

4. Diskussion

4.1 Hintergrund und Ziel der Arbeit

Die vorliegende Arbeit ist Bestandteil der gemeinsamen Untersuchungen der Forschergruppe FOR 438 – „Integrative Analyse der Wirkmechanismen von Probiotika beim Schwein“ am Fachbereich Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin, finanziert durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG). Für den ersten Bewilligungszeitraum waren fünf Institute des Fachbereichs beteiligt, die je nach Fachrichtung ein eigenes Teilprojekt basierend auf dem gemeinsamen Versuchstierbestand bearbeiteten. Die beteiligten Institute und die einzelnen Teilprojekte sind in Tab. 12 aufgeführt.

Tab. 12: Teilprojekte der DFG- Forschergruppe FOR438

Teilprojekt A	Wirkungen von Probiotika auf Transport- und Barrierefunktionen des Darmepithels	Institut für Veterinär-Physiologie, Prof. Dr. H. Martens
Teilprojekt B	Einfluss von Probiotika auf darm-pathogene Bakterien und die mikrobielle Biodiversität der Intestinalflora beim Schwein	Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen, Prof. Dr. L.H. Wieler
Teilprojekt C	Einfluss von Probiotika auf das Immunsystem von Schweinen	Institut für Immunologie und Molekularbiologie, Prof. Dr. M.F.G. Schmidt
Teilprojekt D	Einfluss von Probiotika auf Mikrobiota und intestinale Nährstoffverwertung beim Schwein	Institut für Tierernährung, Prof. Dr. O. Simon
Teilprojekt E	Beeinflussung der funktionellen Feinstruktur der Darmschleimhaut durch Probiotika	Institut für Veterinär-Anatomie, Prof. Dr. K.D. Weyrauch

Diese Arbeit wurden am Institut für Tierernährung, Leitung Prof. Dr. Ortwin Simon, erstellt. Hier befand sich auch der Versuchstierbestand, an dem die Untersuchungen durchgeführt wurden.

Ziel dieser Arbeit war herauszufinden, ob nach Anwendung des hier untersuchten probiotischen *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 in einer Formulierung als Futterzusatzstoff messbare Unterschiede in ausgesuchten Parametern zu Leistung und Gesundheit der Versuchstiere wie auch in Zusammensetzung und Funktion ihrer Darm- und

Kotmikrobiota im Vergleich zu einer Kontrollgruppe zu beobachten sein würden. Hierbei wurde besonderes Augenmerk auf den Verbleib des zugeführten Keimes im Verdauungstrakt sowie die möglicherweise darauf zurückzuführenden Veränderungen der Mikrobiota gerichtet.

4.2 Leistungsdaten der Versuchtiere

4.2.1 Lebendmasseentwicklung und Futtermittelverwertung

Wie kürzlich aus dieser Forschergruppe schon veröffentlicht wurde, ließen sich bei den Leistungsdaten der Ferkel und Sauen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen messen (Taras et al. 2006).

Die beobachteten erheblichen Schwankungen weisen auf andere, stärkere Einflussfaktoren seitens Tier und Umwelt hin. Andere Studien mit diesem Organismus zeigten bei Puten ebenfalls nur nicht signifikante Unterschiede (Jadamus et al. 2001). Weitere kürzlich publizierte Studien mit *E. faecium* NCIMB 10415 bei Ferkeln zeigten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede bei den Leistungsparametern (Paulicks und Roth-Maier 2003; Broom et al. 2006). Hier wird unter anderem als mögliche Erklärung für ausbleibende messbare Unterschiede der stärkere Einfluss anderer Umweltfaktoren wie auch der Fütterung angenommen (Madec et al. 1998; Cromwell 2002). Dabei stellt sich die Frage, ob messbare positive Effekte des Probiotikums bei schlechten oder besonders günstigen Haltungs- und Fütterungsbedingungen zu erwarten wären. Beim Einsatz eines *Enterococcus faecium* DSM 7134 - Probiotikums Bonvital® bei Mastschweinen konnte ebenfalls nur nicht signifikante Unterschiede beobachtet werden (Bartkeviciute et al. 2005).

Auf der anderen Seite wird immer wieder von signifikanten Auswirkungen probiotischer Mikroorganismen auf Leistungsdaten, Durchfallerkrankungen und immunologische Parameter berichtet. Bei Saugferkeln wurde vor kurzem nach direkter oraler Verabreichung hoher Zellzahlen von *E. faecium* NCIMB 10415 bessere Tageszunahmen beobachtet (Zeyner und Boldt 2006). Mit dem probiotischen *E. faecium* DSM 7134 gefütterte Sauen zeigten höhere Futteraufnahmen und größere Würfe als die in der entsprechenden Kontrollgruppe (Bohmer et al. 2006). Bei ebenfalls mit einem *E. faecium* DSM 7134- Probiotikum gefütterten Sauen konnten signifikant bessere Zunahmen bei den Saugferkeln der supplementierten Gruppe sowie signifikant weniger totgeborene Ferkel beobachtet werden (Blömer 2005). Auch beim Einsatz von probiotischen Kombinationspräparaten, die Laktobazillen, Enterokokken und Bifidobakterien enthielten, ist bei Geflügel von deutlichen positiven Effekten auf Leistungsparametern berichtet worden (Kabir 2004). Bei Schweinen wurde mit *Bacillus*-Präparaten Verbesserungen u.a. der Tageszunahmen und der Futtermittelverwertung gegenüber einer Kontrollgruppe gemessen (Kirchgessner et al. 1993; Zani et al. 1998;

Alexopoulos et al. 2001; Wetscherek-Seipelt und Windisch 2005). Auch in einem weiteren Versuch dieser DFG- Forschergruppe konnte bei Verwendung von *Bacillus cereus var. toyoi* positive Auswirkungen auf Leistungsparameter von Sauen und Ferkeln beobachtet werden (Taras et al. 2005). Insgesamt wurde aber in der Vergangenheit beobachtet, dass ein positiver Einfluss von Probiotika auf Leistungsdaten wie Lebendmassezunahme und Futtermittelverwertung selten vorhanden war (Simon 2003). Dagegen wurden in den meisten Fällen ein besserer Gesundheitsstatus und reduzierte Mortalität beobachtet. Als Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse wurde die Vielzahl von Einflussfaktoren (ausgewähltes Bakterium, Dosis, Lagerung, Diät, individueller Einfluss des Wirtstieres usw.) angenommen (Vanbelle et al. 1990; Simon 2005).

4.2.2 Durchfall und Ferkelverluste

Im vorliegenden Versuch zeigten sich zwischen den Versuchsgruppen Unterschiede bei den Durchfallparametern, die sich aber, wie oben beschrieben, nicht auf Lebendmasseentwicklung und Futtermittelverwertung niederschlugen.

Auswirkungen auf Häufigkeit von Durchfallerkrankungen wie auch auf Lebendmasseentwicklung wurden in der Vergangenheit beim Einsatz einer Vielzahl anderer probiotischer Präparate beobachtet (Vanbelle et al. 1990; Reid und Friendship 2002). Mit einem *Bifidobacterium lactis* HN019- Probiotikum konnte z.B. eine verringerte Ausscheidung von Coliformen und Rotaviren sowie schwächere Durchfallsymptome bei Schweinen beobachtet werden (Shu et al. 2001). Deutlich reduzierte Inzidenz von Diarrhöe wurde bei Verwendung eines *Bacillus cereus*- Präparates beschrieben (Zani et al. 1998).

Bei Infektionsversuchen mit pathogenen *E. coli* konnte vor einiger Zeit bei gnotobiotischen Ferkeln durch den Einsatz des *Streptococcus faecium* C68- Probiotikums eine deutliche Linderung der Krankheitssymptome und Mortalität erreicht werden (Underdahl et al. 1982; Underdahl 1983). Niedrigere Inzidenz und kürzere Erkrankungsdauer bei Diarrhöe bei Ferkeln wurden zudem schon mehrfach in neueren Versuchen mit *E. faecium* NCIMB 10415 festgestellt (Männer und Spieler 1997; Zeyner und Boldt 2006). Hier wurden den Tieren allerdings in der Starter- und Aufzuchtphase das Probiotikum in hohen Zellzahlen direkt oral eingegeben, die Muttertiere erhielten dagegen kein Probiotikum. Möglicherweise führt diese frühe Inokulation zu einer ähnlichen Übertragung wie die von uns beschriebene via maternale Faeces (Macha et al. 2004). Die Übertragung des Probiotikums vom Kot der Muttertiere auf die Ferkel konnte auch in einem nachfolgenden, weitgehend gleich aufgebauten Versuch mit *Bacillus cereus var. toyoi* beobachtet werden (Taras et al. 2005). Beim Menschen sind ähnliche Phänomene beschrieben worden (Tannock 2004).

In humanmedizinischen Studien wurde für *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 (SF68) in der Vergangenheit ebenfalls eine Linderung der Durchfallsymptome beispielweise bei Antibiotika- assoziierter Diarrhö beobachtet (Wunderlich et al. 1989; Marteau et al. 2001).

In dem dieser Arbeit zugrunde liegenden Versuch wurde während des Versuchszeitraums auf den kurativen Einsatz von Antibiotika / Chemotherapeutika bei Sauen und Ferkeln verzichtet. Bei den im Schnitt relativ hohen Saugferkelverlusten sowie der hohen Durchfallinzidenz bei den abgesetzten Ferkeln war die Dauer der Diarrhöe jedoch eher kurz und meist selbst-limitierend. Dies kann auf die insgesamt niedrige Häufigkeit von Pathogenitätsgenen bei den fäkalen *E. coli* des Versuchstierbestandes, insbesondere von relevanten Adhäsionsfaktoren wie F4 und F18, zurückgeführt werden (Frydendahl 2002).

Die günstigere Entwicklung der Durchfallerkrankungen in der Probiotikagruppe kann zum einen im Zusammenhang mit den geringeren Zahl an potentiell pathogenen *E. coli*- Isolaten aus Kot (als Indikator für eine geringere pathogene Belastung) gesehen werden. Auch im Ileum und Colon von Ferkeln dieses Versuchs sind verminderte Zahlen spezifischer pathogener *E. coli*- Serotypen gefunden worden (Tedin 2006). Im Zusammenhang mit günstigen Auswirkungen auf Leistungsparameter werden zudem positive Effekte einer veränderten bakteriellen Zusammensetzung im Kot der Mutter durch Modifikationen immunogener Faktoren in Kot und auch in der Milch diskutiert. Hinweise darauf konnten schon beim Vergleich von mit Muttermilch ernährten zu mit Säuglingsnahrung gefütterten Babys gefunden werden (Schanler 2000). Über die Wirkmechanismen herrscht vielfach noch Unklarheit, wobei für viele einzelne Bakterien der intestinalen Mikrobiota bereits Wechselwirkungen mit dem Wirtsorganismus auf molekularer Ebene aufgeklärt wurden (Falk et al. 1998; Mack et al. 1999; Hooper und Gordon 2001; Stokes et al. 2003). Wie essentiell die intestinale Bakteriengemeinschaft für die Entwicklung des Immunsystems ist, wurde an gnotobiotischen Mäusen und Schweinen gezeigt und in einzelnen Fällen direkte Interaktionen zwischen Bakterien und intestinalen lymphatischen Zellen nachgewiesen (Cebra 1999; Rhee, Sethupathi et al. 2004).

Mehrere Untersuchungen mit Probiotika bei Schweinen führten je nach Methode in letzter Zeit zu unterschiedlichen Ergebnissen. Nach Zugabe von (unter anderem) probiotischen Bakterien in Saugferkeldiäten konnten keine Veränderungen der Blut-Lymphozyten- und Granulozytenzahlen, jedoch verbesserte Leistungs- und mikrobielle Parameter beobachtet werden (Shim et al. 2005). Auch detailliertere Untersuchungen des Schleimhaut-Immunsystems aus verschiedenen Darmsegmenten von Schweinen zeigten kaum Einflüsse des zugefütterten probiotischen *E. coli* NISSLE (Duncker et al. 2006). Mit einem *Bifidobacterium lactis* HN019- Probiotikum konnten hingegen erhöhte T-Zell-Proliferation und phagozytotische Aktivität weiterer

Blutleukozyten neben verringerten Durchfallssymptomen beobachtet werden (Shu et al. 2001). Nach dem Absetzen zugefütterte *E. faecium* NCIMB 10415- Bakterien erniedrigten tendenziell die Serum- IgG- Spiegel bei Absetzferkeln (Broom et al. 2006). Beim Einsatz von *Bacillus cereus* var. *toyoi* und *Saccharomyces boulardii* wurde bei Mastschweinen ebenfalls eine Beeinflussung diverser Populationen lymphatischer Zellen in der Darmschleimhaut beobachtet (van Briel 2002).

Ferner konnten *in vitro* Auswirkungen probiotischer Bakterien auf das Immunsystem beobachtet werden. So wurde die Zytokinproduktion von Makrophagen durch Bifidobakterien stimuliert (Marin et al. 1997).

In Zusammenhang mit den Auswirkungen darmpathogener Bakterien konnten neben direkter Hemmung von Wachstum und Anheftung ferner anti- inflammatorische Effekte diverser Probiotika nachgewiesen werden, so z.B. die Hemmung der IL-8 Synthese in Enterozyten, die durch proinflammatorische Zytokine darmpathogener Krankheitserreger wie Salmonellen oder EHEC angeregt werden (Dahan et al. 2003; Bai et al. 2004; Nemeth et al. 2006).

Bei den Saugferkeln des hier untersuchten Versuchstierbestandes wurden im Rahmen des Teilprojekts C der Forschergruppe in der Probiotikagruppe erniedrigte epitheliale CD8+ - Lymphozytenzahlen im Jejunum im Vergleich zur Kontrollgruppe gemessen. Die Autoren sahen dort einen möglichen Zusammenhang mit erniedrigten Zahlen ebenfalls gemessener pathogener *E. coli* im Darm. Serum- IgG waren nach dem Absetzen in der Probiotikagruppe reduziert. Zu anderen Zeitpunkten wie auch bei anderen Parametern des Darmimmunsystems konnten keine Unterschiede beobachtet werden (Scharek et al. 2005). Reduziertes Serum- IgG nach dem Absetzen wurde auch in einem anderen Versuch mit *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 (SF68) bei Schweinen gefunden (Broom et al. 2006). Die verminderte vertikale Übertragung von *Chlamydia* spp. vom Muttertier auf das Ferkel lässt eine günstigere Abwehrlage bezüglich Neuinfektion bzw. ein kompetenteres Immunsystem der Saugferkel in der Probiotikagruppe vermuten (Pollmann et al. 2005).

Das *Enterococcus*- Probiotikum scheint also insbesondere vor dem Absetzen zu einer verminderten Immunantwort im Darm geführt zu haben. Dies könnte indirekt durch geringere pathogene Belastung oder durch direkte Hemmung oder Regulation immunologischer Reaktionen im Darm hervorgerufen worden sein. In der Humanmedizin wurde mehrfach von hemmenden Effekten probiotischer *Lactobacillus* spp. unter anderem auf intestinale T_{H2}- Lymphozyten und damit auf die überschießende Immunreaktion bei Nahrungsmittelallergien berichtet (Kirjavainen et al. 1999; Kirjavainen und Gibson 1999; Forchielli und Walker 2005; Isolauri et al. 2005). Möglicherweise leisten solche Mechanismen einen Beitrag zur beobachteten günstigeren Entwicklung von Durchfallerkrankungen beim Einsatz dieses Probiotikums.

4.3 Bakterielle Zellzahlen und Stoffwechselaktivitäten in Digesta

4.3.1 Zellzahlen in Digesta und Kot

4.3.1.1 Nachweis des Probiotikums

Der Nachweis lebensfähiger bzw. aerob kultivierbarer Zellen des zugefütterten probiotischen Bakteriums aus Kot und Digesta gelang mit der entwickelten und angewendeten Methode zuverlässig, wobei jedoch insbesondere in Digesta- Verdünnungen aus Proben mit relativ niedriger Trockenmasse die Zellzahlen wiederholt unter dem Detektionslimit zu liegen schienen. Die verwendete DNA- Sonde erwies sich dabei als spezifisch; das zugeführte Bakterium konnte sicher von den residenten intestinalen Enterokokken abgegrenzt werden.

4.3.1.2 Gesamt- Enterokokken und *E. faecium* NCIMB 10415

Der Bestimmung der Zellzahl des Genus *Enterococcus* kam insofern besondere Bedeutung zu, da zum einen das angewandte Probiotikum eben zu diesem Genus gehörte, zum anderen diverse Vertreter diesen Genus zur normalen intestinalen Mikrobiota des Schweins gehören (Devriese et al. 1994; Melin et al. 1997; Kuhn et al. 2003). Die Gesamtzahl der Enterokokken nach Zugabe des Probiotikums war deshalb ebenso interessant wie die spezifische Keimzahl des zugesetzten Keimes im Verdauungstrakt der Versuchstiere.

Die Bestimmung der Zellzahlen im Darm und Kot erfolgte in diesem Versuch durch aerobe Kultivierung auf einem sogenannten Selektiv- Nährmedium, in diesem Fall das *Slanetz- Bartley-* (SB-) Medium für Enterokokken, welches bereits für Membranfiltertechniken entwickelt und vom Hersteller auch angeboten wurde (Slanetz und Bartley 1957). Zur selektiven Kultivierung von Enterokokken aus komplexen Bakteriengemeinschaften wurden in der Vergangenheit eine Vielzahl von Medien entwickelt und angewandt. BETZL *et al.* (1990) identifizierten verschiedene Enterokokken- Spezies aus Milchprodukten mittels Koloniehybridisierung nach anaerober Kultivierung auf M17-Medium. Zur Isolation von Enterokokken aus dem Verdauungstrakt von Schweinen wurde ferner häufig CATC-Agar verwendet, der aber wegen zu hoher Karzinogenität nicht mehr verfügbar ist (Reuter 1992; Zentek et al. 1998; du Toit et al. 2000; Peters 2003).

Andere regelmäßig dafür verwendete Medien wie z.B. BEA / Bile-Esculin-Agar zeigen auch nach eigenen Untersuchungen vergleichbare Zellzahlen (Daten nicht gezeigt), eignen sich aber nicht für Membranfiltertechniken wie die Koloniehybridisierung (Leuschner et al. 2002).

Wie bereits erwähnt war bei diesen Untersuchungen der Anteil der unspezifisch auf dem Medium wachsenden Bakterien bei Verwendung von Proben aus dem Verdauungstrakt relativ hoch. Insbesondere *Lactobacillus* spp. konnten als weiße Ko-

lonien regelmäßig bei der Kultivierung beobachtet werden. Diese Phänomene wurden auch von anderen Autoren beschrieben (Hojberg et al. 2005).

Spätere Untersuchungen im Institut für Tierernährung zeigten, dass bei anaerober Inkubation auf SB-Agar Farbstoff- umsetzende Kolonien in erheblich höheren Zahlen zu beobachten waren (Daten nicht gezeigt). Von daher stellt sich die Frage, wie viele der intestinalen Enterokokken, die im Darm an eine mikroaerophile bis anaerobe Umgebung angepasst waren, unter aeroben Bedingungen voll kultivierbar sind. Mehrere Autoren konnten bei anderen intestinalen Bakterien teilweise deutlich niedrigere Zellzahlen durch Messung der KbE/g Feuchtmasse im Vergleich zu molekularbiologisch markierten (FISH) mikroskopischen Zellzahlen messen (Roszak und Colwell 1987; Taras 2001). Eine nach Abschluss dieser Untersuchungen an demselben Untersuchungsmaterial durchgeführte Kultur- unabhängige Zellzahlbestimmung durch einen quantitativen Real-Time-PCR Assay ergab - nach Abgleich mit einer entsprechenden Eichreihe, der DNA- Extrakte aus mit definierten Zellzahlen beimpften, zuvor autoklavierten Kot zugrunde lagen - regelmäßig höhere errechnete Zellzahlen für *E. faecium* NCIMB 10415 als bei der Koloniehybridisierung gezählt wurden (Vahjen et al. 2006). Auch nach weiteren, in den letzten Jahren publizierten Studien muss die Kultivierung als Methode zum Nachweis lebender Bakterien im Verdauungstrakt in diesem Fall kritisch hinterfragt werden. An Bifidobakterien und Laktokokken wurde gezeigt, dass nach Lagerung bzw. Stressfaktoren die durch quantitative Real-time- Polymerase-Kettenreaktion, Lebend-Tot-Färbung und Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) ermittelten Zellzahlen erheblich höher lagen als durch Kultivierung gemessen (Bunthof et al. 2000; Lahtinen et al. 2005).

Bei bestimmungsgemäßer Anwendung und aerober Inkubation der Proben auf SB-Agar muss daher bezüglich der Gesamtzahl der Enterokokken genauer von *aerob kultivierbaren* Enterokokken gesprochen werden. Dabei ist ferner bei der Interpretation der Werte zu bedenken, dass koloniebildende Einheiten eigentlich nur der Nachweis einer *in vitro* vermehrungsfähigen Zelle sind. Ob dieser Organismus aktiv im Darmökosystem mitgewirkt hat, also *in vivo* stoffwechselaktiv war oder den Verdauungstrakt nur inaktiv passiert hat, ist mit der Messung der spezifischen Zellzahl im Kot nicht zu erkennen (Vanbelle et al. 1990).

Die gemessenen Zellzahlen der Gesamt- Enterokokken beider Versuchsgruppen in Kot und Digesta entsprechen weitgehend denen anderer Autoren, unabhängig von den verwendeten Nährmedien (De Cupere et al. 1992; Gedek et al. 1993; Gößling 2001; Klüß 2004; Hojberg et al. 2005).

Im Gruppenvergleich waren keine signifikant erhöhten Gesamt- Enterokokkenzahlen in der Probiotikagruppe feststellbar. Somit kann angenommen werden, dass die Zahl der zugeführten Enterokokken im Vergleich mit den residenten Enterokokken

keine Rolle spielt. Auffallend war, dass schon bei den Saugferkeln der Probiotikagruppe am 14. Tag spezifische Zellzahlen des Probiotikums regelmäßig nachweisbar waren, ohne dass Probiotika- supplementiertes Futter angeboten worden war. Dies weist auf eine direkte Übertragung des Probiotikums von der Mikrobiota des Muttertieres auf die Ferkel hin.

Ferner kam es nach Zufütterung des Probiotikums ab dem 14. Tag und nach dem Absetzen zu keinen weiteren Erhöhungen der spezifischen Zellzahlen, so dass davon ausgegangen werden kann, dass eine übermäßige Zuführung des Probiotikums die Kapazität des lokalen Darm- Ökosystems überschreitet und sich „überschüssige“ Enterokokken nicht weiter halten können.

4.3.1.3 Bakterielle Zellzahlen in Digesta

Insgesamt differierte die Zellzahl kultivierbarer Enterokokken, Coliformen, Milchsäurebakterien und Gesamt- Anaerobiern im Darm vor dem Absetzen nur selten deutlich zwischen den Gruppen. Nach dem Absetzen wurden vereinzelt signifikante Unterschiede bei den einzelnen Bakteriengruppen in den verschiedenen Darmabschnitten gefunden. So waren die Zahlen der Gesamt- Anaerobier und Milchsäurebakterien im Ileum (35. Tag) und im Colon (56. Tag) der Probiotikagruppe teilweise signifikant erhöht. Ein deutlicher Einfluss der Zufütterung des Probiotikums auf die messbare Anzahl intestinaler Bakterien ist aber als unwahrscheinlich anzusehen.

Über die Auswirkungen der Mikrobiota im Verdauungstrakt auf den Energiebedarf eines Wirtsorganismus wurde in der Vergangenheit häufig diskutiert. Schon lange ist bekannt, dass die energieaufwändige epitheliale Erneuerungsrate bei keimfreien Versuchstieren nur halb so hoch ist wie bei unter normalen Bedingungen gehaltenen (Savage et al. 1981). Dagegen wurde ebenso gezeigt, dass keimfreie gehaltene Ratten 30% mehr Energie für ihren Grundumsatz benötigen als konventionell aufgezogen Tiere [(Wostmann et al. 1983), zitiert bei (Hooper et al. 2002)].

Leistungsfördernde Effekte einer reduzierten intestinalen, bakteriellen Gesamt-Zellzahl wurden vielfach in Zusammenhang mit unter anderem antibiotischen Leistungsförderern beobachtet und als Ursache die erhöhte Nährstoffverwertung und reduzierter Energieverbrauch des Verdauungstraktes und des Immunsystems vermutet (Gaskins et al. 2002; Collier et al. 2003; Hojberg et al. 2005). Reduzierte Zellzahlen von bestimmten Bakteriengruppen wie z.B. Enterobakterien wurden mehrfach bei mit Probiotika behandelten Tieren gefunden (Reuter 1997; Adami und Cavazzoni 1999; Shu et al. 2001; Jadamus et al. 2002; Gardiner et al. 2004). Solche Auswirkungen konnten in diesem Versuch nicht beobachtet werden. Genaue Wirkmechanismen konnten in diesen Untersuchungen aber nie direkt aufgezeigt werden, vermutet wurden aber in der Vergangenheit immer wieder die für

Probiotika angenommenen und häufig *in vitro* beobachteten Effekte wie „competitive exclusion“ bzw. Konkurrenz um mucosale Bindungsstellen im Darm (Genovese et al. 2000; Jin et al. 2000; Lee et al. 2000; Reuter 2001; Styriak et al. 2003), Produktion antimikrobieller Substanzen oder Metabolite (Franz et al. 1999; Altenhoefer et al. 2004; Chaveerach et al. 2004; Collado, Gonzalez et al. 2005), Aktivierung spezifischer Gene in der Darmschleimhaut (Mack et al. 1999) sowie spezielle Induktionen des Darmimmunsystems durch probiotische Bakterienstämme (Falk et al. 1998; Cebra 1999; Fuller 1999; McCracken 1999; Erickson und Hubbard 2000).

In der Vergangenheit sind mehrfach Unterschiede zwischen mikroskopischen Zellzählungen und Kultivierung beobachtet worden (Savage 1977; Moore et al. 1987). Differenzen wurden auch bei intestinalen *E. coli* beim Vergleich von Zellzahlen aus Koloniebildenden Einheiten (KbE) zu durch Fluoreszenz- In- Situ- Hybridisierung (FISH) ermittelte Zellzahlen beobachtet (Taras 2001). Dabei kann zwar wie auch bei der Real-Time- Polymerase-Kettenreaktion nicht direkt zwischen lebenden und abgestorbenen Zellen unterschieden werden, zumindest aber intakte Zellen gemessen werden. Spezielle Lebend-Tot-Färbungen ermöglichen jedoch auch dieses (Breeuwer und Abee 2000; Lahtinen et al. 2005). Das Problem lebensfähiger, aber nicht kultivierbarer Bakterien wurde bereits bei ROSZAK (1987a) ausführlich beschrieben und auch bei anderen Autoren wiederholt diskutiert (Roszak und Colwell 1987; Bunthof et al. 2000; Colwell 2000; Lahtinen et al. 2005).

MOUNTZOURIS *et al.* (2006) konnten zudem mit DAPI-Färbung (für die Gesamt-Zellzahl) und gruppenspezifischen 16s r-DNA- Sonden (FISH) zeigen, dass beim Schwein im hinteren Verdauungstrakt die Gruppen *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Clostridium*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus/Enterococcus* und *E. coli* nur zwischen 10-22% der gesamt- Zellzahlen im Darminhalt (Colon ascendens bis Rectum) ausmachen, im Grunde also nur einen kleinen Anteil an der gesamten intestinalen Bakteriengemeinschaft darstellen (Mountzouris et al. 2006). Hinweise darauf gab auch die phylogenetische Analyse der Darmflora beim Schwein, bei denen 83% der gewonnenen Klone von vermutlich unbekanntem Bakterienarten stammten (Leser et al. 2002). Vor diesem Hintergrund muss die Bedeutung der bisher klassisch kultivierbaren Bakteriengruppen in den einzelnen Darmabschnitten möglicherweise neu bewertet werden, insbesondere im Hinblick auf ihre Aussagekraft in bezug auf künstlich verursachte Veränderungen der intestinalen Mikrobiota, wie sie z.B. durch Probiotika hervorgerufen werden sollen.

4.3.2 Bakterielle Stoffwechselaktivität in Digesta

Die Konzentrationen flüchtiger Fettsäuren (FFS), Laktat und Ammoniak wurden als Indikatoren für die bakterielle Stoffwechselaktivität herangezogen. Ferner sind diese Stoffwechselprodukte für das Tier als Energiequelle von Bedeutung. So kann Laktat vom Organismus über die Gluconeogenese zur Energiegewinnung genutzt werden, ist für die enterale Calcium- Resorption notwendig und soll zudem bakteriostatisch gegenüber potentiell pathogenen Mikroorganismen wirken (Nousiainen 1993; Koolman und Röhm 1994). Ferner hat Laktat maßgeblichen Einfluss auf den pH des Dünndarms (Sakata et al. 1999). Butyrat wird hauptsächlich im intestinalen Epithel verwertet, obwohl es auch im peripheren Blutkreislauf nachgewiesen wurde (Imoto und Namioka 1978; Bach Knudsen et al. 2003). Propionat wird über die Pfortader in der Leber der Gluconeogenese zugeführt, Acetat gelangt ebenfalls über das Blut in die peripheren Gewebe und wird dort direkt in den Fettstoffwechsel eingespeißt (Bergman 1990; Cummings und Macfarlane 1997; Stryer 2003). FFS wie Acetat, Propionat, Butyrat und Valeriat enthalten noch mehr als 60% der Energie aus den für den Wirt nicht verdaulichen Kohlehydrate und stehen dem Wirt so wieder zur Verfügung. So wird vermutet, dass Monogastrier zwischen 20-30% ihres Energiebedarfs über Metabolisierung von FFS decken (Bergman 1990; Cummings und Macfarlane 1991).

Übermäßige Produktion von FFS kann sich theoretisch aber auch negativ auf das Wirtstier auswirken. Auswirkungen von Laktat auf den Säure-Base-Haushalt und Mucosa werden eindrucksvoll bei der Pansenazidose der Wiederkäuer deutlich. Auch wenn bei Monogastriern solche Mengen an Laktat nicht anfallen würden, wird z.B. beim Einsatz D-Laktat- produzierender Probiotika bei Kindern die Unbedenklichkeit dieses Metaboliten in Frage gestellt (Mack 2004). *In vitro* wurden sogar zytotoxische Effekte verschiedener FFS in physiologischen Konzentrationen beobachtet (Sakurazawa und Ohkusa 2005). Ferner werden durch Butyrat und Acetat eine Reihe energieaufwändiger Prozesse in der Mucosa induziert, wie die erhöhte Expression von Muzinen, erhöhter epithelialer turnover und erhöhte Aktivität des Immunsystems (Mack et al. 1999; Hooper et al. 2002; Nilsson et al. 2003). Inwieweit dieser erhöhte Energieaufwand durch die oben beschriebene Verwertung der FFS wieder wettgemacht wird, ist unklar. Bei gnotobiotisch aufgezogenen Tieren werden jedoch häufig bessere Zunahmen beobachtet als bei konventionell gehaltenen (Shurson et al. 1990; Kocher et al. 2004).

Die Konzentrationen der bakteriellen Metabolite wurden im Gruppenvergleich in den Darmabschnitten sowie vergleichend vor und nach dem Absetzen beurteilt.

Die wenigen beobachteten, nicht signifikanten Unterschiede bei den FFS und Laktat vor dem Absetzen lassen relevante Auswirkungen des Probiotikums auf diese Parameter unwahrscheinlich erscheinen. Bei den Ammoniak- Konzentrationen am 14.

Tag lagen im Jejunum zunächst tendenziell niedrigere Werte in der Kontrollgruppe vor, am 28. Tag zeigten sich jedoch im Magen und Colon tendenziell bis signifikant niedrigere Werte in der Probiotikagruppe. Sofern das Probiotikum an der Reduktion der Ammoniak-Werte beteiligt ist, könnte hier erst ab dem 14. Tag zusätzlich angebotene Starterfutter mit enthaltenem Probiotikum eine positive Wirkung entfalten zu haben. Das über die Faeces der Mutter aufgenommene Probiotikum schien diesbezüglich nicht ausgereicht zu haben.

Nach dem Absetzen zeigten sich weiterhin kaum Unterschiede bei den FFS und Laktat, generell war jedoch im vorderen Verdauungstrakt (Magen und Jejunum) eine Woche nach dem Absetzen (35. Tag) in beiden Gruppen ein Anstieg der Laktatkonzentrationen zu verzeichnen. Da die Laktatbildung vor allem vom Nahrungsangebot wie auch von der Zahl der Milchsäurebakterien abhängig ist (Williams 2003), war dies eine Woche nach der Umstellung auf Getreidefutter zu erwarten. Dies wurde auch bei anderen Untersuchungen beobachtet, wobei die dort zugefütterten Kohlehydratquellen dabei zusätzlichen Einfluss auf die Aktivität der Laktatproduzierenden Mikroorganismen zu haben schienen (Mathew et al. 1997; Mathew, Upchurch et al. 1998; Canibe et al. 2001; Franklin et al. 2002; Scholten et al. 2002).

Acetat war dagegen nach dem Absetzen (35. Tag) nur in der Probiotikagruppe deutlich erhöht. Acetat kann als Hauptbestandteil der Gesamt-FFS als Indikator für die gesamtbakterielle Aktivität angesehen werden und zeigt so einen erhöhten bakteriellen Kohlehydratabbau im Dünndarm an. Über die Ursachen dieser höheren Werte kann nur spekuliert werden, ein direkter Einfluss des probiotischen *Enterococcus* kann aber ausgeschlossen werden, da dieser vornehmlich Laktat produziert. Erhöhter Kohlehydratabbau im Dünndarm durch höhere Aktivität und/oder Zellzahl residenter Darmbakterien wird in der Literatur unterschiedlich in bezug auf relevante Nährstoffverluste bewertet (Savage 1986; Gaskins et al. 2002; Collier et al. 2003; Hojberg et al. 2005). Beim Vergleich der Menge bakterieller und wirtseigener Enzyme im Dünndarm und der hohen Resorptionskapazität des Wirtstieres im Vergleich mit intestinalen Bakterien in diesen Darmabschnitten sind relevante Nährstoffverluste an verdaulichen Kohlehydraten aber eher unwahrscheinlich.

Bei den übrigen gemessenen FFS wurden im zentralen Jejunum keine Unterschiede festgestellt. FRANKLIN *et al.* (2002) beobachteten dagegen einen generellen Abfall der FFS im gesamten Verdauungstrakt konventionell gehaltener Ferkel nach dem Absetzen wie auch MATHEW *et al.* (1994) speziell im Ileum. Allerdings muss hier bemerkt werden, dass diese Messungen teilweise 2-3 Tage nach dem Absetzen durchgeführt wurden. So kurz nach dem Absetzen sind nach eigenen Erfahrungen noch sehr geringe Futteraufnahmen an Getreidefutter zu erwarten, da die meisten Ferkel während der ersten Tage kaum Futter aufnehmen. Somit könnte sich eine entsprechende bakterielle Aktivität noch nicht entwickelt haben.

Ein messbarer Anstieg der entsprechenden Zellzahlen von Milchsäurebakterien und Enterokokken konnte dagegen nicht beobachtet werden (s. 4.3.1.3).

Bei den Ammoniak- Konzentrationen schienen im vorderen Verdauungstrakt nach dem Absetzen wie auch schon am 28. Tag niedrigere Konzentrationen in der Probiotikagruppe vorzuliegen, was auf reduzierte bakterielle Proteolyse oder erhöhte bakterielle Verwertung des Ammoniaks in diesem Abschnitt hinweist. Da Ammoniak ein Zellgift ist und zudem die Verwertung anderer energiereicher Metabolite wie Butyrat hemmt (Darcy-Vrillon et al. 1996), kann dies als positive Wirkung der Probiotika-Supplementierung verstanden werden. Ein Bezug zu gemessenen Zellzahlen der verschiedenen Bakteriengruppen konnte in dieser Untersuchung aber nicht hergestellt werden.

Bei den bakteriellen Stoffwechselprodukten im hinteren Verdauungstrakt zeigten sich im Colon bei den FFS, Laktat und Ammoniak keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die Zufütterung des *E. faecium*- Probiotikums die messbare Stoffwechselaktivität der Mikrobiota des hinteren Verdauungstraktes weder direkt (als homofermentativer *Enterococcus* über Laktat) noch indirekt, z.B. durch Begünstigung der kohlehydratspaltenden Mikrobiota, beeinflusst (Holt et al. 1994; Macfarlane und Macfarlane 2003). Dagegen hat SAKATA *et al.* (1999, 2003) in Versuchsansätzen mit Chymusproben aus dem Caecum von Schweinen *in vitro* eine Erhöhung der FFS sowie eine Reduktion von Ammoniak durch Probiotika – Applikation beobachten können (Sakata et al. 1999; Sakata et al. 2003). Beim Einsatz eines *Bacillus*- Probiotikums konnte bei Schweinen bessere Stickstoffretention bei niedrigeren Blut- Ammoniak- Werten beobachtet werden (Scheuermann 1993). Bei Puten und Hunden wurde nach Zufütterung des gleichen Probiotikums erhöhte Laktat- Konzentrationen bzw. erhöhte Aktivität der Milchsäurebakterien wie auch erhöhte Enterokokkenzahlen im Dünndarm gemessen (Zentek et al. 1998; Vahjen et al. 2002). Im übrigen konnte das vielfach beschriebene signifikante Absinken der Konzentrationen flüchtiger Fettsäuren nach dem Absetzen (Mathew et al. 1994; Franklin et al. 2002) in diesem Versuch nicht festgestellt werden, wie auch andere Autoren berichteten (Klüß 2004).

Insgesamt scheinen durch die Anwendung des Probiotikums im Jejunum nach dem Absetzen vereinzelt Veränderungen der bakteriellen Aktivität, insbesondere der Stoffwechselaktivität einzelner Gruppen, sichtbar zu sein. Ein Zusammenhang mit geringerer Durchfallhäufigkeit und – Dauer in der Probiotikagruppe kann damit aber nicht hergestellt werden.

Allenfalls die tendenziell bessere Futtermittelverwertung (G:F) der Tiere der Probiotikagruppe könnte unter anderem durch eine geringere Belastung z.B. durch Ammoniak mit verursacht worden sein. Einige Autoren berichteten kürzlich über verbesserte Leistungs- und Gesundheitsparameter bei verminderten, Diät- abhängigen Ammoni-

ak-Konzentrationen im Darm (Bikker et al. 2006; Nyachoti et al. 2006). Bei den vielen weiteren möglichen Einflussfaktoren und den nur vereinzelt signifikanten Unterschieden in diesem Versuch muss diese Ableitung jedoch unter Vorbehalt ausgesprochen werden.

Die Ergebnisse der anderen bakteriellen Stoffwechselprodukte (FFS, Laktat) außer Ammoniak lassen insbesondere in Bezug auf die gemessenen Zellzahlen keine Aussagen über messbare Auswirkungen des verwendeten Probiotikums zu. Hinsichtlich der Methode muss jedoch erwähnt werden, dass sich die luminalen Konzentrationen dieser Substanzen in einem dynamischen Gleichgewicht zwischen Synthese, Abtransport durch die Mucosa und weiterer Metabolisierung befinden. Mit den gewählten Methoden sind vermutlich nur starke Einflussfaktoren, die dieses Gleichgewicht verschieben können, messbar.

4.4 Molekularbiologischer Nachweis von *E. coli*- Pathogenitätsgenen im Kot

Pathogene *E. coli*- Bakterien sind neben *Brachyspira* spp., *Lawsonia intracellularis* und Rotaviren die häufigsten Durchfallerreger bei aufwachsenden Schweinen, gefolgt von Coronaviren, Kryptosporidien, Kokzidien und Clostridien (Jonsson 1992; Herbst et al. 2004; Katsuda et al. 2006). Sie spielen damit eine große Rolle bei krankheitsbedingten, ökonomischen Verlusten in der Schweinehaltung (Wieler et al. 2001). Insofern waren die möglichen Auswirkungen des verwendeten Probiotikums auf das Vorkommen potentiell pathogener *E. coli* im Versuchstierbestand von besonderem Interesse.

Bei der Häufigkeit und Verteilung der neun untersuchten Pathogenitätsgene der fäkalen *E. coli*- Isolate im Gruppenvergleich konnten Unterschiede in Bezug auf das Auftreten bestimmter Genkombinationen wie auch auf das Vorkommen von Isolaten, die keine der untersuchten Sequenzen aufwiesen, dargestellt werden.

Überprüfung auf statistische Signifikanz war aufgrund der großen Anzahl an Kombinationsmöglichkeiten nicht möglich.

Insgesamt war eine große Variabilität bezüglich Häufigkeit und Verteilung der Pathogenitätsgene in beiden Gruppen zu verzeichnen. Der überwiegende Anteil der Isolate wies keines der untersuchten Gensequenzen auf, wobei die Prozentsätze je nach Probenzeitpunkt und Zugehörigkeit zur Versuchsgruppe variierten. Die Gene *fae* und *fedA* (für F4- und F18- Antigene) wurden in der Vergangenheit als Parameter bei der Diagnose der *E. coli*- induzierten Diarrhöe der Absetzferkel vorgeschlagen (Frydendahl 2002). Diese Sequenzen waren bei den gesunden Ferkeln des Versuchstierbestandes insgesamt eher selten (<5% für beide Gene mit Ausnahme des 28. Tages). Adhäsionsgene traten allgemein in relativ geringer Zahl auf. Ähnliche Verhältnisse beschrieben OSEK *et al.* (1999), wobei in dieser Untersuchung nur eine relativ geringe Anzahl Isolate aus gesunden Schweinen untersucht wurde. Dagegen wurde kürzlich von wesentlich höheren Anteilen Pathogenitätsgen-tragender *E. coli*- Isolate im Kot von gesunden, sechs Wochen alten Absetzferkeln berichtet, die unter vergleichbaren Bedingungen wie in dem vorliegenden Versuch gehalten wurden (Schierack, Steinruck et al. 2006).

Um die ursächlichen Auslöser für Durchfallerkrankungen bei Schweinen zu identifizieren, muss neben der Belastung mit potentiell pathogenen *E. coli* sicherlich der Immunstatus bei erkrankten Tieren in Zukunft näher untersucht werden. Mehrere Veröffentlichungen berichten davon, ohne dabei näher auf die zeitliche Fluktuation der Gene bei den Tieren einer Gruppe einzugehen (Kwon et al. 1999; Osek 1999; Frydendahl 2002; Ha et al. 2003). Insbesondere der Zustand der intestinalen Mikrobiota hinsichtlich Diversität und Besiedlung der Mucosa wie auch der Immunstatus zum Zeitpunkt der Exposition gegenüber potentiell pathogenen Bakterien scheinen dabei maßgeblich zu sein. Darauf weisen die gehäuft um den Absetz- Zeitraum beobachteten

Durchfallerkrankungen wie auch die verringerte Diversität kommensaler *E. coli* hin (Melin et al. 1997).

Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigen eine komplexe, dynamische Zusammensetzung der fäkalen *E. coli*- Population, die bei gesunden Tieren als Teil der normalen kommensalen Darmflora angesehen werden können (Schierack, Steinruck et al. 2006; Tedin 2006). Nach dem Absetzen kam es bei den Tieren beider Gruppen zu einem deutlichen Anstieg Pathogenitätstragender *E. coli*, wobei dieser Anstieg in der Probiotikagruppe in deutlich geringerem Maße zu beobachten war. Auch die Diversität der Genkombinationen nahm deutlich ab. Hinweise auf eine reduzierte fäkale Diversität der Coliformen kurz nach dem Absetzen und höhere Anteile Pathogener wurden bereits bei MELIN *et al.* (1997) beschrieben.

Hohe Fluktuationen bei der genetischen Zusammensetzung fäkaler *E. coli* wurden bei Menschen und Kälbern beobachtet (Akiba et al. 2000; Schlager et al. 2002), und auch innerhalb des Verdauungstraktes unterscheiden sich die Populationen von *E. coli* genetisch in erheblichen Maße (Dixit et al. 2004). Dies mag unter anderem durch die in der Regel hohe Mobilität der Pathogenitätsgene dieser Spezies erklärbar sein, deren Sequenzen mit einzelnen Ausnahmen (hier z.B. fimf41a) auf Plasmiden liegen (Nagy und Fekete 1999; Schierack, Steinruck et al. 2006; Wu et al. 2007). Dass *E. coli*- Bakterien solche Gene innerhalb kürzester Zeit abstoßen oder aufnehmen können, konnte sowohl *in vivo* (Casey und Moon 1990) wie auch *in vitro* gezeigt werden (Karch et al. 1992; Blanco et al. 1997). Auch in diesem Versuch wurden bei stichprobenartig rekultivierten *E. coli*- Isolaten die Sequenzen, die bei der ersten Untersuchung festgestellt wurden, nicht immer wieder nachgewiesen. Ferner wurden bei diesen rekultivierten Isolaten eine Serotypisierung durch das Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen der Freien Universität Berlin vorgenommen. Diese zeigte, dass die nachgewiesenen Gene scheinbar nicht immer exprimiert wurden (Daten nicht gezeigt). Dass Serotyp und Genotyp bei *E. coli* nicht immer übereinstimmen, ist bekannt und muss bei der Beurteilung des diagnostischen Wertes dieser PCR- Nachweise berücksichtigt werden (Nagy et al. 1999).

Der Einfluss der Methode, insbesondere das Einfrieren und Auftauen der Isolate kann als Ursache für den offensichtlichen Genverlust bzw. ausgebliebene Genexpression ebenfalls in Betracht gezogen werden (Tedin 2006).

In diesem Versuch traten bis zum 14. Tag sowie eine Woche nach dem Absetzen (35. Tag) mehr PCR- negative Isolate in der Probiotikagruppe auf. Beide Zeiträume können als maßgeblich bei der Entwicklung der Darm- Mikrobiota bei Ferkeln angesehen werden.

In der Probiotikagruppe scheint das verwendete Bakterium demnach in dieser Konzentration Auswirkungen auf das Auftreten potentiell pathogener *E. coli*- Bakterien zu haben. Parallele Untersuchungen der Forschergruppe fanden zudem um 50% reduzierte Nachweishäufigkeit für das mit Pathogenität assoziierte *E. coli* Serovar O141 wie auch

verminderte Zahlen intraepithelialer CD8+ Lymphozyten in der Dünndarmschleimhaut (Scharek et al. 2005; Tedin 2006).

Welche Mechanismen diesem Phänomen in diesem Fall auf zellulärer bzw. molekularer Ebene zugrunde liegen bleibt eine für die Zukunft zu klärende Frage. Das geringere Auftreten von Isolaten mit Pathogenitätsgenen in der Probiotikagruppe könnte zum einen damit erklärt werden, dass sich *E. coli*, welche diese Gene exprimieren, in Anwesenheit des Probiotikums schlechter im Darm anheften und vermehren könnten, also quasi nur Passanten wären. Ferner könnte es aufgrund von bakteriellen oder Wirts-induzierten Stressfaktoren zum Verlust der entsprechenden Plasmide bzw. Gene kommen.

In der Vergangenheit sind vielfach Auswirkungen von probiotischen Bakterien auf pathogene Erreger beschrieben worden. Neben den bereits erwähnten, *in vitro* beobachteten Mechanismen wie der Produktion von antimikrobiellen Substanzen oder Metaboliten (Franz et al. 1999; Chaveerach et al. 2004; Collado, Gonzalez et al. 2005) wurde auch häufig Konkurrenz um Bindungsstellen im Darm beobachtet (Tuomola et al. 1999; Lee et al. 2000; Styriak et al. 2003). In Versuchen wurde mit *Lactobacillus* spp. speziell die Adhäsion von enterohämorrhagischen *E. coli* Serovar O157:H7 auf Darmzelllinien *in vitro* gehemmt (Johnson-Henry et al. 2006). Mit einigen aus Geflügel und Schweinen isolierten *Bacillus* spp. konnte im Agardiffusionstest eine Hemmung des Wachstums von *E. coli* K88,K99, *Salmonella enterica* ssp. typhimurium und *Staphylococcus aureus* beobachtet werden (Guo et al. 2006). Auch bei Verwendung eines *E. faecium* – Probiotikums (als Kultur und Überstand) konnte dosisabhängig eine Hemmung der Adhäsion von *E. coli* K88 an Dünndarm- Mucus von Schweinen beobachtet werden, die nach Meinung der Autoren durch Expression einer Substanz, die zu einer Konkurrenz um Bindungsstellen führte, hervorgerufen wurde (Jin et al. 2000). Ferner konnte in Zellkulturen eine Adhäsionshemmung von sogenannten attaching - effacing EPEC durch zwei verschiedene *Lactobaccillus*- Stämme hervorgerufen werden, wobei hier zusätzlich noch eine Induktion der Genexpression verschiedener Muzin-Gene im Epithel durch die verwendeten Bakterien demonstriert werden konnte (Mack et al. 1999). Mit dem probiotischen *E. coli* NISSLE wie auch mit anderen apathogenen *E. coli* konnte die *Salmonella*- Invasion sowie die Adhäsion von EPEC an Epithelzellen gehemmt werden (Altenhoefer et al. 2004; Kleta et al. 2006). Erste Untersuchungen der Forschergruppe (Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen) zeigten ebenfalls eine Hemmung der *Salmonella*- Invasion in vom Schwein isolierte IPEC-J2 Zellen nach vorheriger Inkubation mit Zellsuspension und Kulturüberstand von *E. faecium* NCIMB 10415 (Schierack et al. 2003; Schierack, Nordhoff et al. 2006; Tedin 2006). Einer kürzlich veröffentlichten Untersuchung zufolge konnte im Infektionsversuch durch eine vorherig verabreichte Mischung verschiedener *Lactobacillus* spp. sowie einer *Pedio-*

coccus sp. klinische Symptome und fäkale Ausscheidung von *Salmonella enterica* ssp. typhimurium bei Schweinen deutlich reduziert werden (Casey et al. 2007).

In den meisten der oben genannten Untersuchungen waren die erwähnten Effekte nur nach vorheriger Anwendung / Inkubation der probiotischen Bakterien zu beobachten, was darauf schließen lässt, dass für die positive und protektive Wirkung dieser Bakterien die initiale Besiedlung der Mucosa vor Kontakt mit Pathogenen von essentieller Bedeutung ist.

Da in diesem Versuch bei Anwendung des Probiotikums zu den gewählten Probenzeitpunkten jedoch keine numerische Reduktion der Gesamt- Coliformen in Digesta und Kot zu beobachten war, müssen diese Mechanismen entweder selektiv gegen pathogene Spezies von *E. coli* wirken oder beispielsweise nur an den mucosalen Grenzflächen eine Rolle spielen, wie dies auch in diesem Versuch beim *E. coli* Serovar O141 bereits beobachtet wurde (Scharek et al. 2005; Tedin 2006). Bei *E. faecium* NCIMB 10415 konnte keines der bekannten Enterocine detektiert werden, jedoch wurde vor einiger Zeit ein 4,5kD großes Enterocin- ähnliches Peptid isoliert, dessen Aminosäuresequenz aber zur Zeit noch nicht entschlüsselt ist (Foulquie Moreno et al. 2003). Hinweise auf das Vorhandensein eines Protein- artigen Produktes zeigte auch der Verlust der Wirksamkeit des Kulturüberstandes bei den beschriebenen *Salmonella*- Invasions- Experimenten nach Behandlung mit einer Protease (Tedin 2006). Bei der Bedeutung der beobachteten Effekte bezüglich der Wirksamkeit *in vivo* muss beachtet werden, dass die in den Versuchen verwendeten hohen Zellzahlen bzw. Konzentrationen an wirksamer sezernierter Substanz *in vivo* nicht erreicht werden können. Insbesondere die beschriebenen Zellzahl- abhängige Hemmungen z.B. bei der Adhäsion pathogener Bakterien an Mucus lassen eine Wirksamkeit *in vivo* unwahrscheinlich erscheinen. Es ist eher vorstellbar, dass diese Mechanismen im Kontext mit anderen vermuteten Effekten der Probiotika die Widerstandsfähigkeit des Wirtes gegenüber Infektion mit Pathogenen verbessern könnten.

4.5 Diversität und Ähnlichkeit der fäkalen Bakteriengemeinschaft im Gruppenvergleich

Die Ähnlichkeit der bakteriellen Zusammensetzung der Kotproben zueinander wurde durch Berechnung des sogenannten Sørensen- Koeffizienten aus den DGGE- Bandenmustern dargestellt. Da jede Kotprobe in der DGGE ein individuelles Bandenmuster erzeugte, konnten so die Einzelproben innerhalb einer Gruppe und gegenüber den Proben aus der anderen Gruppe verglichen werden. Dabei fiel auf, dass sich die bakterielle Zusammensetzung in den Ferkelkotproben innerhalb der Probiotikagruppe deutlich mehr ähnelte als wenn man Kotproben aus den beiden Gruppen gegeneinander verglich.

Demnach scheint die Zufütterung des Probiotikums die bakterielle Zusammensetzung des Ferkelkotes zu beeinflussen. Auch in weiteren Untersuchungen der Forschergruppe konnten bei den Sauen der beiden Versuchsgruppen vor der Geburt stärkere Veränderungen in der bakteriellen Zusammensetzung im Kot nach Zufütterung des Probiotikums als bei gleichbleibender Diät beobachtet werden (Taras 2006).

Da die bakterielle Zusammensetzung auch innerhalb der Kontrollgruppe insbesondere am 56. Tag ähnlicher als im Gruppenvergleich war, muss aber auch der Einfluss der Umgebung in Betracht gezogen werden, da sowohl Muttertiere als auch Ferkel in räumlich getrennten Stallungen gehalten wurden.

Die bei der Untersuchung festgestellten signifikanten Unterschiede in der Ähnlichkeit der bakteriellen Gemeinschaft im Kot können dennoch mit einem deutlichen Einfluss des zugefütterten probiotischen Bakteriums auf die Zusammensetzung der Darm- bzw. Kot- Mikrobiota erklärt werden. Da nach Untersuchungen zur Validierung der Extraktionsmethode bei der DGGE aus Kotproben je nach verwendetem Bakteriengenus eine Nachweisgrenze von $10^5 - 10^7$ Zellen/g Kot vorlag, ist hier eine direkte Messung des zugegebenen Enterococcus als unwahrscheinlich anzusehen (Daten nicht gezeigt). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen ZOETENDAL *et al.* (2001b) bei Anwendung vergleichbarer Extraktions-, PCR- und DGGE- Protokolle. Dagegen konnte aus Reinkultur- Extrakten probiotischer Lebensmittel noch bei Zellzahlen bis 10^4 /ml Kultursuspension DGGE- Banden produziert werden (Temmerman *et al.* 2003). Die Ursache für das höhere Detektionslimit liegt hier vermutlich neben verringerter Polymerase- Effektivität durch die GC-Klemme der Primer in PCR- Inhibitoren, wie sie in Digesta und Kot wie auch in anderen komplexen organischen Medien wie Erdboden vorkommen (Tebbe und Vahjen 1993; Zoetendal *et al.* 2001; Iizuka *et al.* 2004).

Die Zusammensetzung der einzelnen Kotproben war also innerhalb der Probiotikagruppe ähnlicher als in der Kontrollgruppe wie auch zwischen den Gruppen. Dies bestätigt auch die Cluster-Analyse der Sørensen- Werte (UPGMA). Somit konnte mit dieser Methode Veränderungen der bakteriellen Zusammensetzung im Kot nach Zuführung des Probiotikums gemessen werden, die mit der klassischen Kultivierung einzel-

ner Bakteriengruppen (hier im Kot nur Coliforme und Enterokokken) nicht erfasst wurden.

Eine hohe mikrobielle Diversität wird häufig als günstig für den Wirtsorganismus angesehen (Wu et al. 2007). In Untersuchungen zur bakteriellen Zusammensetzung verschiedener Bodenproben erwiesen sich mikrobielle Gemeinschaften mit höherer Diversität als stabiler gegenüber Störungen von außen (Girvan et al. 2005). Daher kann davon ausgegangen werden, dass komplexe Bakteriengemeinschaften widerstandsfähiger gegenüber äußeren Einwirkungen sind, wie z.B. Infektionen des Verdauungstraktes durch pathogene Mikroorganismen. MELIN *et al.* (1997) berichtete von verringerter Diversität kommensaler *E. coli* in Ferkelkot und daraus resultierender erhöhter Krankheitsanfälligkeit.

In humanmedizinischen Untersuchungen zum Heilungsverlauf nach Darmresektionen konnte durch kurativen Einsatz von Probiotika eine höhere bakterielle Diversität und ein günstigerer Heilungsverlauf in den verbliebenen Abschnitten erzielt werden (Kuhbacher et al. 2006). Die geringe intestinale bakterielle Diversität bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen deutet ebenso auf einen Zusammenhang zwischen Diversität und Gesundheitszustand des mittleren und hinteren Verdauungstraktes hin (Ott, Musfeldt, Wenderoth et al. 2004; Manichanh et al. 2006).

Der aus dem Vergleich der Bandenmuster aus Kotproben errechnete Shannon- Index als Maß für die Diversität einer bakteriellen Gemeinschaft zeigte in diesem Versuch nur am 56. Tag tendenziell eine höhere bakterielle Diversität in der Kontrollgruppe an, sodass ein deutlicher bzw. konstanter Einfluss des verwendeten Probiotikums auf die bakterielle Diversität im Kot der Versuchstiere unwahrscheinlich erscheint.

Da man aus der bakteriellen Zusammensetzung im Kot nur bedingt Rückschlüsse auf die Besiedlung der vorderen Darmabschnitte ziehen kann, wären weitere Untersuchungen zur Diversität des vorderen Verdauungstrakts von erheblicher Bedeutung.

4.6 Schlussfolgerungen

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass trotz eines relativ breit angelegten methodischen Versuchsansatzes bei Anwendung dieses Probiotikums in dieser Form und Konzentration nur selten signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den beiden Versuchsgruppen gemessen werden konnten. Für *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 können somit in diesem Versuch beim Zusatz dieser Formulierung zu den Versuchsdiäten keine deutlichen der für Probiotika allgemein angenommenen günstigen Auswirkungen auf die Gesundheit und Leistung der Schweine aufgezeigt werden. Allenfalls bei den Durchfallparametern und der pathogenen Belastung lassen sich bereits früher beobachtete und in der Humanmedizin bereits therapeutisch genutzte Effekte von *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 vermuten. Auch die teilweise reduzierte Ammoniak-Belastung kann als mögliche indirekte, positive Wirkung des Probiotikums angesehen werden. Der überwiegende Teil der untersuchten Parameter zeigte aber keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Die zootecnischen Leistungen, welche erhebliche Praxisrelevanz für einen Futterzusatzstoffs hinsichtlich der Wirtschaftlichkeit beschreiben, waren weitgehend unbeeinflusst oder möglicherweise, wie bereits erwähnt, durch andere Umweltfaktoren stärker beeinflusst. Damit entsprechen diese Ergebnisse weitgehend denen anderer Untersuchungen mit verschiedenen Probiotika, wo der überwiegende Teil der Autoren von fehlenden oder allenfalls tendenziellen Verbesserungen berichtete (Simon 2003). Bezüglich der leistungsfördernden Effekte ist eine nutzbare Wirksamkeit bei Anwendung des Probiotikums in dieser Dosis bei den gewählten Bedingungen also zu verneinen.

Aufgrund der hier beobachteten günstigen Auswirkungen auf Durchfallparameter und pathogene Belastung scheinen die Einsatzmöglichkeit dieses Probiotikums also im Bereich der Prophylaxe zu liegen und erlangen somit ebenfalls wirtschaftliche und auch lebensmittelhygienische Bedeutung.

Die molekularbiologischen Ansätze wie die DGGE zeigen deutliche Hinweise auf Probiotika-induzierte Veränderungen im Verdauungstrakt der Ferkel. Hier sind weitere Untersuchungen nötig, um möglichst die genauen Wirkmechanismen im komplexen Ökosystem der intestinalen Mikrobiota zu ergründen.

Vor dem Hintergrund, dass die meisten gesundheitlichen Probleme in der kommerziellen Tierhaltung aus eben dieser resultieren, muss die Frage gestellt werden, ob ein Probiotikum alleine überhaupt in der Lage sein kann, diese belastenden Faktoren zu kompensieren. Da sich aber Hinweise auf mögliche spezifische Wirkmechanismen mehren, liegt der Schlüssel zur Verbesserung von Gesundheit und Leistung möglicherweise in der Kombination verschiedener Maßnahmen wie Hygiene, Haltungsoptimierung, insbesondere in Bezug auf die Absatzphase und bedarfsgerechter, angepasster Fütterung, in der Probiotika möglicherweise sichtbare positive Auswirkungen haben könnten. Ferner könnte es bei Kombination verschiedener Probiotika mit ähnlichen Wirkungsweisen

möglicherweise zu ausgeprägteren Effekten kommen. Dies bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

Bei den methodischen Ansätzen zur Charakterisierung intestinaler Bakteriengemeinschaften muss die klassische Mikrobiologie mit Anwendung sogenannter Selektiv-Nährmedien weitgehend als ungeeignete Methode angesehen werden, da durch sie nur einen geringer, nicht unbedingt repräsentativer Anteil intestinaler Bakterien erfasst wird. Dennoch bleibt die Kultivierung in einigen Bereichen wichtig, insbesondere wenn einzelne, bekannte Mikroorganismen auf biochemische und morphologische Parameter untersucht werden sollen.

Weitere intensive Forschung und Zusammenarbeit in allen Teilbereichen der intestinalen Mikrobiologie und Ernährungsphysiologie ist nötig, um ein umfassendes Verständnis über Zusammensetzung und Funktion der intestinalen Mikrobiota zu erhalten. Dieses Verständnis ist essentiell, um die Aufdeckung von Wirkungsweisen bereits bekannter Einflussfaktoren wie z.B. Pre- und Probiotika wie auch die gezielte positive Beeinflussung der komplexen Symbiose von Wirt und seiner Mikrobiota in Zukunft zu ermöglichen.