



Ernährungsphysiologische Bewertung von Öko-Futtermitteln für Schweine

Erstellt von:

Georg-August-Universität Göttingen
Forschungs- und Studienzentrum für Landwirtschaft und Umwelt
Am Vogelsang 6, 37075 Göttingen
Tel.: +49 551-393359
E-Mail: habel@gwdg.de
Internet: <http://www.uni-goettingen.de>

Gefördert vom Bundesministerium
für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz
im Rahmen des Bundesprogramms Ökologischer Landbau

Dieses Dokument ist über <http://forschung.oekolandbau.de> verfügbar.



Abschlussbericht

Aktenzeichen 514-43.20/02OE209/F

Ausführende Stelle:

Georg-August-Universität/
Tierärztliche Hochschule Hannover

Prof. Dr. Hansjörg Abel
Institut für Tierphysiologie u. Tierernährung
Kellnerweg 6
37077 Göttingen

Prof. Dr. Gerd Breves
Physiologisches Institut
Tierärztliche Hochschule Hannover
Bischofsholer Damm 15/102
30173 Hannover

Koordination/Verwaltung:

Forschungs- und Studienzentrum
Landwirtschaft und Umwelt
Am Vogelsang 6
37075 Göttingen

Forschungsprojekt:

02 OE 209F

Thema:

Ernährungsphysiologische Bewertung
von Öko-Futtermitteln für Schweine

Laufzeit:

01.12.2004 – 31.07.2005

Berichtszeitraum:

01.12.2004 – 30.09.2005

Göttingen, Hannover, den 31.10.2005

Gliederung	Seite
1. Ziele und Aufgabenstellung des Projektes.....	3
1.1 Projektplanung und Ablauf.....	3
1.1.1 Stoffwechselversuche.....	3
<u>1.1.2 Morphophysiologie und Histomorphologie des Gastrointestinaltraktes.....</u>	<u>3</u>
1.1.3 Darmucosale Transportphysiologie.....	4
1.1.4 Molekularbiologische Charakterisierung der Struktur der intestinalen Mikroorganismen-Gemeinschaften.....	4
1.2 Chronologischer Ablauf der Untersuchungen.....	4
1.3 Bisheriger wissenschaftlicher Stand, von dem ausgegangen wurde.....	4
2. Material und Methoden.....	5
2.1 Stoffwechselversuche.....	5
<u>2.2 Morphologische, Histologische Untersuchungen und Histomorphometrie.....</u>	<u>7</u>
<u>2.3 Darmmucosale transportphysiologische Messungen mittels Ussingkammer-Verfahren.....</u>	<u>7</u>
<u>2.4 Molekularbiologische Untersuchungen zur mikrobiellen Population.....</u>	<u>8</u>
<u>2.5 Statistische Auswertung.....</u>	<u>10</u>
<u>3. Ergebnisse.....</u>	<u>11</u>
<u>3.1 Stoffwechselversuche.....</u>	<u>11</u>
<u>3.2 Morphophysiologische, histologische und histomorphometrische Befunde.....</u>	<u>14</u>
3.3 Darmmucosale Transportphysiologie.....	15
3.4 Molekularbiologische Charakterisierung der Struktur der intestinalen Mikroorganismen-Gemeinschaften.....	16
3.4 Schlussfolgerungen.....	19
4. Zusammenfassung.....	20
Summary	
5. Gegenüberstellung der geplanten zu den erreichten Zielen.....	21
6. Literaturverzeichnis.....	21

1. Ziele und Aufgabenstellung des Projektes

In dem Forschungsprojekt sollten Stoffwechselversuche nach dem Zulageprinzip mit Schwäbisch Hällischen und modernen Gebrauchskreuzungsschweinen durchgeführt und die Wirkung von weitgehend unlöslichen Nicht-Stärke-Polysacchariden (NSP) hinsichtlich der folgenden Aspekte untersucht werden:

- Faserverdauungsvermögen und N-Bilanzen
- Digestapassage
- Morphophysiologie und Histomorphologie des Gastrointestinaltraktes
- Darmmucosale Transportphysiologie
- Molekularbiologische Klassifizierung der intestinalen Mikroflora

Aus den Erkenntnissen sollten unter Berücksichtigung der Ergebnisse aus dem Vorgängerprojekt 02OE209 Empfehlungen zur Auswahl geeigneter Schweineherkünfte und ihrer Fütterung im Ökologischen Landbau gegeben werden.

1.1 Projektplanung und Ablauf

Die Versuche wurden nach dem gleichen Vorgehen wie im Vorgängerprojekt durchgeführt, nur daß anstelle von Zuckerrübertrockenschnitzel im Fortsetzungsprojekt Erbsenschalen mit ausgewiesenen hohen Anteilen unlöslicher NSP als Faserzulagen zum Einsatz kamen. Die Versuchstiere wurden als Absatzferkel (um 30 kg LM) zugekauft.

Tiere: Schwäbisch Hällisches Schweine der Bäuerlichen Erzeugungsgemeinschaft
Schwäbisch Hall, Wolpertshausen
Moderne Gebrauchskreuzung (Deutsche Landrasse x Large White) x Pietrain))
der Versuchswirtschaft Rellehausen, Universität Göttingen

Futter: a) Grundration
b) Grundration + Zulage von Erbsenschalen

Haltung der Schweine im Institut bis Versuchsbeginn: Einzel- und Zweierbuchten,
Sägespäne-Einstreu, Anfütterung mit Versuchsfuttermischungen

1.1.1 Stoffwechselversuche

Einzelhaltung in Stoffwechselkästen während der letzten 3 Tage der Vorfütterungs- und der nachfolgenden Sammelperioden

Versuchsdauer: nach Zukauf der Ferkel 7 Tage Eingewöhnung mit Fütterung der Grundration, anschließend Beginn der Fütterung mit den Versuchsrationen,

7 Tage Vorfütterungsperiode + 5 bis 7 Tage Sammelperiode

Verabreichung von TiO_2 mit der Morgenfütterung, anschließende Kotprobensammlung in zunehmend verlängerten Zeitabschnitten über 3 Tage

Erfasste Merkmale: Verdaulichkeiten
Kot-N- Fraktionen
 TiO_2 in Kotproben
N-Bilanzen

1.1.2 Morphophysiologie und Histomorphologie des Gastrointestinaltraktes

Entnahme des Gastrointestinaltraktes und von Organen (Leber, Pankreas, Milz) sofort nach Schlachtung;

Abbinden und abtrennen einzelner Darmabschnitte, Wägungen und Längenmessungen;
Organwägungen;

Entnahme von ca 1cm breiten Querschnitten von Jejunum und Ileum für histologische Untersuchungen

1.1.3 Darmucosale Transportphysiologie

Messung des elektrogenen Nährstofftransports und der Gewebeleitfähigkeit im mittleren Jejunum der beiden Schweineherkünfte mittels Ussingkammer-Verfahren

1.1.4 Molekularbiologische Charakterisierung der Struktur der intestinalen Mikroorganismen-Gemeinschaften

SSCP-Technik (single-strand conformation polymorphism nach Schwieger und Tebbe 1998); Darstellung natürlich vorkommender Mikroorganismen-Gemeinschaften über PCR-abhängige genetische Profile

Isolierung genomischer DNA von Darmbakterien aus dem Darminhalt (Ileum, Caecum) der Schweine als Ausgangsmaterial für die PCR;

Auswertung der SSCP-Profile anhand von Ähnlichkeitsanalysen der Bandenmuster

1.2 Chronologischer Ablauf der Untersuchungen

Dezember 2004/Januar 2005: Beschaffung der Futterkomponenten, Herstellung und Analyse der Futterrationen

Januar - April 2005: Durchführung der Stoffwechselversuche
Durchführung der Ussingkammer-Messungen

Februar - Juni 2005: Laboranalysen zu Stoffwechselversuchen und
Passageratenbestimmung
Histomorphometrische Messungen

Seit Februar 2005: Molekularbiologische Florenanalysen

Juli - September 2005: Auswertung und Berichterstattung

1.3 Bisheriger wissenschaftlicher Stand, von dem ausgegangen wurde

Nicht-Stärke-Polysaccharide (NSP) haben in den letzten Jahren verstärktes Interesse gefunden, weil diese nur durch mikrobielle Enzyme aufschließbaren Futterinhaltsstoffe tiefgreifende Wirkungen auf die Verdauungsphysiologie und Futterverwertung (Übersicht: Dänicke 1999; Lattemann 2000) sowie auf die Immunfunktion (Stewart et al., 1995) und das Infektionsgeschehen des Gastrointestinaltraktes von Nutztieren (Petkevicius et al., 1997; 2001, 2003a,b) ausüben. Unter den Bedingungen des ökologischen Landbaus finden NSP-reichere Futterrationen als bei konventioneller Schweinemast Verwendung. In der Züchtung von modernen Fleischschweinen wurden während der letzten Jahrzehnte Herkünfte mit hohen täglichen Zunahmen und möglichst niedrigem Futteraufwand beim Einsatz hochkonzentrierter, NSP-armer Futtermischungen selektiert. Es ist ungeklärt, ob derartige Herkünfte noch ein ausreichendes Verdauungsvermögen für NSP-reichere Futtermischungen aufweisen. Deshalb sollte die Verdauungsphysiologie weniger selektierter alter Landrassen und moderner Gebrauchskreuzungsschweine bei Versorgung mit NSP-armen und NSP-reichen Futtermischungen vergleichend untersucht werden.

Die in den üblichen Futtermitteln vorkommenden NSP enthalten als quantitativ bedeutendste Bausteine Arabinose und Xylose. Sie lassen sich in lösliche und unlösliche NSP unterteilen, wobei in Letzteren der meisten Futtermittel die Anteile der Xylose diejenigen der Arabinose deutlich überwiegen (Bach Knudsen 1997). Zu den löslichen NSP zählen auch Pektine und β -Glucane, während Cellulose und Xylane unlösliche NSP darstellen.

In dem Vorgängerprojekt wurden die Wirkungen von Zuckerrübenschnitzel-Zulagen an Schwäbisch Hällischen, Bunten Bentheimer und modernen Gebrauchskreuzungsschweinen

untersucht. In Zuckerrübenschnitzeln kommen deutlich höhere Gehalte an Arabinose als an Xylose vor und die Anteile der löslichen NSP überwiegen diejenigen der unlöslichen NSP (Bach Knudsen 1997). Es zeigte sich, daß Schwäbisch-Hällische Schweine weniger NSP als die beiden anderen Herkünfte verdauten. Vermutlich beruhten diese Unterschiede auf praecaecalen Verdauungsvorgängen und unterschiedlichen Digesta-Passageraten. Im Fortsetzungsprojekt kamen deshalb Schwäbisch Hällische und Gebrauchskreuzungsschweine zum Einsatz, die jeweils entweder eine an die vorangegangene Untersuchung angepasste Grundmischung oder zusätzlich ein Erbsenschalenprodukt mit weitgehend unlöslichen NSP erhielten.

2. Material und Methoden

2.1 Stoffwechselversuche

Je 9 Ferkel der Herkünfte „Schwäbisch Hällisch“ (SH) und „Gebrauchskreuzung“ (CB) im Lebendmassebereich von 34 - 45 kg wurden entweder mit einer Grundration oder mit einer Zulageration versorgt. Die Grundration (GR) bestand aus faserarmen Futterkomponenten, die mit Ausnahme von Kartoffelprotein, Sojaöl, Vormischung und synthetischen Aminosäuren aus ökologischer Erzeugung stammten. Als Zulage dienten Erbsenschalen („Exafine 2000“, Fa. Socode, B-7740 Warcoing, Belgien) mit 88 % Faser, davon 87 % unlöslich und 13 % löslich. Die Zusammensetzung der Grundration geht aus Tabelle 1 hervor.

Tabelle 1: Zusammensetzung der Grundmischung

Komponente	Anteil (%)	Inhaltsstoff		
Weizen	40,00	Trockensubstanz	(g/kg)	888
Gerste	29,27	Rohasche	(g/kg T)	65
Sojabohnenkuchen	20,00	Rohprotein	(g/kg T)	224
Kartoffelprotein	5,00	Rohfett	(g/kg T)	43
Sojaöl	2,00	Rohfaser	(g/kg T)	31
L-Lysin HCl	0,377	N-freie Extr.Stoffe	(g/kg T)	637
DL-Methionin	0,126	Stärke	(g/kg T)	478
L-Threonin	0,116	Zucker	(g/kg T)	42
L-Tryptophan	0,013	NDF	(g/kg T)	129
L-Histidin	0,046	ADF	(g/kg T)	53
L-Valin	0,050			
Vormischung*	3,00			

* Inhaltsstoffe je kg: 245g Ca, 50g P, 55g Na, 10g Mg, 400.000 I.E. Vit. A, 60.000 I.E. Vit. D₃, 2.500 mg Vit. E, 500 mg Cu

In Tabelle 2 werden die analysierten Aminosäuregehalte der Grundmischung aufgezeigt.

Tabelle 2: Analysierte Aminosäuregehalte der Grundmischung

Aminosäure	g/kg	g/16g N
Cystin	3,0	1,5
Methionin	4,7	2,4
Asparaginsäure	18,0	9,0
Threonin	8,6	4,3
Serin	8,8	4,4
Glutaminsäure	37,3	18,8
Prolin	12,5	6,3
Glycin	8,3	4,2
Alanin	8,1	4,1
Isoleucin	7,8	3,9
Leucin	15,1	7,6
Tyrosin	6,0	3,0
Phenylalanin	9,8	4,9
Histidin	4,8	2,4
Lysin	13,2	6,6
Arginin	11,1	5,6

Die nach Maßgabe der metabolischen Lebendmasse ($\text{kg}^{0,75}$) tierindividuell zugeteilten Mengen der Grundration sollten 80 % des Energie- und 100% des Nährstoffbedarfs der Schweine für 700g tägliche Zunahmen (DLG 2002) abdecken. Mit der Zulageration wurden die gleiche Mengen Grundration zuzüglich Erbsenschalen angestrebt. Wasser stand den Tieren zur freien Aufnahme zur Verfügung.

Die Tiere wurden nach der Anlieferung in Einzel- oder Zweierbuchten mit Sägespäne-Einstreu gehalten. Für die Stoffwechselversuche kamen die Tiere 3 Tage vor Beginn der Sammelperiode in Stoffwechselkästen. Die Vorfütterung mit den Versuchsrationen erstreckte sich auf mindestens 17 Tage, die Sammelperioden auf 5 Tage. Am Ende der Sammelperiode erhielten die Tiere eine mit dem Marker TiO_2 vermischte Ration. Anschließend wurden über 4 Tage in steigenden Zeitabständen innerhalb der Sammeltage Kotproben zur Markeranalyse genommen.

Die Rohnährstoffe wurden nach dem Weender Verfahren analysiert (Naumann & Bassler, 1997). Kotstickstoff wurde in Frischkot, die übrigen Inhaltsstoffe des Kotes in getrockneten Proben (60°C) bestimmt. Die Analyse von Stärke erfolgte polarimetrisch, die von Zucker gewichtsanalytisch. Die NDF- und ADF Bestimmung erfolgte nach Goering & van Soest (1970), die Kot-N Fraktionierung nach Mason (1969), modifiziert nach Kreuzer et al. (1999). Für die Bestimmung der Wasserhaltekapazität diente die Methode von Johansen & Bach Knudsen (1994).

2.2 Morphologische, Histologische Untersuchungen und Histomorphometrie

Sofort nach Schlachtung der Tiere wurde der Gastrointestinaltrakt entnommen und einzelne Abschnitte abgebunden, gewogen und vermessen. Des weiteren wurden Leber, Pankreas und Milz entnommen und gewogen. Ferner wurden von jeweils 3 Tieren je Gruppe Querschnitte von Jejunum und Ileum entnommen, mit eiskühler physiologischer Kochsalzlösung gespült und anschließend in 4 % neutral gepufferter Formalinlösung fixiert. Die Proben wurden unter Standardbedingungen mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt und bei 40 bzw. 250facher Vergrößerung lichtmikroskopisch untersucht. Für die histomorphometrischen Untersuchungen wurden je Schnitt an jeweils 10 Lokalisationen Zottenlänge und Kryptentiefe vermessen, und zwar stets von solchen Lokalisationen, in denen Zotte und Krypte in jeweils voller Länge angeschnitten waren.

2.3 Darmmucosale transportphysiologische Messungen mittels Ussingkammer-Verfahren

Tiere. Je Gruppe standen 3 Schweine zur Verfügung, die sich in ihren Lebendmassen zum Zeitpunkt der Schlachtung nicht nennenswert unterschieden: CB-GR $41, \pm 7,8$ kg, CB-ZR $45,8 \pm 0,4$, SH-GR $38,4 \pm 7,5$ kg und SH-ZR $38,1 \pm 5,6$ kg ($\bar{x} \pm SD$, 2-faktorielle ANOVA). Die Tiere wurden am Versuchstag durch einen Bolzenschuss betäubt und mittels Durchtrennung der Arteriae carotides communes sowie beider Venae jugulares internae und externae entblutet. Innerhalb von 5 min wurde das Darmkonvolut zur Probenentnahme exzentriert.

Darmsegment und Präparation. Aus dem Darmkonvolut wurden zunächst 4,5 m Dünndarm kaudal des Pylorus herausgelöst und verworfen. Das folgende 50 cm lange Segment des mittleren Jejunums wurde für die In-vitro-Messungen in Ussing-Kammern mehrfach mit eiskalter physiologischer Kochsalzlösung gespült. Im Anschluss daran wurde die Probe bis zur Gewebepreparation in Carbogen (95%O₂/5%CO₂) -begaster serosaler Pufferlösung aufbewahrt (Tab. 3). Zum Beginn der Präparation wurde das Darmrohr entlang des Gekröseansatzes aufgeschnitten und mit der mukosaabgewandten Seite auf ein Kunststoffbrett gelegt. Mit einem flachen Metallspatel wurde ein Teil der Tunica mucosa, bestehend aus Lamina epithelialis und Lamina propria mucosae, von den übrigen Schichten der Darmwand separiert („strippen“) und in die Ussing-Kammern verbracht.

Ussing-Kammer-Versuche. Die elektrophysiologische Charakterisierung der Mucosaepithelien erfolgte in konventionellen Ussing-Kammern mit einer offenen Fläche von $1,13 \text{ cm}^2$. Die Epithelien wurden mit den in Tabelle 3 angegebenen Puffersystemen über insgesamt ca. 2 Stunden inkubiert. Im Einzelnen wurden die Kurzschlussströme I_{sc} als Maß für den jeweiligen elektrogenen Nettoionenstrom und die Gesamtgewebeleitfähigkeit G_T erfasst. Getestet wurde der Effekt von Glucose in den additiven Konzentrationsstufen 0,5, 1, 2, 4 und 10 mmol l^{-1} auf den durch Na-abhängigen Glucose-Kotransport induzierten I_{sc} und der Effekt des Dipeptids Glycyl-Glutamin (Gly-Gln) auf den durch H^+ -abhängigen Dipeptid-Kotransport (5 und 10 mmol l^{-1}) induzierten I_{sc} . Um die potentielle Hydrolyse des Dipeptids durch endogene Aminopeptidasen zu verhindern, wurde der mukosalen Pufferlösung $10 \mu\text{mol l}^{-1}$ Amastatin zugegeben. Zur Vermeidung osmotischer Gradienten, wurden entsprechende Substratzugaben im serosalen Puffer jeweils durch Mannit ersetzt. Die Vitalität der Gewebe am Versuchsende wurde bei den Versuchen mit Gly-Gln durch Zugabe von Glucose (10 mmol l^{-1} , mukosal) überprüft.

Tabelle 3: Initiale Zusammensetzung der Inkubationslösungen, mit denen die mucosale bzw. serosale Seite der Ussing-Kammern befüllt wurde.

Substanz	Puffer mucosal, Konz. in mmol l ⁻¹ , Glucose-Resorption	Puffer mucosal, Konz. in mmol l ⁻¹ , Dipeptid-Resorption	Puffer serosal, Konz. in mmol l ⁻¹ , beide Versuchsansätze
NaCl	113,6	113,6	113,6
KCl	5,4	5,4	5,4
MgCl ₂ · 6 H ₂ O	1,2	1,2	1,2
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	1,2	1,2	1,2
NaHCO ₃	21,0	–	21,0
Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O	1,5	1,5	1,5
Glucose	–	–	10,0
Mannit	2,0	–	2,0
HEPES	20,0	–	7,0
Na-Gluconat	–	22,2	6,0
Indomethacin	0,01	0,01	0,01
	pH 7,4 mit NaOH/ HCl, im Mittel 297 mosmol l ⁻¹	pH 5,4 mit HCl, im Mittel 300 mosmol l ⁻¹	pH 7,4 mit HCl, im Mittel 296 mosmol l ⁻¹

2.4 Molekularbiologische Untersuchungen zur mikrobiellen Population

Isolierung der Darmbakterien für die SSCP

Die Gewinnung der Darmbakterien erfolgte durch Differentialzentrifugation nach Brandt und Rohr (1981). Nach der Schlachtung wurden aus den Darmbereichen Colon und Ileum der Tiere jeweils 50 ml Inhalt gewonnen und mit 50 ml eiskalter, 0,9%iger NaCl gemischt. Es konnte bei den drei Tieren 11, 26 und 29 kein Ileuminhalt gewonnen werden. Alle folgenden Zentrifugationsschritte erfolgten bei einer Temperatur von +4°C. Zunächst wurden die Proben bei 650 g 5 min und der daraus resultierende Überstand für 20 min bei 27500 g zentrifugiert. Anschließend wurde das gewonnene Pellet in 30 ml 0,9%iger NaCl resuspendiert und drei Mal nachgewaschen. Abschließend wurde das Pellet in 2 ml 0,9%iger NaCl aufgenommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der Bakterien bis zur weiteren Analyse erfolgte bei -80°C. Zur Gewinnung der genomischen DNA wurden 120 mg des bakteriellen Pellets eingesetzt und mit dem FastDNA Kit (Qbiogene, Deutschland) anhand des beiliegenden Protokolls aufgearbeitet. Die genomische DNA wurde bei -20°C gelagert.

Allgemeines Prinzip der SSCP

Für die Durchführung der SSCP werden zunächst die 16S RNA-Gene mit spezifischen Primern in der PCR amplifiziert. An diesen Matrizen werden mit sogenannten Com-Primern, die für alle bakteriellen 16S-RNA-Gene spezifisch sind, *nested* PCRs durchgeführt, bei denen ein Strang über eine Modifikation des Primers phosphoryliert wird. Nach Aufreinigung der PCR-Produkte aus der nested PCR werden die Doppelstränge durch Nuklease-Verdau zu Einzelsträngen abgebaut, aufgereinigt und über ein nicht denaturierendes Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Durch die sich einstellende verschiedene, sequenz-spezifische Konformation eines jeden PCR-Produkt-Einzelstranges (single-strand conformation) werden die Amplifikate aufgrund ihres unterschiedlichen Laufverhaltens aufgetrennt und zeigen die Gesamtheit der Mikroorganismen -Gemeinschaft als Bandenmuster oder genetisches Profil im Silber-gefärbten Gel. Diese Methode lässt allerdings so nur eine qualitative Aussage über die Struktur der Mikroorganismen-Gemeinschaft zu. Gerichtete quantitative Unterschiede im

Auftreten einzelner Banden in Abhängigkeit von Rasse und Fütterung müssten über Real time-PCR abgesichert werden.

Amplifikation der 16S rRNA-Gene

Zur Untersuchung der Domänen Bacteria und Archaea, sowie der Abteilung der Alpha-Proteobacteria wurden die ribosomalen RNA-Gene der Bakterien durch folgende spezifische Primer amplifiziert (Tabelle 4).

Tabelle 4: Primer

Primer Name	Primer 1	Primer 2	Literatur
Bacteria	Com1	Com2Ph	Schwieger & Tebbe (1998)
Archaea	A109f	A934	Weisburg et. al. (1991)
Alpha-Proteobacteria	F203alpha	R1492	Weisburg et. al. (1991)
Eubacteria	F27	R1492	Weisburg et. al. (1991)

Der PCR-Reaktionsansatz enthielt 50 pmol/l jedes Primerpaares (Roth, Deutschland) alle Nucleotide (je 10 mM), 5 U Taq Polymerase (Qiagen) und 1 x PCR Puffer mit 1.25 mM MgCl₂ (Qiagen) und bakterielle DNA in einem Endvolumen von 25 µl. Die PCR-Bedingungen waren wie folgt: Denaturierung 15 min bei 95°C, anschließend 25 Zyklen mit Denaturierung für 60 sec. bei 94°C, Annealing für 60 sec. und Elongation für 2 min. bei 72°C. Der abschließende Elongationsschritt dauerte 10 min bei 72°C. Die Annealingtemperatur war spezifisch für jedes Primerpaar (Archaea 52°C, Alphaproteobacteria 56°C und Eubacteria 50°C). Die Überprüfung des Amplifikats erfolgte durch Elektrophorese in einem mit Ethidiumbromid gefärbten 1%igen Agarosegel. Jeder spezifischen PCR folgte eine zweite PCR („nested PCR“) mit dem universellen Primerpaar Com1 und Com2Ph (Schwieger & Tebbe 1998). Das aus dieser PCR gewonnene Amplifikat entsprach der Position 519-926 auf dem konservierten Abschnitt des 16S rRNA-Gens von *Escherichia coli*. (Brosius et al. 1978). Der PCR-Reaktionsansatz wurde wie oben beschrieben angesetzt und auf ein Endvolumen von 50 µl eingestellt. Die Reaktionsbedingungen für die PCR wurden beibehalten, bei einer Annealingtemperatur von 50°C. Eine Überprüfung des Amplifikats erfolgte wie zuvor beschrieben.

Präparation des Einzelstranges

Zur Aufreinigung der „nested PCR“-Produkte wurde das QIAquick PCR Purifikation Kit (QIAGEN) verwendet. Die gereinigte DNA wurde photometrisch (Eppendorf, Deutschland) quantifiziert. 800 ng dsDNA wurden in den Verdau des phosphorylierten reversen Stranges bei 37°C 45 min mit 5 U Lambda Exonuclease (New England BioLabs) eingesetzt. Die einzelsträngige DNA wurde mit dem MiniElute PCR Purification Kit (QIAGEN) aufgereinigt und mit 8 µl Ladepuffer (95% Formamid, 10mM NaOH, 0.025% Bromophenolblau) versetzt. Bei 95°C wurden die Proben 2 min. denaturiert und sofort auf Eis für mindestens 3 min. gekühlt, bevor sie in die Taschen eines nicht denaturierenden 0.625% MDE Gel (Biozyme) für SSCP aufgetragen wurden (Schwieger und Tebbe 1998). Die Elektrophorese wurde in 1x TAE Puffer (90 mM Tris-borate, 2 mM EDTA) in einem DCode System für SSCP (BioRad, Deutschland) über 17 Std. bei 400 V und einer konstanten Temperatur von 20°C durchgeführt

(Schwieger und Tebbe 1998). Anschließend wurde das Gel mit Silbernitrat gefärbt (Bassam et. al. 1991) und für 24 Std. an der Luft getrocknet.

Digitale Bild-Analyse der SSCP-Profile

Das Gel wurde für die Auswertung mit dem ChemiDoc (BioRad, Deutschland) aufgenommen und mit Hilfe der Quantity One Software (BioRad, Deutschland) analysiert.

Hierbei wurden definierte Spuren im Gel anhand ihres Bandenmusters miteinander verglichen und mit Hilfe der distanzbasierten Phylogeneschätzung UPGMA (**unweighted pair group method with arithmetic means**) zusammengefasst. Die Kalkulation der Ähnlichkeits-Matrix basiert auf dem Koeffizienten nach Dice.

2.5 Statistische Auswertung

Die varianzanalytische Auswertung (ANOVA) erfolgte mit dem SAS-Programm Version 6.12 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) nach dem Modell:

$$Y_{ijk} = \mu + a_i + b_j + c_k + (bc)_{jk} + e_{ijk}$$

mit μ = Gesamtmittel, a_i = Effekt des Versuchsdurchgangs ($i = 1, \dots, 3$), b_j = Effekt der Herkunft ($j = 1, 2$), c_k = Effekt der Ration ($k = 1, 2$), $(bc)_{jk}$ = Interaktion zwischen Herkunft und Ration, e_{ijk} = Restfehler.

Zur Beschreibung der Digestapassage dienten polynomische Funktionen des Typs

$$y_t = a + bx^2 + cx$$

mit y_t = prozentualer Anteil des Markers (TiO₂) im Kot zum Zeitpunkt t; x = Zeit nach der TiO₂ –Verabreichung (Std.); a, b, c = Konstanten.

3. Ergebnisse

3.1 Stoffwechselversuche

Die nach den Versuchsfaktoren „Futtermittellation“ und „Schweineherkunft“ aufgedichterten mittleren Futter- und Nährstoffaufnahmen der Schweine gehen aus Tabelle 5 hervor.

Tabelle 5: Trockensubstanz- und Nährstoffaufnahmen der Schweine (g/kg^{0,75} u. Tag; n = 9)

Futterinhaltsstoff	Futtermittellation		Schweineherkunft		Interaktion	SEM
	GR	ZR	SH	CB	P	
Trockensubstanz	68,54 ^{a*)}	78,10 ^b	73,77 ^b	72,87 ^a	0,615	0,826
Organische Substanz	64,09 ^a	73,57 ^b	69,25 ^b	68,41 ^a	0,602	0,816
Rohprotein	15,31	15,37	15,43 ^b	15,25 ^a	0,766	0,069
Rohfett	2,92 ^b	2,80 ^a	2,87 ^b	2,84 ^a	0,849	0,017
Rohfaser	2,13 ^a	7,50 ^b	4,85	4,78	0,365	0,454
N-freie Extr.Stoffe	43,73 ^a	47,90 ^b	46,10 ^b	45,54 ^a	0,695	0,369
NDF	8,80 ^a	16,71 ^b	12,84 ^b	12,67 ^a	0,375	0,670
ADF	3,59 ^a	10,20 ^b	6,94	6,85	0,586	0,561

*) verschiedene Hochbuchstaben innerhalb Versuchsfaktor „Futtermittellation“ bzw. „Schweineherkunft“ kennzeichnen signifikante Mittelwertunterschiede (P < 0,05)

Mit der Zulageration (ZR) wurden, wie angestrebt, höhere Mengen der faserreichen Fraktionen aufgenommen. Die wesentlich geringeren, nach Versuchsplan nicht beabsichtigten Unterschiede zwischen den beiden Schweineherkünften in den Verzehrslaten sind auf nicht verzehrte Futterreste während der Sammlerperiode zurückzuführen.

In Tabelle 6 sind die von den Schweinen verdauten Mengen an Futtertrockensubstanz und Nährstoffen aufgezeigt.

Tabelle 6: Verdaute Mengen an Trockensubstanz und Nährstoffen (g/kg^{0,75} u. Tag; n = 9)

Futterinhaltsstoff	Futtermittellation		Schweineherkunft		Interaktion	SEM
	GR	ZR	SH	CB	P	
Trockensubstanz	59,03 ^a	64,41 ^b	62,14	61,31	0,347	0,542
Organische Substanz	56,22 ^a	61,55 ^b	59,26	58,51	0,319	0,527
Rohprotein	13,32 ^b	12,64 ^a	13,18 ^b	12,79 ^a	0,168	0,113
Rohfett	1,93 ^b	1,77 ^a	1,87	1,83	0,840	0,027
Rohfaser	0,54 ^a	4,36 ^b	2,31	2,59	0,329	0,345
N-freie Extr.Stoffe	40,42 ^a	42,80 ^b	41,93	41,30	0,692	0,241
NDF	5,22 ^a	11,01 ^b	8,09	8,14	0,907	0,523
ADF	1,46 ^a	6,55 ^b	3,90	4,12	0,306	0,464

*) verschiedene Hochbuchstaben innerhalb Versuchsfaktor „Futtermittellation“ bzw. „Schweineherkunft“ kennzeichnen signifikante Mittelwertunterschiede (P < 0,05)

Es ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen der Grundmischungs- und der Zulagegruppe, während die Schweineherkünfte sich nur in den verdauten Mengen an Rohprotein zugunsten höherer Werte für die Schwäbisch Hällischen Schweine unterschieden.

Fazit: Beide Schweineherkünfte verfügten über ein vergleichbares Verdauungsvermögen für überwiegend unlösliche NSP.

Die in Tabelle 7 zusammengestellten Ergebnisse der Kotstickstofffraktionen zeigen, daß die zulagebedingt höheren Kotstickstoffausscheidungen auf höheren Mengen an wasserlöslichem und an unverdaulichem Futterstickstoff, nicht dagegen auf gesteigerten Mengen an bakteriellem und endogenem Stickstoff (BEDN) beruhten.

Tabelle 7: Zusammensetzung der Kot-N-Ausscheidungen (n = 9)

	Futtermitteln		Schweineherkunft		Interaktion	SEM
	GR	ZR	SH	CB	P	
Gesamt-Kot-N (g/kg ^{0,75} u. Tag)	0,32 ^a	0,45 ^b	0,37	0,39	0,092	0,017
WSN (%)	28,2	30,8	29,9	29,0	0,294	1,151
UDN (%)	25,7 ^a	41,3 ^b	27,9 ^a	39,2 ^b	0,591	2,221
BEDN (%)	46,1 ^b	27,9 ^a	42,2 ^b	31,8 ^a	0,317	2,700

^{*)} verschiedene Hochbuchstaben innerhalb Versuchsfaktor „Futtermitteln“ bzw. „Schweineherkunft“ kennzeichnen signifikante Mittelwertunterschiede (P < 0,05)

Allerdings war der prozentuale BEDN-Anteil am Gesamtstickstoff im Kot der mit der Grundmischung versorgten Schweine signifikant erhöht. Beim Vergleich der beiden Schweineherkünfte ergaben sich höhere Mengen und Anteile an unverdaulichem Kotstickstoff für die Kreuzungsschweine, während bei den Schwäbisch Hällischen Schweinen die BEDN-Anteile höher lagen.

Fazit: Die Faserzulage bewirkte keine Stimulierung der intestinalen mikrobiellen N-Fixierung, allerdings scheinen intestinale mikrobielle Umsetzungen bei Schwäbisch Hällischen Schweinen größere Bedeutung als bei den Kreuzungsschweinen zu haben.

Die N-Bilanzen sind in Tabelle 8 aufgezeigt.

Tabelle 8: N-Bilanzen der Schweine (g N/kg^{0,75} u. Tag; n = 6)

Futterinhaltsstoff	Futtermittler		Schweineherkunft		Interaktion	SEM
	GR	ZR	SH	CB	P	
N-Aufnahme	2,45	2,46	2,47 ^b	2,44 ^a	0,766	0,011
Kot-N-Ausscheidung	0,32 ^a	0,43 ^b	0,36	0,39	0,195	0,015
Harn-N-Ausscheidung	0,95 ^b	0,73 ^a	0,94 ^b	0,73 ^a	0,258	0,037
N-Retention	1,18	1,30	1,17 ^a	1,32 ^b	0,523	0,034
% N-Retention	48	53	47	54		

*) verschiedene Hochbuchstaben innerhalb Versuchsfaktor „Futtermittler“ bzw. „Schweineherkunft“ kennzeichnen signifikante Mittelwertunterschiede ($P < 0,05$)

Mit der Zulageration wurden die Stickstoffausscheidungen über den Kot erhöht und über den Harn verringert. Hieraus ergaben sich jedoch nur tendenziell höhere N-Retentionen in der Zulagegruppe. Demgegenüber retinierten die Kreuzungsschweine im Vergleich zu den Schwäbisch Hällischen Schweinen signifikant mehr Stickstoff, obwohl Letztere höhere Mengen an Futterstickstoff aufgenommen hatten.

Fazit: Die Faserzulage verlagerte die N-Exkretion teilweise vom Harn in den Kot. Die Schwäbisch Hällischen Schweine wiesen im Vergleich zu den Kreuzungsschweinen ein geringeres N-Ansatzvermögen auf und schieden mehr Stickstoff über den Harn aus.

Mit Hilfe der aus den fäkalen TiO₂-Ausscheidungen abgeleiteten Funktionen ergaben sich die in Tabelle 9 wiedergegebenen Zeitdauern (in Stunden) bis zur Ausscheidung des mit dem Futter verabreichten Markers in den in der ersten Spalte angegebenen Anteilen.

Tabelle 9: Fäkale TiO₂ – Ausscheidung der Schweine (Std. nach TiO₂ – Aufnahme)

Anteil TiO ₂ im Kot (%)	Futtermittler		Schweineherkunft		Interaktion	SEM
	GR	ZR	SH	CB	P	
10	30,9	25,4	28,8	27,5	0,105	2,423
25	42,2	35,6	39,3	38,5	0,064	2,624
50	56,4	52,1	54,8	53,7	0,105	2,499

Es ließen sich keine signifikanten Unterschiede feststellen. Allerdings wurde der Marker bei Fütterung der Zulageration tendenziell früher als bei Fütterung der Grundmischung ausgeschieden.

Fazit: Die Zulage überwiegend unlöslicher NSP wirkte sich unabhängig von der Schweineherkunft tendenziell beschleunigend auf die Digestapassage aus.

3.2 Morphophysiologische, histologische und histomorphometrische Befunde

Tabelle 10 zeigt die an den Schlachttieren erhobenen Daten.

Tabelle 10: Darmlängen und -gewichte, Wasserhaltekapazität der Digesta in einzelnen Darmabschnitten sowie Leber-, Pankreas- und Milzgewichte der Schweine (n = 9)

Parameter	Futtermitteln		Schweineherkunft		Interaktion	SEM
	GR	ZR	SH	CB	P	
Darmlängen (cm/kg ^{0,75})						
Dünndarm	94,1	95,0	93,9	95,2	0,875	2,848
Blinddarm	1,2	1,2	1,2	1,2	0,911	0,044
Colon	16,0 ^a	18,8 ^b	17,2	17,6	0,118	0,781
Rectum	6,8	6,7	6,7	6,9	0,174	0,426
Gewicht voll (g/kg ^{0,75})						
Blinddarm	21,8	24,1	21,3	24,7	0,514	1,935
Colon	83,3 ^a	115,8 ^b	98,0	101,0	0,152	3,892
Rectum	24,2	31,2	26,6	28,8	0,237	2,728
WHK (g H ₂ O/g T)						
Dünndarm	4,76	4,18	4,78	4,17	0,650	0,258
Blinddarm	4,90	4,35	4,76	4,49	0,147	0,190
Colon	3,11	2,71	2,90	2,92	0,740	0,111
Rectum	2,86	2,65	2,68	2,83	0,106	0,063
Organgewichte (g/kg ^{0,75})						
Leber	46,1	47,1	46,3	46,9	0,768	0,983
Pankreas	5,90	5,76	5,92	5,74	0,630	0,163
Milz	5,64	5,32	5,67	5,30	0,816	0,267

^{*)} verschiedene Hochbuchstaben innerhalb Versuchsfaktor „Futtermitteln“ bzw. „Schweineherkunft“ kennzeichnen signifikante Mittelwertunterschiede (P < 0,05)

Die Zulagerung führte zu verlängertem und stärker gefülltem Colon, die Längen der übrigen Abschnitte des Intestinaltrakts wurden dagegen weder von der Futtermitteln noch von der Schweineherkunft signifikant beeinflusst. Allerdings zeigte sich in allen Enddarmabschnitten ein tendenziell höherer Füllungsgrad bei Fütterung der Zulagerung und bei den Kreuzungsschweinen im Vergleich zu den Schwäbisch Hällischen Schweinen. Die Wasserbindungskapazität der Digesta lag in allen untersuchten Darmabschnitten bei Fütterung der Zulagerung allenfalls tendenziell etwas niedriger als bei Fütterung der Grundration. Ähnliche Tendenzen ergaben sich für die Kreuzungsschweine im Vergleich zu den Schwäbisch Hällischen Schweinen bei den Digesta des Dünndarms und Blinddarms, während im Rectum eher umgekehrte Verhältnisse zwischen den beiden Schweineherkünften auftraten. Auch die relativen Gewichte von Leber, Pankreas und Milz wurden weder von der Futtermitteln noch von der Schweineherkunft beeinflusst.

Fazit: Die Morphologie des Gastrointestinaltraktes wurde von der Schweineherkunft weniger als von der Fütterung beeinflusst. Größe und Volumen des Gastrointestinaltraktes waren bei Schwäbisch Hällischen Schweinen eher geringer als bei den Kreuzungsschweinen ausgebildet.

Die histologischen Untersuchungen zeigten bei einzelnen Tieren unabhängig von Fütterung und Herkunft überwiegend geringgradige herdförmige Infiltrationen mit neutrophilen Granulozyten und zwar sowohl im Jejunum als auch im Ileum. Ansonsten ergaben sich für beide Darmlokalisationen keine besonderen Befunde.

Bei beiden Schweineherkünften konnten weder im Jejunum noch im Ileum signifikante Effekte der Fütterung auf Zottenlänge bzw. Kryptentiefe nachgewiesen werden. Unabhängig von Fütterung und Herkunft war die Zottenlänge im Jejunum im Mittel um ca. 37 % größer als im Ileum, während bei der Kryptentiefe keine deutlichen Unterschiede zwischen den Darmlokalisationen erkennbar waren (Tab. 11).

Tabelle 11: Zottenlängen und Kryptentiefen (μm) im Jejunum und Ileum, $\bar{x} \pm s$

Zottenlänge	Jejunum		Ileum	
	GR	ZR	GR	ZR
SH	$57,7 \pm 6,7$	$61,9 \pm 3,7$	$38,5 \pm 6,0$	$38,1 \pm 6,7$
CB	$66,9 \pm 5,4$	$63,8 \pm 8,3$	$38,0 \pm 6,0$	$37,7 \pm 6,2$
Kryptentiefe	Jejunum		Ileum	
	GR	ZR	GR	ZR
SH	$34,0 \pm 5,2$	$38,3 \pm 4,2$	$31,7 \pm 6,4$	$31,4 \pm 4,1$
CB	$43,0 \pm 3,5$	$36,4 \pm 6,7$	$36,7 \pm 6,7$	$31,0 \pm 4,1$

Fazit: Die Schleimhautarchitektur im Jejunum und Ileum blieb durch Schweineherkunft und Fütterung unbeeinflusst. Insgesamt zeigte sich ein für das Schwein in dieser Altersklasse typisches Bild.

3.3 Darmmucosale Transportphysiologie

Monosaccharid(Glucose)-Resorption. Die basalen I_{sc} waren bei CB-Schweinen unter Iso-pH-Bedingungen unabhängig von der Fütterung signifikant größer (GR: $0,82 \pm 0,17 \mu\text{Eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$, ZR: $0,98 \pm 0,10 \mu\text{Eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$) als bei SH-Schweinen (GR: $0,47 \pm 0,06 \mu\text{Eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$, ZR: $0,42 \pm 0,25 \mu\text{Eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$). Die Gewebe-Leitfähigkeiten waren zu Beginn der Versuche weder durch die Schweineherkunft noch durch die Art der Fütterung beeinflusst und lagen im Gruppenmittel zwischen 21,0 und 25,8 $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-2}$. Bis zum Versuchsende stiegen die G_T -Werte unabhängig von den Einflussfaktoren um maximal 9% an.

Die Erhöhung der mucosalen Glucose-Konzentration bewirkte in allen Versuchsgruppen deutliche I_{sc} -Anstiege (Tab. 12), die bei den Schwäbisch Hällischen Schweinen allerdings in allen Konzentrationsstufen höher ausfielen als bei den Relliehäuser Schweinen. Aufgrund der hohen interindividuellen Streuung, vor allem in der CB-Gruppe, war dieser Effekt statistisch nicht zu sichern.

Tabelle 12: Glucose-induzierte I_{sc} -Anstiege im Schweinejejunum. Die I_{sc} -Werte zeigen den jeweiligen maximalen Anstieg im Vergleich zum basalen I_{sc} (ΔI_{sc} in $\mu\text{Eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$, $\bar{x} \pm \text{SD}$), der in Abwesenheit von Glucose in der mucosalen Pufferlösung erfasst wurde.

Schweine	Fütterung	Glucose in $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$				
		0,5	1,0	2,0	4,0	10,0
CB	GR (n=3)	$0,58 \pm 0,29$	$0,93 \pm 0,53$	$1,41 \pm 0,99$	$2,00 \pm 1,51$	$2,71 \pm 2,05$
	ZR (n=3)	$0,54 \pm 0,27$	$0,83 \pm 0,41$	$1,23 \pm 0,63$	$1,73 \pm 0,89$	$2,59 \pm 1,13$
SH	GR (n=3)	$0,74 \pm 0,07$	$1,22 \pm 0,11$	$1,74 \pm 0,12$	$2,38 \pm 0,16$	$3,52 \pm 0,09$
	ZR (n=3)	$0,56 \pm 0,19$	$1,11 \pm 0,46$	$1,68 \pm 0,69$	$2,36 \pm 0,74$	$3,23 \pm 0,83$

Dipeptid(Glycyl-Glutamin)-Resorption. In Anwesenheit eines transepithelialen pH-Gradienten waren die basalen I_{sc} bei CB- (GR: $0,62 \pm 0,16 \mu\text{Eq cm}^{-2} \text{h}^{-1}$, ZR: $0,69 \pm 0,42 \mu\text{Eq cm}^{-2} \text{h}^{-1}$) und SH-Schweinen (GR: $0,60 \pm 0,08 \mu\text{Eq cm}^{-2} \text{h}^{-1}$, ZR: $0,53 \pm 0,53 \mu\text{Eq cm}^{-2} \text{h}^{-1}$) unabhängig von der Fütterung nahezu gleich. Die Gewebe-Leitfähigkeiten waren zu Beginn der Versuche weder durch die Schweineherkunft noch durch die Art der Fütterung beeinflusst und lagen im Gruppenmittel zwischen $20,3$ und $25,3 \text{ mS cm}^{-2}$. Bis zum Versuchsende fielen die G_T -Werte unabhängig von den Einflussfaktoren um maximal 13% ab. Die Vitalität der Epithelien war am Ende der Versuche fast vollständig erhalten, denn die Zugabe von 10 mmol l^{-1} Glucose führte zu I_{sc} -Anstiegen, die in derselben Größenordnung lagen wie unter Iso-pH-Bedingungen.

Die Erhöhung der mucosalen Dipeptid-Konzentration bewirkte in allen Versuchsgruppen deutliche I_{sc} -Anstiege (Tab. 13), die allerdings unabhängig vom Schweinetyt und der Fütterungsart waren.

Tabelle 13: Dipeptid-induzierte I_{sc} -Anstiege im Schweinejejunum. Die I_{sc} -Werte zeigen den jeweiligen maximalen Anstieg im Vergleich zum basalen I_{sc} (ΔI_{sc} in $\mu\text{Eq cm}^{-2} \text{h}^{-1}$, $\bar{x} \pm \text{SD}$), der in Abwesenheit von Gly-Gln in der mucosalen Pufferlösung erfasst wurde.

Schweine	Fütterung	Gly-Gln in mmol l^{-1}	
		5,0	10,0
CB	GR (n=3)	$1,75 \pm 0,66$	$2,16 \pm 0,71$
	ZR (n=3)	$1,44 \pm 0,54$	$1,75 \pm 0,74$
SH	GR (n=3)	$1,29 \pm 0,52$	$1,65 \pm 0,57$
	ZR (n=3)	$1,91 \pm 0,44$	$2,31 \pm 0,71$

Fazit. Die hier untersuchten funktionellen Parameter der jejunalen Darmschleimhaut, d.h. Nährstofftransport und Gewebe-Leitfähigkeit, waren zwischen den Schweine- und Fütterungsgruppen nicht nennenswert verschieden.

3.4 Molekularbiologische Charakterisierung der Struktur der intestinalen Mikroorganismen-Gemeinschaften

Auswirkungen von GR-Fütterung und ZR-Fütterung auf die Struktur bakterieller Gemeinschaften im Ileum der Schweineherkünfte Schwäbisch Haller und Relliehäuser

Die SSCP-Bandenmuster in der Darstellung der Eubacteria (Bild 1) als auch der Alpha-Proteobacteria (Bild 2) im Ileum der Schweine weisen eine starke individuelle Streuung auf. Die Ähnlichkeitsanalyse ergab weder einen Einfluss der Fütterung noch einen Einfluss der Rasse.

Auswirkungen von GR-Fütterung und ZR-Fütterung auf die Struktur bakterieller Gemeinschaften im Caecum der Schweineherkünfte Schwäbisch Haller und Relliehäuser

Auch im Caecum der Schweine war die individuelle Schwankung der Strukturprofile von Eubacteria (Bild 3), Alpha-Proteobacteria (Bild 4) und Archaea (Bild 5) sehr hoch. Über die Analyse der Bandenmuster konnten ebenfalls keine Effekte der Fütterung oder/und der Rasse auf die Struktur dieser untersuchten Mikroorganismen-Gemeinschaften gezeigt werden.

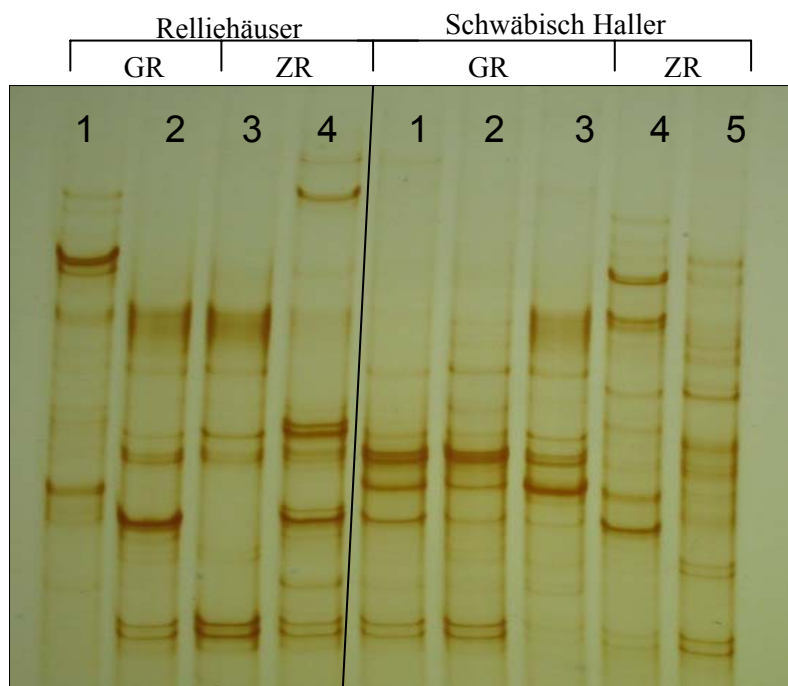


Bild 1: SSCP-Profil von Bakteriengemeinschaften im Ileum nach der PCR-Amplifikation von 16S rRNA-Genen mit Eubacteria-spezifischen Primern.

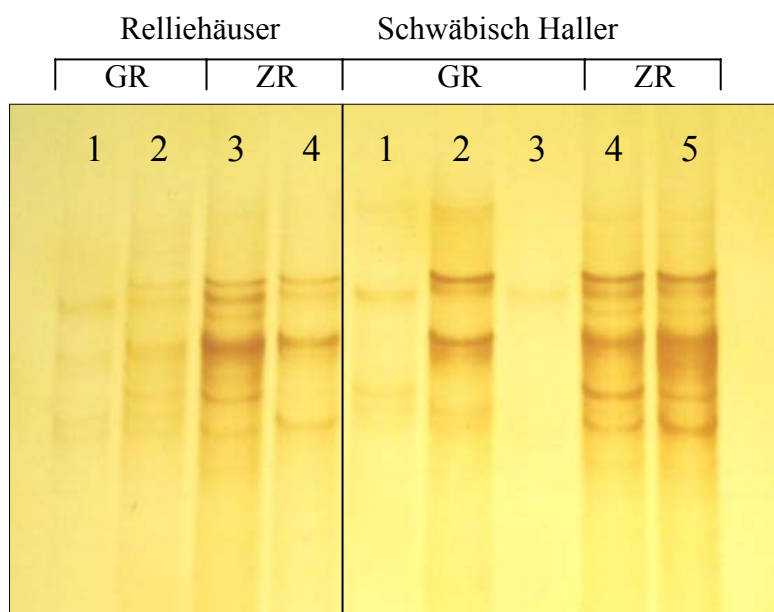


Bild 2: SSCP-Profil von Bakteriengemeinschaften im Ileum nach der PCR-Amplifikation von 16S rRNA-Genen mit Alpha-Proteobacteria-spezifischen Primern

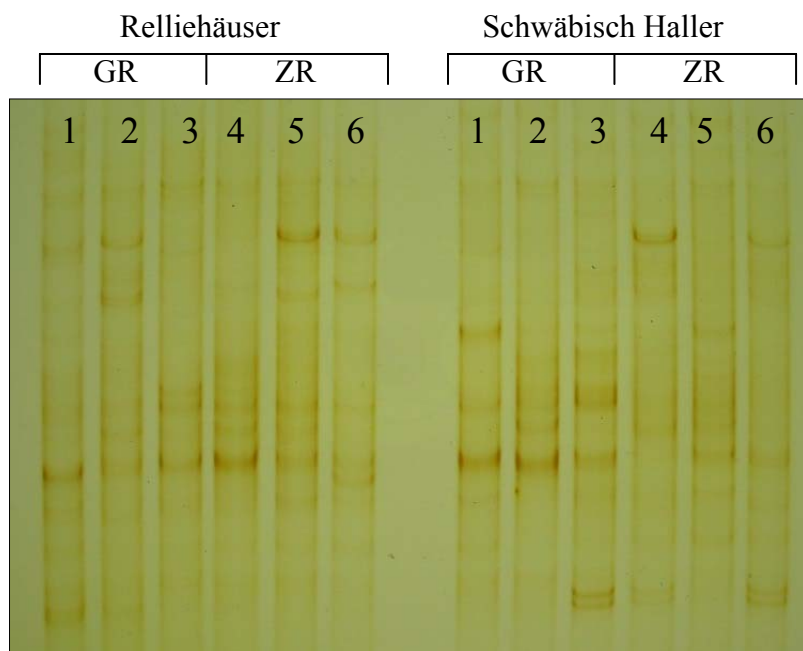


Bild 3: SSCP-Profil von Bakteriengemeinschaften im Caecum nach der PCR-Amplifikation von 16S rRNA-Genen mit Eubacteria-spezifischen Primern.

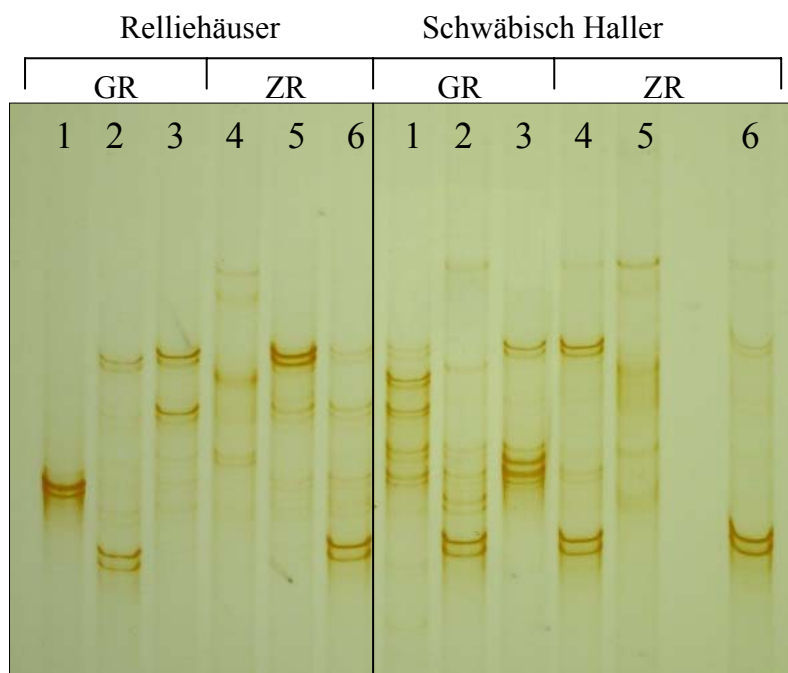


Bild 4: SSCP-Profil von Bakteriengemeinschaften im Caecum nach der PCR-Amplifikation von 16S rRNA-Genen mit Alpha-Proteobacteria-spezifischen Primern.

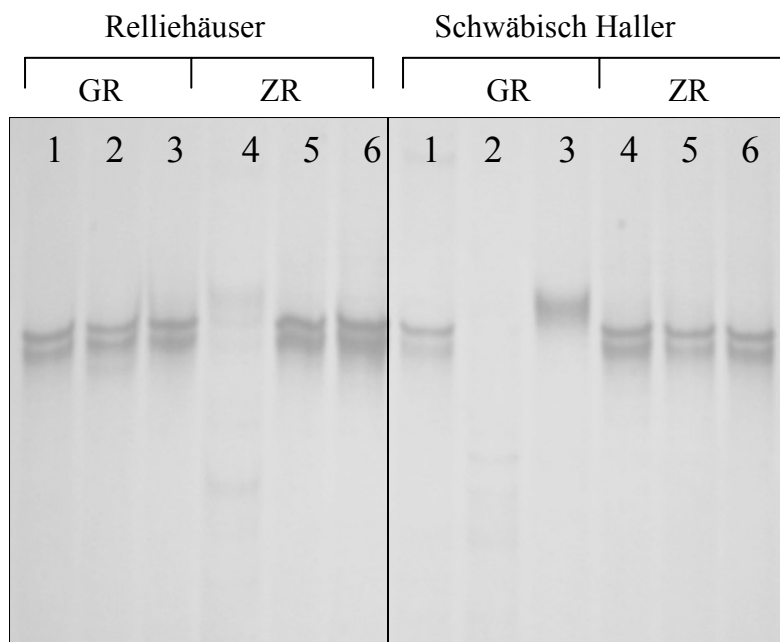


Bild 5: SSCP-Profil von Bakteriengemeinschaften im Caecum nach der PCR-Amplifikation von 16S rRNA-Genen mit Archaea-spezifischen Primern.

3.4 Schlussfolgerungen

Den hier beschriebenen Untersuchungen lag die Hypothese zugrunde, dass Schweine verschiedener genetischer Herkunft infolge unterschiedlich starker Selektion auf hohe tägliche Zunahmen und günstige Futtermittelverwertung sich auch in ihrem Faserverwertungsvermögen unterscheiden, wofür vorrangig Veränderungen im Verhältnis der morphophysiologischen Ausprägung des Gastrointestinaltraktes zum Gesamtkörper verantwortlich zu machen wären. Als Ergebnis dieser Untersuchungen ist jedoch herauszustellen, dass beide Schweineherkünfte, von denen SH als züchterisch weniger bearbeitete alte Landrasse und CB als moderne, fleischbetonte Gebrauchskreuzung gilt, über ein vergleichbares Verdauungsvermögen für überwiegend unlösliche NSP verfügten. Die NSP-Zulage bewirkte bei beiden Schweineherkünften ähnliche Veränderungen in den verschiedenen verdauungsphysiologischen Parametern.

Im Unterschied zur Wirkung löslicher NSP, die bekanntlich die Digestapassage verringern, weisen die gegenüber den Grundmischungsgruppen verkürzten Zeitabschnitte der fäkalen Markerausscheidung (TiO_2) ebenso wie die erhöhten Anteile nicht abgebauten Futterstickstoffs (UDN) bzw. die verminderten Anteile bakteriellen und endogenen Stickstoffs (BEDN) bei Zulage von Erbsenschalen auf beschleunigte Passageraten in Verbindung mit unlöslichen NSP hin. Dennoch wurde – wie allgemein bei faserreicher Fütterung bekannt – auch mit unlöslichen NSP eine ökologisch vorteilhafte, teilweise Verlagerung der N-Exkretion vom Harn in den Kot festgestellt. Die N-Bilanzergebnisse zeigen allerdings auch, dass CB im Vergleich zu SH insgesamt weniger Stickstoff zugunsten eines höheren Ansatzes ausschieden.

Da β -glykosidische, faserartige Kohlenhydratfraktionen im Gastrointestinaltrakt nur mikrobiell aufgeschlossen werden können, und Größe und Zusammensetzung der intestinalen mikrobiellen Population maßgeblich von der Art und Menge der Digesta bestimmt werden,

müssten sich – sofern es sich um praecaecale Umsetzungen handelt - faserbedingt verstärkte mikrobielle Umsetzungen auch auf die Histomorphologie des praecaecalen Gastrointestinaltraktes und die mucosale Transportphysiologie des Dünndarms auswirken. Gleichmaßen wären Wirkungen auf die intestinale Mikrobiota zu erwarten. Diesbezüglich ließen sich jedoch weder Einflüsse der genetischen Schweineherkunft noch der Faserzulage eindeutig nachweisen. Die zugelegten unlöslichen NSP wurden zwar zu etwa gleichen Anteilen wie lösliche Faserstoffe aus Zuckerrübenschnitzel (NDF und ADF ca 65%; Ergebnisse der vorangegangenen Untersuchung mit löslichen NSP) verdaut, sie führten aber zu anderen verdauungsphysiologischen Wirkungen als Letztere. Bei Zulage löslicher Zuckerrübenschnitzel-NSP waren aus den Ergebnissen der verdauungsphysiologischen Untersuchungen Unterschiede zwischen verschiedenen Schweineherkünften in der praecaecalen Faserwirkung auf die intestinale Mikrobiologie, die darmmucosale Transportphysiologie und das Faserverwertungsvermögen ableitbar. Dabei schnitten Schwäbisch Hällische Schweine in Parametern der Faserverwertung ungünstiger als die modernen Kreuzungsschweine ab.

Aus ernährungsphysiologischer Sicht ergeben sich für die Schweineerzeugung im Ökologischen Landbau, die grundsätzlich mit faserreicherer Fütterung als in der konventionellen Erzeugung verbunden ist, auch in dieser Untersuchung keine besonderen Vorzüge für Schwäbisch Hällische Schweine. Vielmehr bieten die modernen fleischbetonten Kreuzungsschweine aufgrund ihrer signifikant höheren Stickstoffretention sowohl hinsichtlich Ökologie als auch hinsichtlich Wirtschaftlichkeit Vorteile.

4. Zusammenfassung

An wachsenden Schwäbisch Hällischen und modernen Gebrauchskreuzungsschweinen (34-45 kg LM) wurden die Wirkungen einer Erbsenschalen-Zulage mit hohen Anteilen unlöslicher Nicht-Stärke-Polysaccharide (NSP) auf Nährstoffverdaulichkeiten, N-Bilanzen, morphophysiologische, histomorphometrische und mucosale transportphysiologische Parameter des Gastrointestinaltraktes sowie auf molekularbiologisch charakterisierbare intestinale Mikroorganismen-Gemeinschaften untersucht. Mit der Grundration erhielten die Schweine 80% des Energie- und 100% des Aminosäurenbedarfs für tägliche Zunahmen von 700g. Das Energiedefizit sollte so weit wie möglich durch die Erbsenschalenzulage gedeckt werden. Die Zulage führte unabhängig von der genetischen Schweineherkunft zu vergrößerten und stärker gefüllten Dickdarmabschnitten, zu beschleunigter Digestapassage, vermehrter Kot-N-Ausscheidung bei gleichzeitig verminderten Anteilen an Bakterien-N sowie zu geringeren Harn-N-Ausscheidungen der Schweine. Die Histomorphologie und mucosale Transportphysiologie des Jejunums und Ileums sowie die Zusammensetzung der intestinalen Mikroorganismen-Gemeinschaften des Gastrointestinaltraktes wurden weder von der Zulage noch von der Schweineherkunft eindeutig beeinflusst. Zwischen den beiden Schweineherkünften ergaben sich keine Unterschiede im Verwertungsvermögen für unlösliche NSP, die Kreuzungsschweine retinierten jedoch mehr Stickstoff als die Schwäbisch Hällischen Schweine. Aus ökologischer und wirtschaftlicher Sicht eignen sich daher die Kreuzungsschweine besser als Schwäbisch Hällische Schweine für den Ökologischen Landbau.

Summary

Metabolic trials were conducted with pigs (34-45 kg bw) of the old landrace breed “Schwäbisch Hällisch” and a modern crossbreed, each supplied with a basal ration and a supplemental ration supplemented with pea hulls rich in insoluble non starch polysaccharides (NSP). The basal ration supplied 80% of the energy and 100% of the amino

acid requirements for daily gains of 700g. The energy deficit was intended to be covered as far as possible by the supplemental pea hulls. Studied items comprised nutrient digestibilities, N-balances, morphophysiological, histomorphometric and transport physiological parameters of the intestinal mucosa as well as molecular biologically characterised intestinal microbial communities. Pea hull supplementation caused enlarged and higher filling values of hind gut sections, accelerated digesta passage rates, increased fecal N combined with reduced proportions of bacterial N and lower urinary N-excretions of the pigs independently of their genetic provenience. The histomorphology, the transport physiology of the jejunal and ileal mucosa as well as the composition of the intestinal microbial communities were neither significantly affected by the pea hull supplement nor by the pig genetic. The digestive potential for the utilisation of unsoluble NSP did not differ between the two pig breeds. However, since CB-pigs retained more nitrogen and from an ecological and economical point of view, pigs of this breed appear better suited for organic farming than pigs of the SH-breed.

5. Gegenüberstellung der geplanten zu den erreichten Zielen

Die Untersuchungen wurden im geplanten Umfang vollständig durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen, dass sich unlösliche NSP anders als lösliche NSP auf die Verdauungsphysiologie von Schweinen auswirken. Für den Ökologischen Landbau sollte herausgefunden werden, ob weniger auf hohe tägliche Zunahmen und niedrigen Futteraufwand gezüchtete Schweine für die im Vergleich zur konventionellen Schweineernährung faserreichere Fütterung besser als moderne fleischbetonte Schweineherkünfte geeignet sind. In Ergänzung der vorangegangenen Untersuchungen mit löslichen NSP kann geschlossen werden, dass moderne fleischbetonte Schweine ein ebenso hohes Verwertungsvermögen für unlösliche NSP wie Schwäbisch Hällische Schweine als Vertreter alter Landrassen besitzen, zusätzlich aber ein höheres Proteinansatzvermögen aufweisen. Insofern wären auch für den Ökologischen Landbau keine besonderen Bedingungen zur Bevorzugung alter Landrassen gegeben. Die Versuchsfrage konnte somit eindeutig beantwortet werden.

6. Literaturverzeichnis

- Bach Knudsen, K.E. 1997: Carbohydrate and lignin contents of plant materials used in animal feeding. *Anim.Feed Sci. Technol.* 67, 319-338.
- Bassam, B.J., Caetanoanollles, G., Gresshoff, P.M. 1991: Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 196, 80 – 83.
- Brandt, M., Rohr, K. 1981: The quantification of nitrogen metabolism in the forestomachs of dairy cows. 1. The examination of microbial nitrogen with ¹⁵N as a marker. *Z. Tierphysiol. Tierernährg. Futtermittelkd.* 46, 39 – 48.
- Brosius, J., Palmer, M.L., Kennedy, P.J., Noller, H.F. 1978: Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 75, 4801 – 4805.
- Dänicke, S. 1999: Zum Einfluss von Nicht-Stärke-Polysacchariden (NSP) und NSP-spaltenden Enzymen auf die Passagezeit der Ingesta sowie den Energie- und Proteinumsatz von wachsenden Schweinen und Broilern. *Übers. Tierernährg.* 27, 221-273.
- DLG 2002: Leistungs-und qualitätsgerechte Schweinefütterung, Teil A: Mastschweine. Deutsche Landwirtschafts-Gesellschaft e.V. (DLG). DLG-Verlags GmbH, Frankfurt am Main.
- Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A., 1991. Method for dietary fibre, neutral detergent fibre, and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74, 3583-3597.

- Johansen, H.N., Bach Knudsen, K.E. 1994: Effects of wheat flour and oat mill fractions of jejunal flow, starch degradation and adsorption of glucose over an insulated loop of jejunum in pigs. *Brit. J. Nutr.* 72, 299-313.
- Kreuzer, M., Wittmann, A., Gerdemann, M.M., Hanneken, H., Abel, H.J., Machmüller, A. 1999: Re-examination of the metabolizable energy contents of various rations containing different types and levels of bacterially fermentable substrates in digestibility experiments with growing pigs. *J. Anim. Physiol. a. Anim. Nutr.* 82, 33-49.
- Lattemann, D. 2000: Einfluss einer Xylanase und von Flavophospholipol allein und in Kombination auf die Leistung, die Verdaulichkeit der Nährstoffe sowie die intestinale Mikroflora bei Legehennen.
- Mason, V.C. 1969: Some observations on the distribution and origin of nitrogen in sheep faeces. *J. Agric. Sci. Cambridge* 73, 99-111.
- Naumann, C., Bassler, R., 1997. Die chemische untersuchung von Futtermitteln. Methodenbuch Band III. VDLUFA Verlag, Darmstadt.
- Petkevicius, S., Bach Knudsen, K.E., Nansen, P., Roepstorff, A., Skjoth, F., Jensen, K. 1997: The impact of diets varying in carbohydrates resistant to endogenous enzymes and lignin on populations of *Ascaris suum* and *Oesophagostomum dentatum* in pigs. *Parasitology* 114, 555-568.
- Petkevicius, S., Bach Knudsen, K.E., Nansen, P., Murrell, K.D. 2001: The effect of dietary carbohydrates with different digestibility on the populations of *Oesophagostomum dentatum* in the intestinal tract of pigs. *Parasitology* 123, 315-324.
- Petkevicius, S., Bach Knudsen, K.E., Murrell, K.D., Wachmann, H. 2003a: The effect of inulin and sugar beet fibre on *Oesophagostomum dentatum* infection in pigs. *Parasitology* 127, 61-68.
- Petkevicius, S., Bach Knudsen, K.E., Murrell, K.D. 2003b: Effects of *Oesophagostomum dentatum* and dietary carbohydrates on morphology of the large intestine of pigs. *Vet. Parasitology* 116, 125-138.
- Schwieger, F., Tebbe, C.C. 1998: A new approach to utilize PCR-single-strand-conformation polymorphism for 16S rRNA gene-based microbial community analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 4870 – 4876.
- Stewart, C.S., Hillman, K., Maxwell, F., Kelly, D., King, T.P. 1995: Recent advantages in probiosis in pigs: observations on the microbiology of the pig gut. *Übers. Tierernährg.* 23, 1-26.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., Lane, D.G. 1991: 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic analyses. *Journal of Bacteriology* 173, 697 – 703.