

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

**Einfluss von Lignocellulose auf die zotechnische Leistung  
sowie verdauungsphysiologische und mikrobiologische  
Parameter bei langsam wachsenden männlichen Hühnern  
einer Kreuzungspopulation aus White Leghorn  
und New Hampshire**

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

**vorgelegt von  
Florian Metzger  
Tierarzt aus Künzelsau**

**Berlin 2020  
Journal-Nr.: 4206**







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

**Einfluss von Lignocellulose auf die zootecnische Leistung sowie  
verdauungsphysiologische und mikrobiologische Parameter bei langsam wachsenden  
männlichen Hühnern einer Kreuzungspopulation aus White Leghorn und New  
Hampshire**

**Inaugural-Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Veterinärmedizin

an der

Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Florian Metzger

Tierarzt

aus Künzelsau

Berlin 2020

Journal-Nr.: 4206

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek  
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek  
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Dr. Hafez Mohamed Hafez  
Dritter Gutachter: PD Dr. Kerstin Müller

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):*

fowls; fowl breeds; leghorn; fowl feedings; feeds; lignocellulose; digestion; intestinal microorganisms; polymerase chain reaction

Tag der Promotion: 30.06.2020

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

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

ISBN: 978-3-96729-059-2

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2020**

Dissertation, Freie Universität Berlin

**D188**

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 2020

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – [www.menschundbuch.de](http://www.menschundbuch.de)

## Inhaltsverzeichnis

<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	V
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	VII
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	VIII
<b>1. Einleitung</b> .....	1
<b>2. Literaturübersicht</b> .....	2
<b>2.1. Diätetische Kohlenhydrate</b> .....	2
2.1.1. Nicht-Stärke-Polysaccharide .....	3
2.1.2. Diätetische Fasern .....	4
2.1.3. Lignocellulose .....	6
2.1.3.1. Cellulose .....	6
2.1.3.2. Hemicellulose.....	6
2.1.3.3. Lignin .....	7
<b>2.2. Kohlenhydratanalytik</b> .....	8
2.2.1. Bestimmung der Gesamt-Nahrungsfaser .....	9
2.2.2. Bestimmung der Neutral-Detergenzienfaser.....	9
2.2.3. Bestimmung der Säure-Detergenzienfaser.....	9
2.2.4. Bestimmung des Säure-Detergenzienlignins.....	10
<b>2.3. Intestinale Mikrobiota beim Huhn</b> .....	11
2.3.1. Charakteristik und Klassifizierung .....	11
2.3.2. Mikrobielle Fermentation im GIT bei Geflügel.....	12
2.3.3. Direkte und indirekte Einflüsse der intestinalen Mikrobiota auf das Geflügel ...	13
<b>2.4. Auswirkungen von Lignocellulose bei Geflügel</b> .....	15
2.4.1. Einfluss diätetischer Lignocellulose auf zootechnische Parameter .....	16
2.4.2. Einfluss diätetischer Lignocellulose auf die verdauungsphysiologischen .....	16
Parameter .....	16
2.4.3. Einfluss diätetischer Lignocellulose auf mikrobiologische Parameter im.....	17
Verdauungstrakt.....	17
2.4.3.1. Bakterielle Metaboliten .....	17
2.4.3.2. Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota.....	17
<b>3. Hintergrund und Fragestellung</b> .....	19
<b>4. Material und Methoden</b> .....	20
<b>4.1. Fütterungsversuch mit Lignocellulose</b> .....	20
4.1.1. Versuchsaufbau, Tiere und Haltungsbedingungen .....	20

4.1.2.	Versuchsfutter und Fütterung .....	21
4.1.3.	Schlachtung und Probenentnahme .....	23
<b>4.2.</b>	<b>Futtermittelanalyse .....</b>	<b>25</b>
4.2.1.	Rohnährstoffe .....	25
4.2.1.1.	Trockensubstanz .....	25
4.2.1.2.	Rohasche .....	25
4.2.1.3.	Rohprotein .....	26
4.2.1.4.	Rohfaser .....	26
4.2.1.5.	Rohfett .....	26
4.2.2.	Detergenzien-Faseranalyse .....	27
4.2.2.1.	NDF-Bestimmung .....	27
4.2.2.2.	ADF-Bestimmung .....	27
4.2.2.3.	ADL-Bestimmung .....	27
4.2.3.	Mengen- und Spurenelemente .....	28
4.2.3.1.	Probenaufarbeitung .....	28
4.2.3.2.	Messung von Kalzium, Natrium, Magnesium, Kalium, Kupfer, Zink und Eisen .....	28
4.2.3.3.	Messung von Phosphor .....	28
<b>4.3.</b>	<b>Zootechnische Parameter .....</b>	<b>29</b>
4.3.1.	Futteraufnahme und Futteraufwand .....	29
4.3.2.	Lebendmasseentwicklung und -zunahme .....	29
4.3.3.	Gesundheitsbeurteilung .....	29
<b>4.4.</b>	<b>Verdauungsphysiologische Parameter .....</b>	<b>30</b>
4.4.1.	Titanbestimmung .....	30
4.4.2.	Scheinbare Verdaulichkeit .....	30
4.4.3.	Trockensubstanz der Exkremente .....	30
<b>4.5.</b>	<b>Mikrobiologische Parameter .....</b>	<b>31</b>
4.5.1.	Bakterielle Metaboliten .....	31
4.5.1.1.	Kurzkettige Fettsäuren .....	31
4.5.1.2.	Ammonium .....	32
4.5.1.3.	L-/D-Laktat .....	33
4.5.2.	Molekularbiologische Quantifizierung ausgewählter Bakteriengruppen und deren metabolischen Aktivität .....	34
4.5.2.1.	DNA/RNA Extraktion .....	34
4.5.2.2.	Quantifizierung der DNA-Konzentration der Extrakte .....	35
4.5.2.3.	Quantifizierung der RNA-Konzentration der Extrakte .....	35



4.5.2.4. Äquimolare Einstellung der DNA/RNA-Extrakte.....	35
4.5.2.5. Prinzip und Durchführung der quantitativen Polymerase-Kettenreaktion .....	36
4.5.2.6. Prinzip und Durchführung der quantitativen Reverse-Transkriptase-..... Polymerase-Kettenreaktion .....	36
4.5.2.7. Berechnung der Kopienzahl pro Gramm Probe .....	36
<b>4.6. Statistische Auswertung.....</b>	<b>37</b>
<b>5. Ergebnisse.....</b>	<b>38</b>
<b>5.1. Versuchsdiäten .....</b>	<b>38</b>
5.1.1. Nährstoffgehalte.....	38
<b>5.2. Zootechnische Parameter.....</b>	<b>39</b>
5.2.1. Futteraufnahme und -aufwand .....	39
5.2.2. Lebendmasseentwicklung und -zunahme.....	39
5.2.3. Gesundheitsbeurteilung .....	39
<b>5.3. Verdauungsphysiologische Parameter .....</b>	<b>42</b>
5.3.1. Scheinbare Verdaulichkeit der Nährstoffe .....	42
5.3.2. Trockensubstanz der Exkremete .....	42
<b>5.4. Mikrobiologische Parameter .....</b>	<b>43</b>
5.4.1. Bakterielle Metaboliten in der Digesta .....	43
5.4.2. Bestimmung ausgewählter Bakteriengruppen mittels quantitativer .....	44
Polymerase-Kettenreaktion .....	44
5.4.3. Bestimmung ausgewählter Bakteriengruppen mittels quantitativer .....	45
Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion .....	45
5.4.4. Vergleich der Ergebnisse von qRT-PCR und qPCR .....	46
<b>6. Diskussion.....</b>	<b>48</b>
<b>6.1. Fütterungsversuch mit Lignocellulose.....</b>	<b>48</b>
6.1.1. Diskussion der Versuchsbedingungen und des Studiendesigns.....	48
6.1.2. Diskussion der zootechnischen Parameter.....	49
6.1.3. Diskussion der verdauungsphysiologischen Parameter.....	50
6.1.4. Diskussion der mikrobiologischen Parameter .....	51
6.1.4.1. Auswirkungen der Versuchsdiäten auf die bakteriellen Metaboliten .....	51
6.1.4.2. Auswirkungen der Versuchsdiäten auf die bakterielle Zusammensetzung.....	53
und metabolischen Aktivität der zäkalen Mikrobiota .....	53
<b>6.2. Schlussfolgerung und Ausblick.....</b>	<b>55</b>
<b>7. Zusammenfassung.....</b>	<b>56</b>
<b>8. Summary.....</b>	<b>58</b>
<b>9. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>60</b>

<b>Anhang</b> .....	74
<b>Publikationsverzeichnis</b> .....	86
<b>Erklärung zu Interessenskonflikten</b> .....	87
<b>Danksagung</b> .....	88
<b>Selbstständigkeitserklärung</b> .....	89

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Zusammenfassung der wichtigsten diätetischen Kohlenhydrate.....	2
<b>Tabelle 2:</b> Vergleichende Darstellung der Rohfaser- und Detergenzien-Faseranalyse.....	8
<b>Tabelle 3:</b> Zeitplan des Fütterungsversuchs mit langsam wachsenden männlichen Hühnern .....	21
<b>Tabelle 4:</b> Futter- und kalkulierte Nährstoffzusammensetzung des Geflügel-Starterfutters und Geflügel-Mittelmastfutters.....	22
<b>Tabelle 5:</b> Futterzusammensetzung und kalkulierte Nährstoffgehalte der Versuchsdäten...23	
<b>Tabelle 6:</b> Analysierte Nährstoffzusammensetzung der Versuchsdäten.....	38
<b>Tabelle 7:</b> Effekte der Fütterung unterschiedlicher Konzentrationen von Lignocellulose auf die zootecnischen Parameter von langsam wachsenden männlichen Hühnern in Gruppenhaltung während der 5-wöchigen Adaptationsphase (n = 20) <sup>1</sup> .....	40
<b>Tabelle 8:</b> Effekte der Fütterung unterschiedlicher Konzentrationen von Lignocellulose auf die zootecnischen Parameter von langsam wachsenden männlichen Hühnern in Einzelhaltung während der 23-tägigen Versuchsphase (n = 20) <sup>1</sup> .....	41
<b>Tabelle 9:</b> Effekte der Fütterung unterschiedlicher Konzentrationen von Lignocellulose auf die scheinbaren Verdaulichkeiten von Rohprotein (präzäkal) und Rohfett (gesamt) sowie den Trockensubstanzgehalt der Exkrememente bei langsam wachsenden männlichen Hühnern (n = 20) <sup>1</sup> .....	42
<b>Tabelle 10:</b> Effekte der Fütterung unterschiedlicher Konzentrationen von Lignocellulose auf die Konzentrationen bakterieller Metaboliten in der Digesta des Zäkums bei langsam wachsenden männlichen Hühnern (n = 20) <sup>1</sup> .....	43
<b>Tabelle 11:</b> Korrelation zwischen Lignocellulosekonzentration im Futter und dem Gehalt an bakteriellen Metaboliten in der Digesta des Zäkums bei langsam wachsenden männlichen Hühnern <sup>1</sup> .....	44
<b>Tabelle 12:</b> Effekte der Fütterung unterschiedlicher Konzentrationen von Lignocellulose auf die Kopienzahl [log <sub>10</sub> Kopienzahl/g uS] der bakteriellen 16s rDNA in der Digesta des Zäkums bei langsam wachsenden männlichen Hühnern (n = 10).....	45
<b>Tabelle 13:</b> Effekte der Fütterung unterschiedlicher Konzentrationen von Lignocellulose auf die Kopienzahl [log <sub>10</sub> Kopienzahl/g uS] der bakteriellen 16s rRNA in der Digesta des Zäkums bei langsam wachsenden männlichen Hühnern (n = 10) .....	46
<b>Tabelle 14:</b> Effekte der Fütterung unterschiedlicher Konzentrationen von Lignocellulose auf das Verhältnis zwischen der Kopienzahl [log <sub>10</sub> Kopienzahl/g uS] der bakteriellen 16s rRNA und der 16s rDNA in der Digesta des Zäkums bei langsam wachsenden männlichen Hühnern (n = 10).....	47
<b>Tabelle 15:</b> Zusammensetzung der verwendeten Lösung zur Analyse des NDF-Gehalts ....	74

<b>Tabelle 16:</b> Zusammensetzung der verwendeten Lösungen zur Analyse von kurzkettigen Fettsäuren.....	74
<b>Tabelle 17:</b> Temperatur- und Zeiteinteilung des Gaschromatographen für die Bestimmung der Konzentration der kurzkettigen Fettsäuren .....	75
<b>Tabelle 18:</b> Zusammensetzung der hergestellten Lösungen zur Analyse der Ammoniumkonzentration.....	75
<b>Tabelle 19:</b> Standardreihe zur photometrischen Bestimmung der Ammoniumkonzentration	76
<b>Tabelle 20:</b> Zusammensetzung der verwendeten Lösungen zur Analyse des Laktatgehalts	76
<b>Tabelle 21:</b> Verwendete Primer für die qPCR/rt-qPCR.....	83
<b>Tabelle 22:</b> Mengenverhältnisse eines Reaktionsansatzes mit Brilliant II SYBR® Green Low ROX QPCR Master Mix für die qPCR.....	84
<b>Tabelle 23:</b> Mengenverhältnisse eines Reaktionsansatzes mit Brilliant II SYBR® Green Low ROX qRT-PCR Master Mix für die qPCR .....	84
<b>Tabelle 24:</b> Reaktionsbedingungen für die qPCR .....	85

## **Abbildungsverzeichnis**

**Abbildung 1:** Schematischer Querschnitt eines Getreidekorns ..... 4

## Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$	Alpha
$\beta$	Beta
®	eingetragenes Warenzeichen
$\lambda$	Wellenlänge
°C	Grad Celsius
ADF	Säure-Detergenzien-Faser (Acid Detergent Fiber)
ADL	Säure-Detergenzien-Lignin (Acid Detergent Lignin)
AGP	antibiotischer Wachstumsförderer (antibiotic growth promoter)
ANOVA	Varianzanalyse (analysis of variance)
AOAC	Association of Official Agricultural Chemists
AME <sub>N</sub>	scheinbare umsetzbare Energie, Stickstoff (N) korrigiert (apparent metabolizable energy)
bp	Basenpaare
c	Konzentration (concentration)
<i>C. coccooides</i>	<i>Clostridium coccooides</i>
<i>C. leptum</i>	<i>Clostridium leptum</i>
cT-Wert	Konzentrationsschwellenwert (concentration threshold)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
cDNA	komplementäre DNA (complementary DNA)
dsDNA	Doppelstrang DNA
rDNA	ribosomale DNA
rDNAase	ribosomale Desoxyribonuklease
DF	diätetische Faser (dietary fiber)
DP	Polymerisationsgrad (degree of polymerization)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
g	Gramm
$\mu$ g	Mikrogramm
ng	Nanogramm
GIT	Gastrointestinaltrakt
h	Stunden (hours)
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (high performance liquid chromatography)

KbE	Koloniebildende Einheit
kg	Kilogramm
l	Liter
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
LW	Lebenswoche
ME	metabolisierbare/ umsetzbare Energie (metabolizable energy)
MJ	Megajoule
m	Meter
m <sup>2</sup>	Quadratmeter
m/s	Meter pro Sekunde
mm	Millimeter
nm	Nanometer
mol	SI-Einheit der Stoffmenge
mmol	Millimol
MOPS	3-(N-Morpholino)-2-hydroxypropansulfonsäure
NaOH	Natriumhydroxid
NDF	Neutral-Detergenzien-Faser (Neutral Detergent Fiber)
n. n.	nicht nachgewiesen
NSP	Nicht-Stärke-Polysaccharide
min	Minute(n)
oM	organische Masse
p.a.	pro Analyse (pro analysis)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
pH	negativer dekadischer Logarithmus des Zahlenwerts der H <sup>+</sup> -Aktivität
pK	negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtskonstanten einer chemischen Reaktion
qPCR	quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (quantitative real-time polymerase chain reaction)
qRT-PCR	quantitative Reverse-Transkriptase- Echtzeit-Polymerase- Kettenreaktion (quantitative reverse transcriptase real-time polymerase chain reaction)
RIN	RNA-Integritätsnummer (RNA integrity number)
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
rRNA	ribosomale RNA
RNase	Ribonuklease
SCFA	Kurzkettige Fettsäuren (short chain fatty acids)

## Verzeichnisse

---

sec	Sekunde (second)
spp.	Spezies (plural)
tägl.	tägliche
TDF	Gesamt-Nahrungsfaser (Total Dietary Fiber)
TNE	Tris-Natriumchlorid-EDTA
TS	Trockensubstanz
upm	Umdrehungen pro Minute
uS	Ursprüngliche Substanz
VDLUFA	Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten
WHO	Weltgesundheitsorganisation (World Health Organization)
WSPA	Welttierschutzgesellschaft (World Society for the Protection of Animals)
x g	Erdbeschleunigung



## 1. Einleitung

Pflanzliche, faserreiche Komponenten sind seit längerem ein wichtiger Bestandteil in der Geflügelfütterung (Jeroch et al., 2019). Das Bestreben zur Senkung des Antibiotikaeinsatzes in der Nutztierhaltung, eine zunehmend ressourcenschonende Tierproduktion, aber auch höhere Rohstoffkosten in der Futtermittelindustrie steigern jedoch das Interesse am Einsatz faserreicher Komponenten. Bei der Entwicklung nachhaltiger Ernährungsstrategien spielt hierbei die Verwendung von Nebenprodukten aus der Biokraftstoff- und Lebensmittelindustrie mit einem hohen Anteil an pflanzlichem Zellwandmaterial eine wichtige Rolle (Smits und Annison, 1996). Von besonderer Bedeutung ist dabei der Einfluss auf die mikrobiellen Populationen des Gastrointestinaltrakts (GIT) (Oakley et al., 2014; Stanley et al., 2014).

Wissenschaftliche Untersuchungen haben gezeigt, dass ein Einsatz von Lignocellulose, als weitgehend unverdauliche Futterkomponente, messbare Auswirkungen auf die Tierleistung, die Nährstoffverdauung und auf die intestinale Mikrobiota beim Geflügel hat (Boguslawska-Tryk et al., 2015; Boguslawska-Tryk et al., 2016; Yokhana et al., 2016; Farran et al., 2017; Kheravii et al., 2017; Makivic et al., 2019). Die Ergebnisse bei Einsatz geringer Konzentrationen von Lignocellulose beschreiben bei den genannten Parametern allerdings unterschiedliche Effekte und keine einheitliche Wirkung. Studien mit höheren Mengen von Lignocellulose in der Futtermittellieferung liegen bisher kaum vor, außer in einem Versuch mit Zweinutzungshennen (Röhe et al., 2019a; Röhe et al., 2019b). Eine eindeutige Aussage über Limitierungen und die Einflüsse von zugesetzter Lignocellulose in der Geflügelfütterung lässt sich daher noch nicht treffen.

Ziel der vorliegenden Studie war es daher, die Auswirkungen von unterschiedlich hohen Konzentrationen von Lignocellulose auf leistungsbezogene, verdauungsphysiologische und mikrobiologische Parameter bei langsam wachsenden männlichen Hühnern einer Kreuzungspopulation aus White Leghorn und New Hampshire zu untersuchen. Die eingesetzten Versuchsdäten wurden unter Einsatz von Lignocellulose weitgehend isoenergetisch und isonitrogen konzipiert. Der Fokus der Arbeit lag auf der Analyse der Zusammensetzung und der metabolischen Aktivität der intestinalen Mikrobiota im Zäkum.

## 2. Literaturübersicht

### 2.1. Diätetische Kohlenhydrate

Die Futterkomponenten, die in Geflügelfutter verwendet werden, sind meist pflanzlichen Ursprungs und im Allgemeinen eine Mischung aus Materialien unterschiedlicher Herkunft und komplexer Zusammensetzung (Larbier et al., 1994; Jorgensen et al., 1996; Jozefiak et al., 2004a; Shakouri et al., 2006). Einen nicht unwesentlichen Bestandteil dieser Komponenten stellen die diätetischen Kohlenhydrate dar. Über eine breite Palette an chemischen und physikalischen Eigenschaften beeinflussen diätetische Kohlenhydrate die Physiologie des Magen-Darm-Trakts (Bach Knudsen, 1997; Cummings und Stephen, 2007). Klassifiziert werden diese Kohlenhydrate anhand ihrer chemischen Eigenschaften. Von primärer Bedeutung sind dabei der Charakter der einzelnen Monomere, der Polymerisationsgrad (DP – degree of polymerization) und die Art und Position der Bindungen ( $\alpha$ - oder  $\beta$ -glycosidisch) (Bach Knudsen et al., 2016). Allgemein lassen sich diätetische Kohlenhydrate in drei Hauptklassen gliedern: Einfachzucker, Mehrfachzucker und Vielfachzucker, wobei letztere weiter in die Speicher-Polysaccharide Stärke und die Nicht-Stärke-Polysaccharide (NSPs) unterteilt werden (Tab.1) (Marx-Figini, 1982; Englyst, 1989; Cummings und Stephen, 2007).

**Tabelle 1:** Zusammenfassung der wichtigsten diätetischen Kohlenhydrate

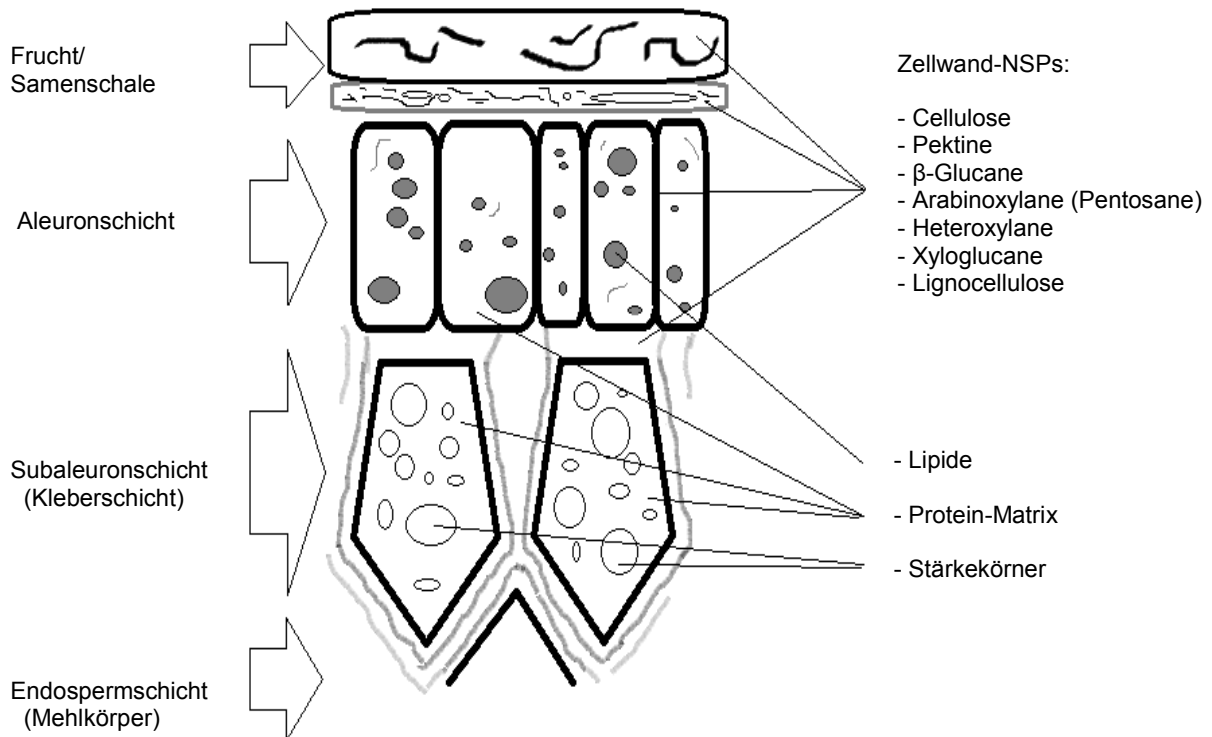
Klasse	Untergruppe	Hauptkomponenten
Einfachzucker (1-2) <sup>1</sup>	Monosaccharide	Glucose, Fructose, Galactose
	Disaccharide	Saccharose, Lactose, Maltose, Trehalose
	Polyole (Zuckeralkohole)	Sorbitol, Mannitol, Lactiol, Xylitol, Erytritol, Isomalt, Maltitol
Mehrfachzucker (3-9)	Malto-Oligosaccharide ( $\alpha$ -Glucane)	Maltodextrine
	Nicht- $\alpha$ -Glucan-Oligosaccharide	Raffinose, Stachyose, Fructo-, Galacto-Oligosaccharide, Polydextrose, Inulin
Vielfachzucker ( $\geq 10$ )	Stärke ( $\alpha$ -Glucane)	Amylose, Amylopektin, modifizierte Stärke
	Nicht-Stärke-Polysaccharide (NSP)	Cellulose, Hemicellulose, Pektin, Arabinoxylane, $\beta$ -Glucane, Glucomannane, pflanzliche Gummis und Schleimstoffe, Hydrokolloide

<sup>1</sup> Polymerisationsgrad/ Anzahl der Zucker-Monomere; basieren auf den Angaben der Food and Agriculture Organization/ Weltgesundheitsorganisation (Cummings et al., 1997b; Joint FAO/WHO Expert Consultation, 1998)

### 2.1.1. Nicht-Stärke-Polysaccharide

Als Hauptvertreter der nicht-glykämischen Kohlenhydrate stellen NSPs vorwiegend die Schlüsselkomponenten der Zellwände verschiedener Futterpflanzen (Abb. 1). Neben ihrer strukturellen Rolle bei der Aufrechterhaltung der Zellintegrität bilden und besitzen sie eine Vielzahl von chemischen Strukturen und biologischen Funktionen (Englyst und Englyst, 2005; Kumar et al., 2012). NSPs bestehen aus makromolekularen Polymeren von Monosacchariden, welche durch eine spezifische Bindung untereinander verknüpft sind. Diese glycosidische Bindung wird zwischen der Hemiacetalgruppe (oder Hemiketalgruppe) eines Zuckers und der Hydroxylgruppe eines anderen gebildet (Smits und Annison, 1996; Kumar et al., 2012). Die Hauptpolysaccharide der NSPs, welche auch unter dem Begriff pflanzliche Gerüstsubstanzen zusammengefasst werden, sind Cellulose, Pektine,  $\beta$ -Glucane, Arabinoxylane (Pentosane), Heteroxylane und Xyloglucan (Englyst, 1989; Jeroch et al., 2019).

Stärke, in welcher Glucose  $\alpha$ -1,4- oder  $\alpha$ -1,6-glycosidisch verknüpft ist, kann durch körpereigene  $\alpha$ -Amylase hydrolysiert und im Dünndarm als Glucose absorbiert werden (Englyst, 1989). Für Polysaccharide mit  $\beta$ -1,4-glycosidischen Bindungen fehlen dem Organismus jedoch die entsprechenden Verdauungsenzyme (Kirchgessner et al., 1999). Deshalb gelten NSPs als intestinal unverdaulich und können lediglich durch mikrobielle Aktivität hydrolysiert und durch die Bildung flüchtiger Fettsäuren für das Tier nutzbar gemacht werden. Entscheidend für die energetische Ausbeute sind hierbei vor allem der Ort und das Ausmaß der mikrobiellen Aktivität. Unterteilt werden NSPs hauptsächlich anhand ihrer Wasserlöslichkeit. Zusätzlich werden die NSPs, aufgrund ihrer sehr spezifischen physikochemischen Eigenschaften, der Gruppe der diätetischen Fasern zugeordnet (Theander et al., 1993; Kirchgessner et al., 1999; de Vries et al., 2012).



**Abbildung 1:** Schematischer Querschnitt eines Getreidekorns (modifiziert nach Bach Knudsen (2001))

### 2.1.2. Diätetische Fasern

Die Definition der diätetischen Fasern (DF) wurde über das letzte Viertel des 20. Jahrhunderts kontinuierlich diskutiert. Trotz umfangreicher Forschungen konnte jedoch keine universell anerkannte Übereinstimmung erzielt werden (Cummings et al., 1997b; DeVries et al., 1999). Der Begriff findet dabei hauptsächlich in den verschiedenen Disziplinen der Human- und Tierernährung Anwendung und beschreibt eine breite Palette von Substanzen. Dies führte oft zu unterschiedlichen Interpretationen, was mit diätetischen Fasern eigentlich gemeint ist und welcher Stoffgruppe sie zugeordnet werden sollten (Englyst et al., 2007). In der Vergangenheit verwendeten die meisten Autoren entweder eine physiologische oder eine chemische Definition. Gemäß der physiologischen Definition sind DFs die diätetischen Bestandteile, die resistent gegen den Abbau durch körpereigene Enzyme sind, während sie chemisch die Summe von NSPs und Lignin darstellen (Theander et al., 1994).

Im Streben nach einer allgemein anerkannten Definition fasste die Codex Alimentarius Kommission (Codex-Alimentarius-Commission, 2009) in einem fast zwei Jahrzehnten andauernden Prozess die Definitionen der auf diesem Gebiet wichtigsten Vertreter, wie dem U.S. Institute of Medicine (IOM), Health Canada, der European Food Safety Authority (EFSA), des Food Standards Australia and New Zealand (FSANZ) und der American Association of Cereal Chemists International (AACCI), einschließlich jener des Codex und derer als NSP beschriebenen Fasern, zusammen.

Die Definition und zwei ergänzende Fußnoten lauten wie folgt (Jones, 2014):

DF bezeichnet Kohlenhydratpolymere mit 10 oder mehr monomerischen Einheiten, welche im Dünndarm nicht durch endogene Enzyme hydrolysiert werden können und den folgenden Kategorien zuzuordnen sind.

1. Kohlenhydratpolymere, welche natürlich und verzehrfertig in der Nahrung vorkommen,
2. Kohlenhydratpolymere, welche aus Nahrungsmittelrohstoffen durch physikalische, enzymatische und chemische Methoden gewonnen wurden und die wissenschaftlich anerkannt einen positiven physiologischen Effekt auf die Gesundheit zeigen,
3. synthetische Kohlenhydratpolymere, welche wissenschaftlich anerkannt einen positiven physiologischen Effekt auf die Gesundheit zeigen.

Fußnote eins ordnet die DF-Fractionen von Lignin und/oder anderen mit Polysacchariden assoziierten Verbindungen pflanzlichen Ursprungs (z.B. Lignocellulose) den Zellwandbestandteilen zu. Diese Verbindungen können durch analytische Methoden gemessen werden.

Die zweite Fußnote gibt an, dass die Entscheidung, ob Kohlenhydrate mit einem DP im Bereich von 3 bis 9 aufgenommen werden, den nationalen Behörden überlassen bleiben sollte.

Somit sind unverdauliche Oligosaccharide mit entsprechendem Polymerisationsgrad und die zu einer der drei oben genannten Kategorien gehören, z.B. in der Definition der EFSA als DF enthalten. Auch andere Länder (z. B. Brasilien, Kanada, China, Australien und Neuseeland) haben beschlossen, diese unverdaulichen Oligosaccharide in die Definition von DFs in ihren nationalen Gesetzgebungen aufzunehmen. Debatten über die Definition von DFs existieren jedoch noch immer (Jones, 2014; Dai und Chau, 2017).

### 2.1.3. Lignocellulose

Die Biomasse von Lignocellulose, als das am häufigsten vorkommende aromatische Polymer der Erde (Kirk und Farrell, 1987; Baurhoo et al., 2008; Morais et al., 2012), lässt sich als assoziierter Teil der unlöslichen NSPs den diätetischen Fasern zuordnen. Es ist ein komplexes heterogenes Material und stellt zum Großteil die strukturgebenden Bestandteile pflanzlicher Zellwände und Mittellamellen der meisten höheren Pflanzen dar (Kirk und Farrell, 1987; Li et al., 2012; Fatma et al., 2018). Lignocellulose besteht hauptsächlich aus drei Komponenten: Cellulose (40 - 50 %), Hemicellulose (25 - 35 %) und Lignin (18 - 35 %) (Pettersen, 1984; Olsson und Hahn-Hägerdal, 1996; Frei, 2013). Die grundlegende Chemie dieser Komponenten hat eine entscheidende Wirkung auf die Tertiärarchitektur der Lignocellulose (Malherbe und Cloete, 2002). Lignocellulose ist ein kompakter, zum Teil kristalliner Komplex, dessen Polysaccharid-bestandteile in Mikrofibrillen angeordnet und durch kovalente, wasserstoffhaltige Bindungen mit einer umgebenden Matrix aus Lignin eng verbunden sind (Kirk und Farrell, 1987; Jeffries, 1990; Edye und Doherty, 2015). Diese ungleiche Verteilung von chemischen und strukturellen Komponenten (Li et al., 2012) schützt sie sowohl vor der Aktivität hydrolytischer Enzyme als auch anderer äußerer Faktoren und dient zusätzlich als Stabilisator der komplexen Struktur (Fengel, 1971).

#### 2.1.3.1. Cellulose

Cellulose, der mengenmäßig größte Bestandteil der meisten Lignocellulosen, ist ein natürliches homogenes Polymer ( $DP \geq 10000$  (Jorgensen et al., 2007)) mit einem vergleichsweise einfachen Aufbau. Bestehend aus linear angeordneten D-Glucose-Monomeren und über  $\beta$ -1,4-glycosidische Bindungen verknüpft, stellt sie sich als hochgeordnetes, zumeist kristallines Makromolekül dar (Fengel, 1971; Fan et al., 1982; Pettersen, 1984; Ljungdahl et al., 1985).

#### 2.1.3.2. Hemicellulose

Die Bezeichnung Hemicellulose wurde erstmals verwendet, um eine Gruppe unterschiedlicher Polysaccharide zu beschreiben, welche im Gegensatz zu Cellulose durch alkalische Lösungen extrahierbar sind (Schulze, 1891). Dem heutigen wissenschaftlichen Stand entsprechend sind Hemicellulosen heterogene, über  $\beta$ -1,4-glycosidische Bindungen verknüpfte Polymere ( $DP < 200$  (Jorgensen et al., 2007)), welche hauptsächlich aus linearen und verzweigten Pentosen (D-Xylose, L-Arabinose), Hexosen (D-Mannose, D-Glucose, D-Galactose) und Zuckersäuren bestehen (Olsson und Hahn-Hägerdal, 1996; Saha, 2003; Scheller und Ulvskov, 2010).

### 2.1.3.3. Lignin

Lignin, zurückzuführen auf das lateinische Wort *lignum*, welches Holz bedeutet (Pollegioni u. a. 2015), ist ein vernetztes, hochpolydisperses, phenolisches Heteropolymer. Das wasserunlösliche und optisch inaktive Polymer zählt somit nicht zur Gruppe der Polysaccharide, geht aber mit verschiedenen NSPs strukturelle Verknüpfungen ein (Kirk und Farrell, 1987; Perez et al., 2002; Baurhoo et al., 2008; Sluiter et al., 2010). Diese Verknüpfungen können hierbei als Hemicellulose-Lignin-Komplex zusammengefasst werden (Englyst, 1989; Jeroch et al., 2019). Chemisch betrachtet, besteht der Kernteil von Lignin hauptsächlich aus strukturell ähnlichen Phenylpropanoid-Molekülen (Coniferylalkohol (Guaiacyl-propanol), Cumarylalkohol (p-Hydroxyphenyl-Propanol) und Sinapylalkohol (Syringyl-Propanol)), welche größtenteils über Ether- oder direkte Kohlenstoffbindungen verknüpft ein dreidimensionales Konstrukt bilden (Breznak und Brune, 1994; Perez et al., 2002; Jorgensen et al., 2007; Taherzadeh und Karimi, 2007).

## 2.2. Kohlenhydratanalytik

Für den Nachweis von DF in pflanzlichen Produkten oder Futtermitteln werden in der Kohlenhydratanalytik eine Vielzahl unterschiedlicher Analysemethoden beschrieben. Aufgrund der komplexen Struktur und den unterschiedlichen physikalischen und chemischen Eigenschaften gibt es jedoch kein quantitatives Analyseverfahren zur Erfassung aller DFs. Bei der Rohfaserbestimmung der Weender-Analyse werden z.B. nur variable Anteile der DFs gemessen. Allerdings lassen sich die Konzentrationen unterschiedlicher Hauptfraktionen nach Aufspaltung über verschiedene Methoden (Tab. 2) einzeln bestimmen. Zusammengefasst kann so ein Rückschluss auf die Gesamt-Konzentration der DF gezogen werden (Theander et al., 1989; Bach Knudsen, 1997, 2014).

Entsprechend unterteilt man DF analytisch in die messbaren Fraktionen: Gesamtnahrungsfaser (Total Dietary Fiber – TDF), Neutrale Detergenzienfaser (Neutral Detergent Fiber – NDF), Säure-Detergenzienfaser (Acid Detergent Fiber – ADF) und Säure-Detergenzienlignin (Acid Detergent Lignin – ADL) (Van Soest et al., 1991).

**Tabelle 2:** Vergleichende Darstellung der Rohfaser- und Detergenzien-Faseranalyse

Weender-Faseranalyse	Diätetische Kohlenhydrate	Detergenzien-Faseranalyse	
N <sup>1</sup> -freie Extraktionsstoffe	Einfach-Zucker	NFK <sup>2</sup>	
	Stärke		
	organischer Rest		
	Pektine		
	Hemicellulose	NDF <sup>3</sup>	
	Cellulose		
Rohfaser	Lignin		
			ADL <sup>5</sup>

● - Zellinhaltsstoffe, ● - Zellwandbestandteile

<sup>1</sup> N = Stickstoff

<sup>2</sup> Nicht-Faserartige-Kohlenhydrate

<sup>3</sup> Neutral-Detergenzienfaser

<sup>4</sup> Säure-Detergenzienfaser

<sup>5</sup> Säure-Detergenzienlignin



### 2.2.1. Bestimmung der Gesamt-Nahrungsfaser

Bezüglich des aktuellen Stands des Codex Alimentarius Ausschusses für Methoden der Analyse und Probenahme stellt die AAAC International Approved Method 32-45.01 (AOAC-Methode 2009.01) zurzeit das akzeptierte Verfahren dar, bei dem alle Bestandteile der DF analysiert und gemessen werden können (McCleary et al., 2013).

Diese enzymatisch-gravimetrische Methode zielt darauf ab, über Amylasen und Proteasen (Van Soest et al., 1991) verdauliche Bestandteile zu hydrolysieren und zu entfernen. Unlösliche und hochmolekulare lösliche Faserstoffe werden durch Lösungsmittel ausgefällt und gravimetrisch bestimmt. Nicht-lösliche Oligosaccharide können anschließend durch Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) bestimmt werden (McCleary, 2003).

### 2.2.2. Bestimmung der Neutral-Detergenzienfaser

Als Teil der von Peter Van Soest vor mehr als 30 Jahren entwickelte Detergenzienmethode stellt die Neutral-Detergenzienfaseranalyse aktuell noch immer eines der wichtigsten Verfahren zur Bestimmung der Zellwandbestandteile von Pflanzen in Futtermitteln dar (Van Soest und Wine, 1967; Bell, 1997; Mertens et al., 2002; Uden et al., 2005). Die Methode unterteilt pflanzliche Kohlenhydrate in unverdauliche Zellwandbestandteile (Cellulose, Hemicellulose und Lignin umfassend) und verdauliche Zellinhalte (bestehend aus Stärke und Zucker). Über die Kombination von neutralen und sauren Detergenzienlösungen erlauben die Analysen eine sequentielle Fraktionierung der Faserfraktionen in NDF, ADF und ADL (Van Soest und Wine, 1967; Van Soest et al., 1991; Bell, 1997; Möller, 2009). Die Variabilität, Faserbestandteile in unterschiedlichen Materialien zu extrahieren macht es jedoch schwierig, NDF reproduzierbar zu bestimmen (Mertens et al., 2002). Basierend auf der angepassten AOAC-Methode 2002.04, stellt die Bestimmung von NDF nach dem Methodenbuch III, 8. Ergänzungslieferung 2012 des Verbands Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA) (Naumann und Bassler, 1976), zurzeit das Standardanalyseverfahren dar.

### 2.2.3. Bestimmung der Säure-Detergenzienfaser

Die Säure-Detergenzienfaseranalyse bezieht sich auf jenen Anteil der in Futtermitteln enthaltenen Faser, welcher die geringste Verdaulichkeit aufweist und kann somit auch zur Vorhersage des Energiegehalts der entsprechenden Futterration genutzt werden. Ein Anstieg des ADF-Gehalts im Futtermittel spiegelt somit eine Abnahme des Energiewerts wider (Bell, 1997). Er repräsentiert dabei den Cellulose- und Ligninanteil von Pflanzenzellwänden (Van Soest und Wine, 1967).

Auf Grundlage der offiziellen AOAC-Methode 973.18 für die Analyse der Fraktionen von ADF und Lignin in Tierfutter (Van Soest, 1963a, 1963b; Möller, 2009), stellt auch hier die ADF-Bestimmung des VDLUFA (Naumann und Bassler, 1976) das Verfahren der Wahl dar.

#### 2.2.4. Bestimmung des Säure-Detergenzienlignins

Entsprechend der vorangegangenen ADF-Bestimmung, wird zur Analyse des ADL in Futtermitteln der verbleibende Rückstand (Cellulose, Lignin, Cutin und säureunlöslicher Asche (hauptsächlich Siliciumdioxid)) verwendet. Die ADF-Bestimmung dient dabei als notwendiger Vorbereitungsschritt, um Protein und anderes säurelösliches Material, das die Ligninbestimmung stören würde, zu entfernen (Van Soest, 1963b; Goering und Van Soest, 1970; Naumann und Bassler, 1976).

## **2.3. Intestinale Mikrobiota beim Huhn**

### 2.3.1. Charakteristik und Klassifizierung

Die intestinale Mikrobiota ist ein integraler Bestandteil des Verdauungssystems aller Tiere (Apajalahti et al., 2004) und bildet eine vielfältige Gemeinschaft aus verschiedenen Mikroorganismen. Beim Geflügel stellt der GIT ein komplexes und dynamisches Ökosystem dar, welches von hunderten Bakterienarten besiedelt wird (Apajalahti et al., 2004; Smulikowska, 2006; Rehman et al., 2007; Stanley et al., 2013). Diese heterogene Population versorgt den Wirt in funktioneller Hinsicht mit einer großen Auswahl an Enzymen und Substraten, die dieser für den Stoffwechsel und die Energiegewinnung nutzen kann (Stanley et al., 2012; Stanley et al., 2013). Im Austausch dafür gewährt der Wirt ein permissives Habitat und Nährstoffe für die Bakterienkolonisation und das Bakterienwachstum (Pan und Yu, 2014).

Der GIT des Geflügels kommt direkt nach dem Schlupf der Tiere mit exogenen Mikroorganismen in Berührung und gewährt den hauptsächlich obligat anaeroben Bakterien relativ stabile Umweltbedingungen (Mead, 1989; Clench und Mathias, 1995; Apajalahti et al., 2004; Stanley et al., 2015). Fakultativ anaerobe Bakterien sowie Hefen, Schimmelpilze und Protozoen kommen im Allgemeinen nur in geringeren Konzentrationen vor (Mead, 1989). Der mit Abstand am dichtesten besiedelte Darmabschnitt beim Geflügel ( $10^9$ -  $10^{12}$  Zellen/g Digesta (Barnes, 1979; Gong et al., 2002)) ist das paarig angelegte Zäkum (Blinddarm) (Pan und Yu, 2014; Pourabedin und Zhao, 2015). Die beiden Zäka, die fast identische mikrobielle Gemeinschaften aufweisen, sind ein zentraler Standort für die Fermentation von unverdaulichen Kohlenhydraten, aber auch ein Schnittpunkt für die Besiedlung durch pathogene Mikroorganismen (Pan und Yu, 2014; Stanley et al., 2015). Während das Tier wächst, passt sich das Mikrobiom sukzessiv an, bis es einen verhältnismäßig konstanten und gleichzeitig anpassungsfähigen Zustand erreicht (Pan und Yu, 2014).

Einen maßgeblichen Einfluss auf die mikrobielle Zusammensetzung hat die Ernährung des Wirts. Bestimmende Faktoren sind die diätetischen Bestandteile, die Nährstoffgehalte in Form von Eiweiß, Fett und Kohlenhydraten, die physikalische Struktur (Verarbeitungsverfahren und Partikelgröße), die Verwendung von antimikrobiellen Zusätzen (Antibiotika und Kokzidiostatika) und weitere Futterzusatzstoffe wie Enzyme. Ein wichtiger Faktor für die standorttypische Besiedlung mit Bakterien ist die, im Vergleich zum oberen GIT, wesentlich langsamere Digesta-Transit-Zeit im Zäkum (2,5 h/12 - 20 h) (Hübener et al., 2002; Rehman et al., 2007; Sergeant et al., 2014).

Das bakterielle Mikrobiom des Geflügels unterteilt sich in 13 übergeordnete Stämme (Phyla). Davon stellen Firmicutes, Proteobacteria und Bacteroidetes, speziell im Zäkum, die dominanten Phyla dar, wobei Firmicutes mit 50 - 90 % am stärksten vertreten ist (Qu et al., 2008; Danzeisen et al., 2011; Wei et al., 2013; Oakley et al., 2014; Pourabedin und Zhao, 2015). Diese drei Phyla repräsentieren wiederum 117 etablierte Gattungen (Genera) (Wei et al., 2013), von denen sich Lactobazillen, Clostridien, *Bacteroides* und Bifidobakterien am häufigsten nachweisen lassen (Zhu et al., 2002; Gong et al., 2007; Rehman et al., 2007; Stanley et al., 2012).

### 2.3.2. Mikrobielle Fermentation im GIT bei Geflügel

Für die intestinale Mikrobiota stellen einfache, unverzweigte Kohlenhydrate die bevorzugteren Substrate dar. Im oberen GIT des Geflügels werden diese durch endogene Enzyme hydrolysiert und die Monomere über die Darmschleimhaut absorbiert (Rehman et al., 2008). Bestimmte komplexere Kohlenhydrate (DFs) können vom Wirt aufgrund der fehlenden Enzymausstattung nicht verdaut werden, passieren den Dünndarm und gelangen in den Dickdarm (Jamroz et al., 2001; Rehman et al., 2008). Diese  $\beta$ -glycosidisch gebundenen Polysaccharide dienen den im Zäkum ansässigen Bakterien als wichtige Kohlenstoffquelle, da sie die für den Aufschluss notwendigen Enzyme (Glycosidhydrolasen, Polysaccharidlyasen und Kohlenhydratesterasen) selbst produzieren können (Kirchgessner et al., 1999; Beckmann et al., 2006; Flint, 2006; Jorgensen et al., 2007; Cantarel et al., 2009; Flint et al., 2012a). Die Zäka des Geflügels sind der Darmabschnitt mit dem intensivsten mikrobiellen Fermentationsprozess. Die Konzentration der kurzkettigen Fettsäuren (SCFAs) kann dort auf bis zu 185 mmol/kg Digesta steigen (Jamroz et al., 1996a; Jamroz et al., 1996b; Jamroz et al., 1998; Jozefiak et al., 2004b). Allerdings besitzen die einzelnen Genera unterschiedlich stark ausgeprägte hydrolytische Fähigkeiten; so weisen Vertreter der Genera *Bacteroides* und *Clostridium* ausgeprägte hydrolytische Kapazitäten auf (Stanley et al., 2012; Stanley et al., 2013).

Zu den wichtigsten Endprodukten der anaeroben Kohlenhydratfermentation zählen neben Laktat, Ammoniak ( $\text{NH}_3$ ) und verschiedenen Gasen ( $\text{H}_2$ ,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{CH}_4$ ) vor allem die SCFAs Essig-, Propion-, Butter- und Valeriansäure (Jorgensen et al., 1996; Jamroz et al., 1998; Topping und Clifton, 2001; Rehman et al., 2007). Diese Fettsäuren können, als Hauptprodukte der Fermentation, 40 - 50 % der metabolisierbaren Energie eines Kohlenhydrats ausmachen (Cummings und Macfarlane, 1997a). Im Darmlumen liegen die SCFAs allerdings aufgrund der vorherrschenden pH- und ihrer pK-Werte fast ausschließlich als Salze (Acetat, Propionat, Butyrat und Valerat) vor und nur zu etwa 1 % als freie Säuren (von Engelhardt, 2015).

Die bakteriellen Produkte, aber auch die Organismen selbst, können vom Wirtstier energetisch genutzt werden und liefern bis zu 2 % der metabolisierbaren Energie (Jorgensen et al., 1996) oder können über „cross-feeding“ anderen Bakterien als Stoffwechsel- und Wachstumssubstrate dienen (Van Soest, 1967; Kirchgessner et al., 1999; Flint, 2006; Flint et al., 2012b). Die Gesamtzahl und der relative Anteil der SCFAs an den mikrobiellen Metaboliten variieren entsprechend der bakteriellen Zusammensetzung und werden demzufolge ebenfalls über die Komponenten und die Struktur des Futters beeinflusst (Topping und Clifton, 2001; Engberg et al., 2002; Rehman et al., 2007).

### 2.3.3. Direkte und indirekte Einflüsse der intestinalen Mikrobiota auf das Geflügel

Die vielfältigen direkten und/oder indirekten Auswirkungen der Mikrobiota auf den Wirt und dessen Stoffwechsel sind noch nicht hinreichend geklärt (Donohoe et al., 2011). Es wurden zum einen vorteilhafte Wirkungen, beispielsweise auf verschiedene Aspekte des Energiestoffwechsels beschrieben (den Besten et al., 2013). Zum anderen beherbergt das bakterielle Mikrobiom aber auch *Genera*, die über ihre Stoffwechsel- und Genprodukte oder ihre Pathogenitätsfaktoren nachteilige Wirkungen für den Wirt haben können (Blaser und Kirschner, 2007; Flint et al., 2012b).

Die von verschiedenen Bakterien luminal synthetisierten SCFAs sind hierbei von besonderer Bedeutung (Cummings und Macfarlane, 1997a). Unter anderem werden die SCFAs transepithelial absorbiert, woraufhin sie durch mitochondriale  $\beta$ -Oxidation metabolisiert werden und den Enterozyten direkt als Energiequelle (60 - 70 %) zur Verfügung stehen (Roediger, 1980; Rerat et al., 1987; Cummings und Macfarlane, 1997a; von Engelhardt et al., 1998). Neben der energetischen Nutzung stimulieren die aus dem Lumen schnell resorbierten SCFAs zusätzlich die Flüssigkeits- und Elektrolytaufnahme im Dickdarm (McNeil, 1984; Cummings und Macfarlane, 1997a; Mroz et al., 2006; Flint und Bayer, 2008; Pan und Yu, 2014). Auch potente antiinflammatorische Effekte werden den SCFAs zugesprochen. So modulieren sie nicht nur die Zellmigration von Immunzellen in die *Lamina propria*, sondern auch deren Aktivität. Durch eine zielgerichtete Wirkung auf Phagozyten und neutrophile Granulozyten sind SCFAs in der Lage, die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine zu unterdrücken (Tan et al., 2014). Außer den umfangreichen Einflüssen auf die Wirtsphysiologie führt die bakterizide/bakteriostatische Wirkung von SCFAs auch zu dynamischen Veränderungen innerhalb der intestinalen Population sowohl residenter als auch transienter Mikroorganismen (< 400 Arten) (van der Wielen et al., 2000; Mroz et al., 2006; Rehman et al., 2007; Tan et al., 2014)

Neben den für den Wirtsorganismus nutzbaren Stoffwechselmetaboliten stellt Ammoniak ein potenziell schädliches Fermentationsprodukt dar (Apajalahti und Vienola, 2016). Als Stickstoffquelle der bakteriellen Proteinsynthese wird Ammoniak durch Desaminierung von Aminosäuren abgespalten und aus dem Darmlumen resorbiert (Okumura et al., 1976; Hughes et al., 2000). Freies Ammoniak, die toxischste Form von Stickstoff, kann dabei sehr leicht von Enterozyten absorbiert werden und führt durch Veränderungen der Nukleinsäuresynthese zum Zelltod (Vissek, 1978; Corpet, 2000). Die *Genera Clostridium* und *Bacteroides* sind am stärksten an der Ammoniak-Synthese beteiligt (Vince und Burridge, 1980). Die höchsten Konzentrationen von Ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) im GIT von Hühnern lassen sich dementsprechend im Zäkum nachweisen (Isshiki, 1980; Rehman et al., 2007).

Zusammenfassend beeinflusst das Gleichgewicht der mikrobiellen Gemeinschaft und deren Produkte die Gesundheit des Wirtstiers. Die Unterdrückung negativer und Förderung positiver Auswirkungen hängen demnach vom Gesamtzustand der Mikrobiota, ihrer Verteilung, Diversität, Artenzusammensetzung und Stoffwechselleistung ab (Flint et al., 2012b).

#### **2.4. Auswirkungen von Lignocellulose bei Geflügel**

Die verschiedenen ernährungsphysiologischen und mikrobiellen Effekte einer mit DF supplementierten Geflügeldiät waren in den letzten Jahren von großem Interesse. Die Studien konzentrierten sich größtenteils auf den Einfluss unterschiedlicher Rohfaserquellen (z.B. Weizen-, Gerste-, Erbsen-, Haferschalen/-spelzen/-kleie), aber auch isolierter Anteile von NSPs bzw. Lignin (Choct et al., 1996; Jorgensen et al., 1996; Smits und Annison, 1996; Kirchgessner et al., 1999; Jamroz et al., 2002; Cao et al., 2003; Shakouri et al., 2006; Baurhoo et al., 2007a; Baurhoo et al., 2007b). So können bestimmte NSP-Fraktionen im Dünndarm die Digestivviskosität steigern und die Nährstoffverdauung und -absorption durch die verringerte Diffusionsrate von Substraten und Verdauungsenzymen hemmen. Vor allem bei Rohprotein, Aminosäuren und Stärke verschlechtert sich die Verdaulichkeit mit zunehmendem Gehalt an diätetischen Fasern (Jeroch et al., 2019). Des Weiteren beeinträchtigt eine hohe Viskosität aufgrund der langsameren Passagerate die Futteraufnahme bei Broilern. Die verlangsamte Passagezeit führt wiederum zu einem verstärkten mikrobiellen Wachstum und einer veränderten Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota (Smits und Annison, 1996; Langhout, 1998; Hetland et al., 2004; Jeroch et al., 2019). Von Bedeutung sind hier vorrangig die wasserlöslichen  $\beta$ -Glucane und Arabinoxylane (Pentosane) und deren Einfluss auf die intestinale Viskosität und damit auf die Mikrobiota (Choct et al., 1996; Smits und Annison, 1996). Unlösliche NSPs können ebenfalls nachteilig Einfluss auf die Nährstoffverdauung nehmen. So bewirken sie durch Einschluss von normalerweise hochverdaulichen Nährstoffen wie Stärke, Protein oder einfachen Zuckern einen sogenannten Verkapselungs- bzw. Käfigeffekt. Dadurch wird die Geschwindigkeit, mit der diese Nährstoffe im Dünndarm verdaut und absorbiert werden können, begrenzt oder die Resorption teilweise verhindert (Theander et al., 1989; Englyst und Englyst, 2005; Jeroch et al., 2019).

Daten über die Wirkung verschiedener Konzentrationen von diätetischer Lignocellulose sind nur limitiert verfügbar (Boguslawska-Tryk et al., 2015; Yokhana et al., 2016; Farran et al., 2017; Kheravii et al., 2017; Makivic et al., 2019; Röhe et al., 2019a; Röhe et al., 2019b). Erst in jüngerer Zeit rückte die Verwendung von Lignocellulose bei Mast- und Legehennen in den wissenschaftlichen Fokus. Versuchsübergreifend wurde in fast jedem genannten Experiment dieselbe handelsübliche Lignocellulose-Zubereitung (ARBOCEL® RC, J. Rettenmaier & Söhne GmbH + CO. KG, Rosenberg, Deutschland) verwendet. Eine Ausnahme stellt der Fütterungsversuch von Kheravii et al., 2017 dar. Hier wurde als kommerzielle Lignocellulosequelle OptiCell® (Agromed GMBH, Kremsmünster, Österreich) verwendet.

#### 2.4.1. Einfluss diätetischer Lignocellulose auf zootechnische Parameter

Die in der Literatur beschriebenen Effekte von zugefütterter Lignocellulose auf die Leistung der Tiere sind sehr unterschiedlich. So waren in einer aktuellen Untersuchung bei 28 Tage alten Broilern (Cobb500) durch Zulage von 0,6 % Lignocellulose die Lebendmassezunahme ( $p < 0,001$ ), der Futteraufwand ( $p < 0,001$ ) aber auch die Futterraufnahme ( $p < 0,001$ ) im Vergleich zu einer eingesetzten herkömmlichen Kontrolldiät signifikant erhöht. In der Gruppe mit 0,6 % Lignocellulose war die Lebendmasse gegenüber einer Gruppe, die 0,4 % Lignocellulose im Futter erhielt, höher (Makivic et al., 2019). Andere Studien konnten diese Effekte allerdings nicht bestätigen. Bei einem Fütterungsversuch mit 0,25, 0,5 und 1 % Lignocellulose wurden keine erkennbaren Auswirkungen auf die leistungsbezogenen Daten nachgewiesen. Lebendmasse, Lebendmassezunahme und der Futteraufwand der 42 Tage alten männlichen Versuchstiere (Ross 308) zeigten sich in dieser Studie zwischen den Versuchsdiäten und der Kontrolldiät kaum verändert ( $p > 0,05$ ) (Boguslawska-Tryk et al., 2015). Diese Ergebnisse werden auch durch einen weiteren Fütterungsversuch mit 35 Tage alten Tieren gestützt (Ross 308). Die Leistungsparameter unterschieden sich hier bei Zusatz von 1 bzw. 2 % Lignocellulose weder zur Kontrolldiät noch untereinander (Kheravii et al., 2017). Unter Berücksichtigung der Effekte auf die Lebendmasse wurden diese Daten durch eine weitere Fütterungsstudie mit Zusatz von 0,8 % Lignocellulose bestätigt. Auch hier konnte kein signifikanter Unterschied der Leistungsparameter der 31 Wochen alten Legehennen (Hy-Line Brown) zwischen Versuchs- und Kontrolldiät beschrieben werden (Yokhana et al., 2016). Ein Fütterungsversuch mit Legehennen einer Zweinutzungsrasse (Lohman Dual) zeigt jedoch negative Auswirkungen bei einer Diät mit 10 % Lignocellulosezusatz. Gegenüber einer Kontrollgruppe konnten signifikant niedrigere zootechnische Leistungen ermittelt werden ( $p < 0,05$ ). Während der Legeperiode (33. – 52. Lebenswoche (LW)) konnte zusätzlich eine deutlich erhöhte Futterraufnahme ( $p < 0,001$ ) bei den mit Lignocellulose gefütterten Tieren festgestellt werden. Allerdings waren die Werte in der Wachstumsphase (1. – 22. LW) und zu Beginn der Legeperiode (22. – 32. LW) zwischen den Gruppen vergleichbar (Röhe et al., 2019a).

#### 2.4.2. Einfluss diätetischer Lignocellulose auf die verdauungsphysiologischen Parameter

Die Effekte unterschiedlich hoher Konzentrationen von diätetischer Lignocellulose auf die Nährstoffverdaulichkeiten sowie den Wassergehalt der Exkremente wurde in verschiedenen Studien beschrieben. Bei einem Versuch mit einer Konzentration von 0,8 % Lignocellulose konnte eine verbesserte präzäkale Rohproteinverdaulichkeit nachgewiesen werden ( $p < 0,05$ ). Die einzeln gehaltenen 55 Wochen alten Hähne (Hy-Line Brown roosters) zeigten gegenüber der eingesetzten Kontrolldiät eine um 6 % gesteigerte Verdauung von Protein im Ileum (Farran et al., 2017).



Bei etwas höheren Gehalten ließen sich diese Ergebnisse allerdings nicht bestätigen. Durch Zusatz von 1 und 2 % diätetischer Lignocellulose konnten keine veränderten Verdaulichkeiten bei Broilern festgestellt werden (Kheravii et al., 2017). Die scheinbare Gesamtverdaulichkeit von Rohfett wurde bei Konzentrationen von 0,25, 0,5 und 1 % Lignocellulose untersucht. Nach 22-tägiger Versuchsdauer zeigten sich keine Unterschiede zur Kontrollgruppe (Boguslawska-Tryk et al., 2016). Konzentrationen von 0,4, 0,6, 1 und 2 % Lignocellulose reduzierten die Wassergehalte der Exkreme bei Broilern (Kheravii et al., 2017; Makivic et al., 2019). Bei Einsatz von 10 % Lignocellulose zeigten sich zunächst erhöhte Trockensubstanzgehalte (TS) der Exkreme. Bei Abschluss des 12 Monate dauernden Fütterungsversuchs ließen sich jedoch keine signifikanten Unterschiede mehr nachweisen (Röhe et al., 2019b).

#### 2.4.3. Einfluss diätetischer Lignocellulose auf mikrobiologische Parameter im Verdauungstrakt

##### 2.4.3.1. Bakterielle Metaboliten

Der Einfluss supplementierter Lignocellulose auf mikrobiell gebildete Metaboliten in der Digesta wurde in zwei Studien untersucht (Boguslawska-Tryk et al., 2015; Röhe et al., 2019b). In der erstgenannten Studie wurden Mengen von 0,25, 0,5 und 1 % Lignocellulose verwendet. In der zäkalen Digesta ließen sich deutliche Unterschiede bei den SCFAs zwischen den jeweiligen Gruppen feststellen. Im Vergleich zur Kontrollgruppe sowie der Gruppe mit 1 % Lignocellulosezusatz war die Summe der gemessenen SCFAs bei 0,5 % Zusatz signifikant erhöht. Zwischen den Versuchsgruppen mit 0,25 und 0,5 % Lignocellulose zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. In der Versuchsgruppe mit 0,5 % supplementierter Lignocellulose waren in der Digesta des Zäkums erhöhte Laktatgehalte festzustellen (Boguslawska-Tryk et al., 2015). Veränderungen der bakteriellen Stoffwechselmetaboliten waren auch in der neueren Studie mit 10 % Lignocellulosezusatz festzustellen. Die gemessene Gesamtkonzentration der SCFAs im Zäkum verringerte sich signifikant ( $p < 0,017$ ) gegenüber der Versuchsgruppe, die die Kontrolldiät erhalten hatte. Deutlich niedrigere Werte zeigten sich bei Ammonium, Essig-, Propion- und n-Valeriansäure. Sowohl die molaren Anteile der Metaboliten als auch der Laktatgehalt blieben jedoch unverändert ( $p > 0,05$ ) (Röhe et al., 2019b).

##### 2.4.3.2. Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota

Messbare Auswirkungen auf die Zusammensetzung der bakteriellen Mikrobiota durch den Einsatz von Lignocellulose sind bisher nur wenig publiziert und in den entsprechenden Studien recht unterschiedlich dargestellt. So wurden fördernde aber auch hemmende Effekte auf die bakterielle Gemeinschaft beschrieben.

In der Versuchsreihe mit 0,25, 0,5 oder 1 % diätetischer Lignocellulose konnte gezeigt werden, dass die Gesamtkeimzahl nicht beeinflusst wurde. Auch die Konzentrationen von *Lactobacillus* spp. ließen zwischen den Versuchsgruppen keine Unterschiede erkennen. Unterschiede wurden allerdings bei den Digesta-Konzentrationen von *Bifidobacterium* spp. beschrieben. Diese stiegen im Vergleich zu Tieren, die die Kontrolldiät erhielten, bei Gabe von Lignocellulose dosisabhängig an. Im Gegensatz dazu wurde die Anzahl von *Escherichia coli* (*E. coli*) und *Clostridium* spp. im Zäkum signifikant durch die Zulage von 0,25 und 0,5 % Lignocellulose reduziert (Boguslawska-Tryk et al., 2015).

Bei Gabe von 1 und 2 % Lignocellulose zeigten sich teilweise ähnliche Ergebnisse. Im Zäkum ließen sich, bezogen auf die Gesamtzahlen der untersuchten Bakterien, keine signifikanten Verschiebungen zwischen den jeweiligen Versuchsgruppen darstellen ( $p > 0,05$ ). Auch die analysierten Daten zu *Lactobacillus* spp. waren bei den eingesetzten Diäten nahezu identisch ( $p = 0,207$ ). Die Keimzahlen von *Bifidobacterium* spp. unterschieden sich kaum voneinander ( $p = 0,150$ ). Auch die Familie der *Enterobacteriaceae* zeigte keine Veränderungen bei unterschiedlichem Lignocellulosegehalt ( $p = 0,146$ ). Bei *Clostridium* spp. wurden gegensätzliche Auswirkungen der supplementierten Lignocellulose dokumentiert. Die Keimzahlen erhöhten sich bei Gabe von 1 % Lignocellulose und verringerten sich ebenso signifikant bei Zusatz von 2 % Lignocellulose ( $p = 0,029$ ). Der Einfluss von steigenden Mengen Lignocellulose zeigte sich bei *Ruminococcus* spp. durch deutlich reduzierte Bakterienzahlen ( $p = 0,020$ ). Bei den *Genera Bacillus* spp., *Bacteroides* spp. und *Salmonella* spp. konnten keine Effekte beobachtet werden ( $p < 0,05$ ) (Kheravii et al., 2017).

Der Einfluss von 0,4 und 0,6 % diätetischer Lignocellulose auf die zäkale Bakterienpopulation wurde anhand von vier ausgewählten *Genera* beschrieben. Durch Zusatz von Lignocellulose wurden signifikant erhöhte Werte an *Lactobacillus* spp. und *Bifidobacterium* spp. zwischen den einzelnen Versuchsgruppen gemessen ( $p < 0,001$ ). Die Werte stiegen in Abhängigkeit von der Lignocellulosekonzentration im Futter an. Ein hemmender Effekt war bei *E. coli* und *Clostridium* spp. zu beobachten ( $p < 0,001$ ) (Makivic et al., 2019).

Im Gesamtvergleich verdeutlichen die beschriebenen Studien (Boguslawska-Tryk et al., 2015; Kheravii et al., 2017; Makivic et al., 2019) einen reduzierenden Effekt von Lignocellulose auf *E. coli* und *Clostridium* spp..

Eine weitere Fütterungsstudie konnte bei einer Konzentration von 10 % Lignocellulose keine signifikanten Veränderungen der ausgewählten Bakterien-Cluster nachweisen. Ein möglicher Effekt der hohen Lignocellulosekonzentration auf die bakterielle Zellzahl wie auch auf die metabolische Aktivität wurde über die analysierten DNA- und RNA-Kopienzahlen nicht bestätigt (Röhe et al., 2019b).

### 3. Hintergrund und Fragestellung

Der Einsatz von Lignocellulose bei Geflügel zeigte bei den in der Literaturübersicht beschriebenen Studien sehr unterschiedliche Auswirkungen. Die zum Teil widersprüchlichen Ergebnisse und die überschaubare Datenlage werfen dabei noch zahlreiche Fragen auf. Auch der bisherige Ansatz der durch Lignocellulose verdünnten Diäten, ohne Ausgleich der verschiebenden Nährstoffgehalte, gewährt Interpretationsspielraum. So wurden in diesem Experiment isoenergetische und isonitrogene Diäten mit gleichzeitig deutlich höheren Konzentrationen von Lignocellulose eingesetzt. Effekte auf die Tierleistung können so, bei konstanten Energie- und Proteingehalten, eindeutiger der supplementierten Lignocellulose zugeordnet werden. Die hier gewählte abgestufte Dosierung der Lignocellulose soll mögliche Effekte auf zootecnische, verdauungsphysiologische und mikrobiologische Parameter verdeutlichen.

Basierend auf der vorhandenen Literatur und den daraus resultierenden Erkenntnissen, ergaben sich folgende Hypothesen:

1. Höhere Konzentrationen supplementierter Lignocellulose beeinflussen die Leistungsparameter von Geflügel nur in geringem Maße.
2. Anhand der steigenden Mengen von Lignocellulose im Futter zeigt sich eine unmittelbare Wirkung auf die Verdaulichkeit der Nährstoffe.
3. Der Einsatz höherer Gehalte von Lignocellulose im Futter hat einen Einfluss auf die Zusammensetzung und Aktivität des intestinalen Mikrobioms.
4. Lignocellulose hat zudem einen wachstumshemmenden Effekt auf potenziell pathogene Bakterien.

Zur Überprüfung der aufgestellten Hypothesen wurden zootecnische, verdauungsphysiologische und mikrobiologische Daten anhand lignocellulosereicher Futterrationen bei langsam wachsenden männlichen Hühnern einer Kreuzungspopulation aus White Leghorn und New Hampshire erhoben und analysiert. Besondere Aufmerksamkeit galt dabei den intestinalen Metaboliten und der Mikrobiota im Verdauungstrakt.

## 4. Material und Methoden

### 4.1. Fütterungsversuch mit Lignocellulose

#### 4.1.1. Versuchsaufbau, Tiere und Haltungsbedingungen

Die Fütterungsstudie wurde durch das Landesamt für Gesundheit und Soziales in Berlin genehmigt (Genehmigungsnummer G 0165/14). Die Daten zur Erhebung der Parameter basierten auf insgesamt 59 Versuchstieren und einer Versuchsdauer von 13 Wochen. Die für die Untersuchung genutzten Hühner stammten aus einer hauseigenen Zucht der Humboldt-Universität zu Berlin. Es handelte sich dabei um eine Kreuzung, bestehend aus den Zuchtlinien WL77 – White Leghorn und NHI – New Hampshire (Goraga et al., 2010). Aus der, unter fortgeschrittener Züchtung entstandenen Kreuzungspopulation (Advanced Intercross Population - ALI) der 11. Generation wurden nach dem Schlupf und optischer Geschlechtsbestimmung 60 männliche Tiere für die Versuchsdurchführung ausgewählt.

Die Tiere wurden ab dem ersten Lebenstag in Bodenhaltung in Gruppen von 25 - 30 Tieren gehalten. Ab der 5. bis zur 10. LW wurden die Tiere randomisiert in drei Versuchsgruppen (LC 1/LC 2/LC 3) zunächst zu je 20 Tieren unterteilt und in jeweils zwei Volieren á 10 Tiere eingestallt. In den Volieren, die eine Größe von 5,60 m<sup>2</sup> und eine Höhe von 2 m besaßen, wurden zudem Ventilrundtränken, Futterautomaten und Sitzstangen installiert. Als Einstreu wurde staubarmes, gehäckseltes Miscanthus verwendet. Ab der 10. LW wurden die Tiere bis zur 13. LW in Einzelkäfigen gehalten. Bezogen auf die unterschiedlichen Schlupfdaten der 60 Versuchstiere wurden diese auf zwei, um eine Woche verschobene Leistungsdurchgänge aufgeteilt. Aufgrund einer erkannten Fehlsexung (Fehler bei der Geschlechtsbestimmung) änderte sich in der 10. LW die Tieranzahl in Gruppe LC 3 (Tab. 3). Der Versuch wurde dementsprechend mit 59 Tieren zu Ende geführt. Die Größe der Einzelkäfige betrug 61 cm x 50 cm x 35 cm. Die Käfige waren mit einem Nippeltränksystem ausgestattet, sodass die Tiere während der gesamten Versuchsdauer die Möglichkeit hatten, Wasser *ad libitum* aufzunehmen. Die Bodenplatte war tiergerecht perforiert, zusätzlich bestand ein Drittel der Grundfläche aus einer geschlossenen Platte mit glatter Oberfläche. Die Käfige waren so angeordnet, dass die Tiere sich gegenseitig beobachten konnten. Ein Lichtprogramm sorgte für eine jeweils zwölfstündige Licht- und Dunkelphase. Die Temperatur im vollklimatisierten Stall betrug durchschnittlich 21 °C. Es erfolgte eine tägliche Gesundheitskontrolle des Bestands durch das Pflegepersonal und eine regelmäßige Reinigung und Desinfektion der Arbeits- und Stallflächen im 2-Tagesrhythmus.

**Tabelle 3:** Zeitplan des Fütterungsversuchs mit langsam wachsenden männlichen Hühnern

		LC 1	LC 2	LC 3
<b>Haltungsbeginn</b>		Tieranzahl pro Gruppe		
Eieinlage	0. LW <sup>1</sup>	20	20	20
Schlupf	1. LW			
<b>Gruppenhaltung</b>				
Starterfutter	1. - 3. LW			
Mastfutter	3. - 5. LW	20	20	20
Diätfutter	5. - 10. LW			
<b>Einzelhaltung</b>				
Diätfutter	10. - 13. LW			
Umstallung	10. LW	20	20	19 <sup>2</sup>
Schlachtung	13. LW			

<sup>1</sup> LW = Lebenswoche

<sup>2</sup> in Gruppe LC 3 standen aufgrund einer anfänglichen Fehlsexung nur 19 männliche Tier zur Verfügung

#### 4.1.2. Versuchsfutter und Fütterung

Die Fütterung der Tiere bestand ab dem Schlupf bis Ende der 3. LW aus einem herkömmlichen Broilerstarterfutter und ab Anfang der 3. bis Ende der 5. LW aus einem Mastfutter für Geflügel (Tab. 4). Ab der 5. bis Ende der 13. LW kamen drei Diäten mit unterschiedlich hohem Lignocellulosegehalt zum Einsatz (Tab. 5). Der Zeitraum ab der 5. bis zur 10. LW diente den Tieren hierbei als Adaptationsphase an die Versuchsdiäten. Für eine individuelle Erfassung und Beurteilung der geplanten Parameter startete mit der Einzelkäfighaltung ab der 10. LW der eigentliche Versuchszeitraum von 23 Tagen. Insgesamt wurden die Tiere über einen Zeitraum von 8 Wochen mit den Versuchsdiäten gefüttert. Die isonitrogen und isoenergetisch konzipierten Diäten basierten auf Mais, Weizen, Sojabohnenmehl und Sojabohnenöl und wurden mit stufenweise erhöhten Mengen von Lignocellulose (ARBOCEL® RC Fine, J. Rettenmaier & Söhne GmbH + Co KG, Rosenberg, Germany) supplementiert. Die Diäten LC 1, LC 2 und LC 3 enthielten dementsprechend 0,8, 5 bzw. 10 % Lignocellulose. Zusätzlich wurde den Versuchsdiäten 0,3 % Titandioxid (TiO<sub>2</sub>) (Titanium(IV)-oxid, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) als unverdaulicher Marker zugesetzt (Tab. 5).

ARBOCEL® RC Fine ist ein kommerzielles Rohfaserkonzentrat (70 %), bestehend aus natürlich vorkommender Lignocellulose. Grundlage bildet frisch geschlagenes und sofort getrocknetes Holz, welches speziell vermahlen und über Hochdruckzentrifugen auffibrilliert wurde. Das homogene, mikrofeine, langfaserige (200 - 300 µm) und unlösliche Produkt mit einer Schüttdichte von 60 - 105 g/l ist laut Hersteller frei von löslichen NSPs, Rohprotein und Phosphor.

Die Einsatz- und Dosierungsempfehlungen von ARBOCEL® RC Fine liegen bei Legefutter bei 0,6 bis 0,8 % und bei Mastfutter bei 0,5 bis 1 % der Gesamtration (J. Rettenmaier & Söhne GmbH + Co KG, 2019).

**Tabelle 4:** Futter- und kalkulierte Nährstoffzusammensetzung des Geflügel-Starterfutters und Geflügel-Mittelmastfutters

		Geflügel-Starterfutter	Geflügel-Mastfutter
<b>Futterzusammensetzung</b>			
Weizen	[%]	38,5	34,5
Sojaextraktionsschrot 42 % XP	[%]	39,0	34,0
Körnermais	[%]	15,0	25,0
Prämix (Ovital MM CV ATG) <sup>1</sup>	[%]	4,00	4,00
Sojaöl	[%]	3,50	2,50
<b>kalkulierte Nährstoffgehalte</b>			
Trockensubstanz	[g/kg uS]	888	880
Rohasche	[g/kg TS]	61,0	59,0
Rohprotein	[g/kg TS]	223	207
Rohfaser	[g/kg TS]	42,0	40,0
Rohfett	[g/kg TS]	52,0	45,0
Kalzium	[g/kg TS]	9,80	9,60
Phosphor	[g/kg TS]	7,30	7,10
Natrium	[g/kg TS]	1,80	1,80
Kupfer	[mg/kg TS]	19,0	19,0
Lysin	[g/kg TS]	11,7	10,5
Methionin	[g/kg TS]	5,29	5,12
Vitamin A	[IE/kg TS]	11890	11906
Vitamin D	[IE/kg TS]	2972	2976
Vitamin E	[mg/kg TS]	69,0	69,0
Vitamin C	[mg/kg TS]	99,0	99,0
Vitamin B12	[µg/kg TS]	40,0	40,0
Biotin	[µg/kg TS]	135	135
BONVITAL <sup>2</sup>	[10 <sup>9</sup> KbE/kg TS]	0,50	0,50
<b>Kalkulierte AME<sub>N</sub><sup>3</sup></b>			
AME <sub>N</sub>	[MJ/kg TS]	11,9	11,9

<sup>1</sup> Zusammensetzung Prämix je kg: 250.00 I.E. Vit. A; 75.000 I.E. Vit. D3; 1.750 mg Vit. E; 1.250 mg Eisen (Eisen-(II)-oxid, Monohydrat E1); 1.500 mg Zink (Zinkoxid); 500 mg Zink (Glycin-Manganchelat-Hydrat E5); 100 mg Kupfer (Kupfer-(II)-sulfat, Pentahydrat E4); 100 mg Kupfer (Glycin-Kupferchelate-Hydrat E4); 20 mg Jod (Kalziumjodat, wasserfrei); 10 mg Selen (Natriumselenit E8)

<sup>2</sup> BONVITAL: 12,5 x 10<sup>9</sup> KbE Milchsäurebakterien-Konzentrat (*Enterococcus faecium*)

<sup>3</sup> scheinbare umsetzbare Energie, Stickstoff (N) korrigiert; berechnet auf der Grundlage der Gleichung von WSPA 1989

**Tabelle 5:** Futterzusammensetzung und kalkulierte Nährstoffgehalte der Versuchsdäten

		LC 1	LC 2	LC 3
<b>Futterzusammensetzung</b>				
Weizen	[%]	40,7	34,9	23,0
Sojaextraktionsschrot 42 % XP	[%]	29,0	30,6	34,5
Körnermais	[%]	19,0	19,0	18,0
Kalziumcarbonat	[%]	4,00	4,00	4,00
Sojaöl	[%]	2,50	2,50	6,50
Prämix (Ovital MM CV ATG) <sup>1</sup>	[%]	4,00	4,00	4,00
Lignocellulose <sup>2</sup>	[%]	0,80	5,00	10,0
TiO <sub>2</sub> <sup>3</sup>	[%]	0,30	0,30	0,30
<b>Kalkulierte Nährstoffe</b>				
Trockensubstanz	[g/kg uS]	878	878	884
Rohasche	[g/kg TS]	69,8	69,7	69,7
Rohprotein	[g/kg TS]	195	195	196
Rohfaser	[g/kg TS]	41,8	68,8	101
Rohfett	[g/kg TS]	45,0	44,2	82,2
Kalzium	[g/kg TS]	11,9	11,9	12,0
Phosphor	[g/kg TS]	7,10	7,00	6,80
Natrium	[g/kg TS]	1,60	1,60	1,60
Stärke	[g/kg TS]	38,0	34,7	27,1
Zucker	[g/kg TS]	4,50	4,46	4,41
<b>Kalkulierte AME<sub>N</sub><sup>4</sup></b>				
AME <sub>N</sub>	[MJ/kg]	11,7	11,1	11,2

<sup>1</sup> Zusammensetzung Prämix je kg: Siehe Tabelle 4;

<sup>2</sup> ARBOCEL® RC Fine, J. Rettenmaier & Söhne GmbH + Co KG, Rosenberg, Germany

<sup>3</sup> Titanium(IV)-oxid (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), Zugabe für die Verdaulichkeitsmessungen

<sup>4</sup> scheinbare umsetzbare Energie, Stickstoff (N) korrigiert; berechnet auf der Grundlage der Gleichung von WSPA 1989

#### 4.1.3. Schlachtung und Probenentnahme

Alle Tiere wurden im Alter von 13 Lebenswochen geschlachtet. Die Entnahme der Digestaprobe aus dem Ileum und der paarig angelegten Zäka erfolgte durch vorsichtiges Ausstreichen. Die Proben des Ileums wurden in 50 ml Greinerröhrchen überführt (Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich) und umgehend bei - 40°C tiefgefroren.

Für die Analyse der bakteriellen Metaboliten (SCFAs, L-/D-Laktat und Ammonium) wurden ca. 2 g des zäkalen Inhalts in ein 2 ml Eppendorfgefäß (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) separiert. Für die molekularbiologischen Untersuchungen wurde die restliche Digesta in 10 ml Greinerröhrchen (Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich) gefüllt.

Beide Proben wurden unverzüglich nach Entnahme in flüssigem Stickstoff bei - 196 °C kryokonserviert und anschließend bei - 80 °C tiefgefroren und gelagert. Die Exkrementproben der einzelnen Tiere wurden über einen Zeitraum von 12 Tagen einmal täglich gesammelt und bei - 30°C gelagert.



## **4.2. Futtermittelanalyse**

### 4.2.1. Rohrnährstoffe

Die Untersuchungen der Versuchsdiäten sowie der Proben des Ileums und der Exkrementensammelproben erfolgte mittels Weender-Futtermittelanalyse und Detergenzien-Faseranalyse und wurden nach Empfehlungen des Verbands Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten durchgeführt (VDLUFA, Methodenbuch III, 8. Ergänzungslieferung 2012 (Naumann und Bassler, 1976).

Zur Vorbereitung wurden die Proben des Ileums über 24 Stunden (h), die Exkrementensammelproben über einen Zeitraum von 5 Tagen gefriergetrocknet (Vakuumgefrieretrockner, Alpha 1-4 LSC, Martin Christ Gefrier Trocknungsanlagen GmbH, Osterode/Harz, Deutschland). Im Anschluss wurden die Digestaprobe des Ileums mittels Mörser zerkleinert und homogenisiert. Die Futter- und Exkrementproben wurden maschinell auf eine Partikelgröße von 0,5 mm gemahlen (Ultra-Zentrifugalmühle ZM 200, Retsch GmbH, Haan, Deutschland).

#### 4.2.1.1. Trockensubstanz

Zur Messung des Trockensubstanzgehalts der drei Versuchsdiäten wurden jeweils 1 - 2 g einer Futterprobe in einen Porzellantiegel eingewogen (Analysewaage Typ Genius, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) und bei einer Temperatur von 103 °C für 4 h getrocknet (Heraeus® Trockenschrank T5042, Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland). Nach anschließender Abkühlung auf Raumtemperatur in einem Exsikkator (DURAN®, DN 300, Exsikkator-Deckel, mit Tubus NS 24/29 Novus, Duran Produktion GmbH & Co. KG, Mainz, Deutschland) wurden die Tiegel erneut gewogen. Die Berechnung der Differenz der ersten und abschließenden Einwaage ergab den Feuchtigkeits- bzw. Trockensubstanzgehalt der Probe.

#### 4.2.1.2. Rohasche

Zur Bestimmung des Rohaschegehalts wurden 0,5 - 1 g Probe eingewogen (Analysewaage Typ Genius, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) und diese dann bei 600 °C für 6 h im Muffelofen (Heraeus® M 110, Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland) verascht. Nach der Veraschung und Abkühlung im Exsikkator auf Raumtemperatur erfolgte im Anschluss die Rückwaage der Probe. Der Rohaschegehalt der jeweiligen Probe ergab sich aus der Differenz der Einwaagen.

#### 4.2.1.3. Rohprotein

Die Rohproteinanalyse erfolgte über die Messung des Stickstoffgehalts der Versuchsdänten nach der Dumas-Verbrennungsmethode (Verbandsmethode) über einen Makro-Elementaranalysator (Makro-Elementaranalysator Vario max CN V 7.2.1, Elementar Analysensysteme GmbH, Hanau, Deutschland). Der Rohproteingehalt wurde unter Berücksichtigung eines Umrechnungsfaktors aus dem ermittelten Gesamtstickstoffgehalt errechnet.

#### 4.2.1.4. Rohfaser

Zur Bestimmung des Gehalts an säure- und alkaliunlöslichen fettfreien Bestandteilen (Rohfaser) wurden 0,5 g Probenmaterial in Filterbeutel (F57 Filter Bags, ANKOM Technology, Macedon, NY, USA) eingewogen (Analysewaage Typ Genius, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) und erst in 1,25 %iger Schwefelsäure (J.T. Baker, Griesheim, Deutschland) und anschließend in 1,25 %iger Natronlauge (Natriumhydroxid  $\geq$  99,0 %, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) mittels Rohfaseranalysator (Ankom2000 Fibre Analyser, ANKOM Technology Macedon, NY, USA) gekocht. Nach anschließender Trocknung bei 105 °C (Lacktrockenschrank LUT 6050 F, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) und Rückwaage wurden die Proben bei 600 °C für 6 h im Muffelofen verascht (Heraeus® M 110, Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland). Der um den Gewichtsverlust der Proben nach Veraschung korrigierte organische Anteil entsprach dem Rohfasergehalt der jeweiligen Probe.

#### 4.2.1.5. Rohfett

Zur Messung des Rohfettgehalts wurden zunächst 0,2-1 g Probenmaterial in Filterbeutel (XT4 Filter Bags, ANKOM Technology Macedon, NY, USA) eingewogen (Analysewaage Typ Genius, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland). Danach erfolgte die Extraktion des Fetts mit Petrolether (Petroleumbenzin, reinst, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) nach dem Soxhlet-Verfahren (Extraktionssystem B-811, Büchi Labortechnik GmbH, Essen, Deutschland). Nach der ca. dreistündigen Extraktion wurden die Proben, um eine vollständige Verdampfung des Lösungsmittels zu gewährleisten, bei 103 °C für 30 min im Trockenschrank (Lacktrockenschrank LUT 6050 F, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) getrocknet und anschließend gewogen. Aus der Differenz der Einwaage ergab sich der Rohfettgehalt der jeweiligen Probe.

#### 4.2.2. Detergenzien-Faseranalyse

##### 4.2.2.1. NDF-Bestimmung

Zur Bestimmung der NDF-Fraktion wurden 0,45 - 0,55 g der Futterproben in Filterbeutel (F57 Filter Bags, ANKOM Technology, Macedon, NY, USA) eingewogen (Analysewaage Typ Genius, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland), mit einer neutralen Detergenzienlösung (Tab. 15) für 1 h inkubiert und mittels Faseranalysator (Ankom2000 Fibre Analyser, ANKOM Technology Macedon, NY, USA) gekocht. Um das noch vorhandene Wasser zu lösen, wurden die Filterbeutel nach der Extraktion für 5 min in Aceton (Aceton  $\geq$  99,5 %, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) eingeweicht. Anschließend wurden die Filterbeutel unter einem Luftabzug vor- und dann bei 104 °C für 1 h (Lackrockenschrank LUT 6050 F, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) endgetrocknet. Nach anschließender Abkühlung auf Raumtemperatur in einem Exsikkator (DURAN<sup>®</sup>, DN 300, Exsikkator-Deckel, mit Tubus NS 24/29 Novus, Duran Produktion GmbH & Co. KG, Mainz, Deutschland), wurden die Filterbeutel erneut gewogen. Danach wurden die Filterbeutel bei 600 °C für 6 h im Muffelofen (Heraeus<sup>®</sup> M 110, Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland) verascht und abschließend nochmals gewogen. Der NDF-Gehalt wurde anhand der Differenzen der Einwaagen berechnet.

##### 4.2.2.2. ADF-Bestimmung

Die Analyse zur Bestimmung der ADF-Fraktion in einer Futtermittelprobe gleicht der unter 4.2.2.1. beschriebenen NDF-Bestimmung, wobei hier eine saure (kationische) Detergenzienlösung (20 g Cetyltrimethylammonium-bromid  $\geq$  99,0 % (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) mit 0,5 molarer Schwefelsäure (Schwefelsäure 95 - 97 %, J.T. Baker, Griesheim, Deutschland) auf einen Liter auffüllen) verwendet wurde. Der nach Trocknung gewogene Rückstand entsprach dabei dem Gehalt an Säure-Detergenzien-Fasern.

##### 4.2.2.3. ADL-Bestimmung

Der Gehalt an ADL einer jeweiligen Probe wurde im verbliebenen Rückstand der vorangegangenen ADF-Analyse bestimmt. Die Filterbeutel wurden mit Schwefelsäure (Schwefelsäure 72 %, J.T. Baker, Griesheim, Deutschland) über 3 h solubilisiert. Anschließend wurden die Filterbeutel gründlich mit *Aqua valde purificata* gewaschen, für 5 min in Aceton (Aceton  $\geq$  99,5 %, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) eingeweicht und bei 104 °C für 1 h (Lackrockenschrank LUT 6050 F, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) getrocknet.

Nach Abkühlung in einem Exsikkator (DURAN<sup>®</sup>, DN 300, Exsikkator-Deckel, mit Tubus NS 24/29 Novus, Duran Produktion GmbH & Co. KG, Mainz, Deutschland) wurden die Filterbeutel gewogen (Analysewaage Typ Genius, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) und bei 600 °C für 6 h im Muffelofen (Heraeus<sup>®</sup> M 110, Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland) verascht. Abschließend wurden die Rückstände erneut gewogen und der ADL-Gehalt anhand der Differenz der Einwaagen berechnet.

#### 4.2.3. Mengen- und Spurenelemente

##### 4.2.3.1. Probenaufarbeitung

Zur Bestimmung der Mengen- und Spurenelemente wurde der Rückstand der Rohaschebestimmung verwendet. Der veraschten Probe wurden 6 ml konzentrierte Salzsäure (37 - 38 %, J.T. Baker, Griesheim, Deutschland) und 20 ml *Aqua valde purificata* zugesetzt, bevor sie in einem vorgeheizten Sandbad (Harry Gestigkeit GmbH, Düsseldorf, Deutschland) bei 210 - 220 °C für 50 min erhitzt wurden. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden die Proben mit *Aqua valde purificata* über einen Faltenfilter (Faltenfilter Whatman 595 ½, 125 mm, GE Healthcare, Little Chalfont, UK) in ein 50 ml Greiner-Röhrchen überführt.

##### 4.2.3.2. Messung von Kalzium, Natrium, Magnesium, Kalium, Kupfer, Zink und Eisen

Die Gehalte an Kalzium, Natrium, Magnesium, Kalium, Kupfer, Zink und Eisen wurden in der Aschelösung mittels Atomabsorptionsspektrometer (Atomabsorptionsspektrometer Vario 6, Analytik Jena AG, Jena, Deutschland) bestimmt.

##### 4.2.3.3. Messung von Phosphor

Die photometrische Bestimmung des Phosphors erfolgte mittels Nitrovanadatmolybdat-Lösung. Dazu wurde die vorbereitete Aschelösung mit einer Lösung aus Salpetersäure (134 ml; 65 %ig, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) und den Phosphor-Komplexbildnern Ammoniumvanadat (200 ml; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) und Ammoniummolybdat (200 ml; Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) versetzt.

Der in der Probe enthaltene Phosphor reagierte in dem salpetersauren Milieu zu einem gelben Farbkomplex, dessen Extinktion photometrisch bei einer Wellenlänge ( $\lambda$ ) von 436 nm gemessen wurde (Photometer: Ultrospec 2100 pro, Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ, USA). Anhand der Kalibrierkurve konnte der Phosphorgehalt der jeweiligen Probe ermittelt werden.

### 4.3. Zootechnische Parameter

#### 4.3.1. Futteraufnahme und Futteraufwand

Die wöchentliche Futteraufnahme wurde durch die Differenz der Futtereinwaage (Tischwaage FKB-1A, KERN & SOHN GmbH, Balingen-Frommern, Deutschland) und der Rückwaage des verbliebenen Futters bestimmt. Die tägliche Futteraufnahme wurde rechnerisch ermittelt.

Der Futteraufwand wurde ebenfalls rechnerisch ermittelt. In der Berechnung wurde die mittlere Futteraufnahme und die mittlere Lebendmassezunahme der einzelnen Tiere verwendet.

$$\text{Futteraufwand} = \frac{\text{mittlere Futteraufnahme [g]}}{\text{mittlere Lebendmassezunahme [g]}}$$

#### 4.3.2. Lebendmasseentwicklung und -zunahme

Jedes Huhn wurde beim Einstellen und während der Versuchsdauer einmal pro Woche gewogen (Tischwaage FKB-1A, KERN & SOHN GmbH, Balingen-Frommern, Deutschland). Die Lebendmassezunahme wurde rechnerisch mithilfe der Lebendmassedaten ermittelt.

#### 4.3.3. Gesundheitsbeurteilung

Der Gesundheitszustand der Hühner wurde täglich routinemäßig erfasst.

#### 4.4. Verdauungsphysiologische Parameter

##### 4.4.1. Titanbestimmung

Zur Messung des Titangehalts wurden jeweils 100 mg der Digesta- und Exkrementproben sowie 200 mg jeder Versuchsdiaät in ein Glasaufschlussgefäß (SCP Science, Courtaboeuf, Frankreich) eingewogen. Anschließend wurden die Proben mit konzentrierter Schwefelsäure (95-97 %; J.T. Baker, Griesheim, Deutschland), einem Kjeldahlkatalysator (Kjeldahl Tabletten 3,5 g/Tablette, AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland) und 2-3 Siedesteinchen (Siedesteinchen, Atn. 1692.1, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) versetzt und bei 400 °C für 95 min aufgeschlossen (Heizblock: SCP Science DigiPREP HAT, S-prep GmbH, Überlingen, Deutschland). Nach Aufschluss der Proben wurden diese mit *Aqua valde purificata* versetzt und filtriert.

Danach wurden jeweils 2 ml der Probe mit 200 µl Wasserstoffperoxid (Pedrogen® 30 %, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) versetzt und die Extinktion mittels einer Standardreihe (50, 100, 200 und 500 µg Titandioxid/2,2 ml) bei  $\lambda = 410$  nm photometrisch (Ultrospec 2100 pro, Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ, USA) gemessen.

##### 4.4.2. Scheinbare Verdaulichkeit

Die Berechnung der scheinbaren präzäkalen und gesamten Verdaulichkeit der Nährstoffe erfolgte über die Indikatormethode mittels unverdaulichem Titandioxid-Marker (TiO<sub>2</sub>) anhand nachfolgender Formel:

$$\text{Verdaulichkeit [\%]} = 100 - \frac{\text{Titandioxidgehalt Futter [g/kg]}}{\text{Titandioxidgehalt Digesta [g/kg]}} \times \frac{\text{Nährstoffgehalt Digesta [g/kg]}}{\text{Nährstoffgehalt Futter [g/kg]}} \times 100$$

##### 4.4.3. Trockensubstanz der Exkremente

Zur Bestimmung der TS wurden die Exkrementensammelproben der Einzeltiere nach der Gefrietrocknung erneut gewogen und der TS-Gehalt anhand folgender Formel ermittelt:

$$\text{TS [g/kg]} = \frac{\text{gefriergetrocknete Auswaage [g]}}{\text{frische Einwaage [g]}} \times 1000$$

#### **4.5. Mikrobiologische Parameter**

Die mikrobiologischen Analysen der zäkalen Digesta lassen sich methodisch in zwei Abschnitte gliedern. Zuerst erfolgte die Bestimmung der bakteriellen Metaboliten (SCFAs, Ammonium und L-/D-Laktat), dann erfolgte die Quantifizierung ausgewählter Bakteriengruppen sowie der metabolischen Aktivität anhand der quantitativen Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) und der quantitativen Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR).

##### 4.5.1. Bakterielle Metaboliten

###### 4.5.1.1. Kurzkettige Fettsäuren

Die Konzentrationen der SCFAs im Zäkum wurden gaschromatographisch analysiert. Zur Aufarbeitung der Digestproben wurden ca. 300 mg Probenmaterial (> 260 mg) in ein 2 ml Eppendorfgefäß (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) eingewogen und mit 1 ml Verdünnungslösung (Tab. 16) versetzt. Zur Homogenisierung und Inkubation wurden die Proben bei Raumtemperatur für 60 min in einen Rüttler (Rüttler VV 3, VWR International GmbH Darmstadt, Deutschland) gestellt und im Anschluss bei 14.800 x g und ebenfalls Raumtemperatur für 10 min zentrifugiert (Zentrifuge 5415 C, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland). Danach wurden 100 µl des klaren Überstands in ein Probengefäß (Screw cap vials, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA) abpipettiert und erneut mit 900 µl der Verdünnungslösung versetzt. Über den Probengeber wurden die verdünnten Proben dann dem Gaschromatographen (GC 6890N, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA) zugeführt.

Zur Auftrennung der SCFAs wurde eine HP-INNOWAX Säule (19095N-123 HP-INNOWAX, Polyethylen Glycol, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA) verwendet. Bei dem verwendeten Trägergas handelte es sich um Wasserstoff, der über einen Gasgenerator (Parker ChromGas 9150, Parker Hannifin Corp., Cleveland OH, USA) erzeugt wurde. Zur Bestimmung der Konzentrationen der aufgetrennten einzelnen Fettsäuren wurde ein Flammenionisationsdetektor verwendet (Tab. 17). Die Injektionsspritze (FN 23-26/42/HP, konisch) hatte ein Fassungsvermögen von 10 µl und das Probenvolumen von 1 µl wurde bei einer Flussrate von 30 ml/min auf die Säule aufgebracht. Die mathematische Auswertung der kurzkettigen Fettsäurekonzentrationen erfolgte durch die Flächenintegration der Chromatogramme mittels HP ChemStation Software Rev.A.10.01 (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA).

#### 4.5.1.2. Ammonium

Die quantitative Bestimmung von Ammonium fand photometrisch nach dem Prinzip der Berthelot-Reaktion statt. Das im alkalischen Milieu (pH = 13) als Ammoniak vorliegende Ammonium reagiert mittels Hypochlorit zu Monochloramin. Dieses reagiert mit Thymolmolekülen zum Zwischenprodukt N-Chlor-2-isopropyl-5-methylchinon-monoamin und dann zu Indophenol. Die Konzentration des Indophenol-Ions in seiner blauen Basenform wurde über ein Mikrotiterplatten-Photometer (Mikrotiterplatten-photometer TECAN infinite M200 PRO, Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz) bei  $\lambda = 620$  nm bestimmt.

Zur Probenaufbereitung wurden ca. 500 mg der zäkalen Digesta mit 1 ml kalter 100 mmol/l MOPS-Lösung (3-(N-Morpholino)-2-hydroxypropansulfonsäure) versetzt und homogenisiert. Anschließend wurde das Gemisch für 10 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Proben bei  $17.000 \times g$  und  $4^\circ C$  so lange (60 - 90 min) zentrifugiert (Heraeus Fresco 17 Centrifuge, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), bis der Überstand klar war. Anschließend wurde der Überstand in ein neues 2 ml Eppendorfgefäß (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) pipettiert, der pH-Wert (pH < 7) mittels Mikro-pH-Elektrode (InLab<sup>®</sup> 410 pH-Kombinationselektrode, Mettler Toledo GmbH, Gießen, Deutschland) bei  $4^\circ C$  kontrolliert und danach mit der MOPS-Lösung (Tab. 18) im Verhältnis 1:20 vorverdünnt. Die photometrische Bestimmung erfolgte in Mikrotiterplatten (Mikrotiterplatte, PS-Microplate, 96 well, F-bottom, Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich). Die Kalibrierreihen (Tab. 19) mit 1000  $\mu\text{mol/l}$  Ammoniumchloridlösung in 100 mmol/l MOPS-Lösung wurden dabei jeden Tag neu angesetzt. In der Mikrotiterplatte wurden dann 20  $\mu\text{l}$  der mit MOPS-Lösung vorverdünnten Probenüberstände mit 100  $\mu\text{l}$  einer gebrauchsfertigen Phenol-Nitroprussid-Lösung (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) sowie mit 100  $\mu\text{l}$  einer 0,2 %igen Na-Hypochloridlösung (0,2 % Na-Hypochloridlösung in 1 mol/l NaOH (1 ml 12 % Na-Hypochlorid + 59 ml 1 mol/l NaOH), Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vermischt. Zusätzlich wurden ein Probenleerwert (20  $\mu\text{l}$  Probe + 200  $\mu\text{l}$  Verdünnungslösung), ein Reagenzienleerwert (20  $\mu\text{l}$  Verdünnungslösung + je 100  $\mu\text{l}$  Phenol-Nitroprussid-Lösung und 0,2 % Na-Hypochloridlösung) sowie ein Wert für die Verdünnungslösung (220  $\mu\text{l}$  Verdünnungslösung) erfasst, um die Werte der Eigenfarbanteile der Reagenzien und der Verdünnungslösung zu erhalten. Diese fanden in der Berechnung des Ammoniumgehalts im Extrakt Berücksichtigung.

Nach einer Inkubation von 15 min bei Raumtemperatur wurden die Proben einer ersten Messung im Photometer unterzogen. Nach weiteren 5 min Inkubationszeit wurde eine zweite Messung vorgenommen.



Abschließend wurden die ermittelten Konzentrationen von Ammonium anhand einer Kalibriergeraden über die i-control 1.7 Software (i-control 1.7 Software, Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz) bestimmt und unter Berücksichtigung der Probeneinwaagen in  $\mu\text{mol/g}$  angegeben.

#### 4.5.1.3. L-/D-Laktat

Die Konzentrationen von L-/D-Laktat im Zäkum wurden über eine HPLC ermittelt. Zur Probenaufbereitung wurden als erster Schritt ca. 500 mg der Digestprobe in ein 2 ml Eppendorfggefäß (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) eingewogen und mit 1 ml einer Kupfer-II-Sulfat-Lösung (0,5 mmol/l) (Tab. 20) versetzt. Anschließend wurden die Proben bei Raumtemperatur für 10 min auf einem Rüttler (Rüttler VV 3, VWR International GmbH Darmstadt, Deutschland) homogenisiert. Durch Zusetzen von je 100 ml Carrezlösung I und II wurde die Proteinfällung eingeleitet.

Nach jeder Zugabe wurden die Proben erst geschüttelt und bei 14.800 x g (Heraeus Fresco 21 Microcentrifuge, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) und Raumtemperatur für 10 min zentrifugiert. Der Überstand einer jeden Probe wurde mit einer 2 ml-Injektionsspritze aufgezogen und über einen sterilen Cellulose-Acetatfilter (Cellulose-Acetat-Spritzenvorsatzfilter, 0,45  $\mu\text{m}$ , VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) in ein 2 ml Eppendorfggefäß filtriert. Als Folgeschritt wurden 400  $\mu\text{l}$  des filtrierten Überstands mit 600  $\mu\text{l}$  Kupfer-II-sulfat-Lösung (0,5 mmol/l) verdünnt und direkt in die zur Analyse vorgesehenen Glasgefäße (Screw cap vials, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA) überführt. Die Glasgefäße wurden über einen Probengeber der HPLC-Anlage (HPLC Agilent 1100, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA), welche eine Vorsäule (Phenomenex C18 4,00 L mm x 2,00 ID mm, Phenomenex Inc., Torrance, CA, USA) und eine chirale Hauptsäule (Phenomenex Chirex 3126 (D)-penicillamine 150 x 4,60 mm, Phenomenex Inc., Torrance, CA, USA) enthielt, zugeführt. Die Temperatur des Säulenofens während des Analysevorgangs betrug 35 °C. Mit einer Flussrate von 1 ml/min passierten die Kupfer-II-sulfat-Lösungen (2,5 mmol/l und 0,5 mmol/l) die Säule. Das Injektionsvolumen betrug 20  $\mu\text{l}$ , und die Proben wurden mittels UV Detektor bei  $\lambda = 253 \text{ nm}$  gemessen.

Die Retentionszeit von L-Laktat betrug 12 - 12,5 min und diejenige von D-Laktat 15 - 15,5 min. Die Daten wurden mit der Chromeleon-Software 6.9 (Chromeleon® Software Version 6.80, Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, USA) ausgewertet.

#### 4.5.2. Molekularbiologische Quantifizierung ausgewählter Bakteriengruppen und deren metabolischen Aktivität

Die Quantifizierung ausgewählter Vertreter der Mikrobiota erfolgte anhand von DNA-Extrakten aus Digestaproben des Zäkums. Die Stoffwechselaktivität der ausgewählten Bakteriengruppen wurde dabei über die Extraktion der ribosomalen RNA bestimmt. Die Auswahl der Digestaproben beschränkte sich pro Gruppe auf je zehn Proben mit dem entsprechend höchsten Gehalt an SCFAs. Die bakteriellen Gruppen wurden anhand von sieben Gruppenprimern untersucht: *Clostridium coccooides* (*C. coccooides*)-Cluster XIVa, Clostridien-Cluster I, *Clostridium leptum* (*C. leptum*)-Cluster IV, *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas*-Cluster und *Escherichia/Hafnia/Shigella*-Cluster (Collins et al., 1994).

##### 4.5.2.1. DNA/RNA Extraktion

Die Extraktion der bakteriellen DNA und RNA aus den Digestaproben erfolgte nach Herstellerangaben mit dem NucleoSpin® RNA Kit (REF 740955, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland) in Kombination mit dem NucleoSpin® RNA/DNA Buffer Set (REF 740944, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland) mit verschiedenen Modifikationen, welche der Zusammensetzung und Beschaffenheit der aviären Digesta des Zäkums geschuldet sind. Die DNA/RNA-Extrakte wurden bis zur weiteren Analyse bei bis zu -30 °C gelagert.

Die Arbeitsanweisungen des NucleoSpin® RNA Kit und NucleoSpin® RNA/DNA Buffer Set wurden dahingehend modifiziert, dass zu Beginn des Extraktionsverfahrens statt 200 mg nur 100 mg Probenmaterial eingewogen wurde. Weiterhin wurde zusätzlich zur chemischen auch eine mechanische Zelllyse durchgeführt. Zur besseren Abtrennung der restlichen Schwebstoffe in der Probe wurde ein zusätzlicher Zentrifugationsschritt ( $\dot{a}$  19000 x g, 10 min) eingesetzt.

Vor den jeweiligen DNA/RNA-Elutionen fand eine Elution der Gesamtnukleinsäuren statt und zusätzliche Reinigungsschritte sowie rDNase-Behandlungen während der anschließenden Aufbereitung. Die detaillierte Beschreibung des angepassten Extraktionsverfahrens ist dem Anhang beigefügt (siehe detailliertes Arbeitsprotokoll mit Modifizierungen zur DNA/RNA Extraktion).

#### 4.5.2.2. Quantifizierung der DNA-Konzentration der Extrakte

Die DNA-Konzentration der jeweiligen Extrakte wurde mittels Fluoreszenz-Spektralphotometer (NanoDrop™ 3300, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) bestimmt.

Die zur Messung notwendige Arbeitslösung wurde, bestehend aus der Stammlösung des Fluoreszenzfarbstoffs Hoechst Dye 33258 (10 mg/ml; Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), mit TNE-Puffer (20 ml Tris 1 mol/l + 10 ml EDTA 0,2 mol/l + 70 ml NaCl 5 mol/l + RNase-freies Wasser auf 200 ml aufgefüllt, pH 7,4; alle Bestandteile: Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) auf eine Konzentration von 200 mg/ml verdünnt. Die DNA-Extrakte wurden dann zu gleichen Teilen mit der Arbeitslösung gemischt und mit je 2 µl auf den Messplatz des Fluoreszenz-Spektralphotometers aufgetragen. Je nach DNA-Konzentration wurde zuvor mit TNE-Puffer verdünnt. Über die durch Oberflächenspannung entstandene Flüssigkeitssäule wurde dann der DNA-Gehalt der Extrakte fluorometrisch bestimmt und anhand einer zuvor mittels Kalbsthymus-DNA (Type XV, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) erstellten Kalibrierreihe die genaue Konzentration berechnet.

#### 4.5.2.3. Quantifizierung der RNA-Konzentration der Extrakte

Die RNA-Konzentration wurde anhand einer Chip-basierten Mikrokapillar-Gelelektrophorese mithilfe des Agilent Bioanalyzers (Agilent Bioanalyzer 2100, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA), bestimmt. Die Durchführung der Messung erfolgte nach Herstellerangaben mit dem Testkit RNA 6000 Nano (Agilent RNA 6000 Nano Kit, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA). Pro Chip wurden zwölf RNA-Proben parallel hinsichtlich ihrer Quantität und Qualität (RIN) analysiert. Alle RNA-Proben (1 µl) wurden zuvor mit RNase-freiem Wasser (RNase-free H<sub>2</sub>O, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland) auf eine Konzentration von 5 - 500 ng/µl eingestellt. Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors wurde die RNA-Konzentration der Probe in ng/µl berechnet.

#### 4.5.2.4. Äquimolare Einstellung der DNA/RNA-Extrakte

Im Anschluss an die quantitative Bestimmung der DNA/RNA-Konzentrationen der Extrakte wurden diese für die weitere Analyse äquimolar eingestellt. Dazu wurden die DNA-Extrakte mit RNase-freiem Wasser auf 20 ng/µl und die RNA-Extrakte auf 100 ng/µl verdünnt.

#### 4.5.2.5. Prinzip und Durchführung der quantitativen Polymerase-Kettenreaktion

Die Quantifizierung der DNA anhand der qPCR erfolgte in Echtzeit über die Messung der Intensität des fluoreszierenden Farbstoffs SYBR® Green während eines PCR-Zyklus. Der sich in die doppelsträngigen DNA-Abschnitte einlagernde Farbstoff fluoresziert bei entsprechender Erwärmung proportional zur Menge der vorhandenen PCR-Produkte und wird als Konzentrationsschwellenwert (cT-Wert) angegeben. Gleichzeitig lassen sich definierte Nukleotidsequenzen qualitativ über die Auswahl der für die zu untersuchenden DNA-Abschnitte spezifischen Primer (Tab. 21) nachweisen. Als quantifizierender Standard wurde eine Kalibrierreihe aus PCR-Produkten (hergestellt im Institut für Tierernährung, Freie Universität Berlin) mit bekannter Kopienzahl/ng DNA verwendet. In Bezug auf diese definierten PCR-Produkte konnte dann die genaue Kopienzahl der Bakteriengruppen/g Probeneinwaage ermittelt werden. Zur Überprüfung der korrekten Amplifikation erfolgte eine Schmelzkurvenanalytik der PCR-Produkte. Vorbereitend zur Durchführung der qPCR wurde je 1 µl der äquimolar eingestellten DNA-Extrakte und je 24 µl Reaktionslösung (Tab. 22) in ein PCR-Gefäß pipettiert und anschließend über das AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA) analysiert.

#### 4.5.2.6. Prinzip und Durchführung der quantitativen Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion

Zur Quantifizierung der RNA mittels qRT-PCR wurde zusätzlich zur qPCR eine reverse Transkriptase (RNA-abhängige DNA-Polymerase) verwendet. Mithilfe der reversen Transkriptase, welche den Reaktionslösungen (Tab. 23) zugesetzt wurde, konnte die extrahierte RNA in einzelsträngige, komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Dem schon beschriebenen Prinzip der qPCR angelehnt, wurde die Analyse der RNA entsprechend durchgeführt. Die festgelegten Reaktionsbedingungen der qPCR-Analyse sind in Tabelle 24 zusammengefasst. Die abschließende Auswertung erfolgte anhand des Softwareprogramms MxPro QPCR Software (Agilent Technologies, Santa Clara, USA).

#### 4.5.2.7. Berechnung der Kopienzahl pro Gramm Probe

Zur Ermittlung der Kopienzahl pro Gramm Probeneinwaage wurde zuerst die Kopienzahl in den verdünnten Proben-Extrakten über die entsprechenden Kalibriereihen bestimmt. Anschließend wurde diese, unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors, mit dem Gesamt-DNA Gehalt der Probe multipliziert und durch die Probeneinwaage dividiert.

#### **4.6. Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mithilfe des Statistikprogramms IBM SPSS Statistics 21 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Dabei wurden alle Daten zunächst auf ihre Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Test überprüft. In Fällen mit normalverteilten Daten wurden diese als Mittelwert und dessen Standardfehler angegeben. Bei nicht-normalverteilten Daten wurde ausschließlich der Mittelwert dargestellt. Nach Überprüfung der Varianzhomogenität mittels Levene-Test, erfolgte bei vorliegender Normalverteilung eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA). Um entsprechende Gruppenunterschiede nachzuweisen, wurden die Daten mithilfe des Post-hoc-Tukey-Tests analysiert. Nicht-normalverteilte Daten wurden mittels Kruskal-Wallis-Test ausgewertet. Bei signifikanten Unterschieden wurden einzelne Gruppenunterschiede anhand des Mann-Whitney-U-Tests ermittelt. Dabei wurden Ergebnisse mit  $p \leq 0,05$  als signifikant und  $p \leq 0,10$  als Trend (tendenziell) festgelegt. Ungerichtete lineare Zusammenhänge zweier Variablen wurden anhand der nicht-parametrischen Rangkorrelationsanalyse nach Spearman berechnet.

## 5. Ergebnisse

### 5.1. Versuchsdiäten

#### 5.1.1. Nährstoffgehalte

Im Versuch wurden drei verschiedene Diäten mit unterschiedlich hohem Lignocellulosegehalt auf Basis einer entsprechend anteiligen Grundmischung eingesetzt. Die analysierten Werte der drei Versuchsdiäten sind in Tabelle 6 abgebildet.

**Tabelle 6:** Analysierte Nährstoffzusammensetzung der Versuchsdiäten

		LC 1	LC 2	LC 3
<b>Analysierte Nährstoffe</b>				
Trockensubstanz	[g/kg uS]	884	891	892
Rohasche	[g/kg uS]	66,9	65,4	64,4
Rohprotein	[g/kg uS]	227	228	220
Rohfett	[g/kg uS]	43,4	43,5	75,8
Rohfaser	[g/kg uS]	41,5	62,4	95,2
NDF <sup>1</sup>	[g/kg uS]	141	164	189
ADF <sup>2</sup>	[g/kg uS]	48,3	75,1	106
ADL <sup>3</sup>	[g/kg uS]	10,9	23,0	29,4
Kalzium	[g/kg uS]	10,0	9,95	9,00
Phosphor	[g/kg uS]	6,78	6,52	6,44
Kalium	[g/kg uS]	7,90	7,61	8,40
Natrium	[g/kg uS]	2,21	2,22	2,15
Magnesium	[g/kg uS]	2,65	2,59	2,62
TiO <sub>2</sub> <sup>4</sup>	[g/kg uS]	2,49	2,53	2,47
<b>Analysierte Spurenelemente</b>				
Eisen	[mg/kg uS]	356	385	399
Mangan	[mg/kg uS]	105	128	128
Kupfer	[mg/kg uS]	11,2	14,4	15,5
Zink	[mg/kg uS]	107	118	115
<b>Kalkulierte AME<sub>N</sub><sup>5</sup></b>				
AME <sub>N</sub>	[MJ/kg]	14,5	14,3	14,5

LC 1: 0,8 % Lignocellulose, LC 2: 5 % Lignocellulose, LC 3: 10 % Lignocellulose

<sup>1</sup> Neutral-Detergenzienfaser

<sup>2</sup> Säure-Detergenzienfaser

<sup>3</sup> Säure-Detergenzienlignin

<sup>4</sup> Titanium(IV)-oxid (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), Zugabe für die Verdaulichkeitsmessungen

<sup>5</sup> scheinbare umsetzbare Energie, Stickstoff (N) korrigiert, berechnet auf Grundlage der Gleichung von WSPA 1989

## 5.2. Zootechnische Parameter

Die zootechnischen Leistungen der drei Versuchsgruppen über die 5-wöchige Adaptationsphase während der Gruppenhaltung (beginnend ab der 5. LW) sowie der 23-tägigen Versuchsperiode sind in Tabelle 7 und 8 dargestellt. Für die Auswertung der Leistungsparameter während der Adaptationsphase wurden die erhobenen Mittelwerte aus einer Box als Versuchseinheit angesehen. Während der Versuchsphase wurden die Parameter der einzelnen Tiere getrennt erfasst.

### 5.2.1. Futteraufnahme und -aufwand

Alle 59 Versuchstiere begannen vom ersten Lebenstag an selbstständig mit der Futter- und Wasseraufnahme. Bei der mittleren Futteraufnahme zeigten sich in der 5-wöchigen Adaptationsphase keine Unterschiede zwischen den drei Versuchsgruppen ( $p = 0,834$ ). Auch die Berechnung des Futteraufwands ließ keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen ( $p = 0,347$ ) erkennen. Dieser Trend zeichnete sich auch in der eigentlichen Versuchsphase während der Einzeltierhaltung ab. In dieser Phase konnten weder bei der mittleren Futteraufnahme ( $p = 0,316$ ) noch beim Futteraufwand ( $p = 0,298$ ) signifikante Unterschiede festgestellt werden.

### 5.2.2. Lebendmasseentwicklung und -zunahme

Beginnend mit der Adaptationsphase zeigten die initialen Lebendmassen der Tiere keine signifikanten Unterschiede ( $p = 0,625$ ). Auch in den folgenden Wochen während der Gewöhnung an die verschiedenen Diäten, aber auch in der 23-tägigen Phase der Einzeltierhaltung, gab es keine erkennbaren Veränderungen bei der Lebendmasse ( $p = 0,428$ ) oder Lebendmassezunahme ( $p = 0,186$ ) zwischen den Versuchsgruppen.

### 5.2.3. Gesundheitsbeurteilung

Es wurden während des Fütterungsversuchs keine Erkrankungen oder Mortalitäten festgestellt.

Ergebnisse

**Tabelle 7:** Effekte der Fütterung unterschiedlicher Konzentrationen von Lignocellulose auf die zootechnischen Parameter von langsam wachsenden männlichen Hühnern in Gruppenhaltung während der 5-wöchigen Adaptationsphase (n = 20)<sup>1</sup>

			LC 1	LC 2	LC 3	SEM <sup>3</sup>	p-Wert <sup>4</sup>
<b>Zootechnische Parameter</b>							
Lebendmasse	LW <sup>2</sup> 5	[g]	389	372	391	7,55	0,625
Lebendmasse	LW 6	[g]	549	521	544	10,2	0,590
tägl. Lebendmassezunahme	LW 5 - 6	[g]	21,6	22,0	22,3	0,40	0,783
tägl. Futteraufnahme	LW 5 - 6	[g]	52,0	54,8	55,0	1,55	0,776
Futteraufwand	LW 5 - 6		2,50	2,52	2,51	0,06	0,990
Lebendmasse	LW 7	[g]	713	682	706	10,6	0,552
tägl. Lebendmassezunahme	LW 6 - 7	[g]	22,6	23,4	23,5	0,29	0,532
tägl. Futteraufnahme	LW 6 - 7	[g]	63,5	65,4	63,5	0,74	0,590
Futteraufwand	LW 6 - 7		2,81	2,83	2,72	0,03	0,507
Lebendmasse	LW 8	[g]	879	847	864	11,1	0,615
tägl. Lebendmassezunahme	LW 7 - 8	[g]	23,0	23,4	23,7	0,39	0,849
tägl. Futteraufnahme	LW 7 - 8	[g]	67,8	71,5	71,7	1,60	0,643
Futteraufwand	LW 7 - 8		3,05	3,10	3,06	0,06	0,950
Lebendmasse	LW 9	[g]	1043	1005	1033	11,5	0,461
tägl. Lebendmassezunahme	LW 8 - 9	[g]	24,7	22,1	22,8	2,04	0,599
tägl. Futteraufnahme	LW 8 - 9	[g]	71,0	76,9	78,0	2,03	0,408
Futteraufwand	LW 8 - 9		2,76	3,19	3,45	0,16	0,205
Lebendmasse	LW 10	[g]	1206	1172	1185	9,53	0,428
tägl. Lebendmassezunahme	LW 9 - 10	[g]	25,7	20,8	23,4	1,77	0,409
tägl. Futteraufnahme	LW 9 - 10	[g]	78,7	85,0	82,9	1,30	0,083
Futteraufwand	LW 9 - 10		3,29	3,63	3,80	0,18	0,485
Lebendmassezunahme Gesamt	LW 5 - 10	[g]	822	781	810	16,3	0,584
Futteraufnahme Gesamt	LW 5 - 10	[g]	2336	2475	2457	24,5	0,982
Futteraufwand Gesamt	LW 5 - 10		2,89	3,26	3,13	0,07	0,111

LC 1: 0,8 % Lignocellulose, LC 2: 5 % Lignocellulose, LC 3: 10 % Lignocellulose

<sup>1</sup> LC 3: n = 19

<sup>2</sup> LW = Lebenswoche

<sup>3</sup> Standardfehler des Mittelwerts

<sup>4</sup> Statistische Analysen basieren auf der einfaktoriellen Varianzanalyse



Ergebnisse

**Tabelle 8:** Effekte der Fütterung unterschiedlicher Konzentrationen von Lignocellulose auf die zootechnischen Parameter von langsam wachsenden männlichen Hühnern in Einzelhaltung während der 23-tägigen Versuchsphase (n = 20)<sup>1</sup>

			LC 1	LC 2	LC 3	SEM <sup>3</sup>	p-Wert <sup>4</sup>
<b>Zootechnische Parameter</b>							
Lebendmasse	VT <sup>2</sup> 1	[g]	1204	1172	1186	14,1	0,651
Lebendmasse	VT 7	[g]	1342	1310	1308	14,5	0,556
tägl. Lebendmassezunahme	VT 1 - 7	[g]	19,7	19,6	17,5	0,56	0,186
tägl. Futteraufnahme	VT 1 - 7	[g]	37,7	39,7	41,4	1,96	0,748
Futteraufwand	VT 1 - 7		1,89	2,10	2,47	0,12	0,142
Lebendmasse	VT 14	[g]	1483	1460	1450	16,7	0,722
tägl. Lebendmassezunahme	VT 7 - 14	[g]	20,0	21,6	20,3	0,84	0,581
tägl. Futteraufnahme	VT 7 - 14	[g]	35,0	39,3	33,1	1,75	0,341
Futteraufwand	VT 7 - 14		1,95	1,89	1,85	0,12	0,938
Lebendmasse	VT 23	[g]	1658	1639	1618	19,2	0,700
tägl. Lebendmassezunahme	VT 14 - 23	[g]	19,5	19,6	18,7	0,60	0,749
tägl. Futteraufnahme	VT 14 - 23	[g]	43,3	48,8	42,6	1,65	0,245
Futteraufwand	VT 14 - 23		2,27	2,55	2,31	0,08	0,325
Lebendmassezunahme Gesamt	VT 1 - 23	[g]	454	467	432	11,6	0,484
Futteraufnahme Gesamt	VT 1 - 23	[g]	899	992	905	28,1	0,316
Futteraufwand Gesamt	VT 1 - 23		1,98	2,15	2,10	0,05	0,298

LC 1: 0,8 % Lignocellulose, LC 2: 5 % Lignocellulose, LC 3: 10 % Lignocellulose

<sup>1</sup> LC 3: n = 19

<sup>2</sup> VT = Versuchstag

<sup>3</sup> Standardfehler des Mittelwerts

<sup>4</sup> Statistische Analysen basieren auf der einfaktoriellen Varianzanalyse

### 5.3. Verdauungsphysiologische Parameter

#### 5.3.1. Scheinbare Verdaulichkeit der Nährstoffe

Die Ergebnisse der Bestimmung der scheinbaren präzäkalen Verdaulichkeit des Rohproteins, der scheinbaren gesamten Verdaulichkeit des Rohfetts sowie die der scheinbaren gesamten Verdaulichkeit der organischen Masse sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

Die dargestellten Werte zeigen eine signifikante Abnahme ( $p = 0,003$ ) der scheinbaren präzäkalen Verdaulichkeit des Rohproteins bei den Tieren, welchen die Diäten LC 1 und LC 2 gefüttert wurden im Vergleich zu der Gruppe, die die Diät LC 3 erhielt. Zwischen den Versuchsgruppen mit einem Zusatz von 0,8 und 5 % Lignocellulose konnten keine Unterschiede ermittelt werden. Es wurden dabei keine Auswirkungen ( $p = 0,058$ ) auf die scheinbare gesamte Verdaulichkeit des Rohfetts dokumentiert. Signifikante Unterschiede ( $p < 0,001$ ) zwischen allen drei Versuchsdiäten ließen sich wiederum bei den Ergebnissen der scheinbaren gesamten Verdaulichkeit der organischen Masse feststellen. Diese nahm mit zunehmendem Gehalt von Lignocellulose in den Diäten ab.

#### 5.3.2. Trockensubstanz der Exkreme

Die analysierten TS-Gehalte der über die letzten 12 Tage des Versuchszeitraums gesammelten Proben sind ebenfalls in Tabelle 9 aufgeführt. Signifikante Unterschiede zwischen den drei Versuchsgruppen konnten nicht dargestellt werden.

**Tabelle 9:** Effekte der Fütterung unterschiedlicher Konzentrationen von Lignocellulose auf die scheinbaren Verdaulichkeiten von Rohprotein (präzäkal) und Rohfett (gesamt) sowie den Trockensubstanzgehalt der Exkreme bei langsam wachsenden männlichen Hühnern ( $n = 20$ )<sup>1</sup>

		LC 1	LC 2	LC 3	SEM <sup>3</sup>	$p$ -Wert <sup>4</sup>
<b>Verdaulichkeiten</b>						
scheinbare präzäkale Verdaulichkeit Rohprotein	[%]	82,3 <sup>a</sup>	81,7 <sup>a</sup>	78,5 <sup>b</sup>	0,50	0,003
scheinbare gesamte Verdaulichkeit Rohfett	[%]	94,9	93,8	95,6	0,19	0,058
scheinbare gesamte Verdaulichkeit oM <sup>2</sup>	[%]	70,0 <sup>a</sup>	66,0 <sup>b</sup>	63,4 <sup>c</sup>	0,55	< 0,001
<b>Trockensubstanzgehalt</b>						
Trockensubstanz der Exkreme	[g/kg]	302	307	305	3,73	0,849

LC 1: 0,8 % Lignocellulose, LC 2: 5 % Lignocellulose, LC 3: 10 % Lignocellulose

<sup>1</sup> LC 1:  $n = 20$ , LC 2:  $n = 20$ , LC 3:  $n = 19$

<sup>2</sup> oM = organische Masse

<sup>3</sup> Standardfehler des Mittelwerts

<sup>4</sup> Statistische Analysen basieren auf der einfaktoriellen Varianzanalyse mit Tukey Test

<sup>a,b</sup> Werte mit unterschiedlichen Indizes in einer Zeile unterscheiden sich signifikant ( $p \leq 0,05$ )

## 5.4. Mikrobiologische Parameter

### 5.4.1. Bakterielle Metaboliten in der Digesta

Die gemessenen Gehalte der bakteriellen Stoffwechselmetaboliten in der Digesta des Zäkums beschreiben deutliche Auswirkungen bei Gabe hoher Konzentrationen von Lignocellulose. Die detaillierten Ergebnisse der quantitativen Analysen sind in Tabelle 10 zusammengefasst. Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen lassen sich bei der Gesamtsumme der SCFAs ( $p < 0,001$ ), von Ammonium ( $p = 0,009$ ) und von L/D-Laktat ( $p = 0,001$ ,  $p = 0,037$ ) darstellen. Die Daten beschreiben eine deutliche Reduzierung der Konzentrationen bei LC 3 gegenüber den Versuchsgruppen LC 1 und LC 2.

**Tabelle 10:** Effekte der Fütterung unterschiedlicher Konzentrationen von Lignocellulose auf die Konzentrationen bakterieller Metaboliten in der Digesta des Zäkums bei langsam wachenden männlichen Hühnern ( $n = 20$ )<sup>1</sup>

		LC 1	LC 2	LC 3	$p$ -Wert <sup>3</sup>
<b>SCFAs</b>					
Essigsäure	[mmol/l]	38,1	39,1	33,9	0,220
Propionsäure	[mmol/l]	8,89 <sup>a</sup>	9,83 <sup>a</sup>	4,82 <sup>b</sup>	< 0,001
i-Buttersäure	[mmol/l]	0,41 <sup>a</sup>	0,39 <sup>a</sup>	0,25 <sup>b</sup>	0,001
n-Buttersäure	[mmol/l]	8,45 <sup>a</sup>	8,04 <sup>a</sup>	5,17 <sup>b</sup>	< 0,001
i-Valeriansäure	[mmol/l]	0,28 <sup>a</sup>	0,28 <sup>a</sup>	0,16 <sup>b</sup>	0,001
n-Valeriansäure	[mmol/l]	0,59	0,62	0,54	0,292
Gesamtfettsäuren	[mmol/l]	56,8 <sup>a</sup>	58,2 <sup>a</sup>	44,9 <sup>b</sup>	< 0,001
<b>Molarer Anteil der SCFAs</b>					
Essigsäure	[%]	66,8 <sup>a</sup>	67,1 <sup>a</sup>	75,5 <sup>b</sup>	< 0,001
Propionsäure	[%]	16,0 <sup>a</sup>	16,8 <sup>a</sup>	10,9 <sup>b</sup>	< 0,001
i-Buttersäure	[%]	0,76	0,69	0,59	0,451
n-Buttersäure	[%]	14,9 <sup>a</sup>	13,8 <sup>a</sup>	11,4 <sup>b</sup>	< 0,001
i-Valeriansäure	[%]	0,52	0,50	0,38	0,318
n-Valeriansäure	[%]	1,07	1,08	1,32	0,465
<b>Ammonium und Laktat</b>					
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	[mmol/l]	9,46 <sup>a</sup>	8,72 <sup>a</sup>	7,71 <sup>b</sup>	0,009
L-Laktat	[mmol/l]	1,70 <sup>a</sup>	1,34 <sup>a</sup>	0,67 <sup>b</sup>	0,001
D-Laktat <sup>2</sup>	[mmol/l]	1,03 <sup>a</sup>	1,06 <sup>a</sup>	0,42 <sup>b</sup>	0,037

LC 1: 0,8 % Lignocellulose, LC 2: 5 % Lignocellulose, LC 3: 10 % Lignocellulose

<sup>1</sup> LC 3:  $n = 19$

<sup>2</sup> LC 1:  $n = 15$ , LC 2:  $n = 16$ , LC 3:  $n = 15$

<sup>3</sup> Statistische Analysen basieren auf dem Kruskal-Wallis-Test

<sup>a,b</sup> Werte mit unterschiedlichen Indizes in einer Zeile unterscheiden sich signifikant ( $p \leq 0,05$ )

Der molare Anteil der Essigsäure war in der Gruppe mit 10 % supplementierter Lignocellulose gegenüber den Gruppen mit 0,8 und 5 % signifikant erhöht. Die Betrachtung der gemessenen Konzentrationen lässt einen Trend zur Abnahme der bakteriellen Metaboliten bei Zunahme der Lignocellulosekonzentration erkennen.

Die Rangkorrelationsanalyse nach Spearman beschreibt eine negative Korrelation zwischen den einzelnen SCFAs und den Konzentrationen der supplementierten Lignocellulose (Tab. 11). Die gemessenen Werte von Essig- und n-Valeriansäure in Bezug zur eingesetzten Menge von Lignocellulose waren dabei nicht signifikant ( $p > 0,05$ ).

**Tabelle 11:** Korrelation zwischen Lignocellulosekonzentration im Futter und dem Gehalt an bakteriellen Metaboliten in der Digesta des Zäkums bei langsam wachsenden männlichen Hühnern<sup>1</sup>

		Korrelationskoeffizient	p-Wert
<b>SCFAs</b>			
Essigsäure	[mmol/l]	- 0,204	0,122
Propionsäure	[mmol/l]	- 0,599	< 0,001
i-Buttersäure	[mmol/l]	- 0,435	0,001
n-Buttersäure	[mmol/l]	- 0,630	< 0,001
i-Valeriansäure	[mmol/l]	- 0,341	0,008
n-Valeriansäure	[mmol/l]	- 0,133	0,316
Gesamtfettsäuren	[mmol/l]	- 0,440	< 0,001
<b>Ammonium und Laktat</b>			
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	[mmol/l]	- 0,385	0,003
L-Laktat	[mmol/l]	- 0,488	< 0,001
D-Laktat	[mmol/l]	- 0,322	0,029

<sup>1</sup> Statistische Analysen basieren auf der nicht-parametrischen Spearman Korrelation

#### 5.4.2. Bestimmung ausgewählter Bakteriengruppen mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion

Für die Analyse der DNA-Extrakte aus den zäkalen Digestaprobe wurden die folgenden sieben Bakteriengruppen ausgewählt: *C. coccoides*-Cluster *XIVa*, Clostridien-Cluster I, *C. leptum*-Cluster *IV*, *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., der *Bacteroides-Prevotella-Porphyrromonas*-Cluster und der *Escherichia/Hafnia/Shigella*-Cluster. Mittels qPCR wurde die mittlere Kopienzahl der bakteriellen 16s ribosomalen DNA (rDNA) und somit die Zellzahlen der repräsentativen Bakterien ermittelt. Die Ergebnisse der qPCR sind in Tabelle 12 dargestellt.

Die Gruppe der Bifidobakterien sowie der *C. coccooides*-Cluster XIVa zeigen hierbei signifikante Unterschiede ( $p = 0,008$  und  $p = 0,001$ ) zwischen LC 1 und den Versuchsgruppen LC 2 und LC 3. Bei der Quantifizierung des *C. leptum*-Clusters IV und des *Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas*-Clusters lassen sich signifikante Veränderungen ( $p = 0,001$ ) zwischen den Versuchsgruppen mit einer Supplementierung von 0,8 und 5 % Lignocellulose zur Gruppe mit 10 % beschreiben. Die Analyse des *Escherichia/Hafnia/Shigella*-Clusters zeigt zwischen allen drei Versuchsgruppen Verschiebungen ( $p = 0,023$ ). So unterscheiden sich die Ergebnisse von LC 1 und LC 3 zueinander, während beide Gruppen keine Differenzierung zu LC 2 erkennen lassen. Dem steigenden Gehalt von Lignocellulose folgend reduzieren sich die gemessenen Kopienzahlen um mehr als 0,5 Log<sub>10</sub>-Stufen pro Versuchsgruppe.

**Tabelle 12:** Effekte der Fütterung unterschiedlicher Konzentrationen von Lignocellulose auf die Kopienzahl [log<sub>10</sub> Kopienzahl/g uS] der bakteriellen 16s rDNA in der Digesta des Zäkums bei langsam wachenden männlichen Hühnern (n = 10)

	LC 1	LC 2	LC 3	p-Wert <sup>1</sup>
<b>Bakteriengruppen</b>				
<i>C. coccooides</i> -Cluster XIVa	9,86 <sup>a</sup>	10,1 <sup>b</sup>	10,1 <sup>b</sup>	0,001
Clostridien-Cluster I	9,28	9,03	9,15	0,756
<i>C. leptum</i> -Cluster IV	9,96 <sup>a</sup>	10,1 <sup>a</sup>	9,79 <sup>b</sup>	0,006
<i>Lactobacillus</i> spp.	7,11	7,35	7,17	0,585
<i>Bifidobacterium</i> spp.	9,39 <sup>a</sup>	9,65 <sup>b</sup>	9,69 <sup>b</sup>	0,008
BPP <sup>2</sup> -Cluster	9,94 <sup>a</sup>	10,0 <sup>a</sup>	9,68 <sup>b</sup>	0,009
<i>Escherichia/Hafnia/Shigella</i> -Cluster	7,42 <sup>a</sup>	6,85 <sup>ab</sup>	6,24 <sup>b</sup>	0,023

LC 1: 0,8 % Lignocellulose, LC 2: 5 % Lignocellulose, LC 3: 10 % Lignocellulose

<sup>1</sup> Statistische Analysen basieren auf dem Kruskal-Wallis-Test

<sup>2</sup> *Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas*-Cluster

<sup>a,b</sup> Werte mit unterschiedlichen Indizes in einer Zeile unterscheiden sich signifikant ( $p \leq 0,05$ )

#### 5.4.3. Bestimmung ausgewählter Bakteriengruppen mittels quantitativer Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion

Für die direkte Bestimmung der metabolischen Aktivität der ausgewählten Bakteriengruppen wurde die mittlere Kopienzahl der bakteriellen 16s ribosomalen RNA (rRNA) durch qRT-PCR erfasst. Für die Untersuchung der bakteriellen Stoffwechselaktivität wurden dieselben Bakteriengruppen wie bei der qPCR ausgewählt: *C. coccooides*-Cluster XIVa, Clostridien-Cluster I, *C. leptum*-Cluster IV, *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas*-Cluster und der *Escherichia/Hafnia/Shigella*-Cluster.

Die Ergebnisse der qRT-PCR sind in Tabelle 13 aufgelistet. Den *C. coccooides*-Cluster XIVa betreffend zeigt die Versuchsgruppe, deren Diät mit 0,8 % Lignocellulose versehen wurde, einen signifikanten Unterschied ( $p = 0,059$ ) zu den Gruppen mit 5 und 10 % zugesetzter Lignocellulose. Signifikante Unterschiede ( $p = 0,026$ ) zwischen allen drei Versuchsgruppen konnten beim *C. leptum*-Cluster IV ermittelt werden. Mit zunehmendem Gehalt von diätetischer Lignocellulose verringerte sich die gemessene Kopienzahl.

**Tabelle 13:** Effekte der Fütterung unterschiedlicher Konzentrationen von Lignocellulose auf die Kopienzahl [ $\log_{10}$  Kopienzahl/g uS] der bakteriellen 16s rRNA in der Digesta des Zäkums bei langsam wachsenden männlichen Hühnern ( $n = 10$ )

	LC 1	LC 2	LC 3	$p$ -Wert <sup>1</sup>
<b>Bakteriengruppen</b>				
<i>C. coccooides</i> -Cluster XIVa	13,5 <sup>a</sup>	13,7 <sup>b</sup>	13,8 <sup>b</sup>	0,059
Clostridien-Cluster I	9,82	9,92	10,3	0,098
<i>C. leptum</i> -Cluster IV	12,8 <sup>a</sup>	12,7 <sup>ab</sup>	12,5 <sup>b</sup>	0,026
<i>Lactobacillus</i> spp.	8,91	8,91	8,83	0,826
<i>Bifidobacterium</i> spp.	10,7	10,7	10,7	0,869
BPP <sup>2</sup> -Cluster	12,4	12,5	12,5	0,199
<i>Escherichia/Hafnia/Shigella</i> -Cluster	7,98	7,55	7,12	0,110

LC 1: 0,8 % Lignocellulose, LC 2: 5 % Lignocellulose, LC 3: 10 % Lignocellulose

<sup>1</sup> Statistische Analysen basieren auf dem Kruskal-Wallis-Test

<sup>2</sup> *Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas*-Cluster

<sup>a,b</sup> Werte mit unterschiedlichen Indizes in einer Zeile unterscheiden sich signifikant ( $p \leq 0,05$ )

#### 5.4.4. Vergleich der Ergebnisse von qRT-PCR und qPCR

Der Vergleich der ermittelten Werte von rRNA und rDNA miteinander beschreibt die Auswirkungen der mit Lignocellulose supplementierten Diäten auf das Verhältnis von Stoffwechselaktivität zu Zellzahl der ausgewählten Bakteriengruppen. Die kalkulierten Ergebnisse der entsprechenden Versuchsgruppen wurden in Tabelle 14 zusammengefasst. Mithilfe des Kruskal-Wallis-Tests konnten deutliche Unterschiede bei *Bifidobacterium* spp. ( $p = 0,028$ ) zwischen LC 1 gegenüber LC 2 und LC 3 dargestellt werden. Beim *Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas*-Cluster ( $p = 0,047$ ) zeigen sich wiederum deutliche Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen LC 1 und LC 2 zu LC 3.

**Tabelle 14:** Effekte der Fütterung unterschiedlicher Konzentrationen von Lignocellulose auf das Verhältnis zwischen der Kopienzahl [log<sub>10</sub> Kopienzahl/g uS] der bakteriellen 16s rRNA und der 16s rDNA in der Digesta des Zäkums bei langsam wachsenden männlichen Hühnern (n = 10)

	LC 1	LC 2	LC 3	p-Wert <sup>1</sup>
<b>Bakteriengruppen</b>				
<i>C. coccooides</i> -Cluster XIVA	3,66	3,67	3,68	0,917
Clostridien-Cluster I	0,54	0,89	1,14	0,303
<i>C. leptum</i> -Cluster IV	2,84	2,63	2,74	0,384
<i>Lactobacillus</i> spp.	1,76	1,56	1,66	0,243
<i>Bifidobacterium</i> spp.	1,31 <sup>a</sup>	1,06 <sup>b</sup>	1,05 <sup>b</sup>	0,028
BPP <sup>2</sup> -Cluster	2,44 <sup>a</sup>	2,46 <sup>a</sup>	2,87 <sup>b</sup>	0,047
<i>Escherichia/Hafnia/Shigella</i> -Cluster	0,56	0,57	0,62	0,840

LC 1: 0,8 % Lignocellulose, LC 2: 5 % Lignocellulose, LC 3: 10 % Lignocellulose

<sup>1</sup> Statistische Analysen basieren auf dem Kruskal-Wallis-Test

<sup>2</sup> *Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas*-Cluster

<sup>a,b</sup> Werte mit unterschiedlichen Indizes in einer Zeile unterscheiden sich signifikant ( $p \leq 0,05$ )

## 6. Diskussion

### 6.1. Fütterungsversuch mit Lignocellulose

#### 6.1.1. Diskussion der Versuchsbedingungen und des Studiendesigns

Der Fütterungsversuch fand in einem Geflügelstall mit 60 baugleichen Boxen statt. Aufgrund einer Fehlsexung standen jedoch abschließend 59 männliche Versuchstiere zur Verfügung. Anhand der separaten Schlupfdaten und der Anzahl der Versuchsgruppen (Tab. 3), wurde die Studie in zwei um 7 Tage versetzte Durchgänge aufgeteilt. Durch die parallele Nutzung der Stalleinheiten konnten zeitliche und örtliche Unterschiede minimiert werden. Saisonal bedingte Umweltschwankungen wurden durch ein einheitliches Lichtregime und automatisiertes Temperaturprogramm weitgehend ausgeglichen. Die 5-wöchige Adaptationsphase an die Diäten während der Gruppenhaltung und die eigentliche Versuchsphase sollten eine optimale Anpassung der Tiere an die Diäten ermöglichen. Insbesondere die intestinalen Mikroorganismen hatten so die Gelegenheit, Fermentationsprozesse und Stoffwechsel auf die erhöhten Gehalte von Lignocellulose einzustellen. Gesundheitliche Störungen konnten weder in der Gruppen- noch während der Einzeltierhaltung beobachtet werden.

In den Studien von Boguslawska-Tryk et al. (2015), Yokhana et al. (2016), Kheravii et al. (2017) und Röhe et al. (2019a, b) wurden die Versuchsdiäten mit einer einheitlichen Grundration konzipiert und die geplanten Mengen von Lignocellulose zusätzlich im Sinne einer Verdünnung eingesetzt. Um dem daraus resultierenden Effekt einer unterschiedlichen Nährstoffaufnahme vorzubeugen, wurde für diesen Fütterungsversuch die Lignocellulose in die Rationsformulierung einbezogen. Anhand vorliegender Literaturempfehlungen (Gesellschaft für Ernährungsphysiologie, 1999; Jeroch et al., 2019) konnten somit weitgehend isoenergetische sowie isonitrogene Diäten erstellt werden. Dies wurde durch die Anpassung der Weizen-, Sojaextraktionsschrot-, Körnermais- und Sojaölkonzentrationen erzielt. Mögliche Unterschiede der Zielp Parameter zwischen den Versuchsgruppen können demnach den unterschiedlich hohen Konzentrationen von Lignocellulose zugeordnet werden. Der gleichzeitig verringerte Gehalt an potenziell fermentierbaren Kohlenhydratquellen durch die Angleichung der Weizenkonzentrationen wurde dabei jedoch nicht berücksichtigt und muss bezüglich der mikrobiologischen Parameter durchaus kritisch betrachtet werden.



Um die Vergleichbarkeit der Versuchsdäten zu gewährleisten, wurden sowohl für die Adaptationsphase während der Gruppenhaltung als auch für die geteilten Leistungsdurchgänge die Mischungen der Grundkomponenten ausschließlich von einer kommerziellen Futtermühle (Lindenberger Mühle GmbH, Ahrensfelde, Deutschland) durchgeführt. Das verwendete Lignocelluloseprodukt wurde der Basaldiät in den entsprechenden Konzentrationen am Institut für Tierernährung der Freien Universität Berlin beigemischt.

#### 6.1.2. Diskussion der zootechnischen Parameter

Die leistungsbezogenen Parameter der Studie zeigten durch den Einsatz höherer Konzentrationen von diätetischer Lignocellulose keine relevanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Weder in der Gruppen- noch während der Einzeltierhaltung konnte bei den Tieren eine Verschiebung der Lebendmassezunahme oder des Futteraufwands zwischen den Gruppen mit 0,8, 5 und 10 % supplementierter Lignocellulose beobachtet werden.

Ein Vergleich der vorliegenden Ergebnisse mit den Leistungsdaten der in der Literatur beschriebenen Fütterungsexperimente ließ bei geringeren Lignocellulosekonzentrationen im Futter einige Gemeinsamkeiten erkennen. Diese Studien konnten ebenfalls keine nachteiligen oder vorteilhaften Veränderungen der Leistung durch geringe Mengen diätetischer Lignocellulose nachweisen (Boguslawska-Tryk et al., 2015; Yokhana et al., 2016; Kheravii et al., 2017). Eine aktuelle Studie über den Einsatz von Lignocellulose bei Broilern bildet hier jedoch eine Ausnahme (Makivic et al., 2019). Die Autoren beschrieben in ihrer Studie einen moderaten Anstieg der Lebendmasse, der wöchentlichen Lebendmassezunahme und der Futteraufnahme bei einem Zusatz von 0,6 % Lignocellulose im Futter. Gleichzeitig konnte dabei auch ein geringerer Futteraufwand der Tiere ermittelt werden. Eine weitere Studie mit hohen Konzentrationen supplementierter Lignocellulose beschreibt jedoch gegenüber den bis *dato* berichteten Effekten relativ deutliche Auswirkungen auf die Leistung von Legehennen einer Zweinutzungsrasse. So war sowohl in der Wachstums- als auch in der Legeperiode die Lebendmasse von Hennen, welche ein Futter mit 10 % Lignocellulose erhielten, geringer als bei Hennen einer Kontrollgruppe. Zudem konnte in diesem Versuch, insbesondere während der Legephase, eine höhere Futteraufnahme in der Gruppe mit zugesetzter Lignocellulose festgestellt werden (Röhe et al., 2019a).

Ein direkter Einfluss von Lignocellulose auf die Leistung der Tiere, scheint jedoch generell fraglich. Die zootechnischen Effekte beziehen sich dabei auf die, entsprechend der Menge von supplementierter Lignocellulose, verringerten Nährstoffgehalte der jeweiligen Versuchsdäten. Für eine vollständige Bewertung der eingesetzten Lignocellulose müsste die umsetzbare Energie exakt erfasst und die Diäten bei gleichbleibendem Proteingehalt energetisch ausgeglichen werden.

Die veränderten wie auch unveränderten Leistungsparameter der erwähnten Studien sind somit nicht explizit auf die unterschiedlichen Konzentrationen von Lignocellulose im Futter zurückzuführen.

### 6.1.3. Diskussion der verdauungsphysiologischen Parameter

Bei einer hohen Konzentration von Lignocellulose im Futter zeigte sich eine deutliche Abnahme der scheinbaren präzäkalen Verdaulichkeit des Rohproteins. Die Ergebnisse der scheinbaren gesamten Verdaulichkeit des Rohfetts ließen keine Veränderungen erkennen. Dagegen nahm die scheinbare gesamte Verdaulichkeit der organischen Masse in allen drei Versuchsgruppen mit steigendem Gehalt von Lignocellulose im Futter ab. Zudem konnten anhand der analysierten Trockensubstanzgehalte keine Auswirkungen auf den Feuchtigkeitsgehalt der Exkreme beobachtet werden.

Die Ergebnisse früherer Studien mit geringeren Konzentrationen supplementierter Lignocellulose dokumentierten zum Teil widersprüchliche Aussagen zu den analysierten Nährstoffverdaulichkeiten. Bei Gabe einer Diät mit 0,8 % Lignocellulose, bei ebenfalls gleichbleibendem Protein- und Energiegehalt, verbesserte sich die wahre Proteinverdaulichkeit gegenüber einer eingesetzten Kontrolldiät um 6 % (Farran et al., 2017). Bei Einsatz von 1 bzw. 2 % Lignocellulose konnten dabei weder positive noch negative Einflüsse auf die scheinbare präzäkale Proteinverdaulichkeit festgestellt werden (Kheravii et al., 2017). Die scheinbare gesamte Verdaulichkeit des Rohfetts, zeigte bei Konzentrationen von 0,25, 0,5 und 1 % ergänzter Lignocellulose keine signifikanten Veränderungen (Boguslawska-Tryk et al., 2016). Bezüglich der Fettverdaulichkeit bestätigen diese Werte die Ergebnisse der vorliegenden Studie. Allerdings zeigen sich abermals gegensätzliche Daten bei den analysierten Verdaulichkeiten von Protein. Ein Vergleich von TS-Gehalten in den Exkrementen liefert hier zusätzlich widersprüchliche Ergebnisse. So konnte bei Hühnern, welche mit 0,4, 0,6, 1 und 2 % Lignocellulose gefüttert wurden, eine verringerte Feuchtigkeit in den Exkrementen gegenüber den Kontrolltieren ermittelt werden (Farran et al., 2013; Kheravii et al., 2017; Makivic et al., 2019). Daten von Legehennen, die 10 % Lignocellulose im Futter erhielten, konnten diese Ergebnisse dabei nur bedingt bestätigen. Während des Fütterungsversuchs wurden in der 10., 17. und 22. Versuchswoche zunächst höhere TS-Werte bestimmt. Abschließende Analysen in der 52. Woche zeigten jedoch vergleichbare TS-Gehalte in den Exkrementen zwischen den Fütterungsgruppen. Dies würde wiederum die Daten der vorliegenden Studie mit ebenfalls 10 % Lignocellulose in der Futtermischung stützen (Röhe et al., 2019b).

Wesentliche Auswirkungen für das Tier ließen sich in der eigenen Studie aufgrund der konstanten Leistungsparameter zwischen den Gruppen, sowohl in der Adaptations- als auch in der eigentlichen Versuchsphase, nicht nachweisen. Auch eine erhöhte Digesta-Retentionszeit und eine dadurch erhöhte Wasserspeicherkapazität, wie bei diätetischem Einsatz geringerer Mengen von Lignocellulose beschrieben wurde, konnten hier anhand der unveränderten TS-Gehalte in den Exkrementen zwischen den Versuchsgruppen nicht bestätigt werden. Ein möglicher positiver Effekt auf die Einstreuqualität bei hohen Konzentrationen von bis zu 10 % Lignocellulose, lässt sich somit ausschließen. Die veränderten scheinbaren Verdaulichkeiten dieser Studie erklären sich durch verschiedene Effekte von Faserstoffen (Smits und Annison, 1996). So könnte sich bei vergleichsweise hoher Konzentration von Lignocellulose der physische Kontakt zwischen den Verdauungsenzymen und den Nährstoffen reduzieren. Zusätzlich wäre auch eine verminderte bakterielle Fermentation von Proteinen im Ileum denkbar. Allerdings kann dies, ohne entsprechende Analysen des im Dünndarm vorherrschenden Mikrobioms und dessen Stoffwechselprodukte, nur vermutet werden. Die gesunkenen Werte der scheinbaren gesamten Verdaulichkeit der organischen Masse verdeutlichen dabei eine generell abnehmende Verdaulichkeit der Versuchsdieten, in Relation zur Menge der Zulage von Lignocellulose.

#### 6.1.4. Diskussion der mikrobiologischen Parameter

Die Wirkung verschiedener Gehalte diätetischer Lignocellulose auf die Zusammensetzung und Stoffwechsellistung der intestinalen Mikrobiota wurde anhand bakterieller Metabolitenkonzentrationen und der Quantifizierung ausgewählter Bakteriengruppen in der Digesta des Zäkums untersucht. Die gemessenen Metaboliten dienen hierbei als Indikatoren für die Fermentation und den Stoffwechsel der Bakterien. Der direkte Nachweis von Quantität und metabolischer Aktivität der Mikrobiota erfolgte über die Analyse der bakteriellen Nukleinsäuren mittels qPCR und qRT-PCR. Die für diese Studie ausgewählten Bakterien-Cluster entsprechen dabei einem im aviären Zäkum repräsentativem Mikrobiom. Die unterschiedlichen Ansätze der mikrobiologischen Untersuchungen wurden gewählt, um ergänzende Informationen durch Nutzung der DNA-basierten taxonomischen Daten und der RNA-basierten Stoffwechselaktivität zu erhalten.

##### 6.1.4.1. Auswirkungen der Versuchsdieten auf die bakteriellen Metaboliten

Die zunehmende Menge von Lignocellulose im Versuchsfutter führte bei den langsam wachsenden männlichen Hühnern zu einer deutlichen Abnahme der Metaboliten im Zäkum. SCFAs, Ammonium und Laktat zeigten dabei in der Versuchsgruppe mit 10 % Lignocellulose die stärksten Konzentrationsveränderungen. Besonders deutlich lässt sich dies bei den gemessenen Werten von Laktat, Propion-, i-Butter- und i-Valeriansäure erkennen.

Gegenüber den Gruppen mit 0,8 und 5 % Lignocellulose verringerten sich deren Konzentrationen in der Gruppe mit 10 % nahezu um die Hälfte. Die gemessenen Werte von Laktat standen dabei mit den Konzentrationen der Propionsäure im Zusammenhang. Wenn Bakterien im Zäkum aus Laktat Propionsäure bilden, sind abnehmende Konzentrationen von Laktat in der Digesta zu erwarten. Betrachtet man die molaren Anteile der SCFAs innerhalb der jeweiligen Versuchsgruppen, zeigten sich auch hier ausschließlich Veränderungen in der Gruppe mit 10 % Lignocellulose. Gegenüber den relativ konstanten Werten von i-Butter- und i-/n-Valeriansäure verschoben sich die Werte der Propion- und n-Buttersäure zugunsten von Essigsäure.

Für einen umfassenden Vergleich der gemessenen Daten mit publizierten Werten aus der Literatur ist die aktuelle Datenlage wenig ergiebig. In einer von lediglich zwei Studien zeigte sich, dass bei einer Steigerung von 0,5 auf 1 % Lignocellulose die Laktat- und die Gesamtkonzentration der SCFAs in der analysierten Digesta sanken. Bei Essig- und Propionsäure ließen sich in den Versuchsgruppen ähnliche Konzentrationsverschiebungen nachweisen. Da die ausschließlich numerischen Veränderungen jedoch weit weniger deutlich ausfielen, dürften sie indes keine biologische Relevanz für das Tier besitzen (Boguslawska-Tryk et al., 2015). Bei einer Konzentration von 10 % Lignocellulose im Futter bestätigten sich dabei die Ergebnisse der vorliegenden Studie. Hier konnten gegenüber einer Kontrollgruppe deutlich niedrigere Werte in der Gesamtkonzentration der SCFAs, bei Essig-, Propion- und n-Valeriansäure sowie Ammonium dargestellt werden (Röhe et al., 2019b).

Die Veränderungen der Metabolitenkonzentrationen der vorliegenden Studie lassen somit eine Wirkung durch die Supplementierung von Lignocellulose auf das Fermentationsprofil der Mikrobiota im Zäkum erkennen. Dabei beschreiben die analysierten Werte von Ammonium, i-Butter- und i-Valeriansäure einen möglichen Effekt auf die mikrobielle Fermentation von Protein. Als Endprodukte des bakteriellen Abbaus verzweigt-kettiger Aminosäuren stellen die Isoformen der kurzkettigen Fettsäuren Indikatoren der zäkalen Proteinfermentation dar (Rasmussen et al., 1988; Mortensen und Clausen, 1996). Der Einfluss hoher Konzentrationen von Lignocellulose im Futter führte somit möglicherweise zu einer Reduktion der zäkalen Proteinfermentation. Die verringerte scheinbare präzäkale Verdaulichkeit von Rohprotein und die dadurch tendenziell gesteigerte Menge an fermentierbarem Substrat aus dem Ileum scheint sich demzufolge nicht in einer gesteigerten postilealen Proteinfermentation zu reflektieren. Die dokumentierten Effekte lassen sich allerdings nicht nur dem durch hohe Konzentrationen von Lignocellulose zu erwartenden Verdünnungseffekt zuordnen. Daher muss dabei der Einfluss eines reduzierten Gehalts an fermentierbaren Kohlenhydraten durch den Austausch mit Lignocellulose in den Versuchsdiäten berücksichtigt werden.

So wurde durch den Einsatz von 10 % Lignocellulose im Hinblick auf den isonitrogenen und isoenergetischen Ausgleich in den Versuchsdiäten der Weizenanteil von 40,7 auf 23,0 % gesenkt. Entsprechend der somit eingeschränkten Verfügbarkeit von Energie- und Substratquellen für die intestinale Mikrobiota ist ein zusätzlicher Einfluss des verringerten Weizenanteils auf die Metabolitenkonzentrationen in der Digesta wahrscheinlich.

#### 6.1.4.2. Auswirkungen der Versuchsdiäten auf die bakterielle Zusammensetzung und metabolischen Aktivität der zäkalen Mikrobiota

Die quantitative Bestimmung der ausgewählten Cluster zeigte sichtbare Veränderungen der bakteriellen Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota durch den Einsatz von Lignocellulose. Über die Zahl der gemessenen rDNA-Kopien ließen sich Unterschiede zwischen den drei Versuchsgruppen bei verschiedenen bakteriellen *Genera* darstellen. Ein entscheidender Einfluss auf das zäkale Mikrobiom ist anhand der festgestellten geringen Zahlen jedoch unwahrscheinlich. Hier ist allerdings auf die Limitierung der eingesetzten Methode hinzuweisen. Es ist möglich, dass bei Anwendung differenzierterer Verfahren größere Unterschiede zutage treten würden. Nur der Cluster von *Escherichia/Hafnia/Shigella* zeigte neben dem statistischen auch einen deutlichen und möglicherweise biologisch relevanten Unterschied bei Gabe höherer Mengen von Lignocellulose an. Mit steigendem Gehalt im Futter verringerten sich hier die analysierten Zellzahlen. Bei der Bestimmung der metabolischen Aktivität konnten trotz erkennbarer Unterschiede bei einzelnen bakteriellen Clustern keine deutlichen weitergehenden Veränderungen erfasst werden. Anhand der sinkenden Zahlen der rRNA-Kopien des *Escherichia/Hafnia/Shigella*-Clusters lässt sich allerdings ein gerichteter Trend ( $\sim 0,5 \log_{10}$ -Stufen) in Richtung einer reduzierten Stoffwechselaktivität bei steigender Lignocellulosekonzentration beschreiben. Ein Vergleich der rRNA- und rDNA-Kopien zeigte ebenfalls Unterschiede bei den kalkulierten Quotienten verschiedener Cluster. Die ermittelten Verhältnisse von metabolischer Aktivität zu bakterieller Zellzahl beschreiben jedoch nur geringe Verschiebungen zwischen den drei Versuchsgruppen. Eine Veränderung der biologischen Aktivität pro Zelle durch den Einfluss der experimentellen Diäten ist somit nicht anzunehmen.

Bei geringeren Zulagen an Lignocellulose in einer Größenordnung von 0,25 bis 1 % wurden sowohl erhöhte wie auch reduzierte Werte unterschiedlicher *Genera* im Zäkum beschrieben (Boguslawska-Tryk et al., 2015). Die mikrobiellen Verschiebungen waren allerdings gering und eine gerichtete Zu- bzw. Abnahme der bakteriellen Konzentrationen war nicht zu erkennen. Die Keimzahlen von *E. coli* und *Clostridium* spp. verringerten sich dabei signifikant bei 0,25 und 0,5 % Lignocellulose im Futter. Die eingesetzten Gehalte von Lignocellulose zeigten jedoch keine Auswirkungen auf die ermittelte Gesamtkeimzahl der Bakterien.

Ähnliche Ergebnisse wurden auch bei einer Supplementation von 1 und 2 % Lignocellulose bei einzelnen ausgewählten Bakterien-Clustern dokumentiert (Kheravii et al., 2017). Die Quantifizierung der untersuchten Bakterien ließ keinen konzentrationsabhängigen Einfluss der Lignocellulose darstellen. Die analysierten Keimzahlen von *Clostridium* spp. erhöhten sich hier signifikant bei 1 % und reduzierten sich ebenso deutlich bei 2 % supplementierter Lignocellulose. Im Gegensatz dazu wurden bei einem weiteren Fütterungsversuch mit 0,4 und 0,6 % Lignocellulose bei allen ausgewählten Bakteriengruppen deutliche Unterschiede dokumentiert (Makivic et al., 2019). Die ermittelten Daten lassen dabei zunehmende Keimzahlen an *Lactobacillus* spp. und *Bifidobacterium* spp. erkennen, wenn Hühner Lignocellulose im Futter erhielten. Reduktionen zeigten sich bei den Keimzahlen von *E. coli* und *Clostridium perfringens*. Die gerichtete Abnahme der Zellzahlen dieser beiden Bakterienarten bei Gabe von Futtermischungen mit erhöhten Mengen von Lignocellulose untermauert die Erkenntnisse der vorangegangenen Versuche. Eine wesentlich höhere Zulage von 10 % Lignocellulose zum Futter zeigte bei Legehennen, sowohl die Anzahl als auch Aktivität der intestinalen Bakterien betreffend, keine Veränderungen zwischen den Tieren der Versuchs- und der Kontrollgruppe (Röhe et al., 2019b).

Einen maßgeblichen Einfluss auf die intestinale Mikrobiota lässt sich so anhand der analysierten Daten sowie der Erkenntnisse aus publizierten Untersuchungen auf den *Escherichia/Hafnia/Shigella*-Cluster nachweisen. Ob dadurch gesundheitliche Wirkungen entstehen können, ist jedoch unklar. Immerhin handelt es sich um eine potenziell pathogene Bakteriengruppe, die allerdings anhand der in der eigenen Studie verwendeten Untersuchung nicht hinreichend genau differenziert werden konnte. Der beobachtete Effekt kann sich nicht durch die in der Literatur häufig angeführte antimikrobielle Wirkung von SCFAs erklären (van der Wielen et al., 2000; Mroz et al., 2006; Rehman et al., 2007; Tan et al., 2014). Die Ergebnisse der mittels qRT-PCR direkt erfassten metabolischen Aktivität zeigten nur bei *Escherichia/Hafnia/Shigella* einen abwärts gerichteten Trend und keinen generell reduzierten bakteriellen Stoffwechsel. Ein selektiver Einfluss der diätetischen Lignocellulose auf die Bakterienzahl scheint so denkbar.

## 6.2. Schlussfolgerung und Ausblick

Der Einsatz hoher Konzentrationen diätetischer Lignocellulose in der Fütterung langsam wachsender männlicher Hühner hatte keinen direkten Einfluss auf die zootecnischen Leistungen und bewirkte nur geringe Veränderungen der Nährstoffverdaulichkeiten und der intestinalen Mikrobiota. Bezüglich der bakteriellen Zusammensetzung des intestinalen Mikrobioms ließ sich mit zunehmendem Gehalt von Lignocellulose ein wachstumshemmender Effekt bei potenziell pathogenen Bakterien im Zäkum nachweisen. Die ausschließlich im Zäkum erhobenen Daten liefern jedoch lediglich einen Hinweis und erlauben ohne zusätzliche mikrobiologische Analysen der Mikrobiota im Kropf bzw. Dünndarm keine verallgemeinernde Aussage. Für die Entwicklung ausgereifter Ernährungsstrategien mit faserreichen Futterkomponenten ist eine detailliertere Kenntnis der Wirkung, vor allem auf die intestinale Mikrobiota, erforderlich. Neben den quantitativen Untersuchungen der dominanten *Genera* dürfte dabei eine weiterführende Analyse mittels 16s DNA-Sequenzierung zusätzliche Veränderungen des bakteriellen Mikrobioms aufzeigen können.

## 7. Zusammenfassung

Metzger, Florian:

### **Einfluss von Lignocellulose auf die zootecnische Leistung sowie verdauungsphysiologische und mikrobiologische Parameter bei langsam wachsenden männlichen Hühnern einer Kreuzungspopulation aus White Leghorn und New Hampshire**

Der Einsatz diätetischer Lignocellulose bei Geflügel wurde bisher nur in wenigen Studien und mit uneinheitlichen Auswirkungen auf die Tierleistung, die Nährstoffverdaulichkeiten und die Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota beschrieben. Ziel dieser Studie war es, den Einfluss einer höheren Dosierung von diätetischer Lignocellulose in isoenergetisch und isonitrogen gestalteten Diäten auf zootecnische, verdauungsphysiologische und mikrobiologische Parameter zu untersuchen. Dafür wurden 59 männliche Hühner einer langsam wachenden Kreuzungspopulation (WL77 – White Leghorn und NHI – New Hampshire) in drei Versuchsgruppen aufgeteilt und über einen Zeitraum von acht Wochen mit einem Futter mit 0,8, 5 und 10 % supplementierter Lignocellulose (ARBOCEL® RC Fine) gefüttert. Der Fütterungsversuch unterteilte sich dabei in eine 5-wöchige Adaptations- und eine 23-tägige Versuchsphase. Futter und Wasser standen durchgehend *ad libitum* zur Verfügung.

Zootecnische Parameter wurden wöchentlich erhoben und die Digestaprobe aus Ileum und Zäkum in der 13. LW entnommen. Zusätzlich wurden über die letzten 12 Tage des Versuchszeitraums täglich Exkremente gesammelt. Die daraus ermittelten Daten umfassten die Bestimmung der scheinbaren präzäkalen Verdaulichkeit des Rohproteins, der scheinbaren gesamten Verdaulichkeit des Rohfetts und der organischen Masse, die TS-Gehalte der Exkremente und die Analysen der bakteriellen Metaboliten sowie die Zusammensetzung und metabolische Aktivität ausgewählter Bakterien-Cluster. Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mittels einfaktorieller Varianzanalyse oder dem Kruskal-Wallis-Test.

Ein Einfluss der eingesetzten Diäten auf die Leistung der Tiere konnte nicht festgestellt werden. So zeigten sich weder bei der Lebendmasse, der Lebendmassezunahme, dem Futterverbrauch noch beim Futteraufwand Veränderungen zwischen den Versuchsgruppen. Die scheinbare präzäkale Verdaulichkeit des Rohproteins reduzierte sich deutlich bei 10 % supplementierter Lignocellulose gegenüber der Versuchsgruppe mit 0,8 und 5 %. Die Werte der scheinbaren Gesamtverdaulichkeit des Rohfetts zeigten keine Veränderungen bei steigendem Gehalt von Lignocellulose in der Ration.



Deutliche Unterschiede zwischen allen drei Versuchsgruppen wurden jedoch bei der scheinbaren gesamten Verdaulichkeit der organischen Masse dokumentiert. Diese sank bei höheren Zulagen von Lignocellulose im Futter. Es konnten keine Gruppenunterschiede zwischen den TS-Gehalten der Exkremate festgestellt werden. Ein Vergleich der bakteriellen Stoffwechselmetaboliten in der Digesta des Zäkums zeigte eine Abnahme der ermittelten Konzentrationen bei steigendem Gehalt von diätetischer Lignocellulose. Die deutlichsten Konzentrationsveränderungen ließen sich dabei in der Versuchsgruppe mit 10 % Lignocellulose beobachten. Signifikante Auswirkungen auf die Zusammensetzung und metabolische Aktivität der bakteriellen Mikrobiota konnten bei der Quantifizierung des *Escherichia/Hafnia/Shigella*-Clusters ermittelt werden. Mit zunehmender Konzentration von Lignocellulose sanken die gemessenen Zellzahlen in der Zäkumdigesta. Die ebenfalls gesunkenen Werte der ermittelten rRNA-Kopien beschrieben einen gerichteten Trend und deuteten dabei zusätzlich auf eine verringerte Stoffwechselaktivität hin.

Schlussfolgernd zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Studie, dass höhere Konzentrationen von Lignocellulose die scheinbare präzäkale Verdaulichkeit von Protein, die mikrobiellen Stoffwechselmetaboliten in der Digesta und die Zusammensetzung und Aktivität des bakteriellen Mikrobioms beeinflussen können. Lignocellulose könnte zudem einen Einfluss auf potenzielle Krankheitserreger im Darm haben, welcher in weiteren Studien untersucht werden sollte.

## 8. Summary

Metzger, Florian:

### **Influence of lignocellulose on zootechnical performance as well as digestive and microbiological parameters in slowly growing male chickens from a cross-breeding population of White Leghorn and New Hampshire**

The use of dietary lignocellulose in poultry has been described in only few studies and with inconsistent effects on animal performance, nutrient digestibility and the composition of the intestinal microbiota. The aim of this study was to investigate the influence of higher dosages of dietary lignocellulose in isoenergetically and isonitrogenically designed diets on zootechnical, digestive and microbiological parameters. For this purpose, 59 male chickens of a slow-growing poultry cross-breeding population (WL77 - White Leghorn and NHI - New Hampshire) were divided into three experimental groups and were fed a diet containing 0.8, 5 and 10 % lignocellulose (ARBOCEL® RC Fine) over a period of eight weeks. The feeding trial was divided into a 5-week adaptation phase and a 23-day trial phase. Feed and water were continuously available *ad libitum*.

Zootechnical parameters were recorded weekly and digesta samples from ileum and caecum were taken in the 13th week. Additionally, excrements were collected daily over the last 12 days of the experimental period. The resulting data included not only the determination of the apparent precaecal digestibility of crude protein and the apparent total digestibility of crude fat and organic matter, but also analyses of bacterial metabolites and the composition and metabolic activity of selected bacterial clusters. Statistical evaluation of the results was performed by means of single factor analysis of variance or the Kruskal-Wallis test.

An influence of the diets used on the performance of the animals could not be determined. Neither the live mass, live mass gain, feed consumption nor feed expenditure showed changes between the experimental groups. The apparent precaecal digestibility of the crude protein was significantly decreased with 10 % supplemented lignocellulose compared to the experimental group with 0.8 and 5 %. The values of the apparent total digestibility of crude fat showed no changes with increasing contents of lignocellulose in the ration. Significant differences between all three experimental groups were documented in the apparent total digestibility of the organic mass. This parameter decreased with increasing supplements of lignocellulose in the diet. There were no group differences between dry matter contents of the excrements observed. A comparison of the bacterial metabolites in the caecal digesta showed a decrease of the analysed concentrations with increasing content of dietary lignocellulose.

The most significant changes in concentration were observed in the experimental group with 10 % lignocellulose. Significant effects on the composition and metabolic activity of the bacterial microbiota were detected in the quantification of the *Escherichia/Hafnia/Shigella* cluster. With increasing concentration of lignocellulose the measured cell numbers in the caecal digesta decreased. The also decreased values of the determined rRNA copies described a directed trend and additionally indicated a reduced metabolic activity.

In conclusion, the results of the present study show that higher concentrations of lignocellulose can influence the apparent precaecal digestibility of protein, the microbial metabolites in the digesta and the composition and activity of the bacterial microbiome. In addition, lignocellulose could have an impact on potential pathogens in the intestine, which should be investigated in further studies.

## 9. Literaturverzeichnis

- Apajalahti, J., Kettunen, A., Graham, H., 2004. Characteristics of the gastrointestinal microbial communities, with special reference to the chicken. *Worlds Poultry Science Journal* **60** (2), 223-232.
- Apajalahti, J., Vienola, K., 2016. Interaction between chicken intestinal microbiota and protein digestion. *Animal Feed Science and Technology* **221** (Part B), 323-330.
- Bach Knudsen, K.E., 1997. Carbohydrate and lignin contents of plant materials used in animal feeding. *Animal Feed Science and Technology* **67** (4), 319-338.
- Bach Knudsen, K.E., 2001. The nutritional significance of "dietary fibre" analysis. *Animal Feed Science and Technology* **90** (1-2), 3-20.
- Bach Knudsen, K.E., 2014. Fiber and nonstarch polysaccharide content and variation in common crops used in broiler diets. *Poultry Science* **93** (9), 2380-2393.
- Bach Knudsen, K.E., Laerke, H.N., Ingerslev, A.K., Hedemann, M.S., Nielsen, T.S., Theil, P.K., 2016. Carbohydrates in pig nutrition - recent advances. *Journal of Animal Science* **94** (Suppl 3), 1-11.
- Barnes, E.M., 1979. Intestinal microflora of poultry and game birds during life and after storage. *Journal of Applied Bacteriology* **46** (3), 407-419.
- Baurhoo, B., Letellier, A., Zhao, X., Ruiz-Feria, C.A., 2007a. Cecal populations of lactobacilli and bifidobacteria and escherichia coli populations after in vivo escherichia coli challenge in birds fed diets with purified lignin or mannanoligosaccharides. *Poultry Science* **86** (12), 2509-2516.
- Baurhoo, B., Phillip, L., Ruiz-Feria, C.A., 2007b. Effects of purified lignin and mannan oligosaccharides on intestinal integrity and microbial populations in the ceca and litter of broiler chickens. *Poultry Science* **86** (6), 1070-1078.
- Baurhoo, B., Ruiz-Feria, C.A., Zhao, X., 2008. Purified lignin: Nutritional and health impacts on farm animals - a review. *Animal Feed Science and Technology* **144** (3-4), 175-184.

- Beckmann, L., Simon, O., Vahjen, W., 2006. Isolation and identification of mixed linked beta-glucan degrading bacteria in the intestine of broiler chickens and partial characterization of respective 1,3-1,4-beta-glucanase activities. *Journal of Basic Microbiology* **46** (3), 175-185.
- Bell, B., 1997. Feed and forage analysis. Ontario Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs. <http://www.omafra.gov.on.ca/english/livestock/sheep/facts/foragean.htm> (eingesehen am 20.02.2020).
- Blaser, M.J., Kirschner, D., 2007. The equilibria that allow bacterial persistence in human hosts. *Nature* **449** (7164), 843-849.
- Boguslawska-Tryk, M., Piotrowska, A., Szymeczko, R., Burlikowska, K., 2016. Effect of dietary lignocellulose on ileal and total tract digestibility of fat and fatty acids in broiler chickens. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* **100** (6), 1050-1057.
- Boguslawska-Tryk, M., Szymeczko, R., Piotrowska, A., Burlikowska, K., Slizewska, K., 2015. Ileal and cecal microbial population and short-chain fatty acid profile in broiler chickens fed diets supplemented with lignocellulose. *Pakistan Veterinary Journal* **35** (2), 212-216.
- Breznak, J.A., Brune, A., 1994. Role of microorganisms in the digestion of lignocellulose by termites. *Annual Review of Entomology* **39**, 453-487.
- Cantarel, B.L., Coutinho, P.M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V., Henrissat, B., 2009. The carbohydrate-active enzymes database (cazy): An expert resource for glycogenomics. *Nucleic Acids Research* **37** (Suppl 1), 233-238.
- Cao, B.H., Zhang, X.P., Guo, Y.M., Karasawa, Y., Kumao, T., 2003. Effects of dietary cellulose levels on growth, nitrogen utilization, retention time of diets in digestive tract and caecal microflora of chickens. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* **16** (6), 863-866.
- Choct, M., Hughes, R.J., Wang, J., Bedford, M.R., Morgan, A.J., Annison, G., 1996. Increased small intestinal fermentation is partly responsible for the anti-nutritive activity of non-starch polysaccharides in chickens. *British Poultry Science* **37** (3), 609-621.
- Clench, M.H., Mathias, J.R., 1995. The avian cecum - a review. *Wilson Bulletin* **107** (1), 93-121.
- Codex-Alimentarius-Commission, 2009. Report of the 30th session of the codex committee on nutrition and foods for special dietary uses, In: *Joint FAO/WHO Food Standards*.

- Collins, M.D., Lawson, P.A., Willems, A., Cordoba, J.J., Fernandez-Garayzabal, J., Garcia, P., Cai, J., Hippe, H., Farrow, J.A.E., 1994. The phylogeny of the genus clostridium: Proposal of five new genera and eleven new species combinations. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **44** (4), 812-826.
- Corpet, D.E., 2000. Mechanism of antimicrobial growth promoters used in animal feed. *Revue de Médecine Vétérinaire* **151** (4), 99-104.
- Cummings, J.H., Macfarlane, G.T., 1997a. Role of intestinal bacteria in nutrient metabolism. *Clinical Nutrition* **16** (1), 3-11.
- Cummings, J.H., Roberfroid, M.B., Andersson, H., Barth, C., FerroLuzzi, A., Ghos, Y., Gibney, M., Hermansen, K., James, W.P.T., Korver, O., Lairon, D., Pascal, G., Voragen, A.G.S., 1997b. A new look at dietary carbohydrate: Chemistry, physiology and health. *European Journal of Clinical Nutrition* **51** (7), 417-423.
- Cummings, J.H., Stephen, A.M., 2007. Carbohydrate terminology and classification. *European Journal of Clinical Nutrition* **61** (Suppl 1), 5-18.
- Dai, F.J., Chau, C.F., 2017. Classification and regulatory perspectives of dietary fiber. *Journal of Food and Drug Analysis* **25** (1), 37-42.
- Danzeisen, J.L., Kim, H.B., Isaacson, R.E., Tu, Z.J., Johnson, T.J., 2011. Modulations of the chicken cecal microbiome and metagenome in response to anticoccidial and growth promoter treatment. *PLoS One* **6** (11), 1-14.
- de Vries, S., Pustjens, A.M., Schols, H.A., Hendriks, W.H., Gerrits, W.J.J., 2012. Improving digestive utilization of fiber-rich feedstuffs in pigs and poultry by processing and enzyme technologies: A review. *Animal Feed Science and Technology* **178** (3-4), 123-138.
- den Besten, G., van Eunen, K., Groen, A.K., Venema, K., Reijngoud, D.J., Bakker, B.M., 2013. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *Journal of Lipid Research* **54** (9), 2325-2340.
- DeVries, J.W., Prosky, L., Li, B., Cho, S., 1999. A historical perspective on defining dietary fiber. *Cereal Foods World* **44** (5), 367-369.

- Donohoe, D.R., Garge, N., Zhang, X.X., Sun, W., O'Connell, T.M., Bunger, M.K., Bultman, S.J., 2011. The microbiome and butyrate regulate energy metabolism and autophagy in the mammalian colon. *Cell Metabolism* **13** (5), 517-526.
- Edye, L.A., Doherty, W.O.S., 2015. Fractionation of a lignocellulosic material, Patent No. US 8,999,067 B2, *Google Patents*.
- Engberg, R.M., Hedemann, M.S., Jensen, B.B., 2002. The influence of grinding and pelleting of feed on the microbial composition and activity in the digestive tract of broiler chickens. *British Poultry Science* **43** (4), 569-579.
- Englyst, H., 1989. Classification and measurement of plant polysaccharides. *Animal Feed Science and Technology* **23** (1-3), 27-42.
- Englyst, K.N., Englyst, H.N., 2005. Carbohydrate bioavailability. *British Journal of Nutrition* **94** (1), 1-11.
- Englyst, K.N., Liu, S., Englyst, H.N., 2007. Nutritional characterization and measurement of dietary carbohydrates. *European Journal of Clinical Nutrition* **61** (Suppl 1), 19-39.
- Fan, L.T., Lee, J.H., Gharpuray, M.M., 1982. The nature of lignocellulosics and their pretreatments for enzymatic hydrolysis. *Adv. Biochem. Eng.* **23**, 158-187.
- Farran, M.T., Akilian, H.A., Hamoud, A.M., Barbour, G.W., Saoud, I.P., 2017. Lignocellulose improves protein and amino acid digestibility in roosters and egg hatchability in broiler breeders. *Journal of Poultry Science* **54** (3), 197-204.
- Farran, M.T., Pietsch, M., Chabrilat, T., 2013. Effect of lignocellulose on the litter quality and the ready to cook carcass yield of male broilers. Actes des 10èmes Journées de la Recherche Avicole et Palmipèdes à Foie Gras du 26 au 28 mars, 2013, La Rochelle, France, 917-921.
- Fatma, S., Hameed, A., Noman, M., Ahmed, T., Shahid, M., Tariq, M., Sohail, I., Tabassum, R., 2018. Lignocellulosic biomass: A sustainable bioenergy source for the future. *Protein and Peptide Letters* **25** (2), 148-163.
- Fengel, D., 1971. Ideas on the ultrastructural organization of the cell wall components. *Journal of Polymer Science* **36** (1), 383-392.

- Flint, H.J., 2006. The significance of prokaryote diversity in the human gastrointestinal tract, In: *Prokaryotic diversity: Mechanisms and significance* / Hrsg.: N. A. Logan, H. M. Lappin-Scott, P. C. F Oyston. Cambridge University Press, 65-90, Cambridge, UK, ISBN-13: 9780521869355
- Flint, H.J., Bayer, E.A., 2008. Plant cell wall breakdown by anaerobic microorganisms from the mammalian digestive tract, In: *Incredible anaerobes: From physiology to genomics to fuels* **1125** (1). Wiley-Blackwell, 280-288, Hoboken, USA, ISBN: 9781573317054.
- Flint, H.J., Scott, K.P., Duncan, S.H., Louis, P., Forano, E., 2012a. Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut. *Gut microbes* **3** (4), 289-306.
- Flint, H.J., Scott, K.P., Louis, P., Duncan, S.H., 2012b. The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* **9** (10), 577-589.
- Frei, M., 2013. Lignin: Characterization of a multifaceted crop component. *Scientific World Journal*, 1-25. Article Number: 436517.
- Gesellschaft für Ernährungsphysiologie, 1999. Empfehlungen zur Energie- und Nährstoffversorgung der Legehennen und Masthühner (Broiler). DLG Verlag, Frankfurt (Main), Germany, ISBN- 13: 978-3769005776.
- Goering, H.K., Van Soest, P.J., 1970. Forage fiber analyses (apparatus, reagents, procedures, and some applications). *Agriculture Handbook* **379**, 1-20.
- Gong, J.H., Forster, R.J., Yu, H., Chambers, J.R., Wheatcroft, R., Sabour, P.M., Chen, S., 2002. Molecular analysis of bacterial populations in the ileum of broiler chickens and comparison with bacteria in the cecum. *FEMS Microbiology Ecology* **41** (3), 171-179.
- Gong, J.H., Si, W.D., Forster, R.J., Huang, R.L., Yu, H., Yin, Y.L., Yang, C.B., Han, Y.M., 2007. 16s rRNA gene-based analysis of mucosa-associated bacterial community and phylogeny in the chicken gastrointestinal tracts: From crops to ceca. *FEMS Microbiology Ecology* **59** (1), 147-157.
- Goraga, Z., Nassar, M., Schramm, G.P., Brockmann, G.A., 2010. Phenotypic characterization of chicken inbred lines that differ extremely in growth, body composition and egg production traits. *Archiv Fur Tierzucht-Archives of Animal Breeding* **53** (3), 337-349.
- Heilig, H.G.H.J., Zoetendal, E.G., Vaughan, E.E., Marteau, P., Akkermans, A.D.L., de Vos, W.M., 2002. Molecular diversity of lactobacillus spp. and other lactic acid bacteria in



- the human intestine as determined by specific amplification of 16s ribosomal DNA. *Applied and Environmental Microbiology* **68** (1), 114-123.
- Hetland, H., Choct, M., Svihus, B., 2004. Role of insoluble non-starch polysaccharides in poultry nutrition. *World's Poultry Science Journal* **60** (4), 415-422.
- Hübener, K., Vahjen, W., Simon, O., 2002. Bacterial responses to different dietary cereal types and xylanase supplementation in the intestine of broiler chicken. *Archives of Animal Nutrition* **56** (3), 167-187.
- Hughes, R., Magee, E.A., Bingham, S., 2000. Protein degradation in the large intestine: Relevance to colorectal cancer. *Current Issues in Intestinal Microbiology* **1** (2), 51-58.
- Isshiki, Y., 1980. Nitrogenous components of cecal contents in fasted chickens. *Japanese Journal of Zootechnical Science* **51** (1), 12-16.
- J. Rettenmaier & Söhne GmbH + Co KG, 2019. Arbocel® Rohfaserkonzentrate. [https://www.jrs.de/jrs\\_de/life-science/tierernaehrung/anwendungen/arbocel-fuer-gefluegel/](https://www.jrs.de/jrs_de/life-science/tierernaehrung/anwendungen/arbocel-fuer-gefluegel/) (eingesehen am 20.02.2020).
- Jamroz, D., Jakobsen, K., Knudsen, K.E.B., Wiliczkeiwicz, A., Orda, J., 2002. Digestibility and energy value of non-starch polysaccharides in young chickens, ducks and geese, fed diets containing high amounts of barley. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology* **131** (3), 657-668.
- Jamroz, D., Jakobsen, K., Orda, J., Skorupinska, J., Wiliczkieicz, A., 2001. Development of the gastrointestinal tract and digestibility of dietary fibre and amino acids in young chickens, ducks and geese fed diets with high amounts of barley. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology* **130** (4), 643-652.
- Jamroz, D., Orda, J., Wiliczkieicz, A., Skorupinska, J., 1996a. The apparent digestibility of structural carbohydrates and the intestine fermentation of different kinds of grains in three poultry species 4. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift* **83** (7), 210-218.
- Jamroz, D., Wiliczkieicz, A., Skorupinska, J., Orda, J., 1998. Fermentation and apparent digestion of the structural carbohydrates in chicks, ducks and geese fed triticale mixtures supplemented with enzyme. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* **79** (1), 1-17.

- Jamroz, D., Wiliczekiewicz, A., Skorupinska, J., Orda, J., Volker, L., 1996b. The effect of increased roxazyme g supplement in the broiler fed with triticales rich mixtures. *Archiv Fur Geflugelkunde* **60** (4), 165-173.
- Jeffries, T.W., 1990. Biodegradation of lignin-carbohydrate complexes. *Biodegradation* **1** (2-3), 163-176.
- Jeroch, H., Simon, A., Zentek, J., 2019. Geflügelernährung, 2 Ed., Ulmer Verlag, Stuttgart, Germany, ISBN: 9783818605551.
- Joint FAO/WHO Expert Consultation, 1998. Carbohydrates in human nutrition, In: *FAO Food and Nutrition Paper* **66**. FAO/WHO, Rome.
- Jones, J.M., 2014. Codex-aligned dietary fiber definitions help to bridge the 'fiber gap'. *Nutrition Journal* **13**, 1-10. Article Number: 34.
- Jorgensen, H., Kristensen, J.B., Felby, C., 2007. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: Challenges and opportunities. *Biofuels Bioproducts & Biorefining* **1** (2), 119-134.
- Jorgensen, H., Zhao, X.Q., Knudsen, K.E.B., Eggum, B.O., 1996. The influence of dietary fibre source and level on the development of the gastrointestinal tract, digestibility and energy metabolism in broiler chickens. *British Journal of Nutrition* **75** (3), 379-395.
- Jozefiak, D., Rutkowski, A., Fraczak, M., Boros, D., 2004a. The effect of dietary fibre fractions from different cereals and microbial enzyme supplementation on performance, ileal viscosity and short-chain fatty acid concentrations in the caeca of broiler chickens. *Journal of Animal and Feed Sciences* **13** (3), 487-496.
- Jozefiak, D., Rutkowski, A., Martin, S.A., 2004b. Carbohydrate fermentation in the avian ceca: A review. *Animal Feed Science and Technology* **113** (1-4), 1-15.
- Kheravii, S.K., Swick, R.A., Choct, M., Wu, S.B., 2017. Coarse particle inclusion and lignocellulose-rich fiber addition in feed benefit performance and health of broiler chickens. *Poultry Science* **96** (9), 3272-3281.
- Kirchgessner, M., Eder, K., Müller, H.L., Jamroz, D., 1999. Zur energetischen Bewertung von Nichtstärke-Polysacchariden beim Geflügel. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* **81** (1), 51-55.

- Kirk, T.K., Farrell, R.L., 1987. Enzymatic combustion - the microbial-degradation of lignin. *Annual Review of Microbiology* **41**, 465-505.
- Kumar, V., Sinha, A.K., Makkar, H.P.S., de Boeck, G., Becker, K., 2012. Dietary roles of non-starch polysachharides in human nutrition: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **52** (10), 899-935.
- Langhout, D.J. 1998. The role of the intestinal flora as affected by non-starch polysaccharides in broiler chicks. Dissertation, Agricultural University Wageningen, Department of Animal Nutrition and Physiology, ISBN: 9789054859123173.
- Larbier, M., Leclercq, B., Wiseman, J., 1994. Nutrition and feeding of poultry. Nottingham University Press, Nottingham, UK, ISBN: 9781897676523.
- Li, X., Clarke, K., Li, K., Chen, A., 2012. The pattern of cell wall deterioration in lignocellulose fibers throughout enzymatic cellulose hydrolysis. *Biotechnology Progress* **28** (6), 1389-1399.
- Ljungdahl, L.G., Eriksson, K.E., 1985. Ecology of microbial cellulose degradation. *Advances in Microbial Ecology* **8**, 237-299.
- Makivic, L., Glisic, M., Boskovic, M., Djordjevic, J., Markovic, R., Baltic, M., Sefer, D., 2019. Performances, heal and cecal microbial populations and histological characteristics in broilers fed diets supplemented with lignocellulose. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi* **25** (1), 83-91.
- Malherbe, S., Cloete, T.E., 2002. Lignocellulose biodegradation: Fundamentals and applications. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* **1** (2), 105–114.
- Malinen, E., Kassinen, A., Rinttila, T., Palva, A., 2003. Comparison of real-time pcr with SYBR Green I or 5'-nuclease assays and dot-blot hybridization with rDNA-targeted oligonucleotide probes in quantification of selected faecal bacteria. *Microbiology-Sgm* **149** (Part 1), 269-277.
- Marx-Figini, M., 1982. The control of molecular weight and molecular-weight distribution in the biogenesis of cellulose, In: *Cellulose and other natural polymer systems : Biogenesis, structure, and degradation* / Hrsg.: R. Malcolm Brown Jr., 8 Ed. Plenum Press New York, 243-271, New York, USA, ISBN: 9781468411164.

- Matsuki, T., Watanabe, K., Fujimoto, J., Miyamoto, Y., Takada, T., Matsumoto, K., Oyaizu, H., Tanaka, R., 2002. Development of 16s rRNA-gene-targeted group-specific primers for the detection and identification of predominant bacteria in human feces. *Applied and Environmental Microbiology* **68** (11), 5445-5451.
- McCleary, B.V., 2003. Dietary fibre analysis. *Proceedings of the Nutrition Society* **62** (1), 3-9.
- McCleary, B.V., Sloane, N., Draga, A., Lazewska, I., 2013. Measurement of total dietary fiber using aoac method 2009.01 (aacc international approved method 32-45.01): Evaluation and updates. *Cereal Chemistry* **90** (4), 396-414.
- McNeil, N.I., 1984. The contribution of the large-intestine to energy supplies in man. *American Journal of Clinical Nutrition* **39** (2), 338-342.
- Mead, G.C., 1989. Microbes of the avian cecum: Types present and substrates utilized. *Journal of Experimental Zoology. Supplement* **3**, 48-54.
- Mertens, D.R., Allen, M., Carmany, J., Clegg, J., Davidowicz, A., Drouches, M., Frank, K., Gambin, D., Garkie, M., Gildemeister, B., Jeffress, D., Jeon, C.S., Jones, D., Kaplan, D., Kim, G.N., Kobata, S., Main, D., Moua, X., Paul, B., Robertson, J., Taysom, D., Thiex, N., Williams, J., Wolf, M., 2002. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beakers or crucibles: Collaborative study. *Journal of AOAC International* **85** (6), 1217-1240.
- Möller, J., 2009. Gravimetric determination of acid detergent fiber and lignin in feed: Interlaboratory study. *Journal of AOAC International* **92** (1), 74-90.
- Morais, S., Morag, E., Barak, Y., Goldman, D., Hadar, Y., Lamed, R., Shoham, Y., Wilson, D.B., Bayer, E.A., 2012. Deconstruction of lignocellulose into soluble sugars by native and designer cellulosomes. *MBio* **3** (6), 1-11.
- Mortensen, P.B., Clausen, M.R., 1996. Short-chain fatty acids in the human colon: Relation to gastrointestinal health and disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* **31** (Suppl 216), 132-148.
- Mroz, Z., Koopmans, S.J., Bannink, A., Partanen, K., Krasucki, W., Øverland, Radcliffe, S., 2006. Carboxylic acids as bioregulators and gut growth promoters in nonruminants, In: *Biology of nutrition in growing animals 4* / Hrsg.: R. Mosenthin, J. Zentek, T. Żebrowska. Elsevier, 81-134, London, UK, ISBN: 9780444512321.

- Naumann, C., Bassler, R., 1976. Methodenbuch III, 8. Ergänzungslieferung 2012 Ed. VDLUFA Verlag, Darmstadt, Germany, ISBN: 9783941273047.
- Oakley, B.B., Lillehoj, H.S., Kogut, M.H., Kim, W.K., Maurer, J.J., Pedroso, A., Lee, M.D., Collett, S.R., Johnson, T.J., Cox, N.A., 2014. The chicken gastrointestinal microbiome. *FEMS Microbiology Letters* **360** (2), 100-112.
- Okumura, J., Hewitt, D., Salter, D.N., Coates, M.E., 1976. The role of the gut microflora in the utilization of dietary urea by the chick. *British Journal of Nutrition* **36** (2), 265-272.
- Olsson, L., Hahn-Hägerdal, B., 1996. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. *Enzyme and Microbial Technology* **18** (5), 312-331.
- Pan, D., Yu, Z., 2014. Intestinal microbiome of poultry and its interaction with host and diet. *Gut Microbes* **5** (1), 108-119.
- Perez, J., Munoz-Dorado, J., de la Rubia, T., Martinez, J., 2002. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: An overview. *International Microbiology* **5**, 53-63.
- Pettersen, R.C., 1984. The chemical-composition of wood. *Advances in Chemistry Series (207)*, 57-126.
- Pourabedin, M., Zhao, X., 2015. Prebiotics and gut microbiota in chickens. *FEMS Microbiology Letters* **362** (15), 1-8.
- Qu, A., Brulc, J.M., Wilson, M.K., Law, B.F., Theoret, J.R., Joens, L.A., Konkel, M.E., Angly, F., Dinsdale, E.A., Edwards, R.A., Nelson, K.E., White, B.A., 2008. Comparative metagenomics reveals host specific metaviromes and horizontal gene transfer elements in the chicken cecum microbiome. *PLoS One* **3** (8), 1-19.
- Rasmussen, H.S., Holtug, K., Mortensen, P.B., 1988. Degradation of amino-acids to short-chain fatty-acids in humans - an invitro study. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* **23** (2), 178-182.
- Rehman, H., Bohm, J., Zentek, J., 2008. Effects of differentially fermentable carbohydrates on the microbial fermentation profile of the gastrointestinal tract of broilers. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* **92** (4), 471-480.

- Rehman, H.U., Vahjen, W., Awad, W.A., Zentek, J., 2007. Indigenous bacteria and bacterial metabolic products in the gastrointestinal tract of broiler chickens. *Archives of Animal Nutrition* **61** (5), 319-335.
- Rerat, A., Fiszlewicz, M., Giusi, A., Vaugelade, P., 1987. Influence of meal frequency on postprandial variations in the production and absorption of volatile fatty-acids in the digestive-tract of conscious pigs. *Journal of Animal Science* **64** (2), 448-456.
- Rinttila, T., Kassinen, A., Malinen, E., Krogius, L., Palva, A., 2004. Development of an extensive set of 16s rdna-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time pcr. *Journal of Applied Microbiology* **97** (6), 1166-1177.
- Roediger, W.E.W., 1980. Role of anaerobic bacteria in the metabolic welfare of the colonic mucosa in man. *Gut* **21** (9), 793-798.
- Röhe, I., Urban, J., Dijkslag, A., te Paske, J., Zentek, J., 2019a. Impact of an energy- and nutrient-reduced diet containing 10% lignocellulose on animal performance, body composition and egg quality of dual purpose laying hens. *Archives of Animal Nutrition* **73** (1), 1-17.
- Röhe, I., Vahjen, W., Metzger, F., Zentek, J., 2019b. Effect of a “diluted” diet containing 10% lignocellulose on the gastrointestinal tract, intestinal microbiota, and excreta characteristics of dual purpose laying hens. *Poultry Science* **99** (1), 1-10.
- Saha, B.C., 2003. Hemicellulose bioconversion. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **30** (5), 279-291.
- Scheller, H.V., Ulvskov, P., 2010. Hemicelluloses. In: *Annual review of plant biology* **61**, 263-289.
- Schulze, E., 1891. Zur Kenntniss der chemischen Zusammensetzung der pflanzlichen Zellmembranen. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **24** (2), 2277-2287.
- Sergeant, M.J., Constantinidou, C., Cogan, T.A., Bedford, M.R., Penn, C.W., Pallen, M.J., 2014. Extensive microbial and functional diversity within the chicken cecal microbiome. *PLoS One* **9** (3), 1-13.

- Shakouri, M.D., Kermanshahi, H., Mohsenzadeh, M., 2006. Effect of different non starch polysaccharides in semi purified diets on performance and intestinal microflora of young broiler chickens. *International Journal of Poultry Science* **5** (6), 557-561.
- Sluiter, J.B., Ruiz, R.O., Scarlata, C.J., Sluiter, A.D., Templeton, D.W., 2010. Compositional analysis of lignocellulosic feedstocks. 1. Review and description of methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **58** (16), 9043-9053.
- Smits, C.H.M., Annison, G., 1996. Non-starch plant polysaccharides in broiler nutrition - towards a physiologically valid approach to their determination. *Worlds Poultry Science Journal* **52** (2), 203-221.
- Smulikowska, S., 2006. Manipulation of the poultry ecosystem through biotechnonology, In: *Biology of nutrition in growing animals 4* / Hrsg.: R. Mosenthin, J. Zentek, T. Żebrowska. Elsevier, 597-609, London, UK, ISBN 9780444512321.
- Song, Y.L., Liu, C.X., Finegold, S.A., 2004. Real-time pcr quantitation of clostridia in feces of autistic children. *Applied and Environmental Microbiology* **70** (11), 6459-6465.
- Stanley, D., Denman, S.E., Hughes, R.J., Geier, M.S., Crowley, T.M., Chen, H.L., Haring, V.R., Moore, R.J., 2012. Intestinal microbiota associated with differential feed conversion efficiency in chickens. *Applied Microbiology and Biotechnology* **96** (5), 1361-1369.
- Stanley, D., Geier, M.S., Chen, H., Hughes, R.J., Moore, R.J., 2015. Comparison of fecal and cecal microbiotas reveals qualitative similarities but quantitative differences. *BMC Microbiology* **15**, 1-11, Article Number: 51.
- Stanley, D., Geier, M.S., Denman, S.E., Haring, V.R., Crowley, T.M., Hughes, R.J., Moore, R.J., 2013. Identification of chicken intestinal microbiota correlated with the efficiency of energy extraction from feed. *Veterinary Microbiology* **164** (1-2), 85-92.
- Stanley, D., Hughes, R.J., Moore, R.J., 2014. Microbiota of the chicken gastrointestinal tract: Influence on health, productivity and disease. *Applied Microbiology and Biotechnology* **98** (10), 4301-4310.
- Taherzadeh, M.J., Karimi, K., 2007. Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: A review. *Bioresources* **2** (3), 472-499.

- Tan, J., McKenzie, C., Potamitis, M., Thorburn, A.N., Mackay, C.R., Macia, L., 2014. The role of short-chain fatty acids in health and disease, In: *Advances in immunology* **121** / Hrsg.: F. W. Alt. Elsevier Academic Press Inc, 91-119, London, UK, ISBN: 9780128001004.
- Theander, O., Aman, P., Westerlund, E., Graham, H., 1994. Enzymatic chemical-analysis of dietary fiber. *Journal of AOAC International* **77** (3), 703-709.
- Theander, O., Westerlund, E., Aman, P., 1993. Structure and components of dietary fiber. *Cereal Foods World* **38** (3), 135-141.
- Theander, O., Westerlund, E., Aman, P., Graham, H., 1989. Plant-cell walls and monogastric diets. *Animal Feed Science and Technology* **23** (1-3), 205-225.
- Topping, D.L., Clifton, P.M., 2001. Short-chain fatty acids and human colonic function: Roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiological Reviews* **81** (3), 1031-1064.
- Uden, P., Robinson, P.H., Wiseman, J., 2005. Use of detergent system terminology and criteria for submission of manuscripts on new, or revised, analytical methods as well as descriptive information on feed analysis and/or variability. *Animal Feed Science and Technology* **118** (3-4), 181-186.
- van der Wielen, P., Biesterveld, S., Notermans, S., Hofstra, H., Urlings, B.A.P., van Knapen, F., 2000. Role of volatile fatty acids in development of the cecal microflora in broiler chickens during growth. *Applied and Environmental Microbiology* **66** (6), 2536-2540.
- Van Soest, P.J., 1963a. Feeds - use of detergents in analysis of fibrous feeds.1. Preparation of fiber residues of low nitrogen content. *Journal of the Association of Official Agricultural Chemists* **46** (5), 825-829.
- Van Soest, P.J., 1963b. Use of detergents in analysis of fibrous feeds. 2. A rapid method for determination of fiber and lignin. *Journal of the Association of Official Agricultural Chemists* **46** (5), 829-835.
- Van Soest, P.J., 1967. Development of a comprehensive system of feed analyses and its application to forages. *Journal of Animal Science* **26** (1), 119-128.



- Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A., 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science* **74** (10), 3583-3597.
- Van Soest, P.J., Wine, R.H., 1967. Use of detergents in analysis of fibrous feeds .4. Determination of plant cell-wall constituents. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* **50** (1), 50-55.
- Vince, A.J., Burridge, S.M., 1980. Ammonia production by intestinal bacteria: The effects of lactose, lactulose and glucose. *Journal of Medical Microbiology* **13** (2), 177-191.
- Visek, W.J., 1978. Diet and cell-growth modulation by ammonia. *American Journal of Clinical Nutrition* **31** (10), 216-220.
- von Engelhardt, W., 2015. Physiologie der Haustiere. Enke Verlag, Stuttgart, Germany, ISBN: 9783830412618.
- von Engelhardt, W., Bartels, J., Kirschberger, S., Duttingdorf, H., Busche, R., 1998. Role of short-chain fatty acids in the hind gut. *Veterinary Quarterly* **20** (Suppl 3), 52-59.
- Walter, J., Hertel, C., Tannock, G.W., Lis, C.M., Munro, K., Hammes, W.P., 2001. Detection of *lactobacillus*, *pediococcus*, *leuconostoc*, and *weissella* species in human feces by using group-specific pcr primers and denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* **67** (6), 2578-2585.
- Wei, S., Morrison, M., Yu, Z., 2013. Bacterial census of poultry intestinal microbiome. *Poultry Science* **92** (3), 671-683.
- Yokhana, J.S., Parkinson, G., Frankel, T.L., 2016. Effect of insoluble fiber supplementation applied at different ages on digestive organ weight and digestive enzymes of layer-strain poultry. *Poultry Science* **95** (3), 550-559.
- Zhu, X.Y., Zhong, T.Y., Pandya, Y., Joerger, R.D., 2002. 16s rna-based analysis of microbiota from the cecum of broiler chickens. *Applied and Environmental Microbiology* **68** (1), 124-137.

## Anhang

**Tabelle 15:** Zusammensetzung der verwendeten Lösung zur Analyse des NDF-Gehalts

<b>Neutrale Detergenzienlösung</b>		
Natriumlaurylsulfat <sup>1</sup>	[g]	30,0
EDTA-Natriumsatz <sup>2</sup>	[g]	18,6
Natriumtetraborat <sup>3</sup>	[g]	6,81
Natriumphosphatdibasic <sup>4</sup>	[g]	4,56
Triethylenglycol <sup>5</sup>	[ml]	10,0
$\alpha$ -Amylase <sup>6</sup> (hitzestabile)	[ml]	8,00
<i>Aqua valde purificata</i>	[ml]	1350

<sup>1</sup> SDS Pellets  $\geq 99,5$  %, Rotiphorese<sup>®</sup>-Grade, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

<sup>2</sup> Ethylendiamintetraessigsäure  $\geq 99,0$  %, p.a., ACS, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

<sup>3</sup> di-Natriumtetraborat-Decahydrat, Merck, KGaA, Darmstadt, Deutschland

<sup>4</sup> Natriumpyrophosphat tetrabasich decahydrat, Riedel-de Haën<sup>®</sup>, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA

<sup>5</sup> Triethylenglycol  $\geq 98,0$  %, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

<sup>6</sup> alpha-Amylase, 17.400 Liquefon Units/ml, ANKOM Technology Macedon, NY, USA

**Tabelle 16:** Zusammensetzung der verwendeten Lösungen zur Analyse von kurzkettigen Fettsäuren

<b>Standardlösung<sup>1</sup> (0,5 mmol/l kurzkettige Fettsäuren)</b>		
SUPELCO Stammlösung <sup>2</sup>	[ $\mu$ l]	50,0
Oxalsäure-Dihydrat	[mg]	10,0
<i>Aqua valde purificata</i>	[ $\mu$ l]	950
<b>Stammlösung (10 mmol/l) zur Probenverdünnung</b>		
Hexansäure	[ $\mu$ l]	250
Oxalsäure-Dihydrat	[g]	2,00
<i>Aqua valde purificata</i>	[ml]	200
<b>Verdünnungslösung<sup>3</sup> (0,5 mmol/l)</b>		
Stammlösung	[ml]	50,0
Natriumazid <sup>4</sup>	[g]	2,50
<i>Aqua valde purificata</i>	[ml]	1000

<sup>1</sup> Verwendung als externen Standard

<sup>2</sup> SUPELCO 4-6975 „Volatile Acids Standard Mix“

<sup>3</sup> Enthält 0,50 mmol/l Hexansäure (Capronsäure; C:6) als internen Standard

<sup>4</sup> Natriumazid zur Abtötung der Keime bzw. stoppen der Fettsäurenproduktion und Oxalsäure

**Tabelle 17:** Temperatur- und Zeiteinteilung des Gaschromatographen für die Bestimmung der Konzentration der kurzkettigen Fettsäuren

<b>Injektor-Programm</b>		
Abfolge	Temperatur [°C]	Zeit [min]
Schritt 1	100	0,02
Schritt 2	150	0,50
Schritt 3	250	2,00
Schritt 4	90,0	-
<b>Ofen-Programm</b>		
Abfolge	Temperatur [°C]	Zeit [min]
Schritt 1	701	0,50
Schritt 2	140	1,00
Schritt 3	190	3,00

<sup>1</sup>Initialtemperatur

**Tabelle 18:** Zusammensetzung der hergestellten Lösungen zur Analyse der Ammoniumkonzentration

<b>Verdünnungsmedium: 100 mmol/l MOPS-Lösung</b>		
MOPS <sup>1</sup>	[g]	2,09
<i>Aqua valde purificata</i>	[ml]	100
<b>Standardstammlösung: 1000 µmol/l Ammoniumchlorit-Lösung</b>		
100 mmol/l Ammoniumchlorid <sup>2</sup> -Lösung	[mg]	538
100 mmol/l MOPS-Lösung	[ml]	10,0

<sup>1</sup> MOPS Pufferan<sup>®</sup>, 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure ≥ 98,0 %, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

<sup>2</sup> Ammoniumchlorid 99,995 Suprapur<sup>®</sup>, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

**Tabelle 19:** Standardreihe zur photometrischen Bestimmung der Ammoniumkonzentration

Endkonzentration $\text{NH}_4^+$ in Verdünnungsmedium [c]E in $\mu\text{mol/l}$	aus Anfangskonzentration [c]A in $\mu\text{mol/l}$	Verdünnungsstufe	Volumen [c]A in $\mu\text{l}$	Volumen Verdünnungsmedium in $\mu\text{l}$	Endvolumen in ml
400	1000	2/5	400	600	1,00
350	1000	7/20	350	650	1,00
300	1000	3/10	300	700	1,00
250	1000	1/4	250	750	1,00
200	400	1/2	500	500	1,00
150	300	1/2	500	500	1,00
100	200	1/2	500	500	1,00
50	100	1/2	500	500	1,00

Die Standardreihe wird in 100 mmol/l MOPS pH 7 hergestellt

**Tabelle 20:** Zusammensetzung der verwendeten Lösungen zur Analyse des Laktatgehalts

<b>Kupfer-II-Sulfat (2,5 mmol/l)</b>		
Kupfer-II-Sulfat <sup>1</sup>	[mg]	399
2-Propanol <sup>2</sup>	[ml]	50,0
<i>Aqua valde purificata</i>	[ml]	1000
<b>Kupfer-II-Sulfat (0,5 mmol/l)</b>		
Kupfer-II-Sulfat	[mg]	79,8
<i>Aqua valde purificata</i>	[ml]	1000
<b>Carrez I</b>		
Zinkchlorid <sup>3</sup>	[g]	17,0
<i>Aqua valde purificata</i>	[ml]	100
<b>Carrez II</b>		
Kaliumhexacyanoferrat-II-Tihydrat <sup>4</sup>	[g]	15,0
<i>Aqua valde purificata</i>	[ml]	100

<sup>1</sup> Kupfer-II-Sulfat (Wasserfrei), Merck, KGaA, Darmstadt, Deutschland

<sup>2</sup> 2-Propanol, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

<sup>3</sup> Zinkchlorid, Merck, KGaA, Darmstadt, Deutschland

<sup>4</sup> Kaliumhexacyanoferrat-II-Tihydrat  $\geq 99,0\%$ , p.a., ACS, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

## **Detailliertes Arbeitsprotokoll mit Modifizierungen zur DNA/RNA Extraktion**

### 1. Aufbereitung/Homogenisierung der zäkalen Digestproben

Es wurden 200 mg der auf Eis angetauten Probe zusammen mit 1,8 ml RNAlater (RNAlater RNA Stabilizations Reagent 250 ml, Qiagen Sample & Assay Technologies, Hilden, Deutschland) in ein 2 ml Eppendorfgefäß (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) gemischt, für 15 min gevortext (Vortex Genie 2 G-560E, Scientific Industries Inc., Bohemia, NY, USA) und dann für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Für die weitere Bearbeitung wurden die so präparierten Proben kurzfristig (1 - 2 Tage) bei 4 °C, mittelfristig bei - 20 °C (< Monat) und langfristig (> Monat) bei - 80 °C gelagert.

### 2. Mechanische und chemische Zellyse

Die auf 4 °C temperierten Proben wurden als erstes bei 19000 x g für 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert (Eppendorf® Centrifuge 5430, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) und der entstandene Überstand möglichst vollständig abpipettiert. Anschließend wurden ca. 100 mg der Probe abgewogen und mit einem Einmal-Rührspatel (Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland) in ein Granulat-Röhrchen (2 ml Matrix E-Tube-RNase/DNase Free, MP Biochemicals LLC, Santa Ana, CA, USA) überführt.

Direkt im Anschluss darauf wurden die Proben unter eingeschaltetem Abzug mit 100 µl TNE Buffer (20 ml Tris 1 mol/l + 10 ml EDTA 0,2 mol/l + 70 ml NaCl 5 mol/l + RNase-freies Wasser auf 200 ml aufgefüllt, pH 7,4 (alle Bestandteile: Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)), 800 µl RA 1 Buffer (Lysis Buffer RA1, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland) und 8 µl 2-Mercaptoethanol (≥ 99.0 %, p.a., Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) versetzt und gevortext, um so die chemische Denaturierung der bakteriellen DNA zu starten. Zusätzlich wurde, mithilfe eines Hochgeschwindigkeits-Kugelhomogenisators (FastPrep-24™ 5G Instrument, MP Biochemicals LLC, Santa Ana, CA, USA), eine physikalische Zellyse durchgeführt. Das Arbeitsprotokoll sah zwei Durchgänge mit einer Geschwindigkeit von 6 m/s für 30 sec bei 2 °C vor. Nach jedem Durchgang wurden die erhitzten Proben für 2 min in Eiswasser inkubiert.

### 3. Lysatfiltration

Als nächstes wurde die so aufgespaltene Probe bei 19000 x g für 1 min bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand komplett abpipettiert und in ein 1,5 ml Sammel-Röhrchen (Collection Tubes 1,5 ml, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland) überführt. Der Überstand wurde dann nochmals bei 19000 x g für 10 min und bei Raumtemperatur zentrifugiert um die noch verbliebenen Schwebstoffe in der Probe abzutrennen.

Von dem nun erhaltenen Lysat wurden 600 µl auf eine violette Filtersäule (NucleoSpin® Filters (violet rings), Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland) in einem 2 ml Eppendorfgesäß, aufgebracht und bei 11000 x g für 1 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die Filtersäule wurde im Anschluss verworfen.

### 4. RNA/DNA-Bindung

Das nun gereinigte Lysat wurde mit 600 µl Ethanol  $\geq 70\%$  (Ethanol ROTIPURAN®  $\geq 70\%$ , p.a., Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) versetzt und für 5 - 10 sec gevortext. Folgend wurden 600 µl des versetzten Lysats auf einen blauen Säulenfilter (NucleoSpin® RNA Columns (light blue rings – plus Collection Tubes), Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland) mit dem entsprechenden 2 ml Sammel-Röhrchen (Collection Tubes 2 ml, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland) pipettiert und bei 11000 x g für 1 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Filtersäule in ein neues 2 ml Sammel-Röhrchen überführt.

Diese Prozedur wurde wiederholt, bis das Lysat vollkommen durchgelaufen war und keine Flüssigkeit mehr auf der Säule stehen blieb (die Zentrifugationszeit konnte der Viskosität der Probe beliebig angepasst werden, die g-Zahl musste jedoch unverändert bleiben).

### 5. Entsalzung der Silikatmembran

Zur Entsalzung und für die weitere Nutzung des blauen Säulenfilters mit der enthaltenen RNA/DNA, wurde dessen Silikatmembran mit 350 µl MDB (Membran Desalting Buffer, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland) in einem neuen 2 ml Sammel-Röhrchen gespült und bei 11000 x g für 1 min bei Raumtemperatur zentrifugiert.

## 6. Waschung/Trocknung der Silikatmembran

Zur weiteren Aufbereitung der Säulenfilter-Membran, folgten Waschungen mit verschiedenen Puffern in jeweils frischen 2 ml Sammel-Röhrchen. Zunächst wurden 200 µl RAW2 Buffer (Wash Buffer RAW2, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland) auf den Säulenfilter pipettiert und bei 11000 x g für 30 sec bei Raumtemperatur zentrifugiert. Als nächsten Waschschrift wurde 600 µl RA3 Buffer (Wash Buffer RA3, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland) auf den Filter gegeben und anschließend wieder bei 11000 x g für 30 sec bei Raumtemperatur zentrifugiert. Dieser Schritt wurde noch einmal mit 250 µl des RA 3 Buffers wiederholt und dann bei 11000 x g für 2 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Zur anschließenden Trocknung, wurde der Säulenfilter in einem neuen 1,5 ml Sammel-Röhrchen bei 11000 x g für 30 sec bei Raumtemperatur zentrifugiert. Dies sollte sicherstellen, dass kein Ethanol mehr enthalten ist.

Zum Abschluss wurde der Filter in ein steriles und PCR-reines 1,5 ml Eppendorfgefäß (Eppendorf® LoBind microcentrifuge tubes DNA/RNA 1,5 ml, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) gestellt.

## 7. RNA/DNA - Elution

Zur gemeinsamen Elution der RNA und DNA, wurde zweimal 50 µl RNase-freies Wasser (RNase-free H<sub>2</sub>O, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland) auf den Säulenfilter gegeben und bei 11000 x g für 1 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der übrig gebliebene Säulenfilter konnte im Anschluss verworfen werden.

## 8. RNA - Reinigung/Aufbereitung

Um die in der Elution enthaltene RNA von den vorher angewendeten Puffern und Reaktionsmischungen zu säubern, wurde zu jeder Probe (100 µl) 600 µl eines RA1/Ethanol Buffer-Mix (300 µl RA1 Buffer + 300 µl Ethanol ≥ 99.8 % (Ethanol ROTIPURAN® ≥ 99.8 %, p.a., Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)) dazugeben und dann intensiv gevortext.

## 9. RNA-Bindung

Zur erneuten Bindung, der nun gereinigten RNA, an die Membran eines neuen blauen Säulenfilters, wurden die Proben in Portionen zu 600 µl pipettiert und bei 11000 x g für eine 1 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Diese Prozedur wurde wiederholt bis das Eluat-RA1-Ethanol-Gemisch komplett durch die Säule gelaufen war. Der jeweilige Durchfluss wurde verworfen.

## 10. Waschung/Trocknung der Silikatmembran

In Vorbereitung zur Elution der DNA aus der gemischten Probe, wurden erst einige Waschschritte durchgeführt. 500 µl DNA Wash (Buffer DNA Wash, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland) wurden auf den Säulenfilter aufgegeben und anschließend bei 11000 x g für 1 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Verwurf des Durchflusses und Überführung des Filters in ein neues 2 ml Sammel-Röhrchen wurden erneut 500 µl DNA Wash pipettiert und bei 11000 x g für 1 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurde noch einmal „trocken“ bei 11000 x g für 30 sec bei Raumtemperatur zentrifugiert. Danach wurde der Säulenfilter zur vollständigen Trocknung in ein steriles und PCR-reines 1,5 ml Eppendorfgefäß gestellt und mit offenem Deckel für 1 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Um zu gewährleisten, dass die Säulenmembran für die folgenden Protokollschritte auch Ethanol-frei war, durfte sich die Oberfläche nun ausschließlich matt darstellen.

## 11. DNA-Elution

Um die bakterielle DNA aus der aufbereiteten Probe zu extrahieren, wurde 50 µl DNA Elute (Buffer DNA Elute, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland) dem Gemisch hinzugeben und dieses 1 min inkubiert und anschließend bei 11000 x g für 1 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Zur vollständigen Lösung der DNA, wurde dieser Schritt erneut mit 50 µl DNA Elute wiederholt. Die so entstandenen 100 µl DNA-Eluate wurden bei - 20 °C eingefroren. Der verbliebene Säulenfilter wurde für die Extraktion der bakteriellen RNA weiterverwendet.



## 12. Waschung/Trocknung der Silikatmembran

Zur erneuten Aufbereitung der Säulenfilter-Membran, folgten Waschungen wie schon im 6. Arbeitsschritt mit verschiedenen Puffern in jeweils frischen 2 ml Sammel-Röhrchen. Zunächst wurden 200 µl RAW2 Buffer auf den Säulenfilter pipettiert und bei 11000 x g für 30 sec bei Raumtemperatur zentrifugiert. Als nächsten Waschschrift wurde 600 µl RA3 Buffer auf den Filter gegeben und anschließend wieder bei 11000 x g für 30 sec bei Raumtemperatur zentrifugiert. Dieser Schritt wurde noch einmal mit 250 µl des RA 3 Buffers wiederholt und dann bei 11000 x g für 2 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Zur anschließenden Trocknung, wurde der Säulenfilter in einem neuen 1,5 ml Sammel-Röhrchen bei 11000 x g für 30 sec bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die sollte sicherstellen, dass kein Ethanol mehr enthalten ist. Zum Abschluss wurde der Filter in ein steriles und PCR-reines 1,5 ml Eppendorfgefäß gestellt.

## 13. RNA-Elution

In diesem Schritt wurde 2x 45 µl RNase-freies Wasser pipettiert und dann jeweils bei 11000 x g für 1 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Säulenfilter wurde im Anschluss verworfen.

## 14. rDNase-Behandlung

Um die in der Probe verbliebene „Rest-DNA“ vollständig zu denaturieren, wurden 10 µl rDNase/DNA-Reaktions-Buffer-Mischung ((rDNase, RNase-free, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland) + (Reaction Buffer for rDNase, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland) im Verhältnis 1:10)) dazugegeben und für 30 min bei 37 °C inkubiert.

## 15. RNA-Reinigung/Aufbereitung

Zur erneuten Reinigung und dem vorangegangenen 8. Arbeitsschritt folgend, wurde zu jeder Probe (100 µl) 600 µl eines RA1/Ethanol Buffer-Mix (300 µl RA1 Buffer + 300 µl Ethanol ≥ 70 %) dazugegeben und dann intensiv gevortext.

## 16. RNA-Bindung

Im Anschluss an die Aufarbeitung, wurde die RNA an die Membran eines neuen blauen Säulenfilters gebunden. Dazu wurden die Proben, wie schon im 9. Arbeitsschritt, in Portionen zu 600 µl pipettiert und bei 11000 x g für eine 1 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die Prozedur wurde wiederholt bis das Eluat-RA1-Ethanol-Gemisch komplett durch die Säule gelaufen war. Die 2 ml Sammel-Röhrchen mit dem jeweiligen Durchfluss wurden verworfen.

#### 17. Entsalzung der Silikatmembran

Zur Entsalzung der Silikatmembran des Säulenfilters wurde dieser, wie schon im 5. Arbeitsschritt, erst in ein neues 2 ml Sammel-Röhrchen gestellt, mit 350 µl MDB gespült und bei 11000 x g für 1 min bei Raumtemperatur zentrifugiert.

#### 18. rDNase-Behandlung

Um sicherzustellen, dass ausschließlich bakterielle RNA aus der Probe extrahiert werden kann, wurde zur vollständigen Denaturierung der eventuell noch vorhandenen DNA in der Probe, 95 µl rDNase/DNA-Reaktions-Buffer-Mischung (rDNase + DNA-Reaktions-Buffer im Verhältnis 1:10) auf die Säule aufgetragen und für 15 - 20 min bei Raumtemperatur inkubiert.

#### 19. Waschung/Trocknung der Silikatmembran

Als Vorbereitung für den letzten Schritt der RNA-Extraktion, folgten noch einmal Waschungen der Säulenfilter-Membran wie schon im 6. Arbeitsschritt mit verschiedenen Puffern in jeweils frischen 2 ml Sammel-Röhrchen. Zunächst wurden 200 µl RAW2 Buffer auf den Säulenfilter pipettiert und bei 11000 x g für 30 sec bei Raumtemperatur zentrifugiert. Als nächsten Waschschrift wurde 600 µl RA3 Buffer auf den Filter gegeben und anschließend wieder bei 11000 x g für 30 sec bei Raumtemperatur zentrifugiert. Dieser Schritt wurde noch einmal mit 250 µl des RA 3 Buffers wiederholt und dann bei 11000 x g für 2 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Zur anschließenden Trocknung, wurde der Säulenfilter in einem neuen 1,5 ml Sammel-Röhrchen bei 11000 x g für 30 sec bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die sollte sicherstellen, dass kein Ethanol mehr enthalten ist. Zum Abschluss wurde der Filter in ein steriles und PCR-reines 1,5 ml Eppendorfgesäß gestellt.

#### 20. RNA-Elution

Um nun auch die bakterielle RNA aus der aufbereiteten Probe zu extrahieren, wurde 60 µl RNase-freies Wasser dem Säulenfilter zugegeben und dann für 1 min inkubiert. Anschließend wurde der Säulenfilter bei 11000 x g für 1 min bei Raumtemperatur zentrifugiert.

Die so entstandenen 60 µl RNA-Eluat wurden bei - 20 °C bis - 30 °C eingefroren. Der verbliebene Säulenfilter wurde verworfen.

**Tabelle 21:** Verwendete Primer für die qPCR/rt-qPCR

Detektierte Bakteriengruppen	Primer	Oligonukleotid-Sequenzen (5'- 3')	C	Produkt größe	Ziel-Gen	Referenz
<i>C. coccoides</i> -Cluster XIVA	g-Ccoc-F	AAATGACGGTACCTGACTAA	0,40	440 bp <sup>1</sup>	16s rDNA	(Matsuki et al., 2002)
	g-Ccoc-R	CTTTGAGTTTCATTCTTGCGAA				(Matsuki et al., 2002)
Clostridien-Cluster I	CI-F1	TACCHRAGGAGGAAGCCAC	0,40	231 bp	16s rDNA	(Song et al., 2004)
	CI-R2	GTTCTTCCTAATCTCTACGCAT				(Song et al., 2004)
<i>C.leptum</i> -Cluster IV	sg-Clept-F	GCACAAGCAGTGGAGT	0,60	239 bp	16s rDNA	(Matsuki et al., 2002)
	sg-Clept-R	CTTCCTCCGTTTTGTCAA				(Matsuki et al., 2002)
<i>Lactobacillus</i> spp.	Lac-1	AGCAGTAGGGAATCTTCCA	0,40	341 bp	16s rDNA	(Walter et al., 2001)
	Lac-2	CACCGCTACACATGGAG				(Heilig et al., 2002)
<i>Bifidobacterium</i> spp.	g-BIFID-F	TCGCGTCYGGTGTGAAAG	0,40	243 bp	16s rDNA	(Rinttila et al., 2004)
	g-BIFID-R	CCACATCCAGCRTCCAC				(Rinttila et al., 2004)
<i>Bacteroides-Prevotella- Porphyromonas</i> -Cluster	BPP1	GGTGTCGGCTTAAGTGCCAT	0,40	140 bp	16s rDNA	(Rinttila et al., 2004)
	BPP2	CGGAYGTAAGGGCCGTGC				(Rinttila et al., 2004)
<i>Escherichia/Hafnia/Shigella</i>	Entero-F	GTTAATACCTTTGCTCATTGA	0,40	340 bp	16s rDNA	(Malinen et al., 2003)
	Entero-R	ACCAGGGTATCTAATCCTGTT				(Malinen et al., 2003)

<sup>1</sup> Basenpaare,<sup>2</sup> F = Vorwärts-Primer,<sup>3</sup> R = Rückwärts-Primer,<sup>4</sup> C = Primerkonzentration (µM)

**Tabelle 22:** Mengenverhältnisse eines Reaktionsansatzes mit Brilliant II SYBR® Green Low ROX QPCR Master Mix für die qPCR

	Menge bei Primer- konzentration 0,4 µmol/l	Menge bei Primer- konzentration 0,6 µmol/l
Brilliant II SYBR® Green Low ROX QPCR Master Mix <sup>1</sup>	12,5 µl	12,5 µl
Forward Primer (10 µmol/l)	1,00 µl	1,50 µl
Reverse Primer (10 µmol/l)	1,00 µl	1,50 µl
Wasser, nuklease-frei, sterilfiltriert	9,50 µl	8,50 µl

<sup>1</sup> Referenznummer: 600830**Tabelle 23:** Mengenverhältnisse eines Reaktionsansatzes mit Brilliant II SYBR® Green Low ROX qRT-PCR Master Mix für die qPCR

	Menge bei Primer- konzentration 0,4 µmol/l	Menge bei Primer- konzentration 0,6 µmol/l
Brilliant II SYBR® Green Low ROX QRT-PCR Master Mix <sup>1</sup>	12,5 µl	12,5 µl
Forward Primer (10 µmol/l)	1,00 µl	1,50 µl
Reverse Primer (10 µmol/l)	1,00 µl	1,50 µl
RT/RNase block (M-MLV RT) <sup>2</sup>	1,00 µl	1,50 µl
Wasser, nuklease-frei, sterilfiltriert	9,50 µl	8,50 µl

<sup>1</sup> Referenznummer: 600835<sup>2</sup> Moloney-Maus-Leukämie-Virus Reverse Transkriptase

**Tabelle 24:** Reaktionsbedingungen für die qPCR

	n <sup>1</sup>	<i>C. coccooides</i> - Cluster XIVa	Clostridien- Cluster I	<i>C. leptum</i> - Cluster IV	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Bifidobacterium</i> spp.	BPP <sup>2</sup> - Cluster	<i>Escherichia</i> / <i>Hafnia/Shigella</i>
Aufwärmung	1	50 °C/30 min	50 °C/30 min	50 °C/30 min	50 °C/30 min	50 °C/30 min	50 °C/30 min	50 °C/30 min
Aktivierung	1	95 °C/15 min	95 °C/15 min	95 °C/15 min	95 °C/15 min	95 °C/15 min	95 °C/15 min	95 °C/15 min
Denaturierung	40	95 °C/30 sec.	95 °C/30 sec.	95 °C/30 sec.	95 °C/30 sec.	95 °C/30 sec.	95 °C/30 sec.	95 °C/30 sec.
Annealing Primermoleküle		60 °C/30 sec.	63 °C/30 sec.	60 °C/30 sec.	58 °C/30 sec.	58 °C/30 sec.	55 °C/30 sec.	55 °C/30 sec.
Elongation der DNA-Fragmente		72 °C/30 sec.	72 °C/30 sec.	72 °C/30 sec.	72 °C/30 sec.	72 °C/30 sec.	72 °C/30 sec.	72 °C/30 sec.
Schmelzkurvenanalytik	1	+	+	+	+	+	+	+
Abkühlung	1	25 °C/1 min	25 °C/1 min	25 °C/1 min	25 °C/1 min	25 °C/1 min	25 °C/1 min	25 °C/1 min

<sup>1</sup> n = Anzahl der PCR-Zyklen

<sup>2</sup> *Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas*

## Publikationsverzeichnis

### Posterbeiträge

Metzger, F.; Röhe, I.; Zentek, J. (2018):

72<sup>nd</sup> Conference of the Society of Nutrition Physiology

Göttingen – 13.03.-15.03.2018

Effect of dietary lignocellulose on the animal performance and intestinal microbiota in slow growing male chickens.

In: *Proceedings of the Society of Nutrition Physiology : Berichte der Gesellschaft für Ernährungsphysiologie* – Gesellschaft für Ernährungsphysiologie (Hrsg.)

Frankfurt am Main: DLG-Verlag GmbH. S. 36

ISBN: 978-3-7690-4111-8

## Erklärung zu Interessenskonflikten

**Interessenkonflikt:** kein Interessenkonflikt

Der Autor bestätigt hiermit, dass er keine Verbindungen zu oder Beteiligung an einer Organisation oder Einrichtung mit finanziellen Interessen (wie Honorare, Bildungszuschüsse, Teilnahme an Rednerbüros, Mitgliedschaft, Beschäftigung, Beratungsfirmen, Aktienbesitz oder andere Kapitalbeteiligungen und Expertenaussagen oder Patentlizenzvereinbarungen) oder nicht-finanziellem Interesse (wie persönliche oder berufliche Beziehungen, Zugehörigkeit, Wissen oder Überzeugungen) an dem Thema oder den Materialien, die in diesem Manuskript besprochen wurden, hat.

## Danksagung

Bedanken möchte ich mich zuallererst bei Herrn Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek für die Überlassung des interessanten Themas und der Möglichkeit zur Promotion am Institut für Tierernährung der FU-Berlin, sowie für die Unterstützung während der gesamten Arbeit.

Außerdem geht mein Dank an Frau Dr. Ilen Röhe, welche meine Dissertation betreute und mir stets beratend zur Seite stand.

Bei Herrn Dr. Wilfried Vahjen möchte ich mich für Seine Hilfe bei der statistischen Auswertung der Daten und bei Herrn Prof. Dr. Klaus Männer für die Unterstützung bei der Rationsgestaltung bedanken.

Mein herzlicher Dank gilt darüber hinaus Frau Marita Eitinger, Frau Anett Kriesten, Frau Katharina Topp und Frau Luisa Ebersbach für Ihre Einführungen in die analytischen Methoden und deren stetige Hilfsbereitschaft im Labor.

Bei den TierpflegerInnen Corinna Schmidt, Ines Bebert, Sandra Fischer und Chris Schulze möchte ich mich für die tatkräftige Unterstützung an den Schlachttagen bedanken.

Meinen Doktoranden-KollegInnen möchte ich ebenfalls für deren Mithilfe an den Schlachttagen aber auch für den großartigen Zusammenhalt und das tolle Arbeitsklima herzlich danken.

Der größte Dank gilt meiner Familie und meiner Freundin Lea, die mich unermüdlich unterstützt und mir diese Arbeit ermöglicht haben.



## **Selbstständigkeitserklärung**

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 30.06.2020

Florian Metzger











9 783967 290592

**mbv**berlin mensch und buch verlag

49,90 Euro | ISBN: 978-3-96729-059-2