

5. Ergebnisse

5.1 Zootechnische Leistungen

Eine Darstellung der zootechnischen Leistungen der Tiere aller Versuchsgruppen ist in Tabelle 15 wiedergegeben. Da der Tierversuch nicht als Leistungsversuch ausgelegt war, relativieren geringe Tierzahlen die getroffenen Aussagen.

5.1.1 Lebendmassezunahme

Die Lebendmassezunahme der Tiere mit Mais-Soja-Diät (Gruppe A) war über den gesamten Versuchszeitraum höher als die der Tiere mit Weizen-Roggen-Diät (Gruppe B) und der Tiere mit Weizen-Roggen-Diät mit Xylanasezusatz (Gruppe C). In der 1., 3. und 4. Lebenswoche lagen die Zunahmen der Tiere der Gruppe C nur gering über denen der Gruppe B. Gruppe C wies in der 2. Lebenswoche deutlich höhere Zunahmen auf. In der 5. Lebenswoche lagen sie hingegen, wenn auch bei stark unterschiedlichen Leistungen der Einzeltiere der Gruppe C, unter denen der Gruppe B.

5.1.2 Futterverzehr

Die Tiere der Gruppe A nahmen in der 1. Lebenswoche und zwischen der 3. und 5. Lebenswoche mehr Futter auf als die Tiere der beiden übrigen Gruppen. In der 2. Lebenswoche nahmen diese Tiere zwar ebenfalls mehr Futter auf als die der Gruppe B, jedoch weniger als die der Gruppe C. Der Futterverzehr der Tiere der Gruppe C lag zwischen der 1. und 3. Lebenswoche, in der 1. Lebenswoche deutlich, über dem der Gruppe B. Für die 4. und 5. Lebenswoche konnte ein geringerer Futterverzehr gegenüber den Tieren der Gruppe B beobachtet werden.

5.1.3 Futteraufwand

In der 1. Lebenswoche war der rechnerisch ermittelte Futteraufwand (kg aufgenommenes Futter/kg Lebendmassezunahme) in der Gruppe A höher als bei den Tieren der Gruppe B. Gegenüber Gruppe C war er geringfügig niedriger. In der darauf folgenden Lebenswoche wurde in Gruppe A deutlich weniger Futter aufgewendet als in den Gruppen B und C. Während in der 3. und 4. Lebenswoche sehr geringe Unterschiede zwischen den Gruppen vorlagen, wiesen in der letzten Lebenswoche die Tiere der Gruppe B den geringsten und die Tiere der Gruppe C den höchsten Futteraufwand auf. Dabei zeigten sich in Gruppe C große tierindividuelle Unterschiede.

Tabelle 15: Zootechnische Leistungen der Versuchstiere

Versuchsgruppe		Gruppe A	Gruppe B	Gruppe C
1. Lebenswoche				
Tierzahl	n	52	54	49
Lebendmasse (1. Lebenstag)	g	33,6 ± 0,4	32,9 ± 0,4	33,1 ± 0,6
Relativ		100	98	99
Lebendmasse (7. Lebenstag)		117,4 ± 1,8	97,7 ± 3,0	100,3 ± 5,7
Relativ		100	83	85
Lebendmassezunahme	g	83,8 ± 1,9	64,7 ± 2,9	67,2 ± 5,7
Relativ		100	77	80
Futtermverzehr	g	111,0 ± 6,3	73,7 ± 6,7	98,6 ± 12,3
Relativ		100	66	89
Futtermaufwand*		1,3 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,478 ± 0,3
Relativ		100	86	112
2. Lebenswoche				
Tierzahl	n	37	34	33
Lebendmasse (14. Lebenstag)	g	321,9 ± 11,1	245,6 ± 3,5	266,6 ± 26,1
Relativ		100	76	83
Lebendmassezunahme	g	204,5 ± 10,8	147,9 ± 5,1	166,2 ± 21,2
Relativ		100	72	81
Futtermverzehr	g	245,6 ± 39,1	235,7 ± 37,0	251,8 ± 26,7
Relativ		100	96	102
Futtermaufwand*		1,2 ± 0,2	1,6 ± 0,3	1,5 ± 0,1
Relativ		100	133	127
3. Lebenswoche				
Tierzahl	n	28	25	24
Lebendmasse (21. Lebenstag)	g	658,1 ± 41,0	516,4 ± 38,8	551,2 ± 27,7
Relativ		100	78	84
Lebendmassezunahme	g	336,1 ± 31,5	270,8 ± 39,5	284,6 ± 31,0
Relativ		100	81	85
Futtermverzehr	g	482,3 ± 37,5	370,0 ± 10,6	381,4 ± 27,0
Relativ		100	77	79
Futtermaufwand*		1,4 ± 0,1	1,4 ± 0,2	1,4 ± 0,2
Relativ		100	96	93
4. Lebenswoche				
Tierzahl		19	15	13
Lebendmasse (28. Lebenstag)	g	1084,7 ± 85,7	811,5 ± 47,5	848,5 ± 39,9
Relativ		100	75	78
Lebendmassezunahme	g	426,7 ± 49,4	295,1 ± 24,7	297,3 ± 49,8
Relativ		100	69	70
Futtermverzehr	g	753,0 ± 35,5	560,3 ± 30,8	531,7 ± 29,4
Relativ		100	74	70
Futtermaufwand*		1,8 ± 0,2	1,9 ± 0,1	1,8 ± 0,4
Relativ		100	107	103
5. Lebenswoche				
Tierzahl		16	11	10
Lebendmasse (35. Lebenstag)	g	1621,3 ± 117,6	1257,7 ± 146,2	1212,6 ± 195,6
Relativ		100	78	75
Lebendmassezunahme	g	536,6 ± 34,2	489,3 ± 34,5	364,1 ± 158,0
Relativ		100	91	68
Futtermverzehr	g	912,8 ± 47,7	729,9 ± 14,7	697,8 ± 74,6
Relativ		100	80	76
Futtermaufwand*		1,7 ± 0,1	1,5 ± 0,1	2,2 ± 0,8
Relativ		100	88	127

Gruppe A: Mais-Soja-Diät, Gruppe B: Weizen-Roggen-Diät, Gruppe C: Weizen-Roggen-Diät + Xylanase

* kg Futter je kg Zunahme

5.2 Anteil der Tiere mit veränderter Kotkonsistenz („sticky droppings“) und Abgänge

Tabelle 16 gibt den Anteil der Tiere mit „sticky droppings“ und die nicht durch Tötung bedingten Abgänge an Tieren in den Futtergruppen wieder.

Tabelle 16: Tiere mit „sticky droppings“ und Abgänge

Versuchsgruppe		Gruppe A	Gruppe B	Gruppe C
1. Lebenswoche				
Tierzahl (1. Lebenstag)		68	69	64
Tierzahl (7. Lebenstag)	n	52	54	49
sticky droppings	n	6	7	2
Anteil	%	11,5	13,0	4,1
Abgänge	n	1	0	0
2. Lebenswoche				
Tierzahl	n	37	34	33
sticky droppings	n	7	11	12
Anteil	%	18,9	32,3	36,4
Abgänge	n	0	5	1
3. Lebenswoche				
Tierzahl	n	28	25	24
sticky droppings	n	2	4	1
Anteil	%	7,1	16,0	4,2
Abgänge	n	0	0	0
4. Lebenswoche				
Tierzahl	n	19	15	13
sticky droppings	n	1	2	1
Anteil	%	5,3	13,3	7,7
Abgänge	n	0	1	2
5. Lebenswoche				
Tierzahl	n	19	14	13
sticky droppings	n	2	3	1
Anteil	%	12,5	27,3	10,0
Abgänge	n	0	1	0

Gruppe A: Mais-Soja-Diät, **Gruppe B:** Weizen-Roggen-Diät, **Gruppe C:** Weizen-Roggen-Diät + Xylanase

Über die gesamte Versuchsperiode trat bei 18 Tieren der Gruppe A, 27 Tieren der Gruppe B und 17 Tieren der Gruppe C das Phänomen der „sticky droppings“ auf. In der 1. Lebenswoche der Tiere lag der Anteil der Tiere mit veränderter Kotkonsistenz in der Gruppe C deutlich unter den Anteilen in den Gruppe A und B. In der 2. Lebenswoche traten „sticky droppings“ in allen 3 Gruppen vergleichsweise häufig auf, wobei die Tiere der Gruppe A den geringsten Anteil aufwiesen. Im Versuchsabschnitt von der 3. bis 5. Lebenswoche ging das Auftreten von „sticky droppings“ deutlich zurück. Es waren geringfügig mehr Tiere der Gruppe B gegenüber den Gruppen A und C betroffen. Während der gesamten Versuchsperiode waren die Abgänge an Versuchstieren niedrig. In der 2. Lebenswoche fallen jedoch hohe Abgänge in Gruppe B auf.

5.3 Agardiffusionsassays

5.3.1 Intestinale Xylanaseaktivitäten

Durch Messung von Xylanaseaktivitäten in Digestaüberständen aus den Darmabschnitten Jejunum, Ileum I und Ileum II sollte vorrangig geprüft werden, ob durch eine Weizen-Roggen-Diät xylana-seproduzierende Mikroorganismen begünstigt werden. Daneben ergab sich durch diese Messung eine indirekte Überprüfung der Aktivität des zugegebenen Enzyms. Die Messung der Xylanaseaktivitäten in den Digestaüberständen der Gruppe C, deren Diät mit einem solchen Enzym ergänzt worden war, erbrachte stets die höchsten Werte gegenüber den anderen Gruppen (Abbildung 3).

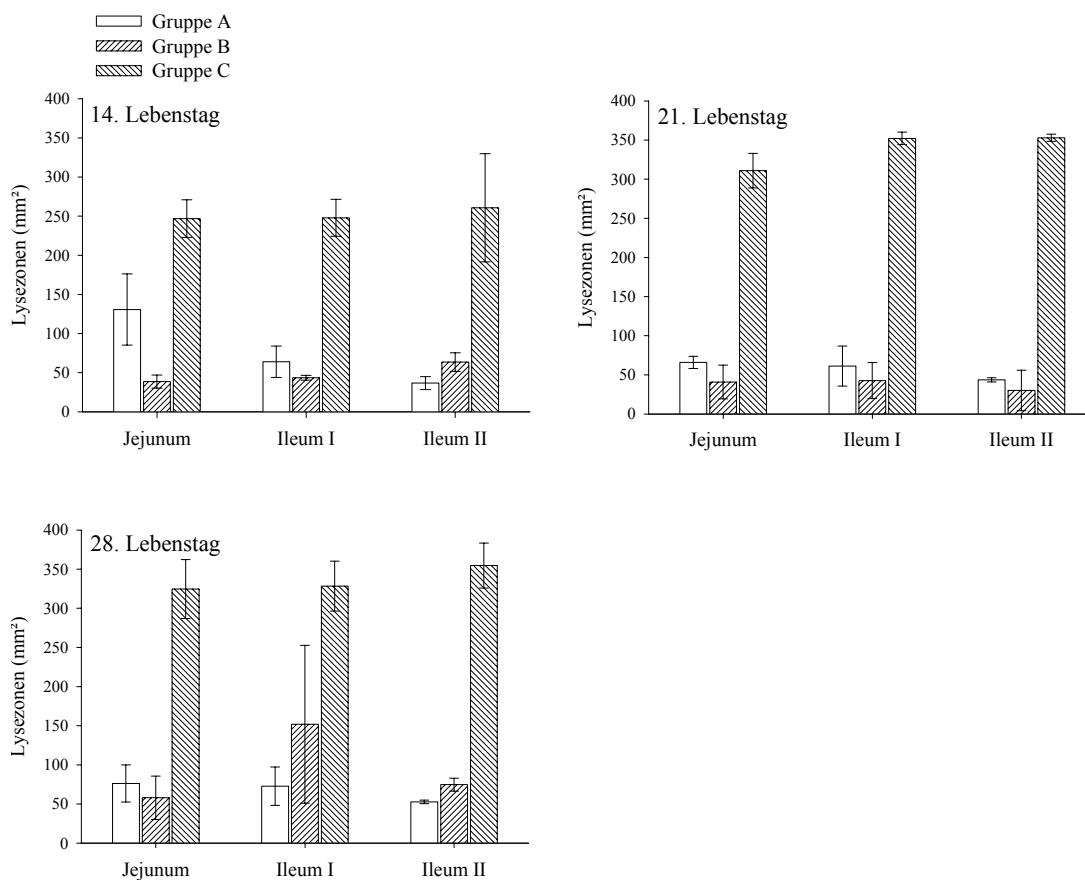


Abbildung 3: Intestinale Xylanaseaktivitäten in Digestaüberständen von Broilern.

Arithmetisches Mittel und Standardabweichungen der Parallelproben (n = 3).

Gruppe A: Mais-Soja-Diät, **Gruppe B:** Weizen-Roggen-Diät, **Gruppe C:** Weizen-Roggen-Diät + Xylanase

Bei dieser Gruppe war an den einzelnen Lebenstagen eine teilweise geringfügige aber stetige Aktivitätszunahme von den vorderen zu den hinteren Teilen des Dünndarms festzustellen. Außerdem zeigte sich eine Entwicklung zu höheren Xylanaseaktivitäten im Verdauungstrakt mit steigendem Alter der Tiere. Am 14. Lebensstag waren für Gruppe A im Jejunum und vorderen Ileum höhere und im terminalen Ileum niedrigere Aktivitäten dieses Enzyms gegenüber Gruppe B zu beobachten. In allen Darmabschnitten wurden am 21. Lebensstag höhere Werte für Gruppe A bestimmt. Auch in den Jejunumüberständen der Gruppe A vom 28. Lebensstag lagen die gemessenen Aktivitäten über

denen der Gruppe B. In beiden Teilen des Ileums lagen höhere Werte für Gruppe B vor. Innerhalb der Gruppe A ließen sich im Jejunum stets die höchsten und im terminalen Ileum die niedrigsten Aktivitäten bestimmen. Dabei war eine deutliche Verringerung der Xylanaseaktivitäten im Jejunum vom 14. zum 21. Lebenstag zu beobachten. Bei den Proben der Gruppe B waren mit steigendem Alter der Tiere im Jejunum zunehmend höhere Werte zu verzeichnen. In beiden Teilen des Ileums konnte eine Verringerung vom 14. zum 21. Lebenstag und eine Zunahme zum 28. Lebenstag festgestellt werden.

Die statistische Bewertung der in den einzelnen Darmabschnitten ermittelten Enzymaktivitäten erfolgte unter Einbeziehung der für alle Probenahmetage bestimmten Werte. Dabei bestätigten sich die hohen Xylanaseaktivitäten in Digestaüberständen der Gruppe C gegenüber den anderen Gruppen. Diese Unterschiede waren statistisch zu sichern (Tabelle 17). Eine Zunahme der Aktivitäten im Verlauf des Verdauungstraktes ist bei dieser Betrachtungsweise festzustellen, jedoch statistisch nicht zu sichern. Die Tendenz zu höheren Aktivitäten im Jejunum bei den Tieren der Gruppe A war im Vergleich zu Gruppe B statistisch zu sichern. Die bei der Betrachtung der Mittelwerte für die einzelnen Tage bei Gruppe A festgestellte Entwicklung zu geringeren Xylanaseaktivitäten im Verlauf des Verdauungstraktes bestätigte sich. Die Aktivitäten im Jejunum waren signifikant höher als in beiden Teilen des Ileums. Die Tiere der Gruppe B zeigten hingegen einen Anstieg der Aktivitäten vom Jejunum zum vorderen Ileum, gefolgt von einer Verringerung zum terminalen Ileum.

Tabelle 17: Abhängigkeit intestinaler Xylanaseaktivitäten von der Diät und der Lokalisation im Verdauungstrakt

<u>Jejunum</u>			<u>Ileum I</u>			<u>Ileum II</u>		
	N	Lysezonen (mm ²)		N	Lysezonen (mm ²)		N	Lysezonen (mm ²)
Gruppe A	9	90,89 ± 43,86 ^{b,1}	Gruppe A	9	59,46 ± 25,53 ^{b,2}	Gruppe A	9	44,38 ± 8,85 ^{b,2}
Gruppe B	9	45,85 ± 23,91 ^c	Gruppe B	9	79,43 ± 83,43 ^b	Gruppe B	9	55,00 ± 26,36 ^b
Gruppe C	9	294,20 ± 47,17 ^a	Gruppe C	9	309,44 ± 53,40 ^a	Gruppe C	9	322,76 ± 65,38 ^a

Gruppe A: Mais-Soja-Diät, **Gruppe B:** Weizen-Roggen-Diät, **Gruppe C:** Weizen-Roggen-Diät + Xylanase

Unterschiedliche hochgestellte Buchstaben innerhalb einer Spalte und unterschiedliche hochgestellte Zahlen innerhalb einer Zeile unterscheiden sich mit $p < 0,05$ signifikant (Scheffé).

5.3.2 Intestinale β -Glucanaseaktivitäten

Die Messung mikrobieller β -Glucanaseaktivitäten erfolgte, um einen Einfluss löslicher NSP in der Diät auf β -Glucan-spaltende Mikroorganismen indirekt zu prüfen. Mögliche zusätzliche Effekte der Enzymzugabe sollten ebenfalls erfasst werden. Die Bestimmung der β -Glucanaseaktivitäten in Digestaüberständen aus den Darmabschnitten Jejunum, Ileum I und Ileum II zeigte an allen Lebenstagen die höchsten Enzymaktivitäten in den Proben der Gruppe C (Abbildung 4). Lediglich am 14. Lebenstag der Tiere waren im vorderen Ileum nahezu identische Werte in den Gruppen C und B zu beobachten. Letztere wies stets höhere Aktivitäten dieser Enzyme gegenüber Gruppe A auf. Gruppe A zeigte regelmäßig zunächst eine Zunahme der gemessenen Aktivitäten vom Jejunum zum vorderen und eine Verringerung zum terminalen Ileum. Die Enzymaktivitäten im Jejunum und terminalen Ileum nahmen vom 14. zum 21. Lebenstag ab, um dann zum 28. Lebenstag wieder anzusteigen, während für die Proben aus dem vorderen Ileum mit zunehmendem Alter der Tiere eine stetige Zu-

nahme der gemessenen Aktivitäten zu verzeichnen war. Die Gruppen B und C wiesen eine Entwicklung zu höheren β -Glucanaseaktivitäten im Verlauf des Verdauungstraktes auf. Bei den Tieren der Gruppe B waren in allen Darmabschnitten jeweils am 21. Lebenstag der Tiere die geringsten und am 28. Lebenstag die höchsten Werte zu messen, während in den Proben der Gruppe C mit steigendem Alter der Tiere zunehmend höhere Aktivitäten nachzuweisen waren.

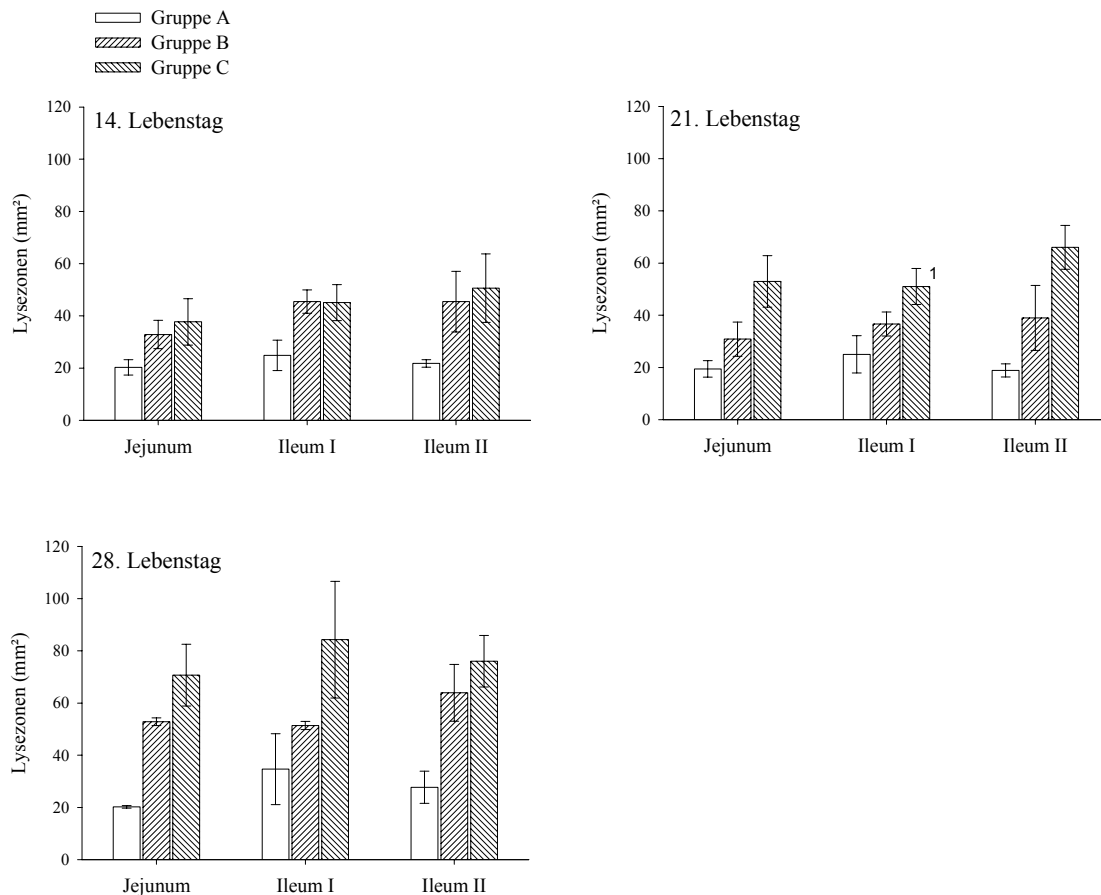


Abbildung 4: Intestinale β -Glucanaseaktivitäten in Digestaüberständen von Broilern. Arithmetisches Mittel und Standardabweichungen der Parallelproben (n = 3, ¹: n = 2). **Gruppe A:** Mais-Soja-Diät, **Gruppe B:** Weizen-Roggen-Diät, **Gruppe C:** Weizen-Roggen-Diät + Xylanase

Zur statistischen Bewertung der in den einzelnen Darmabschnitten ermittelten β -Glucanaseaktivitäten wurden die an allen Probenahmetagen erhobenen Werte herangezogen. Dadurch zeigte sich, dass die Aktivitäten in den Proben der Gruppe A in allen Darmabschnitten niedriger waren als bei Gruppe B und Gruppe C (Tabelle 18). Die Tiere der Gruppe C wiesen stets die signifikant höchsten Werte auf. Sowohl für das Jejunum als auch das terminale Ileum waren die Unterschiede zwischen den Werten der Gruppen A und B statistisch zu sichern. Für alle 3 Gruppen war eine Zunahme der Aktivitäten vom Jejunum zum Ileum festzustellen. Allerdings konnte bei den Tieren der Gruppe A im terminalen Ileum eine höhere Aktivität als im vorderen Ileum nachgewiesen werden, während die Proben der Gruppen B und C eine kontinuierliche Zunahme im Verlauf des Verdauungstraktes zeigten.

Tabelle 18: Abhängigkeit intestinaler β -Glucanaseaktivitäten von der Diät und der Lokalisation im Verdauungstrakt

Jejunum			Ileum I			Ileum II		
	N	Lysezonen (mm ²)		N	Lysezonen (mm ²)		N	Lysezonen (mm ²)
Gruppe A	9	20,31 ± 2,45 ^c	Gruppe A	9	28,19 ± 11,14 ^b	Gruppe A	9	22,81 ± 5,71 ^c
Gruppe B	9	38,85 ± 11,78 ^b	Gruppe B	9	44,52 ± 7,59 ^b	Gruppe B	9	49,55 ± 16,67 ^b
Gruppe C	9	53,77 ± 17,96 ^a	Gruppe C	8	61,27 ± 25,02 ^a	Gruppe C	9	64,21 ± 15,82 ^a

Gruppe A: Mais-Soja-Diät, **Gruppe B:** Weizen-Roggen-Diät, **Gruppe C:** Weizen-Roggen-Diät + Xylanase
 Unterschiedliche hochgestellte Buchstaben innerhalb einer Spalte und unterschiedliche hochgestellte Zahlen innerhalb einer Zeile unterscheiden sich mit $p < 0,05$ signifikant (Scheffé).

5.3.3 Intestinale Lipaseaktivitäten

Da die Fettverdauung als ein limitierender Faktor in der Broilermast anzusehen ist, sollten durch die Messung der Lipaseaktivitäten mögliche Einflüsse löslicher NSP und der Xylanasezugabe ermittelt werden. Bei allen Gruppen fielen die im Vergleich zu den Darmabschnitten Jejunum und Ileum I hohen Aktivitäten von Lipasen im Duodenum auf (Abbildung 5).

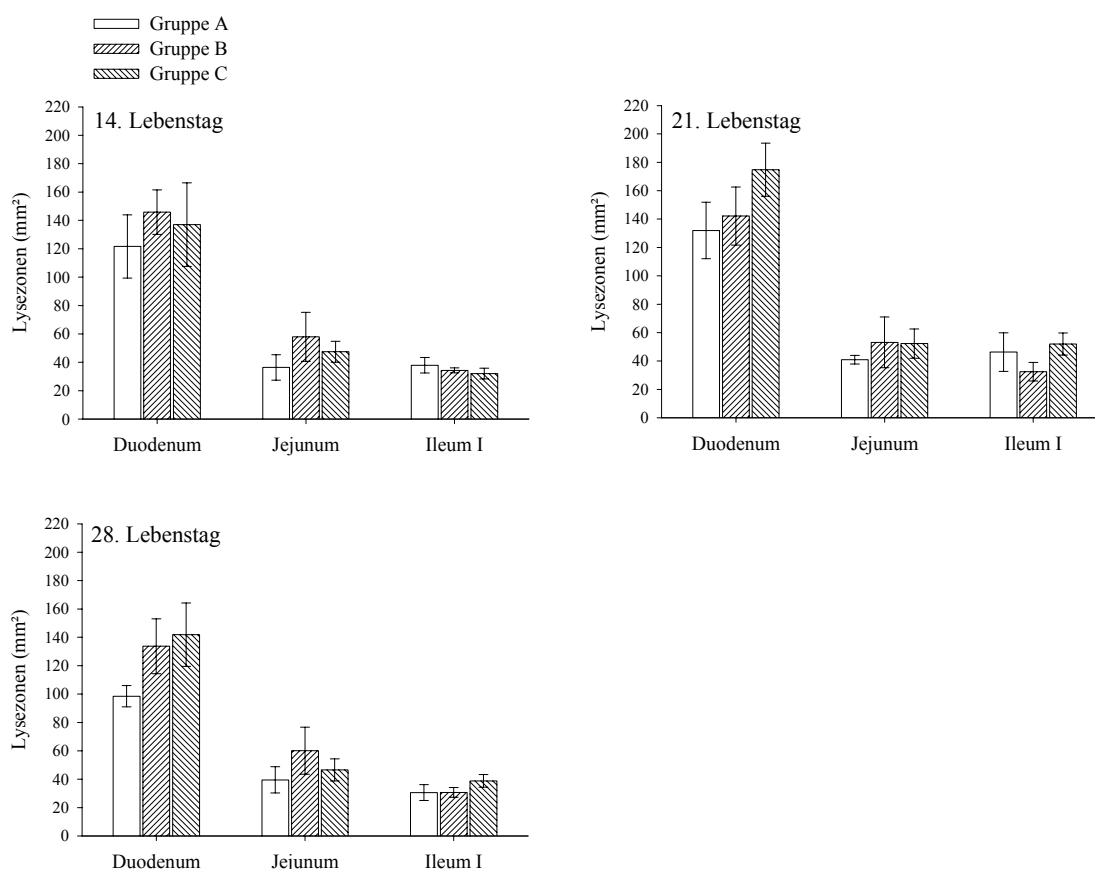


Abbildung 5: Intestinale Lipaseaktivitäten in Digestaüberständen von Broilern. Arithmetisches Mittel und Standardabweichungen der Parallelproben (n = 3).

Gruppe A: Mais-Soja-Diät, **Gruppe B:** Weizen-Roggen-Diät, **Gruppe C:** Weizen-Roggen-Diät + Xylanase

In nahezu allen Fällen wurden die geringsten Lipaseaktivitäten in den Proben der Maisgruppe gemessen. Lediglich am 21. und 28. Lebenstag wurden im vorderen Ileum höhere oder gleiche Aktivi-

täten gegenüber Gruppe B festgestellt. Die Gruppe mit Xylanasezusatz wies am 14. Lebenstag geringere Aktivitäten als Gruppe B auf. Im vorderen Ileum war dieser Unterschied nur gering ausgeprägt. Am 21. und 28. Lebenstag zeigten sich hingegen im Duodenum und vorderen Ileum höhere Lipaseaktivitäten bei den Tieren der Gruppe C. Auch an diesen Lebenstagen waren die für das Jejunum bestimmten Werte bei Gruppe B höher. Neben der bereits erwähnten Verringerung der Lipaseaktivitäten vom Duodenum zum Jejunum hin, zeigten alle Gruppen auch eine tendenzielle Abnahme der ermittelten Werte vom Jejunum zum vorderen Ileum. Diese Entwicklung war bei den Tieren der Gruppe B deutlicher und bei den Tieren der Gruppe A weniger deutlich als bei den Tieren der Gruppe C ausgeprägt. Insgesamt war bei Gruppe B eine stetige Verringerung der Lipaseaktivitäten mit zunehmendem Alter zu beobachten. Für die Gruppen A und C nahmen die gemessenen Werte in der Summe mit steigendem Alter zunächst zu und dann wieder ab.

Betrachtet man die in den einzelnen Darmabschnitten über den gesamten Versuchszeitraum erhobenen Werte, ließen sich in Duodenum und vorderem Ileum für Gruppe A die niedrigsten und für Gruppe C die höchsten Werte bestimmen (Tabelle 19). Der Unterschied zwischen diesen Gruppen war für das Duodenum statistisch zu sichern. Im Jejunum waren die für Gruppe A bestimmten Werte wiederum die geringsten. Hier waren jedoch für Gruppe B höhere Werte als für Gruppe C zu messen. Die aus Abbildung 5 ersichtlichen gegenüber den anderen Darmabschnitten allgemein höheren Lipaseaktivitäten in den Digestaüberständen aus dem Duodenum ließen sich bei allen 3 Gruppen bestätigen. Für alle 3 Gruppen waren im Duodenum signifikant höhere Lipaseaktivitäten zu messen als in den darauf folgenden Abschnitten des Verdauungstraktes. Für die Tiere der Gruppe A waren im Jejunum und vorderen Ileum nahezu gleich hohe Werte festzustellen. Bei Gruppe C war der Unterschied zwischen diesen Darmabschnitten deutlicher, aber ebenfalls nicht zu sichern. Gruppe B hingegen zeigte im vorderen Ileum signifikant niedrigere Werte als im Jejunum.

Tabelle 19: Abhängigkeit intestinaler Lipaseaktivitäten von der Diät und der Lokalisation im Verdauungstrakt

<u>Duodenum</u>			<u>Jejunum</u>			<u>Ileum I</u>		
	N	Lysezonen (mm ²)		N	Lysezonen (mm ²)		N	Lysezonen (mm ²)
Gruppe A	9	117,4 ± 24,0 ^{b,1}	Gruppe A	9	38,9 ± 8,4 ²	Gruppe A	9	38,3 ± 11,7 ²
Gruppe B	9	140,6 ± 20,5 ^{ab,1}	Gruppe B	9	57,1 ± 18,5	Gruppe B	9	32,5 ± 4,9 ²
Gruppe C	9	151,2 ± 31,0 ^{a,1}	Gruppe C	9	48,8 ± 9,5 ²	Gruppe C	9	40,6 ± 11,3 ²

Gruppe A: Mais-Soja-Diät, Gruppe B: Weizen-Roggen-Diät, Gruppe C: Weizen-Roggen-Diät + Xylanase
 Unterschiedliche hochgestellte Buchstaben innerhalb einer Spalte und unterschiedliche hochgestellte Zahlen innerhalb einer Zeile unterscheiden sich mit $p < 0,05$ signifikant (Scheffé).

5.3.4 Intestinale Gallensäurehydrolaseaktivitäten

Da eine mikrobielle Dekonjugation von Gallensäuren möglicherweise Auswirkungen auf die Fettverdauung besitzt, wurde die Aktivität dieser Enzyme in den Darmabschnitten Duodenum, Jejunum und Ileum I geprüft. Die Aktivitäten mikrobieller Gallensäurehydrolasen zeigten in diesen Darmabschnitten uneinheitlich ausgeprägte Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen (Abbildung 6). Insgesamt waren im Vergleich der Gruppen in den Digestaüberständen der Gruppe B eher niedrige und in den Überständen der Gruppe A höhere Aktivitäten nachzuweisen.

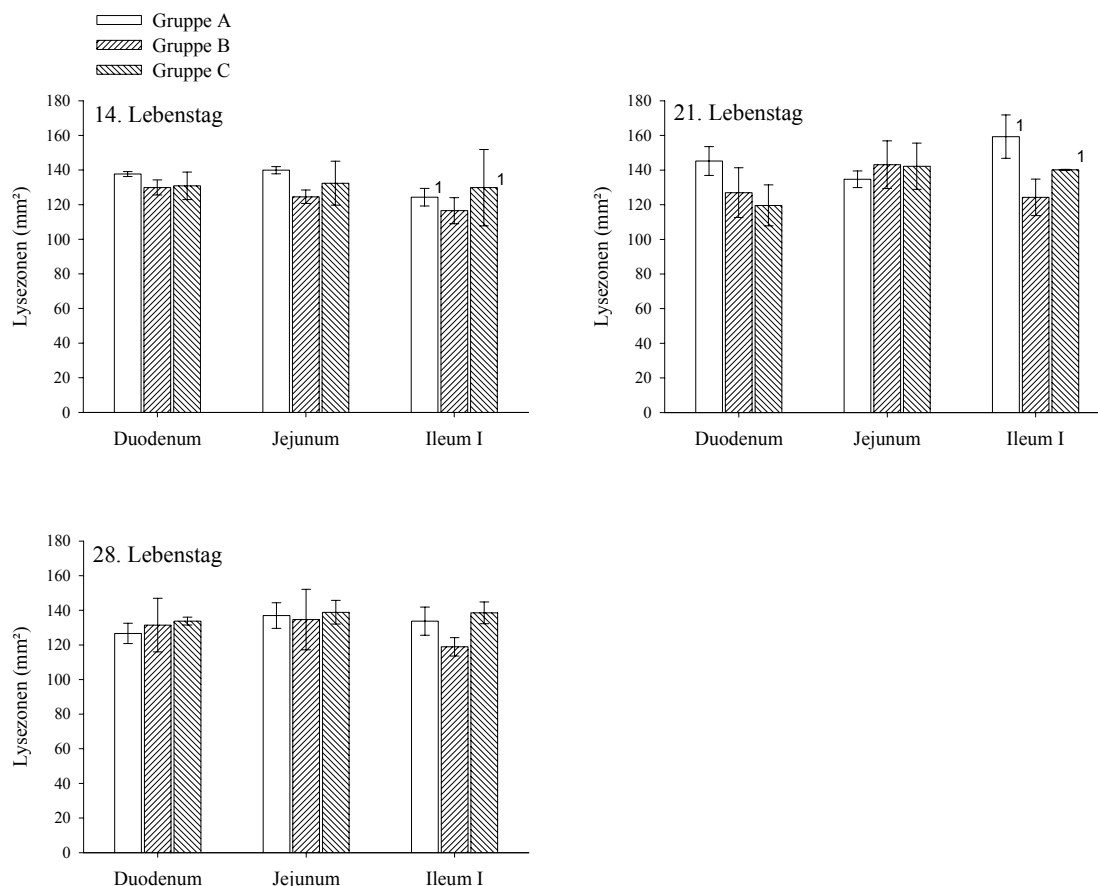


Abbildung 6: Intestinale Gallensäurehydrolaseaktivitäten in Digestaüberständen von Broilern. Arithmetisches Mittel und Standardabweichungen der Parallelproben ($n = 3$; 1 : $n = 2$). **Gruppe A:** Mais-Soja-Diät, **Gruppe B:** Weizen-Roggen-Diät, **Gruppe C:** Weizen-Roggen-Diät + Xylanase

Die zusammenfassende Betrachtung der über den gesamten Versuchszeitraum für die 3 Darmabschnitte erhobenen Werte zeigt jedoch, dass im Duodenum geringfügig höhere Werte für Gruppe B als für Gruppe C gemessen wurden (Tabelle 20).

Tabelle 20: Abhängigkeit intestinaler Gallensäurehydrolaseaktivitäten von der Diät und der Lokalisation im Verdauungstrakt

<u>Duodenum</u>			<u>Jejunum</u>			<u>Ileum I</u>		
	N	Lysezonen (mm ²)		N	Lysezonen (mm ²)		N	Lysezonen (mm ²)
Gruppe A	9	136,51 ± 9,59	Gruppe A	9	137,19 ± 5,07	Gruppe A	7	139,02 ± 18,90 ^a
Gruppe B	9	129,44 ± 10,97	Gruppe B	9	134,12 ± 13,89	Gruppe B	9	119,96 ± 8,40 ^b
Gruppe C	9	127,98 ± 9,97	Gruppe C	9	137,82 ± 10,74	Gruppe C	7	135,92 ± 10,77 ^a

Gruppe A: Mais-Soja-Diät, **Gruppe B:** Weizen-Roggen-Diät, **Gruppe C:** Weizen-Roggen-Diät + Xylanase

Unterschiedliche hochgestellte Buchstaben innerhalb einer Spalte unterscheiden sich mit $p < 0,05$ signifikant (Scheffé).

Für das Jejunum und vordere Ileum wurden niedrige Aktivitäten in den Proben der Gruppe B bestätigt. Sie lagen unterhalb derer der Gruppen A und C. Der im Ileum gemessene Wert war signifikant niedriger als bei den beiden anderen Gruppen. Gruppe A wies in allen Darmabschnitten die höchsten Werte auf, auch wenn die Unterschiede zwischen den Gruppen im Jejunum sehr gering waren. Auch der Unterschied zwischen Gruppe A und C im vorderen Ileum war vergleichsweise gering. Die über den gesamten Versuchszeitraum bestimmten Aktivitäten der Gallensäurehydrolasen stie-

gen in den Proben der Gruppe A im Verlauf des Verdauungstraktes an. Auch für die Gruppen B und C war ein Anstieg vom Duodenum zum Jejunum zu beobachten, allerdings nahmen die Aktivitäten zum terminalen Ileum, bei Gruppe C geringgradig, ab.

5.4 RNA-Extraktion aus Digestaprobe

Für die Untersuchungen mikrobieller Gemeinschaften im Verdauungstrakt mittels 16S und 23S rRNA-Analytik musste die Gesamt-RNA aus den Digestaprobe der Versuchstiere gewonnen werden. Um Verzerrungen der Ergebnisse durch unterschiedlich effiziente Lyse einzelner Bakteriengruppen oder -arten auszuschließen, war eine möglichst vollständige Lyse aller in den Proben enthaltenen Bakterien angestrebt worden. Aus diesem Grund war eine Optimierung der RNA-Extraktion nötig.

5.4.1 Zellaufschluss

Zur Kontrolle der Lyse-Effizienz wurden die Proben nach den Lyseschritten mikroskopisch auf augenscheinlich intakte Zellen überprüft. Bei der ersten Extraktion konnten in einer großen Zahl der Proben sowohl intakte stäbchenförmige Bakterien als auch Kokken beobachtet werden. Durch 15minütige Inkubation der Proben in GITC-Lösung bei 60 °C konnte das Vorkommen intakter Stäbchen und Kokken in allen Proben nahezu vollständig verhindert werden.

5.4.2 Phenolextraktion

Bei allen Proben lag eine deutliche Trennung der lipophilen und hydrophilen Phase, sowie der Interphase vor. Es konnten einheitlich 15 ml der wässrigen Phase nach Zugabe von Rotiphenol (Roth, Karlsruhe) und 12 ml nach Zugabe von Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) gewonnen werden. Augenscheinlich nahm das Volumen der proteinhaltigen Interphase vom Jejunum zum terminalen Ileum stetig ab.

5.4.3 Fällung der Nukleinsäuren

Nach Zugabe von Isopropanol zur wässrigen Phase erstarrte bei -30 °C das Gemisch bei einzelnen Proben nach kurzer Zeit zu einer amorphen Masse. Durch Zugabe von weiteren 5 ml Isopropanol zu diesen Proben konnten sie in flüssiger Form gehalten werden.

5.4.4 Eigenschaften der Zentrifugate

Im letzten Schritt der Nukleinsäureextraktion wurden die Zentrifugate mittels Ethanol gereinigt. Das Zentrum der durch die Extraktion aus den Lumenproben gewonnenen und aufgereinigten Zentrifugate war gelartig, von bräunlicher Farbe und wies einen breiten weißen Rand von körniger Konsistenz auf. Vom Duodenum zum Caecum hin wurde eine zunehmend dunklere Färbung beobachtet. Nach der ersten Extraktion wurden Lösungsversuche in 500 µl Aqua bidest. und 1,5 ml TE-

Puffer (Anhang 1.3.3), pH 8,0 unternommen. Auch durch intensives Mischen, einminütige Ultraschallbehandlung und 16stündige Inkubation in TE-Puffer bei Raumtemperatur konnte die Löslichkeit der Zentrifugate nicht erhöht werden. Durch Erwärmen der Proben auf 45 °C war der braune Kern teilweise zu lösen, die sich am Rand der Zentrifugate befindende weiße Substanz verblieb jedoch unlöslich. Erst durch die Aufnahme in 500 µl Formamid konnte eine fast vollständige Lösung der Zentrifugate erreicht werden. Die weiterhin unlöslichen Bestandteile hatten eine flockige oder eine gelartige Konsistenz. Da die teilweise sehr visköse Konsistenz der Extrakte und die weiterhin ungelösten Partikel ein Hindernis bei molekularbiologischen Untersuchungen erwarten ließen, wurden die Nukleinsäurelösungen einer säulenchromatographischen Reinigung zugeführt. Neben einer weitgehenden Entfernung von Verunreinigungen erfolgte hierbei auch eine Auftrennung der Nukleinsäuren in DNA und RNA. Nach der zweiten Extraktion wurden die Zentrifugate unmittelbar nach der Isopropanolfällung und Ethanolreinigung ohne vorherige Lösungsversuche zur säulenchromatographischen Auftrennung eingesetzt. Dabei ließen sich die Zentrifugate, welche in ihrer Farbe und Konsistenz denen des ersten Extraktionsvorganges glichen, problemlos im Lysepuffer der Fa. Qiagen (Hilden) aufnehmen. Unlösliche Partikel waren danach mit bloßem Auge nicht zu erkennen.

5.4.5 Bestimmung des Nukleinsäuregehaltes

Der Nukleinsäuregehalt der Extrakte wurde photometrisch bei 260 nm und die Verunreinigung mit Proteinen bei 280 nm bestimmt. In den Extrakten der ersten Extraktion konnten sehr unterschiedliche Gehalte in den einzelnen Darmabschnitten gemessen werden. Anhang 3.1 gibt die photometrisch bestimmten Nukleinsäurewerte und die Reinheit der Extrakte wieder. Im Anschluss an die säulenchromatographische Reinigung waren lediglich marginale RNA-Mengen (0-80 ng/µl) in den Proben nachzuweisen, so dass eine erneute Nukleinsäureextraktion aus den Digestaproben aus dem Jejunum, Ileum I und Ileum II der 14 bis 28 Tage alten Tiere durchgeführt werden musste. Die Extrakte der ersten Extraktion wurden verworfen. Die photometrische Bestimmung der Nukleinsäureextrakte der zweiten Extraktion nach der Aufreinigung ergab niedrigere RNA-Gehalte als in den ungereinigten Rohextrakten der ersten Extraktion. Gleichzeitig waren die rechnerisch bestimmten Verunreinigungen mit Proteinen höher, doch traten keine Werte über 2,0 (260 nm:280 nm) auf, welche nicht realistisch gewesen wären.

5.4.6 Nukleinsäuregehalte der für Hybridisierungen verwendeten RNA-Extrakte

Die photometrisch bestimmten Nukleinsäuregehalte und die Reinheit der für die Hybridisierung verwendeten Extrakte finden sich in Anhang 3.2. An allen 3 Probenahmetagen konnte aus allen Proben der Gruppe A mehr RNA gewonnen werden als aus den Proben der übrigen Gruppen (Abbildung 7). Am 14. Lebenstag waren zwischen den Gruppen B und C nur geringe Unterschiede vorhanden. Am 21. und 28. Lebenstag wurde aus den Proben der Gruppe C mehr RNA gewonnen, als aus denen der Gruppe B. Lediglich bei den Jejunumproben vom 28. Lebenstag waren erneut kaum Unterschiede festzustellen. Die Tiere der Gruppen A und C zeigten insgesamt mit steigendem Alter eine Zunahme der RNA-Mengen.

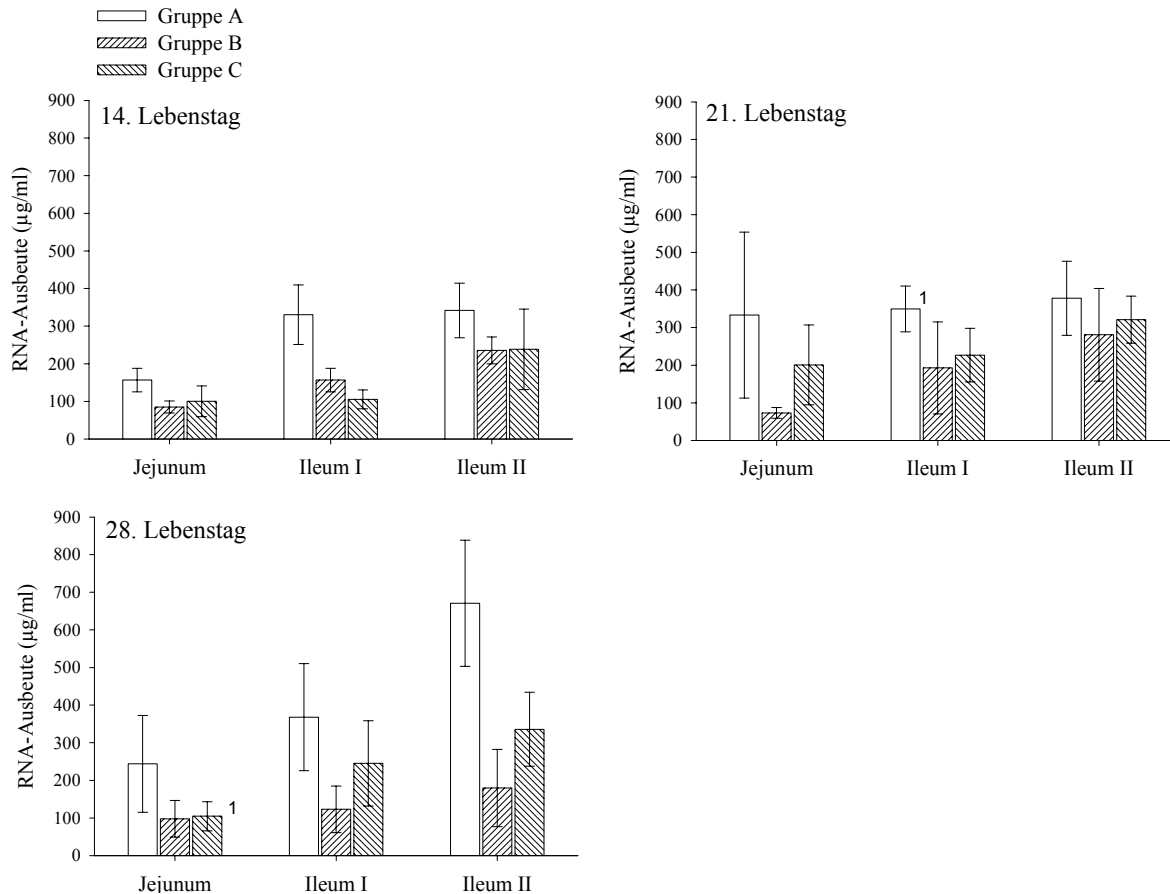


Abbildung 7: RNA-Ausbeute aus Digestaprobe von Broilern. Arithmetisches Mittel und Standardabweichungen der Parallelproben (n = 3; ¹: n = 2). **Gruppe A:** Mais-Soja-Diät, **Gruppe B:** Weizen-Roggen-Diät, **Gruppe C:** Weizen-Roggen-Diät + Xylanase

Der Vergleich der über den gesamten Versuchszeitraum aus den Dünndarmdigesta gewonnenen RNA-Mengen zeigt, dass die Ausbeute an RNA aus den Proben der Gruppe B am geringsten und den Proben der Gruppe A am höchsten war (Tabelle 21). Die Unterschiede zwischen diesen beiden Gruppen konnten in jedem Fall, die höheren Werte bei Gruppe A in beiden Teilen des Ileums auch gegenüber der Gruppe C, statistisch gesichert werden. Für alle Gruppen war eine stetige Zunahme der aus den Digestaprobe extrahierten RNA vom Jejunum über das vordere zum terminalen Ileum zu beobachten. Dabei war aus den Proben des terminalen Ileums bei allen Gruppen eine signifikant höhere RNA-Menge zu gewinnen als aus den Jejunumproben. Die für Gruppe C im terminalen Ileum bestimmten Werte waren signifikant höher als die der beiden vorherigen Darmabschnitten.

Tabelle 21: Abhängigkeit der RNA-Ausbeute (µg/ml) von der Diät und der Lokalisation im Verdauungstrakt

<u>Jejunum</u>			<u>Ileum I</u>			<u>Ileum II</u>		
	N	RNA (µg/ml)		N	RNA (µg/ml)		N	RNA (µg/ml)
Gruppe A	9	244,58 ± 147,58 ^{a,2}	Gruppe A	8	349,35 ± 89,19 ^{a,1-2}	Gruppe A	9	463,42 ± 186,17 ^{a,1}
Gruppe B	9	85,56 ± 26,53 ^{b,2}	Gruppe B	9	157,02 ± 79,22 ^{b,1-2}	Gruppe B	9	232,00 ± 90,86 ^{b,1}
Gruppe C	8	139,05 ± 78,93 ^{ab,2}	Gruppe C	9	192,44 ± 92,94 ^{b,2}	Gruppe C	9	298,42 ± 88,97 ^{b,1}

Gruppe A: Mais-Soja-Diät, **Gruppe B:** Weizen-Roggen-Diät, **Gruppe C:** Weizen-Roggen-Diät + Xylanase
 Unterschiedliche hochgestellte Buchstaben innerhalb einer Spalte und unterschiedliche hochgestellte Zahlen innerhalb einer Zeile unterscheiden sich mit p < 0,05 signifikant (Scheffé).

5.5 Validierung der 16S und 23S rRNA-Oligonukleotidsonden zum Nachweis ausgewählter Bakteriengruppen

Die Validierung und Optimierung der 16S und 23S rRNA-Oligonukleotidsonden zum Nachweis ausgewählter Bakteriengruppen erfolgte nach den unter 4.10.3 beschriebenen standardisierten Methoden. Als variable Faktoren wurden Hybridisierungstemperatur und -dauer, sowie Menge der eingesetzten RNA bestimmt. Die Ergebnisse der Hybridisierungen sind in Anhang 2 dargestellt.

5.5.1 S-G-Enc-038-a-A-18 zum Nachweis von Vertretern der *Enterococcus spp.*

Durch den Einsatz von S-G-Enc-038-a-A-18 konnte bei einer Hybridisierungstemperatur von 50 °C und einer Hybridisierungsdauer von 16 Stunden die 23S rRNA eines Gemisches der Gesamt-RNA aller in der Stammsammlung des Institutes vorhandenen Vertreter der *Enterococcus spp.* bis zu einer Menge von 5 ng deutlich nachgewiesen werden. Unter diesen Bedingungen war allerdings ein schwaches, durch die RNA der Vertreter der *Lactobacillus spp.* (500 ng) hervorgerufenen, Signal festzustellen. Durch eine Erhöhung der Hybridisierungstemperatur auf 55 °C konnte ein vollständig spezifisches Ergebnis erzielt werden. Die Nachweisgrenze lag bei 0,5 ng. Durch Auftrag der unter spezifischen Bedingungen erzielten Lichtintensitäten $[(OD - BG)/mm^2]$ gegen die eingesetzten RNA-Mengen ergab sich eine lineare Beziehung zwischen aufgetragener RNA-Menge und Signalstärke in einem Bereich bis 10 ng (Abbildung 8).

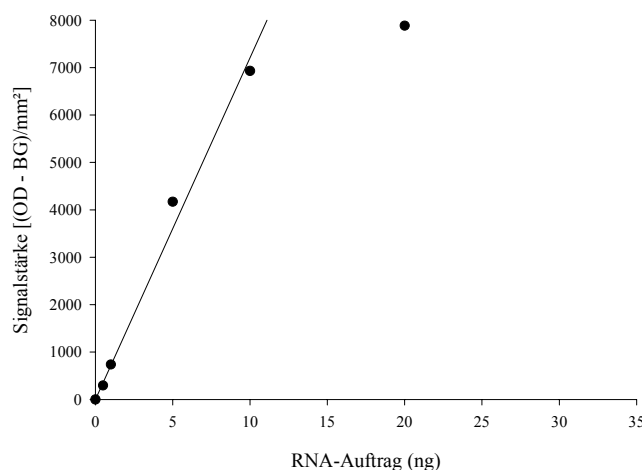


Abbildung 8: Abhängigkeit der Signalstärke von der eingesetzten RNA-Menge bei Hybridisierung eines Gemisches der Gesamt-RNA von *Enterococcus spp.* mit S-G-Enc-038-a-A-18

5.5.2 16E1 zum Nachweis von Vertretern der *E.coli* und *Shigella spp.*

Da die Sonde 16E1 bereits erfolgreich in vorangegangenen Untersuchungen am Institut für Tierernährung der FU Berlin zur Untersuchung mikrobieller Gemeinschaften im Verdauungstrakt des Schweines eingesetzt worden war, interessierte in erster Linie ihre Spezifität für *Enterobacteriaceae* (*E.coli* und *Shigella spp.*) aus dem Verdauungstrakt von Broilern. Die in den oben genannten Untersuchungen gewählte Hybridisierungstemperatur von 50 °C wurde nicht verändert, die Hybridisierungsdauer von 6 Stunden auf 16 Stunden erhöht. Die Hybridisierung der Gesamt-RNA von *E.coli*,

welche am Institut für Tierernährung der FU Berlin aus dem Verdauungstrakt von Broilern isoliert worden waren, zeigte in Konzentrationen von 100 ng und 50 ng sehr kräftige und dabei nahezu gleichstarke Signale. Die kommerziell erhältliche 16S rRNA von *E.coli* war bis zu einer Konzentration von 0,5 ng nachzuweisen. In einer weiteren Hybridisierung wurde ein Gemisch der Gesamt-RNA der Isolate zu gleichen Teilen in stärkerer Verdünnung und einer Verdünnungsreihe eingesetzt. Dabei konnte die 16S rRNA dieser Vertreter der *E.coli* bis zu einer Konzentration von 1 ng nachgewiesen und eine annähernd lineare Abhängigkeit der ermittelten Lichtintensitäten von der eingesetzten RNA-Menge in einem Bereich bis 50 ng gezeigt werden (Abbildung 9).

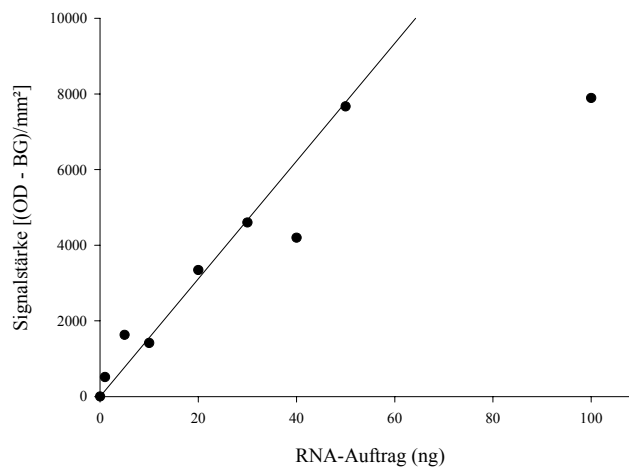


Abbildung 9: Abhängigkeit der Signalstärke von der eingesetzten RNA-Menge bei Hybridisierung eines Gemisches der Gesamt-RNA von *E.coli*-Isolaten aus dem Verdauungstrakt von Broilern mit 16E1

5.5.3 S-*-Chis-0150-a-A-23 zum Nachweis von *Clostridium* spp.

Ein spezifisches Ergebnis für S-*-Chis-0150-a-A-23 konnte bei einer Hybridisierungstemperatur von 50 °C und einer Hybridisierungsdauer von 16 Stunden erzielt werden.

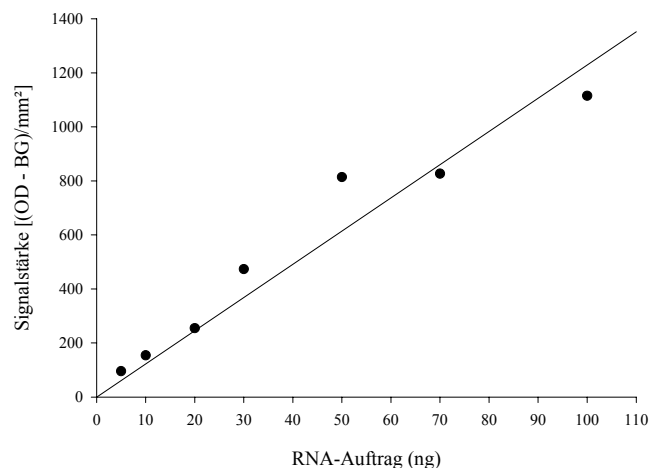


Abbildung 10: Abhängigkeit der Signalstärke von der eingesetzten RNA-Menge bei Hybridisierung der Gesamt-RNA eines *C.perfringens*-Isolates mit S-*-Chis-0150-a-A-23

Die 16S rRNA des *Clostridium*-Isolates wurde bis zu einer Konzentration von 5 ng nachgewiesen. Über den gesamten Bereich der eingesetzten RNA konnte eine enge Beziehung zu den ermittelten Signalstärken festgestellt werden (Abbildung 10).

5.6 Validierung der 16S und 23S rRNA-Oligonukleotidsonden zum Nachweis von Vertretern der *Enterococcus spp.*

Die Validierung und Optimierung der Oligonukleotidsonden zum Nachweis der Vertreter der *Enterococcus spp.* erfolgte nach den unter 4.10.3 beschriebenen standardisierten Methoden. Die Ergebnisse dieser Hybridisierungen sind in Anhang 2 dargestellt.

5.6.1 S-S-Ecae-0181-a-A-24 zum Nachweis von *E.caecorum*

Die Sonde S-S-Ecae-0181-a-A-24 wies bei einer Hybridisierungstemperatur von 55 °C spezifische Signale bis zu einem RNA-Auftrag von 1 ng auf. Ein Absenken der Hybridisierungstemperatur auf 50 °C zur Erhöhung der Sensitivität erbrachte unspezifische Signale (*E.avium*, *E.casseliflavus*, *E.faecalis* und *E.faecium*). Bei einer Hybridisierungstemperatur von 53 °C ließ sich, ohne sensitive-ren Nachweis der spezifischen RNA, auch die RNA von *E.faecium* nachweisen. Durch Auftrag der ermittelten (OD – BG)/mm²-Werte gegen die jeweiligen Mengen an eingesetzter RNA ließ sich eine lineare Beziehung für den Bereich bis 50 ng RNA-Auftrag ermitteln (Abbildung 11).

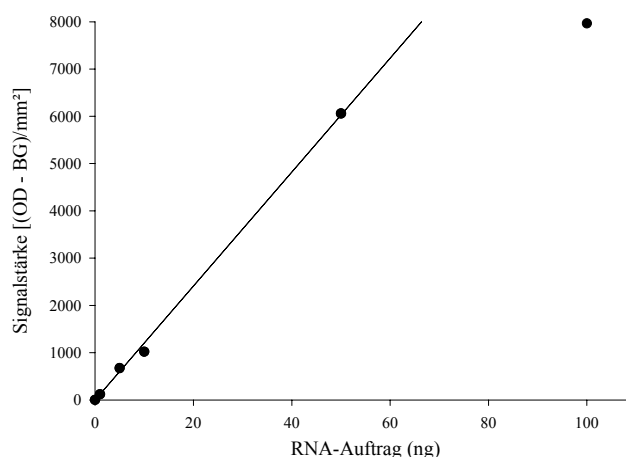


Abbildung 11: Abhängigkeit der Signalstärke von der eingesetzten RNA-Menge bei Hybridisierung der Gesamt-RNA von *E.caecorum* mit S-S-Ecae-0181-a-A-24

5.6.2 S-S-Ecsflaga-0185-a-A-21 zum Nachweis von *E.casseliflavus*, *E.flavescens* und *E.gallinarum*

Durch Einsatz von 50 pM von S-S-Ecsflaga-0185-a-A-21 konnte bei einer Hybridisierungstemperatur von 50 °C nach 16stündiger Hybridisierung die RNA von *E.gallinarum* bis zu einer Menge von 5 ng und die in einheitlicher Konzentration von 100 ng eingesetzte RNA von *E.asini*, *E.avium*, *E.casseliflavus*, *E.faecium* und *E.hirae* nachgewiesen werden. Entsprechend wurde die Temperatur

auf 55 °C erhöht, um die Spezifität zu gewährleisten. Nun waren ausschließlich Signale durch *E.gallinarum* zu ermitteln; die Nachweisgrenze lag bei 10 ng. Durch eine Sondenkonzentration von 500 pM konnte bei erhaltener Spezifität die Nachweisgrenze von *E.gallinarum* auf 0,5 ng spezifische RNA gesenkt werden. Eine lineare Abhängigkeit der Signalstärken von den RNA-Mengen ließ sich durch eine Regressionsgeraden für einen Bereich bis 5 ng feststellen (Abbildung 12).

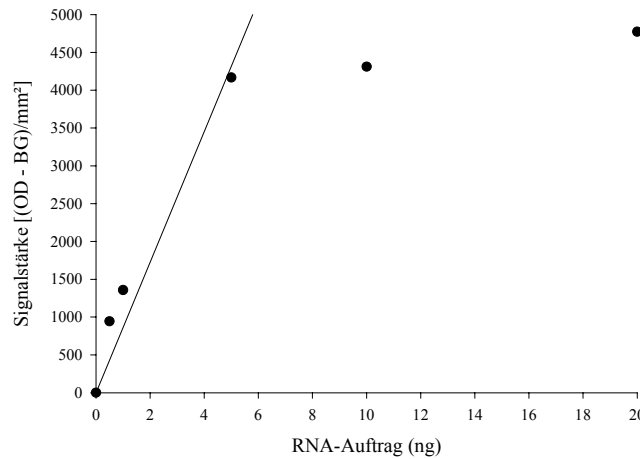


Abbildung 12: Abhängigkeit der Signalstärke von der eingesetzten RNA-Menge bei Hybridisierung der Gesamt-RNA von *E.gallinarum* mit S-S-Ecsflaga-0185-a-A-21

5.6.3 S-S-Efaes-203-a-A-20 zum Nachweis von *E.faecalis*

Die Oligonukleotidsonde S-S-Efaes-203-a-A-20 zeigte sich bei einer Hybridisierungstemperatur von 62 °C gleichermaßen für *E.faecalis* und *E.faecium* spezifisch. 1 ng spezifischer Kultur-RNA beider Vertreter der *Enterococcus spp.* war nachzuweisen. Der Auftrag der Signalstärken gegen die jeweiligen RNA-Mengen verdeutlichte einen nahezu identischen Zusammenhang zwischen Signalstärken und aufgetragenen RNA-Mengen (Abbildung 13).

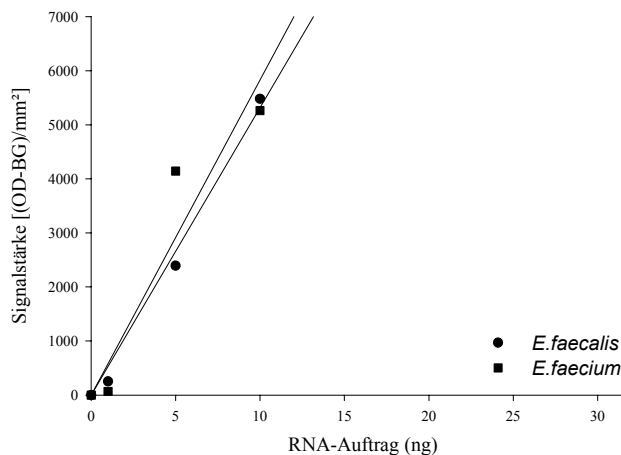


Abbildung 13: Abhängigkeit der Signalstärken von der eingesetzten RNA-Menge bei Hybridisierung der Gesamt-RNA von *E.faecalis* und *E.faecium* mit S-S-Efaes-203-a-A-20

5.6.4 S-S-Efaes-1237-b-A-17 zum Nachweis von *E.faecalis*

Bei Einsatz von S-S-Efaes-1237-b-A-17 wurde neben der 16S rRNA von *E.faecalis* die 16S rRNA von *E.faecium* detektiert. Allerdings waren hier die deutlich stärkeren Signale durch die RNA von *E.faecium* zu erzielen. Die RNA beider Vertreter der *Enterococcus spp.* wies dabei jeweils eine annähernd lineare Abhängigkeit der Signalstärken von der aufgetragenen RNA-Menge auf (Abbildung 14). Entsprechend den stärkeren Signalen wies die Regressionsgerade für *E.faecium* einen deutlich steileren Verlauf auf und erstreckte sich auf einen Bereich bis 30 ng. Demgegenüber erstreckte sich der lineare Bereich für *E.faecalis* über den gesamten Bereich der eingesetzten RNA.

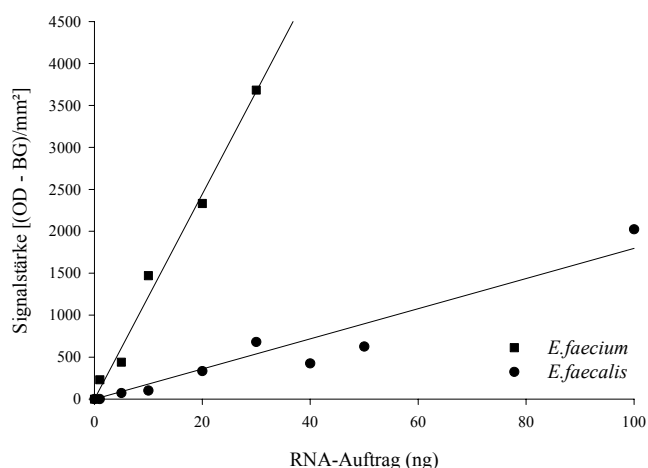


Abbildung 14: Abhängigkeit der Signalstärken von der eingesetzten RNA-Menge bei Hybridisierung der Gesamt-RNA von *E.faecalis* und *E.faecium* mit S-S-Efaes-1237-b-A-17

5.6.5 Unspezifische Sondenkandidaten

Bei den folgenden Sondenkandidaten waren trotz mehrfach durchgeführter Hybridisierungen unter verschiedenen Hybridisierungsbedingungen keine spezifischen Ergebnisse zu erzielen:

S-S-Eas-0187-a-A-20 (*E.asini*)

S-S-Efaes-0099-c-A-18 (*E.faecalis*)

S-S-Eaviraf-0473-a-A-20 (*E.avium*/*E.raffinosus*)

S-S-Efaem-0141-a-A-20 (*E.faecium*)

S-S-Eclb-0026-a-A-26 (*E.columbae*)

S-S-Ehir-0278-a-A-20 (*E.hirae*)

5.6.6 Oligonukleotidsonden ohne Signale

Der Einsatz von DB6 (*E.faecium*), DB9 (*E.avium*, *E.malodoratus*, *E.pseudoavium* und *E.raffinosus*), Ecaf19b (*E.casseliflavus* und *E.flavescens*), Eduhi9b (*E.durans* und *E.hirae*) und Ega9b (*E.gallinarum*) zum Nachweis der 23S rRNA der genannten Vertreter der *Enterococcus spp.* erbrachte unter den getesteten Bedingungen keine Signale.

5.7 Zur Analyse mikrobieller Gemeinschaften eingesetzte 16S und 23S rRNA-Oligonukleotidsonden

In Tabelle 22 sind die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Oligonukleotidsonden, Sondenkonzentrationen/100 cm² Membran, spezifische Hybridisierungstemperaturen und -dauer, sowie die Menge der eingesetzten Kultur- und Proben-RNA wiedergegeben.

Tabelle 22: Oligonukleotidsonden und Hybridisierungsbedingungen

Sonde	Sondenkonz. (pM)	Hyb.-temp. (°C)	Hyb.-dauer (h)	Kultur-RNA (ng)	Proben-RNA (ng)
S-G-Bac-0303-a-A-17	50	50	16	100, 70, 50, 30, 20, 10, 5	500
S*-Chis-0150-a-A-23	20	50	16	100, 70, 50, 30, 20, 10, 5	500
16E1	500	55	16	100, 50, 40, 30, 20, 10, 5	1000
S-G-Enc-038-a-A-18	50	40	16	20, 15, 10, 5, 2, 1	500
S-D-Bact-0338-a-A-18	20	40	16	50, 40, 30, 20, 10, 5, 1	20
S-F-Lact-0770-a-A-24	80	70	6	100, 50, 40, 30, 20, 10, 5	500
S-G-Bif-1432-a-A-21	50	55	16	100, 50, 40, 30, 20, 10, 5	500
S-S-Ecae-0181-a-A-24	50	55	16	100, 70, 50, 30, 20, 10, 5	500
S-S-Efaes-1237-b-A-17	500	50	16	50, 40, 30, 20, 10, 5, 1	500
S-S-Ecasflaga-0185-a-A-21	500	52	16	50, 40, 30, 20, 10, 5, 1	500
S-S-Lacet-0061-a-A-25	75	70	16	60, 50, 40, 30, 20, 10, 5, 1	500
S-S-Lacid-2519-a-A-20	80	60	16	60, 50, 40, 30, 20, 10, 5, 1	500
S-S-Lamy-0499-a-A-24	50	59	16	60, 50, 40, 30, 20, 10, 5, 1	500
S-S-Lfer-061-a-A-26	100	55	16	60, 50, 40, 30, 20, 10, 5, 1	500
S-S-Lgas-0054-a-A-24	150	47	16	60, 50, 40, 30, 20, 10, 5, 1	500
S-S-Lreu-0485-a-A-23	150	48	16	60, 50, 40, 30, 20, 10, 5, 1	100

5.8 Nachweis der 16S und 23S rRNA ausgewählter Bakteriengruppen in RNA-Extrakten aus dem Verdauungstrakt von Broilern

5.8.1 Bakterielle 16S rRNA

S-D-Bact-0338-a-A-18 stellt eine für bakterielle 16S rRNA spezifische Sonde dar. Bei der Hybridisierung der aus den Digestaprobe extrahierten Gesamt-RNA zeigte die mitgeführte Verdünnungsreihe aus einem Gemisch der Gesamt-RNA aller Proben zu gleichen Anteilen eine lineare Abhängigkeit der Signalstärke bis zu einer RNA-Menge von 30 ng (Abbildung 15). Entsprechend konnte eine Umrechnung der bei der Hybridisierung der RNA-Extrakte aus den Digestaprobe der Versuchstiere erzielten Signale in ng spezifische 16S rRNA/μg Gesamt-RNA erfolgen. Die Dokumentation der Hybridisierung ist in Anhang 4 dargestellt.

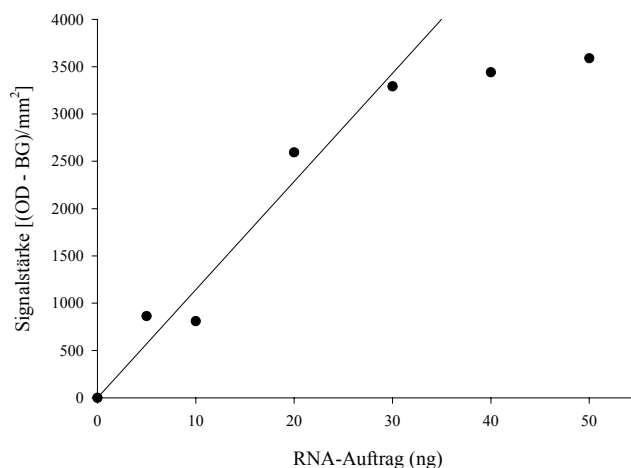


Abbildung 15: Abhängigkeit der Signalstärke von der eingesetzten RNA-Menge bei Hybridisierung eines Gemisches der Gesamt-RNA aller Proben zu gleichen Teilen mit S-D-Bact-0338-a-A-18

Die vergleichende Betrachtung der in den Proben enthaltenen bakteriellen 16S rRNA (Abbildung 16) zeigte für alle Gruppen teilweise erhebliche Abweichungen der für die einzelnen Proben errechneten Gehalte an bakterieller 16S rRNA vom Mittelwert.

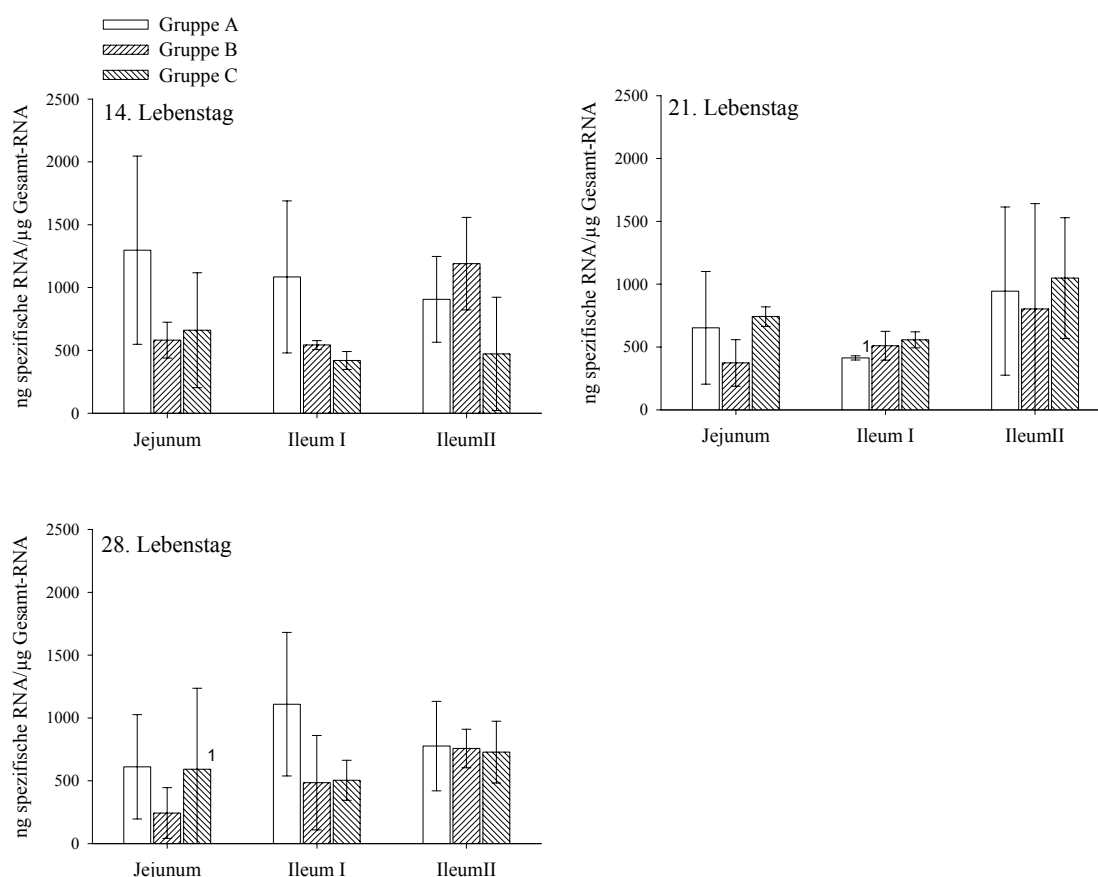


Abbildung 16: Bakterielle 16S rRNA in RNA-Extrakten aus Digestaprobe von Broilern (ng spezifische RNA/µg Gesamt-RNA).

Arithmetisches Mittel und Standardabweichungen der Parallelproben (n = 3; ¹: n = 2).

Gruppe A: Mais-Soja-Diät, **Gruppe B:** Weizen-Roggen-Diät, **Gruppe C:** Weizen-Roggen-Diät + Xylanase

Für den 14. Lebenstag der Tiere waren in den Proben aus den Darmabschnitten Jejunum und Ileum I der Gruppe A und in den Proben aus dem Darmabschnitt Ileum II der Gruppe B die höchsten Mengen bakterieller RNA nachzuweisen. Die niedrigsten Mengen spezifischer RNA im Jejunum waren in den Proben der Gruppe B und in beiden Abschnitten des Ileums in den Proben der Gruppe C festzustellen. Am 21. Lebenstag ließen sich kaum Unterschiede zwischen den Gruppen feststellen. Lediglich im Jejunum und terminalen Ileum zeigten die Proben der Gruppe B niedrige Gehalte an bakterieller RNA. In allen Darmabschnitten wiesen die Proben der Gruppe A am 28. Lebenstag die höchsten Mengen bakterieller 16S rRNA auf. Während in beiden Teilen des Ileums kaum Unterschiede zwischen den Gruppen B und C auszumachen waren, konnten im Jejunum für Gruppe C höhere Werte als für Gruppe B bestimmt werden.

Der Vergleich der über den gesamten Versuchszeitraum erhobenen Daten zeigte die höchsten Mengen bakterieller 16S rRNA in den Darmabschnitten Jejunum und Ileum I bei den Tieren der Gruppe A (Tabelle 23). In den Jejunumproben der Gruppe B waren die geringsten Mengen bakterieller RNA zu messen. Im vorderen Ileum waren die Werte der Proben der Gruppe C am niedrigsten und dabei signifikant niedriger als in denen der Gruppe A. Im terminalen Ileum waren die geringsten Mengen in den Proben der Gruppe C und die höchsten in denen der Gruppe B festzustellen. Bei den Tieren der Gruppe B war ein kontinuierlicher Anstieg der Werte im Verlauf des Verdauungstraktes nachzuweisen. Die Tiere der Gruppe A und der Gruppe C wiesen hingegen im vorderen Ileum höhere Werte als in den beiden anderen Darmabschnitten auf.

Tabelle 23: Abhängigkeit der Menge bakterieller 16S rRNA (ng/µg Gesamt-RNA) von der Versuchsdiaät und der Lokalisation im Verdauungstrakt

<u>Jejunum</u>			<u>Ileum I</u>			<u>Ileum II</u>		
	N	spezifische RNA (ng/µg)		N	spezifische RNA (ng/µg)		N	spezifische RNA (ng/µg)
Gruppe A	9	853,82 ± 587,04	Gruppe A	8	926,30 ± 546,00 ^a	Gruppe A	9	875,80 ± 422,43
Gruppe B	9	399,65 ± 213,62	Gruppe B	9	512,80 ± 198,69 ^{ab}	Gruppe B	9	916,76 ± 508,46
Gruppe C	8	674,19 ± 353,01	Gruppe C	9	493,64 ± 110,52 ^b	Gruppe C	9	749,70 ± 431,55

Gruppe A: Mais-Soja-Diät, Gruppe B: Weizen-Roggen-Diät, Gruppe C: Weizen-Roggen-Diät + Xylanase
 Unterschiedliche hochgestellte Buchstaben innerhalb einer Spalte unterscheiden sich mit $p < 0,05$ signifikant (Scheffé).

5.8.2 16S rRNA von Vertretern der *E.coli* und *Shigella spp.*

Die Menge an spezifischer 16S rRNA von *E.coli* und *Shigella spp.* im Verdauungstrakt der Versuchstiere wurde durch den Einsatz der Oligonukleotidsonde 16E1 ermittelt. Insgesamt waren nur sehr geringe Signale bei Einsatz dieser Sonde zu erzielen (Abbildung in Anhang 4). Erst durch eine Probenmenge von 1 µg und einer Sondenkonzentration von 500 pM waren auswertbare Ergebnisse zu erzielen. Unter diesen Hybridisierungsbedingungen war allerdings keine lineare Beziehung der für die Referenz-RNA ermittelten Signalstärken von der eingesetzten Menge zu bestimmen. Aus diesem Grund wurden die Lichtintensitäten zum Vergleich der im Verdauungstrakt der Versuchstiere vorhandenen RNA-Mengen von *Enterobacteriaceae* herangezogen (Abbildung 17). Die y-Achse für den 14. Lebenstag wurde zur besseren Übersichtlichkeit abweichend skaliert. Für den 14. Lebenstag der Tiere ließen sich im Jejunum nur geringe Unterschieden zwischen den Gruppen mit

pentosanreicher Diät feststellen. Ein sehr hoher Einzelwert führte bei Gruppe A zu deutlich höheren Werten in diesem Darmabschnitt.

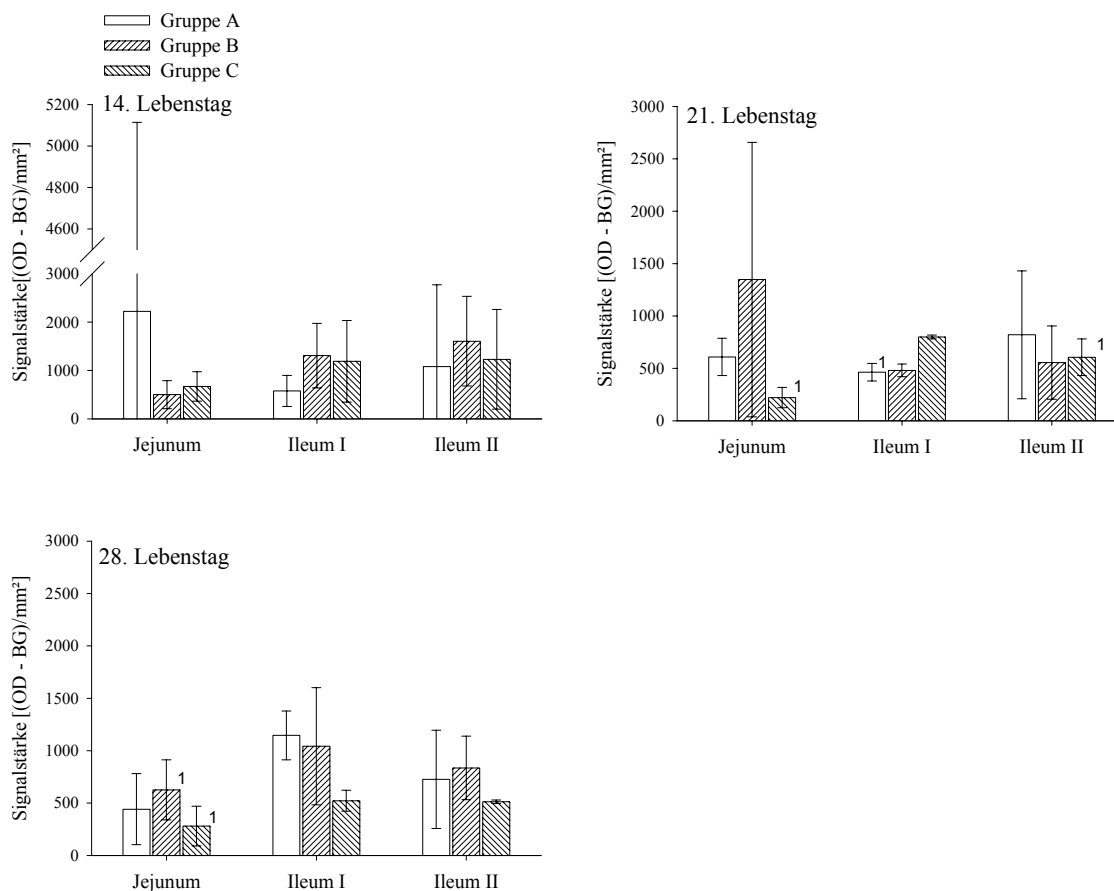


Abbildung 17: Signalstärken bei Hybridisierung von RNA-Extrakten aus Digestaprobe von Broilern mit 16E1 [(OD - BG)/mm²].

Arithmetisches Mittel und Standardabweichungen der Parallelproben (n = 3; ¹: n = 2).

Gruppe A: Mais-Soja-Diät, **Gruppe B:** Weizen-Roggen-Diät, **Gruppe C:** Weizen-Roggen-Diät + Xylanase
cave: Abweichende Skalierung der y-Achse für den 14. Lebensstag!

In beiden Teilen des Ileums zeigten sich hingegen höhere Signalstärken bei den Tieren mit pentosanreichen Diäten gegenüber der Maisgruppe, wobei die Gruppe mit Enzymzusatz etwas niedrigere Werte aufwies. Am 21. Lebensstag fielen im Jejunum hohe Werte für Gruppe B und niedrige Werte für Gruppe C auf. Hier ist ein sehr hoher Einzelwert bei den Tieren der Gruppe B anzumerken. Während im vorderen Ileum die Signale bei den Tieren der Gruppe C am stärksten waren, wurden im terminalen Ileum in den Proben der Gruppe A die höchsten Werte gemessen. Auch am 28. Lebensstag der Tiere waren für die Gruppe mit Weizen-Roggen-Diät im Jejunum die höchsten und in der Gruppe mit Enzymzusatz die geringsten Werte festzustellen. Im vorderen Ileum zeigten sich für Gruppe A die höchsten Werte und erneut für Gruppe C die niedrigsten Signalstärken. Im terminalen Ileum zeigte sich ein ähnliches Bild wie im Jejunum.

Die statistische Auswertung der über den gesamten Versuchszeitraum in den einzelnen Darmabschnitten erhobenen Daten zeigte in allen Darmabschnitten bei Gruppe C die schwächsten Signale (Tabelle 24). Während im Jejunum noch höhere Signalstärken für Gruppe A zu messen waren, konnte in beiden Teilen des Ileums höhere Werte für Gruppe B bestimmt werden. Gruppe A wies

eine kontinuierliche Verringerung der Signalstärken vom Jejunum zum terminalen Ileum auf. Für die Proben der Gruppe B war eine gegensinnige Entwicklung auszumachen. Auch für die Proben der Gruppe C war eine Zunahme der Lichtintensitäten vom Jejunum zum terminalen Ileum auszuweisen, allerdings wurden hier die höchsten Werte im vorderen Ileum gemessen. Statistisch zu sichern war keiner der genannten Unterschiede.

Tabelle 24: Abhängigkeit der Signalstärken [(OD – BG)/mm²] von der Diät und der Lokalisation im Verdauungstrakt

Jejunum		Ileum I		Ileum II				
	N	[(OD – BG)/mm ²]		N	[(OD – BG)/mm ²]		N	[(OD – BG)/mm ²]
Gruppe A	8	1172,67 ± 1781,66	Gruppe A	8	762,64 ± 386,00	Gruppe A	9	660,63 ± 429,30
Gruppe B	9	824,46 ± 791,86	Gruppe B	9	943,14 ± 568,17	Gruppe B	8	1053,90 ± 14,37
Gruppe C	7	429,87 ± 297,96	Gruppe C	8	841,87 ± 549,12	Gruppe C	8	805,32 ± 657,73

Gruppe A: Mais-Soja-Diät, Gruppe B: Weizen-Roggen-Diät, Gruppe C: Weizen-Roggen-Diät + Xylanase

5.8.3 23S rRNA von Vertretern der *Enterococcus spp.*

Um die 23S rRNA der Vertreter der *Enterococcus spp.* in den Digestproben der Versuchstiere nachzuweisen, wurde die Proben-RNA in einer Menge von 500 ng auf positiv geladener Nylonmembran fixiert und eine Hybridisierung mit S-G-Enc-038-a-A-18 durchgeführt (Abbildung in Anhang 4). Die mitgeführte Verdünnungsreihe aus einem Gemisch der Gesamt-RNA aller vorhandenen *Enterococcus spp.* (Tabelle 11) zu gleichen Anteilen wurde in einer Menge von 1 ng, 5 ng, 10 ng und 15 ng eingesetzt und die in der Hybridisierung erhaltenen Signale gegen die entsprechende RNA-Menge aufgetragen. Eine lineare Regression konnte für den Bereich bis 10 ng RNA angelegt werden (Abbildung 18). Dabei wurde eine zur Beurteilung der Proben ausreichende lineare Beziehung zwischen der Menge der eingesetzten Referenz-RNA und den ermittelten Signalstärken beobachtet und eine Berechnung der in den Proben enthaltenen Mengen an ribosomaler *Enterococcus spp.*-RNA je µg Gesamt-RNA durchgeführt.

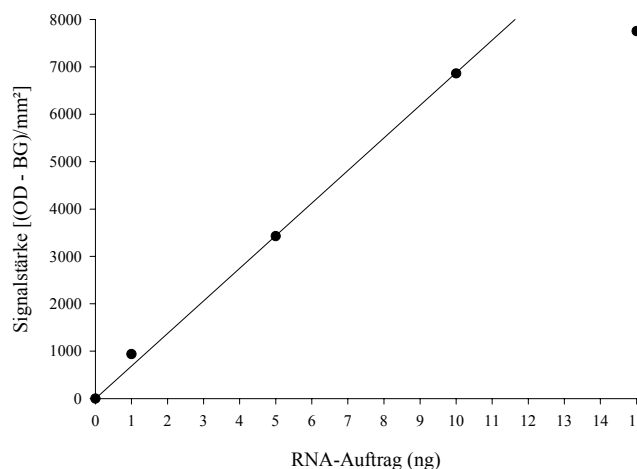


Abbildung 18: Abhängigkeit der Signalstärke von der eingesetzten RNA-Menge bei Hybridisierung eines Gemisches der Gesamt-RNA von Vertretern der *Enterococcus spp.* zu gleichen Teilen mit S-G-Enc-038-a-A-18

In Abbildung 19 sind die für die Darmabschnitten der 3 Gruppen ermittelten Mengen an spezifischer RNA je μg Gesamt-RNA als Mittelwerte der Parallelproben dargestellt. Bei deutlicher Streuung der Werte um den Mittelwert ließen sich am 14. Lebenstag der Tiere im Jejunum die größten Mengen spezifischer *Enterococcus spp.*-RNA in den Proben der Gruppe A nachweisen.

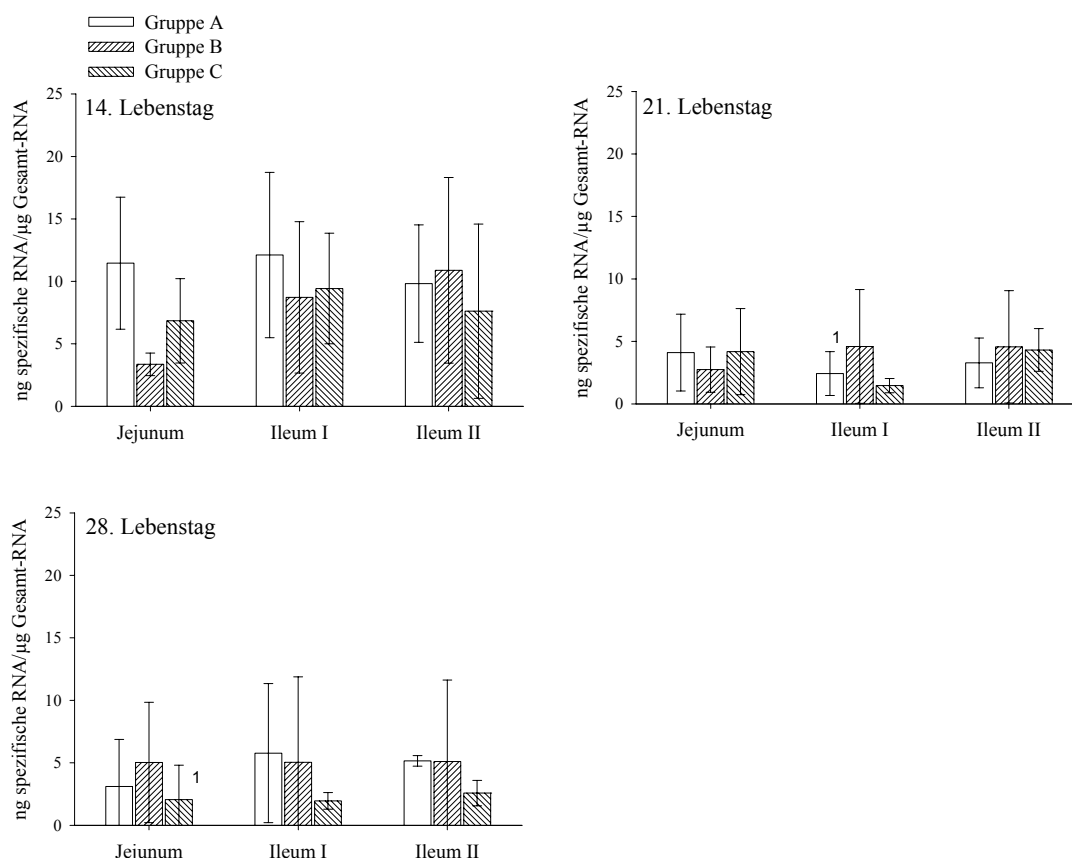


Abbildung 19: 23S rRNA von Vertretern der *Enterococcus spp.* in RNA-Extrakten aus Digestaprobe von Broilern (ng spezifische RNA/ μg Gesamt-RNA).

Arithmetisches Mittel und Standardabweichungen der Parallelproben ($n = 3$; ¹: $n = 2$).

Gruppe A: Mais-Soja-Diät, **Gruppe B:** Weizen-Roggen-Diät, **Gruppe C:** Weizen-Roggen-Diät + Xylanase

Die für Gruppe B ermittelten Werte lagen in diesem Darmabschnitt unterhalb der Werte von Gruppe C. Während diese Aussagen auch für das vordere Ileum gültig sind, konnten für das terminale Ileum in den Proben der Gruppe B höhere Mengen an spezifischer RNA gegenüber den Gruppen A und C nachgewiesen werden. Am 21. Lebenstag der Tiere ließen sich zwischen den Proben der Gruppen A und C im Jejunum kaum Unterschiede feststellen. Die für Gruppe B gemessenen Werte lagen unterhalb dieser Werte. Im vorderen Ileum ließen sich hingegen in den Proben der Gruppe B die höchsten Mengen an *Enterococcus*-RNA nachweisen. Die Proben der Gruppe A wiesen hier geringfügig höhere Mengen als die Proben der Gruppe C auf. Auch im terminalen Ileum waren in den Proben der Gruppe B die höchsten Mengen an *Enterococcus*-RNA festzustellen. Die in diesem Darmabschnitt gemessenen Werte lagen allerdings nur wenig über denen der Gruppe C. Gruppe A wies hier die niedrigsten Werte auf. In den Jejunumproben vom 28. Lebenstag waren ebenfalls die höchsten Mengen spezifischer RNA für Gruppe B zu bestimmen, wohingegen die Proben der Gruppe C in allen Darmabschnitten die niedrigsten Werte zeigten. Im vorderen und terminalen Ileum

lagen die für Gruppe A bestimmten Werte geringfügig über denen der Gruppe B. Für alle Gruppen zeigte sich eine Entwicklung zu geringeren Werten vom 14. zum 21. Lebenstag der Tiere. Für die Tiere der Gruppen B und C setzte sich dieses insgesamt zum 28. Lebenstag fort. Gruppe A zeigte hingegen vor allem im terminalen Ileum eine Zunahme vom 21. zum 28. Lebenstag.

Trotz der größeren Datengrundlage zeigten sich auch bei Auswertung der über den gesamten Versuchszeitraum für die einzelnen Darmabschnitte gemessenen Werte große tierindividuelle Unterschiede (Tabelle 25). Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen waren nicht zu beobachten. Im Jejunum waren die höchsten Werte für die Enzymgruppe festzustellen. In diesem Darmabschnitt wies Gruppe B die geringsten Mengen auf. Im vorderen Ileum konnten hingegen für die Tiere der Maisgruppe die höchsten und für die Enzymgruppe die geringsten Werte gemessen werden. Für die Gruppen mit pentosanreichen Diäten waren im terminalen Ileum höhere Werte festzustellen als bei der Maisgruppe. Die Mengen an spezifischer RNA waren dabei bei Gruppe B geringer als bei Gruppe C. Für Gruppe A und B konnte ein Anstieg der RNA-Mengen vom Jejunum zum vorderen Ileum beobachtet werden, der von einer Verringerung zum terminalen Ileum gefolgt wurde. Gruppe C hingegen wies eine kontinuierlich Zunahme der Mengen an spezifischer RNA auf.

Tabelle 25: Abhängigkeit der 23S rRNA-Mengen (ng/μg Gesamt-RNA) von Vertretern der *Enterococcus spp.* von der Diät und der Lokalisation im Verdauungstrakt

Jejunum			Ileum I			Ileum II		
	N	spezifische RNA (ng/μg)		N	spezifische RNA (ng/μg)		N	spezifische RNA (ng/μg)
Gruppe A	9	5,22 ± 5,44	Gruppe A	8	6,46 ± 6,31	Gruppe A	9	4,27 ± 3,63
Gruppe B	9	3,43 ± 1,84	Gruppe B	9	6,44 ± 5,44	Gruppe B	9	6,17 ± 6,67
Gruppe C	8	5,77 ± 3,88	Gruppe C	9	5,96 ± 4,28	Gruppe C	9	6,46 ± 4,49

Gruppe A: Mais-Soja-Diät, Gruppe B: Weizen-Roggen-Diät, Gruppe C: Weizen-Roggen-Diät + Xylanase

5.8.4 16S rRNA von Vertretern der *Lactobacillus spp.*

Zum Nachweis thermophiler *Lactobacillus spp.* wurde die Oligonukleotidsonde S-F-Lact-0770-a-A-24 eingesetzt. Das Ergebnis dieser Hybridisierung ist in Anhang 4 dargestellt.

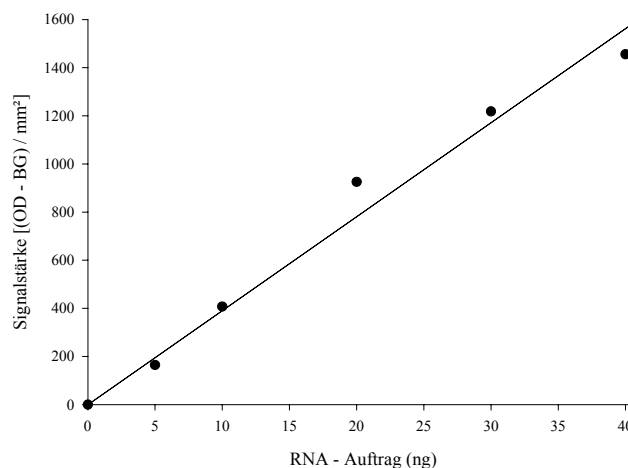


Abbildung 20: Abhängigkeit der Signalstärke von der eingesetzten RNA-Menge bei Hybridisierung eines Gemisches der Gesamt-RNA von *Lactobacillus spp.* zu gleichen Teilen mit S-F-Lact-0770-a-A-24

Dabei konnte durch Einsatz eines Gemisches der RNA aller vorhandener Vertreter dieser Keimgruppe (Tabelle 11) in Konzentrationen von 5 ng bis 40 ng eine zur Beurteilung der Proben geeignete lineare Abhängigkeit der Signalstärken von der eingesetzten RNA-Menge beobachtet werden (Abbildung 20). Nach Umrechnung der in dieser Hybridisierung ermittelten Signalstärken in ng spezifische 16S rRNA je μg Gesamt-RNA und Berechnung der Mittelwerte aus den Werten der Parallelproben ließen sich wiederum teilweise erhebliche individuelle Unterschiede in den Mengen an spezifischer RNA in den Parallelproben der Tiere einer Gruppe feststellen (Abbildung 21).

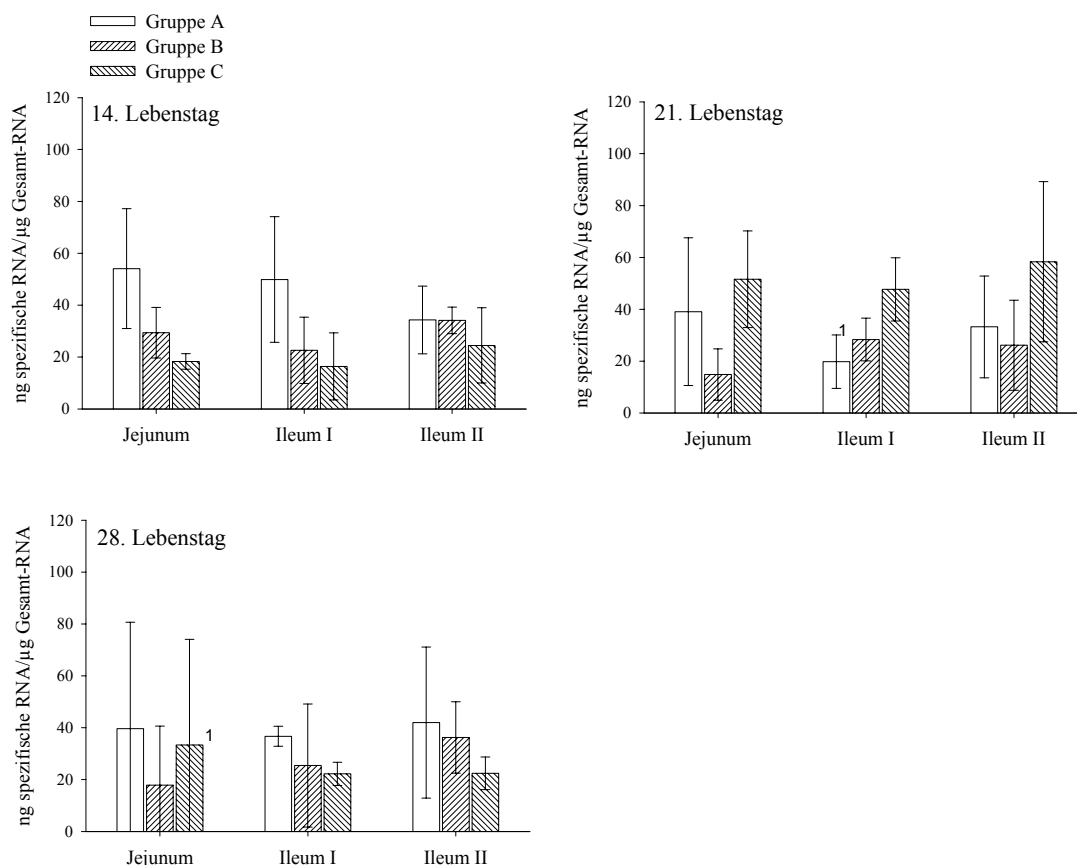


Abbildung 21: 16S rRNA von Vertretern der *Lactobacillus* spp. in RNA-Extrakten aus Digestaprobe von Broilern (ng spezifische RNA/ μg Gesamt-RNA).

Arithmetisches Mittel und Standardabweichungen der Parallelproben ($n = 3$; ¹: $n = 2$).

Gruppe A: Mais-Soja-Diät, **Gruppe B:** Weizen-Roggen-Diät, **Gruppe C:** Weizen-Roggen-Diät + Xylanase

Am 14. Lebensstag der Tiere waren dabei in den Proben der Gruppe A in allen Darmabschnitten, im terminalen Ileum jedenfalls geringgradig, die höchsten Mengen an 16S rRNA thermophiler Laktobazillen festzustellen. Die Proben der Gruppe C wiesen an diesem Lebensstag stets die geringsten Mengen auf. In den Proben der Gruppe C wurden demgegenüber am 21. Lebensstag der Tiere höhere Werte in allen 3 Darmabschnitten gemessen als für die Gruppen A und B. Die für Gruppe A festgestellten Werte lagen in den Darmabschnitten Jejunum und Ileum II über und im vorderen Ileum unterhalb den Werten der Gruppe B. Am 28. Lebensstag der Tiere waren in den Proben der Gruppe A aller Darmabschnitte erneut die höchsten Mengen spezifischer 16S rRNA zu bestimmen. Die für die Proben der Gruppe B bestimmten Mengen lagen in beiden Abschnitten des Ileums oberhalb derer der Gruppe C, im Jejunum jedoch darunter.

In allen 3 beprobten Darmabschnitten waren unter Einbeziehung der über den gesamten Versuchszeitraum erhobenen Werte die höchsten Werte in den Proben der Gruppe A und die geringsten in den Proben der Gruppe B festzustellen (Tabelle 26). Es konnte für die Maisgruppe eine stetige Verringerung und für die Tiere mit pentosanreicher Diät ohne Enzymzusatz eine kontinuierliche Zunahme der Werte ermittelt werden. Die Tiere mit Xylanasezusatz wiesen nach einer Verringerung der 16S rRNA-Gehalte vom 14. zum 21. Lebenstag eine Steigerung zum 28. Lebenstag auf. Diese Unterschiede ließen sich statistisch nicht sichern.

Tabelle 26: Abhängigkeit der 16S rRNA (ng/µg Gesamt-RNA) von Vertretern der *Lactobacillus spp.* von Diät und der Lokalisation im Verdauungstrakt

<u>Jejunum</u>			<u>Ileum I</u>			<u>Ileum II</u>		
	N	spezifische RNA (ng/µg)		N	spezifische RNA (ng/µg)		N	spezifische RNA (ng/µg)
Gruppe A	9	44,27 ± 28,49	Gruppe A	8	37,42 ± 18,50	Gruppe A	9	36,51 ± 19,18
Gruppe B	9	20,70 ± 14,90	Gruppe B	9	25,46 ± 14,31	Gruppe B	9	32,18 ± 12,27
Gruppe C	8	34,55 ± 24,00	Gruppe C	9	28,76 ± 17,08	Gruppe C	9	35,10 ± 24,61

Gruppe A: Mais-Soja-Diät, **Gruppe B:** Weizen-Roggen-Diät, **Gruppe C:** Weizen-Roggen-Diät + Xylanase).

5.8.5 Nicht nachgewiesene Bakteriengruppen

Auch bei Einsatz hoher Mengen Proben-RNA und hoher Sondenkonzentrationen von S-G-Bac-0303-a-A-17(*Bacteroides spp.*), S-*-Chis-0150-a-A-23 (*Costridium spp.*) und S-G-Bif-1432-a-A-21 (*Bifidobacterium spp.*) wurde keine spezifische RNA in den Proben nachgewiesen.

5.9 Nachweis der 16S rRNA ausgewählter Bakterienarten

5.9.1 16S rRNA von *E.faecium* und *E.faecalis*

Zum Nachweis der 16S rRNA von *E. faecium* und *E. faecalis* mittels Hybridisierung der RNA-Extrakte mit S-S-Efaes-1237-b-A-17 war der Einsatz einer hoch konzentrierten Sondenlösung erforderlich. Erst durch Verwendung einer Sondenmenge von 500 pM konnte in den Proben die 16S rRNA dieser Vertreter der *Enterococcus spp.* nachgewiesen werden (Abbildung in Anhang 4). Die bei der Hybridisierung der Proben-RNA mitgeführte Gesamt-RNA von *E. faecium* und *E. faecalis* in einem Gemisch zu gleichen Teilen ließ durch Auftrag der Signalstärken in Abhängigkeit von der eingesetzten RNA-Menge eine lineare Beziehung in einem Bereich bis 10 ng erkennen (Abbildung 22). Da die Proben-RNA aller Versuchstiere lediglich schwache Signale erkennen ließ, war diese Abhängigkeit zur Berechnung der in den Proben enthaltenen Mengen an spezifischer RNA je µg Gesamt-RNA ausreichend.

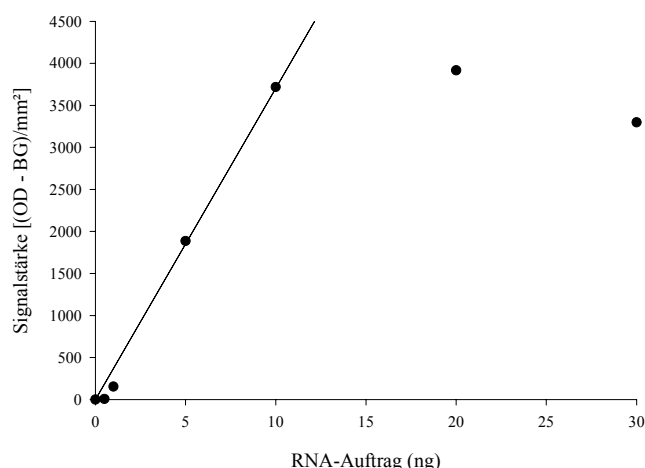


Abbildung 22: Abhängigkeit der Signalstärke von der eingesetzten RNA-Menge bei Hybridisierung eines Gemisches der Gesamt-RNA von *E.faecalis* und *E.faecium* zu gleichen Teilen mit S-S-Efaes-1237-b-A-17

Bei der Bewertung der aus den Parallelproben errechneten Mittelwerte ist zu beachten, dass bei einer großen Zahl von Proben kein Signal ermittelt werden konnte, und die Ergebnisse dadurch auf einer geringen Datenbasis beruhen (Abbildung 23). Zur besseren Übersicht wurde die y-Achse für den 28. Lebenstag abweichend skaliert.

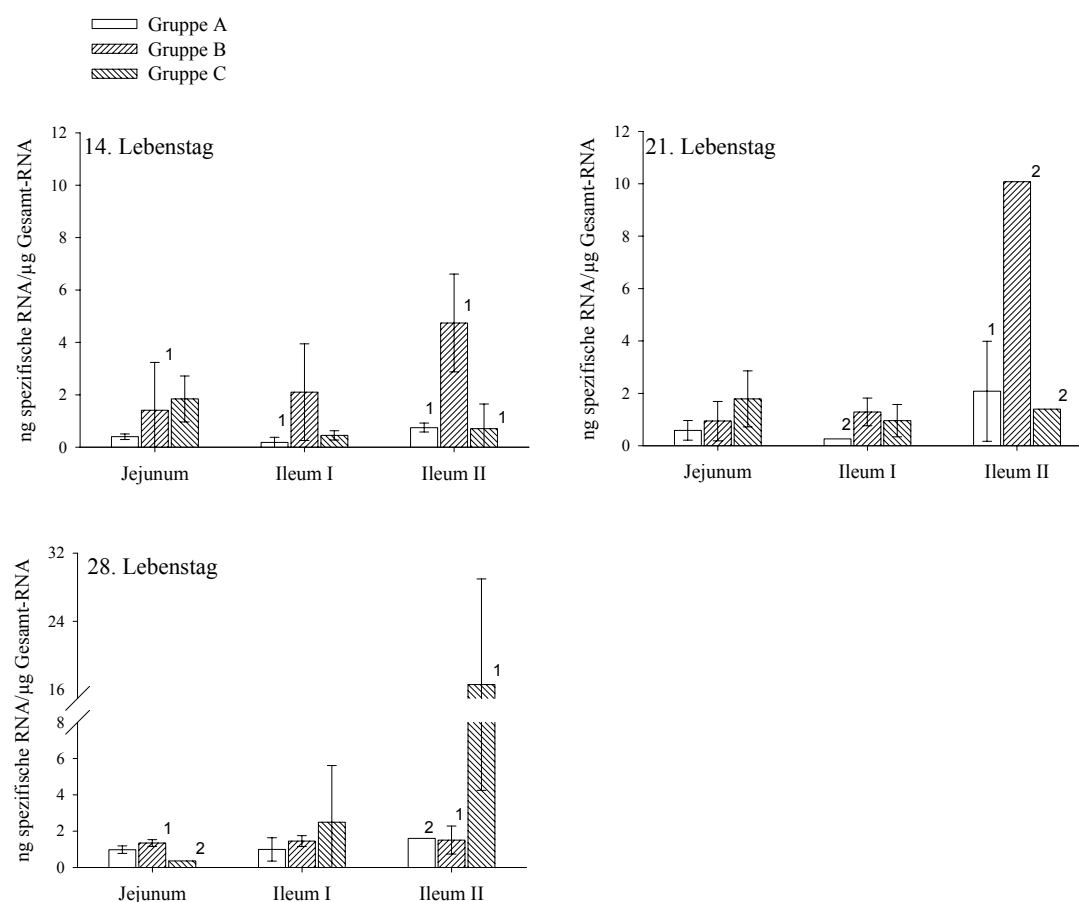


Abbildung 23: 16S rRNA von Vertretern von *E.faecalis* und *E.faecium* in RNA-Extrakten aus Digestaprobe von Broilern (ng spezifische RNA/µg Gesamt-RNA).

Arithmetisches Mittel und Standardabweichungen der Parallelproben (n = 3; ¹: n = 2; ²: n = 1).

Gruppe A: Mais-Soja-Diät, **Gruppe B:** Weizen-Roggen-Diät, **Gruppe C:** Weizen-Roggen-Diät + Xylanase
cave: Abweichende Skalierung der y-Achse für den 28. Lebenstag!

Fasst man die während des gesamten Versuchszeitraumes ermittelten Werte zusammen, waren in den Proben aus allen Darmabschnitten der Gruppe A die Mengen an spezifischer RNA am geringsten (Tabelle 27). Die Proben der Gruppe C wiesen in den Darmabschnitten Jejunum und Ileum II und die der Gruppe B im vorderen Ileum die höchsten Mengen auf. Dabei zeigten sich bei den Proben der Gruppen A und C jeweils die höchsten Werte im terminalen Ileum und die niedrigsten Werte im vorderen Ileum. Für Gruppe B ließ sich hingegen eine Zunahme vom Jejunum zum terminalen Ileum, in dem die signifikant höchsten Werte zu messen waren, aufzeigen.

Tabelle 27: Abhängigkeit der 16S rRNA-Mengen (ng/µg Gesamt-RNA) von *E.faecium* und *E.faecalis* von der Diät und der Lokalisation im Verdauungstrakt

Jejunum			Ileum I			Ileum II		
	N	spezifische RNA (ng/µg)		N	spezifische RNA (ng/µg)		N	spezifische RNA (ng/µg)
Gruppe A	9	0,66 ± 0,34	Gruppe A	6	0,60 ± 0,60	Gruppe A	5	1,45 ± 1,17
Gruppe B	7	1,19 ± 0,90 ²	Gruppe B	9	1,61 ± 1,04 ²	Gruppe B	5	4,52 ± 3,65 ¹
Gruppe C	7	1,61 ± 09,7	Gruppe C	9	1,30 ± 1,84	Gruppe C	6	6,24 ± 9,80

Gruppe A: Mais-Soja-Diät, Gruppe B: Weizen-Roggen-Diät, Gruppe C: Weizen-Roggen-Diät + Xylanase
 Unterschiedliche hochgestellte Zahlen innerhalb einer Zeile unterscheiden sich mit $p < 0,05$ signifikant (Scheffé).

5.9.2 16S rRNA von *Lactobacillus reuteri*

Bei Einsatz von S-S-Lreu-0485-a-A-23 konnte eine zur Bewertung der in den Proben enthaltenen Mengen an spezifischer 16S rRNA befriedigende Abhängigkeit der Signalstärken von der eingesetzten Referenz-RNA in einem Bereich bis 30 ng ermittelt werden (Abbildung 24). Eine Abbildung des Hybridisierungsergebnisses findet sich in Anhang 4.

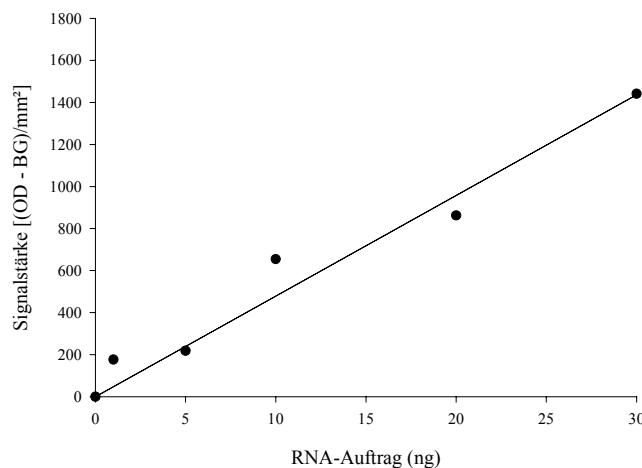


Abbildung 24: Abhängigkeit der Signalstärke von der eingesetzten RNA-Menge bei Hybridisierung der Gesamt-RNA von *L.reuteri* mit S-S-Lreu-0485-a-A-23

Durch Verwendung von 500 ng der Proben-RNA und Umrechnung der in der Hybridisierung erzielten Signale in ng spezifische RNA je µg Gesamt-RNA konnten in den Jejunumproben vom 14. Lebenstag der Gruppe A die höchsten und in denen der Gruppe C die geringsten Mengen an 16S rRNA dieser Bakterienart nachgewiesen werden (Abbildung 25).

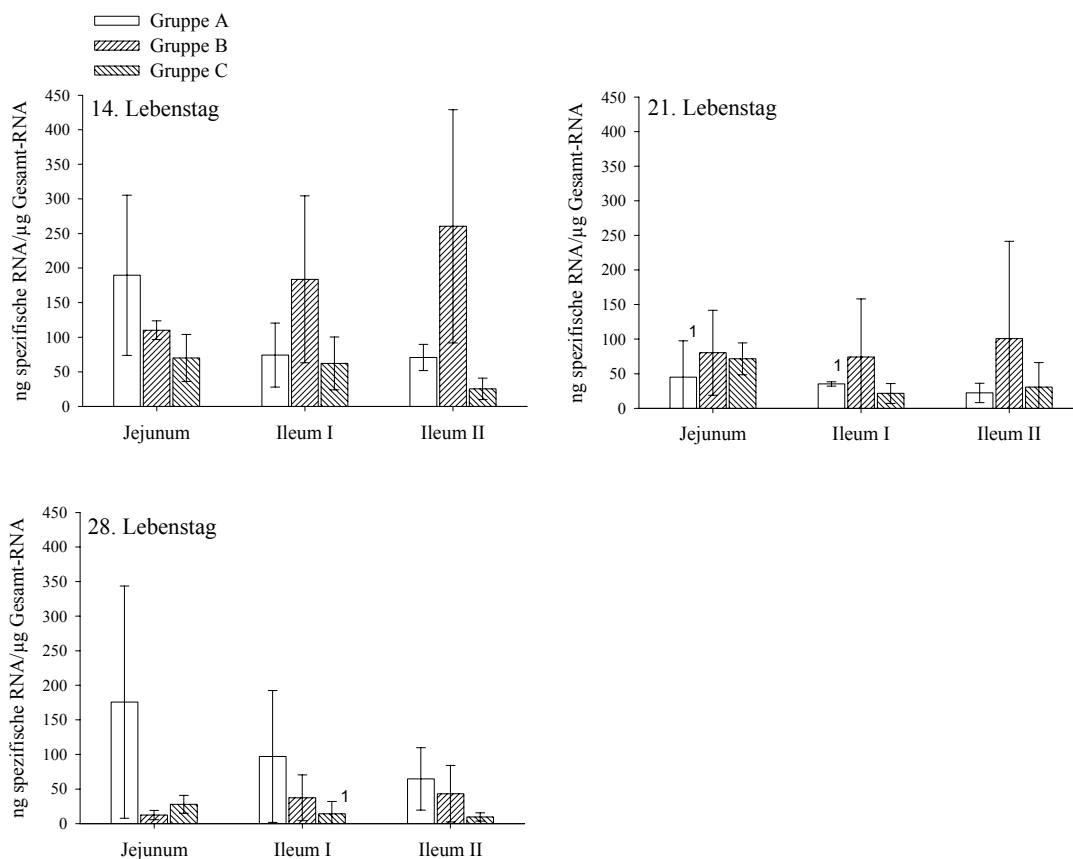


Abbildung 25: 16S rRNA von *L.reuteri* in RNA-Extrakten aus Digestaprobe von Broilern (ng spezifische RNA/µg Gesamt-RNA).

Arithmetisches Mittel und Standardabweichungen Parallelproben (n = 3; ¹: n = 2).

Gruppe A: Mais-Soja-Diät, **Gruppe B:** Weizen-Roggen-Diät, **Gruppe C:** Weizen-Roggen-Diät + Xylanase

Die Tiere der Gruppe B zeigten in den Proben aus beiden Teilen des Ileums höhere Mengen an spezifischer 16S rRNA als die Gruppen A und C. Gruppe C wies hier die geringsten Werte auf. Für die Gruppen A und C war dabei eine stetige Abnahme der ermittelten Werte vom Jejunum zum terminalen Ileum, für Gruppe B hingegen ein stetige Zunahme zu beobachten. Am 21. Lebensstag der Tiere waren für alle Darmabschnitte in den Proben der Gruppe B die höchsten Mengen spezifischer RNA von *L.reuteri* zu bestimmen. In den Proben aus dem Jejunum und terminalen Ileum der Gruppe A und in den Proben aus dem vorderen Ileum der Gruppe C wurden die geringsten Mengen festgestellt. Auch hier nahmen die Mengen spezifischer 16S rRNA im Verlauf des Verdauungstraktes der Tiere der Gruppe A stetig ab. Die Proben der Gruppe A vom 28. Lebensstag wiesen in allen Teilen des Dünndarms die höchsten Mengen ribosomaler *L.reuteri*-RNA auf. Im Jejunum waren die Werte der Gruppe B und in beiden Anteilen des Ileums der Gruppe C am geringsten. Insgesamt zeigten die Tiere der Gruppen B und C eine stetige Verringerung der Werte mit steigendem Alter. Für Gruppe A war eine Verringerung der nachgewiesenen RNA vom 14. zum 21. und eine Zunahme zum 28. Lebensstag zu verzeichnen.

Gruppe C wies unter Einbeziehung der in den einzelnen Darmabschnitten über den gesamten Versuchszeitraum erhobenen Werte jeweils die geringsten Mengen an spezifischer RNA auf (Tabelle 28). Im Jejunum ließen sich in den Proben der Gruppe A die höchsten Mengen an spezifischer RNA nachweisen, in beiden Teilen des Ileums hingegen in den Proben der Gruppe B. Im terminalen

Ileum war der für Gruppe B bestimmte Wert signifikant höher als der in den Proben der Gruppe C. Innerhalb der Gruppen bestätigte sich für die Gruppen A und C eine stetige Verringerung der Mengen an spezifischer 16S rRNA im Verlauf des Verdauungstraktes. In den Jejunumproben der Gruppe A waren dabei signifikant höhere Werte als in den Proben aus dem terminalen Ileum und in den Jejunumproben der Gruppe C signifikant höhere Werte als in beiden Abschnitten des Ileums zu beobachten. Umgekehrt verhielt es sich bei den Proben der Gruppe B. Hier war eine kontinuierliche Zunahme im Verlauf des Verdauungstraktes festzustellen.

Tabelle 28: Abhängigkeit der 16S rRNA-Mengen (ng/µg Gesamt-RNA) von *L.reuteri* von der Diät und der Lokalisation im Verdauungstrakt

Jejunum			Ileum I			Ileum II		
	N	spezifische RNA (ng/µg)		N	spezifische RNA (ng/µg)		N	spezifische RNA (ng/µg)
Gruppe A	9	136,75 ± 125,97 ¹	Gruppe A	8	73,08 ± 62,21 ¹⁻²	Gruppe A	9	52,53 ± 34,24 ^{ab,2}
Gruppe B	9	67,65 ± 53,73	Gruppe B	9	98,45 ± 100,09	Gruppe B	9	134,85 ± 148,21 ^a
Gruppe C	8	60,03 ± 29,95 ¹	Gruppe C	8	34,94 ± 32,19 ²	Gruppe C	9	21,88 ± 21,75 ^{b,2}

Gruppe A: Mais-Soja-Diät, Gruppe B: Weizen-Roggen-Diät, Gruppe C: Weizen-Roggen-Diät + Xylanase
 Unterschiedliche hochgestellte Zahlen innerhalb einer Zeile unterscheiden sich mit $p < 0,05$ signifikant (Scheffé).

5.9.3 16S rRNA von *Lactobacillus gasseri*

Zur Bestimmung der 16S rRNA-Gehalte von *L.gasseri* in den Proben wurde die RNA dieses Vertreters der thermophilen *Lactobacillus spp.* in Konzentrationen von 1 ng bis 30 ng und die aus den Proben extrahierte Gesamt-RNA in einer Menge von 500 ng auf positiv geladener Nylonmembran fixiert. Das Ergebnis der Hybridisierung mit S-S-Lgas-0054-a-A-24 ist in Anhang 4 dargestellt. Es konnte eine zur Bewertung der Proben geeignete lineare Beziehung zwischen aufgetragener Menge der Referenz-RNA und der Signalstärke ermittelt werden (Abbildung 26), so dass auch hier eine Umrechnung der Probensignale in ng spezifische RNA je µg Gesamt-RNA erfolgen konnte.

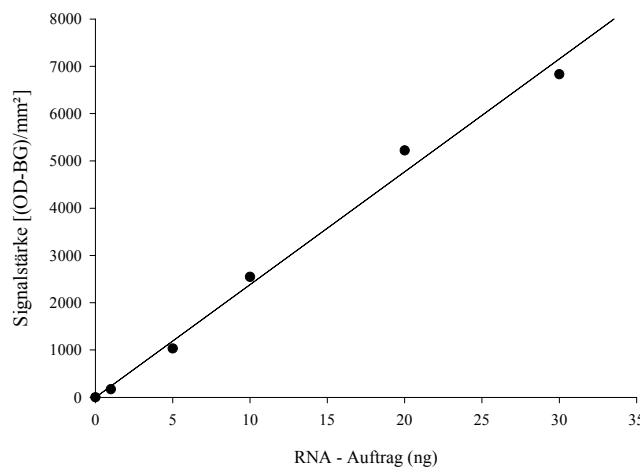


Abbildung 26: Abhängigkeit der Signalstärke von der eingesetzten RNA-Menge bei Hybridisierung der Gesamt-RNA von *L.gasseri* mit S-S-Lgas-0054-a-A-24

Bei Einsatz von S-S-Lgas-0054-a-A-24 war bei einer größeren Zahl von Proben kein Signal zu erzielen. Davon waren in erster Linie die Proben des 28. Lebensstages der Tiere betroffen (Abbildung

27). Zur besseren Übersicht wurde die y-Achse für den 14. Lebenstag abweichend skaliert. Es zeigte sich, dass in den Proben der Gruppe A vom 14. Lebenstag in allen Darmabschnitten die höchsten Mengen an spezifischer RNA nachzuweisen waren. Diese Aussage bleibt auch dann gültig, wenn der Mittelwert der parallel angelegten Jejunumproben dieser Gruppe um den mit Abstand höchsten Wert korrigiert wird. In den Proben aus den Darmabschnitten Jejunum und Ileum II waren die geringsten Mengen an *L.gasseri*-16S rRNA in den Proben der Gruppe C und im Darmabschnitt Ileum I in den Proben der Gruppe B zu verzeichnen. Für die Proben der Gruppe A und B war eine Verringerung der zu messenden Werte vom Jejunum zum vorderen Ileum, gefolgt von einer Zunahme zum terminalen Ileum festzustellen. Demgegenüber nahmen die Werte in den Proben aus Gruppe C vom Jejunum zum vorderen Ileum erst zu, um dann zum terminalen Ileum wieder abzunehmen.

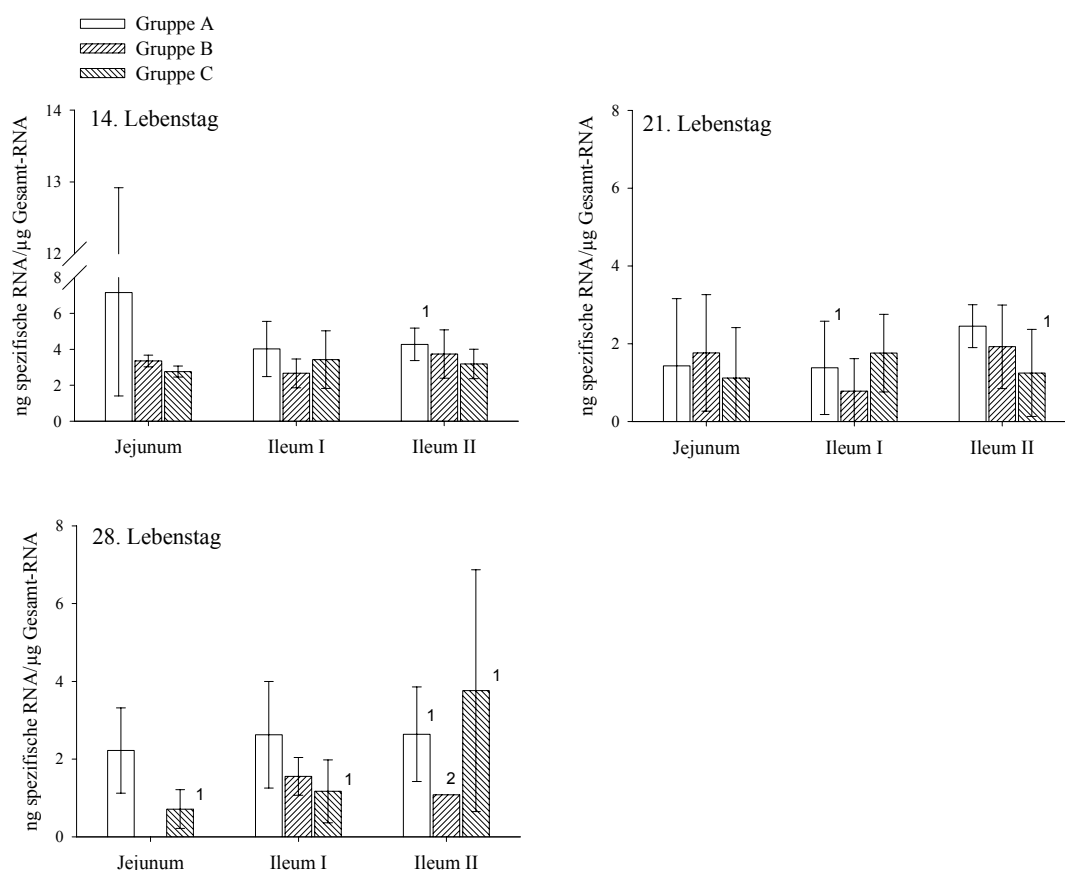


Abbildung 27: 16S rRNA von *L.gasseri* in RNA-Extrakten aus Digestaprobe von Broilern (ng spezifische RNA/µg Gesamt-RNA).

Arithmetisches Mittel und Standardabweichungen der Parallelproben (n = 3; ¹: n = 2; ²: n = 1).

Gruppe A: Mais-Soja-Diät, **Gruppe B:** Weizen-Roggen-Diät, **Gruppe C:** Weizen-Roggen-Diät + Xylanase

cave: Abweichende Skalierung der y-Achse für den 14. Lebenstag!

Am 21. Lebenstag konnten die höchsten Mengen spezifischer RNA im Jejunum in den Proben der Gruppe B, im vorderen Ileum in den Proben der Gruppe C und im terminalen Ileum in den Proben der Gruppe A gemessen werden. Die niedrigsten Werte im Jejunum und terminalen Ileum wurden für Gruppe C und im vorderen Ileum für Gruppe B bestimmt. Dabei wiesen die Mengen spezifischer 16S rRNA in den Proben aller Gruppen denselben Verlauf in Abhängigkeit von der Lokalisation im Verdauungstrakt auf wie am 14. Lebenstag. In den Proben aus den Darmabschnitten Jejunum und Ileum I der Gruppe A waren am 28. Lebenstag der Tiere mehr Anteile von *L.gasseri*-RNA

an der Gesamt-RNA als für die beiden übrigen Gruppen nachzuweisen. In den Proben aus dem terminalen Ileum waren in den Proben der Gruppe C die höchsten Werte zu messen. Die Proben der Gruppe A zeigten in allen Darmabschnitten eine Verringerung der gemessenen Werte vom 14. zum 21. Lebenstag und einen Anstieg vom 21. zum 28. Lebenstag. Sowohl für Gruppe B als auch für Gruppe C war im Jejunum und für Gruppe B im terminalen Ileum eine kontinuierliche Verringerung in Abhängigkeit vom Alter der Tiere zu beobachten. Demgegenüber kam es bei den Tieren der Gruppe B im vorderen Ileum zunächst zu einer Verringerung der Mengen an spezifischer RNA vom 14. zum 21. Lebenstag und dann zu einem Anstieg zum 28. Lebenstag. Diese Entwicklung war ebenfalls im terminalen Ileum der Tiere der Gruppe C zu verzeichnen, welche im vorderen Ileum hingegen eine gegenläufige Entwicklung zeigten.

Die statistische Bewertung der über den gesamten Versuchszeitraum für die einzelnen Darmabschnitte ermittelten Werte ließ keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen erkennen. In den Darmabschnitten Jejunum und Ileum I lagen die Werte in den Proben der Gruppe A oberhalb den Werten der Gruppen B und C (Tabelle 29). Im Jejunum waren die Mengen der 16S rRNA von *L.gasseri* in den Proben der Gruppe C und in beiden Teilen des Ileums in denen der Gruppe B am geringsten. Im terminalen Ileum waren die für Gruppe C errechneten Werte höher als die der Gruppe A. Die Proben der Gruppe A wiesen eine kontinuierliche Verringerung und die der Gruppe C einen kontinuierlichen Anstieg vom Jejunum zum terminalen Ileum auf. Auch in den Proben der Gruppe B waren im terminalen Ileum die höchsten Mengen an spezifischer RNA zu messen. Allerdings zeigten hier die Proben aus dem vorderen Ileum die geringsten Werte.

Tabelle 29: Abhängigkeit der 16S rRNA (ng/µg Gesamt-RNA) von *L.gasseri* von der Diät und der Lokalisation im Verdauungstrakt

<u>Jejunum</u>			<u>Ileum I</u>			<u>Ileum II</u>		
	spezifische RNA			spezifische RNA			spezifische RNA	
	N	(ng/µg)		N	(ng/µg)		N	(ng/µg)
Gruppe A	8	4,20 ± 4,40	Gruppe A	8	2,73 ± 1,93	Gruppe A	8	2,64 ± 1,82
Gruppe B	9	2,04 ± 1,72	Gruppe B	9	1,75 ± 1,13	Gruppe B	7	2,40 ± 1,75
Gruppe C	6	1,87 ± 1,36	Gruppe C	9	1,92 ± 1,60	Gruppe C	7	3,21 ± 2,87

Gruppe A: Mais-Soja-Diät, **Gruppe B:** Weizen-Roggen-Diät, **Gruppe C:** Weizen-Roggen-Diät + Xylanase

5.9.4 16S rRNA von *L.fermentum*

Durch Auftrag der Gesamt-RNA von *L.fermentum* in Konzentrationen von 1 ng bis 60 ng gegen die jeweils erzielten Signalstärken nach Hybridisierung mit S-S-Lfer-061-a-A-26 (Abbildung in Anhang 4) konnte eine exponentielle Beziehung festgestellt werden. Nachdem die Signalstärken gegen die eingesetzten RNA-Mengen in logarithmischer Form aufgetragen wurden, ergab sich auch in diesem Fall eine zur Beurteilung der Probensignale geeignete lineare Abhängigkeit (Abbildung 28).

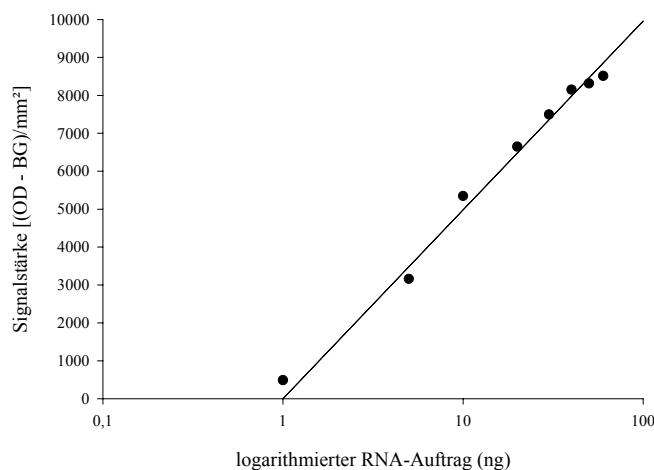


Abbildung 28: Abhängigkeit der Signalstärke von der eingesetzten RNA-Menge (logarithmischer Auftrag) bei Hybridisierung der Gesamt-RNA von *L. fermentum* mit S-S-Lfer-061-a-A-26

Nach Umrechnung der log-RNA Mengen in ng spezifische RNA je μg Gesamt-RNA und Berechnung der Mittelwerte aus den Parallelproben zeigten sich nur geringgradige Unterschiede zwischen den 3 Gruppen in allen beprobten Darmabschnitten (Abbildung 29).

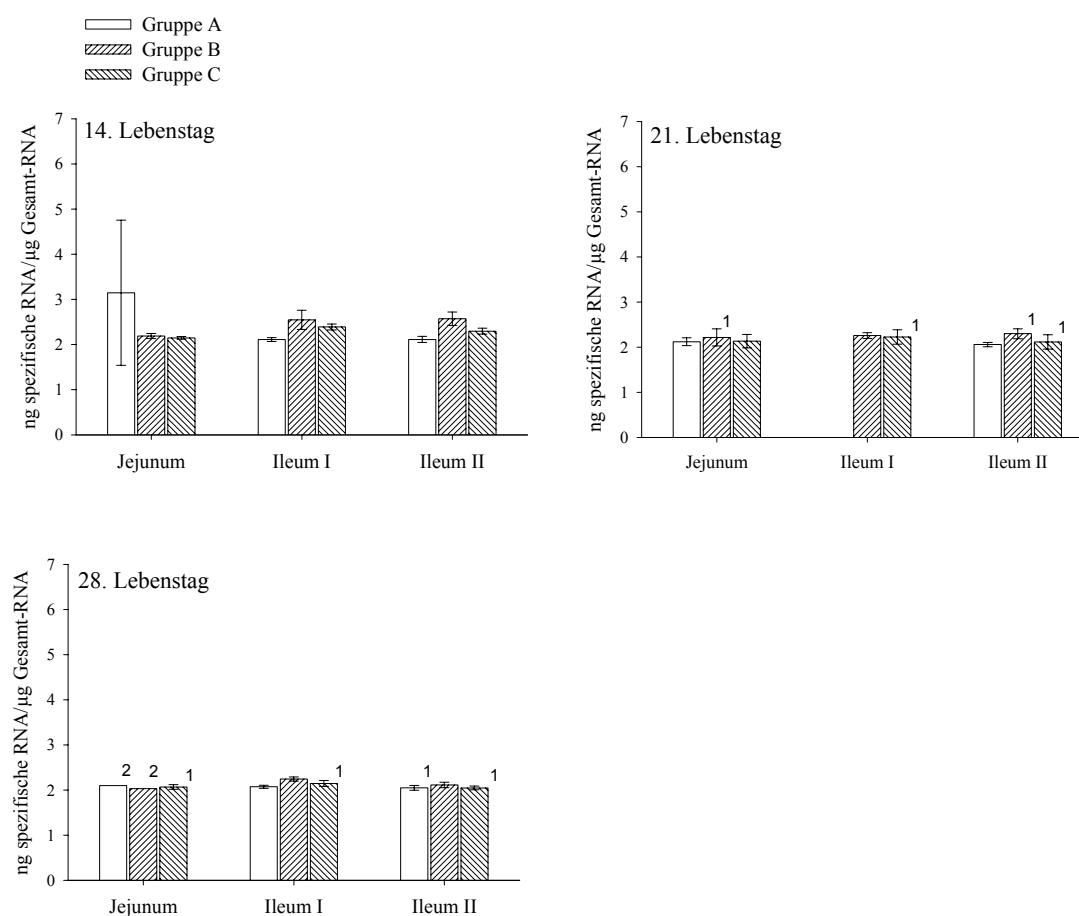


Abbildung 29: 16S rRNA von *L. fermentum* in RNA-Extrakten aus Digestaprobe von Broilern (ng spezifische RNA/ μg Gesamt-RNA).

Arithmetisches Mittel und Standardabweichungen der Parallelproben ($n = 3$; 1 : $n = 2$).

Gruppe A: Mais-Soja-Diät, **Gruppe B:** Weizen-Roggen-Diät, **Gruppe C:** Weizen-Roggen-Diät + Xylanase

Es sei auf eine große Zahl von Proben verwiesen, welche bei Hybridisierung mit S-S-Lfer-061-a-A-26 kein Signal aufwiesen. Dabei waren vor allem die Proben vom 21. und 28. Lebenstag betroffen. Gruppe B wies mit Ausnahme der Jejunumproben des 14. und 28. Lebenstages die höchsten Mengen an *L.fermentum*-RNA auf. In diesen Proben zeigte Gruppe A die höchsten und Gruppe B die niedrigsten Werte. Nach Korrektur des Mittelwertes der Maisgruppe vom 14. Lebenstag um einen einzelnen sehr hohen Wert ist dieser Unterschied nur noch sehr gering.

Unter Einbeziehung der über den gesamten Versuchszeitraum für die einzelnen Darmabschnitte ermittelten Werte ließen sich im Jejunum die höchsten Mengen spezifischer RNA für die Tiere mit Maisdiät und die geringsten für die Tiere mit Enzymzulage feststellen (Tabelle 30). In beiden Anteilen des Ileums konnten hingegen jeweils die höchsten Mengen an 16S rRNA von *L.fermentum* in den Proben der Tiere aus Gruppe B und die geringsten in denen der Tiere aus Gruppe A bestimmt werden. Im vorderen Ileum ließen sich diese Unterschiede gegenüber den Gruppen A und C und im terminalen Ileum gegenüber der Gruppe A statistisch sichern. Bei den Tieren der Gruppe A war bei dieser Bewertung der Ergebnisse eine kontinuierliche Verringerung der Werte vom Jejunum zum terminalen Ileum zu beobachten. Demgegenüber ließen sich für die Proben aus dem vorderen Ileum der Tiere der Gruppen B und C jeweils die höchsten und im Jejunum die geringsten Mengen an spezifischer RNA nachweisen. In den Jejunumproben der Gruppe B lagen die gemessenen Werte signifikant unterhalb derer aus beiden Abschnitten des Ileums.

Tabelle 30: 16S rRNA (ng/µg Gesamt-RNA) von *L.fermentum* in Digestaprobe
Abhängigkeit von der Versuchsdiät und der Lokalisation im Verdauungstrakt

Jejunum			Ileum I			Ileum II		
	N	spezifische RNA (ng/µg)		N	spezifische RNA (ng/µg)		N	spezifische RNA (ng/µg)
Gruppe A	7	2,56 ± 1,08	Gruppe A	6	2,09 ± 0,04 ^b	Gruppe A	8	2,08 ± 0,06 ^b
Gruppe B	6	2,17 ± 0,12 ²	Gruppe B	9	2,35 ± 0,19 ^{a,1}	Gruppe B	8	2,33 ± 0,23 ^{a,1}
Gruppe C	8	2,12 ± 0,09	Gruppe C	8	2,27 ± 0,14 ^a	Gruppe C	7	2,17 ± 0,14 ^b

Gruppe A: Mais-Soja-Diät, Gruppe B: Weizen-Roggen-Diät, Gruppe C: Weizen-Roggen-Diät + Xylanase
Unterschiedliche hochgestellte Buchstaben innerhalb einer Spalte und unterschiedliche hochgestellte Zahlen innerhalb einer Zeile unterscheiden sich mit $p < 0,05$ signifikant (Scheffé).

5.9.5 Nicht nachgewiesene Bakterienarten

Bei Einsatz der Sonden S-S-Ecae-0181-a-A-24 (*E.caecorum*), S-S-Ecasflaga-0185-a-A-21 (*E.casseliflavus*, *E.flavescens*, *E.gallinarum*), S-S-Lacet-0061-a-A-25 (*L.acetolerans*), S-S-Lacid-2519-a-A-20 (*L.acidophilus*) und S-S-Lamy-0499-a-A-24 (*L.amylovorus*) konnte keine Hybridisierung der Proben-RNA beobachtet werden, obwohl die als Positivkontrolle eingesetzte Kultur-RNA Signale erbrachte.