

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

**Untersuchungen über verdauungsphysiologische Effekte eines Probiotikums
aus *Enterococcus faecium* und *Lactobacillus rhamnosus* bei Pferden**

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

vorgelegt von
Fanny Luise Saalschmidt
Tierärztin aus Berlin

Berlin, 2017

Journal-Nr.: 3856

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan:	Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter:	Prof. Dr. Jürgen Zentek
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. Heidrun Gehlen
Dritter Gutachter:	PD Dr. Friederike Stumpff

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus): horses, probiotics, feeding, Lactobacillus rhamnosus, Entereococcus faecium, intestinal microorganisms

Tag der Promotion: 26.10.2016

Inhalt

1	Einleitung.....	9
2	Literaturübersicht.....	10
2.1	Mikrobiota im Verdauungstrakt.....	10
2.2	Mikrobielle Besiedlung des Gastrointestinaltrakts beim Pferd.....	11
2.2.1	Maulhöhle.....	12
2.2.2	Speiseröhre.....	12
2.2.3	Magen.....	13
2.2.4	Dünndarm.....	17
2.2.5	Caecum.....	20
2.2.6	Colon.....	25
2.2.7	Faeces.....	28
2.3	Probiotika.....	34
2.3.1	Definition.....	34
2.3.2	Geschichte der Probiotika und rechtlicher Hintergrund.....	34
2.3.3	Wirkungsweise von Probiotika.....	35
2.3.4	Probiotika in der Tierernährung.....	38
2.3.5	Probiotika in der Pferdefütterung.....	39
2.3.5.1	Hefen.....	40
2.3.5.2	Bakterien.....	42
3	Material und Methoden.....	47
3.1	In- vivo- Untersuchungen.....	47
3.1.1	Versuchsdesign.....	47
3.2	Untersuchung der Kotproben.....	48
3.2.1	Bestimmung des pH-Werts.....	48
3.2.2	Messung des Trockensubstanzgehalts.....	48
3.2.3	Bestimmung von Ammonium.....	49
3.2.4	Bestimmung von Laktat.....	49
3.2.5	Messung kurzkettiger Fettsäuren.....	50
3.2.6	DNA- Extraktion.....	50
3.2.7	Anfertigung einer Kalibrierreihe für die quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR).....	51
3.2.8	Auswahl der Primer für die qPCR.....	51
3.2.9	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR).....	52
3.2.10	Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese (DGGE).....	52

3.2.10.1	Messung und Einstellung des DNA-Gehalts der Extrakte.....	52
3.2.10.2	PCR für die DGGE.....	52
3.2.10.3	DGGE.....	53
3.2.10.4	Berechnung ökologischer Indizes.....	53
3.3	In vitro Versuch.....	54
3.4	Statistische Auswertungen.....	56
4	Ergebnisse.....	58
4.1	In vivo Versuch.....	58
4.1.1	Klinische Auswertung.....	58
4.1.2	Trockensubstanzgehalt und pH-Werte der Kotproben.....	58
4.1.3	Mikrobielle Metabolite in den Kotproben.....	60
4.1.3.1	Ammoniumgehalt.....	60
4.1.3.2	Laktatkonzentration.....	60
4.1.3.3	Anteil kurzkettiger Fettsäuren.....	61
4.1.4	Fäkale Zellzahlen der probiotischen Stämme.....	64
4.1.5	Mikrobiologisches Profil der Kotproben.....	65
4.1.6	Clusteranalyse der Ergebnisse des in vivo Versuchs.....	66
4.2	In vitro Versuch.....	68
5	Diskussion.....	73
5.1	In vivo Versuch.....	73
5.1.1	Trockensubstanz und pH-Werte der Kotproben.....	73
5.1.2	Einfluss der probiotischen Supplementierung auf mikrobielle Metabolite.....	74
5.1.2.1	Ammoniumgehalt.....	74
5.1.2.2	Laktatkonzentration.....	75
5.1.2.3	Anteil kurzkettiger Fettsäuren.....	76
5.1.3	Fäkale Zellzahlen der probiotischen Stämme.....	77
5.1.4	Veränderungen der bakteriellen Biodiversität unter probiotischer Supplementierung.....	78
5.1.5	Übergreifende Auswertung des in vivo Versuchs mittels Clusteranalyse.....	79
5.2	Auswertung des Inkubationsversuchs zum Überleben der probiotischen Stämme im GIT des Pferdes.....	80
6	Zusammenfassung.....	83
7	Summary.....	84
8	Literaturverzeichnis.....	85
9	Danksagung.....	99
10	Publikationsverzeichnis.....	100

Tabellen

Tabelle 1: Mikrobielle Besiedlung des Magens gesunder Pferde.....	16
Tabelle 2: Mikrobielle Besiedlung des Dünndarminhalts gesunder Pferde.....	19
Tabelle 3: Mikrobielle Besiedlung des Caecuminhalts gesunder Pferde	22
Tabelle 4: Mikrobielle Besiedlung des Coloninhalts gesunder Pferde	27
Tabelle 5: Mikrobiota in den Faeces gesunder Pferde	30
Tabelle 6: Pipettierschema für den Inkubationsversuch.....	55
Tabelle 7: Verwendete Primer	56
Tabelle 8: Trockensubstanzgehalte und pH-Werte der Kotproben im ersten Durchgang	59
Tabelle 9: Trockensubstanzgehalte und pH-Werte der Kotproben im zweiten Durchgang	59
Tabelle 10: Ammoniumgehalte in den Kotproben	60
Tabelle 11: Laktatgehalte in den Kotproben	61
Tabelle 12: Gehalte kurzkettiger Fettsäuren in den Kotproben in mmol/l	63
Tabelle 13: Zellzahl <i>E.faecium</i> in log cfu/g.....	64
Tabelle 14: Diversitätindizes der DGGE	66
Tabelle 15: Wachstumsverhalten verschiedener Verdünnungsstufen des Probiotikums im Sterilfiltrat des Magens, Angabe in % des Wachstums der Negativkontrolle.....	70
Tabelle 16: Wachstumsverhalten verschiedener Verdünnungsstufen des Probiotikums im Sterilfiltrat des Jejunums, Angabe in % des Wachstums der Negativkontrolle	70
Tabelle 17: Wachstumsverhalten verschiedener Verdünnungsstufen des Probiotikums im Sterilfiltrat des Cäcums, Angabe in % des Wachstums der Negativkontrolle	71

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Versuchsdesign des Fütterungsversuchs.....	48
Abb. 2: Gesamtlaktatgehalte der Kotproben in mmol/l.....	61
Abb. 3: Verhältnis von Acetat zu Propionat in den Kotproben.....	64
Abb. 4: Hierarchische Clusteranalyse der erhobenen Daten (Dendrogramm mit durchschnittlicher Verknüpfung zwischen den Gruppen, ohne D-Laktat), Tier 1-10.....	67
Abb. 5: Hierarchische Clusteranalyse der erhobenen Daten (Dendrogramm mit durchschnittlicher Verknüpfung zwischen den Gruppen, ohne D-Laktat), Tier 16 & 18-26....	68
Abb. 6: Wachstumsverhalten von <i>E. faecium</i> (1:100) in 0,85 % NaCl.....	69
Abb. 7: Wachstumsverhalten von <i>L. rhamnosus</i> (1:100) in 0,85 % NaCl.....	69
Abb. 8: Wachstum von <i>E. faecium</i> (1:100) im Sterilzentrifugat relativ zur Negativkontrolle..	71
Abb. 9: Wachstum von <i>L. rhamnosus</i> (1:100) im Sterilzentrifugat relativ zur Negativkontrolle, Ordinate logarithmisch skaliert	72

Abkürzungsverzeichnis

ADF...	Säure-Detergenz-Faser
CA...	Kalifornien
cfu...	Colony Forming Units (Kolonie bildende Einheiten)
cm...	Zentimeter
Corp....	Corporation
DGGE...	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (Denaturierungsgradientengelelektrophorese)
DNA...	Desoxyribonukleinsäure
DSM...	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
EG...	Europäische Gemeinschaft
EGS...	Equine Grass Sickness
FAO...	Ernährungs- und Landwirtschaftsorganisation der Vereinten Nationen
g...	Gramm (im Anschluss an absolute Werte)
x g...	x mal 9,81 m/s ²
GKZ...	Gesamtkeimzahl
H...	Shannon-Index
Inc....	Incorporated
kg...	Kilogramm
KM...	Körpermasse
lg...	dekadischer Logarithmus
m...	Meter
M...	mol/l

min...	Minuten
µl...	Mikroliter
ml...	Milliliter
mm ² ...	Quadratmillimeter
mmol/l...	Millimol je Liter
mRNA...	messenger ribonucleic acid (Boten-Ribonukleinsäure)
NDF...	Neutral-Detergenz-Faser
NFκB...	Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
ng...	Nanogramm
nm...	Nanometer
NPN...	Nicht-Protein-Stickstoff
Nr....	Nummer
PCR...	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
qPCR...	quantitative Polymerase-Kettenreaktion
rDNA...	ribosomale Desoxyribonukleinsäure
s...	Sekunden
SCFA...	short-chain fatty acids (kurzkettige Fettsäuren)
TGFβ...	Transforming Growth Factor beta
UV...	ultraviolett
V...	Volt
VO...	Verordnung
WHO...	Weltgesundheitsorganisation
\bar{x} ...	Mittelwert

1 Einleitung

Während Probiotika in der Nutztierfütterung bereits erfolgreich eingesetzt werden und ihre Wirkmechanismen wissenschaftlich detailliert beschrieben wurden, stellt sich die Situation bezüglich des Einsatzes in der Pferdefütterung grundlegend anders dar. Der einzige bisher in Deutschland als Futterzusatzstoff für Pferde zugelassene lebende Mikroorganismus ist die Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Sie ist als Zusatzstoff zur „Verdauungsförderung“ und als „Stabilisator der physiologischen Darmflora“ registriert.

Probiotika werden in der Nutztierernährung überwiegend zur Leistungsförderung eingesetzt. Die möglichen Anwendungsgebiete in der Ernährung von Pferden sind allerdings unter anderen Aspekten zu betrachten. Sport- oder Freizeitpferde eröffnen angesichts vielfältiger Verdauungsprobleme wie z. B. Ausscheidung ungebundener Flüssigkeit („Kotwasser“), chronischem Durchfall, Rekonvaleszenz nach Koliken sowie Turnierstress eher auf die Tiergesundheit und das Wohlbefinden zielende Einsatzmöglichkeiten von Probiotika.

Das mikrobielle Ökosystem im Gastrointestinaltrakt des Pferdes hat bisher vergleichsweise wenig wissenschaftliche Beachtung gefunden, verdauungsphysiologische Zusammenhänge sind besonders auf mikrobieller Ebene noch nicht immer nachvollziehbar. Daraus resultiert die Notwendigkeit der wissenschaftlichen Überprüfung eines jeden möglichen probiotischen Stammes ebenso wie eine vorsichtige Interpretation anderer Forschungsergebnisse und die Berücksichtigung eventueller individueller Einflüsse auf verdauungsphysiologische Parameter.

Die vorliegende Arbeit soll eine Übersicht über den derzeitigen Kenntnisstand über die mikrobielle Besiedlung des Verdauungstrakts beim Pferd geben und durch gezielte Untersuchungen einen Beitrag zur Erforschung der Wirkungen von Probiotika bei dieser Tierart leisten. Bei Jungpferden wurden Parameter einer möglichen Beeinflussung verdauungsphysiologischer Effekte erhoben und in einem zweiten Versuchsabschnitt das Verhalten der probiotischen Stämme *Enterococcus faecium* und *Lactobacillus rhamnosus in vitro* untersucht.

2 Literaturübersicht

Der Inhalt des vorliegenden Literaturteils entspricht der folgenden Publikation: „Die Mikrobiota im Gastrointestinaltrakt von adulten Pferden und Einflüsse der Fütterung“ (Saalschmidt, Vahjen, Zentek) in „Übersichten Tierernährung“ (42(2) — S. 141–164, 2015)

2.1 Mikrobiota im Verdauungstrakt

Im Verdauungstrakt gesunder Säugetiere lebt eine Vielzahl verschiedener Bakterien, aber auch Protozoen und Pilze. Auch Viren können zur intestinalen Mikrobiota gezählt werden, doch liegen dazu für das Pferd kaum Erkenntnisse vor. Im Zustand der Eubiose bestehen keine krankheitsauslösenden Verschiebungen des Gleichgewichts zwischen den einzelnen Bakterienpopulationen. Nahezu alle Bakterienarten leben in kommensaler oder symbiotischer Beziehung zum Wirt. Ihre Funktionen können im Wesentlichen in metabolische, protektive und trophische unterteilt werden (Aziz, 2013). Der Zustand der Dysbiose beschreibt eine Verschiebung der Zusammensetzung und der Stoffwechselaktivität, aus denen wiederum Verdauungsstörungen ebenso wie systemische Erkrankungen resultieren können. Trotz eingeschränkter Vergleichbarkeit der vorliegenden Studien aufgrund methodischer Unterschiede soll im Folgenden ein Überblick über die mikrobielle Besiedlung der verschiedenen Abschnitte des Gastrointestinaltrakts im Zustand klinischer Gesundheit gegeben werden.

Der zahlenmäßig am stärksten vertretene Stamm aus dem Reich der Bacteria beim Pferd sind die Firmicutes, zu denen unter anderem Clostridien, Bazillen und Milchsäurebakterien gehören und denen 44 % bis 72 % der molekularbiologisch in Faeces identifizierten bakteriellen Gensequenzen zugeordnet werden konnten. Auch die Phyla Verrucomicrobia (4,1 %) mit *Verrumicrobium* spp. und *Prosthetobacter* spp., Bacteroidetes (3,7–27 %), zu denen *Bacteroides* spp. und *Prevotella* spp. und Proteobacteria (3,8 %), zu denen beispielsweise die Familie der Enterobakteriaseen zählt, sind stark vertreten (Biddle, 2013a; Daly, 2001; Shepherd, 2012; Willing, 2009). Die Zusammensetzung der enteralen Mikrobiota wird entscheidend durch die Ernährung beeinflusst (Blaut, 2007).

Die Bakterien nutzen unterschiedliche Substrate zur Energiegewinnung und setzen Stoffwechselprodukte frei, die teilweise wiederum vom Wirt genutzt werden können. Die Mehrzahl der Bakterien kann entweder lösliche Kohlenhydrate, komplexe Kohlenhydrate oder Proteine als Substrat nutzen. Anderen Arten ist es dagegen möglich, sich an ein veränderndes Nahrungsangebot anzupassen (Daly, 2012). Zu den Proteolyten gehören vor allem Arten der Enterobakteriaseen, aber auch einige Clostridienarten und Bacteroides. Saccharolytische

Bakterien nutzen neben löslichen Kohlenhydraten aus der Nahrung auch mikrobiell gebildete Intermediärprodukte aus dem Abbau komplexer Kohlenhydrate als Substrat (Blaut, 2007). Neben Vertretern der Bacteroidetes wie *Prevotella* spp. gehören die Laktobazillen in die Gruppe der saccharolytischen Bakterien. Sie gewinnen Energie durch Fermentation, setzen als Stoffwechselprodukt Laktat frei und reagieren sehr stark auf eine Erhöhung des Stärkegehalts und der Gehalte an Einfachzuckern und löslichen Polysacchariden in der Nahrung (Al Jassim, 2005). Zu den Laktat verwertenden Bakterien zählen beispielsweise Vertreter der Familie *Veillonellaceae* (Daly, 2012). Ihre besondere Bedeutung liegt darin, dass sie eine Anreicherung des Chymus mit Laktat verhindern und so dessen ansäuernden Effekt abpuffern können. Aufgrund seiner von Natur aus rohfaserreichen Ernährung für das Pferd entscheidend sind fibrolytische (faserabbauende) Bakterien, die dank spezieller enzymatischer Ausstattung in der Lage sind, komplexe Polysaccharide abzubauen (Biddle, 2013b). Die auf diesem Weg anfallenden kurzkettigen Fettsäuren (SCFA) können resorbiert und zur Deckung von bis zu 65% des Energiebedarfs des Pferdes genutzt werden (Al Jassim, 2009). Fibrolytische Bakterien im Darm des Pferdes sind vor allem Vertreter der *Lachnospiraceae* und *Ruminococcaceae*, wodurch sich die Dominanz der Firmicuten im Dickdarm des Pferdes erklären lässt (Biddle, 2013b; Costa, 2012). Aber auch Bacteroidetes können fibrolytische Gene exprimieren (Daly, 2012).

2.2 Mikrobielle Besiedlung des Gastrointestinaltrakts beim Pferd

Der Verdauungsapparat des Pferdes ist evolutionsbiologisch an eine langsame Futteraufnahme und die mikrobielle Verdauung großer Mengen rohfaserreicher Futtermittel angepasst. Diese erfolgt vor allem im Dickdarm, dementsprechend zeichnet sich die Physiologie der Verdauung beim Pferd durch eine relativ rasche Passage (< 6 h) der vorderen und eine entsprechend verzögerte Passage (24-48 h) der Digesta in hinteren Abschnitten des Verdauungstrakts aus (Van Weyenberg, 2006). Die Verdauung der nicht durch körpereigene Enzyme abgebauten komplexen Kohlenhydrate findet durch Fermentation hauptsächlich im Caecum und Colon statt (Santos, 2011). Diese sind mit ihrem vergleichsweise großen Volumen an die Funktion als Fermentationskammer angepasst (Alexander, 1952). Beim gesunden Pferd macht der Inhalt des Dickdarms allein etwa 13 % des Körpergewichts aus (Rechkemmer, 1988). Dieser Wert verändert sich mit der Rationsgestaltung. Der Verdauungstrakt wird neben Bakterien von Hefen, Protozoen und Pilzen besiedelt, deren Stoffwechselprodukte dem Pferd als Energiequelle dienen. Im Folgenden soll ein Überblick über die bisher aus den Abschnitten des Gastrointestinaltrakts gesunder Pferde isolierten bzw. genotypisch nachgewiesenen bakteriellen Mikroorganismen gegeben werden.

Die dem jeweiligen Kapitel angefügten Tabellen dienen der Darstellung einiger bisher im Gastrointestinaltrakt des Pferdes identifizierter Bakterien. Es wurden nur Werte gesunder Pferde einbezogen, Fütterungseinflüsse wurden ebenso wie methodische Unterschiede kenntlich gemacht. Die Quantifizierung der funktionellen Gruppen wird nur angegeben, wenn diese in der entsprechenden Studie als solche untersucht wurden.

2.2.1 Maulhöhle

Die bakterielle Besiedlung des Oropharynx des Pferdes erfolgt weitgehend transient und erscheint äußerst variabel. Die aerobe Gesamtkeimzahl beträgt bei gesunden Tieren etwa 3.8×10^4 cfu/g Schleimhautabstrich (Hoquet, 1985). Etwa ein Drittel der Bakterien sind fakultativ anaerobe Spezies (Bailey, 1991). *Corynebacterium* spp., *Nocardia* spp., *Moraxella* spp., *Enterobacter* spp. sowie koagulasenegative Staphylokokken sind dagegen unter aeroben Bedingungen am häufigsten nachweisbar. Bei den meisten Isolaten handelt es sich um opportunistische Erreger, außerdem existieren große Unterschiede zwischen den Individuen. Auch *Streptococcus zooepidemicus*, Erreger von Atemwegeserkrankungen, venerischen Infektionen und Fohlenlähme, kann im Rachenraum gesunder Tiere auftreten (Hoquet, 1985). Neben *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp. und *Bacillus* spp. wurde in einer Studie an 174 Pferden in 37 % der Proben *Actinobacillus equuli* auf Tupferproben aus der Maulhöhle nachgewiesen. Dies legt die Schlussfolgerung nahe, dass diese Spezies ebenfalls zu den indigenen Mikrobiota gehört (Sternberg, 1998). Mittels phänotypischer (kultureller / biochemischer) Nachweismethoden konnten die aus dem Rachenraum klinisch gesunder Pferde isolierten Bakterien den Genera *Peptostreptococcus* spp., *Eubacterium* spp., *Clostridium* spp., *Veillonella* spp., *Megasphaera* spp., *Bacteroides* spp. und *Fusobacterium* spp. zugeordnet werden. Für die isolierten Fusobakterien wurde ein separates genetisches Cluster gefunden. (Bailey, 1991). Außerdem sind *Lactobacillus reuteri*, *L. salivarius* sowie *L. acidophilus* nachgewiesen worden (Fujisawa, 1993). Ob ein symbiotischer Charakter der mikrobiellen Besiedlung der Maulhöhle vorliegt, ist aufgrund mangelnder Untersuchungen und ihrer Instationarität bisher nicht nachvollziehbar.

2.2.2 Speiseröhre

Auch die bakterielle Besiedlung der Speiseröhre von Pferden ist bisher selten Gegenstand wissenschaftlicher Studien gewesen. Bei der Untersuchung des Ösophagusepithels von vier Pferden konnten im mittleren Oesophagusabschnitt Gesamtkeimzahlen von $5,6-7,2 \times 10^3$ cfu / mm² ermittelt werden. Der Großteil dieser anaeroben Bakterien besiedelt einschichtig die Oberfläche des Epithels in den Bereichen des Oesophagus, die nicht von einer Mukusschicht bedeckt sind. Bei allen Pferden konnten *Prevotella* spp. nachgewiesen werden, auch

Fusobacterium spp. wurden regelmäßig isoliert. Von den gramnegativen, fakultativ anaeroben Bakterien war *Actinobacillus equuli* subsp. *haemolyticus* in jeder Probe nachweisbar, während die Enterobakteriaceen *Escherichia coli*, *Pantoea* spp. und *Proteus* spp. ebenfalls regelmäßig, aber in geringerer Anzahl auftraten. Auch α -hämolyzierende Streptokokken konnten in jeder Probe in großer Zahl nachgewiesen werden. Hefen stellten weniger als 1% der identifizierten Arten dar und waren nicht an das Epithel gebunden sondern waren vielmehr im Chymus nachweisbar. Hervorzuheben ist außerdem, dass zwar einige regelmäßig im Futter vorliegende bakterielle Spezies nachgewiesen wurden (z. B. *Pantoea* spp., *Streptococcus* spp.), andere möglicherweise mit dem Futter aufgenommene Bakterien der Genera *Pseudomonas* spp., *Flavobacterium* spp. und *Bacillus* spp. die Mukosa der Speiseröhre aber nicht besiedelten. Die Autoren schließen aus ihren Untersuchungen, dass der Oesophagus eine organspezifische Besiedlung mit Mikroorganismen aufweist, deren Profil von fakultativ und obligat anaeroben Spezies dominiert wird und dem der Maulhöhle ähnelt, sich aber stark von dem der postgastrischen Abschnitten des Verdauungstrakts unterscheidet (Meyer, 2010).

2.2.3 Magen

Das Pferd besitzt einen einhölig-zusammengesetzten Magen, dessen *Pars nonglandularis* sich über den Fundus, dem *Saccus caecus ventriculi* und Teile des Korpus erstreckt und durch den *Margo plicatus* von der *Pars glandularis* mit *Glandulae gastricae propriae*, Pylorusdrüsen und Kardiadrüsen abgegrenzt ist. Während die Haupt- und Belegzellen der Fundusdrüsen die Sekrete für die Vorverdauung produzieren, sezernieren Pylorus- und Kardiadrüsen den Magenschleim (Nickel, 2004). Das Fassungsvermögen beträgt etwa 9-15 Liter und die Magenpassage dauert beim Pferd etwa 1-5 Stunden (Meyer, 2002; Sutton, 2011). Grundsätzlich wird die Passagedauer ungeachtet des betrachteten Verdauungsorgans von der Art des Futters, der Behandlung bzw. Struktur seiner Bestandteile und der Größe der aufgenommenen Mahlzeit bestimmt (Hudson, 2008; Rosenfeld, 2009).

Durch von der Schleimhaut abgelöste Bakterien, die mit der Ingesta in die folgenden Darmabschnitte gelangen, stellt der Magen einen wichtigen Ausgangspunkt für die Besiedlung des gesamten Gastrointestinaltrakts dar (Fuller, 1978; Varloud, 2007; Yuki, 2000). Er besitzt außerdem eine Filterfunktion, da nicht säuretolerante Bakterien die Magenpassage nicht überleben.

Eine bakterielle Besiedlung ist vor allem an Futterpartikeln und an der Mucosa der glandulären Schleimhaut nachzuweisen (Husted, 2010). Die bakterielle Gesamtkeimzahl im Fundus des Magens beträgt zwischen 10^6 cfu/ml (Varloud, 2007) und 10^9 cfu/ml Ingesta (de Fombelle, 2003; Kern, 1974) und nimmt zum Pylorus hin ab (Kern, 1974). Der Mageninhalt beherbergt

große Zahlen Laktobazillen, Streptokokken und Laktat verwertender Bakterien (de Fombelle, 2003). *Lactobacillus acidophilus* und *L. reuteri* wurden in der Ingesta nachgewiesen (Fujisawa, 1993). Mittels Sequenzanalyse konnten Isolate aus dem Mageninhalt von Pferden *L. mucosae* mit 95 % Ähnlichkeit und *L. delbrueckii* (98 %) zugeordnet werden (Al Jassim, 2005). Diese Besiedlung lässt bereits auf eine bakterielle Fermentationsaktivität im Magen schließen. Diese unterscheidet sich von den Fermentationsprozessen in den hinteren Abschnitten des Verdauungstrakts vor allem dadurch, dass die Besiedlung durch säuretolerante Bakterien erfolgt. Die o. g. Genera sind vor allem saccharolytisch aktiv.

Die Schleimhaut des Magens wird vor allem durch Laktobazillen und Streptokokken in einer Dichte von $<10^3$ Bakterien/mm² besiedelt (Perkins, 2012). *Lactobacillus salivarius*, *L. crispatus*, *L. reuteri*, und *L. agilis* bilden auf der Schleimhaut der *Pars nonglandularis* eine dichte Schicht. An einer Epithelzelle können so über 100 Bakterien haften. Außer für *Lactobacillus reuteri* konnte für diese Bakterien *in vitro* eine Wirtsspezifität nachgewiesen werden. Während für Schleimhautzellen eines Fohlens eine Adhäsion gezeigt werden konnte, hafteten die Bakterien nicht an Epithelzellen aus dem Magen von Ratten. Aufgrund dieser starken Anpassung sowie ihrer Dominanz im oberen Verdauungstrakt kann davon ausgegangen werden, dass Laktobazillen die bakterielle Besiedlung dominieren und so Kontrolle über die Besiedlung mit anderen Spezies ausüben (Yuki, 2000). Sie können so einen Teil der Magen- Barriere gegen Salmonellen darstellen. Auch *Sarcina ventriculi* konnte von der Schleimhaut gesunder Pferde isoliert werden (Husted, 2010). An 36 Pferden mit unterschiedlichen Schleimhautläsionen konnte keine Assoziation zur mikrobiellen Besiedlung der Schleimhaut hergestellt werden. Nur bei einem der untersuchten Pferde wurden *Escherichia fergusonii* und *Enterococcus faecium* in räumlicher Assoziation zu Schleimhautläsionen gefunden (Husted, 2010).

Die Zusammensetzung der Mikrobiota des Magens wird sehr stark durch die Fütterung beeinflusst. Ein wichtiger Einflussfaktor ist außerdem der Zeitpunkt der Probennahme, da Milieu und Substratverfügbarkeit, die das Überleben und Wachstum von Mikroorganismen im Magen beeinflussen, nicht nur in Abhängigkeit von der Zusammensetzung der Ration, sondern auch je nach Zeitpunkt der letzten Futteraufnahme stark schwanken (de Fombelle, 2003). So konnten bei Pferden, die unmittelbar nach Heufütterung getötet und beprobt wurden, vor allem *Lactobacillus* spp., *Streptococcus* spp., und *Sarcina* spp. nachgewiesen werden. Auf Schleimhautbiopsien von Tieren, die mit Gras und Heu gefüttert wurden und nach zwölfstündiger Nahrungskarenz beprobt wurden, waren *Proteobacterium* spp. (*Actinobacillus* spp. und *Moraxella* spp.) und *Bacteroidetes* (*Prevotella* spp. und *Porphyromonas* spp.) dominant. Hierbei waren die Unterschiede zwischen den einzelnen Tieren größer als diejenigen zwischen den Lokalisationen der Biopsieentnahme im Magen. Besonders

Streptokokken und Laktobazillen lagen schleimhautassoziiert vor, für Streptokokken konnte außerdem gezeigt werden, dass sie in den Bereichen mit glandulärer Schleimhaut in höheren Konzentrationen vorkommen als auf der drüsenlosen Schleimhaut (Perkins, 2012). Bei Einsatz stärkereicher Rationen steigt der Anteil von Laktobazillen und laktatverwertenden Bakterien im Magen chymus an (de Fombelle, 2003). Mittels einer Beprobung des Mageninhalts vier gesunder Pferde jeweils 30 Minuten vor sowie 60 und 210 Minuten nach Aufnahme eines pelletierten Futters wurde dieser Einfluss provoziert. Es konnte gezeigt werden, dass die kulturell im Chymus ermittelte anaerobe Gesamtkeimzahl (GKZ) sowie die Keimdichte der Laktobazillen und der Streptokokken nach der Fütterung linear anstieg. Wurde bei den nüchternen Pferden eine GKZ von $3,46 \times 10^5$ /ml gemessen, stieg diese 90 Minuten später auf $9,55 \times 10^6$ /ml und dreieinhalb Stunden nach der Futteraufnahme auf $2,09 \times 10^8$ /ml. Parallel dazu stieg die Konzentration der Laktobazillen von $6,03 \times 10^3$ /ml auf $1,23 \times 10^7$ /ml, die der Streptokokken von $6,92 \times 10^3$ /ml auf $1,45 \times 10^6$ /ml. Die ebenfalls untersuchten Laktat verwertenden Bakterien zeigten diese Entwicklung weniger deutlich, stiegen aber insgesamt von $1,78 \times 10^4$ /ml vor der Fütterung auf $2,63 \times 10^4$ /ml vier Stunden später. Zwischen den einzelnen Tieren bestanden große individuelle Unterschiede, die sich als statistisch signifikanter Einzeltiereffekt bezüglich der Laktat verwertenden Bakterien äußerten (Varloud, 2007).

Trotz des sporadischen Nachweises von DNA von *Helicobacter pylori* auf der Schleimhaut gesunder Tiere (Contreras, 2007) konnte dieses Ergebnis nicht regelmäßig reproduziert werden, sodass davon auszugehen ist, dass dieser nicht zur physiologischen Mikroflora des Pferdemagens gehört (Husted, 2010; Perkins, 2012). Bislang gibt es keine Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von Schleimhautläsionen und der mikrobiellen Besiedlung. Ob andere Erreger oder deren Stoffwechselprodukte an der Entstehung ulzerativer Magenerosionen beteiligt sind, bedarf einer weiteren wissenschaftlichen Abklärung (Sykes, 2015).

Tabelle 1: Mikrobielle Besiedlung des Magens gesunder Pferde

	Kern (1974) ¹	de Fombelle (2003) ¹	Varloud (2007) ¹	Husted (2010)	Perkins (2012)
n Proben	5	7	4	63*	9*
fakultativ anaerob					
aerobe Gesamtkeimzahl					
<i>Escherichia coli</i>	<4,89 (1) ⁹ <3 (1) ¹⁰				
<i>Moraxella</i> sp.					(2) ^{6,7}
<i>Streptococcus</i> spp.		7,3-7,5 (1)	3,84 ² – 6,16 ³ (1)		(2) ⁷
<i>Actinobacillus</i> sp.					(2) ⁷
<i>Acinetobacter</i> sp.					(2) ⁶
strikt anaerob					
anaerobe Gesamtkeimzahl	9,44 (1) ⁹ 9,28 (1) ¹⁰	9,0-9,1 (1)	5,54 ² – 8,32 ³ (1)		
<i>Lactobacillus</i> spp.		7,8-8,4 (1)	3,78 ² -7,09 ³ (1)		
<i>L. salivarius</i>				(2) ⁵	
<i>L. hayakitensis</i>					(2) ⁶
<i>L. jensenii</i> / <i>L. fornicalis</i>					(2) ^{6,8}
<i>Sarcina</i> sp.					(2) ⁷
<i>Sarcina ventriculi</i>				(2) ⁵	
<i>Eubacterium</i> sp.					(2) ⁷
<i>Veillonella</i> sp.					(2) ⁶
funktionelle Gruppen					
Proteolyten					
Cellulolyten	2 ⁹ 2,48 ¹⁰	1,0-1,4			
Laktat verwertende Bakterien		6,8-7,6	4,22 ⁴ – 4,42 ³		

Identifikation der Mikroorganismen: (1) phänotypisch, (2) genotypisch, * qualitativer Nachweis

¹ colony count; Ig/g(ml) Chymus, ² 30 Minuten vor Fütterung, ³ 210 Minuten postprandial, ⁴ 60 Minuten postprandial, ⁵ Klonen und Sequenzieren; gesunde Schleimhaut von Tieren mit Schleimhaut- Läsionen, ⁶ Drüenschleimhaut, ⁷ drüsenlose Schleimhaut, ⁸ phylogenetisch verwandt, ⁹ Fundusregion, ¹⁰ Pylorusregion

2.2.4 Dünndarm

Der Dünndarm des Pferdes hat eine Gesamtlänge von etwa 25 Metern, davon entfallen 1 m auf das Duodenum und 0,5 m auf das Ileum, der Rest auf das Jejunum (Budras, 2004). Die Passagezeit durch den Dünndarm beträgt etwa 1,5-4,5 Stunden (Meyer, 2002; Sutton, 2011).

Im Vergleich zum Magen ist die GKZ im Dünndarm niedriger. Gründe dafür können einerseits in der Veränderung des pH-Wertes, andererseits in einer starken Proteolyse bestehen (de Fombelle, 2003). Außerdem zu berücksichtigen ist die zum Magen vergleichsweise schnellere Passage des Verdauungsbreis durch den Dünndarm (Mackie, 1988; Meyer, 2002). Die Gesamtpopulation von Bakterien steigt entlang des Dünndarms an. Kann im Duodenum eine Gesamtkeimzahl kultivierbarer Bakterien von $2,9 \times 10^6$ cfu/g gemessen werden, liegt sie im Ileum bei $3,8 \times 10^7$ cfu/g Chymus. Hierbei sinkt der relative Anteil der mukosalen Keimzahl an der GKZ zugunsten der luminalen Bakterienpopulationen (Mackie, 1988).

Im Dünndarminhalt werden hohe Konzentrationen an Laktobazillen, Streptokokken sowie Laktat verwertenden Bakterien gefunden (de Fombelle, 2003; Mackie, 1988). Der Grund hierfür liegt in der relativ hohen Verfügbarkeit leicht fermentierbarer Kohlenhydrate. Entlang des Dünndarms sinkt die Anzahl der Laktobazillen, die Streptokokken nehmen zu (de Fombelle, 2003). Die Laktatkonzentration im Dünndarminhalt sinkt bei ausschließlicher Raufutteraufnahme von 0,75 mmol/l im Duodenum auf etwa 0,4 mmol/l im Ileum (Mackie, 1988). *L. salivarius*, *L. reuteri*, *L. acidophilus* besiedeln alle Abschnitte des Dünndarms (Fujisawa, 1993).

In Analogie zur Gesamtkeimzahl steigt die Zahl proteolytischer Bakterien entlang des Dünndarms an. (Mackie, 1988). Da die vorderen Abschnitte des Verdauungstrakts beim Pferd insgesamt eine eher geringe bakterielle Besiedlung aufweisen, die proteolytische Aktivität im Dünndarm aber 10-100fach höher ist als im Dickdarm, kann auf eine geringe Nutzung mikrobiellen Proteins aus dem Dickdarm und eine anteilig hohe Nutzung im Dünndarm enzymatisch verdauter Proteine zur Deckung des Bedarfs geschlossen werden (Kern, 1974).

Auch die mikrobielle Besiedlung des Dünndarms unterliegt dem Einfluss durch die Fütterung. So steigt beispielsweise die Anzahl cellulolytischer Bakterien bei rohfaserreicher Fütterung auf etwa 10^2 cfu/ml Ingesta. Nach hoher Aufnahme an Stärke kommt es im Dünndarm von Pferden dagegen zu einer Akkumulation von Laktat sowie zu einer Reduktion der pH-Werte (Radicke, 1990). Im Vergleich zu Caecum und Colon sind die cellulolytische Aktivität im Dünndarm, die Konzentration kurzkettiger Fettsäuren (SCFA) und auch die Zahl cellulolytischer Bakterien sehr gering, sodass davon ausgegangen werden kann, dass der Beitrag des Dünndarms zur fermentativen Energiegewinnung zu vernachlässigen ist (de Fombelle, 2003; Kern, 1974).

Bei der Ergänzung einer heubasierten Ration mit Getreide verschiebt sich das Verhältnis der Bakterien im Jejunum zu Ungunsten der SCFA- produzierenden Bakterien, die Laktobazillen steigen von etwa 10^8 cfu/g auf 10^9 cfu/g, Enterokokken und Enterobakteriazeen nehmen im Vergleich zur reinen Heufütterung ab (Kollarczik, 1992). Im Ileum steigt die Gesamtkeimzahl ebenso wie die Besiedlung mit Laktobazillen und Streptokokken (de Fombelle, 2003). Diese Laktat produzierenden Bakterien tragen zu stark erhöhten Laktatkonzentrationen unter stärkereicher Fütterung und einem damit einhergehenden Abfall des pH- Wertes bei (Kollarczik, 1992). Unter Betrachtung von Wasserstoff im Expirat als Parameter der bakteriellen Stoffwechselaktivität im Dünndarm konnte erhöhte mikrobielle Aktivität nach der Fütterung von hohen Stärkemengen (2 g/kg Körpermasse) sowie von Inulin (1,5 g/kg Körpermasse) nachgewiesen werden (Coenen, 2006; Vervuert, 2009).

Tabelle 2: Mikrobielle Besiedlung des Dünndarminhalts gesunder Pferde

	Duodenum		Jejunum			Ileum				
	Mackie (1988) ¹	Schoster (2012)	Mackie (1988) ¹	de Fombelle (2003) ¹	Kollarczik (1992) ¹	Schoster (2012)	Mackie (1988) ¹	de Fombelle (2003) ¹	Schoster (2012)	Kern (1974)
n Proben	11	15	11	7	5	15	11	7	15	5
fakultativ anaerob										
aerobe Gesamtkeimzahl										
<i>Enterobacteriaceae</i>					7,8 – 8,3 (1) ⁵ 7,1 – 8,3 (1) ⁶					
<i>Escherichia coli</i>										3,95 (1)
<i>Streptococcus</i> spp.				7,5 – 8,1 (1)				7,4 – 8,0 (1)		
<i>Enterococcus</i> spp.					5,3- 7,7 (1) ⁵ 5,2-7,9 (1) ⁶					
strikt anaerob										
anaerobe Gesamtkeimzahl	6,47 (1) ² 6,33 (1) ³		7,46 (1) ² 6,8 (1) ³	8,6-8,7 (1)	8,25- 9,1 (1) ⁵ 8,7- 9,0 (1) ⁶		7,58 (1) ² 6,96 (1) ³	7,9-8,8 (1)		7,56 ⁷ (1) 9,31
<i>Lactobacillus</i> spp.	6,27 (1) ²		6,15 (1) ²	6,5 – 6,8 (1)	7,3 – 8,8 (1) ⁵ 7,8 – 8,8 (1) ⁶		6,12 (1) ²	6,4 – 7,2 (1)		
<i>Clostridium difficile</i>		(1) ⁴				(1) ⁴			(1) ⁴	
funktionelle Gruppen										
Proteolyten	6,48 ² 6,25 ³		7,19 ² 6,46 ³				7,34 ² 6,96 ³			
Cellulolyten				0,9 – 1,8				1,0 – 1,7		
Laktat verwertende Bakterien				6,5 – 6,7				6,5 – 7,2		

Identifikation der Mikroorganismen: (1) phänotypisch, (2) genotypisch

¹ colony counts, ² Lumen, ³ Mucosa, ⁴ 1 von 15 Tieren, ⁵ nüchtern, ⁶ 4 h postprandial, ⁷ kultivierbar

2.2.5 Caecum

Das Pferd besitzt unter den Haussäugetieren das mit etwa einem Meter Länge am stärksten entwickelte Caecum. Es wird in *Basis*, *Corpus* und *Apex caeci* unterteilt und fasst im Mittel 35 Liter (Budras, 2004; Nickel, 2004). Beim Pferd entfallen etwa 85 % der Darmpassagezeit auf den Dickdarm, im Caecum verbleibt die Ingesta für bis zu 20 Stunden (Meyer, 2002).

Unter der Annahme, dass die Aufnahme von Aminosäuren am Ende des Dünndarms abgeschlossen ist, ist davon auszugehen, dass die wichtigste Funktion des Caecums für das Pferd in dem Beitrag der cellulolytischen Bakterien zum Energiehaushalt mit der Produktion flüchtiger Fettsäuren besteht (GfE, 2104). Die dominierenden cellulolytischen Spezies im Caecumchymus sind *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens* (Julliand, 1999) sowie *Fibrobacter succinogenes* (Julliand, 1999; Lin, 1995).

Die mikrobielle Besiedlung des Caecums gesunder Tiere variiert in Abhängigkeit von der Zusammensetzung des Futters (Goodson, 1988; Julliand, 2001; Julliand, 1993). Veränderungen in der mikrobiellen Besiedlung des Chymus wurden bereits fünf Stunden nach Fütterung von Getreide beobachtet (de Fombelle, 2001). Nach erhöhter Gabe leichtverdaulicher Kohlenhydrate können höhere Gesamtzahlen obligat anaerober sowie fakultativ anaerober Bakterien gemessen werden. Lagen diese in der Digesta während reiner Heufütterung bei $1,82 \times 10^7$ cfu/ml bzw. $2,0 \times 10^6$ cfu/ml, stiegen die Keimzahlen zwei Wochen nach isoenergetischer Futterumstellung auf Gerste als Krafftutter mit reduzierter Heugabe auf jeweils über 10^8 cfu/ml an. Gleichzeitig sank die Anzahl cellulolytischer Bakterien von $1,18 \times 10^7$ cfu/ml auf $6,0 \times 10^4$ cfu/ml (Julliand, 2001). Zwei Tage nach Erhöhung des Stärkegehalts in der Ration konnte bei einem Pony eine Gesamtkeimzahl von 10^{10} cfu/ml gemessen werden, während der Wert einen Tag zuvor noch um 10^9 cfu/ml variierte (Goodson, 1988). Gleichzeitig kann es zu einer erheblichen Vermehrung von Streptokokken und Laktobazillen kommen (de Fombelle, 2001). Dennoch ist die Anzahl der Laktobazillen, Streptokokken und Laktat verwertenden Bakterien mit je etwa 10^6 cfu/ml im Caecum etwa um das zehnfache niedriger als die entsprechenden Werte im Colon. Auch dieses Verhältnis ist stark fütterungsabhängig (de Fombelle, 2001; de Fombelle, 2003). Aus diesen Ergebnissen schließen die Autoren, dass möglicherweise nicht-Partikel-assoziierte leicht fermentierbare Kohlenhydrate eher durch das Caecum transportiert werden und größeren Einfluss auf die mikrobielle Besiedlung des Colons nehmen (s.u.) (Drogoul, 2000; de Fombelle et al., 2001). Gelangen hohe Gehalte leicht fermentierbarer Kohlenhydrate in das Caecum, kann es zur Azidose kommen. Die klinischen Konsequenzen sind verschieden und können neben Koliken und Durchfall unter anderem auch Hufrehe einschließen (Garner, 1978; Wolter, 1983; Zeyner 2003; Van Eps, 2006). Durch Gabe kurzkettiger Fructooligosaccharide dagegen konnten die Folgen einer plötzlichen

Futterumstellung auf große Mengen Gerste insofern abgemildert werden, als Laktatkonzentration und Anstieg der Laktobazillen und Streptokokken im Caecum im Vergleich zu einer Kontrollgruppe nicht oder nur abgeschwächt stattfanden (Respondek, 2008).

Tabelle 3: Mikrobielle Besiedlung des Caecuminhalts gesunder Pferde

	Kern (1974) ⁸	Greiß (1996) ⁸	Mackie (1988) ⁸	Moore (1993) ⁹	Lin, (1995) ⁵	Bailey (2003) ⁸	Julliand (1999)	Julliand (2001) ⁸	Milinovich (2008)	Maczulak (1985) ⁸	Julliand (1993) ⁸	de Fombelle (2001) ^{7,8}	de Fombelle (2003) ⁸
n Proben	5	6 ¹	11	4	1	10 ⁽⁶⁾	3	3	5	2	5	3	7
fakultativ anaerob													
aerobe Gesamtkeimzahl		7,1 (1)						6,3-8,06 (1)				ca. 7-8,1 (1)	
<i>Escherichia coli</i>	4,41 (1)	4,0 (1)							(2)				
<i>Hafnia</i> spp.		3,8 (1)											
<i>Enterobacter</i> spp.		3,6 (1)											
<i>Citrobacter</i> spp.		3,5 (1)											
<i>Acinetobacter</i> spp.		3,3 (1)											
<i>Pseudomonas</i> spp.		3,0 (1)											
<i>Flavobacterium</i> spp.		4,0 (1)											
<i>Actinobacillus</i> spp.		5,3 (1)											
<i>Streptococcus</i> spp.		5,8 (1)											
<i>Staphylococcus</i> spp.		4,0 (1)								(1)			
<i>Micrococcus</i> spp.		5,6 (1)											
<i>Bacillus</i> spp.		1,3 (1)											
<i>Streptococcus</i> spp.						ca, 7,5 (1) ⁷		5,7- 6,95 (1)	19,1- >80 % (2) ¹⁰	(1)		ca. 5,9- 7,2 (1)	6,2-6,3 (1)
<i>Streptococcus</i> <i>bovis</i>						(2)							
<i>Streptococcus</i> <i>lutetiensis</i>									(2)				
<i>Streptococcus</i> <i>gallolyticus</i>									(2)				
<i>Streptococcus</i> <i>henryi</i>									(2)				
<i>Streptococcus</i> <i>caballi</i>									(2)				
strikt anaerob													

anaerobe Gesamtkeimzahl	8,69 (1) 9,81 ¹²		9,41 (1)	8,96			8,62 (1) ⁸	7,26- 8,55 (1)		8,4-8,6 (1) 9,4-9,7 ¹²		ca. 7,7- 8,3 (1)	7,6-7,7 (1)
<i>Clostridium perfringens</i>		<1,0 (1) ²											
<i>Butyrivibrio spp.</i>										(1)			
<i>Anaerovibrio spp.</i>									3,9-12,4 % (2) ¹⁰ <40 % ¹¹				
<i>Anaerovibrio lipolyticus</i>									<0,06 % (2) ¹⁰				
<i>Succinivibrio spp.</i>									(2) , <40 % ¹¹				
<i>Succinivibrio dextrinosolvens</i>									<19,4 % (2) ¹⁰				
<i>Lactobacillus spp.</i>		6,0 (1)	8,54 (1) ¹³			ca. 7,1 ⁷ (1)		5,62- 6,87 (1)		(1)		ca. 5,7- 7,2 (1)	6,1-6,2 (1)
<i>Lactobacillus equi</i>									(2)				
<i>Lactobacillus hayakitensis</i>									(2)				
<i>Lactobacillus mucosae</i>						(2)							
<i>Lactobacillus reuteri</i>						(2)							
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>						(2)							
<i>Lactobacillus salivarius</i>						(2)							
<i>Lactobacillus fermentum</i>						(2)							
<i>Bacteroides spp.</i>										(1)			
<i>Fibrobacter succinogenes</i>					12% (2) ⁵		0,28-4,3 % (2) ⁵						
<i>Selenomonas spp.</i>										(1)			
<i>Propionibacterium spp.</i>										(1)			
<i>Eubacterium spp.</i>										(1)			
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>							1,9-4,69 % (2) ⁵						
<i>Ruminococcus albus</i>							< 0,01 % (2) ⁵						

funktionelle Gruppen													
Proteolyten			9,2								5,5-6 ³		
Cellulolyten	7,63 ⁹			7,28			7,2 ⁹	4,78-6,27			6,7-6,97 ³	ca. 5,5-5,8	5,0-6,0
Laktat verwertende Bakterien			8,7 ²					5,39-6,18				ca. 5,7-6,2	5,6-6,1

Identifikation der Mikroorganismen: (1) phänotypisch, (2) genotypisch

¹ 21 Proben, davon 6 von gesunden Tieren, ² ein Tier, ³ nach 7-tägiger Inkubation (nach Hungate, 1950), ⁴ keine Angabe zur Methode, ⁵ Angabe in % der gesamten isolierten rRNA, ⁶ in-vitro Studie, ⁷ aus Diagramm, ⁸ colony count; Ig/g(ml) Chymus, ⁹ Angabe als Most Probable Number, ¹⁰ in % der Bakterienpopulation (qPCR), ¹¹ in % der Bakterienpopulation (Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung), ¹² direkte mikroskopische Auszählung, ¹³ drei Tiere

2.2.6 Colon

Das Colon des Pferdes ist stark entwickelt mit einem Gesamtvolumen von etwa 100 Litern, die Colonpassage dauert bis zu 24 Stunden (Meyer, 2002). Beginnend mit dem *Collum coli*, das den Übergang vom Caecum zum Colon bildet, setzt es sich zuerst als *Colon ventrale dextrum* kranial fort, um dann an der *Flexura diaphragmatica ventralis* in das *Colon ventrale sinistrum* überzugehen. An der *Flexura pelvina* geht es in das *Colon dorsale sinistrum* und schließlich an der *Flexura diaphragmatica dorsalis* in das *Colon dorsale dextrum* über. Das *Colon transversum* bildet den Übergang zum langen und engen *Colon descendens* (Nickel, 2004). Ebenso wie das Caecum ist das Colon Ort der Faserverdauung (Kern, 1974). Die anaerobe GKZ im Colon des Pferdes erreicht bei Heufütterung Werte von etwa 10^8 cfu/ml (Muhonen, 2009). Werden erhöhte Mengen Konzentratfutter (Gerste vs. Heu) gefüttert, kann die Gesamtkeimzahl vor allem aufgrund der Zunahme der amylytischen Bakterien ansteigen, während die Keimzahlen cellulolytischer Bakterien abnehmen. Die Keimzahlen der Laktobazillen, Streptokokken und der Laktat verwertenden Bakterien nehmen nach Erhöhung des Stärkegehalts im Futter zu. Diese Veränderungen sind individuell unterschiedlich ausgeprägt (Julliand, 2001; Muhonen, 2009). Wird von Heu als Raufutter plötzlich auf Grassilage umgestellt, so wird nach drei Wochen ein Anstieg der Laktobazillenpopulation von $5,01 \times 10^5$ /ml Chymus auf $1,58 \times 10^6$ /ml beobachtet. Wird anstelle dessen Heulage eingesetzt, sinkt die Anzahl der Streptokokken von 10^6 cfu/ml auf etwa 10^5 cfu/ml. In dieser Studie wurde ein Einfluss der Raufutterumstellung auf die anaerobe GKZ ebenso wenig festgestellt wie Veränderungen der Konzentrationen von cellulolytischen oder Laktat verwertenden Bakterien (Muhonen, 2009).

In einigen Studien konnten fütterungsbedingte Veränderungen der Mikrobiota vor allem im Colon, weniger im Caecum beobachtet werden (de Fombelle, 2001; Julliand, 2001). Unabhängig von Änderungen des Stärkegehalts der Ration konnte festgestellt werden, dass die Keimzahlen amylytischer und Laktat verwertender Bakterien im Colon höher sind als im Caecum (de Fombelle, 2001). Diese Autoren schließen, dass das Caecum geringeren Konzentrationen leicht fermentierbarer Kohlenhydrate ausgesetzt ist, als die ventralen Colonlagen. Ebenso kann aber geschlossen werden, dass gerade aufgrund dieser Verteilung das Caecum besonders empfindlich auf erhöhte Gehalte leicht fermentierbarer Polysaccharide in der Ingesta reagiert.

Des Weiteren ist die mikrobielle Besiedlung des Colons nicht homogen. In der rechten ventralen Colonlage entspricht sie am ehesten der des Caecums. Die cellulolytischen Bakterien nehmen in den hinteren Dickdarmabschnitten ab (de Fombelle, 2003). Diese Effekte beruhen wahrscheinlich auf zwei Mechanismen, einerseits werden Partikel von >1 cm Länge

an der Beckenflexur zurückgehalten und andererseits der Durchfluss von Flüssigkeit und kleinen Partikeln am Übergang von der rechten dorsalen Colonlage ins distale Colon verzögert („Colonic Separation Mechanism“) (de Fombelle, 2003; Drogoul, 2000).

Auch *Clostridium difficile* konnte in allen Dünn- und Dickdarmabschnitten gesunder Pferde nachgewiesen werden. In acht von 15 gesunden Tieren wurden toxigene Stämme nachgewiesen. *C. difficile* wird mit akuter Enterocolitis beim Pferd in Verbindung gebracht, deren Verlauf von milden Enterocolitiden bis zu schweren hämorrhagisch- nekrotischen Entzündungen reichen kann. Auch Entzündungen des Duodenums und Jejunums können durch *C. difficile* ausgelöst werden (Schoster, 2012). Neben Enterocolitiden wird *C. perfringens* außerdem mit der Equine Grass Sickness (EGS) assoziiert, einer Polyneuropathie, die sich meist als Kolik mit gastrointestinaler Stase äußert. In der vorliegenden Studie konnte *C. perfringens* nur aus dem Colon eines klinisch gesunden Tieres isoliert werden (Schoster, 2012).

Tabelle 4: Mikrobielle Besiedlung des Coloninhalts gesunder Pferde

	Mackie (1988) ¹	Fujisawa (1993)	Moore (1993) ¹	Lin (1995)	de Fombelle (2001) ¹	Kern (1974)	Julliand (2001)	de Fombelle (2003)
n Proben	11		4	1	3	5	3	7
fakultativ anaerob								
aerobe Gesamtkeimzahl					ca. 7-8,1 ⁵			
<i>Escherichia coli</i>						5,33 (1)		
<i>Streptococcus</i> spp.					ca. 6,1-7,5(1) ⁵		6,51- 7,64 (1) ⁷	7,1-7,6 ⁷ 6,9-7,4 ⁸
strikt anaerob								
anaerobe Gesamtkeimzahl	8,78 (1)		9,51 (1)		ca. 7,7-8,3 ⁵	8,56 (1) 9,5 ⁶		8,1-8,9 ⁷ 8,3-8,6 ⁸
<i>Lactobacillus</i> spp.	8,32 (1) ²	(1)			ca. 6,5-8,5(1) ⁵		6,63- 8,58 (1) ⁷	7,0-7,4 ⁷ 7,4-7,5 ⁸
<i>Lactobacillus reuteri</i>		(1)						
<i>Lactobacillus acidophilus</i>		(1)						
<i>Lactobacillus salivarius</i>		(1)						
<i>Fibrobacter succinogenes</i>				4% (2) ⁴				
<i>Fibrobacter intestinalis</i>				(2)				
funktionelle Gruppen								
Proteolyten	8,48							
Cellulolyten			7,42		ca. 5,5-5,8 ⁵	6,85		5,5-6,0 ⁷ 4,7-5,6 ⁸
Laktat verwertende Bakterien	8,04 ³				ca. 6,5-7,5 ⁵		6,49- 7,33 ⁷	5,8-6,0 ⁷ 5,9-6,5 ⁸

Identifikation der Mikroorganismen: (1) phänotypisch, (2) genotypisch

¹colony counts in Ig/g (ml) Chymus, ² drei Tiere, ³ ein Tier, ⁴ Angabe in % der isolierten rRNA, ⁵ aus Diagramm, ⁶ mikroskopische Auszählung, ⁷ rechte ventrale Colonlage, ⁸ linke dorsale Colonlage

2.2.7 Faeces

Wie auch in der vorliegenden Arbeit wird aus praktischen Gründen meist auf Faeces zurückgegriffen, um ein möglichst repräsentatives Bild der mikrobiellen Besiedlung der hinteren Abschnitte des Verdauungstrakts zu erhalten. Dementsprechend liegen vergleichsweise viele Studien vor, die die bakterielle Besiedlung von Pferdekot untersuchen. Die Aussagekraft dieser Proben wird unterschiedlich bewertet. Während einer Studie zufolge das mikrobiologische Profil von Kotproben am ehestem dem des Caecums entspricht (Schoster, 2013), wurden in einer anderen Studie große Abweichungen festgestellt (Dougal, 2012).

In einer Studie, die 104 16SrDNA Klone aus Faeces mit bekannten Gensequenzen verglich, konnten nur bei 3,8 % der Sequenzen Ähnlichkeiten ab 97 % mit Sequenzen aus der GenBank festgestellt werden. Der Großteil (96,2 %) der molekularbiologisch im Pferdekot nachgewiesenen Sequenzen zeigte weniger genetische Übereinstimmung mit derzeit bekannten Arten. Diese Studie stellte außerdem Unterschiede zwischen Wild- und Hauspferden fest (Yamano, 2008). In einer anderen Studie konnten 27 % der 67 isolierten Sequenzen bekannten Arten zugeordnet werden (Ähnlichkeit >97 %). Die größte Ähnlichkeit der aus Pferdekot isolierten Gensequenzen bestand zu Sequenzen, die zuvor aus dem Kot anderer Tierarten, die ebenfalls Energie aus Fermentation im Dickdarm gewinnen, isoliert wurden (Willing, 2009). Die bakterielle Diversität im Pferdekot ist höher als die von Menschen, Schweinen und Rindern und die Bakterienpopulation wird weniger stark von einzelnen taxonomischen Gruppen dominiert. Es konnten Vertreter aus 10 Bakterienstämmen identifiziert werden (Shepherd, 2012). Die dominierenden Arten unter den Laktobazillen sind *L. hayakitensis*, *L. equigenerosi* und *L. equi* (Morita, 2009).

Auch neuere Studien weisen eine hohe Artenvielfalt der fäkalen Mikrobiota nach. So konnten von 158 mittels Pyrosequenzierung identifizierten Gattungen nur 40 mit einer relativen Häufigkeit von >1 % nachgewiesen werden. Es dominieren die Familien *Ruminococcaceae*, *Lachnospiraceae* und bisher nicht identifizierte Familien innerhalb der Clostridiales und Bacteroidales. Ein Fütterungseinfluss durch siliertes Raufutter in Kombination mit Getreide im Vergleich zu Weide äußerte sich weniger als Änderung der Artenvielfalt und vielmehr als Änderung der Häufigkeit einzelner Bakterienarten (Fernandes, 2014). In einer weiteren Studie wurde wiederum mittels Pyrosequenzierung die Dominanz der Firmicutes gefolgt vom Stamm der Bacteroidetes bestätigt (Dougal, 2014). In einer Studie, in der die Faeces von sechs Rennpferden untersucht wurden, zeigte sich ebenfalls die Dominanz der Firmicutes und

Bacteroidetes, gefolgt von den Stämmen *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Actinobacteria*, *Euryarchaeota*, *Fibrobacteres* and *Spirochaetes* (O'Donnell, 2013).

Ähnlich den weiter proximal gelegenen Darmabschnitten kann auch in den Faeces ein gewisser Fütterungseffekt nachgewiesen werden. Bei erhöhten Gaben leichtverdaulicher Kohlenhydrate werden Laktobazillen und Streptokokken in größerer Anzahl gemessen (de Fombelle, 2003; Willing, 2009). Mittels Pyrosequenzierung von 16S rDNA wurde ein Fütterungseinfluss durch Stärke und Öl an der abnehmenden Häufigkeit der Firmicuten und bei Ölfütterung an dem vermehrten Nachweis von *Proteobacteria* verglichen mit reiner Heufütterung nachgewiesen. Außerdem stellten die Autoren fest, dass die bakterielle Diversität in den Faeces älterer Pferde (5-12 Jahre vs. 19-28 Jahre) abnimmt (Dougal, 2014).

Neuere Untersuchungen zeigen, dass das Phylum Methanomicrobiales offenbar die am häufigsten vorkommende Gruppe der methanogenen Archaeen im Dickdarm des Pferdes darstellt. Die meisten der aus Kotproben isolierten Klone waren allerdings nicht eindeutig taxonomisch identifizierbar (Lwin, 2014). Zuvor waren mittels Sequenzanalyse bakterieller 16S rDNA *Methanobrevibacter ruminantium* und *Methanocorpusculum parvum* identifiziert worden (Yamano, 2008).

Mittels Sequenzierung konnten Hinweise darauf gewonnen werden, dass eine Colitis auf einer bakteriellen Dysbiose und einer Verschiebung zugunsten der *Bacteroidetes* (14,2 % der RNA gesunder Pferde vs. 40 % bei Pferden mit Colitis) und *Proteobacteria* (10 % vs. 18 %) bei Abnahme der Vertreter der Firmicuten (68,1 % vs. 30,3 %) beruhen kann. *Actinobacteria*, Spirochäten, *Lachnospiraceae* und Clostridien wurden bei gesunden Pferden in größeren Konzentrationen im Kot nachgewiesen. Die Autoren schließen auf eine Dysbiose, eine Verschiebung des bakteriellen Gleichgewichts im Gegensatz zu einer Vermehrung eines spezifischen pathogenen Bakteriums als mögliche Ursache der Colitis beim Pferd (Costa, 2012).

Tabelle 5: Mikrobiota in den Faeces gesunder Pferde

	Garrett (2002)	de Fombelle (2003)	Endo (2007)	Willing (2009)	Endo (2009)	Weaver (2005)	Koike (2000)	Kuhl (2011)	Morita (2009) ⁷	Yamano (2008)	Berg (2005)	Shepherd (2012) ⁷
n Proben	6	7	6	6	12	4	4 ⁵ +2	30	9	4 ⁵ +2	9	2
fakultativ anaerob												
aerobe Gesamtkeimzahl	8,56 (1)						10,2 ^{3,6} - 10,8 (1) ^{4,5}				4,9	
<i>Enterobacteriaceae</i>				2,5-5,3 (1)								
<i>Escherichia coli</i>				(1) (2)		4,8 (1)		2,3-2,9 (1)				
<i>Escherichia fergusonii</i>				(1) (2)								
<i>Actinobacillus</i> spp.												0,03 % (2)
<i>Enterococcus</i> sp.								1,6-2,5 (1)				
<i>Streptococcus</i>		7,4-7,8 (1)	8,50 (2)			5,5 (1)		0,6-2,5 (1)				0,17 % (2)
<i>S. bovis/S. equinus</i>			(2)					(2)				
<i>Staphylococcus</i>								0,1-1,7 (1)				
<i>Proteus</i> sp.								≤ 0,4 (1)				
<i>Acinetobacter</i> sp.								≤ 1,2 (1)				
<i>Asaccharobacter</i> spp.												0,03 % (2)
<i>Denitrobacterium</i> spp.												0,05 % (2)
strikt anaerob												
anaerobe Gesamtkeimzahl	8,64 (1)	8,3-8,6 (1)										
<i>Clostridium bifermentans</i>	(1)											
<i>Clostridium polysac- charolyticum</i>										(2) ⁵		
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>										(2) ⁵		
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	(1)											
<i>P. prevotii</i>	(1)											
<i>P. productus</i>	(1)											
<i>P. micros</i>	(1)											
<i>Sarcinia ventriculi</i>	(1)											

<i>Lactobacillus</i>	(1)	7,4-7,5 (1)	8,47 (2)		7,49 (2)						7,11	0,36 % (2)
<i>Lactobacillus crispatus</i>									(2)			
<i>Lactobacillus amylovorus</i>									(2)			
<i>Lactobacillus johnsonii</i>			(2)		(2)				(2)			
<i>Lactobacillus salivarius</i>			(2)	(1) (2)					(2)			
<i>Lactobacillus reuteri</i>									(2)			
<i>Lactobacillus equi</i>			(2)	(1) (2)	(2)				(2)			
<i>Lactobacillus gastricus</i>			(2)*									
<i>Lactobacillus ruminis</i>				(1) (2) ¹								
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>									(2)			
<i>Lactobacillus buchneri</i>									(2)			
<i>Lactobacillus vitulinus</i>												
<i>Lactobacillus mucosae</i>				(1) (2)					(2)			
<i>Lactobacillus agilis</i>				(1) (2)					(2)			
<i>Lactobacillus hayakitensis</i>					(2)				(2)			
<i>Lactobacillus equigenosus</i> sp. nov.					(2) ²				(2)			
<i>Eubacterium</i> spp.	(1)											0,09 % (2)
<i>Bifidobacterium</i>	(1)											
<i>Parascardovia denticolens</i> (<i>Bifidobacterium denticolens</i>)			(2)		(2)							
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>					(2) ²							
<i>Bifidobacterium urinalis</i>			(2)*									
<i>Bifidobacterium boum</i>			(2)									
<i>Weissella confusa</i> / <i>Weissella cibaria</i>			(2)		(2)							
<i>Ruminococcus</i> spp.										(2) ^{*5}		0,50 % (2)
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>							(2)					

<i>Ruminococcus albus</i>							(2)					
<i>Fibrobacter</i> spp.										(2)		0,75 % (2)
<i>Fibrobacter succinogenes</i>							(2)			(2) ^{*5}		
<i>Alloscardovia omnicolens</i>					(2) ^{*2}							
<i>Acetivibrio</i> spp.												0,19 % (2)
<i>Acidaminococcus</i> spp.												0,31 % (2)
<i>Anaerosporebacter</i> spp.												0,09 % (2)
<i>Blautia</i> spp.												0,92 % (2)
<i>Coprococcus</i> spp.												0,23 % (2)
<i>Faecalibacterium</i> spp.												0,08 % (2)
<i>Mogibacterium</i> spp.												0,16 % (2)
<i>Oscillibacter</i> spp.												0,43 % (2)
<i>Papillibacter</i> spp.												0,07 % (2)
<i>Pseudobutyrvibrio</i> spp.												0,23 % (2)
<i>Roseburia</i> spp.												0,27 % (2)
<i>Schwartzia</i> spp.												0,12 % (2)
<i>Sporobacter</i> spp.												0,22 % (2)
<i>Treponema</i> spp.												1,93 % (2)
<i>Treponema zioleckii</i>										(2) ^{*5}		
<i>Treponema bennaborensis</i>										(2) ^{*5}		
<i>Prevotella</i> spp.												0,23 % (2)
<i>Prevotella albensis</i>										(2) ^{*5}		
<i>Selenomonas ruminantium</i>										(2) [*]		
<i>Mollicutes</i> spp.												0,13 % (2)
<i>Succinivibrio</i> spp.												0,16 % (2)
funktionelle Gruppen												
cellulolytische Bakterien		5,0-5,2										
Laktat verwertende Bakterien		6,2-6,3										
Milchsäurebakterien				ca. 6,5- 7,5								

Identifikation der Mikroorganismen: (1) phänotypisch, (2) genotypisch

* phylogenetisch verwandt, ¹ nur bei Verfütterung von Konzentratfutter, ² in 1 von 12 Tieren, ³ Winter, ⁴ Sommer, ⁵ Hokkaido native horses, ⁶ mikroskopische Auszählung, ⁷ Sequenzierung 16S rRNA

2.3 Probiotika

2.3.1 Definition

Mit seiner Definition von Probiotika als „A live microbial feed supplement which beneficially affects the host animal by improving its intestinal microbial balance“ (Fuller, 1989) legte FULLER 1989 erstmals Betonung darauf, dass ein probiotischer Organismus lebensfähig sein muss. Eine von der Expertenkommission der FAO/WHO aufgestellte Definition aus dem Jahre 2001 bezieht sich nur auf die Wirkung, ohne den Wirkmechanismus in den Vordergrund zu stellen: “Probiotics are live microorganisms which when administered in adequate amounts confer a health benefit on the host“ (Julliand, 2006).

2.3.2 Geschichte der Probiotika und rechtlicher Hintergrund

Seit Beginn des 20. Jahrhunderts ist dank der Arbeit von Elie Metchnikoff das Prinzip der Aufnahme lebender Mikroorganismen zur Verbesserung der Gesundheit des Wirtsorganismus bekannt (Fuller, 1992). Er nannte den von ihm in fermentierten Milchprodukten entdeckten Organismus *Bacillus bulgaricus* (Busch, 1999). Nur wenige Jahre später wurde bereits an der Verabreichung intestinaler Isolate geforscht (Rettger, 1921). Etwa 50 Jahre nach der Arbeit von Metchnikoff begann die Aufdeckung der Rolle, die die Mikrobiota des Gastrointestinaltrakts für die Gesundheit des Wirtsorganismus spielen (Bohnhoff, 1954; Freter, 1955). Aus diesen Erkenntnissen entstand Interesse an der Erforschung möglicher Probiotika, nicht zuletzt als Alternative zu antibiotischen Leistungsförderern (Fuller, 1992).

Vor dem Einsatz als Futterzusatzstoff müssen Probiotika im Rahmen der Verordnung (EG) 1831/2003 über Zusatzstoffe zur Verwendung in der Tierernährung zugelassen werden. In dieser Verordnung werden verschiedene Kategorien von Futtermittelzusatzstoffen unterschieden. Probiotika gehören zu den zootechnischen Zusatzstoffen. Neben dem Nachweis von Unbedenklichkeit, Wirksamkeit und Stabilität müssen für die Zulassung eines Probiotikums unter anderem Daten zu Identität, Charakteristika sowie Bedingungen für den Einsatz der Mikroorganismen und zur Umweltsicherheit vorgelegt werden. Die Zulassung erfolgt nach den Maßgaben der Verordnung (EG) Nr. 429/2008 mit Durchführungsbestimmungen zur Verordnung (EG) Nr. 1831/2003. Der Antrag auf Zulassung als Futtermittelzusatzstoff wird über das Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit an die Europäische Kommission weitergeleitet und von der Europäischen Lebensmittelbehörde (EFSA) geprüft, hierzu muss der Antragsteller außerdem

Informationen zur Nachweisbarkeit und über mögliche Rückstände im Lebensmittel an das Gemeinschaftliche Referenzlabor übergeben. Auf der Basis der von der EFSA erstellten Stellungnahme und des Bewertungsberichts verfasst die Europäische Kommission einen Verordnungsentwurf und nimmt ggf. auch die Eintragung in das Gemeinschaftsregister vor. Die Zulassung erfolgt für einen Stamm und eine Tierart für 10 Jahre und kann auf Antrag verlängert werden.

2.3.3 Wirkungsweise von Probiotika

Über die gesetzlichen Anforderungen an ein probiotisches Präparat hinaus muss ein Stamm andere Eigenschaften haben, die entscheidend für seine Wirksamkeit und somit Verwendbarkeit als Probiotikum sind. So sind Bakterien, die die Fähigkeit zur Kolonisierung des Gastrointestinaltrakts besitzen von besonderem Interesse, da sie einerseits eine kontinuierliche Verabreichung überflüssig machen würden (Bezkorovainy, 2001) und andererseits eine Konkurrenz zu pathogenen Bakterien entsteht ließen, die zumeist an Schleimhautrezeptoren binden müssen, um Symptome auslösen zu können (Cho, 2011). Eine anhaltende Kolonisation des Gastrointestinaltrakts durch ein Probiotikum konnte *in vivo* bisher nicht nachgewiesen werden (Ohashi, 2009). Für das Überleben der Darmpassage und somit das Erreichen ihres Wirkungsortes sind außerdem Resistenz gegen Magensäure und Enzyme des Verdauungstrakts entscheidend (Bezkorovainy, 2001; Dunne, 2001). Die Art der Wirkung eines Probiotikums hängt von seinen metabolischen und antigenen Eigenschaften ebenso wie von möglicherweise sezernierten Substanzen ab (Soccol, 2010). Ein weiterer Aspekt ist die Abhängigkeit der Wirkung eines Probiotikums von der mikrobiellen Ausgangssituation im Darmtrakt des Wirtes, die individuell stark unterschiedlich sein kann und eine Vorhersage der Höhe der Effekte unmöglich macht (Mackie, 1999; Ohashi, 2009; Simon, 2005).

Die Wirkungsmechanismen von Probiotika werden kontinuierlich besser aufgeklärt, sind aber stammspezifisch, sodass Forschungsergebnisse nicht übertragbar sind (Dongarrà, 2013; Salminen, 2004). Es kann grundsätzlich zwischen der Wirkung des Probiotikums auf den Wirt und seiner Wirkung auf dessen intestinales Mikrobiom unterschieden werden (Murguía-Peniche, 2013). Aus diesem Grund wird an der Aufklärung der Mechanismen der Wirt-Mikroben Interaktion und der Interaktion der Mikrobiota untereinander ebenso wie deren gesundheitlichen Auswirkungen konzentriert geforscht (Soccol, 2010). Viele der klinisch zu beobachtenden Auswirkungen nach Supplementierung mit Probiotika beruhen auf einer indirekten Wirkung, die beispielsweise durch die stationären intestinalen Bakterien vermittelt wird (Ohashi, 2009). So wurde für verschiedene Stämme zum Beispiel der Gattungen *Lactobacillus* und *Lactococcus* nachgewiesen, dass sie in der Lage sind, zum Teil sehr spezifisch wirkende antibakterielle Peptide zu produzieren (Flynn, 2002; Ng, 2009). Im Darm

des Wirtstieres rufen probiotische Stämme über verschiedene Effektormoleküle und Rezeptoren eine spezifische Antwort von Immunzellen ebenso wie Epithelzellen hervor (Riedel, 2006). Probiotische Bakterien können die Permeabilität der Darmschranke durch Beeinflussung der *tight junctions* der Epithelzellen herabsetzen (Guarner, 2003). Die genauen Abläufe hinter der Beeinflussung der Darmschranke sind unklar, könnten aber auf Veränderungen der Schleim- oder Chloridsekretion oder einer veränderten Proteinexpression der *tight junctions* selbst zurückzuführen sein (Ng, 2009). Nachdem *in vitro* bereits eine erhöhte mRNA- Expression der Gene *MUC2* und *MUC3* bei Inkubation von *L. plantarum* mit einer Epithelzelllinie nachgewiesen wurde (Mack, 1999), führte die Gabe einer Mischung aus verschiedenen probiotischen Bakterien der Gattungen *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* und *Streptococcus* bei Ratten durch Hochregulierung des *MUC2*- Gens zu einer Erhöhung der luminalen Mucinproduktion im Colon (Caballero-Franco, 2007).

Die Immunmodulation durch Probiotika erfolgt zum Beispiel über die Erkennung durch membranständige *pattern recognition receptors* (PRRs) auf Immunzellen, welche dann unterschiedliche Signalkaskaden aktivieren. Probiotika können so Einfluss nehmen auf regulatorische T-Zellen, die Prägung naiver T-Zellen und antigenpräsentierende Zellen wie dendritische Zellen und Makrophagen (Wells, 2011). Eine bekanntermaßen durch Probiotika beeinflusste Signalkaskade umfasst die Erkennung von Zellwandbestandteilen durch TLR-2 (*toll-like receptor*) und die durch den *Nuclear factor κ B* (NF κ B) vermittelte Produktion von Chemokinen wie Interleukinen, Tumornekrosefaktoren und Defensinen beim Menschen (Riedel, 2006; Wells, 2011). Diese Botenstoffe können als Signal zur Differenzierung naiver T-Zellen dienen (Dongarrà, 2013). Weiterhin kann über die Bindung eines Bakteriums an TLRs Einfluss auf Cytoprotektion, epitheliale Zellproliferation und die Sekretion antimikrobieller Peptide ausgeübt werden (Patel, 2010).

Viele Laktobazillen sind an Milieu und Substratverfügbarkeit im Magen-Darm-Trakt angepasst, sodass aufgrund größerer Überlebenschancen ein Vorteil gegenüber anderen potentiell probiotischen Bakterien entstehen kann (Socol, 2010). Zu den bisher bekannten Eigenschaften probiotischer Laktobazillen zählt die Beeinflussung der intestinalen *Lactobacillus*-Stämme bezüglich der Anzahl und der Zusammensetzung beim Schwein (Ohashi, 2007; Takahashi, 2007). Als Ursache für diese Effekte kann die Produktion von Wachstumsfaktoren durch die probiotischen Stämme infrage kommen (Ohashi, 2009). Eine Folge dieser veränderten intestinalen Bakterienpopulation ist der Anstieg der Produktion kurzkettiger Fettsäuren durch Vermehrung der Laktat verwertenden Bakterien (Ohashi, 2009). Auch eine stammspezifische Immunmodulation wurde *in vitro* bereits für probiotische Laktobazillen nachgewiesen (Delcenserie, 2008; Ohashi, 2009; Vaarala, 2003). Die

Stammspezifität ergibt sich hierbei zum einen durch Produktion verschiedener Effektormoleküle der Laktobazillen, wie beispielsweise von proinflammatorischer Lipoteichonsäure (van Baarlen, 2013). Das Genom von *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) kodiert für das SpaC- Protein, das an die Muzinschicht der Darmwand binden kann und so die gegenüber anderen Bakterien erhöhte Verweildauer im Verdauungstrakt des Menschen erklärbar macht. Für die LGG wurde *in vitro* eine verringerte Apoptoseinduktion durch Cytokine nachgewiesen (van Baarlen, 2013). Dieser Effekt kann auf der Sekretion der Proteine p40 und p75, für die im Mausmodell eine epitheliale Schutzfunktion nachgewiesen wurde, beruhen (Yan, 2007). Die entsprechenden Gene finden sich bei verschiedenen Stämmen der Spezies *L. rhamnosus* und *L. casei* (van Baarlen, 2013). Eine Immunmodulation über eine Beeinflussung des Nuclear Factor κ B (NF κ B) wurde beispielsweise für *L. acidophilus* Lafti-L10 nachgewiesen (van Baarlen, 2011). Nach derzeitigem Kenntnisstand ist die Wachstumsphase, in der sich ein probiotischer Stamm befindet, von großer Bedeutung für sein immunmodulatorisches Potenzial. Während *L. plantarum* in der stationären Phase eine Immunstimulation im Duodenum des Menschen bewirkte, konnte dieses Ergebnis für Bakterien aus der exponentiellen Wachstumsphase nicht bestätigt werden (van Baarlen, 2009). Ebenso ist aber die immunologische Ausgangssituation des Wirtes entscheidend, da Anzahl und Zustand von Immunzellen über die Induktion von Signalkaskaden bestimmen. Und schließlich muss die individuelle Genetik des Wirtsorganismus sowie deren Prägung in Betracht gezogen werden, da *in vivo* individuell unterschiedliche Proteinexpressionsmuster als Reaktion auf Probiotikasupplementierung festgestellt werden können (van Baarlen, 2013).

Bei *in vitro* Behandlung isolierter menschlicher Darmabschnitte mit dem probiotischen Bakterium *Bifidobacterium infantis* wurden vermehrt die antiinflammatorischen Chemokine Interleukin-10 und TGF β über die Aktivierung dendritischer Zellen produziert (O'Mahony, 2006). Außerdem konnte eine Induktion regulatorischer T-Zellen nachgewiesen werden (O'Mahony, 2008). In Folge derartiger Immunmodulation sowie ebenfalls der Bindung an menschliche Epithelzellen ohne Aktivierung der NF κ B- Signalkaskade kann *Bifidobacterium infantis* eine Regulation überschießender Immunreaktionen bewirken (Konieczna, 2012).

Bisher konnten für eine Vielzahl probiotischer Keime in unterschiedlichen Wirten immunregulatorische Eigenschaften nachgewiesen werden. Ob die messbaren Wirkungen pro- oder antiinflammatorisch ausfallen, hängt neben dem eingesetzten Stamm von den beeinflussten Immunzellen sowie nicht zuletzt von den im jeweiligen Versuch erhobenen immunologischen Parametern ab (Delcenserie, 2008).

Die beschriebenen Mechanismen wirken ebenso wie eine beabsichtigte Nahrungskonkurrenz der Ansiedlung und Vermehrung potentiell pathogener Bakterien im Gastrointestinaltrakt entgegen (Busch, 1999).

2.3.4 Probiotika in der Tierernährung

Aufgrund ihrer prophylaktischen und stabilisierenden Auswirkungen empfehlen sich Probiotika vor allem für den Einsatz in Lebensabschnitten, in denen das Tier erhöhtem Stress ausgesetzt ist. Hierzu gehören unabhängig von der Tierart der Zeitraum nach dem Absetzen und die Laktation. Sie werden aber ebenso zur Leistungsförderung während der Mast eingesetzt (Chaucheyras-Durand, 2010). In der Tierernährung kommen Milchsäurebakterien, Hefen und Bazillussporen zur Stabilisierung der intestinalen Bakterienpopulation zum Einsatz. Zu den verwendeten Milchsäurebakterien gehören u.a. die Gattungen *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* und *Weissella* (Alloui, 2013).

In der Schweinefütterung wird bereits eine relativ breite Palette probiotischer Bakterien eingesetzt. Neben Laktobazillen und Hefen der Gattung *Saccharomyces* sind vor allem Stämme von *Enterococcus spp.*, *Bacillus spp.*, *Streptococcus spp.* und Bifidobakterien auf ihren möglichen Einsatz als Probiotikum untersucht worden (Cho, 2011; Reid, 2002). In zahlreichen Studien konnten positive Effekte auf Leistung und Verdaulichkeit wie eine Erhöhung der Futterverwertung und täglichen Zunahmen sowie Abnahme der Durchfallinzidenz, besonders während der Aufzucht, nachgewiesen werden (Cho, 2011; Reid, 2002; Sauter, 2003; Simon, 2005). Als zugrunde liegende Mechanismen kommen neben einer kompetitiven Hemmung pathogener Bakterien die Stabilisierung der intestinalen Barrierefunktion sowie die Förderung der Reifung des darmassoziierten Immunsystems infrage (Bohmer, 2006; Corcionivoschi, 2010; Taras, 2005). Beim Wiederkäuer kommen vor allem Hefen zum Einsatz, die die Trockensubstanzaufnahme und die Milchleistung (Jouany, 2006; Stella, 2007) sowie Wachstumsparameter erhöhen können (Lesmeister, 2004). Diese Effekte werden auf eine erhöhte Faserverdaulichkeit zurückgeführt (Chaucheyras-Durand, 2010; Guedes, 2008). Hierfür wiederum kommt ursächlich die Bereitstellung der für die Pansenflora notwendigen Vitamine durch die Hefe infrage (Corcionivoschi, 2010). Außerdem kann eine Supplementierung mit Lebendhefen den ruminalen pH- Wert stabilisieren und das Azidoserisiko senken (Chaucheyras-Durand, 2008; Marden, 2008; Stephens, 2007; Tabe, 2008). Der seit vielen Jahren erfolgreiche Einsatz von Probiotika beim Geflügel beruht u.a. auf der Arbeit von Nurmi und Rantala, die das Prinzip der kompetitiven Hemmung enteropathogener Bakterien durch Verfütterung von Darminhalt resistenter Tiere beschrieben („Nurmi- Konzept“) (Nurmi, 1973). Einer der seither diskutierten zugrunde liegenden Mechanismen ist die Produktion kurzkettiger Fettsäuren durch die enthaltenen

Mikroorganismen. Dieser Ansatz erklärt allerdings nicht, dass ein Schutz gegen Salmonelleninfektionen bereits nach 1-2 Stunden erkennbar wird (Schneitz, 2005). Aber auch einzelne probiotische Stämme finden beim Geflügel Verwendung. Neben einer Leistungssteigerung konnten bei Supplementierung mit Milchsäurebakterien oder *Bacillus subtilis* experimentell Infektionen verhindert werden oder deren klinische Symptomatik abgeschwächt werden (Alloui, 2013; Higgins, 2008; Morishita, 1997; Reid, 2002). Puten, die mit *Salmonella* Enteritidis infiziert wurden, zeigten unter Supplementierung mit einer *Lactobacillus*- Kultur in Kombination mit Lactose eine höhere Leistung als eine Kontrollgruppe (Vicente, 2007). Stämme wie beispielsweise *Lactobacillus reuteri* können die Überlebensrate von Puten und Hühnern bei Infektionen mit Bakterien wie *S. Typhimurium* und enteropathogenen *E. coli* verbessern (Reid, 2002).

Bei Hunden wurde für verschiedene probiotische Stämme der Gattungen *Lactobacillus* spp. und *Bacillus* spp. eine transiente Kolonisierung des Darms nachgewiesen (Benyacoub, 2003; Biagi, 2007; Manninen, 2006). Daneben zeigen einige Studien Hinweise auf die Stimulierung sowohl der humoralen (Benyacoub, 2003) als auch der zellulären (Baillon, 2004) Immunantwort. In klinischen Studien konnte durch Gabe verschiedener Probiotika die Erkrankungsdauer von akuten und idiopathischen Durchfallerkrankungen gesenkt werden (Herstad, 2010; Lefebvre, 2011).

2.3.5 Probiotika in der Pferdefütterung

Der Einsatz von Probiotika beim Pferd unterscheidet sich vom Nutztierbereich durch die grundsätzlich anders gearteten Ansprüche an ihre Wirkung. Werden bei Nutztieren wirtschaftliche Kriterien, insbesondere die Gewichtszunahme zur Wirksamkeitsbeurteilung herangezogen, stehen beim Pferd gastrointestinale Probleme unterschiedlichster Genese als Anwendungsbereich im Vordergrund (Zentek, 2008). Nach gültigem Gemeinschaftsregister der Futtermittelzusatzstoffe ist der derzeit einzige explizit als Probiotikum zugelassene Zusatzstoff für Pferde die Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, die nach Anhang 1 VO (EG) 1831/2003 als verdauungsfördernd (Kategorie 4a) und stabilisierend für die physiologische Darmflora (4b) klassifiziert ist (European Union, 2012) (Stand: 08.10.2015).

2.3.5.1 Hefen

Der größte Teil der aktuell verfügbaren Literatur über den Probiotikaeinsatz beim Pferd untersucht die Auswirkungen einer Supplementation mit Hefen, im Besonderen mit der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*.

Bei Supplementierung von Saug- und Absetzfohlen konnten signifikante Einflüsse auf freie Aminosäuren im Blut nachgewiesen werden. Die außerdem erhöhten Zunahmen der Versuchstiere gegenüber einer Kontrollgruppe lassen auf Veränderungen im Muskelstoffwechsel zugunsten einer Zunahme der Muskelmasse und auf eine verbesserte skelettale Entwicklung schließen. Als Indikator für den Knochenstoffwechsel wird hier die Konzentration von Hydroxyprolin herangezogen, welches in hohen Gehalten in der Knochenmatrix enthalten ist und bei Knochenabbauprozessen vermehrt freigesetzt wird (Glade, 1990). In einem Versuch an dreijährigen Wallachen konnte kein signifikanter Einfluss einer Supplementierung mit $3,75$ bis 15×10^9 cfu/d *Saccharomyces cerevisiae* auf die scheinbare Verdaulichkeit von Trockensubstanz, Bruttoenergie, Rohasche, Rohprotein, ADF (Säure-Detergenz-Faser), NDF (Neutrale Detergenzfaser), Hemicellulose oder Lignin festgestellt werden. Die Autoren schließen, dass die Hefe verdaut wurde, anstatt nach Passage der vorderen Darmabschnitte Einfluss auf die Fermentation zu nehmen. Alternativ kommt die Möglichkeit einer zu geringen Dosierung in Frage (Hall, 1990). Wurden tragende Stuten mit *Saccharomyces cerevisiae* gefüttert, konnte nach zwei Wochen eine erhöhte Verdaulichkeit der Trockensubstanz, ADF, NDF und des Rohproteins verzeichnet werden. Aus einer geringeren fäkalen Stickstoffausscheidung schließen die Autoren außerdem auf eine bessere Nutzung des Nicht-Protein-Stickstoffs (NPN) unter Hefesupplementierung (Glade, 1991a). Des Weiteren nahm bei laktierenden Stuten der Energiegehalt der Milch zu, was auf höhere Gehalte an Fett, Milchzucker, Rohprotein und die Zunahme der Konzentration einzelner Aminosäuren unter Zufütterung einer Hefekultur zurückgeführt werden konnte. Die Fohlen der supplementierten Stuten zeigten eine größere Gewichtszunahme in den ersten Lebenswochen als die einer Kontrollgruppe. Dieser Effekt wurde hauptsächlich durch eine aufgrund der Hefefütterung verbesserte Energieausbeute erklärt (Glade, 1991b). In einem weiteren Versuch an adulten Wallachen konnte kein Einfluss auf die Verdaulichkeit von Trockensubstanz, NDF oder ADF sowie den Stickstoffhaushalt festgestellt werden (Brown, 2004). Diese Ergebnisse zur Faserverdaulichkeit wurden in einem *in vitro* Versuch zur Ermittlung der Auswirkungen der Supplementierung zweier unterschiedlich rohfaserehaltiger Rationen mit *Saccharomyces cerevisiae* bestätigt, lediglich bei Untersuchung eines stärkereichen Substrats kam es zu einer erhöhten Acetatbildung. Außerdem übte die Hefe keinen Einfluss auf die Konzentrationen von Streptokokken, Laktobazillen, Laktat

verwertenden und cellulolytischen Bakterien in den Inkubationsgefäßen aus (Lattimer, 2007). In einem ähnlichen Versuchsaufbau mit 8 caecal und colonal fistulierten Pferden, die eine stärke- oder eine rohfaserreiche Ration erhielten, wurden bei beiden rohfasereich gefütterten und mit Hefe supplementierten Tieren geringere Schwankungen des caecalen pH-Werts beobachtet. Bei der Kombination aus der Verfütterung der stärkereichen Ration und der Hefesupplementierung wurde ein höherer caecaler pH-Wert bei geringeren Laktatwerten gemessen. Ein Anstieg der Acetatkonzentration lässt die Autoren auf eine erhöhte cellulolytische Aktivität bei etwa gleichbleibenden Zellzahlen schließen. Dank dieses Versuchsaufbaus konnte festgestellt werden, dass *Saccharomyces cerevisiae* ihre Hauptwirkung im Caecum ausübt während sie in späteren Darmabschnitten vermehrt abstirbt (Medina, 2002). Untersuchungen bezüglich der cellulolytischen Aktivität unter Hefesupplementierung konnten eine erhöhte Verdaulichkeit der ADF- Fraktion (Jouany, 2008) bzw. von ADF, NDF und organischer Substanz (Agazzi, 2011) bestätigen.

Die Mikroflora des Verdauungstrakts wird durch die Hefefütterung insofern beeinflusst, dass im Dickdarm eine Zunahme der Gesamtkeimzahl, von Laktobazillen, Laktat verwertenden und cellulolytischen Bakterien und Protozoen beobachtet werden kann (Moore, 1994; Jouany, 2009; Medina, 2002). Eine erhöhte Futteraufnahme (Jouany, 2008) kann nicht immer bestätigt werden (Agazzi, 2011; Hall, 1990). Ebenso übt die Verfütterung von *Saccharomyces cerevisiae* keinen Einfluss auf die Verweildauer der Digesta im Verdauungstrakt aus (Jouany, 2008). Da probiotische Hefe den Verdauungstrakt des Pferdes nicht kolonisieren kann, muss sie kontinuierlich verabreicht werden und kann dann zu einer besseren Toleranz gegenüber erhöhten Gehalten leicht verdaulicher Kohlenhydrate im Futter führen (Medina, 2002).

Eine mögliche Erklärung für die wiederholt beobachtete bessere Faserverdaulichkeit von Rationen unter Hefesupplementierung kann in der erhöhten Aktivität bakterieller Polysaccharidasen unter Hefesupplementierung liegen. An 4 caecal und colonal fistulierten Pferden konnten unter Supplementierung mit $4,5 \times 10^{10}$ cfu/d *Saccharomyces cerevisiae* erhöhte Aktivitäten besonders der Enzyme der partikelassoziierten Bakterienfraktion festgestellt werden. Dies betrifft im Besonderen die Aktivitäten von Carboxymethyl-Cellulase, Cellobiosidase, β - d- Glucosidase und Xylosidase im Caecum (Jouany, 2009).

Die verschiedenen Untersuchungen über eine Supplementierung mit *Saccharomyces cerevisiae* lassen darauf schließen, dass sie sich zur Verbesserung der Faserverdaulichkeit (Jouany, 2009) und zur Stabilisierung des mikrobiellen Ökosystems (Agazzi, 2011) ebenso wie bei Fütterung hoher Stärkegehalte zur Verbesserung der Verträglichkeit (Medina, 2002) einsetzen lässt. Außerdem wird ein Einsatz bei laktierenden und säugenden Stuten ebenso wie für wachsende Fohlen zur verbesserten Faserverdauung empfohlen (Julliand, 2006).

Die praktisch relevanten klinischen Auswirkungen einer Supplementierung mit *Saccharomyces boulardii* wurden an hospitalisierten Pferden mit akuter Enterocolitis untersucht. Die behandelten Pferde zeigten eine verkürzte Krankheitsdauer sowie einen weniger schweren Krankheitsverlauf (Desrochers, 2005).

2.3.5.2 Bakterien

Bisher sind für Pferde keine Präparate zugelassen, deren Wirkung auf probiotischen Bakterien beruht. Diese könnten aber einerseits dank großer Artenvielfalt und andererseits aufgrund des Potentials, den Magen-Darm-Trakt zu kolonisieren, weit gefächerte Möglichkeiten zur Behandlung beim Pferd häufiger und bisher schwer behandelbarer intestinaler Erkrankungen bieten. Die Erforschung probiotischer Bakterien konzentriert sich vor allem auf die Gattung *Lactobacillus*, die im Dickdarminhalt des gesunden Pferdes in Konzentrationen von etwa 10^6 cfu/ml vorkommt (de Fombelle, 2001; de Fombelle, 2003; Julliard, 2001). Um die probiotischen Eigenschaften von Bakterien zu überprüfen, sind verschiedene *in-vitro* Verfahren entwickelt worden. Diese dienen zum größten Teil der Erprobung des Überlebens unter ähnlichen Bedingungen, wie sie im Verdauungstrakt des Pferdes herrschen sowie der Aktivität gegen pathogene Erreger wie *Salmonella spp.* und *Clostridium spp.* (Darby, 2007; Fraga, 2008; Laukova, 2008).

Aus den Faeces gesunder Pferde und Fohlen konnten 47 Spezies der Gattung *Lactobacillus* isoliert werden, die für einen möglichen Einsatz als Probiotikum untersucht wurden. Vier dieser Stämme waren säure- und galletolerant und inhibierten außerdem das Wachstum verschiedener Salmonellen *in vitro*. Für eine spätere *in-vivo* Überprüfung wurde *Lactobacillus pentosus* WE7 aufgrund guter Wachstumseigenschaften sowie der Inhibition des Wachstums von Salmonellen, *Escherichia coli*, *Streptococcus zooepidemicus*, *C. perfringens* und *C. difficile* ausgewählt (Weese, 2004). In einem weiteren Versuch wurden *L. salivarius*, *L. agilis*, *Bacillus subtilis* und *B. licheniformis* isoliert. *B. subtilis* und *L. salivarius* vermehrten sich trotz Gallezusatz und besonders *B. subtilis* zeigte eine Inhibition des Wachstums von *S. Typhimurium*, *E. coli* und *C. perfringens* (Darby, 2007). Zur Etablierung möglicher probiotischer Bakterien aus der Vaginalflora von Stuten wurden *L. equi*, *L. pantheris*, *L. mucosae*, *Enterococcus faecalis* und *E. faecium* auf antimikrobielle Eigenschaften, Adhäsion an equine vaginale Epithelzellen sowie die Fähigkeit zur Ausbildung eines Biofilms an abiotischen Oberflächen untersucht. Der isolierte Stamm der Art *E. faecalis* zeigte die stärkste antimikrobielle Aktivität gegen *Staphylococcus aureus* und *E. coli* sowie die größte Adhäsion an die Schleimhautzellen. *L. mucosae* bildete den stärksten Biofilm an einer Oberfläche aus Glas aus. Die bei allen isolierten Stämmen festgestellte antimikrobielle Aktivität führen die Autoren auf die Produktion von Säure zurück, da der Effekt nicht durch thermische oder

proteolytische Behandlung, aber durch eine Neutralisierung mit Natronlauge aufzuheben war (Fraga, Perelmutter et al. 2008).

In vivo Untersuchungen wurden vor allem bei neugeborenen oder Absetz-Fohlen durchgeführt. Die Dosierungen der probiotischen Bakterien waren aber sehr unterschiedlich und bewegten sich im Rahmen von 10^7 cfu/d (Swanson, 2002) bis 10^{11} cfu/d (Weese, 2005).

Verschiedene Dosierungen zwischen 10^9 cfu/50 kg Körpermasse (KM) und 10^{11} cfu/50 kg KM des bereits beim Menschen zum Einsatz kommenden *Lactobacillus rhamnosus* GG wurden an adulte Pferde und neugeborene Fohlen verfüttert. Der Stamm war bei den Pferden bis maximal 48 Stunden nach Beendigung der Supplementierung nachweisbar, bei Fohlen im Mittel drei Tage, höchstens neun Tage. Dieses Ergebnis lässt die Autoren darauf schließen, dass *Lactobacillus rhamnosus* GG den Gastrointestinaltrakt (GIT) von Fohlen kolonisieren kann, während bei adulten Pferden unklar ist, ob das Ergebnis auf einer temporären Kolonisierung oder lediglich dem passiven Transport durch den Verdauungstrakt beruht. In beiden Gruppen waren die Ergebnisse zur Dauer der Nachweisbarkeit unabhängig von der verabreichten Dosierung. Obwohl keine unerwünschten Wirkungen festgestellt werden konnten, lässt die unzureichende Kolonisierung besonders bei adulten Tieren nicht den Schluss zu, dass sich der getestete Stamm für den Einsatz als Probiotikum beim Pferd eignet (Weese, 2003).

Lactobacillus pentosus WE7 wurde aus gesunden Pferden isoliert und nach *in vitro* Untersuchungen zur Überprüfung der Überlebensfähigkeit im Gastrointestinaltrakt an Pferde und Fohlen verfüttert. Es konnte festgestellt werden, dass der Stamm spätestens sechs Tage nach Beendigung der Supplementation nicht mehr in den Faeces nachzuweisen war. Bei Gabe von 10^{11} cfu/d lagen die Zellzahlen im Kot der acht Pferde bzw. neun Fohlen im Alter von 2 Tagen zwischen 10^3 und 10^8 cfu/g (Weese, 2004). In einem größeren Versuchsentwurf mit 153 Fohlen wurde dieser Stamm an neonatalen Fohlen getestet. Siebzig Fohlen erhielten das Probiotikum erstmals im Alter von 18-36 Stunden und dann über sieben Tage. Die Versuchsgruppe zeigte Zeichen gestörten Allgemeinbefindens, Anorexie, Kolik und mehr Tage mit Diarrhoe als die Kontrollgruppe. Die Autoren vermuten, dass neugeborene Fohlen aufgrund ihrer wenig ausgeprägten intestinalen Mikroflora keine großen Keimzahlen tolerieren können. Angesichts der Einstufung der Food and Drug Administration (USA) von Lactobazillen als unbedenklich (GRAS = generally recognized as safe) und der Ergebnisse der zuvor erfolgten *in vitro* Untersuchungen wurde dieses Ergebnis als unerwartet angesehen, gleichzeitig aber verstärkt es die Notwendigkeit intensiver klinischer Sicherheitsüberprüfung potentieller probiotischer Bakterien vor einer Zulassung für den kommerziellen Einsatz (Weese, 2005). Eine Mischung aus fünf ebenfalls aus Pferden isolierten *Lactobacillus*- Arten

(*L. salivarius*, *L. reuteri*, *L. crispatus*, *L. johnsonii*, *L. equi*) wurde in einem weiteren Versuch in einer Dosierung von 10^{10} cfu/d neonatalen Fohlen verabreicht. Die Bakterien stammten aus der Faeces oder dem gastrointestinalen Epithel gesunder Pferde und zeigten in *in vitro* Versuchen eine starke Adhäsion an Epithelzellen des Verdauungstrakts. Die 27 Tiere der Versuchsgruppe erhielten das Probiotikum während der ersten sieben Lebenstage, es wurden eine Tendenz zu einer früheren Besiedlung des Verdauungstrakts mit Laktobazillen, außerdem eine signifikant geringere Durchfallinzidenz in der zweiten und dritten Lebenswoche sowie ein höheres Körpergewicht am Ende des ersten Lebensmonats ermittelt. Ein Einfluss auf hämatologische und biochemische Blutparameter konnte nicht festgestellt werden. Die um 6 % größere Gewichtszunahme kann auf das seltenere Auftreten von Durchfall in der Versuchsgruppe zurückgeführt werden. Der Einsatz zur Prävention von Fohlendiarrhoe kann demnach in Betracht gezogen werden (Yuyama, 2004).

Das für die vorliegende Arbeit verwendete Probiotikum aus *E. faecium* DSM 7134 und *L. rhamnosus* DSM 7133 war zuvor bereits an 22 neugeborene Fohlen verfüttert worden. In diesem Versuch wurde es in Dosierungen von $1,05 \times 10^9$ cfu/d *E. faecium* und $0,45 \times 10^9$ cfu/d *L. rhamnosus* vor der ersten Kolostrumaufnahme und dann täglich während der ersten beiden Lebenswochen verabreicht. Mittels denaturierender Gradienten-Gelelektrophorese (DGGE) und Sequenzierung konnte festgestellt werden, dass bei allen Fohlen die Familie *Lachnospiraceae* sowie *Akkermansia muciniphila* in den Faeces dominierten. Die Ähnlichkeit des genetischen Musters der Mikrobiota nahm zwischen dem 14. und 56. Lebenstag nur in der Kontrollgruppe ab. Außerdem waren die Häufigkeit und Dauer von Durchfallerkrankungen in der Versuchsgruppe größer. Die Autoren kommen zu dem Schluss, dass die Kombination dieser beiden Bakterienstämme für neonatale Fohlen augenscheinlich nicht geeignet sei (Günther, 2012).

Während des Absetzens ist das Fohlen im Alter von etwa einem halben Jahr großem psychischen wie physischen Stress ausgesetzt, da es einerseits meist gravierenden Veränderungen der Herdenstruktur, andererseits einer Futterumstellung ausgesetzt ist (Apter, 1996; Malinowski, 1990). Aus diesem Grund stellt diese Lebensphase einen entscheidenden Ansatzpunkt für einen möglichen Einsatz von Probiotika dar. In einer Studie mit 20 Fohlen, deren Mutterstuten bereits vor dem Abfohlen mit unterschiedlich stärkehaltigen Rationen gefüttert worden waren, wurden die Auswirkungen einer Supplementation mit *E. faecium*, *L. acidophilus*, *L. casei* und *L. plantarum* untersucht. Um den Zeitpunkt des Absetzens erhielten zehn Tiere eine Dosis von 10^7 cfu/d, jeweils vier Tage vor und nach dem Absetzen erfolgte die Entnahme von Kotproben. Neben verdauungsphysiologischen Parametern wurden Blutuntersuchungen durchgeführt und Stressindikatoren analysiert. In den Faeces

supplementierter Fohlen wurden höhere Laktatgehalte gemessen. Die Autoren vermuten, dass eine der im Probiotikum enthaltenen *Lactobacillus*- Spezies die Darmpassage überlebt und den Darm kolonisiert hat. Die Kombination mit gleichzeitig auftretenden geringeren Acetatgehalten lässt aber auch den Verdacht zu, dass diese Tiere anfälliger für Verdauungsstörungen aufgrund hoher Stärkegehalte im Futter sind. Stressparameter, Plasma- Laktatgehalte und fäkaler pH-Wert wurden nicht durch das Probiotikum beeinflusst. Ein Einsatz des Probiotikums zur Unterstützung beim Absetzen lässt sich anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht begründen (Swanson, 2002).

Um den Futterumsatz bei verschiedenen probiotischen Ergänzungen zu einer rohfaserreichen Ration zu untersuchen, wurde eine rohfaserreiche Diät für acht Monate alte Mangalarga Marchador- Fohlen mit 10^9 cfu/d *S. cerevisiae* oder einer Mischung aus 10^8 cfu/d *B. bifidum*, *E. faecium*, *L. acidophilus* und *L. plantarum* sowie 10^5 cfu/d *S. cerevisiae* ergänzt. Gegenüber einer Kontrollgruppe hatten sechs Versuchstiere, die Bakterien und Hefen zugefüttert bekamen einen geringeren Futteraufwand bei gleichen täglichen Zunahmen innerhalb eines Versuchsmonats. Diese Ergebnisse könnten durch eine Zunahme der bakteriellen Besiedlung des Dickdarms zustande kommen, die die verbesserte Faserverdauung ermöglichte (de Moura, 2009).

An je fünf ausgewachsenen Quarterhorses wurde das Überleben im Verdauungstrakt zuvor isolierter und *in vitro* getesteter Stämme von *B. subtilis* und *L. salivarius* untersucht. Es konnte nachgewiesen werden, dass beide Stämme die Magen-Darm-Passage überleben. Eventuell aufgrund von Kreuzkontamination und/oder Koprophagie konnten aber keine Unterschiede bezüglich der Zellzahlen zu einer Kontrollgruppe festgestellt werden (Darby, 2007). Das zuvor bereits an Fohlen untersuchte Präparat (Swanson, 2002), das eine Mischung aus *L. plantarum*, *L. casei*, *L. acidophilus*, und *E. faecium* enthält, wurde auf die Fähigkeit hin untersucht, die Salmonellenausscheidung bei hospitalisierten Pferden zu verringern. In den Versuch wurden 130 Pferde einbezogen, die aufgrund nicht- gastrointestinaler Erkrankungen stationär behandelt wurden. Das Präparat wurde an vier aufeinander folgenden Tagen verabreicht, gleichzeitig wurden Kotproben genommen, die dann mikrobiologisch auf Salmonellen untersucht wurden. In der Gruppe der behandelten Tiere konnte eine statistisch nicht signifikante Reduzierung der Ausscheidung von *Salmonella* spp. um 65 % festgestellt werden. Die sehr geringen Fallzahlen von Salmonellenausscheidung (5 Tiere der Kontrollgruppe, 2 Tiere der Versuchsgruppe) schränken die Aussagekraft dieser Studie allerdings ein (Ward, 2004). In einem weiteren Versuch wurde der Einfluss probiotischer Supplementation bei abrupter Erhöhung des Stärkegehalts in der Ration untersucht. Je fünf Pferde erhielten über vier Wochen 10^8 cfu/50 kg KM *L. acidophilus* oder einer Mischung aus

L. acidophilus, *L. casei*, *B. bifidum* und *E. faecium*. In beiden Versuchsgruppen konnten erhöhte Werte für Kupfer-, Zink-, Eisen- und Rohfettverdaulichkeit festgestellt werden, außerdem eine geringere Natriumverdaulichkeit als bei den Kontrolltieren. Ein Einfluss auf die fäkalen Gehalte kurzkettiger Fettsäuren konnte ebensowenig festgestellt werden wie eine Veränderung der Konzentration der Laktobazillen. Allerdings wurde bei Verfütterung von *L. acidophilus* beobachtet, dass die Konzentration fäkaler Enterokokken zunahm, während sie bei der Gabe des Kombinationspräparates sank. Nach der abrupten Rationsumstellung konnte bei den mit *L. acidophilus* supplementierten Tieren ein Trend zu einem höheren fäkalen pH-Wert festgestellt werden. Die Autoren vermuten, dass durch eine Gabe von Milchsäurebakterien der Mineralstoffhaushalt insbesondere hinsichtlich Kupfer, Eisen und Zink verbessert werden kann (Swyers, 2008). Ebenfalls zur Ergänzung einer stärkereichen Ration (1,8 g/kg KM/d) kam eine Mischung aus *L. farciminis* und *L. rhamnosus* in einer Dosierung von 20×10^8 cfu/d zum Einsatz. Zehn Wochen nach Versuchsbeginn lag die Konzentration der cellulolytischen Bakterien im Coloninhalt der Versuchsgruppe tendenziell über der der Kontrolltiere. Der Propion- und Buttersäuregehalt im Coloninhalt stieg im Versuch an, die Acetatkonzentration zeigte einen Trend zu höheren Werten bei probiotischer Supplementierung. Diese Ergebnisse lassen die Autoren darauf schließen, dass sich durch die Supplementierung mit dem getesteten Präparat trotz hoher Stärkegaben eine hohe cellulolytische Aktivität erhalten lässt (Goachet, 2012).

Diese Untersuchungen zeigen, dass sich durch probiotische Supplementierung das mikrobiologische Gleichgewicht im Darmtrakt des Pferdes beeinflussen lässt. Diese Veränderungen sind jedoch nicht immer anhand mikrobieller Verdauungsparameter greifbar und nicht vorhersagbar. Ebensowenig kann ein Rückschluss aus der Wirkung bei anderen Tierarten gezogen werden. Besonders bei Fohlen kann es zu unerwünschten Wirkungen kommen. Aus diesen Gründen muss ein probiotischer Stamm vor seinem Einsatz auf Wirksamkeit und Unbedenklichkeit hin untersucht werden. In der vorliegenden Arbeit soll eine Kombination aus *L. rhamnosus* und *E. faecium* an Junghengsten getestet werden, um festzustellen, ob ein Einfluss auf die intestinalen Mikroorganismen und auf fäkale Verdauungsparameter feststellbar ist.

3 Material und Methoden

3.1 *In-vivo*-Untersuchungen

Der Fütterungsversuch fand im Graf-Lehndorff-Institut (Hauptgestüt 10, Neustadt/Dosse) im Zeitraum vom 20.11.2011 bis 29.1.2012 statt. Die Versuchstiere waren 29 Hengste (Geburtsjahr 2010). Sie wurden in Gruppen von 5 bis 9 Tieren in strohgestreuten Laufställen gehalten (mind. 9,7 m²/Tier, max. 12 m²) und erhielten in den jeweiligen Versuchsgruppen täglich mindestens vier Stunden Auslauf auf Sandpaddocks (71-74 m²/Tier).

3.1.1 Versuchsdesign

Die Tiere wurden zufällig in zwei Gruppen zu 14 bzw. 15 Tieren eingeteilt. Während des Versuchs wurden alle Pferde im gleichen Gebäude gehalten, die beiden Gruppen waren aber stets räumlich voneinander getrennt. Die Tiere 1-15 erhielten neben einer Ration aus Heulage, Hafer, Mineralfutter und Futterkalk über 28 Tage einmal täglich 15 ml eines probiotischen Präparates, das eine Mischung aus *L. rhamnosus* und *E. faecium* in einer Gesamtkonzentration von 600×10^9 cfu/g (Provita-LE, Lactosan GmbH, Kapfenberg, Österreich) enthält. Das Probiotikum wurde als Topdressing über das Krafftutter gegeben, als Trägerstoffe dienten Sonnenblumenöl, Palmfett und Molkenpulver. Die 14 Tiere der Kontrollgruppe erhielten zur o.g. Grundration als Placebo 15 ml Pflanzenöl. Am Ende dieses ersten Versuchsdurchgangs folgte eine zweiwöchige Auswaschphase, an die sich ein Tausch der Gruppen (Crossover) und der zweite Versuchsdurchgang mit dem gleichen Versuchsaufbau anschlossen. Während des Versuchs wurden Kotproben rektal entnommen, die Konsistenz grobsinnlich bonitiert und sofort bei -30°C eingefroren. Die Probennahme erfolgte an den jeweils ersten und letzten drei Tagen eines Versuchsdurchgangs von jedem Tier. Ebenso wurden klinische Parameter erhoben. Atem- und Pulsfrequenz sowie innere Körpertemperatur wurden gemessen und die Darmgeräusche abgehört. Tier 17 schied ab dem 27.1.2012 verletzungsbedingt aus dem Versuch aus, sodass 345 Kotproben für weitere Untersuchungen zur Verfügung standen.

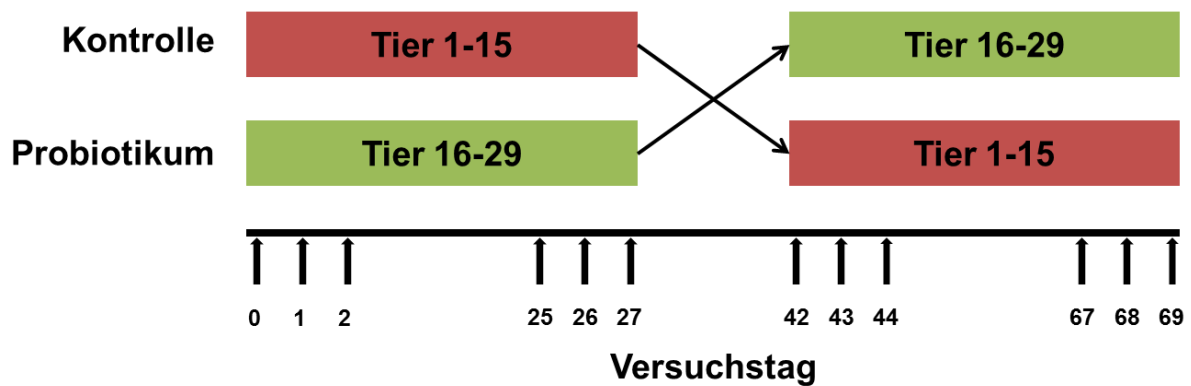


Abb. 1: Versuchsdesign des Fütterungsversuchs

3.2 Untersuchung der Kotproben

Die Untersuchung der Kotproben fand am Institut für Tierernährung der Freien Universität Berlin statt. Von allen zur Verfügung stehenden Proben wurden Trockensubstanz und pH-Wert bestimmt. Laktat, kurzkettige Fettsäuren und Ammoniumgehalte wurden in den Proben aller Tiere des jeweils ersten und letzten Tags eines Durchgangs (Tag 0, 27, 42 und 69) gemessen. Die Bestimmung der Zellzahlen der probiotischen Bakterien und die DGGE (Denaturierungsgradientengelelektrophorese) wurden ebenfalls mit Proben der Tage 0, 27, 42 und 69 durchgeführt, hierzu wurden zufällig 10 Tiere aus jeder Gruppe ausgewählt.

3.2.1 Bestimmung des pH-Werts

Die Messung des pH-Werts erfolgte mittels Einstichelektrode (Mettler Toledo GmbH, Greifensee, Schweiz) bzw. Einstabmesskette. Hierzu wurden 5 g Probenmaterial mit 20 ml einer 0,01 M Calciumchloridlösung (Calciumchlorid-Dihydrat, Carl Roth GmbH & Co Kg, Karlsruhe, Deutschland) aufgerührt und dann der pH-Wert mittels Elektrode (InLab Routine Pro, Mettler Toledo GmbH, Greifensee, Schweiz) bestimmt und jeweils am pH-Meter (Seven Multi, Mettler Toledo GmbH, Greifensee, Schweiz) abgelesen.

3.2.2 Messung des Trockensubstanzgehalts

Der Trockensubstanzgehalt der Kotproben wurde durch Gefriertrocknung bis zur Gewichtskonstanz (Gefriertrocknungsanlage Alpha 1-4 LSC, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode, Deutschland) und anschließende Differenzmessung bestimmt.

3.2.3 Bestimmung von Ammonium

Die quantitative Bestimmung von Ammonium erfolgte über den photometrischen Nachweis von Indophenol nach Berthelot (Berthelot, 1859). Da die Reaktion im alkalischen Milieu stattfindet, liegt das Gleichgewicht auf Seiten des Ammoniaks.

Nach Auftauen der Probe wurde diese auf Eis gehalten und eine geeignete Verdünnungsstufe mit 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure- Puffer (MOPS Pufferan® ≥ 99%, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) eingestellt. Nach 15- und 20minütiger Inkubation mit Phenol-Nitroprussid (Phenol nitroprusside solution, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) und 0,2 % Na-Hypochloritlösung (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) in 1 M NaOH (Natriumhydroxid, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) wurde die Konzentration photometrisch (Mikrotiterplatten-Lesegerät SUNRISE-BASIC TECAN, Tecan Austria GmbH, Grödig, Österreich) bei 620 nm bestimmt.

3.2.4 Bestimmung von Laktat

Die Laktatgehalte wurden mittels HPLC (High-performance liquid chromatography, HPLC-Anlage Agilent 1100, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, Kalifornien, USA) bestimmt. Zur Aufarbeitung der Proben wurde mit Kupfer-II-Sulfat-Lösung (0,5 mmol/l, Merck KGA, Darmstadt, Deutschland) extrahiert, mit Carrez-Lösungen (Carrez-I: Zinkchlorid-Lösung (12,47 mmol/l, Merck KGA, Darmstadt, Deutschland), Carrez-II: Kaliumhexacyanoferrat-II-Lösung (4,07 mmol/l, Merck KGA, Darmstadt, Deutschland)) geklärt, zehn Minuten zentrifugiert (14.000 rpm, Heraeus Biofuge 13, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA), der Überstand über einen Cellulose-Acetat-Filter (Porengröße 0,45 µm, VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) in das zur Messung vorgesehene Glasgefäß gegeben und mit Kupfer-II-Sulfat-Lösung (0,5 mmol/l, s.o.) verdünnt.

Die Vorsäule (Phenomenex C18 4.0 L mm x 2.0 ID mm, Phenomenex Inc., Torrance, Kalifornien, USA) der HPLC-Anlage trennte die Proben von verbliebenen Matrixbestandteilen, in der chiralen Säule (Phenomenex Chirex 3126 (D)- penicillamine 150 x 4,6 mm, Phenomenex Inc.) wurden sie getrennt. Bei einer Flussrate von 1 ml/min der Eluenten (Kupfer-II-sulfat-Lösung 2,5 mmol/l und Kupfer-II-sulfat-Lösung 0,5 mmol/l) und einer Säulenofentemperatur von 35 °C betragen die Retentionszeiten von D- Laktat 12-12,5 min und von L-Laktat 15-15,5 min. Die Messung erfolgte mittels UV Detektor bei 253 nm, die Auswertung mit der Chromeleon-Software (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA).

3.2.5 Messung kurzkettiger Fettsäuren

Die Bestimmung der kurzkettigen Fettsäuren erfolgte gaschromatographisch (Gaschromatograph 6890N mit Probengeber G2614A und Injektionsturm G2613A, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, Kalifornien, USA).

Zur Aufarbeitung der Proben wurden diese mit einem internen Standard versetzt (0,5 mmol/l ISTD; SUPELCO 4-6975 „Volatile Acids Standard Mix“ gemischt (Vortex- Schüttler VV3, VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland), abzentrifugiert (13.000 rpm, Heraeus Fresco 21, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA) und in einer 1:10 Verdünnung (Verdünnungslösung ISTD, s.o.) gemessen.

Die chromatografische Trennung erfolgte auf einer Säule mit einer Polyethylen-Glycol Beschichtung (Agilent 19095N-123 HP-INNOWAX, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, Kalifornien, USA). Als Trägergas diente Wasserstoff, welcher nach Bedarf über einen Gasgenerator (Parker Chromgas Gas Generator 9150, Parker Hannifin Corp, Cleveland, Ohio, USA) zugegeben wurde. Der Detektor ist ein selbstzündender Flammenionisationsdetektor. Die Injektionsspritze (konisch, FN 23-26/42/HP, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, Kalifornien, USA) hatte ein Fassungsvermögen von 10 µl. Das Probenvolumen betrug 1 µl, die Flussrate 30 ml/min.

3.2.6 DNA- Extraktion

Die erste DNA-Extraktion erfolgte mit dem QIAmp-Stool Kit (Qiagen N.V., Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben. Einige der Extrakte waren braun bis grün gefärbt und eine Amplifizierung von DNA mit einem Laktobazillen- Gruppenprimer (LAB-1, LAB-2, siehe Tabelle 7), die zur Überprüfung der Extraktion diente, war nicht möglich. Ebenso gelang die Extraktion mit o.g. Kit nach Vorbehandlung mit Tween (0,1% aus Tween 80%, Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) oder bei Wiederholung des im Kit vorgesehenen Schrittes zur Entfernung von PCR- Inhibitoren nicht.

Die Extraktion amplifizierbarer DNA gelang schließlich mit dem PowerSoil-Kit (Mo Bio Laboratories Inc., Carlsbad, Kalifornien, USA) nach Vorgaben des vom Hersteller entwickelten Protokolls. Der Extraktionserfolg wurde mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) überprüft. Hierzu wurden die Primer LAC-1 und LAC-2 (Tab. 7) verwendet.

3.2.7 Anfertigung einer Kalibrierreihe für die quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Um die Konzentrationen der eingesetzten Bakterien *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 7133) und *Enterococcus faecium* (DSM 7134) in den Kotproben ermitteln zu können, wurde eine Kalibrierreihe mit bekannten Konzentrationen erstellt. Hierzu wurden die beiden Spezies von der Lactosan GmbH (Kapfenberg, Österreich) zur Verfügung gestellt. Nach dem Ausstreichen von *L. rhamnosus* auf MRS- Agar (deMan, Rogosa, Sharpe, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) und *E. faecium* auf BHI-Agar (Brain Heart Infusion, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) sowie Inkubation (BINDER GmbH, Tuttlingen, Deutschland) über Nacht bei 37 °C wurden beide Stämme in ein entsprechendes Flüssigmedium (MRS bzw. BHI) überimpft und im Schüttelinkubator (MaxQ6000, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA) erneut über Nacht inkubiert. Dieser Schritt wurde noch einmal wiederholt, nach Zentrifugation (13.000 x g, 3 min) und Aufnahme des Bakterienpellets in 0,9 %iger Natriumchloridlösung (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) erfolgte die Auszählung mittels Thoma- Zählkammer. Schließlich wurde zuvor autoklavierter (SHP Laboklav, SHP Steriltechnik AG, Detzel Schloss, Deutschland) Pferdekot (Mischprobe aus acht Kotproben) beimpft, sodass er Konzentrationen von $1,71 \times 10^8$ cfu/g *E. faecium* und $3,56 \times 10^8$ cfu/g *L. rhamnosus* enthielt.

3.2.8 Auswahl der Primer für die qPCR

Für den quantitativen Nachweis von *E. faecium* in den Kotproben wurde das Primerpaar Efum-dnak-2f/2r (Tab. 7, entwickelt am Institut für Tierernährung, FU Berlin) verwendet.

Die Auswahl geeigneter Primer für *L. rhamnosus* erforderte zuvor eine Validierung der aus der Literatur bekannten möglichen Primer. Diese erfolgte, indem eine qPCR mit *Lactobacillus rhamnosus* und eng verwandten Spezies durchgeführt wurde, um Spezifität und Sensitivität der möglichen Primerpaare einschätzen zu können. Es wurden hierfür institutseigene Kulturextrakte von DNA aus *L. johnsonii*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. acidophilus*, *L. zeae*, *L. gasseri* und *L. crispatus* verwendet. Als Positivkontrolle dienten ein Kulturextrakt von *L. rhamnosus* (DSM 7133) und verschiedene Verdünnungsstufen der selbst erstellten Kalibrierreihe. Das Primerpaar Rham1/RhamR (Sul, 2007) wurde schließlich für die qPCR verwendet (Tab. 7).

3.2.9 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Mit der Polymerase-Kettenreaktion lassen sich spezifische DNA-Abschnitte nachweisen. Deren Eingrenzung erfolgt durch Auswahl geeigneter Primer, die den zu amplifizierenden DNA- Abschnitt flankieren. Für alle qPCRs wurde das SYBR®-Green Programm (Life Technologies Corp., Carlsbad, CA, USA) genutzt. Nach Denaturierung der doppelsträngigen DNA (95°C, 10 Minuten) erfolgt die Anlagerung der Primer und schließlich die Elongation, während derer die Polymerase neue DNA synthetisiert. Dieser Schritt wird 40-fach wiederholt, die amplifizierte DNA-Menge dann fluorometrisch bestimmt.

3.2.10 Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese (DGGE)

3.2.10.1 Messung und Einstellung des DNA-Gehalts der Extrakte

Die Bestimmung des DNA-Gehalts der Extrakte erfolgte mittels Fluorospektrometer (Nano-Drop® ND-3300, PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland). 2 µl des zuvor 1:10 mit TE-Puffer (TRIS (PUFFERAN®)/EDTA, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) und dem gleichen Volumen einer 1:5000-Verdünnung des Farbstoffs SYBR-Green® (Life Technologies Corp., Carlsbad, CA, USA) versetzten DNA-Extrakts wurden auf den Probenarm pipettiert und der DNA-Gehalt fluoressenzphotometrisch gegen eine Standardreihe ermittelt. Um vor der Durchführung der DGGE die bei der Amplifikation entstehenden relativen Abweichungen zwischen eingesetzter DNA-Menge und dem Amplifizierungsergebnis (Frey, 2006) abzufangen, wurde anschließend der DNA-Gehalt der Extrakte für die weitere Verwendung mit RNase-freiem Wasser auf 2500 ng/ml (1 l ddH₂O + 1 ml DMPC (Dimethyldicarbonat, Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)) eingestellt.

3.2.10.2 PCR für die DGGE

Die in den Extrakten enthaltene DNA wurde mittels PCR vervielfältigt. Hierzu wurde das Primerpaar F-0968-GC / R-1401 (je 4 pmol/µl, siehe Tab. 7) eingesetzt. Der Primer F-0968-GC war mit einer GC-Klammer versehen, die eine genauere sequenzabhängige Auftrennung ermöglicht (Myers, 1985). Die PCR lief nach folgendem Schema: 15 min 94°C, dann 20 Wiederholungen einer Abfolge von 94 °C (30 s), 66 °C (90 s, 0,3 °C weniger je Zyklus) und 72 °C (90 s), 14 Wiederholungen aus 94 °C (30 s), 59 °C (90 s) und 72 °C (90 s). Dann wurde die Temperatur von 72 °C für 10 min aufrechterhalten.

3.2.10.3 DGGE

Der denaturierenden Gradienten-Gelelektrophorese liegt die Erkenntnis zugrunde, dass sich doppelsträngige DNA in einem Gel mit zunehmend denaturierendem Milieu sequenzabhängig auftrennen lässt (Fischer, 1979). Die zuvor in der PCR vervielfältigten doppelsträngigen DNA-Fragmente wurden in ein Gel aus einer Polyacrylamid-Matrix pipettiert. Unter einer Spannung von 100 V bewegten sie sich entlang der steigenden Konzentration des denaturierenden Agens (Harnstoff, 0-55 %, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland). Am jeweiligen Schmelzpunkt des DNA-Fragments wird der Doppelstrang getrennt und die denaturierte DNA bleibt liegen. So entstehen charakteristische Banden, die mittels Silberfärbung sichtbar gemacht werden können.

In einem Wasserbad (Modell IPU-S, Ingeny International BV, Goes, Niederlande), in dem sich etwa 16 l 0,5 x TAE- Puffer (100fache Verdünnung eines 50 x TAE-Puffers aus 242 g TRIS (PUFFERAN[®], Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland), 57,1 ml Eisessig (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) und 100 ml 0,5 M EDTA (Ethylendiamin-Tetraessigsäure, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) je Liter) befanden. Es wurden Gele mit 32 Taschen angefertigt, die Laufzeit betrug zwischen 20 und 21 Stunden. Die Banden wurden mit einer Silberfärbung sichtbar gemacht. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Phoretix 1D (TotalLab Ltd, Newcastle upon Tyne, UK). Es wurden die Diversitätsindizes Shannon-Index, Richness und Evenness berechnet. Durchführung der DGGE und deren Auswertung entsprachen der am Institut bereits etablierten Methode (Kirsch, 2010).

3.2.10.4 Berechnung ökologischer Indizes

Durch die sequenzabhängige Auftrennung der DNA aus den Kotproben ließen sich bakterielle „Fingerabdrücke“ einer Probe erstellen (Kwak, 2007). Bandenanzahl, -breite und die Farbintensität nach Silberfärbung bildeten die Grundlage für die Berechnung der Diversitätsindizes. Die Richness ist die Anzahl der angefärbten Banden je Gelspur. Sie entspricht also am ehesten der Artenvielfalt. Die Evenness beschreibt die Verteilung der verschiedenen Gensequenzen, die sich durch Breite und Farbintensität auf dem Gel äußert. Sie ergänzt die aus der Richness ersichtliche Vielfalt um den Parameter der Häufigkeit des Auftretens im Ökosystem. Der Shannon-Index ist ein Maß für die innere Entropie des Systems und berücksichtigt beide Werte. Bei gleicher Häufigkeit aller in einem System vorkommenden Arten (hier: Gensequenzen) wird der höchstmögliche Shannon-Index bzw. die größte innere Unordnung für dieses System erreicht.

3.3 *In vitro* Versuch

In einem *in vitro* Modell wurde das Verhalten der probiotischen Bakterien bei Inkubation mit Ingesta anderer Pferde, die zuvor kein Probiotikum erhalten hatten, untersucht. Hierzu wurde von sechs Schlachtpferden unmittelbar *post mortem* Inhalt von Magen, Jejunum und Caecum entnommen. Bei den Pferden handelte es sich um Stuten im Alter von 1- 20 Jahren. Nach der Entnahme wurden die Proben auf 4 °C gekühlt, etwa eine Stunde transportiert und im Labor während der weiteren Behandlungen stets auf Eis gelagert. Es erfolgte eine Sterilzentrifugation bei 4°C mit 50.000 x g für 30 min (Avanti J-26 AP, Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA). Aus den Überständen wurden nach Darmabschnitt getrennte Mischproben aller Pferde hergestellt. Die Inkubation erfolgte in 2 ml Eppendorf- Zentrifugationsgefäßen, die zuvor autoklaviert (SHP Laboklav, SHP Steriltechnik AG, Detzel Schloss, Deutschland) und für 15 min mit UV-Licht (Ultraviolet Sterilizing PCR Workstation, PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) bestrahlt wurden. Mit autoklavierter Natriumchloridlösung (0,85 %, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) wurden eine 1:10 und eine 1:100-Verdünnung des probiotischen Präparats hergestellt. Die Inkubation der Proben mit diesen Verdünnungen erfolgte im Dreifachansatz, parallel wurde ein Leerwert erhoben, als Negativkontrolle diente ein Ansatz mit steriler Natriumchloridlösung (0,85 %, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland).

Tabelle 6: Pipettierschema für den Inkubationsversuch

	Leerwert	Negativkontrolle	Probe (dreifach)
NaCl (0,85 %)	-	1800 µl	-
Probiotikum (Verdünnung)	-	200 µl	200 µl
Sterilzentrifugat	2000 µl	-	1800 µl

Für die verschiedenen Darmabschnitte wurden in Anlehnung an die physiologischen Passagezeiten im Pferd zu unterschiedlichen Zeitpunkten Proben untersucht. Proben vom Magen wurden nach 0, 2 und 4 Stunden gestoppt, vom Jejunum nach 0, 1 und 2 Stunden und vom Caecum nach 0, 2, 4, 8 und 24 Stunden. Zu jedem dieser Zeitpunkte wurden ein Dreifachansatz des entsprechenden Darmabschnitts sowie ein zugehöriger Leerwert entnommen. Außerdem wurde für jeden Zeitpunkt eine Negativkontrolle untersucht. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C im Schüttelinkubator (MaxQ6000, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA). Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch Zentrifugieren (5.000 x g, 5 Minuten, Heraeus Fresco 17 Centrifuge, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA) und sofort anschließendes Färben mit Propidium- Monoazid (PMA, Biotium, Inc., Hayward, Kalifornien, USA).

Die Färbung mit PMA dient der Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen. PMA bindet an doppelsträngige DNA, kann aber intakte Zellmembranen nicht penetrieren. DNA, an die der Farbstoff gebunden hat, ist mittels PCR nicht amplifizierbar (Kobayashi, 2009; Kobayashi, 2010; Luo, 2010). In die Färbung wurden neben dem Pellet aus der Zentrifugation außerdem 200 µl Überstand eingesetzt. Diese Fraktionen wurden in 800 µl 0,85 %iger steriler Natriumchloridlösung (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) aufgenommen und nach der Zugabe von 2,5 µl PMA (20 mM) bei Raumtemperatur unter Lichtabschluss inkubiert. Danach wurden die Proben für 10 min mit einem handelsüblichen 500 W Halogenstrahler m Abstand von ~20 cm bestrahlt. Nach Zentrifugation (5.000 x g, 5 min, Heraeus Fresco 17 Centrifuge, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA) wurde der Überstand verworfen und das Pellet für die spätere DNA- Extraktion eingefroren.

Die DNA-Extraktion erfolgte mit dem Nucleo Spin® Tissue Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland) nach den Vorgaben des Herstellers für die DNA-Extraktion aus Bakterien. Begonnen wurde mit der Aufnahme des Bakterienpellets in 180 µl Lysepuffer.

Die qPCR wurde analog zu den Untersuchungen der Proben aus dem *in vivo* Versuch durchgeführt. Als Standard zur Kalibrierung diente eine Verdünnungsreihe des Extrakts der Negativkontrolle zum Zeitpunkt 0, das entspricht einer Verdünnung des Probiotikums von 1:100. Zum Nachweis von *E. faecium* wurde das Primerpaar ENT-1/ENT-2 (Tab. 7) verwendet.

Tabelle 7: Verwendete Primer

Bakterium	Sequenz	Name	Quelle
<i>Lactobacillus</i> spp.	AGCAGTAGGGAATCTTCCA CACCGCTACACATGGAG	LAC-1 LAC-2	(Rinttilä, 2004)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	GTCGAACGAGTTCTGATTATTG GAACCATGCGGTTCTTGGAT	Rham1 RhamR	(Sul, 2007)
<i>Enterococcus faecium</i>	AGCCGCTGTTGAAGCAAACAAC TGCTCCGCCTTGAGCTGCTT	EfumdnaK-2f EfumdnaK-2r	Institut für Tierenährung, FU Berlin
Intestinale Mikrobiota	CGCCCGGGGCGCGCCCGGGCGGGG CGGGGGCACGG GCG TGT GTA CAA GAC CC	F-0968-GC R-1401	(Ölschläger, 2007)
<i>Enterococcus faecium</i>	CCCTTATTGTTAGTTGCCATCATT ACTCGTTGTA CTCCATTGT	ENT-1 ENT-2	(Rinttilä, 2004)

3.4 Statistische Auswertungen

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm SPSS (SPSS Statistics Version 21.0, IBM, Chicago, USA). Anfangs wurde eine optische Ausreißerdetektion für jede zu untersuchende Gruppe durchgeführt. Anhand von Boxplots wurden diejenigen Werte ermittelt, die mehr als den 1,5-fachen Interquartilsabstand vom 25/75- Quartil entfernt lagen und aus den folgenden Untersuchungen ausgeschlossen.

Jede zu untersuchende Gruppe wurde aufgrund der Stichprobengröße mittels Shapiro-Wilk Test auf Normalverteilung überprüft. Dem Ergebnis entsprechend wurden normalverteilte Gruppen mit T-Tests, nicht normalverteilte Gruppen mit nichtparametrischen Tests (Mann-Whitney-U-test bzw. Wilcoxon-Rangsummentest) untersucht. Ergebnisse aus Proben des gleichen Entnahmetags aber verschiedener Tiere wurden als unabhängige Stichprobe behandelt, bei der Betrachtung der Gruppen aus identischen Tieren aber zu verschiedenen Zeitpunkten wurde der entsprechende Test für gepaarte Stichproben benutzt. Das

Signifikanzniveau lag für alle Untersuchungen bei $p < 0,05$ festgelegt, ab $p < 0,1$ wird eine Tendenz angenommen.

Ebenfalls mit SPSS wurde eine hierarchische Clusteranalyse durchgeführt. Hierfür wurden die Werte zuvor durch Z-Transformation normalisiert. Aufgrund relativ häufigen Auftretens von D-Laktat-Gehalten unterhalb der Nachweisgrenze wurde dieser Parameter nicht in die Clusteranalyse einbezogen. Es wurden lediglich die Tiere berücksichtigt, für die das gesamte Spektrum der Untersuchungen durchgeführt wurde (Tier 1-10, 16 und 18-26).

4 Ergebnisse

4.1 *In vivo* Versuch

4.1.1 Klinische Auswertung

Die klinische Beurteilung der Pferde ergab keine Auffälligkeiten hinsichtlich des Allgemeinbefindens. Auch eine pathologische Veränderung der Kotkonsistenz wurde nicht beobachtet.

4.1.2 Trockensubstanzgehalt und pH-Werte der Kotproben

Im gesamten Versuchszeitraum lag der Trockensubstanzgehalt der Kotproben im Mittel bei 21,6 %, mindestens bei 12,7 %, höchstens bei 28,3 %. Der Mittelwert der pH-Werte betrug 6,7. Alle Werte bewegten sich zwischen 5,8 und 8,1. Im ersten Durchgang konnte ein Trend zu unterschiedlichen Ergebnissen zwischen Kontroll- und Versuchsgruppe an Tag eins ($p=0,05$) und an Tag 25 ($p=0,10$) festgestellt werden. Der Trockensubstanzgehalt der Kotproben der Versuchstiere war an den Tagen 26 und 27 signifikant höher als der der Kontrolltiere (Tabelle 8, $p<0,001$). Die Kontrollgruppe des ersten Durchgangs hatte an Tag 0 einen signifikant geringeren Trockensubstanzgehalt im Kot als an Tag 42 ($p<0,001$). In der Versuchsgruppe war der Trockensubstanzgehalt der Kotproben an Tag 1 tendenziell ($p=0,08$) geringer als an Tag 25. Die Kontrollgruppe startete den ersten Durchgang mit einem signifikant höheren pH-Wert ($p<0,001$). In der Versuchsgruppe unterschied sich der pH-Wert zwischen Tag eins und 26 bzw. 27 tendenziell ($p=0,09$ bzw. $0,08$).

Tabelle 8: Trockensubstanzgehalte und pH-Werte der Kotproben im ersten Durchgang

	Trockensubstanzgehalt in %			pH-Wert		
	Kontrolltiere	Versuchstiere	p	Kontrolltiere	Versuchstiere	p
Tag 0	20,19 ^a ± 1,40	20,38 ^{ac} ± 1,40	0,723	6,87 ^a ± 0,13	6,58 ^{AB} ± 0,24	0,001
Tag 1	18,81 ^b ± 1,54	19,85 ^{ab} ± 1,19	0,050	6,76 ^b ± 0,15	6,59 ^{AC} ± 0,32	0,089
Tag 2	19,55 ^{ab} ± 2,42	20,77 ^c ± 1,10	0,103	6,63 ^c ± 0,12	6,57 ^A ± 0,18	0,334
Tag 25	20,02 ^a ± 1,21	21,17 ^{bcd} ± 2,22	0,098	6,78 ^{ab} ± 0,15	6,76 ^{BC} ± 0,10	0,142
Tag 26	20,79 ^a ± 0,69	22,24 ^{de} ± 1,01	<0,001	6,84 ^{ab} ± 0,15	6,76 ^C ± 0,11	0,117
Tag 27	20,38 ^a ± 1,64	22,75 ^e ± 0,82	<0,001	6,84 ^{ab} ± 0,12	6,73 ^C ± 0,11	0,019

^{ab} = signifikant unterschiedlich in einer Zeile t-Test.

^{AB} = signifikant unterschiedlich in einer Zeile; nichtparametrischer Wilcoxon Rangsummentest.

Im zweiten Durchgang wurde in der Versuchsgruppe ein Trend zu unterschiedlichen Ergebnissen des Trockensubstanzgehalts zwischen Tag 44 und 69 ($p=0,09$) sowie Tag 67 und 68 ($p=0,08$) beobachtet, der pH-Wert war an Tag 44 tendenziell höher als an Tag 67 ($p=0,08$).

Tabelle 9: Trockensubstanzgehalte und pH-Werte der Kotproben im zweiten Durchgang

	Trockensubstanzgehalt in %			pH-Wert		
	Kontrolltiere	Versuchstiere	p	Kontrolltiere	Versuchstiere	p
Tag 42	21,09 ^a ± 1,43	21,37 ^{ab} ± 1,59	0,631	6,72 ^a ± 0,11	6,71 ^a ± 0,13	0,725
Tag 43	22,24 ^b ± 1,12	22,11 ^{abc} ± 2,08	0,836	6,88 ^b ± 0,14	6,89 ^b ± 0,16	0,963
Tag 44	22,84 ^{bc} ± 1,43	22,58 ^{bd} ± 2,02	0,692	6,78 ^{ab} ± 0,16	6,83 ^{ab} ± 0,26	0,572
Tag 67	23,43 ^c ± 1,18	23,36 ^{bcd} ± 1,63	0,905	6,49 ^c ± 0,24	6,62 ^a ± 0,21	0,131
Tag 68	22,74 ^{bc} ± 1,37	22,20 ^{ad} ± 1,67	0,358	6,57 ^c ± 0,12	6,68 ^a ± 0,19	0,110
Tag 69	23,51 ^c ± 1,31	24,14 ^b ± 2,34	0,382	6,58 ^c ± 0,16	6,69 ^a ± 0,1	0,082

^{ab} = signifikant unterschiedlich in einer Zeile; t-Test.

^{AB} = signifikant unterschiedlich in einer Zeile; nichtparametrischer Wilcoxon Rangsummentest.

4.1.3 Mikrobielle Metabolite in den Kotproben

4.1.3.1 Ammoniumgehalt

Es wurden Ammoniumgehalte zwischen 0,9 mmol/l und 8,8 mmol/l gemessen. Im Mittel lag der Wert bei 4,3 mmol/l. Im ersten Durchgang lag der Ammoniumgehalt in der Kontrollgruppe signifikant unterhalb der Werte der Versuchstiere ($p=0,01$). Im Verlauf des ersten Durchgangs wurde in der Kontrollgruppe ein Trend zu höheren Ammoniumgehalten an Tag 27 als an Tag 0 nachgewiesen ($p=0,06$).

Tabelle 10: Ammoniumgehalte in den Kotproben

	Ammoniumgehalt in mmol/l		p
	Kontrolltiere	Versuchstiere	
Tag 0	2,99 ± 1,33	4,53 ± 1,19	0,006
Tag 27	3,75 ± 0,97	4,93 ± 1,60	0,037
Tag 42	4,47 ± 1,34	4,32 ± 1,54	0,747
Tag 69	4,90 ± 1,15	4,14 ± 0,88	0,141

4.1.3.2 Laktatkonzentration

Der D-Laktatgehalt der Proben betrug im Mittel 0,45 mmol/l. Mit 0,35 mmol/l lag dieser Wert zu Versuchsbeginn in der Versuchsgruppe fast doppelt so hoch wie in der Kontrollgruppe ($p=0,04$). Im zweiten Durchgang waren die Werte der Kontrollgruppe am letzten Tag signifikant höher als an Tag 42 ($p=0,01$), in der jeweiligen Versuchsgruppe zeigte sich diese Tendenz im ersten und im zweiten Durchgang ($p=0,09$ bzw. 0,07).

Der Mittelwert der L-Laktatgehalte in den Proben lag bei 0,72 mmol/l. Ebenso wie die D-Laktatgehalte wurden im ersten Durchgang in den Proben der Kontrolltiere in diesem Fall an beiden Tagen signifikant geringere Werte gemessen ($p=0,01$ bzw. 0,05). An Tag 0 lag der L-Laktatgehalt in den Proben der Kontrolltiere bei etwa 36 % des Wertes der Versuchstiere. Nach dem Wechsel der Gruppen an Tag 42 war dagegen ein Trend ($p=0,08$) zu höheren Werten in der Versuchsgruppe zu erkennen. In der Kontrollgruppe waren die fäkalen L-Laktatgehalte an Tag 69 signifikant höher als an Tag 42 ($p=0,01$). Die Auswertung des Gesamtlaktatgehalts zeigte ein ähnliches Bild. Am Ende beider Durchgänge lagen die Werte in der Kontrollgruppe signifikant höher als zu Beginn ($p=0,03$ bzw. 0,01). Am ersten Tag

unterschieden sich die fäkalen Laktatgehalte zwischen den beiden Gruppen signifikant ($p < 0,001$), an Tag 27 und 42 im Trend ($p = 0,06$ bzw. $0,08$)

Tabelle 11: Laktatgehalte in den Kotproben

	D-Laktat in mmol/l			L-Laktat in mmol/l		
	Kontrolltiere	Versuchstiere	p	Kontrolltiere	Versuchstiere	p
Tag 0	0,18 ± 0,07	0,35 ± 0,18	0,043	0,27 ± 0,18	0,74 ± 0,55	0,005
Tag 27	0,33 ± 0,18	0,48 ± 0,24	0,110	0,40 ± 0,24	0,69 ± 0,45	0,046
Tag 42	0,27 ± 0,15	0,34 ± 0,20	0,353	0,57 ± 0,34	0,90 ± 0,44	0,080
Tag 69	0,51 ± 0,22	0,56 ± 0,21	0,545	0,99 ± 0,43	0,91 ± 0,51	0,608

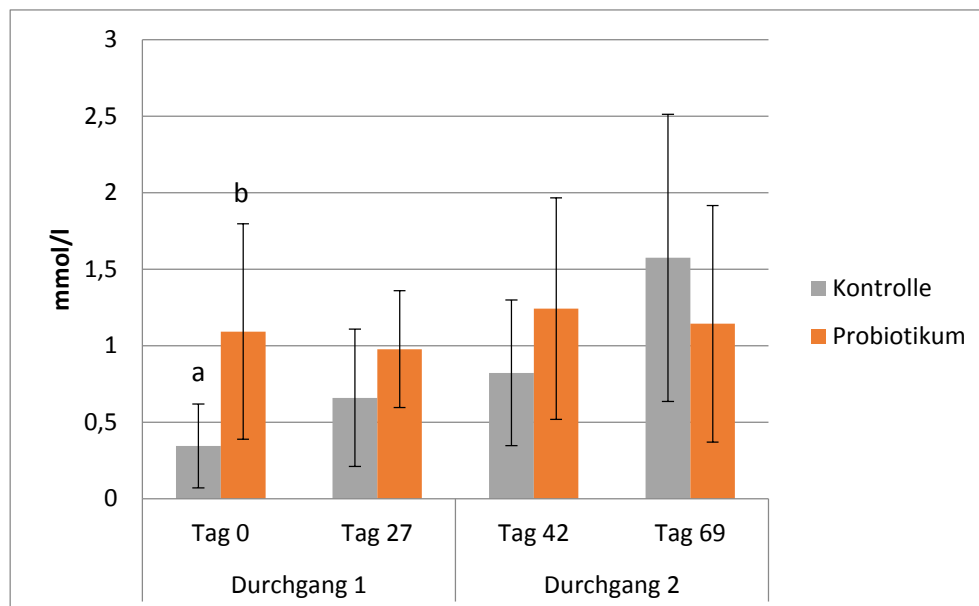


Abb. 2: Gesamtlaktatgehalte der Kotproben in mmol/l

4.1.3.3 Anteil kurzkettiger Fettsäuren

In der Kontrollgruppe war der Essigsäuregehalt an Tag 69 statistisch signifikant höher als an Tag 42 ($p = 0,015$). Für Propionsäure konnte ein Trend zu höheren Gehalten in den Proben der Versuchstiere an Tag 69 im Gegensatz zu Tag 42 gezeigt werden ($p = 0,053$). Das Verhältnis von Acetat zu Propionat lag an Tag 69 mit $3,99 (\pm 0,46)$ höher als zu Beginn des zweiten Durchgangs an Tag 42 ($3,67 \pm 0,40$, $p = 0,01$) und signifikant über dem der Versuchsgruppe an

Tag 69 mit $3,56 (\pm 0,32, p=0,01)$. Während im ersten Durchgang in der Versuchsgruppe ein Trend zu einem höheren Acetat-Anteil am Ende des Versuchszeitraums gezeigt werden konnte ($4,01 \pm 0,62$ an Tag 0, $4,27 \pm 0,56$ an Tag 27, $p= 0,07$), war dieser Effekt im zweiten Durchgang nach dem Gruppenwechsel umgekehrt ($3,83 \pm 0,41$ an Tag 42, $3,56 \pm 0,32$ Tag 69, $p=0,07$).

Am Ende des ersten Durchgangs enthielten die Kotproben der supplementierten Tiere einen signifikant geringeren i-Buttersäureanteil als zu Beginn des Versuchs ($p=0$) und als die Kontrolltiere. Der Gehalt an n-Buttersäure lag an Tag 27 in der Kontrollgruppe signifikant höher als an Tag 0 (nicht parametrisch, $p=0,02$).

Für die Proben von Tieren aus der Versuchsgruppe zu Versuchsbeginn konnte gezeigt werden, dass sie tendenziell ($p=0,06$) höhere i-Valeriansäuregehalte aufwiesen als die Kontrollgruppe am gleichen Tag und die Versuchsgruppe an Tag 27. Die n-Valeriansäuregehalte der Kontrollgruppe lagen an den jeweils letzten Tagen eines Durchgangs tendenziell höher als zu Versuchsbeginn ($p=0,07$ bzw. $0,1$).

Bei Untersuchung des Gesamtfettsäuregehaltes konnten in der Kontrollgruppe statistisch signifikant höhere Werte ($p=0,02$) an Tag 69 als an Tag 42 gemessen werden.

Tabelle 12: Gehalte kurzkettiger Fettsäuren in den Kotproben in mmol/l

	Gruppe	Tag 0	Tag 27	Tag 42	Tag 69
Essigsäure	Kontrolle	18,57 ± 3,32	19,53 ± 2,89	15,80 ^A ± 3,54	19,46 ^B ± 4,61
	Versuch	19,71 ± 3,79	19,39 ± 3,65	16,31 ± 2,73	17,81 ± 2,50
	p	0,377	0,715	0,621	0,618
Propionsäure	Kontrolle	4,74 ± 0,96	4,77 ± 0,66	4,37 ± 1,14	4,81 ± 1,23
	Versuch	4,98 ± 1,55	4,64 ± 1,23	4,33 ± 1,00	5,05 ± 0,87
	p	0,621	0,729	0,925	0,554
i-Buttersäure	Kontrolle	0,60 ± 0,11	0,59 ± 0,13	0,45 ± 0,10	0,47 ± 0,12
	Versuch	0,64 ^A ± 0,12	0,47 ^B ± 0,11	0,51 ± 0,09	0,49 ± 0,13
	p	0,354	0,033	0,234	0,683
n-Buttersäure	Kontrolle	1,08 ^A ± 0,18	1,31 ^B ± 0,23	1,08 ± 0,34	1,32 ± 0,49
	Versuch	1,10 ± 0,34	1,26 ± 0,48	1,10 ± 0,30	1,24 ± 0,27
	p	0,583	0,310	0,780	1,000
i-Valeriansäure	Kontrolle	0,40 ± 0,09	0,41 ± 0,11	0,31 ± 0,08	0,39 ± 0,17
	Versuch	0,46 ± 0,11	0,38 ± 0,13	0,37 ± 0,12	0,35 ± 0,11
	p	0,057	0,477	0,252	0,892
n-Valeriansäure	Kontrolle	0,14 ± 0,05	0,17 ± 0,05	0,16 ± 0,05	0,19 ± 0,06
	Versuch	0,17 ± 0,06	0,18 ± 0,07	0,17 ± 0,05	0,19 ± 0,06
	p	0,178	0,747	0,290	0,685
Gesamt-fettsäuren	Kontrolle	25,53 ± 4,46	26,78 ± 3,82	22,18 ^A ± 5,09	26,65 ^B ± 6,16
	Versuch	27,22 ± 5,88	26,32 ± 5,52	22,80 ± 4,03	25,15 ± 3,73
	p	0,451	0,533	0,652	0,856

^{A,B} = signifikant unterschiedlich in einer Zeile; nichtparametrischer Wilcoxon Rangsummentest.

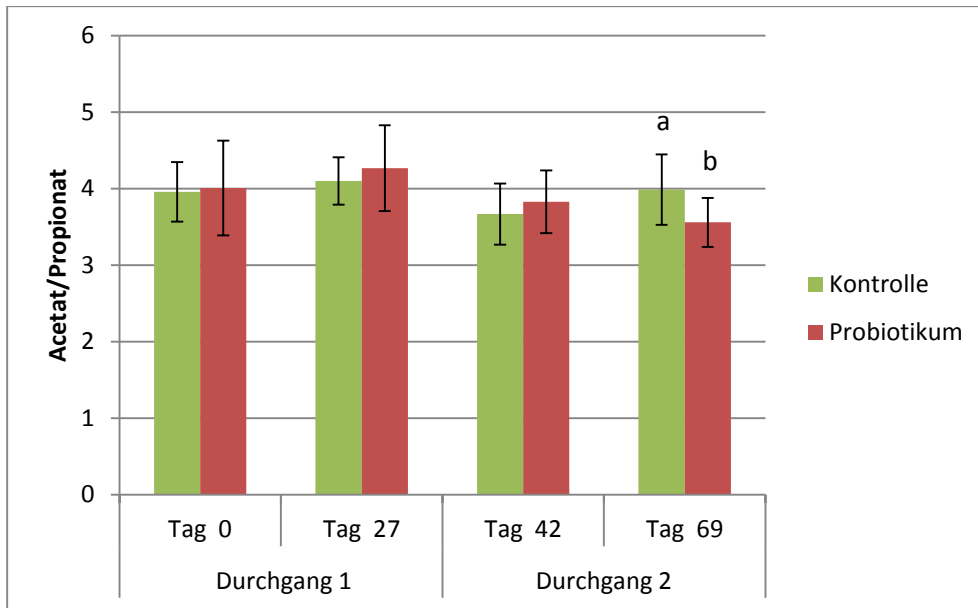


Abb. 3: Verhältnis von Acetat zu Propionat in den Kotproben

4.1.4 Fäkale Zellzahlen der probiotischen Stämme

DNA von *Lactobacillus rhamnosus* konnte nur in einer Probe (Tier 2, Tag 27) nachgewiesen werden.

Enterococcus faecium wurde in Konzentrationen zwischen \lg 1,24 cfu/g und 5,8 cfu/g gemessen, im Mittel lag die Konzentration bei \lg 5,3 cfu/g. In der Kontrollgruppe war die Konzentration an Tag 0 signifikant geringer als an Tag 27 ($p=0,038$) und tendenziell geringer als die der Versuchsgruppe an Tag 0 ($p=0,089$).

Tabelle 13: Zellzahl *E.faecium* in log cfu/g

	Zellzahl <i>E.faecium</i> in log cfu/g		p
	Kontrollgruppe	Versuchsgruppe	
Tag 0	5,29 ^A ± 0,19	5,42 ± 0,16	0,089
Tag 27	5,47 ^B ± 0,17	5,37 ± 0,25	0,315
Tag 42	5,38 ± 0,13	5,38 ± 0,18	0,529
Tag 69	5,32 ± 0,18	5,45 ± 0,18	0,165

^{A,B} = signifikant unterschiedlich in einer Spalte; nichtparametrischer Wilcoxon Rangsummentest.

4.1.5 Mikrobiologisches Profil der Kotproben

Die Richness, das Maß für die Anzahl der verschiedenen Bakterienarten, war an Tag 0 in der Versuchsgruppe signifikant geringer als in der Kontrollgruppe und als an Tag 27 in der Versuchsgruppe ($p=0,012$). Im zweiten Durchgang war der Wert in der Kontrollgruppe an Tag 69 signifikant niedriger als an Tag 42 ($p=0,005$).

Der Shannon-Index (H) war an den Tagen 0, 27 und 42 in den Proben der Kontrolltiere signifikant größer als in den Proben der supplementierten Tiere und an Tag 27 für die Proben der Versuchsgruppe signifikant höher als an Tag 0 ($p=0,017$).

Im ersten Durchgang konnte in der Kontrollgruppe eine gleichmäßigere Verteilung der Arten innerhalb der Bakterien (Evenness) nachgewiesen werden. In beiden Gruppen wurden am letzten Tag signifikant unterschiedliche Werte für die Evenness gemessen als an Tag 0. Die Gensequenzen waren bei den Tieren 1-10 zu Versuchsende gleichmäßiger verteilt ($p=0,005$) als zu Beginn des zweiten Durchgangs, bei den Tieren 16-26 verhielt es sich umgekehrt ($p=0,028$). In den Proben dieser Tiere konnte außerdem ein signifikanter Unterschied der Evenness zwischen Tag 0 und Tag 42 festgestellt werden ($p=0,008$).

Tabelle 14: Diversitätsindizes der DGGE

	Gruppe	Tag 0	Tag 27	Tag 42	Tag 69
Richness	Kontrolle	33,30 ± 3,95	33,56 ± 4,30	35,10 ^A ± 4,07	23,50 ^B ± 4,09
	Versuch	24,00 ^A ± 3,68	33,60 ^B ± 4,93	32,60 ± 4,22	34,38 ± 5,78
	p	<0,001	0,968	0,247	<0,001
Shannon-Index	Kontrolle	3,14 ± 0,17	3,04 ± 0,18	2,93 ± 0,29	2,77 ± 0,21
	Versuch	2,50 ^A ± 0,20	2,78 ^B ± 0,16	2,73 ± 0,31	2,84 ± 0,16
	p	<0,001	0,008	0,043	0,897
Evenness	Kontrolle	0,90 ± 0,02	0,87 ± 0,05	0,82 ± 0,06	0,88 ± 0,05
	Versuch	0,79 ± 0,05	0,80 ± 0,05	0,77 ± 0,11	0,81 ± 0,06
	p	<0,001	0,006	0,190	0,021

^{A,B} = signifikant unterschiedlich in einer Zeile; nicht parametrischer Wilcoxon Rangsummentest.

4.1.6 Clusteranalyse der Ergebnisse des *in vivo* Versuchs

Die aus der Clusteranalyse resultierenden Dendrogramme wurden jeweils für die Tiere 1-10 und 16 sowie 18-29 erstellt und fallen für die beiden untersuchten Gruppen unterschiedlich aus. Zu bedenken ist bei dieser Art der Analyse, dass alle erhobenen Parameter gleichwertig in die Betrachtung einfließen. Die Tiere 1-10, die im ersten Durchgang das Probiotikum bekamen und im zweiten Kontrollgruppe waren, zeigen keine Gruppierung nach Versuchstagen. In einigen Fällen (Tier 2, 3, 6, 7) ist zu erkennen, dass sich die Ergebnisse, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten von diesem Tier erhoben wurden weniger voneinander unterscheiden als sie sich von den Werten anderer Tiere am gleichen Versuchstag unterscheiden.

In der zweiten Gruppe (Tier 16 sowie 18-26) zeichnet sich ab, dass sich an einem Versuchstag erhobene Werte der gesamten Gruppe weniger unterscheiden als die Werte eines Tieres zu den verschiedenen Beprobungszeitpunkten. Diese Tendenz ist an der farblich getrennten Anordnung im Dendrogramm zu sehen.

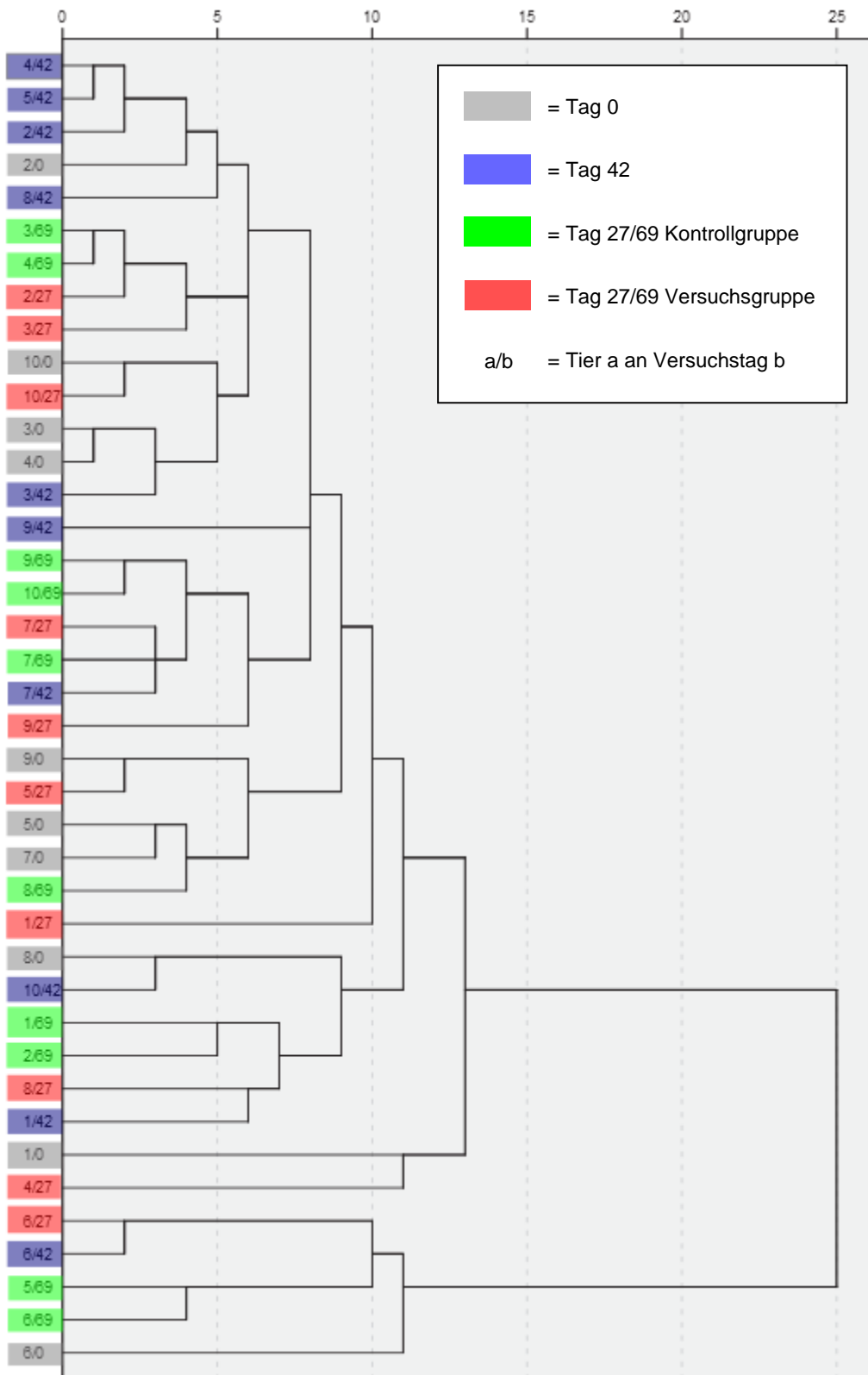


Abb. 4: Hierarchische Clusteranalyse der erhobenen Daten (Dendrogramm mit durchschnittlicher Verknüpfung zwischen den Gruppen, ohne D-Laktat), Tier 1-10

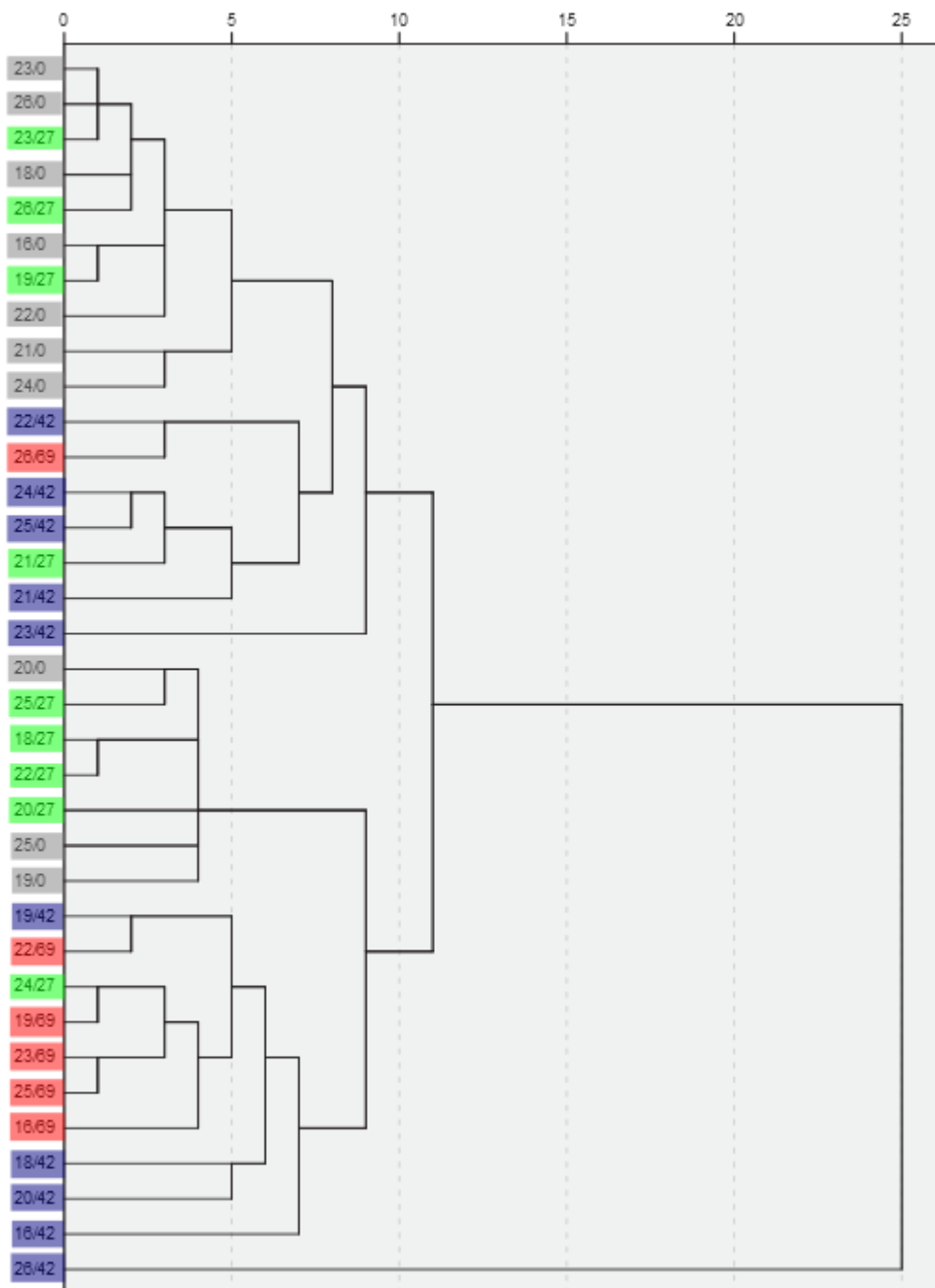


Abb. 5: Hierarchische Clusteranalyse der erhobenen Daten (Dendrogramm mit durchschnittlicher Verknüpfung zwischen den Gruppen, ohne D-Laktat), Tier 16 & 18-26

4.2 *In vitro* Versuch

In einem *in vitro* Versuch wurden die probiotischen Stämme mit Inhalt des Magen-Darm-Trakts von Pferden inkubiert, um die gastrointestinale Passage zu simulieren. Die Auswertung des Inkubationsversuchs erfolgte als relative Angabe zum Wachstumsverhalten der Stämme in 0,85-prozentiger Natriumchloridlösung. Dadurch konnten medienbedingte Effekte

berücksichtigt werden. In der höheren Verdünnungsstufe des Probiotikums waren die DNA-Gehalte sehr gering. Für *E. faecium* konnte während der ersten acht Stunden ein etwa exponentielles Wachstum in Natriumchloridlösung beobachtet werden, danach blieb die Konzentration lebender Zellen etwa konstant. *L. rhamnosus* dagegen vermehrte sich nicht. Vielmehr nahm die Konzentration lebender Zellen innerhalb des Inkubationszeitraums auf etwa ein Fünftel der eingesetzten Zellzahl ab.

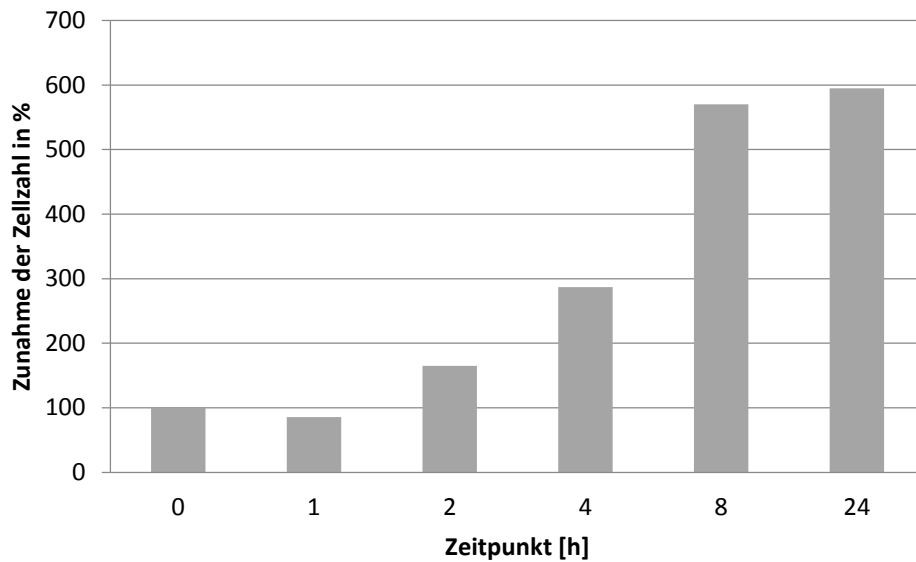


Abb. 6: Wachstumsverhalten von *E. faecium* (1:100) in 0,85 % NaCl

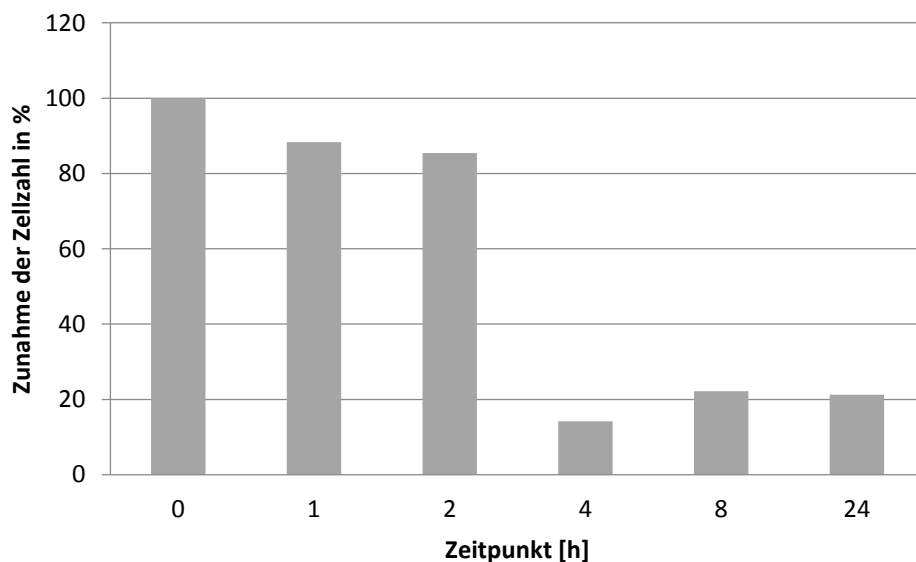


Abb. 7: Wachstumsverhalten von *L. rhamnosus* (1:100) in 0,85 % NaCl

Zur Messung des pH-Wertes und vor Anfertigen der Verdünnungen wurde von allen untersuchten Organinhalten eine Mischprobe aus den Proben der 6 Schlachtpferde angefertigt. Das Sterilfiltrat des Magens hatte einen pH-Wert von 3,62. In der 100 fachen Verdünnung wurde eine Gesamtkeimzahl von 10^9 /ml eingesetzt. In dieser Verdünnungsstufe konnte für *E. faecium* keine signifikante Veränderung des Wachstumsverhaltens im Vergleich zur Negativkontrolle festgestellt werden. *L. rhamnosus* zeigte nach vier Stunden ein fast vierfach höheres Wachstum im Sterilfiltrat als in 0,85 %iger Natriumchloridlösung und damit einen fast zehnfach höheren Wert als nach zwei Stunden.

Tabelle 15: Wachstumsverhalten verschiedener Verdünnungsstufen des Probiotikums im Sterilfiltrat des Magens, Angabe in % des Wachstums der Negativkontrolle

	<i>Enterococcus faecium</i>		<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	
	1:100	1:1000	1:100	1:1000
t=0	88,33 ± 6,54	277,81 ^{a,b} ± 138,02	23,65 ^a ± 15,03	38,23 ^a ± 27,71
t=2	82,82 ± 11,85	185,61 ^a ± 52,48	40,89 ^a ± 17,47	235,24 ^b ± 47,99
t=4	89,43 ± 12,52	73,28 ^b ± 26,55	396,34 ^b ± 29,56	377,75 ^b ± 100,74

^{a,b} = signifikant unterschiedlich in einer Spalte; t-Test.

Das Sterilfiltrat des Jejunums hatte einen pH-Wert von 8,23. Die Konzentrationen beider Bakterienarten nahm bereits in der ersten Stunde der Inkubation signifikant ab und betrug nach zweistündiger Inkubation weniger als 10 % des Wertes der Negativkontrolle.

Tabelle 16: Wachstumsverhalten verschiedener Verdünnungsstufen des Probiotikums im Sterilfiltrat des Jejunums, Angabe in % des Wachstums der Negativkontrolle

	<i>Enterococcus faecium</i>		<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	
	1:100	1:1000	1:100	1:1000
t=0	50,37 ^a ± 11,89	5,31 ^a ± 0,97	18,33 ^a ± 3,0	0,94 ^a ± 0,01
t=1	10,74 ^b ± 1,25	1,50 ^b ± 0,41	2,41 ^b ± 0,18	0,19 ^b ± 0,17
t=2	6,76 ^b ± 2,23	0,63 ^c ± 0,34	2,12 ^b ± 1,01	0,08 ^b ± 0,1

^{a,b} = signifikant unterschiedlich in einer Spalte; t-Test.

Der pH-Wert des Sterilfiltrats aus dem Caecum lag bei 7,88. Auch bei diesem Versuch lagen am Ende der Inkubation in fast allen Fällen nur noch sehr geringe Konzentrationen lebender Bakterien im Vergleich zur Negativkontrolle vor.

Tabelle 17: Wachstumsverhalten verschiedener Verdünnungsstufen des Probiotikums im Sterilfiltrat des Cäcums, Angabe in % des Wachstums der Negativkontrolle

	<i>Enterococcus faecium</i>		<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	
	1:100	1:1000	1:100	1:1000
t=0	55,26 ^{a,c} ± 22,38	2,4 ^a ± 0,88	29,55 ^{a,b} ± 13,79	0,42 ^a ± 0,4
t=2	30,56 ^{b,c} ± 5,1	1,74 ^a ± 0,49	8,46 ^a ± 1,92	0,47 ^a ± 0,1
t=4	17,64 ^b ± 6,88	5,56 ^b ± 1,65	22,95 ^{a,b} ± 10,1	1,51 ^b ± 0,44
t=8	5,24 ^a ± 1,6	5,64 ^{b,c} ± 1,25	5,26 ^a ± 1,23	1,45 ^{a,b} ± 1,28
t=24	2,5 ^a ± 0,13	82,57 ^c ± 48,15	2,01 ^b ± 0,12	0,65 ^{a,b} ± 0,17

^{a,b} = signifikant unterschiedlich in einer Spalte; t-Test.

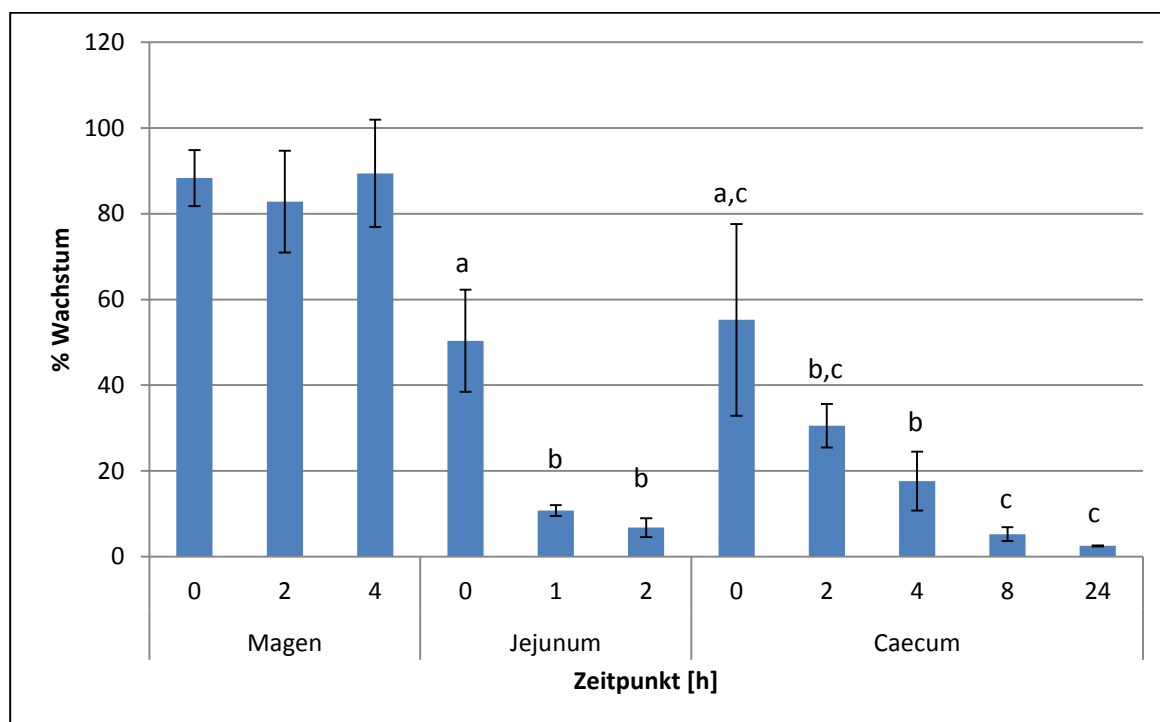


Abb. 8: Wachstum von *E. faecium* (1:100) im Sterilzentrifugat relativ zur Negativkontrolle

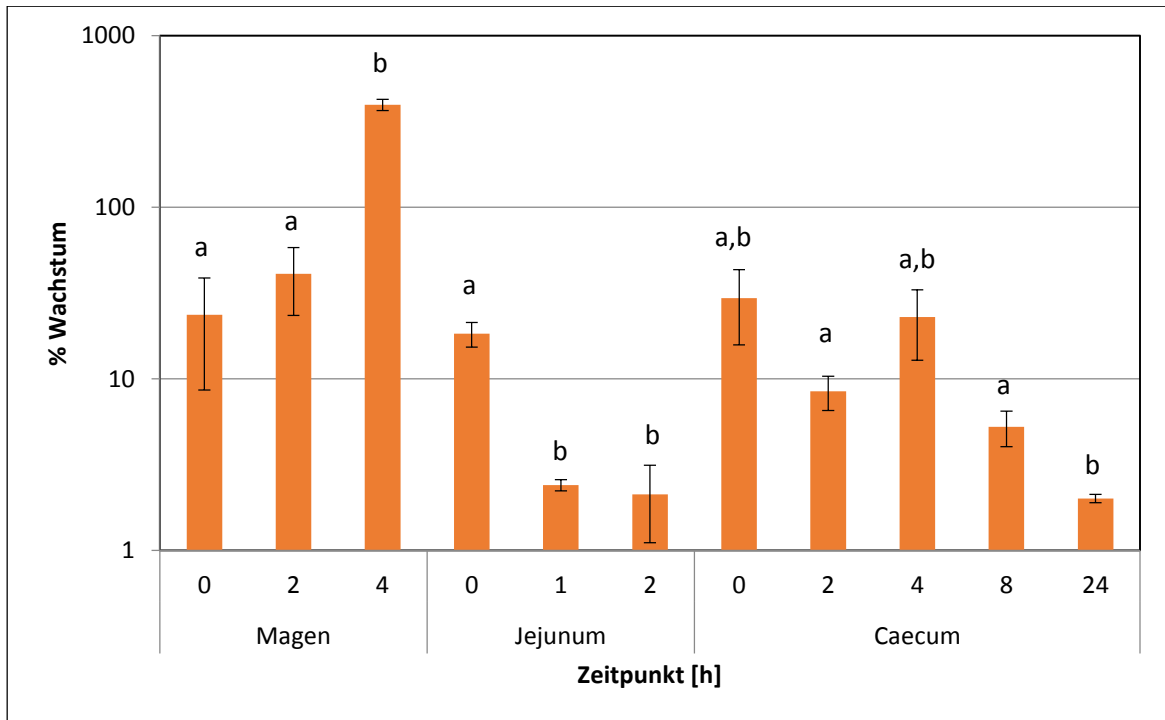


Abb. 9: Wachstum von *L. rhamnosus* (1:100) im Sterilzentrifugat relativ zur Negativkontrolle, Ordinate logarithmisch skaliert

5 Diskussion

Die Arbeit diente der Untersuchung der Auswirkungen einer probiotischen Supplementierung von Pferden mit *E. faecium* und *L. rhamnosus*. Hierzu wurden klinische Parameter an Junghengsten erhoben und Kotproben gesammelt, in denen die Konzentrationen bakterieller Metabolite und der probiotischen Bakterien bestimmt wurden. Dadurch sollte einerseits festgestellt werden, ob sie eine Wirkung auf das intestinale Ökosystem gesunder Pferde haben und ob die Stämme die Magen- Darm- Passage beim Pferd überleben. Anschließend wurden in einem *in vitro* Versuch milieubedingte Effekte auf die probiotischen Bakterien untersucht.

5.1 *In vivo* Versuch

5.1.1 Trockensubstanz und pH-Werte der Kotproben

Mit einem mittleren Trockensubstanzgehalt von 21,6 % liegen die Kotproben der untersuchten Tiere im Bereich der bei der Verfütterung von Heu gemessenen Werte von 20,6–23,3 % (Zeyner, 2004) und damit oberhalb der Werte, die bei Heulagefütterung festgestellt wurden (17,5-17,6 %) (Jensen, 2010). Durch die Supplementierung mit *L. rhamnosus* und *E. faecium* ergab sich keine eindeutige Veränderung der Trockensubstanzgehalte. Am Ende des ersten Versuchsdurchgangs (Tag 26 und 27) lag der Trockensubstanzgehalt in der Versuchsgruppe zwar höher als in der Kontrollgruppe, dieses Ergebnis konnte im zweiten Durchgang aber nicht reproduziert werden. Es zeichnete sich vielmehr zwischen den Gruppen im gesamten Versuchszeitraum eine Parallelität von Schwankungen im Trockensubstanzgehalt ab. Klinisch manifester Durchfall wurde nicht beobachtet. Die Veränderungen sind mit hoher Wahrscheinlichkeit auf Fütterungseinflüsse wie zum Beispiel unterschiedliche Feuchtegehalte der Heulageballen oder andere äußere Einflüsse (z. B. Wetter, sozialer Stress) zurückzuführen. Ein Einfluss der probiotischen Supplementierung auf den fäkalen Trockensubstanzgehalt der Tiere konnte nicht nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis ist angesichts gesunder Versuchstiere nicht unerwartet. Es unterscheidet sich damit außerdem von Ergebnissen, die an neonatalen Tieren erhoben wurden (Günther, 2012; Weese, 2005; Yuyama, 2004).

Aus der Literatur entnommene Werte für den pH-Wert von Kotproben von Pferden liegen im Bereich von 6,43-6,57 bei Heulagefütterung (Jensen, 2010) bzw. 6,36-6,76 bei Verfütterung von Heu als Raufutter (Mackenthun, 2013; Zeyner, 2004). Mit 6,7 lag der Durchschnitt in diesem Versuch also im oberen Bereich. Der pH-Wert wird indirekt durch die Futterzusammensetzung beeinflusst, indem diese zu unterschiedlichen Konzentrationen basischer (Ammonium) und saurer (Laktat und kurzkettige Fettsäuren) Abbauprodukte führt.

Ähnlich wie die Schwankungen im Trockensubstanzgehalt der Kotproben veränderte sich der pH-Wert mehrfach im Untersuchungszeitraum, auch hier ändern sich Kontroll- und Versuchsgruppe meist in gleicher Weise. Außer an Tag 42 haben die Tiere 16-29 während des gesamten Versuchs einen geringeren fäkalen pH-Wert als die andere Hälfte der Tiere, unabhängig von der Zufütterung des Probiotikums, sodass auch hier davon auszugehen ist, dass kein Einfluss durch das Probiotikum ausgeübt wurde und die Veränderungen vielmehr auf andere Fütterungseinflüsse zurückzuführen sind.

5.1.2 Einfluss der probiotischen Supplementierung auf mikrobielle Metabolite

5.1.2.1 Ammoniumgehalt

Nahrungsproteine werden im Dünndarm in Di- und Tripeptide gespalten und schließlich als Aminosäuren resorbiert. Protein, das unverdaut den Dünndarm passiert, kann in hinteren Darmabschnitten durch proteolytische Bakterien gespalten werden. Hierbei entsteht neben Schwefelwasserstoff, biogenen Aminen und Amiden auch Ammonium, das durch die Dickdarmwand resorbiert und zum Aufbau nicht essentieller Aminosäuren in der Leber genutzt werden kann oder Ausgangsprodukt der Harnstoffsynthese ist. Der nicht resorbierte Anteil des Ammoniums ist in den Kotproben nachweisbar. Ob das durch Bakterien synthetisierte Protein auch direkt vom Pferd genutzt werden kann, ist nicht abschließend geklärt, da einerseits die Resorption von Aminosäuren im Dünndarm erfolgt (GfE, 2014), andererseits in hinteren Darmabschnitten mRNA von Aminosäuretransportern nachgewiesen werden konnte (Woodward, 2010). Aus der Literatur entnommene Werte für den Ammoniumgehalt von Kotproben von Pferden liegen bei 9,2-12 mmol/l bei Heu- und Haferfütterung (Zeyner, 2004). Mit 4,3 mmol/l lag der durchschnittliche Ammoniumgehalt der in dieser Arbeit untersuchten Kotproben damit nur bei etwa der Hälfte dieser Werte. Eine Erklärung hierfür kann in einer geringeren Proteinaufnahme mit der Nahrung liegen. Außerdem ist zu berücksichtigen, dass der fäkale pH-Wert bei den untersuchten Tieren vergleichsweise hoch war, sodass Ammoniak zu erheblichen Teilen als flüchtiges NH_3 vorlag.

Im ersten Durchgang hatte die Versuchsgruppe zu Beginn und Ende des Untersuchungszeitraums höhere Ammoniumgehalte im Kot als die Kontrollgruppe. In der Kontrollgruppe war ein Trend zu einer höheren Ammoniumkonzentration im Kot an Tag 27 verglichen mit Tag 0 erkennbar. Im zweiten Durchgang wurden keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen. Diese Ergebnisse suggerieren, dass durch den Einsatz des Probiotikums kein Einfluss auf den bakteriellen Eiweißabbau ausgeübt wurde. Vielmehr deuten sowohl die großen Unterschiede zwischen den Gruppen im ersten Versuchsdurchgang als auch die relative Annäherung beider Gruppen nach der

Übergangsphase auf einen überwiegend individuellen Einfluss auf den intestinalen Ammoniumgehalt hin.

5.1.2.2 Laktatkonzentration

Das Pferd nimmt gemäß seiner Natur große Mengen pflanzlicher Faserstoffe auf, die zum überwiegenden Teil aus komplexen Kohlenhydraten wie Cellulose und Hemicellulosen wie z. B. β -Xylanen und β -Glucanen bestehen. Die Enzymausstattung von Säugetieren lässt den Abbau dieser Kohlenhydrate nicht zu, da ihnen die Möglichkeit zur Spaltung β -glykosidischer Bindungen fehlt. Die Spaltung dieser Bindungen ist jedoch faserspaltenden Bakterien durch Fermentation möglich. Deren hydrolytische Enzyme umfassen u.a. Endoglucanasen, Xylanasen, Glycosid-Hydrolasen und Cellulasen, die unlösliche Polysaccharide zu löslichen Kohlenhydraten spalten können (Qi, 2005). Zu den häufigsten faserspaltenden Bakterien im Dickdarm des Pferdes gehören neben *Ruminococcus* spp. und den *Lachnospiraceae* auch *Fibrobacter* spp. (Costa, 2012). Auch im Dünndarm unverdaute Stärke wird in den distalen Darmabschnitten durch Fermentation abgebaut.

Der weitere Abbau der Oligosaccharide erfolgt durch saccharolytische Bakterien. Zu beachten ist, dass die Expression der Enzyme eines Bakteriums an das verfügbare Substrat angepasst werden kann. So sind *Bacteroides* und *Prevotella* spp. vornehmlich saccharolytische Bakterien, können aber auch faserspaltende Gene exprimieren (Daly, 2012). Den größten Anteil milchsäurebildender saccharolytischer Bakterien stellen beim Pferd die Laktobazillen dar (Al Jassim, 2005). Die relativen Mengen der produzierten Enantiomere D- und L-Laktat ist arten- und z.T. stammspezifisch (Macfarlane, 2012). Laktat verwertende Bakterien wie beispielsweise *Veillonella* spp. und *Megasphaera* spp. können dann wiederum das Laktat zu kurzkettigen Fettsäuren (zumeist Propionat und n-Butyrat) umsetzen. Durch die individuell unterschiedlich zusammengesetzten Mikrobenpopulationen entstehen demnach mitunter gravierende Unterschiede in den Konzentrationen intestinaler bakterieller Stoffwechselprodukte (Biddle, 2013a).

Die für den Laktatgehalt im hinteren Verdauungstrakt des Pferdes aus der Literatur verfügbaren Werte unterscheiden sich stark. Für fäkale Konzentrationen bei Verfütterung einer heubasierten Ration werden Angaben im Bereich von 0,7 mmol/l D-Laktat (da Veiga, 2005) oder 0,17-0,3 mmol/l L-Laktat (da Veiga, 2005; Zeyner, 2004) gemacht. Bei Heulagefütterung wurde mit 0,08 mmol/l ein deutlich geringerer Gehalt an Gesamtlaktat gemessen (Müller, 2008). Im Caecum und besonders im Colon liegen die Konzentrationen beider Enantiomere höher (da Veiga, 2005; Respondek, 2008).

Im Versuch betrug der durchschnittliche L-Laktatgehalt der Proben 0,72 mmol/l, D-Laktat konnte im Mittel in einer Konzentration von 0,45 mmol/l gemessen werden. Beide Durchgänge starteten mit signifikant höheren Laktatgehalten in der jeweiligen Versuchsgruppe. Im zweiten Durchgang lagen die Laktatgehalte in der Kontrollgruppe außerdem am Ende des Versuchszeitraums höher als zu Beginn. Bezüglich des L-Laktatgehalts ist auffällig, dass in beiden Durchgängen steigende Werte in der jeweiligen Kontrollgruppe gleich bleibenden oder sinkenden Werten der Versuchsgruppe gegenüber stehen. Diese sind allerdings nicht immer statistisch zu belegen. Neben dem Einfluss der individuellen mikrobiellen Besiedlung und deren Anpassung an die Substratverfügbarkeit muss als Erklärung auch die Nutzung von Laktat als Substrat in den hinteren Abschnitten des Dickdarms berücksichtigt werden, sodass die fäkalen Laktatgehalte nicht zwingend Rückschlüsse auf dessen Stoffwechsel im Gastrointestinaltrakt zulassen.

Der D-Laktatgehalt der Kotproben lag jeweils am letzten Tag eines Durchgangs im Trend über dem Wert des ersten Probennahmetages. Dies war in beiden Durchgängen und für beide Gruppen zu beobachten. Darüber hinaus begannen die Tiere der Versuchsgruppe des ersten Durchgangs den Versuch bereits mit signifikant höheren D-Laktatgehalten im Kot. Für die Unterschiede zwischen den Gruppen sind wiederum individuell unterschiedliche Reaktionen der Bakterien des Gastrointestinaltrakts eine mögliche Erklärung, während die Veränderungen innerhalb des Versuchszeitraums auf einen Fütterungseinfluss hindeuten. Durch die stark unterschiedlichen Laktatgehalte zwischen den Gruppen bereits zu Beginn des jeweiligen Versuchszeitraums wird eine Interpretation bezüglich eines möglichen Einflusses durch das Probiotikum erschwert.

5.1.2.3 Anteil kurzkettiger Fettsäuren

Als kurzkettige Fettsäuren werden Carbonsäuren mit einer Kettenlänge von bis zu sechs C-Atomen bezeichnet. Sie entstehen durch Fermentation von Kohlenhydraten, welche beim Pferd vor allem in Caecum und Colon stattfindet (Rombeau, 1990; de Fombelle et al., 2001). Als Substrat für die faserspaltenden Bakterien liegen im Dickdarm überwiegend Zellwandbestandteile der Pflanzenzellen vor, die den Dünndarm zu 85-95 % unverdaut passieren (Santos, 2011). Neben der Bildung aus Pyruvat, das durch Glykolyse aus Monosacchariden entsteht, können kurzkettige Fettsäuren auch aus Laktat gebildet werden oder aus Wasserstoff und Kohlendioxid aufgebaut werden (Hooper, 2002). Beim Pferd wurde für *Spirochaetaceae* nachgewiesen, dass so durch Acetogenese unter Umgehung von Methanbildung die Wasserstoffkonzentration im Dickdarm gesenkt werden kann (Santos, 2011). Kurzkettige Fettsäuren können sekundär aktiv oder durch Diffusion durch das Epithel von Caecum und Colon aufgenommen werden, es können unterschiedliche Affinitäten der

Transportproteine für die Isoformen der Fettsäuren bestehen (Sejrsen, 2006). Während der Darmpassage werden 95 % der produzierten Fettsäuren aus der Ingesta resorbiert oder fermentiert (Rechkemmer, 1988). Während das Epithel selbst vor allem n-Butyrat als Energiequelle nutzen kann, kann Acetat auch zu peripheren Geweben transportiert werden. Propionat dient u.a. der Gluconeogenese in der Leber. Darüber hinaus stellen kurzkettige Fettsäuren die vorherrschenden Anionen im Dickdarm dar und wirken so osmoregulatorisch (Hooper, 2002). Gesamtkonzentration und Zusammensetzung kurzkettiger Fettsäuren im Dickdarm des Pferdes sind abhängig vom Rohfasergehalt der Ration (Santos, 2011), bis zu 65% seines Energiebedarfs kann es durch kurzkettige Fettsäuren decken (Al Jassim, 2009).

Die bisher gemessenen Werte für fäkale Gehalte von Acetat bewegen sich im Rahmen von 24,2 mmol/l (Jensen, 2010) bis 35,6 mmol/l (Müller, 2008) bei Verfütterung von Heu oder Heulage. Mit 18,3 mmol/l mittlerem Acetatgehalt lagen die Werte in diesem Versuch etwas niedriger. Für Propionsäure lag der Mittelwert der Proben mit 4,7 mmol/l ebenfalls unterhalb der der Literatur entnommenen Werte (6,3 mmol/l (Dougal, 2012) bis 10,3 mmol/l (Müller, 2008)). Die gemessenen mittleren Buttersäurekonzentrationen bewegen sich etwa im Rahmen der Ergebnisse vorheriger Studien, die Werte zwischen 0,6-0,9 mmol/l für i-Buttersäure (Jensen, 2010; Müller, 2008) und 1,2-3,4 mmol/l für n-Buttersäure (da Veiga, 2005; Jensen, 2010) nennen. Auch die gemessenen Valeriansäuregehalte liegen im Rahmen von Literaturangaben, die bei 0-0,9 mmol/l i-Valeriansäure und 0-0,5 mmol/l n-Valeriansäure (da Veiga, 2005; Jensen, 2010) liegen. Die im zweiten Durchgang beobachteten Trends zu höheren Acetatkonzentrationen in der Kontrollgruppe und höheren Propionatgehalten in den Proben der Versuchstiere an Tag 69 schlagen sich als signifikant geringeres Acetat/Propionat-Verhältnis in der Versuchsgruppe nieder. Diese Veränderungen im Fermentationsmuster sind durch eine veränderte Zusammensetzung der intestinalen Bakterienpopulationen bedingt.

5.1.3 Fäkale Zellzahlen der probiotischen Stämme

L. rhamnosus konnte bis auf eine Ausnahme weder in den Kotproben der Kontrolltiere, noch bei den Versuchstieren nachgewiesen werden, sodass geschlossen werden kann, dass diese Spezies einerseits nicht zu den indigenen Mikrobiota des Pferdes gehört (siehe 2.2.7) und andererseits auch nicht in der Lage ist, den Gastrointestinaltrakt des Pferdes zu kolonisieren. Im Vergleich mit zurückliegenden Studien fällt auf, dass sich *L. rhamnosus* DSM 7133 in dieser Eigenschaft von anderen Stämmen der gleichen Spezies unterscheidet, da *L. rhamnosus* GG bei adulten Pferden noch zwei Tage nach Beendigung der Supplementierung im Pferdekot nachweisbar war (Weese, 2003). Dieses Ergebnis liefert ein weiteres Argument für die separate Bewertung jedes potentiell probiotisch wirksamen Stammes und gegen stammübergreifende Schlussfolgerungen. Ein ähnliches Bild zeigt sich

auch bei der Auswertung der Ergebnisse des *in vitro* Versuchs, in dem beide probiotischen Stämme sehr unterschiedlich auf die Inkubation mit den Sterilzentrifugaten reagieren.

Der in diesem Versuch gemessene Mittelwert für die Konzentration von *E. faecium* lag bei lg 5,3 cfu/g. Zuvor konnte gezeigt werden, dass *E. faecium* den überwiegenden Teil der Population von Enterokokken in Kotproben von Pferden ausmacht, die in Größenordnungen von log 1,0-5,0 cfu/g kulturell nachgewiesen wurden (Laukova, 2008). Ein Einfluss der Supplementierung mit dem probiotischen Stamm auf die Konzentration von *E. faecium* in den Kotproben konnte nicht festgestellt werden. Aufgrund der eingesetzten Konzentration des probiotischen Bakteriums (etwa 10⁶ Bakterien je ml Darminhalt) ist davon auszugehen, dass *E. faecium* sich im Gastrointestinaltrakt des Pferdes nicht etablieren kann.

5.1.4 Veränderungen der bakteriellen Biodiversität unter probiotischer Supplementierung

Aus der Literatur können für die mittels PCR-DGGE ermittelte Richness aus Kotproben adulter Pferde Werte zwischen 23 und 41 Banden entnommen werden (Earing, 2012). Ungeachtet methodischer Unterschiede wie Primerwahl, Durchführung der PCR und Analyse der Gele, bewegte sich die Artenvielfalt mit einer Spanne von 16 bis 43 Banden (\bar{x} =31) je Probe in den hier untersuchten Proben etwa im gleichen Rahmen. Die Richness war am Ende beider Versuchsdurchgänge in der Versuchsgruppe am letzten Tag höher, im ersten Durchgang signifikant, im zweiten steht sie einem signifikant geringeren Wert der Kontrollgruppe an Tag 69 als an Tag 42 gegenüber. Daraus lässt sich schließen, dass es unter der Supplementierung offenbar zu einer Zunahme der Artenvielfalt im Verdauungstrakt kommt.

Die Evenness, die die Häufigkeitsverteilung der verschiedenen Bakterien beschreibt, lag an Tag 0, 27 und 69 in den Proben der Kontrolltiere signifikant über der der Versuchstiere. Außerdem unterschieden sich die Werte innerhalb der Gruppen am letzten und ersten Tag des Versuchs, für die Tiere 16-29 zusätzlich im Vergleich der jeweils ersten Tage eines Versuchsdurchgangs. Die Unterschiede zwischen den Gruppen sind ein Hinweis darauf, dass sich durch Supplementierung mit dem Probiotikum die intestinale Mikrobiota derartig ändert, dass es zu einer stärkeren Dominanz bestimmter Bakteriengruppen kommt. Eine solche Entwicklung kann auch scheinbar ungerichtete Veränderungen in den Metabolitgehalten der Kotproben erklären. Eine Aussage über die Bakterienarten, die diese Veränderungen hervorrufen, ist jedoch nicht möglich, da die DGGE selbst keine Spezieszuordnung zulässt. Ähnliche Effekte zeigten sich in einer vorangegangenen Studie an Saugfohlen, die mittels DGGE ermittelte Ähnlichkeit der Mikrobiota zwischen den Tieren verglich. Diese nahm im Versuchsverlauf nur in der Kontrollgruppe, nicht aber in einer mit *L. rhamnosus* und *E. faecium*

supplementierten Versuchsgruppe ab (Günther, 2012). Beide Ergebnisse sprechen für eine Verringerung der Ausgeglichenheit der bakteriellen Besiedlung in den hinteren Darmabschnitten unter Supplementierung mit dem Probiotikum.

Betrachtet man die Ergebnisse bezüglich Richness und Evenness im Zusammenhang, zeichnet sich das Bild einer größeren Artenvielfalt bei gleichzeitiger Zunahme der Dominanz einzelner Bakteriengruppen.

Der Shannon-Index (H) macht eine Aussage über die Ungewissheit des Zutreffens einer Vorhersage über eine zufällige Stichprobe (Shannon, 1948). In Anwendung dieses Prinzips auf ein Ökosystem bedeutet das eine größere die Biodiversität je höher H ist. Da dieser Wert sowohl Richness als auch relative Verteilung berücksichtigt, erlaubt er eine Einordnung der sich einzeln abzeichnenden Entwicklungen sowie eine Standardisierung des Maßes für die Biodiversität.

In beiden Versuchsdurchgängen stehen abnehmende Shannon-Indizes in der Kontrollgruppe zunehmenden Werten in der Versuchsgruppe gegenüber. Diese Entwicklungen sind jedoch außer im ersten Durchgang für die Versuchsgruppe (maximale Veränderung mit 11,2 %) nicht statistisch zu belegen. Akzeptiert man diesen Index als Maß für die Biodiversität, kann geschlussfolgert werden, dass sich die Biodiversität des hier untersuchten Ökosystems unter probiotischer Supplementierung möglicherweise erhöht.

5.1.5 Übergreifende Auswertung des *in vivo* Versuchs mittels Clusteranalyse

Die Clusteranalyse erlaubt die Auswertung über alle erhobenen Parameter eines Experiments. Durch Einbeziehung aller Parameter in die Berechnung und die gewählte Darstellung lassen sich die Tiere in Gruppen unterteilen, die eine ähnliche Entwicklung zeigen, auch wenn die Veränderungen der Einzelparameter mitunter schwach oder scheinbar unschlüssig sind. Anhand der Verknüpfungen (Knotenpunkte) im Dendrogramm ist der Grad der Ähnlichkeit zwischen den „mikrobiellen Mustern“ der einzelnen Kotproben dann ablesbar. Um eine gewisse Übersichtlichkeit für die optische Auswertung zu erhalten, wurden für die beiden Gruppen einzelne Dendrogramme erstellt. Die Berücksichtigung der verschiedenen Parameter und die durch Normalisierung ermöglichte Vergleichbarkeit lassen Entwicklungen, die bei der statistischen Auswertung der einzelnen Parameter eventuell nicht greifbar sind, deutlicher hervortreten.

Im Dendrogramm für die Tiere 1-10 ist das Gruppierungsmuster nicht sofort augenscheinlich. Es ist aber zu erkennen, dass sich einige Tiere (3, 4, 6, 7) relativ unabhängig vom Probennahmezeitpunkt näher beieinander gruppieren als im Vergleich zu anderen Tieren am

gleichen Tag. Daraus kann geschlossen werden, dass die individuellen Unterschiede zwischen den Tieren dieser Gruppe im Vergleich zu dem vom Probiotikum ausgeübten Einfluss auf die untersuchten verdauungsphysiologischen und mikrobiologischen Parameter überwiegen.

Das Dendrogramm der Tiere 16-26 zeigt eine deutlichere Gruppierung nach dem gewählten Farbschema. In dieser Abbildung sind zwei Cluster, in denen sich die Mehrzahl der Werte aus dem ersten Durchgang befindet, erkennbar. In diesem Durchgang waren diese Tiere Kontrolltiere und das Fehlen getrennter Cluster für die beiden Probenahmetage lässt auf ähnliche Untersuchungsergebnisse an diesen Tagen schließen. Im zweiten Versuchsdurchgang erhielten die Tiere das probiotische Präparat. Für diesen Zeitraum ist ein Cluster erkennbar, in dem sich vier von sechs Werten des letzten Probenahmetages gruppieren. Die Werte des 42. Tages zeigen die größten Streuungen. Diese Gruppe zeigt also im Gegensatz zu den Tieren 1-10 eine Gruppierung nach der Behandlung. Da fast alle im Versuch untersuchten Parameter mikrobiologische Grundlagen haben, kann also geschlossen werden, dass das Probiotikum Einfluss auf das Ökosystem des Gastrointestinaltrakts des Pferdes nehmen kann. Allerdings lässt die Auswertung der Clusteranalyse keinen Rückschluss auf Ort oder Art der Einflussnahme zu. Auch aus den undeutlichen Entwicklungen der Einzelparameter war diesbezüglich keine Aussage möglich.

5.2 Auswertung des Inkubationsversuchs zum Überleben der probiotischen Stämme im GIT des Pferdes

Eine entscheidende Grundvoraussetzung für die Wirksamkeit und damit für die Eignung eines probiotischen Präparats ist das Überleben der Darmpassage bei der jeweiligen Tierart. Diese wird durch Schutzmechanismen des Wirtes deutlich erschwert. Die Ergebnisse der qPCR aus den Kotproben des Fütterungsversuchs deuten darauf hin, dass *L. rhamnosus* DSM 7133 den Verdauungstrakt des Pferdes nicht kolonisieren kann. Für *E. faecium* DSM 7134 konnte festgestellt werden, dass sich der probiotische Stamm unter den *in vitro* Bedingungen nicht signifikant vermehrt.

Der Inkubationsversuch wurde durchgeführt, um den Einfluss des Milieus der verschiedenen Abschnitte des Darmtrakts auf die eingesetzten probiotischen Stämme zu überprüfen. Um speziell diese Wechselwirkung unabhängig von der individuell stark unterschiedlichen mikrobiellen Besiedlung untersuchen zu können, wurden im Inkubationsversuch Sterilzentrifugate eingesetzt. Individuelle Einflüsse auf die relevanten Parameter wie Konzentrationen löslicher Stoffe und pH-Wert wurden durch die Verwendung von Mischproben von verschiedenen Tieren unterschiedlicher Altersgruppen möglichst abgefangen. Die

Inkubationszeiten orientierten sich an den physiologischen Passagezeiten. Für den Magen liegt diese bei etwa 2-6 Stunden und ist stark fütterungsabhängig, da eine Entleerung ins Duodenum vor allem bei erneuter Futteraufnahme erfolgt (Van Weyenberg, 2006). Der im Versuch gemessene pH-Wert des eingesetzten Sterilzentrifugats lag unter den aus der Literatur entnommenen Werten von 4,5-5,1 für Ingesta (de Fombelle, 2003). Die pH- Werte der aus Jejunum- und Caecuminhalt gewonnenen Sterilzentrifugate liegen über den entsprechenden Ergebnissen vorheriger Untersuchungen (Jejunum: 6,9-7,2; de Fombelle et al., 2003, Caecum: 6,2 (de Fombelle, 2003)- 7,26 (Respondek, 2008)). Das Auftreten derart hoher pH-Werte ist möglicherweise dadurch zu erklären, dass zwischen Entnahme der Probe und dem Messen des pH- Wertes aufgrund von Transport und anschließender Bearbeitung im Labor (Einwaage, Zentrifugation) etwa zwei Stunden vergangen waren, während derer enzymatische und bakterielle Abbauprozesse fortschreiten. So reagiert beispielsweise das beim Eiweißabbau frei werdende Ammonium basisch. Außerdem entweicht während dieser Zeit in den Proben enthaltenes CO₂. Die Ergebnisse des Inkubationsversuchs legen nahe, dass beide probiotischen Bakterienstämme die Magenpassage überleben, sich möglicherweise aufgrund des sauren Milieus sogar vermehren können. Der niedrige pH-Wert vor allem im Fundus des Magens stellt einen frühen Abwehrmechanismus gegen die Besiedlung des Gastrointestinaltrakts mit Bakterien aus dem Futter dar. Im Gegensatz dazu muss festgestellt werden, dass beide Bakterienstämme empfindlich auf die Inkubation mit Jejunum- und Caecuminhalt reagiert haben. Das kann darauf zurückzuführen sein, dass beide Stämme Milchsäurebakterien sind, die pH-Werte oberhalb von 7,0 generell kaum tolerieren. Diesbezüglich kann jedoch auf die zuvor erwähnten Literaturwerte hingewiesen werden, die bereits Werte in diesem Bereich im Darminhalt gesunder Pferde feststellen konnten. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den Ergebnissen der Clusteranalyse der Tiere 16-26, die sich in Abhängigkeit von der Behandlung mit dem Probiotikum gruppierten. Da in diese Clusteranalyse Ergebnisse eingeflossen sind, die aus Messungen von Parametern der hinteren Darmabschnitte gewonnen wurden, wurde auf eine Beeinflussung des Ökosystems dieser Darmabschnitte geschlossen. Für diesen Widerspruch kommen verschiedene Gründe in Frage, vor allem die eher hohen pH-Werte, die in den Proben gemessen wurden. Auch durch die Fütterung der Tiere wird der pH-Wert in den Verdauungsorganen beeinflusst, die Fütterung der Schlachtpferde war nicht bekannt. Eine Beeinflussung des Ökosystems der vorderen Verdauungsabschnitte beim lebenden Pferd kann die Bedingungen in den folgenden Darmabschnitten maßgeblich beeinflussen, was sich dann auch in den Kotproben zeigen kann, aufgrund des Designs des *in vitro* Versuchs aber in diesem nicht nachvollzogen werden kann.

Darüber hinaus wirken im Dünndarm weitere Mechanismen zur Verhinderung einer bakteriellen Besiedlung. Dazu gehören neben proteolytischen Sekretionsprodukten der Duodenalschleimhaut und des Pankreas auch die im Duodenum zugesetzten Gallensalze, die antimikrobielle Effekte haben. Vor allem im Jejunum und Ileum ist das Mucosa-assoziierte lymphatische Gewebe stark ausgeprägt. Spezifische und unspezifische Immunantworten werden durch antimikrobielle Peptide der Paneth-Zellen, intraepitheliale Lymphozyten und in der Lamina propria enthaltene Immunzellen vermittelt. Derartige Einflüsse sind bei der Auswertung des *in vivo* Versuchs unbedingt zu berücksichtigen und können einen wesentlichen Beitrag dazu leisten, dass die probiotischen Bakterien die Magen-Darm-Passage nicht zu überleben scheinen. Im *in vitro* Versuch werden diese Einflüsse aber größtenteils eliminiert, da sie auf einem Zusammenspiel aus Ingesta und Mucosa beruhen.

Um ein Probiotikum möglichst gegen die Einflüsse körpereigener Schutzmechanismen zu stabilisieren, werden verschiedene technische Verfahren eingesetzt. Dazu gehören neben einer gründlichen Auswahl geeigneter Stämme in späteren Schritten die Konservierung der verabreichten Bakterien durch z. B. Sprühtrocknung oder Extrusion, die Kapsulierung mittels Calciumalginat-Gel, Gellan oder Stärke und die Verabreichung in einem geeigneten Nährmedium. Das im vorliegenden Versuch verwendete Produkt enthielt Süßmolkepulver. Kritisch ist dabei zu beachten, dass sich unter Praxisbedingungen der Einfluss dieses Trägerstoff entlang des Gastrointestinaltrakts aufgrund der Verdauungsprozesse verringern würde, dieser Umstand wurde aber im *in vitro* Versuch nicht berücksichtigt.

Die DNA-Konzentrationen in den Proben der 10^{-3} -Verdünnung waren sehr gering, sodass hier auch bei statistisch signifikanten Unterschieden aufgrund relativ hoher Standardabweichungen eine schlüssige Interpretation kaum möglich ist. Auch in der 1:100-Verdünnung sind große Unterschiede zwischen den Werten aufgrund hoher Standardabweichungen nicht immer statistisch zu belegen. Weiterhin muss bei der Auswertung der Ergebnisse der Vergleich mit der Negativkontrolle berücksichtigt werden. So zeigt *E. faecium* ein nahezu exponentielles Wachstum in physiologischer Kochsalzlösung, während die Konzentration von *L. rhamnosus* ab etwa vier Stunden nach Inkubationsbeginn deutlich einbricht. Die in der nährstofffreien Kochsalzlösung zu beobachtenden Effekte sind auf die im Präparat enthaltenen Trägerstoffe (z. B. Süßmolkepulver, s.o.) zurückzuführen, die *E. faecium* als Substrat dienen können, während *L. rhamnosus* offenbar nicht oder kaum in der Lage war, diese unter den Versuchsbedingungen zu verwerten.

6 Zusammenfassung

Bakterielle Probiotika werden beim Pferd derzeit aus verschiedenen Gründen noch nicht eingesetzt. Neben sehr unterschiedlichen Studienergebnissen hinsichtlich Wirksamkeit und Sicherheit ist die Wahl des Einsatzzweckes als Grund anzuführen. Bisherige Untersuchungen orientieren sich an Studien über Nutztiere, bei denen in der Regel Jungtiere eingesetzt werden. In der vorliegenden Arbeit konnten Ergebnisse an einer bezüglich Rasse, Alter und Haltungsform relativ einheitlichen und vergleichsweise großen Herde erhoben werden. Anhand verdauungsphysiologischer und mikrobieller Parameter aus Kotproben konnten Erkenntnisse über eine Einwirkung des probiotischen Präparats aus *L. rhamnosus* (DSM 7133) und *E. faecium* (DSM 7134) auf das bakterielle Ökosystem der hinteren Darmabschnitte gewonnen werden. Anschließend wurden in einem *in vitro* Versuch abiotische Einflüsse verschiedener Darmabschnitte des Pferdes auf das Überleben der probiotischen Stämme untersucht. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass bei der Supplementierung gesunder Jungpferde mit dem probiotischen Präparat keine Auswirkungen auf klinische Parameter zu erwarten sind. Veränderungen der Konzentrationen fäkaler bakterieller Metabolite sind teilweise zu beobachten, lassen aber keine eindeutige Entwicklung erkennen. Die Ergebnisse der DGGE und der Clusteranalyse deuten auf eine Beeinflussung des intestinalen Ökosystems durch das Probiotikum hin, obwohl das Überleben der Darmpassage beim Pferd für beide Stämme nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden konnte. Besonders die Ergebnisse des *in vitro* Versuchs deuten aber auf einen möglichen Einfluss des Probiotikums in proximalen Darmabschnitten hin. Die Auswertung der Dendrogramme lässt auf große individuelle Unterschiede schließen, deren Einfluss den der probiotischen Supplementierung meist überwiegt.

Diese Studie belegt ähnlich vorangegangenen Untersuchungen, dass die Eigenschaften probiotischer Bakterien stamm- und tierartspezifisch zu untersuchen sind. Außerdem sind die bisherigen Erkenntnisse über das bakterielle Ökosystem im Gastrointestinaltrakt des Pferdes einerseits vergleichsweise lückenhaft, deuten aber andererseits auf große individuelle und fütterungsbedingte Unterschiede hin. Dadurch wird die Übertragbarkeit von Studienergebnissen besonders von Untersuchungen an kleinen Gruppen oder Spezialrassen wiederum in Frage gestellt. Wie auch in der vorliegenden Arbeit können durch eine probiotische Supplementierung gesunder Pferde unterschiedlichen Alters selten eindeutige Aussagen bezüglich einer spezifischen Wirkung gemacht werden. Parallel sollten möglicherweise klinische Studien an Tieren mit den vielfältigen und häufig beim Pferd auftretenden Krankheitsbildern, deren Ursachen in Dysbiosen des Gastrointestinaltrakts liegen können, durchgeführt werden.

Effects of the Application of a Probiotic Preparation containing *Lactobacillus rhamnosus* and *Enterococcus faecium* on intestinal Parameters in Horses

7 Summary

The use of bacterial probiotics for horses has yet to be established in the European Union. Reasons range from different results from clinical trials concerning safety and efficacy to a presently missing area of application. Available studies are similar to previous studies on production animals using mainly young animals. The present study was conducted on a relatively large group of horses comprising 29 comparatively similar horses regarding age, breed and keeping. Parameters of gastrointestinal health were determined on fecal samples to examine the effects of a probiotic supplementation with a preparation of *L. rhamnosus* (DSM 7133) and *E. faecium* (DSM 7134) on the lower gastrointestinal tract of the horse. The following *in vitro* trial tested the survival of both probiotic species under the influence of different segments of the equine gastrointestinal tract. The results show that the supplementation of healthy young horses does not seem to influence clinical parameters. Though there are some changes in fecal bacterial metabolites to be registered, they are not coherent. The results of both the DGGE and cluster analysis indicate an influence of the probiotic supplementation on the intestinal ecosystem though the survival of the gastrointestinal passage could not be proven definitely for either of the probiotic strains. Especially the results of the *in vitro* trial indicate an influence on the proximal parts of the gastrointestinal tract. The interpretation of the dendrograms points to individual differences that seem to outbalance the influence of the probiotic supplementation.

This study proves once again the necessity to examine the characteristics of probiotics specifically to the animal and the strain. Additionally, though knowledge about the intestinal bacterial ecosystem of the horse is still lacking, it points towards great individual and feed-dependent differences. Thus results from studies especially on small groups of animals or on specific breeds are to be interpreted very carefully. Specific effects are rarely to be obtained by supplementation of healthy horses as was the case in the present study. A closer examination of the effects of a probiotic supplementation of horses with gastrointestinal disease that can be caused by intestinal dysbiosis may be advisable.

8 Literaturverzeichnis

<http://www.bvl.bund.de/> (2015). Zulassung von Futtermittelzusatzstoffen. Retrieved 08.10.2015.

Agazzi, Ferroni, Fanelli, Marocco, Invernizzi, Dell'Orto und Savoini (2011). Evaluation of the Effects of Live Yeast Supplementation on Apparent Digestibility of High-Fiber Diet in Mature Horses Using the Acid Insoluble Ash Marker Modified Method. Journal of Equine Veterinary Science 31(1): 13-18.

Al Jassim und Andrews (2009). The bacterial community of the horse gastrointestinal tract and its relation to fermentative acidosis, laminitis, colic, and stomach ulcers. Vet Clin North Am Equine Pract 25(2): 199-215.

Al Jassim, Scott, Trebbin, Trott und Pollitt (2005). The genetic diversity of lactic acid producing bacteria in the equine gastrointestinal tract. FEMS Microbiol Lett 248(1): 75-81.

Alexander (1952). Some functions of the large intestine of the horse. Q J Exp Physiol Cogn Med Sci 37(4): 205-214.

Alloui, Szczurek und Swiatkiewicz (2013). The usefulness of prebiotics and probiotics in modern poultry nutrition: a review. Annals of Animal Science 13(1): 17-32.

Apter und Householder (1996). Weaning and weaning management of foals: A review and some recommendations. Journal of Equine Veterinary Science 16(10): 428-435.

Aziz, Dore, Emmanuel, Guarner und Quigley (2013). Gut microbiota and gastrointestinal health: current concepts and future directions. Neurogastroenterol Motil 25(1): 4-15.

Bailey, Baillon, Rycroft, Harris und Elliott (2003). Identification of Equine Cecal Bacteria Producing Amines in an In Vitro Model of Carbohydrate Overload. Applied and Environmental Microbiology 69(4): 2087-2093.

Bailey und Love (1991). Oral associated bacterial infection in horses: studies on the normal anaerobic flora from the pharyngeal tonsillar surface and its association with lower respiratory tract and paraoral infections. Vet Microbiol 26(4): 367-379.

Baillon, Marshall-Jones und Butterwick (2004). Effects of probiotic Lactobacillus acidophilus strain DSM13241 in healthy adult dogs. Am J Vet Res 65(3): 338-343.

Benyacoub, Czarnecki-Maulden, Cavadini, Sauthier, Anderson, Schiffrin und von der Weid (2003). Supplementation of food with Enterococcus faecium (SF68) stimulates immune functions in young dogs. J Nutr 133(4): 1158-1162.

Berg, Fu, Porter und Kerley (2005). Fructooligosaccharide supplementation in the yearling horse: Effects on fecal pH, microbial content, and volatile fatty acid concentrations. J Anim Sci 83(7): 1549-1553.

Berthelot (1859). Répertoire de chimie Appliqué: 254.

Bezkorovainy (2001). Probiotics: determinants of survival and growth in the gut. The American Journal of Clinical Nutrition 73(2): 399s-405s.

Biagi, Cipollini, Pompei, Zaghini und Matteuzzi (2007). Effect of a Lactobacillus animalis strain on composition and metabolism of the intestinal microflora in adult dogs. Vet Microbiol 124(1-2): 160-165.

Biddle, Black und Blanchard (2013a). An In Vitro Model of the Horse Gut Microbiome Enables Identification of Lactate-Utilizing Bacteria That Differentially Respond to Starch Induction. PLoS One 8(10): e77599.

Biddle, Stewart, Blanchard und Leschine (2013b). Untangling the Genetic Basis of Fibrolytic Specialization by Lachnospiraceae and Ruminococcaceae in Diverse Gut Communities. Diversity 5(3): 627-640.

Blaut und Clavel (2007). Metabolic Diversity of the Intestinal Microbiota: Implications for Health and Disease. J Nutr 137(3): 751S-755S.

Bohmer, Kramer und Roth-Maier (2006). Dietary probiotic supplementation and resulting effects on performance, health status, and microbial characteristics of primiparous sows. J Anim Physiol Anim Nutr (Berl) 90(7-8): 309-315.

Bohnhoff, Drake und Miller (1954). Effect of streptomycin on susceptibility of intestinal tract to experimental Salmonella infection. Proc Soc Exp Biol Med 86(1): 132-137.

Brown (2004). Effects of Saccharomyces cerevisiae on Nutrient Digestibility in Mature Horses fed Diets with high and low Concentrate to Hay Ratios. Faculty of the Graduate College of Oklahoma State University. Manhattan, Kansas, Kansas State University. Master of Science: 75.

Budras und Röck (2004). Atlas der Anatomie des Pferdes: Lehrbuch für Tierärzte und Studierende, Schlütersche.

Busch (1999). Probiotika in der Tierernährung. Bergen, Hrsg.: Arbeitsgemeinschaft für Wirkstoffe in der Tierernährung e.V. (AWT). Agrimedica Buchedition.

Caballero-Franco, Keller, De Simone und Chadee (2007). The VSL#3 probiotic formula induces mucin gene expression and secretion in colonic epithelial cells. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 292(1): G315-322.

Chaucheyras-Durand und Durand (2010). Probiotics in animal nutrition and health. Beneficial Microbes 1(1): 3-9.

Chaucheyras-Durand, Walker und Bach (2008). Effects of active dry yeasts on the rumen microbial ecosystem: Past, present and future. Animal Feed Science and Technology 145(1-4): 5-26.

Cho (2011). Probiotics as a Dietary Additive for Pigs: A Review. Journal of Animal and veterinary Advances 10(16): 2127-2134.

Contreras, Morales, Garcia-Amado, De Vera, Bermudez und Gueneau (2007). Detection of Helicobacter-like DNA in the gastric mucosa of Thoroughbred horses. Lett Appl Microbiol 45(5): 553-557.

Corcionivoschi, Drinceanu, Pop, Stack, Ștef, Julean und Bourke (2010). The Effect of Probiotics on Animal Health. Animal Science and Biotechnologies 43(1).

Costa, Arroyo, Allen-Vercoe, Stämpfli, Kim, Sturgeon und Weese (2012). Comparison of the Fecal Microbiota of Healthy Horses and Horses with Colitis by High Throughput Sequencing of the V3-V5 Region of the 16S rRNA Gene.

da Veiga, Chaucheyras-Durand und Julliand (2005). Comparative study of colon and faeces microbial communities and activities in horses fed a high starch diet.

Daly, Proudman, Duncan, Flint, Dyer und Shirazi-Beechey (2012). Alterations in microbiota and fermentation products in equine large intestine in response to dietary variation and intestinal disease. Br J Nutr 107(7): 989-995.

Daly, Stewart, Flint und Shirazi-Beechey (2001). Bacterial diversity within the equine large intestine as revealed by molecular analysis of cloned 16S rRNA genes. FEMS Microbiology Ecology 38(2-3): 141-151.

Darby (2007). In Vitro Inhibition of growth of Escherichia coli, Salmonella Typhimurium and Clostridia perfringens using Probiotics. Graduate Faculty of The University of Georgia. Athens, Georgia, University of Georgia.

de Fombelle, Julliand, Drogoul und Jacotot (2001). Feeding and Microbial disorders in horses: 1-Effects of an abrupt incorporation of two levels of barley in a hay diet on microbial profile and activities. Journal of Equine Veterinary Science 21(9): 439-445.

de Fombelle, Varloud, Goachet, Jacotot, Philippeau, Drogoul und Julliand (2003). Characterization of the microbial and biochemical profile of the different segments of the digestive tract in horses given two distinct diets. Animal Science 77: 293-304.

de Moura, Saliba, Almeida, Lana, Silva und Rezende (2009). Feed efficiency in Mangalarga Marchador foals fed diet supplemented with probiotics or phytase. Revista Brasileira de Zootecnia 38(6): 1045-1050.

Delcenserie, Martel, Lamoureux, Amiot, Boutin und Roy (2008). Immunomodulatory effects of probiotics in the intestinal tract. Curr Issues Mol Biol 10(1-2): 37-54.

Desrochers, Dolente, Roy, Boston und Carlisle (2005). Efficacy of Saccharomyces boulardii for treatment of horses with acute Enterocolitis. Journal of the American Veterinary Medical Association 227(6).

Dongarrà, Rizzello, Muccio, Fries, Cascio, Bonaccorsi und Ferlazzo (2013). Mucosal Immunology and Probiotics. Current Allergy and Asthma Reports 13(1): 19-26.

Dougal, Harris, Edwards, Pachebat, Blackmore, Worgan und Newbold (2012). A comparison of the microbiome and the metabolome of different regions of the equine hindgut. FEMS Microbiology Ecology: n/a-n/a.

Dougal, de la Fuente, Harris, Girdwood, Pinloche, Geor, Nielsen, Schott, Elzinga und Newbold (2014). Characterisation of the Faecal Bacterial Community in Adult and Elderly Horses Fed a High Fibre, High Oil or High Starch Diet Using 454 Pyrosequencing. Plos One 9(2). DOI: 10.1371/journal.pone.0087424.

Drogoul, Poncet und Tisserand (2000). Feeding ground and pelleted hay rather than chopped hay to ponies. 1. Consequences for in vivo digestibility and rate of passage of digesta. Animal Feed Science and Technology 87(1/2): 117-130.

Dunne (2001). Adaptation of bacteria to the intestinal niche: probiotics and gut disorder. Inflamm Bowel Dis 7(2): 136-145.

Earing (2012). Bacterial Colonization of the Equine Gut; Comparison of Mare and Foal Pairs by PCR-DGGE. Advances in Microbiology 02(02): 79-86.

EFSA (2009). Safety and efficacy of the product ColiCure (Escherichia coli) as a feed additive for horses. EFSA Journal 7(3).

Endo, Futagawa-Endo und Dicks (2009). Lactobacillus and Bifidobacterium diversity in horse feces, revealed by PCR-DGGE. Curr Microbiol 59(6): 651-655.

Endo, Okada und Morita (2007). Molecular profiling of Lactobacillus, Streptococcus, and Bifidobacterium species in feces of active racehorses. Journal of General and Applied Microbiology 53: 191-200.

European Union (2012). Register of Feed Additives. Edition 145.

Fernandes, Kittelmann, Rogers, Gee, Bolwell, Bermingham und Thomas (2014). Faecal Microbiota of Forage-Fed Horses in New Zealand and the Population Dynamics of Microbial Communities following Dietary Change. Plos One 9(11). DOI: 10.1371/journal.pone.0112846.

Fischer und Lerman (1979). Length-independent separation of DNA restriction fragments in two-dimensional gel electrophoresis. Cell 16(1): 191-200.

Flynn, van Sinderen, Thornton, Holo, Nes und Collins (2002). Characterization of the genetic locus responsible for the production of ABP-118, a novel bacteriocin produced by the probiotic bacterium Lactobacillus salivarius subsp. salivarius UCC118. Microbiology 148(Pt 4): 973-984.

Fraga, Perelmuter, Delucchi, Cidade und Zunino (2008). Vaginal lactic acid bacteria in the mare: evaluation of the probiotic potential of native Lactobacillus spp. and Enterococcus spp. strains. Antonie Van Leeuwenhoek 93(1-2): 71-78.

Freter (1955). The Fatal Enteric Cholera Infection in the Guinea Pig, Achieved by Inhibition of Normal Enteric Flora. The Journal of Infectious Diseases 97(1): 57-65.

Frey, Angert und Pell (2006). Assessment of biases associated with profiling simple, model communities using terminal-restriction fragment length polymorphism-based analyses. J Microbiol Methods 67(1): 9-19.

Fujisawa, Itoh und Mitsuoka (1993). Lactobacilli in the alimentary tract of horses. Bifidobacteria and Microflora 12(2): 87-90.

Fuller (1989). Probiotics in man and animals. Journal of Applied Bacteriology 66: 365-378.

Fuller (1992). Probiotics: the scientific basis, Chapman & Hall.

Fuller, Barrow und Brooker (1978). Bacteria associated with the gastric epithelium of neonatal pigs. Appl Environ Microbiol 35(3): 582-591.

Garner, Moore, Johnson, Clark, Amend, Tritschler, Coffmann, Sprouse, Hutcheson und Salem (1978). Changes in the caecal flora associated with the onset of laminitis. Equine Veterinary Journal 10(4): 249-252.

Garrett, Brown und Poxton (2002). A comparative study of the intestinal microbiota of healthy horses and those suffering from equine grass sickness. Veterinary Microbiology 87: 81-88.

GfE (2014). Empfehlungen zur Energie- und Nährstoffversorgung von Pferden. DLG Verlag, Frankfurt.

Glade (1991a). Dietary yeast culture supplementation of mares during late gestation and early lactation Effects on dietary nutrient digestibilities and fecal nitrogen partitioning. Journal of Equine Veterinary Science 11(1): 10-16.

Glade (1991b). Effects of dietary yeast culture supplementation of lactating mares on the digestibility and retention of the nutrients delivered to nursing foals via milk. Journal of Equine Veterinary Science 11(6): 323-329.

Glade und Sist (1990). Supplemental yeast culture alters the plasma amino acid profiles of nursing and weanling horses. Journal of Equine Veterinary Science 10(5): 369-379.

Goachet, Berger und Julliand (2012). Effect of Vivaflor 03 on the colonic ecosystem of horses fed a high forage diet. Forages and grazing in horse nutrition. Saastamoinen, Fradinho, Santos and Miraglia, Wageningen Academic Publishers. 132: 263-266.

Goodson, Tyznik, Cline und Dehority (1988). Effects of an abrupt diet change from hay to concentrate on microbial numbers and physical environment in the cecum of the pony. Applied and Environmental Microbiology 54(8): 1946-1950.

Greiß (1996). Die Zusammensetzung der Zäkalfloora des Pferdes und ihre mögliche Bedeutung für die Entstehung der Tzphlocolitis. Pferdeheilkunde 12(5): 725-736.

Guarner und Malagelada (2003). Gut flora in health and disease. The Lancet 361(9356): 512-519.

Guedes, Gonçalves, Rodrigues und Dias-da-Silva (2008). Effects of a *Saccharomyces cerevisiae* yeast on ruminal fermentation and fibre degradation of maize silages in cows. Animal Feed Science and Technology 145(1–4): 27-40.

Günther, Ströbel, Romanowski, Urubschurov, Büsing, Souffrant, . . . Zeyner (2012). Effects of probiotic strains of *Enterococcus faecium* and *Lactobacillus rhamnosus* on diarrhoea patterns and the faecal microbiome of suckling foals. Proceedings of the Society of Nutrition Physiology 21: 134.

Hall, Jackson, Baker und Lowry (1990). Influence of yeast culture supplementation on ration digestion by horses. Journal of Equine Veterinary Science 10(2): 130-134.

Herstad, Nesheim, L'Abée-Lund, Larsen und Skancke (2010). Effects of a probiotic intervention in acute canine gastroenteritis--a controlled clinical trial. J Small Anim Pract 51(1): 34-38.

Higgins, Higgins, Wolfenden, Henderson, Torres-Rodriguez, Tellez und Hargis (2008). Evaluation of a *Lactobacillus*-based probiotic culture for the reduction of *Salmonella enteritidis* in neonatal broiler chicks. Poult Sci 87(1): 27-31.

Hooper, Midtvedt und Gordon (2002). How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. Annu Rev Nutr 22: 283-307.

Hoquet, Higgins, Lessard, Vrins und Marcoux (1985). Comparison of the bacterial and fungal flora in the pharynx of normal horses and horses affected with pharyngitis. Can Vet J 26(11): 342-346.

Hudson und Merritt (2008). Equine gastrointestinal motility research: where we are and where we need to go. Equine Vet J 40(4): 422-428.

Husted, Jensen, Olsen und Molbak (2010). Examination of equine glandular stomach lesions for bacteria, including *Helicobacter* spp by fluorescence in situ hybridisation. BMC Microbiol 10: 84.

Jensen, Brokner, Knudsen und Tauson (2010). A comparative study of the apparent total tract digestibility of carbohydrates in Icelandic and Danish warmblood horses fed two different haylages and a concentrate consisting of sugar beet pulp and black oats. Arch Anim Nutr 64(5): 343-356.

Jouany (2006). Optimizing rumen functions in the close-up transition period and early lactation to drive dry matter intake and energy balance in cows. Anim Reprod Sci 96(3-4): 250-264.

Jouany, Gobert, Medina, Bertin und Julliard (2008). Effect of live yeast culture supplementation on apparent digestibility and rate of passage in horses fed a high-fiber or high-starch diet. J Anim Sci 86(2): 339-347.

Jouany, Medina, Bertin und Julliand (2009). Effect of live yeast culture supplementation on hindgut microbial communities and their polysaccharidase and glycoside hydrolase activities in horses fed a high-fiber or high-starch diet. J Anim Sci 87(9): 2844-2852.

Julliand (2006). Pre-and Probiotics: Potentials for Equine Practice Proceedings of the 3rd European Equine Nutrition & Health Congress Ghent University, Merelbeke, Belgium.

Julliand, de Fombelle, Drogoul und Jacotot (2001). Feeding and microbial disorders in horses: Part 3—Effects of three hay:grain ratios on microbial profile and activities. Journal of Equine Veterinary Science 21(11): 543-546.

Julliand, DeVaux, Millet und Fontz (1999). Identification of Ruminococcus flavefaciens as the Predominant Cellulolytic Bacterial Species of the Equine Cecum. Applied and Environmental Microbiology 65(8): 3738-3741.

Julliand, Prevost und Tisserand (1993). Preliminary study of the cecal bacterial flora in the pony: quantification and diet effect. Annales de Zootechnie 42(2).

Kern, Slyter, Leffel, Weaver und Oltjen (1974). Ponies vs. Steers: Microbial and Chemical Characteristics of Intestinal Ingesta. J Anim Sci 38(3): 559-564.

Kirsch (2010). Die Wirkung organischer Säuren als Futterzusatzstoff auf Nährstoffumsatz und Bakterienpopulationen im Verdauungstrakt von Absetzferkeln. Berlin.

Kobayashi, Oethinger, Tuohy, Hall und Bauer (2009). Improving clinical significance of PCR: use of propidium monoazide to distinguish viable from dead Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis. J Orthop Res 27(9): 1243-1247.

Kobayashi, Oethinger, Tuohy, Hall und Bauer (2010). Distinction between intact and antibiotic-inactivated bacteria by real-time PCR after treatment with propidium monoazide. J Orthop Res 28(9): 1245-1251.

Koike (2000). Fecal Bacteria in Hokkaido Native Horses as Characterized by Microscopic Enumeration and Competitive Polymerase Chain Reaction Assays. Journal of equine veterinary science 11(2): 45-50.

Kollarczik (1992). Auswirkungen der Rationszusammensetzung auf das Keimspektrum im Jejunum von Pferden.

Konieczna, Akdis, Quigley, Shanahan und O'Mahony (2012). Portrait of an immunoregulatory bifidobacterium. Gut Microbes 3(3): 261-266.

Kuhl, Winterhoff, Wulf, Schweigert, Schwendenwein, Bruckmaier, . . . Aurich (2011). Changes in faecal bacteria and metabolic parameters in foals during the first six weeks of life. Vet Microbiol 151(3-4): 321-328.

Kwak und Peterson (2007). Community Indices, Parameters, and Comparisons. Analysis and interpretation of freshwater fisheries data. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland.: 677-763

Lattimer, Cooper, Freeman und Lalman (2007). Effect of yeast culture on in vitro fermentation of a high-concentrate or high-fiber diet using equine fecal inoculum in a Daisy II incubator. J Anim Sci 85(10): 2484-2491.

Laukova, Simonova, Strompfova, Styriak, Ouwehand und Varady (2008). Potential of enterococci isolated from horses. Anaerobe 14(4): 234-236.

Lefebvre (2011). Literature Review – Probiotics. Putting Knowledge into Practice. Team, Banfield Pet Hospital. August 2011: 12.

Lesmeister, Heinrichs und Gabler (2004). Effects of supplemental yeast (Saccharomyces cerevisiae) culture on rumen development, growth characteristics, and blood parameters in neonatal dairy calves. J Dairy Sci 87(6): 1832-1839.

Lin und Stahl (1995). Taxon-specific probes for the cellulolytic genus Fibrobacter reveal abundant and novel equine-associated populations. Appl Environ Microbiol 61(4): 1348-1351.

Luo, Lin und Guo (2010). Method to detect only viable cells in microbial ecology. Appl Microbiol Biotechnol 86(1): 377-384.

Lwin und Matsui (2014). Comparative analysis of the methanogen diversity in horse and pony by using mcrA gene and archaeal 16s rRNA gene clone libraries. Archaea 2014: 483574.

Macfarlane und Macfarlane (2012). Bacteria, colonic fermentation, and gastrointestinal health. J AOAC Int 95(1): 50-60.

Mack, Michail, Wei, McDougall und Hollingsworth (1999). Probiotics inhibit enteropathogenic E. coli adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression. Am J Physiol 276(4 Pt 1): G941-950.

Mackenthun, Coenen und Vervuert (2013). Effects of Saccharomyces cerevisiae supplementation on apparent total tract digestibility of nutrients and fermentation profile in healthy horses. J Anim Physiol Anim Nutr (Berl) 97 Suppl 1: 115-120.

Mackie, Sghir und Gaskins (1999). Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. The American Journal of Clinical Nutrition 69(5): 1035s-1045s.

Mackie und Wilkins (1988). Enumeration of anaerobic bacterial microflora of the equine gastrointestinal tract. Applied and Environmental Microbiology 54(9): 2155-2160.

Maczulak, Dawson und Baker (1985). Nitrogen Utilization in Bacterial Isolates from the Equine Cecum. Applied and Environmental Microbiology December 1985: 1439-1443.

Malinowski, Hallquist, Helyar, Sherman und Scanes (1990). Effect of different separation protocols between mares and foals on plasma cortisol and cell-mediated immune response. Journal of Equine Veterinary Science 10(5): 363-368.

Manninen, Rinkinen, Beasley und Saris (2006). Alteration of the canine small-intestinal lactic acid bacterium microbiota by feeding of potential probiotics. Appl Environ Microbiol 72(10): 6539-6543.

Marden, Julien, Monteils, Auclair, Moncoulon und Bayourthe (2008). How does live yeast differ from sodium bicarbonate to stabilize ruminal pH in high-yielding dairy cows? J Dairy Sci 91(9): 3528-3535.

Medina, Girard, Jacotot und Julliand (2002). Effect of a preparation of Saccharomyces cerevisiae on microbial profiles and fermentation patterns in the large intestine of horses fed a high fiber or a high starch diet. Journal of Animal Science 80: 2600-2609.

Meyer und Coenen (2002). Pferdefütterung, Parey.

Meyer, Kacza, Schnapper, Verspohl, Hornickel und Seeger (2010). A first report on the microbial colonisation of the equine oesophagus. Ann Anat 192(1): 42-51.

Milnovich, Burrell, Pollitt, Klieve, Blackall, Ouwerkerk, . . . Trott (2008). Microbial ecology of the equine hindgut during oligofructose-induced laminitis. ISME J 2(11): 1089-1100.

Moore und Dehority (1993). Effects of diet and hindgut defaunation on diet digestibility and microbial concentrations in the cecum and colon of the horse. J Anim Sci 71(12): 3350-3358.

Morishita, Aye, Harr, Cobb und Clifford (1997). Evaluation of an avian-specific probiotic to reduce the colonization and shedding of Campylobacter jejuni in broilers. Avian Dis 41(4): 850-855.

Morita, Nakano, Shimazu, Toh, Nakajima, Nagayama, . . . Murakami (2009). Lactobacillus hayakitensis, L. equigenerosi and L. equi, predominant lactobacilli in the intestinal flora of healthy thoroughbreds. Anim Sci J 80(3): 339-346.

Muhonen, Julliand, Lindberg, Bertilsson und Jansson (2009). Effects on the equine colon ecosystem of grass silage and haylage diets after an abrupt change from hay. J Anim Sci 87(7): 2291-2298.

Müller, von Rosen und Udén (2008). Effect of forage conservation method on microbial flora and fermentation pattern in forage and in equine colon and faeces. Livestock Science 119(1-3): 116-128.

Murguía-Peniche, Mihatsch, Zegarra, Supapannachart, Ding und Neu (2013). Intestinal Mucosal Defense System, Part 2. Probiotics and Prebiotics. The Journal of Pediatrics 162(3, Supplement): S64-S71.

Myers, Fischer, Lerman und Maniatis (1985). Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. Nucleic Acids Res 13(9): 3131-3145.

Ng, Hart, Kamm, Stagg und Knight (2009). Mechanisms of action of probiotics: recent advances. Inflamm Bowel Dis 15(2): 300-310.

Nickel, Seiferle und Frewein (2004). Eingeweide. Lehrbuch der Anatomie der Haustiere 2, Parey im MVS.

Nurmi und Rantala (1973). New Aspects of Salmonella Infection in Broiler Production. Nature 241(5386): 210-211.

O' Donnell, Harris, Jeffery, Claesson, Younge, O' Toole und Ross (2013). The core faecal bacterial microbiome of Irish Thoroughbred racehorses. Letters in Applied Microbiology 57(6): 492-501.

O'Mahony, O'Callaghan, McCarthy, Shilling, Scully, Sibartie, . . . Shanahan (2006). Differential cytokine response from dendritic cells to commensal and pathogenic bacteria in different lymphoid compartments in humans. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 290(4): G839-845.

O'Mahony, Scully, Murphy, O'Brien,... Lyons (2008). Commensal-induced regulatory T cells mediate protection against pathogen-stimulated NF-kappaB activation. PLoS Pathog 4(8): e1000112.

Ohashi, Tokunaga, Taketomo und Ushida (2007). Stimulation of indigenous lactobacilli by fermented milk prepared with probiotic bacterium, Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus strain 2038, in the pigs. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo) 53(1): 82-86.

Ohashi und Ushida (2009). Health-beneficial effects of probiotics: Its mode of action. Animal Science Journal 80(4): 361-371.

Ölschläger (2007). Molekularbiologische und enzymatische Untersuchungen zum Einfluss von Partikellänge und Konzentratanteil auf Parameter der fibrolytischen Pansenverdauung, Cuvillier.

Patel und Lin (2010). Developmental biology of gut-probiotic interaction. Gut Microbes 1(3): 186-195.

Perkins, den Bakker, Burton, Erb, McDonough, . . . Simpson (2012). Equine stomachs harbor an abundant and diverse mucosal microbiota. Appl Environ Microbiol 78(8): 2522-2532.

Qi, Nelson, Daugherty, Nelson, Hance, Morrison und Forsberg (2005). Novel molecular features of the fibrolytic intestinal bacterium Fibrobacter intestinalis not shared with Fibrobacter succinogenes as determined by suppressive subtractive hybridization. J Bacteriol 187(11): 3739-3751.

Radicke (1990). Untersuchungen zur Verdauung von Mais- und Haferstärke beim Pferd. Dissertation. Tierärztliche Hochschule Hannover.

Rechkemmer, Rönnau und Engelhardt (1988). Fermentation of polysaccharides and absorption of short chain fatty acids in the mammalian hindgut. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology 90(4): 563-568.

Reid und Friendship (2002). Alternatives to Antibiotic use: Probiotics for the gut. Animal Biotechnology 13(1): 97-112.

Respondek, Goachet und Julliand (2008). Effects of dietary short-chain fructooligosaccharides on the intestinal microflora of horses subjected to a sudden change in diet. J Anim Sci 86(2): 316-323.

Rettger und Cheplin (1921). A treatise on the transformation of the intestinal flora: with special reference to the implantation of Bacillus acidophilus, Yale University Press.

Riedel, Foata, Philippe, Adolfsson, Eikmanns und Blum (2006). Anti-inflammatory effects of bifidobacteria by inhibition of LPS-induced NF-kappaB activation. World J Gastroenterol 12(23): 3729-3735.

Rinttilä, Kassinen, Malinen, Krogius und Palva (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.

Rombeau, Kripke und Settle (1990). Short-Chain Fatty Acids. Dietary Fiber. Kritchevsky, Bonfield and Anderson, Springer US: 317-337.

Rosenfeld und Austbo (2009). Effect of type of grain and feed processing on gastrointestinal retention times in horses. J Anim Sci 87(12): 3991-3996.

Salminen und Gueimonde (2004). Human Studies on Probiotics: What Is Scientifically Proven. Journal of Food Science 69(5): M137-M140.

Santos, Rodrigues, Bessa, Ferreira und Martin-Rosset (2011). Understanding the equine cecum-colon ecosystem: current knowledge and future perspectives. animal 5(01): 48-56.

Sauter und Blum (2003). Probiotika in der Veterinärmedizin: Eine Übersicht. Schweiz Arch Tierheilkd 145(11): 507-518.

Schneitz (2005). Competitive exclusion in poultry—30 years of research. Food Control 16(8): 657-667.

Schoster, Arroyo, Staempfli, Shewen und Weese (2012). Presence and molecular characterization of Clostridium difficile and Clostridium perfringens in intestinal compartments of healthy horses. BMC Vet Res 8(1): 94.

Schoster, Arroyo, Staempfli und Weese (2013). Comparison of microbial populations in the small intestine, large intestine and feces of healthy horses using terminal restriction fragment length polymorphism. BMC Research Notes 6(91).

Sejrsen, Hvelplund und Nielsen (2006). Ruminant Physiology: Digestion, Metabolism and Impact of Nutrition on Gene Expression, Immunology and Stress, Wageningen Academic Publishers.

Shannon (1948). A mathematical theory of communication. Bell System Technical Journal 27: 379–423.

Shepherd, Swecker, Jensen und Ponder (2012). Characterization of the fecal bacteria communities of forage-fed horses by pyrosequencing of 16S rRNA V4 gene amplicons. FEMS Microbiol Lett 326(1): 62-68.

Simon (2005). Mikroorganismen als Futterzusatzstoffe: Probiotika- Wirksamkeit und Wirkungsweise. 4. BOKU Symposium Tierernährung; Tierernährung ohne antibiotische Leistungsförderer, Wien.

Socol, de Souza Vandenberghe, Spier, Medeiros, Yamaguishi C., De Dea Lindner, . . . Thomaz-Socol (2010). The Potential of Probiotics: A Review. Food Technol. Biotechnol. 48(4): 413-434.

Stella, Paratte, Valnegri, Cigalino, Soncini, Chevaux, . . . Savoini (2007). Effect of administration of live Saccharomyces cerevisiae on milk production, milk composition, blood metabolites, and faecal flora in early lactating dairy goats. Small Ruminant Research 67(1): 7-13.

Stephens, Loneragan, Karunasena und Brashears (2007). Reduction of Escherichia coli O157 and Salmonella in feces and on hides of feedlot cattle using various doses of a direct-fed microbial. J Food Prot 70(10): 2386-2391.

Sternberg (1998). Isolation of Actinobacillus equuli from the oral cavity of healthy horses and comparison of isolates by restriction enzyme digestion and Pulsed-Field Gel Electrophoresis. Vet Microbiol 59(2): 147-156.

Sul, Kim, Kim und Kim (2007). Rapid identification of Lactobacillus and Bifidobacterium in probiotic products using multiplex PCR. J Microbiol Biotechnol 17(3): 490-495.

Sutton, Preston und Love (2011). Application of the lactose 13C-ureide breath test for measurement of equine oro-caecal transit time. Equine Vet J Suppl(39): 49-55.

Swanson (2002). Effects of Diet and Probiotic Supplementation on Stress during Weaning in Thoroughbred Foals. Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University. Blacksburg, Virginia, Virginia Polytechnic Institute and State University.

Swyers, Burk, Hartsock, Ungerfeld und Shelton (2008). Effects of direct-fed microbial supplementation on digestibility and fermentation end-products in horses fed low- and high-starch concentrates. J Anim Sci 86(10): 2596-2608.

Sykes und Jokasilo (2015). Rethinking equine gastric ulcer syndrome: Part 3-Equine glandular gastric ulcer syndrome (EGGUS). Equine Veterinary Education 27(7): 372-375.

Taber, Oloya, Doetkott, Bauer, Gibbs und Khaitsa (2008). Comparative effect of direct-fed microbials on fecal shedding of Escherichia coli O157:H7 and Salmonella in naturally infected feedlot cattle. J Food Prot 71(3): 539-544.

Takahashi, Egawa, Simojo, Tsukahara und Ushida (2007). Oral administration of Lactobacillus plantarum strain Lq80 to weaning piglets stimulates the growth of indigenous lactobacilli to modify the lactobacillal population. The Journal of General and Applied Microbiology 53(6): 325-332.

Taras, Vahjen, Macha und Simon (2005). Response of performance characteristics and fecal consistency to long-lasting dietary supplementation with the probiotic strain Bacillus cereus var. toyoi to sows and piglets. Arch Anim Nutr 59(6): 405-417.

Vaarala (2003). Immunological effects of probiotics with special reference to lactobacilli. Clinical & Experimental Allergy 33(12): 1634-1640.

Van Baarlen, Troost, van der Meer, Hooiveld, Boekschoten, Brummer und Kleerebezem (2011). Human mucosal in vivo transcriptome responses to three lactobacilli indicate how probiotics may modulate human cellular pathways. Proc Natl Acad Sci U S A 108 Suppl 1: 4562-4569.

Van Baarlen, Troost, van Hemert, van der Meer, de Vos, de Groot, . . . Kleerebezem (2009). Differential NF-kappaB pathways induction by Lactobacillus plantarum in the duodenum of healthy humans correlating with immune tolerance. Proc Natl Acad Sci U S A 106(7): 2371-2376.

Van Baarlen, Wells und Kleerebezem (2013). Regulation of intestinal homeostasis and immunity with probiotic lactobacilli. Trends in Immunology 34(5): 208-215.

Van Eps und Pollitt (2006). Equine laminitis induced with oligofructose. Equine Veterinary Journal 38(3): 203-208.

Van Weyenberg, Sales und Janssens (2006). Passage rate of digesta through the equine gastrointestinal tract: A review. Livestock Science 99(1): 3-12.

Varloud, Fonty, Roussel, Guyonvarch und Julliand (2007). Postprandial kinetics of some biotic and abiotic characteristics of the gastric ecosystem of horses fed a pelleted concentrate meal. J Anim Sci 85(10): 2508-2516.

Vicente, Wolfenden, Torres-Rodriguez, Higgins, Tellez und Hargis (2007). Effect of a Lactobacillus Species-Based Probiotic and Dietary Lactose Prebiotic on Turkey Poultry Performance With or Without Salmonella Enteritidis Challenge. The Journal of Applied Poultry Research 16(3): 361-364.

Ward, Alinovi, Couëttil, Glickman und Wu (2004). A randomized clinical trial using probiotics to prevent Salmonella fecal shedding in hospitalized horses. Journal of Equine Veterinary Science 24(6): 242-247.

Weaver, Entry und Graves (2005). Numbers of fecal streptococci and Escherichia coli in fresh and dry cattle, horse, and sheep manure. Can J Microbiol 51(10): 847-851.

Weese, Anderson, Lowe, Penno, Costa, Button und Goth (2004). Screening of the equine intestinal microflora for potential probiotic organisms. Equine Veterinary Journal 36(4): 351-355.

Weese, E.C.Anderson, Lowe, J. und Monteith (2003). Preliminary investigation of the probiotic potential of Lactobacillus rhamnosus strain GG in horses: fecal recovery following oral administration and safety. Canadian Veterinary Journal 44.

Weese und Rousseau (2005). Evaluation of Lactobacillus pentosus WE7 for prevention of diarrhea in neonatal foals. Journal of the American Veterinary Medical Association 226(12).

Wells (2011). Immunomodulatory mechanisms of lactobacilli. Microbial Cell Factories 10(Suppl 1): S17.

Willing, VÖRÖS, Roos, Jones, Jansson und Lindberg (2009). Changes in faecal bacteria associated with concentrate and forage-only diets fed to horses in training. Equine Veterinary Journal 41(9): 908-914.

Wolter, Durix, Letourneau, Carcelen und Henry (1983). Experimental Reproduction of Lactic-Acidosis in the Pony. Annales De Recherches Veterinaires 14(3): 195-206.

Woodward, Holcombe, Steibel, Staniar, Colvin und Trottier (2010). Cationic and neutral amino acid transporter transcript abundances are differentially expressed in the equine intestinal tract. J Anim Sci 88(3): 1028-1033.

Yamano, Koike, Kobayashi und Hata (2008). Phylogenetic analysis of hindgut microbiota in Hokkaido native horses compared to light horses. Animal Science Journal 79(2): 234-242.

Yan, Cao, Cover, Whitehead, Washington und Polk (2007). Soluble proteins produced by probiotic bacteria regulate intestinal epithelial cell survival and growth. Gastroenterology 132(2): 562-575.

Yuki, Shimazaki, Kushiro, Watanabe, Uchida, Yuyama und Morotomi (2000). Colonization of the stratified squamous epithelium of the nonsecreting area of horse stomach by lactobacilli. Appl Environ Microbiol 66(11): 5030-5034.

Yuyama (2004). Evaluation of a Host-Specific Lactobacillus Probiotic in Neonatal Foals. Journal of Applied Research in Veterinary-Medicine 2: 26-33.

Zentek (2008). Probiotika beim Pferd, Hilfe oder Hoffnung? Pferdeheilkunde 24(4): 524-528.

Zeyner (2003). Physiology of the digestion in ileum and caecum in the horse. Pferdeheilkunde 19(4): 391-396.

Zeyner, Geissler und Dittrich (2004). Effects of hay intake and feeding sequence on variables in faeces and faecal water (dry matter, pH value, organic acids, ammonia, buffering capacity) of horses. J Anim Physiol Anim Nutr (Berl) 88(1-2): 7-19.

9 Danksagung

Mein Dank gilt vor allem Prof. Dr. Zentek für seine geduldige, zuverlässige und umfassende Betreuung und stets sachdienliche Ermutigung.

Ebenso gilt mein Dank Dr. Vahjen für die praktische und analytische Förderung der Arbeit.

Dank für das in meine Person gesetzte Vertrauen und die großzügige finanzielle Förderung über 18 Monate gilt der H. W. Schaumann Stiftung zur Förderung der Tier- und Agrarwissenschaften.

Für die unschätzbare Hilfe und Behandlung anfänglich beinahe ängstlicher Laborscheu danke ich vor allem Frau Eitingen, ebenso aber allen anderen Labormitarbeitern des Instituts für Tierernährung der FU Berlin.

Bei meiner Familie und all meinen Lieben bedanke ich mich für Geduld und bedingungslose Unterstützung.

10 Publikationsverzeichnis

Teile des Inhalts der vorliegenden Arbeit wurden vor Drucklegung wie folgt veröffentlicht:

Saalschmidt, Vahjen, Zentek; 2015; Die Mikrobiota im Gastrointestinaltrakt von adulten Pferden und Einflüsse der Fütterung; Übersichten Tierernährung; 42(2) — S. 141–164, ISSN: 0303-6340

Saalschmidt, Vahjen, Wulf, Zentek; 2014; Untersuchungen über den Einsatz eines Probiotikums aus *E. faecium* und *L. rhamnosus* bei Pferden; Poster / Präsentation n° 87; 68. Tagung der Gesellschaft für Ernährungsphysiologie 18. – 20. März 2014; Göttingen

Selbständigkeitserklärung:

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