsteht. Es hat eine enorme Absorptionskapazität und kann die Hälfte seines Flüssiggewichts aufnehmen, ohne seine Größe auszuweiten.

Die antimikrobielle Wirkung der Ameisensäure richtet sich hauptsächlich gegen Hefen und bestimmte Bakterien wie *Bacillus spp.*, *E.coli* und Salmonellen, während Milchsäurebakterien und Schimmelpilze relativ resistent gegenüber der Ameisensäure sind (Partanen und Mroz 1999). Die antimikrobielle Wirkung bleibt hierbei nicht nur auf das Futter begrenzt, sondern erstreckt sich bis in den Verdauungstrakt. So wurde durch den Zusatz von Ameisensäure bzw. Formiaten zum Futter eine beträchtliche Verminderung der Keimzahl von *E.coli*, *Bacteroidaceae*, Enterokokken, Milchsäurebakterien sowie Hefen im Verdauungstrakt beobachtet (Kirchgessner 1992; Overland et al. 2000; Canibe et al. 2001). Durch den erhöhten pKs-Wert der Ameisensäure gegenüber dem Magen pH-Wert bleibt sie in ihrer undissoziierten Form bestehen. Der antimikrobielle Effekt beruht hauptsächlich auf der

Diffusion der undissoziierten Säuremoleküle in die Bakterienzelle und den anschließenden Zerfall in Protonen (H^+) und das Formiat-Anion ($HCOO^-$). Letzteres stört speziell den Proteinstoffwechsel des Bakteriums, setzt es unter Stress und hemmt dadurch seine Vermehrung (Lück 1986). Durch die Ansäuerung der Digesta werden jedoch nicht nur Mikroorganismen in ihrem Wachstum gehemmt, sondern auch Enzyme wie Decarboxylasen und Katalasen in ihrer Wirkung inhibiert.

Im tierischen Organismus sind Formiate natürliche Bestandteile von Gewebe und Blut, während die Ameisensäure im Stoffwechselgeschehen eine tragende Rolle spielt. So ist sie metabolisch von Interesse beim Transfer von 1-C vermittelnder Substanzen, welche primär während des Aminosäuremetabolismus erzeugt werden. Somit dient sie dann als Substrat in der Biosynthese für Purinbasen und damit für Nukleinsäuren (Stryer 1988).

Durch die Nahrung aufgenommene Ameisensäure wird leicht von der Schleimhaut absorbiert, da sie in undissoziierter Form sehr schnell durch die Zellmembran diffundiert. Der Absorptionsmechanismus ist dabei gleich dem anderer kurzkettiger Fettsäuren (Chang 1994). Der größte Teil der absorbierten Ameisensäure wird zur Leber transportiert. Hier wird die Ameisensäure zu CO_2 und H_2O oxidiert. Der restliche Anteil der Ameisensäure wird über die Nieren als alkalines Salz (Formiat) ausgeschieden. Die erste Stufe des Formiatabbaus beginnt mit der Bildung von 10-Formyltetrahydrofolat aus Formiat und Tetrahydrofolsäure, die durch die 10-Formyltetrahydrofolatsynthetase katalysiert wird. Das 10-Formyltetrahydrofolat wird dann durch die 10-Formyltetrahydrofolatdehydrogenase zu CO_2 oxidiert (Partanen und Mroz 1999). Die Abbaugeschwindigkeit wird dabei durch die Folsäurekapazität der Leber limitiert und hier insbesondere vom Tetrahydrofolat. Schweine haben ein extrem niedriges Niveau an hepatischem Foliat und 10-Formyltetrahydrofolatdehydrogenase, einem Schlüsselenzym des Foliatstoffwechselwegs (Johlin et al. 1987; Makar et al. 1990). Durch eine diätische Supplementierung können bei Schweinen die hepatischen Foliatreserven effizient gesteigert werden.

Viele verschiedene Studien befassen sich mit den Effekten der Ameisensäure beim Einsatz unterschiedlicher Konzentrationen.

Bolduan *et al.* (1988) untersuchten den Effekt von supplementierter Ameisensäure in einer Konzentration von 0,35 und 1,2% bei Ferkeln. Hierbei war zu beobachten, dass ein niedriger pH-Wert im Magen bei einer Konzentration von 0,35% auftrat, es allerdings keinen Effekt bezüglich kurzkettiger Fettsäuren im Gastrointestinaltrakt gab. Dennoch war festzustellen, dass die Tiere mit 1,2%iger Ameisensäuresupplementierung im Gegensatz zu den

Kontrolltieren eine geringere Milchsäurekonzentration im Magen und eine geringere Gesamtkeimzahl von *E.coli* im Gastrointestinaltrakt aufwiesen.

Roth *et al.* (1992), setzten Ameisensäure ebenfalls im Tierfutter von Absetzferkeln in Konzentrationen von 0,6; 1,2; 1,8 und 2,4% ein und untersuchten die Digesta aus Magen, Jejunum, Caecum und Colon. Es war zu beobachten, dass die Konzentration an Milchsäure im Jejunum und ebenso die Konzentration kurzkettiger Fettsäuren im Colon niedriger war als bei den Kontrolltieren.

In einer weiteren Studie von Maribo *et al.* (2000), wurden 0,7 und 1,4% Ameisensäure zum Ferkelfutter supplementiert. Beim Einsatz von 1,4% Ameisensäure konnte eine Reduktion des pH-Wertes im Magen, Caecum und Colon, wie auch eine niedrigere Konzentration von Milchsäure im Jejunum und eine erhöhte Konzentration von Milchsäure im Colon im Gegensatz zur Kontrollgruppe festgestellt werden. Die Konzentration von Ameisensäure im Magen, von Essigsäure im Jejunum und von Essigsäure sowie Propionsäure im Caecum und Colon war höher bei den Versuchstieren, als bei den Kontrolltieren. Der Einsatz von Ameisensäure in einer Konzentration von 0,7% bewirkte eine Verringerung der Milchsäurebakterienkonzentration im distalen Jejunum und Caecum sowie eine niedrigere Gesamtkeimzahl an coliformen Bakterien im Magen.

Auch positive Effekte auf die Verdaulichkeit von Nährstoffen konnten mit dem Einsatz von Ameisensäure in Zusammenhang gebracht werden. Hierbei wurde eine Verbesserung der Verdaulichkeit von Proteinen um bis zu 4% beobachtet, wobei der Effekt unmittelbar nach dem Absetzen der Tiere besonders stark ausgeprägt war (Eckel 1992). Zusammenfassend bezeichnet Partanen (2001) die Ameisensäure, als die wirtschaftlich „attraktivste“ Säure, da sie die Wachstumsleistung von Absetzferkeln und Mastschweinen erhöht, jedoch in niedrigeren Dosierungen eingesetzt werden kann, als andere organische Säuren.

Häufig werden auch die Salze der organischen Säure als Futterzusatzstoff eingesetzt. Ein häufig verwendetes Präparat ist das Kaliumdifomat (Formi LHS). Seit 2007 ist Kaliumdifomat als Futterzusatzstoff zugelassen (Verordnung (EG) Nr. 184/2007). Kaliumdifomat ist ein kristallines Pulver, das das Salz der Ameisensäure gebunden an Kalium enthält. In einer Studie von Canibe *et al.* (2001), wurde Kaliumdifomat bei Absetzferkeln eingesetzt. Dabei konnten zwar keine Effekte auf die Leistungsparameter und die Trockenmasse der Digesta festgestellt werden, aber der mikrobiologische Versuchsteil zeigte deutliche antimikrobielle Effekte besonders im Magen und Jejunum. Es kam zu einer Reduktion der anaeroben Keime, Milchsäurebakterien und von *E.coli*-Bakterien.

Benzoessäure

Seit dem 21. Mai 2003 ist der Säureregulator Benzoessäure als Futterzusatzstoff in einer Konzentration von mind. 5 g/kg Futter und max. 10 g/kg Futter in der Europäischen Union zugelassen (Verordnung (EG) Nr. 1730/2006).

Die Benzoessäure (C_6H_5COOH) ist eine aromatische Carbonsäure, die aus einem Phenylrest mit einer gebundenen Carboxylgruppe besteht.

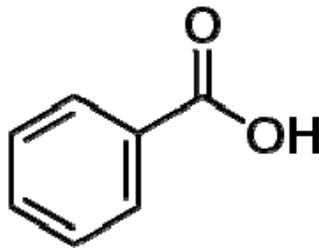


Abb.2: Strukturformel der Benzoessäure

Benzoate sind natürliche Bestandteile in vielen Pflanzen und werden oft präventiv im Futtermittel eingesetzt, um ihren antibakteriellen und antifugalen Effekt zu nutzen (Mroz et al. 2000). Benzoessäure ist ein Hauptbestandteil des Harzes Benzoe, zweier in Südostasien beheimateten Baumarten (Siam-Benzoe und Sumatra-Benzoe). Auch in einigen Früchten, wie z.B. Pflaumen, Heidel- und Preiselbeeren, kommt Benzoessäure vermehrt vor. Die industrielle Herstellung von Benzoessäure erfolgt durch eine chemische Reaktion aus Toluol. In der Lebensmittelindustrie ist Benzoessäure als Konservierungsstoff (E 210) zugelassen (BGBl, Anlage 5, Zusatzstoffe, die für Lebensmittel als Konservierungsstoff oder Antioxidationsmittel zugelassen sind). Die Salze und Ester der Benzoessäure werden Benzoate genannt und sind ebenfalls in der Futtermittel- und Lebensmittelindustrie als Zusatzstoff gebräuchlich.

Die Wirkung dieses Futterzusatzstoffes basiert auf zwei physiologischen Eigenschaften: Zum einen bewirkt Benzoessäure eine pH-Wert Absenkung im Magen-Darmtrakt der Tiere und ruft damit antimikrobielle Effekte hervor. Zum anderen wird die Benzoessäure im Gegensatz zu anderen organischen Säuren im Stoffwechsel der Tiere umgewandelt. Nach Absorption im Dünndarm entsteht in der Leber mit der Aminosäure Glycin die chemische Verbindung Hippursäure. Die gebildete Hippursäure wird dann über die Niere ausgeschieden und bewirkt dabei eine Absenkung des Harn-pH-Wertes (Taras 2005). In Folge dieser Absenkung wird wiederum die Ureaseaktivität in der Schweinegülle reduziert, woraus eine verminderte

Ammoniak-Freisetzung aus der Gülle resultiert. Dieser Vorgang kann zu einer Verbesserung der Stallluft beitragen, was nicht nur im Hinblick auf eine Umweltentlastung, sondern auch in Form einer Leistungssteigerung der Tiere von Vorteil sein kann (Mroz et al. 2000). Nach der EU-Richtlinie 2001/81/EG soll die gesamte Ammoniak-Emission von 1999 bis 2010 um 28% gesenkt werden. In der Schweineproduktion kann hierbei die Benzoesäure einen wichtigen Beitrag leisten. Schon beim Einsatz von 5 g Benzoesäure auf 1 kg Futter, kann eine signifikant höhere Hippursäurekonzentration und Absenkung des Harn-pH-Wertes festgestellt werden (Mroz et al. 2000). Auch in Versuchen an männlich kastrierten Mastschweinen konnte durch den Einsatz von Benzoesäure eine Reduzierung des Harn pH-Wertes und eine Reduktion der Ammoniakemission um 30% festgestellt werden. Schon 1970 untersuchte Bridges *et al.* die Umwandlung der Benzoesäure zu Hippursäure im Organismus von Menschen und 20 verschiedenen Tierarten. Erstaunlich war, dass alle Säugetiere hierbei denselben Metabolisierungsmechanismus aufwiesen. Je nach eingesetzter Konzentration von Benzoesäure wurden bis zu 80% in den ersten 24 h verstoffwechselt. Bei Versuchen mit Geflügel, Pelomedusenschildkröten und Geckos kamen Bridges *et al.* (1970) jedoch zu dem Ergebnis, dass die Benzoesäure bei diesen Tieren nicht hauptsächlich in Hippursäure, sondern in Ornithursäure umgewandelt wird. Alle drei Spezies schieden jedoch trotzdem noch einen kleinen Anteil der Benzoesäure als Hippursäure aus.

In neueren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass der Einsatz von 0,5% Benzoesäure im Futtermittel einen Einfluss auf die zootechnischen Leistungen (tägliche Gewichtszunahme und Futteraufwand) von Absetzferkeln hat (Guggenbuhl 2007). In derselben Studie konnte festgestellt werden, dass Benzoesäure bestimmte Bakterienpopulationen im Gastrointestinaltrakt (Magen und Caecum) der Ferkel reduzierte. Diese Reduktion war signifikant für Milchsäurebakterien und *E.coli*. Zusätzlich konnte eine bessere ileale Verdaulichkeit für Aminosäuren (Lysin und Threonin) festgestellt werden.

Kluge *et al.* (2006), stellten dagegen beim Einsatz von 0,5% und 1% Benzoesäure im Futtermittel keine signifikanten Effekte auf die Nährstoffverdaulichkeit fest, jedoch eine Steigerung der Stickstoffretention um 5-6%. Auch in diesem Versuch konnte eine Reduktion der Bakterienpopulationen (aerobe und anaerobe Gesamtkeimzahl, Milchsäurebildner und gram-negative Bakterien) hauptsächlich im Duodenum festgestellt werden.

Die antimikrobiellen Eigenschaften der Benzoesäure beruhen hauptsächlich auf dem inhibitorischen Effekt, der auf einige mikrobielle Enzyme wirkt, wie die α -Ketoglutaräuredehydrogenase und die Bernsteinsäuredehydrogenase (Bosund 1962).

Bezüglich des Einflusses der Benzoesäure auf die Mikrobiota des Verdauungstraktes von Absetzferkeln, kamen Torrallardona *et al.* (2007) zu dem Ergebnis, dass die Mikrobiota im Ileum und Caecum der mit Benzoesäure gefütterten Tiere eine größere Ähnlichkeit aufweist als die der Kontrolltiere.

Zitronensäure

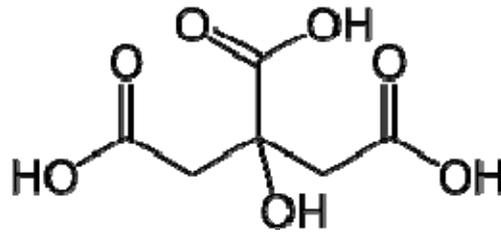


Abb.3: Strukturformel der Zitronensäure

Die Zitronensäure wird systematisch nach IUPAC auch 2-Hydroxypropan-1,2,3-tricarbonsäure genannt. Sie ist eine wasserlösliche, farblose Feststoffsäure.

Im Tierfutter ist Zitronensäure als Futtermittelzusatzstoff bei allen Tierarten und ohne Mindest- oder Höchstgehalt zugelassen (Anhang II der Richtlinie 70/524/EWG 1). Zitronensäure hat einen sauren Geschmack und einen geringeren antimikrobiellen Effekt im Vergleich zu anderen organischen Säuren. Der geringe antimikrobielle Effekt beruht sowohl auf der Fähigkeit vieler Mikroorganismen, Zitronensäure selber metabolisieren zu können, als auch am niedrigen pKs-Wert der Zitronensäure (Foegeding und Busta 1991).

Supplementierte Fumarate und Citrate werden gemeinschaftlich durch einen Na⁺-Gradienten-Mechanismus absorbiert, der für Tri- und Dicarboxylate spezifisch ist (Wolffram *et al.* 1990; Wolffram *et al.* 1992). Im tierischen Organismus werden Fumarate und Citrate im Intermediärstoffwechsel direkt im Zitronensäurezyklus eingesetzt, wo sie als wichtiger Metabolit fungieren (Stryer 1988).

In mehreren Studien ergab die Supplementierung von 1,5% Zitronensäure zur Basisdiät weder einen signifikanten Effekt auf den pH-Wert, noch auf die Konzentration von flüchtigen und nichtflüchtigen Fettsäuren. Auch die Untersuchung der Gesamtkeimzahl anaerober Bakterien, Milchsäurebakterien, Clostridien und *E.coli* aus der Digesta von Magen, Jejunum, Caecum und vorderem Colon beim Absetzferkel ergab hierbei keine signifikanten Unterschiede (Risley 1991; Risley *et al.* 1992; Risley 1993). Außerdem konnte durch den Zusatz der

Zitronensäure in einer Konzentration von 1,5% kein Einfluss auf die Schwere oder die Häufigkeit von absetzbedingten *E.coli*-Infektionen registriert werden (Risley 1993).

In einer Untersuchung von Tsiloyiannis *et al.* (2001) konnte jedoch festgestellt werden, dass beim Zusatz von 1,5% Zitronensäure zur Basisdiät eine Steigerung der durchschnittlichen täglichen Gewichtszunahme um 12,7% bei Absetzferkeln erfolgte. Ebenso erfolgte auch eine Steigerung der durchschnittlichen täglichen Futterraufnahme um 5,8%. Dieser Effekt wird von den Autoren mit dem ebenfalls besseren Gesundheitsstatus der Tiere im Gegensatz zur Kontrollgruppe erklärt. Also zeigt auch Zitronensäure in der Literatur durchaus positive Effekte im Hinblick auf gesteigerte Leistungsparameter.

Organische Säuren in Kombination mit pflanzlichen Futterzusatzstoffen (Cuxarom spice®)

Bei Cuxarom spice® der Firma Lohmann Animal Health & Co. KG, Cuxhaven, handelt es sich um einen Aromastoff der in Kombination mit organischen Säuren verwendet werden kann. Cuxarom spice® ist eine Gewürzmischung, bestehend aus: Braunalgen, Basilikum, Fenchel, Knoblauch, Zimt sowie den ätherischen Ölen von Anis und Thymian (Ehrlinger 2007).

Pflanzliche Futterzusatzstoffe spielen bereits seit Jahrhunderten in Asien und bei den amerikanischen Ureinwohnern eine bedeutende Rolle zur Stabilisierung der Gesundheit und Ernährung des Menschen (Bye 1999). Im allgemeinen Sprachgebrauch werden die Begriffe „pflanzliche bzw. phytogene Futterzusätze“, „Kräuter“, „Phytobiotika“, „Gewürze“ und „ätherische Öle“ häufig synonym verwendet (Ehrlinger 2007). Phytogene Zusatzstoffe weisen selbst keinen Nährstoff-, Mineralstoff- oder Vitamincharakter auf, besitzen aber die Fähigkeit- aufgrund ihrer aromatischen und funktionellen Eigenschaften- einen positiven Einfluss auf die tierischen Leistungen auszuüben (Westendarp 2003; Ehrlinger 2007).

Die Wirkung der phytogenen Zusatzstoffe wird in der Regel auf die sekundären Pflanzeninhaltsstoffe, wie ätherische Öle, Scharfstoffe, Bitterstoffe, Farbstoffe, phenolische Stoffe u.a. zurückgeführt. Oftmals sind die Wirksamkeit bestimmende Substanzen jedoch unbekannt bzw. nicht zu identifizieren. Die Wirkung ist außerdem nicht auf einzelne Substanzen beschränkt, sondern oft das Resultat einer Kombination. Das Wirkungsspektrum ist äußerst vielfältig. Am bekanntesten ist der Geschmack verbessernde und Appetit anregende Effekt, aber auch verdauungsfördernde Eigenschaften durch Anregung der Speichel-, Magen- und Darmsekretion, sowie antimikrobielle, entzündungshemmende, beruhigende Wirkungen werden beschrieben (Wald 2002; Schöne 2003; Westendarp 2003).

In einer Studie von Richter (2006), wurde der phyto gene Zusatzstoff Spicemaster (Cuxarom Spice®) in einer Konzentration von 300 g und 500 g/t Futter, bei Mastschweinen eingesetzt. Tendenziell nahmen die Tiere mit dem Einsatz von 500 g/t Futter 1,4% mehr Futter auf als die Tiere der Kontrollgruppe. Entsprechend der Futterverzehrserhöhung in der Endmastperiode erzielten die Mastschweine bei 300 g bzw. 500 g Spicemaster/t Futter mit 6,7% ($p < 0,05$) bzw. 10,2% ($p < 0,001$) signifikante Mehrzunahmen.

Auch Wald (2004) berichtete von einem nicht signifikanten Mehrverzehr der Mastschweine um 3% beim Einsatz von Spicemaster (Cuxarom Spice®) und eine um 6% erhöhte Körpermassezunahme ($p < 0,05$).

1.2. Bakterienpopulationen im Verdauungstrakt

Die intestinale Bakteriengemeinschaft monogastrischer Tiere und auch des Menschen besteht aus hunderter verschiedener Bakterienarten (Savage 1977; Conway 1995). In den letzten Jahrzehnten wurde die Rolle dieser intestinalen Bakteriengemeinschaft in Bezug auf die große Bedeutung der physiologischen Funktionen des Wirtes zunehmend bekannter (Cummings und Macfarlane 1997).

Die Entwicklung der intestinalen Mikrobiota ist Thema etlicher Studien. Die meisten Untersuchungen basieren auf kulturellen Methodetechniken für die bakterielle Analyse (Uchida 1965; Swords 1993; Melin et al. 1997). Weil diese Methodetechniken nur Informationen über leicht kultivierbare Bakterien liefern (Langendijk 1995; Suau 1999) entsteht ein verzerrtes Bild der intestinalen Bakteriendiversität. Um das Bild zu präzisieren wurden in jüngster Zeit die molekularbiologischen Methoden der Temperatur Gradient Gel Elektrophorese (TGGE) und der Denaturierenden Gradientengelelektrophorese (DGGE) immer gebräuchlicher (Muyzer 1993), da sich insbesondere Nukleotidsequenzen von Ribosomen für die phylogenetische Zuordnung von Bakterien eignen (Lane 1985). Für die Analyse können Sequenzen, die sowohl für die ribosomale DNA als auch die ribosomale RNA codieren, herangezogen werden. So lassen sich mit rRNA Gruppensonden alle Bakterien einer Gattung erfassen. Besonders geeignet für derartige Untersuchungen sind Sequenzen der 16S Untereinheit der Ribosome.

Die Methoden DGGE/TGGE und die Untersuchung mit rRNA Gruppensonden sind besonders nützlich, um Veränderungen in der Beschaffenheit der Bakteriengemeinschaft festzustellen. Diese Veränderungen können unter anderem durch einen Wechsel des Umgebungsmilieus der Bakterien hervorgerufen werden. So ist eine Umstellung des Futters,

z.B. durch einen Zusatzstoff, ein Reiz der zu einer Veränderung der Bakteriengemeinschaft des Verdauungstrakts führen kann (Simpson 2000; Tannock 2000; Satokari 2001).

Neben den ca. 400 verschiedenen Bakterienarten, sind pathogene *Escherichia coli* in der Ferkelaufzucht von besonderem Interesse, da sie Ursache des Postweaning Coli Complex (PWCC) sind. Ein besonderes Augenmerk liegt hier auf den schweinetypischen Pathogenitätsfaktoren von *E.coli*.

1.2.1 *Escherichia coli*

Beim Genus *Escherichia* handelt es sich um gramnegative, fakultativ anaerobe, meist peritrich begeißelte Stäbchen mit einer Größe von 1,1 - 1,5 µm x 2,0 - 6,0 µm. Einige *E.coli*-Stämme bilden Kapseln oder Mikrokapselfen und fermentieren neben D-Glukose auch L-Arabinose, Maltose, D-Mannitol, D-Mannose, L-Rhamnose, Trehalose und D-Xylose unter der Bildung von Säure und Gas. Die bevorzugte Wachstumstemperatur von *E.coli* liegt bei 37°C (Holt 1994).

Das von dem Pädiater Theodor Escherich 1885 im Stuhl von Säuglingen entdeckte Stäbchenbakterium *Escherichia coli* tritt in einer Vielzahl von Stämmen auf, die sowohl Bestandteil der Normalmikrobiota als auch wichtige Krankheitserreger bei Menschen und Tieren sein können (Rolle und Mayr 2002).

E.coli Bakterien sind eine anaerob auftretende intestinale Bakterienpopulation bei Schweinen, die den Verdauungstrakt distal vom Magen kolonisieren. Enterotoxinproduzierende *E.coli*-Stämme (ETEC) vermehren sich vorzugsweise im oberen Dünndarmabschnitt. Von ungefähr 10^{12} Bakterien/g Kot kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei 10^7 - 10^8 dieser Bakterien um *Escherichia coli* handelt (Vahjen 2009). Andere Quellen sprechen sogar von 10^{10} *E.coli*/g Kot (Schierack et al. 2006). *Escherichia coli* gehört zur autochthonen Mikrobiota und ist ein Saprophyt, der schon kurz nach der Geburt den Dickdarm von Warmblütern besiedelt. Der größte Anteil der *E.coli*-Stämme sind harmlose Bakterien, die keine Möglichkeit haben sich an die Darmwand des Wirts anzuheften und somit wieder ausgeschieden werden. Problematisch für den Wirtsorganismus sind dagegen pathogene *E.coli*-Stämme. Diese können sich an die Darmwand anheften und durch verschiedene Mechanismen zu einer Schädigung des Wirtsorganismus führen (Holt 1994).

1.2.2 Pathogene, Diarrhoe verursachende *Escherichia coli*

Zurzeit werden nach epidemiologischen und klinischen Eigenschaften sowie den spezifischen Virulenzdeterminanten in der Veterinärmedizin 5 Kategorien von durchfallverursachenden *E.coli* Stämmen unterschieden:

- EPEC enteropathogene *E. coli*
- ETEC enterotoxische *E. coli*
- EIEC enteroinvasive *E. coli*
- EHEC enterohämorrhagische *E.coli*
- EAggEC enteroaggregative *E. coli*

Als sechste Klasse der Durchfall verursachenden *E.coli* Stämme bezeichnet man nach Ha (2003):

- DAEC diffus adhärente *E. coli*

EPEC, EAggEC und DAEC Stämme werden klassifiziert nach ihrem Vermögen *in vitro* Epithelzellen lokalisiert, aggregativ und diffus zu binden (Ha et al. 2003). Schweinepathogene Stämme verursachen auf Blutagar meist eine deutliche Hämolyse. In einer Studie von Frydendahl *et al.* (2002) konnte gezeigt werden, dass von 563 *E.coli*-Isolaten, die von Absetzferkeln mit Durchfallerkrankung isoliert wurden, 87,8% hämolytische Eigenschaften hatten. Obwohl Hämolysin offenbar keine Rolle in der Pathogenese von PWD und ED spielt (Smith und Linggood 1971), haben nahezu alle PWD- und ED-Stämme hämolytische Eigenschaften (Bertschinger 1999; Nagy und Fekete 1999). Damit ist das Hämolysin ein wichtiger Indikator für die Diagnostik.

1.2.3 Serotypen/Serogruppen von *E.coli*

Als Serotyp oder Serogruppe werden unterscheidbare Varianten innerhalb einer Subspezies von Bakterien oder Viren bezeichnet. Vor der Entdeckung der Virulenzfaktoren von ETEC diente die Serotypisierung von Bakterienstämmen als guter Marker für ETEC (Sojka 1965).

Eine vollständige Serotypisierung beinhaltet den Nachweis folgender Antigene:

- O** - somatische Antigene
- K** - kapsuläre Antigene
- H** - flagelläre Antigene
- F** - fimbriale Antigene

Mit einer Mikrokapsel versehene mukoide Kolistämme bilden außerdem das sogenannte M-Antigen aus. Für die Serovarbestimmung wird seit Jahrzehnten die O:K:H- Seroformel verwendet. Der Nachweis eines bestimmten O-Antigens oder Serovar erlaubt in vielen Fällen gewisse Rückschlüsse auf die Virulenz eines Kolistamms, da Virulenzmerkmale gehäuft bei bekannten O-Gruppen auftreten. Diese sind somit als indirekte Virulenzfaktoren oder Indikator der Virulenz zu interpretieren (Rolle und Mayr 2002).

Für die pathogene Wirkung von *E.coli* sind vor allem Endo-, Entero- und Cytotoxine sowie Adhäsionsfaktoren ausschlaggebend. Wenn ETEC und/oder STEC (Shigatoxinbildende *E.coli*) in der Lage sind, eine Adhäsion und Kolonisation der Enterozyten im Dünndarm zu bewirken, kann es unter Umständen zur Erkrankung des Absetzferkels kommen. Diese Anheftung wird unter Mithilfe von fimbrialer Adhäsion an spezifische Rezeptoren auf der Darmschleimhaut erreicht. Dabei spielen F4 (früher: K88), F5 (früher: K99), F6 (früher: 987P), 213P und F41 bei PWD und F107 bei ED die bedeutendste Rolle (Bertschinger 1990; Erickson 1992; Imberechts et al. 1992; Bertschinger et al. 1993). Zusätzlich erschweren die verschiedenen Serotypen von *E.coli* erheblich die Immunantwort.

Die durch *E.coli* hervorgerufene PWD beruht meist auf einer ETEC-Infektion (Bilkei 1996). Es ist bekannt, dass die meisten Serogruppen zwar eng verbundene Genotypen aufweisen, jedoch zeigen nicht alle Mitglieder einer Serogruppe dieselben Virulenzgene oder die Expression gleicher Fimbrien (Nagy et al. 1999). Alle Enterotoxine und die meisten Fimbrien (ausgenommen F41 und F17) sind plasmidkodiert (Nagy und Fekete 1999). Diese Plasmide sind übertragbar und können aber auch, z.B. bei der Replikation des Bakteriums, verloren gehen. Somit ist der Serotyp nicht in jedem Fall mit der Ausstattung des Pathogenitätsfaktors korreliert (Blanco et al. 1997). Durch die Plasmidcodierung wird eine rasche Evolution der Virulenztypen bedingt (Fairbrother et al. 2005).

Die Pathogenitätsfaktoren F4 (K88) und F18 (F107, 2134P, '8813') sind für gewöhnlich die am häufigsten auffindbaren Typen in pathogenen *E.coli* Isolaten bei Absetzferkeln (Ojeniyi et al. 1994; Bertschinger 1999; Nagy und Fekete 1999). Die Pathogenitätsfaktoren F5 (K99), F6 (987P) und F41 sind ebenfalls häufig auffindbar, diese spielen jedoch eher eine Rolle bei *E.coli*- Infektionen, die ursächlich verantwortlich sind für Durchfallgeschehen bei Saugferkeln (Wilson und Francis 1986; Harel et al. 1991; Ojeniyi et al. 1994).

Spezifische Serogruppen von ETEC sind oft assoziiert mit verschiedenen Virulenzgenen, darunter Variationen von Toxin-codierten Genen und Fimbrien-codierten Genen. Als Beispiel ist die Serogruppe O139 des ETEC weltweit assoziiert mit dem F18ab Fimbrium. Allerdings verursachen Bakterienstämme dieser Serogruppe in Australien typischerweise PWD, während

sie in Europa typischer Verursacher der ED sind (Fairbrother et al. 2005). Innerhalb einer Serogruppe können sich verschiedene Klone entwickeln, die verschiedene Virulenzgene aufweisen. Das erzeugt Klonvarianten mit besonderer Genregion.

Die vorherrschende Serogruppe von PWD auslösendem *E.coli* ist weltweit O149. Diese Serogruppe wurde erstmals durch Orskov *et al.* (1969) bekannt und nennt sich O149:K91:F4ac:H10, wobei K91 wieder entfernt wurde, als man herausfand, dass der Mikroorganismus keine Kapsel bildet. O149 ETECs wurden erstmals in Dänemark 1966 detektiert (Frydendahl 2002). Andere häufig isolierte Serogruppen bei PWD sind O8, O138, O141, O147 und O157 (Sojka 1965; Nagy 1997; Nagy und Fekete 1999; Francis 2002; Frydendahl 2002; Schierack et al. 2006). Weiterhin können viele andere Serogruppen ursächlich für PWD sein, jedoch sind diese weniger häufig in ihrem Auftreten.

Die Analyse von Serotypen von *E.coli* wurde im Laufe der Jahre ausgeweitet und beinhalteten die Auffindung von Fimbrienantigenen, welche Virulenzfaktoren darstellen.

1.2.4 Pathogenitätsfaktoren und Pathogenitätsgene von *E.coli*

Tabelle 2 zeigt eine Zusammenfassung typischer schweinepathogener Virulenzgene von *E.coli* nach einer Zusammenfassung von Wu (2007).

Tabelle 2: Virulenzgene schweinepathogener *E.coli*

Name des Gens	Bezeichnung
ETEC (Enterotoxinbildende <i>E.coli</i>)	
<i>faeG</i>	F4 Fimbrial adhesin (K88)
<i>fedA</i>	F18 Fimbrial adhesin
<i>fanC</i>	F5 Fimbrial adhesin (K91)
<i>fasA</i>	F6 Fimbrial adhesin
<i>F41</i>	Fimbrial adhesin
<i>estI</i>	hitze stabiles Enterotoxin (Sta)
<i>estII</i>	hitze stabiles Enterotoxin (Stb)
<i>eltA</i>	hitze labiles Toxin
EaggEC (enteroaggregative <i>E.coli</i>)	
<i>east-1</i>	EaggEC hitze stabiles Enterotoxin (EAST1)
<i>aggC</i>	Fimbrien Antigen-spezifisches Gen
EPEC (enteropathogene <i>E.coli</i>)	
<i>bfpA</i>	Type IV Bündelförmige Pili
EIEC (enteroinvasive <i>E.coli</i>)	
<i>ipaH</i>	invasives Plasmidantigen
STEC (Shigatoxinbildende <i>E.coli</i>)	
<i>stx1</i>	Shigatoxin I
<i>stx2</i>	Shigatoxin II
<i>stx2e</i>	Shigatoxin 2e
<i>eae</i>	Intimin
<i>ehxA</i>	Enterohämolyisin
Zytolethales-Toxinproduzierendes <i>E.coli</i>	
<i>cdt</i>	Zytolethales ausdehnendes Toxin

Die Anwesenheit von Virulenzgenen ist die Voraussetzung für die Pathogenität von *E.coli*. Generell kann mit dem Vorhandensein von Pathogenitätsgenen bei *E.coli* eine Einteilung in pathogene und nichtpathogene *E.coli*-Stämme vorgenommen werden (Wu et al. 2007).

Zahlreiche Gene verschlüsseln Virulenzfaktoren wie Adhesin, Wirts-Zell-Oberflächen-modifizierende Faktoren, Invasin, Toxine und Sekretionssysteme, die an dem Mechanismus

der Pathogenität von *E.coli* beteiligt sind. Ein Virulenzgen kann sowohl einzeln als auch in Kombination mit anderen Virulenzgenen auftreten. Viele der Virulenzfaktoren befinden sich auf übertragbaren genetischen Elementen wie Plasmiden oder Transposons (Lee et al. 1985; Fairbrother 1999). Durch den Vorgang der Übertragung können aus gewöhnlichen pathogenen Serogruppen ungewöhnliche, seltene Typen werden. Der Durchfall nach dem Absetzen wird hauptsächlich durch β -hämolisierendes *E.coli* im proximalen Dünndarm und/oder Gärung von verdaulichen Nährstoffen aus der Absetzfutterdiät im Dickdarm verursacht (Partanen et al. 2007). Nachweisbar sind diese Stämme durch eine hämolytische Zone um die entsprechenden Bakterienkolonien auf Blutagar (Fairbrother et al. 2005).

ETEC exprimieren 2 Typen von Virulenzfaktoren: Fimbrien (Pili), mit denen sie am Darmepithel adhären, und Enterotoxine. Letztere sind plasmidcodiert und können in 2 verschiedene Klassen eingeteilt werden: Hitzestabile (ST-) und hitzelabile (LT-) Toxine.

Das LT zeigt auf DNA-Ebene große Ähnlichkeit mit dem Cholera-Toxin und wirkt über eine Aktivierung der Adenylatzyklase in Darmepithelien, während ST eine heterogene Gruppe kleinerer Enterotoxine darstellt, welche über die Aktivierung der Guanylatzyklase wirken (Moseley 1983; Frankel und Giron 1989).

Eine weitere Gruppe von *E.coli*, welche PWD verursachen, sind die enteropathogenen *E.coli* (EPEC). Diese zeichnen sich in der Regel durch das Fehlen von Enterotoxinen aus und sind ebenfalls am Krankheitsbild juveniler Durchfallerkrankungen beteiligt. Der hier wirkende Pathogenitätsfaktor ist der „attaching and effacing“-factor Intimin. Nach der Anheftung mittels der „bundle-forming Pili“ (Fimbrien) kommt es zum engen Kontakt des membranständigen Proteins zum Enterozyten (Nataro und Kaper 1998). Als Resultat einer Strukturänderung des Zytoskeletts der Enterozyten kommt es bevorzugt an der apikalen Seite der Darmzotten zu histopathologisch charakteristischen „attaching and effacing“ (AE) Läsionen.

Frydendahl (2002) berichtete, dass die meisten *E.coli* Isolate (von 219 getesteten Isolaten) von Schweinen mit PWD oder ED die Pathogenitätsgene: *faeG* (44,7% der Testisolate), *fedA* (39,3%), *fasA* (0,9%), *est-Ib* (77,6%), *elt* (61,6%), *est-Ia* (26,5%) und *stx2e* (16,4%) trugen. Aus diesem Grund soll im Folgenden kurz auf einige wichtige Pathogenitätsgene mit den entsprechenden Pathogenitätsfaktoren eingegangen werden.

1.2.4.1 Fimbrien-tragende *E.coli*

Fimbrien sind die Anheftungsorgane einiger *E.coli* Stämme. Sie heften sich an spezifische Rezeptoren der Enterozyten und verhindern so das Abschwemmen aus dem Darm. Fimbrien werden nach ihrer serologischen Aktivität in der Immunelektrophorese differenziert. Die Fimbrien F4 (K88) codiert auf dem *fae*-Gen, F5 (K99) auf dem *fan*-Gen, F6 (987P) auf dem *fas*-Gen, F41 (Adhäsion) auf dem *fimf_{41a}*-Gen und F18 (F107, 2134P, 8813) codiert auf dem *fedA*-Gen, treten häufig in Kombination miteinander und mit einem oder mehreren Toxinen auf (Mainil et al. 1998).

Die Fimbrientragenden Typen F18 und F4 (K88) sind die häufigsten, die bei der Analyse der ETEC bei PWD gefunden werden (Frydendahl 2002). Typischerweise ist F18 mit Durchfall beim Absetzferkel assoziiert, während F4 vor allem bei Durchfällen beim Saugferkel nachgewiesen wird. Vor einiger Zeit wurde das Gen für ein Afimbriumadhesin von *E.coli*, genannt AIDA (adhesin involved in diffuse adherence) bei an PWD und ED erkrankten Absetzferkeln entdeckt (Niewerth et al. 2001; Fekete et al. 2002; Mainil et al. 2002; Ha et al. 2003; Ngeleka et al. 2003).

fedA (F18)-Gen (Pathogenitätsfaktor: Fimbrium F107)

F18 Fimbrien sind lange flexible Anhänge mit charakteristischer Zickzack-Struktur und einem Durchmesser von 4,6 nm. Sie treten in zwei Antigenvarianten auf, F18ab und F18ac.

F18ab Fimbrien sind für gewöhnlich bei STEC, ETEC oder ETEC/STEC zu finden und nur schlecht *in vitro* nachzuweisen. Wohingegen F18ac Fimbrien im Allgemeinen bei ETEC vorkommen und recht gut *in vitro* nachzuweisen sind (Wittig et al. 1995; Nagy 1997).

F18-positive ETEC - Stämme produzieren oft das hitzestabile Enterotoxin St_a und St_b, mit oder ohne *stx2e* und nur selten das hitzelabile Enterotoxin LT (Rippinger et al. 1995; Francis 2002).

Fünf Gene wurden bereits als Mitglieder des Operons identifiziert: *fedA* (major pilus subunit), *fedB* (usher), *fedC* (chaperone), *fedE* (minor Protein ohne Funktion) und *fedF* (Adhesin) (Imberechts et al. 1996; Smeds et al. 2001; Smeds et al. 2003). Imberechts *et al.* (1992) fanden einen Zusammenhang zwischen dem *fedA*-Gen und dem *stx2e*-Gen. In ihren Untersuchungen kamen bei 83,3% der untersuchten Isolate von ED erkrankten Schweinen beide Gene zusammen vor.

fae (F4 /K88)-Gen (Pathogenitätsfaktor: Fimbrium F4)

F4 ist ein flexibles Fimbrium, bestehend aus F4ab, F4ac oder F4ad, wobei die F4ac-Variante die Häufigste und Bekannteste weltweit ist. In einer Studie von Choi und Chae (1999), wurden von 44 F4 positiven *E.coli*-Isolaten isoliert, von an Durchfall erkrankten Schweinen 96% mit dem F4ac- Fimbriengen gefunden, während nur 4% das F4ab-Fimbriumgen trugen. Das *fae*-Operon codiert die Biosynthese für das F4 Fimbrium (Huisman et al. 1994). Dieses *fae*-Gen liegt auf einem langen nichtkonjugativen Plasmid, welches ebenfalls die Raffinosefermentation codiert (Van den Broeck et al. 2000).

Die Gene für F4ab und F4ac sind auf einem Operon mit 10 Genen codiert und unterscheiden sich in ihrer *faeG*-Genvarianz, welche das Adhesin codiert.

1.2.4.2 Enterotoxine von *E.coli*

ETEC-Stämme, die als Verursacher der Koliruhr der Saugferkel und der PWD der Absetzferkel gelten, tragen als Virulenzfaktoren das hitzestabile Toxin (ST) und/oder das hitzelabile Toxin (LT). Da beide Toxine ihre Wirkung im Darm des Wirts entfalten, werden sie als Enterotoxine bezeichnet.

elt-Ia (LT)-Gen (Pathogenitätsfaktor: das hitzelabile Enterotoxin A)

LT ist eine 84 kDa A:B5 Proteinstruktur, die mit einer enzymatischen A-Untereinheit nicht kovalent mit einem Pentamer einer B-Untereinheit assoziiert ist. Die B-Untereinheit bindet das Toxin an den Rezeptor (de Haan und Hirst 2004). LT bleibt bei 60 °C für 15 min. stabil und zerfällt dann.

Die Bezeichnung LT kann synonym gebraucht werden mit der Bezeichnung LTI. Ein zweiter Ausdruck der sich für LT entwickelt hat, ist LTII (Holmes et al. 1986). LTI unterscheidet sich in der Antigenstruktur deutlich von LTII. Zusätzlich fehlt diesem die Enterotoxinaktivität und ist somit auch nicht assoziiert mit Erkrankungen beim Tier (Holmes et al. 1986). LTI ist durch das Anticholeratoxin neutralisierbar und wird hauptsächlich bei porcinen *E.coli*-Stämmen detektiert. Morphologisch handelt es sich dabei um einen hochmolekularen Toxin-Komplex, der mit fünf B-Untereinheiten an die Gangliosid-Rezeptoren der Darmschleimhaut bindet und dessen enzymatisch aktive A-Untereinheit die Adenylatcyklase aktiviert. Hierdurch kommt es zum Anstieg des intrazellulären zyklischen Adenosinmonophosphats und damit zu einer vermehrten Cl⁻, Na⁺, HCO³⁻ -Sekretion in das Darmlumen. Das Wasser folgt dabei den

Elektrolyten, wodurch eine sekretorische Diarrhoe entsteht. Codiert ist dieser Pathogenitätsfaktor LT auf dem *elt-IA*-Gen (Bosworth und Casey 1997).

est-Ib (STaP)-Gen (Pathogenitätsfaktor: das hitzestabile Enterotoxin II)

St ist ein nicht-immunogenes Protein, welches bei einer Temperatur von 100 °C für 15 min. stabil bleibt. Es wird nach seiner Löslichkeit in Methanol und seiner biologischen Aktivität in STa (löslich) und STb (unlöslich) eingeteilt (Lee et al. 1985).

Der Typ von STa der durch das schweinepathogene ETEC produziert wird, besteht aus 18 Aminosäuren und wird als STaP (codiert durch das *est-Ib*-Gen) bezeichnet. STaP aktiviert die Guanylatcyclase in Enterozyten, wodurch es zu einem Anstieg von zyklischem Guanidinmonophosphat in der Zelle kommt und über eine Hemmung des Na⁺-Cl⁻-Cotransports zu einer Verminderung der Wasser- und Elektrolytresorption aus dem Darmlumen.

STa als Produkt von ETEC wird besonders häufig beobachtet bei Erkrankungen neugeborener Ferkel. Das bovine ETEC und einige ETEC-Stämme bei neugeborenen Ferkeln weisen den Pathogenitätsfaktor F5 auf und produzieren zusätzlich STa als einziges Toxin.

est-II (STb)-Gen (Pathogenitätsfaktor: das hitzestabile Enterotoxin I)

STb ist ein 48 Aminosäuren, 5 kDa großes Peptid. Das STb-Gen wird häufig unter den Enterotoxingenen von ETEC gefunden, die aus an PWD erkrankten Schweinen stammen (Moon et al. 1986). Das ist nicht überraschend, da das STb-Gen für gewöhnlich auf dem Plasmid liegt, welches für LT codiert.

Nach Bertschinger *et al.* (1992) entfaltet STb seine pathogene Wirkung durch eine Steigerung der Wasser- und Elektrolytsekretion über ein zyklisches-Nucleotid unabhängiges System. Es konnte dargestellt werden, dass STb an allen Darmabschnitten, sowie in Leber, Lunge, Milz und Niere pH-abhängige Bindungen eingeht (Rousset und Harel 1998). Als Wirkungsweise am Enterozyten wird die Anregung der Prostaglandin E2 Synthese über die Öffnung eines mit einem G-Protein verbundenen Kalziumkanals diskutiert. Die intrazellulär erhöhte Kalziumkonzentration aktiviert eine Prostaglandin-Endoperoxidase-Synthetase, woraufhin die Flüssigkeits- und Elektrolytaborption verringert wird (Nagy und Fekete 1999).

stx2e (SLT)-Gen (Pathogenitätsfaktor: SLT IIe Toxin)

Shigatoxin produzierende *E.coli* (STEC)-Stämme werden in der Veterinärmedizin für die Ödemkrankheit bei Absetzferkeln verantwortlich gemacht (Gyles 1993). Obwohl der exakte Mechanismus, der die Ödemkrankheit auslöst, noch nicht vollständig geklärt ist, ist es auffällig, dass bei erkrankten Schweinen sehr häufig die gleiche Kombination an Virulenzfaktoren gefunden werden kann. Dabei handelt es sich um den *stx2e*-Virulenzfaktor, sowie das F18-Adhesin, F4-Fimbrium und AIDA (Niewerth et al. 2001; Ha et al. 2003).

Das Shigatoxin zeigt eine antigene Kreuzreaktion zu *Shigella dysenteriae* Typ 1 Toxin und wird in *stx1*, *stx2* und *stx3* eingeteilt. Das Toxin, welches für die Ödemkrankheit ursächlich verantwortlich ist, wird als *stx2e*-Variante bezeichnet (*stx2*-edema disease). Diese Variante ist hitzestabiler als die *stx2*-Variante. Die B-Untereinheit des Toxins bindet spezifisch an den Endothelrezeptor der Darmwand. Die A-Untereinheit des Toxins besitzt eine RNA-N-Glycosidase-Aktivität und ist in der Lage, einen Adenosinrest spezifisch aus der 28S-RNA des Wirts zu entfernen (Imberechts et al. 1992), wodurch die Proteinbiosynthese der Wirtszelle gehemmt wird und der Zellmetabolismus entgleist.

Das absorbierte Toxin gelangt in den Kreislauf und führt hier zu Läsionen der Gefäße des Darmtraktes, der Subkutis und des Gehirns (Imberechts et al. 1992). Die so entstehenden Defekte führen zu subkutanen Ödemen der Augenlider und generalisierten Ödemen, die im Bereich des zentralen Nervensystems neurologische Symptome wie Ataxie, Krämpfe und Paralyse hervorrufen (Imberechts et al. 1992). Aus diesem Grund findet man *stx2e* auch unter der Bezeichnung Vasotoxin oder Neurotoxin.

2. Material und Methoden

2.1 Tiere und Haltungsbedingungen

Die Ferkel beiderlei Geschlechts (die männlichen Tiere waren kastriert) kamen aus einem Zuchtbetrieb (Fa. Schaumann) und waren Kreuzungsprodukte aus der Mutterlinie Landrasse x Euroc und der Vaterlinie Pietrain. Die Tiere bekamen bis zum Tag des Absetzens (am 23. Tag) kein Ergänzungsfuttermittel und wurden nicht mit Antibiotika behandelt.

Die Haltung im Institut für Tierernährung der Freien Universität Berlin erfolgte in klimatisierten Ställen in Vollspalten-Flat-Deck- Buchten (2 m²) mit 24,4 °C Raumtemperatur und einer Luftfeuchtigkeit von 65%. Der Tag-Nachtrhythmus war untergliedert in eine sechzehnständige Licht- und eine achtstündige Dunkelphase.

2.2 Aufteilung der Versuchsgruppen

Die Ferkel wurden unmittelbar nach dem Absetzen angeliefert und anhand der Parameter Wurf, Geschlecht und Gewicht gleichmäßig auf die vier Versuchsgruppen aufgeteilt. Die Bestimmung der Leistungsparameter und der mikrobiologischen Daten wurde bei räumlich getrennten Tieren untersucht. Im Stall für den Leistungsversuch wurden je zwei Tiere beiderlei Geschlechts pro Box aufgestellt. Das ergab eine Anzahl von 14 Tieren pro Gruppe in jeweils 7 Boxen (gesamt 56 Tiere). Für den mikrobiologischen Versuch wurden in einem separaten Stall 7 Tiere pro Gruppe zusammengesetzt (gesamt 28 Tiere). Diese Ferkel wurden jeweils zu zweit oder zu dritt in Boxen gehalten.

Tabelle 3: Versuchsdesign

Versuchsgruppe		A	B	C	D
Anzahl der Ferkel	n	21	21	21	21
Anzahl der Wiederholungen (Leistungsversuch)	n	14	14	14	14
Anzahl der Wiederholungen (Mikrobiologie)	n	7	7	7	7
Ameisensäure (flüssig)	g/kg	-	5	-	-
Benzoessäure (granuliert)	g/kg	-	-	5	-
Kombinationspräparat	g/kg	-	-	-	-
Ameisensäure 44 % (granuliert)		-	-	-	1
Benzoessäure (granuliert)		-	-	-	3
Zitronensäuremonohydrat		-	-	-	1
Kaliumsorbat		-	-	-	1
Cuxarom Spice 301		-	-	-	0,2

A= Kontrollgruppe, B= Ameisensäuregruppe, C= Benzoessäuregruppe, D= Kombinationspräparatgruppe

2.3 Versuchsdiäten

Es wurde eine praxisübliche Diät für Aufzuchtferkel nach den Empfehlungen der Gesellschaft für Ernährungsphysiologie (Ausschuss für Bedarfsnormen Nr. 10, 2006) mit den Hauptkomponenten Gerste, Weizen, Sojabohnen (dampferhitzt) und Molkenfett konzipiert. Die Herstellung der Basisdiät erfolgte im Mischfutterbetrieb Fugema (Futtermittel- und Getreidehandelsgesellschaft mbH & Co. KG, 17132 Malchin). In der Tabelle **4a** sind die vom Institut für Tierernährung der Freien Universität Berlin ermittelten Analyseergebnisse des Futtermittels zusammengefasst.

Tabelle 4: Basisdiät und gemessene Energie- sowie Nährstoffgehalte des Alleinfutter - mittels für Aufzuchtferkel (Angaben des Herstellers)

Futtergruppe	Alle Versuchsgruppen	
Zusammensetzung		
Gerste	[g/kg]	372,9
Weizen	[g/kg]	300
Sojabohnen, dampferhitzt	[g/kg]	100
Molkenfett	[g/kg]	90
Sojaextraktionsschrot	[g/kg]	48
Kartoffeleiweiß	[g/kg]	30
Mineralstoff-Spurenelement-Vormischung	[g/kg]	15
Sojaöl	[g/kg]	14
L-Lysin-Konzentrat, flüssig	[g/kg]	10
Kalziumcarbonat	[g/kg]	7,7
Monokalziumphosphat	[g/kg]	5,2
DL-Methionin-Konzentrat, flüssig	[g/kg]	4,9
L- Threonin	[g/kg]	1
Vitamin E	[g/kg]	1
L-Tryptophan	[g/kg]	0,3
Gehalte		
ME	[MJ/kg]	14
Rohprotein	[g/kg]	175
Rohfaser	[g/kg]	34
Rohfett	[g/kg]	68
Lysin	[g/kg]	14
Methionin	[g/kg]	4,9
Threonin	[g/kg]	7,8
Tryptophan	[g/kg]	2,5
Methionin + Cystin	[g/kg]	8
Kalzium	[g/kg]	7
Phosphor	[g/kg]	6
Natrium	[g/kg]	2,9

Zusatzstoffe je kg Alleinfutter: 20000 IE Vit. A; 3500 IE Vit. D₃; Antioxidans BHT, BHA, Aromastoffe, L-Lysin-Konzentrat, flüssig; DL-Methionin-Natrium-Konzentrat, flüssig; L-Threonin; L-Tryptophan; 22 mg Cu aus Cu II - Sulfat-Pentahydrat; 0,4 mg Se.

Tabelle 4a: Am Institut für Tierernährung (FU-Berlin) analysierte Futtermittelgehalte der vier Versuchsgruppen nach VDLUFA-Empfehlungen (Naumann 1988)

		Kontrolle	Ameisensäure	Benzoessäure	Kombination
Trockensubstanz	[%]	89,62	89,58	89,79	90,47
Rohasche	[g/kg]	53,62	52,26	54,92	57,76
Rohfett	[g/kg]	47,64	46,23	48,64	50,45
Rohprotein	[g/kg]	170,0	170,2	169,3	171,6
Rohfaser	[g/kg]	39,19	33,67	35,64	31,52
Phosphor	[g/kg]	5,71	5,73	5,71	5,74
Kalzium	[g/kg]	7,57	6,92	8,08	8,29
Natrium	[g/kg]	2,23	2,17	2,19	2,38

Nach Aufteilung der Basisdiät in 4 Einzelchargen a 500 kg wurden 3 Einzelchargen mit den jeweils zu prüfenden Futterzusatzstoffen in einer Dosierung von 5 g Säure/kg Futter versetzt (Versuchsgruppen B, C, D). Zu der Basisdiät der Versuchsgruppe B wurden 5 g/kg Ameisensäure (98 %, Hersteller: Ligrana, Eilsleben, Deutschland) zugegeben. Die Basisdiät der Versuchsgruppe C wurde mit 5 g/kg Benzoessäure (Vevo Vitall E 210, Hersteller: DSMBrand, Heerlen, Niederlande) versetzt. Der Basisdiät der Versuchsgruppe D wurde eine Säuremischung zugefügt, die sich zusammensetzt aus 1 g/kg Säuregranulat, das aus einer auf einen Trägerstoff aufgebracht, gepufferte Ameisensäure bestand (44% Ameisensäure, 4% Ammoniak, 12% Wasser, 40% Vermiculit, Hersteller: Ligrana/ Lohmann Animal Health, Cuxhaven, Deutschland), 3 g/kg Benzoessäure (Vevo Vitall E 210 Hersteller: DSMBrand), 1 g/kg Zitronensäuremonohydrat (Gehalt mind. 90% Zitronensäure, Hersteller: Lohmann Animal Health), 1 g/kg Kaliumsorbat (Gehalt mind. 98% Kaliumsorbat, Hersteller: Lohmann Animal Health) sowie 0,2 g/kg Cuxarom Spice 301 (Aromastoff) (Hersteller: Lohmann Animal Health). Die verbleibende Einzelcharge diente ohne den Zusatz einer Säure als Kontrollfutter (Versuchsgruppe A). Von jeder dieser vier Chargen wurden je 80-100 kg Futter entnommen und mit 5 g Cr₂O₃/kg supplementiert. Die Herstellung der jeweiligen Versuchsmischungen erfolgte im institutseigenen Mischfutterbetrieb (Institut für Tierernährung; Anerkennungsnummer: αDE-BE-100001; Registriernummer DE-BE-100001).

2.3.1 Fütterung

Im mikrobiologischen Versuchsabschnitt wurden die Ferkel vom Tag des Absetzens bis 5 Tage vor der Tötung *ad libitum* gefüttert. Danach erfolgte eine restriktive Fütterung. Die Tiere erhielten ihr Futter berechnet nach ihrem Bedarf (9% der metabolischen Lebendmasse) in 5 Portionen alle 2 Stunden über den Tag verteilt. Nach Möglichkeit wurden die Ferkel für

die restriktive Fütterung einzeln gesetzt. Aus Platzgründen war dies jedoch am Anfang nicht möglich, sodass zwei Tieren in einer Box das Futter zusammen verabreicht wurde. Die Tiere im Leistungsversuch erhielten durchgängig eine *ad libitum* Fütterung. Das Angebot an frischem Trinkwasser erfolgte über Nippeltränken, *ad libitum*.

2.4 Zootechnische Leistungen

Die zootechnischen Leistungen wurden durch Lebendmasseentwicklung, Futteraufnahme und Futteraufwand charakterisiert. Hierfür wurden die Tiere wöchentlich je Bucht gewogen (Waage Bizerba, Bizerba ITU, Meßkirch, Deutschland). Die Futteraufnahme je Bucht erfolgte ebenfalls wöchentlich über die Dokumentation der jeweiligen Ein- und Rückwaagen unter Berücksichtigung gesammelter Futtermittelverluste. Für die Berechnung des Futteraufwandes wurde die je Bucht erzielte durchschnittliche Lebendmassezunahme und gemittelte Futteraufnahme je Tier herangezogen.

$$\text{Futteraufwand} = \frac{\text{mittlere Futteraufnahme}}{\text{mittlere Lebendmassezunahme}}$$

2.5 Kotkonsistenz

Die Kotkonsistenz wurde täglich auf der Grundlage des nachfolgend ausgewiesenen Bonitierungsschlüssels dokumentiert. Der Gesundheitszustand der Tiere wurde täglich kontrolliert.

Tabelle 5: Bonitierungsschlüssel für die Kotkonsistenz

Kotkonsistenz	Kodierung	Beurteilung
fester, trockener Kot	1	physiologisch
weicher, geformter Kot	2	physiologisch
weicher ungeformter Kot	3	beginnende Diarrhoe
flüssiger Kot	4	Diarrhoe
flüssiger Kot mit Farbveränderung	5	schwere Diarrhoe

Als Diarrhoe wurde weicher ungeformter Kot (3) gewertet, der an zwei oder mehr aufeinander folgenden Tagen auftrat (Männer 1997).

2.6 Probengewinnung

Futterproben

Nach der vollständigen Mischung der vier Versuchsdiäten, wurden sofort verschließbare Probentüten mit den entsprechenden Futtermitteln gefüllt und analysiert. Nach Ablauf einer Woche wurden wiederum Proben aus allen vier Versuchsdiätmischungen genommen. Zusätzlich wurde direkt nach der Tötung der Tiere abermals Proben aus den Futtermittelvorratsbehältern entnommen.

Die Entnahme der Futtermittelproben erfolgte jeweils aus der Mitte des Aufbewahrungsbehälters.

Kotproben

Die Probennahmen für die mikrobiologische Untersuchungen erfolgte von den für die Verdaulichkeitsuntersuchungen aufgestellten Ferkeln. Diese erhielten von Anfang an das Futter mit Indikatorsubstanz. Während der ersten drei Wochen erfolgte eine allgemeine Beurteilung des mikrobiologischen Status anhand von Kotproben. Die Kotproben wurden am 5., 9. und 14. Tag nach dem Absetzen genommen. Die Tiere wurden hierfür einzeln in zuvor gereinigte Boxen gesetzt und der frisch abgesetzte Kot in je zwei 2 ml-Plastikgefäße für die mikrobiologische Untersuchung und für die Bestimmung der Trockensubstanz gefüllt.

Am Tag der Tötung wurde erneut von jedem Tier Kotproben gesammelt. Diese Proben wurden zur Untersuchung der scheinbaren Verdaulichkeit benötigt.

Gewinnung der Proben aus dem Verdauungstrakt

Die Tötung erfolgte am 25. Tag 30 Minuten nach der letzten Futteraufnahme. Dieses Vorgehen erfolgte aus arbeitstechnischen Gründen auch am 26. und 27. Tag. Die Tiere wurden durch intramuskuläre Verabreichung von Ketamin (10% Ursotamin, Serumwerk, Bernburg, Deutschland) in einer Dosierung von 0,2 ml/kg und Azaperon (Stresnil®, Janssen-Cilag, Neuss, Deutschland) in einer Dosierung von 0,1 ml/kg sediert. Die Tötung erfolgte durch eine intrakardiale Injektion von T61® (Kombinationspräparat, Wirkstoffe: Embutramid, Tetracain, Mebenzonium, Intervet, Unterschleißheim, Deutschland) in einer Dosierung von 10 ml/Tier.

Die Öffnung der Bauchhöhle wurde entlang der *Linea alba* und durch zwei Entlastungsschnitte entlang des Rippenbogens durchgeführt. Nach dem Eröffnen wurde zuerst

das Ileum aufgesucht. Die *Plica ileocaecalis* gab dabei Aufschluss über den Anfang des Ileums. An dieser Stelle wurde der Darm mittels zweier Arterienklemmen abgeklemmt und durchtrennt. Von dieser Stelle wurde dann nach proximal 1,5 m vom Dünndarm abgemessen. Dieser Abschnitt wurde ebenfalls mit Arterienklemmen gesichert und durchtrennt. Der Inhalt dieses 1,5 m langen Dünndarmabschnitts wurde in ein steriles Probengefäß überführt und später zur Bestimmung der scheinbaren praecaecalen Verdaulichkeit verwendet. Der verbleibende Dünndarm wurde herauspräpariert und halbiert. So ergaben sich die Abschnitte proximales und distales Jejunum. Der Inhalt aus dem Jejunum, Magen und Colon wurde ebenfalls in sterile Probengefäße überführt und sofort auf Eis gelagert, um dann anschließend in 2 ml-Plastikgefäße gefüllt zu werden. Je eine Probe aus dem proximalen und distalen Jejunum sowie aus dem Colon wurde sofort ins Labor verbracht, um Enterobakterien auf Endoagar (Carl Roth GmbH & Co, Deutschland) anzuzüchten.

Die Lagerung der restlichen Proben erfolgte bei -80 °C.

Harnprobengewinnung

Nach der Tötung der Tiere wurde der Harn mittels einer 20 ml Spritze (Kanüle: 1,2 x 40 mm) steril aus der Harnblase gewonnen und in ein 50 ml-Plastikgefäß überführt, um es zur Hippursäurebestimmung ins VMDI (Veterinärmedizinisch-Diagnostisches Institut GmbH) zu verbringen.

2.7 Futtermittelanalysen

2.7.1 Bestimmung der Pufferkapazität des Futters

Zur Bestimmung der Pufferkapazität wurden jeweils 10 g pro Futtermittelvariante eingewogen und mit 80 ml destilliertem Wasser versetzt. Mit einer 0,5 N Salzsäure wurden dann mittels Titration die pH-Wert Stufen 5, 4, 3 und 2 mit einem pH-Meter (Seven Multi, Mettler Toledo, Schweiz) eingestellt und der Verbrauch an Salzsäure in ml notiert. Rechnerisch konnte dann die Pufferkapazität bestimmt werden.

$$\text{Pufferkapazität } \beta: \quad \beta = \frac{\text{H}^+ \text{ Zugabe/ Volumen}}{\Delta\text{pH}}$$

2.7.2 Benzoessäurekonzentrationsbestimmung im Futtermittel und Digesta mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Eine Auflistung der verwendeten Materialien und Chemikalien befindet sich im Anhang **(Tabelle A1)**.

Die HPLC ist ein Flüssigchromatographieverfahren, mit dem Substanzen getrennt werden, um dann durch Standards identifiziert sowie quantifiziert zu werden. Die Benzoessäure wurde alkalisch gelöst und mittels der HPLC auf einer Hydro RP Säule isokratisch bei ca. pH 4,1 von Matrixbestandteilen sauber getrennt und quantifiziert.

Wegen des großen linearen Bereiches erfolgte eine Ein-Punkt-Kalibrierung entweder mit dem Standard 10 ppm (für Futtermittel und Magen) oder 2 ppm (für Jejunum).

Die Nachweisgrenze wurde aus dem Signal/Rauschverhältnis zu 0,02 ppm abgeschätzt. Die Bestimmungsgrenze lag also bei 0,2 ppm.

Für die Vorbereitung der Proben aus Futtermittel wurden 5 g in einen 100 ml-Messkolben eingewogen und ca. 60 ml NaOH 50 mM (siehe Anhang A1) dazugegeben. Der Kolben wurde dann 30 min. bei ca. 175 mot/min geschüttelt und dann mit NaOH (50 mM) aufgefüllt. 15 oder 50 ml wurden dann bei 3000 x g für 15 min. zentrifugiert. Vom Überstand wurden 5 ml abgenommen und in einen 50 ml-Messkolben gegeben. Dann wurden je 0,5 ml Carrez I und II (siehe Anhang A1), und 5 ml HCl (50 mM) (siehe Anhang A1) zur Neutralisation dazugegeben und auf 50 ml mit Reinstwasser aufgefüllt. Die Probe wurde umgeschwenkt, zentrifugiert und ca. 3 – 5 ml durch ein Spritzenfilter in ein Gefäß gegeben. 400 µl der filtrierten Probe, 400 µl Methanol und 200 µl Puffer (pH 3,1) (siehe Anhang A1) wurden direkt im Probengefäß verdünnt und gut gemischt. Die Probe war nun zur Analyse bereit.

Zur Vorbereitung der Magenproben wurden 500 mg in ein 15 ml-Plastikgefäß eingewogen und mit je 300 µl Carrez I und II und 4 ml NaOH (50 mM) versetzt, anschließend wurde das Gefäß gut manuell geschüttelt, so dass alle Bestandteile aufgeschlemmt wurden, um es danach für 30 min. bei 200-250 mot/min. zu schütteln. Die Probe wurde zentrifugiert (3000 x g für 15 min.) und der Überstand durch einen Spritzenfilter gegeben. 1,25 ml wurden in einen 10 ml-Messkolben gegeben, zur Neutralisation mit 1,25 ml HCl (50 mM) versetzt und mit Reinstwasser aufgefüllt. 400 µl der filtrierten Probe, 400 µl Methanol und 200 µl Puffer (pH 3,1) wurden direkt im Probengefäß verdünnt und gut gemischt. Die Probe war nun zur Analyse bereit.

Um die Jejunumproben vorzubereiten, wurde wenn möglich 1 g Jejunuminhalt eingewogen (mind. 500 – 600 mg), in ein 15 ml-Plastikgefäß gegeben und mit je 300 µl Carrez I und II sowie mit 3,5 ml NaOH (50 mM) versetzt, anschließend wurde gut manuell geschüttelt, so dass alle Bestandteile aufgeschlemmt wurden, um dann 30 min. bei 200-250 mot/min. zu schütteln. Die Probe wurde zentrifugiert (3000 x g für 15 min.) und der Überstand durch einen Spritzenfilter gegeben. 400 µl der filtrierten Probe und 400 µl Methanol sowie 200 µl Puffer (pH 3,1) wurden direkt im Probengefäß verdünnt und gut gemischt. Die Probe war nun zur Analyse bereit. Für die Programmeinstellungen und Probenverdünnungen siehe Anhang A1.

2.7.3. Ameisensäurekonzentrationsbestimmung im Futtermittel und Digesta mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Eine Auflistung der verwendeten Materialien und Chemikalien befindet sich im Anhang (**Tabelle A2**).

Um die Standards für die Ameisensäurebestimmung herzustellen, wurde zuerst eine 10fache Verdünnung der Stammlösung (siehe Anhang A2) hergestellt. Dazu wurden 10 ml der Stammlösung und 10 ml 0,2 N H₂SO₄ in einen 100 ml-Messkolben gegeben und mit Aqua dest. aufgefüllt.

Der Standard für Proben aus dem Magen wurde wie folgt hergestellt:

2,5 ml Stammlösung und 10 ml H₂SO₄ (0,2 N) in einen 100 ml-Messkolben, der dann mit Aqua dest. aufgefüllt wurde.

Der Standard für Digestaproben wurde wie folgt hergestellt:

100 µl Stammlösung und 100 µl 0,2 N H₂SO₄ sowie 800 µl Aqua dest. direkt in das Probengefäß.

Herstellung des Probenextraktes:

Futtermittel mit 5 g Ameisensäure/kg FM (0,5%):

10 g Futtermittel wurden in einen 100 ml-Messkolben eingewogen und mit 60 ml Aqua dest. 30 min. bei ca. 160 mot/min. horizontal geschüttelt. Anschließend wurde der Messkolben mit Aqua dest. bis zum Eichstrich aufgefüllt. 40-50 ml dieser Lösung wurden abgenommen und in ein 50 ml-Plastikgefäß überführt und zentrifugiert (3000 x g, 15 min.). Ca. 10 ml der Lösung wurden dann durch einen Spritzenfilter (0,2 µm) filtriert. Von der filtrierten Lösung wurden 500 µl in ein Probengefäß pipettiert. 500 µl H₂SO₄ wurden dazugegeben. Das Probengefäß wurde gut verschlossen und geschüttelt.

Magen- und Digestaprobe:

Die Proben wurden aufgetaut, um dann 0,6-1 g in ein 15 ml-Plastikgefäß einzuwiegen. Zusätzlich wurden 0,5 ml einer Kaliumhexacyanoferratlösung und 0,5 ml einer Zinkchloridlösung zugegeben. Das Gefäß wurde gut geschüttelt und anschließend zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde danach durch einen Spritzenfilter (0,2 µm) filtriert. 500 µl dieser Probenlösung wurden mit derselben Menge 0,04 N H₂SO₄ direkt ins Probengefäß gegeben, gut durchmischt und anschließend mit der HPLC analysiert. Für die Programmeinstellungen siehe Anhang A2.

2.8 Messungen von Stoffwechselprodukten in Digesta

2.8.1 Ammonium-Bestimmung in Digesta mittels ionenselektiver Elektrode

Eine Auflistung der verwendeten Materialien und Chemikalien befindet sich im Anhang (**Tabelle A3**).

Eine 55,56 mM NH₄Cl Stamm-Lösung (= 1000 ppm, entsprechen 55,56 mmol/l) (siehe Anhang A3) wurde verdünnt, um die folgenden Konzentrationen zu erhalten: 500 ppm, 100 ppm, 50 ppm, 10 ppm, 5 ppm. Mittels dieser Verdünnungsreihe erfolgte die Kalibrierung der NH₄⁺- Elektrode. Die Messung erfolgte im mV-Modus.

Digestaprobe aus Magen, distalem Jejunum und Colon wurden aufgetaut und danach auf Eis gehalten. Es wurden 0,5 g jeder Probe abgewogen und in ein neues steriles 2 ml-Plastikgefäß überführt. Auch diese Proben wurden ständig auf Eis gehalten. 500 µl bidestilliertes Wasser wurde jeder Probe zugesetzt. Anschließend wurden die Proben mittels Vortexer homogenisiert. Die Proben wurden für 10 min. und 4 °C bei 16.200 x g zentrifugiert. Wenn möglich wurden 500 µl des Überstandes abgenommen und in ein Szintillationsgefäß überführt. War der Überstand nicht ausreichend, wurde er in ein neues steriles 2 ml-Plastikgefäß überführt und mit 500 µl bidestiliertem Wasser verdünnt. Aus dieser Verdünnung wurden dann nach Durchmischung 500 µl abgenommen und in ein Szintillationsgefäß verbracht. Die Verdünnung wurde notiert.

In die Szintillationsgefäße wurde zusätzlich 200 µl ISA-Lösung (0,9-molare Aluminiumsulfatlösung) und 9,5 ml bidestilliertes Wasser gegeben. Auf einem Magnetprüher wurde darauf die aufbereitete Probe unter ständigem Rühren durchmischt.

Die Elektrode wurde in die Probenlösung getaucht und der gemessene mV-Wert protokolliert. Anhand der vorher erstellten Kalibrierkurve konnte die Ammoniumkonzentration jeder Digestaprobe abgelesen werden.

2.8.2 Enzymatische Bestimmung von [D(-)- und L(+)]-Laktat

Eine Auflistung der verwendeten Materialien und Chemikalien befindet sich im Anhang (**Tabelle A4**).

Das Prinzip der enzymatischen Milchsäurebestimmung besteht darin, dass D-Milchsäure durch NAD in Gegenwart von D-Laktat-Dehydrogenase zu Pyruvat oxidiert wird. L-Milchsäure wird entsprechend durch L-Laktat-Dehydrogenase zu Pyruvat oxidiert. Das Gleichgewicht der Reaktion kann durch Zugabe von Glutamat-Pyruvat-Transaminase in Gegenwart von Glutamat auf die Seite von Pyruvat und NADH verschoben werden. Das entstandene NADH wird photometrisch bei 365 nm gemessen und verhält sich proportional zur Ausgangsmenge an Milchsäure.

Zur Probenvorbereitung wurden Digestaprobe aus Magen, distalem Jejunum und Colon aufgetaut und danach auf Eis gehalten. Von jeder Probe wurde jeweils 1,0 g abgewogen und in ein neues 15 ml-Plastikröhrchen überführt. Auch diese Probenabfüllung war ständig auf Eis zu halten. Nun wurden 2,0 ml 1 N Perchlorsäure zugegeben und 10 sec. mit einem Vortexer durchmischt. Die so behandelte Probe wurde sofort zurück auf Eis gestellt. Es wurden 200 µl 4 N KOH zugegeben. Die Probe wurde gut durchmischt und zurück auf Eis gestellt. Im Anschluss wurden die Proben für 10 min. und 4 °C bei 400 x g zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde in ein neues steriles 2 ml-Plastikgefäß überführt. Die Proben wurden erneut bei 4 °C und 16.200 x g für 10 min. zentrifugiert. Von dem so entstandenen Überstand wurden jeweils 1000 µl abgenommen und in ein neues steriles 2 ml-Plastikgefäß überführt.

Um optimale Bedingungen für die Enzymreaktion zu schaffen, wurde für jede Probe mittels Mikro-pH-Elektrode der pH-Wert bestimmt und mit 4 N KOH ein pH-Wert zwischen 8 und 10 eingestellt.

Die Ermittlung des Milchsäuregehalts der behandelten Proben erfolgte anschließend photometrisch mit Hilfe eines kommerziellen enzymatischen Laktat-Test Kits, nach Angaben des Herstellers. Zur photometrischen Messung wurde das Programm Swift Quantification II verwendet. Nach der photometrischen Bestimmung des Milchsäuregehalts erfolgte die Berechnung der Laktatgehalte (L- und D- Isomere).

2.8.3 Gaschromatographische Messung der kurzkettigen flüchtigen Fettsäuren (FFS)

Eine Auflistung der verwendeten Materialien und Chemikalien befindet sich im Anhang (**Tabelle A5**).

Für die Untersuchung der FFS in den einzelnen Darmabschnitten wurden Proben aus Magen, distalem Jejunum und Colon herangezogen. Mit einem Gaschromatograph (GC), ausgerüstet

mit einem Flammenionisationsdetektor und der Kapillarsäule InnoWax, erfolgte die Konzentrationsbestimmung der FFS Acetat, Propionat, Butyrat und Valeriat. Die Proben wurden nach der Methode von Schäfer (1995) behandelt und aufgearbeitet. Die Proben wurden aufgetaut, 300 mg abgewogen und in ein steriles 1,5 ml-Plastikgefäß überführt. Durch Zugabe von 1000 µl eines internen Standards (enthält 0,5 mmol/l Capronsäure, 950 ml bidestilliertes Wasser HPLC/GC-grade, 50 ml Stammlösung, 25 g Natriumacetat und 10 g Oxalsäuredihydrat) wurden die Proben suspendiert. Die Proben wurden dann 1 Stunde geschüttelt und danach bei Raumtemperatur, 8 min. bei 16.200 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde wie folgt abgenommen:

- Magenproben: 500 µl + 500 µl interner Standard
- Jejunumproben: 400 µl + 800 µl interner Standard
- Colonproben: 100 µl + 1000 µl interner Standard

Die Proben wurden gut durchmischt und mit dem Gaschromatographen untersucht. Für die Programmeinstellungen siehe Anhang A5.

2.8.4 pH-Messung in Digesta und Harn

Eine Auflistung der verwendeten Materialien und Chemikalien befindet sich im Anhang (**Tabelle A6**).

Sofort nach der Tötung der Ferkel und nach der Entnahme der Digesta aus dem Verdauungstrakt wurde aus den Darmabschnitten Magen, proximales, distales Jejunum, Caecum und Colon 1 g Digesta entnommen und mit 4 ml 0,01 M Kalziumchloridlösung (siehe Anhang A6) verdünnt. Die entstandene Suspension wurde mittels Vortexer gut durchmischt. Dann wurde mit Hilfe eines pH-Meters der pH-Wert bestimmt.

Der pH-Wert des Harns wurde direkt nach der Entnahme ohne weitere Aufarbeitung mittels pH-Meter bestimmt.

2.8.5 Bestimmung des Markers Chromoxid für die Berechnung der scheinbaren praecaecalen Verdaulichkeit

Für die Messung des Chromgehaltes aus den Proben distales Jejunum und Kot, die am Tötungstag genommen worden waren, wurden ca. 0,5 g in Tiegel eingewogen und im Muffelofen (Typ: M110, Heraeus, Herrenberg, Deutschland) für 4 h bei 600 °C verascht. Anschließend wurden den Proben 4 ml Kaliumbromat und 3 ml Mangansulfat zugefügt und dann leicht geschwenkt. Die Proben wurden dann für 50 min. bei 200 °C im Sandbad erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden sie durch einen Faltenfilter in 50 ml-Messkolben überführt, in die je 6 ml Kalziumchlorid vorgelegt worden waren, und anschließend mit destilliertem

Wasser auf 50 ml aufgefüllt. Die Bestimmung des Markers Chromoxid erfolgte mittels Atomabsorptionsspektrometrie (AAF Vario 6, Analytik-Jena, Jena, Deutschland) (Arthur 1970).

2.8.6 Lyophilisierung der Kot- und Digestaprobe

Für die Bestimmung der scheinbaren praecaecalen und scheinbaren Gesamttraktverdaulichkeit mussten die Kotproben vom Tag der Tötung und die Digestaprobe (distales Jejunum) gefriergetrocknet werden (Lyovac GT2, Leybold-Heraeus, Köln, Deutschland). Nach dreitägiger Gefrietrocknung wurden die Proben anschließend auf eine Partikelgröße von 0,25 mm gemahlen (Retsch ZM 100, Retsch, Haan, Germany).

2.8.7 Trockenmassebestimmung aus Kot und Digesta

Für die Trockenmassebestimmung wurden die Digestaprobe aus Magen, proximalem und distalem Jejunum und Colon verwendet. Die Kotproben wurden am 5., 9. und 14. Tag nach dem Absetzen genommen. Eine definierte Menge jeder Probe wurde in ein 2 ml-Plastikgefäß abgewogen (Analysewaage, Sartorius BP 1105, Sartorius AG, Deutschland). Die Proben wurden dann drei Tage gefriergetrocknet (Lyovac GT2, Leybold-Heraeus, Deutschland) und zurückgewogen.

2.8.8 Hippursäurebestimmung aus Harn

Die Hippursäurebestimmung aus dem Harn erfolgte am VMDI (Veterinärmedizinisch-Diagnostisches Institut GmbH, Sonnenburger Straße 70, 10437 Berlin, Deutschland) mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC).

2.8.9 Weender Analyse, Aminosäuregehaltbestimmung und Berechnung der scheinbaren praecaecalen und scheinbaren Gesamttraktverdaulichkeit

Anhand der distalen Jejunaligesta wurden mittels Weender Analyse die Rohnährstoffe Rohprotein, Rohfett, Rohfaser, Rohasche sowie Phosphor, Natrium und Kalzium bestimmt und anschließend deren scheinbare praecaecale Verdaulichkeit berechnet. Hierzu wurden die jeweiligen VDLUFA-Methoden verwendet (Naumann 1988).

Des Weiteren wurden die Aminosäuren Asparaginsäure, Threonin, Serin, Glutaminsäure, Glycin, Alanin, Valin, Isoleucin, Leucin, Tyrosin, Phenylalanin, Histidin, Lysin, Arginin und Prolin sowie Methionin und Cystein bestimmt und anschließend deren scheinbare praecaecale

Verdaulichkeit berechnet. Hierzu wurde ebenfalls nach den Angaben der VDLUFA gearbeitet. Die Proben wurden mit 6 N Salzsäure (22 h bei 110 °C) hydrolysiert, und der pH-Wert der Hydrolysate auf pH 2,2 eingestellt. Danach wurden die Aminosäuren in einem Aminosäureanalysator (Typs Biochrom 20 Plus, Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, USA) durch Ionenaustauscher-Chromatographie getrennt und anschließend bestimmt. Im Falle der Bestimmung der Aminosäuren Methionin und Cystein wurde vor der Hydrolyse zusätzlich eine Oxidation (mittels Wasserstoffperoxid, Ameisensäure und Phenol; 24 h bei 0 °C) durchgeführt.

Die Berechnung der Werte für die scheinbare praecaecale Verdaulichkeit erfolgte für die Rohnährstoffe und die Aminosäuren nach folgender Formel, unter Berücksichtigung der Werte der Chromoxidbestimmung:

$$\text{Schein. praecae. Verd. [\%]} = 100 - (\text{Chromoxid}_{\text{Diät}} / \text{Chromoxid}_{\text{Digesta}}) \times (\text{Nährstoff}_{\text{Digesta}} / \text{Nährstoff}_{\text{Diät}}) \times 100$$

Weender Analyse, Aminosäuregehaltbestimmung und Berechnung der scheinbaren Gesamtraktverdaulichkeit

Für diese Untersuchung wurden die gleichen Analysen wie unter 2.8.9 durchgeführt, wobei hierfür allerdings die Kotproben vom Tag der Tötung verwendet wurden.

Zur Berechnung der scheinbaren Gesamtraktverdaulichkeit wurde folgende Formel angewendet:

$$\text{scheinbare Gesamt.verd. [\%]} = 100 - (\text{Chromoxid}_{\text{Diät}} / \text{Chromoxid}_{\text{Kot}}) \times (\text{Nährstoff}_{\text{Kot}} / \text{Nährstoff}_{\text{Diät}}) \times 100$$

2.9 Mikrobiologische Methoden

2.9.1 Bestimmung der Koloniebildenden Einheiten (KbE) von *Escherichia coli*

Um einen Eindruck über *E.coli* Populationen in den einzelnen Darmabschnitten zu gewinnen, wurde direkt nach der Tötung aus dem proximalen und distalem Jejunum sowie aus dem Colon Digesta entnommen und in unterschiedlichen Verdünnungsstufen mittels Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) (siehe Anhang A7) (Jejunum $10^{-1} - 10^{-3}$, Colon $10^{-1} - 10^{-5}$) auf Endoagar (Carl Roth GmbH & Co, Deutschland) ausplattiert und bei 37 °C für 24 h bebrütet. Als putative *E. coli* wurden Kolonien von metallischem Glanz und mit rosa Hof gewertet.

2.10 Molekularbiologische Methoden

2.10.1 DNA- Gewinnung aus Bakterienkolonien für die Multiplex-Polymerase-Kettenreaktion (MPCR)

Eine Liste der verwendeten Chemikalien und Materialien befindet sich im Anhang (**Tabelle A7**).

Es wurden, wenn möglich, je 10 Kolonien pro Endoagarplatte mit einer sterilen Impföse isoliert. Hierfür wurde die Platte mit der geringsten Verdünnungsstufe gewählt, bei der die Kolonien noch deutlich zu unterscheiden waren. Jede Kolonie wurde einzeln mit der Impföse von der Platte gelöst und in ein separates 2 ml-Plastikgefäß, welches mit 1 ml 0,9%iger Natriumchloridlösung befüllt war, überführt. Insgesamt wurden so 415 Isolate gewonnen.

Zur Freisetzung der DNA aus diesen Isolaten, wurden diese mittels Vortexer homogenisiert und dann 2 min. bei 100 °C in einem Heizblock aufgeköcht. Im Anschluss wurden die Proben zentrifugiert (5 min., 13.000 x g), der Überstand abgenommen und in ein neues steriles 2 ml-Plastikgefäß überführt. Die Proben wurden dann bei -80 °C eingefroren.

2.10.2 Extraktion der Gesamt-Nukleinsäuren aus Digesta

Eine Liste der verwendeten Chemikalien und Materialien befindet sich im Anhang (**Tabelle A8**).

Zur Phenol-Chloroform Extraktion wurde das vorher auf -80 °C tiefgefrorene Digestamaterial verwendet. Das Material wurde in einem Wasser-Eisbad aufgetaut. Vom Magen- und Colonmaterial wurde jeweils 1 g verwendet, während bei den Proben aus dem distalen Jejunum mindestens 1,5 g und wenn möglich auch mehr eingesetzt wurde. Jede Probe wurde in ein Szintillationsröhrchen, welches mit 3 g säuregewaschenen, sterilen 0,25 mm Glasperlen bestückt war, eingewogen. Die Proben waren ständig auf Eis zu halten.

Um nun die bakterielle DNA aus dem biologischen Material zu gewinnen, wurde mit einer Zellyse begonnen. Hierbei kam es zu einer mechanischen und chemischen Zerstörung der Zellwände. Auf diese Weise lagen die Nukleinsäuren frei vor. Anschließend erfolgte eine Isolierung und Aufreinigung der Nukleinsäuren.

Lyse der Zellwände

- In die bestückten Szintillationsröhrchen wurden 10 ml 60 °C warme GITC-Lösung gegeben.
- Die Proben wurden gut geschüttelt (Vortexer) und dann ebenfalls für 5 min. in einem 60 °C warmen Wasserbad inkubiert. Alle 60 sec. wurden die Proben kurz geschüttelt (Vortexer).
- Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Proben wieder auf Eis gestellt.
- Die Proben wurden darauf in der Retschmühle bei maximaler Frequenz (2000/min) für 2 min. geschüttelt.
- Danach wurden die Proben sofort wieder auf Eis gestellt und 1 min. gewartet, bis sich noch verbliebene größere Partikel am Grund abgesetzt hatten.
- Der Überstand wurde vorsichtig in ein autoklaviertes Oak-Ridge®-Zentrifugenröhrchen dekantiert.
- Der verbleibende Rest im Szintillationsröhrchen, wurde abermals mit 7 ml 60 °C GITC-Lösung versetzt und für 5 min. im 60 °C warmen Wasserbad inkubiert.
- Nach diesem Arbeitsschritt wurden die Proben erneut in der Retschmühle für 2 min. bei maximaler Frequenz geschüttelt.
- Die Proben wurden wieder auf Eis gestellt und nach 1 min. wurde der gesamte Inhalt der Szintillationsröhrchen in die entsprechenden Oak-Ridge®-Zentrifugenröhrchen überführt.

Nukleinsäureextraktion

- Zur Heraustrennung der Nukleinsäure aus dem proteinhaltigen Zellysat erfolgten die folgenden Arbeitsschritte:
- Die mit den Proben gefüllten Oak-Ridge®-Zentrifugenröhrchen wurden ebenfalls auf Eis gehalten.
- Zu jeder Probe wurden 20 ml Phenol/Chloroform (pH 8) gegeben.
- Die Probenröhrchen wurden geschwenkt und dann bei 4 °C, 18.000 x g, für 5 min. mit ausgesetzter Bremse zentrifugiert.
- Die obige wässrige Phase wurde darauf mit einer sterilen Spritze in ein neues steriles Oak-Ridge®-Zentrifugenröhrchen überführt.
- Zu der wässrigen Phase wurde sodann die gleiche Menge Chloroform/Isoamylalkohol gegeben. Dies diente der Entfernung der Phenol/Chloroformreste aus dem Nukleinsäure-Extrakt.

- Die Röhren wurden geschüttelt und für 5 min., bei 4 °C bei 18.000 x g und ausgestellter Bremse zentrifugiert.
- Die obige wässrige Phase wurde mit einer sterilen Spritze in ein neues steriles Oak-Ridge®-Zentrifugenröhrchen überführt.
- Zum Aufkonzentrieren und Fällen der DNA wurde dann das gleiche Volumen an eiskaltem Isopropanol zugegeben.
- Die Zentrifugenröhrchen wurden kurz geschüttelt und über Nacht bei -30 °C gelagert.

Abtrennung des DNA-Rohextrakts

- Die Zentrifugenröhrchen wurden bei 4 °C, 25.000 x g bei ausgestellter Bremse 30 min. zentrifugiert.
- Der Überstand wurde vorsichtig vom entstandenen Pellet dekantiert.
- Dann wurden 40 ml 70% eiskalter Ethanol zugegeben.
- Die Zentrifugenröhrchen wurden darauf wieder bei 4 °C, 25.000 x g bei ausgestellter Bremse 30 min. zentrifugiert.
- Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert und die Zentrifugenröhrchen über Kopf für 10 min. zum Trocknen aufgestellt.
- Danach wurde das Pellet mit einer sterilen Pipettenspitze vorsichtig aus dem Zentrifugenröhrchen herausgelöst und in ein steriles 2 ml-Plastikgefäß überführt.
- In dieses wurde sodann, auf das Pellet, 1000 µl T1 -Puffer (MACHERY-NAGEL Nucleo-Spin® Tissue T1) gegeben.
- Die Proben (Rohextrakte) wurden gut geschüttelt (Vortexer) und dann bei -80 °C eingefroren.

Reinigung des DNA-Rohextrakts

- Die Reinigung der DNA erfolgte auf Siliziumsäulen des MACHERY-NAGEL Nucleo-Spin® Tissue Kit.
- Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.
- Die gereinigten DNA-Extrakte wurden bei – 80 °C gelagert.

2.10.3 Extraktion der Gesamt-Nukleinsäuren aus Kot

Die Kotproben wurden nicht wie die Digestaproben mit der Phenol-Chloroform-Extraktion behandelt, sondern es erfolgte nur die Aufreinigung mit dem MACHERY-NAGEL Nucleo-Spin® Tissue Kit. Dafür wurde der Kot homogenisiert und 100 mg für die Aufreinigung

entnommen. Da der Hersteller für die DNA-Aufreinigung, von nur 25 mg Ursprungsgewebe ausgeht, mussten die Arbeitsschritte Prelyse, Lyse und Abgleichen der DNA-Bindungsgegebenheiten mit der vierfachen Menge an Reagenzlösungen stattfinden.

Nachdem die DNA auf der Säule gebunden wurde, konnte die weitere Aufreinigung wie vom Hersteller angegeben, fortgesetzt werden.

Die gereinigten DNA-Extrakte wurden bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.10.4 Messung des Gesamt-DNA-Gehaltes

Eine Auflistung der verwendeten Chemikalien und Materialien befindet sich im Anhang (**Tabelle A9**).

Nach Verdünnung des 10 x TNE-Puffers (siehe Anhang A10) auf 1 x TNE-Puffer, wurden damit die weiteren Lösungen hergestellt (siehe Anhang A10).

Zur Erstellung einer Kalibrierreihe wurden die folgenden DNA-Konzentrationen mittels der Standard-DNA-Lösung hergestellt: 1500 ng/ml, 1000 ng/ml, 500 ng/ml, 250 ng/ml, 125 ng/ml und 0 ng/ml (als Referenz = 1x TNE).

Für die Messung am NanoDrop®-Gerät wurde zuvor die jeweilige Probe in einer Mikrotiterplatte 1:1 mit Hoechst-Arbeitslösung verdünnt und gut durchmischt.

2 μl dieses Gemisches wurden dann vorsichtig auf die vorher gereinigte Plattform gegeben, der Arm geschlossen und die Messung vorgenommen. Nach der Messung der Kalibrierreihe, wurden die DNA-Extrakte ebenfalls 1:1 mit der Arbeitslösung verdünnt, gut durchmischt und mit dem NanoDrop®-Gerät der DNA-Gehalt (ng/ml) gemessen.

2.10.5 Untersuchung auf das Vorkommen pathogener *E.coli* mittels MPCR

Eine Auflistung der verwendeten Chemikalien und Materialien befindet sich im Anhang (**Tabelle A10**).

Als Probenmaterial wurde die DNA aus dem proximalen und distalen Jejunum, sowie aus dem Colon verwendet, die zuvor aus Bakterienkolonien isoliert wurde. Als Laufweitenstandard wurden vier *E.coli*- Stämme aus der Stammsammlung des Institutes für Tierernährung mit folgenden Pathogenitätsfaktoren verwendet:

- *E.coli* 0138:K81, positiv für *stx2e*, *est-Ib*, *est II*, *fedA*
(Stammsammlung Institut für Tierernährung *E.coli* Nr. PS7)
- *E.coli* 0147:K89:K88, positiv für *fae*, *est-II*, *elt-Ia*
(Stammsammlung Institut für Tierernährung *E.coli* Nr. PS79)
- *E.coli* CS2011, positiv für *fas*, *est-Ib*, *est-II*
(Stammsammlung Institut für Tierernährung *E.coli* Nr. PS90)
- *E.coli* 09:K35:K99, positiv für *fan*, *est-Ib*, *est-II*, *fedA*, *fimf41A*
(Stammsammlung für Tierernährung *E.coli* Nr. PS37)

Tabelle 6: Primersequenzen für pathogene *E.coli* (Bosworth und Casey 1997)

Pathogenitätsgen	Primersequenz (5' → 3')	Produktgröße, bp
<i>est-II</i> (STb)- Gen, hitze stabiles Enterotoxin II	TGCCTATGCATCTACACAAT CTCCAGCAGTACCATCTCTA	113
<i>est-Ib</i> (StaP)-Gen, hitze stabiles Enterotoxin I	CAACTGAATCACTTGACTCTT TAATAACATCCAGCACAGG	158
<i>fan</i> (F5/K99)- Gen, Fimbrium A und B	AATACTTGTTTCAGGGAGAAA AACTTTGTGGTTAACTTCCT	230
<i>elt-IA</i> (LT)-Gen, hitze labiles Enterotoxin A	GGCGTTACTATCCTCTCTAT TGGTCTCGGTCAGATATGT	272
<i>FedA</i> (F18)-Gen, Fimbrium F107	TGGTAACGTATCAGCAACTA ACTTACAGTGCTATTCGACG	313
<i>fas</i> (F6/987P)-Gen, Fimbrium (Fas-G Protein)	GTA ACTCCACCGTTTGTATC AAGTTACTGCCAGTCTATGC	409
<i>fae</i> (F4/K88)- Gen, Fimbrium	GTTGGTACAGGTCTTAATGG GAATCTGTCCGAGAATATCA	499
<i>fimf41a</i> (F41)- Gen, Adhesin	AGTATCTGGTTCAGTGATGG CCACTATAAGAGGTTGAAGC	612
<i>stx2e</i> (SLT)- Gen, SLT IIe Toxin	AATAGTATACGGACAGCGAT TCTGACATTCTGGTTGACTC	733

Die Synthese der Primer erfolgte durch die Firma MWG Biotech AG, Ebersberg, Deutschland. Die Primer wurden als äquimolarer Mix (je Primer 2 pmol/μl) in den Mastermix eingebracht.

Als so genannte Negativkontrolle wurde der *E.coli*-Stamm DSM 2840 (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) verwendet, da dieser negativ für die oben genannten Pathogenitätsfaktoren ist.

Um ausreichend DNA-Material aus den genannten *E.coli*-Stämmen zu gewinnen, wurden diese zuerst auf Endoagarplatten angezüchtet (24 h bei 37 °C). Das Koloniematerial wurde

mittels einer Impföse von der jeweiligen Platte genommen und in ein 1,5 ml- Plastikgefäß, welches mit 1 ml 0,9 %iger Natriumchloridlösung befüllt war, überführt. Zur Gewinnung der DNA wurden die Isolate mittels Vortexer homogenisiert und dann 2 min. bei 100 °C in einem Heizblock aufgeköcht. Im Anschluss wurden die Proben zentrifugiert (5 min., 13.000 x g), der Überstand abgenommen und in ein neues steriles 2 ml- Plastikgefäß überführt.

2.10.5.1 Untersuchung des Darminhalts auf das Vorkommen neun schweinetypischer Pathogenitätsgene von *E.coli*

Nach einer bereits etablierten Methode (Göbel 2003) wurde mittels der Multiplex-Polymerase-Kettenreaktion (MPCR) der Darminhalt der Versuchstiere auf das Vorhandensein von neun schweinetypischen Pathogenitätsfaktoren von *E.coli* untersucht.

Verwendet wurde das Qiagen Multiplex PCR Kit, in dem enthalten war: HotStar Taq® DNA-Polymerase, Multiplex PCR-Buffer (6 mM MgCl₂) und dNTP-Mix (für 50 Reaktionsansätze).

Mastermix (für je 30 µl Ansatz)

15 µl 2x Qiagen Multiplex PCR Master Mix

3 µl Primer Mix (forward) (2 pmol/µl je Primer)

3 µl Primer Mix (reverse) (2 pmol/µl je Primer)

9 µl RNase freies Wasser

1 µl Ziel-DNA

Ein PCR-Ansatz wurde als Kontaminationskontrolle, statt mit Ziel-DNA mit 1 µl RNase freiem Wasser versetzt.

Tabelle 7: PCR-Programm für *E.coli*-MPCR (touchdown PCR)

Wiederholungen	Zeit	Temperatur in °C
1 x	900 sec.	95
10 x	30 sec.	94
	90 sec.	60 (- 0,5 je Zyklus)
	90 sec.	72
30 x	30 sec.	94
	90 sec	72
1 x	600 sec.	72
1 x	hold	4

2.10.5.2 Agarose-Gelelektrophorese zur Sichtbarmachung der MPCR-Ergebnisse

Verwendet wurden 2,5%ige Agarosegele, die aus niedrig schmelzender Agarose (50-1500 bp Auflösung) und 1 x TAE (siehe Anhang A11) durch Lösen und Erhitzen hergestellt wurden. Vor dem Gießen des Gels wurde der Lösung Sybr®green I nucleic acid gel stain, in einer Konzentration von 10 µl/100 ml zugesetzt.

Das Ergebnis wurde mittels einer CCD-Kamera mit gekoppeltem UV-Filter und eines UV-Durchlichttisches (312 nm) dokumentiert.

Anhand der DNA-Marker und der DNA-Proben aus den vier *E.coli*- Stämmen mit bekannten Pathogenitätsfaktoren, konnte jede Probe qualitativ auf das Vorhandensein von Pathogenitätsgenen untersucht werden.

2.10.6 Untersuchung der mikrobiellen Diversität mittels der Denaturierenden Gradientengelelektrophorese (DGGE)

Eine Liste der verwendeten Materialien und Chemikalien befindet sich im Anhang (**Tabelle A11**).

Die der DGGE zugrunde liegende Technik der Auftrennung wurde erstmals von Fischer und Lerman (1983) beschrieben.

Die molekularbiologische Methode der Denaturierenden Gradientengelelektrophorese ist seit einiger Zeit eine beliebte Methode, um Unterschiede in intestinalen Bakteriengemeinschaften festzustellen (Muyzer 1993). Die doppelsträngigen 16S rDNA-Fragmente werden dabei einem zunehmenden denaturierenden Milieu ausgesetzt und denaturieren bzw. schmelzen in diskreten Banden, den so genannten „Schmelzdomänen“ (melting domains), auf. Die Schmelztemperatur T_m dieser Domänen ist sequenzabhängig und spezifisch für eine Sequenz. Wird die T_m der niedrigsten Schmelzdomäne erreicht, schmilzt die DNA partiell auf und bildet dann ein verzweigtes Molekül. Diese Struktur verringert nun die Mobilität der DNA im Gel. Da die T_m einer bestimmten Schmelzdomäne sequenzspezifisch ist, ändert eine Mutation verglichen mit dem Wildtyp das Schmelzprofil der DNA.

Diese spezielle Form der Denaturierung wird durch einen steigenden Gradienten im Gel, bestehend aus Harnstoff und Formamid, in Zusammenhang mit einer Lauftemperatur von 60 °C ermöglicht. Eine optimale Auflösung erzielt man, wenn die Moleküle nicht vollständig denaturieren und die zu untersuchende Region in der niedrigsten Schmelzdomäne liegt. Dies erreicht man durch den Anhang einer 30-40 bp langen Sequenz sich wiederholender GC-Nukleotide (GC-clamp) an einem der Primer (Nübel 1996).

Polymerase-Kettenreaktion (PCR) für DGGE

Um die bakteriellen 16S rRNA-Genfragmente zu vervielfältigen, wurden die folgenden Primer (Nübel 1996), in einer Konzentration von 4 pmol/μl verwendet.

Primer	Sequenz 5'→3'
F-968-GC	CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCG GGGGCACGGGGGGAACGCGAAGAACCTTAC
R-1401	GCGTGTGTACAAGACCC

Für die Herstellung eines PCR-Mastermixansatzes wurde das HotStar Taq MasterMix Kit verwendet.

Master Mix (für je 30 μl Ansatz)

- 15 μl HotStar Taq Master Mix
- 2 μl Primer F-968-GC (4 pmol/μl)
- 2 μl Primer R-1401 (4 pmol/μl)
- 11 μl RNase freies Wasser
- 1 μl DNA-Extrakt

Ein PCR-Ansatz wurde als Kontaminationskontrolle, statt mit DNA-Extrakt mit 1 μl RNase freiem Wasser versetzt. Als Standard diente eine DNA-Sammelprobe (je 1 μl) aus dem jeweiligen Darmabschnitt bzw. der Gesamt-Kotproben eines Tages.

Tabelle 8: PCR-Programm für die DGGE

Wiederholungen	Zeit	Temperatur in °C
1x	15 min.	95
	60 sec.	94
21x	90 sec.	65
	90 sec.	72
	60 sec.	94
14x	90 sec.	58
	90 sec.	72
1x	10 min.	72
1x	hold	4

DGGE- Lauf

Es wurde eine Elektrophoreseapparatur der Firma Ingeny International BV verwendet. Der Elektrophoresetank wurde mit 1xTAE-Puffer befüllt und bei 60 °C vorgeheizt.

Fertigstellung des Gels:

Die PAG-Gradientengele führten einen Gradienten von 30 -55% Harnstoff (siehe Anhang A12). Für das Herstellungsschema der Gelgradienten siehe Anhang **Tabelle A12**.

Das Gel wurde mittels einer Pumpe und eines Gradientenmischers im Gießstand gegossen und ein Kamm mit 48 Taschen eingesetzt. Nach der vollständigen Polymerisation des Gels wurde der gesamte Gießstand in den Elektrophoresetank gestellt. 10 µl jedes PCR-Produktes wurden in einer Mikrotiterplatte mit je 3 µl eines Auftragspuffers gemischt und anschließend vorsichtig in die Geltschen pipettiert. Nach dem Beladen des Gels wurde die Elektrophorese-Kammer des INGENYphorU-2-System auf „High Voltage“ eingestellt und 10 min. bei 200 V laufen gelassen. Danach lief die Elektrophorese bei konstanter Spannung von 100 V und einer Temperatur von 60 °C im abgedunkelten Raum für 17 Stunden.

Färbung des Polyacrylamidgels

Die Stromquelle wurde ausgestellt und das Gel vorsichtig entnommen. In mehreren Arbeitsschritten wurden die Spuren auf dem Gel mittels einer Silberfärbelösung sichtbar gemacht. Das Gel wurde fixiert und durch eine mit Glycerin versetzte Aufbewahrungslösung haltbar gemacht. Alle Arbeitsschritte des Färbens wurden unter ständigem leichtem Schütteln mittels eines Schüttlers durchgeführt. Das fertig gefärbte Gel wurde dann vorsichtig und unter Ausschluss von Luftblasen mit Cellophan eingepackt.

Densitometrische Auswertung des Gels

Die Auswertung der Gele erfolgte mit dem Programm Phoretix 1D v2003.02. Das Programm beruht auf der densitometrischen quantitativen Analyse des Gel-Bilds bzw. 16S rDNA-Fingerabdrücke der untersuchten Proben. Als erstes wurden alle Gele mit der Auflösung 400 dpi (Grau-Stufen) gescannt und im TIFF-Format als Datei auf einem Computer gespeichert.

Statistische Auswertung des Gels

Die Auswertung des Gelbildes beruht auf einer densitometrischen Analyse. Bei der Densitometrie handelt es sich um die quantitative Messung der Farbdichte, das heißt der Farbmenge pro Flächeneinheit.

Das Programm Phoretix 1D, untersucht jede einzelne Bande einer jeden Spur auf Farbintensität, Breite und Laufweite im Gel.

- Rf-Wert = Die Laufweite einer Bande im Gel wird durch den Retardation Faktor (Rf- Wert) definiert. Dieser ergibt sich durch die Division der Laufweite der Bande durch die Laufweite der gesamten Spur.
- Volumen = Farbintensität (in Pixel) aus denen jede Bande einer Spur besteht.

Jede Spur wurde untersucht auf:

- Richness = Anzahl der detektierten Banden in einer Spur
- Band Percentage = Prozentanteil des Volumens der einzelnen Bande an dem Gesamtvolumen aller detektierten Banden einer Spur.

Alle Analyseschritte können bei Phoretix 1D vom Benutzer überprüft und eventuell manuell korrigiert werden. Die auf diese Weise durchgeführte Datenanalyse wurde abschließend in einer tabellarischen Übersicht zusammengefasst, um weiter in Excel bearbeitet zu werden.

Berechnung ökologischer Indizes zur Untersuchung der Ähnlichkeit zwischen den Proben

Für die Bewertung der Biodiversität (Artenvielfalt) eines Ökosystems werden seit Jahrzehnten verschiedenste mathematische Verfahren angewendet. Bisher gibt es keine universelle Methodologie, die alle Aspekte der Biodiversität berücksichtigt (Lévêque 2004).

Der Einfachheit halber werden Biodiversitätsmaße verwendet, die die Artenvielfalt eines Ökosystems durch eine einzige Zahl („Index“) charakterisieren.

Zur Untersuchung des Einflusses der organischen Säuren im Futtermittel auf die Bakteriengemeinschaft im Verdauungstrakt der Versuchstiere, wurden die durch die DGGE ermittelten 16S rDNA Fingerabdrücke durch folgende Parameter beschrieben:

- Diversitäts- Indizes: Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaft der Versuchstiere
- Ähnlichkeits-Indizes: Gleichheit der Bakteriengemeinschaft der Versuchstiere

Diversitätsindizes:

- a) Richness: Beschreibt die Anzahl der unterschiedlichen Arten. In der hier vorliegenden Untersuchung ist Richness die Anzahl der detektierten Banden einer Spur.
- b) Simpson-Index (D): Er drückt die Wahrscheinlichkeit aus, dass zwei aus allen Individuen einer Aufnahme zufällig ausgewählte Individuen der gleichen Art

angehören. Dazu werden die Wahrscheinlichkeiten, eine bestimmte Art i auszuwählen und diese Art nochmals auszuwählen, wobei das erste Individuum nicht mehr zur Wahl steht, multipliziert und anschließend dieses Produkt für alle Arten summiert.

Der Simpson-Index D wird also wie folgt berechnet:

$$D = \sum n_i(n_i-1) / N(N-1)$$

n_i = Individuenzahl der Art i (*Phoretix-Daten*: Volumen einer einzelnen Bande in einer Spur)

N = Gesamtindividuenzahl (*Phoretix-Daten*: Gesamtvolumen aller Banden einer Spur)

Für alle Untersuchungen dieser Art ergibt sich daher das Fazit, dass je höher der prozentuale Anteil einer bestimmten Bakterienart an der Gesamtbakterienpopulation, desto höher wird der Simpson-Index und dementsprechend niedriger ist dann die Diversität.

- c) Shannon-Index (H'): Er beschreibt die Vielfalt betrachteter Daten und berücksichtigt dabei sowohl die Anzahl unterschiedlicher Datenkategorien (z.B. die Artenzahl), als auch die Abundanz (Anzahl der Individuen je Art) (Kwak 2004).

Der Shannon-Index (H') wird wie folgt berechnet:

$$H' = - \sum_{i=1}^s p_i \cdot \ln p_i$$

$$p_i = n_i/N$$

s = Gesamtzahl der Arten (*Phoretix-Daten*: Anzahl der detektierten Banden pro Spur)

p_i = Wahrscheinlichkeit des Auftretens der Art i oder relative Häufigkeit der i -ten Art in der Gesamtindividuenzahl, gemessen von 0,0 bis 1,0 (*Phoretix-Daten*: *Band Percentage*)

N = Gesamtindividuenzahl

n_i = Individuen der Art i

Eine maximale Diversität nach dem Shannon-Index wäre gegeben, wenn in einer s Arten enthaltenden Gemeinschaft alle Arten im gleichen quantitativen Verhältnis vorhanden sind (Untersteiner 2005).

- d) Evenness (E): Da bei einem Vergleich verschiedener Ökosysteme der Diversitätsindex allein nicht erkennen lässt, ob sein Wert aufgrund einer hohen Artenzahl mit jeweils unterschiedlicher Individuenzahl oder durch gleichmäßige Verteilung der Individuen auf wenig Arten entstanden ist, benutzt man als

Vergleichsmaß die berechnete Evenness. Man setzt den Diversitätswert in Relation zu dem maximal möglichen Diversitätswert, der sich bei gleicher Artenzahl, aber unter größtmöglicher Gleichverteilung der Individuen auf die bestehenden Arten ergeben würde.

$E = \text{berechneter Diversitätswert} / \text{maximaler Diversitätswert}$

E wird wie folgt berechnet:

$$E_s = H' / H_{\max.} = H' / \ln S$$

H' = Shannon-Index

S = Gesamtzahl der Arten (*Phoretix-Daten*: Anzahl der detektierten Banden pro Lane (16S rDNA-Spezies))

Fazit: Je ungleicher die einzelnen Bakterienspezies in der Population verteilt sind, desto niedriger wird der E-Wert (von 0,0 bis 1,0) und desto inhomogener die Struktur des betrachteten Systems.

Ähnlichkeits-Index:

- a) Sørensen-Quotient (QS): Er dient dem einfachen Vergleich von Artengemeinschaften und berücksichtigt die Anzahl der gemeinsam in zwei Habitaten vorkommenden Arten und die jeweilige Anzahl der Arten in den zu vergleichenden Habitaten.

Er wird wie folgt berechnet:

$$QS (\%) = 2G \times 100 / S_A + S_B$$

G = Zahl der in beiden Habitaten gemeinsam vorkommenden Arten (*Phoretix-Daten*: Zahl der in beiden Habitaten vorkommenden Banden, die die gleichen Rf-Werte haben)

S_A, S_B = Zahl der Arten in Habitat A bzw. B (*Phoretix-Daten*: Anzahl der Banden pro Spur)

Fazit: Der Sørensen-Quotient liegt zwischen 0% und 100%. Je höher der Quotient, desto größer ist die Ähnlichkeit in der Artenzusammensetzung.

2.10.7 Quantitative Realtime PCR

Eine Liste der verwendeten Chemikalien und Materialien befindet sich im Anhang (**Tabelle A13**).

Bei der Realtime-PCR wird, im Gegensatz zur konventionellen PCR, die Anzahl der entstandenen PCR-Produkte nach jedem Zyklus gemessen. Die Messung erfolgt mittels

fluoreszierenden Farbstoffs, der sich an doppelsträngige DNA anlagert, bzw. durch Sonden die im hybridisierten Zustand fluoreszieren.

Die einfachste Möglichkeit für die Fluoreszenzmessung sind interkalierende Farbstoffe wie SYBR-Green. Diese lagern sich in doppelsträngige DNA ein (interkalieren). Das bedeutet, dass bei Zunahme der Ziel-DNA es ebenfalls zur Zunahme der Fluoreszenz von Zyklus zu Zyklus kommt. Der Nachteil liegt bei SYBR-Green® in einer geringen Spezifität. Es ist also keine Unterscheidung zwischen verschiedenen PCR-Produkten möglich.

Im Gegensatz dazu werden mit fluoreszenzmarkierten DNA-Sonden Signale erzeugt, die auf der sequenzspezifischen Bindung an die Ziel-DNA beruhen.

In beiden Detektionsverfahren wird eine Mindestmenge DNA benötigt, bevor ein Signal vor dem Hintergrundsignal detektiert werden kann. Das benötigte Signal wird mit etwa 10^{10} - 10^{11} Kopien erreicht. Sobald diese Anzahl DNA-Moleküle überschritten wird, kann entsprechend der PCR-Kinetik ein exponentieller Anstieg des Signals beobachtet werden (exponentielle Phase).

Am Ende des gesamten Laufs, der aus mehreren Zyklen besteht, wird anhand von erhaltenen Fluoreszenzsignalen die Quantifizierung in der linearen Phase der PCR vorgenommen, da hier die Reaktionsbedingungen optimal sind und die Fluoreszenz proportional zum Amplikon ansteigt.

Durchführung der Real-Time PCR

Um eine quantitative Aussage über verschiedene Bakteriengruppen machen zu können, wurden die DNA-Extrakte aus Magen, Jejunum und Colon der Versuchstiere auf Eubakterien (Gesamtbakterienzahl: erfasst alle Bakterien, außer Archaeobakterien), *Escherichia spp.* und *Lactobacillus spp.* untersucht.

Zusätzlich wurden diese Darmabschnitte auf die Pathogenitätsgene *est-II* und *elt-IA* von *E.coli* untersucht.

Für die Untersuchung der *Lactobacillus spp.* sowie die Untersuchung auf *est-II* und *elt-IA* wurde der Stratagene Brilliant SYBRGreen 2x Mastermix verwendet.

Um die Fluoreszenzmessung im Reaktionsansatz vom Volumen unabhängig zu machen und störende Fluktuationen der Fluoreszenz während der Reaktion auszugleichen, wurde zu jedem PCR-Ansatz auch ein passiver Referenzfarbstoff ROX (6-carboxy-X-Rhodamine) in der Konzentration von 30 nM (1:500 der Originallösung) zugegeben.

Die Zusammenstellung des Mastermix erfolgte nach folgenden Rechnungen:

Mastermix für *Lactobacillus ssp. est-II* und *elt-IA* (25 µl Ansatz):

- 2 x Mastermix (Gesamtvolumen/2)
- Primer 1 (10 µM) (Gesamtvolumen /50 = 0,2 µM)
- Primer 2 (10 µM) (Gesamtvolumen /50 = 0,2 µM)
- ROX (1:500) (Gesamtvolumen x 0,015 = 30 nM)
- Reinstwasser (Gesamtvolumen- [Summe aller Komponenten])
- 1 µl des jeweiligen DNA-Extrakts

Um Eubakterien und *Escherichia spp.* quantitativ zu bestimmen, wurde der HotStarTaq Master Mix von QIAGEN mit den entsprechenden Sonden verwendet. Für die Detektion bakterieller Gruppen einschließlich der gesamt bakteriellen Zellzahl war das Zielgen das bakterielle 16S rDNA-Gen.

Mastermix für Eubakterien und *Escherichia spp.* (25 µl Ansatz):

- 12,5 µl 2x MasterMix (Qiagen, HotStarTaq)
- 1 µl Sonde 2 µM
- 1 µl Primer 1 (f) (10 µM) Endkonzentration 400 nM
- 1 µl Primer (r) (10 µM) Endkonzentration 400 nM
- 0,75 µl ROX (1:500)
- 8,75 µl Reinstwasser
- 1 µl jeweiliges DNA-Extrakt

Tabelle 9: Gruppen und speziesspezifische Oligonukleotide für Detektion der ausgewählten Bakterienarten- und gruppen

Detektierte Bakterien	Primer/Sonde	Primer-, SONDENSEQUENZ (5'→3')	Produktgröße, bp
Eubakterien	785 (f)	GGATTAGATACCCTGGTAGTC	727
	1512 (r)	TACCTTGTTACGACT T	
	T-1400 (r)	TGACGGGCGGTGTGTACAAGGC	
<i>Escherichia spp.</i>	Entero (f)	GTTAATACCTTTGCTCATTGA	340
	Entero (r)	ACCAGGGTATCTAATCCTGTT	
	Entero FAM	CGTGCCAGCAGCCGCGGTA	
<i>Lactobacillus spp.</i>	Lac1 (f)	AGCAGTAGGGAATCTTCCA	340
	Lac2 (r)	ATT(CT)CACCGCTA ACATG	
<i>est-II</i>	est-II1 est-II2	TGCCTATGCATCTACACAAT CTCCAGCAGTACCATATATA	113
<i>elt-IA</i>	elt-IA1 elt-IA2	GGCGTFACTATCCTCTCTAT TGGTCTCGGTCAGATATG	158

Die Synthese der Primer erfolgte durch die Firma MWG Biotech AG, Ebersberg, Deutschland.

Zur Amplifikation wurden Reaktionsansätze zu je 25 µl in Real-Time PCR-Gefäße gegeben. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1,0 µl des untersuchten DNA-Extrakts. Als Quantifizierungsstandard wurden DNA-Extrakte aus mit Referenzstämmen (siehe Anhang **Tabelle A14**) beimpften, sterilen Sauenkotproben verwendet, um die Spezifität und Sensitivität der ausgewählten Primer zu beurteilen. Zusätzlich wurde bei jedem Real-Time PCR-Lauf eine „Nullprobe“, die statt DNA nur Reinstwasser enthielt, zur Kontrolle mitanalysiert. Als Standard-Amplifikationprotokoll wurde das in **Tabelle 10** dokumentierte Temperaturprogramm verwendet:

Tabelle 10: Standard-Temperaturprogramm der Real-Time PCR

Phase	Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
Initialisation	95 °C	15 min.	x1
Denaturierung	95 °C	15 sec.	
Anlagerung	55-60 °C	30-60 sec.	x40
Elongation	72 °C	30-60 sec.	

Erstellung einer Kalibrierreihe zur Quantifizierung von Real-Time PCR Assays (est-II und elt-IA)

Eine Auflistung der verwendeten Chemikalien und Materialien befindet sich im Anhang (**Tabelle A15**).

Um die Real-Time PCR auf ihre Spezifikation zu testen, musste vorab für die *E.coli* Pathogenitätsfaktoren *est-II* und *elt-IA* eine Kalibrierreihe erstellt werden.

Um eine Vergleichbarkeit zu den vorliegenden Proben zu schaffen, wurde als Grundlage autoklavierter (121 °C, 20 min.) Sauenkot verwendet. Dieser wurde mit einer bekannten Menge an Zellen, der zuvor angezüchteten Bakterienstämme *E.coli* Nr. PS37 und Nr. PS79 (Stammsammlung Institut für Tierernährung) beimpft, da bei diesen Bakterienstämmen bekannt ist, dass sie die gefragten Pathogenitätsgene aufweisen.

Für die Anzucht wurde BHI-Medium in einem 10 ml-Plastikröhrchen verwendet, in das jeweils eine Kryokugel mit dem daran haftenden Bakterienstamm gegeben wurde. Die Plastikröhrchen wurden über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Nach der Inkubationszeit wurden die Röhren zentrifugiert (10 min., 3000 x g) und der Überstand dekantiert. Das entstandene Pellet wurde in 1 ml PBS (siehe Anhang A14) aufgenommen. Mittels der Thoma-Zählkammer wurde die Anzahl der Bakterien pro ml Suspension ermittelt. Als Ausgangskonzentration wurden die Bakteriensuspensionen auf eine Konzentration von 5×10^8 Zellen/ml eingestellt. Die beiden Stammlösungen wurden zu einer vereinigt, aus der dann eine dekadische Verdünnungsreihe erstellt wurde ($5 \times 10^8 / 5 \times 10^7 / 5 \times 10^6 / 5 \times 10^5 / 5 \times 10^4 / 5 \times 10^3 / 5 \times 10^2 / 5 \times 10^1 / 5 \times 10^0$ Zellen/ml).

Autoklavierter Sauenkot (5 g) wurde mit jeder Verdünnungsstufe (500 µl) beimpft und anschließend homogenisiert. Mit diesen Proben wurde dann eine DNA-Extraktion durchgeführt. Die Extrakte wurden dann bei -80°C gelagert und als Kalibrierreihe für die *E.coli* Pathogenitätsgene *est-II* und *elt-IA* verwendet.

Auswertung der Real-Time PCR

Die Auswertung der Real-Time PCR erfolgte über die ermittelten Fluoreszenzdaten. Anhand der gemessenen Standards berechnet das MxPro-Programm eine Eichgrade. Zur Ermittlung des Gehalts an amplifizierter DNA jeder Probe wurden alle erfassten Fluoreszenzdaten aus der linearen Amplifikationsphase durch die Eichgrade bestimmt.

2.11 Datenverarbeitung und statistische Untersuchungen

Die statistischen Auswertungen und die graphischen Darstellungen wurden mit der Software SPSS 15.0 für Windows (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) erstellt.

Die Versuchsergebnisse für die einzelnen Parameter wurden auf ihre Normalverteilung getestet. Hierfür wurde der nicht-parametrische Kolmogorow-Smirnow-Test mit Signifikanzkorrektur nach Lilliefors verwendet (Werte gelten als normalverteilt, wenn $p \leq 0,05$). Im Falle der Bestätigung der Normalverteilung wurden die Werte als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt. Um die Daten auf Signifikanzen hin zu untersuchen, wurde bei normalverteilten Werten eine One-Way-ANOVA (analysis of variance) mit Post Hoc-Test Bonferroni durchgeführt. Als signifikant unterschiedlich galten Werte $p \leq 0,05$, während Werte $p \leq 0,1$ als tendenziell unterschiedlich angesehen wurden.

Werte die nicht normalverteilt waren, wurden als Median mit Minimum- und Maximumangabe dargestellt. Um diese Daten auf Signifikanzen zu untersuchen, wurde der nicht-parametrische Kruskal-Wallis-Test verwendet. Dieser Test vergleicht alle vier Gruppen untereinander. Ergab der Kruskal-Wallis-Test einen p-Wert $\leq 0,05$, so wurden alle vier

Gruppen nacheinander mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney-U-Test untersucht. Als Ergebnis wurden p-Werte $\leq 0,05$ als signifikant unterschiedlich bewertet, p-Werte $\leq 0,1$ dagegen als tendenziell unterschiedlich.

Die graphische Darstellung der ökologischen Indizes (DGGE-Ergebnisse aus dem Kot), erfolgte als Mittelwerte die durch Linien miteinander verbunden wurden, um den Zeitverlauf vom 5. bis zum 14. Tag nach dem Absetzen darzustellen.

3. Ergebnisse

3.1. Zootechnische Leistungsdaten

Um Effekte der verschiedenen Futterdiäten auf die zootechnische Leistung von Absetzferkeln zu untersuchen, wurde neben dem mikrobiologischen Versuch ein räumlich getrennter Leistungsversuch mit 56 Tieren durchgeführt. In der folgenden Tabelle **11** sind die Ergebnisse als Mittelwert mit Standardabweichung für die einzelnen Versuchswochen aus diesem Leistungsversuch aufgeführt.

In Tabelle **12** sind die Leistungsdaten periodisch für die einzelnen Wochen zusammengefasst, um den relativen Futteraufwand zu bestimmen.

Tabelle 11: Effekte von Ameisensäure und Benzoesäure einzeln oder in Kombination auf die zootechnischen Leistungen bei abgesetzten Saugferkeln im Altersabschnitt 23. bis 64. Lebenstag aus dem Leistungsversuch (Angaben je Tier)

Versuchsgruppe		Kontrolle	Ameisensäure	Benzoesäure	Kombination
Ameisensäure	[g/kg]	0	5	0	0
Benzoesäure	[g/kg]	0	0	5	0
Kombinationspräparat	[g/kg]	0	0	0	6,9
Ferkelzahl	n	14	14	14	14
Anzahl d. Wdh.	n	7	7	7	7
1. Versuchswoche		(23. - 29. Lebenstag)			
Lebendmasse	[kg]				
Beginn		7,37 ± 0,52	7,29 ± 1,14	7,25 ± 1,16	7,15 ± 1,30
Ende		8,60 ± 0,65	8,76 ± 1,24	8,49 ± 1,07	8,56 ± 1,33
Lebendmassezunahme	[kg]	1,23 ± 0,32	1,47 ± 0,25	1,24 ± 0,44	1,41 ± 0,79
Futtermverzehr	[kg]	1,52 ± 0,44 ^{ab}	1,82 ± 0,35 ^a	1,65 ± 0,25 ^{ab}	1,26 ± 0,34 ^b
Futteraufwand*		1,243 ± 0,198	1,246 ± 0,172	1,543 ± 0,873	1,048 ± 0,360
2. Versuchswoche		(30. - 36. Lebenstag)			
Lebendmasse	[kg]				
Beginn		8,60 ± 0,65	8,76 ± 1,24	8,49 ± 1,07	8,56 ± 1,33
Ende		11,25 ± 1,32	11,86 ± 1,42	11,33 ± 1,13	11,37 ± 1,36
Lebendmassezunahme	[kg]	2,65 ± 0,79	3,11 ± 0,47	2,84 ± 0,32	2,81 ± 0,38
Futtermverzehr	[kg]	3,91 ± 0,84	4,36 ± 0,55	4,14 ± 0,36	3,88 ± 0,45
Futteraufwand*		1,554 ± 0,405	1,412 ± 0,133	1,464 ± 0,125	1,387 ± 0,127
3. Versuchswoche		(37. - 43. Lebenstag)			
Lebendmasse	[kg]				
Beginn		11,25 ± 1,32	11,86 ± 1,42	11,33 ± 1,13	11,37 ± 1,36
Ende		15,15 ± 1,66	15,62 ± 1,42	15,34 ± 1,53	15,11 ± 1,57
Lebendmassezunahme	[kg]	3,90 ± 0,45	3,76 ± 0,26	4,01 ± 0,41	3,74 ± 0,36
Futtermverzehr	[kg]	5,58 ± 0,73	5,38 ± 0,56	5,72 ± 0,66	5,50 ± 0,79
Futteraufwand*		1,431 ± 0,081	1,432 ± 0,107	1,426 ± 0,044	1,467 ± 0,110

Ergebnisse

4. Versuchswoche	(44. - 50. Lebenstag)				
Lebendmasse	[kg]				
Beginn		15,15 ± 1,66	15,62 ± 1,42	15,34 ± 1,53	15,11 ± 1,57
Ende		19,19 ± 2,12	20,18 ± 1,91	19,71 ± 1,87	19,33 ± 2,01
Lebendmassezunahme	[kg]	4,04 ± 0,50	4,56 ± 0,61	4,37 ± 0,42	4,22 ± 0,68
Futtermverzehr	[kg]	6,29 ± 1,01	6,73 ± 0,80	6,96 ± 0,51	6,40 ± 1,11
Futtermverbrauch*		1,552 ± 0,081	1,482 ± 0,076	1,598 ± 0,110	1,516 ± 0,061
5. Versuchswoche	(51. - 57. Lebenstag)				
Lebendmasse	[kg]				
Beginn		19,19 ± 2,12	20,18 ± 1,91	19,71 ± 1,87	19,33 ± 2,01
Ende		23,55 ± 2,75	25,55 ± 2,53	24,86 ± 1,80	24,10 ± 1,98
Lebendmassezunahme	[kg]	4,36 ± 0,82 ^a	5,37 ± 0,68 ^b	5,15 ± 0,29 ^{ab}	4,78 ± 0,50 ^{ab}
Futtermverzehr	[kg]	7,30 ± 1,33	8,28 ± 0,70	8,14 ± 0,97	7,42 ± 1,31
Futtermverbrauch*		1,697 ± 0,249	1,550 ± 0,089	1,586 ± 0,204	1,570 ± 0,347
6. Versuchswoche	(58. - 64. Lebenstag)				
Lebendmasse	[kg]				
Beginn		23,55 ± 2,75	25,55 ± 2,53	24,86 ± 1,80	24,10 ± 1,98
Ende		28,90 ± 3,41	31,08 ± 2,45	30,23 ± 2,67	29,57 ± 3,24
Lebendmassezunahme	[kg]	5,35 ± 1,01	5,53 ± 0,53	5,37 ± 1,05	5,46 ± 1,56
Futtermverzehr	[kg]	8,35 ± 1,37	9,30 ± 0,44	8,77 ± 0,96	8,78 ± 2,12
Futtermverbrauch*		1,569 ± 0,092	1,692 ± 0,162	1,662 ± 0,178	1,625 ± 0,200

*kg Futter je kg Zunahme

^{ab} Mittelwerte mit unterschiedlich hochgestellten Buchstaben innerhalb einer Zeile unterscheiden sich signifikant (p<0,05)

Tabelle 12: Effekte von Ameisensäure und Benzoesäure einzeln oder in Kombination auf die periodisch zusammengefassten zotechnischen Leistungen bei abgesetzten Saugferkeln im Altersabschnitt 23. bis 64. Lebenstag aus dem Leistungsversuch (Angaben je Tier)

Versuchsgruppe		Kontrolle	Ameisensäure	Benzoesäure	Kombination
Ameisensäure	[g/kg]	0	5	0	0
Benzoesäure	[g/kg]	0	0	5	0
Kombinationspräparat	[g/kg]	0	0	0	6,9
Ferkelzahl	n	14	14	14	14
Anzahl d. Wdh.	n	7	7	7	7
1. bis 2. Versuchswoche	(23. - 36. Lebenstag)				
Tierzahl	n	14	14	14	14
Lebendmasse	[kg]				
Beginn		7,37 ± 0,52	7,29 ± 1,14	7,25 ± 1,16	7,15 ± 1,30
Ende		11,25 ± 1,32	11,86 ± 1,42	11,33 ± 1,13	11,37 ± 1,36
Lebendmassezunahme	[kg]	3,88 ± 1,00	4,58 ± 0,46	4,09 ± 0,35	4,23 ± 1,05
relativ	[%]	100	118	105,4	109
Futterverzehr	[kg]	5,43 ± 1,24	6,18 ± 0,66	5,80 ± 0,36	5,13 ± 0,70
Futtermittelverbrauch*		1,428 ± 0,215	1,352 ± 0,082	1,424 ± 0,103	1,252 ± 0,198
relativ	[%]	100	94,7	99,7	87,7
3. bis 6. Versuchswoche	(37. - 64. Lebenstag)				
Tierzahl	n	14	14	14	14
Lebendmasse	[kg]				
Beginn		11,25 ± 1,32	11,86 ± 1,42	11,33 ± 1,13	11,37 ± 1,36
Ende		28,90 ± 3,41	31,08 ± 2,45	30,23 ± 2,67	29,57 ± 3,24
Lebendmassezunahme	[kg]	17,65 ± 2,21	19,22 ± 1,41	18,90 ± 1,61	18,19 ± 2,44
relativ	[%]	100	108,9	107,1	103,1
Futterverzehr	[kg]	27,52 ± 4,07	29,70 ± 2,32	29,60 ± 2,45	28,10 ± 5,00
Futtermittelverbrauch*		1,558 ± 0,089	1,546 ± 0,059	1,567 ± 0,035	1,538 ± 0,105
relativ	[%]	100	99,2	100,6	98,7
1. bis 6. Versuchswoche	(23. - 64. Lebenstag)				
Tierzahl	n	14	14	14	14
Lebendmasse	[kg]				
Beginn		7,37 ± 0,52	7,29 ± 1,14	7,25 ± 1,16	7,15 ± 1,30
Ende		28,90 ± 3,41	31,08 ± 2,45	30,23 ± 2,67	29,57 ± 3,24
Lebendmassezunahme	[kg]	21,53 ± 3,12	23,80 ± 1,74	22,98 ± 1,70	22,42 ± 3,10
relativ	[%]	100	110,5	106,7	104,1
Futterverzehr	[kg]	32,96 ± 5,18	35,88 ± 2,77	35,39 ± 2,67	33,23 ± 5,31
Futtermittelverbrauch*		1,530 ± 0,071	1,508 ± 0,055	1,540 ± 0,031	1,481 ± 0,103
relativ	[%]	100	98,6	100,7	96,8

*kg Futter je kg Zunahme

Lebendmasseentwicklung

Die Aufzuchtferkel der Kontrollgruppe ließen während der 6wöchigen Aufzuchtperiode mit einer durchschnittlichen Gesamtzunahme von 21,53 kg bzw. 513 g je Tier und Tag, ein für abgesetzte Ferkel hohes Leistungsniveau erkennen. Mit Zulage von Ameisensäure konnte die gemittelte Zunahmeleistung auf den Gesamtversuch bezogen um 10,5% gegenüber Ferkeln ohne Säurezulage verbessert werden. Die Unterschiede ließen sich jedoch nur in der 5. Versuchswoche statistisch sichern. Hier unterscheidet sich die Lebendmassenzunahme der Kontrollgruppe signifikant von der der Ameisensäuregruppe. Mit der Supplementierung von Benzoesäure lag die Zunahme insgesamt um durchschnittlich 6,7% höher als bei Ferkeln ohne Säurezulage. Der Zulageeffekt erreichte damit jedoch nicht das für die Ameisensäurezulage dokumentierte Leistungsniveau. Das Kombinationspräparat wies mit einer Verbesserung der Zunahme um 4,1% gegenüber der Kontrolle das insgesamt niedrigste Wirkungspotential auf.

Futteraufnahme

Die während der Versuchsperiode aufgenommene Futtermenge lag bei den Ferkeln der Kontrollgruppe im Mittel bei 32,96 kg bzw. 785 g je Tier und Tag. Während die Ferkel der Ameisensäuregruppe oder Benzoesäuregruppe durchschnittlich eine um 8,9 bzw. 7,4% höhere Futteraufnahme aufwiesen als die Ferkel der Kontrollgruppe, wurde von Ferkeln mit Zulage des Kombinationspräparates mit durchschnittlich 33,23 kg gegenüber der Kontrollgruppe nur geringgradig mehr Futter aufgenommen.

Futteraufwand

Die durchschnittliche Futteraufnahme je kg Lebendmassezunahme lag bei den Ferkeln der Kontrollgruppe auf den Gesamtversuch bezogen bei 1,53 kg je Tier. Mit Zulage von Ameisensäure konnte der Futteraufwand geringgradig um 1,4% gegenüber der Kontrollgruppe vermindert werden. Demgegenüber war nach Zulage von Benzoesäure ein leichter Anstieg des Futteraufwandes um durchschnittlich 0,7% im Vergleich zur Kontrolle festzustellen. Die Zulage des Kombinationspräparates ließ dagegen eine deutliche Reduktion des Futteraufwandes um durchschnittlich 3,2% gegenüber der Kontrolle erkennen. Alle aufgezeigten Unterschiede waren jedoch statistisch nicht signifikant.

3.1.2 Leistungsdaten als Kombination aus beiden Versuchsabschnitten

Da im mikrobiologischen Versuch, in der Versuchszeit von 3 Wochen regelmäßig die Leistungsparameter (Lebendmasse, Futtermittelverzehr, Futteraufwand) erhoben wurden, können hieraus und aus den Daten des Leistungsversuchs die Leistungsdaten kombiniert werden.

Tabelle 13: Effekte von Ameisensäure und Benzoesäure einzeln oder in Kombination auf die zootecnischen Leistungen bei abgesetzten Saugferkeln im Altersabschnitt 23. bis 43. Lebenstag kombiniert aus dem mikrobiologischen- und Leistungsversuch (Angaben je Tier)

Versuchsgruppe		Kontrolle	Ameisensäure	Benzoesäure	Kombination
Ameisensäure	[g/kg]	0	5	0	0
Benzoesäure	[g/kg]	0	0	5	0
Kombinationspräparat	[g/kg]	0	0	0	6,9
Ferkelzahl	n	21	21	21	20
Anzahl d. Wdh	n	10	10	10	10
1. Versuchswoche	(23. - 29. Lebenstag)				
Lebendmasse	[kg]				
Beginn		7,39 ± 0,81	7,35 ± 1,20	7,48 ± 1,32	7,38 ± 1,46
Ende		8,65 ± 0,75	8,58 ± 1,63	8,56 ± 1,11	8,80 ± 1,52
Lebendmassezunahme	[kg]	1,26 ± 0,32	1,24 ± 0,77	1,09 ± 0,51	1,42 ± 0,75
Futtermittelverzehr	[kg]	1,64 ± 0,41 ^{ab}	1,96 ± 0,38 ^a	1,64 ± 0,21 ^{ab}	1,42 ± 0,48 ^b
Futteraufwand*		1,324 ± 0,271	1,338 ± 0,258	1,303 ± 0,236	1,191 ± 0,509
2. Versuchswoche	(30. - 36. Lebenstag)				
Lebendmasse	[kg]				
Beginn		8,65 ± 0,75	8,58 ± 1,63	8,56 ± 1,11	8,80 ± 1,52
Ende		11,42 ± 1,41	11,90 ± 1,42	11,45 ± 1,36	11,66 ± 1,77
Lebendmassezunahme	[kg]	2,77 ± 0,76	3,32 ± 0,69	2,88 ± 0,42	2,86 ± 0,48
Futtermittelverzehr	[kg]	4,14 ± 0,87	4,43 ± 0,49	4,33 ± 0,49	4,02 ± 0,71
Futteraufwand*		1,555 ± 0,336	1,367 ± 0,212	1,516 ± 0,169	1,410 ± 0,112
3. Versuchswoche	(37. - 43. Lebenstag)				
Lebendmasse	[kg]				
Beginn		11,42 ± 1,41	11,90 ± 1,42	11,45 ± 1,36	11,66 ± 1,77
Ende		15,02 ± 1,71	15,46 ± 1,49	15,18 ± 1,84	15,38 ± 2,10
Lebendmassezunahme	[kg]	3,60 ± 0,67	3,56 ± 0,47	3,74 ± 0,71	3,72 ± 0,44
Futtermittelverzehr	[kg]	5,20 ± 0,88	5,06 ± 0,71	5,42 ± 0,75	5,23 ± 0,85
Futteraufwand*		1,454 ± 0,117	1,429 ± 0,160	1,486 ± 0,285	1,403 ± 0,138

*kg Futter je kg Zunahme

^{ab} Mittelwerte mit unterschiedlich hochgestellten Buchstaben innerhalb einer Zeile unterscheiden sich signifikant (p<0,05)

In Tabelle 14 sind die Leistungsdaten aus beiden Versuchsabschnitten (mikrobiologischer Versuch und Leistungsversuch) für die Dauer des mikrobiologischen Versuchs als periodische Zusammenfassung mit Mittelwerten und Standardabweichungen dargestellt.

Tabelle 14: Effekte von Ameisensäure und Benzoesäure einzeln oder in Kombination auf die periodisch zusammengefassten zotechnischen Leistungen bei abgesetzten Saugferkeln im Altersabschnitt 23. bis 43. Lebenstag kombiniert aus dem mikrobiologischen- und Leistungsversuch (Angaben je Tier)

Versuchsgruppe		Kontrolle	Ameisensäure	Benzoesäure	Kombination
Ameisensäure	[g/kg]	0	5	0	0
Benzoesäure	[g/kg]	0	0	5	0
Kombinationspräparat	[g/kg]	0	0	0	6,9
Ferkelzahl	n	21	21	21	20
Anzahl d. Wdh.	n	10	10	10	10
1. bis 2. Versuchswoche (23. - 36. Lebenstag)					
Tierzahl	n	21	21	21	20
Lebendmasse	[kg]				
Beginn		7,39 ± 0,81	7,35 ± 1,20	7,48 ± 1,32	7,38 ± 1,46
Ende		11,42 ± 1,41	11,90 ± 1,42	11,45 ± 1,36	11,66 ± 1,77
Lebendmassezunahme	[kg]	4,03 ± 0,87	4,56 ± 0,42	3,97 ± 0,41	4,28 ± 1,12
Relativ	[%]	100	113,2	98,5	106,2
Futterverzehr	[kg]	5,78 ± 1,21	6,39 ± 0,66	5,97 ± 0,46	5,44 ± 1,15
Futteraufwand*		1,452 ± 0,181	1,404 ± 0,111	1,520 ± 0,213	1,305 ± 0,208
relativ	[%]	100	96,7	104,7	89,9
1. bis 3. Versuchswoche (23. - 43. Lebenstag)					
Tierzahl	n	21	21	21	20
Lebendmasse	[kg]				
Beginn		7,39 ± 0,81	7,35 ± 1,20	7,48 ± 1,32	7,38 ± 1,46
Ende		15,02 ± 1,71	15,46 ± 1,49	15,18 ± 1,84	15,38 ± 2,10
Lebendmassezunahme	[kg]	7,63 ± 1,17	8,12 ± 0,59	7,71 ± 1,04	8,00 ± 1,38
relativ	[%]	100	106,4	101	104,8
Futterverzehr	[kg]	10,98 ± 1,60	11,45 ± 0,91	11,39 ± 0,87	10,67 ± 1,56
Futteraufwand*		1,444 ± 0,091	1,411 ± 0,077	1,501 ± 0,232	1,344 ± 0,131
relativ	[%]	100	97,7	103,9	93,1

*kg Futter je kg Zunahme

Lebendmasseentwicklung

Während der ersten drei Wochen nahmen die Aufzuchtferkel der Kontrollgruppe im Durchschnitt 7,63 kg zu. Damit lag die Zunahme numerisch unter den Lebendmassezunahmen der Säuregruppen. Die numerisch höchste Lebendmassezunahme erzielten die Ferkel der Ameisensäuregruppe mit 8,12 kg. Die Lebendmassenzunahmen der beiden anderen Säuregruppen lagen etwas unter der der Ameisensäuregruppe (Benzoesäuregruppe 7,71 kg und Kombinationspräparatgruppe 8,00 kg). Statistisch waren keine signifikanten Unterschiede nachweisbar.

Futtermittelaufnahme

Während der ersten drei Wochen lag der durchschnittliche Futtermittelverzehr der Kontrollgruppe mit 10,98 kg numerisch geringer als der Futtermittelverzehr der Ameisensäure- oder Benzoesäuregruppe (11,45 kg bzw. 11,39 kg). Die Futtermittelaufnahme der Kombinationspräparatgruppe lag mit 10,67 kg unterhalb der übrigen Gruppen. Statistisch waren nur in der 1. Versuchswoche signifikante Unterschiede zu ermitteln. In dieser Versuchswoche war die Futtermittelaufnahme der Ameisensäuregruppe signifikant höher als die der Kombinationspräparatgruppe.

Futtermittelaufwand

Der Futtermittelaufwand war in der Ameisensäure- und Kombinationspräparatgruppe gegenüber der Kontrollgruppe geringgradig vermindert. Der numerisch höchste Futtermittelaufwand konnte in der Benzoesäuregruppe verzeichnet werden.

3.2. Ergebnisse der Kotkonsistenzbeurteilung

In den ersten 25 Versuchstagen wurden die Kotkonsistenz der Tiere des Leistungsversuchs (14 Tiere pro Gruppe) und der des mikrobiologischen Versuchs (7 Tiere pro Gruppe) zusammenfassend beurteilt. Alle weiteren Werte ab Tag 26 beziehen sich nur noch auf die Tiere aus dem Leistungsversuch. In der folgenden Tabelle **15** sind für jede Gruppe die Kotkonsistenzen als Mittelwerte mit Standardabweichungen aufgeführt.

Tabelle 15: Kotkonsistenz für die einzelnen Versuchsgruppen (Angaben je Tier)

Gruppe	Kontrolle	Ameisensäure	Benzoessäure	Kombination
Tag				
1	2,05 ± 0,22	2,14 ± 0,48	2,05 ± 0,22	2,10 ± 0,30
2	2,02 ± 0,11 ^{ab}	2,00 ± 0,00 ^a	2,29 ± 0,64 ^b	2,05 ± 0,22 ^{ab}
3	2,19 ± 0,60	2,00 ± 0,00	2,19 ± 0,60	2,05 ± 0,22
4	2,05 ± 0,22	2,05 ± 0,22	2,05 ± 0,22	2,00 ± 0,00
5	2,05 ± 0,22	2,00 ± 0,00	2,00 ± 0,00	2,00 ± 0,00
6	2,05 ± 0,22	2,00 ± 0,00	2,05 ± 0,22	2,00 ± 0,00
7	2,00 ± 0,00	2,00 ± 0,00	2,00 ± 0,00	2,00 ± 0,00
8	2,10 ± 0,30	2,00 ± 0,00	2,05 ± 0,22	2,00 ± 0,00
9	2,05 ± 0,22	2,00 ± 0,00	2,05 ± 0,23	2,00 ± 0,00
10	2,00 ± 0,00	2,00 ± 0,00	2,00 ± 0,00	2,00 ± 0,00
11	2,00 ± 0,00	2,00 ± 0,00	2,00 ± 0,00	2,00 ± 0,00
12	2,00 ± 0,00	2,00 ± 0,00	2,00 ± 0,00	2,00 ± 0,00
13	2,00 ± 0,00	2,05 ± 0,22	2,00 ± 0,00	2,05 ± 0,22
14 - 42	2,00 ± 0,00	2,00 ± 0,00	2,00 ± 0,00	2,00 ± 0,00

^{ab} Mittelwerte mit unterschiedlich hochgestellten Buchstaben innerhalb einer Zeile unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$)

Am zweiten Versuchstag konnte ein signifikanter Unterschied zwischen der Ameisensäure- und der Benzoessäuregruppe festgestellt werden. Die Tiere der Benzoessäuregruppe wiesen an diesem Tag eine weichere Kotkonsistenz auf als die Tiere der Ameisensäuregruppe. Im gesamten Versuch traten nur vereinzelt Durchfälle auf.

Nach Männer und Spieler (2001) wird Durchfall als weicher, verlaufender bis hin zu flüssigwässrigem Kot bezeichnet, der mindestens an zwei aufeinander folgenden Tagen auftritt.

Tabelle 16 zeigt die Anzahl der Fälle in denen das oben beschriebene Ereignis auftrat. Dabei handelt es sich jeweils nie um dasselbe Tier.

Tabelle 16: Durchfallgeschehen im Gruppenvergleich

Gruppe	Kontrolle	Ameisensäure	Benzoessäure	Kombination
	2	0	2	1

Bei der Betrachtung der Ergebnistabelle fällt auf, dass die Häufigkeit der Durchfälle in der Kontrollgruppe im Vergleich zu den Säuregruppen, mit Ausnahme der Benzoessäure, höher war.

3.3 Futtermitteluntersuchungen

3.3.1 Ergebnisse der Pufferkapazitätsbestimmung

Um zu beurteilen, in wie weit die Säurezusätze einen Einfluss auf die Pufferkapazität des Futtermittels hatten, wurde diese in allen vier Futtermitteln ermittelt. In Tabelle 17 sind die Ergebnisse als Mittelwerte mit Standardabweichungen aufgeführt.

Tabelle 17: Pufferkapazität β der Versuchsdiäten [mol/l]

Gruppe	Kontrolle	Ameisensäure	Benzoessäure	Kombination
Pufferkapazität	0,029 ± 0,007	0,033 ± 0,006	0,031 ± 0,005	0,034 ± 0,005

Je konzentrierter eine Pufferlösung ist, umso größer ist auch ihre Pufferkapazität β . Statistisch ergeben sich keine Unterschiede in der Pufferkapazität zwischen den Gruppen. Numerisch kann festgestellt werden, dass die Pufferkapazität β der Kontrollgruppe mit 0,029 mmol/l geringer war als in den Säuregruppen. Die Pufferkapazität der Kombinationspräparatgruppe war größer als die der anderen Gruppen.

3.3.2 Ergebnisse der Benzoessäurekonzentrationsbestimmung

3.3.2.1. Benzoessäurekonzentrationsbestimmung im Futtermittel

Die Futtermittel der Benzoessäure- und Kombinationspräparatgruppe wurden auf ihren Gehalt an Benzoessäurekonzentration untersucht. Durch diese Untersuchung sollte die Richtigkeit der Futterzumischung kontrolliert werden. Die Futtermittel wurden aus beiden Versuchsteilen untersucht (mit Chrom = mikrobiologischer Versuchsteil; ohne Chrom = Leistungsversuch). Tabelle 18 zeigt die gemittelten Werte mit Standardabweichung für die beiden untersuchten Gruppen, sowie die Benzoessäurekonzentration bezogen auf die Trockenmasse des Futters.

Tabelle 18: Benzoessäurekonzentrationsbestimmung aus den Futtermitteln der Benzoessäuregruppe (mit und ohne Chrom) und der Kombinationspräparatgruppe (mit und ohne Chrom)

Gruppen	Benzoessäure	Benzoessäure + Chrom	Kombination	Kombination + Chrom
Benzoessäure [g/kg]	4,80 ± 0,02	5,56 ± 0,01	3,00 ± 0,08	3,10 ± 0,07
Benzoessäure bezogen auf die TM Futter [g/kg]	5,35	6,19	3,32	3,43

TM= Trockenmasse

3.3.2.2 Benzoessäurekonzentrationsbestimmung in Digesta

Die folgenden Ergebnisse aus Tabelle **19** und **19a** sollen verdeutlichen, welche Menge der eingesetzten Säure in welchem Teil des Verdauungsabschnitts von der eingesetzten Ursprungssubstanz zur Verfügung stand. Die aufgeführten Werte sind als Mittelwerte mit Standardabweichungen in mg/kg für die Magen-Darmabschnitte (Magen und proximales Jejunum) dargestellt. Um einen besseren Vergleich zur Ursprungskonzentration im Futtermittel herstellen zu können, wurde zusätzlich die Benzoessäure auf die Trockenmasse der Digesta bezogen. Durch eine erfolgte Chromoxidbestimmung (Marker) im distalen Jejunum konnte hier die scheinbare praecaecale Verdaulichkeit der Benzoessäure berechnet werden.

Tabelle 19: Konzentration der Benzoessäure in Digesta und Digestatrockenmasse [mg/kg]

Gruppe	Benzoessäure	Benzoessäure in TM Digesta	Kombination	Benzoessäure in TM Digesta
Magen	1053 ± 343	3561	704 ± 88	2101
prox. Jejunum	17 ± 26	142,6	1,1 ± 0,3	18,2

TM=Trockenmasse

Tabelle 19a: Konzentration der Benzoessäure im distalen Jejunum [mg/kg] und scheinbare praecaecale Verdaulichkeit [%] der Benzoessäure

Gruppe	Benzoessäure	Verdaulichkeit [%]	Kombination	Verdaulichkeit [%]
distal. Jejunum	2,3 ± 1,1	99,99	1,9 ± 1,6	99,9

Bei der Benzoessäurekonzentrationsbestimmung war eine deutliche Reduktion der Konzentration in Bezug auf die Passagelänge im Verdauungstrakt zu bemerken. Während die Konzentration an Benzoessäure im Magen mit 1053 mg/kg noch recht hoch war, nahm sie zum Ende des Jejunums sehr stark ab (2,3 mg/kg). Besonders deutlich wurde diese Reduktion durch die Berechnung der scheinbaren praecaecalen Verdaulichkeit der Benzoessäure in Tabelle **19a**. Mittels des Markers Chromoxid konnte gezeigt werden, dass im distalen Jejunum mehr als 99% der Säure aus der Digesta verschwunden waren.

3.3.3 Ergebnisse der Ameisensäurekonzentrationsbestimmung

3.3.3.1. Ameisenkonzentrationsbestimmung im Futtermittel

Zur Überprüfung der Richtigkeit der Futtermischungen wurden die Futtermittel, denen Ameisensäure zugefügt wurde, auf ihren Gehalt untersucht. Dies erfolgte sowohl für die

Futtermittel der Ameisensäuregruppe und der Kombinationspräparatgruppe aus dem mikrobiologischen Versuchsteil (+ Chrom), als auch für die Futtermittel der gleichen Gruppen aus dem Leistungsversuch.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 20 als Mittelwerte mit Standardabweichungen dargestellt.

Tabelle 20: Ameisensäurekonzentrationsbestimmung aus den Futtermitteln der Ameisensäuregruppe (mit und ohne Chrom) und der Kombinationspräparatgruppe (mit und ohne Chrom)

	Ameisensäure	Ameisensäure + Chrom	Kombination	Kombination + Chrom
Ameisensäure [g/kg]	4,59 ± 0,07	5,00 ± 0,06	0,72 ± 0,07	0,77 ± 0,06
Ameisensäure bezogen auf die TM Futter[g/kg]	5,12	5,58	0,79	0,85

TM=Trockenmasse

3.3.3.2 Ameisensäurekonzentration in Digesta

Um eine Aussage über die Wirkungsweise der Säuren machen zu können, war es wichtig, festzustellen, in welchem Darmabschnitt welche Konzentrationen der Säure vorlagen.

Die folgende Tabelle 21 zeigt die Konzentrationsangaben der Ameisensäure in mg/kg der Ameisensäure- und der Kombinationspräparatgruppe in Digesta (Magen und proximales Jejunum). Um eine Aussage über die Verfügbarkeit machen zu können, wurde der gemessene Anteil an Säure, in Bezug zur Digestatrockenmasse gesetzt. In Tabelle 21a ist aufgrund des Markers Chromoxid zusätzlich eine Aussage über die scheinbare praecaecale Verdaulichkeit möglich.

Tabelle 21: Konzentration der Ameisensäure in Digesta und Digestatrockenmasse [mg/kg]

Gruppe	Ameisensäure	Ameisensäure in TM Digesta	Kombination	Ameisensäure in TM Digesta
Magen	1177± 363	3424	142 ± 34	423,9
prox. Jejunum	65 ± 19	463,6	11 ± 8	182,4

TM=Trockenmasse

Tabelle 21a: Konzentration der Ameisensäure im distalen Jejunum [mg/kg] und scheinbare praecaecale Verdaulichkeit [%] der Ameisensäure

Gruppe	Ameisensäure	Verdaulichkeit	Kombination	Verdaulichkeit
		[%]		[%]
distal. Jejunum	48 ± 12	99,71	14 ± 4	99,41

Die Ergebnisse zeigen eine deutliche Abnahme der Ameisensäurekonzentration vom Magen bis hin zum distalen Jejunum. Besonders deutlich machen das die Ergebnisse aus der Ameisensäuregruppe. Während im Magen die Ameisensäurekonzentration im Mittel bei 1177 mg/kg lag, war es im distalen Jejunum im Mittel nur noch 48 mg/kg. Ausgehend von der Trockenmasse der Digesta standen im Magen dem tierischen Organismus noch 3424 bzw. 423,9 mg/kg zur Verfügung und am Ende des Dünndarms nur noch 48 bzw. 14 mg/kg. Tabelle 21a zeigt eine scheinbare Verdaulichkeit der Ameisensäure im distalen Jejunum von über 99%.

3.4. Ergebnisse der Stoffwechselprodukte in Digesta

3.4.1 Ammoniumionenkonzentration in Digesta

Die Ammoniumionenkonzentrationen in der Digesta von Magen, distalem Jejunum und Colon sind in Tabelle 22 dargestellt.

Tabelle 22: Ammoniumgehalte in Digesta für die vier Versuchsgruppen [mmol/l]

Gruppe	Kontrolle		Ameisensäure		Benzoessäure		Kombination	
	n ¹		n		n		n	
Magen	7	12,01 ± 2,77	7	10,37 ± 2,17	7	11,87 ± 2,59	6	10,88 ± 3,10
distales Jejunum	6	3,18 ± 0,26	6	2,82 ± 0,34	7	2,90 ± 0,34	6	2,83 ± 0,15
Colon	7	8,53 ± 1,94	7	7,81 ± 1,69	7	7,71 ± 1,96	6	7,70 ± 1,13

¹Anzahl der Tiere

Bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden. Zu bemerken ist jedoch, dass die Ammoniumkonzentration in der Kontrollgruppe in allen drei Abschnitten des Verdauungstrakts numerisch höher lag als bei den Säuregruppen.

3.4.2 [D(-)- und L(+)]-Laktatgehalte in Digesta

Als Maß der metabolischen Aktivität der Milchsäurebakterien in der bakteriellen Population der einzelnen Darmabschnitte wurde der Gehalt an D(-)- und L(+)-Isomeren der Milchsäure ermittelt.

D(-)-Laktatgehalt in Digesta

Die Tabelle 23 zeigt den ermittelten Median der D(-)-Laktatkonzentration in den einzelnen Darmabschnitten im Gruppenvergleich mit Minimum- und Maximumangabe.

Tabelle 23: D(-)-Laktatgehalt in Digesta für die vier Versuchsgruppen [mmol/kg]

	Kontrolle		Ameisensäure		Benzoessäure		Kombination	
	n ¹	Median	n	Median	n	Median	n	Median
Magen	7	1,92 (0,26 - 2,11)	7	0,77 (0,35 - 1,77)	7	1,14 (0,25 - 2,95)	6	1,58 (0,30 - 2,60)
proximales Jejunum	2	0,23 (0,18 - 0,28)	4	0,1 (0,05 - 0,36)	6	0,35 (0,06 - 1,41)	4	0,22 (0,03 - 0,33)
distales Jejunum	6	0,23 (0,00 - 0,55)	6	0,3 (0,00 - 0,50)	7	0,31 (0,02 - 1,14)	6	0,31 (0,00 - 3,74)
Colon	7	0,06 (0,03 - 0,25)	7	0,15 (0,04 - 0,25)	7	0,12 (0,00 - 0,45)	6	0,03 (0,00 - 0,04)

¹Anzahl der Tiere

Für das proximale Jejunum konnten auf Grund der geringen Probenanzahl in der Kontroll-, Ameisensäure- und Kombinationspräparatgruppe keine statistischen Aussagen getroffen werden. Bezügliche des distalen Jejunums und des Colons konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden.

L(+)-Laktatgehalt in Digesta

In Tabelle 24 sind die Konzentrationen des L(+)-Laktatgehalts in mmol/kg der einzelnen Darmabschnitte im Gruppenvergleich aufgeführt.

Tabelle 24: L(+)-Laktatgehalt in Digesta für die vier Versuchsgruppen [mmol/kg]

	Kontrolle		Ameisensäure		Benzoessäure		Kombination	
	n ¹	Median	n	Median	n	Median	n	Median
Magen	7	1,13 (0,70 - 2,73)	7	1,31 (0,48 - 2,03)	7	1,13 (0,45 - 3,66)	6	2,36 (1,27 - 4,27)
proximales Jejunum	2	3,39 (3,26 - 3,52)	4	1,52 (1,11 - 1,78)	6	2,7 (0,00 - 4,74)	4	2,99 (1,80 - 4,33)
distales Jejunum	6	2,48 (0,98 - 4,04)	6	2,6 (1,98 - 4,47)	7	2,23 (0,00 - 5,97)	6	2,94 (0,00 - 12,5)
Colon	7	0,1 (0,02 - 0,29)	7	0,19 (0,00 - 0,29)	7	0,09 (0,00 - 0,80)	6	0,02 (0,00 - 0,38)

¹Anzahl der Tiere

Die statistische Auswertung ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Im Magen konnte ein tendenzieller Unterschied zwischen der Kontroll- und der Kombinationspräparatgruppe festgestellt werden ($p=0,086$). In der Kombinationspräparatgruppe lag die Konzentration an L(+)-Laktat deutlich höher als in der Kontrollgruppe. Statistisch konnten die Proben aus dem proximalen Jejunum nicht ausgewertet werden, da in der Kontroll-, Ameisensäure- und Kombinationspräparatgruppe zu wenig Material vorlag. Es waren jedoch numerische Unterschiede feststellbar. Der L(+)-Laktatgehalt im proximalen Jejunum lag bei der Kontrollgruppe mit 3,39 mmol/kg deutlich höher als in der Ameisensäuregruppe mit 1,52 mmol/kg. Auch der Unterschied zwischen der Ameisensäuregruppe und der Kombinationspräparatgruppe war numerisch deutlich ersichtlich. Die Konzentration an L(+)-Laktat war in der Kombinationspräparatgruppe mit 2,99 mmol/kg fast doppelt so hoch wie in der Ameisensäuregruppe mit 1,52 mmol/kg.

Gesamtlaktatgehalt in Digesta

Die Tabelle 25 zeigt, den Gesamtgehalt an Laktat, der in den jeweiligen Darmabschnitten in der Digesta gefunden wurde.

Tabelle 25: Gesamtlaktatgehalt in Digesta für die vier Versuchsgruppen [mmol/kg]

	Kontrolle		Ameisensäure		Benzoessäure		Kombination	
	n ¹	Median	n	Median	n	Median	n	Median
Magen	7	3,06 (0,96 - 4,71)	7	2,31 (0,98 - 3,58)	7	2,27 (0,70 - 6,30)	6	4,19 (1,57 - 6,13)
proximales Jejunum	2	3,62 ^{ab} (3,54 - 3,71)	4	1,72 ^a (1,16 - 1,92)	6	2,99 ^{ab} (1,41 - 5,54)	4	3,16 ^b (1,93 - 4,67)
distales Jejunum	6	2,69 (0,98 - 4,49)	6	2,68 (2,20 - 4,97)	7	2,42 (1,14 - 6,81)	6	3,13 (0,00 - 16,19)
Colon	7	0,18 (0,06 - 0,54)	7	0,34 (0,05 - 0,54)	7	0,39 (0,07 - 4,51)	6	0,06 (0,00 - 0,72)

¹Anzahl der Tiere

^{ab} Mediane mit unterschiedlich hochgestellten Buchstaben innerhalb einer Zeile unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$)

Bei der Betrachtung des Gesamtlaktatgehalts konnte festgestellt werden, dass im proximalen Jejunum ein signifikanter Unterschied zwischen der Ameisensäuregruppe mit einem Laktatgehalt von 1,72 mmol/kg und der Kombinationspräparatgruppe mit einem Laktatgehalt von 3,16 mmol/kg bestand ($p=0,02$). Auch zwischen der Ameisensäure- und der Benzoessäuregruppe besteht ein tendenzieller Unterschied ($p = 0,06$), ebenso zwischen der

Kontroll- und der Ameisensäuregruppe ($p = 0,06$), wobei die Anzahl der Tiere in der Kontrollgruppe keine statistische Aussagekraft hat.

Auch im Gesamtlaktatgehalt der Colondigesta besteht ein tendenzieller Unterschied zwischen der Ameisensäure- und Kombinationspräparatgruppe ($p = 0,09$), sowie zwischen der Benzoesäure- und Kombinationspräparatgruppe ($p = 0,09$).

Verhältnis [L(+)] zu D(-)]- Laktat

Die Tabelle 26 zeigt das Verhältnis von L(+)-Laktat zu D(-)-Laktat in den einzelnen Darmabschnitten.

Tabelle 26: Verhältnis von [L(+)] und D(-)]-Laktat zueinander aus den Digestaproben der einzelnen Darmabschnitte

	Kontrolle	Ameisensäure	Benzoesäure	Kombination
Magen	0,59 :1	1,70 :1	0,99 :1	1,49 :1
prox. Jejunum	14,7 :1	15,2 : 1	7,71 :1	13,6 :1
dist. Jejunum	10,8 : 1	8,67 : 1	7,19 : 1	9,48 : 1
Colon	1,62 : 1	1,27 : 1	0,75 :1	0,67 : 1

Durch die Berechnung von [L(+)] und D(-)]-Laktat im Verhältnis, wurde ersichtlich, dass im proximalen und distalen Jejunum bedeutend mehr L(+)-Laktat auffindbar war als D(-)-Laktat. Signifikante Unterschiede konnten statistisch nicht nachgewiesen werden, jedoch war das Verhältnis in der Kontrollgruppe im Magen numerisch niedriger als in den anderen Versuchsgruppen.

3.4.3 Flüchtige Fettsäuren (FFS) in Digesta

Magen

In Tabelle 27 sind die Konzentrationen als Median mit Minimum und Maximum (in mmol/kg) der freien Fettsäuren, (Essigsäure, Propionsäure, i-Buttersäure, n-Buttersäure, i-Valeriansäure und n-Valeriansäure) im Magen aufgeführt.

Tabelle 27: Die Konzentrationen der einzelnen und gesamten freien Fettsäuren aus Magendigesta für die vier Versuchsgruppen [mmol/kg]

	Kontrolle		Ameisensäure		Benzoessäure		Kombination	
	n ¹	Median	n	Median	n	Median	n	Median
Essigsäure	7	6,83 (1,12 - 11,56)	6	2,26 (0,73 - 9,23)	7	2,19 (0,80 - 11,16)	6	6,56 (1,16 - 41,93)
Propionsäure	7	0,83 (0,11 - 3,0)	6	0,29 (0,13 - 2,23)	7	0,74 (0,13 - 7,57)	6	0,29 (0,12 - 24,75)
i-Buttersäure	7	0 (0,00 - 0,39)	6	0 (0,00 - 0,76)	7	0 (0,00 - 0,49)	6	0 (0,00 - 0,87)
n-Buttersäure	7	0,319 (0,23 - 0,87)	6	0,235 (0,13 - 0,75)	7	0,457 (0,20 - 0,96)	6	0,343 (0,16 - 0,56)
i-Valeriansäure	7	0 (0,00 - 0,11)	6	0,07 (0,00 - 0,36)	7	0 (0,00 - 0,41)	6	0 (0,00 - 0,93)
n-Valeriansäure	7	0,13 ^{ac} (0,00 - 0,26)	6	0,3 ^b (0,16 - 0,50)	7	0,15 ^{ac} (0,00 - 0,23)	6	0,26 ^{abc} (0,00 - 0,88)
Gesamt-FFS	7	9,63 (1,91 - 14,40)	6	3,19 (1,77 - 13,21)	7	5,60 (1,84 - 12,73)	6	7,94 (1,50 - 68,71)

¹ Anzahl der Tiere^{abc} Mediane mit unterschiedlich hochgestellten Buchstaben innerhalb einer Zeile unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$)

Bei der n-Valeriansäure konnten signifikante Unterschiede zwischen einerseits der Kontrollgruppe und der Ameisensäuregruppe ($p = 0,012$) und andererseits zwischen der Ameisensäuregruppe und der Benzoessäuregruppe ($p = 0,012$) gefunden werden. Die übrigen FFS sind ohne signifikante Unterschiede. Numerisch ist festzustellen, dass bei der Essigsäure die Mediane der Kontrollgruppe und der Kombinationspräparatgruppe deutlich höher lagen als die der Ameisensäure- und der Benzoessäuregruppe. Ebenso bestand ein numerischer Unterschied bei der Propionsäure zwischen der Kontrollgruppe mit 0,83 mmol/kg und der Ameisensäure- und Kombinationspräparatgruppe mit jeweils 0,29 mmol/kg. Auch in der Benzoessäuregruppe lag die Konzentration an Propionsäure mit 0,74 mmol/l deutlich höher als in den anderen beiden Säuregruppen.

Proximales Jejunum

In Tabelle 28 sind die Ergebnisse der Gehalte an freien Fettsäuren als Median mit Minimum und Maximum im proximalen Jejunum aufgeführt. Auf Grund der geringen Probenanzahl in der Kontroll-, Ameisensäure- und Kombinationspräparatgruppe konnten keine statistischen

Tests zur Prüfung auf Signifikanzen herangezogen werden. Auch numerisch konnten kaum Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden. Auffällig war, dass die Fettsäuren Propionsäure, i-Buttersäure und n-Valeriansäure in den vier Gruppen im proximalen Jejunum nicht oder nur teilweise nachweisbar waren.

Tabelle 28: Die Konzentrationen der einzelnen und gesamten freien Fettsäuren aus Jejunal digesta (proximal) für die vier Versuchsgruppen [mmol/kg]

	Kontrolle		Ameisensäure		Benzoesäure		Kombination	
	n ¹	Median	n	Median	n	Median	n	Median
Essigsäure	2	0,28 (0,22 - 0,34)	4	0,31 (0,12 - 0,43)	6	0,31 (0 - 0,50)	4	0,29 (0,25 - 0,36)
Propionsäure	2	0 (0,00 - 0,00)	4	0 (0,00 - 0,00)	6	0 (0,00 - 0,13)	4	0 (0,00 - 0,00)
i-Buttersäure	2	0 (0,00 - 0,00)	4	0 (0,00 - 0,00)	6	0 (0,00 - 0,00)	4	0 (0,00 - 0,00)
n-Buttersäure	2	0 (0,00 - 0,00)	4	0 (0,00 - 0,17)	6	0,13 (0,00 - 0,77)	4	0 (0,00 - 0,56)
i-Valeriansäure	2	0,57 (0,26 - 0,89)	4	0,38 (0,00 - 0,65)	6	0,13 (0,00 - 0,75)	4	0,06 (0,00 - 0,54)
n-Valeriansäure	2	0 (0,00 - 0,00)	4	0 (0,00 - 0,00)	6	0 (0,00 - 0,36)	4	0 (0,00 - 0,00)
Gesamt-FFS	2	0,85 (0,60 - 1,10)	4	0,7 (0,39 - 0,94)	6	0,89 (0,00 - 1,35)	4	0,61 (0,26 - 0,93)

¹ Anzahl der Tiere

Distales Jejunum

Die Konzentrationsangaben der FFS als Median mit Minimum und Maximum sind in Tabelle 29 dargestellt.

Tabelle 29: Die Konzentrationen der einzelnen und gesamten freien Fettsäuren aus Jejunaldigesta (distal) für die vier Versuchsgruppen [mmol/kg]

	Kontrolle		Ameisensäure		Benzoessäure		Kombination	
	n ¹	Median	n	Median	n	Median	n	Median
Essigsäure	7	0,75 (0,30 - 0,98)	7	0,42 (0,25 - 3,36)	7	0,52 (0,19 - 0,83)	6	0,83 (0,47 - 4,37)
Propionsäure	7	0 (0,00 - 0,76)	7	0 (0,00 - 0,40)	7	0 (0,00 - 0,27)	6	0 (0,00 - 0,62)
i-Buttersäure	7	0 (0,00 - 0,00)	7	0 (0,00 - 0,00)	7	0 (0,00 - 0,00)	6	0 (0,00 - 0,00)
n-Buttersäure	7	0 (0,00 - 0,30)	7	0 (0,00 - 0,12)	7	0 (0,00 - 0,33)	6	0 (0,00 - 0,79)
i-Valeriansäure	7	0,16 (0,00 - 0,24)	7	0,26 (0,00 - 0,95)	7	0,15 (0,00 - 0,43)	6	0,17 (0,00 - 0,85)
n-Valeriansäure	7	0 (0,00 - 0,46)	7	0 (0,00 - 0,00)	7	0 (0,00 - 0,61)	6	0 (0,00 - 0,00)
Gesamt-FFS	7	0,94 (0,59 - 2,19)	7	1,29 (0,25 - 3,36)	7	0,7 (0,33 - 1,59)	6	1,68 (0,48 - 4,37)

¹ Anzahl der Tiere

Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden. Es war jedoch zu bemerken, dass die FFS Propionsäure, i-Buttersäure, n-Buttersäure und n-Valeriansäure in den Digestaproben nicht (i-Buttersäure) oder nur teilweise nachweisbar waren. Zusätzlich konnte festgestellt werden, dass es zu einer weiteren numerischen Verringerung der Konzentrationen der FFS im distalen Jejunum im Gegensatz zum proximalen Jejunum kam.

Colon

In Tabelle 30 sind die Messergebnisse der FFS der Colondigestaproben als Median mit Minimum und Maximum im Gruppenvergleich dargestellt.

Tabelle 30: Die Konzentrationen der einzelnen und gesamten freien Fettsäuren aus Colondigesta für die vier Versuchsgruppen [mmol/kg]

	Kontrolle		Ameisensäure		Benzoessäure		Kombination	
	n ¹	Median	n	Median	n	Median	n	Median
Essigsäure	7	65,4 (12,2 - 92,5)	7	77,8 (68,6 - 98,5)	7	79,6 (0,0 - 98,4)	6	66,1 (59,5 - 84,0)
Propionsäure	7	37,1 (3,40 - 46,5)	7	34,5 (20,0 - 44,4)	7	40 (3,59 - 51,7)	6	27,3 (3,15 - 35,3)
i-Buttersäure	7	1,29 (0,65 - 2,47)	7	1,49 (0,57 - 3,41)	7	0,79 (0,00 - 1,74)	6	1,47 (0,89 - 2,38)
n-Buttersäure	7	0,64 (0,21 - 1,41)	7	0,86 (0,36 - 9,68)	7	0,86 (0,52 - 11,98)	6	0,59 (0,27 - 0,88)
Verhältnis n- zu i-Buttersäure		0,50 : 1		0,58 : 1		1,09 : 1		0,40 : 1
i-Valeriansäure	7	1,26 (0,35 - 3,52)	7	1,13 (0,55 - 4,64)	7	0,69 (0,00 - 1,64)	6	1,18 (0,24 - 2,49)
n-Valeriansäure	7	3,52 (1,60 - 7,54)	7	3,55 (1,15 - 4,99)	7	2,12 (0,97 - 5,23)	6	2,31 (2,15 - 2,61)
Gesamt- FFS	7	109 (65,4 - 140)	7	126 (93,5 - 149)	7	133 (40,4 - 159)	6	99,8 (77,4 - 120)

¹ Anzahl der Tiere

In den angewendeten statistischen Tests konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden. Erwartungsgemäß lagen die Konzentrationen der FFS in der Colondigesta höher als in den Digestaproben aus Magen, proximalem und distalem Jejunum. Die Konzentrationen an Essigsäure und Propionsäure lagen im Vergleich zu den anderen FFS deutlich höher, wobei die Essigsäurekonzentration in der Benzoessäuregruppe mit 79,55 mmol/kg den höchsten Wert erreichte. Ebenso verhielt es sich auch mit dem Gehalt an Propionsäure, auch dieser war in der Benzoessäuregruppe mit 39,96 mmol/kg am Höchsten. Bei der Betrachtung der Verhältnisse n- zu i- Buttersäure konnte festgestellt werden, dass bei der Benzoessäuregruppe das Verhältnis mit 1,09 : 1 doppelt so hoch lag wie in den anderen Gruppen (0,4 - 0,58 : 1).

3.5. Ergebnisse der pH-Wertmessung in Harn und Digesta

pH-Wertmessung in Digesta

Die Ergebnisse der pH-Wertmessung als Mittelwerte mit Standardabweichung sind in Tabelle 31 aufgeführt.

Tabelle 31: pH-Werte der einzelnen Darmabschnitte für die vier Versuchsgruppen

		Kontrolle	Ameisensäure	Benzoessäure	Kombination
	n ¹	n	n	n	n
Magen	7	3,92 ± 0,40	7 3,89 ± 0,80	7 3,46 ± 0,61	6 4,03 ± 0,49
proximales Jejunum	2	6,02 ± 1,52	4 4,89 ± 0,55	6 5,64 ± 0,79	4 6,03 ± 0,43
distales Jejunum	7	6,73 ± 0,67	7 6,60 ± 0,51	7 6,60 ± 0,42	6 6,52 ± 0,64
Caecum	7	5,13 ± 0,26	7 5,15 ± 0,38	7 5,07 ± 0,34	6 5,04 ± 0,29
Colon	7	5,35 ± 0,46	7 5,26 ± 0,33	7 5,08 ± 0,44	6 5,44 ± 0,71

¹Anzahl der Tiere

Die Werte des proximalen Jejunums waren auf Grund ihrer geringen Anzahl statistisch nicht auswertbar. Die Mittelwerte der übrigen Darmabschnitte ergaben statistisch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Auffällig ist jedoch, dass der pH-Wert im proximalen Jejunum in der Ameisensäuregruppe mit 4,89 deutlich geringer war als in den übrigen Gruppen.

pH- Werte des Harns

Die Ergebnisse der pH-Wertmessung des Harns der Versuchstiere sind in Tabelle 32 mit ihrem Mittelwert und Standardabweichung für die jeweilige Gruppe dargestellt.

Tabelle 32: pH-Werte des Harns für die vier Versuchsgruppen

		Kontrolle	Ameisensäure	Benzoessäure	Kombination
	n ¹	n	n	n	n
Harn	7	6,87 ± 0,64 ^{ab}	7 6,98 ± 0,45 ^{ab}	7 5,63 ± 0,72 ^c	6 6,16 ± 0,86 ^{abc}

¹Anzahl der Tiere

^{abc} Mittelwerte mit unterschiedlich hochgestellten Buchstaben innerhalb einer Zeile unterscheiden sich signifikant (p < 0,05)

Im statistischen Test konnte festgestellt werden, dass es signifikante Unterschiede zwischen dem Harn-pH-Wert der Kontrollgruppe (6,87) und dem der Benzoessäuregruppe (5,63) gab (p = 0,014), wie auch zwischen der Ameisensäure- (6,98) und der Benzoessäuregruppe (5,63) (p = 0,007).

3.6. Ergebnisse der Trockenmassebestimmung in Kot und Digesta

Ergebnisse der Trockenmassebestimmungen des Kotes

Um Unterschiede sowohl im Zeitverlauf als auch gegebenenfalls zwischen den Gruppen registrieren zu können, wurde die Trockenmasse des Kots am 5., 9. und 14. Versuchstag ermittelt. Tabelle 33 zeigt für die jeweilige Gruppe die Ergebnisse in Mittelwert und Standardabweichung.

Tabelle 33: Trockenmassebestimmung des Kots am 5., 9. und 14. Tag nach dem Absetzen für die vier Versuchsgruppen [%]

	Kontrolle		Ameisensäure		Benzoessäure		Kombination	
	n ¹		n		n		n	
TM Kot 5.Tag	7	27,27 ± 5,33	7	23,29 ± 2,41	7	26,82 ± 4,22	7	30,68 ± 4,05
TM Kot 9.Tag	7	24,58 ± 5,41	7	26,75 ± 3,21	7	23,45 ± 2,65	7	26,59 ± 4,09
TM Kot 14.Tag	7	26,19 ± 2,54	7	23,09 ± 1,31	7	26,82 ± 2,53	7	25,03 ± 3,14

¹Anzahl der Tiere

Zwischen den Gruppen gab es keine signifikanten Unterschiede.

Ergebnisse der Trockenmassebestimmungen der Digesta

Die Tabelle 34 zeigt die ermittelten Trockenmassen der Digesta im Gruppenvergleich, als Mittelwerte mit Standardabweichungen.

Tabelle 34: Trockenmassebestimmung aus Digesta für die vier Versuchsgruppen [%]

	Kontrolle		Ameisensäure		Benzoessäure		Kombination	
	n ¹		n		n		n	
Magen	7	31,96 ± 4,54	7	34,38 ± 3,81	7	29,57 ± 4,16	6	33,50 ± 2,07
proximales Jejunum	3	15,10 ± 7,27	4	14,02 ± 2,19	5	11,92 ± 6,17	4	6,03 ± 1,01
distales Jejunum	7	11,45 ± 4,15	7	13,90 ± 4,19	7	12,54 ± 5,41	6	8,67 ± 5,43
Colon	7	22,15 ± 3,06	7	22,29 ± 2,05	7	20,53 ± 3,31	6	21,12 ± 2,24

¹Anzahl der Tiere

Statistisch konnte in den Magen- und Darmabschnitten im Gruppenvergleich kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Numerisch war der Trockenmassegehalt der Jejunaldigesta in der Kombinationspräparatgruppe geringer als in den übrigen Gruppen.

3.7. Ergebnisse der Hippursäurebestimmung

Um zu überprüfen, ob durch die Supplementierung von Benzoesäure im Harn der Ferkel vermehrt Hippursäure entstanden war und somit die Ammoniakausscheidung verringert werden konnte, wurden Proben aus der Harnblase direkt nach dem Tod der Tiere entnommen. Untersucht wurden nur die Kontroll-, die Benzoesäure- und die Kombinationspräparatgruppe, da bei der Ameisensäuregruppe nicht mit der Bildung von Hippursäure zu rechnen war. Die Werte lassen sich nicht als absolute Werte sondern als eine Momentaufnahme verstehen. Da weder bekannt ist wie viel Benzoesäure jedes Versuchstier vor der Tötung genau aufgenommen hat, noch wie groß die Harnabsatzmenge jedes Tieres am Versuchstag war, kann die eingesetzte Menge Benzoesäure nicht mit der Hippursäurekonzentration im Harn verglichen werden. Eine erhöhte Konzentration von Hippursäure weist lediglich auf die Bildung dieser hin.

In Tabelle 35 sind die Ergebnisse als Median mit Minimum und Maximum für die einzelnen Gruppen dargestellt.

Tabelle 35: Hippursäuregehalte im Harn für die Kontrollgruppe, Benzoesäuregruppe und Kombinationspräparatgruppe [mg/l]

	Kontrolle		Benzoesäure		Kombination	
	n ¹	Median	n	Median	n	Median
Harn	6	432,5 ^a	7	17000 ^b	6	11000 ^c
		(88 - 720)		(6348 - 23000)		(9000 - 11000)

¹Anzahl der Tiere

^{abc} Mittelwerte mit unterschiedlich hochgestellten Buchstaben innerhalb einer Zeile unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$)

Die Ergebnisse der Hippursäurebestimmung zeigten numerisch deutliche Unterschiede zwischen den Gruppen. Auch die statistischen Tests zeigten hier Signifikanzen zwischen der Kontrollgruppe und der Benzoesäuregruppe ($p = 0,03$), der Kontrollgruppe und der Kombinationspräparatgruppe ($p = 0,03$) und der Benzoesäuregruppe und der Kombinationspräparatgruppe ($p = 0,027$). Die Messwerte sind allgemein als sehr stark erhöht einzustufen.

3.8. Ergebnisse zur scheinbaren praecaecalen und scheinbaren Gesamttraktverdaulichkeit

3.8.1 Ergebnisse zur scheinbaren praecaecalen Verdaulichkeit

Die scheinbare praecaecale Verdaulichkeit beschreibt den Anteil der Nährstoffe, der nach der oralen Aufnahme bis zum Caecum verdaut worden ist. Die Unterscheidung zur scheinbaren

Gesamtraktverdaulichkeit ist wichtig, weil die Rohprotein- und Aminosäureverdaulichkeit praecaecal stattfindet.

Die Tabelle 36 veranschaulicht die Ergebnisse zur scheinbaren praecaecalen Verdaulichkeit der Rohnährstoffe (Rohasche, Rohprotein, Rohfett und Rohfaser) sowie Phosphor und Kalzium. Die Ergebnisse sind für die jeweiligen Gruppen als Mittelwerte mit Standardabweichungen dargestellt.

Tabelle 36: Scheinbare praecaecale Verdaulichkeit der Rohnährstoffe für die vier Versuchsgruppen [%]

Gruppe	Kontrolle	Ameisensäure	Benzoessäure	Kombination
n ¹	n	n	n	n
Rohasche	7 36,44 ± 4,56	7 31,91 ± 6,00	7 36,76 ± 11,04	6 36,04 ± 5,25
Rohprotein	7 79,58 ± 5,15	7 78,27 ± 3,54	7 79,70 ± 3,05	6 74,59 ± 6,85
Rohfett	7 88,57 ± 3,45	7 89,25 ± 2,37	7 90,27 ± 3,49	6 86,87 ± 2,62
Rohfaser	7 47,87 ± 11,45	7 40,35 ± 8,07	7 43,09 ± 11,92	5 40,39 ± 11,31
Phosphor	7 56,91 ± 4,54	7 56,19 ± 3,88	7 54,65 ± 4,65	6 56,63 ± 6,83
Kalzium	7 57,94 ± 8,21	7 58,20 ± 5,12	7 61,34 ± 8,19	6 66,15 ± 10,96

¹Anzahl der Tiere

Im Gruppenvergleich ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Numerisch war eine höhere Kalziumverdaulichkeit in der Kombinationspräparatgruppe (66,15%) gegenüber der Kontrollgruppe (57,94%) festzustellen.

3.8.1.1 Scheinbare praecaecale Aminosäureverdaulichkeit

Zur besseren Beurteilung der Rohproteinverdaulichkeit wurde zusätzlich die scheinbare praecaecale Aminosäureverdaulichkeit untersucht. In Tabelle 37 ist die scheinbare praecaecale Verdaulichkeit der einzelnen Aminosäuren in % als Mittelwert mit Standardabweichung aufgeführt.

Tabelle 37: Scheinbare praecaecale Aminosäurenverdaulichkeit für die vier Versuchsgruppen [%]

Gruppe	Kontrolle		Ameisensäure		Benzoessäure		Kombination	
	n ¹		n		n		n	
Asparaginsäure	7	69,7 ± 2,41	7	69,0 ± 2,19	7	69,0 ± 2,21	6	67,1 ± 4,45
Threonin	7	69,7 ± 3,17	7	70,8 ± 3,50	7	70,6 ± 1,64	6	69,6 ± 2,63
Serin	7	71,9 ± 2,05	7	70,2 ± 3,18	7	72,5 ± 1,65	6	72,0 ± 2,92
Glutaminsäure	7	81,2 ± 1,64	7	79,9 ± 1,44	7	81,8 ± 1,79	5	79,1 ± 4,13
Glycin	7	42,1 ± 11,8	7	36,2 ± 9,29	7	37,3 ± 11,2	6	31,5 ± 16,9
Alanin	7	70,8 ± 2,55	7	68,8 ± 2,85	7	69,5 ± 3,09	6	69,6 ± 2,73
Cystin	7	70,4 ± 3,96 ^a	6	66,2 ± 1,06 ^{ab}	7	67,8 ± 2,93 ^{ab}	6	64,2 ± 4,70 ^b
Valin	7	75,7 ± 3,80	7	73,6 ± 3,47	7	72,6 ± 4,31	6	74,4 ± 3,86
Methionin	7	85,1 ± 1,81 ^{ad}	6	85,6 ± 1,74 ^d	7	82,6 ± 1,10 ^{bc}	6	80,2 ± 1,46 ^{bc}
Isoleucin	7	77,1 ± 5,84	7	75,8 ± 5,32	7	74,2 ± 4,68	6	77,2 ± 4,22
Leucin	7	79,6 ± 2,82	7	78,2 ± 2,78	7	78,7 ± 2,48	6	78,6 ± 2,31
Tyrosin	7	73,6 ± 2,85	7	72,8 ± 3,18	7	69,3 ± 10,68	6	72,0 ± 1,73
Phenylalanin	7	79,9 ± 3,02	7	75,9 ± 2,33	7	72,8 ± 8,48	6	76,7 ± 1,65
Histidin	7	75,6 ± 2,20	7	73,9 ± 2,72	7	74,7 ± 1,44	6	74,2 ± 2,41
Lysin	7	82,0 ± 3,71	7	81,6 ± 2,33	7	81,1 ± 1,79	6	80,5 ± 2,87
Arginin	7	78,4 ± 3,14	7	76,6 ± 4,09	7	78,9 ± 2,64	6	77,7 ± 3,13
Prolin	7	67,1 ± 10,7	7	73,3 ± 4,70	7	77,9 ± 1,81	6	73,4 ± 14,4

¹Anzahl der Tiere^{abcd} Mittelwerte mit unterschiedlich hochgestellten Buchstaben innerhalb einer Zeile unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$)

Bei der Betrachtung der einzelnen Aminosäuren fällt auf, dass bei den Aminosäuren Cystein und Methionin signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen vorlagen. Bei der Aminosäure Cystein ist ein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der Kombinationspräparatgruppe nachweisbar ($p = 0,023$).

Die Aminosäure Methionin wies mehrere signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen auf. Signifikant unterschieden sich die Kontrollgruppe und die Benzoessäuregruppe voneinander ($p = 0,043$), ebenso die Kontrollgruppe und die Kombinationspräparatgruppe ($p < 0,0001$), die Ameisensäuregruppe und die Benzoessäuregruppe ($p = 0,015$) und die Ameisensäuregruppe und die Kombinationspräparatgruppe ($p < 0,0001$). Ein tendenzieller Unterschied lag zwischen der Benzoessäuregruppe und der Kombinationspräparatgruppe vor ($p = 0,055$).

3.8.2 Ergebnisse zur scheinbaren Gesamttraktverdaulichkeit

Die scheinbare Gesamttraktverdaulichkeit ist der Anteil eines Rohnährstoffs, der nicht wieder mit dem Kot ausgeschieden wird.

In der Tabelle **38** ist die scheinbare Gesamttraktverdaulichkeit der Rohnährstoffe sowie von Phosphor und Kalzium als Mittelwert und Standardabweichung der Rohnährstoffe in % angegeben.

Tabelle 38: Scheinbare Gesamttraktverdaulichkeit der Rohnährstoffe für die vier Versuchsgruppen [%]

Gruppe	Kontrolle	Ameisensäure	Benzoessäure	Kombination				
	n ¹	n	n	n				
Rohasche	7	45,4 ± 3,13	7	43,5 ± 4,06	6	42,0 ± 4,65	6	46,4 ± 9,16
Rohprotein	7	81,3 ± 3,29	7	79,9 ± 3,86	6	80,1 ± 3,30	6	80,0 ± 3,29
Rohfett	7	81,0 ± 5,20	7	82,2 ± 5,16	6	81,9 ± 4,25	6	85,5 ± 3,78
Rohfaser	6	28,6 ± 13,2	7	26,4 ± 12,4	6	16,3 ± 9,06	6	24,0 ± 10,8
Phosphor	7	61,8 ± 2,40	7	63,9 ± 6,15	6	60,8 ± 5,04	6	48,3 ± 24,3
Kalzium	7	61,3 ± 6,02	7	60,8 ± 9,09	6	63,5 ± 7,05	6	51,3 ± 21,9

¹Anzahl der Tiere

Zwischen den Gruppen konnten keine signifikanten Unterschiede gefunden werden. Numerisch konnten Abweichungen bei der Benzoessäuregruppe bezüglich der Rohfaser festgestellt werden. In dieser Gruppe liegt die Rohfaserverdaulichkeit mit 16,29% deutlich unter den Werten der anderen Gruppen. Auffällig ist jedoch, dass die scheinbare praecaecale Rohfaserverdaulichkeit größer ist als die scheinbare Gesamttraktverdaulichkeit. Die Ergebnisse der Phosphormessung in der Kombinationspräparatgruppe zeigen eine sehr große Streuung. Dieser Wert ist damit kaum verlässlich.

3.9. Ergebnisse zu den Koloniebildenden Einheiten (KbE) von *Escherichia coli*

Um eine quantitative Aussage über die *E.coli*-Population in den einzelnen Darmabschnitten machen zu können, wurde Material aus proximalem, distalem Jejunum und Colon entnommen und auf Endoagar angezüchtet. Tabelle **39** stellt die Ergebnisse der Auszählung nach der Anzucht als Mittelwert mit Standardabweichung im Gruppenvergleich dar. Zur Vereinfachung der Datenansicht sind die Werte in logarithmierter Form angegeben.

Tabelle 39: Koloniebildene Einheiten von *E.coli* für die vier Versuchsgruppen [log KbE/g Feuchtgewicht]

Gruppe	Kontrolle		Ameisensäure		Benzoessäure		Kombination	
	n ¹		n		n		n	
prox. Jejunum	1	2,85	0	-	2	1,35 ± 0,49	4	2,72 ± 1,61
dist. Jejunum	6	3,39 ± 1,32 ^a	3	1,43 ± 0,23 ^b	6	2,22 ± 0,72 ^{ab}	6	3,21 ± 0,97 ^{ab}
Colon	6	5,25 ± 1,27	6	3,26 ± 0,80	7	4,28 ± 2,37	6	5,18 ± 1,47

¹Anzahl der Tiere^{ab} Werte mit unterschiedlich hochgestellten Buchstaben innerhalb einer Zeile unterscheiden sich tendenziell ($p < 0,1$)

Es konnten bei den Versuchstieren nur wenig Proben aus dem proximalen Jejunum gewonnen werden, deshalb ist eine statistische Auswertung nicht möglich. Bei der Betrachtung der Proben aus dem distalen Jejunum konnte ein tendenzieller Unterschied ($p = 0,068$) zwischen der Kontroll- und der Ameisensäuregruppe festgestellt werden. Im Colon waren numerische Unterschiede festzustellen. Die Kontrollgruppe wies mit 5,25 den höchsten Wert an KbE von *E.coli* auf, während die Ameisensäuregruppe mit 3,26 einen deutlich geringeren Wert an KbE aufwies.

3.10. Ergebnisse zur Multiplex-Polymerasekettenreaktion (MPCR)

Mittels der Multiplex-PCR sollten *E.coli*-Isolate auf ihre eventuell vorhandenen Pathogenitätsgene hin untersucht werden. Tabelle 40 zeigt in einer Zusammenfassung sowohl die Anzahl der gewonnenen Isolate als auch die Anzahl der Isolate, die positiv für einen oder mehrere Pathogenitätsgene waren. Der untere Teil der Tabelle benennt die Pathogenitätsgene, die in den einzelnen Darmabschnitten (auch in Kombinationen) gefunden wurden und zeigt den Mittelwert an koloniebildenden Einheiten, aus denen diese Isolate gewonnen wurden.

Tabelle 40: Ergebnisse der MPCR zu Pathogenitätsgenen von *E.coli*

Gruppe		Kontrolle	Ameisensäure	Benzoessäure	Kombination
Anzahl der Tiere		7	7	7	6
<i>E.coli</i> -Isolate		108	74	110	131
pos. <i>E.coli</i> Isolate		7	10	13	21
Anzahl positiver Tiere		5	4	2	3
Anzahl positiver Isolate in %		6,48	13,51	11,82	16,03
Darm- abschnitt	Pathogenitäts- gene	Kontrolle	Ameisensäure	Benzoessäure	Kombination
prox Jejunum	<i>est-II</i>	-	-	-	2,2 x 10 ³
	<i>est-II</i>	6,3 x 10 ²	2,9 x 10 ¹	1 x 10 ¹	9,2 x 10 ⁴
dist. Jejunum	<i>FedA</i>	3 x 10 ⁴ (1 Tier)	-	-	-
	<i>est-II</i>	-	1,2 x 10 ³	1,4 x 10 ⁴	2 x 10 ⁵
	<i>est-II, FedA</i>	3,14 x 10 ²	2,6 x 10 ²	-	-
Colon	<i>fas</i>	1,4 x 10 ⁵ (1 Tier)	-	-	-

Bei näherer Betrachtung der Ergebnisse konnte festgestellt werden, dass in den Proben der Säuregruppen mehr positive *E.coli*-Isolate gefunden wurden als in der Kontrollgruppe. Ein Vergleich der Tieranzahl bei denen diese Isolate gefunden wurden, zeigte aber, dass in der Kontrollgruppe mehr Tiere positive Isolate aufwiesen als in den Säuregruppen. Zusätzlich ist auffällig, dass die Diversität der Pathogenitätsgene in den Säuregruppen viel geringer war als in der Kontrollgruppe. In den Säuregruppen war das *est-II* Gen dominant. Lediglich in der Ameisensäuregruppe taucht ein zweites Pathogenitätsgen auf (*FedA*), welches in Kombination mit *est-II* agiert. Im Gegensatz dazu zeigen sich in der Kontrollgruppe auf die Darmabschnitte verteilt, vier verschiedenen Kombinationen von Pathogenitätsgenen.

3.11. Ergebnisse zur Denaturierenden Gradientengelelektrophorese (DGGE)

Die Diversität der eubakteriellen Populationen im Kot und in der Digesta der Versuchstiere wurde anhand der DGGE ermittelt. Hierfür wurden verschiedene ökologische Indizes herangezogen. Berücksichtigt wurden der Speziesreichtum (Richness), die Gleichverteilung der einzelnen bakteriellen Zellen innerhalb von Populationen einer Spezies (Evenness), die Gleichverteilung individueller Spezies innerhalb der gesamten bakteriellen Population (Shannon-Index) sowie die Dominanzverhältnisse der verschiedenen Spezies in der Gesamtpopulation (Simpson-Index).

Höhere Werte von Richness, Evenness und Shannon-Index sowie niedrigere Werte beim Simpson-Index entsprechen dabei einer höheren Diversität und Homogenität der bakteriellen

Population. Als Vergleich dienten hier die Kotproben, die am 5., 9. und 14. Tag nach dem Absetzen genommen wurden, wie auch die Digestaproben vom Tötungstag.

Ergebnisse zum 5. Versuchstag nach dem Absetzen

Die folgende Tabelle **41** zeigt die errechneten ökologischen Indizes, Richness, Shannon-Index, Evenness und Simpson-Index als Mittelwerte mit Standardabweichungen. Zum Einsatz kamen die gewonnenen Kotproben, die am 5. Tag nach dem Absetzen von jedem Ferkel gesammelt wurden.

Tabelle 41: Ökologische Indizes im Kot am 5. Tag nach dem Absetzen für die vier Versuchsgruppen (n=7)

Gruppe	Kontrolle	Ameisensäure	Benzoessäure	Kombination
Richness	28,4 ± 4,65	25,6 ± 6,85	27,6 ± 9,83	33,4 ± 16,6
Shannon- Index	3,25 ± 0,20	2,87 ± 0,80	3,19 ± 0,39	3,41 ± 0,94
Evenness	0,97 ± 0,03	0,89 ± 0,24	0,98 ± 0,01	1,00 ± 0,11
Simpson- Index	0,04 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,02	0,06 ± 0,06

Zwischen den einzelnen Gruppen ergaben sich für keinen der ökologischen Indizes signifikante Unterschiede.

Ergebnisse zum 9. Versuchstag nach dem Absetzen

In der unten aufgeführten Tabelle **42** sind die Ergebnisse der ökologischen Indizes für den Kot der Tiere am 9. Versuchstag als Mittelwerte mit Standardabweichung aufgeführt. Die Versuchstieranzahl betrug in jeder Gruppe 7 Tiere.

Tabelle 42: Ökologische Indizes im Kot am 9. Tag nach dem Absetzen für die vier Versuchsgruppen (n =7)

Gruppe	Kontrolle	Ameisensäure	Benzoessäure	Kombination
Richness	18,1 ± 5,87	22,6 ± 8,16	18,4 ± 4,69	19,7 ± 8,60
Shannon- Index	2,39 ± 0,33	2,45 ± 0,38	2,49 ± 0,26	1,94 ± 0,95
Evenness	0,84 ± 0,08 ^{ab}	0,80 ± 0,10 ^{ab}	0,87 ± 0,07 ^a	0,68 ± 0,22 ^b
Simpson- Index	0,12 ± 0,04	0,12 ± 0,06	0,12 ± 0,05	0,24 ± 0,26

^{ab} Werte mit unterschiedlich hochgestellten Buchstaben innerhalb einer Zeile unterscheiden sich tendenziell (p < 0,1)

Am 9. Versuchstag konnte ein tendenzieller Unterschied beim Evennesswert zwischen der Benzoessäure- und der Kombinationspräparatgruppe festgestellt werden (p = 0,08). Alle weiteren Indizes waren ohne signifikanten Unterschied.

Ergebnisse zum 14. Versuchstag nach dem Absetzen

In der unten aufgeführten Tabelle **43** sind die Ergebnisse der ökologischen Indizes für den Kot der Tiere am 14. Versuchstag als Mittelwerte mit Standardabweichung aufgeführt. Die Versuchstieranzahl betrug für jede Gruppe 7 Tiere.

Tabelle 43: Ökologische Indizes im Kot am 14. Tag nach dem Absetzen für die vier Versuchsgruppen (n=7)

Gruppe	Kontrolle	Ameisensäure	Benzoessäure	Kombination
Richness	25,0 ± 5,54	25,1 ± 10,46	21,4 ± 6,35	27,7 ± 3,77
Shannon- Index	2,27 ± 0,46 ^a	2,27 ± 0,43 ^a	2,37 ± 0,69 ^{ab}	3,00 ± 0,30 ^b
Evenness	0,71 ± 0,15	0,74 ± 0,18	0,78 ± 0,20	0,91 ± 0,07
Simpson- Index	0,11 ± 0,03 ^a	0,10 ± 0,04 ^{ab}	0,10 ± 0,03 ^{ab}	0,06 ± 0,02 ^b

^{ab} Werte mit unterschiedlich hochgestellten Buchstaben innerhalb einer Zeile unterscheiden sich tendenziell ($p < 0,1$)

Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen konnten nicht gefunden werden, jedoch gab es Tendenzen. Beim Shannon-Index lag ein tendenzieller Unterschied zwischen der Kontroll- und der Kombinationspräparatgruppe ($p = 0,059$) vor. Ebenso zwischen der Ameisensäuregruppe und der Kombinationspräparatgruppe ($p = 0,057$).

Ein weiterer tendenzieller Unterschied fand sich beim Simpson-Index zwischen der Kontroll- und der Kombinationspräparatgruppe ($p = 0,058$).

3.11.1 Ökologische Indizes im Zeitverlauf

Die folgenden Abbildungen **4-11** sollen einen Eindruck von der Entwicklung der einzelnen ökologischen Indizes für ein Zeitfenster vom 5. Tag bis zum 14. Tag nach dem Absetzen vermitteln.

Richness

Die Abbildungen **4** und **5** zeigen die Mittelwerte für Richness als Liniendiagramm. Die Mittelwerte jeder Gruppe sind mit Linien verbunden, um einen Zeitverlauf vom 5. bis zum 14. Tag nach dem Absetzen darzustellen. Zur Übersichtlichkeit sind jeweils nur zwei Gruppen in einer Graphik zusammengefasst. Auf der ersten Abbildung (**Abbildung 4**) stellt die schwarze durchgehende Linie die Kontrollgruppe und die graue gestrichelte Linie stellt die Ameisensäuregruppe dar. Auf der zweiten Abbildung (**Abbildung 5**) werden die Benzoessäuregruppe von der schwarzen durchgezogenen Linie und die Kombinationspräparatgruppe von der grauen gestrichelten Linie dargestellt.

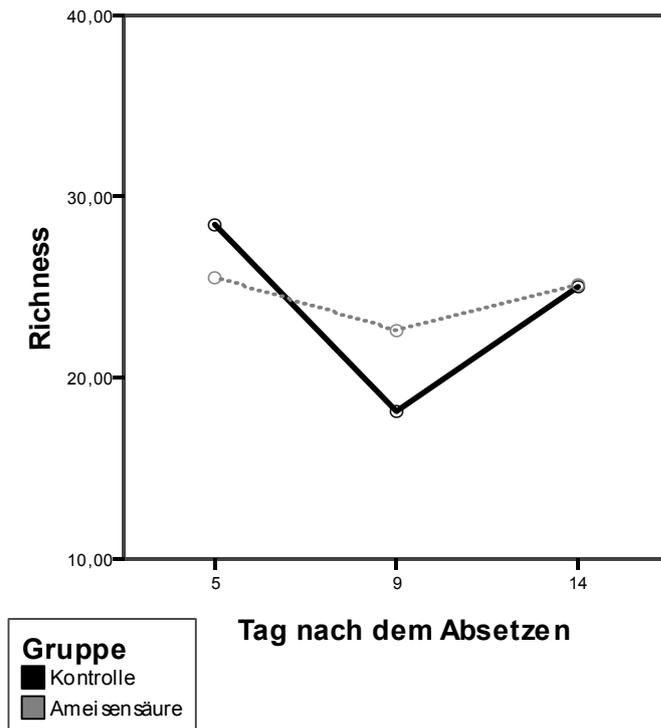


Abbildung 4: Richnesswerte der Kontroll- und Ameisensäuregruppe im Zeitverlauf vom 5. bis zum 14. Tag nach dem Absetzen

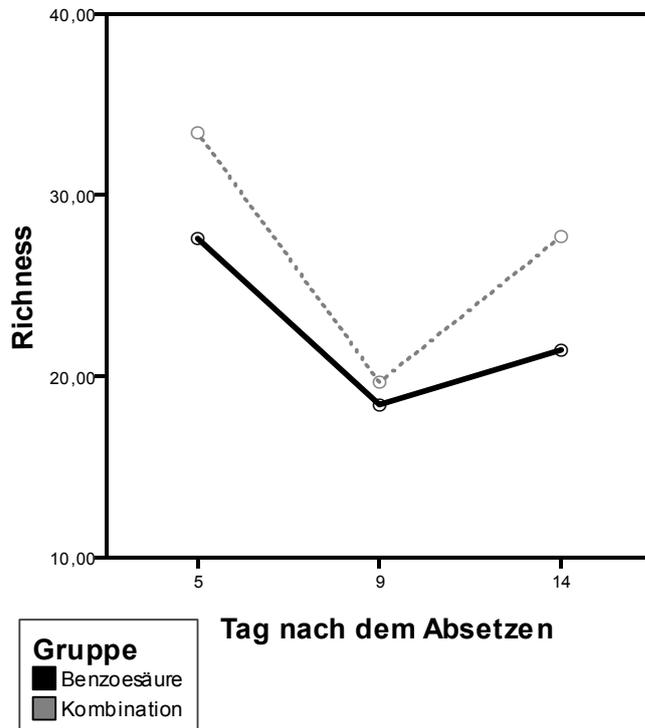


Abbildung 5: Richnesswerte der Benzoessäure- und Kombinationsgruppe im Zeitverlauf vom 5. bis zum 14. Tag nach dem Absetzen

Am 5. Tag nach dem Absetzen waren in der Kombinationspräparatgruppe höhere Richnesswerte zu verzeichnen als in den übrigen Gruppen. Am 9. Tag nach dem Absetzen kam es in der Kontroll-, Benzoessäure- und Kombinationspräparatgruppe zu einem Abfall der Richnesswerte, während dann am 14. Tag nach dem Absetzen die Richnesswerte in diesen drei genannten Gruppen wieder anstiegen, jedoch nicht den Ausgangswert vom 5. Tag erreichten. In der Ameisensäuregruppe ist der Richnesswert fast gleichbleibend. Am 9. Tag konnte auch hier ein leichter Abfall beobachtet werden, der jedoch sehr viel schwächer ausgeprägt war als bei den übrigen Gruppen. Der Wert vom 14. Tag war in der Ameisensäuregruppe der einzige, der den Richnesswert vom 5. Tag überstieg.

Shannon-Index

In der folgenden Abbildung 6 und 7 sind die Mittelwerte des Shannon-Index für jede Gruppe als Liniendiagramm dargestellt. Die Mittelwerte sind durch eine Linie miteinander verbunden, um einen Zeitverlauf (5. - 14. Tag nach dem Absetzen) darzustellen.

Auf der ersten Abbildung (**Abbildung 6**) stellt die schwarze durchgehende Linie die Kontrollgruppe und die graue gestrichelte Linie die Ameisensäuregruppe dar. Auf der zweiten Abbildung (**Abbildung 7**) werden die Benzoessäuregruppe von der schwarzen durchgezogenen Linie und die Kombinationspräparatgruppe von der grauen gestrichelten Linie dargestellt.

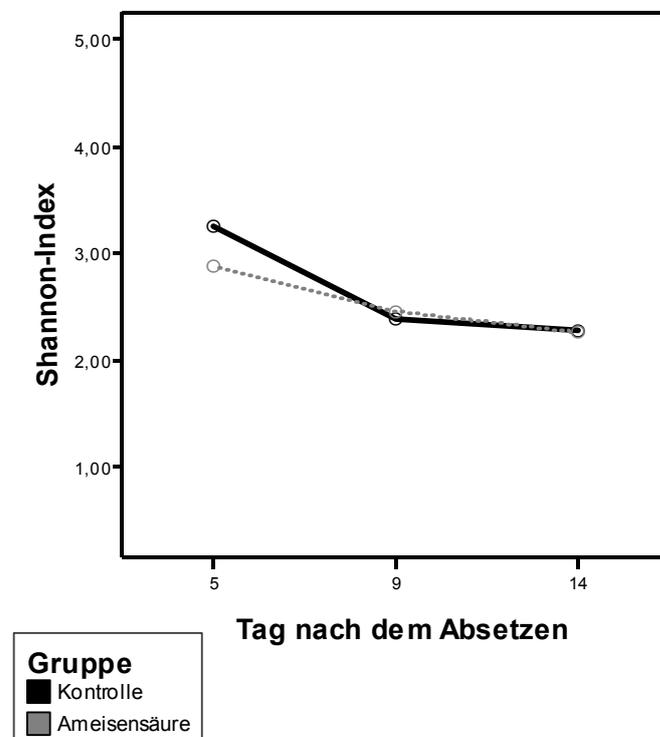


Abbildung 6: Shannon-Indizes der Kontroll- und Ameisensäuregruppe im Zeitverlauf vom 5. bis zum 14. Tag nach dem Absetzen

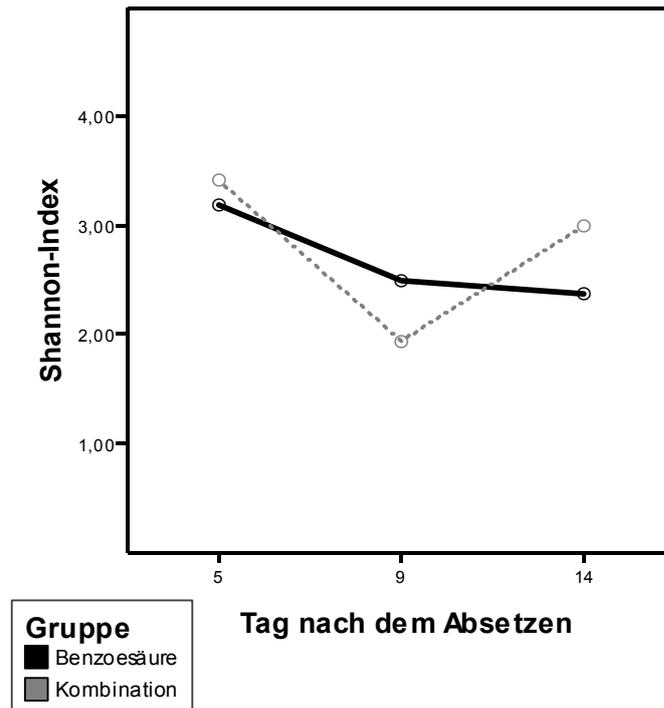


Abbildung 7: Shannon-Indizes der Kontroll- und Ameisensäuregruppe im Zeitverlauf vom 5. bis zum 14. Tag nach dem Absetzen

Die Kontroll-, Ameisensäure- und Benzoessäuregruppen zeigten einen deutlichen Abfall des Shannon-Index vom 5. bis zum 14. Tag nach dem Absetzen. Bei der Kombinationspräparatgruppe kam es vom 5. zum 9. Tag zu einem starken Abfall und am 14. Tag wieder zu einem starken Anstieg des Shannon-Index. Damit ergab sich für den Zeitverlauf in der Kombinationspräparatgruppe ein anderes Muster als für die anderen Gruppen. Auch der Endwert liegt mit 3,00 höher als in den anderen Gruppen.

Evenness

In der unten aufgeführten Abbildung 8 und 9, sind die Evennesswerte für die vier Versuchsgruppen als Mittelwerte dargestellt. Die Mittelwerte der jeweiligen Gruppe sind durch Linien verbunden, um einen Zeitverlauf vom 5. bis zum 14. Tag nach dem Absetzen darzustellen.

Auf der ersten Abbildung (**Abbildung 8**) stellt die schwarze durchgehende Linie die Kontrollgruppe und die graue gestrichelte Linie die Ameisensäuregruppe dar. Auf der zweiten Abbildung (**Abbildung 9**) werden die Benzoessäuregruppe von der schwarzen durchgezogenen Linie und die Kombinationspräparatgruppe von der grauen gestrichelten Linie dargestellt.

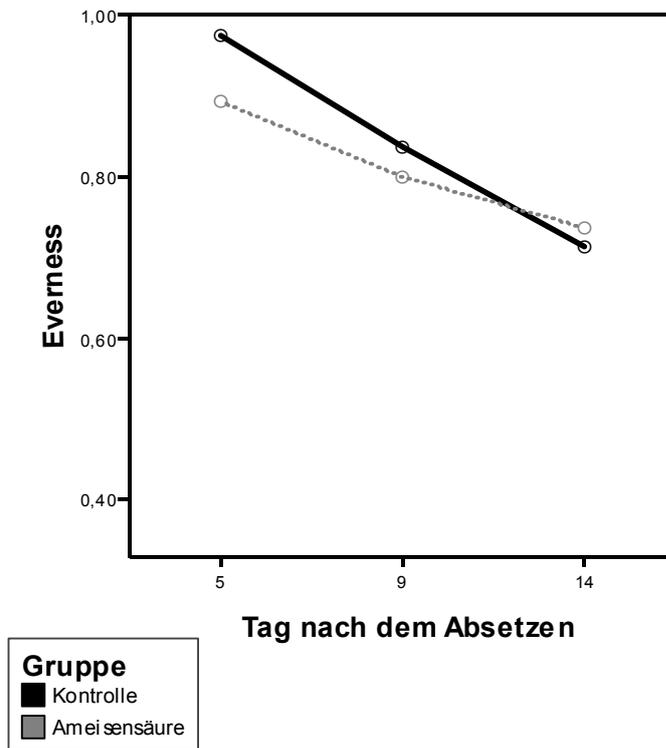


Abbildung 8: Evennesswerte der Kontroll- und Ameisensäuregruppe im Zeitverlauf vom 5. bis zum 14. Tag nach dem Absetzen

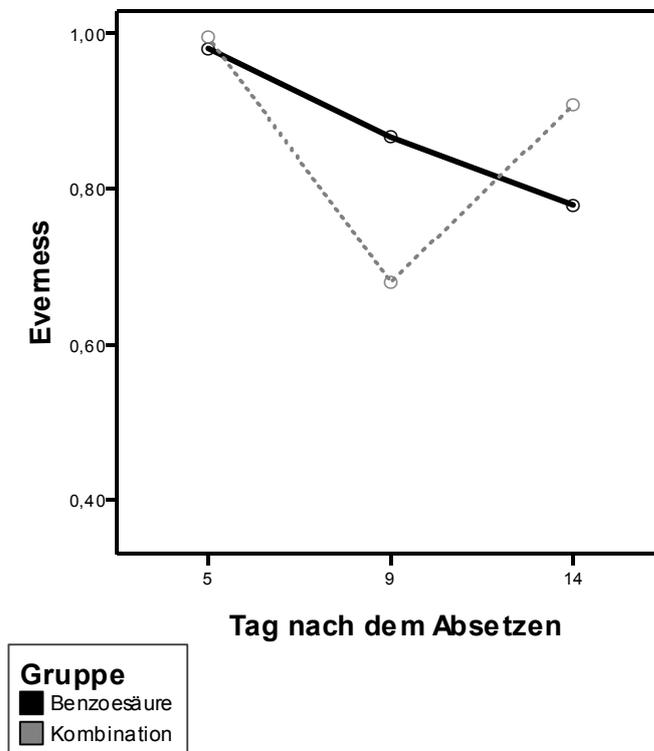


Abbildung 9: Evennesswerte der Benzoessäure- und Kombinationsgruppe im Zeitverlauf vom 5. bis zum 14. Tag nach dem Absetzen

In der Kontroll-, Ameisensäure- und Benzoesäuregruppe war ein stetiger Abfall des Evennesswertes vom 5. bis zum 14. Tag nach dem Absetzen zu beobachten. Im Gegensatz dazu war bei der Kombinationspräparatgruppe vom 5. zum 9. Tag nach dem Absetzen ein starker Abfall des Evennesswertes zu bemerken. Am 14. Tag jedoch stieg der Evennesswert wieder stark an, bis er fast den ursprünglichen Wert (5. Tag 0,97 und 14. Tag. 0,98) erreichte. Damit unterschied sich die Kombinationspräparatgruppe im Muster ihres Zeitverlaufs deutlich von den anderen Gruppen.

Simpson-Index

In der Abbildungen **10** und **11** sind die Simpson-Indizes für die vier Gruppen als Mittelwerte im Liniendiagramm dargestellt. Durch die verbundenen Mittelwerte wird der Zeitverlauf vom 5. bis zum 14. Tag nach dem Absetzen dargestellt. Auf der ersten Abbildung (**Abbildung 10**) stellt die schwarze durchgehende Linie die Kontrollgruppe und die graue gestrichelte Linie die Ameisensäuregruppe dar.

Auf der zweiten Abbildung (**Abbildung 11**) werden die Benzoesäuregruppe von der schwarzen durchgezogenen Linie und die Kombinationspräparatgruppe von der grauen gestrichelten Linie dargestellt.

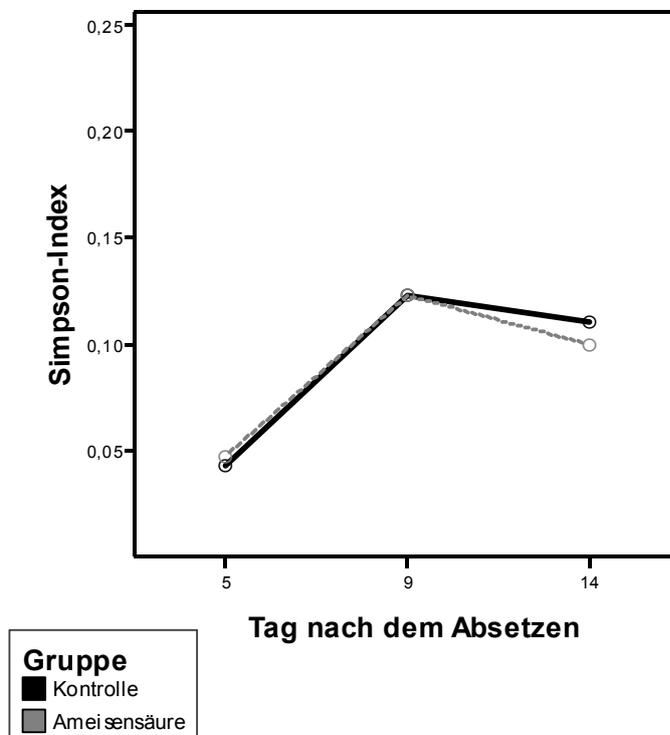


Abbildung 10: Simpson-Indizes der Kontroll- und Ameisensäuregruppe im Zeitverlauf vom 5. bis zum 14. Tag nach dem Absetzen

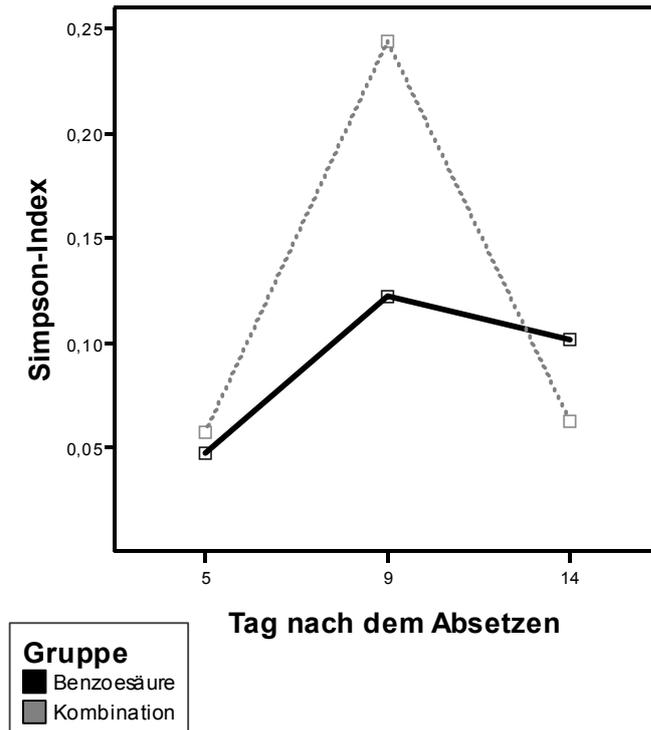


Abbildung 11: Simpson-Indizes der Kontroll- und Ameisensäuregruppe im Zeitverlauf vom 5. bis zum 14. Tag nach dem Absetzen

Die Werte des Simpson-Index stiegen in allen vier Gruppen vom 5. zum 9. Tag hin an. Ein besonders starker Anstieg ist in der Kombinationspräparatgruppe zu beobachten. Zum 14. Tag hin zeigten die Simpson-Indizes der Kontroll-, Ameisensäure und Benzoessäuregruppe wieder eine leichte Senkung. In der Kombinationspräparatgruppe kam es vom 9. zum 14. Tag zu einem sehr starken Abfall des Simpson-Index, so dass wieder der Ursprungswert vom 5. Tag erreicht wurde (0,06).

Sörensen-Quotient

Der Sörensen-Quotient dient dem einfachen Vergleich von Artengemeinschaften. Der Vergleich findet hier zwischen den Gruppen statt. Je höher der Sörensen-Quotient ist (bis 1), umso größer ist auch die Ähnlichkeit der Artenzusammensetzung. In Tabelle 44 sind die Sörensen-Werte für die Kotproben der Tage 5, 9 und 14 als Mittelwerte mit Standardabweichungen als Vergleich zwischen den Gruppen aufgeführt.

In diese statistische Auswertung gingen für die Gruppenvergleiche derselben Gruppe (z.B. A und A) je 21 gültige Fälle und für die Gruppenvergleiche der Gruppen untereinander (z.B. A und B) je 49 gültige Fälle ein.

Der Übersichtlichkeit halber sind die einzelnen Gruppen mit den Buchstaben A, B, C und D codiert. (A= Kontrollgruppe, B= Ameisensäuregruppe, C= Benzoessäuregruppe, D= Kombinationspräparatgruppe)

Die Tabelle 44 zeigt den Sörensen-Quotient im Gruppenvergleich am 5., 9. und 14. Tag. Der Vergleich am 5. und 9. Versuchstag zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Am 14. Tag gab es jedoch signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppenvergleichen. So lag der Sörensen-Quotient bei A und A numerisch höher als bei B und B, C und C sowie D und D. In der Kontrollgruppe war demnach die Ähnlichkeit der Bakterienpopulation größer als in den Säuregruppen.

Tabelle 44: Der Sörensen-Quotient im Gruppenvergleich aus Kot am 5., 9. und 14. Tag

	A und A	B und B	C und C	D und D	A und B	A und C	A und D	B und C	B und D	C und D
Sörensen 5.Tag	0,52 ± 0,08	0,46 ± 0,11	0,46 ± 0,11	0,47 ± 0,15	0,52 ± 0,09	0,50 ± 0,10	0,51 ± 0,12	0,48 ± 0,11	0,47 ± 0,12	0,48 ± 0,14
Sörensen 9.Tag	0,46 ± 0,11	0,46 ± 0,10	0,45 ± 0,13	0,41 ± 0,20	0,41 ± 0,09	0,42 ± 0,12	0,41 ± 0,14	0,45 ± 0,12	0,43 ± 0,12	0,43 ± 0,15
Sörensen 14.Tag	0,53 ± 0,09 ^a	0,50 ± 0,11 ^{ab}	0,45 ± 0,16 ^{ab}	0,51 ± 0,11 ^a	0,51 ± 0,09 ^a	0,48 ± 0,11 ^{ab}	0,45 ± 0,10 ^{ab}	0,46 ± 0,12 ^{ab}	0,42 ± 0,10 ^b	0,41 ± 0,10 ^b

^{ab} Mittelwerte mit unterschiedlich hochgestellten Buchstaben unterscheiden sich signifikant

A = Kontrollgruppe, B = Ameisensäuregruppe, C = Benzoessäuregruppe

D = Kombinationspräparatgruppe

Die folgende Tabelle 45 zeigt detailliert die signifikanten Unterschiede zwischen den Sörensen-Quotienten sowie Tendenzen am 14. Tag.

Tabelle 45: Signifikante und tendenzielle Unterschiede des Sörensen-Quotienten aus den Kotproben am 14. Tag

Signifikanter Unterschied	p	tendenzieller Unterschied	p
A u. A ↔ B u. D.	0,005	B u. B ↔ C u. D	0,082
A u. A ↔ C u. D.	0,001	D u. D ↔ B u. D	0,077
D u. D ↔ C u. D	0,021	A u. C ↔ C u. D	0,068
A u. B ↔ B u. D	0,001		
A u. B ↔ C u. D	≤ 0,001		

A = Kontrollgruppe, B = Ameisensäuregruppe, C = Benzoessäuregruppe

D = Kombinationspräparatgruppe

3.11.2 Ergebnisse der DGGE in Digestproben

Die Untersuchung der Proben aus dem Magen und Jejunum der Versuchstiere brachten keine auswertbaren Banden, deshalb sollen hier nur die Ergebnisse aus den Colonproben besprochen werden.

Die berechneten ökologischen Indizes für die Colonproben sind in der Tabelle 46 als Mittelwerte mit Standardabweichungen aufgeführt. Die Versuchstieranzahl betrug in der Kontroll-, Ameisensäure- und Benzoesäuregruppe je 7 Tiere. In der Kombinationspräparatgruppe betrug die Versuchstieranzahl 6 Tiere.

Tabelle 46: Ökologische Indizes der bakteriellen Besiedlung im Colon in den Versuchsgruppen

Gruppe	Kontrolle		Ameisensäure		Benzoesäure		Kombination	
	n ¹		n		n		n	
Richness	7	20,0 ± 11,93	7	9,57 ± 6,58	7	14,5 ± 8,42	6	13,8 ± 8,93
Shannon-Index	7	2,35 ± 0,77	7	1,56 ± 0,62	7	2,03 ± 0,75	6	1,87 ± 0,68
Evenness	7	0,85 ± 0,08	7	0,80 ± 0,17	7	0,83 ± 0,11	6	0,82 ± 0,12
Simpson-Index	7	0,16 ± 0,13	7	0,29 ± 0,13	7	0,21 ± 0,17	6	0,22 ± 0,16

¹Anzahl der Tiere

Die hier berechneten ökologischen Indizes wiesen im Gruppenvergleich keine signifikanten Unterschiede auf. Es ist jedoch deutlich, dass ein numerischer Unterschied besteht zwischen der Kontrollgruppe und den Säuregruppen. Die Werte für Richness, Shannon-Index und Evenness lagen in der erst genannten Gruppe höher als bei den Säuregruppen, während der Simpson-Index in der Kontrollgruppe deutlich niedriger lag als in den Säuregruppen.

Sörensen-Quotient

Der Sörensen-Quotient dient dem Vergleich der Ähnlichkeit zwischen den Gruppen. In Tabelle 47 sind die Sörensen-Quotienten als Mittelwerte mit Standardabweichungen dargestellt. Da ein Tier aus der Kombinationspräparatgruppe am Tag vor der Tötung verstarb, konnten von diesem keine Digestproben gesammelt werden. Aus diesem Grund gibt es keine einheitliche Anzahl an gültigen Fällen.

Der Übersichtlichkeit halber sind die einzelnen Gruppen mit den Buchstaben A, B, C und D codiert. (A = Kontrollgruppe, B = Ameisensäuregruppe, C = Benzoesäuregruppe, D = Kombinationspräparatgruppe)

Tabelle 47: Sörensen-Quotienten im Gruppenvergleich aus den Colonproben

	n ¹	A und A	n	B und B	n	C und C	n	D und D	n	A und B
Sörensen Colon	21	0,37	21	0,33	21	0,36	15	0,36	49	0,35
		± 0,13		± 0,16		± 0,12		± 0,15		± 0,15

	n	A und C	n	A und D	n	B und C	n	B und D	n	C und D
Sörensen Colon	49	0,35	42	0,35	49	0,34	42	0,31	42	0,33
		± 0,15		± 0,15		± 0,15		± 0,14		± 0,14

¹Anzahl der Tiere

A= Kontrollgruppe, B= Ameisensäuregruppe, C= Benzoesäuregruppe, D= Kombinationspräparatgruppe

Für den Sörensen-Quotient wurden im Vergleich der Gruppen keine signifikanten Unterschiede gefunden.

3.12. Ergebnisse der Realtime-Polymerasekettenreaktion (Realtime-PCR)

Ergebnisse der Realtime-PCR aus dem Magen

Um eine quantitative Aussage über die Zusammensetzung der bakteriellen Bakteriengemeinschaft in den einzelnen Darmabschnitten machen zu können, wurden die DNA-Extrakte, die aus Digestamaterial gewonnen wurden, auf verschiedene Bakteriengruppenspezies sowie Pathogenitätsfaktoren von *E.coli* untersucht. Die Tabelle 48 zeigt die Ergebnisse der Realtime-PCR aus den DNA-Extrakten des Mageninhalts.

Tabelle 48: Ergebnisse der Realtime-PCR aus Mageninhalt [log₁₀ Zellzahl] und der Verhältnisse [%]

Gruppen	Kontrolle		Ameisensäure		Benzoessäure		Kombination	
	n ¹	Median	n	Median	n	Median	n	Median
Eubakterien	3	7,21 (6,47 - 8,42)	6	7,62 (6,43 - 8,01)	7	7,32 (6,63 - 8,05)	3	7,44 (7,24 - 7,83)
<i>Lactobacillus spp.</i>	2	6,53 (5,52 - 7,55)	6	5,73 (3,75 - 6,24)	7	5,52 (4,72 - 7,05)	4	5,06 (3,59 - 7,42)
Verhältnis <i>Lact/Eub.</i> [%]	2	7,77 (2,03 - 13,5)	6	1,16 (0,08 - 13,6)	7	5,4 (0,48 - 10,3)	3	0,72 (0,38 - 38,3)
<i>Escherichia spp.</i>	7	5,53 (5,40 - 6,85)	7	5,59 (4,47 - 6,04)	6	5,25 (4,91 - 5,56)	5	5,7 (5,11 - 5,89)
Verhältnis <i>Escher/Eub.</i> [%]	3	4,74 (2,69 - 8,39)	6	1,49 (0,07 - 12,8)	6	1,31 (0,32 - 1,94)	2	0,75 (0,74 - 0,75)
<i>elt-IA</i>	6	3,97 (3,23 - 4,39)	6	4,00 (3,39 - 4,36)	7	4,06 (2,37 - 4,31)	6	3,54 (2,46 - 4,21)
Verhältnis <i>elt-IA/Escher.</i> [%]	6	2,39 (0,11 - 7,72)	6	1,54 (1,04 - 76,2)	6	2,8 (0,28 - 13,8)	5	0,91 (0,19 - 4,45)
<i>est-II</i>	1	2,41 (2,41)	3	2,23 (1,78 - 2,34)	4	1,91 (1,54 - 2,38)	1	2,62 (2,62)
Verhältnis <i>est-II/Escher.</i> [%]	1	0,004 (0,004)	3	0,02 (0,01 - 0,044)	3	0,043 (0,015 - 0,066)	1	0,081 (0,081)

¹Anzahl der positiven Proben

Aufgrund der teilweise sehr geringen Anzahl von positiven Proben konnten keine statistischen Tests durchgeführt werden. Numerisch lassen sich jedoch Unterschiede in den einzelnen Gruppen feststellen. So ist das *Lactobacillus spp./Eubakterien*-Verhältnis in der Ameisensäure- und der Kombinationspräparatgruppe geringer als in den übrigen Gruppen. Ebenso zeigt sich numerisch das Verhältnis von *Escherichia spp./Eubakterien* in den Säuregruppen als geringer als in der Kontrollgruppe. Numerisch lässt sich auch ein Unterschied feststellen im Verhältnis *elt-IA/Escherichia spp.*. Die Kombinationspräparatgruppe zeigt einen kleineren Wert als die übrigen Gruppen. Bei der Betrachtung der positiven Fälle konnte festgestellt werden, dass in der Kontrollgruppe weniger *Lactobacillus spp.* im Magen zu finden waren als in den Säuregruppen, diese beiden Proben jedoch numerisch höher lagen als die der Säuregruppen. Auch bei den Pathogenitätsfaktoren von *E.coli* wurde für *est-II* in der Kontroll- und

Kombinationspräparatgruppe nur eine positive Probe gefunden. Diese Probe wies jedoch jeweils höhere Werte auf als die Proben aus der Ameisensäure- und Benzoesäuregruppe insgesamt.

Ergebnisse der Realtime-PCR aus dem distalen Jejunum

Die Tabelle 49 stellt die Ergebnisse der Realtime-PCR der DNA-Extrakte aus dem distalen Jejunum dar.

Tabelle 49: Ergebnisse der Realtime-PCR aus distalem Jejunuminhalt [log₁₀ Zellzahl] und der Verhältnisse [%]

Gruppen	Kontrolle	Ameisensäure	Benzoesäure	Kombination
	n ¹ Median	n Median	n Median	n Median
Eubakterien	6 7,91 (6,63 - 8,91)	6 7,69 (6,63 - 8,30)	7 6,62 (6,03 - 8,80)	4 7,49 (7,03 - 8,09)
<i>Lactobacillus spp.</i>	7 6,93 (3,73 - 7,64)	6 6,57 (4,10 - 7,76)	7 5,6 (3,38 - 7,50)	5 5,81 (2,71 - 7,08)
Verhältnis <i>Lact./Eub.</i> [%]	6 2,33 (0,06 - 40,9)	6 27,51 (0,14 - 43,7)	7 1,76 (0,06 - 30,0)	4 6,63 (1,38 - 14,2)
<i>Escherichia spp.</i>	7 6,78 (4,71 - 7,69)	6 5,59 (5,46 - 6,90)	7 6,03 (5,38 - 6,68)	6 6,3 (5,94 - 7,67)
Verhältnis <i>Escher./Eub.</i> [%]	6 12,1 (0,08 - 56,8)	5 0,3 (0,19 - 7,71)	7 22,6 (0,41 - 127)	4 24,3 (3,29 - 443)
<i>elt-IA</i>	6 4,13 (3,44 - 4,93)	7 3,93 (3,49 - 4,38)	7 4,33 (3,40 - 4,83)	4 4,05 (3,57 - 4,26)
Verhältnis <i>elt-IA/Escher.</i> [%]	6 0,14 (0,03 - 55,1)	6 1,59 (0,13 - 8,31)	7 1,58 (0,08 - 28,0)	4 0,41 (0,04 - 0,92)
<i>est-II</i>	4 3,23 (2,63 - 4,23)	3 2,58 (1,16 - 2,72)	5 3,04 (2,07 - 3,87)	5 2,52 (1,50 - 6,23)
Verhältnis <i>est-II/Escher</i> [%]	4 0,031 (0,002 - 0,073)	3 0,092 (0,002 - 0,178)	5 0,158 (0,03 - 0,45)	5 0,009 (0,002 - 3,63)

¹Anzahl der positiven Proben

Auch bei der Untersuchung der distalen Jejunumproben auf quantitative Unterschiede verschiedener Bakterienspezies und Pathogenitätsfaktoren von *E.coli* konnten statistisch keine signifikanten Unterschiede gefunden werden. Die Anzahl der *Lactobacillus spp.*-positiven Proben war in der Kontroll- und Kombinationspräparatgruppe höher als im Magen. Auch die Zahl der Eubakterien und *est-II*-positiven Proben ist in diesen beiden Gruppen im Gegensatz zum Magen deutlich gestiegen.

Ergebnisse der Realtime-PCR aus dem Colon

In der unten aufgeführten Tabelle 50 sind die Ergebnisse der Realtime-PCR der DNA-Extrakte aus dem Coloninhalt in zur Basis 10 logarithmierter Form als Median mit Minimum- und Maximumangabe aufgeführt.

Tabelle 50: Ergebnisse der Realtime-PCR aus Colon [log₁₀ Zellzahl] und der Verhältnisse [%]

Gruppen	Kontrolle		Ameisensäure		Benzoessäure		Kombination	
	n ¹	Median	n	Median	n	Median	n	Median
Eubakterien	5	9,84 (9,05 - 11,0)	7	9,75 (7,94 - 10,5)	5	9,33 (8,29 - 10,1)	6	8,85 (7,72 - 10,5)
<i>Lactobacillus spp.</i>	5	7,14 (4,29 - 7,62)	7	6,3 (4,38 - 7,77)	5	5,44 (4,57 - 7,49)	6	5,61 (5,02 - 7,78)
Verhältnis <i>Lact./Eub.</i> [%]	5	0,04 (0 - 0,21)	7	0,04 (0,03 - 0,21)	5	0,02 (0 - 0,29)	6	0,075 (0,01 - 0,35)
<i>Escherichia spp.</i>	7	7,13 ^{ab} (6,31 - 8,98)	7	6,39 ^a (6,05 - 7,57)	7	7,48 ^b (6,77 - 8,54)	6	7,67 ^b (7,15 - 9,32)
Verhältnis <i>Escher./Eub.</i> [%]	5	0,18 ^{ab} (0,01 - 16,66)	7	0,02 ^a (0 - 42,05)	5	1,48 ^{ab} (0,05 - 15,21)	6	8,39 ^b (1,99 - 52,55)
<i>elt-IA</i>	4	3,68 ^a (1,70 - 4,06)	6	3,53 ^a (2,82 - 3,79)	4	3,33 ^a (2,93 - 3,45)	5	4,44 ^b (3,86 - 4,61)
Verhältnis <i>elt-IA/Escher.</i> [%]	4	0 ^a (0 - 0,03)	6	0,195 ^b (0 - 0,55)	4	0,005 ^a (0 - 0,04)	5	0,04 ^{ab} (0 - 0,2)
<i>est-II</i>	2	1,87 (1,42 - 2,32)	3	1,77 (1,28 - 2,03)	2	1,44 (0,87 - 2,01)	5	2,88 (1,77 - 7,66)
Verhältnis <i>est-II/Escher.</i> [%]	2	0,001 (0 - 0,002)	3	0,005 (0,002 - 0,01)	2	0 (0 - 0)	5	0,004 (0 - 5,06)

¹ Anzahl der positiven Proben

^{ab} Mediane mit unterschiedlich hochgestellten Buchstaben innerhalb einer Zeile unterscheiden sich signifikant (p < 0,05)

Bei dieser Untersuchung ergaben sich einige signifikante und tendenzielle Unterschiede zwischen den Gruppen. Bei der Betrachtung der *Escherichia spp.* bestand ein signifikanter Unterschied zwischen der Ameisensäure- und Benzoessäuregruppe (p = 0,025), sowie zwischen der Ameisensäure- und der Kombinationspräparatgruppe (p = 0,015) und ein tendenzieller Unterschied zwischen der Kontroll- und der Ameisensäuregruppe (p = 0,064). Das Verhältnis der *Escherichia spp.* zu den Eubakterien unterschied sich signifikant zwischen der Ameisensäure- und Kombinationspräparatgruppe (p = 0,022).

Bei der Untersuchung des Pathogenitätsfaktors *elt-IA* zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen der Kontroll- und der Kombinationspräparatgruppe ($p = 0,05$), zwischen der Ameisensäure- und der Kombinationspräparatgruppe ($p = 0,006$) sowie zwischen der Benzoe- und Kombinationspräparatgruppe ($p = 0,014$).

Das Verhältnis von positiven Proben mit dem Pathogenitätsfaktor *elt-IA* zur *Escherichia spp.* wies signifikante Unterschiede zwischen der Kontroll- und Ameisensäuregruppe ($p = 0,037$) und der Ameisensäure- und Benzoesäuregruppe ($p = 0,052$), sowie tendenziell zwischen der Kontroll- und Kombinationspräparatgruppe ($p = 0,071$) auf.

4. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung verschiedener organischer Säuren als Futterzusatzstoff bei früh abgesetzten Ferkeln (23.Tag) und deren Einfluss auf die intestinale Mikrobiota. Weiterhin sollten Effekte auf den Gesundheitsstatus und die Kondition beobachtet werden. Zusätzlich sollte geklärt werden, ob einzelne Fütterungssäuren oder Kombinationen aus mehreren Säuren unterschiedliche Effekte ausüben. Auch war die Frage zu klären, wie hoch der Anteil der supplementierten Säure war, der in der Digesta des Verdauungstraktes dem tierischen Organismus zur Verfügung stand, sowie die Frage nach möglichen Einflüssen der Futterzulagen auf die Chymusqualität und –zusammensetzung. Über den Nachweis der Konzentrationen mikrobiell gebildeter Metaboliten in der Digesta erfolgte eine indirekte Bestimmung der Effekte auf die intestinale Mikrobiota. Eine Feststellung der direkten Auswirkung der Futterzusätze auf die bakterielle Zusammensetzung (Bakterienzahl und –diversität) wurde über mikro- und molekularbiologische Untersuchungen durchgeführt. Durch molekularbiologische Methoden (Denaturierende Gradientengelelektrophorese = DGGE; Realtime-PCR) und die Analyse der bakteriellen Stoffwechselaktivitäten sollte geklärt werden, inwieweit organische Säuren einen qualitativen und quantitativen Einfluss auf die bakterielle Zusammensetzung der Mikrobiota des Verdauungstraktes haben.

Um eine praxisnahe Studie durchzuführen, wurde beim Einsatz der Säuren auf die vorgeschriebenen Höchstmengen geachtet (Benzoessäure nach der EU-Verordnung (EG) Nr. 1730/2006; Ameisensäure und Zitronensäure laut Futtermittelzusatzstoffverordnung Anhang II der Richtlinie 70/524/EWG 1). Prinzipiell muss beim Einsatz von Futterzusatzstoffen die wirtschaftliche Rentabilität beachtet werden. Ein Futterzusatzstoff der in seiner Anschaffung teurer ist als letztendlich an tierischem Produkt zu erwirtschaften ist, wird in der Praxis keine Anwendung finden.

Da das frühe Absetzalter ebenfalls von wirtschaftlichem Interesse ist, früh abgesetzten Ferkeln jedoch die Möglichkeit der Azidierung ihres Mageninhalts fehlt, sind organische Säuren auch hier näher in den Blickpunkt geraten. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit Ferkel im Alter von 23 Tagen für den Fütterungsversuch herangezogen.

4.1 Leistungsparameter

Der Leistungsversuch zeigte, dass durch die Zulagen verschiedener Säuren im Vergleich zur Kontrollgruppe eine Steigerung der Leistungsparameter möglich war.

Statistische Unterschiede der Lebendmassezunahme waren allerdings nur in der 5. Versuchswoche zu verzeichnen. Hier zeigte die mit Ameisensäure supplementierte Gruppe eine signifikante Steigerung zur Kontrollgruppe. Jedoch auch in den Wochen davor (ausgenommen die 3. Versuchswoche) konnte numerisch eine höhere Lebendmassezunahme bei der mit Ameisensäure supplementierten Gruppe im Gegensatz zur Kontrollgruppe beobachtet werden. Bezogen auf den Gesamtversuch konnte so eine Steigerung der Lebendmassezunahme um 10,5% erreicht werden. Dieses Versuchsergebnis bestätigt das Ergebnis eines ähnlichen Versuchs von Partanen *et al.* (2007). In dieser Studie wurde ebenfalls Ameisensäure (allerdings 8 g/kg Futter) bei Absetzferkeln eingesetzt, wodurch es zu einer Steigerung der Lebendmassezunahme in der Ameisensäuregruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe kam. Auch der Futteraufwand konnte in dieser Studie, durch die Ameisensäuresupplementierung gesenkt werden.

Der in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Leistungsversuch zeigte eine geringgradige Steigerung der Futteraufnahme bei den Gruppen die mit Ameisensäure- oder Benzoesäure supplementiert waren, im Gegensatz zur Kontrollgruppe. Das lässt darauf schließen, dass der Geschmack des Futters nicht negativ beeinflusst wurde. Die Futteraufnahme der Kombinationspräparatgruppe lag nur geringgradig unter der der Kontrollgruppe. Nach einer Zusammenfassung von Partanen und Mroz (1999), wird der Zitronensäure zwar ein negativer Effekt bezüglich der Futteraufnahme besonders bei jungen Ferkeln zugesprochen, was jedoch in der vorliegenden Untersuchung nicht bestätigt werden konnte. Da dem Kombinationspräparat ein Aromastoff zugesetzt wurde (Cuxarom spice®), ist der geschmackliche Einfluss durch die Zitronensäure in diesem Punkt scheinbar zu vernachlässigen.

Der Futteraufwand der Ameisensäuregruppe wurde geringgradig gegenüber der Kontrollgruppe vermindert. Dieser Effekt war jedoch statistisch nicht nachweisbar.

Mit der Supplementierung von Benzoesäure lag die Lebendmassezunahme insgesamt um durchschnittlich 6,7% höher als bei Ferkeln ohne Säurezulage.

Auch in einer Untersuchung von Torrallardona *et al.* (2007) konnte mit dem Einsatz von Benzoesäure ein positiver Effekt auf die Leistungsdaten von Absetzferkeln gezeigt werden. Durch die Benzoesäuresupplementierung (0,5%) kam es hier zur Steigerung der täglichen

Lebendmassezunahme, des Futtermittelsverzehrs und zur Senkung des Futteraufwands.

In einer weiteren Studie zur Benzoesäure von Kluge *et al.* (2006) konnte ebenfalls eine Verbesserung der Wachstumsleistung festgestellt werden, die hauptsächlich auf eine verbesserte Nährstoffverdaulichkeit zurückzuführen war.

Das Kombinationspräparat wies im hier durchgeführten Versuch mit einer Verbesserung der Zunahme um 4,1% gegenüber der Kontrolle das insgesamt niedrigste Wirkungspotential auf. Der Futteraufwand ließ dagegen mit 3,2% eine deutliche Reduktion gegenüber der Kontrollgruppe erkennen.

In der Literatur zeigt der Einsatz von Zitronensäure im Vergleich zu anderen organischen Säuren auch eine geringere Steigerung der Leistungsparameter (Radecki *et al.* 1988; Risley *et al.* 1992).

Radcliffe *et al.* (1998) untersuchten den Effekt von Zitronensäuresupplementierung in verschiedenen Konzentrationen (Experiment 1 = 0%, 1,5% und 3%; Experiment 2 = 0% und 2%) bei Ferkeln mit unterschiedlichen Absetzgewichten (Experiment 1 = 7,4 kg, Experiment 2 = 9,6 kg) auf die Leistungsparameter: durchschnittliche tägliche Gewichtszunahme, Futteraufwand und Kalziumverdaulichkeit. Bei den Absetzferkeln mit einem niedrigen Anfangsgewicht konnten für die Leistungsparameter signifikante Unterschiede festgestellt werden, während in Experiment 2 keine signifikanten Unterschiede festgestellt wurden. Auch Roth *et al.* (2005) beschreiben für die Di- und Tricarbonsäuren Fumarsäure, Zitronensäure und Äpfelsäure eine Verbesserung des Gewichtszuwachses bei Absetzferkeln von 4 - 19% und eine Senkung des Futteraufwands von 5 - 9%. Die optimale Dosierung der Zitronensäure lag nach ihren Erkenntnissen bei 4,5%.

Da die Kontrollgruppe in keinem der untersuchten Leistungsparameter bessere Ergebnisse aufwies als die übrigen Säuregruppen, diese hingegen trotz kaum vorhandener statistischer Absicherungen jeweils verbesserte Leistungsparameter zeigten, kann davon ausgegangen werden, dass die Supplementierung von Ameisen- und Benzoesäure sowie des Kombinationspräparates einen geringen steigernden Effekt auf die Leistungsparameter hatte. Auch Roth *et al.* (2005) bestätigten, dass besonders unter den Monocarbonsäuren Ameisensäure, Milchsäure und Sorbinsäure einen eindeutig positiven Effekt auf die tägliche Zunahme (8 - 27%) und den Futteraufwand (2 - 8%) hatten, während Propionsäure und Essigsäure eine wesentlich geringere oder überhaupt keine Wirkung hatten. Nach Roth *et al.* (2005) beruhen die unterschiedlichen Resultate hauptsächlich auf der Art der organischen Säure und deren Eigenschaft (z.B. pKs-Wert), der eingesetzten Menge und einer bei hoher

Dosierung häufig auftretenden Beeinträchtigung der Futteraufnahme der Tiere. Innerhalb der von ihnen untersuchten Dosierungsbereiche erreichte die Ameisensäure beim Gehalt von 1,2% das Maximum der leistungsfördernden Wirksamkeit.

4.2 Ameisensäure- und Benzoessäurekonzentration und Einsatz der Säuren

Die eingesetzten Mengen an organischen Säuren richteten sich nach den gesetzlichen Vorgaben. Es wurden 5 g/kg Benzoessäure, wie in der EU-Verordnung (EG) Nr. 1730/2006 als Mindestgehalt vorgegeben, eingesetzt. Für die Ameisen- und Zitronensäure gibt es keine vorgeschriebenen Höchstwerte. Zur Vergleichbarkeit wurden jedoch ebenfalls 5 g/kg Ameisensäure und 5 g/kg des Kombinationspräparates eingesetzt.

Bezüglich der Wirtschaftlichkeit ist bei Untersuchungen mit organischen Säuren auch zu bedenken, dass sie für den Anwender rentabel sein müssen. Die Effekte besonders im Hinblick auf die Steigerung der Leistungsparameter müssen immer mit den Kosten für das Fütterungsadditiva abgeglichen werden.

Auch das Alter der Tiere beim Absetzen ist von Bedeutung. Die Fähigkeit zur Ansäuerung des Mageninhaltes ist bei früh abgesetzten Ferkeln (vor dem 28. Lebenstag) noch nicht so entwickelt wie bei älteren Tieren. So kann durch die zusätzliche Ansäuerung des Futters von einer guten Hilfestellung bezüglich der Azidierung ausgegangen werden (Stuke 2003).

In Untersuchungen zur Toxizität der Ameisensäure erkannte bereits Marlorny (1969), dass die Absorption der Ameisensäure schon im Magen beginnt.

Auch in der hier untersuchten Fragestellung konnte bestätigt werden, dass der Anteil an Ameisensäure und Benzoessäure im Laufe des Verdauungstraktes stark reduziert wird. Schon im Magen reduzierte sich die Konzentration der eingesetzten Säure um ca. 50-60%, und die scheinbare praecaecale Verdaulichkeit beträgt sogar mehr als 99%. Es ist deshalb davon auszugehen, dass in den hinteren Darmabschnitten keine Säure mehr zur Verfügung steht. In einer Studie von Roth *et al.* (2005) verhielt sich die Konzentration der zugesetzten Ameisensäure selbst bis zum Ende des Dünndarms proportional zur Dosierung im Futter und war im Caecum und Colon nicht mehr nachweisbar. Mögliche Effekte im hinteren Teil des Verdauungstraktes können demzufolge nur sekundär sein und beruhen somit auf Veränderungen der Mikrobiota im vorderen Teil des Verdauungstraktes.

4.3 Verdaulichkeit der Rohnährstoffe

Im Hinblick auf die Verdaulichkeit der Rohnährstoffe und Aminosäuren zeigt die Literatur, je nach Einsatz und Dosis der organischen Fütterungssäure, unterschiedliche Versuchsergebnisse.

Giesting und Easter (1991) waren die Ersten, die eine nicht-signifikante Steigerung der scheinbaren ilealen Rohproteinverdaulichkeit beim Einsatz von 20 g Fumarsäure/kg Diät (Mais/Soja-Diät) feststellten. Andererseits beobachteten Bolduan *et al.* (1988) beim Einsatz von Ameisensäure keinen Effekt auf die Rohproteinverdaulichkeit.

Mroz *et al.* (2000) fanden heraus, dass die Supplementierung von 300 mEq Ameisensäure/kg Futter bei Aufzuchtschweinen (30 kg) die scheinbare praecaecale Aminosäureverdaulichkeit für Arginin, Methionin und Cystein um 5,4% signifikant verbesserte. In einer früheren Studie berichteten Mroz *et al.* (1997; 2000) von einer signifikanten Steigerung der scheinbaren praecaecalen Verdaulichkeit essentieller Aminosäuren (ausgenommen Arginin, Methionin und Cystein) um 5,4% und dem Rohprotein bei einer Ameisensäuresupplementierung von 1,38% bei Mastschweinen, während eine Studie im Jahre 2002 (Mroz *et al.*) keine Steigerung der scheinbaren praecaecalen Verdaulichkeit der Trockenmasse und des Rohproteins beim Einsatz von Ameisensäure bei Mastschweinen nachweisen konnte.

Auch Babinszky *et al.* (1998) untersuchten die Wirkung von 1%iger Ameisensäuresupplementierung in einer Diät für Absetzferkel und fanden eine signifikante Verbesserung der scheinbaren praecaecale Verdaulichkeit von Rohprotein und Aminosäuren um 4,6%, wohingegen Gabert *et al.* (1995) keinen Effekt ($p > 0,05$) der Ameisensäure auf die Verdaulichkeit von Aminosäuren bei Absetzferkeln fanden. Diese unterschiedlichen Ergebnisse stehen sicherlich mit den unterschiedlichen Versuchsansätzen in Verbindung. So spielt die Höhe des Ameisensäureeinsatzes, die Zusammensetzung des Grundfutters wie auch das Alter der Tiere eine ausschlaggebende Rolle.

In der vorliegenden Untersuchung konnten keine signifikanten Unterschiede in der scheinbaren praecaecalen und scheinbaren Gesamttrakt- Rohnährstoffverdaulichkeit gefunden werden. Auffällig war jedoch, dass die scheinbare praecaecale Rohfaserverdaulichkeit größer war als die scheinbare Gesamttraktverdaulichkeit. Dieses Ereignis ist als sehr unwahrscheinlich einzustufen und macht damit die Messergebnisse wenig verlässlich. Möglich ist hier, dass es sich um einen methodischen Messfehler handelt. Bei der Untersuchung der Aminosäurenverdaulichkeit konnte, ganz im Gegensatz zu den Studien von Mroz *et al.* (1997; 2000), ein signifikanter Unterschied der scheinbaren praecaecalen

Verdaulichkeit von Methionin und Cystein gefunden werden. Die Kontrollgruppe wies eine signifikant höhere Methioninverdaulichkeit auf als die Benzoe- und Kombinationspräparatgruppe. Die Ameisensäuregruppe zeigte die höchste scheinbare praecaecale Verdaulichkeit an Methionin und unterschied sich damit ebenfalls signifikant von der Benzoesäure- und Kombinationspräparatgruppe. Die Aminosäure Cystein zeigte in der Kontrollgruppe die höchste scheinbare praecaecale Verdaulichkeit und unterschied sich damit signifikant von der Ameisensäuregruppe. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der Untersuchung von Mroz *et al.* (2000), in denen es ebenfalls zu einer signifikanten Steigerung der Verdaulichkeit von Methionin und Cystein kam.

Methionin und Cystein sind die beiden einzigen schwefelhaltigen Aminosäuren, wobei Methionin eine essentielle und Cystein eine semiessentielle Aminosäure ist. Im Stoffwechselgeschehen ist Methionin ein Lieferant von Methylgruppen z.B. für die Biosynthese von Cholin, Kreatin, Adrenalin, Carnitin, Nukleinsäuren, Histidin, Taurin und Glutathion. Cystein ist ebenfalls an der Biosynthese von Kreatin beteiligt. Durch die verbesserte Verdaulichkeit von Methionin und Cystein sind folglich positive Effekte auf den tierischen Organismus zu erwarten.

Weitere Unterschiede in der scheinbaren praecaecalen und scheinbaren Gesamttraktverdaulichkeit bezüglich der Rohrnährstoffe konnten in der hier vorliegenden Studie zwischen den Gruppen nicht festgestellt werden. Die Beeinflussung der Verdaulichkeit beim Einsatz organischer Säuren ist demnach also von untergeordneter Rolle.

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit war die Untersuchung der Absorption und Retention von Mineralstoffen, da viele der organischen Säuren (Zitronensäure, Ameisensäure, Fumarsäure, Milchsäure und Propionsäure) laut Literatur einen positiven Effekt auf die Kalzium- und Phosphorabsorption haben.

Laut Jongbloed *et al.* (1987) steigern niedrigere intestinale pH-Werte die Löslichkeit von Phytinphosphor, was wiederum die Absorption verbessert.

Organische Säuren können ebenfalls die Retention von Mineralstoffen beeinflussen. Kirchgessner und Roth (1980) berichteten, dass sich bei einer Supplementierung von 20 g/kg Fumarsäure zu einer Diät für Absetzferkel die Balance von Kalzium, Phosphor, Magnesium und Zink um 14, 13, 21 bzw. 43% verbesserte. Nach ihren Erfahrungen ist das Ausmaß des Effektes der organischen Säuren auch vom Typ und der Mineralstoffzusammensetzung der Diät abhängig. In einer Diät mit suboptimalem Zinkgehalt und Einsatz von 15 g Zitronensäure/kg zur Diät konnten die Zinkmangelsymptome (Parakeratosis) reduziert

werden, jedoch gab es keine signifikanten Effekte auf die Absorption und Retention von Zink oder anderen Mineralien (Kalzium, Phosphor, Magnesium, Eisen, Kupfer und Mangan) (Höhler und Pallauf 1993; Höhler und Pallauf 1994).

In der vorliegenden Studie konnten statistisch keine Unterschiede in der Verdaulichkeit von Kalzium und Phosphor festgestellt werden. Bei der praecaecalen Kalziumverdaulichkeit war jedoch numerisch eine Erhöhung in der Kombinationspräparatgruppe gegenüber der Kontrollgruppe zu verzeichnen. Durch die hohe Streuung der Werte ist dieses Ergebnis statistisch jedoch nicht abgesichert.

4.4 Zusammenhänge des pH-Wertes und der Pufferkapazität des Futters auf Effekte im Gastrointestinaltrakt

In der vorliegenden Untersuchung konnte kein Einfluss der supplementierten Säuren auf den pH-Wert der Digesta festgestellt werden. Lediglich die Ameisensäuregruppe zeigte eine numerische Verringerung des pH-Wertes im proximalen Jejunum im Vergleich zu den anderen Gruppen. Die Senkung des pH-Wertes durch die Zulage organischer Säuren wird auch in der Literatur diskutiert.

Risley *et al.* (1992), untersuchten den Einsatz von 1,5% Fumarsäure, sowie 1,5% Zitronensäure bei Absetzferkeln im Alter von 21 Tagen, wobei die zugeführten Säuren keinen Effekt auf den pH-Wert im Magen, Jejunum, Caecum und unteren Colon hatten.

Einige Autoren vermuten, dass methodische Fehler der Grund sind, warum es in einigen Studien beim Zusatz von organischen Säuren zur Absenkung des Magen pH-Wertes kommt (Bolduan 1988; Eidelburger 1992; Radcliffe *et al.* 1998). Häufig sind bei den Messungen des pH-Wertes im Magen keine signifikanten, jedoch numerische Effekte zu verzeichnen (Scipioni 1978; Burnell *et al.* 1988; Risley *et al.* 1992; Gabert 1995). Sehr starke Schwankungen des pH-Wertes in den Messungen im Mageninhalt indizieren bereits, dass es schwierig ist, repräsentative Proben zu gewinnen. So können die Anteile von Futter und Exkreten von Probe zu Probe variieren. Digestaprobe für pH-Wertmessungen müssen generell von Schweinen genommen werden, die alle im gleichen Zeitabstand zur letzten Fütterung getötet wurden. Die Variationen, die der pH-Wert im Gastrointestinaltrakt über den Tag betrachtet erreicht, sind groß. Deshalb muss die Probennahmezeit zur Fütterungszeit standardisiert werden, um vergleichbare Aussagen treffen zu können. Zusätzlich sollten die Proben aus spezifischen Bereichen des Magens stammen. Ohne einen festen Zugang zum Magen des Tieres für eine permanente pH-Messung, ist es schwer, objektiv den Effekt der organischen Säuren auf den gastrointestinalen pH-Wert zu beurteilen (Partanen und Mroz 1999).

Eine viel diskutierte Zielsetzung des Einsatzes von organischen Säuren in der Ferkelfütterung ist die Verminderung des pH-Wertes und der Pufferkapazität des Futters, um die Proteolyse im Magen des Tieres zu unterstützen. Deshalb stellt sich die Frage, ob nicht die Steigerung des Gehalts an Protonen (H^+) im Futter, z.B. zur Supplementierung einer anorganischen Säure, alleine schon leistungsfördernd wirkt. In Fütterungsversuchen konnte jedoch gezeigt werden, dass beispielsweise o-Phosphorsäure selbst bis zu einer Dosierung von 3,55% wirkungslos blieb, und dass Zusätze von Salzsäure oder Kalziumchlorid sogar starke Einbrüche im Gewichtszuwachs und Futtermittelverzehr, sowie Entgleisungen des Säure-Basen-Haushalts auslösten (Giesting und Easter 1986; Roth und Kirchgessner 1989). Diese Befunde lassen darauf schließen, dass die nutritive Wirksamkeit von Säurezusätzen weniger auf der Verminderung des pH-Werts (Steigerung der Konzentration an H^+) beruht, sondern eher durch die Konzentration der undissoziierten Säure vermittelt wird (Roth und Etle 2005).

Statt die Absenkung des pH-Wertes für eventuelle positive Effekte der organischen Säuren verantwortlich zu machen, ist es durchaus wahrscheinlicher, dass die Säuren an sich eine antibakterielle Wirkung erzielen. So ist z.B. die Benzoesäure eine schwache Säure mit einem hohen pKs-Wert, und liegt damit im Magen und Dünndarm in undissoziierter Form vor. Die undissoziierte Form wird dann passiv in die Bakterienzelle aufgenommen, wo sie dissoziiert und dadurch in den Bakterienstoffwechsel eingreift, was letztendlich zum Absterben der Bakterienzelle führt (Jensen 2001).

In einer Studie von Kluge *et al.* (2006) führte der Einsatz von Benzoesäure in einer Konzentration von 20 g/kg Futter zu keiner Reduktion des gastrointestinalen pH-Wertes, jedoch zu einer Reduktion der bakteriellen Mikrobiota (Milchsäurebakterien und Laktobazillen). Eine Supplementierung von 2% Benzoesäure ist jedoch nach der EU-Verordnung (EG) Nr. 1730/2006 nicht zulässig und kann sogar zu Schädigungen der Schleimhäute des Gastrointestinaltraktes führen.

Ebenfalls wird in der Literatur die Pufferkapazität säuresupplementierter Diäten diskutiert. So ist nach Bolduan (1988) der zu beobachtende Unterschied bezüglich der Leistungsparameter bei säuresupplementierten Diäten wahrscheinlich auf die unterschiedliche Pufferkapazität zurückzuführen. Die Pufferkapazität variiert beträchtlich zwischen einzelnen Futtermitteln. Die Säurepufferkapazität ist am niedrigsten in Getreide- und Getreidenebenprodukten, mittel bis hoch in proteinreichen Futtermitteln und sehr hoch bei Futter mineralischen Ursprungs, wie Dikalzium und Mononatriumphosphat (Jasaitis 1987). Auch die Form der Titrationskurven variieren stark zwischen den einzelnen Futtermitteln (Wohlt 1987). Deshalb

wird ein Zusammenhang zwischen der Absenkung des pH-Wertes und der Pufferkapazität der Diät im Hinblick auf positive Effekte vermutet.

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen des Futters, konnten statistisch keine Unterschiede der Pufferkapazität zwischen den Gruppen festgestellt werden. Numerisch lag die Pufferkapazität des Kontrollfutters sogar unter der der Säuregruppen. Ein positiver Effekt durch die geringere Pufferkapazität in der Kontrollgruppe konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

Nach Roth und Kirchgessner (1989) reduziert die Supplementierung organischer Säuren den pH-Wert der Diät kurvenförmig, abhängig vom pKs-Wert der jeweiligen Säure und der Pufferkapazität der Diät. Der pH-Wert absenkende Effekt verschiedener Säuren verhält sich in der folgenden Reihenfolge: Weinsäure > Zitronensäure > Apfelsäure > Fumarsäure > Milchsäure und Ameisensäure > Essigsäure > Propionsäure. Die Salze organischer Säuren haben nur einen geringen Einfluss auf den pH-Wert der Diät. Der Zusatz von Proteinen und Mineralstoffquellen zur Diät hat einen abschwächenden Effekt auf die pH-Wertabsenkung der Säure (Roth und Kirchgessner 1989). Wichtig ist hierbei natürlich auch die eingesetzte Menge der organischen Säure. Die in der hier vorliegenden Studie eingesetzten Mengen von 0,5% reichten für eine Absenkung des pH-Wertes im Verdauungstrakt scheinbar nicht aus. Auch für eine effektive Veränderung der Pufferkapazität war die eingesetzte Menge nicht ausreichend.

Schon Roth *et al.* (1992) fanden in Untersuchungen heraus, dass der pH-Wert der Digesta nur durch höhere Dosierungen (z.B. 1,8 bzw. 2,4% Ameisensäure) beeinflusst wird.

4.5 Harn-pH und Hippursäurebestimmung

Wie in der Literatur beschrieben, kam es auch in der vorliegenden Studie zur starken Erhöhung der Hippursäure im Harn der Tiere mit Benzoessäurezulage und zur Absenkung des Harn-pH-Wertes. So zeigten Bühler *et al.* (2006), dass der Einsatz von 1% Benzoessäure zur Diät bei Schweinen in der Wachstumsphase zu einer Erhöhung des Hippursäuregehaltes im Harn und zur Absenkung des pH-Wertes um eine pH Einheit führt.

In der vorliegenden Untersuchung zeigten die Tiere der Benzoessäuregruppe einen ca. 40-fach höheren Hippursäurewert im Harn als die Tiere der Kontrollgruppe. Auch die Werte der Kombinationspräparatgruppe lagen 25-mal höher als die der Kontrollgruppe. Wichtig ist hierbei, dass diese Konzentrationsmessungen nicht als absolute Werte zu verstehen sind. Die Werte für die Hippursäurekonzentration erscheinen allgemein als sehr hoch. Möglich wäre

hier ein Fehler in der Berechnung der Verdünnung, damit würden aber die starken Abweichungen zwischen den Werten erhalten bleiben und somit auch die wichtige Aussage bezüglich der Benzoessäureverstoffwechslung in Hippursäure.

Es ist weder bekannt wie viel Benzoessäure die Versuchstiere vor ihrer Tötung aufgenommen haben und wie viel Harn bereits abgesetzt worden war, noch wie viel Glycin im tierischen Organismus für die Bildung von Hippursäure zur Verfügung stand. Aussagekräftig sind hier nur die stark signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Diese starken Erhöhungen der Hippursäure bei der Supplementierung von Benzoessäure wurden bereits bei Bridges *et al.* (1970) beobachtet. Bei Untersuchungen mit Schweinen wurde gezeigt, dass beim Einsatz von 50 mg/kg Benzoessäure 80% dieser Säure innerhalb von 24 h als Hippursäure im Harn ausgeschieden wurde. Die verbleibenden 20% wurden im Organismus als Benzoylglucuronid und Benzoessäure gefunden, wobei beim Abbau der Benzoylglucuronide möglicherweise Benzoessäure anfiel.

Durch die Bindung des Harn-Ammoniaks wird, nach Literaturangaben (den Brok 1999) die Ammoniakemission um bis zu 30% reduziert.

Die Ergebnisse der Harn-pH Untersuchung ergaben signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen. Die Tiere der Kontrollgruppe hatten einen um mehr als eine pH-Einheit höheren Harn-pH Wert als die der Benzoessäuregruppe. Auch der Harn-pH der Tiere aus der Ameisensäuregruppe war mit mehr als einer pH-Einheit signifikant höher als der der Benzoessäuregruppe. Damit bestätigt sich also auch die Aussage aus der Literatur, dass der Zusatz von Benzoessäure den Harn-pH senkt und damit ein antimikrobieller Effekt in der Harnblase entsteht (Mroz *et al.* 2000; Bühler *et al.* 2006).

4.6 Durchfall und Ferkelverluste

Durchfälle waren aufgrund von Stressfaktoren (Futterumstellung, Umstallung usw.) insbesondere in den ersten Tagen nach dem Absetzen zu erwarten. Die Beobachtungen der Kotkonsistenzen zeigten aber in diesem Versuch, dass Durchfälle kaum auftraten und dann auch nur von kurzer Dauer (max. 2 Tage) und geringgradiger Schwere waren. Die betroffenen Tiere wurden dadurch gesundheitlich kaum beeinträchtigt, was sich in der weiter steigenden Lebendmassezunahme zeigte.

Zu bemerken war allerdings, dass in der Ameisensäuregruppe während des gesamten Versuchs kein Tier mit Durchfall zu beobachten war, während in den übrigen Gruppen maximal 2 Tiere ein Durchfallgeschehen zeigten. Bei Untersuchungen von Tsiloyiannis *et al.*

(2001) war es ebenfalls die Ameisensäuregruppe, die das geringste Vorkommen von Durchfallerkrankungen im Vergleich zur Kontrollgruppe und anderen Säuregruppen zeigte.

Das geringgradige Auftreten von Durchfall bei den Versuchstieren lag zum einen sicher an den vor Ort sehr guten Haltungs- und Umgebungsbedingungen (Raumklima, Temperatur, Lichtprogramm) und an der geringen Ferkeldichte. Da die Tiere zu zweit bzw. zu dritt aufgestellt waren und die Boxen jeden Tag gründlich gereinigt wurden, war das Risiko einer Ansteckung durch das Fressen von Kot erkrankter Tiere nur sehr gering.

Zum anderen kann von einem positiven Effekt der supplementierten organischen Säuren auf die Gesundheit der Ferkel ausgegangen werden, denn durch den guten Gesundheitsstatus der Versuchsgruppentiere war die Möglichkeit der Ansteckung der Kontrolltiere mit pathogenen Keimen infolge des niedrigen Keimdruck eher gering.

In einer Untersuchung von Tsiloyannis *et al.* (2001) wurden 384 Absetzferkel im Alter von 28 Tagen auf das Vorkommen des PWD-Syndroms bei Supplementierung verschiedener organischer Säuren untersucht. Unter anderem kamen 1,2% Ameisensäure und 1,5% Zitronensäure zum Einsatz. Es stellte sich heraus, dass sowohl die Inzidenz als auch die Schwere der Durchfallerkrankungen signifikant reduziert war, im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Die Untersuchung der Trockenmasse des Kotes im Zeitverlauf vom 5., 9. und 14. Tag nach dem Absetzen und der Trockenmasse der Digesta vom Tötungstag zeigte keinen signifikanten Unterschied.

In der Kombinationspräparatgruppe war der Verlust von einem Ferkel zu verzeichnen. Nach einer Untersuchung durch das Institut für Pathologie der Freien Universität Berlin wurde festgestellt, dass die Todesursache in einer Septikämie, hervorgerufen durch eine hochgradige, akute, katharrhalisch-eitrige Bronchopneumonie, bestand. Es ist anzunehmen, dass es keinen Zusammenhang zwischen der Erkrankung und der speziellen Fütterung des Tieres gibt.

4.7 Einfluss der verschiedenen organischen Säuren auf die Mikrobiota des Verdauungstraktes von Absetzferkeln

4.7.1 Bakterielle Stoffwechselmetabolite

Zur Analyse der bakteriellen Stoffwechselaktivität wurden als Indikator die Konzentrationen flüchtiger Fettsäuren (FFS), [D(-)- und L(+)]- Laktat und der Ammoniumionen herangezogen.

Veränderungen der intestinalen Mikrobiota zeigen sich für gewöhnlich bei der Bildung von Laktat, Ammonium und flüchtigen Fettsäuren. Dabei muss jedoch bedacht werden, dass die Stoffwechselprodukte durch ihre ständigen Umbau- und Abbauprozesse, kein statisches Bild, sondern nur eine Momentaufnahme des „Ist-Zustandes“ liefern können.

Laktat

Die Milchsäurebakterien sind ein wichtiger Bestandteil der „gesunden“ gastrointestinalen Mikrobiota des Schweins. Eine wichtige und dominante Gruppe in Magen und Dünndarm stellen hierbei die Laktobazillen dar (Pryde et al. 1999; Al Jassim 2003). Nach Danielson *et al.* (1989) wirken *E.coli* und Milchsäurebakterien antagonistisch zueinander. Als Beispiel inhibieren Milchsäurebakterien die Ansiedlung und Proliferation von *E.coli* Bakterien (Blomberg et al. 1993) indem sie intestinale *E.coli* Bakterienrezeptoren blockieren und toxische Metabolite sekretieren.

Milchsäurebakterien sind zur Energiegewinnung auf Kohlenhydrate angewiesen, die sie in der Glycolyse zu Laktat umwandeln und dieses dann als Endprodukt ausscheiden. Laktat kommt in zwei enantiomeren Formen vor. Entsprechend gibt es auch zwei Formen des Anions, die man nach ihrer Ausrichtung in der Fischer-Projektion als D(-)- und L(+)-Form bezeichnet. Die beiden Isomeren D(-)- und L(+)-Laktat sind ihrer Entstehung nach als „biologisch“ zu bezeichnen. Dieser weitgehende Begriff sagt grundsätzlich nichts über ihre Verträglichkeit und Wirkung im Organismus aus. Darum muss man weiter differenzieren und untersuchen, ob beide Formen auch „physiologisch“ sind. Für L-Milchsäure fällt das Resultat eindeutig aus: Seit Cori und Cori (1929) an der Ratte bewiesen haben, dass nur dieses Isomer in der Glykolyse entsteht und für die Resynthese von Glukose und Glykogen verwertet wird, gilt L(+)-Laktat als „das physiologische Isomer“. D(-)-Laktat ist dagegen schwieriger zu beurteilen. Wegen seiner erheblichen Ausscheidung im Harn von Ratten nach peroraler Gabe (Cori 1929; Medzihradsky und Lamprecht 1966) wird es als „unphysiologisch“, im Sinne von nicht vom Wirt verwertbar, angesehen. Die bei Wiederkäuern beschriebene D-Milchsäure-Azidose (Dunlop und Hammond 1965) vervollständigt das Bild einer allgemeinen Unverträglichkeit.

Diese und weitere Befunde haben auch gezeigt, das D(-)-Laktat für bestimmte Bakterienarten der Gastrointestinalflora ein „biologisches“ Produkt, aber für den Wirtsorganismus eine „pathologisch“ wirkende Verbindung sein kann (Giesecke 1985).

Die hier vorliegende Untersuchung erbrachte kaum signifikante Unterschiede der Laktatkonzentration in den Darmabschnitten im Gruppenvergleich. Bei der Betrachtung des Gesamtlaktats konnte festgestellt werden, dass im proximalen Jejunum eine signifikante Erhöhung des Laktatgehaltes der Kombinationspräparatgruppe im Gegensatz zur Ameisensäuregruppe vorlag. Auch im distalen Jejunum der Kombinationspräparatgruppe war die Gesamtlaktatkonzentration noch deutlich höher als in den übrigen Gruppen. Auffällig war ein starker Abfall des Gesamtlaktats in der Kombinationspräparatgruppe im Colon, im Gegensatz zu den übrigen Gruppen. Da weitere Untersuchungen zeigten, dass die Ameisen- und Benzoessäure im Laufe des Verdauungstraktes stark in ihrer Konzentration sanken, und im hinteren Verdauungstrakt davon ausgegangen werden kann, dass keine Säure mehr vorlag, kann vermutet werden, dass es bei der Ameisensäure- und Benzoessäuregruppe zu einer Hemmung der gesamten Milchsäurebiota kam, während in der Kombinationspräparatgruppe das Wachstum der Milchsäurebakterien gefördert wurde. Diese Vermutung wird von dem Anteil von D(-)-Laktat untermauert, da sich in der Kontrollgruppe der numerisch größte Anteil an D(-)-Laktat im Magen findet. Die Säuregruppen weisen im Magen alle weniger D(-)-Laktat auf, was die Vermutung zulässt, dass die organische Säure das Wachstum der Milchsäurebakterien hemmt.

Beim L(+)-Laktat zeichnet sich ein etwas anderes Bild ab. Hier ist der L(+)-Laktatgehalt der Kontrollgruppe im Magen tendenziell niedriger als in der Kombinationspräparatgruppe. Numerisch liegen hier auch die L(+)-Laktatkonzentrationen der Ameisen- und Benzoessäuregruppe unter der der Kombinationspräparatgruppe. Bis zum distalen Jejunum zeigt die Kombinationspräparatgruppe durchgehend höhere L(+)-Laktatkonzentrationen als die übrigen Gruppen. Durch diese Konzentrationssteigerung kann von einem positiven Effekt für das Wirtstier ausgegangen werden. Im Colon kommt es jedoch zum starken Abfall der Konzentration, so dass hier die Kombinationspräparatgruppe den niedrigsten Wert im Vergleich zu den anderen Gruppen erzielt.

In einer Studie von Roth und Etle (2005), konnten beim Einsatz von Ameisensäure eine deutliche Senkung der Laktatkonzentration im Dünndarm festgestellt werden.

Die Benzoessäure zeigte ebenfalls in Untersuchungen einen antimikrobiellen Effekt im Magen und Jejunum (Kluge et al. 2006). Die Zahl der aeroben-, anaeroben- und Milchsäurebakterien wurde im Magen beachtlich reduziert, wobei der Effekt dosisabhängig war.

Winkenwerder (1999) und Kulla (2001) zeigten, dass geringe Mengen an Laktat und flüchtigen Fettsäuren im Magen von Ferkeln gebildet werden. Konzentrationen von L(+)-Laktat liegen hiernach im Magen bei 1 – 3 mmol/kg Digesta und flüchtige Fettsäuren bei 5 –

7 mmol/kg Digesta. Im Jejunum liegt die Konzentration von L(+)-Laktat 4 – 10-mal höher als im Magen, während die Konzentration der flüchtigen Fettsäuren nur etwas höher ist als im Magen (Kluge et al. 2006).

Auch die Tiere der hier vorliegenden Studie zeigten eine höhere Konzentration an L(+)-Laktat im Magen im Vergleich zum Jejunum.

Das Verhältnis von L(+)-Laktat zu D(-)-Laktat war im Jejunum deutlich zum L(+)-Laktat hin verschoben, was wiederum als günstig für das Wirtstier einzustufen ist.

Die Untersuchung der Zellzahl an *Lactobacillus spp.* mittels der Realtime-PCR vervollständigte das Bild über die bakterielle Gruppe der Milchsäurebildner. Hier konnten im Magen keine Unterschiede zwischen den Gruppen gefunden werden. Betrachtete man jedoch das Verhältnis der Eubakterien zu den *Lactobacillus spp.*, konnte man feststellen, dass der prozentuale Anteil an Laktobazillen in der Kontrollgruppe höher lag als in den Säuregruppen. Auch im distalen Jejunum gab es keine Unterschiede zwischen den Gruppen. Bei der Betrachtung des Verhältnisses Eubakterien zu *Lactobacillus spp.* war auffällig, dass der prozentuale Anteil in der Ameisensäuregruppe bis zu 4-mal höher lag als in den übrigen Gruppen. Hier war allerdings auch eine sehr hohe Streuung zu bemerken. Während es bis zum distalen Jejunum hin noch deutliche Unterschiede zwischen den Gruppen gab, war im Colon, wie auch schon bei den vorherigen Laktatuntersuchungen zu bemerken, kein Unterschied mehr vorhanden. Der Einfluss der eingesetzten Säuren scheint also auf die Bakterien im Colon keinen Einfluss mehr zu haben.

Flüchtige Fettsäuren (FFS)

Flüchtige Fettsäuren (FFS) sind Endprodukte der mikrobiellen Fermentation von Kohlenhydraten und Proteinen (Bach Knudsen et al. 1991). Für den Magen-Darmtrakt sind sie in mehrfacher Hinsicht bedeutsam, da einzelne kurzkettige FFS eine antimikrobielle Wirkung gegen pathogene Bakterien aufweisen und ihre Anwesenheit somit als gesundheitsfördernd angesehen wird (Rolfe 2000). Welche FFS bei der Fermentation entstehen, hängt jedoch zum einen stark mit der bakteriellen Population des Verdauungstraktes zusammen und bietet dadurch Rückschlüsse auf eben jene Mikrobiota, zum anderen mit den zur Verfügung stehenden verdaulichen Substraten in der Digesta.

FFS wie Acetat, Propionat, Butyrat und Valeriat enthalten noch mehr als 60% der Energie aus den, für den Wirt nicht verdaulichen Kohlenhydraten und stehen dem Wirt somit wieder zur

Verfügung. Vermutet wird, dass Monogastrier zwischen 20 – 30% ihres Energiebedarfs über die Metabolisierung von FFS decken (Bergman 1990; Cummings und Macfarlane 1997).

Bei der Untersuchung der FFS in der hier vorliegenden Studie konnten kaum signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen gefunden werden. Im Magen konnten lediglich bei der n-Valeriansäure signifikante Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe, die eine geringere Konzentration aufwies, und der Ameisensäuregruppe festgestellt werden. Ein ebenfalls signifikanter Unterschied wurde zwischen der erhöhten Konzentration in der Ameisensäuregruppe, im Gegensatz zu einem niedrigen Konzentrationswert in der Benzoesäuregruppe, gefunden. Numerisch war festzustellen, dass bei der Essigsäure die Mediane bei der Kontrollgruppe und der Kombinationspräparatgruppe deutlich höher lagen als bei der Ameisensäure- und der Benzoesäuregruppe. Ebenso bestand ein numerischer Unterschied bei der Propionsäure zwischen der Kontrollgruppe mit einem deutlich höheren Konzentrationswert und den Säuregruppen, wobei die Benzoesäuregruppe nur gering unter dem Wert der Kontrollgruppe lag. Essigsäure, Propionsäure und n-Buttersäure sind die Hauptprodukte des bakteriellen Metabolismus (Kobayashi und Sakata 2006). Eine Erhöhung dieser FFS lässt auf einen regen Stoffwechsel schließen. Es ist deshalb anzunehmen, dass in der Kontroll- und Kombinationspräparatgruppe eine größere Menge metabolisch aktiver Bakterien vorlag als in der Ameisen- und Benzoesäuregruppe.

In vitro Untersuchungen an unterschiedlichen Zelllinien zeigten, dass verschiedene FFS schon in physiologischer Konzentration zytotoxische Effekte verursachen können (Sakurazawa und Ohkusa 2005). So bewirkten 2,7 mM n-Buttersäure und 5,0 mM n-Valeriansäure bereits den Zelltod der eingesetzten Zelllinie.

Im proximalen Jejunum konnten auf Grund der geringen Probenanzahl in der Kontroll-, Ameisensäure- und Kombinationspräparatgruppe keine statistischen Tests zur Prüfung auf Signifikanzen herangezogen werden. Auch die numerische Untersuchung ergab kaum Unterschiede zwischen den Gruppen. Erwartungsgemäß waren die Fettsäuren Propionsäure, i-Buttersäure und n-Valeriansäure in den vier Gruppen im proximalen Jejunum nicht oder nur teilweise nachweisbar.

Ebenso konnten auch im distalen Jejunum keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden. Die FFS Propionsäure, i-Buttersäure, n-Buttersäure und n-Valeriansäure kamen erwartungsgemäß nur in sehr geringen Konzentrationen in den Digestaprobe vor. Die i-Buttersäure war im distalen Jejunum nicht nachzuweisen.

Die verzweigten FFS i-Valeriansäure und i-Buttersäure gelten als potenziell toxische Substanzen und als peptidolytische Abbauprodukte (Topping und Clifton 2001). Ein erhöhter

Anteil spricht für eine vermehrte Nutzung von Proteinen, bei dem auch zusätzlich toxische Substanzen wie Ammoniak, Amine, flüchtige Phenole und Indole entstehen (Lalles et al. 2007). Wie erwartet, fand die Hauptproduktion der FFS im Colon statt, da dies bei Schweinen und anderen Omnivoren der vorrangige Ort der Kohlenhydratfermentation ist (Kobayashi und Sakata 2006). Statistisch konnten bei den Proben aus dem Colon keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Die Konzentrationen an Essigsäure und Propionsäure lagen im Vergleich zu den anderen FFS deutlich höher, wobei die Essigsäure- und Propionsäurekonzentrationen in der Benzoessäuregruppe den höchsten Wert erreichten. Da Propionat über die Pfortader zur Leber transportiert wird und dort in der Gluconeogenese verarbeitet wird, während das Acetat der Essigsäure im peripheren Gewebe für den Fettstoffwechsel herangezogen wird (Bergman 1990; Cummings und Macfarlane 1997), ist davon auszugehen, dass eine höhere Konzentration an Essig- und Propionsäure einen positiven Effekt für die Energiebilanz des Wirtstieres hat.

Kluge *et al.* (2006) verwendeten ausschließlich die Essigsäure als Indikator für den Stoffwechsel der flüchtigen Fettsäuren, da sie nach Franklin *et al.* (2002) als die Wichtigste anzusehen ist. Essigsäure dient den Myozyten als wichtige Energiequelle (Bergman 1990). In der erwähnten Untersuchung von Kluge *et al.* (2006) wurde festgestellt, dass der Einsatz von Benzoessäure zu einer deutlichen Reduktion der Essigsäure im Duodenum führt. Dieser Effekt ist wahrscheinlich assoziiert mit einer Reduktion der gram-negativen Bakterienzellzahl der Familie der Acetobacteriaceae und Enterobacteriaceae, die hauptsächlich Produzenten von Essigsäure im Dünndarm. Auch in einer Untersuchung von Franco *et al.* (2005) kam es beim Einsatz eines Säuregemisches aus Fumar- und Ameisensäure zu einer Reduktion der Acetatkonzentration und zu einer Erhöhung der Butyratkonzentration in der Dünndarmdigesta. Butyrat wird hauptsächlich im intestinalen Epithel verwertet und konnte in Untersuchungen auch im peripheren Blutkreislauf nachgewiesen werden (Imoto und Namioka 1978; Bach Knudsen 2003). In der hier vorliegenden Studie konnte bezüglich der Buttersäure festgestellt werden, dass das Verhältnis n- zu i- Buttersäure bei der Benzoessäuregruppe im Colon mit 1,09: 1 doppelt so hoch lag wie in den anderen Gruppen (0,4 - 0,58: 1). Ausschließlich in der Benzoessäuregruppe wurde also gleichviel n- Buttersäure zu i- Buttersäure gebildet. Die n-Buttersäure dient den Colonozyten als wichtige Energiequelle (Wang und Friedman 1998; Topping und Clifton 2001). Deshalb ist anzunehmen, dass in der Benzoessäuregruppe energetisch günstigere Verhältnisse vorlagen.

Ammonium

Ammoniak, worunter man im Folgenden die Summe von $\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$ zu verstehen hat, ist im physiko-chemischen Sinne ein korrespondierendes Säure (NH_4^+)-Base(NH_3)-Paar. Da NH_3 als neutrales Molekül ähnlich wie CO_2 die Zellmembranen leicht durchdringen kann, das NH_4^+ -Ion dagegen nicht oder zumindest wesentlich langsamer, kann ein Konzentrationsausgleich für NH_3 zwischen extra- und intrazellularem Raum angenommen werden (Langendorf 1969).

Ammonium/Ammoniak, Amine und Amide, die nach der Proteolyse entstehen, werden für den Wirtsorganismus als toxisch eingestuft. *In vitro* führen Ammonium-Salze zu einer Verschiebung der Stoffwechsellage in Richtung einer gesteigerten Ketogenese (Langendorf 1969).

Die Ammoniumionenkonzentration, die im luminalen Inhalt des Gastrointestinaltraktes gemessen wird, gestattet jedoch keine eindeutige Aussage über ihre tatsächliche Freisetzung, Absorption oder bakterielle Fixierung, weil diese Ereignisse hauptsächlich in der mukosalen Schicht bzw. auf der Oberfläche der Epithelzellen stattfinden.

In einer Studie von Roth und Ertle (2005) konnte beim Einsatz von Ameisensäure eine deutliche Senkung der Ammoniakkonzentration im Magen festgestellt werden. Die Reduktion der bakteriellen Population steht in direktem Bezug zu einer niedrigeren Konzentration an Ammoniak in Digesta. Eidelsburger *et al.* (1992) beobachteten nach einer Supplementierung von 12,5 g/kg Ameisensäure eine signifikante Reduktion der Ammoniakkonzentration im Verdauungstrakt von Ferkeln. In den Studien von Bolduan *et al.* (1988), Eckel *et al.* (1992) und Stuke (2003) wurde dagegen keine Reduktion der Ammoniakkonzentration durch den Einsatz organischer Säuren in Digesta von Ferkeln gefunden.

Nach Gedek (1974), Kozasa (1986) sowie Roth und Kirchgessner (1988) lassen hohe Ammoniakgehalte auf eine gesteigerte mikrobielle Aktivität schließen, was auch auf eine Vermehrung coliformer Keime hindeutet. Diesen Effekt kann man auch in der hier durchgeführten Untersuchung feststellen. Obwohl keine statistisch signifikanten Unterschiede bezüglich der Ammoniumkonzentration festgestellt werden konnten, ist doch auffällig, dass die Konzentration an Ammonium in allen drei untersuchten Magen-Darmabschnitten im Vergleich zu den Säuregruppen, in der Kontrollgruppe numerisch höher lag. Diese Beobachtung ist mit einer tendenziellen Erhöhung der koloniebildenden Einheiten von *E.coli* in der Kontrollgruppe gegenüber der Ameisensäuregruppe im distalen Jejunum assoziiert. Ebenfalls besteht ein numerischer Unterschied zwischen einer erhöhten Zahl an

koloniebildenden Einheiten von *E.coli* im Colon der Kontrollgruppe zur Colondigesta der Ameisensäuregruppe. Bei der molekularbiologischen Untersuchung der DNA-Digestaprobe der einzelnen Darmabschnitte konnten bezüglich der *Escherichia spp.* Zellzahl im Magen keine Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen festgestellt werden. Im distalen Jejunum und im Colon zeigten sich aber auch hier Unterschiede in der *Escherichia spp.* Zellzahl. Bei der Untersuchung des distalen Jejunums war auffällig, dass die Kontrollgruppe höhere Zellzahlen an *Escherichia spp.* aufwies als die Säuregruppen. Im Colon bestand ein signifikanter Unterschied zwischen der Ameisensäure- und Benzoessäuregruppe, sowie zwischen der Ameisensäure- und der Kombinationspräparatgruppe und ein tendenzieller Unterschied zwischen der Kontroll- und der Ameisensäuregruppe, wobei die Ameisensäuregruppe jeweils die geringste Zellzahl an *Escherichia spp.* aufwies. Bezüglich der Ammoniumkonzentration war in der Kontrollgruppe eine stets höhere Ammoniumkonzentration zu verzeichnen als in den Säuregruppen. Eine Reduktion von Enterobakterien in den Säuregruppen ist also anzunehmen.

4.7.2 Untersuchungen zum Einfluss auf die *E.coli*-Population

Um quantitativ eine Aussage über die Anzahl der koloniebildenden Einheiten (KbE) von *E.coli* machen zu können, wurden Digestaprobe gleich nach der Tötung der Tiere bakteriologisch untersucht. Dabei konnte durchweg höhere KbE von *E.coli* in der Kontrollgruppe im Vergleich zu den Säuregruppen festgestellt werden. Ein statistisch abgesichertes Ergebnis zeigte sich im distalen Jejunum. Hier ergab sich eine Tendenz zwischen erhöhten Werten in der Kontrollgruppe und verringerten Werten in der Ameisensäuregruppe. Im Hinblick auf die Keimzahl von *E.coli* beim Einsatz von Ameisensäure konnten Partanen *et al.* (2007) ebenfalls eine Reduktion der KbE im Vergleich zur Kontrollgruppe während der Absetzperiode feststellen.

Im vorliegenden Versuch waren im proximalen Jejunum und Colon zumindest numerische Unterschiede zu beobachten. Auch hier lagen die *E. coli* KbE der Kontrollgruppe höher als in den Säuregruppen. Die Kombinationspräparatgruppe ergab dagegen kaum einen Unterschied zur Kontrollgruppe. Die eingesetzte Zitronensäure scheint also keinen erweiterten positiven Effekt auf die KbE-Reduktion von *E.coli* zu haben. Dies bestätigt auch eine Studie von Risley *et al.* (1992), welche *E.coli* und Milchsäurebakterien bei Absetzferkeln (21d) mit einer Supplementierung von entweder 1,5% Fumarsäure, sowie 1,5% Zitronensäure untersuchten. Bei beiden organischen Säuren konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen und der Kontrollgruppe festgestellt werden.

Laut Kluge *et al.* (2006) reduziert der Einsatz von Benzoesäure die Bakterienanzahl in der Dünndarmdigesta. Dabei kommt es jedoch nicht nur zur Reduktion der gram-negativen Bakterien, sondern der allgemeinen Bakterienpopulation (aerobe-, anaerobe- und Milchsäurebakterien).

Das Ergebnis der vorliegenden Untersuchung bestätigt die Beobachtungen aus der Literatur. Wenn auch statistisch keine signifikanten Unterschiede vorlagen, so war dennoch eine numerische Reduktion der KbE von *E.coli* in der Benzoesäuregruppe gegenüber der Kontrollgruppe zu beobachten.

Von den angezüchteten *E.coli* Kolonien wurden jeweils 10 Kolonien pro Platte abgenommen. Aus diesen Proben wurde die DNA isoliert, um mittels der Multiplex-PCR die Pathogenitätsfaktoren zu untersuchen. Diese Methode barg einige Schwierigkeiten. Zum einen wurden diejenigen *E.coli*-Stämme kultiviert, die quantitativ am häufigsten im jeweiligen Darmabschnitt vorkamen. So ist es möglich, dass *E.coli*-Stämme mit geringem Vorkommen auf den Agarplatten von *E.coli*-Stämmen mit häufigem Vorkommen überwuchert wurden. Zum anderen war da die willkürliche Abnahme der Kolonien von der Platte. Im ungünstigsten Fall wurden so von einer Platte nur Kolonien eines *E.coli*-Stammes abgenommen. Andererseits ermöglicht diese Vorgehensweise auch eine quantitative Aussage, da die Wahrscheinlichkeit oftmals denselben Stamm abzunehmen größer ist bei einem hohen Auftreten des Stammes. So konnte in der Multiplex-PCR gezeigt werden, dass in den Säuregruppen zwar mehr *E.coli*-Isolate gefunden wurden, die einen Pathogenitätsfaktor aufwiesen, dass aber die Varianz an Pathogenitätsfaktoren geringer war als in der Kontrollgruppe.

Da bei der Multiplex-PCR in einem Zielansatz mehrere Primer eingesetzt werden, besteht die Schwierigkeit dieser Methode darin, für alle Primer optimale Reaktionsbedingungen zu schaffen. So werden einzelne Zielsequenzen trotz aller Bemühungen häufig benachteiligt oder bevorzugt (Pass *et al.* 2000). In der vorliegenden Untersuchung betrug die geringste Konzentration eingesetzter Ziel-DNA aus Referenzstämmen, die nach der Multiplex-PCR in der Agargelelektrophorese die Darstellung aller den einzelnen Stämmen entsprechenden Pathogenitätsfaktorgene ermöglicht, 1 pg. Nach Schulz (1999) lassen sich aus 10^9 *E.coli* Bakterien 17 µg DNA isolieren. Demzufolge entspräche der Nachweis von 1 pg *E.coli*-DNA der Zahl von 60 Bakterien. Hierbei muss aber auch bedacht werden, dass 8 der 9 untersuchten Gene plasmidkodiert sind und die Möglichkeit besteht, dass mehrere Kopien des Plasmids in einer Bakterienzelle vorliegen.

Eine statistische Auswertung der Multiplex-PCR Ergebnisse, war aufgrund der beschriebenen Schwierigkeiten für die unterschiedlichen Gruppen nicht möglich.

Das dominante *E. coli* Pathogenitätsgen in allen Versuchsgruppen war das *est II*-Gen, welches für das hitzestabile Enterotoxin I kodiert. Dieses Toxin ist verantwortlich für Durchfallerkrankungen durch Veränderung der Wasser- und Elektrolytbalance im Dünndarm (Fairbrother 1999). Eine Untersuchung von Frydendahl (2002) an PWD und ED erkrankten Schweinen zeigte ebenfalls, dass das *est II*-Gen das am häufigsten Auftretende war. Diese Beobachtung steht in Übereinstimmung mit vielen weiteren Untersuchungen verschiedener Autoren (Moon et al. 1986; Harel et al. 1991; Ojeniyi et al. 1994; Wittig et al. 1995; Blanco et al. 1997).

In der vorliegenden Untersuchung kam das *FedA*-Gen nur bei einem Tier in der Ameisensäuregruppe im Colon in Kombination mit dem *est II*- Gen vor. Dagegen waren in der Kontrollgruppe mehrere Tiere mit *E.coli*-Isolaten, die das *FedA* und *fas*-Gen trugen, belastet.

Zu bemerken war zusätzlich, dass neben der erhöhten Varianz an Pathogenitätsfaktoren, ebenfalls mehr Tiere in der Kontrollgruppe positive *E.coli*-Isolate aufwiesen als in den anderen Gruppen.

Das *fae*- und das *FedA*- Gen stehen für die Fimbrien F4 und F18, die wiederum Hauptmarker für pathogene *E.coli* sind (Blomberg et al. 1993). In einer Zusammenfassung schlug Frydendahl (2002) deshalb als Alternative zur Diagnostik von PWD die Detektion der Pathogenitätsgene von *fae* und *FedA* vor. In derselben Studie fand Frydendahl heraus, dass 47 von 173 ETEC-Stämmen die von an PWD erkrankten Ferkeln aus Dänemark stammten, positiv für das *FedA*-Gen getestet wurden. Wohingegen 154 von 173 der Isolate von ED erkrankten Tieren positiv für dieses Gen getestet wurden. Das durch diese Studie vorliegende Untersuchungsergebnis deckt sich mit den Ergebnissen aus der bereits bestehenden Literatur. So wurden auch bei Tsiloyiannis *et. al* (2001) verschiedene organische Säuren zur Vorbeugung gegen PWD eingesetzt und gleichzeitig der Kot auf das Vorkommen von F4 tragenden *E.coli* untersucht. Die Ergebnisse zeigten eine deutliche Reduktion der untersuchten *E.coli* bei den säuresupplementierte Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe. *In vitro*-Untersuchungen von Gedek (1999) zeigten, dass bei einem Säurezusatz von 1,2% Ameisensäure das Anhaften eines ETEC *E. coli* (Serotyp O157:H7) um 54% reduziert wurde. Das unterstützt die Annahme, dass die Säure einen direkten Einfluss auf das Vorkommen von *E.coli* hat.

Betrachtet man die Ergebnisse der Untersuchung auf Pathogenitätsfaktoren im Zusammenhang mit denen der tatsächlich aufgetretenen Durchfallerkrankungen, kann man feststellen, dass das Vorkommen von Pathogenitätsfaktoren von *E.coli* nicht grundsätzlich zu einer Durchfallerkrankung führen muss. Zu dieser Erkenntnis kamen auch Schierack *et al.* (2006). Hier wurden Virulenzfaktorgene von *E.coli*, die aus klinisch gesunden Schweinen isoliert worden waren, untersucht. Das Ergebnis zeigte, dass das Vorhandensein von Virulenzgenen in *E.coli*-Stämmen der intestinalen Bakterienbiota nicht in Korrelation zu eintretenden Erkrankungen steht. Das Vorkommen von *E.coli* Pathogenitätsgenen bedingt also nicht unbedingt eine Erkrankung des Tieres. Wohingegen bei einem an PWD/ED erkranktem Tier stets pathogenitätsgen-tragende *E.coli* gefunden werden können. Zur Auslösung einer Erkrankung spielt somit zum einen der Immunstatus des Tieres eine wichtige Rolle, zum anderen auch die Menge an pathogenitätsgen-tragenden *E.coli*.

Die Ergebnisse der Realtime-PCR bezüglich der *Escherichia spp.* Zellzahl und der untersuchten Pathogenitätsgene bestätigten die oben beschriebenen Ergebnisse. Da diese Proben DNA-Extrakte aus der Digesta der einzelnen Darmabschnitte waren, ist hier das quantitative Bild noch aussagekräftiger. Die Ergebnisse aus der Magendigesta zeigten bei der Betrachtung der *Escherichia spp.* Zellzahl keine Unterschiede zwischen den Gruppen. Verglich man dagegen das Verhältnis *Escherichia spp.* zu Eubakterien, konnte man feststellen, dass das Verhältnis in der Kontrollgruppe stärker in Richtung der *Escherichia spp.* verschoben war. Im distalen Jejunum ergab sich ein etwas anderes Bild. Hier fand sich in der Benzoessäure- und Kombinationspräparatgruppe ein weitaus größerer Anteil von *Escherichia spp.* innerhalb der Eubakterien. Allerdings ist anzumerken, dass die Streuung in diesen Gruppen sehr hoch war und die Ergebnisse damit weniger verlässlich waren. Bei der Betrachtung der *Escherichia spp.* im Colon bestand ein signifikanter Unterschied zwischen der Ameisensäure- und Benzoessäuregruppe, sowie zwischen der Ameisensäure- und der Kombinationspräparatgruppe und ein tendenzieller Unterschied zwischen der Kontroll- und der Ameisensäuregruppe. Die Ameisensäuregruppe wies dabei im Vergleich zu den anderen Gruppen immer einen niedrigeren Wert auf. Auch das Verhältnis der *Escherichia spp.* zu den Eubakterien unterschied sich signifikant zwischen der Ameisensäure- und Kombinationspräparatgruppe, wobei auch hier die Ameisensäuregruppe von allen Gruppen den niedrigsten Wert aufwies.

So ist also durch die Supplementierung von Ameisensäure ein deutlicher reduzierender Effekt im Hinblick auf die *Escherichia spp.* im Colon zu verzeichnen. Da im Colon jedoch keine

Ameisensäure mehr nachweisbar ist, scheint dieser Effekt im Dünndarm seinen Ursprung zu haben.

Eine weitere mittels der Realtime-PCR durchgeführte Untersuchung bezog sich auf die Pathogenitätsfaktoren von *E.coli*, die quantitativ nachgewiesen wurden. Zum einen wurde das *est-II*-Gen ausgewählt, da es in der vorliegenden Studie in der Multiplex-PCR-Untersuchung am häufigsten vorkam. Zum anderen wurde das *elt-IA*-Gen untersucht, welches für das hitzelabile Enterotoxin steht und mittels der Multiplex-PCR nicht nachgewiesen werden konnte, obwohl es sich in der Literatur als sehr häufiges Pathogenitätsgen von *E.coli* zeigte (Chapman et al. 2006). Überraschend war, dass im Magen von 7 Tieren jeweils 6-7 pro Gruppe mittels der Realtime-PCR positiv für das *elt-IA*-Gen getestet wurden, wobei jedoch keine Unterschiede zwischen den Gruppen vorlagen. Auch im distalen Jejunum waren in der Kontroll-, Ameisensäure- und Benzoesäuregruppe noch 6-7 positive Proben zu verzeichnen, während die Kombinationspräparatgruppe nur noch 4 positive Proben aufwies. Im Colon kam es dann mit 4-6 positiven Proben zu einer Reduktion. Allerdings ergaben sich quantitativ signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen. Die Kombinationspräparatgruppe zeigte deutlich höhere Werte des *elt-IA*-Gens als die übrigen Gruppen. Die restlichen Gruppen waren jedoch nicht signifikant unterschiedlich zueinander. Das supplementierte Kombinationspräparat scheint also einen Einfluss auf die Anzahl der *Escherichia spp.* im Colon zu haben, nicht jedoch auf die Pathogenitätsgene von *E.coli*.

Das *est-II*-Gen wurde im Vergleich zum *elt-IA*-Gen in geringerer Menge in den Digestaprobe gefunden. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu den Ergebnissen der Multiplex-PCR, denn dort konnte kein *elt-IA* gefunden werden. Dies kann an der unterschiedlichen Amplifizierung liegen, da bei der Realtime PCR einzelne Gene, bei der Multiplex-PCR jedoch ein Gemisch von neun Pathogenitätsfaktoren nachgewiesen wurde. Eventuell war der Nachweis von *elt-IA* in der Multiplex PCR suboptimal.

4.7.3 Bakterielle Diversität

Die Diversität ist ein Maß für die Unterschiedlichkeit der detektierten Mikroorganismen, was wiederum als ein Indikator für die Ausgeglichenheit der intestinalen Mikrobiota angesehen werden kann (Zoetendal et al. 2004). Eine höhere Diversität hat laut Jensen *et al.* (Jensen 2003) einen positiven Effekt auf die Leistung des Wirtstieres, weil so eine Proliferation einer bestimmten Bakteriengruppe und damit die Gefahr einer Dysbiose vermieden wird.

Der Einfluss der verschiedenen organischen Säuren auf die Diversität der Magen-, Jejunum- und Colon-Mikrobiota wurde mittels der Denaturierenden Gradientengelelektrophorese

(DGGE) untersucht. Die 16S rRNA-Profile der bakteriellen Populationen, die mittels der DGGE hergestellt werden, ermöglichen sowohl eine schnelle Einschätzung der Diversität als auch die gleichzeitige Analyse mehrerer Proben, was ebenso die Bewertung der Ähnlichkeit der Mikrobiota einzelner Tiere innerhalb wie zwischen den Versuchsgruppen erlaubt. Die DGGE an sich macht jedoch nur eine Aussage über eventuelle Veränderungen der bakteriellen Gemeinschaft. Welche Bakterienpopulationen beeinflusst werden, kann nur durch eine Sequenzierung der Banden analysiert werden.

Zusätzlich besteht eine wesentliche Beeinträchtigung der DGGE-Auswertung in der Detektion verschiedener 16S rRNA-Operone einer Spezies. Dadurch kann die Bildung von mehreren Banden in einem Gel verursacht werden (Nübel 1996; Satokari 2001).

Die Untersuchung der Magen- und Jejunum-Mikrobiota, in der vorliegenden Studie lieferte keine brauchbaren Ergebnisse, da die Sensitivität dieser Methode nicht ausreichend war, um auf dem Gel ein Bandenmuster entstehen zu lassen. Nach Untersuchungen von Klär (2008) liegt diese Tatsache darin begründet, dass mit zunehmendem Alter der Absetzferkel die Magensäureproduktion ansteigt und damit die Zahl der Bakterien stark absinkt. Laut Muyzer *et al.* (1993) und Zoetendal *et al.* (1998) können jedoch durch die DGGE nur solche bakteriellen Populationen detektiert werden, deren Anteil an der gesamten bakteriellen Vielfalt mehr als 1% beträgt. Abhängig von der DNA-Extraktionsmethode werden bakterielle Gattungen, Spezies oder Gruppen in Konzentrationen von insgesamt weniger 10^8 Zellen/g Probenmaterial nur mit geringer Wahrscheinlichkeit durch die DGGE detektiert (Muyzer und Smalla 1998; Simpson *et al.* 1999). Mithilfe der Realtime-PCR konnten jedoch Eubakterien, *Lactobacillus spp.* und *Escherichia spp.* im Magen und Jejunum nachgewiesen werden.

Aufgrund dessen konnte nur das Colon auf Unterschiede und Ähnlichkeiten in der mikrobiellen Zusammensetzung zwischen den Versuchsgruppen untersucht werden. Statistisch signifikante Ergebnisse waren hier nicht zu verzeichnen. Auffällig war jedoch, dass die Indizes Richness, Shannon-Index und Evenness in der Kontrollgruppe alle numerisch höher lagen als in den Säuregruppen, während der Simpson-Index in der Kontrollgruppe numerisch deutlich niedriger war als in den Säuregruppen. Diese Tatsache lässt den Schluss zu, dass die Diversität der bakteriellen Gemeinschaft im Colon der Kontrollgruppe höher war als bei den Säuregruppen, die supplementierten Säuren also einen Einfluss auf die Diversität der bakteriellen Population haben. Da davon auszugehen ist, dass im Colon keine der supplementierten organischen Säuren mehr vorhanden ist, muss es sich dabei um einen sekundären Effekt handeln, der auf einer Veränderung der bakteriellen Mikrobiota auch in den anderen Darmabschnitten zurückzuführen ist. Vergleicht man dann jedoch die

Ähnlichkeiten zwischen den Gruppen, so zeigt der Sørensen-Quotient, dass hier keine signifikanten Unterschiede zu finden sind.

Um einen Einblick über die gesamte Phase des Absetzens zu bekommen, wurden am 5., 9. und 14. Tag nach dem Absetzen Kotproben jedes Tieres gesammelt und mittels der DGGE untersucht.

An keinem der untersuchten Tage konnten signifikante Unterschiede der ökologischen Indizes beobachtet werden. Durch die Kotproben konnten also zwischen den Gruppen keine Unterschiede festgestellt werden.

Betrachtet man die untersuchten Proben jedoch im Zeitverlauf vom 5. zum 14. Tag, so fällt auf, dass die Kombinationspräparatgruppe häufig ein etwas anderes Muster zeigt als die übrigen Gruppen. So waren am 5. Tag nach dem Absetzen in der Kombinationspräparatgruppe höhere Richnesswerte zu verzeichnen als in den übrigen Gruppen. In dieser Gruppe war also eine höhere Diversität der bakteriellen Population vorhanden. Am 9. Tag nach dem Absetzen kam es in der Kontroll-, Benzoessäure- und Kombinationspräparatgruppe zu einem Abfall der Richnesswerte und damit zum Abfall der Diversität der bakteriellen Population im Kot. Während dann am 14. Tag nach dem Absetzen die Richnesswerte in diesen drei genannten Gruppen wieder anstiegen und alle Gruppen ein ähnliches Ergebnis zeigten.

Die Kontroll-, Ameisensäure- und Benzoessäuregruppen zeigen einen deutlichen Abfall des Shannon-Index vom 5. bis zum 14. Tag nach dem Absetzen und damit einen Abfall der Diversität der bakteriellen Population. In der Kombinationspräparatgruppe stieg der Shannon-Index am 14. Tag wieder stark an und erreichte damit fast den Ausgangswert vom 5. Tag. Dies lässt damit auch einen Anstieg der Diversität der bakteriellen Population vermuten.

Ebenso war in der Kontroll-, Ameisensäure- und Benzoessäuregruppe ein stetiger Abfall des Evennesswertes und damit der Diversität der bakteriellen Population vom 5. bis zum 14. Tag nach dem Absetzen zu beobachten. Im Gegensatz dazu ist bei der Kombinationspräparatgruppe vom 5. zum 14. Tag nach dem Absetzen ein starker Abfall des Evennesswertes zu bemerken. Am 14. Tag jedoch stieg auch dieser Wert wieder stark an, bis er fast den ursprünglichen Wert erreicht. Damit unterscheidet sich die Kombinationspräparatgruppe im Muster ihres Zeitverlaufs deutlich von den anderen Gruppen. Der Simpson-Index zeigt im Zeitverlauf ein gegensätzliches Bild zu den anderen Indizes und hat damit bezüglich der Diversität eine ähnliche Aussagekraft.

Daraus ist also zu schließen, dass die einzelnen Gruppen im Zeitverlauf einer ständigen Abnahme der Diversität der intestinalen Mikrobiota unterworfen waren. In der

Kombinationspräparatgruppe wurde am 9. Tag nach dem Absetzen allerdings ein Abfall der Diversität beobachtet, die zum 14. Tag hin wieder anstieg. Auch in der Literatur ist bekannt, dass es zu einer altersabhängigen Änderung der Diversität der intestinalen Mikrobiota kommt (Simpson et al. 1999; Favier et al. 2002; Inoue et al. 2005; Konstantinov et al. 2006). In einer Studie von Melin *et al.* (1997) wurde die Homogenität der Mikrobiota in der Aufzuchtperiode der Ferkel beobachtet. Aus dieser Untersuchung ist bekannt, dass die Homogenität am 3. Tag nach dem Absetzen sinkt und dann Tage später wieder den gleichen Status wie vor dem Absetzen erreicht. Auch in der hier vorliegenden Untersuchung kommt es am 5. Tag nach dem Absetzen zu einem Abfall der Homogenität der Mikrobiota, die dann zum 14. Tag hin wieder ansteigt. Die stärkeren Schwankungen in der Kombinationspräparatgruppe lassen darauf schließen, dass die Veränderungen der Mikrobiota bedingt durch das Absetzen schneller überwunden werden, als in den anderen Gruppen, was wiederum auf einen positiven Effekt durch das Kombinationspräparat hinweist.

Der Sörensen-Quotient am 14. Tag nach dem Absetzen, deutet an, dass die Bakterienpopulationen der einzelnen Gruppen (ausgenommen der Benzoesäuregruppe) sich ähnlicher waren als zwischen den Gruppen. Besonders deutlich wird dies in der Kontrollgruppe, die die höchste Ähnlichkeit der Bakterienpopulationen innerhalb dieser Gruppe zeigt. Diese Beobachtung lässt den Schluss zu, dass die spezielle Fütterung der einzelnen Gruppen Bakteriengemeinschaften im Verdauungstrakt geschaffen haben, die sich voneinander unterscheiden.

4.8 Schlussfolgerung und Ausblick

Die vorliegende Arbeit hat gezeigt, dass der Einsatz von organischen Säuren Einfluss auf die intestinale Bakterienpopulation hat. Es zeigten sich bei verschiedenen Parametern wiederholt Unterschiede zwischen den Säuregruppen und der Kontrollgruppe. In keiner der Gruppen trat signifikant vermehrt Durchfall auf oder eine Beeinträchtigung der Gesundheit. Betrachtet man jedoch die Bakterienspezies, die Verursacher der PWD sind, so ist festzustellen, dass die Tiere in der Kontrollgruppe eine höhere Diversität an Pathogenitätstragenden *E.colis* zeigten als die Säuregruppen. Bei schlechteren Stall- und Umgebungsbedingungen wäre für diese Tiere das Erkrankungsrisiko höher als für die Tiere der Säuregruppen. Bei der Untersuchung auf Pathogenitätsgene zeigte die Ameisensäuregruppe mit dem Erscheinen von nur einer Variante an Pathogenitätsgenen das für die Tiere günstigste Ergebnis. Ebenso fiel

die Ameisensäuregruppe bei der Messung der *Escherichia spp.* Zahl mithilfe der Realtime-PCR durch ein niedriges Ergebnis positiv auf.

Die Leistungsparameter der Absetzferkel wurden durch den Säurezusatz kaum beeinflusst. Signifikante Steigerungen der Leistungen waren auch hier wieder nur in der Ameisensäuregruppe zu verzeichnen.

Anhand der gezeigten Ergebnisse ist folglich die Ameisensäure vor der Benzoesäure und dem Kombinationspräparat in ihrer positiven Wirkung anzusiedeln.

Bezüglich der Benzoesäure sind besonders die gesteigerte Konzentration an Hippursäure im Harn und der gesenkte Harn pH-Wert hervorzuheben. Beides ist als durchaus vorteilhaft für die Gesunderhaltung der Tiere anzusehen. Zusätzlich erzielte auch die Benzoesäure wichtige positive Effekte auf die intestinale Bakterienpopulation, ebenfalls im Bereich der Pathogenitätsgene von *E.coli*. Bei der Kombinierung der beiden Säuren im Kombinationspräparat könnte man annehmen, dass sich diese positiven Effekte summieren. Dies war aber nicht der Fall, denn die Kombinationspräparatgruppe zeigte teilweise sogar schlechtere Ergebnisse als die übrigen Säuregruppen. Es kann also nicht davon ausgegangen werden, dass eine Summierung der Säuren gleichbedeutend mit einer Summierung der positiven Effekte ist.

Da alle hier untersuchten organischen Säuren im Laufe des Verdauungstraktes an Konzentration verloren, wäre es interessant, ein Kombinationspräparat zu untersuchen, welches aus einer mikroverkapselten organischen Säure und aus einer nicht-verkapselten organischen Säure besteht. Da von der mikroverkapselten organischen Säure zu erwarten ist, dass sie ihre Wirkung erst im distalen Bereich des Dünndarms entfaltet, wäre es so eventuell möglich die positive Wirkung der organischen Säuren an unterschiedlichen Stellen im Verdauungstrakt zum Einsatz zu bringen.

5. Zusammenfassung

Kirsch, Katrin: „**Die Wirkung organischer Säuren als Futterzusatzstoff auf den Nährstoffumsatz und Bakterienpopulationen im Verdauungstrakt von Absetzferkeln.**“

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung verschiedener organischer Säuren und eines Säuregemisches als Futterzusatz bei früh abgesetzten Ferkeln, die daraus resultierenden Einflüsse auf die intestinale bakterielle Mikrobiota und mögliche Einflüsse auf die Leistungsparameter der Tiere.

Der Tierversuch bestand aus insgesamt 84 Ferkeln, die im Alter von 23 Tagen abgesetzt wurden. Es wurden die folgenden organischen Säuren geprüft: 5 g/kg Ameisensäure, 5 g/kg Benzoesäure und eine Kombination aus 1 g/kg Ameisensäure, 3 g/kg Benzoesäure, 1 g/kg Zitronensäuremonohydrat, 1 g/kg Kaliumsorbat und 0,2 g/kg Cuxarom Spice 301. Die Messung des Harn - pH ergab einen signifikant niedrigeren pH-Wert in der Benzoesäuregruppe im Gegensatz zur Kontroll- und Ameisensäuregruppe. Die Hippursäurekonzentration war in der Benzoesäuregruppe signifikant höher als in der Kontroll- und Kombinationspräparatgruppe. In Letzterer war die Konzentration jedoch ebenfalls signifikant höher als in der Kontrollgruppe.

Bezüglich der untersuchten mikrobiellen Metaboliten wies die Ameisensäuregruppe bei der Betrachtung des Gesamtlaktatgehalts im proximalen Jejunum signifikant weniger Laktat auf als die Kombinationspräparatgruppe. Die Untersuchung der flüchtigen Fettsäuren ergab eine signifikant geringere n-Valeriansäurekonzentration in der Kontroll- und Benzoesäuregruppe gegenüber der Ameisensäuregruppe ($p = 0,012$).

Es wurden tendenziell geringere *E.coli* Keimzahlen in der Ameisensäuregruppe gegenüber der Kontrollgruppe beobachtet ($p = 0,068$). In allen Gruppen konnte mittels Multiplex-PCR das *est-II*-Gen als dominantes Pathogenitätsgen nachgewiesen werden. Die Kontrollgruppe wies im Gegensatz zu den Säuregruppen eine höhere Varianz an Pathogenitätsgen-tragenden *E.coli* auf. Auch war die Anzahl der positiv getesteten Tiere in der Kontrollgruppe höher als in den Säuregruppen.

Die quantitative Untersuchung der Bakterienpopulationen im Colon ergab in der Ameisensäuregruppe eine signifikante Senkung der *Escherichia spp.*, gegenüber der Benzoesäure- und Kombinationspräparatgruppe. Das Verhältnis der *Escherichia spp.* zu Eubakterien ergab einen signifikanten Unterschied zwischen der Ameisensäure- und Kombinationspräparatgruppe. Der Pathogenitätsfaktor *elt-IA* von *E.coli* war in der

Kombinationspräparatgruppe signifikant höher als in den übrigen Gruppen. Bei der Betrachtung des Verhältnis *elt-IA* zu *Escherichia spp.* zeigte sich ein signifikant niedrigerer Wert in der Kontroll- und Benzoessäuregruppe gegenüber der Ameisensäuregruppe.

Die mittels DGGE untersuchten Kotproben zeigten im Laufe des Versuchszeitraumes in der Kontroll-, Ameisensäure- und Benzoessäuregruppe eine ständige Abnahme der bakteriellen Diversität. Demgegenüber steht die Kombinationspräparatgruppe, in deren Kot am 9. Tag nach dem Absetzen ein Abfall der Bakteriendiversität nachzuweisen war, die jedoch zum 14. Tag hin wieder anstieg. Die Bakteriengemeinschaften in den Kotproben waren am 5. und 9. Tag kaum unterschiedlich zwischen den Gruppen. Am 14. Tag jedoch gab es signifikante Unterschiede, so war die Kontrollgruppe in sich homogener als die Säuregruppen.

Bezüglich der scheinbaren praecaecalen Verdaulichkeit konnte in der Kontrollgruppe eine signifikant höhere Cysteinverdaulichkeit gegenüber der Kombinationspräparatgruppe und eine signifikant höhere Methioninverdaulichkeit der Kontrollgruppe gegenüber der Benzoessäure- und Kombinationspräparatgruppe festgestellt werden. Die Methioninverdaulichkeit der Ameisensäuregruppe war ebenfalls signifikant höher als die der Kombinationspräparatgruppe ($p < 0.0001$). Die Überprüfung der Ameisensäure- und Benzoessäurekonzentration in der Digesta ergab, dass schon im Magen die Konzentration der eingesetzten Säure stark verringert war, und am Ende des Jejunums eine scheinbare praecaecale Verdaulichkeit von mehr als 99% bestand. Die Leistungsparameter zeigten eine Lebendmassezunahme um 10,5% und eine Senkung des Futteraufwands der Tiere in der Ameisensäuregruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Signifikante Ergebnisse konnten jedoch nur in der 5. Versuchswoche gefunden werden. In der ersten Versuchswoche nahmen die Tiere der Ameisensäuregruppe signifikant mehr Futter auf als die Tiere der Kombinationspräparatgruppe.

Effekte organischer Säuren auf die intestinale Mikrobiota von Absetzferkeln wurden in dieser Arbeit festgestellt. Ameisensäure sticht dabei durch geringere *Escherichia spp.* Zellzahlen und vermindertes Auftreten an Pathogenitätsfaktoren hervor. Hinsichtlich der Leistungsparameter war Ameisensäure ebenfalls die effektivste Säure in dieser Studie. Auch mittels Einsatz von Benzoessäure sind einige Effekte besonders im Hinblick auf die Hippursäurebildung und die Harn pH-Wert Absenkung zu verzeichnen. Das Kombinationspräparat zeigte gegenüber der Kontrollgruppe die schwächsten Effekte. Eine Kombination wirksamer organischer Säuren summiert somit nicht die positiven Effekte der einzelnen Säure.

6. Summary

Kirsch, Katrin: „**The effect of organic acids used as feed additives on the nutrient conversion and bacteria population in the intestinal tract of weaning pigs.**“

The current study was conducted to test the use of various organic acids and an acid mixture as feed additives for early-weaned pigs, the resulting effects on the intestinal bacterial microbiota and possible effects on performance parameters of the animals.

The study was performed on a total of 84 pigs weaned at the age of 23 days. The following organic acids were tested: 5 g/kg formic acid, 5 g/kg benzoic acid and a combination of 1 g/kg formic acid, 3 g/kg benzoic acid, 1 g/kg citric acid monohydrate, 1 g/kg potassium sorbate and 0.2 g/kg Cuxarom Spice 301. The urinary pH was significantly lower in the benzoic acid group compared to the control and formic acid groups. The hippuric acid concentration was significantly higher in the benzoic acid group compared to the control and combined acid groups. In the latter, the concentration was however higher than in the control group.

With regards to the tested microbial metabolites, a significantly lower concentration of lactate was found in animals in the formic acid group compared to the combined acid group after measurement of the total lactate in the proximal jejunum. Measurement of volatile fatty acids resulted in a significantly lower n-valerian acid concentration in the control and benzoic acid groups compared to the formic acid group ($p = 0.012$). The number of *E.coli* bacteria in the formic acid group had a tendency to be lower than in the control group ($p = 0.068$). Using Multiplex-PCR, the *est-II*-gene was shown to be the dominant pathogenicity gene in all groups. The control group exhibited a higher variance of pathogenicity gene containing *E.coli* compared to the other groups. In addition, the number of animals testing positive was higher in the control group than in the remaining groups.

The quantitative tests of bacteria populations in the colon resulted in a significant decrease of the *Escherichia spp* bacteria in the formic acid group compared to the benzoic acid and combined acid groups. The ratio of *Escherichia spp.* and eubacteria was significantly different between the formic acid and the combined acid groups. The pathogenicity factor *elt-IA* from *E.coli* was significantly higher in the combined acid group compared to the remaining groups. The ratio of *elt-IA* and *Escherichia spp.* had a significantly lower value in the control and benzoic acid groups compared to the formic acid group.

In the fecal samples examined with DGGE, a continuous decrease of bacterial diversity occurred in the control, formic acid and benzoic acid groups over the course of the study. In contrast, in the combined acid group an initial decrease in the bacterial diversity in the feces was observed on day 9 after weaning was followed by an increase observed on day 14. With regards to the bacterial colonies in the fecal samples no substantial difference was observed between the groups on days 5 and 9. On day 14, however, significant differences could be shown with the control group being more homogenous than the acid groups.

Regarding the praecaecal digestibility, the control group showed a significantly higher cysteine digestibility than the combined acid group and a significantly higher methionine digestibility compared to the benzoic acid and combined acid groups. The methionine digestibility in the formic acid group was also significantly higher than in the combined acid group ($p < 0.0001$). Measurements of the formic acid and benzoic acid concentration in the digesta showed that the concentration of the supplemental acids had decreased in the stomach very strong, and the apparent praecaecal digestibility at the far end of the jejunum was more than 99%.

Testing of the performance parameters showed an increase in body weight by 10.5% and a decrease in the feed conversion of the animals in the formic acid group compared to the control group. These findings were only significant in the 5th study week. In the 1st study week, the animals in the formic acid group consumed significantly more feed than the animals in the combined acid group.

The current study shows that organic acids have various effects on the intestinal microbiota of weaning pigs. Formic acid was of particular interest due to its correlation with lower *Escherichia spp.* bacterial numbers and less frequent occurrence of pathogenicity factors.

Regarding performance parameters, formic acid was also the most effective acid in this study. The use of benzoic acid resulted in some important effects particularly with regards to the formation of hippuric acid and the decrease in urinary pH-values. The use of the combined acid supplement showed only minor effects compared to the control group. A combination of active organic acids does therefore not result in an additive effect.

7. Literaturverzeichnis

Al Jassim, R. A. (2003). "Lactobacillus ruminis is a predominant lactic acid producing bacterium in the caecum and rectum of the pig." Lett. Appl. Microbiol. **37**(3): S. 213-217.

Amezcuca, R., Friendship, R., Dewey, C.E., Gyles, C., Fairbrother, J.M. (2002). "Presentation of postweaning *Escherichia coli* in southern Ontario, prevalence of hemolytic *E.coli* serogroups involved, and their antimicrobialresistance patterns." Can. J. Anim. Sci. **66**: S. 73-78.

Argenzio, A. (1984). "Gastrointestinal motility." Duke's Physiology of Domestic Animals: S. 278-289.

Arthur, D. (1970). "The determination of chromium in animal feed and excreta by atomic absorption spectrometry." Can. J. Spectrosc. **15**: S. 1-4.

Babinszky, L., Tossenberger, J., Palmai, L., Karakas, P., Szab, J., Horn, P. (1998). "The effect of formic acid on ileal digestibility of amino acids and on performance in weaned piglets." J. Anim. Sci. **76**: S. 181.

Bach Knudsen, K. E., Jensen, B. B. und Andersen, J. O., Hansen, I. (1991). "Gastrointestinal implications in pigs of wheat and oat fractions. 2. Microbial activity in the gastrointestinal tract." Br. J. Nutr. **65**(2): S. 233-48.

Bach Knudsen, K. E., Serena, A., Canibe, N., Juntunen, K.S. (2003). "New insight into butyrate metabolism." Proc. Nutr. Soc. **62**(1): S. 81-86.

Baustad, B. (1993). "Effects of formic acid on performance in growing pigs." Nor. J. Agric. Sci. **7**: S. 61-69.

Bergman, E. N. (1990). "Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species." Physiol. Rev. **70**(2): S. 567-90.

Bertschinger, H. U. (1999). Postweaning *E.coli* diarrhea and edema disease. Diseases of Swine. B. E. Straw, Dallaire, S., Mengeling, W.L. und Taylor, D.J. (Eds.), Iowa State University Press, Ames, : S. 441-454

Bertschinger, H. U., Bachmann, M., Mettler, C., Pospischil, A., Schraner, E.M., Stamm, M., Sydler, T., Wild, P. (1990). "Adhesive fimbriae produced in vivo by *Escherichia coli* 0139:K12(B): H1 asociated with enterotoxaemia in pigs." Vet. Mikrobiol. **25**: S. 267-281.

Bertschinger, H. U., Fairbrother, J.M., Nielsen, N.O., Pohlenz, J.F. (1992). Diseases of Swine, 7th edition. London, Wolfe: S. 487-521

Bertschinger, H. U., Fairbrother, J.M., Nielsen, N.O., Pohlenz, J.F. (1992). "*Escherichia coli* Infections." In Leman et al. Disease of Swine, 7th Edition, Iowa University Press: S. 487-521.

- Bertschinger, H. U., Stamm, M. und Vogeli, P. (1993). "Inheritance of resistance to oedema disease in the pig: experiments with an *Escherichia coli* strain expressing fimbriae 107." *Vet Microbiol* **35**(1-2): 79-89.
- Bilkei, G. (1996). Ferkelverluste nach dem Absetzen -Vet special. Jena; Stuttgart, Gustav-Fischer-Verlag: S. 15-34
- Blanco, M., Blanco, J. E., Gonzalez, E. A., Mora, A., Jansen, W., Gomes, T. A., Zerbini, L. F., Yano, T., de Castro, A. F. und Blanco, J. (1997). "Genes coding for enterotoxins and verotoxins in porcine *Escherichia coli* strains belonging to different O:K:H serotypes: relationship with toxic phenotypes." *J. Clin. Microbiol.* **35**(11): S. 2958-63.
- Blomberg, L., Henriksson, A. und Conway, P. L. (1993). "Inhibition of adhesion of *Escherichia coli* K88 to piglet ileal mucus by *Lactobacillus* spp." *Appl. Environ. Microbiol.* **59**(1): S. 34-9.
- Bolduan, v. G., Jung, H., Schneider, R., Block, J., Klenke, B. (1988). "Influence of propionic- and formic acid on piglets." *J Anim. Physiol. a. Anim. Nutr.* **59**: S. 72-78.
- Bosund, I. (1962). "The action of benzoic and salicylic acid on the metabolism of microorganisms." *Adv. Food Res.* **11**: S. 331-353.
- Bosworth, B. T. und Casey (1997). Identification of toxin and pilus genes in porcine *Escherichia coli* using polymerase chain reaction (PCR) with multiple primer pairs. 97th general meeting of the American Society for Microbiology, Miami Beach, Florida, 4.-8. Mai
- Bosworth, B. T., Samuel, J. E., Moon, H. W., O'Brien, A. D., Gordon, V. M. und Whipp, S. C. (1996). "Vaccination with genetically modified Shiga-like toxin IIe prevents edema disease in swine." *Infect. Immun.* **64**(1): S. 55-60.
- Bridges, J. W., French, M. R., Smith, R. L. und Williams, R. T. (1970). "The fate of benzoic acid in various species." *Biochem. J.* **118**(1): S. 47-51.
- Brooks, P. H., Moran, C.A., Beal, J.D., Demeckova (2001). Liquid feeding for the young piglets. *The Weaner Pig: Nutrition and Management.* J. W. H. M.A. Varley. Oxon: CAB International, Wallingford: S.153-178
- Broz, J. (2004). Benzoic acid- a new feed additive for swine with multiple effects 8. Tagung Schweine- und Geflügelernährung, Institut für Ernährungswissenschaften, Universität Halle-Wittenberg, 23.-25. November Universitätsdruckerei Halle. S. 39- 41 ISBN: 3-860107429
- Bühler, K., Wenk, C., Broz, J. und Gebert, S. (2006). "Influence of benzoic acid and dietary protein level on performance, nitrogen metabolism and urinary pH in growing-finishing pigs." *Arch. Anim. Nutr.* **60**(5): S. 382-9.
- Burnell, T. W., Cromwell, G. L. und Stahly, T. S. (1988). "Effects of dried whey and copper sulfate on the growth responses to organic acid in diets for weanling pigs." *J. Anim. Sci.* **66**(5): S. 1100-8.

- Bye, R., Linares, E. (1999). Medicinal plant diversity of Mexico and its potential for animal health sciences. *Biotechnology in the Feed Industry*. N. U. Press. Nottingham, UK, Lyons, P., Jacques, K.A.: S.265-294
- Canibe, N., Steien, S. H., Overland, M. und Jensen, B. B. (2001). "Effect of K-diformate in starter diets on acidity, microbiota, and the amount of organic acids in the digestive tract of piglets, and on gastric alterations." *J. Anim. Sci.* **79**(8): S. 2123-33.
- Cera, K. R., Mahan, D. C., Cross, R. F., Reinhart, G. A. und Whitmoyer, R. E. (1988). "Effect of age, weaning and postweaning diet on small intestinal growth and jejunal morphology in young swine." *J. Anim. Sci.* **66**(2): S. 574-84.
- Chang, E. B., Rao, M.C. (1994). Intestinal water and elektrolyt transport. Mechanism of physiological and adaptive responses. Lippencott Raven Press New York, Johnson, L.R. Alpers, D.H., Christensen, J. und Jacobsen, E.
- Chapman, T. A., Wu, X. Y., Barchia, I., Bettelheim, K. A., Driesen, S., Trott, D., Wilson, M. und Chin, J. J. (2006). "Comparison of virulence gene profiles of *Escherichia coli* strains isolated from healthy and diarrheic swine." *Appl. Environ. Microbiol.* **72**(7): S. 4782-95.
- Choi, C. und Chae, C. (1999). "Genotypic prevalence of F4 variants (ab, ac, and ad) in *Escherichia coli* isolated from diarrheic piglets in Korea." *Vet. Microbiol.* **67**(4): S. 307-10.
- Cole, D. J., Beal, R. M. und Luscombe, J. R. (1968). "The effect on performance and bacterial flora of lactic acid, propionic acid, calcium propionate and calcium acrylate in the drinking water of weaned pigs." *Vet. Rec.* **83**(18): S. 459-64.
- Conway, P. L., Gibson, G.R., Macfarlane, G.T. (1995). Microbial ecology of the human large intestine. In *Human Colonic Bacteria*, CRC Press, Boca Raton, FL: S. 1-24
- Cori, C. F., Cori, G.T. (1929). "Glycogen formation in the liver from D- and L- lactic acid." *J. biol chem.* **81**: S. 389-403.
- Cummings, J. H. und Macfarlane, G. T. (1997). Colonic microflora: Nutrien and health. *Nutrien.* **13**: S. 476-478
- Danielson, A. D., Peo, E. R., Jr., Shahani, K. M., Lewis, A. J., Whalen, P. J. und Amer, M. A. (1989). "Anticholesteremic property of *Lactobacillus acidophilus* yogurt fed to mature boars." *J. Anim. Sci.* **67**(4): S. 966-74.
- de Haan, L. und Hirst, T. (2004). "Cholera toxin: a paradigm for multi-funktional engagement of cellular mechanisms." *Mol. Membr. Biol.* **21**: S. 77-92.
- den Brok, G. M., Hendriks, J.G.L., Vrieling, M.G.M., van der Peet-Schwering, C.M.C. (1999). Urinary pH, ammonia emission and performance of growing/finishing pigs after the addition of mixture of organic acids, mainly benzoic acid, to the feed. In: *Praktijkonderzoek Varkenshouderij*. Raalte-Rosmalen, Netherlands, Research Institute for Pig Husbandry
- Dunlop, R. H. und Hammond, P. B. (1965). "D-Lactic acidose of ruminants." *Ann. NY Acad. Sci.* **119**: S. 1109-1152.

- Eckel, B., Roth, F.X., Kirchgeßner, M., Eidelsburger, U. (1992). "Zum Einfluß von Ameisensäure auf die Konzentration an Ammoniak und biogenen Aminen im Gastrointestinaltrakt." *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* **67**: S. 198-205.
- Egert, M., de Graaf, A. A., Smidt, H., de Vos, W. M. und Venema, K. (2006). "Beyond diversity functional microbiomics of the human colon." *Trends. Microbiol.* **14**(2): S. 86-91.
- Ehrlinger, M. (2007). *Phytogene Zusatzstoffe in der Tierernährung*, Ludwig-Maximilian-Universität München, Dissertation.
- Eidelburger, U. (1997). *Organische Säuren in der Schweinefütterung -Wirkungsweise als Basis für die richtige Produktwahl Deutsche Vilomix, Tagungsband.S. 24-40*
- Eidelburger, U., Kirchgessner, M., Roth, F.X. (1992). "Zum Einfluß von Ameisensäure, Calciumformiat und Natriumhydrogencarbonat auf pH-Wert, Trockenmassegehalt, Konzentration an Carbonsäuren und Ammoniak in verschiedenen Segmenten des Gastrointestinaltraktes." *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* **68**: S. 20-32.
- Engelhardt, v. W. und Breves, G. (2000). *Physiologie der Haustiere*. Stuttgart, Enke-Verlag: S. 394-399. ISBN: 3-7773-1429-3
- Erickson, A. K., Willgoos, J.A., McFarland, S.Y., Benfield, D.A., Francis, D.H. (1992). "Identification of two porcine brush border glycoproteins that bind the K88ac adhesion of *Escherichia coli* and correlation of these glycoproteins with the adhesive phenotype." *Infect. Immun.* **60**: S. 983-988.
- Fairbrother, J. M. (1999). Neonatal *E.coli* diarrhea. Diseases of Swine. B. E. In: Straw, D'Allaire, S., Mengeling, W.L., Taylor, D.J.(Eds.),. Iowa State University, Press, Ames: S. 433-441
- Fairbrother, J. M., Nadeau, E. und Gyles, C. L. (2005). "*Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies." *Anim. Health. Res. Rev.* **6**(1): S. 17-39.
- Fairbrother, J. M. H., R., Desautels, C. (2000). "Trends in pathotypes and antimicrobial resistance of *E.coli* isolates from weaned pigs; Proceedings of the 16th IPVS Congress, Melbourn, Australia." S. 16-17.
- Favier, C. F., Vaughan, E. E., De Vos, W. M. und Akkermans, A. D. (2002). "Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates." *Appl. Environ. Microbiol.* **68**(1): S. 219-26.
- Fekete, P. Z., Gerardin, J., Jacquemin, E., Mainil, J. G. und Nagy, B. (2002). "Replicon typing of F18 fimbriae encoding plasmids of enterotoxigenic and verotoxigenic *Escherichia coli* strains from porcine postweaning diarrhoea and oedema disease." *Vet. Microbiol.* **85**(3): S. 275-84.
- Fischer, S. G. und Lerman, L. S. (1983). "DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory." *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **80**(6): S. 1579-83.

- Foegeding, P. M. und Busta, F. F. (1991). Desinfection, Sterilization and Preservation. S. B. editor. Philadelphia PA, Lea & Febiger: S.802-832
- Francis, D. H. (2002). "Enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in pigs and its diagnosis." J. o. Swine Health a. Production **10**: S. 171-175.
- Franco, L. D., Fondevila, M., Lobera, M. B. und Castrillo, C. (2005). "Effect of combinations of organic acids in weaned pig diets on microbial species of digestive tract contents and their response on digestibility." J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. **89**(3-6): S. 88-93.
- Frank, K. (1994). "Maßnahmen zum Schutz von Lebens- und Futtermitteln vor Schädigung durch Mikroorganismen." Übers. Tierernährg. **22**: S. 149.
- Frankel, G. und Giron, J. (1989). "Multigene amplication: simultaneous detection of three virulenz genes in diarrheal Stoll." Mol. Microbiol.: S. 1729-1734.
- Franklin, M. A., Mathew, A. G., Vickers, J. R. und Clift, R. A. (2002). "Characterization of microbial populations and volatile fatty acid concentrations in the jejunum, ileum, and cecum of pigs weaned at 17 vs 24 days of age." J. Anim. Sci. **80**(11): S. 2904-10.
- Frydendahl, K. (2002). "Prevalence of serogroups and virulence genes in *Escherichia coli* associated with postweaning diarrhoea and edema disease in pigs and a comparison of diagnostic approaches." Vet. Microbiol. **85**(2): S. 169-82.
- Fuller, R. (1977). "The importance of Lactobacilli in maintaining normal microbial balance in the crop." Br. Poult. Sci. **18**(1): S. 85-94.
- Gabert, V. M., Sauer, W.C., Schmitz, M., Ahrens, F., Mosenthin, R. (1995). "The effect of formic acid and buffering capacity on the ileal digestibilities of amino acids and bacterial populations and metabolites in the small intestine of weanling pigs fed semipurified fish meal diets." Can. J. Anim. Sci. **75**: S. 615-623.
- Gabert, V. M., Sauer, W.C., Schmitz, M., Ahrens, F., Mosenthin, R. (1995). "The effect of fumaric acid and sodium fumarate supplementation to diets for weanling pigs on amino acid digestibility and volatile fatty acid concentrations in ileal gigesta." Anim. Feed Sci. a. Technol. **53**: S. 243-254.
- Galfi, P. und Bokori, J. (1990). "Feeding trial in pigs with a diet containing sodium n-butyrate." Acta. Vet. Hung. **38**(1-2): S. 3-17.
- García, V., Catalá-Gregori, P., Hernández, F., Megías, M.D., Madrid, J. (2007). "Effect of formic acid and plant Extracts on growth, nutrient digestibility, intestine mucosa morphology and meat yield of broilers." J. Appl. Poult. Res. **16**: S. 555-562.
- Gedek, B., Kirchgessner, M. Edelburger, U., Wiehler, S. Bott, A., Roth, F.X. (1992). "Influence of formic acid on the microflora in different segments ofthe gastrintestinal tract. 5.Nutritive value of organic acids in piglets rearing." J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. **67**: S. 206-214.

Gedek, B. R. (1974). Auswirkung der Zusammensetzung und Stoffwechselfätigkeit der Darmflora auf den Gesundheitszustand des Makroorganismus. Zbl. Bakteriologie. Abt. 1 Ref 240: S. 418-423

Gedek, B. R. (1999). "Adherence of *Escherichia coli* serogroup O 157 and the Salmonella typhimurium mutant DT 104 to the surface of *Saccharomyces boulardii*." Mycoses **42**(4): S. 261-4.

Giesecke, D., Stangassinger, M., Henle, K. (1985). "D(-) Milchsäure- ein Stoffwechselproblem." Z. Ernährungswiss. **24**(3): S. 172-186.

Giesting, D. W. und Easter, R. A. (1985). "Response of starter pigs to supplementation of corn soybean meal diets with organic acids." J. Anim. Sci. **60**: S. 1288-1294.

Giesting, D. W. und Easter, R. A. (1986). "Acidification. Status in swine diets." Feed Management **37**: S. 8-10.

Giesting, D. W. und Easter, R. A. (1991). "Effect of protein source and fumaric acid supplementation on apparent ileal digestibility of nutrients by young pigs." J. Anim. Sci. **69**(6): S. 2497-503.

Göbel, S. B. (2003). "Multiplex-Polymerase- ketten-Reaktion (MPCR) zum Nachweis ausgewählter Virulenzfaktoren schweinepathogener *Escherichia coli* -Einsatz bei Ferkeln mit *Bacillus cereus* var. *toyoi* Zulage." Dissertation, Institut für Tierernährung, FU-Berlin.

Guggenbuhl, P., Seon, A., Pinon Quintana, A., Simoes Nunes, C. (2007). "Effects of dietary supplementation with benzoic acid on zootechnical performance, the gastrointestinal microflora and the ileal digestibility of the young pig." Livestock Science **108**: S. 218-221.

Gyles, C. L. (1993). *Escherichia coli*. Pathogenesis of bacterial infections in animal, Iowa state University Press, Ames: S. 164-187

Ha, S. K., Choi, C. und Chae, C. (2003). "Prevalence of a gene encoding adhesin involved in diffuse adherence among *Escherichia coli* isolates in pigs with postweaning diarrhea or edema disease." J. Vet. Diagn. Invest. **15**(4): S. 378-81.

Harel, J., Lapointe, H., Fallara, A., Lortie, L. A., Bigras-Poulin, M., Lariviere, S. und Fairbrother, J. M. (1991). "Detection of genes for fimbrial antigens and enterotoxins associated with *Escherichia coli* serogroups isolated from pigs with diarrhea." J. Clin. Microbiol. **29**(4): S. 745-52.

Heinritzi, K., Gindele, H.R., Reiner, G., Schurrbusch, U. (2006). Schweinekrankheiten, Verlag Eugen Ulmer Stuttgart. **1.Auflage**: S. 335-344

Henry, R. W., Pickard, D.W., Hughes, P.E. (1985). "Citric acid and fumaric acid as food additives for early-weaned piglets." Anim. Produc. **40**: S. 505-509.

Höhler, D. und Pallauf, J. (1993). "Effect of citric acid added to a maize-soya diet with or without Zn supplementation on the availability of minerals." J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. **69**: S. 133-142.

- Höhler, D. und Pallauf, J. (1994). "Effect of Zn supply and addition of citric acid to maize-soya diet on nutritive value and mineral absorption in piglets." *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* **71**: S. 858-866.
- Holmes, R. K., Twiddy, E. M. und Pickett, C. L. (1986). "Purification and characterization of type II heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*." *Infect. Immun.* **53**(3): S. 464-73.
- Holt, J. G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., Williams, S.T. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Williams and Wilkins USA0-683-00603-7
- Huisman, T. T., Bakker, D., Klaasen, P. und de Graaf, F. K. (1994). "Leucine-responsive regulatory protein, IS1 insertions, and the negative regulator FaeA control the expression of the fae (K88) operon in *Escherichia coli*." *Mol. Microbiol.* **11**(3): S. 525-36.
- Imberechts, H., De Greve, H. und Lintermans, P. (1992). "The pathogenesis of edema disease in pigs. A review." *Vet. Microbiol.* **31**(2-3): S. 221-33.
- Imberechts, H., De Greve, H., Schlicker, C., Bouchet, H., Pohl, P., Charlier, G., Bertschinger, H., Wild, P., Vandekerckhove, J. und Van Damme, J. (1992). "Characterization of F107 fimbriae of *Escherichia coli* 107/86, which causes edema disease in pigs, and nucleotide sequence of the F107 major fimbrial subunit gene, fedA." *Infect. Immun.* **60**(5): S. 1963-71.
- Imberechts, H., Wild, P., Charlier, G., De Greve, H., Lintermans, P. und Pohl, P. (1996). "Characterization of F18 fimbrial genes fedE and fedF involved in adhesion and length of enterotoxemic *Escherichia coli* strain 107/86." *Microb. Pathog.* **21**(3): S. 183-92.
- Imoto, S. und Namioka, S. (1978). "VFA production in the pig large intestine." *J. Anim. Sci.* **47**(2): S. 467-78.
- Inoue, R., Tsukahara, T., Nakanishi, N. und Ushida, K. (2005). "Development of the intestinal microbiota in the piglet." *J. Gen. Appl. Microbiol.* **51**(4): S. 257-65.
- Jasaitis, D. K., Wohlt, J.E., Evans, J.L. (1987). "Influence of feed ion content on buffering capacity of ruminant feedstuffs in vitro." *J. Dairy Sci.* **70**: S. 1391-1403.
- Jensen, B. B. (2001). Possible ways of modifying type and amount of products from microbial fermentation in gut. *Gut Environment of Pigs*. A. Piva, Bach Knudsen, K.E., Lindberg, J.E. Nottingham, Nottingham University Press: S. 181-200
- Jensen, B. B., Hojiberg, O., Mikkelsen, L.L., Hedemann, M.S., Canibe, N. (2003). "Enhancing intestinal function to treat and prevent intestinal disease." *9th Int. Symp. Dig. Physiol. Pigs* **1**: S. 103-120.
- Johlin, F. C., Fortman, C. S., Nghiem, D. D. und Tephly, T. R. (1987). "Studies on the role of folic acid and folate-dependent enzymes in human methanol poisoning." *Mol. Pharmacol.* **31**(5): S. 557-61.
- Jones, P. H., Roe, J. M. und Miller, B. G. (2001). "Effects of stressors on immune parameters and on the faecal shedding of enterotoxigenic *Escherichia coli* in piglets following experimental inoculation." *Res. Vet. Sci.* **70**(1): S. 9-17.

- Jongbloed, A. W. (1987). "Phosphorus in the Feeding of Pigs. Effect of the Diet on the Absorption and retention of Phosphorus by Growing Pigs." **Report Nr. 179**: Lelystad, The Netherlands: IVVO.
- Jonsson, E. und Conway, P. (1992). Probiotic for pigs. Probiotics- The Scientific Basis. R. Fuller. London, Chapman & Hall: S. 260-303
- Katouli, M. und Wallgren, P. (2005). Metabolism and population dynamic of intestinal microflora in the growing pig. Biology of growing animals series. P. J. N. H. In: W.H. Holzapfel, Elsevier, S. **2**: S. 21-53
- Khai, L. T. L., Kobayashi, H., Phan, T.T., Duyen, T.T.T., Tuan, N.A., Yamasaki, S., Taniguchi, T. (2002). "Diagnosis of post-weaning diarrhea and edema disease due to *colibacilli* in pigs in the Mekong Delta, Vietnam." *Livestock. Prod. Sci.* **11**.
- Kidder, D. E. und Manners, M. J. (1978). Digestion in pig. Scientifica Bristol, Avon ISBN: 0856080225
- Kirchgessner, M., Gedek, B., Wiehler, S., Bott, A., Eidelsburger, U., Roth, F.X. (1992). "Influence of formic acid, calcium formate and sodium hydrogen carbonate on the microflora in different segments of the gastrointestinal tract. 10. Communication. Investigation about the nutritive efficacy of organic acids in the rearing of piglets." *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* **63**: S. 73-81.
- Kirchgessner, M. und Roth, F. X. (1978). "Fumarsäure als Futteradditiv in der Ferkelaufzucht und Schweinemast." *Züchtungskunde* **50**: S. 17-25.
- Kirchgessner, M. und Roth, F. X. (1980). "[Digestibility and balance of proteins, energy and several minerals in fumaric acid supplementation in piglets]." *Z. Tierphysiol. Tierernähr. Futtermittelk.* **44**(4-5): S. 239-46.
- Kirchgessner, M. und Roth, F. X. (1982). "Propionsäure als Futteradditiv in der Ferkelaufzucht und Schweinemast." *Wirtschaftseig. Futter* **28**: S. 225-234.
- Kirchgessner, M. und Roth, F. X. (1988). "Ergotrope Effekte durch organische Säuren in der Ferkelaufzucht und Schweinemast." *Übers. z. Tierernä.* **16**: S. 93-108.
- Klär, I. (2008). Einfluss der Verfütterung des Probiotikums *E.faecium* NCIMB 10415 im frühen postnatalen Stadium auf die Zusammensetzung und Stoffwechselaktivität der gastrointestinalen Mikrobiota bei Ferkeln, Dissertation. Berlin, Freie Universität.
- Kluge, H., Broz, J. und Eder, K. (2006). "Effect of benzoic acid on growth performance, nutrient digestibility, nitrogen balance, gastrointestinal microflora and parameters of microbial metabolism in piglets." *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* **90**(7-8): S. 316-24.
- Knarreborg, A., Miquel, N., Granli, T., Jensen, B.B. (2002). "Establishment and application of an in vitro methodology to study the effects of organic acids on coliform and lactic acid bacteria in the proximal part of the gastrointestinal tract of piglets." *Anim. Feed Sci. a. Technol.* **99**: S. 131-140.

- Kobayashi, D. und Sakata, T. (2006). "Influence of temperature on short-chain fatty acid production by pig cecal bacteria in vitro." *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **52**(1): S. 66-9.
- Konstantinov, S. R., Awati, A. A., Williams, B. A., Miller, B. G., Jones, P., Stokes, C. R., Akkermans, A. D., Smidt, H. und de Vos, W. M. (2006). "Postnatal development of the porcine microbiota composition and activities." *Environ. Microbiol.* **8**(7): S. 1191-9.
- Korunic, Z. (1998). "Diatomaceous earths, a group of natural insecticides." *J. Stored. Prod. Res.* **34**: S. 87-97.
- Kozasa, M. (1986). "Probiotics for animal use in Japan." *Microbiol. Alim.Nutr.* **4**: S. 121-135.
- Kulla, S. (2001). "Untersuchungen zum Einfluss von Kaliumdiformiat als Futterzusatz auf das Keimspektrum und Parameter des mikrobiellen Stoffwechsels im Chymus sowie verschiedenen Verdauungsprozessen von Absetzferkeln." Hannover, Dissertation.
- Kwak, T. J., Peterson, J.T. (2004). *Community Indices, Parametrs, and Comparisons. Analysis and Interpretation of Freshwater Fisheries Data American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, M.Brown, C.Guy (Hrsg.),: S. 677-763*
- Lalles, J. P., Bosi, P., Smidt, H. und Stokes, C. R. (2007). "Nutritional management of gut health in pigs around weaning." *Proc. Nutr. Soc.* **66**(2): S. 260-8.
- Lane, D. J., Pace, B., Olsen, G.J., Stahl, D.A., Sogin, M.L., Pace, N.R. (1985). "Rapid determination of 16S ribosomal RNA Sequences for phylogenetic analysis." *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **82**: S. 6955-6959.
- Langendijk, P. S., Schut, F., Jansen, G.J., Raangs, G.C., Kamphuis, G.R., Wilkinson, M.H., Welling, G.W. (1995). "Quantitative Fluorescence in situ hybridization of *Bifidobacterium* spp. with genus-specific 16S rRNA-targeted probes and its application in fecal samples." *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: S. 3069-3075.
- Langendorf, H. (1969). "Ammoniak als Lebensmittelbestandteil und als Metabolit." *Z. Ernährungswiss.* **9**(4): S. 301-311.
- Lanz, R., Kuhnert, P., Boerlin, P. (2003). "Antimicrobial resistance and resistance gene determinants in clinical *Escherichia coli* from different animal species in Switzerland." *Vet. Microbiol.* **91**: S. 73-84.
- Lee, C. H., Hu, S. T., Swiatek, P. J., Moseley, S. L., Allen, S. D. und So, M. (1985). "Isolation of a novel transposon which carries the *Escherichia coli* enterotoxin STII gene." *J. Bacteriol.* **162**(2): S. 615-20.
- Lévêque, C., Mounolou, J.-C. (2004). "Biodiversity." Wiley, New York.
- Lück, E. (1986). *Benzoessäure. Chemische Lebensmittelkonservierung. Stoffe, Wirkungen, Methoden.* Heidelberg, Springer-Verlag: S. 181-188
- Lupton, J. R. und Kurtz, P. P. (1993). "Relationship of colonic luminal short-chain fatty acids and pH to in vivo cell proliferation in rats." *J. Nutr.* **123**(9): S. 1522-30.

- Mackie, R. I., Sghir, A. und Gaskins, H. R. (1999). "Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract." *Am. J. Clin. Nutr.* **69**(5): S. 1035-1045.
- Mainil, J. G., Daube, G., Jacquemin, E., Pohl, P. und Kaeckenbeeck, A. (1998). "Virulence plasmids of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolates from piglets." *Vet. Microbiol.* **62**(4): S. 291-301.
- Mainil, J. G., Jacquemin, E., Pohl, P., Kaeckenbeeck, A. und Benz, I. (2002). "DNA sequences coding for the F18 fimbriae and AIDA adhesin are localised on the same plasmid in *Escherichia coli* isolates from piglets." *Vet. Microbiol.* **86**(4): S. 303-11.
- Makar, A. B., Tephly, T. R., Sahin, G. und Osweiler, G. (1990). "Formate metabolism in young swine." *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **105**(2): S. 315-20.
- Männer, K., Spieler, A. (1997). "Probiotics in piglets- an alternative traditional growth promoters." *Micoecol. Ther.* **26**: S. 243-256.
- Maribo, H., Jensen, B.B., Hedemann, M.S. (2000). Different doses of organic acids to piglets. Report Nr. 469 Danish Bacon and Meat Council, Dänemark
- Marlorny, G. (1969). "Die akute und chronische Toxizität der Ameisensäure und ihrer Formiate." *Z. Ernährungswiss.* **9**: S. 332-339.
- Marsman, K. E., McBurney, M. I. (1996). "Dietary fiber and short-chain fatty acids affect cell proliferation and protein synthesis in isolated rat colonocytes." *J. Nutr.* **126**(5): S. 1429-37.
- Maxwell, F. J., Stewart, C.S. (1995). The microbiology of the gut and the role of probiotics. *The Neonatal Pig: Development and Survival.* e. MA Varley. Wallingford, Oxon, CAB International: S. 155-186
- Mayer, E. A. (1994). The physiology of gastric storage and emptying. *Physiology of the Gastrointestinal Tract.* L. R. Press. New York, Johnson, L.R., Alpers, D.H., Christensen, J. und Jacobsen, E.: S. 929-976
- Maynard, C., Fairbrother, J.M., Bekal, S., Sanschagrin, F., Levesque, R.C., Brousseau, R., Masson, L., Lariviere, S., Harel, J. (2003). "Antimicrobial resistance genes in enterotoxigenic *Escherichia coli* O149:K91 isolates obtained over a 23-year period from pigs." *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**: S. 3214-3221.
- McCracken, B. A., Spurlock, M. E., Roos, M. A., Zuckermann, F. A. und Gaskins, H. R. (1999). "Weaning anorexia may contribute to local inflammation in the piglet small intestine." *J. Nutr.* **129**(3): S. 613-9.
- Medzihradsky, F. und Lamprecht, W. (1966). "Stoffwechseluntersuchungen mit Essig-, Milch- und Zitronensäure." *Z. Lebensmitteluntersuchung* **130**: S. 171-180.
- Melin, L., Jensen-Waern, M., Johannisson, A., Ederoth, M., Katouli, M. und Wallgren, P. (1997). "Development of selected faecal microfloras and of phagocytic and killing capacity of neutrophils in young pigs." *Vet. Microbiol.* **54**(3-4): S. 287-300.

- Moon, H. W., Schneider, R. A. und Moseley, S. L. (1986). "Comparative prevalence of four enterotoxin genes among *Escherichia coli* isolated from swine." Am. J. Vet. Res. **47**(2): S. 210-2.
- Moseley, S. L., Hardy, J. (1983). "Isolation and Nucleotide Sequence Determination of Gene Encoding a Heat-Stable Enterotoxin in *Escherichia coli*." S. 1167-1174.
- Mroz, Z., Jongbloed, A. W., Partanen, K. H., Vreman, K., Kemme, P. A. und Kogut, J. (2000). "The effects of calcium benzoate in diets with or without organic acids on dietary buffering capacity, apparent digestibility, retention of nutrients, and manure characteristics in swine." J. Anim. Sci. **78**(10): S. 2622-32.
- Mroz, Z., Jongbloed, W.A., Partanen, K., van Diepen, J.Th.M., Kemme, P.A., Kogut, J. (1997). "Apparent digestibility of amino acids and balance of nitrogen and minerals as influenced by buffering capacity and organic acids in diets for growing swine." J. Anim. Sci. **75**: S. 185.
- Mroz, Z., Reese, D. E., Overland, M., van Diepen, J. T. und Kogut, J. (2002). "The effects of potassium diformate and its molecular constituents on the apparent ileal and fecal digestibility and retention of nutrients in growing-finishing pigs." J. Anim. Sci. **80**(3): S. 681-90.
- Muyzer, G., de Waal, E.C., Uitterlinden, A.G. (1993). "Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16 S rRNA." Appl. Environ. Microbiol. **59**: S. 695-700.
- Muyzer, G. und Smalla, K. (1998). "Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology." Ant. V. Leeuwen. **73**(1): S. 127-41.
- Nabuurs, M. J. A. (1995). "Microbiological, structural and functional changes of the small intestine of pigs at weaning." Pig New. a. Info. **16**: S. 93N-97N.
- Nagy, B., Casey, T. A. und Moon, H. W. (1990). "Phenotype and genotype of *Escherichia coli* isolated from pigs with post-weaning diarrhea in Hungary." J. Clin. Microbiol. **28**: S. 651-653.
- Nagy, B. und Fekete, P. Z. (1999). "Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in farm animals." Vet. Res. **30**(2-3): S. 259-84.
- Nagy, B., Whipp, SC., Imbrechts, H., Bertschinger, HU., Dean-Nystrom, EA., Casey, TA., Salajka, E. (1997). "Biological relationship between F18ab and F18ac fimbriae of enterotoxigenic and verotoxigenic *Escherichia coli* from weaned pigs with oedema disease or diarrhoea." Microb. Pathog. **22**: S. 1-11.
- Nagy, B., Wilson, R. A. und Whittam, T. S. (1999). "Genetic diversity among *Escherichia coli* isolates carrying f18 genes from pigs with porcine postweaning diarrhea and edema disease." J. Clin. Microbiol. **37**(5): S. 1642-5.
- Nataro, J. P. und Kaper, J. B. (1998). "Diarrheagenic *Escherichia coli*." Clin. Microbiol. Rev. **11**(1): S. 142-201.

- Naughton, P. J. und Jensen, B. B. (2001). "A bioreactor system to study survival of *Salmonella typhimurium* in pig gut content." Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr. **114**(9-10): S. 378-81.
- Naumann, C., Bassler, R., Seibold, R., Barth, C. (1988). Die chemische Untersuchung von Futtermitteln, 2. Ergänzungslieferung, Methodenbuch Band III Darmstadt:, VDLUFA-Verlag
- Ngeleka, M., Pritchard, J., Appleyard, G., Middleton, D. M. und Fairbrother, J. M. (2003). "Isolation and association of *Escherichia coli* AIDA-I/STb, rather than EAST1 pathotype, with diarrhea in piglets and antibiotic sensitivity of isolates." J. Vet. Diagn. Invest. **15**(3): S. 242-52.
- Niewerth, U., Frey, A., Voss, T., Le Bouguenec, C., Baljer, G., Franke, S. und Schmidt, M. A. (2001). "The AIDA autotransporter system is associated with F18 and *stx2e* in *Escherichia coli* isolates from pigs diagnosed with edema disease and postweaning diarrhea." Clin. Diagn. Lab. Immunol. **8**(1): S. 143-9.
- Nübel, U., Engelen, B., Felske, A., Snaidr, J. (1996). "Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNA in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis." J. Bacteriol. **178**(19): S. 5636-5643.
- Ojeniyi, B., Ahrens, P. und Meyling, A. (1994). "Detection of fimbrial and toxin genes in *Escherichia coli* and their prevalence in piglets with diarrhoea. The application of colony hybridization assay, polymerase chain reaction and phenotypic assays." Zentralbl. Veterinarmed. B. **41**(1): S. 49-59.
- Orskov, I., Orskov, F., Wittig, W. und Sweeney, E. J. (1969). "A new *E. coli* serotype O149:K9 (B), K88ac (L): H10 isolated from diseased swine." Acta. Pathol. Microbiol. Scand. **75**(3): S. 491-8.
- Overland, M., Granli, T., Kjos, N. P., Fjetland, O., Steien, S. H. und Stokstad, M. (2000). "Effect of dietary formates on growth performance, carcass traits, sensory quality, intestinal microflora, and stomach alterations in growing-finishing pigs." J. Anim. Sci. **78**(7): S. 1875-84.
- Partanen, K. (2001). Organic acids- there efficacy and modes of action in pigs. Gut Environment of Pigs, Nottigham University Press: S. 201-218
- Partanen, K., Siljander-Rasi, H., Pentikainen, J., Pelkonen, S. und Fossi, M. (2007). "Effects of weaning age and formic acid-based feed additives on pigs from weaning to slaughter." Arch. Anim. Nutr. **61**(5): S. 336-56.
- Partanen, K. H. und Mroz, Z. (1999). "Organic acids for performance enhancement in pig diets." Nutr. Res. Rev. **12**(1): S. 117-45.
- Pass, M. A., Odedra, R. und Batt, R. M. (2000). "Multiplex PCRs for identification of *Escherichia coli* virulence genes." J. Clin. Microbiol. **38**(5): S. 2001-4.
- Pluske, J. R., Williams, I.H., Aherne, F.X. (1996). "Maintenance of villous height and crypt depth in piglets by providing continuous nutrition after weaning." Anim. Sci. **62**: S. 131-144.

- Pryde, S. E., Richardson, A. J., Stewart, C. S. und Flint, H. J. (1999). "Molecular analysis of the microbial diversity present in the colonic wall, colonic lumen, and cecal lumen of a pig." *Appl. Environ. Microbiol.* **65**(12): S. 5372-7.
- Radcliffe, J. S., Zhang, Z. und Kornegay, E. T. (1998). "The effects of microbial phytase, citric acid, and their interaction in a corn-soybean meal-based diet for weanling pigs." *J. Anim. Sci.* **76**(7): S. 1880-6.
- Radecki, S. V., Juhl, M. R. und Miller, E. R. (1988). "Fumaric and citric acids as feed additives in starter pig diets: effect on performance and nutrient balance." *J. Anim. Sci.* **66**(10): S. 2598-605.
- Richter, G., Hartung, H., Bargholz, J., Herzog, E., Otto, F., Müller-Dittmann, T. (2006). "Organische Futterzusätze in der Schweinemast." *J. f. Verbrauchers. u. Lebensmittelsicher.* **1**: S. 210-221.
- Rippinger, P., Bertschinger, H. U., Imberechts, H., Nagy, B., Sorg, I., Stamm, M., Wild, P. und Wittig, W. (1995). "Designations F18ab and F18ac for the related fimbrial types F107, 2134P and 8813 of *Escherichia coli* isolated from porcine postweaning diarrhoea and from oedema disease." *Vet. Microbiol.* **45**(4): S. 281-95.
- Risley, C. R., Kornegay, E. T., Lindemann, M. D., Wood, C. M. und Eigel, W. N. (1992). "Effect of feeding organic acids on selected intestinal content measurements at varying times postweaning in pigs." *J. Anim. Sci.* **70**(1): S. 196-206.
- Risley, C. R., Kornegay, E.T., Lindemann, M.D., Weakland, S.M. (1991). "Effects of organic acids with and without a microbial culture on performance and gastrointestinal tract measurements of weanling pigs." *Anim. Feed Sci. Technol.* **35**: S. 259-270.
- Risley, C. R., Kornegay, E.T., Lindemann, M.D., Wood, C.M., Eigel, W.N. (1993). "Effect of feeding organic acids on gastrointestinal digesta measurements at various times postweaning in pigs challenged with enterotoxigenic *Escherichia coli*." *Can. J. Anim. Sci.* **73**: S. 931-940.
- Rolfe, R. D. (2000). "The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health." *J. Nutr.* **130**(2S Suppl): S. 396S-402S.
- Rolle, M. und Mayr, A. (2002). *Escherichia*. *Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*. A. Mayr. Stuttgart: S. 451-459
- Roth, F. X., Eckel, B., Kirchgessner, M., Eidelburger, U. (1992). "Influence of formic acid on pH-value, dry matter content, concentration of volatile fatty acids and lactic acid in gastrointestinal tract. 3. Communication: Investigations about the nutritive efficacy of organic acids in the rearing of piglets." *J. Anim. Physiol.a. Anim. Nutr.* **67**: S. 148-156.
- Roth, F. X. und Etle, T. (2005). *Organische Säuren: Alternative zu antibiotischen Leistungsförderern*In: Plitzer et al. (Eds.): *Tierernährung ohne antibiotische Leistungsförderer* 4.BOKU-Symposium Tierernährung, 27.10.2005, Universität für Bodenkultur Wien.S. 10-16 ISBN: 3-9-0096-62-6

- Roth, F. X. und Kirchgessner, M. (1988). "Zum Einsatz von Essigsäure in der Ferkelfütterung." *Landwirtsch. Forschu.* **41**: S. 58-62.
- Roth, F. X. und Kirchgessner, M. (1989). "Significance of dietary pH and buffering capacity in piglet nutrition. 1. pH and buffering capacity in diets supplemented with organic acids." *Landwirtsch. Forschu.* **42**: S. 157-167.
- Rousset, E. und Harel, J. D., J. D. (1998). "Binding characteristics of *Escherichia coli* enterotoxin b (STb) to the pig jejunum and partial characterization of the molecule involved." *Microb. Pathog.* **24**(5): S. 277-88.
- Russell, J. B. (1992). "Another explanation for the toxicity of fermentation acids at low pH: anion accumulation versus uncoupling." *J. Appl. Bacteriol.* **73**: S. 363-370.
- Russell, J. B. und Diez-Gonzales, F. (1998). "The effects of fermentation acids on bacterial growth." *Adv. Microb. Physiol.* **39**: S. 205-234.
- Sakata, T. (1987). "Stimulatory effect of short-chain fatty acids on epithelial cell proliferation in the rat intestine: a possible explanation for trophic effects of fermentable fibre, gut microbes and luminal trophic factors." *Br. J. Nutr.* **58**(1): S. 95-103.
- Sakata, T., Adachi, M., Hashida, M., Sato, N. und Kojima, T. (1995). "Effect of n-butyric acid on epithelial cell proliferation of pig colonic mucosa in short-term culture." *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.* **102**(4): S. 163-4.
- Sakurazawa, T. und Ohkusa, T. (2005). "Cytotoxicity of organic acids produced by anaerobic intestinal bacteria on cultured epithelial cells." *J. Gastroenterol.* **40**(6): S. 600-9.
- Satokari, R. M., Vaughan, E.E., Akkermans, A.D., Saarela, M., de Vos, W.M. (2001). "Bifidobacterial diversity in human feces detected by genus-specific PCR and denaturing gradient gel electrophoresis." *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: S. 504-513.
- Savage, D. C. (1977). "Microbial ecology of the gastrointestinal tract." *Annu. Rev. Microbiol.*, **31**: S. 107-133.
- Schäfer, K. (1995). "Analysis of short chain fatty acids from different intestinal samples by capillary gas chromatography." *Chromatograph.* **40**(9-10): S.550-556.
- Schierack, P., Steinruck, H., Kleta, S. und Vahjen, W. (2006). "Virulence factor gene profiles of *Escherichia coli* isolates from clinically healthy pigs." *Appl. Environ. Microbiol.* **72**(10): S. 6680-6.
- Schöne, F., Hartung, H., Richter, G., Kinast, C., Lutz, J. (2003). Pflanzenzubereitungen für Schweine, Abschlussbericht an der TLL Jena. Projektnummer: 45.19.340/2003 Bericht/Analyse S. 1-33.
- Schulz, K., Setzke, E., Grieb, E., Meckelein, B. (1999). Isolierung von DNA. Gentechnische Methoden 2.Auflage. G. S. In H.G. Gassen. Heidelberg, Berlin Spektrum, Akademischer Verlag Gustav Fischer: S. 105-135

- Scipioni, R., Zaghini, G., Biavati, B. (1978). "The use of acidified diets for early weaning of piglets." *Zootech. e Nutrizi. Anim.* **4**: S. 201-218.
- Simpson, J. M., McCracken, V. J., White, B. A., Gaskins, H. R. und Mackie, R. I. (1999). "Application of denaturant gradient gel electrophoresis for the analysis of the porcine gastrointestinal microbiota." *J. Microbiol. Methods* **36**(3): S. 167-79.
- Simpson, J. M., McCracken, V.J., Gaskins, H.R., Mackie, R.I. (2000). "Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of 16 S ribosomal DNA amplicons to monitor changes in fecal bacterial populations of weaning pigs after introduction of *Lactobacillus reuteri* strain MM53." *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: S. 4705-4714.
- Smeds, A., Hemmann, K., Jakava-Viljanen, M., Pelkonen, S., Imberechts, H. und Palva, A. (2001). "Characterization of the adhesin of *Escherichia coli* F18 fimbriae." *Infect. Immun.* **69**(12): S. 7941-5.
- Smeds, A., Pertovaara, M., Timonen, T., Pohjanvirta, T., Pelkonen, S. und Palva, A. (2003). "Mapping the binding domain of the F18 fimbrial adhesin." *Infect. Immun.* **71**(4): S. 2163-72.
- Smith, H. W. und Linggood, M. A. (1971). "Observations on the pathogenic properties of the K88, *Hly* and *Ent* plasmids of *Escherichia coli* with particular reference to porcine diarrhoea." *J. Med. Microbiol.* **4**(4): S. 467-85.
- Sojka, W. J. (1965). "*Escherichia coli* in domestic animals and Poultry. Farnham Royal Bucks, England." *Commonw. Agricult. l Burea.*: S. 104,156.
- Sommer, W. und Kuhlmann, K. (2006). Benzoesäure in der Schweinemast?9. Tagung Schweine- und Geflügelernährung, Halle (Saale),28. November In: Tagungsband der 9. Tagung Schweine- und Geflügelernährung.S. 226-228
- Spreeuwenberg, M. A., Verdonk, J. M., Gaskins, H. R. und Verstegen, M. W. (2001). "Small intestine epithelial barrier function is compromised in pigs with low feed intake at weaning." *J. Nutr.* **131**(5): S. 1520-7.
- Strauss, G. und Hayler, R. (2001). "Wirkung organischer Säuren: gesundheitsrelevante Kontaminationen im Mischfutter vermeiden." *Kraftf./Fee. Maga.* **4**: S. 147-151.
- Stryer, L. (1988). *Biochemistry* New York, WH Freeman and Company
- Stuke, O. (2003). Untersuchungen zu möglichen infektionsprophylaktischen Effekten verschiedener Futterzusätze (Ameisen- und Zitronensäure/laktulose/Pankreasenzyme unter den Bedingungen einer experimentellen oralen Belastung mit *E.coli* (Absetzferkel) bzw. mit *S.derby* (Mastschweine). Hannover.
- Suau, A., Bonnet, R., Sutren, M., Godon, J.J., Gibson, G.R., Collins, M.D., Dore, J. (1999). "Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut." *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: S. 4799-4807.
- Swords, W. E., Wu, C.C., Champlin, F.R., Buddington, R.K. (1993). "Postnatal changes in selected bacterial groups of the pig colonic microflora." *Biol. Neonate* **63**: S. 191-200.

Tannock, G. W., Munro, K., Harmsen, H.J., Wellings, G.W., Smart, J., Gopal, P.K. (2000). "Analysis of the fecal microflora of human subjects consuming a probiotic product containing *Lactobacillus rhamnosus* DR20." *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: S. 2578-2588.

Taras, D., Männer, K., Kraatz, M., Lübke-Becker, A., Simon, O. (2005). Impact of benzoic acid on early weaned piglets. Symposium Vitamine und Zusatzstoffe in der Ernährung von Mensch und Tier, Jena, 28. September In: Tagungsband zum 10. Symposium Vitamine und Zusatzstoffe in der Ernährung von Mensch und Tier. S. 211 - 216

Taylor, D. J. (1995). *Pig Diseases*. D. J. Taylor. Cambridge, Burlington Press: S. 116-135

Thomlinson, J. R. und Lawrence, T. L. (1981). "Dietary manipulation of gastric pH in the prophylaxis of enteric disease in weaned pigs: some field observations." *Vet. Rec.* **109**(6): S. 120-2.

Topping, D. L. und Clifton, P. M. (2001). "Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides." *Physiol. Rev.* **81**(3): S. 1031-64.

Torrallardona, D., Badiola, I., Broz, J. (2007). "Effects of benzoic acid on performance and ecology of gastrointestinal microbiota in weanling piglets." *Livestock Science* **108**: S. 210-213.

Tsiloyiannis, V. K., Kyriakis, S. C., Vlemmas, J. und Sarris, K. (2001). "The effect of organic acids on the control of porcine post-weaning diarrhoea." *Res. Vet. Sci.* **70**(3): S. 287-93.

Tsiloyiannis, V. K., Kyriakis, S. C., Vlemmas, J. und Sarris, K. (2001). "The effect of organic acids on the control of post-weaning oedema disease of piglets." *Res. Vet. Sci.* **70**(3): S. 281-5.

Uchida, K., Kataoka, K., Mituoka, T., Shinjo, T., Ogata, M. (1965). "Studies of the intestinal flora of pigs. I. The faecal bacterial flora of the healthy pig." *Nippo. Juiga. Zas.* **27**: S. 215-220.

Untersteiner, H. (2005). *Biostatistik- Datenauswertung mit SPSS und Excel für Naturwissenschaftler und Mediziner* Wien, Facultas Universitätsverlag

Vahjen, W. (2009). "Von 10^{12} Bakterien/g Kot handelt es sich bei 10^7 - 10^8 um *E.coli*". Berlin, Dr. Wilfried Vahjen: Persönliche Mitteilung.

Van den Broeck, W., Cox, E., Oudega, B. und Goddeeris, B. M. (2000). "The F4 fimbrial antigen of *Escherichia coli* and its receptors." *Vet. Microbiol.* **71**(3-4): S. 223-44.

Van Immerseel, F., Russell, J. B., Flythe, M. D., Gantois, I., Timbermont, L., Pasmans, F., Haesebrouck, F. und Ducatelle, R. (2006). "The use of organic acids to combat Salmonella in poultry: a mechanistic explanation of the efficacy." *Avian. Pathol.* **35**(3): S. 182-8.

Wald, C. (2002). *Untersuchung zur Wirksamkeit verschiedener ätherischer Öle im Futter von Aufzuchtsferkeln und Broilern*. Dissertation, Halle-Wittenberg, Martin-Luther-Universität

- Wald, C. (2004). "Die Wirkung phytogener Zusatzstoffe in der Tierernährung." Lohmann Information, Nr.2: S. 19-22.
- Wang, J. und Friedman, E. A. (1998). "Short-chain fatty acids induce cell cycle inhibitors in colonocytes." Gastroenterol. **114**(5): S. 940-6.
- Westendarp, H. (2003). "Kräutereinsatz in der Schweinefütterung." Internationale Jubiläumskonferenz der angewandten Wissenschaften: Gegenwärtige Probleme und Errungenschaften der Agrarwissenschaften in Viehhaltung und Pflanzenbau **4**: S. 236-246.
- Wilson, R. A. und Francis, D. H. (1986). "Fimbriae and enterotoxins associated with *Escherichia coli* serogroups isolated from pigs with colibacillosis." Am. J. Vet. Res. **47**(2): S. 213-7.
- Winkenwerder, F. (1999). Wirkung gekapselter Milchsäure bzw. eines gekapselten Säuregemisches als Futteradditiv auf die Darmflora von Absetzferkeln. Hannover.
- Wittig, W., Klie, H., Gallien, P., Lehmann, S., Timm, M. und Tschape, H. (1995). "Prevalence of the fimbrial antigens F18 and K88 and of enterotoxins and verotoxins among *Escherichia coli* isolated from weaned pigs." Zentralbl. Bakteriol. **283**(1): S. 95-104.
- Wohlt, J. E., Jasaitis, D.K., Evans, J.L. (1987). "Use of acid and Base titrations to evaluate the buffering capacity of ruminant feedstuffs in vitro." J. o. Dair. Sci. **70**: S. 1465-1470.
- Wolffram, S., Bisang, B., Grenacher, B. und Scharrer, E. (1990). "Transport of tri- and dicarboxylic acids across the intestinal brush border membrane of calves." J. Nutr. **120**(7): S. 767-74.
- Wolffram, S., Hagemann, C., Grenacher, B. und Scharrer, E. (1992). "Characterization of the transport of tri- and dicarboxylates by pig intestinal brush-border membrane vesicles." Comp. Biochem. Physiol. Comp. Physiol. **101**(4): S. 759-67.
- Wu, X. Y., Chapman, T., Trott, D. J., Bettelheim, K., Do, T. N., Driesen, S., Walker, M. J. und Chin, J. (2007). "Comparative analysis of virulence genes, genetic diversity, and phylogeny of commensal and enterotoxigenic *Escherichia coli* isolates from weaned pigs." Appl. Environ. Microbiol. **73**(1): S. 83-91.
- Zoetendal, E. G., Akkermans, A. D. und De Vos, W. M. (1998). "Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria." Appl. Environ. Microbiol. **64**(10): S. 3854-9.
- Zoetendal, E. G., Collier, C. T., Koike, S., Mackie, R. I. und Gaskins, H. R. (2004). "Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota: a review." J. Nutr. **134**(2): S. 465-72.

Verordnungen und Richtlinien:

Verordnung zum Schutz landwirtschaftlicher Nutztiere und anderer zur Erzeugung tierischer Produkte gehaltener Tiere bei ihrer Haltung (Tierschutz-Nutztierhaltungsverordnung-TierSchNutzV) vom 22. August 2006 (BGBl. I S. 2043), geändert durch Verordnung vom 30. November 2006 (BGBl. I S. 2759)

Verordnung (EG) Nr. 1831/2003 des Europäischen Parlamentes und des Rates vom 22. September 2003 über Zusatzstoffe zur Verwendung in der Tierernährung

Verordnung (EG) Nr. 184/2007 Der Kommission vom 20. Februar 2007 zur Zulassung von Kaliumdiformat (Formi LHS) als Futterzusatzstoff

Verordnung (EG) Nr. 1730/2006 Der Kommission vom 23. November 2006 zur Zulassung von Benzoesäure (VevoVital) als Futtermittelzusatzstoff

Verordnung über die Zulassung von Zusatzstoffen zu Lebensmitteln zu technologischen Zwecken (Zusatzstoffsverordnung- ZZuIV) BGBl 2000, Anlage 5, Zusatzstoffe, die für Lebensmittel als Konservierungsstoff oder Antioxidationsmittel zugelassen sind.

Richtlinie 70/524/EWG des Rates vom 23. November 1970 über Zusatzstoffe in der Tierernährung, Anhang II

Richtlinie 2001/81/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 23. Oktober 2001 über Nationale Emissionshöchstmengen für bestimmte Luftschadstoffe

Anhang

A1. zu 2.7.2 Benzoessäurekonzentrationsbestimmung im Futtermittel und Digesta mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Tabelle A1: Verwendete Chemikalien und Geräte zur Benzoessäurekonzentrationsbestimmung

Bezeichnung	Hersteller	Ort, Staat
HPLC-Anlage Agilent 1100	Agilent Technologies	Kalifornien, USA
<u>Säule:</u> Synergi 4u Hydro RP 80A, 250 x 4.6 mm, 4 micron	Phenomenex	Kalifornien, USA
<u>Vorsäule:</u> C184.0 L mm x 2.0 ID mm	Phenomenex	Kalifornien, USA
Eppendorf Centrifuge 5415C	Eppendorf	Wessling, Deutschland
Vortex-Genie 2	Scientific Industries INC.	New York, USA
Spritzenfilter (25 mm 0,2 µm Cellulose Acetate Membrane)	VWR	Darmstadt, Deutschland
Schüttler	Edmund Bühler GmbH	Tübingen, Deutschland
KH ₂ PO ₄	Merck	Darmstadt, Deutschland

Lösungen für die Benzoessäurekonzentrationsbestimmung mittels HPLC:

1) Methanol/Wasser:

- 2 x 500 ml Methanol mit 500 ml bidestilliertem Wasser mischen
- mindestens 5 min. im Ultraschall entgasen

2) Puffer:

- 5,44 g Kalium-Dihydrogenphosphat (Riedel-de Haen 30407) in einem 2 l-Messkolben lösen
- auf 2 l mit bidestilliertem Wasser auffüllen
- pH auf 3.1 (± 0.05) mit HCl 1 M einstellen.
- 1 l in 1 l-Schottflasche abfüllen und 5 min. im Ultraschall entgasen
- 100 ml separat zur Probenaufbereitung abfüllen.

3) Carrez Ersatz I:

- 17 g Zinkchlorid (zur Analyse Merck 1.08816.0250)
- mit 100 ml bidestilliertem Wasser lösen

4) Carrez II:

- 15 g Kaliumhexacyanoferrat (II) (zur Analyse Merck alte Art.Nr. 4984)
- mit 100 ml bidestilliertem Wasser lösen.

5) NaOH 50 mM:

- 2 g NaOH
- in 2 l bidestilliertem Wasser lösen

6) HCl 50 mM

- 0,18 g HCl
- ad 1000 ml bidestilliertes Wasser

7) Standardlösungen:

a. Stammlösung 1000 ppm:

- 100 mg (± 0.5 mg) Benzoesäure (zur Analyse, Merck 1.00136.0100)
- in 100 ml-Messkolben mit NaOH 50 mM lösen
- mit der NaOH auffüllen

b. Benzoesäure 250 ppm:

- 5 ml Stammlösung
- ad 20 ml mit NaOH 50 mM

c. Benzoesäure 25 ppm:

- 5 ml der 250 ppm-Lösung
- 5 ml HCl 50 mM (zur Neutralisation)
- ad 50 ml mit bidestilliertem Wasser auffüllen

d. Standard für die Analyse:

- Verdünnung für Futter- und Magenproben (10 ppm):
- 400 μ l der 25 ppm-Lösung
- 400 μ l Methanol
- 200 μ l des auf pH 3.1 eingestellten Puffers
- mischen
- Verdünnung für Jejunumproben (2 ppm):
- 80 μ l der 25 ppm-Lösung
- 320 μ l bidestilliertes Wasser
- 400 μ l Methanol
- 200 μ l Puffer
- direkt ins Probengefäß und gut mischen

Programmeinstellungen an der HPLC

Durchfluss =	1,5 ml/min
Einstellung A =	Methanol/Wasser = 1:1
Einstellung B =	leer
Einstellung C =	KH ₂ PO ₄ 20 mM, mit HCl 1M auf pH 3,1 eingestellt
Einstellung D =	Methanol/Wasser = 1:1

Injektionsvolumen = 10 µl (FM), 20 µl (Digesta)
UV Detektor = 227 nm
Säulen Ofen Temperatur = 30 °C
Stoppzeit = 20 min
RT (Benzoessäure) = 10,5 bis 11,1 min

Probenverdünnung: Futtermittel Einwaage 5 g, Verdünnungsfaktor 2500,
 Injektionsvolumen 10 µl
Magen Einwaage 0,5 g, Verdünnung ca. 100, Injektionsvolumen 10 µl
Jejunum Einwaage 0,6 – 1 g, Verdünnungsfaktor ca. 24,
 Injektionsvolumen 20 µl

A2. zu 2.7.3 Ameisensäurekonzentrationsbestimmung im Futtermittel und Digesta mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Tabelle A2: Für die Ameisensäurekonzentrationsbestimmung verwendete Chemikalien und Geräte

Bezeichnung	Hersteller	Ort, Staat
Agilent 1100	BioRad	Kalifornien, USA
<u>Säule:</u> Aminex HPX-84H	BioRad	Kalifornien, USA
Spritzenfilter (25 mm 0,2 µm Cellulose Acetate Membrane)	VWR	Darmstadt, Deutschland

Lösungen für die Ameisensäurekonzentrationsbestimmung mittels HPLC:

- 1) Ameisensäure Stammlösung „1%“ (10 mg/ml= 10000 ppm) (Merck 1.00264
 Ameisensäure 98-100%, Dichte: 1 l = 1,22 kg)
 - 820 µl Ameisensäure
 - ad 100 ml mit destilliertem Wasser (entspricht 1 g/100 ml)
- 2) Ameisensäurestandard „0,1%“ (1 mg/ml= 1000 ppm)
 - 10fache Verdünnung der Stammlösung:
 - 10 ml Stammlösung und 10 ml 0,2 N H₂SO₄ in einen 100 ml-Kolben
 - ad 100 ml mit destilliertem Wasser
- 3) Ameisensäurestandard für Magenproben (0,25 mg/ml= 250 ppm)
 - 2,5 ml Stammlösung
 - 10 ml 0,2 N H₂SO₄ werden in einen 100 ml-Kolben
 - ad 100 ml destilliertem Wasser
- 4) Ameisensäurestandard für Digestaproben (0,1 mg/ml= 100 ppm)
 - 100 µl Stammlösung
 - 100 µl 0,2 N H₂SO₄
 - 800 µl destilliertes Wasser
 - direkt in das Probengefäß
 - mischen

5) Klärungsmittel (1 und 2):

- 15 g Kaliumhexacyanoferrat (II) * 3 H₂O ad 100 ml mit destilliertem Wasser
- 17 g Zinkchlorid (ZnCl₂) ad 100 ml mit destilliertem Wasser

Programmeinstellungen an der HPLC

Durchfluss = 0,6 ml/min
Injektionsvolumen = 50 µl
UV Detektor = 210 nm
Säulen Ofen Temperatur = 30 °C

A3. zu 2.8.1 Ammoniumbestimmung in Digesta mittels Ionenselektiver Elektrode

Tabelle A3: Verwendete Chemikalien und Geräte zur Ammoniumbestimmung

Bezeichnung	Hersteller	Ort, Staat
Messgerät SevenMultiIon S80	Mettler Toledo	Greifensee, Schweiz
Ionenselektive Halbzellenelektrode DC218- NH ₄ ⁺ (#51340910)	Mettler Toledo	Greifensee, Schweiz
pH-Elektrode InLab 410	Mettler Toledo	Greifensee, Schweiz
Magnetrührer: Typ RH-KT/C	IKA®Works	Brasilien
ISA-Lösung 0,9M Al ₂ (SO ₄) ₃ (#51340072)	Mettler Toledo	Greifensee, Schweiz
Vortex-Genie 2	Scientific Instustries INC.	New York, USA
Fresco 17 Centrifuge	Heraeus	Herrenberg, Deutschland
Szintillationsgefäße	Carl Roth GmbH & Co	Karlsruhe, Deutschland

Lösung für die Ammoniumbestimmung mittels Ionenselektiver Elektrode

1) 55,56 mM NH₄-Lösung:

- Einwaage von 0,5944 g NH₄Cl in einen 200 ml-Messkolben
- auffüllen mit bidestilliertem Wasser 200 ml

A4. zu 2.8.2 Enzymatische Bestimmung von [L(+)] und [D(-)]-Laktat

Tabelle A4: Chemikalien und Geräte zur Bestimmung von [L(+)] und [D(-)]-Laktat

Bezeichnung	Hersteller	Hersteller Ort, Staat
Photometer Ultrospec 2000	Pharmacia Biotech	Wien, Österreich
Program Swift Quantification II	Biochrom	Cambridge, England
Fresco 17 Centrifuge	Heraeus	Herrenberg, Deutschland
Vortex-Genie 2	Scientific Instustries INC.	New York, USA
Messgerät SevenMultiIon S80	Mettler Toledo	Greifensee, Schweiz
1 N Perchlorsäure	Riedel-de-Häen #34288	Hannover, Deutschland
D/L- Laktat Kit	Boehringer, #1112821	Mannheim, Deutschland

A5. zu 2.8.3 Gaschromatographische Messung der kurzkettigen flüchtigen Fettsäuren (FFS)

Tabelle A5: Verwendete Chemikalien und Geräte zur Bestimmung von FFS

Bezeichnung	Hersteller	Ort, Staat
Gaschromatograph Modell 6890N	Agilent Technologies	Kalifornien, USA
Kapillarsäule InnoWax (Länge: 30 m; Durchmesser: 530 µm)	Agilent Technologies	Kalifornien, USA
Eppendorf Centrifuge 5415C	Eppendorf	Wessling, Deutschland
Schüttler Typ: Reax 2000	Heidolph	Schwabach, Deutschland

Folgende Parameter wurden am GC eingestellt:

Ofenprogramm:

- 70°C (Initialtemperatur); 0,5 min.
- 140°C; 1,5 min.
- 190°C; 4 min.

Analysezeit: 11,08 min.

Injektortemperaturprogramm (HP-PTV):

- 100°C (Initialtemperatur); 0,02 min.
- 150°C; 0,5 min.
- 250°C; 2 min.

Splitverhältnis: 1:1

A6. zu 2.8.4 pH-Messung in Digesta und Harn

Tabelle A6: Chemikalien und Geräte zur Bestimmung des pH-Wertes

Bezeichnung	Hersteller	Ort, Staat
Messgerät SevenMultiIon S80	Mettler Toledo	Greifensee, Schweiz
pH-Elektrode InLab 410	Mettler Toledo	Greifensee, Schweiz
Vortex-Genie 2	Scientific Industries INC.	New York, USA

Lösung zur pH-Messung in Digesta und Harn

1) 0,01 M Kalziumchloridlösung:

- 0,75 g KCl
- ad 1000 ml bidestilliertes Wasser

A7. zu 2.9.1 Zellzahlbestimmung von *Escherichia coli*:

1) 1 x PBS

- 8g NaCl
- Na₂HPO₄ (10 mM) 1,44 g
x 12 H₂O 3,58 g
x 2 H₂O 1,8 g
- NaH₂PO₄ (2 mM) 0,24 g
x 1 H₂O 0,276 g
x 2 H₂O 0,312 g

- auf pH 7,4 (mittels 1 M HCl) einstellen
- ad 1000 ml mit destilliertem Wasser
- autoklavieren für 20 min. bei 121 °C

A8. zu 2.10.1 DNA- Gewinnung aus Bakterienkolonien für die Multiplex-PCR (MPCR)

Tabelle A7: Chemikalien und Geräte zur Ziel-DNA-Gewinnung

Bezeichnung	Hersteller	Ort, Staat
Endoagar	Carl Roth GmbH & Co	Karlsruhe, Deutschland
Vortex-Genie 2	Scientific Instustries INC.	New York, USA
Thermoblock TB 1	Biometra	Göttingen, Deutschland
Biofuge fresco	Heraeus	Herrenberg, Deutschland

A9. zu 2.10.2 Extraktion der Gesamt-Nukleinsäuren aus Digesta

Tabelle A8: Verwendete Geräte und Chemikalien zur DNA-Extraktion

Bezeichnung	Hersteller	Ort, Staat
Szintillationsröhrchen	Carl Roth GmbH & Co	Karlsruhe, Deutschland
GITC (Guanidinium-Thiocyanat)	Carl Roth GmbH & Co	Karlsruhe, Deutschland
Oak-Ridge® Zentrifugenröhrchen	Thermo Scientific	Massachusetts, USA
Phenol/Chloroform pH 8	Carl Roth GmbH & Co	Karlsruhe, Deutschland
Zentrifuge Sorvall® RC 5B Plus	Thermo Scientific	Massachusetts, USA
Isoamylalkohol	Carl Roth GmbH & Co	Karlsruhe, Deutschland
reinst Ethanol 70 %	Carl Roth GmbH & Co	Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol (2-Propanol)	Carl Roth GmbH & Co	Karlsruhe, Deutschland
0,25 mm Glasperlen	Carl Roth GmbH & Co	Karlsruhe, Deutschland
Retschmühle Retsch MM 200	Retsch GmbH & Co, KG	Haan, Deutschland
Vortex-Genie 2	Scientific Instustries INC.	New York, USA
Nucleo-Spin® Tissue Kit	MACHERY-NAGEL	Düren, Deutschland
Biofuge fresco	Heraeus	Herrenberg, Deutschland

A10. zu 2.10.3 Messung des Gesamt-DNA-Gehaltes

Tabelle A9: Geräte und Chemikalien zur Messung des Gesamt-DNA Gehalts

Bezeichnung	Hersteller	Ort, Staat
ND-3300 Fluorospectrometer	NanoDrop® Thermo Scientific	Massachusetts, USA
Fluorescent DNA Quantitation Kit	BioRad	Kalifornien, USA

Lösungen für die Messung des Gesamt-DNA Gehalts:

1) 10x TNE- Puffer:

- 70 ml bidestilliertes Wasser
- 20 ml 1 M Tris-base
- 10 ml 0,2 M Na-EDTA
- 70 ml 5 M NaCl
- mittels 1 M HCL den pH-Wert auf 7,4 einstellen
- ad 200 ml Reinstwasser

2) Stammlösung:

In einem schwarzen lichtgeschützten 1,5 ml- Plastikgefäß wurde Hoechst Dye 1:100 verdünnt (5 µl + 495 µl 1x TNE).

3) Arbeitslösung:

In einem schwarzen lichtgeschützten 1,5 ml- Plastikgefäß wurde Hoechst Dye 1: 50000 verdünnt (1 µl der Stammlösung + 499 µl 1x TNE).

4) Standard-DNA-Lösung:

1 mg/ml Ausgangslösung wurden auf 10 µg/ml verdünnt (2 x 1:10 => 10.000 pg/µl)

A11. zu 2.10.5 Untersuchung auf das Vorkommen pathogener *E.coli* mittels Multiplex-Polymerase-Kettenreaktion (MPCR)

Tabelle A10: Verwendete Geräte und Chemikalien für die Durchführung der MPCR

Bezeichnung	Hersteller	Ort, Staat
Endoagar	Carl Roth GmbH & Co	Karlsruhe, Deutschland
Vortex-Genie 2	Scientific Instustries INC.	New York, USA
Thermoblock TB 1	Biometra	Göttingen, Deutschland
Biofuge fresco	Heraeus	Herrenberg, Deutschland
Qiagen Multiplex PCR Kit	Qiagen	Hilden, Deutschland
PCR- Cyclor T1 Thermocycler	Biometra	Göttingen, Deutschland
Agarose GTQ	Carl Roth GmbH & Co	Karlsruhe, Deutschland
Sybr®green I nucleic acid gel strain	Bio Whittaker Molecular Applications	Rockland, USA
Agarosegel- Elektrophorese Agagel Maxi	Biometra	Göttingen, Deutschland
DNA- Beladepuffer Roti®Load DNA	Carl Roth GmbH & Co	Karlsruhe, Deutschland
Marker 100 bp DNA-Leiter extended	Carl Roth GmbH & Co	Karlsruhe, Deutschland
Marker 100 bp DNA-Leiter equalised	Carl Roth GmbH & Co	Karlsruhe, Deutschland
CCD-Kamera SensiCam QE 12 bit	PCO Computer Optics	Kehlheim, Deutschland

A12. zu 2.10.6 Untersuchung der Kot- und Digestproben zur mikrobiellen Diversität mittels der Denaturierenden Gradientengelelektrophorese (DGGE)

Tabelle. A11: Verwendete Chemikalien, Materialien und Geräte für die DGGE

Bezeichnung	Hersteller	Ort, Staat
Hot Star Taq TM Master Mix	Qiagen	Hilden, Deutschland
PCR- Cycler T1 Thermocycler	Biometra	Göttingen, Deutschland
INGENY phorU-2-System (DGGE-Gerät)	Ingeny International BV	Goes, Niederlande
Gradient Former Model 485	BioRad	München, Deutschland
Power Pac 300	BioRad	München, Deutschland
Zellophanmembran 30x30	Biostep GmbH	Jahnsdorf, Deutschland
Multi Flex® 0,5-200 µl ECOFlex® Tips	Carl Roth GmbH & Co	Karlsruhe, Deutschland
TEMED	Carl Roth GmbH & Co	Karlsruhe, Deutschland
APS	Fluka Chemie	Buchs, Schweiz
Scanner Canon F917800	Canon	Deutschland
Primer	MWG-Biotech AG	Ebersberg, Deutschland
Färbeschüttler	Edmund Bühler, Labortechnik	Tübingen, Deutschland
Phoretix 1D v2003.02	Nonlinear Dynamics	Newcastle, UK
GelBond® PAG-Folie	Lonza Rockland Inc.	Rockland, USA
Roti® Load Auftragspuffer	Carl Roth GmbH & Co	Karlsruhe, Deutschland

Tabelle A12: Herstellungsschema der denaturierenden Gradienten

Gewünschte Harnstoff-Konzentration (%)	Komponenten der Gradienten			
	Polyacrylamid-Stammlösungen, ml		Polymerisierungskatalysator, µl	
	0%	100%	TEMED	10% APS
30	15,4	6,6	28,6	66
55	9,9	12,1	28,6	66
0	12	-	20	50

Da die Polymerisation von Acrylamid durch Zugabe von N, N, N', N'- Tetramethylethylen-diamin (TEMED) und Ammoniumpersulfat (APS) katalysiert wird, wurden die 30% und 55% Gradienten-Lösungen mit diesen Katalysatoren ergänzt.

Lösungen für die Gel- Elektrophorese (MPCR, DGGE):

1) TAE-Puffer für Agarose- Gele / DGGE

- 50 x TAE-Stammlösung
- 242 g TRIS
- ~ 600 ml Wasser
- 57,1 ml Eisessigsäure
- 100 ml 0,5 M EDTA, pH 8.0
- ad 1000 ml mit Wasser

1 x TAE = 100 ml 50x TAE ad 5000 ml mit Wasser

2) Ladepuffer / DNA-Auftragspuffer

DNA-Auftragspuffer Roti®Load DNA, Art.Nr. T847.1
Enthält 240 mM Tris-Acetat,
6 mM EDTA,
0,12 % w/v Bromphenolblau,
40 % Saccharose,
pH 8,2

3) DNA-Standard

DNA-Standard: 100 bp-DNA-ladder, extended, Fa. Roth, Karlsruhe
DNA-Standard: 100 bp-DNA-ladder, equalised, Fa. Roth, Karlsruhe

4) Nicht- denaturierendes (0%) Polyacrylamid (DGGE)

- 50 ml 40 % Acrylamid / Bisarylamid (37,5:1)
- 2,5 ml 50x TAE- Puffer
- 5 ml Glycerin
- ad 250 ml mit bidestilliertem Wasser

5) 100 % denaturierendes Polyacrylamid (DGGE)

- 105,4 g Harnstoff
- 100 ml Formamid
- 50 ml 40 % Acrylamid / Bisarylamid (37,5:1)
- 2,5 ml 50x TAE- Puffer
- 5 ml Glycerin
- ad 250 ml mit bidestilliertem Wasser

6) 10 % Ammoniumperoxisulfat (APS) (DGGE)

- 100 mg APS
- ad 1 ml mit bidestilliertem Wasser

7) 8 x Cairns- Stammlösung (DGGE-Gelfärbung)

- 200 ml 96 % Ethanol
- 10 ml Essigsäure
- 40 ml bidestilliertes Wasser
- 50 ml 8x Cairns- Lösung ad 400 ml mit bidestilliertem Wasser ergibt 400 ml 1x Cairns- Fixierungslösung

8) Silberfärbe- Lösung (DGGE-Gelfärbung)

- 1 g AgNO₃
- gelöst in 400 ml 1 x Cairns- Fixierungslösung

9) Entwickler- Lösung (DGGE-Gelfärbung)

- 250 ml 1,5 % NaOH
- 750 µl Formaldehyd

10) Aufbewahrungs- Lösung (DGGE-Gelfärbung)

- 250 ml 96% Ethanol
- 100 ml Glycerin
- ad 1000 ml mit bidestilliertem Wasser

A13. zu 2.10.7 Realtime quantitative PCR

Tabelle A13: Verwendete Geräte und Chemikalien für die Realtime-PCR

Bezeichnung	Hersteller	Ort, Staat
Mx3000P QPCR System (Cycler)	Stratagene	Amsterdam, Niederlande
MxPro Programm	Stratagene	Amsterdam, Niederlande
Brilliant SYBRGreen 2x Mastermix	Stratagene	Amsterdam, Niederlande
Hot Star Taq TM Master Mix	Qiagen	Hilden, Deutschland
Primer	MWG-Biotech AG	Ebersberg, Deutschland

Referenzstämme für die Realtime-PCR

Tabelle A14: Referenzstämme und Kultivierungsbedingungen

Stamm/Name	DSM Nummer	Nährmedium	T in °C	O ₂
<i>Acetomicrobium faecale</i>	DSM 20678			
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	DSM 20083	BBM	37	-
<i>B. bifidum</i>	DSM 20456	BBM	37	-
<i>B. longum</i>	DSM 20219	BBM	37	-
<i>B. suis</i>	DSM 20211	BBM	37	-
<i>B. thermophilum</i>	DSM 20210	BBM	37	-
<i>Escherichia coli</i>	DSM2840	LB	37	+
<i>E. coli</i> (institutseigene)	PS37	LB	37	
<i>E. coli</i> (institutseigene)	PS79	LB	37	
<i>E. coli</i> (institutseigene)	PS90	LB	37	
<i>Enterococcus cecorum</i>	DSM 20682	LB	37	microaerophilic
<i>E. durans</i>	DSM 20633	LB	37	+
<i>E. faecalis</i>	DSM 13591	LB	37	microaerophilic
<i>E. faecium</i> (Cylactin)	NCIMB 10415	LB		
<i>E. hirae</i>	DSM 20160	LB	37	+
<i>E. villorum</i>	DSM 15688	LB		microaerophilic
<i>Lactobacillus acetotolerans</i>	DSM 20749	LAS	30	+
<i>L. acidophilus</i>	DSM 20079	MRS	37	+
<i>L. alimentarius</i>	DSM 20249	MRS	30	+
<i>L. amylovorus</i>	DSM 20531	MRS	37	+
<i>L. animalis</i>	DSM 20602	MRS	37	+
<i>L. bif fermentans</i>	DSM 20003	MRS	30	+
<i>L. bifidus</i>	DSM 20100	MRS	30	+
<i>L. brevis</i>	DSM 20054	MRS	30	+
<i>L. delbrueckii s. bulgaricus</i>	DSM 20081	MRS	37	+
<i>L. casei</i>	DSM 20011	MRS	30	+
<i>L. crispatus</i>	DSM 20584	LAS	37	-
<i>L. delbrueckii</i>	DSM 20711	LAS	37	
<i>L. farciminis</i>	DSM 20184	MRS	30	+
<i>L. fermentum</i>	DSM 20052	MRS	37	+
<i>L. gallinarum</i>	DSM 10532	MRS	37	+
<i>L. gasserii</i>	DSM 20243	MRS	37	+
<i>L. jensenii</i>	DSM 20557	MRS	37	+
<i>L. johnsonii</i>	DSM 10533	MRS	37	+

Anhang

Stamm/Name	DSM Nummer	Nährmedium	T in °C	O ₂
<i>L. mucosae</i>	DSM 13345	MRS	37	+
<i>L. murinus</i>	DSM 20452	MRS	37	+
<i>L. panis</i>	DSM 6035	LAS	37	+
<i>L. paracasei</i>	DSM 20020	MRS	30	+
<i>L. plantarum</i>	DSM 20174	MRS	30	+
<i>L. pontis</i>	DSM 8475	LAS	30	+
<i>L. reuteri</i>	DSM 20016	MRS	37	+
<i>L. rhamnosus</i>	DSM 20021	MRS	37	+
<i>L. sharpeae</i>	DSM 20505	LAS	30	+
<i>L. vaginalis</i>	DSM 5837	MRS	37	+
<i>L. salivarius subsp. Salivarius</i>	DSM 20555	MRS	37	+
<i>L. zaeae</i>	DSM 20178	MRS	37	+
<i>Lactococcus lactis subsp. Lactis</i>	DSM 20481	LAS	30	+
<i>Streptococcus alactolyticus</i>	DSM 20728	BHI	37	+
<i>S. bovis</i>	DSM 20480	BHI	37	+
<i>S. infantis</i>	DSM 12492	BHI	37	+
<i>S. mutans</i>	DSM 20523	BHI	37	+
<i>S. porcinus</i>	DSM 20725	BHI	37	+
<i>S. salivarius</i>	DSM 20560	BHI	37	+
<i>S. suis</i>	DSM 9682	BHI	37	+
<i>S. dysgalactiae subsp. dysgalactiae</i>	DSM 20662	BHI	37	+
<i>S. hyointestinalis</i>	DSM 20770	BHI	37	+
<i>S. gallolyticus</i>	DSM 13808	BHI	37	+
<i>Weissella confusa</i>	DSM 20196	MRS	30	+
<i>W. hellenica</i>	DSM 7378	MRS	30	+

A14. zu 2.10.7.2 Erstellung einer Kalibrierreihe zur Quantifizierung von Real-Time PCR Assays

Tabelle A15: Verwendete Geräte und Chemikalien für die Erstellung einer Kalibrierreihe

Bezeichnung	Hersteller	Ort, Staat
BHI-Medium (Brain Heart Infusion)	Merck	Darmstadt, Deutschland
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraus	Herrenberg, Deutschland
Thoma-Zählkammer	Zeiss	Jena, Deutschland
Lichtmikroskop (40 x Objektiv)	Zeiss	Jena, Deutschland

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Ortwin Simon möchte ich recht herzlich für die Überlassung des interessanten Themas und die finanzielle und fachliche Unterstützung danken.

Der Firma Lohmann Animal Health und hier im besonderen Herrn Schurz danke ich für die Bereitstellung der finanziellen Mittel zur Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Dr. David Taras möchte ich für die große Hilfe bei der Versuchsplanung und Durchführung danken. Außerdem auch noch ganz lieben Dank für den hilfreichen Erfahrungsaustausch bezüglich der etwas widerspenstigen DGGE.

Herrn Dr. Wilfried Vahjen möchte ich ganz besonders danken für die großzügige und tatkräftige Unterstützung und Betreuung sowohl im Labor als auch mit der Datenverarbeitung.

Dem Laborteam des Instituts für Tierernährung danke ich für die freundliche Hilfe in allen „Laborfragen“. Allen voran Anett Kriesten und Marita Eitinger.

Den Tierpflegern danke ich für ihre Hilfe beim Fütterungsversuch.

Frau Dr. Arndt danke ich für die Beratung in statistischen Fragen.

Im Speziellen möchte ich meinen Mitdoktoranden und Freunden: Susanne Buchheit, Linda Koïou, Birgit Schläfke, und Irina Klär für den produktiven Ideenaustausch und die seelische Unterstützung danken.

Meiner Familie danke ich herzlich für ihre Unterstützung in allen Lebensbereichen und im Besonderen für die Betreuung meines kleinen Sohnes Nicolás während der langwierigen Schreibarbeit. Und meinem geliebten Freund und Partner Roland Günther danke ich für die Geduld und die aufbauenden Worte während der schwierigen Phasen die solch eine Doktorarbeit mit sich bringt.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe.

Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 28.10.2010

Katrin Kirsch