

2. Literaturübersicht

2.1 NSP und NSP-hydrolysierende Enzyme

2.1.1 Definition der NSP

Broilerfutter enthält auf Grund der Verwendung von Getreide als Hauptkomponente hohe Anteile an Kohlenhydraten. Neben niedermolekularen Zuckern (Mono- und Disaccharide) und dem pflanzlichen Speicherkohlenhydrat Stärke kommen komplexe Gerüstsubstanzen der Zellwand in pflanzlichem Material vor. Diese hochmolekularen Kohlenhydrate werden der Gruppe der NSP zugeordnet. Entsprechend dieser weit gefassten Zuordnung ist diese Stoffgruppe eher heterogen. Gemeinsam ist ihnen jedoch, dass ein Abbau durch endogene Enzyme im Verdauungstrakt höherer Lebewesen nicht erfolgt, eine mikrobielle Hydrolyse aber möglich ist. Tabelle 1 stellt eine Einteilungsmöglichkeit einiger wichtiger Polysaccharide nach ihrer chemischen Struktur dar.

Tabelle 1: Einteilungsmöglichkeit einiger wichtiger Polysaccharide

Homoglycane		Heteroglycane
Pentosane	Hexosane	
	α -Glucane	β -Glucane
Xylan (1,4- β -Xylose) Arabinan (1,5-1,3- α -Arabinose)	Stärke 20 % Amylose (1,4- α -Glucose) 80 % Amylopektin (1,4- α -1,6- α -Glucose) Glycogen (1,4- α -1,6- α -Glucose, stärker verzweigt als Amylopektin)	Cellulose (1,4- β -Glucose) 1,3-1,4-β-Glucane (1,3-1,4- β -Glucose)
		Arabinoxylane Hauptkette: 1,4- β -Xylose Seitenketten (Weizen): 1,2- α -Xylose 1,3- α -Arabinose Pectine Poly-D-Galacturonsäure mit kurzen Zucker-Seitenketten Proteoglycane (Mucopolysaccharide)

Eine weitere Möglichkeit zur Einteilung der Kohlenhydrate besteht in der Zuordnung in Stoffgruppen, die nicht auf der chemischen Struktur dieser Moleküle, sondern den analytischen Methoden zu ihrem Nachweis beruht. Tabelle 2 führt solche Einteilungsmöglichkeiten auf.

Eine besondere Bedeutung kommt in der Broilerernährung den Arabinoxylanen (Pentosane) und 1,3-1,4- β -Glucanen (im weiteren als β -Glucane bezeichnet) zu. Auf ihre physikochemischen Eigenschaften, ihren Einfluss auf verdauungsphysiologische Parameter und den Abbau dieser Substanzen durch mikrobielle Enzyme wird im folgenden eingegangen. Neben diesen beiden Vertretern und weiteren Glucanen werden außerdem Cellulose, Mannane und Galactane, sowie Xyloglucane und Pektine den NSP zugeordnet.

Tabelle 2: Einteilung von Kohlenhydraten nach analytischer Methodik

Begriff	Analytik	Bestimmung	zugeordnete Kohlenhydrate
Rohfaser	Weender Analyse	in verdünnten Säuren und Laugen unlöslicher fett- und aschefreier organischer Rückstand	unlösliche Anteile der Cellulose und Hemicellulosen, Lignin und weitere Zellwandbestandteile
N-freie Extraktstoffe	Weender Analyse	rechnerisch ermittelt [TS – (Ra + Rfe + Rfa + Rp)]	Stärke, Glycogen, lösliche Zucker, lösliche Anteile der Cellulose, Hemicellulosen, Lignin, Pektin
Hemicellulosen	erweiterte Weender Analyse	rechnerisch ermittelt (NDF – ADF)	Pentosane, Hexosane
Ballaststoffe	nach § 35 LMBG	entsprechend der „Sammlung von Verfahren zur Probenahme und Untersuchung von Lebensmitteln“	Cellulose, Hemicellulosen, Pentosane, β -Glucane, Glucofructane, Oligofructose, Inulin, Pectin, residente Stärke

1,3-1,4- β -Glucane bestehen aus 1,3-1,4- β -glycosidisch verknüpften Glucoseeinheiten (Hexosen). Das bedeutet, dass neben den linearen 1,4- β -glycosidischen Bindungen, wie sie der Cellulose eigen sind, nach 3 bis 4 1,4- β -glycosidischen Bindungen auch Verknüpfungen des Moleküls über 1,3- β -Bindungen vorhanden sind. Demgegenüber stellen in linearer 1,4- β -Bindung verbundene Xyloseeinheiten (Pentosen) das Rückgrat der Xylane dar. Die Beschaffenheit der an dieses Grundgerüst 1,2- bzw. 1,3-glycosidisch gebundenen Seitenketten ist abhängig von der Herkunft des Makromoleküls. Im Falle des im Weizen besonders stark vertretenen Arabinoxylans handelt es sich hierbei in erster Linie um Arabinofuranose. Eine der wichtigsten physikochemischen Eigenschaften der β -Glucane und Arabinoxylane ist die Fähigkeit ihrer wasserlöslichen Fraktionen zur Gelbildung. Die besondere Bedeutung dieser Eigenschaft wird in Kapitel 2.2 beschrieben.

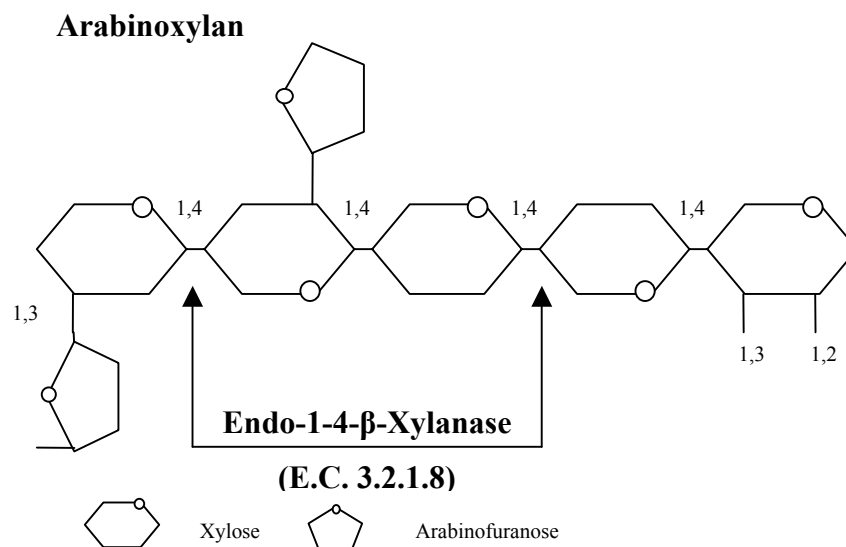
Für die Tierernährung ist Getreide, welches aufgrund seines hohen Stärkegehaltes eine hohe Energiedichte besitzt, von besonderem Interesse. Allerdings beinhalten viele Getreidearten neben der Stärke häufig auch teilweise hohe Anteile an den unverdaulichen NSP. So ist Roggen trotz seines vorteilhaften Nährstoffgehaltes als Bestandteil von Broilerdiäten wenig geeignet (BEDFORD und CLASSEN, 1993). Getreide mit einem hohen Gehalt an löslichen NSP sollten folglich in einer Broilerdiät zur Vermeidung negativer Auswirkungen auf die Leistungsparameter in der Mast einen Anteil von 5 % (Roggen) bis 20 % (Weizen) nicht überschreiten (JEROCH, 1998). Bei Verwendung pentosanarmer Sorten kann der Anteil von Weizen nach SIMON und JEROCH (1999) auf bis zu 40 % erhöht werden. Die Autoren empfehlen zumindest bei Broilerstarterfutter einen völligen Verzicht auf Roggen. In Tabelle 3 sind Stärke- und NSP-Gehalte einiger Getreidearten wiedergegeben. Es fallen teilweise deutliche Unterschiede in den Angaben zum NSP-Gehalt der einzelnen Getreidearten auf. CAMPBELL *et al.* (1991) zeigten in ihren Untersuchungen, dass der Anteil an unlöslichen Pentosanen in Roggen abhängig von Sorte, Anbaugebiet und Reifezustand ist. Auch für den Anteil der Gerüstkohlenhydrate in Weizen konnten solche Abhängigkeiten festgestellt werden (DUSEL *et al.*, 1998, LONGSTAFF und MCNAB, 1986).

Tabelle 3: Gehalt einiger Getreidearten an Stärke, β -Glucanen und Pentosanen (g/kg) (nach JEROCH *et al.*, 1999)

	Gerste	Roggen	Weizen	Hafer	Mais
Stärke	517	520	590	395	612
β -Glucane (gesamt)	22-66	18-47	6,5-8,5	23-51	1,2
β -Glucane (löslich)	24-50	-	-	16	-
Pentosane (gesamt)	31-60	66-122	62-75	37-80	43
Pentosane (löslich)	5-8	19-27	8-12	8	-

2.1.2 NSP-hydrolysierende Enzyme als Futterzusatzstoffe

FRY *et al.* (1957a) zeigten, dass durch Einweichen von Gerste deren Verdaulichkeit für Geflügel erhöht wird und vermuteten als Ursache pflanzliche Enzyme, welche die Zellwand zur Keimung aufbrechen. Durch Zugabe einer α -Amylaseformulierung, welche auch β -Glucanaseaktivitäten enthalten haben könnte, zu einer auf Gerste basierenden Diät, konnten im selben Jahr signifikant bessere Lebendmassezunahmen und Futterverwertung bei Küken beobachtet werden (FRY *et al.*, 1957b). Seit dieser Zeit gewinnt der Einsatz NSP-hydrolysierender Enzyme in der Broilermast zunehmend an Bedeutung. Dieses findet seinen Ausdruck auch in der steigenden Zahl der vorläufigen Zulassungen entsprechender Enzymformulierungen in der EU. Die Wirkung NSP-hydrolysierender Enzyme beruht auf ihrer Fähigkeit, hochmolekulare NSP in kleinere Moleküle zu spalten. Als Endoenzyme sind sie jedoch nicht in der Lage, Monomere von den Makromolekülen abzuspalten. PETERSON und ÅMAN (1989) sprechen den Oligomeren weniger viskositätsbildende Eigenschaften als den Makromolekülen zu, verweisen aber auf eine mögliche Viskositätserhöhung durch Solubisierung bisher unlöslicher NSP bei Einsatz entsprechender Enzyme. Da allerdings vorrangig große Moleküle durch NSP-hydrolysierende Enzyme abgebaut werden (BEDFORD und CLASSEN, 1992), verringert sich insgesamt die Wasserhaltekapazität und letztlich die Digestivviskosität. Die Ansatzstellen zur Hydrolyse von Arabinoxylanen durch die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Xylanase sind in Abbildung 1 dargestellt.

**Abbildung 1:** Positionen der Hydrolysestellen eines Arabinoxylans durch eine Xylanase (E.C.3.2.1.8)

Der Einsatz NSP-hydrolysierender Enzyme unterliegt seit 1970 in der Europäischen Union der Zulassungspflicht. In der RICHTLINIE DES RATES DER EUROPÄISCHEN GEMEINSCHAFT ÜBER ZUSATZSTOFFE IN DER TIERERNÄHRUNG (70/524/EWG) ist ihr Einsatz in der Tierernährung geregelt. Die Umsetzung in nationales Recht erfolgt über das FUTTERMITTELGESETZ (FMG) in seiner aktuell gültigen Fassung vom 20. Juli 2000. Auf der Grundlage der RICHTLINIE DES RATES ÜBER DIE VERWENDUNG UND VERMARKTUNG VON ENZYMEN, MIKROORGANISMEN UND DEREN ZUBEREITUNGEN IN DER TIERERNÄHRUNG (93/113/EG) vom 14. Dezember 1993 wurden im VERZEICHNIS DER IN DEN VERSCHIEDENEN MITGLIEDSTAATEN ZUGELASSENEN ENZYME, MIKROORGANISMEN UND DEREN ZUBEREITUNGEN IN DER TIERERNÄHRUNG (96/C263/03) vom 11. September 1996 124 Enzyme und Enzymprodukte gelistet. Für diese Futterzusatzstoffe wird grundsätzlich nur eine vorläufige Zulassung erteilt. In der aktuell gültigen VERORDNUNG (EG) Nr. 2200/2001 DER KOMMISSION vom 17. Oktober ÜBER DIE VORLÄUFIGE ZULASSUNG VON FUTTERZUSATZSTOFFEN sind derzeit 61 Enzympräparate aufgeführt; in der entsprechenden Verordnung aus dem Jahr 1999 waren es noch 42.

2.2 Antinutritive Effekte löslicher NSP in der Broilermast

Wie bereits dargestellt, ist der Einsatz von Getreide mit einem hohen Gehalt an NSP in der Broilerfütterung wegen der antinutritiven Wirkungen der wasserlöslichen Fraktionen dieser Stoffgruppe limitiert. Die antinutritive Wirkung der in Weizen (CHOCT und ANNISON, 1992a) und Roggen (ANTONIOU und MARQUARDT, 1982) enthaltenen Arabinoxylane (Pentosane) ist bekannt und wird weitestgehend auf eine Erhöhung der Digestaviskosität (BEDFORD und CLASSEN, 1992, CHOCT und ANNISON, 1992b, BEDFORD, 1995, LANGHOUT *et al.*, 1997, SIMON, 1998, DÄNICKE *et al.*, 1999b, SILVERSIDE und BEDFORD, 1999) zurückgeführt. Dabei wird beim Geflügel eine Abhängigkeit der unerwünschten Effekte vom Alter der Tiere festgestellt (VIVEROS *et al.*, 1994, VELDMANN und VAHL, 1994). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass mit Ausnahme der Stärkeverdauung die Fähigkeit zur Verwertung von Nährstoffen beim jungen Broiler noch nicht voll ausgeprägt ist (NOY und SKLAN, 1995).

Die Erhöhung der Digestaviskosität bedingt eine verlangsamte Passage der Digesta durch den Verdauungstrakt (ALMIRALL und ESTEVE-GARCIA, 1994, DÄNICKE *et al.*, 1997a) und eine schlechtere Durchmischung der Digesta mit Verdauungsenzymen, sowie eine Verminderung der Aktivität dieser Enzyme (CHOCT und ANNISON, 1992 b, CHOCT *et al.*, 1996). Außerdem wird angenommen, dass der Einschluss von Nährstoffen, vor allem von Stärke, durch unverdauliche Zellwandstrukturen („cage-effect“) eine schlechtere Nährstoffverwertung zur Folge hat (BEDFORD und MORGAN, 1996, PETERSON und ÅMAN, 1989, ALMIRALL *et al.*, 1995). Neben diesen, sich unmittelbar auf die Verdauung der Nährstoffe auswirkenden Effekten, werden auch Einflüsse hochvisköser Diäten auf die Gewebe des Verdauungstraktes beobachtet. So konnten SMITS *et al.* (1997) eine höhere Masse von Dünn- und Dickdarm nach Zugabe von viskositätserhöhender Carboxymethylcellulose (CMC) zu einer Broilerdiät beobachten. Ein Einfluss löslicher NSP in der Diät auf mikrobielle Populationen im Verdauungstrakt wird ebenfalls als Erklärungsansatz für die antinutritiven Effekte löslicher NSP herangezogen, wobei hier noch ein großer Klärungsbedarf besteht (SIMON, 1998).

Bei Zusatz von NSP-hydrolysierenden Enzymen zu Diäten mit hohem Gehalt löslicher NSP werden in der Mast allgemein bessere Leistungen von Broilern bezüglich der Lebendmassezunahme in Größenordnungen bis 9 % und des Futteraufwandes in Bereichen bis 5 % erzielt (JEROCH, 1998, CHOCT *et al.*, 1995). Es ist folglich davon auszugehen, dass die antinutritiven Wirkungen löslicher NSP durch die Ergänzung mit NSP-hydrolysierenden Enzymen zumindest teilweise aufgehoben werden. Abbildung 2 verdeutlicht schematisch die möglichen Wirkungsebenen löslicher NSP und NSP-hydrolysierender Enzyme. Durch Erhöhung der Digestivviskosität wird also eine Reihe von verdauungsphysiologisch bedeutsamen Faktoren beeinflusst. Diese Wirkungsebenen und mögliche Effekte NSP-hydrolysierender Enzyme werden im folgenden detailliert beschrieben.

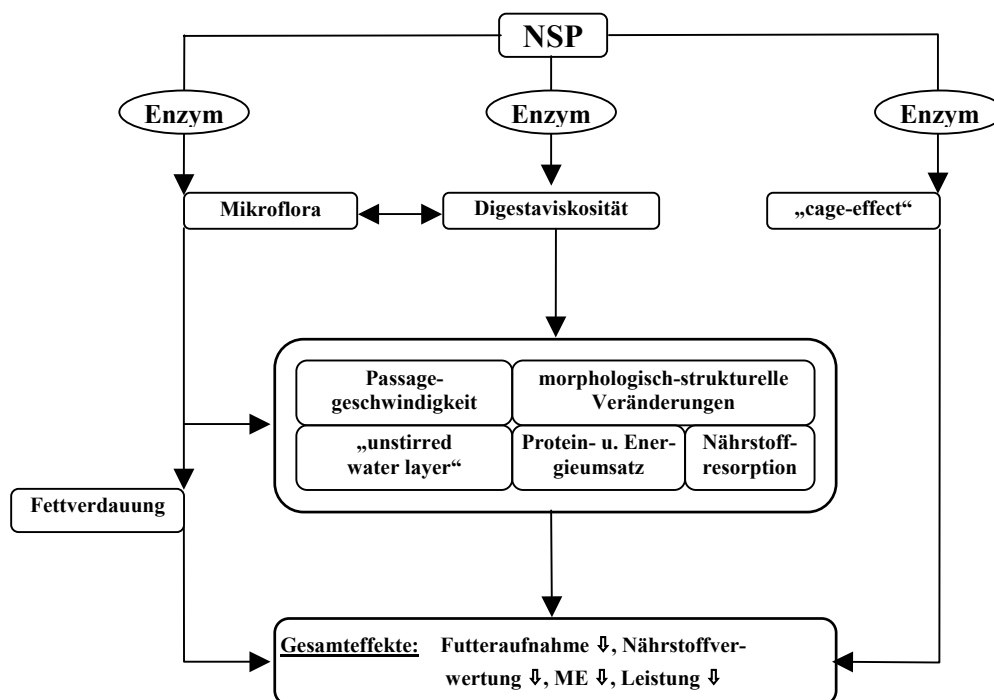


Abbildung 2: Mögliche Wirkungsebenen von löslichen NSP und NSP-hydrolysierenden Enzymen (nach SIMON, 1998)

2.2.1 Einfluss löslicher NSP und NSP-hydrolysierender Enzyme auf die Fettverdauung

Die Verwertung der in der Diät enthaltenen Fette stellt einen der begrenzenden Faktoren zur Optimierung der Mastleistung beim Broiler dar, da die Verdauung von Stärke und Protein für junge Broiler nur wenig limitiert ist (MORAN, 1985). So zeigten LANGHOUT *et al.* (1999) bei Zulage von Zitruspektin zu einer auf Mais basierenden Diät einen Rückgang der Verdaulichkeit des Rohfettes um 47 %, während die Verdaulichkeit der organischen Substanz um 17 % und die der Stärke lediglich um 9 % abnahm. Durch Zugabe von Weizenpentosanen zu einer NSP-armen Kontrolldiät konnten CHOCT und ANNISON (1992a) auch schlechtere präcaecale Verdaulichkeiten von Stärke und Stickstoff beobachten, allerdings nahm die Verdaulichkeit von Stärke und Protein in dieser Untersuchung um 15 % bzw. 19 %, die der Fette hingegen um 26 % ab. Zahlreiche Untersuchungen zeigen, dass bei Einsatz von Talg die leistungsmindernden Eigenschaften der NSP besonders ausgeprägt sind (ANTONIOU und MARQUARDT, 1982, DÄNICKE *et al.*, 1997b und 1999b, FENGLER *et al.*,

1988, CHOCT und ANNISON, 1992a). Eine Ursache könnte in dem gegenüber anderen Fettquellen hohen Anteil an langkettigen gesättigten Fettsäuren und dem damit verbundenen hohen Schmelzpunkt von Talg liegen (WARD und MARQUARDT, 1983). Auch hier wird als mögliche Ursache für eine schlechtere Verwertung der Einfluss einer erhöhten Digestivviskosität postuliert (ANTONIOU *et al.*, 1981, FENGLER *et al.*, 1988). Die schlechtere Durchmischung des Nahrungsbreies mit Verdauungsenzymen dürfte eine Rolle spielen (ANTONIOU und MARQUARDT, 1982).

Für die Fettverdauung ist die Aktivität der Lipase essentiell. KROGDAHL und SELL (1989) sehen in ihrer Funktion den entscheidenden Faktor, der die Fettverdauung begrenzt. Lipasen werden im Pankreas gebildet und in das distale Duodenum sezerniert. Durch eine kontinuierliche Antiperistaltik im Dünndarm (SKLAN *et al.*, 1978) erfolgt eine Durchmischung der Digesta mit den Pankreasenzymen auch in den proximalen Anteilen des Duodenums. Es ist davon auszugehen, dass bei erhöhter Digestivviskosität diese Durchmischung negativ beeinflusst wird (SMULIKOWSKA, 1998). Der Umstand, dass die Sekretion der Lipasen in das Darmlumen mit zunehmendem Alter der Tiere langsamer ansteigt als die anderer Pankreasenzyme (NOY und SKLAN, 1995), könnte die von VIVEROS *et al.* (1994) und VELDMANN und VAHL (1994) festgestellte Altersabhängigkeit der antinutritiven Effekte der NSP weitergehend erklären.

Eine Bedingung für eine adäquate Verdauung der als unpolare Triglyceride vorliegenden Futterfette ist eine ausreichende Konzentration konjugierter Gallensäuren im Darmlumen. SMITS *et al.* (1998) konnten bei Verwendung viskositätssteigerender CMC einen Zusammenhang zwischen geringeren Gallensalzkonzentrationen und schlechterer Fettverdauung feststellen. Konjugierte Gallensäuren stellen als polare Abkömmlinge des Cholesterins hocheffiziente Detergentien dar und erleichtern durch Oberflächenvergrößerung sowohl die Hydrolyse der Triglyceride zu Glycerin und freien Fettsäuren als auch die resorptiven Vorgänge. Dieses geschieht durch die Bildung von Micellen, welche durch ihre kugelförmige Struktur eine maximale Oberfläche und Polarität aufweisen. Als Hauptvertreter der Gallensäuren findet man beim Huhn Chenodesoxycholyltaurin und Cholyltaurin (ELKIN *et al.*, 1990). Sie werden in der Leber synthetisiert, in der Gallenblase zwischengespeichert und über die Gallengänge in das Darmlumen sezerniert. LISBONA *et al.* (1981) geben für nüchterne Broiler eine Sekretionsrate von 24,2 µl Galle pro Minute an. Gallensäuren unterliegen einem enterohepatischen Kreislauf und werden mit steigender Resorptionsrate nach distal im Verdauungstrakt wieder aufgenommen (LINDSAY und MARCH, 1967). Während sie so im vorderen Verdauungstrakt weiterhin für die Micellenbildung zur Verfügung stehen, werden die weiter distal resorbierten Gallensäuren über das Blut der Leber zugeführt und erneut in das Duodenum sezerniert. Durch Dekonjugation (Hydrolyse) werden Gallensäuren deaktiviert, bzw. wird ihre Fähigkeit zur Micellenbildung erheblich herabgesetzt. Hier spielen insbesondere mikrobielle Gallensäurehydrolasen eine Rolle (siehe Kapitel 2.4.5). Die Verfügbarkeit konjugierter Gallensäuren kann durch einen hohen Gehalt an NSP in der Broilerdiät beeinflusst werden. Während HURWITZ *et al.* (1973) von einer Rückresorption der Gallensäuren im Verdauungstrakt in einer Größenordnung von 90 % ausgehen, zeigte KRITCHEVSKY (1978), dass Gallensäuren an Faserstrukturen in der Nahrung binden und so dem enterohepatischen Kreislauf entzogen werden. In Abwesenheit konjugierter Gallensäuren werden kurzkettige, ungesättigte Fettsäuren besser resorbiert als langkettige mit hohem Sättigungsgrad (GARRET

und YOUNG, 1975), was wiederum eine Erklärung für die stärker ausgeprägten antinutritiven Effekte der NSP bei Verfütterung von Talg als Fettquelle darstellen dürfte.

Die präcaecale Verdaulichkeit der Nahrungsfette kann durch Zusatz NSP-hydrolysierender Enzyme zu Diäten mit hohem Gehalt löslicher NSP um bis zu 30 % verbessert werden (DÄNICKE *et al.*, 1997b). DÄNICKE *et al.* (1999a) konnten bei unterschiedlichen Roggenanteilen einer Diät bei Sojaöl als Fettquelle geringfügige und bei Talg deutliche Verbesserungen der präcaecalen Verdaulichkeit durch Zusatz einer Xylanase erreichen. Dabei schien der förderliche Effekt der Xylanase mit steigendem Anteil von Roggen zuzunehmen. In dieser Untersuchung wurde eine deutliche Erhöhung der Lipaseaktivitäten bei Verfütterung der auf Roggen basierenden Diät mit Talg als Fettquelle und eine Verringerung der Aktivitäten bei Enzymzusatz festgestellt.

Auf mögliche Veränderungen intestinaler mikrobieller Populationen durch Zugabe von NSP-hydrolysierenden Enzymen, welche über ihre Fähigkeit zur Dekonjugation von Gallensäuren negativ auf die Fettverdauung einwirken können, wird in Kapitel 2.3 eingegangen.

2.2.2 Einfluss löslicher NSP und NSP-hydrolysierender Enzyme auf die Verdauung von Stärke und Proteinen

Werden die Anteile löslicher NSP in der Diät erhöht, lassen sich nicht nur negative Einflüsse auf die präcaecale Verdaulichkeit der Futterfette, sondern auch auf die übrigen Nährstoffe feststellen. Dabei scheint die Verdauung von Stärke, welche bereits beim frisch geschlüpften Küken nahezu vollständig ausgebildet ist (NITSAN *et al.*, 1991), durch hochvisköse Diäten am wenigsten beeinflusst zu werden. Allerdings wiesen SMITS *et al.* (1997) auch bei Stärke einen Rückgang der präcaecalen Verdaulichkeit bei Austausch von niedrig- gegen hochvisköse CMC nach. Die Autoren stellten in dieser Untersuchung auch einen Rückgang der scheinbaren Verdaulichkeit von Stickstoff fest.

Bei der schlechteren präcaecalen Verdaulichkeit von Stärke könnte der von PETERSON und ÅMAN (1989) postulierte Käfigeffekt (Einschluss von Nährstoffen durch unverdauliche Zellwandbestandteile) eine Rolle spielen (SIMON, 1998). Zudem scheint eine geringere Resorption von Glucose und Fructose bei einer NSP-reichen Diät gegenüber einer NSP-armen Diät vorzuliegen (SAVORY, 1992). Eine deutliche Verringerung der Verdaulichkeit von Proteinen wird bei Diäten beobachtet, welche reich an Weizen und Haferkleien sind (JØRGENSEN *et al.*, 1996). Ein solcher Rückgang der scheinbaren Verdaulichkeit könnte in einer erhöhten Sekretion von Verdauungsenzymen des Pankreas und von Galle liegen (ISAKSSON *et al.*, 1983), da diese aus Proteinen bestehen bzw. einen hohen Proteinanteil besitzen.

Ein weiterer Einfluss auf die scheinbare Verdaulichkeit von Proteinen könnte durch eine erhöhte Proteinsyntheseleistung im Dünndarm und dadurch bedingte erhöhte N-Verluste gegeben sein (DÄNICKE *et al.*, 2000a). Auf diesen Umstand wird in Kapitel 2.2.4 näher eingegangen.

Eine wesentliche Ursache für eine bessere Verdaulichkeit von Stärke und Proteinen durch Zusatz NSP-hydrolysierender Enzyme dürfte, analog zur Verdauung der Fette, in der Verminderung der

Digestaviskosität liegen. Bei Stärke kommt eine mögliche Verminderung eines Käfigeffektes durch Aufbrechen unverdaulicher Zellwandstrukturen hinzu. Die Verdaulichkeit von Stärke konnte durch Zusatz NSP-hydrolysierender Enzyme zu NSP-reichen Diäten verbessert werden (PETTERSON und ÅMAN, 1989, ALMIRALL *et al.*, 1995, GRAHAM, 1996). Hier liegt ein Indiz für die Richtigkeit der Hypothese des „cage-effects“ vor, da durch Aufbrechen der Zellwand die im Mehlkörper des Getreidekornes vorliegende Stärke frei werden könnte. Während VIVEROS *et al.* (1994) eine signifikante Verbesserung der Verdaulichkeit von Stärke bei Zugabe einer β -Glucanase zu einer Gersten-Soja-Diät feststellten, wiesen HESSELMANN und ÅMAN (1986) nur geringfügige Verbesserungen der Verdaulichkeit durch Zusatz einer β -Glucanase zu einer auf Gerste basierenden Diät nach. Der Einsatz von β -Glucanasen in Verbindung mit Xylanasen bei Weizen-Roggen-Diäten bzw. Weizen-Roggen-Gerste-Diäten führte zu signifikanten Verbesserungen der Verdaulichkeit (PETTERSON und ÅMAN, 1989, PETTERSON *et al.*, 1991). GRAHAM (1996) konnte durch Einsatz einer Xylanase zu einer Gerstendiät eine signifikante Verbesserung der Stärkeverdaulichkeit erreichen.

Auch eine Verbesserung der präcaecalen Proteinverdaulichkeit durch Zusatz NSP-hydrolysierender Enzyme zu NSP-reichen Diäten wurde beobachtet (JARONI *et al.*, 1999, DÄNICKE *et al.*, 1997b und 1999d). Dabei liegt jedoch nicht nur eine verbesserte Nettoproteinverwertung vor. Vielmehr konnte eine erhöhte scheinbare Verdaulichkeit der Aminosäuren Aspartat, Isoleucin, Lysin, Methionin, Phenylalanin, Serin und Valin nachgewiesen werden (GRAHAM, 1996, JAMROZ *et al.*, 1998a, DÄNICKE *et al.*, 1999d).

2.2.3 Einfluss löslicher NSP und NSP-hydrolysierender Enzyme auf die umsetzbare Energie

Die schlechtere Verdauung der Hauptnährstoffe bei hohen Anteilen löslicher NSP in Broilerdiäten übt einen negativen Einfluss auf die umsetzbare Energie (ME) aus. So wiesen LANGHOUT *et al.* (1999) durch Zusatz von hochviskösem Pektin zu einer Kontrolldiät eine Verringerung der stickstoffkorrigierten scheinbar umsetzbaren Energie (AME_N) von ca. 13 MJ/kg auf ca. 10 MJ/kg nach. Eine eindeutige Abhängigkeit zwischen dem Gehalt an Pentosanen und scheinbar umsetzbarer Energie (AME) verschiedener Getreidearten arbeiteten CHOCT und ANNISON (1990) heraus (Tabelle 4). Durch Berechnung des Anteils der AME an der Bruttoenergie und Auftrag gegen den Pentosangehalt der einzelnen Getreidearten stellten die Autoren eine hochsignifikante Korrelation dieser Parameter fest.

Tabelle 4: Abhängigkeit der AME vom Pentosangehalt bei verschiedenen Getreidearten (modifiziert nach CHOCT und ANNISON, 1990)

Getreideart	Pentosangehalt (%)	AME (MJ/kg TM)
Reis	0	17,4
Hirse	2,8	15,8
Mais	4,3	15,8
Weizen	6,0	14,3
Triticale	7,0	13,8
Gerste	7,6	11,9
Roggen	8,9	11,3

Da die präcaecale Verdaulichkeit von Futterfetten, Stärke und Proteinen durch Zusatz NSP-hydrolysierender Enzyme zu NSP-reichen Diäten verbessert wird, werden in zahlreichen Untersuchungen steigende AME und AME_N festgestellt (CHOCT *et al.*, 1996, DÄNICKE *et al.*, 1997b und 1999d, DUSEL *et al.*, 1998). Der Anstieg der AME bzw. AME_N dürfte in erster Linie auf die bessere Verdauung der hochenergetischen Futterfette zurückzuführen sein, da die positiven Effekte der NSP-hydrolysierenden Enzyme bei Einsatz von Talg besonders deutlich ausgeprägt sind (DÄNICKE *et al.*, 1999a und 1999c).

2.2.4 Einfluss löslicher NSP und NSP-hydrolysierender Enzyme auf die Morphologie des Verdauungstraktes

Aufgrund des vergleichsweise kurzen Verdauungstraktes und des geringen Anteils der paarig angelegten Caeca und des Enddarmes am gesamten Verdauungstrakt (LABIER und LECLERCQ, 1994) ist die Beschaffenheit der resorptiven Oberfläche des Dünndarmes beim Broiler von besonderer Bedeutung. Neben den beschriebenen Einflüssen auf die Verdauung der Hauptnährstoffe lassen sich bei Einsatz NSP-reicher Diäten in der Broilerfütterung, bzw. bei erhöhter Digestivviskosität, morphologische Veränderungen am Verdauungstrakt feststellen. Verlängerung und höheres Gewicht des gesamten Darmes bei vergrößerten Caeca und ein vergrößertes Pankreas (ALMIRALL *et al.*, 1995, VAN DER KLIES und VAN VOORST, 1993, SAVORY, 1992, JØRGENSEN *et al.*, 1996, VELDMANN und VAHL, 1994, VIVEROS *et al.*, 1994), sowie verkürzte und dabei verdickte Mikrovilli (JARONI *et al.*, 1999, BEST *et al.*, 1999), wurden beschrieben. Allerdings konnten ROLLS *et al.* (1978) bei Zugabe von Weizenkleien zu einer NSP-armen Diät weder bei keimfreien noch bei konventionellen Tieren eine erhöhte epitheliale Erneuerungsrate feststellen, was darauf hindeutet, dass der NSP-Gehalt der Diät nicht *per se* für morphologische Veränderungen verantwortlich ist.

Die Erhöhung des Darmgewichtes ist in erster Linie auf morphologische Veränderungen der mukosalen Anteile der Darmwand, nämlich erhöhte Proliferation von Enterozyten und Becherzellen, zurückzuführen (VIVEROS *et al.*, 1994, BEST *et al.*, 1999, LANGHOUT *et al.*, 1999). Eine höhere Zahl von Becherzellen führt über eine gesteigerte Mucinbildung zu einem höheren Verlust von Kohlenhydraten und Proteinen, aus denen Mucin zu großen Teilen besteht. Da die unbewegliche Wasserschicht („unstirred water layer“), welche als Schutzschicht zwischen Digesta und Enterozyten fungiert, aus einer Mischung aus Wasser und Mucin besteht (MORAN, 1985), ist ihre Vergrößerung durch erhöhte Mucinproduktion anzunehmen. Durch JOHNSON und GEE (1981) *in vitro* nachgewiesene verschlechterte Resorptionsbedingungen für Glucose wären gegeben.

DÄNICKE *et al.* (2000a und 2000b) konnten bei einer Diät, welche reich an löslichen NSP war, signifikant höhere Proteinsyntheseraten in den Geweben des Dünndarmes bei Broilern feststellen. Dabei traten Einflüsse unterschiedlicher Fettquellen auf. Sie schlossen daraus auf eine höhere N-Sekretion in das Darmlumen und folglich auf höhere endogene N-Verluste. Eine erhöhte Syntheseleistung zur Erneuerung der Epithelien des Verdauungstraktes bedeutet für das Tier einen höheren Protein- und Energiebedarf für diesen Zweck. Die hierfür aufgewendeten Proteine stehen nicht zum Proteinansatz der Muskelmasse zur Verfügung (SIMON, 1998).

Zahlreiche Untersuchungen belegen, dass morphologische Veränderungen an Geweben des Verdauungstraktes nach Zugabe NSP-hydrolysierender Enzyme abgemildert werden oder nicht mehr auftreten (PETTERSON und ÅMAN, 1989, BRENES *et al.*, 1993, VIVEROS *et al.*, 1994). SAVORY (1992) zeigte eine um 8 % reduzierte Länge des Dünndarmes bei Zusatz einer Enzymformulierung mit verschiedenen Polysaccharidaseaktivitäten zu einer NSP-reichen Diät. Die Länge der Caeca war hingegen um 7 % erhöht. Ebenso konnte eine Verringerung des relativen Darmgewichtes im Verhältnis zum Körpergewicht festgestellt werden (JACKISCH und JEROCH, 1990). Durch geringer ausgeprägte Auswirkungen löslicher NSP auf morphologische Strukturen des Verdauungstraktes bei Einsatz NSP-hydrolysierender Enzyme, ist ein Rückgang der Proteinsyntheserate im Darmgewebe anzunehmen. Tatsächlich konnten VIVEROS *et al.* (1994) bei Zusatz einer β -Glucanase zu einer auf Gerste basierenden Diät geringere Proteinmengen im Darmgewebe beobachten. DÄNICKE *et al.* (2000b) stellten fest, dass der Zusatz einer Xylanase zu einer Roggen-Diät den endogenen Stickstoffverlust bei Broilern ebenfalls senkte. Dabei wurde zusätzlich ein deutlicher Einfluss der Fettquelle (Sojaöl vs. Talg) auf den N-Verlust im Verdauungstrakt gezeigt.

2.3 Mikrobielle Gemeinschaften im Verdauungstrakt von Broilern

Ein Einfluss mikrobieller Gemeinschaften im Verdauungstrakt auf die Verdauung und somit auf die Leistungsparameter in der Broilermast ist seit langer Zeit bekannt. Einerseits zeigten Untersuchungen an keimfreien Tieren bessere Leistungen gegenüber konventionellen Tieren (COATES *et al.*, 1963, FORBES und PARK, 1959), andererseits wurden die positiven Auswirkungen verschiedener Antibiotika auf die Leistung von Mastgeflügel bei NSP-reichen Diäten beschrieben (z.B. MARQUARDT *et al.*, 1979) und seit den 1950er Jahren antimikrobiell wirkende Futterzusatzstoffe zur Verbesserung der Mastleistung erfolgreich eingesetzt.

2.3.1 Die mikrobielle Besiedlung des Verdauungstraktes von Broilern

Es ist davon auszugehen, dass das Ei-Innere und folglich der Verdauungstrakt des Tieres unter physiologischen Bedingungen vor der ersten Aufnahme von Nahrung, Wasser oder Partikeln aus der Umgebung steril ist (OCHI *et al.*, 1964, MEAD und ADAMS, 1975, SALANITRO *et al.*, 1978). Doch bereits unmittelbar nach dem Schlupf kommt das Küken mit einer Vielzahl von Mikroorganismen in Kontakt. Diese Mikroorganismen können nun in das noch nicht voll entwickelte und nach außen offene Habitat Verdauungstrakt eindringen. Neben ausgesprochenen „Darmspezialisten“ passieren auch ubiquitäre Mikroorganismen den Darm. Spezialisierte Mikroorganismen weisen entweder die Fähigkeit zur Anheftung an das Darmepithel auf oder besitzen eine ausreichend hohe Teilungsrate, um nicht mit den Digesta aus dem Habitat entfernt zu werden. Demgegenüber können weniger angepasste Mikroorganismen diese Nische nur so lange besiedeln, bis sie von einer besser adaptierten Spezies verdrängt werden. Entsprechend lassen sich die Keime, mit denen der junge Vogel in Kontakt kommt, in eine „residente Flora“, welche an das Ökosystem angepasst ist, und in eine „transiente Flora“ nicht angepasster Mikroorganismen einteilen (SAVAGE, 1977). Unter naturnahen Haltungsbedingungen spielt die Aufnahme von Mikroorganismen über aufgenommenen Kot

(Koprophagie) oder Federmaterial usw. bei engem Kontakt der Küken mit adulten Tieren eine große Rolle für die Erstbesiedlung des Verdauungstraktes (SMITH, 1965). Unter modernen Produktionsbedingungen stellt hingegen der Mensch einen Überträger von Mikroorganismen durch Geschlechtsbestimmung und weitere Handhabungen (FULLER, 1984, VAHJEN *et al.*, 1998) auf das frisch geschlüpfte Tier dar. Auch obligat oder fakultativ pathogene Mikroorganismen sind in kommerziellen Aufzuchtbetrieben auf der Eischale und in der Umgebung vorhanden. Als wichtigste Vertreter konnten *Salmonella*-Serotypen trotz üblicher Desinfektionsmaßnahmen bereits auf der Eischale nachgewiesen werden (COX *et al.*, 1990 und 1994, BAILEY *et al.*, 1994). Besonders während des Transportes erfolgt eine Weiterverbreitung von Mikroorganismen unter den Küken über Kot oder Gefieder (SHACKELFORD, 1988). Eine Übertragung von Mikroorganismen von der Eischale, der direkten Umgebung und der menschlichen Haut auf das Tier, sowie die intensive Ausbreitung von Mikroorganismen unter den Tieren während des Transportes, dürften wichtige Faktoren für den späteren mikrobiellen Status im Verdauungstrakt dieser Tiere darstellen. Es ist zu erwarten, dass der hygienische Status der neuen Umgebung des Mastbetriebes und die dort vorhandenen Mikroorganismen eine maßgebliche Bedeutung für die weitere Besiedlung des Verdauungstraktes des Küken haben, da dort in der Regel die erste Nahrungs- und Wasseraufnahme und somit eine Beimpfung mit der dort vorherrschenden Mikroflora stattfindet.

2.3.2 Zusammensetzung mikrobieller Gemeinschaften im Verdauungstrakt von Broilern

Untersuchungen zu mikrobiellen Gemeinschaften im Verdauungstrakt von Broilern beschränken sich auf einige wenige Keimgruppen. Selten werden Bakterienarten bestimmt. Insgesamt können die Erkenntnisse über mikrobielle Populationen als unzureichend bezeichnet werden. Es sei außerdem auf das hohe Alter der Untersuchungen zur sogenannten „normalen Darmflora“ verwiesen. Der Verdauungstrakt der Küken weist nicht gleich von Beginn an stabile mikrobielle Gemeinschaften auf. Vielmehr ist mit einer zweiwöchigen Selektionsphase zu rechnen, bis sich eine Mikroflora im vorderen Verdauungstrakt etabliert hat; für die Caeca dürfte dieser Zeitraum 4 Wochen betragen (OCHI *et al.*, 1964, BARNES *et al.*, 1972, GERLACH, 1994). Seit langem besteht die Übereinkunft, dass im vorderen Verdauungstrakt Vertreter der *Lactobacillus spp.* und fakultativ anaerobe gram positive Kokken dominieren (OCHI *et al.*, 1964, TIMMS, 1968, BARNES *et al.*, 1972, SALANITRO *et al.*, 1978). Die leicht sauren Milieubedingungen im Kropf mit pH-Werten von 4,5-6,0 (BARNES, 1979) und die hier noch recht hohen Sauerstoffkonzentrationen bieten Wachstumsbedingungen für *E.coli* und Vertreter der *Streptococcus spp./Enterococcus spp.*, welche jedoch bereits nach der 1. Lebenswoche nahezu vollständig durch *Lactobacillus spp.* verdrängt werden (SMITH, 1965). Diese Laktobazillen liegen in enger Beziehung zu den Epithelzellen des Kropfes vor (FULLER und TURVEY, 1971) und üben eine für den Wirt protektive Funktion aus (FULLER, 1977). Enterokokken, Coliforme, sowie Mikrokokken und Staphylokokken kommen später als Begleitflora vor (JAYNE-WILLIAMS und FULLER, 1971). Durch den niedrigen pH-Wert stellt der Drüsenmagen ein schwer zu besiedelndes Habitat dar. Im Muskelmagen konnten durch SMITH (1965) ähnliche Verhältnisse wie im Kropf festgestellt werden. Das Duodenum bietet durch die hohe Passagegeschwindigkeit der Digesta durch diesen kurzen Darmabschnitt für luminale Mikroorganismen wenig günstige Wachs-

tumsverhältnisse und so konnten nur geringe Mengen an Vertretern der *Streptococcus (Enterococcus) faecalis*, *Lactobacillus spp.* und *Eubacterium spp.* (HUHTANEN und PENSACK, 1965, BARNES *et al.*, 1972, SALANITRO *et al.*, 1978) gefunden werden. Im weiteren Verlauf des Verdauungstraktes nimmt die Fließgeschwindigkeit der Digesta ab, so dass auch für luminale Mikroorganismen ein günstigeres Habitat gegeben ist. Entsprechend werden die dort nachgewiesenen Populationen vielschichtiger. SALANITRO *et al.* (1978) wiesen als Hauptvertreter der mikrobiellen Populationen im Jejunioileum vor allem Vertreter der *Lactobacillus spp.* und *E.coli*, aber auch Vertreter der *Streptococcus spp./Enterococcus spp.* und *Eubacterium spp.* nach. TIMMS (1968) verwies ebenfalls auf Laktobazillen, Enterokokken und Enterobakterien als Hauptvertreter der Populationen in diesem Abschnitt des Verdauungstraktes. Die Caeca stellen aufgrund der langen Verweildauer der Digesta (BARNES, 1979) ein stabiles Habitat für luminale Mikroorganismen dar und weisen in allen Untersuchungen die höchsten Keimzahlen auf. Wegen des geringen Redoxpotentials liegt zudem ein günstiges Milieu für strikt anaerobe Mikroorganismen vor. BARNES (1979) konnte in diesem Darmabschnitt über 40 verschiedene Vertreter gram positiver und gram negativer Mikroorganismen (nicht sporenbildend) und 17 verschiedene Vertreter der *Clostridium spp.* (sporenbildend), welche im vorderen Verdauungstrakt nur sporadisch auftraten, nachweisen. Zu Beginn der Besiedlung dominieren in den Caeca noch die fäkalen Streptokokken und coliforme Keime, während die Besiedlung mit Laktobazillen langsamer erfolgt (SMITH, 1965, HUHTANEN und PENSACK, 1965, MEAD und ADAMS, 1975). Als Hauptvertreter der den Verdauungstrakt besiedelnden Vertreter der *Lactobacillus spp.* wurden *L.acidophilus*, *L.salivarius* und *L.fermentum* (MORISHITA *et al.*, 1971) beschrieben. Die quantitative Bedeutung verschiedener Enterokokken-Arten variiert mit dem Alter der untersuchten Tiere. Verschiedene Untersuchungen kommen hier zu unterschiedlichen Ergebnissen. Einigkeit besteht jedoch darüber, dass *E.faecium* und *E.faecalis* die am häufigsten isolierten Vertreter dieser Gruppe sind, wenn auch mit unterschiedlicher Gewichtung (DEVRIESE *et al.*, 1991, KAUKAS *et al.*, 1988). Als weitere wichtige Vertreter werden *E.caecorum* (DEVRIESE *et al.*, 1991) bzw. *E.gallinarum* (KAUKAS *et al.*, 1988) genannt.

2.4 Bedeutung intestinaler Mikroorganismen für den Wirt

Die mikrobiellen Populationen im Verdauungstrakt haben für den Wirt sowohl günstige, als auch nachteilige Auswirkungen. Einen Überblick über die positiven und negativen Faktoren, welche durch die Darmflora bedingt sind, gibt Tabelle 5.

Tabelle 5: Bedeutung der Darmflora für den Wirt (modifiziert nach GOLLNISCH, 1998)

positive Faktoren	negative Faktoren
Verhinderung der Besiedlung durch pathogene Mikroorganismen	Verlängerung von Diffusionsstrecken durch Verdickung der Darmwand
Antagonismus gegenüber unerwünschten Mikroorganismen	Produktion belastender/toxischer Stoffwechselmetaboliten
Vitaminsynthese	Inaktivierung endogener Enzyme
Proteinsynthese	Dekonjugation von Gallensäuren
Produktion flüchtiger Fettsäuren	Nährstoffkonkurrenz

2.4.1 Schutz vor pathogenen/unerwünschten Mikroorganismen

Eine wichtige, die Gesundheit des Wirtes unterstützende und erhaltende Funktion der Normalflora ist der Schutz vor pathogenen Mikroorganismen. Diese Schutzfunktion geht einerseits von einer gesteigerten Immunkompetenz des Wirtes und andererseits von unmittelbaren Wechselwirkungen der Mikroorganismen untereinander aus.

Im Gegensatz zu keimfreien Tieren kann bei konventionellen Mäusen und Ratten eine erhöhte Produktion von Immunglobulin A (IgA), intraepithelialen Lymphozyten und Molekülen des „major histocompatibility complex“ (MHC) nachgewiesen werden (UMESAKI und SETOYAMA, 2000).

Eine unmittelbare Beeinflussung der Mikroorganismen untereinander erfolgt unter anderem durch eine Senkung des intestinalen Redox-Potentials, Nährstoffkonkurrenz und eine Produktion von Bakteriozinen (BATT *et al.*, 1996). So zeigt Reuterin, ein durch *L.reuteri* produziertes Bakteriozin, *in vitro* einen inhibitorischen Effekt auf eine Reihe von gram positiven (*B.cereus*, *S.aureus* und *L.monocytogenes*) und gram negativen (*E.coli* und *Yersinia enterocolica*) Mikroorganismen (EL-ZINEY *et al.*, 1999). JIN *et al.* (1996) wiesen für 12 Vertreter der *Lactobacillus spp.* einen inhibitorischen Effekt auf verschiedene Vertreter der *Salmonella spp.* und Serotypen der *E.coli* nach. Auch *E.faecium* (Stamm J96) übt einen inhibitorischen Effekt auf verschiedene *Salmonella spp.* aus, welcher neben der Produktion von Milchsäure auf einen bakterioziden Faktor zurückzuführen ist (AUDISIO *et al.*, 1999).

Da die epitheliale Oberfläche des Verdauungstraktes und so die Möglichkeiten der Anheftung begrenzt sind, kommt der Besiedlung dieser Fläche durch Mikroorganismen mit für den Wirt vorrangig förderlichen Eigenschaften eine große Bedeutung zu. Eine Übersicht über mögliche inhibitorische Mechanismen zwischen Mikroorganismen zeigt Tabelle 6.

Tabelle 6: Inhibitorische Mechanismen zwischen Mikroorganismen (modifiziert nach SPRING, 1996)

Wirkungsebene	Faktor
Nährstoffe	Nährstoffkonkurrenz
Anhaftung an epitheliale Oberflächen	Konkurrenz um Rezeptoren, Stimulation des „cell-turnovers“
Milieubedingungen	pH-Wert, Milchsäure, freie Fettsäuren, H ₂ S, Modifikation von Gallensäuren, Stimulation des Immunsystems
Antimikrobielle Substanzen	NH ₃ , H ₂ O ₂ , Enzyme, Bakteriozine, Antibiotika

2.4.2 Produktion nützlicher Substanzen

Während die mikrobielle Vitamin- (VISEK, 1978) und wohl auch die Proteinsynthese unter modernen Produktionsbedingungen mit ihren bedarfsgerechten Diäten zu vernachlässigen ist, kommt der Produktion freier Fettsäuren eine gewisse Bedeutung bei der Energieversorgung des Wirtes zu. Ältere Untersuchungen sprechen den durch mikrobielle Fermentation entstandenen freien Fettsäuren einen Anteil von 10 % an der gesamten Energieversorgung beim Geflügel zu (ANNISON *et al.*,

1968). In neueren Untersuchungen wird dieser Anteil mit bis zu 30 % sogar deutlich höher angesetzt (JØRGENSEN *et al.*, 1996).

Als Hauptproduzenten von Laktat im Verdauungstrakt sind Milchsäurebakterien anzusehen. Zu dieser Gruppe werden Vertreter der *Aerococcus spp.*, *Carnobacterium spp.*, *Enterococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Lactococcus spp.*, *Leuconostoc spp.*, *Pediococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Tetragenococcus spp.* und *Vagococcus spp.* als gram positive, nicht sporenbildende Bakterien, deren Hauptfermentationsprodukt Milchsäure darstellt, gezählt (AXELSSON, 1998). Das Hauptfermentationsprodukt der *Enterobacteriaceae* stellt Azetat dar, es kann jedoch auch Laktat gebildet werden. Die Bildung von Buttersäure geht in erster Linie auf Vertreter der *Clostridium spp.* (WAGNER und THOMAS, 1978), sowie auf Vertreter der *Bacteroides spp.* und *Eubacterium spp.* zurück. Propionsäurebildende Bakterien, welche in großer Zahl im Pansen von Wiederkäuern vorkommen, sind normalerweise nicht in relevanten Mengen im Verdauungstrakt von Broilern vorhanden (WAGNER und THOMAS, 1978).

HEDGE *et al.* (1982) zeigten, dass konventionell gehaltene Hühner bei energiearmer Rationsgestaltung in der Lage waren, Stroh zur Energiegewinnung zu nutzen, während dieses keimfreien Tieren nicht möglich war. Dieses ist ein Hinweis auf einen Beitrag der durch mikrobielle Fermentation entstandenen freien Fettsäuren zur Energieversorgung des Wirtstieres. Die freien Fettsäuren tragen jedoch nicht nur zur Gesamtenergieversorgung bei. Sie dienen vielmehr den Epithelzellen des Verdauungstraktes als Hauptenergiequelle. Dieses konnte für n-Butyrat *in vitro* an Kolonepithelzellen von Ratten demonstriert werden (CLAUSEN und MORTENSEN, 1994). SAKATA (1987) bezeichnete die freien Fettsäuren als trophische Faktoren für die Epithelien des Kolons und stellte neben einer Dosis-Wirkung-Beziehung fest, dass n-Butyrat die Proliferation der Zellen stärker stimuliert als Propionat und Azetat. Auch FURUSE *et al.* (1991) bestätigten den stimulierenden Effekt von kurzkettigen Fettsäuren auf die Epithelien des Verdauungstraktes.

Die scheinbare Verdaulichkeit der Gerüstsubstanzen wird von JAMROZ *et al.* (1998b) mit 33-40 % für die in neutralen (NDF) und mit 5-7 % für die in sauren (ADF) Detergentien löslichen Fasern angegeben. Für Hemicellulosen geben die Autoren eine scheinbare Verdaulichkeit von 50-57 % an. Dabei nimmt die scheinbare Verdaulichkeit der NDF, ADF und der Hemicellulosen mit steigendem Anteil der NSP an der Diät zu. Da wirtseigene Enzyme zum Abbau dieser Substanzen fehlen, ist dieses auf mikrobiellen Abbau der NSP zurückzuführen. Beim Abbau der β -Glucane entstehende Glucosemoleküle könnten zur Energiegewinnung durch das Wirtstier genutzt werden (SCHUTTE *et al.*, 1992). Beim Abbau der Pentosane entstehen jedoch Pentosen, wie D-Xylose und L-Arabinose. Auch diese Fünferzucker werden resorbiert. Ihr Gehalt an umsetzbarer Energie ist zwar als wesentlich geringer einzustufen als der von Glucose, kann aber dennoch zur Deckung des Energiebedarfes herangezogen werden (SCHUTTE *et al.*, 1992). Die Autoren verweisen allerdings darauf, dass mit steigenden Konzentrationen dieser Kohlenhydrate in der Diät eine linear ansteigende Exkretion über den Harn stattfindet.

2.4.3 Produktion unerwünschter Stoffwechselprodukte

Die durch den Stoffwechsel intestinaler Mikroorganismen anfallenden Stoffwechselprodukte Ammoniak, biogene Amine, Schwefelwasserstoff und Methan stellen für den Wirtsorganismus eine Belastung dar und müssen aus dem Körper entfernt bzw. entgiftet werden (VISEK, 1978, SALMINEN *et al.*, 1998). WAGNER und THOMAS (1978) stellten zudem einen direkten Zusammenhang zwischen der Produktion von Buttersäure und Leistungsdepressionen bei Broilern her.

2.4.4 Einfluss auf die Morphologie des Verdauungstraktes

Vergleiche zwischen konventionellen und keimfreien Tieren zeigen einen um 50 % erhöhten Enterozyten-Umsatz (ROLLS *et al.*, 1978) und eine Gewichtszunahme des Verdauungstraktes je Längeneinheit (COATES *et al.*, 1981, FURUSE *et al.*, 1991). Außerdem ist eine verdickte Lamina propria mucosae (ABRAMS *et al.*, 1963) zu beobachten. Hieraus ergeben sich für den Wirt ein erhöhter Energie- und Proteinbedarf zur Zellsynthese, sowie verschlechterte Resorptionsbedingungen. ROLLS *et al.* (1978) wiesen gegenüber keimfreien Tieren bei konventionellen Hühnern eine erhöhte mitotische Aktivität, einen erhöhten Zellumsatz und eine schnellere Migration der Epithelzellen aus den Krypten zur Zottenspitze nach. In dieser Untersuchung wurden auch höhere Mikrovilli, tiefere Krypten und eine unregelmäßigere Epitheloberfläche bei konventionellen Tieren festgestellt.

2.4.5 Dekonjugation von Gallensäuren

Die Dekonjugation von Gallensäuren im Verdauungstrakt ist eine rein bakterielle Fähigkeit und für eine Vielzahl von Mikroorganismen nachgewiesen (FEIGNER und DASHKEVICZ, 1987 und 1988). COLE und FULLER (1984) zeigten, dass Vertreter der *Bifidobacterium spp.*, *Bacteroides spp.*, *Lactobacillus spp.*, *E.faecium* und *C.perfringens* die für das Huhn spezifischen Gallensäuren Taurochenodesoxycholin und Taurocholin dekonjugieren und somit in die wesentlich weniger wirksame Form überführen können.

Konjugierte Gallensäuren scheinen vor allem das Wachstum von Bakterien zu hemmen, welche nicht an das Habitat Verdauungstrakt angepasst sind (SAVAGE, 1977). Ihre bakteriostatische Eigenschaft im Verdauungstrakt von Broilern wurde von DÄNICKE *et al.* (1999e) gezeigt. Entsprechend muss die Fähigkeit zur Dekonjugation als ein Anpassungsmechanismus gedeutet werden, obwohl sie für aus dem Darm von Broilern isolierte Vertreter der *E.coli* und für *Klebsiella aerogenes* nicht nachgewiesen werden konnte (COLE und FULLER, 1984). MOSER und SAVAGE (2001) stellten außerdem fest, dass die Produktion von Gallensäurehydrolasen und Resistenz gegenüber Gallensäuren bei verschiedenen Vertretern der *Lactobacillus spp.* nicht korrelieren.

Die Summe der bakteriellen Gallensäurehydrolasen scheint in ihrer Wirkung ausreichend sein, um für die Fettverdauung des Wirtes negative Auswirkungen zu bewirken. COLE und BOYD (1967) zeigten, dass die Absorption der in der Diät enthaltenen Fette bei keimfreien Tieren geringfügig höher ist, als bei solchen, die mit Vertretern der *Staphylococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*, *C.perfringens* oder *E.coli* monoassoziiert wurden. Diese Feststellung gilt für die vorderen Abschnitte

des Verdauungstraktes. Weiter distal konnte ein solcher Unterschied nicht einheitlich festgestellt werden. Teilweise war dort die Absorptionsrate bei den monoassoziierten Tieren höher.

Durch Zugabe konjugierter Gallensäuren lässt sich die präcaecale Verdaulichkeit der Nahrungsfette bei Diäten, welche auf Weizen und Roggen basieren, erhöhen (CAMPBELL *et al.*, 1983, FENGLER *et al.*, 1988). Die Verdaulichkeit steigt dann bei konventionellen Tieren auf ein ähnliches Niveau, wie es bei keimfreien Tieren zu beobachten ist (KUSSAIBATI *et al.*, 1982). Besonders ausgeprägt sind die der Fettverdaulichkeit förderlichen Effekte zugesetzter Gallensäuren bei einem hohen Gehalt an langkettigen ungesättigten Fettsäuren, wie sie beispielsweise in Talg vorkommen (CAMPBELL *et al.*, 1983, GREEN und KELLOG, 1987). Um diese ausgesprochen unpolaren Fettsäuren durch Micellenbildung in eine wasserlösliche Form zu überführen, scheint eine besonders hohe Menge der Gallensäuren notwendig zu sein (DÄNICKE *et al.*, 1999a).

Neben dem Umstand, dass die Gallensäuren in dekonjugierter Form nicht mehr für eine adäquate Fettverdauung zur Verfügung stehen, gibt es auch Anhaltspunkte für direkte Schädwirkungen dieser Verbindungen für den Organismus. So weisen dekonjugierte Gallensäuren *in vitro* eine höhere Schädwirkung auf Leberzellen von Ratten auf als ihre konjugierte Form (MARTINEZ-DIEZ *et al.*, 2000) und wirken deutlich stärker stimulierend auf murine Mastzell-Linien, was zu einer Histaminfreisetzung führt (QUIST *et al.*, 1991).

2.5 Auswirkung löslicher NSP auf mikrobielle Gemeinschaften im Verdauungstrakt von Broilern

Durch einen hohen Gehalt löslicher NSP in der Diät ist eine gegenüber NSP-armen Diäten tiefgreifende Änderung der Milieubedingungen anzunehmen. Zu den wesentlichen Faktoren, welche die mikrobiellen Gemeinschaften beeinflussen könnten, gehören die Erhöhung der Digestaviskosität und ein verändertes Substratangebot. Entsprechend werden tatsächlich Veränderungen mikrobieller Gemeinschaften im Verdauungstrakt von Broilern bei hochviskösen Diäten beobachtet. Ein Einfluss NSP-hydrolysierender Enzyme wird bei solchen Diäten ebenfalls beschrieben.

2.5.1 Einfluss erhöhter Digestaviskosität auf mikrobielle Gemeinschaften im Verdauungstrakt von Broilern

Die Verweildauer der Digesta im Verdauungstrakt von Broilern ist mit 5 bis 7 Stunden (JEROCH *et al.*, 1999) relativ kurz. Aus diesem Grund stellt das Darmlumen besondere Anforderungen an Mikroorganismen, die dieses Habitat besiedeln. MADIGAN *et al.* (1997) verweisen darauf, dass sich im Darmlumen nur solche Bakteriengruppen oder -arten behaupten können, deren Teilungsrate ausreichend hoch ist, um die Ausschwemmung mit den Digesta auszugleichen. Durch die Erhöhung der Digestaviskosität verlängert sich die Verweildauer der Digesta im Verdauungstrakt auf bis zu 9 Stunden (DÄNICKE *et al.*, 1997a). Dadurch steht bei hochviskösen Diäten luminalen Mikroorganismen mehr Zeit zur Vermehrung zur Verfügung. Bewegliche Bakterien werden bei hohen Viskositäten in ihrer Motilität gehemmt (GREENBERG und CANALE-PAROLA, 1977). Ihre Motilität dürfte jedoch bei Viskositäten wie sie im Verdauungstrakt von Broilern durch getreidereiche Diäten hervor-

gerufen werden einen Selektionsvorteil bieten. Entsprechend sind die bei NSP-reichen Diäten ermittelten Keimzahlen höher als bei NSP-armen Diäten.

WAGNER und THOMAS (1978) konnten im Ileum von 4 Tage alten Broilern, welche mit einer auf Mais basierenden Diät gefüttert worden waren, pro cm² Darmschleimhaut $4,3 \times 10^7$ koloniebildende Einheiten (KbE) total anaerober Bakterien nachweisen. Demgegenüber wurden in dieser Untersuchung $7,5 \times 10^9$ KbE bei einer auf Roggen basierenden Diät festgestellt. Durch Zugabe von Pektin zur Mais-Diät stieg die Zahl der KbE sogar auf $1,1 \times 10^{10}$. Noch deutlicher war in dieser Untersuchung der Anstieg der Sporenbildner, deren Zahl um 6 bis 7 Zehnerpotenzen anstieg. Da in dieser Untersuchung ein unmittelbarer Zusammenhang zwischen Buttersäure- und Gasproduktion sowie Leistungsdepressionen hergestellt wurde, postulierten die Autoren Vertreter der sporenbildenden *Clostridium spp.* als Ursache für die schlechteren Leistungen. Eine große Zahl weiterer Untersuchungen bestätigt erhöhte Proliferationen sowohl lumen- als auch mucosaständiger Darmbakterien bei hochviskösen Diäten (UNTAWALE und MCGINNIS, 1979, BRENES *et al.*, 1989, HÜBENER *et al.*, 1998).

2.5.2 Einfluss eines veränderten Substratangebotes auf mikrobielle Gemeinschaften im Verdauungstrakt von Broilern

Da NSP nur für Bakterien mit entsprechender Enzymausstattung als Substrat geeignet sind, genießen solche Mikroorganismen einen Selektionsvorteil (VAHJEN und SIMON, 1997) und könnten sich gegenüber den übrigen Bakterien behaupten oder diese gar verdrängen.

BECKMANN *et al.* (2000a) isolierten aus dem Darm von Hühnern, welche mit Weizen und Roggen gefüttert wurden, 4 Bakterienarten mit der Fähigkeit, β -Glucane zu spalten. Die Autoren ordneten sie den *Enterococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Bacteroides spp.* und *Clostridium spp.* zu. In einer weiteren Untersuchung konnte für einen aus dem Verdauungstrakt von Broilern isolierten *E.faecium*-Stamm ebenfalls die Fähigkeit zum Abbau von β -Glucanen nachgewiesen und das Enzym charakterisiert werden (BECKMANN *et al.*, 2000b). Als weitere β -Glucan-spaltende Bakterien wurden *Streptococcus bovis* (EKINCI *et al.*, 1997), *Fibrobacter succinogenes* (TEATHER und ERFLE, 1990) und *Ruminococcus flavefaciens* (FLINT *et al.*, 1993) und weitere Pansenbakterien identifiziert.

2.5.3 Einfluss NSP-hydrolysierender Enzyme auf mikrobielle Gemeinschaften im Verdauungstrakt von Broilern bei NSP-reichen Diäten

Bei Zusatz NSP-hydrolysierender Enzyme zu Diäten mit einem hohen Anteil löslicher NSP werden veränderte mikrobielle Gemeinschaften gegenüber unsupplementierten Diäten beobachtet.

GRAHAM (1996) stellte neben einer signifikanten Abnahme der anaeroben Gesamtkeimzahlen von $12,3 \times 10^{10}$ auf $4,7 \times 10^{10}$ KbE im gesamten Dünndarm eine ebenfalls signifikante Reduktion von Laktobazillen, Enterokokken und coliformen Keimen bei Zusatz einer Xylanase zu einer auf Weizen basierenden Diät fest. Eine Abnahme gram positiver Kokken konnten VAHJEN und SIMON (1997) im Dünndarm 4 Tage alter Broiler zeigen, während in den Caeca keine Veränderung zu verzeichnen war. Bei 7 Tage alten Broilern konnte in dieser Untersuchung ebenfalls eine Abnahme

dieser Mikroorganismen, in den Caeca jedoch ein Anstieg beobachtet werden. HOCK *et al.* (1997a) zeigten in Jejunum und Caeca eine Verringerung von *C.perfringens* durch Zugabe einer Xylanase bei einer Weizendiät, während diese Spezies im Ileum nicht beeinflusst wurde. In einer weiteren Untersuchung konnten HOCK *et al.* (1997b) für anaerobe Kokken, Enterokokken, Laktobazillen, Bakteroides und coliforme Keime im Caecum keinen Einfluss einer Xylanase feststellen. Von diesen untersuchten Spezies zeigten im Dünndarm nur die Laktobazillen und coliformen Keime eine Verringerung. *C.perfringens* wurde in dieser Untersuchung weder im Dünndarm, noch in den Caeca beeinflusst. Der Einsatz eines Multienzympräparates, welches neben NSP-hydrolysierenden Enzymen auch Amylase enthielt, bei einer auf Triticale basierenden Diät konnte gegenüber einer Kontrollgruppe eine geringere Gesamtkeimzahl im Dünndarm beobachtet werden. In den Caeca waren keine Effekte zu verzeichnen (JAMROZ *et al.*, 1998b).

DÄNICKE *et al.* (1999e) konnten zeigen, dass die Art der Futterfette nicht nur die Verdaulichkeit von Nährstoffen beeinflusst. Auch die Wirkung einer Xylanase auf mikrobielle Gemeinschaften im Verdauungstrakt zeigte Abhängigkeiten von der Fettquelle.

2.6 Identifizierung und Quantifizierung von Mikroorganismen

2.6.1 Mikrobiologische Methoden

Über lange Zeit bestand in der Anwendung mikrobiologischer Methoden die einzige Möglichkeit zur Beurteilung mikrobieller Gemeinschaften im Verdauungstrakt. Über die Auswahl der Substrate, die Inkubationstemperatur und weitere Faktoren, wie z.B. die Menge des zur Verfügung gestellten Sauerstoffes, kann das Wachstumspotential ausgewählter Bakterien bestimmt werden. Daneben besteht die Möglichkeit mikrobielle Aktivitäten über den Nachweis von Metaboliten des bakteriellen Stoffwechsels zu erfassen. Zu diesen Metaboliten gehören beispielsweise flüchtige Fettsäuren und Laktat. Die Anwendung mikrobiologischer Methoden zur Identifizierung und Quantifizierung von Mikroorganismen ist jedoch mit einer großen Zahl methodischer Probleme verbunden. Bereits bei der Entnahme von Probenmaterialien muss darauf geachtet werden, die zur Untersuchung vorgesehenen Mikroorganismen nicht zu schädigen (SAVAGE, 1977, JONES, 1991). Für eine Kultivierung muss die physiologische Nische der jeweiligen Mikroorganismen exakt imitiert werden (WARD *et al.*, 1990), um ein optimales Wachstumsergebnis zu erreichen. Insbesondere das komplexe Habitat Verdauungstrakt lässt sich nur schwer simulieren (SALANITRO *et al.*, 1978). Lassen sich nahezu optimale Wachstumsbedingungen schaffen, entsprechen die kultivierten Mikroorganismen oft nicht exakt den deskriptiven Schemata (STAHL *et al.*, 1988). Diese Probleme potenzieren sich in komplexen Habitaten (AMANN *et al.*, 1995). Außerdem ist davon auszugehen, dass ein grosser Teil der lebensfähigen Mikroorganismen keine sichtbaren Kolonien ausbildet oder während der Probenaufbereitung in ein nicht kultivierbares Stadium übertritt (AMANN *et al.*, 1995). Eine weitere mögliche Fehlerquelle besteht in der visuellen Quantifizierung von Mikroorganismen. STALEY und KONOPKA (1985) stellten fest, dass mikroskopische Lebendzählungen und K_BE-Bestimmungen bei ein und derselben Probe erheblich differieren können und schufen hierfür den Begriff der „great

plate count anomaly“. Bisher nicht kultivierte oder noch nicht kultivierbare Mikroorganismen werden bei mikrobiologischen Untersuchungen bakterieller Gemeinschaften im Verdauungstrakt nicht erfasst (JONES *et al.*, 1991). BARNES und IMPEY (1970) schätzten nach Versuchen mit unterschiedlichen Kultivierungsmethoden, dass im Caecum von Broilern lediglich 25 % der Mikroorganismen zu kultivieren waren. Für marine Habitate oder Belebtschlamm werden Anteile kultivierbarer Mikroorganismen von höchstens 0,3 % bzw. 15 % angegeben (AMANN *et al.*, 1995). Diese methodischen Grenzen lassen sich mittels klassischer Methoden der Mikrobiologie nicht überwinden (MACKIE *et al.*, 1999, RICKE und PILLAI, 1999, O’SULLIVAN, 1999).

2.6.2 Molekularbiologische Methoden

Molekularbiologische Ansätze zur Beschreibung mikrobieller Populationen in komplexen Habitaten, wie es der Verdauungstrakt darstellt, weisen gegenüber Kultivierungstechniken zahlreiche Vorteile auf. Sie bieten die Möglichkeit, Mikroorganismen ohne Kultivierung in ihrem natürlichen Habitat nachzuweisen (AMANN *et al.*, 1995) und umgehen die Problematik, dass aufgrund des einfachen morphologischen Aufbaus und der schlechten Kultivierbarkeit vieler Mikroorganismen nur wenige Anhaltspunkte zur Differenzierung gegeben sind (OLSEN *et al.*, 1986). Die Anwendung dieser Methoden konnte zeigen, dass tatsächlich eine große Zahl von Mikroorganismen durch mikrobiologische Methoden nicht erfasst werden (ORVOS, 1992, WAGNER *et al.* 1993, DORÉ, 1995).

Molekularbiologische Ansätze bedienen sich entweder der DNA, dem konservativen Träger der Erbinformation, oder der RNA, welche transkriptive oder translative Prozesse in der Zelle kennzeichnet. Der spezifische Nachweis der DNA über Vervielfältigung mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) hat sich als Methode zum qualitativen Nachweis von Bakteriengruppen und -arten bewährt. Gegenstand der meisten Arbeiten mit dieser Technik ist der qualitative oder semiquantitative Nachweis von obligat pathogenen Mikroorganismen, vor allem solcher, die eine gesundheitliche Relevanz für den Menschen besitzen. So sind Methoden zur schnellen Diagnostik von *Salmonella spp.* (z.B. PILLAI *et al.*, 1994) oder *Campylobacter spp.* (z.B. OYOFO *et al.*, 1997) vorhanden. Doch auch Mikroorganismen, denen für den Wirt negative Eigenschaften zugeschrieben werden, sind Gegenstand molekularbiologischer Untersuchungen. Der Nachweis von *Clostridium spp.* (z.B. MIWA *et al.*, 1997) oder pathogener *E.coli* (z.B. NAGANO *et al.*, 1998, GÖBEL *et al.*, 2000) mittels PCR ist möglich.

Der Nachweis der DNA spiegelt in erster Linie den genetischen Status mikrobieller Gemeinschaften und deren mögliches Potential wieder (TEBBE und VAHJEN, 1993). Quantitative Ansätze der kompetitiven PCR können mit hohem Aufwand und vielen Fehlerquellen behaftet sein (BECKER *et al.*, 2000).

Ribosomale RNA bietet sich wegen ihres großen Anteils an den Gesamtnukleinsäuren einer Zelle (ca. 80 % der RNA) und ihrer Länge (ca. 1600 Nukleotide) besonders als Ziel für molekularbiologische Untersuchungen an (OLSEN *et al.*, 1986, OLSEN und WOESE, 1993). AMANN und LUDWIG (2000) beschreiben die Vorzüge der rRNA-Analytik und postulieren sowohl quantitative dot/slot blot Hybridisierung, sowie FISH (Fluorescent In Situ Hybridization) als Methoden der Wahl zur Beschreibung komplexer Habitate. Die Existenz umfangreicher rRNA-Datenbanken, welche über das Internet allge-

mein zugänglich sind, ermöglicht eine schnelle Entwicklung neuer 16S/23S rRNA gerichteter Oligonukleotidsonden. Es besteht ebenfalls über das Internet die Möglichkeit, eine theoretische Spezifität solcher Oligonukleotide zu ermitteln und so einen großen Teil einer Optimierung von Sonden *in silico* zu bewerkstelligen. Allerdings bereitet ein hoher Grad an Übereinstimmung von Nukleinsäuresequenzen Probleme bei der molekularbiologischen Differenzierung von Mikroorganismen einer Bakteriengruppe. Da sich die 16S und 23S rRNA-Sequenzen im Verlauf der Evolution nur sehr wenig verändert haben, bestehen hohe Übereinstimmungen dieser Sequenzen zwischen eng verwandten Mikroorganismen (FOX *et al.*, 1992). Dadurch besteht die Möglichkeit, dass keine geeignete Sondensequenz gefunden werden kann, um *in praxi* verschiedene Vertreter einer Bakteriengruppe voneinander zu differenzieren. Tabelle 9 gibt die Homologien in der Sequenz der 16S rRNA ausgewählter Vertreter der *Enterococcus spp.* wieder. Sie liegen in keinem Fall unterhalb von 95 % und reichen bis zu 99,8 %.

Tabelle 7: Homologien der 16S rRNA-Sequenzen von Vertretern der *Enterococcus spp.* (PATEL *et al.*, 1998)

homolog (%) mit:	<i>E. malodoratus</i>	<i>E. columbae</i>	<i>E. dispar</i>	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. hirae</i>	<i>E. mundtii</i>	<i>E. avium</i>	<i>E. casseliflavus</i>	<i>E. sulfureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. saccharolyticus</i>	<i>E. durans</i>	<i>E. faecium</i>
<i>E. caecorum</i>	95,9	97,9	95,8	96,6	95,8	95,7	95,9	96,8	95,4	96,8	96,6	95,8	95,7
<i>E. malodoratus</i>		96,0	97,8	98,7	99,4	99,3	99,5	98,8	97,3	96,7	97,8	99,3	99,1
<i>E. columbae</i>			96,3	96,5	95,8	95,8	96,0	96,4	95,5	95,2	96,7	95,9	95,8
<i>E. dispar</i>				97,9	97,7	97,6	97,6	97,9	96,6	96,9	97,7	97,7	97,7
<i>E. gallinarum</i>					98,5	98,4	98,4	99,9	97,6	97,3	98,8	98,5	98,4
<i>E. hirae</i>						99,5	99,5	98,5	97,1	97,0	97,7	99,8	99,7
<i>E. mundtii</i>							99,5	98,4	97,1	96,9	97,6	99,5	99,4
<i>E. avium</i>								98,5	97,3	96,6	97,7	99,4	99,2
<i>E. casseliflavus</i>									97,7	97,3	99,0	98,4	98,3
<i>E. sulfureus</i>										96,4	97,9	97,0	96,9
<i>E. faecalis</i>											97,4	97,0	97,3
<i>E. saccharolyticus</i>												97,7	97,5
<i>E. durans</i>													99,8