

## **Beeinflussung der Darmflora durch Probiotika – Analyse mittels molekularer Methoden**

M. HANDSCHUR, C. JUSEK, D. JÖLLI, J. ZULEHNER, A. HASLBERGER

### **Zusammenfassung**

Der Einfluss von Probiotika auf die Darmflora wurde bei Küken mit molekularbiologischen, kulturfreien Methoden (Polymerasekettenreaktion - PCR, Denaturant Gel Elektrophorese – DGGE) untersucht und mit mikrobiologischen Methoden verglichen. Küken wurden vier Wochen lang mit einem *Enterococcus faecium* Stamm gefüttert und Proben von unterschiedlichen Regionen des Gastrointestinaltrakts wurden mit Proben aus normal gefütterten Küken verglichen. Als zusätzliche Kontrolle dienten Proben normal gefütterter Küken, welche mit dem probiotischen Stamm gespikt wurden. In Übereinstimmung mit den konventionellen Methoden zeigte die wesentlich raschere Methode der DGGE die Besiedlung des Darms mit dem *Enterococcus faecium* Stamm, aber auch Veränderungen im Muster der wichtigsten Keime.

#### **Kennwörter:**

Küken, Probiotika, Antibiotika, Darmflora, Enterococcus, Denaturant Gradient Gel Elektrophorese

### **Summary**

Consequences of probiotics on the gastrointestinal (GI) flora of poultry has been analysed using microbial, culture free methods including PCR and DGGE and compared with standard microbial methods. Poultry was fed with a selected strain of *Enterococcus faecium* for four weeks and samples of the GI flora were taken from various regions of the GI tract. The GI flora was compared with a control. As an additional control the GI flora of a control group was spiked with *Enterococcus faecium*. In accordance with microbial standard methods the time saving DGGE analysis revealed colonisation of the GI tract by *Enterococcus faecium* but also changes in the pattern of prominent bacterial strains.

#### **Keywords:**

poultry, probiotics, antibiotics, gut flora, enterococcus, denaturing gradient gel electrophoresis

### **Einleitung**

Die Nutzung von Antibiotika in der landwirtschaftlichen Tierhaltung hat in den letzten Jahrzehnten enorme Ausmaße angenommen. Die Anwendung der Antibiotika liegt dabei hauptsächlich im therapeutischen, prophylaktischen und nutritiven Bereich [1].

Doch aufgrund der vermehrten Anwendung von Antibiotika kommt es bei vielen gesundheitsrelevanten Bakterien zur Ausbildung von Resistenzen gegenüber Antibiotika, was zu Problemen bei der Behandlung von Infektionen durch diese Bakterien führen kann [1].

Aus diesem Grund sind in der Europäischen Union seit 1995 viele Antibiotika verboten, welche als Wachstumsförderer verwendet wurden. Mit Beginn des Jahres 2006 ist in der EU die Verwendung von Antibiotika als Wachstumsförderer verboten [1]. Die WHO empfiehlt generell die Anwendung von Antibiotika, sowohl beim Mensch als auch beim Tier, weitestgehend einzuschränken.

Aufgrund dieser Empfehlungen müssen neue Wege und Alternativen gefunden werden, um die Tiere besonders in deren ersten Lebensstagen vor Infektionen durch pathogene Bakterien, wie *Clostridium*

*perfringens* oder *Campylobacter jejuni*, zu schützen. Eine dieser Alternativen stellt das Konzept der Competitive Exclusion (CE) dar. Darunter versteht man im Allgemeinen den Schutz vor Kolonisation von pathogenen Mikroorganismen durch vorteilhafte Mikroorganismen [2].

Die wichtigsten Mechanismen der CE sind der Wettbewerb um Nährstoffe und Rezeptorstellen, die Coaggregation mit Pathogenen, die Produktion von organischen Säuren sowie die Stimulation des Immunsystems [3].

Die Bakterien, die diese Mechanismen aufweisen, werden im Darmtrakt eines jeden gesunden Tieres gefunden und sind wichtige Vertreter der Darmflora [4]. Durch die Zugabe dieser probiotischen Stämme als Futterzusatzmittel soll die Darmflora von jungen Tieren aufgebaut bzw. gestärkt werden, damit sie in der Lage sind, Infektionen durch pathogene Bakterien zu widerstehen. In der Tierernährung werden Probiotika aus prophylaktischen und leistungsfördernden Indikationen im engeren Sinne als Ersatz für Antibiotika als Futtermittelzusatzstoffe zur Unterstützung der Mast (Schweine, Geflügel), aber auch therapeutisch zur Gesunderhaltung bei Störungen des

mikroökologischen Gleichgewichts der Darmmikroflora eingesetzt [5].

Im nachfolgenden Experiment sollte anhand eines Tiermodells untersucht werden, inwiefern die Darmflora der beiden Darmabschnitte Jejunum und Caecum durch die Zugabe eines probiotischen Stammes beeinflusst wird. Dabei muss auch auf die beiden unterschiedlichen Darmabschnitte, die sich wesentlich in ihrer physiologischen Umgebung unterscheiden, eingegangen werden:

Im Jejunum findet der Hauptanteil der Verdauung statt. Daher finden sich hier hohe Konzentrationen von Gallensalzen, Verdauungsenzymen und Pankreatin. Der pH-Wert liegt zwischen 6,5 und 7,0.

Was die vorherrschende Darmflora betrifft, sind hier viele fakultativ anaerobe Formen, wie Laktobazillen, die den größten Anteil der Darmflora ausmachen, Streptokokken und Enterokokken, Enterobacteriaceae und Clostridien angesiedelt [6].

Selektion auf höhere Wachstumsraten bei Masthähnchen führte zu unerwünschten Nebeneffekten wie einer veränderten Magen-Darm-Entwicklung während des Wachstums, Stoffwechselproblemen, einer schlechten Immunkompetenz und einer erhöhten Anfälligkeit auf Pathogene [7].

Die beiden Caeca sind durch ihr streng anaerobes Klima und die höchste Bakteriendichte gekennzeichnet. Es finden sich hauptsächlich nicht-sporulierende Anaerobier sowie 17 unterschiedliche Arten von Clostridien [2].

Der pH-Wert liegt zwischen 8,0 und 9,0. Die Konzentration von Gallensalzen ist nur mehr gering, wohingegen die Konzentration von kurzkettigen Fettsäuren, die von den Darmbakterien durch Umbau von Zellulose entstehen, sehr hoch ist [8].

## Material und Methoden

Als Untersuchungsmaterial diente der Inhalt aus den Darmabschnitten Jejunum und Caecum dreier vier Wochen alter Küken, welche mit  $2,7 \times 10^{11}$  Gramm/Tag probiotischem *Enterococcus faecium* DSM350 der Firma Biomin und Kükenfutter gefüttert wurden. Als Kontrolle wurde ein Küken nur mit Kükenfutter

Primer	Sequenz [5'- 3']	Annealing Temperatur	Target	Referenz
341f	CCTACGGGAGGCAGCAG	55°C	Eubakterien	10
985r	GTAAGGTTCTTCGCGTT	55°C	Eubakterien	11
518r	ATTACCGCGCTGCTGG	55°C	Eubakterien, nested	12
DG74f	AGGAGGTGATCCAACCGCA	58°C	Enterobacteriaceae	13
RW01r	AACTGGAGGAGGTGGGGAT	58°C	Enterobacteriaceae	13
Lac1	AGCAGTAGGGAATCTTCCA	60°C	Laktobazillen	14
Lac2	ATTYCACCGCTACACATG	60°C	Laktobazillen	
GC-Klammer	CGCCCGCCGCGCGCGGGG CGGGCGGGGACGGGGG			10

Tab. 1: PCR Bedingungen und Primer.

(Kontrolltier) gefüttert. Die Gesamt-DNA aus 200 mg Stuhl wurde durch ein Extraktionskit für Stuhl (Fa. Genxpress) gewonnen. Mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR) wurden bestimmte Abschnitte bakterieller 16S rDNA aus der Gesamt-DNA amplifiziert und gereinigt. Die PCR-Bedingungen und verwendete Primer sind in *Tabelle 1* dargestellt.

Die amplifizierten PCR-Produkte wurden mittels Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) nach ihrer Sequenz aufgetrennt. Dies geschieht in einem Polyacrylamidgel entlang eines ansteigenden Gradienten von DNA-denaturierenden Substanzen [9]. Die Struktur der DNA wird durch das sequenzabhängige Schmelzverhalten geändert und damit wird die Wandergeschwindigkeit im Gel beeinflusst. Durch die unterschiedlichen Wanderstrecken können Unterschiede in der Sequenz verschiedener DNA-Bereiche festgestellt werden [9].

Es wurde ein Screen auf Eubakterien, Enterobacteriaceen und Laktobazillen durchgeführt. Dabei wurden die DNA-Fragmente dreieinhalb Stunden bei 200 Volt und einem 8 %igen Polyacrylamidgel mit einem Denaturantengradienten von 30 bis 60 % aufgetrennt. Als Sensitivitätstest (Spiketest) wurden  $10^4$  Bakterien des probiotischen Keims pro Gramm Stuhl des Kontrolltieres beigemischt. Sowohl DNA-Extraktion als auch PCR und DGGE wurden im 3er-Ansatz durchgeführt.

Keimart	Nährmedien	Differenzierung
Gesamtkeimzahl Aerob	Tryptone Soya Agar	weiße, scheibenförmige Kolonien
Gesamtkeimzahl Anaerob	Reinforced Clostridial Agar	weiße, scheibenförmige Kolonien
Enterokokken	Kanamycin-Aesculin-Azid-Agar	Enterococcus, Staphylococcus, Bacillus cereus, E.coli
Enterobacteriaceae	VRBD-Agar	Enterobacteriaceae

Tab. 2: Selektierte Mikroorganismen und Nährmedien. Die Keime wurden 24 Stunden bei 37°C bebrütet.

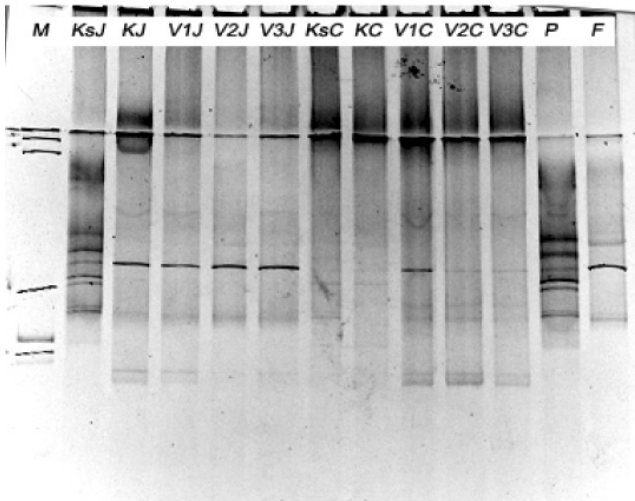
Neben der molekulargenetischen Untersuchung wurde auch die klassische Kultivierung mit Selektivmedien als Vergleich herangezogen. Hierbei wurde auf *Enterococcus faecium* sowie aerobe und anaerobe Bakterien allgemein und auf Staphylokokken, *Bacillus cereus*, *E.coli* und allgemein auf Enterobacteriaceae selektiert. Die Selektion erfolgt aufgrund unterschiedlicher Wachstumsbedingungen für unterschiedliche Bakteriengruppen und -spezies (Tab. 2).

## Ergebnisse

Anhand des Bandenmuster der amplifizierten DNA der Eubakterien ist der Unterschied einerseits zwischen Caecum und Jejunum und dem probiotischen Keim und dem Kükenfutter deutlich erkennbar.

Der Unterschied im Bandenmuster zwischen dem Kontrolltier und den Versuchstieren ist bei den Eubakterien (Abb. 1) deutlich zu erkennen, während das Bandenmuster innerhalb der Versuchsgruppe kaum Unterschiede aufweist.

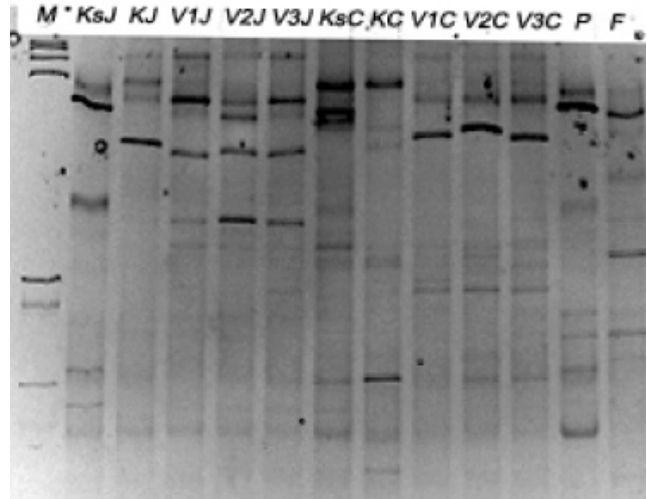
Die Bande des zugesetzten Keims war in der gespikten Probe deutlich zu sehen, nicht aber bei den Proben des Kontrollküchens.



**Abb. 1:** DGGE der mit den Primern 341fGC-518r amplifizierten DNA Fragmente der drei Versuchsküken, der Kontrollen, des Probiotikum-Stammes und des Kükenfutters: M) Marker, KsJ) Jejunum Kontrolltier gespikt, KJ) Jejunum Kontrolltier, V1J-V3J) Jejunum Versuchstiere, KsC) Caecum Kontrolltier gespikt, KC) Caecum Kontrolltier, V1C-V3C) Caecum Versuchstiere, P) Probiotischer Keim, F) Kükenfutter

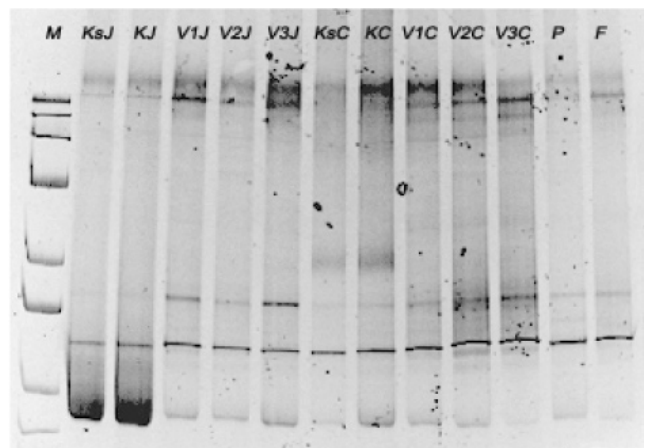
Greisen et al. [15] führte die Primer anfangs als universelle Primer. Bunyard und Valez [13] beschrieben die Primer DG74f und RW01r als Enterobacteriaceae-spezifisch. Tatsächlich amplifizieren diese Primer eine andere konserviertere Region der 16S rDNA.

Die Amplifikation mit den Primern DG74f und RW01 (Abb. 2) zeigt einen deutlichen Unterschied zwischen den Proben des Jejunum der gespikten Kontrolle und der Kontrolle, nicht aber zwischen Kontrolle und Versuchstieren. Das Bandenmuster der Proben des Caecum der Versuchstiere weist ein gering anderes Bandenmuster auf als das der Kontrolle.



**Abb. 2:** DGGE mit den Primern DG74f-RW01rGC amplifizierten DNA Fragmente der der drei Versuchsküken, der Kontrollen, des Probiotikum-Stammes und des Kükenfutters: M) Marker, KsJ) Jejunum Kontrolltier gespikt, KJ) Jejunum Kontrolltier, V1J-V3J) Jejunum Versuchstiere, KsC) Caecum Kontrolltier gespikt, KC) Caecum Kontrolltier, V1C-V3C) Caecum Versuchstiere, P) Probiotischer Keim und F) Kükenfutter.

Das DNA-Bandenmuster der Laktobazillen (Abb. 3) weist kaum sichtbare Unterschiede zwischen Jejunum, Caecum, dem Probiotikum und dem Kükenfutter auf. Lediglich die Versuchsgruppe – v.a. die Proben aus dem Jejunum – zeigt eine zusätzliche Bande.



**Abb. 3:** DGGE mit den Primern Lac1fGC-Lac2r amplifizierten DNA Fragmente der drei Versuchsküken, der Kontrollen, des Probiotikum-Stammes und des Kükenfutters: M) Marker, KsJ) Jejunum Kontrolltier gespikt, KJ) Jejunum Kontrolltier, V1J-V3J) Jejunum Versuchstiere, KsC) Caecum Kontrolltier gespikt, KC) Caecum Kontrolltier, V1C-V3C) Caecum Versuchstiere, P) Probiotischer Keim, F) Kükenfutter.

Die Ergebnisse der Kultivierung sind in *Tabelle 3, 4* und *5* zusammengefasst. Die Gesamtkeimzahl aerober und die anaeroben, nicht-pathogener Mikroorganismen ist bei den Versuchstieren um ein bis zwei Zehnerpotenzen gestiegen.

	Kontrolle	Versuchstier 1	Versuchstier 2	Versuchstier 3
Gesamtkeimzahl aerob	2,61*10 <sup>4</sup>	1,64*10 <sup>7</sup>	2,84*10 <sup>6</sup>	9,64*10 <sup>6</sup>
Gesamtkeimzahl anaerob	2,27*10 <sup>4</sup>	1,89*10 <sup>7</sup>	2,64*10 <sup>6</sup>	1,06*10 <sup>6</sup>
Enterokokken	1,57*10 <sup>4</sup>	1,63*10 <sup>7</sup>	2,20*10 <sup>6</sup>	8,27*10 <sup>6</sup>
Enterobacteriaceae	4,00*10 <sup>1</sup>	1,00*10 <sup>2</sup>	4,55*10 <sup>2</sup>	3,30*10 <sup>1</sup>

**Tab. 3: Keimzahlen im Jejunum in der Kontrolle und den Versuchstieren.**

	Kontrolle	Versuchstier 1	Versuchstier 2	Versuchstier 3
Gesamtkeimzahl aerob	5,39*10 <sup>6</sup>	1,64*10 <sup>7</sup>	2,84*10 <sup>6</sup>	9,64*10 <sup>6</sup>
Gesamtkeimzahl anaerob	1,30*10 <sup>6</sup>	1,89*10 <sup>7</sup>	2,64*10 <sup>6</sup>	1,06*10 <sup>6</sup>
Enterokokken	6,16*10 <sup>6</sup>	1,63*10 <sup>7</sup>	2,20*10 <sup>6</sup>	8,27*10 <sup>6</sup>
Enterobacteriaceae	1,23*10 <sup>4</sup>	1,00*10 <sup>2</sup>	4,55*10 <sup>2</sup>	3,30*10 <sup>1</sup>

**Tab. 4: Keimzahlen im Caecum der Kontrolle und des Versuchstieres.**

	Kükenfutter
Gesamtkeimzahl aerob	2,72*10 <sup>4</sup>
Gesamtkeimzahl anaerob	1,33*10 <sup>4</sup>
Enterokokken	2,48*10 <sup>2</sup>
Enterobacteriaceae	1,83*10 <sup>3</sup>

**Tab. 5: Keimzahlen von Kükenfutter**

## Diskussion

Anhand des eubakteriellen Bandpattern der amplifizierten DNA konnte eine Beeinflussung der Darmflora durch Fütterung eines probiotischen Keimes gezeigt werden. Der probiotische Keim zeigt anhand der DNA-Bandenmuster eine – wenn auch geringe – Beeinflussung der Darmflora dieser Gruppe, und das nur in den anaeroben, alkalischen Darmabschnitten (Caecum). Die Beeinflussung der Laktobazillen-Flora durch den probiotischen *Enterococcus faecium* dürfte – wenn auch nur gering – vor allem im Bereich des Jejunum liegen. Eine mögliche Erklärung für die sehr ähnlichen Bandenmuster könnten die verwendeten Primer liefern: Sie amplifizieren nur einige bestimmte, in Getreide und Milchprodukten vorkommende Laktobazillusarten. Da das Trägermaterial für den probiotischen Keim *E. faecium* Milchpulver war, das Kükenfutter aus Getreidekörnern bestand und Lakto-

bazillen fakultativ anaerob sind – also sowohl im Jejunum als auch im Caecum wachsen können, ist eine sehr ähnliche Laktobazillen-Flora zwischen allen Gruppen durchaus denkbar. Anhand der klassischen Kultivierung konnte eine quantitative Beeinflussung der gesamten Darmflora durch Probiotika gezeigt werden. Zusammenfassend konnte in der Studie festgestellt werden, dass durch Fütterung der Hühner mit dem probiotischen Stamm eine Veränderung der Darmflora, sowohl qualitativ als auch quantitativ stattgefunden hat. Nicht nur der probiotische Keim hat sich im Darm angesiedelt, auch andere Gruppen traten vermehrt auf.

## Literatur

- [1] Collignon P. (2004): A Review – The use of antibiotics in food production animals – Does this cause problems in human health? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 54(1): 276-278.
- [2] Ewing W.N., Cole D.J.A. (1994): *The living gut: An introduction to microorganisms in nutrition.* Context Publications, Dungannon, Ireland.
- [3] Ouwehand A.C., Kirjavainen P.V., Shortt C., Salminen S. (1999): Probiotics: Mechanisms and establishes effects, *International Dairy Journal* 9: 43 - 52.
- [4] Hübener K. (2001): *Untersuchung zur Wirkungsweise einer Xylanase im Verdauungstrakt von Masthühnern.* Dissertation an der Freien Universität Berlin: 27-44.
- [5] Fuller R. (1989). Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol* 66: 365-378.
- [6] Lu J, Idris U, Harmon B, Hofacre C, Maurer JC, Lee MD (2003): Diversity and Succession of the Intestinal Bacterial Community of the Maturing Broiler Chicken. *Appl Environ Microbiol.* 69(11): 6816–6824.
- [7] Lan Y., Versteegen M.W.A., Tamminga S., Williams B.A. (2005): Die Rolle der symbiotischen Mikrobengemeinschaft im Darm von Masthähnchen. *World's Poultry Science Journal* 61: 95-104.
- [8] Jölli D. (2005): *Bestimmung von Effizienzkriterien für ausgewählte probiotische Stämme zur Verwendung in der Geflügelproduktion; Diplomarbeit Universität für Bodenkultur, Wien.*
- [9] Muyzer G., De Waal E.C., Uitterlinden A.G. (1993): Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 695-700.

- [10] *Muyzer G., Smalla K.* (1998): Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek* 73: 127-141.
- [11] *Heuer H., Hartung K., Wieland G., Kramer I., Smaller K.* (1999): Polynucleotide probes that target a hypervariable region of 16S rRNA genes to identify bacterial isolates corresponding to bands of community fingerprints. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 4845-4862.
- [12] *Neefs J.M., Van de Peer Y., Hendriks L., De Wachter R.* (1990): Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences. *Nucleic Acids Res.* 18: 2237-2317.
- [13] *Bunyard, Valez.* (2000): Bacterial communities on leaves of cauliflower. unpublished data.
- [14] *Walter J, Hertel C, Tannock GW, Lis CM, Munro K, Hammes WP* (2001): Detection of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, and *Weissella* Species in Human Feces by Using Group-Specific PCR Primers and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 2578-2585.
- [15] *Greisen K., Loeffelholz M., Purohit A., Leong D.* (1994): PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol.* 32(2): 335-51.

*Adresse der Autoren:*

*Mag. Michael Handschur  
Inst. für Mikrobiologie und Genetik  
Universität Wien  
Ludwig-Boltzmann-Institut für Leukämieforschung  
e-mail: michael.handschur@univie.ac.at*

*Mag. Claudia Jusek  
Inst. f. Ernährungswissenschaften  
Universität Wien  
e-mail: claudia\_jusek@yahoo.de*

*Mag. Daniela Jölli  
Interuniversitäres Department für  
Agrarbiotechnologie  
Universität für Bodenkultur Wien  
e-mail: daniela\_joelli@gmx.at*

*Jutta Zulehner  
Inst. f. Ernährungswissenschaften  
Universität Wien  
e-mail: a9909763@unet.univie.ac.at*

*Univ. Doz. Dr. Alexander Haslberger  
Bundesministerium für Gesundheit und Frauen  
Universität Wien  
Radetzkystr. 2  
A-1030 Wien  
Institut für Mikrobiologie und Genetik  
e-mail: alexander.haslberger@univie.ac.at*

Eingelangt am: 30. 8. 2005  
Akzeptiert am: 28. 10. 2005