

*Krüsenberger  
Gespräche  
2004*



20. Hülsenberger Gespräche 2004  
*der H. Wilhelm Schaumann Stiftung*



*Hübsenberger  
Gespräche  
2004*



»MIKROBIOLOGE UND TIERERNÄHRUNG«

## Inhaltsverzeichnis

Begrüßung .....	V. MELOSCH	7
<b>I. Die Bedeutung von Mikroorganismen in der Tierernährung</b>		
Probiotische Mikroorganismen und ihre zellulären Wirkungsmechanismen .....	G. BREVES	9
Diskussion .....	E. KALM	14
Möglichkeiten, Grenzen und Zukunftsperspektiven der mikrobiellen Umsetzungen im Pansen .....	G. FLACHOWSKY, E. STROBEL und P. LEBZIEN	19
Diskussion .....	E. KALM	37
Pro- und Präbiotika in der Humanernährung .....	B. BISPING und C. KOOB	40
Diskussion .....	E. KALM	50
EU-Vorgaben und Praxis in der Bewertung von Mikroorganismen als Zusatzstoffe .....	J. GROPP und A. SCHUHMACHER	55
Diskussion .....	H. STEINHART	62
<b>II. Silierung von Futtermitteln</b>		
Mikrobiologie der Silierung .....	J. BAUER	65
Diskussion .....	H. STEINHART	73
Developments in silage making and silage research in the Netherlands .....	F. DRIEHUIS und M.C. TE GIFFEL	76
Diskussion .....	H. STEINHART	81
Erfahrungen mit Mikroorganismen in der Silierung .....	G. PAHLOW	85
Diskussion .....	H. STEINHART	94

### III. Mikroorganismen in der Ernährung

#### Einflüsse von Fütterungsgestaltung und Fütterungsmanagement

auf die Lebensbedingungen der Pansenflora .....	K.-H. SÜDEKUM	97
Diskussion .....	E. PFEFFER	106
Ernährung und intestinale Mikrobiota		
bei Schwein und Geflügel .....	O. SIMON, W. VAHJEN und D. TARAS	112
Diskussion .....	E. PFEFFER	121
Mikroorganismen in der Ernährung des Menschen .....	M. BLAUT	125
Diskussion .....	E. PFEFFER	130
Grundlagen der Risikoabschätzung und Sicherheitsbewertung		
von Lebensmitteln .....	G. EISENBRAND	133
Diskussion .....	E. PFEFFER	140

### IV. Perspektiven für Forschung und Praxis

#### Mikrobiologie und Tierernährung – Herausforderungen aus Sicht

der Ernährung landwirtschaftlicher Nutztiere .....	F. SCHWARZ	143
Diskussion .....	G. BREVES	152
Über das Wachstum von Mikroorganismen .....	H. MÄRKL	156
Diskussion .....	G. BREVES	166
Zusammenfassung .....	D. SMIDT	171
Schlusswort .....	H. O. GRAVERT	177
Festvortrag: 20 Hülseberger Gespräche 1965–2004 .....	D. SMIDT	178
Teilnehmer der HÜLSEBERGER GESPRÄCHE 2004 .....		183

## Begrüßung zu den »20. Hülsenberger Gesprächen 2004«



Verehrte Familie Seiller,  
meine sehr verehrten Damen und Herren!

Im Namen der SCHAUMANN-Stiftung begrüße ich Sie sehr herzlich zu den 20. Hülsenberger Gesprächen. Wir freuen uns, dass Sie unserer Einladung gefolgt sind und hoffen, Sie fühlen sich hier in der Hansestadt Lübeck wohl und werden informative Hülsenberger Gespräche erleben.

20 Hülsenberger Gespräche im Zeitraum von 1965 bis 2004, also in 40 Jahren, das war und ist ein erfolgreicher Weg, den die SCHAUMANN-Stiftung gegangen ist. Im Mittelpunkt hat immer das interdisziplinäre Gespräch gestanden, um den Informationsfluss zwischen Ernährungsphysiologie, Tierernährung, Futtermittelkunde, Tierzucht, Genetik, Tierhygiene und Veterinärmedizin zu fördern. Lebensmittelqualität, Qualitätssicherung, Umweltschutz und Verbraucherverhalten sind Punkte, die in den letzten 1 1/2 Jahrzehnten zusätzlich einbezogen wurden. Der Teilnehmerkreis ist daher stets sehr breit gefächert und der Thematik angepasst gewesen.

Ich möchte an dieser Stelle zwei Dinge ansprechen. Wir haben wie Sie sehen eine Posterausstellung vorbereitet, die alle Programme mit Themen und Referenten der 20 Hülsenberger Gespräche zeigt. Eine ausführliche Würdigung der 20 Hülsenberger Gespräche wird Herr Prof. Smidt morgen im Rahmen des festlichen Abendessens vornehmen. Prof. Smidt ist übrigens einer der Anwesenden, die von Anfang an dabei gewesen sind, zumindest seit 1967. Wenn ich

in das Auditorium schaue, dann gehören die Herren Professoren Gravert, Gropp und Pallauf ebenfalls zu diesem erlauchten Kreis.

Vor zwei Jahren haben wir uns mit den Perspektiven für die Erzeugung von Lebensmitteln tierischer Herkunft in Europa befasst. Das war ein Thema mit deutlichen ökonomischen Akzenten. Für dieses Jahr wurde das Generalthema Mikrobiologie und Tierernährung ausgewählt und vorbereitet. Im Vordergrund stehen der Probiotikaeinsatz bei Mensch und Tier sowie der Einsatz von Mikroorganismen bei der Silierung.

Der praktische Probiotikaeinsatz in der Tierernährung in Deutschland begann im verstärkten Maße vor etwa 20 Jahren (insbesondere bei Ferkeln und Kälbern) und hat in den letzten Jahren durch den Wegfall der antibiotischen Leistungsförderer einen erneuten Schub erfahren.

Parallel dazu etablierten sich die so genannten biologischen Siliermittel für den Einsatz bei der Silierung von Gras, Mais und Luzerne. Das letzte Jahrzehnt hat in allen Bereichen sehr umfangreiche Forschungs- und Entwicklungsarbeit gebracht, so dass es sinnvoll erschien, den aktuellen wissenschaftlichen Kenntnisstand zu beleuchten. Ich denke, wir können schon jetzt auf das Fazit der diesjährigen Hülsenberger Gespräche gespannt sein.

An dieser Stelle begrüße ich speziell unsere Referenten, die mit umfassender Sachkenntnis und Kompetenz zu uns sprechen werden. Verehrte Referenten,

wir danken Ihnen für Ihre Bereitschaft, im Rahmen der 20. Hülsenberger Gespräche aktiv zu werden.

Ich begrüße aber auch die Nachwuchswissenschaftler in unseren Reihen. Sie werden hier eine Tagung erleben, die sich deutlich von den zumeist von Spezialisten besuchten Fachtagungen unterscheidet. Wie die Bezeichnung Hülsenberger Gespräche andeutet, soll hier das Gespräch im Mittelpunkt stehen.

Dabei stellen wir uns eine Dreiteilung vor. Ein Drittel der Zeit ist den Referenten gewidmet, ein weiteres Drittel der anschließenden Diskussion und das letzte Drittel dem persönlichen Gespräch in den Pausen. Das interdisziplinäre Gespräch soll den Blick auf die Nachbardisziplinen schärfen, vielleicht auch dem Spezialisten neue Ideen und Impulse vermitteln. Machen Sie bitte regen Gebrauch von der Diskussion. Wie Sie wissen, gibt es allenfalls unbefriedigende Antworten.

Die Referate und die Diskussionen werden wieder als Broschüre gedruckt und im Internet veröffentlicht. Hierbei setzen wir Ihr Einverständnis voraus. Alle Tagungsteilnehmer werden diese Broschüre erhalten.

Der besondere Dank gilt den heutigen Gesellschaftern Herrn Olivier Seiller und Herrn Charles-Antoine Seiller, den Enkeln der Stifter H. Wilhelm Schaumann

und seiner Frau Irene Schaumann. Sie ermöglichen durch Ihr persönliches und insbesondere durch Ihr finanzielles Engagement die Fortsetzung und vor allem auch die Weiterentwicklung der Aktivitäten der SCHAUMANN-Stiftung.

Der größte Teil der Leistungen wird für die Förderung von agrarwissenschaftlichen und veterinärmedizinischen Forschungsvorhaben zur Verfügung gestellt. Schaut man sich das letzte Jahr an, dann hat die SCHAUMANN-Stiftung weit über 50 Einzelprojekte gefördert. Am stärksten waren die Fächer Tierernährung, Tierphysiologie sowie Tierzucht und Genetik vertreten. Die anderen geförderten Fächer erstreckten sich u. a. auf Immunologie, Virologie, Tierhygiene, Ökonomie, Pharmakologie, Lebensmittelchemie und Biotechnologie. Diese Auflistung unterstreicht das vielfältige Wirken der SCHAUMANN-Stiftung.

Sehr verehrte Damen und Herren,

ich wünsche uns einen erfolgreichen Verlauf unseres Treffens hier in Lübeck und erkläre die 20. Hülsenberger Gespräche für eröffnet. Das Wort übergebe ich jetzt an den Moderator des ersten Themenblocks Herrn Prof. Kalm.

Vielen Dank!



# Probiotische Mikroorganismen und ihre zellulären Wirkungsmechanismen

## Einleitung und Definitionen

Probiotika werden als lebende oder lebensfähige Mikroorganismen definiert, die im Gastrointestinaltrakt von Mensch und Tier günstige Wirkungen vermitteln können. Sie werden beim Menschen sowohl unter klinischen Indikationen zur Prävention oder Behandlung von Darmerkrankungen unterschiedlicher Genese als auch als Zusatzstoffe in Lebensmitteln eingesetzt. Beim Tier steht dagegen der Einsatz als nicht-antibiotische Leistungsförderer im Vordergrund. Zum Einsatz kommen dabei verschiedene Bakterienarten und Hefen, die Zielspezies sind vor allem Schwein, Geflügel und Wiederkäuer, wobei beim Rind vorwiegend Daten zur Beeinflussung des Vormagenstoffwechsels durch Hefen vorliegen. Das zunehmende Interesse an Probiotika in der Tierernährung ist eng mit dem schrittweisen Verbot antibiotischer Leistungsförderer korreliert. Bei diesen Substanzen handelte es sich ursprünglich um eine Gruppe von verschiedenen Substanzen mit unterschiedlichen Wir-

kungsmechanismen. Dazu zählen die Hemmung der Zellwand-, Protein- und DNA-Synthese ebenso wie die Veränderung der Ionenpermeabilität.

Beispielhaft sind in Abb. 1 einige der über lange Zeit eingesetzten antibiotischen Leistungsförderer mit ihren zellulären Wirkungen zusammengefasst. Von diesen sind nur noch bis Ende 2005 Monensin für Mastrinder, Salinomycin für Ferkel und Mastschweine, Avilamycin für Ferkel, Mastschweine und Masthühner sowie Flavophospholipol für Ferkel, Mastschweine, Hühner, Kälber und Mastrinder zugelassen. Alle anderen sind bereits jetzt nicht mehr zugelassen. Das Interesse an Alternativen für antibiotische Leistungsförderer ist daher stetig gewachsen und hat zu einer Vielzahl von Untersuchungen geführt. Dabei sind Probiotika, Prebiotika und Synbiotika voneinander zu unterscheiden, deren Definitionen in Abb. 2 angegeben sind.

Abbildung 1: Wirkungsmechanismen von antibiotischen Leistungsförderern

Wirkung	Substanzen
Kationenpermeabilität	Monensin, Salinomycin
Zellwandsynthese	Bacitracin, Flavophospholipol, Avoparcin
Proteinsynthese	Spiramycin, Tylosin, Virginiamycin
DNA-Synthese	Carbadox, Olaquinox

Abbildung 2: Definition von Pro-, Pre- und Synbiotika

- Probiotika sind definierte lebende Mikroorganismen, die in ausreichender Menge in aktiver Form in den Darm gelangen und hierbei positive gesundheitliche Wirkungen erzielen (BgVV 1999)
- Prebiotika sind durch körpereigene Enzyme kaum spaltbare Substrate für den mikrobiellen Stoffwechsel im Gastrointestinaltrakt, die ggf. eine Keimselektion bedingen und über Stoffwechselprodukte protektive Wirkungen entfalten können (Daniel 1999)
- Synbiotika sind Kombinationen von Pro- und Prebiotika, die deren Vorteile synergistisch in sich vereinigen (BgVV 1999)

Die als Futterzusatzstoffe zugelassenen Probiotika sind Bakterien und Pilzen zuzuordnen. Bei den Bakterien gehören die wichtigsten Arten zu den Gattungen *Bacillus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* und *Streptococcus*, Stämme von *Saccharomyces* stellen die wichtigsten Vertreter der Pilze dar.

### Hefen und mikrobieller Vormagenstoffwechsel

Verschiedene Hefen werden bereits seit längerer Zeit in der Wiederkäuerfütterung eingesetzt, Untersuchungen zu ihrer Wirkung konzentrieren sich vor allem auf den Vormagenstoffwechsel. Dabei ist als ein wesentlicher Faktor ihre Fähigkeit zu Sauerstoffverwertung in Betracht zu ziehen. Diese Eigenschaft trägt zu einer Stabilisierung der anaeroben Verhältnisse in den Vormägen bei und begünstigt so möglicherweise die Stoffwechselaktivität cellulolytischer Mikroorganismen. Neben dem probiotischen Effekt sind bei Hefen vor allem prebiotische Wirkungen in Betracht zu ziehen, die sich aus den am Wandaufbau beteiligten mikrobiell fermentierbaren Kohlenhydraten erklären lassen. So wurden kürzlich in der eigenen Arbeitsgruppe In-vitro-Studien mit der Pansensimulationstechnik durchgeführt, in denen die Wirkungen von nativen und autoklavierten Hefen auf den mikrobiellen Vormagenstoffwechsel vergleichend untersucht wurden. Die tägliche Zugabe von Hefen

führte im Vergleich mit Kontrollansätzen zu signifikant negativeren Redoxpotentialen und zu einer dosisabhängigen Steigerung der Produktion an kurzkettigen Fettsäuren, und zwar unabhängig davon, ob die Hefen in nativer oder autoklavierter Form appliziert wurden. Aus diesen Befunden ist zu schlussfolgern, dass bei der Wirksamkeit von Hefen auf der Ebene des mikrobiellen Vormagenstoffwechsels die Fermentierbarkeit der Hefebestandteile im Vordergrund steht (1). Bislang liegen aus Studien an Wiederkäuern keine Daten darüber vor, in welchem Umfang Hefezellen in den Vormägen abgebaut werden. Unter der Voraussetzung, dass native Hefen in signifikanten Größenordnungen den Dünndarm erreichen, kann möglicherweise eine zusätzliche probiotische Wirkung im Dünndarm erwartet werden. Diese Möglichkeit ist in weiteren Untersuchungen zu prüfen.

### Probiotika als nicht-antibiotische Leistungsförderer

Probiotika sind in zahlreichen Untersuchungen auf ihre Wirksamkeit als Leistungsförderer geprüft worden. In diesen vor allem am Schwein und Geflügel durchgeführten Versuchen wurden meist Futteraufnahme, Gewichtszunahme und Futteraufwand im Vergleich mit Kontrolltieren bestimmt. In Abb. 3 sind beispielhaft für derartige Studien die Ergebnisse aus einem Versuch an Absetzferkeln unter Verwendung eines *Bacillus cereus* Präparates dargestellt. Die quantitativen Effekte wurden in diesem Versuch nicht nur gegenüber einer unbehandelten Kontrolle sondern auch gegenüber einer Positivkontrolle mit einem antibiotischen Leistungsförderer getestet. Gegenüber den Kontrolltieren führten die Probiotika zu signifikant gesteigertem täglichen Zuwachs und verbessertem Futteraufwand. Die Erhöhung der Futteraufnahme war nicht statistisch gesichert. Beim Vergleich der Probiotikagruppe mit der Positivkontrolle ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Aus diesen Ergebnissen ist zu schließen, dass Probiotika ähnliche Wirkungen auf Leistungsparameter haben können wie antibiotische Leistungsförderer (2).

In einer ähnlichen Studie an Ferkeln, mit der die Ergebnisse auf Leistungsebene bestätigt werden

Abbildung 3: Einfluss auf die Leistung von Absetzferkeln (Van Isterdael 1998)

	Neg. Kontrolle	Pos. Kontrolle [50 mg/kg]	<i>B. cereus</i> var. <i>toyoi</i> [10 <sup>8</sup> KbE/kg]
Futteraufnahme [g/Tag]	666 (100)	704 (106)	685 (103)
Zunahme [g/Tag]	384 <sup>b</sup> (100)	431 <sup>a</sup> (112)	410 <sup>a</sup> (107)
Futteraufwand [1: 1]	1,73 <sup>b</sup> (100)	1,63 <sup>a</sup> (94)	1,67 <sup>a</sup> (97)

Tiere: 30 Ferkel/Behandlung (Seghers x Pietrain), 9-25 kg Lebendmasse  
Futtlr. 18,3% XP, 4,7% XL, 3,7% XF

konnten, wurde zusätzlich registriert, mit welcher Häufigkeit Durchfallerkrankungen von mehr als 2 Tagen Dauer auftraten. Mit etwa 2% in der Probiotikagruppe war dies gegenüber der Kontrollgruppe mit fast 18% deutlich reduziert (3).

### Wirkungsmechanismen auf zellulärer Ebene

Auf der Grundlage positiver Wirkungen von Probiotika auf Leistungsparameter ist zu diskutieren, über welche zellulären Effekte diese Wirkungen vermittelt werden. Anders als bei den antibiotischen Leistungsförderern mit klar identifizierten Wirkungen auf Mikroorganismen liegen hierzu trotz zahlreicher Untersuchungsergebnisse immer noch keine eindeutig geklärten Konzepte vor. Die meisten Untersuchungen zu möglichen Wirkungsmechanismen wurden an isolierten Epithelien durchgeführt, die von wachsenden Schweinen stammten, denen über eine Dauer bis zu 3 Wochen die entsprechenden Probiotika über das Futter verabreicht wurden. Mit diesen Studien wurden die folgenden hypothetischen Erklärungsansätze geprüft:

#### 1. Beeinflussung von elektrophysiologischen Eigenschaften intestinaler Epithelzellen

Unter In-vitro-Bedingungen sind als grundlegende elektrophysiologische Eigenschaften der Kurzschlussstrom als Maß aller elektrogenen Ionenfluxe und die Gewebeleitfähigkeit als reziproker Wert des elektri-

schen Gewebewiderstandes zu registrieren. Beide Parameter wurden an Schweinen im Gewichtsbereich zwischen 30 und 35 kg im Anschluss an eine dreiwöchige Applikation von *Saccharomyces boulardii* (Sb), *Bacillus cereus* var. *toyoi* (Bct) oder *E. coli* Nissle (EcN) an Epithelien aus dem mittleren Jejunum gemessen (4). Mit diesen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die basalen elektrophysiologischen Gewebeeigenschaften gegenüber den entsprechenden Kontrollansätzen durch Probiotika nicht beeinflusst wurden. Dies wird beispielhaft in Abb. 4 für den Kurzschlussstrom dargestellt.

Im Gegensatz dazu ergaben sich jedoch nach Applikation von Sb oder Bct deutliche Unterschiede, wenn der Kurzschlussstrom nicht unter basalen sondern stimulierten Bedingungen gemessen wurde. Bei diesem Vorgehen wird den Epithelien Theophyllin zugesetzt und dadurch in den Enterozyten die Konzentration an cAMP erhöht, was wiederum apikale Cl<sup>-</sup>-Kanäle zu einer vermehrten Cl<sup>-</sup>-Sekretion veranlasst, wodurch der Kurzschlussstrom zunimmt. Dieser Stromanstieg blieb nach Sb-Applikation signifikant und nach Bct-Applikation tendenziell niedriger als unter Kontrollbedingungen. Daraus kann geschlossen werden, dass die Probiotika zu einer Abnahme der Sekretionsbereitschaft der Epithelien führten. Dies wiederum könnte ein Erklärungsansatz für die Wirksamkeit von Probiotika bei der Behandlung von Durchfallerkrankungen sein (Abb. 5).

Abbildung 4: Der basale elektrogene Netto-Ionenflux im Jejunum wird nicht beeinflusst.  
(- = Kontrolle, + = Probiotikum)

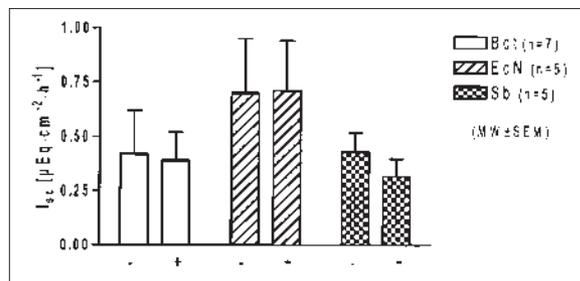
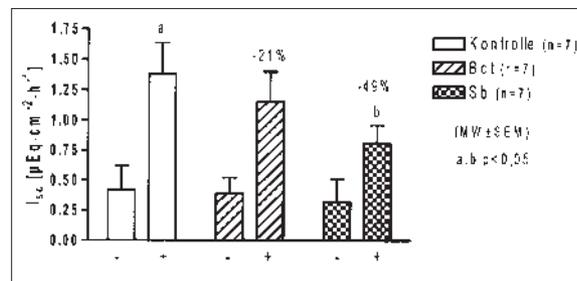


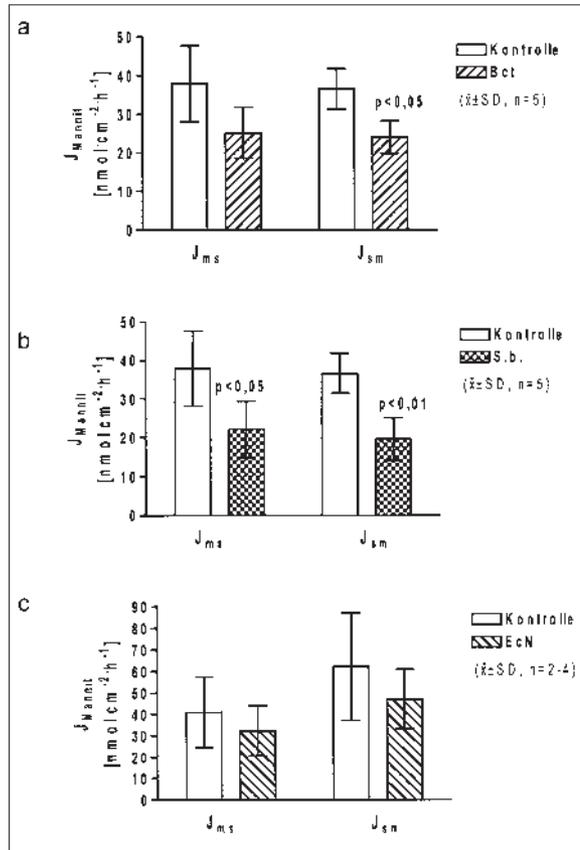
Abbildung 5: Verminderung der Sekretionsbereitschaft durch Bct und Sb im Jejunum.  
(- = Kontrolle, + = nach Theophyllin)



## 2. Beeinflussung der parazellulären Permeabilität

Um mögliche Einflüsse von Probiotika auf die parazelluläre Permeabilität im Jejunum zu bestimmen, wurden transportphysiologische Studien unter Verwendung von Mannitol durchgeführt, das als Referenzsubstanz für In-vitro-Permeabilitätsmessungen etabliert ist (4). Dabei wurden für Sb, Bct und EcN (*E. coli* Nissle 1917) unterschiedliche Ergebnisse ermittelt, die in Abb. 6 dargestellt sind.

Abbildung 6: Einfluss von Bct (a), Sb (b) und EcN (c) auf die Mannitol-Fluxraten



Bei diesen Versuchen waren nur nach Sb die Mannitolfluxraten in beiden Richtungen signifikant vermindert, nach Bct war dies nur in der Richtung von serosal nach mukosal der Fall, und nach EcN ergaben sich keine gerichteten Unterschiede. Diese Ergebnisse deuten an, dass Probiotika unterschiedliche Wirkungen auf die Dichtigkeit des Epithels haben können. Gegenwärtig liegen keine Hinweise über die beteiligten zellulären Prozesse vor.

## 3. Einfluss auf intestinale Nährstofftransportsysteme

Wenn durch Probiotika signifikante Effekte auf Leistungsparameter im Tier zu erwarten sind, so könnten diese durch Interaktionen mit intestinalen Nährstofftransportsystemen zusammenhängen. Daher wurden in Studien an sog. Bürstensaummembranvesikeln, die aus jejunalen Epithelien isoliert wurden, die kinetischen Eigenschaften des  $\text{Na}^+$ -gekoppelten Glukosetransportes (SGLT1), und zwar die maximale Transportrate ( $T_m$ ) und die halbmaximale Sättigung ( $K_m$ ) als Maß der Affinität gemessen. Hierzu liegen bislang nur Daten nach Verabreichung von Sb oder Bct vor. Sie zeigen, dass beide Probiotika zu einer signifikanten Stimulation der Transportrate des SGLT1 führen ohne dass eine Veränderung der Affinität zu registrieren war (5). Ob diese Veränderung mit einer erhöhten Expressionsrate des Glukosetransporters einhergeht, ist bislang nicht geklärt. In einigen Untersuchungen wurde geprüft, ob sich ähnliche Interaktionen mit dem intestinalen Peptidtransport nachweisen lassen. Dafür gibt es allerdings bisher keine Hinweise.

## 4. Einfluss auf morphologische Schleimhautparameter

Zur Beeinflussung der Schleimhautarchitektur durch Probiotika gibt es ebenfalls einige Befunde aus Versuchen mit Sb, Bct und EcN, die insgesamt keine drastischen Veränderungen von Zottenlänge und Kryptentiefe im Dünndarm bzw. Kryptentiefe im Dickdarm erkennen lassen. Allerdings ließen sich die geringen Steigerungen der Zottenlänge im vorderen und mittleren Jejunum nach Bct statistisch absichern (6). Dies könnte insgesamt eine Vergrößerung der absorptiven Oberfläche vermitteln und damit syner-

gistisch zur Stimulation der Transportrate des Glukose-transportes wirken. Es ist gegenwärtig nicht geklärt, ob an der Zunahme der Zottenlängen eine gesteigerte Proliferation und /oder eine verminderte Apoptoserate der Enterozyten beteiligt sind.

#### **5. Enterisches Nervensystem (ENS), Darm-assoziiertes Immunsystem (GALT) und Mucinsekretion als weitere Zielgrößen für Probiotika**

Insgesamt liegt zum Einfluss von Probiotika auf diese Funktionsgrößen im Darm noch kein umfangreiches Datenmaterial vor. In Untersuchungen zum ENS wurde nach Verabreichung von Sb die neurochemische Kodierung in myenterischen Neuronen bestimmt. Dabei wurde festgestellt, dass diese Neuronen nach Sb-Exposition deutlich weniger Calbindin exprimierten als unter Kontrollbedingungen (7). Da Calbindin in enterischen Neuronen ebenfalls eine Funktion als  $\text{Ca}^{++}$ -Bindungsprotein besitzt, könnte dieser Unterschied also Auswirkungen auf die second-messenger-Funktion von  $\text{Ca}^{++}$  in den Neuronen haben. Dies müsste in weiteren Untersuchungen geklärt werden. Eine Beeinflussung immunologischer Funktionen des Darms durch Probiotika wird zwar in der Literatur immer wieder diskutiert, bislang fehlen aber keine eindeutigen Hinweise vor, dass immunologische Parameter wie z. B. sekretorisches IgA oder die einzelnen Lymphozytenpopulationen signifikant verändert werden. Ähnliches gilt für die Mucinsekretion sowie die biochemischen Mucineigenschaften. Auch hier lässt die gegenwärtige Datenlage noch keine eindeutigen Rückschlüsse zu, da aber die Kohlenhydratstrukturen im Mucin für das Adhäsionsverhalten pathogener Keime von Bedeutung sind, sollten auch hier weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

#### **Ausblick und weiterer Forschungsbedarf**

Der Erkenntnisstand zu möglichen Wirkungen von Probiotika auf zellulärer Ebene ist in den letzten Jahren zweifellos erheblich gewachsen. Allerdings ist ein klares Konzept zu zellulären Wirkungsmechanismen immer noch nicht zu formulieren, so dass noch ein erheblicher Forschungsbedarf besteht. Ein Problem vieler bisheriger Untersuchungen besteht darin, dass sie an konventionell gehaltenen und klinisch gesunden Schweinen durchgeführt wurden. Bislang liegen kaum Daten zu Probiotikawirkungen aus Studien an definierten und standardisierten Krankheitsmodellen vor. Hier ist auch im Hinblick auf die Wirksamkeit eine hohe Priorität für weitere Untersuchungen zu sehen.

#### *Literatur*

1. Öztürk, H. (2003) In-vitro-Studien zum Einfluss von Topinamburmehl und *Saccharomyces boulardii* auf den mikrobiellen Vormagenstoffwechsel. Diss. Tierärztliche Hochschule Hannover
2. Van Isterdael (1989) zitiert nach Kühn, I. (2000) Aktuelle Themen der Tierernährung und Veredelungswirtschaft, LAH Cuxhaven, ISBN 3-933885-04-3
3. Jadamus, A., W. Vahjen, O. Simon (1999) zitiert nach Kühn, I. (2000) Aktuelle Themen der Tierernährung und Veredelungswirtschaft, LAH Cuxhaven, ISBN 3-933885-04-3
4. Winckler, C., B. Schroeder, G. Breves (1998) Effects of *Saccharomyces boulardii*, *Bacillus cereus* var. *caron* and *Bacillus cereus* var. *toyoi* on epithelial transport functions in pig jejunum. *Z. Gastroenterol.* 36 (Suppl. 1), 30–37.
5. Breves, G., C. Walter, m: Burmester, B. Schroeder (2000) In vitro studies on the effects of *Saccharomyces boulardii* and *Bacillus cereus* var. *toyoi* on nutrient transport in pig jejunum. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 84, 9–20.
6. Baum, B., E. M. Liebler-Tenorio, M.-L. Enss, J. F. Pohlenz, G. Breves (2002) *Saccharomyces boulardii* and *Bacillus cereus* var. *toyoi* influence the morphology and the mucins of the intestine of pigs. *Z. Gastroenterol.* 40, 277–284.
7. Kamm, K., S. Hoppe, G. Breves, B. Schröder, M. Schemann (2004) Effects of the probiotic yeast *Saccharomyces boulardii* on the neurochemistry of myenteric neurons in pig jejunum. *Neurogastroenterol. Motil.* 16, 53–60.

## Diskussion\*



### SAUERWEIN

Ich wollte gleich zum letzten gezeigten Versuch nachfragen:

Wie kann man denn sicherstellen, dass die Ferkel, während sie noch bei der Sau sind, entsprechende Mengen von dem »Nissle« aufnehmen?

### BREVES

Wir haben diesen Ansatz unter definierten experimentellen Bedingungen gemacht, d.h. wir haben mittels einer Spritze, die wir über den Zungengrund geführt haben, den Tieren definiert den probiotischen Keim verabreicht. Das ist das Grundproblem beim Einsatz unter praktischen Bedingungen in der Phase, wo die Ferkel noch keine kontrollierte Futteraufnahme zeigen.

### BLAUT

Was mich überrascht hat, ich arbeite ja auf dem Gebiet des Einsatzes von Probiotika im Humanbereich, ist, dass Sie die Effekte, die Sie dargelegt haben, nämlich dass die Tiere besser gedeihen, die Probiotika bekommen, im Wesentlichen erklärt haben durch elektrophysiologische Änderungen, bessere Aufnahme von Nährstoffen, während bei den untersuchten immunologischen Parametern keine Erklärungsmöglichkeiten heraus kamen. Im Humanbereich kann man Diarrhoeen bei Kleinkindern mit Probiotikabehandlung verkürzen. In diesem Fall ist es für mich schwer vorstellbar, wie man allein durch den Effekt, den Sie hier erklärt haben, dieses Phänomen belegen kann.

Die zweite Frage hängt wieder mit Immunologie zusammen, das sind die Ergebnisse von der Frau Isolauri, die Probiotika eingesetzt hat bei atopischen Kindern. Auch dort muss man davon ausgehen, dass es Interaktionen gibt zwischen den Probiotika und dem Immunsystem. Deswegen bin ich überrascht, dass die untersuchten immunologischen Parameter bei Ihnen keine Veränderung zeigten.

### BREVES

Ich kann das nachvollziehen und möchte Folgendes darauf antworten: Wir haben den E-Coli-Nissle im Hinblick auf mögliche immunologische Wirkungen sicherlich am besten charakterisiert. Die entsprechenden Untersuchungen unter Einsatz von *Bacillus cereus*, bzw. *Saccharomyces*, sind nicht so umfangreich gewesen. Da ist vielleicht auch noch Unsicherheit mit im Spiel. Beim E-Coli-Nissle können wir mittlerweile ganz eindeutig sagen, dass es beim klinisch gesunden Tier zu keiner signifikanten Veränderung irgendeines immunologischen Parameters kommt. Wir wissen auch, dass, wenn wir eine eindeutige sekretorische Diarrhoe induzieren, wie durch den von uns verwendeten F4-positiven Coli-Keim, dann sehen wir auch innerhalb 48 Stunden nach der Infektion ebenfalls keine immunologischen Veränderungen. Offenbar läuft die stimulierende Wirkung über die Coli-Toxine oder auf der Ebene der Chloridsekretion. Das ist ja das Hauptmerkmal einer sekretorischen Diarrhoe und ein sehr spezifisches Symptom, und dann überrascht es mich nicht, dass wir keine im-

\* Alle Diskussionsbeiträge wurden dankenswerterweise von Frau Heide Smidt und Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Dietrich Smidt anhand von Tonbandaufzeichnungen angefertigt.

munologischen Veränderungen sehen. Das wird natürlich im Falle einer mehr entzündlichen Diarrhoe oder einer Mischdiarrhoe anders aussehen können. Aber auch aus Literaturkenntnis sind mir keine Daten bekannt, die für *Saccharomyces*, bzw. Sporenbildner, im Tierversuch statistisch absicherbare Effekte auf der Ebene des Immunsystems zeigen, abgesehen von einigen Befunden beim Menschen beim Einsatz von Laktobazillen.

#### SCHWERIN

Auf der einen Seite überrascht, dass so ein Gebiet, das relativ wenig charakterisiert ist, gesellschaftlich eine so große Akzeptanz findet, und andere Dinge, wo man sehr viel weiß, z. B. transgene Pflanzen, so in der gesellschaftlichen Kritik stehen.

Zwei Fragen: Sind die Wirkungen ausschließlich auf die Darmschleimhaut beschränkt? Was ist bekannt über die Substanzklassen, die zu diesen Wirkungen führen, oder sind sie ausschließlich auf zelluläre Komponenten dieser Mikroorganismen zurückzuführen?

#### BREVES

Zur ersten Frage: Es gibt bislang keine eindeutigen Hinweise, dass irgendeiner dieser Keime, die als Probiotika zugelassen sind, zu einer Translokation führt. Damit kann die Wirkung eigentlich nur auf der Ebene der Darmschleimhaut erzielt werden. Man weiß, dass bestimmte Sensoren auf der Oberfläche der Darmschleimhaut durch irgendwelche Stoffe angesprochen werden und darüber Veränderungen in der Aktivität des Enterischen Nerven-Systems (ENS) hervorrufen können. Aber Ihre Frage geht ja mehr in Richtung Translokation, was keine hohe Relevanz hat, es sei denn, dass wir es mit einem Darm zu tun haben, der hochgradig geschädigt ist. Wenn eine hochgradige entzündliche Diarrhoe vorliegt, sind andere Permeabilitätseigenschaften da.

Zur zweiten Frage: Wir wissen nicht, was das für Substanzen sind. Die Interaktion zwischen dem probiotischen Keim und den Enterozyten hat sicher irgendein Substrat in Form zellstimulierender Faktoren. Eine Hypothese betrifft die sogenannten Polya-

mine. Durch Probiotika kann die Produktion an Polyaminen im Darm verändert werden, die wiederum Funktionszustände der Zellen verändern können.

Aber zu Ihrer Einleitung: Das Thema muss man sehr differenziert betrachten in der Tierernährung und in der Humanernährung. Die Ebene, auf der das in der Humanernährung diskutiert wird, sieht man täglich in den Medien, wenn man sich Werbung anschaut. Der Ansatz beim Tier, der auch zur verstärkten Auseinandersetzung mit solchen Keimen geführt hat, ist viel stärker unter sehr klaren und hart formulierten Fragestellungen geschehen. Deswegen habe ich eingangs diese Daten noch einmal gezeigt, da ging es um die Frage: Haben wir Alternativen für die antibiotischen Leistungsförderer?

#### FLACHOWSKY

Ich möchte auf die eingangs zitierten Ergebnisse zu Rusitec und Hefen, Redox-potential, zurückkommen. Dort wurden 0,5 und 1,5 g Hefen zugesetzt im Rusitec, was relativ viel ist auf die Trockenmasse oder auf die gesamte Aufnahme beim Wiederkäuer. In-vivo-Ergebnisse haben nichts gebracht, soweit ich die Literatur kenne. Welche Mengen sind das, auf das kg Trockenmasse oder auf Tier und Tag bezogen?

#### BREVES

Vor diesem Problem steht man bei jedem Rusitec-Versuch. Beide genannten Dosierungen liegen bereits im oberen Bereich dessen, was unter in-vivo-Bedingungen eingesetzt wird, was bei Kühen in einer Größenordnung zwischen 10 und 100g schwankt, und wir liegen hier deutlich zur oberen Seite. Nach den Ergebnissen, die wir hier mit hohen Dosierungen erzielen können, ist es für mich ausgeschlossen, dass man mit den niedrigen Dosierungen, also 1/10 z. B., überhaupt irgendetwas gesehen hätte.

#### STANGASSINGER

Ich habe eigentlich 2 Anmerkungen. Wir beschäftigen uns inzwischen auch mit Probiotika, vor allem literarisch, weil wir uns mit der Immunologie intensiver befassen wollen in unserer Gruppe. Es gibt neue

Erkenntnisse, die Vieles erklären und verständlich machen. Ein Aspekt ist, dass probiotische Keime unterschiedliche Wirkungen zeigen. Eine Arbeit zeigt, dass probiotische Keime in den Mucus eindringen müssen im Darm, und die Kohlehydrate dieses Mucus eine Geninduktion verursachen. Das heißt, Keime, die nicht in den Mucus eindringen, haben keine Geninduktion und sind dementsprechend nicht wirksam.

Das Zweite haben wir von Mikrobiologen, die sich mit Pflanzen beschäftigen, gelernt, dass die Mikroorganismen kommunizieren. Es gibt also eine regelrechte Sprache zwischen den Bakterien, und zwar bei Gram-Negativen eine spezifische Sprache und bei Gram-Positiven wieder eine andere, und sogar Dialekte sind beschrieben. Damit wird erklärbar, warum bestimmte Kolonien eine bestimmte Größe erreichen, warum im Darm z.B. ein Biofilm entsteht, unter manchen Bedingungen kein Biofilm entsteht, dass bestimmte Keime diesen Biofilm z.B. auf Pflanzen stören können und andere Keime diesen Biofilm wieder intakt setzen. Ähnlich muss man sich das wahrscheinlich im Darm vorstellen, d.h. im Endeffekt setzen sich Probiotika nicht mit der Darmwand auseinander, sondern mit dem Biofilm der natürlich vorhandenen Mikroorganismen. Damit kommt es möglicherweise zu einer veränderten Sprache zwischen den vorhandenen Mikroorganismen, und diese Verbindungen, die diese biochemische Sprache wiedergeben, haben direkte Wirkungen auf die Enterozyten oder auf andere Bakterien. Also müsste man sich mehr von Seiten der Mikrobiologen mit der Interaktion der Bakterien und der probiotischen Bakterien im Darm auseinandersetzen, um zu sehen, was in dieser Interaktion sich verändert, und zu verstehen, was als Produkt herauskommt und den Darm beeinflusst.

#### BREVES

Wenn ich ganz kurz auf den ersten Teil etwas erwidern darf: Ich stimme Dir zu, die Veränderungen, die ich gezeigt habe auf der Ebene der chemisch-physikalischen Eigenschaften der Muzine, können über eine Veränderung der sogenannten Muc-Gene hervorgerufen worden sein. Eine ganze Reihe von Un-

tersuchungen liegen mittlerweile vor, in denen gezeigt wird, dass diese Muc-Gene in ihrem Expressionsniveau verändert werden können. Defizient war bisher das Wissen um Funktionsänderungen, dass durch Probiotika das Anheftungsverhalten durch veränderte Kohlehydratstrukturen in den Muzinen beeinflusst wird, und somit vielleicht eine Infektanfälligkeit heruntergesetzt wird.

#### STEINHART

Herr Breves, welche Organismen werden denn überhaupt zugelassen? Wer trifft die Auswahl und was müssen die für Eigenschaften haben?

Wie ist die gesetzliche Situation? Wir haben ja jetzt ein gemeinsames Lebensmittel- und Futtermittelrecht, oder es kommt. Wie bringt man das im Humanbereich und im Tierbereich in Übereinstimmung? Im Humanbereich liegt die Problematik in der Anwendung darin, dass man nicht weiß, wieviel lebende Organismen in den jeweiligen Lebensmitteln drin sind. Wieviel kommen im Darm an und wieviel brauche ich, um einen Effekt zu erzielen? Gibt es darüber im Tierbereich schon Aussagen?

Gibt es Wechselwirkungen mit der Matrix, in denen diese Mikroorganismen den Tieren oder den Menschen verabreicht werden?

#### BREVES

Es wird Ihnen ja sicher ein Vergnügen sein, morgen zu moderieren, wenn Herr Gropp das ganze Thema der Zulassungsverfahren im Detail ausführen wird. Da kann ich an dieser Stelle einfach meine weiteren Ausführungen sparen.

Aber einen Hinweis möchte ich gern machen. Ich glaube, das ist eine wirklich relevante Diskussion zwischen der Humanernährung und der Tierernährung. Wir sind bei der Tierernährung im Zusammenhang mit Probiotika in einer hochsignifikant weiter fortgeschrittenen Situation als die Humanernährung. Die Härte der Versuchsergebnisse, die z.B. im Humanbereich für diesen ganzen Joghurt-Probiotika vorliegen, ist mehr als dürftig. Die Kriterien Wirksamkeit und Unbedenklichkeit sind bei Probiotika, die in der Tier-

ernährung zugelassen sind, wirklich hart untersucht worden und, wo das nicht eindeutig belegt wird, sind sie nicht auf dem Markt erschienen. Das ist zur Zeit noch konträr zur Situation in der Humanernährung.

TARAS

Probiotika sind in sehr vielen Arbeitsgruppen untersucht worden, häufig immer wieder die gleichen Stämme. Trotzdem haben wir sehr unterschiedliche Versuchsergebnisse, zum Teil mit positiven Effekten, zum Teil mit gar keinen, zum Teil sogar mit negativen Effekten. Ich möchte Sie einladen, zu spekulieren, warum es denn so viele unterschiedliche Ergebnisse in diesen Arbeitsgruppen gibt?

BREVES

Ich möchte aufgreifen, was Herr Stangassinger gesagt hat. Was bei der Wirksamkeit der Probiotika bislang noch nicht ausreichend untersucht ist, ist der Cross-Talk innerhalb des Gastrointestinaltraktes, der auch die vorhandene Flora mit einbezieht. Diese Situation kann, trotz vermeintlich identischer Versuchsbedingungen, recht unterschiedlich sein und so unterschiedliche Wirkungen erklären. Es wird ja z.B. auch diskutiert, dass bei optimalen Haltungsbedingungen bei Tieren weder auf Leistungsebene noch bei physiologischen, immunologischen Parametern eine Wirkung zu erzielen ist. Das heißt, die Haltungsbedingung ist, wie das innere Milieu innerhalb des Gastrointestinaltraktes, ein erheblicher Varianzfaktor.

KALM

Könnte man die Umweltbedingungen nicht irgendwie definieren, dass z.B. so und so viele Keime im Stall vorhanden sein müssen, damit vielleicht vergleichbare Ergebnisse erzielt werden?

BREVES

Das ist auch der Hintergrund, warum wir uns entschlossen haben, statt der Anwendung vermeintlich klinisch gesunder Tiere, mit solchen Präparaten in ein definiertes Infektionsmodell zu gehen. Ich konnte

Ihnen ja zeigen, dass wir zumindest elektrophysiologisch dieses System eindeutig definieren können, was eine gute Grundlage für Messungen ist. Im Übrigen ist es ja auch so, dass gesunde Tiere im Grunde keine Indikationsstellung darstellen.

MEYER

Gibt es Hinweise auf Geschlechts- oder Entwicklungsunterschiede oder spezifische Wirkungsunterschiede bei den Probiotika?

BREVES

Aus unserem letzten Versuch: Die Antwort nach Forskolin, also die Intensität der Sekretionsbereitschaft, war bei 3 Wochen alten Ferkeln deutlich niedriger als bei Kontrollen und bei älteren Tieren. Das ist ein erster Hinweis darauf, dass offenbar ein Altersunterschied besteht.

WENK

Ich komme noch mal auf die Versuche Rusitec mit den lebenden und toten Hefen zurück: Meinst Du, dass diese beiden Kriterien, die Du gewählt hast, ausreichen, um zu sagen, dass die Hefen nicht leben müssen, diese flüchtigen Fettsäuren und die Elektro-Potenzialdifferenz?

BREVES

Das ist nur ein Ausschnitt gewesen. Wir haben im Rahmen dieser Arbeit, einer Dissertation, auch die anderen Parameter gemessen, z.B. mikrobielle Proteinsynthese, Ammoniak N-Umsatz, und alles wies in die Richtung, dass keine absicherbare Wirkung der lebenden Hefen da war, die ihnen einen Vorteil gab gegenüber den inaktivierten. Nach unseren Ergebnissen betrifft das die ganze Biochemie des mikrobiellen Vormagenstoffwechsels. Die einzige Ausnahme ist, dass bei aktiven Hefen mehr Isovalerat gebildet wird, was nicht überrascht, weil Isovalerat im Zuge des Aethanol-Abbaus nur durch lebende Hefen gemacht wird. Bei allen anderen biochemischen Parametern, die wir zum Mikrostoffwechsel gemessen haben, war kein Unterschied da.

WENK

Würde das heißen, dass eine oder zwei, oder wenige Substanzen aus der Hefe verantwortlich sind für diesen Effekt?

BREVES

Ein Diskussionsgegenstand sind sicherlich die Kohlenhydrate, die am Wandaufbau der Hefen beteiligt sind und zweifellos ein hervorragendes Substrat für Pansenbakterien darstellen.

BLAUT

Ich habe eine Frage bezüglich der Wirkungsdauer, wozu es ja wenig Untersuchungen gibt. Man beobachtet Effekte über einen relativ kurzen Zeitraum. Haben Sie mal geschaut, ob diese Effekte auch nachweisbar sind, nachdem die Probiotika über einen langen Zeitraum gegeben worden sind?

BREVES

Wir führen dazu zur Zeit ein gemeinsames Projekt, unter Verwendung von Laktobazillen, mit der Bundesforschungsanstalt für Ernährung in Karlsruhe durch. Modelltier dafür ist auch das Schwein, und wir vergleichen da eine 3monatige gegenüber einer 3wöchigen Applikation dieses Keimes. Das ist experimentell noch nicht ganz abgeschlossen, aber wir haben bislang keine Hinweise darauf, dass sich die beiden Gruppen voneinander unterscheiden.

Man müsste auch soweit gehen, über 3 oder 4 Wochen Probiotika zu verabreichen und zu schauen, ob die Reaktionen in die Ausgangsebene zurückkommen. Das ist auch noch nicht systematisch untersucht worden.

ELLENDORFF

Die Tatsache, dass Sie das Nichtvorhandensein von Interaktionen mit Antibiotika-Resistenzen so betont haben, zeigt ja, dass eine Diskussion darüber

existiert hat. Was war die Evidenz dafür, dass es sein sollte, und welche Evidenz existiert jetzt dafür, dass es nicht ist?

BREVES

Ich muss jetzt bei dieser Antwort sehr vorsichtig sein, weil ich von den molekularen Mechanismen des Resistenztransfers wenig verstehe. Aber ich habe mich mit Ihrem Mitarbeiter, Herrn Schwarz, sehr ausführlich über dieses Thema unterhalten, und es sollte Erwähnung finden, dass grundsätzlich alle lebenden Keime, die in den Gastrointestinaltrakt hineinkommen, mögliche Rezipienten für Resistenzgene sind, und diese auch auf andere Keime wieder übertragen können. Ich wiederhole aber, dass bisher keine massive Beteiligung gezeigt wurde. Aber das ist auch ein Thema für Zulassungsbehörden.

GÄBEL

Nochmal zu dem Modell. Reicht der verwendete Parameter als Modell für die Diarrhoeinzidenz aus? Du sagtest ja, dass bei jungen Tieren der Foskolin-Response kleiner ist als bei älteren Tieren. Das würde sich widersprechen, denn die Inzidenz bei Diarrhoeen ist ja genau umgekehrt.

BREVES

Da haben wir uns missverstanden. Der Response auf E-Coli-Nissle wird gegenüber den Kontrollen gedrosselt, wenn die kleinen Saugferkel vorher E-Coli-Nissle bekommen haben. Für die Beurteilung der Sekretionsbereitschaft ist natürlich der Unterschied zwischen dem Placebo-Tier und dem infizierten Tier relevant, und das ist statistisch abzusichern. Aber das ist auch nur ein Teil gewesen. Die Tiere werden auch klinisch eindeutig einem Score zugeordnet, und wir machen die ganze Histologie und einige andere Dinge, um dieses Modell weiter zu charakterisieren. Ich habe aus Zeitgründen nur diesen Parameter gezeigt.



# Möglichkeiten, Grenzen und Zukunftsperspektiven der mikrobiellen Umsetzungen im Pansen

## 1 Einleitung

Auf der Erde leben über 3 Mrd. Wiederkäuer (FAO 2001), von denen die Rinder ( $\approx 1,35$  Mrd.) und die Schafe ( $\approx 1,07$  Mrd.) den größten Teil ausmachen (Tab. 1). Die Wiederkäuer verfügen mit ihrem Vormagensystem über einen Verdauungsraum, in dem infolge der dort vorhandenen mikrobiellen Besiedlung Umsetzungen möglich sind, die im Verdauungstrakt von Nichtwiederkäuern nicht oder nur in geringem Umfang stattfinden (van Soest 1994). Schätzungen zum Pansenvolumen der auf der Erde lebenden Wiederkäuer erfordern verschiedene Unterstellungen (z. B. Pansenvolumen der verschiedenen Tierarten unter Berücksichtigung der Lebendmasse). In Tabelle 1 wird der Versuch einer Schätzung des »globalen Pansenvolumens« vorgenommen.

## 2 Möglichkeiten der Umsetzungen im Vormagen

Zu den wesentlichen Potenzialen der Mikroorganismen im Pansen zählen der Zellwandabbau und die

mikrobielle Proteinsynthese. Nicht unerwähnt bleiben dürfen jedoch auch die mikrobielle Vitaminsynthese und der Abbau unerwünschter Stoffe durch Mikroorganismen (Abb.1).

Bakterien, aber auch Protozoen und anaerobe Pilze zählen zu den Hauptakteuren bei den Umsetzungen im Pansen. Ihre Aktivitäten greifen weitgehend symbiotisch ineinander, so dass zunehmend von den Umsetzungen bzw. Leistungen der mikrobiellen Gemeinschaft gesprochen wird (Baldwin 1995, Dehority 2003, Hobson 1988, van Soest 1994). Auf verschiedene Vorteile und Grenzen der mikrobiellen Umsetzungen im Pansen wurde kürzlich detaillierter eingegangen (Flachowsky et al. 2004).

Abbildung 1: Potenziale und Akteure im Pansen

Tabelle 1: Wiederkäuer auf der Erde und deren Pansenvolumen

Tierart	Tierzahl (in Mrd.)	Vormagenvolumen ( $\approx 20\%$ des Gewichtes, l/Tier)	Fermentationsraum (Mio. m <sup>3</sup> )
Rinder	1,35	30 – 180 ( $\bar{x}$ = 60)	110
Büffel	0,13	80	10
Schafe	1,07	15	16
Ziegen	0,71	70	7
Kamele (funktionaler Wiederkäuer)	0,03	80	2
Wildwiederkäuer	0,20	30	4
Gesamt	3,5		$\approx 158$



## 2.1 Zellwandabbau

Das Potenzial des mikrobiellen Abbaus  $\beta$ -glucosidisch gebundener Kohlenhydrate und der Nutzung der Endprodukte dieses Abbaus, vor allem der flüchtigen Fettsäuren, versetzt den Wiederkäuer in die Lage, pflanzliche Zellwände energetisch zu nutzen. Der Zellwandabbau ist als mehrstufiger Prozess das Ergebnis der Aktivitäten verschiedener Mikroorganismen, von denen die anhaftenden Bakterien die größte Bedeutung haben (Abb. 2). Bei Einsatz hoher Anteile zellwandreicher Futtermittel (z.B. Stroh) kommt infolge der längeren Aufenthaltsdauer im Pansen auch den anaeroben Pilzen erhebliche Bedeutung zu (Orpin und Joblin 1988, Abb. 2). Stewart et al. (1995) und Gordon et al. (2001) sehen zukünftig ein erhebliches Potenzial für die Nutzung geringwertiger Grundfuttermittel durch anaerobe Pilze.

Verschiedene fördernde und hemmende Faktoren können erheblichen Einfluss auf den mikrobiellen Zellwandabbau ausüben (Abb. 2). Auf ausgewählte Einflussfaktoren wird später näher eingegangen (s. Tab. 10 und 11, Abb. 7 und 9).

Unter Berücksichtigung des in Tabelle 1 abgeleiteten Pansenvolumens und einem mittleren NDF-Gehalt von 35 % in der Futtertrockensubstanz (NDF wird

Abbildung 2: Mikrobieller Zellwandabbau und Einflussfaktoren

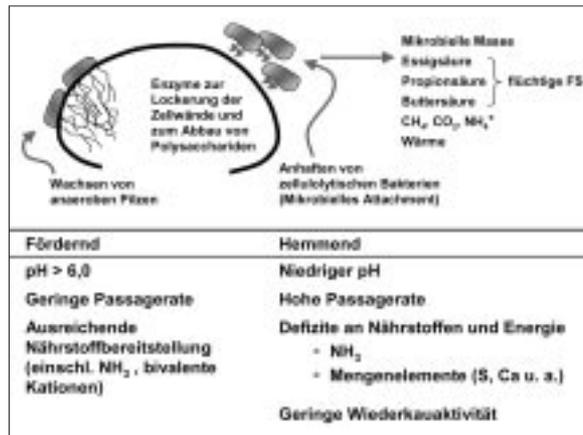


Tabelle 2: Globales Potenzial des Zellwandabbaus (NDF)

Pansenvolumen	= 150 Mio. m <sup>3</sup>
Tägliche NDF-Aufnahme (< 35 % der T)	6 kg/100 l bzw. 60 kg/m <sup>3</sup>
Jährlicher Umsatz	= 3 Mrd. t/Jahr <sup>1)</sup>
Geschätzte Cellulosesynthese auf dem Festland	40 Mrd. t/Jahr
Ligninsynthese	20 Mrd. t/Jahr
Weltgetreideernte	= 2 Mrd. t/Jahr

<sup>1)</sup> entspricht etwa jährlicher Weltrodforstung

als Zellwand betrachtet) ergibt sich ein jährlicher Zellwandumsatz im Pansen von etwa 3 Mrd. t (Tab. 2).

## 2.2 Mikrobielle Proteinsynthese

Wachstum und Vermehrung der Mikroorganismen führen u. a. zur Bildung von Mikrobenprotein. Dieses Protein kann von den Wiederkäuern in den dem Labmagen folgenden Abschnitten des Verdauungstraktes genutzt werden. Die mikrobiell gebildete Proteinmenge hängt von der im Pansen fermentierten organischen Substanz ab (Oba und Allen 2003) und betrug im Mittel umfangreicher Untersuchungen (335 Messwerte) an Milchkühen  $156 \pm 24$  g je kg verdaute organische Substanz (Lebzien et al. 1996, GfE 2001).

Abbildung 3: Schema der Protein- und Stärkeumsetzungen im Pansen (nach Lebzien 1998)

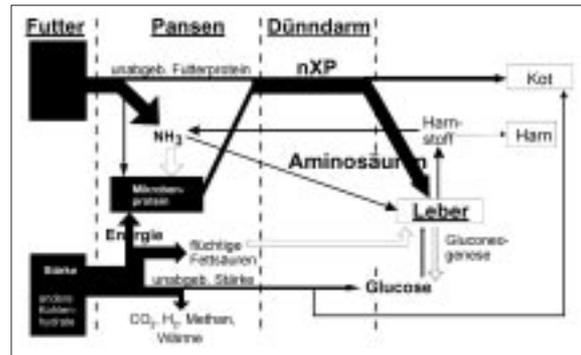


Tabelle 3: Globales Potenzial der ruminalen Proteinsynthese

Mikrobielle Proteinsynthese (g je MJ ME)	≈ 10
Proteinsynthese (Energieaufnahme: 150 MJ ME/ 100 l Pansenvolumen u. Tag)	
je 100 l Pansenvolumen (kg/Tag)	1,5
je m <sup>3</sup> Pansenvolumen (kg/Jahr)	5500
Gesamtsynthese in 150 Mio. m <sup>3</sup> Pansenvolumen (Mrd. t/Jahr)	0,8
Proteinerträge (Mrd. t/Jahr)	
Weltgetreideernte	0,2
Weltsojabohnenernte	0,05

Je MJ umsetzbare Energie (ME) kann mit einer mittleren mikrobiellen Proteinsynthese von  $10,1 \pm 1,5$  g kalkuliert werden. Daraus resultiert, dass erhebliche Mengen an mikrobiellem Protein (bei 12 kg im Pansen fermentierter organischer Substanz annähernd 2 kg/Tag) im Pansen gebildet werden (Clark et al. 1992). Diese Menge ist in den meisten Fällen deutlich größer als die Menge an unabgebautem Futterprotein. Abbildung 3 demonstriert die komplexen Zusammenhänge zwischen Energie- und Stickstoffumsetzungen im Pansen (s. auch Tab. 14–17) und in der Leber.

Ausgehend von der mikrobiellen Proteinsynthese je MJ ME, dem Pansenvolumen (Tab. 1) und der Energieaufnahme der Wiederkäuer wird in Tabelle 3 das globale Potenzial der mikrobiellen Proteinsynthese geschätzt. Diese Menge ist jährlich etwa viermal so hoch wie der Proteinерtrag der globalen Getreideernte.

### 2.3 Vitaminsynthese

Die mikrobielle B-Vitaminsynthese steht in gewisser Beziehung zur gebildeten Menge an Mikroben bzw. Mikrobenprotein. Protein- und B-Vitamin-Synthese korrelieren meist mit Koeffizienten zwischen  $r = 0,6$  bis  $0,9$  miteinander. Allerdings haben auch andere Faktoren Einfluss auf die erzeugte B-Vitamin-Menge, wie Tabelle 4 am Beispiel des am Dünndarm anfließenden Vitamins B<sub>12</sub> zeigt. Bei höherer Kobalt-Versorgung wurde mehr Vitamin B<sub>12</sub> gemessen, überraschenderweise stieg auch die Effizienz der Co-Nutzung an

Tabelle 4: Einfluss der Co-Versorgung auf die Vitamin B<sub>12</sub>-Synthese im Pansen der Milchkuh (Stemme 2002)

Co-Versorgung (mg/Tag)	Vit. B <sub>12</sub> (4,35 % Co) am Dünndarm (mg/Tag)	B <sub>12</sub> -Synthese je kg fermentierte organische Substanz (mg)	Effizienz der Co-Nutzung zur ruminalen Vit. B <sub>12</sub> -Synthese (% des max. möglichen)
2,3	3,7	0,40	7,5
4,0	8,6	0,95	11,1

(Tab. 4). Verursacht wird dieser Effekt vermutlich durch die Bindungsform des Kobalts. Während bei der niedrigen Dosierung (2,3 mg/Tag) das Element überwiegend aus den Futtermitteln stammte, erfolgte die Zulage in mineralischer Form (Sulfat).

### 2.4 Abbau/Inaktivierung unerwünschter Stoffe

Während Zellwandabbau sowie Protein- und Vitaminsynthese meist als die wichtigsten Potenziale der mikrobiellen Umsetzungen im Pansen genannt werden, bleibt das Potenzial des Abbaus bzw. der Inaktivierung verschiedener unerwünschter Stoffe häufig unerwähnt (Craig 1995, Weimer 1998). In Tabelle 5 sind exemplarisch einige unerwünschte Stoffe aufgeführt, die im Pansen ab- oder umgebaut bzw. inaktiviert werden können.

Dieses Potenzial ermöglicht es, auch Futtermittel mit derartigen Inhaltsstoffen an Wiederkäuer zu verfüttern.

Tabelle 5: Abbau (Inaktivierung) ausgewählter unerwünschter Stoffe

Pflanzeninhaltsstoffe, wie z. B.	Mykotoxine, wie z. B.
<ul style="list-style-type: none"> <li>&gt; Oxalate</li> <li>&gt; Nitrat, Nitrosamine</li> <li>&gt; Phenolverbindungen (Tannine, Gallate, Lignin-Monomere)</li> <li>&gt; Glucosinolate</li> <li>&gt; Alkaloide</li> <li>&gt; Phyto-Oestrogene</li> <li>&gt; Mimosin</li> <li>&gt; Lathyrogene AS</li> <li>&gt; Phytat</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>&gt; Ochratoxin A</li> <li>&gt; T2-Toxin</li> <li>&gt; Deoxynivalenol</li> <li>&gt; Zearalenon</li> </ul> <p><b>Schwermetalle</b> Bildung weniger löslicher Komplexe</p>

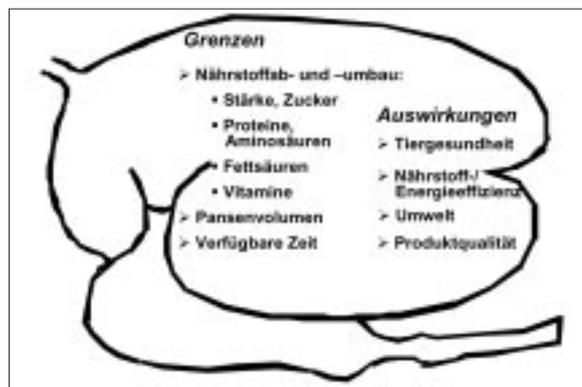
So stellt der Mykotoxinum- und -abbau ein bedeutendes Potenzial zur Nutzung von belasteten Futtermitteln dar. Sowohl in vitro als auch in vivo (Dänicke et al. 2003, Razzazi 2000, Ping 1992) konnte gezeigt werden, dass die Fusarientoxine Deoxynivalenol (DON) und Zearalenon (ZON) im Pansen weitgehend ab- oder umgebaut werden können. Bei einer täglichen Aufnahme von ~25 mg DON wurden lediglich 4,6% als DON plus de-epoxy DON im Dünndarmchymus wieder gefunden. Beim ZON (0,37 mg/Tier und Tag) waren es etwa 68% (ZON plus  $\alpha$ -Zearalenol) der aufgenommenen Menge (Dänicke et al. 2003). Gegenwärtig ist unklar, ob es sich bei diesen Veränderungen ausschließlich um Ab- und Umbau handelt oder ob die Mykotoxine im Pansen auch absorbiert werden können.

In Zukunft könnte das Potenzial verschiedener Mikroorganismen zum Ab- und Umbau unerwünschter Stoffe auch für die Futtermittelbehandlungen genutzt werden. Wenn es gelingt, derartige Mikroorganismen zu isolieren und zu konservieren, dürften sie als Futterzusatzstoffe (Probiotika) Bedeutung erlangen.

### 3 Grenzen der Umsetzungen im Vormagensystem

Der Ab- und Umbau von Nährstoffen im Pansen, die bei einer Verdauung mit körpereigenen Enzymen

Abbildung 4: Grenzen/Nachteile und Auswirkungen der Umsetzungen im Pansen



effizienter genutzt werden könnten, wie z.B. Zucker, Stärke und verschiedene Proteine/Aminosäuren, zählt zu den wesentlichsten Nachteilen der Umsetzungen im Pansen (Abb. 4).

Andererseits benötigen die zellwandabbauenden Mikroorganismen Energie und Stickstoff, so dass sie auf die Bereitstellung zügig abbaubarer Kohlenhydrate und N-Verbindungen angewiesen sind. Zu den Nachteilen der Umsetzungen im Pansen zählt auch die Methanbildung, die insbesondere mit dem Ausmaß des Zellwandabbaus korreliert (Kirchgessner et al. 1993). Das Methan verursacht nicht nur Energieverluste, sondern trägt auch zum weltweiten Treibhauseffekt bei (Crutzen 1995). Es wird eingeschätzt, dass etwa ein Fünftel der anthropogenen Methanemissionen aus der Nutztierhaltung stammt. Bemühungen zur Verminderung der Methanbildung im Wiederkäuerpansen stellen demnach ein wichtiges Forschungsziel dar (z.B. Yates et al. 2001, Hess et al. 2003).

### 3.1 Zucker- und Stärkeabbau

Zucker in den Futtermitteln wird im Pansen schnell und nahezu vollständig zu flüchtigen Fettsäuren abgebaut. Der Stärkeabbau kann in Abhängigkeit von Stärkequelle, -menge und -behandlung sowie Rationsgestaltung und der Höhe der Futteraufnahme zwischen 40 (z.B. Körnermais, sehr hohe Futteraufnahme) und nahezu 100% (z.B. Weizen- oder Gerstenstärke, niedrige Futteraufnahme; Flachowsky et al. 2000) variieren.

Bei zügigem Abbau größerer Stärkemengen treten im Pansen nicht nur erhebliche Energieverluste auf (Tab. 6), sondern die intensivere Säurebildung kann zu einem deutlichen Abfall des pH-Wertes (<6) und damit zur Verschlechterung der Lebensbedingungen von zellulolytischen Mikroorganismen führen.

Andererseits ist es möglich, dass bei Milchkühen mit hohen Stärkeaufnahmen mehr als 1,5 kg/Tag dem mikrobiellen Abbau im Pansen entkommen und in den Dünndarm gelangen und das Abbau- und/oder Absorptionsvermögen des Dünndarms überfordert ist (Matthé et al. 2000, 2001). Auf diese Art und Weise kann Stärke in den Dickdarm gelangen oder mit

Tabelle 6: Energetische Kalkulation zur Stärkenutzung im Pansen bzw. im Dünn-/Dickdarm bei unterschiedlichem Stärkeeintritt in den Dünndarm (Energiegehalt der Glucose: 15,7 kJ/g, Matthé et al. 2001)

Umsetzungen	Energieverlust/ Energieverbrauch (% des Energiegehaltes der Glucose)	Stärkeeintritt in den Dünndarm (kg/Tag)			
		0	1	2	3
Fermentation im Pansen	25	11,8	-	-	-
Verdaulichkeit im Dünndarm	bei 1/2/3 kg 70/88/95 %	-	15,0	8,6	5,5
Absorption der Glucose	(25)	-	8,5	8,6	4,1
Glucoseenergie	25	7,9	-	-	-
Auspeicherung im Kot	100	-	-	(8 %)	(20 %)
Energiegewinn bei Fermentation im Dickdarm und Glucoseenergie	Energieertrag aus Stärke = 0,5 (Fermentation) + 8,75 (Glucoseenergie)	-	1,8	2,4	2,4
Verfügbare Energie je g Glucose		7,9	10,1	8,0	6,9

dem Kot ausgeschieden werden. Dabei können nicht nur höhere Energieverluste als im Pansen auftreten (Tab. 6), sondern auch günstige Bedingungen für die Ansiedlung säureresistenter, virulenter Keime (z.B. Enterohämorrhagische Escheridiacos: EHEC) im Dickdarm entstehen (Gollnisch 2000).

### 3.2 Proteinabbau

Die Mikroorganismen können Proteine bzw. Aminosäuren bis zu den Kohlenstoffgerüsten, flüchtigen Fettsäuren und Ammoniak abbauen. Diese Abbauprodukte dienen gleichzeitig als Rohstoffe für die mikrobielle Proteinsynthese.

Im Aminosäurenmuster des im Dünndarm anflutenden Proteins bestehen beim Einsatz praxisüblicher Rationen zwischen dem Mikrobenprotein und dem gesamten Duodenalprotein (nutzbares Protein) keine wesentlichen Unterschiede (Clark et al. 1992, Lebzién 1997). Da die mikrobielle Proteinsynthese begrenzt ist und primär von der Energieaufnahme der Wiederkäuer abhängt (s. Abb. 3), kann bei sehr hohen Milchleistungen der Einsatz von Proteinen, die im Pansen nur wenig abgebaut werden, zweckmäßig sein. Teilweise wird auch eine Ergänzung mit pansenstabilen Aminosäuren angestrebt. Die dabei erzielten Ergebnisse können jedoch nicht immer reproduziert werden (Jochmann et al. 1996). Als Ursachen für ausbleibende Effekte kommen ein Aminosäurenab-

bau im Pansen oder eine anderweitige intermediäre Nutzung der Aminosäuren in Betracht.

### 3.3 Umbau von Fettsäuren

Langkettige ungesättigte Fettsäuren werden über Zwischenstufen im Pansen überwiegend hydrogeniert (z.B. Looor et al. 2003; Abb. 5). Bei dieser Biohydrogenierung entstehen u.a. trans-Fettsäuren, die in geringen Mengen absorbiert und ins Milchfett eingebaut werden können. Besondere Bedeutung kommt dabei den cis/trans-Fettsäuren (z.B. konjugierte Linolsäure) zu, die sowohl im Pansen entstehen können als auch durch Desaturierung in verschiedenen Geweben gebildet werden (Abb. 5).

Die verschiedenen transisomeren Fettsäuren erfahren eine unterschiedliche ernährungsphysiologische Bewertung in der Humanernährung (Jahreis et al. 1999, 2002).

Während trans-Fettsäuren negativ bewertet werden, sind CLA erwünscht. Normalerweise besteht jedoch eine positive Beziehung zwischen dem Gehalt an trans-Fettsäuren und CLA in der Milch (Jahreis et al. 1997).

Hohe Mengen an Polyen-Fettsäuren bewirken im Pansen hohe Anteile an trans-Fettsäuren, die in die Milch übergehen und gleichzeitig einen Abfall des Milchfettgehaltes zur Folge haben (Abb. 6). Das glei-

Abbildung 5: Bildung von trans-Fettsäuren einschl. von CLA aus Linolsäure bei Wiederkäuern

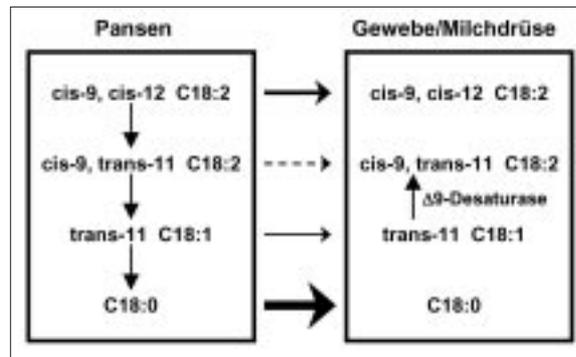
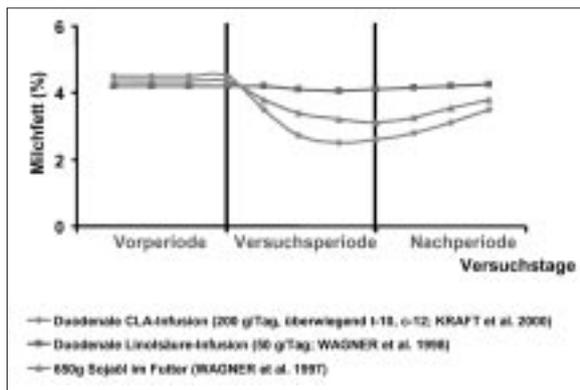


Abbildung 6: Einfluss unterschiedlicher Fettgaben auf den Milchfettgehalt



che gilt für die CLA. Analoge Effekte wurden bei der duodenalen Infusion von trans-Fettsäuren oder CLA (Kraft et al. 2000) beobachtet. Die duodenale Infusion entsprechender Mengen nicht-transisomerisierter Fettsäuren (z. B. Linolsäure) hatte keinen Einfluss auf den Milchfettgehalt (Abb. 6, Wagner et al.1998).

Zur Reduzierung des Anteils von trans-Fettsäuren in Milch und anderen Lebensmitteln von Wiederkäuern sollte demnach die Menge an Polyensäuren im Futter begrenzt werden oder der Einsatz in pansenstabiler Form erfolgen. Ein niedriger pH-Wert im Pansen bei kraftfutterreicher Fütterung kann ebenfalls die trans-Fettsäuren-Bildung fördern (Bauman und Griinari 2001).

### 3.4 Vitaminabbau

Neben den Hauptnährstoffen und verschiedenen unerwünschten Stoffen werden im Pansen auch Vitamine um- und abgebaut (Tab. 7). Diese Feststellung trifft sowohl auf fettlösliche als auch wasserlösliche Vitamine zu. Bei sehr hohen Vitamin A- (1 Mio. IE) und -E-Gaben (10 g/Tier und Tag) fanden Lebzien et al. (2001) lediglich 72 % bzw. 13 % der applizierten Mengen am Dünndarm wieder. Die unterschiedlichen Auswirkungen oraler bzw. parenteraler Vitamin-A-Gaben auf den Vitamin A-Status wachsender Rinder

Tabelle 7: Vitamin A-Abbau im Pansen nach verschiedenen Autoren

Autor	Hinweise zur Versuchsgestaltung	Abbau (% der Aufnahme)
Warner et al. (1970)	Heu/Mais	60
Rode et al. (1990) Weiss et al. (1995)	in vitro-Studie Grundfutter 50 – 70 % Kraftfutter	20 70
Lebzien et al. (2001)	in vivo (= 40 % Kraftfutter) Zufuhr 250.000 IE/Tier Zufuhr 1.25 Mio IE/Tier	14 25

sprechen auch für einen erheblichen Vitaminabbau im Pansen (Flachowsky et al. 1993).

Von den aufgenommenen B-Vitaminen kann ebenfalls ein beträchtlicher Teil im Pansen abgebaut werden. Meist ist die Neubildung jedoch größer als der Abbau, so dass duodenal mehr anflutet als aufgenommen wurde. Unter bestimmten Bedingungen (z. B. strukturfutterarme Fütterung, niedriger pH-Wert) können jedoch auch Umwandlungen von B-Vitaminen im Pansen erfolgen, so dass sogenannte Antivitamine (z. B. Pyriithiamin, Antithiamin im Fall von Thiamin) entstehen, die bei Jungwiederkäuern das Auftreten der Zerebrokortikalnekrose (CCN) bewirken können (Flachowsky und Löhnert 1974; Seffner und Flachowsky 1976).

### 3.5 Wünschenswerte Umsetzungen im Pansen

Die bisher gemachten Ausführungen belegen, dass die Vorteile im Pansen nicht ohne gewisse Nachteile zu haben sind. Demnach sollte ein Optimum der Umsetzungen angestrebt werden. Als Zielgrößen für optimale Umsetzungen im Pansen sind zu erwähnen:

- Möglichst zügiger und hoher Zellwandabbau
- Allmählicher Stärkeabbau, kontinuierliche Energielieferung für mikrobielle Aktivität, 1,0–1,5 kg Stärke-Bypass je Milchkuh und Tag
- Möglichst hohe mikrobielle Protein- (> 10 g/MJ ME) und B-Vitamin-Synthese
- Möglichst vollständiger Abbau bzw. Inaktivierung unerwünschter Stoffe

- Minimaler Abbau hochwertiger Proteine und fettlöslicher Vitamine
- Optimale Bedingungen für hohe Trockensubstanz- bzw. Energieaufnahme
- Reduzierung der Methanbildung

#### 4 Einflussfaktoren auf die Umsetzungen im Pansen

Die Potenziale und Grenzen der mikrobiellen Umsetzungen im Pansen werden von einer Vielzahl von Faktoren beeinflusst. Dazu zählen vor allem die aufgenommene Futtermenge und resultierend daraus die Aufenthaltsdauer des Futters im Pansen bzw. die Passagerate sowie die Rationszusammensetzung.

Tierart- bzw. einzeltierspezifische Faktoren sollten jedoch nicht vernachlässigt werden. Nachfolgend wird auf ausgewählte Faktoren eingegangen.

##### 4.1 Höhe der Futteraufnahme

Zwischen der Höhe der Futteraufnahme bzw. dem Ernährungsniveau und der Aufenthaltsdauer des Futters im Pansen bzw. der Passagerate bestehen enge Zusammenhänge, die vom AFRC (1993) modellartig dargestellt wurden (Tab. 8).

Mit zunehmendem Ernährungsniveau bzw. höherer Futteraufnahme steigt die Passagerate an, es steht demnach weniger Zeit für den mikrobiellen Abbau im Pansen zur Verfügung.

Obwohl diese Zusammenhänge zwischen Höhe der Futteraufnahme und Passagerate weitgehend akzeptiert sind und für verschiedene Modellierungen verwendet werden, fanden nicht alle Versuchsansteller (z. B. Spanghero et al. 1999; s. Tab. 9) derartig eindeutige Entwicklungen, wie sie in Tabelle 8 dargestellt sind. Auch zwischen den Tieren dürften erhebliche Schwankungen auftreten, die u. a. als Erklärung für

Tabelle 8: Zusammenhang zwischen Ernährungsniveau (EN = 1; Erhaltungsbedarf) und Passagerate des Futters bei Rindern (nach AFRC 1993)

Ernährungsniveau	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0
Passagerate (%/h)	1,9	5,2	7,7	9,6	11,2

Tabelle 9: Einfluss des Fütterungsniveaus auf die Ausflussrate von Proteinquellen bei Schafen und Milchkühen (Elima und Ørskov 1984)

Schafe		Milchkühe	
Aufnahme (Vielaches des Erhaltungsbedarfes)	Ausflussrate (%/h)	Aufnahme (Vielaches des Erhaltungsbedarfes)	Ausflussrate (%/h)
0,5	0,8	1,5	6,5
1,0	1,8	2,0	7,2
1,5	2,6	2,5	9,1
2,0	3,2	3,0	8,8

unterschiedliche Reaktionen von Einzeltieren bei gleichem Futterangebot angesehen werden können.

Die geringere Aufenthaltsdauer im Pansen bei hoher Futteraufnahme hat einen geringeren Nährstoffabbau zur Folge (Tab. 10). Der Verdaulichkeitsrückgang im Pansen bei höherer Passagerate ist umso größer, je langsamer der Nährstoff abgebaut wird.

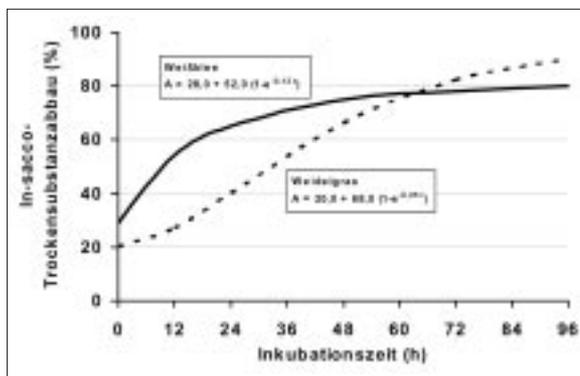
Zellwände von monokotylen Pflanzen (z. B. Gräser einschl. Getreidestroh) werden im Pansen langsamer abgebaut als die von Leguminosen. Daraus resultiert bei höherer Futteraufnahme für Gräser eine deutlichere Verdauungsdepression als bei Leguminosen (Tab. 10).

Durch in sacco-Abbaumessungen können diese Zusammenhänge ebenfalls bestätigt werden (Abb. 7). Bei hoher Futteraufnahme haben demnach Leguminosen einen anderen Stellenwert in Milchkuhrationen

Tabelle 10: Einflussfaktor Futteraufnahme/Passagerate auf den Nährstoffabbau im Pansen von Milchkühen

Futteraufnahme (kg T/Tier und Tag)	6	12	18	24
Passagerate (%/h)	2	5	8	11
Zellwandabbau (%)				
Weizenstroh	45	35	25	15
Weidelgras	85	78	70	62
Luzerne	75	72	68	65
Weißklee	62	78	74	70
Stärkeabbau (%)				
Mais	80	85	50	40
Weizen	96	95	90	80

Abbildung 7: In sacco-Trockensubstanzabbau von Weißklee und Weidelgras bei etwa vergleichbarem Vegetationsstadium in Abhängigkeit von der Inkubationszeit im Pansen (Flachowsky et al. 1999)



als bei niedrigerem Verzehr, da bei ihnen dann die Verdaulichkeit bzw. der Futterwert sogar über dem von Gräsern liegen kann (s. Tab. 10 und Abb. 7).

Durch züchterische Bearbeitung von Pflanzen kann ebenfalls der mikrobielle Abbau im Pansen und damit die Futteraufnahme beeinflusst werden. Diese Zusammenhänge sind für ligninärmere Mais- und Grassorten (z.B. Köhler et al. 1990) bereits längere Zeit bekannt, sie konnten kürzlich auch für ligninärmere Sorghumsorten demonstriert werden (Tab. 11).

#### 4.2 Vergleich von in sacco- und in vivo Abbaudaten

Durch die Nylonbeutel-Methode (in sacco) besteht die Möglichkeit, einen guten Einblick in die Umsetzungen im Pansen zu erhalten (Ørskov et al. 1980).

Dabei darf jedoch nicht übersehen werden, dass einige, im normalen Prozess ablaufende Vorgänge, wie das »Mahlen« und »Quetschen« im Rahmen des Wiederkauens und die Durchmischung mit anderem Panseninhalt in den Beutelchen nicht stattfinden. Während die mechanische Bearbeitung vor allem für Zellwandbestandteile bedeutsam sein dürfte (z. B. Überführung der Zellulose von kristallinen in amorphe Strukturen; Bergner 1980), soll der Abbau der schnell abbaubaren Stärke in sacco häufig über- und

Tabelle 11: Einfluss der Pflanzenzüchtung (z. B. Brown Mid Rib-Hybriden bei Sorghum) auf ausgewählte Kriterien (lat. Quadrat, 28 Tage, n = 4; Oliver et al. 2004)

	Kontrolle	bmi-8
NDF (% der T)	58,1	50,2
KMinO <sub>2</sub> -Lignin	8,8	8,9
Verdaulichkeit (%), NDF	40,8	54,4
Pansen-pH	5,82	5,96
Passage (%/h)	2,93	3,21
T-Aufnahme (kg/d) <sup>1)</sup>	23,2	25,2
Kauzeit (min/d)	340	287
Wederkauzeit (min/d)	420	450
Milchfett (%)	3,57	3,89
FCM (kg/d)	29,1	33,7

<sup>1)</sup> 40 % Sorghum-Silage in T-Aufnahme

der langsam abbaubarer Stärke unterschätzt werden (Tab. 12, Abb. 8). Die großen Schwankungen zwischen den Versuchsserien (Tab. 12) bzw. einzelnen Messwerten verdeutlichen, dass erhebliche stärke- bzw. tierspezifische Faktoren bedeutsam sind. Offner und Sauvant (2004a) schlagen verschiedene Korrekturfaktoren vor, um aus den in sacco Daten repräsentative in vivo-Werte zu erhalten.

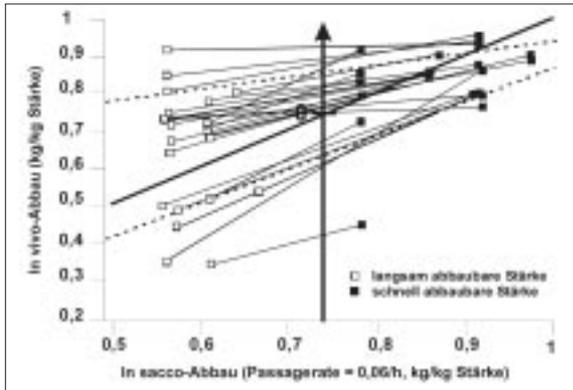
Tabelle 12: Vergleich von in sacco und in vivo erzielten Stärkeabbauwerten (%) im Pansen

Versuchsnummer	Stärkequelle	In sacco Abbau (k = 0,08)	In vivo Abbau <sup>2)</sup> (T-Aufnahme: 18,3 kg/Tag)
1 <sup>1)</sup>	Maissilage (26 % T)	95,7	83,8
	Maissilage (32 % T)	90,7	82,0
	Maissilage (38 % T)	91,8	85,0
2 <sup>1)</sup>	Weizenschrot	93,6	82,1
	Maisschrot 1	45,4	49,0
	Maisschrot 2	44,9	49,8
3 <sup>1)</sup>	Maisschrot 1	57,5	47,8
	Maisschrot 2	59,6	53,2
	Maisschrot 3	68,5	51,6
	Maisschrot 4	63,5	53,0

<sup>1)</sup> Jochmann 1960 <sup>2)</sup> Loose et al. 1995 <sup>3)</sup> Loose 1999

<sup>1)</sup> Stärke der Gesamtration

Abbildung 8: In vivo und in sacco-Abbau von verschiedenen Stärkequellen (nach Offner und Sauvant 2004a)



### 4.3 pH-Wert und Zellwandabbau

Die zellwandabbauende Haftflora (s. Abb. 2) benötigt einen gewissen pH-Wert im Pansen-saft, um an die Zellwände anhaften zu können und optimale Leistungen zu entwickeln. Offner und Sauvant (2004b) verglichen kürzlich die maximale Zellwandabbaurate nach verschiedenen Modellen in Abhängigkeit vom Pansen-pH-Wert (Abb. 9). Obwohl die verschiedenen

Abbildung 9: Einfluss des pH-Wertes im Pansen-saft auf die Abbaurate der Zellwandkohlenhydrate nach verschiedenen Modellen (Offner und Sauvant 2004b)

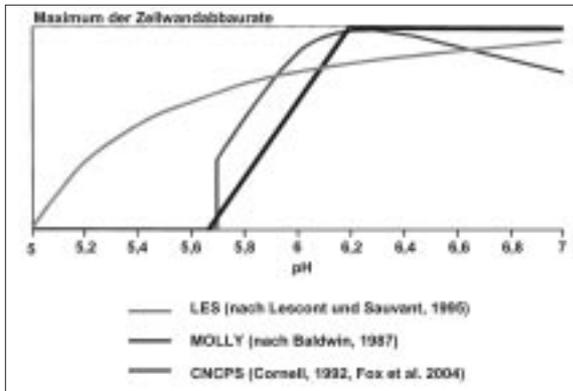


Tabelle 13: Verdaulichkeit (%) von Organischer Substanz und Rohfaser einer Kraftfutter-Weizenstroh-Mischung (80:20) bei Kleinwiederkäuern (n = 6) in Abhängigkeit von der Ca-Versorgung (Flachowsky et al. 1994)

Ca-Menge (g/Tier und Tag)	Verdaulichkeit (%)	
	Organische Substanz	Rohfaser
0,8	84,4	57,4
5,0	86,7	66,8

Modelle zu unterschiedlichen Optima gelangen, sollte nach allen Ansätzen der pH-Wert im Pansen-saft für einen möglichst hohen Zellwandabbau bei > 6,0 liegen.

Die hohe H<sup>+</sup>-Konzentration bei niedrigerem pH-Wert im Pansen-saft erschwert vermutlich das mikrobielle Attachment an die Zellwandstrukturen. Eine bestimmte Menge an bivalenten Kationen (z.B. Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>) scheint Voraussetzung für das Anhaften der zellulolytischen Mikroben an die Zellwände und für den Zellwandabbau zu sein (Tab. 13).

### 4.4 Einfluss der Stickstoffversorgung auf die Umsetzungen im Pansen

In jüngster Vergangenheit wurden vor allem die von GfE (2001) eingeführte ruminale Stickstoffbilanz (RNB) sowie die Synchronisation von Energie- und Protein-/Stickstoffbereitstellung in Verbindung mit einer möglichst hohen mikrobiellen Proteinsynthese und einer effektiven N-Nutzung im Pansen diskutiert.

Bezüglich der RNB konnte in Versuchen am Institut für Tierernährung demonstriert werden, dass eine RNB nahe 0 (g RNB/MJ ME) sowohl die Umsetzungen im Pansen, die mikrobielle Proteinsynthese als auch die nXP-Anflutung im Dünndarm günstig beeinflusst (Tab 14).

Im Fütterungsversuch bewirkte eine negative RNB von -0,6 g RNB/MJ ME eine signifikant verminderte Futteraufnahme und geringere Milchleistung (Tab. 15).

Der Synchronisationsindex nach Sinclair et al. (1993) führte in zwei Versuchen zu unterschiedlichen

**Tabelle 14:** Einfluss unterschiedlicher RNB auf verschiedene Umsetzungen im Pansen bei Milchkühen (Riemeier et al. 2004)

RNB (g/MJ ME)	-0,6 (n=7)	-0,3 (n=6)	0 (n=7)	+0,3 (n=7)
Fermentierte org. Masse (FOM) (kg/d)	9,3 *	9,4 **	12,1 *	9,9 **
Unabgeb. Fibrinogen (UDF) (g/d)	390 *	442 **	532 *	470 *
UDP (g/d)	1688 *	1792 **	2084 *	1911 **
Mikrobielles Protein (g/d)	1038 *	1350 **	1552 *	1441 **
(g/MJ ME)	7,66 *	7,84 **	8,83 *	8,25 **
(g/kg FOM)	143	140	153	166

a, b P = 0,05

**Tabelle 15:** Einfluss unterschiedlicher RNB auf Futteraufnahme und Milchleistung (121 Versuchstage; Kriete et al. 2004)

RNB (g/MJ ME)	Tierzahl je Gruppe	Futteraufnahme (kg/Tag)	Milchleistung (kg/Tag)	Milchbestandteile		
				Fett %	Protein %	Harnstoff (mg/100ml)
-0,6	16	16,4	21,6	3,49	3,22	11,6
+0,2	14	18,5	24,7	3,20	3,90	29,1

Ergebnissen bezüglich der Umsetzungen im Pansen (Tab. 16). Im ersten Versuch hatte der niedrigste Index (0,52) die höchste mikrobielle Proteinsynthese zur Folge, während im zweiten Versuch diese Aussage für den höchsten Index (0,90) zutrifft (Tab 16).

Auch in Fütterungsversuchen führte eine Synchronisation der Energie- und Protein-/N-Versorgung im

**Tabelle 16:** Einfluss des Synchronisationsindex auf die mikrobielle Proteinsynthese bei Milchkühen (Kaswari et al. 2003)

Rationen (Index)	Versuch 1			Versuch 2		
	A (0,76)	B (0,52)	C (0,82)	A (0,85)	B (0,90)	C (0,72)
Mikrob. Protein g/Tag	1515	1672	1576	1723	2037	1777
g/MJ ME	9,0	10,2	9,5	8,9	10,6	9,2
g/kg FOM	167	194	193	187	257	201

FOM = Fermentierte organische Substanz

**Tabelle 17:** Milchleistung (kg energiekorrigierte Milch/Tag) von Kühen beim Einsatz »synchroner« bzw. »asynchroner« Rationen

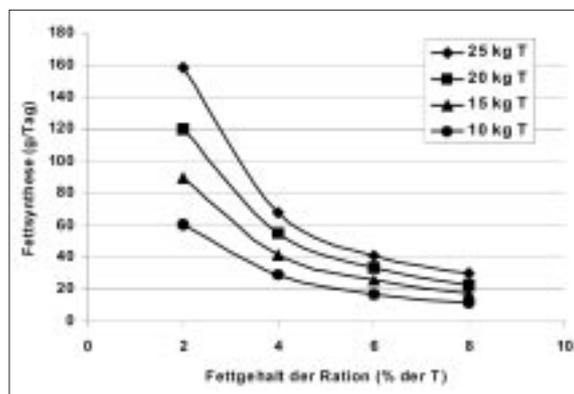
Grüddiät	Metzsilage		Grassilage		Weide	
	„Maai“ (synchr.)	„Gras“ (asynchr.)	„Gras“ (synchr.)	„Maai“ (asynchr.)	synchr.	asynchr.
Konyali (2001)	28,9	27,9	26,8	26,0	22,1	21,7
Keller et al. (2002)	27,4	27,6	27,4	28,3	-	-

Pansen nicht immer zu den »erhofften« Ergebnissen, wie in Tabelle 17 an zwei Versuchsergebnissen gezeigt wird. Vermutlich wird durch den ruminohepatischen Kreislauf auch bei asynchroner N-Versorgung eine ausreichende N-Versorgung erreicht. Nicht ohne Einfluss dürften auch Futterauffnahmefrequenz und -seque sowie die Höhe der Futteraufnahme der Kühe sein.

#### 4.5 Mikrobielle Fettbildung

Die mikrobielle Fettbildung im Pansen ist relativ gering und wird neben der Höhe der Futteraufnahme vor allem vom Fettgehalt der Ration beeinflusst (Abb. 10).

**Abbildung 10:** Einfluss der Höhe der Futteraufnahme und der Fettmenge in der Ration auf die Neubildung von Fettsäuren (gemischte Ration; Moate et al. 2004)

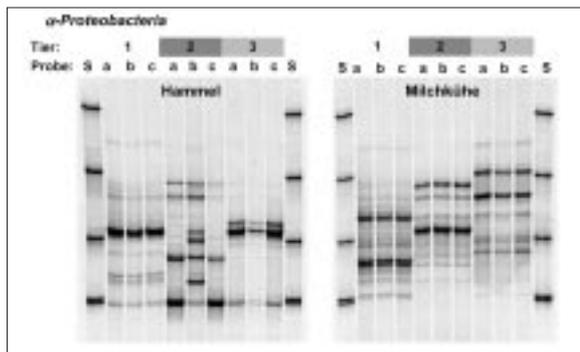


#### 4.6 Einfluss der mikrobiellen Besiedelung

Mit Hilfe der herkömmlichen Methoden der Mikrobiologie konnten eine Vielzahl im Pansen vorkommender Mikroorganismen identifiziert werden. Die notwendige Kultivierung unter anaeroben Bedingungen ist jedoch sehr aufwendig. Da eine Reihe von Mikroorganismen auf Grund ihrer Ansprüche an Substrate und Lebensbedingungen nicht kultivierbar sind, konnte nur ein Bruchteil aller vorkommenden Arten und Stämme erfasst werden. Mit der Einführung molekularbiologischer Methoden in die Taxonomie wurde dies eindrucksvoll bestätigt. Es wird geschätzt, dass die Zahl der in natürlichen Habitaten vorkommenden Bakterien 10 bis 100mal höher ist, als die der kultivierbaren (Krause and Russell 1996). Von Whitford et al. (2001) wurden zum Beispiel bisher nicht identifizierte methanogene Archaea im Pansen von Kühen der Rasse Holstein gefunden. Die Betrachtung der ruminalen Mikroflora als Summe der einzelnen Spezies mit einer bestimmten Stoffwechselleistung sowie auch die selektive Untersuchung einer oder weniger predominanter Spezies ist unzureichend. Die in vielfältigen Abhängigkeiten und Wechselwirkungen zueinander stehenden Arten und Stämme bilden eine Gemeinschaft, welche wiederum durch das Wirtstier beeinflusst wird (Wiederkauaktivität, Höhe der Speichelproduktion und N-Gehalt, Resorption von Produkten der mikrobiellen Tätigkeit durch die Pansenwand, Regulation der Fermentationstemperatur, Durchmischung des Panseninhaltes). Zur Charakterisierung einer derartigen Gemeinschaft ist ein möglichst umfassendes Bild ihrer qualitativen und quantitativen Zusammensetzung notwendig. Mit Hilfe kultivierungsunabhängiger, molekularbiologischer Methoden, wie der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und des Einzelstrang-Konformationspolymorphismus (SSCP, Schwieger und Tebbe 1998) oder der Denaturierenden Gradienten Gelelektrophorese (DGGE, Muyzer et al. 1993) ist es möglich, genetische Profile zu erstellen, welche ohne aufwendige anaerobe Kultivierungstechniken einen Überblick über die Gesamtheit der mikrobiologischen Vielfalt geben und einer bildanalytischen Auswertung zugänglich

sind. Damit ergibt sich die Möglichkeit, bei genügendem Stichprobenumfang Einflüsse der Fütterung auf die ruminale Mikrobenpopulation vergleichend zu untersuchen. Derartige mit der SSCP-Technik erstellte Profile für die Gesamtheit der Bakterien zeigten wenige, sehr breite Banden (Strobel et al. 2004). Es ist anzunehmen, dass die hohe Artenvielfalt die Kapazität der elektrophoretischen Trennung überstieg. Dargestellt wurden somit nur die dominant auftretenden Spezies. Die Verwendung spezifischer Primersysteme, welche eine Auswahl der darzustellenden Bakteriengruppen erlaubt, ergab klar differenzierte Strukturen. In Abbildung 11 wurden Bakterienfraktionen aus Pansensaftproben von jeweils drei fistulierten Milchkühen sowie Hammeln verglichen. Dargestellt wurde die Gruppe der  $\alpha$ -Proteobakterien. Gewonnen wurden von allen Tieren drei Proben aus unterschiedlichen Pansenregionen. Trotz identischer Fütterung der Tiere jeder Art und Haltung am gleichen Standort wiesen die Bandenmuster individuelle Unterschiede auf, die bei den Milchkühen noch deutlicher als bei den Hammeln ausgeprägt waren. Mit Hilfe der Bildanalyse wurde eine strikte Differenzierung der  $\alpha$ -Proteobakterien-Populationen für Hammel und Milchkühe bestätigt. Am ähnlichsten waren sich die jeweils von einem Tier wiederholt gewonnenen Proben. Die ruminale Bakteriengemeinschaft erscheint somit wirtsspezifisch. Dies könnte zur Erklärung auftretender individueller Unterschiede bei der Bestimmung ruminaler Stoffwechselleistungen (z. B. Bakterienproteinsynthese) beitragen. Bei *in vitro*-Methoden, wie zum Beispiel dem Rusitec-Verfahren kann diese Problematik umgangen werden, da die entsprechenden Fermenter mit dem Panseninhalt eines Spendertieres befüllt werden können. Die Adaptation des Inhaltes von 6 Fermentern an eine einheitliche Mikrobenpopulation konnte bestätigt werden. Die darauf folgende Fütterung von jeweils drei Fermentern mit einer unterschiedlich zusammengesetzten TMR führte zu Veränderungen der genetischen Profile als Folge von Verschiebungen der Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass sich die Bandenmuster auch mit der

Abbildung 11: SSCP-Profile von jeweils drei Hammeln und Milchkühen bei wiederholter Probenahme aus verschiedenen Pansenregionen (a,b,c) (Strobel et al. 2004) (S-Speziesstandard – Banden stammen von bekannten Bakterienstämmen)



Versuchsdauer veränderten. In der Regel wurden Banden schwächer oder verschwanden ganz, andere nahmen an Intensität auch zu. Vermutlich ist einigen Spezies das Überleben in diesem System nicht über eine längere Zeit möglich, an deren Stelle dann andere, an diese Bedingungen besser angepasste Arten bzw. Stämme treten. Daher ist es nicht zwingend, dass diese Verschiebungen sich zwangsläufig in anderen, in solchen Systemen üblicherweise bestimmten Parametern (pH-Wert, Redoxpotential, Gasbildung) ausdrücken. Gleichzeitig verweist dieser Befund aber auch auf die Grenzen von *in vitro*-Techniken. Es kann nicht davon ausgegangen werden, dass die in den Fermentern kultivierte Mikroorganismenpopulation identisch mit der *in vivo* vorliegenden ist. Zudem kann eine Produkthemmung nicht ausgeschlossen werden, da zwar ein kontinuierlicher Durchfluss eines künstlichen Speichels stattfindet, jedoch eine Resorption von Stoffwechselprodukten durch die Magenschleimhaut fehlt.

Ein mit Hilfe der SSCP-Technik erstelltes genetisches Profil erlaubt den Vergleich verschiedener bakterieller Gemeinschaften ohne Kenntnis der Arten und Stämme aus denen sich diese zusammensetzten. Diese können jedoch durch die in den einzelnen

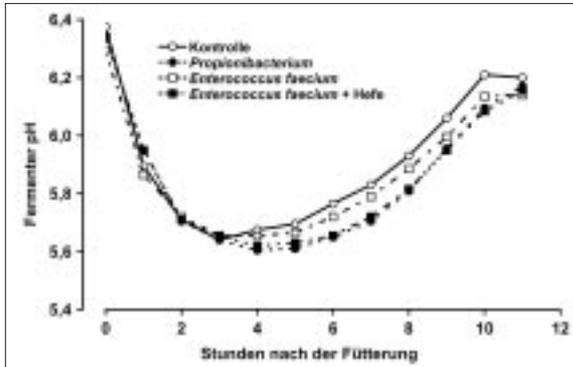
Banden enthaltene genetische Information identifiziert werden. So ist es möglich, gezielt diejenigen Banden auszuwählen, die in Abhängigkeit vom zu untersuchenden Parameter (z.B. Futterzusammensetzung, Inhaltsstoffe) verändert erscheinen. Eine Quantifizierung einer bekannten Art oder Stammes ist dann in der Ausgangsprobe mit Hilfe geeigneter speziespezifischer Primersysteme oder Sonden mit Hilfe der real time PCR möglich (Tajima et al. 2001). Ouwerkerk et al. (2002) entwickelten einen derartigen Assay mit dem der Nachweis von weniger als 100 Zellen *Megasphaera elsdenii* je ml Pansenflüssigkeit möglich war.

Moderne molekulargenetische Methoden erlauben die Identifizierung und phylogenetische Einordnung bisher unbekannter im Pansen vorkommender Arten und Stämme. Des Weiteren ermöglichen sie den Vergleich verschiedener mikrobieller Gemeinschaften und eine spezies- bzw. gruppenspezifische Quantifizierung.

#### 4.7 Zusatz von Mikroorganismen

Durch den Zusatz von Mikroorganismen mit einer vermuteten probiotischen Wirkung (Bakterien, wie *Bacillus cereus* var. *toyoi*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *Megasphaera elsdenii*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus fermentum*, *L. casei*, und Hefen, wie *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus oryzae*) wird schon seit längerer Zeit versucht, Pansenfunktionen zu stabilisieren und zur Leistungssteigerung beizutragen. Die Fähigkeit des Bakteriums *Megasphaera elsdenii*, Laktat abzubauen, soll zum Beispiel den pH-Wert bei Fütterung getreidereicher Rationen stabilisieren und so einer Pansenacidose vorbeugen sowie dadurch die Effizienz des Stärkeabbaus erhöhen (Kung und Hession 1995, Wiryawan und Brooker 1995, Owens et al. 1998). Ein anderer Weg, diese Wirkung zu erzielen, besteht in der Stimulierung im Pansen vorkommender Bakterien durch Hefe- und andere Pilzkulturen. So konnte nach Supplementation von *Saccharomyces cerevisiae* oder *Aspergillus oryzae* eine Steigerung des Lactatabbaus und ein verstärktes Wachstum von *Selenomonas ruminantium* gezeigt werden (Nisbet und Martin 1991; Martin und Nisbet 1991). Eine weitere

Abbildung 12: Einfluss des Zusatzes von Mikroorganismen auf den pH-Wert im kontinuierlichen Fermentor bei kraftfutterreicher Fütterung (Yang et al. 2004)



Wirkung verspricht man sich von einer Beeinflussung der Produktion flüchtiger Fettsäuren (z.B. Forster et al. 2001). Die teilweise in der Literatur beschriebenen positiven Effekte können jedoch nicht immer reproduziert werden. Die gewünschte puffernde Wirkung von Hefen bei sehr hohen Kraftfuttermengen (Schwarz 2004) konnte auch *in vitro* nicht in jedem Fall verifiziert werden (Abb. 12). Garza (2001) prüfte Zulagen von *Bacillus cereus* var. *toyoi* und *Saccharomyces cerevisiae* bei Schafen und Jungbullen und konnte auch am Tier keine signifikanten Effekte auf Pansenparameter, die scheinbare Verdaulichkeit der Ration sowie Mast- und Schlachtleistungen nachweisen.

Die probiotisch verabreichten Mikroorganismen persistieren in der Regel nicht, sondern müssen regelmäßig mit dem Futter zugeführt werden. Andererseits gibt es Bemühungen, die ruminale Bakterienflora permanent in einer gewünschten Weise zu verändern. Das Ziel ist zumeist die Erhöhung der zellulytischen Aktivität. Neben aus natürlichen Habitaten isolierten werden auch gentechnisch veränderte Stämme eingesetzt (z.B. McSweeney et al. 1999). Zum Beispiel wurde das alpha-Amylasegen in Stämme von *Streptococcus bovis* eingebracht, welche zuvor Stärke nicht hydrolysieren konnten. Andere Versuche beschäftigten sich mit der Verbesserung der Lysinsyntheserate

(Kmet 1997). Jedoch werden diese Mikroorganismen zumeist in kurzer Zeit wieder aus der mikrobiellen Gemeinschaft verdrängt. Das sich über Jahrtausende etablierte System Pansen erweist sich gegenüber Störungen durch aufgenommene Mikroorganismen als erstaunlich stabil, so dass die *in vitro* durch Reinkulturen erbrachten Effekte im Pansen selbst kaum zu realisieren sind. Allerdings gibt es auch Berichte, nach denen es gelungen ist, aus der Pansenflora bestimmter Wiederkäuer isolierte Mikroorganismen im Pansen anderer Wiederkäuer anzusiedeln und von deren Leistungen zu profitieren. Als bekanntestes Beispiel ist der Mimosinabbau (Mimosin ist eine nicht im Protein vorkommende Aminosäure, welche in der tropischen Leguminose *Leucaena* (Jonas und Megarity 1986) zu finden ist) anzuführen (Tab. 18). Dem Bakterium *Synergistes jonesii* ist es offenbar gelungen, in der mikrobiellen Gemeinschaft der Vormagenflora eine ökologische Nische zu besetzen. Ein aus Rinderpansen isolierter Pilzstamm (*Piromyces* sp. CS 15) bewirkte bei mit Gerstenstroh und Luzerneheu gefütterten Schafen eine Steigerung der Futteraufnahme. Der inokulierte Stamm war bei der Hälfte der Tiere noch bis zu 3 Monate nach der letzten Aufnahme nachweisbar (Gordon 2000).

Als aussichtsreicher scheint gegenwärtig der Weg durch eine gezielte Fütterungsoptimierung erwünschte Verschiebungen in der nativen mikrobiellen Gemeinschaft herbeizuführen. Als Beispiel sei die Förderung anaerober Pilzen durch eine Schwefelverbindung bei auf schwefelarmen Böden gehaltenen Schafen ge-

Tabelle 18: Beispiele für eine erfolgreiche Ansiedlung von Mikroorganismen im Pansen von Wiederkäuern

Mikroorganismus	Effekte	Autor
<i>Synergistes jonesii</i>	Mimosinabbau in <i>Leucaena</i>	Jonas und Megarity (1986)
GMO mit Dehalogenase-Gen	Abbau von Flour-acetal in <i>Acacia georgina</i>	Gregg et al. (1994, 1995)
<i>Butyrivibrio fibrosolvens</i> mit Pilz-Xylanase (GMO)	Zellwandabbau (bis 4 Wochen überlebt)	Krause et al. (2001)

nannt (Gordon et al. 2001). Gentechnisch veränderte Mikroorganismen sind unter Umständen dann erfolgreich im Pansen etablierbar, wenn es sich bei den Ausgangsstämmen um solche handelt, die in der ruminalen Flora der vorgesehenen Wiederkäuerpopulation predominant sind. Die Besetzung ökologischer Nischen bleibt wohl Mikroorganismen mit besonderen Stoffwechselleistungen bzw. Substratansprüchen vorbehalten, was von besonderem Interesse für das Detoxifikationspotential der ruminalen Mikroorganismengemeinschaft ist.

#### 4.8 Enzymzusatz

Seit Jahren wird versucht, evtl. fehlende zellwandspaltende Enzyme exogen zuzuführen, um den Zellwandabbau bei der Grundfutterlagerung oder im Pansen zu verbessern. Dabei soll auch dem Rückgang der Verdaulichkeit bei hoher Futtermittelaufnahme infolge zügiger Passage durch den Pansen entgegengewirkt werden.

Die bisher erzielten Ergebnisse, die auszugsweise in Tabelle 19 zusammengestellt sind, vermitteln kein einheitliches Bild und erfordern weitere Studien.

Tabelle 19: Ergebnisse neuerer Studien zum Einsatz NSP-hydrolysierender Enzyme in der Milchkuhfütterung (nach verschiedenen Autoren)

Enzym bzw. Enzymgemisch	Ausgewählte Effekte					Autor
	Futtermittelaufnahme	Verdaulichkeit	Milchleistung	Milchinhaltsstoffe	Sonstige Bemerkungen	
Zellulase, Xylanase	=	↑	↑	Fett ↑, Protein =		Beauchemin et al. 1999
Zellulase, Xylanase	↑	=	↑ (bis 13 %)	Fett = ↑, Protein = ↓		Lewis et al. 1999
Zellulase, Xylanase	=	↑	↑ (bis 10 %)	↓		Rode et al. 1999
Zellulase, Xylanase	= ↑	k. A.	↑ (bis 11 %)	k. A.		Schingoethe et al. 1999
Zellulase, Xylanase	=	↑	↑	=		Yang et al. 1999
β-Glucanase, Xylanase, Zellulase	↑	= ↑	=	= ↑		Beauchemin et al. 2000
Zellulase, Xylanase	=	k. A.	= ↑	=		Kung et al. 2000
Xylanase (viel), Zellulase (wenig)	=	↑	= ↑	Fett ↓, Protein =	Verd. Schaf bei EN 1,2 =	Yang et al. 2000
Zellulase, Xylanase	=	k. A.	k. A.	k. A.	Erhöhte Speichelabsonderung	Bowman et al. 2003
Xylanase, Endoglucanase	=	k. A.	=	k. A.	Erhöhte Partikeldurchflussrate durch Pansen	Sutton et al. 2003
Xylanase, Endoglucanase	=	k. A.	=	=		Vicini et al. 2003
Review-Beitrag	= (↑)	↑ =	= (↑)	=	Herausforderung für Forschung	McAllister et al. 2001

↑ Erhöhung ↓ Senkung = signifikanter Einfluss

## 5 Zukunftsperspektiven und Herausforderungen

Zukunftsperspektiven und Herausforderungen für die Forschung sind mit einem besseren Verständnis mikrobieller Aktivitäten im Pansen verbunden. Sie ergeben sich vor allem aus globalen Ansätzen, wie der Effizienzsteigerung und Reduzierung der Anzahl der in den Tropen/Subtropen lebenden Wiederkäuer, welche  $\approx 70\%$  der insgesamt gehaltenen Zahl ausmachen, jedoch nur etwa ein Viertel des von Wiederkäuern stammenden essbaren Proteins erzeugen, aber zu etwa drei Viertel zur Methanausscheidung dieser Tiere beitragen.

Zu den in Frage kommenden Forschungsansätzen zählen:

- exakte und möglichst komplette Beschreibung der mikrobiellen Gemeinschaft im Pansen durch Methoden, die eine schnelle und genaue Detektion der mikrobiellen Dichte, Diversität und Phylogenie erlauben
- Analyse der funktionellen Gene der Mikroorganismen und ihrer Expression
- Verbesserung der Kenntnisse über die Interaktionen zwischen den Mikroorganismen und zwischen Mikroorganismen und den Substraten
- Erhöhung des Potenzials zum Zellwandabbau durch anaerobe Pilze, verbesserte Lebensbedingungen von zellulose-abbauenden Bakterien bei niedrigeren pH-Werten, Vorbehandlung der Ligno-Zellulose und Reduzierung der Energie- (einschließlich der Methan-) verluste
- Erhöhung des Potenzials zum Abbau unerwünschter Stoffe (z.B. Mykotoxine) im Pansen
- Einsatz effektiver Formen des ruminalen Bypasses verschiedener Nährstoffe bzw. sichere Vorhersage der mit verschiedenen Zusatzstoffen zu erwartenden Effekte
- Nutzung der Potenziale von Pansenmikroorganismen oder mikrobiellen Gemeinschaften als Futterzusatzstoffe zur Dekontamination unerwünschter Stoffe

## ● langfristige Etablierung »erwünschter« mikrobieller Gemeinschaften

Bei aller Zuversicht über eine weitere Optimierung der mikrobiellen Prozesse im Pansen sollte nicht übersehen werden, dass es sich beim Pansen um ein über Jahrtausende etabliertes, komplexes Mikro-Ökosystem handelt und dass eine nachhaltige Einflussnahme nicht einfach sein dürfte.

Über weitere Aspekte zum Thema wird u.a. in den Beiträgen von Südekum (2004) und Schwarz (2004) informiert.

### Literatur

AFRC (1993): Agricultural and Food Research Council: Energy and protein requirements of ruminants. CAB International, Wallingford, UK

BALDWIN, R.L. (1995): Modeling ruminant digestion and metabolism. Chapman and Hall, London, Glasgow, Weinheim, New York, Tokyo, Melbourne, Madras

BAUMAN, D.E., GRINARI, J.M. (2001): Regulation and nutritional manipulation of milk fat: Low milk fat syndrome. *Livest. Prod. Sci.* 70, 15–29

BEAUCHEMIN, K.A., YANG, W.Z., RODE, L.M. (1999): Effects of grain source and enzyme additive on site and extent of nutrient digestion in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82, 378–390

BEAUCHEMIN, K.A., RODE, L.M., MAEKAWA, M., MORGAVI, D.P., KAMPEN, R. (2000): Evaluation of a nonstarch polysaccharidase feed enzyme in dairy cow diets. *J. Dairy Sci.* 83, 543–553

BERGNER, H. (1980): Chemische Grundlagen des Strohaufschlusses in der Pelletierpresse. *Arch. Tierernähr.* 30, 239–256

BOWMAN, G.R., BEAUCHEMIN, K.A., SHELFORD, J.A. (2003): Fibrolytic enzymes and parity effects on feeding behavior, salivation and rumen pH of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 86, 565–575

CLARK, J.H., KLUSMEYER, T.H., CAMERON, M.R. (1992): Microbial protein synthesis and flows of nitrogen fractions to the duodenum of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 75, 2304–2323

CRAIG, A.M. (1995): Detoxification of plant and fungal toxins by ruminant microbiota. *Proc. 8<sup>th</sup> Int. Symp. in Ruminant Physiology*, Enke Verlag, 271–288

CRUTZEN, P.F. (1995): The role of methane in atmospheric chemistry and climate. In: ENGELHARDT, W.v., LEONHARD-MAREK, S. BREVES, G. GRIESECKE, D. (ed.): *Ruminant Physiology, Digestion, Metabolism, Growth and Reproduction*. *Proc. 8<sup>th</sup> Int. Symposium on Ruminant Phys.* F. Enke Verlag Stuttgart, 291–315

DÄNICKE, S., MATTHÄUS, K., LEBZIEN, P., VALENTA, H. (2003): On the effects of Fusarium toxins on the fermentation and nutrient utilization in the rumen of dairy cows. 25. Mykotoxin-Workshop 19.–21. Mai 2003, Gießen, 15

- DEHORITY, B.A. (2003): Rumen microbiology, Nottingham Univ. Press, 372 p.
- FLACHOWSKY, G., LEBZIEN, P., DAENICKE, R. (1999): Zur Bedeutung von Leguminosen als Grundfutterkomponente in Rationen von Hochleistungskühen. VDLUFA-Kongressband 1999, 111. VDLUFA-Kongress Halle, VDLUFA Schriftenreihe 52, 293–296
- FLACHOWSKY, G., LEBZIEN, P., STROBEL, E. (2004): »Biotechnikum« Pansen – Potenziale und Grenzen. Züchtungskunde 76, 46–65
- FLACHOWSKY, G., LÖHNERT, H.-J. (1974): Einige Aspekte zur Vitamin B<sub>1</sub>-Versorgung von Lämmern nach provoziierter Pansenacidose. Arch. Exper. Vet. Med. 28, 543–549
- FLACHOWSKY, G., LOOSE, K., LEBZIEN, P., MATTHÈ, A., GOLLNISCH, K., DAENICKE, R. (2000): Zur Bereitstellung von Maisprodukten als Stärkequellen für Milchkühe. Landbauforschung Völknerode, Sonderheft 217, 71–85.
- FLACHOWSKY, G., SCHNEIDER, A., OCHRIMENKO, W.I., KRONE-MANN, H. (1994): Calcium release from various roughage and influence of Ca on dry matter degradability of roughages in rumen and apparent digestibility of ration. J. Appl. Anim. Res. 6, 43–57
- FLACHOWSKY, G., WILK, H., OCHRIMENKO, W.I., LÖHNERT, J., SCHLENZIG, M. (1993): Einfluss der Karotin- und Vitamin A-Versorgung auf die Vitamin A-Konzentration in Leber und Plasma bei wachsenden Rindern. Ernährungsforschung 37, 83–95
- FORSTER, R.J., KLIEVE, A.V., OWERKERK, D. (2001): Advances in evaluating and altering the rumen microbial ecosystem. Rec. Advances in Anim. Nutr. in Australien 13, 37–42
- FOX, D.G., TEDESCHI, L.O., TYLUTKI, T.P., RUSSELL, J.B., VAN AMBURGH, M.E., CHASE, L.E., PELL, A.N., OVERTON, T.R. (2004): The Cornell Net Carbohy draft and Protein System muscle for evaluating herd nutrition and nutrient excretion. Anim. feed Sci. Technol. 112, 29–78
- GARZA, J.F. (2001): Einfluss verschiedener Probiotika (*Bacillus cereus* und *Saccharomyces cerevisiae*) auf den in sacco Abbau und die Verdaulichkeit bei Schafen sowie die Mast- und Schlachtleistung von Jungbullern. Diss., Fakultät für Agrarwissenschaften, Georg-August-Universität Göttingen
- GlE (2001): Energie- und Nährstoffbedarf landwirtschaftlicher Nutztiere, Nr. 8, Empfehlungen von Energie- und Nährstoffversorgung der Milchkühe und Aufzuchttrinder. DLG-Verlag, Frankfurt (Main), 136 S.
- GOLLNISCH, K. (2000): Folgen hoher Stärkeaufnahmen auf Prozesse im Dickdarm von Rindern. Landbauforschung Völknerode, Sonderheft 217, 46–59.
- GORDON, G.L.R., PHILLIPS, M.W., RINTOUL, A. J., WHITE, S.W. (2000): Increased intake of fibrous feed by sheep orally dosed with a culture of an elite non-indigenous anaerobic gut fungus. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences 13, Suppl. C, 143
- GORDON, G.L.R., PHILLIPS, M.W., WHITE, S.W., RINTOUL, A.R., MICHELL, P.A. (2001): Can anaerobic fungi be manipulated in the sheep rumen to improve the utilization of poor quality feed? Recent Adv. in Anim. Nutr. in Australia 13, 43–48
- GREGG, K., COOPER, C.L., SCHAFER, D.J., SHARPE, H., BEARD, C.E., ALLEN, G., XU, J.W. (1994): Detoxifikation of the plant toxin fluoracetate by a genetically modified rumen bacterium. Bio/Technology 12, 1361–1365
- GREGG, K., HARNDORF, B., HENDERSON, K., KOPECNY, J., WONG, C. (1998): Genetically modified ruminal bacteria protect sheep from fluoroacetate poisoning. Appl. Environm. Microbiol. 64, 3496–3498
- HESS, H.D., KREUZER, M., DIEZ, T.E., LASCANO, C.E., CARULLA, J.E., SOLIVA, C.R., MACHMÜLLER, A. (2003): Saponin rich tropical fruits affect fermentation and methanogenesis in faunated and defaunated rumen fluid. Anim. Feed Sci. Technol. 109, 79–94
- HOBSON, P.N. (1988): The rumen microbial ecosystem. Elsevier Sci. Publishers LTD, Barking, England
- HOFFMANN, M. (Hrsg.) (1990): Tierfütterung. Dt. Landwirtschaftsverlag, 2. Aufl. 348 S.
- JAHREIS, G.; FRITSCHKE, J., STEINHART, H. (1997): Conjugated linoleic acid in milk fat: igh variations depending on production system. Nutr. Res. 17, 1479–1484.
- JAHREIS, G.; FRITSCHKE, J., MÖCKEL, P., SCHÖNE, F., MÖLLER, U., STEINHART, H. (1999): The potential anticarcinogenic Conjugated linoleic acid, cis-9, trans-11C 18:2, in milk of different species: cow, goat, ewe, sow, mare, women. Nutr. Res. 19, 1541–1549
- JAHREIS, G.; KRAFT, J.; MICHEL, P. (2002): Milch vom Nutzerzeugnis zum Designerprodukt. Sonderheft 242, Landbauforschung Völknerode, 13–23
- JOCHMANN, K. (1999): Ernährungsphysiologische Untersuchungen zum Einfluss der Maissilage und des Einsatzes von Milchsäurebakterien bei der Herstellung von Maissilage auf die Umsetzungen im Verdauungstrakt sowie auf die Leistungen beim Wiederkäuer. Diss. Univ. Jena
- JOCHMANN, Karla, P. LEBZIEN und G. FLACHOWSKY (1996): Zum Einsatz pansenstabiler Aminosäuren in der Milchviehfütterung. Übers. Tierernährung 24, 255–292.
- JONES, R.J., MEYARRITY, R.G. (1986): Successful transfer of DHP-degrading bacteria from Hawaiian grats to Australian ruminants to overcome the toxicity of lencaena. Austr. Vet. J. 63, 259–262
- KASWARI, T., LEBZIEN, P., ter MEULEN H., FLACHOWSKY, G. (2003): Effects of synchronisation of protein and energy availability in the rumen on microbial protein synthesis in dairy cows. Proc. Soc. Nutr. Physiol. 12, 86 (Abstr.)
- KELLER, S., STEINGASS, H.; DROCHNER, W. (2002): Einfluss der Synchronisierung von Kohlenhydrat- und Proteinabbau auf Parameter der Verdauungsphysiologie und Leistung bei Milchkühen. In: 114. VDLUFA-Kongress in Leipzig, 16.–10. September 2002, VDLUFA-Verl., 118–119 (Abstr.)
- KIRCHGESSNER, M., ROTH, F.X., WINDISCH, W. (1993): Verminderung der Stickstoff- und Methanausscheidung von Rind und Schwein durch die Fütterung. Übers. Tierernährung 21, 89–120
- KMET, V. (1997): Gene manipulation in rumen microbes. Ed. J. Voigt und H. Hagemeister. FBN Dummerstorf, Schriftenreihe 10, Internat. Vortragstagung »Verdauungsphysiologie und Stoffumsatz beim Wiederkäuer«, Rostock, 21.2.1997
- KONYALI, A. (2001): Effects of synchronous and asynchronous concentrates on performance and efficiency of nitrogen utilization of lactating dairy cows. In: Dissertation. Institute für Tierzucht und Tierhaltung der Agrar- und Ernährungswissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität Kiel

- KÖHLER, R., JEROCH, H., FLACHOWSKY, G., GEBHARDT, G., HILSCHER, H., KAPPEL, W. (1990): Futtermittelkundliche Bewertung verschiedener Maisgenotypen. Arch. Anim. Nutr. 40, 267–274
- KRAUSE, D.O., RUSSELL, J.B. (1996): Symposium: Ruminant microbiology. How many ruminal bacteria are there? J Dairy Sci 79, 1467–1475
- KRAUSE, D.O., BUNCH, R.J., DALRYMPLE, B.A., GOBINS, K.S., SMITH, W.J., XNE, G.P., McSWEENEY, C.S. (2001): Expression of a modified *Neocallimastix patriciarum* xylanase in *Butyrivibrio fibrisolvens* digests more fibre but can effectively compete with high fibrolytic bacteria in the rumen. J. Appl. Microbiol. 90, 388–396
- KRIETE, V., MEYER, U., LEBZIEN, P., LIEBERT, F. (2004): Effect of varying ruminal Nbalance on feed intake and milk yield of dairy cows. Proc. Soc. Nutr. Physiol. 13, 46 (Abstr.)
- KRAFT, J., LEBZIEN, P., FLACHOWSKY, G., MÖCKEL, P., JAHREIS, G. (2000): Duodenal infusion of conjugated linoleic acid mixture influences milk fat synthesis and milk CLA content in dairy cows. Occ. Publ. of British Soc. Anim. Sci. 25, 143–147
- KUNG, L.J.; HESSION, A.O. (1995): Preventing *in vitro* lactate accumulation in ruminal fermentations by inoculation with *Megasphaera elsdenii*. J Anim Sci 73, 250–256
- KUNG, L., TREACHER, R.J., NAUMAN, G.A., SMAGALA, A.M., ENDRES, K.M., COHEN, M.A. (2000): The effect of treating forages with fibrolytic enzymes on its nutritive value and lactating performance of dairy cows. J. Dairy Sci. 83, 115–122
- LEBZIEN, P. (1998): Bedeutung der Protein- und Stärkeumsetzungen im Pansen für die Versorgung der Hochleistungskuh. Lohmann Informationen 2/98, 7–15
- LEBZIEN, P. (1997): Zum Einfluss des Futterproteins auf das Aminosäuremuster des Proteins am Duodenum von Wiederkäuern. Übers. Tierernährung 25, 137–153
- LEBZIEN, P., FLACHOWSKY, G., SZAKACZ, J., KELLER, T. (2001): Einfluss hoher Vitamin A- und E-Gaben in den Pansen von Kühen auf die Anflutung der beiden Vitamine am Duodenum. Proc. 8. Symp. »Vitamine und Zusatzstoffe in der Ernährung von Mensch und Tier«, 26./27.09.2001, Jena, 295–300
- LEBZIEN, P.; VOIGT, J.; GABEL, M.; GÄDEKEN, D. (1996): Zur Schätzung der Menge an nutzbarem Rohprotein am Duodenum von Milchkühen, J. Anim. Phys. a. Anim. Nutr. 76, 218–233
- LEWIS, G.E., SANCHEZ, W.K., HUNT, C.W., GUY, M.A., PRITCHARD, G.T., SWANSON, B.L., TREACHER, M.A. (1999): Effect of direct-fed fibrolic enzymes on the lactational performance of dairy cows. J. Dairy Sci. 82, 611–617
- LOOR, J.J., SORIANO, F.D., LIN, X., HERBIN, J.H., POLAN, C.E. (2003): Grazing allowance after the morning of afternoon milking for lactating cows fed a total mixed ration (TMR) enhances trans 11-18:1 and cis 9, trans 11-18:2 (rumenic acid) in milk fat to different extents. Anim. Feed Sci. Technol. 109, 105–119
- LOOSE, K. (1999). Untersuchungen zum Einfluss verschiedener Körnermais-hybriden auf die Stärke- und Proteinumsetzungen im Verdauungstrakt von Milchkühen. Diss. Tierärztliche Hochschule Hannover
- LOOSE, K., LEBZIEN, P., FLACHOWSKY, G. (1998): Einfluss von Maissorten mit unterschiedlichen Stärke- und Proteingehalt auf den in sacco-Abbau im Pansen bei nicht laktierenden Milchkühen. Proc.Soc.Nutr.Physiol. 7, 23
- MARTIN, S.A., NISBET, D.J. (1991): Symposium: Direct-fed microbials and rumen fermentation: Effect of direct-fed microbials on rumen microbial fermentation. J Dairy Sci 75, 6, 1736–1744
- MATTHÉ, A., LEBZIEN, P., FLACHOWSKY, G. (2000): Zur Bedeutung von Bypass-Stärke für die Glucoseversorgung von hochleistenden Kühen. Übers. Tierernährung 28, 1–64
- MATTHÉ, A., LEBZIEN, P., HRIC, I., FLACHOWSKY, G., SOMMER, A. (2001): Effect of starch application into the proximal duodenum of ruminants on starch digestibility in the small and total intestine. Arch. Anim. Nutr. 55, 351–369
- McALLISTER, T.A., HRISTOV, A.N., BEAUCHEMIN, K.A., RODE, L.M., CHENG, K.-J. (2001): Enzymes in ruminant Diets. In: Enzymes in farm animal nutrition, M.R. Bedford, G.G. Partridge (eds.), CAB International, Wallingford, UK, 273–298
- McNAMARA, J.P. (2004): Research improvement and application of mechanistic, biochemical, dynamic models of metabolism in lactating dairy cattle. Anim. Feed Sci. Technol. 112, 155–176
- McSWEENEY, C.S., DALRYMPLE, B.P., GABINS, K.S., KENNEDY, P.M., KRAUSE, D.O., MACKIE, R.I., XUE, G.P. (1999): The application of rumen biotechnology to improve the nutritive value of fibrous feedstuffs: pro- and post-ingestion. Livestock. Prod. Sci. 59, 265–283
- MOATE, P.J., CHALUPA, W., JANKINS, T.J., BOSTON, R.C. (2004): A model to describe ruminal metabolism and intestinal absorption of long chain fatty acids. Anim. Feed Sci. Technol. 112, 79–105
- 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
- NISBET, D.J., MARTIN, S.A. (1991): Effect of a *Saccharomyces cerevisiae* culture on lactate utilization by the ruminal bacterium *Selenomonas ruminantium*. J Anim Sci 69, 4628–4633
- OBA, M., ALLEN, M.S. (2003): Effect of diet fermentability on efficiency of microbial nitrogen production in lactating dairy cows. J. Dairy Sci. 86, 195–207
- OFFNER, A., SAUVANT, D. (2004a): Prediction of *in vivo* starch digestion in cattle from *in situ* data. Anim. Feed Sci. Technol. 11, 41–56
- OFFNER, A., SAUFANT, D. (2004b): Comparative evaluation of the Molly, CNCPS, and LES rumen models. Anim. Feed Sci. Technol. 112, 107–130
- OUWERKERK, D.; KLIEVE, A.V. FORSTER, R.J. (2002): Enumeration of *Megasphaera elsdenii* in rumen contents by real-time Taq nuclease assay. J Appl Microbiol 92, 753–758
- ORPIN, C.G., JOBLIN, K.N. (1988): The rumen anaerobic fungi. In: The rumen microbial eco system. P.N. Hobson, ed. Elsevier Applied Science Publ. New York, p. 21–76
- OWENS, F.N., ECRIST, D.S. HILL, W.J., GILL, D.R. (1998): Acidosis in cattle: a review. J Anim Sci 76, 275–286

- PING, H., YOUNG, L.G., FORSBERG, C. (1992): Microbial transformation of deoxynivalenol (Vomitoxin). *Appl. Environ Microbiol.* 58, 3857–3863
- RAZZAZI, E., BÖHM, J., AHMED, K.E., CECON, B., RABUS, B. (2002): Investigation on the biogradability of mycotoxins nivalenol (NIV) and deoxynivalenol (DON) in a RUSITEC fermentor and their monitoring by HPLC/MS. *Mycotoxin Res.* 16, 4–14
- RIEMEIER, A., LEBZIEN, P., FLACHOWSKY, G. (2004): Influence of the Ruminant Nitrogen-Balance (RNB) on rumen fermentation, microbial protein synthesis, amount of utilisable crude protein and milk urea. *Proc. Soc. Nutr. Physiol.* 13, 36 (Abstr.)
- RIEMEIER, A., LEBZIEN, P., FLACHOWSKY, G. (2004): Influence of the ruminal N-balance on rumen metabolism. *J. Anim. Feed Sci.* 13, Suppl. 1 (im Druck)
- RODE, L.M., McALLISTER, T.A., CHENG K.-J. (1990): Microbial degradation of vitamin A in rumen fluid from steers fed concentrate, hay or straw diets. *Can. J. Anim. Sci.* 70: 227–233
- RODE, L.M., YANG, W.Z., BEAUCHEMIN, K.A. (1999): Fibrolytic enzyme supplements for dairy cows in early lactation. *J. Dairy Sci.* 82, 2121–2126
- SCHINGOETHE, D.J., STEGEMAN, G.A., TREACHERT, R.J. (1999): Response of lactating dairy cows to a cellulase and xylanase enzyme mixture applied to forages at the time of feeding. *J. Dairy Sci.* 82, 996–1003
- SCHWARZ, F. (2004): Mikrobiologie und Tierernährung – Herausforderungen aus der Sicht der Ernährung landwirtschaftlicher Nutztiere. 20. Hülensberger Gespräche, 9.–11.06.2004, Lübeck (im Druck)
- SCHWIEGER, F. TEBBE, C.C. (1998): A new approach to utilize PCR-single-strand conformation polymorphism for 16S rRNA gene-based microbial community analysis. *Appl Environ Microbiol* 64, 4870–4876
- SEFFNER, W., FLACHOWSKY, G. (1976): Zu den Spätveränderungen bei der Zerebralknekrose (CCN) des Rindes. *Arch. Exper. Vet. Med.* 30, 203–210
- SINCLAIR, L.A., GARNSWORTHY, P.C., NEWBOLD, J.R., BUTTERY, P.J. (1993): Effects of synchronizing the rate of dietary energy and nitrogen release on rumen fermentation and microbial protein synthesis in sheep. *J. Agric. Sci. Camb.* 120, 251–263
- SPANGHERO, M., GRUBER, L., STEFANON, B., SUSMEL, P. (1999): The estimation of the rumen rate of passage of dietary NDF from degradability and digestibility in cows. *Livest. Prod. Sci.* 60, 71–79
- STEMME, K. (2002): Untersuchungen zur Cobaltversorgung von Milchkühen. Diss. Tierärztliche Hochschule Hannover, 160 S.
- STEWART, C.S., FEVRE, M., PRINS, R.A. (1995): Factors affecting fermentation and polymer degradation by anaerobic fungi and the potential for manipulation of rumen function. *Proc. 8<sup>th</sup> Int. Symp. on Ruminant Physiology*, Enke Verlag 251–270
- STROBEL, E.; WESOLOWSKI, J., FLACHOWSKY, G. TEBBE, C.C. (2004): Genetic profiles of rumen communities: A cultivation independent technique to study the effect of feeding. *Proc Soc Nutr Physiol* 13, 81
- SUTTON, J.D., PHIPPS, R.H., BEEVER, D.E., HUMPHRIES, D.J., HARTNELL, G.F., VICINI, J.L., HARD, D.L. (2002): Effect of method of application of a fibrolytic enzyme product on digestive processes and milk production in Holstein-Friesian cows. *J. Dairy Sci.* 86, 546–556
- SÜDEKUM, K.-H. (2004): Einflüsse von Fütterungsgestaltung und Fütterungsmanagement auf die Lebensbedingungen der Pansenflora. 20. Hülensberger Gespräche, 9.–11.06.2004, Lübeck (im Druck)
- TAJIMA, K., AMINOV, R.I., NAGAMINE, T., MATSUI, H., NAKAMURA, M., BENNO, Y. (2001): Diet-dependent shifts in the bacterial population of the rumen revealed with real time PCR. *Appl Environ Microbiol* 67 (6), 2766–2774
- Van SOEST, P.J. (1994): Nutritional ecology of the ruminant. Cornell Univ. Press (2nd ed.), 476 p.
- VICINI, J.L., BATEMAN, H.G., BHAT, M.K., CLARK, J.H., ERDMAN, R.A., PHIPPS, R.H., VAN AMBURGH, M.E., HARTNELL, G.F., HINTZ, R.L., HARD, D.L. (2002): Effect of feeding supplemental fibrolytic enzymes or soluble sugars with malic acid on milk production. *J. Dairy Sci.* 86, 576–585
- WAGNER, K., Karen AULRICH, P.LEBZIEN and G. FLACHOWSKY (1998). Research Note: Effect of duodenal-infused unsaturated fatty acids on dairy milk composition. *Arch. Anim. Nutr.* 51, 349–354.
- WAGNER, K., D. KAMPF, P. LEBZIEN, W. HOFFMANN, W. BUCHHEIM and G. FLACHOWSKY (1999): Einfluss einer duodenalen Infusion von Transferfettsäuregemischen auf Inhaltsstoffe der Kuhmilch. *Proc. Milchkonferenz 1999*, Dt. Ges. Milchwiss.
- WEIMER, P.J. (1998): Manipulating ruminal fermentation: A microbial ecological perspective. *J. Anim. Sci.* 76, 3114–3122
- WHITFORD, M. F.; TEATHER, R.M., FORSTER, R.J. (2001): Phylogenetic analysis of methanogenes from the bovine rumen. *BMC Microbiology* 1,5–9
- WIRYAWAN, K.G., BROOKER, J.D. (1995): Probiotic control of lactate accumulation in acutely grain-fed sheep. *Austr J Agri Res* 46, 1555–1568
- YANG, W.Z., BEAUCHEMIN, K.A., RODE, L.M. (1999): Effects of an enzyme feed additive on extent of digestion and milk production of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82, 391–403
- YANG, W.Z., BEAUCHEMIN, K.A., RODE, L.M. (2000): A comparison of methods of adding fibrolytic enzymes to lactating cow diets. *J. Dairy Sci.* 83, 2512–2520
- YANG, W.Z., BEAUCHEMIN, K.A., VEDRES, D.D., GHORBANI, G.R., COLOMBATTO, D., MORGAVI, D.P. (2004): Effects of direct-fed microbial supplementation on ruminal acidosis, digestibility, and bacterial protein synthesis in continuous culture. *Anim. Feed Sci. Technol.* 114, 179–193
- YATES, C.M., MILLS, J., FRANCE, J., CAMELL, S.B., BEEVER, D.E. (2001): Development of strategies to provide cost effective means of reducing emissions from dairy cows. *EAAAP-Publ.* 103, Energy metabolism in animals, 201–204

## Diskussion



### WOLFRAM

Sie haben mehrfach erwähnt, dass, wenn im Pansen das nicht ausreichend abgebaut wird, in den weiter distal gelegenen Abschnitten so gut wie nichts mehr geht. Ich möchte Sie fragen nach Ihrer Einschätzung zum Fermentationspotenzial im Dickdarmbereich beim Wiederkäuer, auch im Hinblick, dass Stärke, die vorher nicht verdaut wird, als Energiesubstrat für Fermentationsprozesse im Dickdarm die Sache dort doch wesentlich effizienter gestalten kann. Der Wiederkäuer hat durch seine Spezialisierung das Vorbrennerprinzip mit seinen Vormägen. Aber es gibt auch sehr erfolgreiche Pflanzenfresser mit dem Nachbrennerprinzip, z. B. das Pferd, und der Wiederkäuer hat im Dickdarm meiner Ansicht nach auch noch eine ganz ordentliche Kapazität, zu fermentieren.

### FLACHOWSKY

Wir haben bei diesen energetischen Kalkulationen das Potenzial im Dickdarm mit berücksichtigt. Die Dinge beruhen auch auf eigenen Messungen, wo wir in den Faeces Stärke mit gemessen haben. Wir haben teilweise bis zu 4,5 kg Stärke durch den Pansen gebracht bei 10–12 kg Maisaufnahme oder noch mehr. Da kam dann eben durchaus noch über 1 kg an, und wenn ich mal das alles unterstelle, was wir den einzelnen Segmenten zuordnen können, dann bleibt da Einiges übrig. Wenn die Tiere 25 oder 30 kg Trockenmasse fressen, dann geht das auch relativ schnell durch. Fermentation im Dickdarm findet statt, aber unbedeutend im Vergleich zum Pansen. Deshalb die-

ser prinzipielle Wunsch, es sollte so viel wie möglich dort verfügbar sein, wird auch absorbiert, vor allem die kleineren Moleküle, bei Aminosäuren bin ich mir da nicht so sicher. Besonders beim Pferd konnte ja gezeigt werden, dass keine Aminosäure mehr absorbiert wird, aber Fettsäuren werden natürlich absorbiert.

### BREVES

Das Einbringen von Mikroorganismen mit bestimmten Funktionen in das Vormagensystem ist ja nun seit Jahrzehnten schon verfolgt worden. Ich denke an Lignozellulose-Verdauung, z. B. aus den 80er Jahren. Die acetogenen Bakterien, die man im Zusammenhang mit der Reduzierung des Methan-Outputs gerne einsetzen möchte, die man ja im Dickdarm identifiziert hat und die aus irgendwelchen Gründen im Pansen nicht sind. Was wissen wir eigentlich über die Mechanismen, warum solche spezifisch in das Vormagensystem eingebrachten Mikroorganismen dort nicht überleben können? Es gibt viele Ansätze, keine nachvollziehbare Erklärung, wie man sich diesen Mechanismus vorstellen kann.

Als Anmerkung auch zu dem, was Herr Wolfram gesagt hat, bezüglich der Kohlenhydratfermentation im Dickdarm. Ich meine, aus den Transportmechanismen für die kurzkettigen Fettsäuren ist ja überhaupt keine Limitierung da, auch gerade beim großen Wiederkäuer nicht, wenn wir an diesen sehr flüssigen Dickdarminhalt über einen ganz langen Dickdarm-Abschnitt denken. Da steckt sehr viel Potenzial drin.

FLACHOWSKY

Zur Frage nach den Mechanismen komme ich auf das Beispiel zurück. Warum siedelt der, warum überlebt der, warum findet der eine Nische? Der hat wahrscheinlich keinen Konkurrenten. Der stürzt sich auf Substrate, die die anderen nicht mögen. Es sind ja im Vergleich zu den vorhandenen Mengen an Mikroorganismen im Pansen relativ kleine Mengen, die wir da zusetzen. Bei diesem großen Übergewicht von den vorhandenen und über Jahrmillionen optimierten Mikroorganismen hat ein Fremdhinzukömmling es extrem schwer.

STEINHART

Ich möchte auf einen Aspekt nochmal zu sprechen kommen hinsichtlich dieser Transfettsäuren und konjugierten Fettsäuren. Es ist aus amerikanischen Versuchen bekannt, dass CLA, wenn die also zugegeben werden, eine Depression im Fettgehalt bewirken. Jetzt, wenn ich das noch in Erinnerung habe, war das trans-9,cis-11 und cis-10,trans-12, was Du da zugegeben hast, und da kam diese Depression im Fettsäuregehalt. Publikationen der letzten Zeit weisen aus, dass der Ausdruck CLA etwas irreführend ist und dass man in Einzelisomere hineingehen muss, da einzelne Isomere sich völlig anders verhalten. Gibt es da schon irgendeine Erklärung, dass bei trans-10,cis-12 eine Depression im Fettgehalt eintritt?

Auf der anderen Seite ist trans-10,cis-12 eines der Hauptisomere, aber im Metabolismus macht das nicht viel. Da gibt es andere, die sehr viel aktiver sind.

Das Thema Transfettsäuren wird ja sogar jetzt gesetzlich geregelt, unsinnigerweise, muss ich dazu sagen, weil man noch viel zu wenig Erfahrung hat, um da schon Gesetze machen zu können. Aber der Zusammenhang mit den Pansenmikroorganismen scheint mir ein interessanter Effekt zu sein, weil der auch in die Richtung »functional food« führt.

FLACHOWSKY

Wir hatten damals, 1996, mit Herrn Wagner angefangen und haben diesen Effekt gehabt. Nun fragt

man sich natürlich, was ist das? Verschiedene Autoren, u.a. Jareis oder Kreuzer begründen den Effekt mit niedrigem pH-Wert im Pansen, der verstärkte Bildung von Transfettsäuren bewirken soll. Daraufhin haben wir das, was wir über das Futter gegeben haben, duodenal infundiert, und da passierte gar nichts. Da hatten wir sogar exzellente Transferraten dieser Fettsäuren. Dann haben wir mit Herrn Jareis diesen Versuch gemeinsam gemacht, wo wir die CLA duodenal infundiert haben, und da kam das raus. Es gibt vorsichtige Ansätze, dass die Konfiguration, der Aufbau dieser Fettsäuren und auch der Einbau, dazu beitragen, dass die Fette, das Glycerin, nicht mehr vollständig praktisch abgebunden wird. Das wäre vielleicht ein Ansatz, also man kann das reproduzieren, indem man bestimmte Sachen duodenal infundiert, und ich stimme auch zu, dass CLA nicht gleich CLA ist. Es kommt hinzu, was als 10,12 angeboten wird, da sind noch andere Kongenere mit drin. Das ist das nächste Problem.

KALM

Sie haben die Passagerate so herausgestellt, und dass die einen großen Einfluss hat. Kann man die verändern, züchterisch-genetisch? Könnte man die gut messen?

FLACHOWSKY

Das ist für Züchter eine sehr interessante Sache, denn Passagerate und Futteraufnahme sind eng korreliert. Je schneller das Material passiert, umso mehr kann Neues nachrutschen, salopp gesagt.

KALM

Wer steuert die Passagerate?

FLACHOWSKY

Das ist ein sehr komplexes Geschehen. Sicherlich wurde auch über die Züchtungsergebnisse der letzten Jahrzehnte dazu beigetragen, dass die Tiere höhere Futteraufnahmen haben. Das sind verschiedene Prinzipien, auf der einen Seite die Zerkleinerung der Partikel, die müssen ja passieren. Das Wiederkauen

wird teilweise auch auf Zerkleinerung eingestellt. Aber was ist primär, ob nun im Ergebnis bei hoher Futteraufnahme das Material schneller passiert, oder ob bestimmte Änderungen im Ablauf dann in Wechselwirkung treten?

SCHWERIN

Sie haben die große Heterogenität der Zusammensetzung der Mikroorganismen-Population zwischen den einzelnen Tieren dargestellt. Gibt es auch Erkenntnisse darüber, inwieweit die Mikroorganismen-Populationen abhängig sind von der Diätgabe oder von der Futtergabe, und wie weit spielt die Individualität der Tiere dort eine Rolle in der Reaktion auf solche unterschiedlichen Diäten?

FLACHOWSKY

Sie wollen schon mehr wissen, als wir beantworten können. Wir sind ganz am Anfang, weil, wir sehen das als einen Ansatz mit, um Dinge zu erklären, und haben zunächst die Methode etabliert, und das sind die nächsten Schritte, was kann man erwarten, welchen Einfluss kann die Diätgestaltung haben? Es ist ja relativ wenig vorhanden auf dem Feld, aber wir waren überrascht, bei den Rindern ist ja zumindest noch zwischen den Probenahmen-Stellen eine recht gute Übereinstimmung, aber beim Schaf geht es durcheinander an verschiedenen Orten im Panseninhalt zur gleichen Zeit.

GÄBEL

Sie haben sehr stark abgehoben auf die Pilze. Sie haben gesagt, das ist praktisch die Zukunft. Ist es denn tatsächlich so, dass für den Abschluss der Zellwandbestandteile die Pilze eine *Conditio sine qua non* sind. Ein anderer Ansatz wäre ja auch, da wo keine Pilze sind, wird deren Platz durch die zellolytischen Bakterien übernommen.

Und das Zweite ist, wie stark ist es denn ausgeprägt mit der pH-Sensitivität der Pilze? Meines Wissens sind sie ja Indikator-Organismen, die am ehesten

kaputt gehen, wenn es sauer wird. Also, es gibt ja auch ein paar Schwierigkeiten, diesen Ansatz weiter zu verfolgen.

FLACHOWSKY

Ich stimme Ihnen vollkommen zu. Unter unseren Bedingungen, Trockenmasseaufnahme 25–30 Kilo, haben die anderen Fungi keine Chance. Die Arbeiten, vor allem von Gordon in Australien, oder auch von einigen Gruppen in den USA, haben einen anderen Hintergrund. Dort geht es um zellwandreiche Ernährung, wo auch Passageraten von 2–3 %, wo ganz andere Zeiten vorhanden sind, dass die Pilze siedeln können, und dass die auch ihre Hyphen hineintreiben können. Ich glaube nicht, dass die Bakterien das ersetzen können, weil sie immer an der Oberfläche haften. Durch dieses Hineintreiben der Hyphen unter Sezernierung einer alkalischen Peroxidase, pH 11, ist wirklich eine richtige Aufschließung, Auflockerung möglich. Bei Wiederkäuern, die 5 kg Stroh und Graslandfutter aufnehmen, wird dieses gelockerte Material durch dieses Mahlen beim Wiederkauen von kristalliner in amorphe Struktur überführt, und das mikrobielle Attachment der zellolytischen Bakterien wird deutlich verbessert. Die Australier haben für solche Typen, für solche Rationsgestaltung Fungi schon im Angebot, was sie als eine Art Probiotika anbieten. Also, das ist nichts für uns und nicht für so eine 50 Liter-Milchkuh, weil die Zeit überhaupt nicht ausreicht. Ehe die Pilze siedeln würden, ist das Futter schon weg.

KALM

Herr Flachowsky, da ist noch ein enormer Forschungsbedarf. Wie ich das eben herausgehört habe, die individuellen Unterschiede sind noch da, wenn wir 10.000 Liter-Kühe haben, dann müssen die nicht alle die gleichen Pansenbakterien haben. Die können vielleicht noch recht unterschiedlich sein. Das ist noch gar nicht in dem Sinne systematisch untersucht, zumindest, wenn man die noch beeinflussen möchte.

# Pro- und Prä- und Synbiotika in der Humanernährung



## 1 Einleitung

Im Jahre 1907 veröffentlichte E. Metchnikoff die Theorie, dass der Mensch durch den Konsum großer Mengen an Sauermilch oder Joghurt seine Lebensspanne deutlich verlängern könne, wodurch der intellektuelle Ursprung für eine Probiotic gelegt wurde. Er war der Ansicht, dass die Milchsäurebakterien aus solchen Produkten sich im Darm des Essers vermehren, wodurch gefährliche Bakterien in ihrer Teilung gehemmt werden sollten und den Konsumenten Gesundheit und Langlebigkeit verliehen werden sollte. Dieser Vorstellung widerspricht aber die Tatsache, dass die für die Joghurtherstellung verwendeten Stämme von *Streptococcus thermophilus* und *Lactobacillus delbrückii* ssp. *bulgaricus* die Magenpassage nicht überleben und so den Darm nicht besiedeln können.

Nach Havenaar et al. (1992) werden Probiotika wie folgt definiert: »Eine Reinkultur oder Mischkultur, die bei Anwendung auf Menschen oder Tiere – in Form dehydratisierter Zellen oder als fermentiertes Produkt – den Wirt durch die Verbesserung der Eigenschaften (und der Stabilität) der vorhandenen Mikroflora vorteilhaft beeinflusst.«

Seit Mitte der 90iger Jahre wurden probiotische Joghurts eingeführt und erreichten bis zum Jahre 1998 einen beeindruckenden Umsatz von 2 Milliarden US-Dollar auf dem europäischen Markt.

## 2 Der Gastrointestinaltrakt

Betrachtet man die mikrobielle Zusammensetzung

des Gastrointestinaltraktes (Abb. 1), so beträgt die Gesamtkeimzahl  $10^{14}$  Zellen bei ungefähr 400 verschiedenen Spezies. Diese Gesamtkeimzahl wirkt insofern sehr beeindruckend, da die Gesamtzahl der eukaryotischen Körperzellen  $10^{13}$  Zellen beträgt.

Im Ösophagus lassen sich die Bakterien der aufgenommenen Nahrung nachweisen. Im Magen beträgt die Anzahl der Kolonie bildenden Einheiten  $10^0 - 10^3$  pro mL. Im Duodenum und Jejunum lassen sich  $10^2 - 10^5$  KBE / mL nachweisen. Im Ileum und Caecum steigt die Zellzahl dann auf  $10^3 - 10^9$  KBE / mL an, um im Colon schließlich  $10^{10} - 10^{12}$  KBE / g zu erreichen.

Abbildung 1



Während des ersten Lebensjahres stabilisiert sich die intestinale Mikroflora und nimmt dann allmählich die Zusammensetzung wie bei Erwachsenen an (Abb. 2). Interessant ist dabei, dass nur bei brustgenährten Säuglingen ab dem Beginn des Stillens die Bifidobakterien bis zu 90% der bakteriellen Flora ausmachen. Dieses Überwiegen der Bifidobakterien wird durch Oligosaccharide aus der Muttermilch, zu denen auch N-Acetylglucosamin gehört, verursacht und führt durch den Stoffwechsel der Bifidobakterien zu einer ausgeprägten Ansäuerung, was die Vermehrung von pathogenen Bakterien verhindert. Des Weiteren bilden *Bifidobacterium* spp. kein Gas, was dazu führt, dass die Säuglinge weniger Blähungen haben. Mit zunehmendem Alter verschiebt sich das mikrobielle Spektrum und die Stoffwechselaktivitäten im Darm. Bei älteren Menschen wird die Konzentration an Bifidobakterien reduziert, wohingegen zum Beispiel die Konzentration an *Clostridium perfringens* stark ansteigt, was auf mehrere Faktoren wie beispielsweise veränderte Essgewohnheiten zurückzuführen ist (Kasper 2001).

Die Physiologie des Intestinaltraktes und die Abwehrmechanismen des Wirtes haben einen entscheidenden Einfluss auf die letztendliche Zusammen-

setzung der Darmflora des Wirtes und auf die Verhinderung einer Überwucherung der wirtseigenen Mikroflora durch schädliche Mikroorganismen. Die hauptsächlichen Faktoren, die die Zusammensetzung der Darmflora beeinflussen sind in der Tabelle 1 dargestellt. Diese Faktoren haben Bezüge zu Veränderungen der physiologischen Umstände des Wirtes (Alterung, Stress, Gesundheitszustand, ethnische Umgebung), Zusammensetzung der Nahrung und Umwelteinflüsse (Kontamination mit Pathogenen, Einnahme von Medikamenten). In dieser Weise werden die Bedingungen, denen die Verdauung unterliegt (z. B.: pH, Substratverfügbarkeit, Redoxpotential, Verweilzeit, Ausschüttung von Verdauungssäften, IgA-Sekretion), beeinflusst. Diese Einflüsse können zu einer Abnahme von »gewünschten« Mikroorganismen und zu einer Zunahme schädlicher Mikroorganismen führen. Veränderungen der Kost oder des Klimas, Alterung, Krankheit, Behandlung mit Medikamenten, Stress oder Infektionen führen allgemein zu einem Anstieg von Anaerobiern und *Escherichia coli* im Dünndarm und zu einem Anstieg von *Enterobacteriaceae* und Streptokokken unter gleichzeitiger Abnahme von Bifidobakterien im Dickdarm (Holzapfel et al. 1998).

Abbildung 2

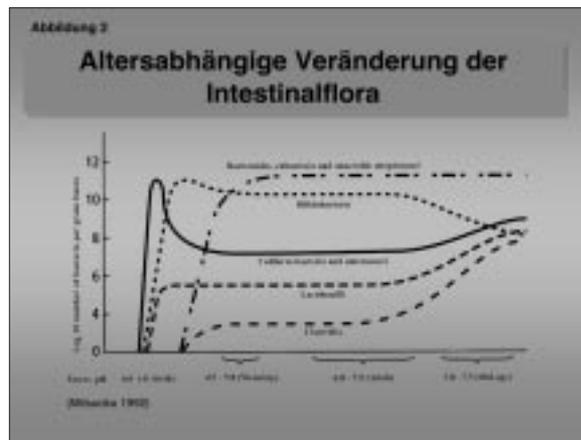


Tabelle 1

Einflussfaktoren auf die Darmflora	
<b>Wirtsfaktoren</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>pH, Salinität von Gallensäure, Enzyme, Immunoglobuline</li> <li>Antibiotika, z.B. Penicilline</li> <li>Physiologischer Magen-Darm-Trakt, z.B. Rhythmus der Motilität</li> <li>Alkoholische Ethanol, Nikotin</li> </ul>	<b>Mikrobielle Interaktionen</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Synergie</li> <li>Mutualistische Koordination</li> <li>Quorum-sensing, Quorum-sensing</li> <li>Änderung des Redoxpotentials, pH</li> <li>Anpassungsreaktion</li> <li>Kurzlebigkeit Pathogenen, Antikörper</li> <li>Änderung des Redoxpotentials, pH</li> <li>Bifidobakterien, z.B.</li> </ul>
<b>Mikrobielle Faktoren</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Adhäsion</li> <li>Motilität</li> <li>Anpassungsreaktion an Nährstoffe</li> <li>Sporenbildung, Kapselbildung, Antikörper</li> <li>Quorum-sensing</li> <li>Quorum-sensing</li> </ul>	<b>Nahrung</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Zusammensetzung der Nahrung</li> <li>Unverdauliche Nahrungskomponenten, z.B. Ballaststoffe</li> <li>Antikörper, z.B.</li> </ul>

Man nimmt an, dass die Populationsgröße jeder einzelnen Spezies durch die Konkurrenz um Nährstoffe stark reguliert wird. Die Anzahl potentieller Krankheitserreger kann so in Grenzen gehalten werden und neu eingeführte Keime können nur schwer Fuß fassen. Diese Funktion der normalen Darmflora wird als Kolonisierungsresistenz bezeichnet.

Mikrobielle Interaktionen haben eine regulative Bedeutung für die Entstehung, Entwicklung und Erhaltung der normalen Darmflora. Sie sind zugleich auch die Mechanismen, die das Wachstum fremder Mikroorganismen begrenzen oder verhindern. Dazu können sowohl synergistische als auch antagonistische Beziehungen beitragen, wobei durch metabolische Kooperation, Bildung von Wachstumsfaktoren und Vitaminen, Änderungen des Redoxpotentials und pH das gemeinsame Wachstum gefördert wird. Das bekannteste Beispiel ist das gemeinsame Wachstum von Aerobiern und Anaerobiern bei der wandständigen Darmflora. Insbesondere spielt die Adhäsion eine dominierende Rolle für die Art der Mikroorganismen am jeweiligen Standort sowie auch die Bildung von antimikrobiellen Substanzen wie Bacteriocinen. Aufgrund von wissenschaftlichen Erkenntnissen über die funktionellen Eigenschaften der Darmflora und ihrer

Auswirkungen auf die menschliche Ernährung und möglicherweise auch auf die Gesundheit besteht gegenwärtig verstärktes Interesse daran die Anzahl und Aktivität von gewünschten »guten« Mikroorganismen im Darm, möglichst auf Kosten von potentiellen Krankheitserregern, zu erhöhen und dadurch das gesundheitsfördernde Potential zu erhöhen. Besonderes Interesse gilt dabei den »günstig wirkenden« *Lactobacillus* spp. und *Bifidobacterium* spp., die direkt als lebende Mikroorganismen und/oder indirekt durch bestimmte Ernährungsmaßnahmen in ihrem Wachstum gefördert werden sollen (Großklaus 1999).

### 3 Angenommene Wirkungen von Probiotika

Die folgenden Wirkungen werden den Probiotika zugeschrieben (Tabelle 2): Bessere Verträglichkeit bei Lactoseintoleranz, geringere Durchfallhäufigkeit, Immunmodulation, Absenkung krebsfördernder Enzyme im Colon, Einstellung eines mikrobiellen Gleichgewichtes im Darm, Mobilitätsregulierung bei Obstipation, Senkung des Cholesterinspiegels und eine verbesserte Mineralresorption.

Bei Lactoseintoleranz (Milchzuckerunverträglichkeit) wird das Vorhandensein von  $\beta$ -Galactosidase als Vorteil der Probiotika angesehen (Goldin 1998). Dieses trifft aber nicht in allen Fällen zu, da *Lactobacillus casei* gar keine  $\beta$ -Galactosidase besitzt. Andererseits wird die  $\beta$ -Galactosidase aber auch von den Stämmen, die in herkömmlichen Joghurts vorhanden sind, exprimiert, so dass für diesen Effekt keine speziellen probiotischen Mikroorganismen zu den Joghurts zugesetzt werden müssen.

Zahlreiche probiotische Mikroorganismen besitzen die Fähigkeit, die Schwere und Dauer bestimmter Durchfallerkrankungen günstig zu beeinflussen (Marteau et al. 1998). So gilt der positive Einfluss probiotischer Mikroorganismen auf Durchfallerkrankungen bei Kindern, die durch Rotaviren hervorgerufen werden, als auch auf Durchfallerkrankungen nach Breitbandantibiotikabehandlung, die durch *Clostridium* sp. verursacht werden, als gesichert. Weniger gut belegt ist die Wirksamkeit von Probiotika bei Reisedurchfällen. Verschiedene Probiotikapräparate waren

Tabelle 2

Tabelle 2	
Wirkungen von Probiotika	
•	Bessere Verträglichkeit der Lactoseintoleranz
•	Geringere Durchfallhäufigkeit
•	Immunmodulation
•	Senkung krebsfördernder Enzyme im Colon
•	Einstellung eines mikrobiellen Gleichgewichtes im Darm
•	Mobilitätsregulierung bei Obstipation
•	Stärkung des Immunsystems
•	Senkung des Cholesterinspiegels
•	Verbesserte Mineralresorption

teils ohne Effekt, teils reduzierten sie signifikant die Diarrhoehäufigkeit (Black et al. 1989; Oksanen et al. 1990).

Probiotische Mikroorganismen können verschiedene immunologische Parameter beeinflussen. Diese Fähigkeit ist aber nicht auf probiotische Mikroorganismen beschränkt, da sie auch für konventionelle Starterkulturen gezeigt werden konnte. In klinischen Versuchen an Menschen konnte sowohl die Zunahme einer nicht spezifischen Phagozytoseaktivität der Leukozyten als auch eine Verstärkung der spezifischen humoralen Immunantwort (sIgA) gezeigt werden. Das Zusammenwirken der verschiedenen Komponenten des Immunsystems und deren Regulation sind jedoch sehr komplex, so dass die Immunmodulation einzelner Parameter nicht automatisch mit einer Stärkung des Immunsystems gleichgesetzt werden kann (Großklaus 1999).

In Untersuchungen an Menschen konnte wiederholt gezeigt werden, dass nach oraler Gabe von *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus GG* und *Lactobacillus acidophilus* die Aktivität der Nitroreduktase, der  $\beta$ -Glucuronidase und der Azoreduktase im Stuhl signifikant abnahmen, während *Lactobacillus bulgaricus* und *Streptococcus thermophilus* keinen Einfluss zeigten. In mehreren epidemiologischen Studien konnte gezeigt werden, dass Ernährungsformen, die mit einem hohen Krebsrisiko verbunden sind, die Aktivität der genannten Enzyme im Stuhl erhöhen, es liegen aber keine zuverlässigen epidemiologischen Studien vor, die entsprechende Aussagen zur Verringerung des Risikos an Kolon- oder Brustkrebs zu erkranken, rechtfertigen würden (Großklaus 1999).

Jeder Mensch hat eine individuelle äußerst komplexe Darmflora, die taxonomisch noch nicht ausreichend charakterisiert ist (Teuber 1998). Jeder Abschnitt des Verdauungssystems hat seine eigene spezifisch angepasste Mikroflora, deren Zusammensetzung und Populationsdichte zwar langfristig stabil, aber kurzfristig erheblichen Fluktuationen unterworfen sein kann. Stuhlproben zeigen oft nur Zufallsbefunde und die Konzentration einzelner Bakterienstämme im Dickdarm kann oft um einen Faktor 100 variieren.

Viele Arten der Darmflora sind bisher im Labor noch nicht züchtbar und sind mit konventionellen Methoden nicht nachweisbar. Deshalb sind Aussagen über die Einstellung eines mikrobiellen »Gleichgewichtes« im Darm wertlos. Bei gesunden Probanden lässt sich lediglich das Risiko von Störungen dieses Gleichgewichtes durch äußere Einflüsse verringern. Die transiente Beeinflussung der Dickdarmflora beim Verzehr von probiotischen Lebensmitteln und die Unterdrückung unerwünschter Keime gilt in vielen Definitionen von Probiotika als Voraussetzung und ist inzwischen auch gut belegt. Der Nachweis erniedrigter Keimzahlen von *E. coli* oder *Clostridium* sp. ist aber kein hinreichendes Kriterium für einen gesundheitsfördernden Effekt, sondern eine Voraussetzung (De Vreese und Schrezenmeier 2000).

Aussagen über eine Mobilitätsregulierung bei Obstipation beruhen auf persönlichen Berichten und nicht auf kontrollierten klinischen Studien. Die anti-diarrhoeische Wirkung von Probiotika beruht auf der Bekämpfung der Durchfallursache, demgegenüber sind die Mechanismen, die eine Beschleunigung der Darmtätigkeit verursachen könnten, noch unbekannt (Yaeshima et al. 1997).

Wie oben bereits erwähnt, kann die Immunmodulation einzelner Parameter nicht automatisch mit einer Stärkung des Immunsystems gleichgesetzt werden (Großklaus 1999).

Die cholesterinsenkende Wirkung von probiotischen fermentierten Milchprodukten wird seit den Arbeiten von Mann und Spoerry (1974) und Mann (1977) angeführt. Dabei ist aber zu kritisieren, dass den untersuchten Massaikriegern extrem hohe Joghurtdosen von bis zu 8,3 L (5500 kcal) pro Tag verabreicht wurden und dass die Massaikrieger gleichzeitig ein Trainingsprogramm aufnehmen mussten, um nicht zuzunehmen. Bei einigen späteren Untersuchungen wurde eine signifikante Senkung des Gesamt-Cholesterinspiegels beobachtet, während bei anderen Untersuchungen nur kurzfristige vorübergehende Effekte festgestellt wurden (Großklaus 1999). In vitro konnte mit *L. acidophilus*-Stämmen eine cholesterinsenkende Wirkung gezeigt werden. Ob auch in vivo



## 5 Kriterien zur Stammauswahl

### 5.1 Gesundheitliche Unbedenklichkeit

Viele der verwendeten Milchsäurebakterien gelten auf Grund der langjährigen Erfahrungen mit ihnen als gesundheitlich unbedenklich und sicher und haben in den USA den »GRAS«-Status (Generally recognized as safe). Bei der Verwendung von neuen Spezies in Lebensmitteln muss die gesundheitliche Unbedenklichkeit auf jeden Fall eindeutig nachgewiesen werden. Dazu gehört der Ausschluss von Nebenwirkungen, d.h. dürfen die Stämme nicht pathogen und für den Menschen nicht toxisch sein. Das gilt vor allem für Menschen mit einer reduzierten Abwehrlage. Allerdings konnte bisher in keinem Falle eine Infektion durch den Verzehr von Lebensmitteln, die durch Fermentation mit Milchsäurebakterien hergestellt worden waren, nachgewiesen werden. Bei der Auswahl von neuen probiotischen Mikroorganismen muss eine Reihe von unerwünschten Stoffwechselaktivitäten ausgeschlossen werden (Tabelle 5). Das gilt für die Befähigung biogene Amine zu bilden, was eine große Anzahl von bestimmten Milchsäurebakterien leisten kann. Die Dekonjugation oder Dehydroxylierung von Gallensalzen sowie die Aktivität bestimmter Enzyme (Azoreduktase, Nitroreduktase,

$\beta$ -Glucuronidase) stehen im Zusammenhang mit einer tumorfördernden Wirkung. Der Mucinabbau durch bestimmte Bifidobakterien setzt das Darmepithel dem unmittelbaren Angriff durch pathogene Bakterien aus, konnte aber bei *Lactobacillus* spp. nie gefunden werden. Des Weiteren muss die Übertragung von Antibiotikaresistenzen ausgeschlossen werden (Großklaus 1999).

### 5.2 Probiotische Funktion

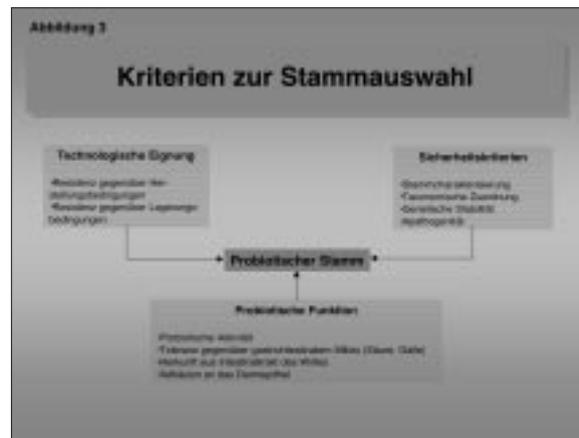
Ein Stamm, der zum Einsatz in einem probiotischen Lebensmittel in Betracht gezogen wird (Abb. 3), sollte natürlich probiotische Aktivitäten aufweisen. Er sollte gegenüber Magen-, Galle- und Verdauungssäften resistent sein. Die Überlebenszeit eines Mikroorganismus ist stammspezifisch, aber auch vom gesamten Nahrungsbrei abhängig. So ist z.B. in Milch die Magen-Darm-Passage günstiger. *Lactobacillus bulgaricus* wird durch Gallensalze abgetötet. Auch *Streptococcus thermophilus* überlebt die Passage nicht. Ein Vergleich der Überlebensfähigkeit von *Lactobacillus delbrückii* ssp. *bulgaricus* mit *Lactobacillus acidophilus* und *Lactobacillus johnsonii* wird in der Abbildung 4 wiedergegeben. *L. bulgaricus* überlebt die Magenpassage nicht, *L. acidophilus* ist zwar etwas resistenter, aber wird

Tabelle 5

Tabelle 5	
Unerwünschte Stoffwechselaktivitäten	
-	Bildung von biogenen Aminen (insbesondere Tyramin, Histamin, Phenylethylamin)
-	Dekonjugation oder Dehydroxylierung von Gallensalzen
-	Aktivierung von Prokarcinogenen (mit Hilfe von Azoreduktase, Nitroreduktase, $\beta$ -Glucuronidase)
-	Induktion bzw. Abbau von Thrombin mit Hilfe spezifischer Hydrolasen
-	Aktivierung der Thrombozytenaggregation
-	Bindung an Fibrinogen und Fibrinester
-	Mucinabbau (wird in bestimmten Bifidobakterien nachgewiesen und kann als Voraussetzung zur Invasion der Keime gewertet werden)
-	Hämolytische Aktivität
-	Antibiotikaresistenzen

(Thomas 1998)

Abbildung 3



ebenfalls abgetötet. Nur der eingesetzte Stamm von *L. johnsonii* überlebt die Magen- und Duodenum-Passage, so dass ausgehend von  $10^8$  KBE/mL nach 4,5 Stunden noch  $10^7$  KBE/mL vorhanden sind und sich der Zelltitel nach 6 Stunden bei ca.  $5 \times 10^7$  stabilisiert.

Für *L. johnsonii* La1, der in dem fermentierten Milchprodukt LC1 eingesetzt wird, konnte gezeigt werden, dass der Zelltitel an lebensfähigen Zellen bei der Magen-Darmpassage nur um ein Drittel reduziert wird (Zink und Pfeifer 1999).

Die Mindestkeimzahl von lebenden Mikroorganismen im Lebensmittel ist im Hinblick auf eine angestrebte positive Wirkung im menschlichen Organismus von zentraler Bedeutung. Die Verabreichung von  $10^8$  KBE/mL *L. rhamnosus* GG führte zu einer signifikanten Abnahme von faekalen bakteriellen Enzymen, die an der Bildung von toxischen, mutagenen oder karzinogenen Metaboliten im Dickdarm beteiligt sind. Aber erst Gesamtzelltitel von  $10^{10}$  und  $10^{11}$  lebenden Zellen führten bei allen normalen, gesunden Probanden zu einer faekalen Kolonisierung, während ein Gesamtzelltitel von  $10^9$  lebenden Zellen bei 2 von 7 Probanden gelegentlich zu einer Kolonisierung führte. Unter Berücksichtigung der Mindesthaltbarkeitsfrist ist bei den meisten Produkten die Aufnahme

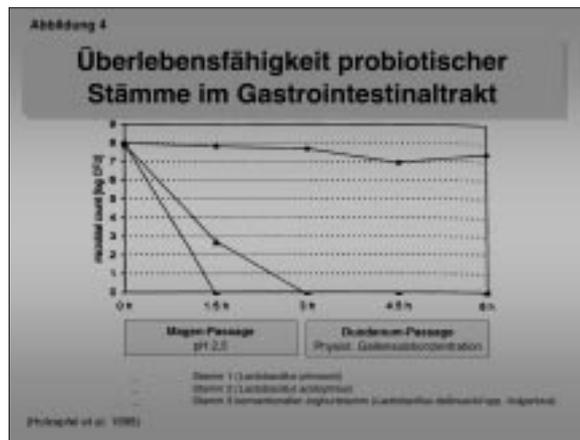
einer regelmässigen, meist täglichen Menge von  $10^8$  bis  $10^9$  lebenden Zellen erforderlich, um probiotische Wirkungen im menschlichen Körper zu entfalten (Großklaus 1999).

Optimalerweise sollte ein Stamm, der in einem probiotischen Lebensmittel eingesetzt werden soll, aus dem menschlichen Darm isoliert worden sein, um an das Darmmilieu möglichst gut angepasst zu sein.

Die Adhäsion probiotischer Stämme an humane Intestinalzellen und die darauf folgende Kolonisierung des menschlichen Gastrointestinaltraktes wurde als eine wichtige Voraussetzung für probiotische Wirkungen proklamiert. Die Adhäsion führt zu einer Interaktion mit der Mukosaoberfläche und erleichtert den Kontakt mit dem darmassoziierten Immunsystem, wodurch lokale und systemische Immuneffekte hervorgerufen werden können. Untersuchungen im Rahmen eines Forschungsprogramms in Skandinavien zeigten bei in-vitro Testsystemen deutliche Unterschiede in der Adhäsionsfähigkeit unterschiedlicher Stämme, die aber auch vom jeweils verwendeten Testsystem abhängig waren (Toba et al. 1995, Westerland und Korhonen 1993).

Es wurde offensichtlich, dass zusätzlich zu Experimenten mit Caco-2 Zelllinien andere Testsysteme zur Charakterisierung des Adhäsionspotentials und der verschiedenen Adhäsionsmechanismen notwendig sind. Bei den meisten Kolonisierungsstudien mit probiotischen Bakterien wurden Stuhlproben untersucht. Diese geben jedoch nur die bakterielle Situation in der Masse des Stuhls wieder und machen keinerlei Aussage über die Situation an unterschiedlichen Orten des Gastrointestinaltraktes oder über die Besiedlung der Darmmukosa. Vorteile liegen in der Untersuchung von Biopsiematerial von Klostropatienten: auf diese Weise konnte Biopsiematerial von unterschiedlichen Orten des Dickdarms gewonnen werden. Es konnte gezeigt werden, dass Zellen des kommerziellen probiotischen Stammes *Lactobacillus rhamnosus* GG im Epithel der Dickdarmmukosa mehrere Tage nach der Beendigung des Konsums des probiotischen Lebensmittels überleben konnten und zwar sogar dann noch, als der Stamm nicht län-

Abbildung 4



ger in den Stuhlproben nachgewiesen werden konnte (Alander et al. 1997).

### 5.3 Technologische Eignung

Die Notwendigkeit probiotisch interessante Stämme im technischen Maßstab herzustellen, hat für den Produzenten wichtige praktische Konsequenzen. Die Stämme sollten an ein geeignetes Trägermaterial oder fermentierbares Substrat (z.B. Milch) angepasst sein und das fertige Produkt sollte eine akzeptable Haltbarkeit und sensorische Eigenschaften, wie Farbe, Geschmack, Aroma und Textur, aufweisen. Probiotische Stämme, die in einem Produkt ausgewiesen werden, sollten in ausreichend hohen Lebendzellzahlen vorhanden sein und in ihrer Stoffwechselaktivität auch über das ausgewiesene Mindesthaltbarkeitsdatum hinaus ausreichend aktiv sein (Holzapfel et al. 1998).

### 5.4 Probiotische Produkte

Die Tabelle 6 gibt einen Überblick über verschiedene probiotische Produkte auf dem europäischen Markt.

### 5.5 Präbiotika

Präbiotika sind unverdauliche Nahrungsbestand-

teile, die den Wirt gesundheitsfördernd beeinflussen, indem sie das Wachstum und die Aktivität einer begrenzten Anzahl an Darmbakterien stimulieren (Gibson und Roberfroid 1995). Für eine präbiotische Substanz müssen verschiedene Voraussetzungen erfüllt sein. Sie sollte im oberen Teil des Gastrointestinaltrakts weder hydrolysiert noch absorbiert werden, so dass sie das Kolon erreicht. Hier stellt sie ein selektives Substrat für eine begrenzte Anzahl an gesundheitsfördernden Darmbakterien dar. Diese werden in Wachstum und Aktivität gefördert und verändern die Darmflora zu einer günstigeren Zusammensetzung, was die beschriebenen probiotischen Effekte verstärken kann (Collins und Gibson 1999, Kneifel 2000).

In Tabelle 7 sind einige kommerziell erhältliche präbiotische Produkte aufgeführt. Als Präbiotika werden hauptsächlich Fructooligosaccharide, wie Oligofruktose und Inulin, eingesetzt. Diese gelten als bifidogen, d.h. sie fördern das Wachstum von Bifidobakterien. Auch die Population einiger Laktobazillen kann in der Darmflora durch Präbiotika erhöht werden. Präbiotika können in Nahrungsmitteln ferner zur Verbesserung des Geschmacks und der Textur eingesetzt werden und haben den Vorteil des geringen Gehalts an Kalorien. Ferner zeichnen sich die meis-

Tabelle 6

Produkt	Wachstumsmedium	Stamm	HB-Zugabeform	Land
Agfort	LI	Medis	L. acidophilus 0-1	F, R, G, UK, P, I, S, DK
Agfort	Grillen	Medis	L. acidophilus 0-1	Frankreich
Agfort	Yog	Medis	L. acidophilus 0-1	Frankreich/Italien
Agfort	Yog	1. Lactob	L. acidophilus 0-1	Frankreich
Agfort	Yog/Flu	Substratfrei kult.	L. acidophilus	Italien
Agfort	Yog/Flu	Medis	Wegweis-Mutante	Frankreich
Agfort	LI	Medis	L. acidophilus	Frankreich
Essenstärker-Hilfsstoffe	Yogurt	Medis	L. casei Strain	N, DE, S
Agfort	Yog	HB-Fruktose	L. casei	Frankreich
Agfort	LI	Medis	L. acidophilus	Italien
Agfort	Agfort/Agfort/Agfort/Agfort	Medis	L. acidophilus	Frankreich
Essenstärker-Hilfsstoffe	Yogurt	Medis	L. casei	Frankreich
Agfort	Yogurt	Substratfrei kult.	L. acidophilus	Italien
Essenstärker-Hilfsstoffe	Yogurt	Medis	B. bifidus, L. acidophilus, L. casei	Frankreich
Essenstärker-Hilfsstoffe	Yogurt	Medis	L. casei	Frankreich
Agfort	Yogurt/Agfort	Medis	L. acidophilus, L. casei, L. acidophilus	Frankreich
Agfort	Yogurt	Medis	L. casei	Frankreich

(Quelle: Kneifel 2000)

Tabelle 7

Kommerziell erhältliche präbiotische Zuckerverbindungen		
Zuckerverbindung	Markenname	Hersteller/ Lieferant
Galacto-Oligosaccharid	Elix or	Borculo Dome Ingredients
	Origonate 55	Yakult
	Rafinose	Orbit
Fructo-Oligosaccharid	Actlight	Belgin-Meiji
	Fructose	Sensus-Fruital
	MeiLogo	Meiji
	Nutriflora	Golden Technologies
Inulin	Rafinose	Orbit
	Fruital	Sensus-Fruital
Lactulose	Lactulac	Lactulose/Fresenius
	Bifidol	Solvay
	MLSPC	Monnagge

(Quelle: Kneifel 2000)

ten präbiotischen Präparate durch eine gute Stabilität aus. Um eine präbiotische Wirkung zu erzielen, ist die Aufnahme einer geeigneten Dosis der präbiotischen Substanz erforderlich. Zu hohe Dosen können allerdings bei empfindlichen Menschen zu unerwünschten Nebeneffekten führen, wie intestinale Beschwerden und Flatulenz.

## 5.6 Synbiotika

Synbiotika sind definiert als eine Kombination von Probiotika und Präbiotika (Gibson und Roberfroid 1995). Sie beeinflussen den Wirt günstig, indem sie die Überlebensfähigkeit der probiotischen Mikroorganismen erhöhen und die Kolonisierung des Kolons mit förderlichen Bakterien begünstigen. Es sind auch synergistische Effekte zu erwarten. Allerdings kann nicht jeder probiotische Stamm mit jedem präbiotischen Zucker kombiniert werden. Die wichtigsten Eigenschaften pro-, prä- und synbiotischer Produkte sind in Abbildung 5 vergleichend zusammengefasst. Durch Verkapselung der probiotischen Mikroorganismen kann ihre Stabilisierung während der Passage durch den oberen Gastrointestinaltrakt erreicht werden (Topping et al. 2003).

Abbildung 5

Eigenschaften von pro-, prä- und synbiotischen Produkten		
Probiotika + Präbiotika = Synbiotika		
Stabilitätsprobleme der Probiotika während der Lagerung des Produkts	Gute Stabilität der Disaccharide während Lebensmittellagerung und Lagerung	Stabilitätsprobleme der probiotischen Bakterien während der Lagerung des Produkts durch Probiotika teilweise behoben
Stabilitätsprobleme der Probiotika während der Passage durch den oberen Gastrointestinaltrakt	Gute Stabilität der Disaccharide während der Passage durch den oberen Gastrointestinaltrakt	Stabilitätsprobleme der probiotischen Bakterien während der Passage durch den oberen Gastrointestinaltrakt
Überlebende Bakterien über gesundheitliche Effekte aus	Oligosaccharide ernähren Colon und stimulieren gesundheitsfördernde Darmbakterien	Gesundheitfördernde Wirkung durch überlebende probiotische Bakterien und ernährte gesundheitsfördernde Darmbakterien

Probiol (2003)

Der wissenschaftliche Nachweis gesundheitlicher Wirkungen von Probiotika und Präbiotika ist schwierig. Deshalb kann nur ein Teil der Wirkungen als wissenschaftlich gesichert gelten. Weitere Effekte werden vermutet, können bis jetzt jedoch nur im Modell- oder Tierversuch nachgewiesen werden. Daraus können lediglich Hinweise auf mögliche Effekte beim Menschen abgeleitet werden. Letztendlich müssen diese durch geeignete klinische Studien bestätigt werden. Genauere Erkenntnisse über die molekularen und mikrobiologischen Zusammenhänge werden durch den Einsatz von molekularbiologischen Methoden erwartet. Die Komplexität der Zusammenhänge zwischen Gesundheit und Ernährung macht die interdisziplinäre Zusammenarbeit der unterschiedlichsten Forschungsgebiete erforderlich.

### Literaturverzeichnis

Alander M, Korpela R, Saxelin M, Vilpponen-Salmela T, Mattila-Sandholm T, Von Wright A (1997) Recovery of *Lactobacillus rhamnosus* GG from human colonic biopsies. *Lett Appl Microbiol* 24: 361 – 364

Black FT, Andersen PL, Orskov J, Orskov F, Gaarslev K, Laulund S (1989) Prophylactic efficacy of lactobacilli on travellers diarrhea. *Travel Medicine* 333 – 335

Blaut M (2003) Influence of food components on intestinal microbiota composition. In: *Inside Story: diet, intestinal flora and health*. Yakult Europe BV, pp 7 – 8

Collins MD, Gibson GR (1999) Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *Am J Clin Nutr* 69(suppl): 1052S–1057S

De Vreese M, Schrezenmeier J (2000) Probiotika. *Praxishandbuch Functional Food*, Behr's Hamburg

Gibson GR, Roberfroid MB (1995) Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutrition* 125: 1401–1412

Goldin BR (1998) Health benefits of probiotics. *Br J Nutr* 80: 203 – 207

Großklaus R (1999) Pro- und Präbiotika. *Workshop Moderne Ernährung – Lifestyle*. Werkstattbericht 5 der Stockmeyer Stiftung für Lebensmittelforschung, pp 21 – 48

Hammes WP (1998) Bewertung der gesundheitlichen Unbedenklichkeit von Milchsäurebakterien und Probiotika. *Monatsschr Kinderheilk* 146: 31 – 38

- Havenaar RR, Ten Brink B, Huis in't Veld JHJ (1992) Selection of strains for probiotic use. In: Probiotics: The scientific basis (Fuller R, ed) Chapman & Hall, London, pp 209 – 224
- Holzappel WH, Haberer P, Snel J, Schillinger U, Huis in't Veld JHJ (1998) Overview of gut flora and probiotics. *Int J Food Microbiol* 41: 85 – 101
- Igarashi M, Liyama Y, Kato R, Tomita M, Asami N, Ezawa I (1994) Effect of *Bifidobacterium longum* and lactulose on the strength of bone in ovariectomized osteoporosis model rats. *Bifidus* 7: 139 – 147
- Kasper H (2001) Development and modification of the intestinal flora. In: Intestinal microflora and human health: The balance functional aspects of intestinal flora. Yakult Europe BV, pp 7 – 16
- Kneifel W (2000) Functional foods with lactic acid bacteria: probiotics – prebiotics – nutraceuticals. *Food Biotechnology. Progress in Biotechnology Vol 17*. Bielicki S, Tramper J, Polak J (eds) Elsevier Amsterdam, pp101 – 107
- Mann GV (1977) A factor in yoghurt which lowers cholesteremia in man. *Atherosclerosis* 26: 335 – 340
- Mann G V, Spoerry A (1974) Studies of a surfactant and cholesteremia in the Massai. *Am J Clin Nutr* 27 464 – 469
- Marteau P, De Vrese M, Cellier C, Schrenzenmeir J (1998) Protection from gastrointestinal diseases using probiotics. *Am J Clin Nutr* 73 (suppl): 430 S – 436 S
- Mattila-Sandholm T (2000) Healthy eating – healthy living. Workshop: Sichere Lebensmittel – gesunde Ernährung. Werkstattbericht 6 der Stockmeyer Stiftung für Lebensmittelforschung, pp 56 - 91
- Mitsuoka T (1992) Intestinal flora and aging. *Nutr Rev* 50: 438 – 446
- Oksanen PJ, Salminen S, Saxelin M, Hämäläinen P, Ihantola-Vormisto A, Murausniemi-Isoviita, Nikkari S, Oksanen T, Pörsti I, Salminen E, Siitonen S, Stuckey H, Richelsen B, Kristensen K, Pedersen SB (1996) Long-term (6 months) effect of a new fermented milk product on the level of plasma lipoproteins – a placebo-controlled and double blind study. *Eur J Clin Nutr* 50: 811 – 815
- Teuber M (1998) Probiotika – Wissenschaft contra Marketing – Kritische Gedanken zum Konzept. Rundgespräche der Kommission für Ökologie, Bd. 15 »Lebensmittel im Wandel«, Friederich Pfeil München, pp 93 – 102
- Toba T, Virkola R, Westerlund B, Björkman Y, Sillanpää J, Vartio T, Kalkkinen N, Korhonen T (1995) A collagen binding S-layer protein in *Lactobacillus crispatus*. *Appl Environ Microbiol* 61: 2467 – 2471
- Toppila A, Vapaatalo H (1990) Prevention of travellers' diarrhoea by *Lactobacillus* GG. *Ann Med* 22: 53 – 56
- Topping DL, Fukushima M, Bird AR (2003) Resistant starch as a prebiotic and synbiotic: state of the art. *Proceedings of the Nutrition Society* 62: 171-176
- Westerlund B, Korhonen T (1993) Bacterial proteins binding to the mammalian extracellular matrix. *Mol Microbiol* 9: 687 – 694
- Yaeshima T, Takahashi S, Matsumoto N, Ishibashi N, Hayasawa H, Hisakazu I (1997) Effect of yogurt containing *Bifidobacterium longum* BB536 on the intestinal environment, fecal characteristics and defecation frequency: a comparison with standard yogurt. *Biosci Microflora* 16: 73 – 77
- Zink R, Pfeifer A (1999) Gesundheitsförderliche Aspekte der Probiotika und industrielle Umsetzung. DEHEMA-Kolloquium 25.03.1999

## Diskussion



### BREVES

Ich komme nicht umhin, einige kritische Dinge zu sagen. Ich glaube, dass wir in der Auseinandersetzung zur Thematik Probiotika nicht weiter kommen, wenn man mit pauschaler Darstellung aller möglichen gesundheitsfördernden Aspekte argumentiert. Das ist eine Ebene der Auseinandersetzung gewesen, mit der solche Keime eingeführt worden sind, die dann, zumindest partiell, irgendwann ersetzt wurden durch Fragestellungen und Hypothesen für experimentelle Untersuchungen. Wenn wir wirklich Licht in diese ganze Problematik hineinbringen wollen, hilft uns nur so ein streng wissenschaftlich hypothesengeführter Ansatz.

Zur Ergänzung: Die positiven Effekte von Probiotika auf die intestinale Calciumresorption halte ich für schlichtweg unmöglich, weil die Veränderungen, die im Chymus eintreten können, keineswegs so ausgeprägt sein können. Richtig ist, und dafür gibt es einige Daten aus Untersuchungen an Ratten, dass durch Präbiotika der aktive Calciumtransport im Dickdarm stimuliert werden kann, wobei man heute noch nicht weiß, ob das eine Frage der Löslichkeit von Calcium ist, oder ob das eine direkte Interaktion mit Spaltprodukten der Präbiotika und dem Calcium-Transportsystem ist.

### BISPING

Gut, kommen wir zu der ersten Frage zurück. Sie können nicht von allgemeinen, tollen Wirkungen reden, wenn wir irgendeine Spezies einsetzen. Wir

müssen erst einen Stamm isolieren, der optimalerweise aus dem Darmsystem kommt, damit er die Fähigkeit hat, Magen und Gallenblase zu passieren. Dann braucht er, untersucht und wissenschaftlich belegt, eine gute Adhäsionsfähigkeit an die Epithelzellen. Erst wenn wir diese Dinge nachgewiesen haben, können wir von einem probiotischen Stamm reden. Wir können natürlich nicht, wie Sie gesagt haben, hier große Wolkenbilder machen. Ich habe natürlich auch Aussagen aus der Literatur genommen. Wir haben, wirklich nachgewiesen, eine Verhinderung und eine Verkürzung von Diarrhoeen vorliegen. Und dass es da einen kompetitiven Effekt gibt zwischen den probiotischen Bakterien und möglichen pathogenen Bakterien, daran können wir nicht vorbei reden, da sollte man Konsensus zeigen. Des weiteren gibt es natürlich Aussagen zu Antikanzerogenität usw., die mit großen Fragezeichen zu versehen, und natürlich durch placebokontrollierte Doppelblindstudien und alles Weitere zu kontrollieren sind, da sind wir einer Meinung.

Zur Calcium-Absorption: Wenn wir jetzt zurückgehen auf dieses Beispiel, haben wir natürlich, wenn wir Bifido-Bakterien betrachten, eine erhöhte Säurekonzentration. Wenn wir Bifido-Bakterien an ein Substrat dranbringen, was dann ja ein Präbiotikum wäre, haben wir vielleicht einen lokalen Effekt, dass die Säure da produziert wird, wo das Calcium auch sitzt. Lokale Effekte gibt es auch beispielsweise bei anderen Dingen. Wenn wir eine spezifische Konzentration beispielsweise von Protonen haben, die nur örtlich lokal begrenzt sind, die von einem Organismus direkt in

der Umgebung ausgeschieden werden, können wir vielleicht eine höhere Löslichkeit, beispielsweise des Calciums, erreichen.

BLAUT

Ich kann mich in großen Teilen dem anschließen, was Herr Breves gesagt hat. Es gibt ein paar Dinge, die Sie vorgestellt haben, die erscheinen mir auch in sich widersprüchlich. Zum Beispiel: Sie haben Experimente an Epithelzellen, Caco 2-Zellen zitiert, an denen die Adhäsion untersucht wurde. In diesen in-vitro-Experimenten hat man gezeigt, dass die Adhäsion zunimmt. Auf der anderen Seite wissen wir, dass die Situation dieser Caco 2-Zellen nicht der Situation in vivo entspricht. In vivo ist die Oberfläche des Epithels bedeckt mit einer Schicht von Muzin. Es gibt für mich überhaupt keine Anhaltspunkte, die belegen, dass die Adhäsion an die Epithelzellen erforderlich ist, damit es probiotische Effekte gibt. Bestimmte Fragen kann man nicht in Humanexperimenten klären. Dazu zählt zum Beispiel der Nachweis, dass Probiotika Krebs verhindern können, das kann man in klinischen Studien nicht klären.

BISPING

Da haben Sie vollkommen Recht, dass man das nicht klären kann. Ich habe nur gesagt, dass es in der Literatur zitiert wird, und dass ich das selber in Frage stelle. Zu den Adhäsionsfähigkeiten kann ich mich eigentlich nur darauf zurückziehen, dass es wichtig ist, dass sie auf jeden Fall einen kompetitiven Effekt haben. Ein Effekt gegenüber pathogenen Mikroorganismen, die eine Diarrhoe auslösen können, kann eigentlich nur dadurch auftreten, wenn Rezeptoren-Stellen auf den Zellen im Darm, auf den Epithelien, besetzt sind, beispielsweise durch Probiotika. Insofern denke ich, dass es schon irgendeinen Hintergrund geben muss, dass solche probiotischen Mikroorganismen zumindest eine gute Adhäsionsfähigkeit an Epithelzellen haben.

GROPP

Herr Bisping, ich komme aus der Tierernährung. Tierernährer haben viel Mühe darauf verwandt, heraus-

zukriegen, wie macht man einen gescheiterten Versuch, der dadurch überzeugt, dass er eine ordentliche Versuchsanordnung hat. Wenn ich mir diese, für mich überwältigende, ein ganzes Dia füllende Vielzahl positiver gesundheitlicher Effekte ansehe, dann möchte ich mir erlauben, Sie zu fragen, gibt es dazu Versuche, wo man mit einer vergleichbaren Kontrollgruppe und einem Probiotikum gearbeitet hat? Wenn wir von Ihnen als Behauptungen auch infrage gestellte Wirkungen weglassen, müssen ein paar von diesen gesundheitlichen Wirkungen doch nicht nur auf Beobachtungen, sondern auf klinischen Studien beruhen mit einer echten, zweifelsfreien Kontrollgruppe. Davon weiß ich nichts. Ich bin neugierig, wie viel davon so erhärtet ist, dass Sie sagen würden, das hält den Kriterien einer Versuchsnachprüfung stand.

BISPING

Ich stehe jetzt hier in der Position des *Advocatus diaboli*. Ich habe Ihnen Daten aus der Literatur vorgestellt. Ich habe keine eigene Versuchsplanung hinterlegt. Ich habe Daten genommen, gerade in Bezug auf die Verhinderung und Verminderung von Diarrhoeen, und auf die kürzere Dauer von Diarrhoeen, beispielsweise. Das waren Doppel-Blind-Studien, die Placebo-kontrolliert waren. Also, alles, was ich selber präsentiert habe als feste Daten, habe ich auch so in der Literatur gefunden. Bei anderen Dingen habe ich gesagt, das wird behauptet. Was behauptet wird, da steht derjenige hinter, der es gemacht hat, aber nicht ich.

GAEBEL

Man müsste vielleicht die Erklärungsansätze hinterfragen. Sie sagten, diese kompetitiven oder antimikrobiellen Effekte sind unter Anderem zurückzuführen auf eine Peroxidbildung und eine Absenkung im Redoxpotential. Sie müssen mich korrigieren, aber ich denke, das widerspricht sich. Das Eine kann nicht das Andere bedingen.

BISPING

Entschuldigung, jetzt müssen wir nicht beide Dinge gleichzeitig nennen. Wir haben einerseits gesagt, was

wir erwarten können, ist eine Absenkung des Redoxpotenzials. Wir haben Laktobazillen, die wir einsetzen, Streptococci, die können auch noch Sauerstoff verarbeiten. Insofern wird eine Anaerobiosis geschaffen für rein anaerobe Mikroorganismen. Wir kriegen das Redoxpotenzial gesenkt. Andererseits haben die Laktobazillen, auch die Streptococci, keine Katalase. Die produzieren Wasserstoffperoxid, aber nicht in riesigen Mengen. In der direkten Umgebung reicht das aber sicherlich dazu aus, andere Mikroorganismen in ihrem Wachstum zu hemmen, und dadurch kriegt man einen anderen Effekt.

Ich habe weiterhin angesprochen, es könnte möglich sein, dass Bakteriozine gebildet werden. Wir haben einerseits ein Redoxpotenzial, was allgemein dadurch abgesenkt wird, dass ein vorhandener Restsauerstoff verbraucht wird, da unsere Milchsäurebakterien aerotolerant sind. Andererseits produzieren sie natürlich  $H_2O_2$ , und die direkte Abgabe von geringsten Konzentrationen  $H_2O_2$  in die Umgebung hindert auch andere Mikroorganismen in ihrem Wachstum. Das ist natürlich nicht so stark, dass der allgemeine Effekt der Absenkung des Redoxpotenzials dadurch aufgehoben wird oder dem entgegengearbeitet wird.

#### STEINHART

Wir haben in den beiden Vorträgen zu Probiotika gehört, welche Wechselwirkungen möglicherweise diese Mikroorganismen mit dem Tier oder dem Menschen machen und in welcher Weise Stoffwechsel beeinflusst wird. Könnte man sich nicht auch überlegen, Mikroorganismen einzusetzen, die per se günstige Substanzen erzeugen könnten. Ich denke an *Butyrivibrio*, der produziert z.B. CLA (konjugierte Linolsäure). Genau so gut könnte man sich vorstellen, dass es welche gibt, die Flavonoide produzieren, die als Antioxydantien wirken, die könnte man dann sogar im Körper selber produzieren. Oder denken wir an die Phytosterole oder überhaupt Steroide, denen man auch positive Wirkungen im Hinblick auf Cholesterinabsorption nachsagt. Gibt es in dieser Richtung, jetzt an beide Redner, Überlegungen im Tierbereich und Humanbereich?

#### BISPING

Zu *Butyrivibrio* müssen wir natürlich erst gucken, ob der die Chance hat, durch den menschlichen Magen zu kommen, und ob er die Gallensalze verträgt oder nicht. Wieweit kann er sich ansiedeln im Darm? Des Weiteren müssen wir nach toxischen Nebenprodukten gucken. Also da sind viele offene Fragen zu klären.

Zur Frage der Isoflavonoide habe ich ein anderes Beispiel, das einen Hinweis geben kann. Ich habe eben gesagt, ein Hauptarbeitsgebiet von mir war diese Tempehfermentation. Die ganze Tempehfermentation ist überhaupt nur in die Gänge gekommen, weil ein bestimmtes Isoflavonoid, ein 6,7,4-trihydroxiisoflavon, nachgewiesen werden konnte in diesem Tempeh. Dafür konnte man zeigen: Antioxydative Aktivität, Blutdrucksenkung usw., und deswegen war der Stoff interessant. Er wurde aber nie in Sojabohnen gefunden, sondern immer nur im Tempeh, also musste die mikrobielle Fermentation für die Bildung dieses Stoffes verantwortlich sein. Immer, wenn wir Bakterien zu den Pilzen zugegeben haben für die Fermentation, war der Stoff nicht mehr da. Nur wenn wir den Pilz alleine da hatten, war auch der Stoff da. Der Hintergrund war, dass der Stoff natürlicher Inhaltsstoff von Sojabohnen ist, aber unter normalen Bedingungen, bei denen man sonst Isoflavonoid wieder frei setzt, nicht freigesetzt wird. Erst, wenn man die Sojabohnen eine halbe Stunde lang mit 2n HCl kocht, wird dieser Stoff freigesetzt, weil er so stark glykosidisch gebunden ist. Das heißt also, nicht immer ist in Nahrungsmitteln direkt ersichtlich, welches Isoflavonoid vorhanden ist, und wie können wir es freisetzen. Denn in diesem Falle wurde das spezielle Isoflavonoid, was gewünscht war, nur freigesetzt durch die hydrolytische Aktivität des Pilzes. Insofern denke ich, dass erst mal noch weitere Grundlagenforschung gemacht werden muss, welche potenziellen Isoflavonoide sind in Grundnahrungsmitteln vorhanden, und brauchen wir unbedingt Bakterien, um die freizusetzen, oder gibt es noch andere Wege?

#### BREVES

Herr Steinhart, zu Ihrer Frage: Ich habe das ja bewusst am Ende meines Vortrags angeschnitten,

Probiotika als mögliche Vektoren zu verwenden. Ich weiß von Untersuchungen, im Zusammenhang mit E-Coli-Nissle, bei denen gegenwärtig in der GBF in Braunschweig versucht wird, das Gesamt-Genom zu charakterisieren. Auf der Grundlage dieser Kenntnis sollen dann Ansätze für genterapeutische Anwendungen probiert werden, eine Idee, die uns möglicherweise auf neue Ebenen führen wird, was eine gezielte Applikation von Substanzen unter therapeutischen Gesichtspunkten ermöglicht.

GROPP

Herr Bisping, Sie haben gesagt, wir haben Kriterien, die erfüllt sein müssen, damit ein Stamm sich Probiotikum nennen darf. Dazu gehört, dass mindestens 50 % den Magen überstehen, besser 60 %. Dazu gehört die Adhäsion an den Intestinalzellen. Gibt es da auch Sicherheitsüberlegungen bei dieser Frage, ob ein Stamm Probiotikum sein kann in der Humanernährung?

BISPING

Natürlich gibt es Sicherheitsüberlegungen. Man muss von vornherein nachweisen, dass wir es nicht zu tun haben mit einem Toxinbildner. Wir dürfen keinen pathogenen oder opportunistisch pathogenen Stamm einsetzen. Das sind Voraussetzungen, die gegeben sein müssen, bevor wir überhaupt daran denken können, ob ein solcher Stamm als probiotisches Bakterium zum Einsatz kommen kann.

WENK

Darf ich das Thema etwas in die Richtung Präbiotika umlenken? Herr Breves hat die Hefezellwände erwähnt,  $\beta$ -Glukane oder Mannanoligosaccharide, die möglicherweise da die spezifische Wirkung haben. Sie haben jetzt viel mehr Gewicht auf die Fruktose-Oligosaccharide gelegt. Die Industrie verkauft auch resistente Stärke mit den gleichen Ideen, um Bifido-Bakterien zu füttern. Hier ist ja die Schnittstelle zu den Nahrungsfasern offensichtlich relativ weich. Meine Frage ist, kann man die Präbiotika sinnvoll definieren, wenn man davon ausgeht, dass es ge-

scheiter wäre, etwas mehr Nahrungsfasern zu essen, und haben dann die Oligosaccharide überhaupt noch eine Wirkung?

Zum Schluss noch eine Bemerkung: Wenn ich Arbeiten über Präbiotika lese, in der Ferkelfütterung oder Geflügelfütterung, dann fällt mir immer wieder auf, dass das semisynthetische Rationen sind mit praktisch keiner Nahrungsfasern oder höchstens nur ganz schwer löslichen. Könnte man das nicht viel einfacher machen mit etwas mehr löslicher Nahrungsfasern?

BISPING

Ich gebe Ihnen da vollkommen Recht. Man kann das sehr viel einfacher machen, ohne auf spezielle Produkte Rücksicht zu nehmen. Wenn Sie auf die resistente Stärke ansprechen, da kann ich Ihnen ein sehr einfaches Beispiel aus der Haushaltsküche geben. Wenn Sie die Nudeln, die Sie essen wollen, nicht weich kochen, sondern al dente lassen, wie es in Italien üblich ist, dann haben Sie auch noch resistente Stärke, die als potenzielles Präbiotikum im Darm erscheint. Das wäre sicherlich ein einfacherer Weg. Jeder Ballaststoff hat sicherlich eine Auswirkung, aber welcher Organismus soll gefördert werden? Die Aussagen über Oligofruktosen oder Inulin sind ja vor dem Hintergrund gemacht worden, dass speziell Bifido-Bakterien gefördert werden sollen. Also müssen wir untersuchen, welche Bakterien wollen wir fördern, und ist ein spezifisches Substrat nur für diese Organismen da.

WENK

Könnten wir nicht sogar sagen, dass Laktose für alle jene, bei denen die  $\beta$ -Galaktosidase nicht sehr aktiv ist, auch ein Präbiotikum ist. Die Laktose ist ein Präbiotikum für Leute, bei denen die  $\beta$ -Galaktosidase nicht so gut funktioniert.

BISPING

Ich möchte Menschen, bei denen die  $\beta$ -Galaktosidase nicht so gut funktioniert, lieber keine Laktose geben. Die Leute leiden an Blähungen und, wenn es

schlimm wird, kriegen sie Diarrhoe. Also da sollte man sehr vorsichtig sein.

Zwischenruf WENK: Kommt auf die Menge an!

BISPING

Deswegen wird ja auch bei den Präbiotika gesagt, dass man möglichst nicht mehr als 10 g pro Tag zu sich nehmen sollte, auch weil bei dem Inulin der Effekt auftritt, dass Galaktose-Intolerante auch auf Inulin reagieren und Schwierigkeiten bekommen, sobald sie mehr als 10 g je Tag zu sich nehmen.

BREVES

Bezüglich der Zusammensetzung der Ration kann ich auch aus eigener Erfahrung sagen, wenn man kontrollierte Studien beim Schwein in puncto möglicher Wirkungen von Probiotika machen möchte, muss man gewaltige Drahtseilakte vollziehen, eine Ration zu finden, bei der die Zugabe des Probiotikums einen signifikanten Anteil der Faserbestandteile darstellen kann. Wenn man eine normale, ausgewogene Ration nimmt, dann sind sie schlichtweg überflüssig. Ich möchte aber noch mal an die Frage erinnern, die Herr Groppe angesprochen hat, nämlich was sind die Kriterien der Sicherheit von Probiotika, die zugelassen werden. Für mich ist das noch nicht beantwortet.

BISPING

Ich bin keine Zulassungsinstanz. Ich kann Ihnen nur sagen, was ich machen würde als Mikrobiologe. Wenn ich einen Stamm habe, muss ich natürlich von vornherein ausschließen, dass er pathogen ist. Ich

muss von vornherein ausschließen, dass er ein Toxinbildner oder Endotoxinbildner ist. Das ist klar, die Sicherheit muss als Erstes gewährleistet sein. Welche Paragraphen dahinter stecken, welche Instanz das macht, das ist nicht meine Aufgabe.

Meine Aufgabe im Labor ist, dafür zu sorgen, dass auf jeden Fall nur ein Stamm, der unter die Kategorie GRAS-Organismus (generally recognized as safe), zur Verwendung kommt. Das ist ein Hauptkriterium.

STEINHART

Eine ganz kurze Ergänzung. Wir haben die Novel-Food-Verordnung, und darunter fällt das jetzt auch. Das heißt, es ist nicht mehr so einfach. Es ist eine neue Technologie, und dafür steht dann drin, welche Sicherheitsuntersuchungen gemacht werden müssen, um eine Zulassung zu bekommen.

BISPING

Vielleicht darf ich noch ein Schlusswort einfügen. Sie haben eben gesagt, alles muss wissenschaftlich hinterlegt und untersucht werden. Meiner Meinung nach sind solche Stämme, wie der *Lactobacillus Johnsonii*, oder *Lactobacillus casei*, die eingesetzt werden, hinreichend und gut und abgedeckt untersucht in Bezug auf ihre Wirkung. Aber es gibt sicherlich viele Firmen, die irgendwelche Produkte als probiotisch deklarieren, ohne dass genug Hintergrundwissen und ohne, dass genug Absicherung vorhanden ist. Ich denke, das ist einfach ein finanzieller Aspekt bei Leuten, die auf einen fahrenden Zug aufgesprungen sind, um verdienen zu können.

# EU-Vorgaben und -Praxis in der Bewertung von Mikroorganismen als Zusatzstoffe



Mikroorganismen (MO) sind in der Europäische Union – weniger dagegen in deren Mitgliedstaaten – eine relativ junge Gruppe der Zusatzstoffe. Erst 1993 wurden sie (RL 93/114/EG) in die Zusatzstoffrichtlinie 70/524/EWG aufgenommen. Damit wurden dann auch an MO vergleichbare Anforderungen wie an andere Futterzusatzstoffe (FZS) gestellt. Die erste Stellungnahme des Scientific Committee on Animal Nutrition (SCAN) bei der GD XXIV zu MO resultiert aus dem Jahr 1997. Gefragt waren (zu 26 Produkten) nahezu ausschließlich Sicherheitsaspekte (Sicherheit für das Zieltier? Entwicklung bakterieller Resistenzen gegen Antibiotika? GVO? Sicherheit für Verbraucher und Anwender?). Bis Mai 2003 wurden vom SCAN zu 42 einschlägigen Fragen Stellungnahmen erarbeitet sowie Grundsatzpapiere zur Resistenzbeurteilung und zur Problematik der Toxinbildung von *Bacillus* spp, weiter ein Leitlinien-Entwurf mit Anforderungen für die gemeinschaftliche Zulassung von MO.

Mit Erlass der Verordnung 178/2002 ging dann die Bewertung der Zulassungsunterlagen von der Kommission auf die Europäische Lebensmittelbehörde (Behörde; European Food Safety Authority: EFSA) über, deren Ausschüsse im Mai 2003 ihre Arbeit aufnahmen. Zuständig innerhalb der Behörde ist heute der FEEDAP Ausschuss (Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed). Teile der bisher in die Zuständigkeit des SCAN gefallenen Arbeitsgebiete gingen dabei an andere eigens gebildete Panels über (GVO, unerwünschte Substanzen).

Grundlage der Bewertung von FZS für die Behörde sind die für »Andere Zusatzstoffe als Mikroorganismen und Enzyme« und damit für chemisch definierte Wirkstoffe in den RL 87/153 EWG (mit der aktualisierten RL 2001/79 EG) und spezifisch für Mikroorganismen in einer weiteren Leitlinie (SCAN) festgelegten Anforderungen ([http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scan/out68\\_en.pdf](http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scan/out68_en.pdf)). GVO müssen zusätzlich den Anforderungen der RL 2001/18/EG und RL 90/219/EWG entsprechen.

## **Bisheriges Vorgehen bei der Bewertung (SCAN und FEEDAP)**

Entsprechend den Leitlinien werden im Einzelnen beurteilt: der MO selbst (auch Anwendung von DNA-Techniken, Vorkommen von Toxinen und Virulenzfaktoren, Antibiotika-Produktion und -Resistenz), Stabilität, Anwendungsbedingungen (einschließlich Sicherheitsdatenblatt), Analysenmethode(n), Wirksamkeit (signifikante Verbesserung des beworbenen Parameters in drei Versuchen bei festgelegter Mindestversuchsdauer gefordert), Zieltiertoleranz, Wirkung auf die Darmflora, Genotoxizitätstests (in vitro und gegebenenfalls in vivo), orale subchronische Toxizität (90 Tage), Anwendersicherheit (Reizung, Haut-Sensitivierung, Effekte auf das respiratorische System, systemische Toxizität, Kontrollmaßnahmen), Umweltsicherheit (nur wenn die MO nicht der Intestinalflora zugeordnet werden oder sonst ubiquitär sind).

Anhand einiger Beispiele aus der Arbeit von SCAN und FEEDAP werden kritische Momente aus den Dossiers bzw. in der Bewertung der Unterlagen vorgestellt.

SCAN hat im Februar 2000 ein Grundsatzpapier zum Einsatz von *Bacillus* spp. in der Tierernährung verfasst. Darin wird u. a. ausgeführt, dass das Vorkommen von Lebensmitteltoxinen im Zusammenhang mit Mitgliedern der taxonomischen Gruppe *B. cereus* hinlänglich bekannt ist, dass wahrscheinlich alle Mitglieder dieser Gruppe als Toxinbildner anzusehen sind und unter dem Gesichtspunkt der Lebensmittelsicherheit auch *B. thuringiensis* hier zugeordnet werden sollte. Stämme der *B. cereus* Gruppe, die mit einer Lebensmittelvergiftung in Zusammenhang gebracht wurden, bilden im Allgemeinen mehr Toxine in Laborkulturen als Stämme anderer Herkünfte. Einige Toxine sind in Tabelle 1 aufgeführt. Obwohl auch Stämme anderer Species (drei der *B. subtilis* Gruppe (*B. subtilis*, *B. licheniformis* und *B. pumilus*) sowie drei aus anderen Gruppen (*B. alvei*, *B. circulans* und *B. sphaericus*) in Lebensmittelvergiftungen involviert waren, kann die Mehrheit der *B. subtilis* Stämme als sicher angesehen werden, weil ihnen die eine Toxinbildung codierenden Gene fehlen. SCAN räumt

Tabelle 1: Toxine, die von *Bacillus cereus* gebildet werden

Toxin	Typ	Lebensmittelvergifter
Hämolysin BL (HBL)	Protein, 3 Komponenten	wahrscheinlich
Nicht-hämolytisches Enterotoxin (Nhe)	Protein, 3 Komponenten	JA
Enterotoxin T (BceT)	Protein, 1 Komponente, 41 kDa	?
Enterotoxin FM (EntFM)	Protein, 1 Komponente, 45 kDa	??
Enterotoxin K (EntK)	Protein, 1 Komponente, 35 kDa	ja, 3 Todesfälle bekannt
Emetisches Toxin (Cereulid)	Cyclisches Peptid, 1,2 kDa	ja, 1 Todesfall bekannt

ein, dass derzeit noch zu wenig über die genetische Grundlage der Toxinbildung bei der Species *Bacillus* bekannt ist. SCAN empfiehlt aber für alle künftigen Anträge zur Verwendung von MO in Futtermitteln, dass vom Einsatz der *B. cereus* Gruppe nachdrücklich abgeraten werden sollte.

So wurde denn auch bei der Prüfung eines Antrags zu einem *B. cereus* Probiotikum dessen Sicherheit wegen möglicher Toxinbildung vom SCAN nicht bestätigt ([http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scan/out62\\_en.pdf](http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scan/out62_en.pdf)).

Obwohl der Keim in vitro in einem Medium für langsames Wachstum keine messbaren Toxine produzierte, wohl aber in einem Medium, das schnelles Wachstum begünstigt, obwohl der Keim in vivo im Gastrointestinaltrakt sich kaum vermehrt und auch dort Toxine nicht gemessen werden konnten – alles Argumente, die auf ein vernachlässigbares Risiko hindeuten – hat SCAN das verbliebene Risiko als nicht unbedeutend eingestuft. SCAN hielt es nicht für vertretbar, dem Prinzip des vorbeugenden Verbraucherschutzes folgend, einen Keim mit dem nachweislichen Potenzial Lebensmittelvergiftungen auszulösen, in die Lebensmittelkette einzuführen.

Da MO mit einer Antibiotika-Resistenz nur dann als Futterzusatzstoffe eingesetzt werden sollten, wenn die Resistenz im Gen intrinsisch verankert ist und daher als nicht mobil gilt, konnte die Sicherheit in bisher zwei Fällen nicht attestiert werden. So enthielt ein Probiotikum zwei Keime, *Pediococcus acidilactici* und *Lactobacillus plantarum*, die 70% aller im Produkt vorhandenen Keime ausmachten, mit einer auf dem tetS Gen verankerten Tetrazyklin Resistenz. Diese Gene sind generell häufig in Plasmiden oder Transposonen lokalisiert und im Allgemeinen sehr mobil. Tiere gelten als Reservoir für antibiotikaresistente Keime. Der Resistenztransfer auf Humankeime kann zur Verbreitung der Resistenz gegen therapeutisch genutzte Antibiotika beitragen. Der Selektionsvorteil, den solche Keime angesichts des in der Tiermedizin verbreiteten Tetrazyklin-Einsatzes genießen, dürfte den Resistenztransfer begünstigen. SCAN hat daher

diesen Keimen bei Einsatz in der Tierernährung ein Risiko attestiert ([http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scan/out58\\_en.pdf](http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scan/out58_en.pdf)). Auch ein Probiotikum auf der Basis von *Bacillus licheniformis* NCTC 13123 wurde als unsicher eingestuft, weil es möglicherweise zur Verbreitung einer Resistenz gegen Erythromycin beitragen könnte, obwohl SCAN das Risiko nicht zu quantifizieren vermochte. Auch hier hat SCAN in Anbetracht des häufigen Einsatzes von Makrolidantibiotika in der Schweinehaltung einen Selektionsvorteil für den Keim unterstellt, der schließlich risikoe erhöhend gewertet wurde ([http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scan/out79\\_en.pdf](http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scan/out79_en.pdf)).

Diese Entscheidungen gehen auf ein Grundsatzpapier des SCAN zur Antibiotikaresistenz ([http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scan/out108\\_en.pdf](http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scan/out108_en.pdf)) zurück, das wahrscheinlich von FEEDAP 2005 aktualisiert werden wird. Darin wird die Unterteilung von stabilen im Chromosom verankerten Genen und mobilen Genen im Plasmid oder Transposon als veraltet bezeichnet. Heute müssen alle Antibiotika-Resistenz-Gene vorerst als übertragbar und daher als riskobehaftet angesehen werden. Auch wenn das Gesamtrisiko, das grundsätzlich von einer Verbreitung von Resistenzgenen ausgeht, derzeit nicht quantifiziert werden kann, so ist der Risikograd einer Freisetzung anhand der genetischen Verankerung der Resistenz beurteilbar. Taxonomische Gruppen, die grundsätzlich als resistent gelten, und deren Resistenz nicht in mobilen Elementen lokalisiert ist, werden als risikoarm angesehen. Gehört jedoch ein resistenter Keim einer Gruppe an, die im Allgemeinen als empfindlich gilt, wird das Risiko eines Resistenztransfers erheblich höher eingeschätzt. Wenn hinwiederum die erworbene Resistenz nachweislich auf eine Mutation zurückgeführt werden kann und das Gen von anderen »housekeeping« Genen »eingerahmt« ist, wird das Risiko wieder so gering wie beim Vorliegenden einer immanenten Resistenz. Infolgedessen ist SCAN der Ansicht, dass Bakterien, die eine erworbene Resistenz gegen Human- oder Veterinärantibiotika tragen, als probiotischer Futterzusatz nicht in Frage kommen sollten, vorausgesetzt das Resistenzgen ist gleicher-

maßen fest verankert wie bei grundsätzlich resistenten Stämmen.

### Wirksamkeit

Solange Futtermittel nicht als Mülleimer für jederlei Stoffe gelten, seien diese nur unschädlich in Bezug auf das zu fütternde Tier, Verbraucher, Anwender und die Umwelt, solange bedarf ein Futterzusatzstoff des Nachweises seiner Wirksamkeit. Die Leitlinien sind hier klar und unterscheiden sich nur unwesentlich von denen für chemisch definierte Stoffe. Wirksamkeitsuntersuchungen müssen an der Tierart/kategorie durchgeführt werden, an der der MO Verwendung finden soll. Ein bestimmter Versuchsansatz wird absichtlich nicht empfohlen, damit das Design der wissenschaftlichen Fragestellung angepasst werden kann. Allerdings muss der Ansatz so gewählt werden, dass

Tabelle 2: Mindestdauer von Versuchen zum Wirknachweis an ausgewählten Zieltierspezies/kategorien

Kälber (Mastkälber)	Gesamte Fütterungsperiode bis zur Schlachtung
Kälber (Aufzuchtälber)	Mindestens 6 Wochen von Geburt an
Mastrinder	Gesamte Fütterungsperiode bis zur Schlachtung
Milchkühe (Kriterium Milchleistung)	Mindestens 100 Tage; wenn der Versuch in den ersten 100 Tage der Laktationsperiode durchgeführt wird, soll die gesamte Laktationsperiode berichtet werden
Milchkühe (Kriterium Fruchtbarkeit)	Zwei Abkalbeperioden
Ferkel (Saugferkelbefütter)	Bis zum Absetzen
Ferkel	Vom Absetzen bis zum Erreichen von 25 kg Körpergewicht (oder wie lokal üblich)
Mastschweine	Gesamte Fütterungsperiode bis zur Schlachtung
Sauen (Kriterium Fruchtbarkeit)	Zwei Abferkelperiode
Masthühnerküken	Von Tag 1 mindestens 35 Tage (bis zum Schlachten)
Legehennen	Mindestens 24 Wochen. Wenn Effekte für die gesamte Legeperiode beworben werden, dann die gesamte Legeperiode
Mastputen	Von Tag 1 mindestens 12 Wochen (bis zur Schlachtung)

eine statistische Prüfung der Ergebnisse möglich ist. Das Design soll nach Möglichkeit für alle Versuche gleich gehalten werden, damit die Daten unter Umständen auf Homogenität geprüft und zusätzlich einer gemeinsamen statistischen Auswertung unterzogen werden können. Insgesamt werden pro Zieltierart/kategorie drei Versuche an mindestens zwei verschiedenen Versuchsorten gefordert, in denen das geprüfte Kriterium sich mit  $P < 0,05$  (Ausnahme Wiederkäuer wegen der geringeren Homogenität des Tiermaterials:  $P < 0,1$ ) von den Kontrollwerten unterscheidet. Falls Versuche durchgeführt wurden, in denen ein statistisch gesicherter Unterschied nicht auftrat, sollen diese ebenfalls vorgelegt werden. Eine Übersicht über die geforderte Mindestdauer der Versuche an ausgewählten Tierarten/kategorien gibt Tabelle 2.

Die Kriterien richten sich nach den Absichten des Herstellers/Inverkehrbringers, wie der MO platziert werden soll. Die Leitlinie nennt exemplarisch (i) verbesserte Zunahmen und Futtermittelverwertung der Zieltierart/kategorie, (ii) verringerte Morbidität oder Mortalität (auch messbar an geringeren Arbeits- oder Tierarztkosten), (iii) Nutzen für Verbraucher durch verbesserte Produktqualität (beispielsweise geringerer Cholesteringehalt, geringerer Milchfettgehalt oder reduzierte Kontamination von Geflügel mit human pathogenen Keimen), (iv) Nutzen für die Umwelt (etwa geringere Emissionen aus der Tierhaltung).

### **Sicherheit für das Zieltier**

Hierunter fallen zwei Arten von Untersuchungen, Toleranztests an der Zieltierart/kategorie sowie mikrobiologische Untersuchungen. Die Toleranzstudien – wieder an jeder Zieltierart/kategorie – sollen sicherstellen, dass keine abträglichen Wirkungen auftreten, wenn das Zieltier (versehentlich) die zehnfache Menge der ursprünglich vorgesehenen Höchstdosis des MO aufnimmt. Die Mindestversuchsdauer ist bei schnell wachsenden (Jung) Tieren auf einen Monat angesetzt, für erwachsene Tiere wie etwa Milchkühe werden 3 Monate gefordert. Treten keine Nebenwirkungen der zehnfachen Dosis auf, sind die geforderten Versuchs-

kriterien relativ einfach zu erfüllen. Geprüft/erhoben werden sollen (i) das Auftreten klinischer Symptome, (ii) die Leistungsparameter (unter Umständen auch die Produktqualität (siehe (iii) unter Wirksamkeitskriterien), (iii) Blutuntersuchungen (klinisch chemische Parameter) und (iv) gegebenenfalls – abhängig vom Bestimmungszweck des MO – andere Parameter.

Die mikrobiologischen Untersuchungen beziehen sich zum einen auf das Verhalten des dem Futter zugesetzten MO im Verdauungstrakt des Zieltieres (Überleben im Gastrointestinaltrakt, Ausscheidung des MO auch nach Absetzen). Zum anderen werden Untersuchungen zur Beeinflussung der Darmflora durch den MO verlangt. In den meisten Fällen dürfte es genügen, diese Untersuchungen auf das quantitative Vorkommen von Keimen zu beschränken, die routinemäßig in der Darmflora bestimmt werden und für die Sicherheit relevant sind (beispielsweise fakultativ pathogene Keime einschließlich coliformer Keime, Enterokokken und Clostridien).

### **Sicherheit für den Verbraucher**

Unter Verbrauchersicherheit werden im Allgemeinen die toxikologischen Untersuchungen an Laborieren sowie Stoffwechsel- und Rückstandsstudien am Zieltier subsummiert. Letztere fallen bei MO nicht an. An toxikologischen Daten werden verlangt eine subchronische Toxizitätsstudie (90 Tage) sowie zwei In-vitro-Mutagenitätstests (im Regelfall eine Testbatterie an Bakterien und ein Test an Säugetierzellen). Lässt sich aus den Ergebnissen nicht mit ausreichender Sicherheit auf das Nichtvorhandensein genotoxischer Effekte schließen, fallen im Regelfall weitere Untersuchungen (in vivo) an zwei verschiedenen Säugertierzellarten an.

### **Sicherheit für den Anwender**

Auf die notwendigen Untersuchungen (z.B. Studien zur Haut- und Augenreizung, zur Sensibilisierung der Haut, Effekte bei Einatmung etc.) soll hier nicht weiter eingegangen werden. Wichtig ist, dass die Leitlinien generell bei MO (wie auch bei Enzymen)

ein Allergie-Potenzial unterstellen, solange nicht das Gegenteil bewiesen ist. Es erscheint deshalb klug, bereits früh in der Entwicklung eines MO-Zusatzstoffes entsprechende Formulierungen zu überdenken, welche die Staubbildung minimieren und den Anteil einatembarer Partikel ( $< 10 \mu$ ) möglichst klein halten.

### Sicherheit für die Umwelt

Die meisten MO, die für eine Verwendung als Futterzusatz in Betracht kommen, sind ohnehin »Darmbewohner«, sie wurden häufig aus dem Verdauungstrakt isoliert oder kommen im Boden vor. Die Anzahl der so aufgenommenen MO dürfte ohne Auswirkung auf die Anzahl der fäkal ausgeschiedenen MO bleiben, auch wenn Verschiebungen zwischen den einzelnen Spezies auftreten können. Deshalb wird im Regelfall ein neutraler Umwelteffekt unterstellt, gesonderte Untersuchungen werden nicht als notwendig erachtet. Dies gilt nur dann nicht, wenn die als Zusatzstoff vorgesehenen Keime nicht im Normalfall im Darm oder im Boden vorkommen.

### Künftiges Vorgehen

Bisher fielen Siliermittel und damit auch zur Silierung verwendete MO nicht in den Geltungsbereich europäischer Futtermittel-Rechtsnormen. Für technologische Zusatzstoffe war bisher (nach der eingangs erwähnten Leitlinie 153/87/EG) nur ein (statistisch signifikanter) Wirknachweis im Vergleich zu einem unbehandelten Kontrollfuttermittel vorgesehen.

Nach der ab November 2004 gültigen Verordnung 1831/2003 des Europäischen Parlaments und des Rates über Zusatzstoffe in der Tierernährung gehören allerdings auch Silierzusatzstoffe (»Stoffe, einschließlich Enzyme oder Mikroorganismen, die Futtermittel

Tabelle 3: Definition Futtermittelzusatzstoffe nach VO 1831/2003

**Futtermittelzusatzstoffe: Stoffe, Mikroorganismen oder Zubereitungen, die keine Futtermittel-Ausgangserzeugnisse oder Vormischungen sind und bewusst Futtermitteln oder Wasser zugesetzt werden, um insbesondere eine oder mehrere der in Artikel 5 Absatz 3 genannten Funktionen erfüllen.**

zugesetzt werden, um die Silageerzeugung zu verbessern«) zu der Kategorie der technologischen Zusatzstoffe. In Erwägungsgrund 24 wird zu Silierzusatzstoffen eher lapidar aufgeführt, dass diese Stoffe aufgrund ihrer Beschaffenheit und Verwendung von der vorliegenden Verordnung erfasst werden müssen, gefolgt von: »Dies bietet die Möglichkeit, Informationen über alle derzeit verwendeten Zusatzstoffe zu erhalten und ein Verzeichnis dieser Stoffe anzulegen, sodass in Bezug auf diejenigen Stoffe, die die Zulassungskriterien nach Artikel 5 dieser Verordnung nicht erfüllen, gegebenenfalls Schutzmaßnahmen getroffen werden können«.

Deshalb soll kurz auf diese Verordnung eingegangen werden. In Tabelle 3 findet sich die künftig gültige Definition eines Futterzusatzstoffes.

Der bereits genannte Artikel 5 der VO zählt u.a. auf, was ein Futterzusatzstoff nicht darf und was er können muss (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4: Anforderungen an Futtermittelzusatzstoffe nach VO 1831/2003, Art. 5

#### Der Futtermittelzusatzstoff darf

- sich nicht schädlich auf die Gesundheit von Tier und Mensch oder die Umwelt auswirken;
- nicht in einer Weise dargeboten werden, die den Anwender irreführen kann;
- keinen Nachteil für den Verbraucher durch die Beeinträchtigung der Beschaffenheit der tierischen Erzeugnisse mit sich bringen und darf ihn bezüglich der Beschaffenheit der tierischen Erzeugnisse nicht irreführen.

#### Der Futtermittelzusatzstoff muss

- die Beschaffenheit des Futtermittels positiv beeinflussen;
- die Beschaffenheit der tierischen Erzeugnisse positiv beeinflussen;
- die Farbe von Zierfischen und -vögeln positiv beeinflussen;
- den Ernährungsbedarf der Tiere decken;
- die ökologischen Folgen der Tierproduktion positiv beeinflussen;
- die Tierproduktion, die Leistung oder das Wohlbefinden der Tiere, insbesondere durch Einwirkung auf die Magen- und Darmflora oder die Verdaulichkeit der Futtermittel, positiv beeinflussen oder
- eine kokzidiostatische oder histomonostatische Wirkung haben.

*Tabelle 5:* Kategorien von Futtermittelzusatzstoffen nach VO 1831/2003, Art. 6 mit ausgewählten Funktionsgruppen (Buchstaben a, k und b) aus Anhang 1

- technologische Zusatzstoffe: jeder Stoff, der Futtermitteln aus technologischen Gründen zugesetzt wird;
  - a) Konservierungsmittel: Stoffe oder gegebenenfalls Mikroorganismen, die Futtermittel vor den schädlichen Auswirkungen von Mikroorganismen oder deren Metaboliten schützen;
  - k) Silierzusatzstoffe: Stoffe, einschließlich Enzyme oder Mikroorganismen, die Futtermitteln zugesetzt werden, um die Silageerzeugung zu verbessern;
- sensorische Zusatzstoffe: jeder Stoff, der einem Futtermittel zugesetzt die organoleptischen Eigenschaften dieses Futtermittels bzw. die optischen Eigenschaften des aus den Tieren gewonnenen Lebensmittels verbessert oder verändert;
- ernährungsphysiologische Zusatzstoffe;
- zootechnische Zusatzstoffe: jeder Zusatzstoff, der die Leistung und den Gesundheitszustand von Tieren oder die Auswirkungen auf die Umwelt positiv beeinflussen soll;
  - b) Darmflorastabilisatoren: Mikroorganismen oder andere chemisch definierte Stoffe, die bei der Verfütterung an Tiere eine positive Wirkung auf die Darmflora haben;
- Kokzidiostatika und Histomonostatika.

Die sieben möglichen (zulässigen) Einsatzgebiete von Zusatzstoffen werden in Artikel 6 zu fünf Kategorien zusammengefasst, die in Anhang 1 der VO eine weitere Unterteilung erfahren. Die Kategorien sind zusammen mit den für MO relevanten Funktionsgruppen nach Anhang 1 in Tabelle 5 wiedergegeben.

MO finden sich folglich in der Kategorie »technologische Zusatzstoffe« als Konservierungsmittel oder als Silierzusatzstoff und in der Kategorie »zootechnische Zusatzstoffe« als so genannte Darmflorastabilisatoren.

Der Antrag auf Zulassung eines Zusatzstoffes ist an die Kommission zu richten, diese leitet ihn an die Behörde (EFSA) weiter. Die Behörde soll innerhalb einer Frist von sechs Monaten eine Stellungnahme abgeben. Ist eine Rückfrage an den Antragsteller notwendig, wird die Frist bis zur Vorlage einer Antwort unterbrochen. Die Kommission hat dann drei Monate

Zeit, einen Entwurf zur Beschlussfassung zu erarbeiten, der wieder innerhalb von drei Monaten vom Ständigen Ausschuss für die Futtermittelkette und die Tiergesundheit verabschiedet werden soll.

Die VO hält die Kommission an, Leitlinien für die Zulassung von Zusatzstoffen fest zulegen, erforderlichenfalls für jede einzelne Kategorie von Zusatzstoffen, dabei sollen erleichterte Verfahren für Minor Species, Nichtlebensmittel liefernde Tiere und Lebensmittelzusatzstoffe Berücksichtigung finden. Letzterem Anliegen (Lebensmittelzusatzstoffe) müssen jedoch mehr oder weniger starke Bedenken entgegengebracht werden. So kennt beispielsweise die stringente Handhabung von Antibiotikaresistenzen bei MO für Futterzusatzstoffe keine Parallele bei Lebensmittelzusatzstoffen. SCAN hat in einem Arbeitspapier auf diese Ungleichheit hingewiesen, die im Gegensatz zu den erklärten Wünschen der Kommission stehen dürfte und für die Produzenten vom Tier stammender Lebensmittel sowie die Zusatzstoffhersteller eine offensichtliche Ungerechtigkeit bedeutet ([http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out178\\_en.pdf](http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out178_en.pdf)).

Schließlich ist die EFSA gehalten, detaillierte Anleitungen zur Unterstützung des Antragstellers bei der Erstellung und der Vorlage des Antrags zu veröffentlichen, die wahrscheinlich aber rein formaler Natur sein werden. Soweit der VO-Text. Heute kann davon ausgegangen werden, dass die Kommission eine Art Basisrichtlinie erlassen wird, die einzelnen Richtlinien für die verschiedenen Kategorien der Zusatzstoffe werden von den Panels der EFSA ausgearbeitet. Bis zum Erlass dieser neuen Durchführungsvorschriften (Leitlinien) wird der Antrag gemäß dem Anhang der Richtlinie 87/153/EWG (bzw. RL 2001/79/EG) gestellt, die Richtlinie selbst wird aufgehoben.

Übergangsregelungen sind vorgesehen, alle bisher zugelassenen Stoffe bleiben vorerst marktfähig, wenn der Kommission bis zum 07.11.2004 eine »Mitteilung im Hinblick auf die Evaluierung dieser Erzeugnisse gemacht wurde« (Notifizierung). Für Silierzusatzstoffe, die ja bisher keine Futterzusatzstoffe waren,

sollen dieselben Übergangsregelungen gelten (Erwägungsgrund 24 zur VO 1831/2003). Binnen Jahresfrist soll entschieden sein, ob und inwieweit die einzelnen Notifizierungsanträge anerkannt werden.

### **Spekulativer Ausblick – eine sehr persönliche Meinung**

Besonders in Kreisen, die bisher mit der Beantragung einer Zulassung von Futterzusatzstoffen nicht oder kaum befasst waren, könnte der Eindruck entstanden sein, dass die neuen Verfahren, die so neu gar nicht sind, nicht nur Verteuerung in der Antragstellung sondern auch Knebelung und Fortschrittshemmnis bedeuten. Wahrscheinlich ist mit einer Übergangszeit von mindestens acht Jahren zu rechnen, eine Abänderung der VO in Richtung besserer Praktikabilität sollte dabei nicht ausgeschlossen werden. Die wissenschaftlichen Gremien der EFSA, ohnehin überlastet, werden in der Erarbeitung von Leitlinien auch neue Verfahrensweisen erproben und finden müssen, Gremien überschreitend und in frühem Kontakt mit allen Beteiligten in der Lebensmittelerzeugung. Dies wird den Prozess der Umsetzung neuen Rechts nicht eben beschleunigen. Insofern wird das wirklich Neue erst schrittweise erkennbar werden.

Viele bedauern offensichtlich den Wegfall des nationalen Berichterstatters, dessen Vorprüfung bisher manchen Antrag vor der Einreichung entscheidend verbessern konnte. Andererseits erscheint das neue Verfahren sehr viel Zeit sparender, insbesondere weil die manchmal bis zu zwei Jahre dauernde Prüfung in Ständigen Futtermittelausschuss vor der wissen-

schaftlichen Begutachtung durch den SCAN ebenfalls der Vergangenheit angehören wird.

Unterstellt darf aber auch werden, dass die Mitglieder der wissenschaftlichen Gremien der EFSA optimistisch sind, klare und einfache Regeln zu finden, die ein weiter beschleunigtes Verfahren begünstigen werden. Wenn die Antragsteller sich dann tatsächlich mit den Leitlinien auseinandersetzen, sodass sie diese auch kennen und berücksichtigen, kann von dieser Seite ebenfalls ein wichtiger Beitrag zur schnelleren Abwicklung von Anträgen geleistet werden.

Alle Beteiligten, Antragsteller und genehmigende Behörden, beschreiten Neuland; dieses fruchtbar zu machen, bedarf der gutwilligen Anstrengung aller, weniger der vorauseilenden Nörgelei.

### *Fundstellen*

Richtlinie 70/524/EWG des Rates vom 23.11.1970, ABl. L270 vom 14.12.1970, S. 1

Richtlinie 87/153/EWG des Rates vom 16.02.1987, ABl. L 64 vom 7.3.1987, S. 19

Richtlinie 2001/79 EG der Kommission vom 17.9.2001, ABl. L 267 vom 6.10.2001, S. 1

Verordnung (EG) Nr. 1831/2003 des Europäischen Parlaments und der Rates vom 22.9.2003, ABl. L 268 vom 18.10.2003, S. 29

Council and Parliament Directive 2001/18/EC, OJ EC N° L 106 of 17.04.2001, p. 1.

Council Directive 90/219/EEC, OJ EC N° L 117 of 08.05.1990, p. 1.

### *Anschrift der Autoren*

Universität Leipzig, Veterinärmedizinische Fakultät, An den Tierkliniken 29, 04103 Leipzig

## Diskussion



STEINHART

Sie haben es geschafft, uns einen trockenen Stoff lebendig darzubieten, und auch die Probleme, die in Zukunft auf uns zukommen, zu schildern. Ich glaube, es gibt noch mehr Probleme. Ich beispielsweise komme aus dem Lebensmittelbereich, und da müssen Lebensmittelrecht und Futtermittelrecht harmonisiert werden. Wenn ich jetzt Ihre Ausführungen höre, und das vergleiche mit dem Lebensmittelrecht, dann sind Welten dazwischen, nicht nur in den Definitionen, sondern auch in den Auslegungen. Sie haben das ja mit angesprochen.

ROTH

Eine Anmerkung zum Nachweis der Wirksamkeit. Kann es richtig sein, dass man hier signifikante Versuche verlangt, wenn doch jeder weiß, dass es sehr, sehr schwierig ist, beispielsweise bei Probiotika Signifikanzen wirklich nachzuweisen? Das könnte doch leicht dazu führen, dass man so lange forscht und untersucht, bis es zu einem signifikanten Ergebnis kommt. Legt man hier die Messlatte richtig an?

GROPP

Darüber gibt es sehr unterschiedliche Ansichten. Wir haben auch in FEEDAP, in Barcelona, eine offene Anhörung mit den ganzen Interessenverbänden, Consultants und Vertretern der Industrie gehabt, und natürlich schießt man gegen den Nachweis der Wirksamkeit. Auch das Parlament sitzt in manchen Dingen solchen Einflüsterungen auf, und sagt, über die Wirk-

samkeit kann doch der Markt entscheiden. Herr Roth, es ist natürlich schön, zu sagen: Warum verlangt man Wirksamkeit, wenn man doch weiß, dass sie kaum nachzuweisen ist. Dann frage ich mich, worüber wir eigentlich hier reden. Etwas, dessen Wirksamkeit nicht nachweisbar ist, verdient kaum weitere Gedanken. Fest steht: Niemand hat den Antragstellern vorgeschrieben, was für Versuchsanstellungen sie machen sollen, welche Kriterien sie verwenden. Bisher haben alle, die die unbefristete Genehmigung erreicht haben, diese Hürde auch geschafft. Natürlich soll man die Versuche, die es nicht geschafft haben, Signifikanzen zu erreichen, ebenfalls abliefern. Auch dieses ist dann ein gewisser Hinweis, wie gut, wie sicher etwas wirkt. Es ist kaum zu glauben, dass die Industrie derzeit bei den zu veröffentlichenden Stellungnahmen Druck macht, dass die Berichtskapitel über die Wirksamkeit als vertraulich erklärt werden, weil man sagt, das ist ja für die Konkurrenz nicht uninteressant.

Ich weiß wirklich nicht, wie lange Wirksamkeit überhaupt noch geprüft wird, weil es im politischen Bereich starke Bestrebungen gibt, das abzuschaffen.

Letzter Punkt: Wie weise ich Wirksamkeit für Siliierzusatzstoffe nach? Das wird eine echte Herausforderung sein, und in einem Jahr wissen wir da mehr. Im Augenblick kann Ihnen innerhalb von FEEDAP niemand sagen, wie das gelöst werden wird.

SIMON

Sie haben zur Prüfung der Sicherheit am Zieltier gesagt, es geht auch darum, den Keim im Verdauungs-

trakt nachzuweisen, seine Etablierung und die Persistenz. Nun ist das für manche Keime relativ einfach, aber für manche schier unlösbar, z.B. Enterococcus faecium, da gibt es verschiedene Stämme, die als Probiotika eingesetzt werden. Heißt das, dass die Hersteller jetzt auch eine spezifische Nachweismethode mitliefern müssen?

GROPP

Das ist ein Grundsatz aller vergangenen und bestehenden Richtlinien im Futtermittelzusatzstoff-Bereich, dass es nichts geben darf, was nicht auch nachweisbar ist. Da haben wir die Ausnahme mit den Aromastoffen und Appetitstimulierern. Aber ansonsten ist jeder Antrag immer mit Nachweis versehen. Wenn Sie den nicht nachweisen können, müssen Sie wahrscheinlich in den Antrag schreiben, warum Sie es nicht können. Die Analytik im Futter ist Standard, und inwieweit man das im Tier hinkriegt, wird im Einzelfall zu prüfen sein. Der Keim ist ja in aller Regel etwas Anderes, als der normal im Magen-Darmtrakt vorhandene. Das müsste man in der Ausscheidung auch rauskriegen, z.B. über PCR. Es kann sein, dass der Nachweis guter, gleichwohl vergeblicher Anstrengungen des Antragstellers akzeptiert wird. Wie man das dann wertet, muss man nachher sehen.

FLACHOWSKY

In der Endphase des SCAN hatten wir doch ein Papier gemacht an das Scientific Committee of Food, um gewisse gemeinsame Positionen zu den Prüfkriterien in der Humanernährung einzubringen? Wie ist denn der Rücklauf auf dieses Positionspapier des SCAN?

GROPP

Es gibt ein Papier, »Qualified assumption of safety«. Ich sage das auf Englisch, weil ich vorgestern das ins Deutsche übersetzen sollte in EFSA und es kaum geschafft habe. Denn ein System qualifizierter Sicherheitsvermutungen, das ist das, was wir angeregt haben gegenüber der Kommission, und zwar gleich im Lebensmittel- und Futtermittelrecht.

Das setzt aber voraus, dass man insgesamt Regelungen findet, und was wirklich Safety angeht, zu vergleichenden Standards kommt. Die Reaktion, Herr Flachowsky, war einfach, wir haben ja nie wieder was davon gehört. Mag auch sein, dass dieses Papier in einer Zeit kam, als die Kommission, was die Zusatzstoffe anging, mit der neuen Verordnung beschäftigt war. Aber auch das Committee of Food hat sich nicht damit beschäftigt, und ich weiß nicht, ob Sie jemals dieses Papier gesehen haben, Herr Vorsitzender.

STEINHART

Das habe ich nicht.

SCHUH

Ich hätte eine Frage bezüglich Kräutern, Kräutermischungen, ätherischen Ölen, die werden ja jetzt sehr häufig beprobt, beziehungsweise stehen unter sehr vielen Versuchen. Wir haben leider keine Kriterien, sie laufen derzeit unter Aromastoffen, und nicht unter Futtermittelzusatzstoffen. Wie wird das in Zukunft gehandhabt, weil ja die antibiotischen Leistungsförderer im Jahre 2006 weg sein werden, und man stellt sich vor, dass man die genannten Substanzen dann dementsprechend wirkungsvoll einsetzen kann. Wir haben sehr unterschiedliche Untersuchungsergebnisse bezüglich in vivo- und in vitro-Wirkungen.

GROPP

Aus Zeitgründen, und da es mit Mikroorganismen wenig zu tun hat, sollten wir uns darüber in der Kaffeepause unterhalten.

SPIEKERS

Ich wollte beantworten, was Herr Gropp gesagt hat zu den Siliern und deren Wirksamkeitsnachweis. Ich bin Mitglied der DLG-Kommission »Siliern«, und ich denke, wir haben gerade im Siliernbereich hervorragende Methoden, um die Wirksamkeit zu überprüfen. Die einzige Schwierigkeit, die wir generell haben, ist, dass auch beim Tier nachher zu prüfen, wenn es um Leistungsdaten geht, weil man da Schwierigkeiten hat.

GROPP

Das Tier interessiert nicht in dem Fall. Das ist ein technologischer Zusatzstoff.

SPIEKERS

Aber die anderen Methoden haben wir doch!

GROPP

Wir sind dankbar für jede Hilfe, die wir kriegen können hinsichtlich der Methoden, aber ob 25 Länder das akzeptieren, was die DLG gerade für gut hält, das ist wieder eine ganz andere Sache. Zu den Ölen und Aromastoffen und Appetitanregern hat EFSA im Rahmen der Selbstaufgabenstellung akzeptiert, dass

wir einen Vorabkatalog, also Mutter einer Leitlinie für Aromastoffe und ätherische Öle, machen.

STEINHART

Vielen Dank, Herr Gropp. Ich denke, wir könnten über dieses Thema noch sehr lange diskutieren. Sie haben ja sehr viele Anregungen gegeben, und wir haben gemerkt, dass man das Gebiet nicht genau eingrenzen kann. Es gibt Randbereiche, die die Sache noch komplizierter machen. Ich könnte jetzt auch noch einen Vortrag halten zur Novel Food-Verordnung, in deren Rahmen auch ganz strenge Prüfungen erforderlich sind. Da geht es um eine Notifikation, wo man substantielle Äquivalenzen nachweist, und dann gibt es das Zulassungsverfahren.

# Mikrobiologie der Silierung



Die Notwendigkeit, Tiere ganzjährig mit Futtermitteln zu versorgen, hat schon vor mehr als 3000 Jahren zur Anwendung von Konservierungsverfahren geführt. Wandzeichnungen aus dem alten Ägypten weisen darauf hin, dass bereits 1000 bis 1500 vor Christus Silieren zur Konservierung von Feldfrüchten eingesetzt worden ist (Schukking, 1976). Bis zum heutigen Tag hat sich am Prinzip der Silageherstellung nicht viel geändert, allerdings wissen wir über die Bedeutung der einzelnen Vorgänge viel besser Bescheid. Als Siliergut sind verschiedenste Substrate z. B. Getreide, Kartoffeln, Sonnenblumen, Bananen oder Orangenschalen geeignet; mengenmäßig haben jedoch Gras, Mais und Luzerne mit Abstand die größte Bedeutung (Jonsson, 1989; Wilkinson et al., 1996). Selbst Fisch und Fischabfälle wurden versucht zu silieren, seuchenhygienische Gründe sprechen jedoch gegen einen Einsatz derartiger Futtermittel.

Tabelle 1: Typische Zusammensetzung der Bakterien- und Pilzflora auf Pflanzen vor dem Silieren (Pahlow et al., 2003)

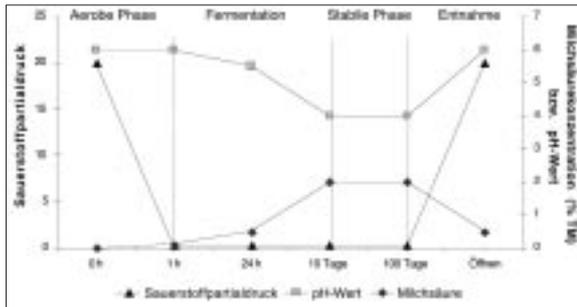
Mikroorganismen	KBE/g
Aerobier, insgesamt	> 10 000 000
Milchsäurebakterien	10 – 1 000 000
Enterobacteriaceae	1000 – 1 000 000
Hefen	1000 – 100 000
Schimmelpilze	1000 – 10 000
Clostridien (Endosporen)	100 – 1000
Bazillen (Endosporen)	100 – 1000
Essigsäurebakterien	100 – 1000
Propionsäurebakterien	10 – 100

Ziel der Silierung ist, ein mikrobiell stabiles Produkt zu erzeugen. Dies gelingt durch die Reduktion des Sauerstoffpartialdruckes im Siliergut auf nahezu »Null«, durch Anreicherung organischer Säuren (insbesondere Milchsäure) und durch Absenkung des pH-Wertes auf ~ 4,0. So einfach dieses Ziel und dessen Realisierung in Worte gefasst werden können, so kompliziert sind die mikrobiellen Vorgänge beim Silierprozess. Dabei gilt es, die dem Siliergut natürlicherweise anhaftende epiphytische Mikrobenflora zu einer stabilen »Silageflora« zu transformieren. Wie aus Tabelle 1 hervorgeht, ist die Diversität der epiphytischen Keimflora außerordentlich hoch. Neben Milchsäurebakterien und Enterobacteriaceae sind regelmäßig Hefen und Schimmelpilze sowie aerobe und anaerobe Sporenbildner auf den Silierpflanzen zu finden. Diese qualitativ und quantitativ äußerst heterogene Keimflora stellt die mikrobiologische Ausgangssituation für den Silierprozess dar, der in vier Phasen eingeteilt werden kann: 1. Aerobe Phase, 2. Fermentationsphase, 3. stabile Phase und 4. Entnahmephase (vergl. Abbildung 1). Die kritischen Bereiche aus mikrobiologischer Sicht sind insbesondere in der aeroben Phase und der Entnahmephase zu sehen.

## Aerobe Phase

Die aerobe Phase umfasst den Zeitraum, von der Silofüllung bis zum Vorhandensein anaerober Verhältnisse im Substrat. Durch Verdichtung und Schließung (Abdeckung) des Silos sowie insbesondere durch die Atmung der Pflanzenzellen und der Mikroorganismen

Abbildung 1: Wesentliche Veränderungen während des Silierprozesses



kommt es zur drastischen Reduktion des Sauerstoffgehaltes binnen weniger Stunden. Dieser Vorgang wird durch eine Erwärmung des Substrates begleitet. Proteasen, vorwiegend pflanzlicher Herkunft, spalten Proteine in Aminosäuren, Carbohydrasen sorgen für die Transformation von Strukturkohlenhydraten zu wasserlöslichen Kohlenhydraten. In dieser Phase ist das Wachstum aerober und fakultativ anaerober Bakterien und Pilze möglich.

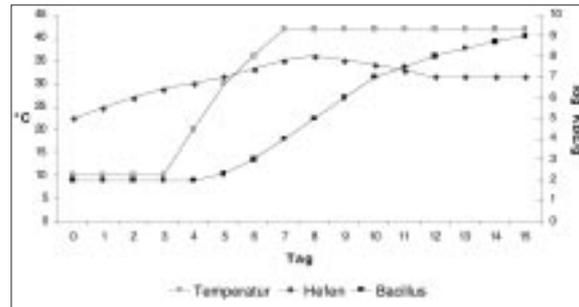
### Fermentationsphase

Streng genommen beginnt die Fermentationsphase wenn anaerobe Verhältnisse im Siliergut eingetreten sind. Unter diesen Bedingungen wachsen Enterobacteriaceae, Clostridien, Bacillus sp., Milchsäurebakterien und Hefen. In dieser Phase muss es u.a. gelingen, die Zahl der Enterobacteriaceae deutlich zu reduzieren und stabile Milchsäurebakterienflora aufzubauen.

### Milchsäurebakterien

Zur Gruppe der Milchsäurebakterien gehören die Gattungen *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* und *Leuconostoc*. Ihnen ist gemeinsam, dass sie aus Glukose Milchsäure bilden können; darüber hinaus können sie Verbindungen mit antibakteriellen Eigenschaften produzieren, z.B. Wasserstoffperoxyd, Kohlendioxid, Diacetyl, Reuterin oder Bakteriozine. Am bedeutendsten für den Si-

Abbildung 2: Mikrobielle Dynamik während der Entnahmephase im Bereich der Öffnungsstelle (Lindgren et al., 1985)



lierprozess ist die Produktion von Milchsäure, was, je nach Spezies, durch homo- oder heterofermentative Gärung geschehen kann (vergl. Abb. 1 und 2). Bei der homofermentativen Gärung entsteht ausschließlich Laktat, bei der heterofermentativen Fermentation wird neben Laktat ein anderes Produkt gebildet z.B. Ethanol. Wichtig ist, dass NADH<sub>2</sub> innerhalb der Substratkette zu NAD oxidiert wird und pro Mol Laktat ein bzw. ein halbes Mol ATP gewonnen werden. Dies ist die Erklärung, warum die Gärungsverluste bei der Herstellung von Silagen relativ gering sind. Auf Futterpflanzen kommen regelmäßig homofermentative, heterofermentative und fakultativ heterofermentative Milchsäurebakterien vor (Tabelle 2).

Tabelle 2: Auf Futterpflanzen und Silage vorkommende Milchsäurebakterien (Holzer et al., 2003; Pahlow et al., 2003)

Genus	Homofermentativ	Fakultativ heterofermentativ	Heterofermentativ
Lactobacillus	L. acidophilus L. helveticus L. plantarum L. pentosus	L. casei L. L. curvatus L. confusus L. fermentum	L. brevis L. buchneri
Pediococcus	P. acidilactici P. pentosaceus		
Leuconostoc	Leuc. Mesenteroides		
Enterococcus	E. faecium		
Lactococcus	Lc. lactis		

Unter letzteren versteht man Milchsäurebakterien, die normalerweise Hexosen homofermentativ zu Milchsäure vergären, unter bestimmten Bedingungen schalten sie auf einen heterofermentativen Stoffwechsel um und produzieren Milchsäure, Kohlendioxid und Ethanol (Holzer et al., 2003). Bestimmte, auch in Silage vorkommende Milchsäurebakterien können allerdings nicht nur aus Hexosen Milchsäure bilden, sondern auch abbauen. Hierzu zählt *L. buchneri*, der aus Milchsäure Essigsäure und 1,2-Propandiol bilden kann (Oude-Elferink et al., 2001). Nach Danner et al. (2003) verbessern höhere Essigsäurekonzentrationen die aerobe Stabilität der Silage. Die Aktivität der Milchsäurebakterien und damit die Geschwindigkeit der pH-Reduktion ist abhängig von der Menge mikrobiell verfügbarer Kohlenhydrate. Dies hängt natürlich wieder von der Struktur des Siliergutes ab. Nach Untersuchungen von Weinberg und Muck (1996) war ein schnellerer Abfall des pH-Wertes beim Silieren von Weizen als von Futterwicke und Luzerne zu beobachten.

#### *Enterobacteriaceae*

Bakterien der Familie *Enterobacteriaceae* sind auf Feldfrüchten weit verbreitet. Arten wie *Pantoea agglomerans*, *Rahnella aquatilis*, *Hafnia alvei*, *Escherichia coli* oder *Serratia fonticola* sind regelmäßig zu isolieren; Keimgehalte von  $10^6$ /g sind selten im Siliergut anzutreffen. Die Stoffwechselleistungen der *Enterobacteriaceae* sind vielfältig; u. a. reduzieren sie einerseits Nitrat zu Nitrit und vergären Hexosen zu Essigsäure, Ameisensäure und Ethanol, was die Vermehrung von Clostridien hemmt bzw. zu einem schnellen Absinken des pH-Wertes im Siliergut führen kann, andererseits bilden sie aus Aminosäuren Ammoniak oder biogene Amine; ersteres erhöht die Pufferkapazität und wirkt damit einer raschen pH-Absenkung entgegen, letzteres beeinträchtigt den Geschmack der Silage (Pahlow et al., 2003). Da sie mit den Milchsäurebakterien um die zur Verfügung stehenden Kohlenhydrate konkurrieren, ist es das Ziel, durch rasche pH-Absenkung die *Enterobacteriaceae* möglichst vollständig zu eliminieren.

#### *Clostridium spp.*

Clostridien sind in der Umwelt weit verbreitet. Gekennzeichnet sind diese gram-positiven Stäbchenbakterien durch einen obligat anaeroben Stoffwechsel und der Bildung von Endosporen. Auch wenn der Gehalt an Clostridien sporen im Siliergut im Vergleich zu dem an *Enterobacteriaceae* oder Milchsäurebakterien gering ist (vergl. Abb. 1), so kann es dennoch bei schlechten Silierbedingungen zu einer Anreicherung dieser Mikroorganismen kommen. Die Folgen vermehrten *Clostridium*-Wachstums sind unterschiedlich. Zum einen kommt es vor allem zu einer vermehrten Bildung von Buttersäure und Essigsäure, was die Schmackhaftigkeit und die Qualität der Silage reduziert. Zum anderen können bestimmte Clostridienarten die Lebensmittelqualität beziehungsweise auch die Tiergesundheit unmittelbar beeinträchtigen. Das Vorkommen von *C. tyrobutyricum* in der Silage hat zur Folge, dass sich dieser Keim im Gastrointestinaltrakt von Kühen weiter vermehrt und fäkale Kontamination der Milch die Käseproduktion beeinträchtigt (Bergère und Sivelä, 1990). Bei bestimmten Käsesorten (z. B. Emmentaler, Gouda, Parmesan) führt *C. tyrobutyricum* zur so genannten späten Blähung; dabei die Käseläuber durch clostridiale Gärprodukte aufgetrieben. Der Milchindustrie entstehen durch unattraktives Aussehen des Käses und durch Geschmacksabweichungen enorme Verluste (Kammerlehner, 1995). Dies

Tabelle 3: Einflussfaktoren auf den Sporengehalt von Silage

Faktor	Wirkung	Clostridiengehalt
Düngung	Nitratgehalt steigt	Sinkt
Einstellung der Schnitthöhe	Reduzierung der Kontamination des Siliergutes mit Erde	Sinkt
Anwelken des Siliergutes	Reduktion des $a_w$ -Wertes	Sinkt
Wenden des Siliergutes	Reduktion des $a_w$ -Wertes	Sinkt
Häckseln	Steigerung der Milchsäurebildung	Sinkt
Gärzusätze	Steigerung der Milchsäurebildung	Sinkt
Verzögerte Siloabdichtung	Langsame Säurebildung	Steigt
Ungeeignete Siloabdichtung	Sauerstoffzutritt, schlechte Säurebildung	Steigt
Silageentnahme	Sauerstoffzutritt	(Steigt)

führt dazu, dass in manchen Gegenden Italiens und der Schweiz die Fütterung von Silage an Milchkühe verboten ist. Darüber hinaus kommt vereinzelt *Cl. botulinum* in Silagen vor, was zu schweren Intoxikationskrankheiten bei landwirtschaftlichen Nutztieren führen kann (Dyson et al., 1997; Jean et al., 1995). Aufgrund der vielfältigen Folgen, die aus einer Kontamination der Silage mit Clostridien resultieren können, ist man bestrebt durch verschiedene Maßnahmen den Gehalt an diesen Mikroorganismen im Siliergut bzw. in der Silage zu reduzieren (vergl. Tabelle 3).

### Stabile Phase

Während der stabilen Phase ist die Aktivität der Mikroorganismen sehr stark eingeschränkt. Säuretolerante Enzyme hydrolysieren Strukturkohlenhydrate zu wasserlöslichen Kohlenhydraten. Proteasen transformieren komplexe N-Verbindungen zu  $\text{NH}_3$ . Die Anzahl der Milchsäurebakterien geht aufgrund des niedrigen pH-Wertes und der Gärungsprodukte um bis zu zwei Zehnerpotenzen zurück. Solange fermentierbare Kohlenhydrate vorhanden sind, ist die Silage haltbar. Normalerweise dauert dies in der Praxis nicht länger als bis zur nächsten Ernte.

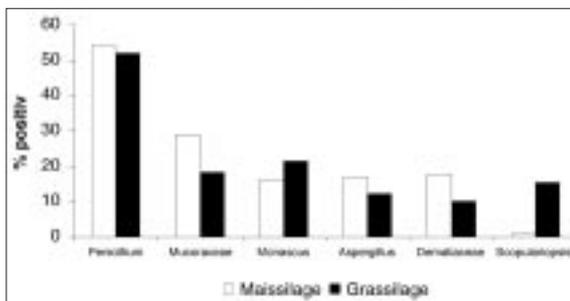
### Entnahme Phase

Mit der Öffnung des Silos dringt Sauerstoff in die Silage ein. Dies führt zur Reaktivierung aerober Mikroorganismen, insbesondere von Hefen, Schimmelpilzen, *Bacillus* sp. und Essigsäurebakterien. Die Folge davon ist, dass es zu einem Anstieg des pH-Wertes im Bereich der Öffnungsstelle kommt, dass Trockenmasse verloren geht, und dass der Nährwert der Silage reduziert wird. Begleitet wird dies durch einen Anstieg der Substrattemperatur (vergl. Abb. 1). Aufgrund des pH-Anstieges kann es im anaeroben Bereich zu einer Vermehrung der Clostridien kommen, deren Sporenbildung dann durch den eindringenden Sauerstoff induziert wird.

### Mikrobieller Verderb von Silage

Am mikrobiellen Verderb von Silage sind in erster Linie Hefen und Schimmelpilze beteiligt. Während

Abbildung 3: Dominante Schimmelpilze in Silagen (Schneweis, 2000)



erstere fast ausschließlich zu einem Verlust an Trockenmasse und damit an Nährwert führen, sind Schimmelpilze zusätzlich in der Lage, Stoffe zu bilden, die die Gesundheit und Leistungsfähigkeit der Tiere beeinträchtigen können. Einer Untersuchung von Schneweis (2000) zufolge dominieren in verdorbenen Silagen vor allem *Penicillium roqueforti*, *Monascus ruber* und *Aspergillus fumigatus*. Darüber hinaus darin sind *Mucoraceae*, *Dematiaceae* und *Scopulariopsis* sp. zu finden (vergl. Abb. 3).

### *Penicillium roqueforti*

*Penicillium roqueforti* ist in der Lage, eine Vielzahl von Sekundärmetaboliten zu bilden. Während PR-Toxin an SH-haltige Aminosäuren gebunden wird und deshalb in Silagen bislang noch nicht nachgewiesen wurde, ist durch aus mit dem Vorkommen von Roquefortin C und Mykophenolsäure zu rechnen. Deren Bedeutung für die Tiergesundheit wird im Folgenden kurz dargestellt.

### Roquefortin C

Roquefortin C ist ein Indol-Alkaloid vom 2,5-Diketopiperazin-Typ und wird außer von *P. roqueforti* noch von einer Vielzahl anderer *Penicillium* Arten gebildet (Cole et al., 1983). Bei einer Untersuchung von 111 verpilzten Gärfuttermittelproben waren 22% mit Roquefortin C kontaminiert, wobei Konzentrationen bis zu 28,15 mg/kg gemessen werden konnten (Tabelle 4).

Tabelle 4: Vorkommen von Roquefortin C in Gärfuttermitteln (Armbruster, 1994)

Gärfutterart	Probenzahl (n)	Positiv		Roquefortin C (µg/kg)	
		N	%	0	Bereich
Maissilage	60	18	30	5470	48 – 28150
Grassilage	20	3	15	278	99 – 584
CCM*	27	2	7	1106	86 – 2127
BWS**	4	1	25	481	
Insgesamt	111	24	22	4250	48 – 28150

\* Corn-Cob-Mix

\*\* Ballenwickelsilage

Zur Toxizität von Roquefortin C liegen sehr widersprüchliche Angaben vor. So variieren die LD<sub>50</sub>-Werte bei der Maus (i.p. Injektion) zwischen 15 und 184 mg/kg (Scott et al., 1976; Arnold et al., 1978). Eine 28-tägige Verfütterung von schimmelgereiftem Käse an männliche Mäuse (tägliche Roquefortin Dosis 238 µg/kg Körpergewicht) führte zu keinerlei Anzeichen einer Vergiftung (Schoch et al., 1984). Demgegenüber wurden neurologische Symptome (u.a. Gleichgewichtsstörungen) nach Verabreichung von Roquefortin (Dosis nicht angegeben) bei Eintagsküken beschrieben (Wagener et al., 1980). Das Auftreten von Inappetenz, Ketose, Mastitis, Paralysen und Aborten in einer Milchviehherde glaubt Häggblom (1990) auf die Verfütterung Roquefortin-C-haltiger Futtermittel zurückführen zu können.

Da die Datenlage unklar ist, haben wir einen Fütterungsversuch mit Schafen (n=18) durchgeführt (Tüller et al., 1998). Die Verabreichung von 10 bzw. 50 mg/Tier und Tag (äquivalent 5 bzw. 25 mg/kg Silage) über die Dauer von 2 Zyklen (34–36 Tage) führte zu keinerlei klinischen Symptomen. Weder das Verhalten der Tiere noch deren Futteraufnahme waren in irgendeiner Form beeinträchtigt. Die klinisch-chemischen (ALT, AST, GLDH, Gesamtbilirubin, Blutzucker) und hämatologischen Parameter (Anzahl der Erythrozyten, Thrombozyten und Leukozyten, Hämoglobin, Hämatokrit) wurden durch die Verabreichung von Roquefortin C nicht in einer dosisabhängigen Weise beeinflusst; alle gemessenen Werte lagen in

den als physiologisch geltenden Bereichen (Kraft und Dürr, 1999). Die Profile von FSH, LH und Progesteron während der Belastungsperiode unterschieden sich unwesentlich von denen der Kontrollperiode. Die Zyklusdauer wurde durch die Verabreichung von Roquefortin C nicht verändert. Allerdings sank der pH-Wert des Pansensaftes der mit Roquefortin C behandelten Tiere (50 mg/Tag) statistisch signifikant um 0,5 Einheiten ab. Die pathologisch-anatomischen und histopathologischen Untersuchungen ergaben keine Hinweise auf Veränderungen, die durch die Verabreichung von Roquefortin C verursacht worden sind. Diese Daten zeigen ganz klar, dass praxisrelevante Roquefortin-C-Mengen keine klinisch relevanten Symptome beim Schaf hervorrufen.

### Mykophenolsäure

Mykophenolsäure ist erstmals 1913 von Alsberg und Black isoliert worden. Diese Verbindung, die unter anderem antibiotische und antivirale Aktivität aufweist, wird außer von *P. roqueforti* auch noch von *P. stoloniferum* und *P. brevicompactum* produziert (Cole und Cox, 1981; Frisvad und Thrane, 1996).

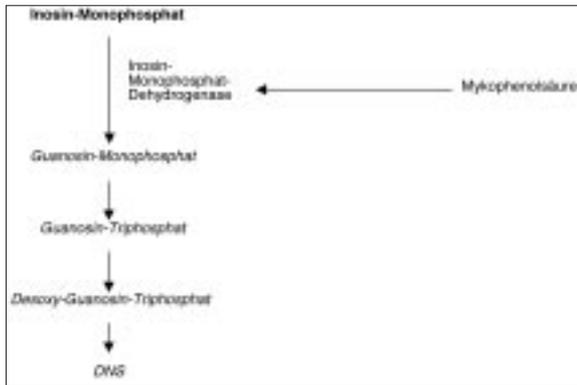
Den Untersuchungen von Schneweis et al. (2000) zufolge sind schlechte Silagen häufig mit Mykophenolsäure kontaminiert. Tabelle 5 zeigt, dass in 32 % der Proben Mykophenolsäure nachweisbar war, wobei als Höchstgehalt 35 mg/kg gefunden wurden.

Mykophenolsäure weist eine relativ geringe akute Toxizität auf und zeigt keine hepatotoxische, nephrotoxische oder neurotoxische Wirkung (Sievers et al., 1997). Die Besonderheit von Mykophenolsäure liegt in ihrer selektiv immunsuppressiven Wirkung. Diese

Tabelle 5: Vorkommen von Mykophenolsäure in Silagen (Schneweis et al., 2000)

Gärfutterart	Probenzahl (n)	Positiv		Mykophenolsäure (µg/kg)	
		N	%	0	Bereich
Maissilage	135	38	28	690	20 – 23000
Grassilage	98	36	37	2200	21 – 35000
Insgesamt	233	74	32	1400	20 – 35000

Abbildung 4: Wirkung von Mykophenolsäure im Purinstoffwechsel



Verbindung ist ein hochwirksamer Hemmstoff der Inosin-Monophosphat-Dehydrogenase (IMP-Dehydrogenase), die unter anderem ein wichtiges Schlüsselenzym der DNS-Synthese in proliferierenden Zellen darstellt. Die nichtkompetitive, reversible Hemmung der IMP-Dehydrogenase blockiert die Synthese von Guanosin-Monophosphat (GMP), das normalerweise zu Guanosin-Triphosphat (GTP) phosphoryliert und anschließend zum Desoxy-Molekül (dGTP) umgewandelt wird. Dieses wird durch die DNS-Polymerase als dGMP in die DNS eingebaut. Wegen der Bedeutung der Guanosin-Nukleotide bei der DNS-Synthese hemmt der Mangel an GMP - und infolgedessen auch an GTP und dGTP - die DNS-Synthese und wirkt somit antiproliferativ (vergleiche Abbildung 4). Da die B- und T-Zellpopulationen des Immunsystems die Puringerüste nicht »recyclen« können, sind sie stärker als andere Zellarten auf die de-novo-Synthese angewiesen, so dass die hemmende Wirkung von Mykophenolsäure bei diesen am stärksten zur Geltung kommt (Fulton und Markham, 1996).

Zusätzlich hemmt Mykophenolsäure den Einbau von Mannose und Fucose in Proteine und damit die Glykoproteinsynthese. Dadurch können wichtige Adhäsionsmechanismen beeinflusst und die Produktion von Zytokinen inhibiert werden (Fulton und Markham, 1996; Laurent et al., 1996; Weigel et al., 1999).

Aufgrund der ausgeprägten immunsuppressiven Wirkung wird Mykophenolsäure in Form von Mykophenolat-Mofetil unter dem Namen CellCept<sup>®</sup> in Kombination mit Cyclosporin und Kortikoiden in der Humanmedizin zur Verhinderung von akuten Transplantatabstoßungen eingesetzt.

Die geschilderten Sachverhalte lassen keinen Zweifel, dass Mykophenolsäure ein hochwirksames Immunsuppressivum ist, das natürlicherweise auch in Silagen vorkommt. Bei Untersuchungen an Schafen, denen bis zu 300 mg/Tag über einen Zeitraum von 44 Tagen verabreicht worden war, konnten wir keine Beeinträchtigung des Allgemeinzustandes feststellen. Weder das Blutbild noch klinisch chemische Parameter wurden durch die Applikation von Mykophenolsäure signifikant beeinflusst (Mohr, 2003). Allerdings konnten wir eine immunmodulatorische Wirkung (Niederregulierung der Expression des Fc-Rezeptors in der Leber, Hochregulierung des Polymeren Immunglobulin-Rezeptors in Ileum und Leber) feststellen (Dzidic et al., 2004). Auch histologische Veränderungen am Thymus und den retropharyngealen Lymphknoten wurden beobachtet. Diese ersten Resultate weisen darauf hin, dass zumindest hohen Mykophenolsäurekonzentrationen in der Silage Beachtung geschenkt werden muss.

#### *Monascus ruber*

*Monascus ruber* gehört mit zu den in Silagen am häufigsten nachweisbaren Schimmelpilzen. Diese Spezies ist in der Lage, sekundäre Stoffwechselprodukte wie z. B. Monaculin K oder Citrinin zu bilden.

#### Citrinin

Citrinin ist als *Aspergillus*- und *Penicillium*-Toxin bekannt. Erst kürzlich wurde entdeckt, dass auch *Monascus ruber* Citrinin bilden kann (Blanc et al., 1995). Es handelt sich dabei um ein die Nieren schädigendes Toxin, das Enzyme der Atmungskette sowie Malat- und Glutamatdehydrogenasen und den ATP-Synthetasekomplex hemmt. In Silage kommt Citrinin nicht so häufig vor wie Mycophenolsäure oder Monacoline. Nur 14 von 233 Proben wiesen

dieses Mykotoxin auf (Schneewis et al., 2001). Da nur geringe Konzentrationen gefunden wurden (maximal 0,064 mg/kg), ist davon auszugehen, dass kaum schädigende Wirkungen zu erwarten sind.

### Monacolin K

Monacolin K kommt in Silagen als Säure (Monacolin K<sub>A</sub>) oder als Lakton (Monacolin K<sub>L</sub>) vor. Nach Schneewis et al. (2001) wiesen ca. 20% von 233 qualitativ als schlecht eingestuftem Mais- und Grassilagen Monacolin K<sub>A</sub> und/oder Monacolin K<sub>L</sub> auf, wobei Konzentrationen bis zu 65,4 mg/kg gemessen wurden. Die Bedeutung von Monacolin K für die Leistungsfähigkeit von Rindern ist noch nicht klar einzuordnen. Monacolin K<sub>A</sub> ist strukturell dem Hydroxymethylglutaryl-Coenzym A ähnlich und hemmt deshalb die 3-Hydroxymethylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase, die ein Schlüsselenzym in der Mevalonatsynthese darstellt (Endo, 1980). Damit hemmt Monacolin K<sub>A</sub> nicht nur die Sterolsynthese in Säugerzellen und die Stigmasterolsynthese in Pflanzenzellen sondern auch die Squalen- bzw. Ergosterinsynthese in Pilzen. Eigene Untersuchungen haben gezeigt, dass mit Monacolin K<sub>A</sub> das Wachstum anaerober Pansenpilze in dosisabhängiger Weise gehemmt wird. Es ist bekannt, dass Cellulose abbauende, anaerobe Pansenpilze (z.B. *Neocallimastix sp.*) eine wichtige Rolle im Pansenstoffwechsel spielen (Orpin und Joblin, 1997). Eine Reduktion dieser Spezies bzw. eine Hemmung der Stoffwechselaktivität dürfte zu einer schlechteren Verdauung der Rohfaser führen.

### Zusammenfassung

Die Notwendigkeit, Tiere ganzjährig mit Futtermitteln zu versorgen, hat schon vor geraumer Zeit zur Entwicklung von Konservierungsverfahren geführt. Gemälde aus dem alten Ägypten weisen darauf hin, dass bereits 1000 bis 1500 vor Christus Siliertechniken zur Haltbarmachung von Feldfrüchten eingesetzt worden sind. Das Wort Silo leitet sich vom griechischen Wort »siros« ab, womit ein Erdloch zur Aufbewahrung von Getreide bezeichnet wurde.

Der Silierung liegt ein komplexes Zusammenspiel biologischer Prozesse zu Grunde, an dem vor allem

Milchsäurebakterien der Gattungen *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* und *Lactococcus* beteiligt sind. Aus mikrobiologischer Sicht lässt sich der Silierprozess in vier Phasen einteilen:

Die erste Phase umfasst den Übergang des Siliergutes vom aeroben zum anaeroben Status. Erzielt wird dies durch die mechanische Verdichtung, durch Sauerstoff verbrauchende pflanzliche und mikrobielle Stoffwechselprozesse, sowie durch luftdichte Abdeckung des Siliergutes. In der zweiten Phase findet die eigentliche Fermentation statt, die je nach Art und Beschaffenheit des Siliergutes eine bis mehrere Wochen dauern kann. Diese Silierperiode wird von heterofermentativen Mikroorganismen (meist epiphytische Bakterien der Familie Enterobacteriaceae) eingeleitet, die kurzkettige flüchtige Fettsäuren bilden. Durch die damit verbundene pH-Absenkung werden nach und nach die Enterobakterien gehemmt und es bildet sich eine Milchsäurebakterienflora aus. Äußeres Zeichen der Fermentation sind die Produktion von Silogasen und Siliersaft sowie eine gleichzeitige Schrumpfung der Silomasse. Wenn aufgrund der pH-Absenkung und der Erschöpfung der mikrobiell nutzbaren Nährstoffe der Fermentationsprozess abklingt, findet der Übergang in die dritte, die sogenannte stabile Phase statt. Diese ist durch reduzierte enzymatische und mikrobielle Aktivitäten gekennzeichnet. Die Anzahl der Milchsäurebakterien geht um etwa drei Zehnerpotenzen zurück. Der mikrobiell stabile Status der Silage wird durch das Öffnen des Silos in einen labilen Zustand überführt. Sauerstoff gelangt durch die Anschnittfläche in die Silage (bis zu einem Meter) und ermöglicht das Wachstum unerwünschter Mikroorganismen (z.B. Hefen, Schimmelpilze und Essigsäurebakterien). Dies kann zu einer Verminderung des Milchsäuregehaltes, einem Anstieg des pH-Wertes und einem deutlichen Abfall des Nährwertes führen. Darüber hinaus ist mit der Bildung von Stoffen zu rechnen, welche die Gesundheit und Leistungsfähigkeit der Tiere beeinträchtigen können. Aufgrund der in Silagen herrschenden Bedingungen ist *Penicillium roqueforti* häufig am Verderb beteiligt; diese Schimmelpilzart bildet u. a. Mykophenolsäure, ein bekanntes

Immunsuppressivum. *Monascus ruber*, eine ebenfalls in Silage häufig anzutreffende Pilzart, produziert u.a. Monacolin K; diese Verbindung hemmt kompetitiv die 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-Reduktase und beeinträchtigt damit die Aktivität Rohfaser abbauender Pansenpilze (z.B. *Neocallimastix spp.*).

#### Literaturverzeichnis

Alsberg C.J., Black O.F. (1913): US Dept. of Agriculture, Bureau of Plant Industry, Bull. No. 270.

Armbruster G. (1994): Futtermittelhygienische Untersuchungen von Silagen: Nachweis und Vorkommen des Mycotoxins Roquefortin. Diss. Med. Vet., Ludwig-Maximilians-Universität München.

Arnold D.L., Scott P.M., McGuire P.F., Harwig J., Nera E.A. (1978): Acute toxicity studies on roquefortine and PR-toxin, metabolites of *Penicillium roqueforti*, in the mouse. Food Cosmet. Toxicol., **16**, 369–371.

Blanc P.J., Loret M.O., Goma G. (1995): Production of citrinin by various species of *Monascus*. Biotechnology letters, **17**, 291–294.

Bergère J.L., Sivelä S. (1990): Detection and enumeration of clostridial spores related to cheese quality – classical and new methods. Bulletin of the IDF, **251**, 18–23.

Cole R.J., Cox R.H. (1981): Handbook of toxic fungal metabolites. Academic Press, New York.

Cole R.J., Dorner J.W., Cox R.H., Raymond L.W. (1983): Two classes of alkaloid mycotoxins produced by *Penicillium crustosum* THOM isolated from contaminated beer. J. Agr. Food Chem., **31**, 655–657.

Danner H., Holzer M., Mayrhuber E., Braun R. (2003): Acetic acid increases stability of silage under aerobic conditions. Appl. Environm. Microbiol., **69**, 562–567.

Dyson S., Marr C.M., Barr T.J. (1997): Equine botulism. Vet Rec. **141**, 56.

Dzidic A., Mohr A., Meyer K., Bauer J., Meyer H.D.H., Pfaffl M.W. (2004): Effects of mycophenolic acid (MPA) treatment on expression of Fc receptor (FcRn) and polymeric immunoglobulin receptor (pIgR) mRNA in adult sheep tissues. Croatian Med. J., **45**, 130–135.

Endo A. (1980): Monacolin K, a new hypocholesterolemic agent produced by *Monascus* species. Journal of Antibiotics, **32**, 852–855.

Frisvad, J.C., Thrane U. (1996): Mycotoxin production by food-borne fungi. In: Samson, R. A.; Hoekstra, E. S.; Frisvad, J. C.; Filtenborg, J.: Introduction to food-born fungi. 5th edition, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Delft, 251–260.

Fulton, B., Markham A. (1996): Mycophenolate Mofetil: A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and clinical efficacy in renal transplantation. Drugs, **51**, 278–298.

Häggbloom P. (1990): Isolation of roquefortine C from feed grain. Appl. Environ. Microbiol. **56**, 2924–2926.

Holzer M., Mayrhuber E., Danner H., Braun R. (2003): The role of *Lactobacillus buchneri* in forage preservation. Trends in Biotechnology, **21**, 282–287.

Jean D., Fecteau G., Scott D., Higgins R., Quessy S. (1995): Clostridium botulinum type C intoxication in feedlot steers being fed ensiled poultry litter. Can. Vet. J., **36**, 626–628.

Jonsson A. (1989): The role of yeasts and Clostridia in silage deterioration. Diss. Swedish University of Agricultural Sciences, Rapport 42.

Kammerlehner, J. (1995) Butyric acid fermentation in cheese throughout the year? Measures for avoiding late blowing. Deutsche Milchwirtschaft, **46**, 903–908.

Kraft W., U.M. Dürr U.M. (1999): Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin. Schattauer-Verlag, Stuttgart, New York.

Laurent A.F., Dumont S., Poindron P. (1996): Mycophenolic acid suppresses protein N-linked glycosylation in human monocytes and their adhesion to endothelial cells and some substrates. Experimental Hematology, **24**, 59–67.

Lindgren S., Pettersson K., Kaspersson A., Jonsson A., Lingvall P., (1985): Microbial dynamics during aerobic deterioration of silages. J. Sci. Food Agric., **36**, 765–774.

Mohr A. (2003): Untersuchungen zur Analytik und zum »carry over« von Mycophenolsäure beim Schaf. Diss. Med. Vet., Ludwig-Maximilians-Universität München.

Orpin C.G., Joblin K.N. (1997): The rumen anaerobic fungi. In: Hobson P.N., Stewart C.S. (eds), The rumen microbial ecosystem. Blackie Academic & Professional, London, 140–195.

Oude-Elferink S.J.W.H., Krooneman J., Gottschal J.C., Spoelstra S.F., Faber F., Driehuis F. (2001): Anaerobic conversion of lactic acid to acetic and 1,2-propanediol by *Lactobacillus buchneri*. Appl. Environ. Microbiol., **67**, 125–132.

Pahlow, G., R.E. Muck, F. D. Driehuis, S.J.W.H. Oude Elferink, S.F. Spoelstra (2003): Microbiology in ensiling. In: Silage Science and Technology. Agronomy Monograph no. 42, 31–93.

Schneweis I., (2000): Futtermittelhygienische Untersuchungen von Silagen: Nachweis und Vorkommen von Monacolinen, Citrinin und Mycophenolsäure. Diss. Agr., Technische Universität München.

Schneweis I., Meyer K., Hörmansdorfer S., Bauer J. (2000): Mycophenolic acid in silage. Appl. Environ. Microbiol., **66**, 3639–3641.

Schneweis I., Meyer K., Hörmansdorfer S., Bauer J. (2001): Metabolites of *Monascus ruber* in silages. J. Anim. Physiol. a. Anim. Nutr., **85**, 38–44.

Schoch, U., Lüthy J., Schlatter C. (1984): Subchronische Toxizitätsprüfung von schimmelgereiften Käsen. Z. Lebensm. Unters. Forsch., **179**, 99–103.

Schukking I.S. (1976): The history of silage making. Stikstof, **19**, 2–11.

Scott P.M., Merrien M.-A., Polonsky J. (1976): Roquefortine and isofumiclavine A, metabolites from *Penicillium roqueforti*. Experientia, **32**, 140–142.

Sievers T.M., Rossi S.J., Ghobrial R.M., Arriola E., Nishimura P., Kawano M.K., Holt C.D. (1997): Mycophenolate Mofetil. Pharmacotherapy, **17**, 1178–1197.

Tüller G., Armbruster G., Wiedenmann S., Hänichen T., Schams D., Bauer J. (1998): Occurrence of roquefortine in silage – toxicological relevance to sheep. J. Anim. Physiol. a. Anim. Nutr., **80**, 246–249.

Wagner R.E., Davis N.D., Diener U.L. (1980): Penitrem A and roquefortine production by *Penicillium commune*. Appl. Environ. Microbiol., **39**, 882–887.

Weigel G., Bertalanffy P., Dubsy P., Giesmacher A., Wolner E. (1999): Mycophenolic acid influences T helper 2 (Th2) cytokine induced expression of intercellular cell adhesion molecule-1 (ICAM-1) on human endothelial cells. Clin. Chem. Lab. Med., **37**, 253–257.

Weinberg Z.G., Muck, R.E. (1996): New trends and opportunities in the development and use of inoculants for silage. FEMS Microbiol Rev., **19**, 53–58.

Wilkinson J.M., Wadephul, F., Hill J. (1996): Silage in Europe – A Survey of 33 Countries. Chalcombe Publications, Painshall, Church Lane, Welton, Lincoln LN2 3LT, United Kingdom, ISBN 0 948617 33 0

## Diskussion



KNEIFEL

Es ist ja bekannt, dass bei einigen Stämmen von *Monascus*, speziell bei für Farbstoffe interessanten Purpureus-Stämmen, einige Citrininbildner dabei sind. Wie schaut das aus bei Ihren Stämmen, die Sie geprüft haben. Könnte das nicht auch ein Problem in Bezug auf die Mycotoxinbildung sein?

BAUER

Natürlich haben wir auch die Silagen im Hinblick auf das Vorhandensein von Citrinin untersucht. Ich kann Ihnen versichern, es gibt wenig Citrinin in den Silagen, wo viel *Monascus* ist. Es ist so wenig, dass man es meiner Meinung nach toxikologisch vernachlässigen kann. Es ist viel mehr Monacolin vorhanden als Citrinin.

GÄBEL

Ich bin kein Fachmann auf Ihrem Gebiet, aber wenn ich mir anschau, was Sie präsentiert haben, ist das ja praktisch völlig identisch mit den Vorgängen, denen wir als Tierärzte bei der Pansenazidose begegnen, sowohl was die Produktionen, als auch, was das Kippen der Mikroorganismen angeht. Allerdings sind mir bei Ihrem Vortrag heute zwei Dinge aufgefallen, wo es auseinander klappt.

Das Eine ist, Sie haben diese Bakterien sehr statisch dargestellt und haben gesagt, die können das und machen nichts Anderes. Bei den Pansenbakterien weiß man, dass die ihre Fermentation sehr nach den Umwelteinflüssen einstellen, und das ist das Redoxpotenzial und der pH-Wert. Zum Beispiel ist die Initi-

alzündung für die Pansenazidose die pH-Absenkung, die die Laktatdehydrogenase dann aktiviert. Wenn Sie Ihre heterofermentativen Bakterien angucken, könnte ich mir vorstellen, dass dort auch so etwas passiert.

Das Zweite ist: Bei Ihrer sukzessiven Laktatfermentation fiel mir auf, dass die Propionsäure fehlte, und das ist ja das klassische Endprodukt bei den Pansenbakterien. Ist das so oder gibt es da Erklärungen für die Divergenzen?

BAUER

Fangen wir mit der 2. Frage an. Natürlich gibt es auch Mikroorganismen in der Silage, die Propionsäure bilden, beziehungsweise die auch in der Lage sind, aus Essigsäure dann Propionsäure zu synthetisieren. Es gibt viele Möglichkeiten, die habe ich aus Gründen der didaktischen Reduktion weglassen müssen. Auf der anderen Seite sehen die Mikrobiologen immer den Stamm, und der Stamm kann bestimmte Eigenschaften, d.h. nicht die Spezies. Man kann von einem Mikroorganismus sagen, der kann dies und das bilden, aber es ist ganz klar, dass hier Induktionen stattfinden über die Umwelt, und ich habe auch ganz kurz erwähnt, dass es fakultativ heterofermentative Keime gibt. Das sind genau die, die in bestimmten Umweltsituationen dann vom homofermentativen auf heterofermentativen Stoffwechsel umschalten.

SCHUH

Ich komme wieder zurück auf den *Monascus* rubber. Wir haben sehr interessante Fälle, wo wir makro-

skopisch bei der Silage das sehr schön diagnostizieren können, und die Schweine in der Mast neigen dann zu Leberzirrhosen, beziehungsweise Fibrosierung der Leberzellen. Ich habe gesehen, dass sehr hohe Konzentrationen notwendig sind, um eben diese Veränderungen wahrscheinlich auszulösen. Gibt es hier experimentelle Studien, dass man sagen kann, Monacolin in der und der Konzentration hat auch klinische Relevanz im Bereich der Schweinemast?

BAUER

Ich kenne keine Studien, die aufzeigen, dass hier speziell beim Schwein solche Erscheinungen auftreten. Ich denke, ich habe das zwei- oder dreimal nebenbei auch angesprochen und beschrieben. Man könnte ganz einfach einen Versuch machen. Diese Substanz ist in der Apotheke zu erhalten, das macht das Ganze billig. Bei anderen Versuchen, z.B. dem Versuch mit Mycophenolsäure, hat allein die Mycophenolsäure ungefähr 50.000 – 70.000 € gekostet. Deswegen gibt es auf dem Sektor sehr wenige Untersuchungen an landwirtschaftlichen Nutztieren. Aber das wäre mal eine Untersuchung wert.

ROTH-MAIER

Zu meinem Vorredner in der Diskussion: Ich denke, es gibt auch deswegen wenig Versuche in der Schweinemast bezüglich dieser Substanzen, weil in Deutschland Schweinemast mit Silage überhaupt nicht üblich ist, weil es völlig unwirtschaftlich ist.

Jetzt zu meinen Fragen: Was ist die genaue Ursache, dass Clostridien empfindlich sind gegen höhere Trockenmasse-Gehalte?

Warum können die Clostridien wieder wachsen, wenn die Silage herausgenommen wird und aerobe Verhältnisse entstehen? Wie ist es möglich, dass Clostridien auf dem epiphytischen Keimbesatz sind, da sie doch eigentlich obligat anaerob sind?

BAUER

Frage Nr. 1: Das Warum kann ich Ihnen nicht beantworten, aber ich kann Ihnen das Dass beant-

worten. Aus experimenteller Erfahrung, wo man unterschiedliche Aw-Werte getestet hat, stellt man fest, dass Bakterien bei unterschiedlichen Aw-Werten gerade noch wachsen können, z.B. Salmonellen oder Coli-Keime wachsen bei Aw-Werten von 0,99, 0,98. Die Clostridien waren eben in dem Bereich, den ich angegeben habe, gerade noch in der Lage, zu wachsen. Die Laktobazillen wachsen einfach bei niedrigeren Aw-Werten und die Staphylococci sogar noch bei 0,88 in etwa.

Die Clostridien wachsen, weil sie als Sporen vorhanden sind, und nicht in der vegetativen Form. Sie versporen dort und die Spore keimt wieder aus, wenn sie günstige Bedingungen hat.

STEINHART

Herr Bauer, bei den Enterobacteriaceen haben Sie den Abbau Nitrat-Nitrit gezeigt, und da fehlt mir die nächste Stufe, nämlich die Nitrosamine. Hat man nachgeguckt, ob Nitrosamine da vorkommen?

Eine 2. Frage: Bei den Lebensmitteln spielen ja sensorische Einflüsse immer die größte Rolle für die Akzeptanz. Jetzt haben Sie hier eine Mixtura von allen möglichen Mikroorganismen drin, die zahlreiche Synthesen produzieren können. Da sind sicherlich auch sensorisch aktive Verbindungen drunter, und wahrscheinlich auch solche, die die Tiere nicht so gerne mögen. Gibt es Untersuchungen, inwiefern solche sensorischen Parameter Einfluss nehmen auf die Akzeptanz dieser Silagen?

BAUER

Fangen wir mit der letzten Frage an: Es gibt tatsächlich Untersuchungen über die Aufnahme von Silagen unterschiedlicher Qualität durch Wiederkäuer. Wir haben eine Studie mit Frau Kienzle zusammen gemacht, die dies geprüft hat. Wir haben aber nicht Ausschau gehalten nach speziellen Verbindungen, sondern es ging um den mikrobiellen Status. Und zwar den mesophilen Keimgehalt, also nur ein kleines Spektrum von den Keimen, die wir anzüchten können. Es war in der Tat so, Silagen, die wir als verdorben eingestuft haben, sind widerwilliger auf-

genommen worden als es normalerweise bei guten Silagen der Fall ist.

Zur 1. Frage, Nitrosamine, ist mir nichts bekannt.

STEINHART

Noch folgende Bemerkung: Es wäre vielleicht eine interessante Fortsetzung der Silageforschung, sich mal mit diesen sensorischen Dingen zu beschäftigen. Im Heintierbereich spielt die Sensorik offensichtlich doch eine große Rolle bei der Akzeptanz von Futtermitteln.

KRAMER

Sie haben den Enterobakterien beim Beginn der Silierung eine relativ große Rolle zugeteilt für die pH-Wert-Absenkung. Mich wundert das ein wenig, wenn ich mir die Endprodukte anschau, eben Essigsäure

und Ameisensäure. Ist es nicht so, dass das nur dann passieren kann, wenn relativ wenig geeignete Milchsäurebakterien vorhanden sind, die den pH-Wert rasch ansteigen lassen?

BAUER

Es ist natürlich immer abhängig von der Zusammensetzung der Keimflora. Man darf aber nicht vergessen, dass die Enterobacteriaceen auch unter aeroben Bedingungen wachsen können, was die Milchsäurebakterien nicht können. Das heißt, die haben schon einen gewissen Vorteil in der ersten Phase, und je nachdem, wie schnell sie die anaeroben Bedingungen dann schaffen, kommen die Milchsäurebakterien dazu. Einmal kommen die Milchsäurebakterien, ein anderes Mal die Enterobacteriaceen etwas schneller dran.

# Developments in silage making and silage research in The Netherlands



## Silage making in The Netherlands

The main crops used in dairy farming systems in The Netherlands are grass and forage maize. Permanent grassland represents about 97% of the total grassland area and almost exclusively is constituted of perennial ryegrass. About 10 million tonnes of grass dry matter is produced annually. Grassland production in The Netherlands is characterized by a high N-fertilization rate (on average 250 kg N from fertilizer per ha), a high annual yield (10–12 tonnes of dry matter per ha) and harvesting or grazing at a young growth stage (2–3 tonnes per ha). Grass is cut for silage on average two times per year. In 2000 grass silage production was 4.3 million tonnes of dry matter. There are large differences between European countries with respect to the popularity of silage making and ensiling methods practised. In The Netherlands

about 95% of harvested grass is preserved as silage and 5% as hay. In most European countries silage making is less popular than in The Netherlands (Figure 1). For example, in Germany about 80% is preserved as silage, whereas in France this value is about 20%.

A characteristic of grass silage production in The Netherlands is intensive pre-wilting during a short period, usually about 24 h. As a result, the typical dry matter concentration of grass silage is high. In the last decade, the annual average varied between 450 and 500 g/kg, which is substantially higher than in other European countries (Table 1). For comparison, the typical dry matter concentration in Germany is 350 g/kg, and in the UK 250 g/kg. The use of silage additives in The Netherlands is low in comparison with other European countries (Table 1). In The Netherlands, on average 5 to 10% of the grass silages is treated with an additive. This value is estimated to be 25% in Germany and 30% in the UK. Biological

Figure 1: Estimated production of grass silage, maize silage and hay in different countries in 2000 (data partly taken from ref. 1).

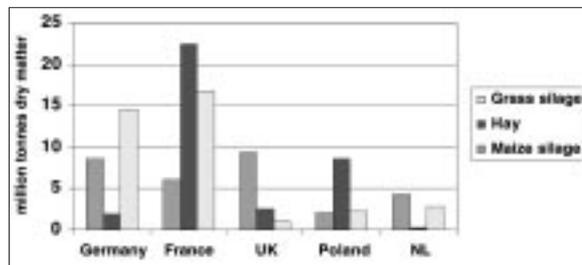


Table 1: Estimated typical dry matter concentration of grass silage and additive use in grass silage making in different countries in 2000 (data partly taken from ref. 1).

	Dry matter (g/kg)	Additive use (%)
Germany	350	25
France	270 to 350	10
UK	250	30
Poland	220 to 280	12
The Netherlands	450 to 500	5

additives, bacterial cultures in particular, are the most popular type of additive in almost all countries, including The Netherlands and Germany.

Maize is the second most popular silage crop in The Netherlands. About 3 million tonnes of maize is conserved as whole crop maize silage annually. Germany and France are responsible for more than 50% of the maize silage production in Europe (Figure 1).

### The silage fermentation process

The main principles of preservation by ensilage are a rapid achievement of a low pH by lactic acid fermentation and the maintenance of anaerobic conditions. The ensiling process can be divided into four phases (3). The first phase, the initial aerobic phase, usually takes only a few hours as atmospheric oxygen trapped in the ensiled mass is rapidly reduced due to the respiratory activity of plant material and (facultative) aerobic micro-organisms. The second phase, the fermentation or acidification phase, starts when the ensiled mass has become anaerobic, and continues for several days to several months, depending on crop properties and ensiling conditions. During this phase different groups of micro-organisms capable of anaerobic growth (lactic acid bacteria, Enterobacteriaceae, clostridia, and yeasts) compete for available nutrients. In well-preserved silage, lactic acid bacteria rapidly dominate the fermentation, the result being a decrease in pH due to the accumulation of lactic acid and, to a lesser extent, acetic acid formed from sugars. The third phase, the storage phase, usually lasts several weeks to a year or longer. As long as the pH is sufficiently low and penetration of air into the silage is excluded, relatively little occurs during this phase. Some acid-tolerant micro-organisms (e.g. some yeast species) survive this period in an almost inactive state, others, such as clostridia and bacilli, survive as spores. The fourth phase, the feed-out or aerobic deterioration phase, starts when the silage becomes exposed to air.

### Silage quality problems

Silage quality problems can be divided in two types, anaerobic instability and aerobic instability (3). An-

aerobic instability results from insufficient acidification and generally relates to crop composition (e.g. concentrations of dry matter, fermentable sugars and nitrate and buffering capacity). Lactic acid-consuming clostridia, *Clostridium tyrobutyricum* in particular, are the main spoilage causing micro-organisms associated with this type of quality problem. A typical »clostridial silage« is characterized by a high pH and high levels of butyric acid, ammonia and amines. Aerobic instability results from exposure of the silage to O<sub>2</sub>, causing proliferation of different groups of undesirable micro-organisms. Acid-tolerant yeasts, capable of oxidizing the preservative acids in silage, are recognized as the most important group responsible for the onset of aerobic instability. As the oxidation reactions proceeds, the pH rises and other undesirable micro-organisms, such as moulds and bacilli, start to proliferate too. Exposure to air is inevitable after the silo is opened, but aerobic deterioration processes often start already during the storage phase, for instance due to damage to the silage plastic and because silage plastics are not completely airtight. The extent of O<sub>2</sub> penetration depends mainly on the porosity and density of the material and the rate of silage removal.

### Clostridia spores in silage: the current situation in The Netherlands

For many years, the risk of growth of clostridia in silage, *C. tyrobutyricum* in particular, was the main driver for research efforts and technological innovations in the field of silage making. Clostridial fermentation

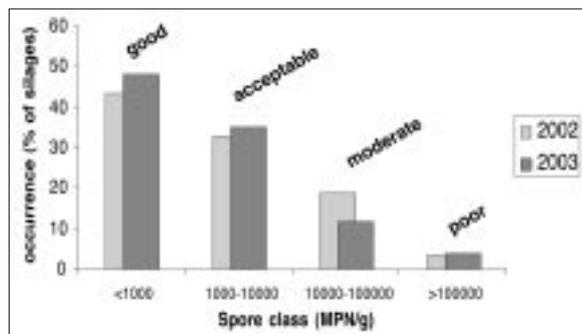
Figure 2: Example of late-blowing of Gouda cheese (right).



not only causes significant loss of the silage nutritional value, but also results in high levels of spores. These spores survive passage through the cow's intestinal tract and are excreted via the faeces. Contamination of raw milk can take place via faeces-contaminated udders that are insufficiently cleaned prior to milking. The spores survive pasteurization of milk. Even low levels of *C. tyrobutyricum* spores in milk cause off-flavours and excessive gas formation, so-called late-blowing, in semi-hard cheeses such as Gouda (Figure 2). Since maize was considered an ›easy-to-ensile‹ crop and a minor source of clostridia spores, research focused on grass silage.

In The Netherlands milk supplies of farmers are analyzed monthly for the presence of spores of lactic acid-consuming, gas-forming clostridia (butyric acid bacteria (BAB)). Farmers receive a penalty on the milk price when the concentration of BAB spores exceeds a limit value. Since the introduction of this system in The Netherlands 22 years ago a significant reduction of the average contamination level of BAB spores in raw milk has occurred. The percentage of milk supplies with a BAB penalty decreased between 1982 and 1990 from about 5% to about 1.5%. This was mainly due to improvements in mechanisation and techniques for making wilted grass silage and increased awareness of farmers.

Figure 3: Concentration of BAB spores in grass silage produced in The Netherlands in 2002 and 2003.



A side effect of these achievements was, however, that silage research declined in priority. Interest in silage research revived in The Netherlands recently. The main drivers were, firstly, data indicating that since a few years the average contamination level of BAB spores in raw milk slowly increased and, secondly, the increased focus of the food industry on quality and safety. In a research programme carried out by NIZO food research for the Dutch dairy industry, a survey has been conducted to investigate the microbiological and chemical composition of silages produced at dairy farms in 2002 and 2003. In 4% grass silage samples the concentration of BAB spores exceeded  $10^5$ /g, defined as ›poor‹, and in 16–23% samples it was between  $10^4$  and  $10^5$ /g, defined as ›moderate‹ (Figure 3). BAB spores had increased more than 10–100 fold in these silages, since the level immediately after harvesting is less than  $10^3$ /g. Interestingly, no correlation between BAB spores and dry matter concentration was observed (Figure 4). In fact, for the majority of ›poor‹ and ›moderate‹ silages dry matter exceeded 350 g/kg, a concentration above which theoretically no growth of BAB is expected. In addition, no correlation between BAB spores and pH and between BAB spores and the ammonia-N fraction was observed (not shown). This is in line

Figure 4: Concentration of BAB spores as a function dry matter concentration in grass silage produced in The Netherlands in 2002 (n=160).

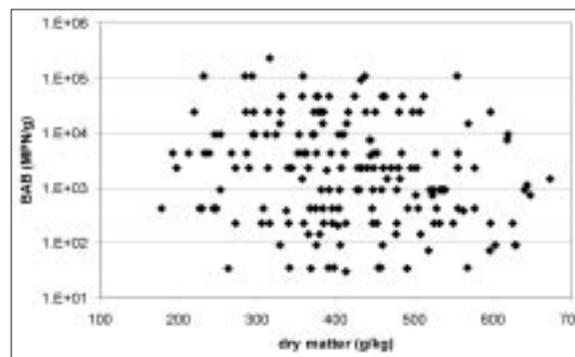
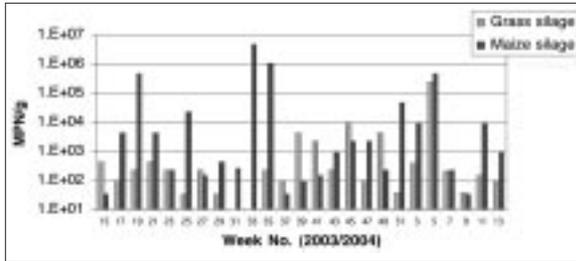


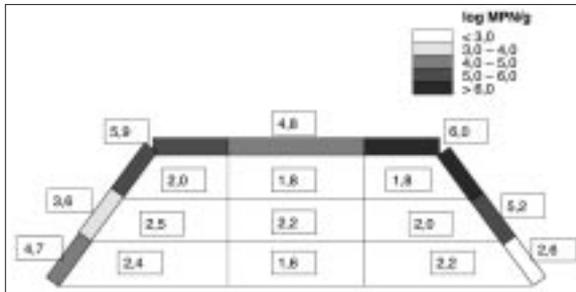
Figure 5: Concentration of BAB spores in samples taken from the open front of grass and maize silages during feed-out at a dairy farm. Multiple silages were fed during the monitoring period (April 2003 to April 2004).



with results of earlier studies by Spoelstra et al. (4), who found good correlations between BAB spores and chemical parameters such as pH and ammonia-N in laboratory-scale silages, but poor correlations in farm-scale silages. Our hypothesis is that heterogeneity of farm silages with respect to BAB concentration plays an important role in these observations.

The importance of heterogeneity was confirmed by analyses of silage clamps during the feed-out phase. The BAB spore concentration of samples taken at different time points after opening showed a large variation, from about  $10^2/g$  to almost  $10^7/g$  (Figure 5). Surprisingly, this was observed not only for grass

Figure 6: Concentration of BAB spores in samples taken from the surface layer and central area of the open front of maize silage during feed-out at a dairy farm (front view).



silage but also for maize silage. Peak values occurred even more frequently and were even higher in maize silage than in grass silage.

Analysis of the distribution of the spores in opened silages indicated that in many cases BAB spore concentrations were significantly higher in the surface layer than in the central area of the front. An example of this phenomenon is depicted in Figure 6, which shows the distribution of BAB spores in the front side of a regular whole crop maize silage clamp. High spore concentrations, up to  $10^6/g$ , were detected at different positions in the surface layer. Further research indicated that surface layers with high BAB spore concentrations usually showed signs of aerobic instability, *i.e.* a high pH and a high concentration of yeasts and moulds.

### Conclusions and discussion

The results of these investigations indicated that:

- 20–25 % of grass silages produced in 2002 and 2003 had a concentration of BAB spores higher than  $10^4/g$ ; the majority of these silages had a dry matter concentration higher than 350 g/kg;
- maize silage is an important source of BAB spores;
- BAB spores accumulate in aerobically instable outer layers and moulded spots.

An unexpected finding was that the occurrence of high levels of BAB spores in Dutch silages seems to be associated more often with aerobic instability problems rather than with anaerobic instability problems. Growth of clostridia, which are strictly anaerobic bacteria, in aerobically instable surface layers may seem a contradiction. However, though aerobic micro-organisms dominate the microflora of these layers, it is plausible that anaerobic micro-spots or niches occur also. The rise in pH and temperature associated with aerobic deterioration probably create environmental conditions favourable to *C. tyrobutyricum* in these niches.

The most likely causes for these problems are insufficient consolidation and/or sealing of silages. It is unknown why the problem hasn't been recognized

earlier. A possible explanation is that there may be a relation with the increase in capacity of harvesting machinery in recent years. This increase may have lead, on average, to a decrease in the time spent for consolidation and sealing of silages.

Future research will focus on, firstly, the evaluation of practical measures for prevention of aerobic instability problems, for instance increasing silage density in surface layers and use of special silage additives, and, secondly, creating awareness among farmers and contractors.

#### References

1. Wilkinson, J.M. and M.I. Toivonen. 2003. *World silage*. Chalcombe Publications. Welton, UK.
2. Stadhouders, J. 1990. Prevention of butyric acid fermentation by the use of nitrate. *Bulletin of the International Dairy Federation*. 251: 40 – 46.
3. Pahlow, G., R.E. Muck, F. Driehuis, S.J.W.H. Oude Elferink and S.F. Spoelstra. 2003. Microbiology of Ensiling. In: *Silage Science and Technology* (Eds. D.R. Buxton, R.E. Muck and J.H. Harrison). Agronomy Monograph 42. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, and Soil Science Society of America. Madison, WI.
4. Spoelstra, S.F. 1990. Comparison of the content of clostridial spores in wilted grass silage ensiled in either laboratory, pilot-scale or farm silos. *Neth. J. Agric. Sci.* 38: 423 – 434.

## Diskussion



SCHWARZ

Coming to your last conclusions: What would you recommend the farmers to interrupt this problem with BAB-spores and so on?

DRIEHUIS

We see this relation with aerobic instability, and also notice that in these poor layers the consolidation was very poor. It was loose material. It seems that the poor compaction of these silages is simply the reason why at least these layers are so instable, and probably also the reason that these Butyric Acid Bacteria start to grow. Probably this does not only occur in the endphase, I mean, the feed out phase, but probably already earlier during the storage phase. During the storage phase we have some oxygen penetration into the silage already. That gives these Butyric Acid Bacteria, these Clostridia, more time to grow, because they need time. They need a high pH, they need the lack of oxygen, but they also need time, because they are very slow growers. The other organisms involved in aerobic instability grow much faster. So, we have calculated, that you need about 2 weeks or so to go from 100 spores to 1 Million spores. There must be a long incubation period.

What can farmers do? Now we think that the poor consolidation, the poor compaction, the low density of the grass- and of the maize-silage in particular forces this, and what we wonder is, whether this has changed in the recent years. Is the situation that we experience now, different from 5–10 years ago? We

think so. We think that this may be the reason why the percentage of milk deliveries with too much spores goes up again.

We think that trends taking place in agriculture, with a higher and higher capacity of machinery, result in less and less attention in silage making, less and less intention to good compaction and taking enough time for compaction and good sealing, and that might be a reason why this is now occurring more and more.

ROTH-MAIER

You spoke about the penalty system you have in the Netherlands. Could you just shortly explain how this penalty system works, that you can identify the so called bad farmers who had contaminated milk?

DRIEHUIS

The system works so that farmers are tested six times during the winter period. Samples were taken from the milk tank, the milk that they delivered to the milk industry, and it was analysed for butyric acid bacteria with a very simple method. This just gives an indication of »higher« or »lower« than a certain value. If they are higher than that limit value, they get a penalty. If it is just at that critical value, then the analysis will be repeated. And if it is high again, they get a penalty. But it is a very rough analysis for this. Since this year, the system will be changed, and they will analyse it through the whole year, not only in the winter period, but also in the summer period, which is quite logical, if you see this.

ROTH-MAIER

And what is done with the penalized milk?

DRIEHUIS

It's too late for measures, because analysis takes 4 days, then the milk is already in the cheese factory.

ROTH-MAIER

And afterwards? With these farmers, which are producing this milk, what is done?

DRIEHUIS

If they have this penalty, they will be analysed the next time again, 2 weeks or 4 weeks later, and the farmer is kindly asked to do something else, take hygiene measures or take another silage, or whatever.

But because it costs him a lot of money, he probably will do so.

JANKNECHT

Ich hätte eine Frage zu den letzten Untersuchungen auf dem Betrieb. Sie haben gesagt, Sie haben Proben genommen an der Frontseite des Silos, und es ist ja bekannt, dass wir mit dem Eintritt des Sauerstoffs die Reaktionsfolge auslösen. Je weiter wir in das Silo hineinkommen, umso geringer sind die Probleme. Sind dort auch Proben im Abstand 1 m, 2 m, 3 m von der Frontseite gezogen worden? Die Frage zielt aus pragmatischer Sicht darauf, was der Landwirt machen kann. »Verdichtung« ist eine Sache, die andere die angepasste Silogröße auf dem Betrieb.

DRIEHUIS

There are more measures possible, because it's not only the consolidation, the compaction, it's also the feeding rate, controlling aerobic instability. Another possibility is the use of special silage additives which reduce the risk of aerobic instability. But that should not be the primary measure. The primary measure should be, make a good silage first. But to answer the first part of your question, we do not take samples at different depths of the silage. We just took the material that was in front, and one hour later was moved to the cows.

KNEIFEL

I should like to come back to the distribution of the clostridia within the silage package. May be, there could be some theory behind this and may be this theory is based on a methodological artefact which could be caused by the following phenomenon: If you consider the surface layer of the silage, there are the clostridia and they react against the oxygen by the production of spores. If you put the sample from there, going to the NPN, you have to perform heat treatment to perform the NPN-Test. During the treatment you kill the vegetative cells, and only the spores survive. So you get many positive results from the spores, but if you go to the inner core of the silage package you have more or less vegetative cells, and you are going to kill the vegetative cells by the NPN-Test. So, this could be the reason to have a lower count inside than outside, but in fact the total count, if you compare vegetative cells with the spores, could be the same.

DRIEHUIS

You are correct, that we analyse spores, we do not analyse vegetative cells. And, of course, there must be a step that the spores germinate and grow and, in the end, sporulate again, but we don't have any indication that in the centre of the material there are a lot of vegetative cells. If it would be, you would expect some butyric acid, for instance. We do heat treatment on all samples. That's the classical way of measuring spores.

The reason, we think, is, that in the surface layer the spores, may be due to the oxygen, also probably due to the increasing pH, start to germinate, grow and sporulate again, and in the central part you do not necessarily have high numbers of vegetative cells.

SAUERWEIN

All your approaches to solve the problem in the cheese were so far focussed on the silage itself. Would you see any chance to tackle the problem via increasing milking hygiene. The numbers Prof. Bauer was talking about, about 1 g of faecal contamination

in 100 l of milk. That sounds to me quite big. Would you think that is an absolute minimum or would there be an hygienic approach to come to lower numbers?

DRIEHUIS

Hygiene during milking is very important. If you can prevent the transfer of the faeces completely, then there wouldn't be any problem. But you can never, at least in the practical situation, prevent that for 100 % by taking hygiene measures. There has been an estimation that the difference between perfect hygiene and poor hygiene during milking is only a factor 10 in spore content. And your range in spores in silage is much greater. It's from hundreds to a few millions. Therefore, we think, we should tackle the problem there, but we do never forget about good hygiene.

KRAMER

In your samples you measured the amount of Clostridia spores.

Did you also measure the butyric acid and acetic acid, and was there a correlation between the values?

DRIEHUIS

In this survey in which we analysed the grass silage we did also butyric acid measurements. I didn't show them.

In the silage with a high content of spores you can find a correlation. These silages also have a high butyric acid content, but in the intermediate groups you find poor relation. You find silages with 100000 spores, but no butyric acid. Probably the way the samples are taken, and all these things, can interfere with it.

KRAMER

That is what we also find, because the occurrence of spores does not always mean, that they are active and can produce butyric acid.

DRIEHUIS

The butyric acid of course, is a product of the vegetative cell, and the spore itself doesn't produce it any more.

SCHUH

You mentioned mycotoxin and mold contamination of your grass silage. Which mycotoxins are you analysing for, and have they any clinical relevance in dairy production, concerning milk yield, infertility problems, etc?

DRIEHUIS

This part of the work that I showed today, is about spores and the contamination of milk with spores. But we have indeed another project. We look at the occurrence of mycotoxins in silages and any possible transfer to milk. What we concluded was that DON = Deoxynivalenol and Zearalenon are the most relevant and the most frequently occurring mycotoxins in grass- and maize silage, but they are not transferred to the milk, at least at a very low rate fraction. And with respect to milk quality there is no problem for these mycotoxins, which, by the way, do not result from ensiling, they come from the field.

And we hope to do some work in the future on the silage mold, on typical silage mycotoxins, like roquefortin and monacolins.

METGES

In one of your slides you showed the disappearance of BAB-spores along the observation weeks, and what I was very astonished about was that the disappearance was observed within 2 weeks.

So, you had quite a reduction of about 80 % of the spores within 2 weeks. What would be a possible explanation for that?

DRIEHUIS

I think these are just artefacts of the sampling. It indicates, it shows, more or less, that there is a lot of heterogeneity in the silages, that probably explains this high variation.

It is a problem of doing this kind of research in practical situations.

STEINHART

You used the BAB as a sort of biomarker, if I understood your investigations correctly. And you

showed us also, that the theory is quite different from what you found in practice, and I think we discussed one point which can probably explain this difference, namely the depth of the sample.

May be there is another explanation we didn't discuss until now. What happens, if the temperature changes during silage preparation? I think this is also, may be, an important point, which can influence the flora of this silage.

Have you any experience on what happens if temperature changes or on the influence of temperature?

DRIEHUIS

Now, what is known, is, that these BAB, these clostridia have a growth optimum of, I think, 30°C, so that would help, if heat is produced during aerobic instability. But first the pH has to rise above the critical value, and then the increasing temperature only helps.

## Erfahrungen mit Mikroorganismen in der Silierung



Vor exakt 20 Jahren bot sich schon einmal die Gelegenheit anlässlich der Hülsenberger Gespräche zum Thema Futterkonservierung zu referieren. Seitdem hat sich genug Neues auf diesem Sektor getan, um auch ein zweites Mal bei dieser Veranstaltungsreihe von eigenen oder in der Literatur beschriebenen Erfahrungen mit Mikroorganismen bei der Silierung zu berichten (Pahlow et al., 2003). Beide Vorträge haben bzw. hatten biologische Siliermittel zum Hauptgegenstand. Die damaligen Präparate zielten vorrangig auf eine Verbesserung des Gärverlaufes von Silagen. Mit den heutigen, speziell weiterentwickelten Mitteln wird nun auch eine gezielte Verhinderung des aeroben Verderbs angestrebt. Das war damals ausschließlich mit chemischen Zusätzen möglich. Ich war übrigens bei einem Blick in den Tagungsband selbst gespannt, was denn wohl von der 1984 in meinem Vortrag gestellten Ausgangsfrage sowie von den Schlussfolgerungen auch heute noch gültig ist.

Damals hatte ich in meiner Einleitung gefragt, ob die Anwendungspraxis mit einem Anteil von nur 10 % behandelter Silagen, den prinzipiellen Wirkungsmöglichkeiten insbesondere der biologischen Siliermittel angemessen wäre. Meine abschließende Antwort darauf lautete, und ich zitiere jetzt den Schlussabsatz meines Vortrages im Wortlaut:

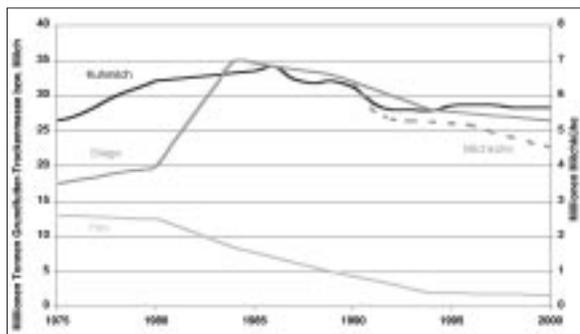
*»Die Wirkungsvoraussetzungen für die neuen, biologischen Mittel werden vom Nährstoff- und Feuchtegehalt der meisten Silagen erfüllt. Hier scheint bei sachgemäßer Anwendung und zugegebenermaßen einem hohen*

*Basisniveau der Siliertechnik eine künftige Chance für Qualitäts- und Effektivitätsverbesserungen im Grundfutterbereich zu liegen«.*

Wie Sie sehen hatte ich schon vor 20 Jahren einen positiven Gesamteindruck von den biologischen Zusätzen und auch heute besteht für mich kein Anlass, von dieser Perspektive abzuweichen. Man muss allerdings nüchtern feststellen, dass unser damals formuliertes Qualitätsziel bislang nur von der Spitzengruppe rinderhaltender Betriebe erreicht wurde. Es ist daher unbedingt erforderlich, den eingeschlagenen Weg weiter zu verfolgen. Diese Sicht möchte ich mit einigen Daten zum Entwicklungsfortschritt seit den 10. Hülsenberger Gesprächen belegen.

Ausgehend von den 70-er Jahren erfolgte mit einem Maximum in der Mitte der 80-er Jahre etwa eine Verdopplung der Silageproduktion auf 35 Millionen Tonnen Trockenmasse. Das geschah über Jahre vorwiegend auf Kosten von Heu. (Abb. 1). Gleichzeitig stieg der durchschnittliche Energiegehalt des Gärfutters um beachtliche 8 Zehntel MJ NEL/kg TM an, vor allem durch erheblich früheren Schnitt bei Gras und entscheidende Züchtungsfortschritte bei Silomais. Nur deshalb können wir heute trotz weitgehend unveränderter Pansenkapazität genug an artgerechter Silage an unsere Wiederkäuer verfüttern, um damit Leistungen jenseits der 10000 l-Marke bei Milchkühen und tägliche Zunahmen von mehr als einem Kilogramm bei Mastvieh zu erzielen. Die hierzu erforderlichen Qualitätsverbesserungen sind auch den

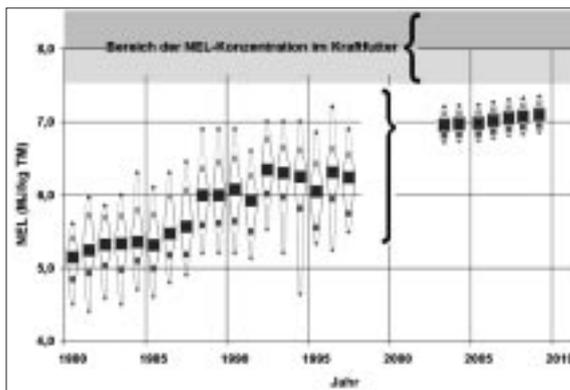
Abbildung 1: Entwicklung der Heu-, Silage- und Milchproduktion sowie der Milchviehbestände



biologischen Siliermitteln zuzuschreiben, deren strategischer Einsatz in erfolgreichen Betrieben einfach dazugehört. Dabei geht es darum, nicht etwa schlechte Silagen akzeptabel, sondern gute Silagen noch besser zu machen. Damit wurden diese Produkte zu einer Art »Siliermittel für Fortgeschrittene«.

Auch dieser Zusammenhang wurde bereits in dem Vortrag vor 20 Jahren dargestellt, konnte damals jedoch vorwiegend mit Versuchsdaten aus den USA belegt werden. Dort waren zusätzliche Versteinsparungen selbst in der überschaubaren Größenordnung von 3 bis 6% der Trockenmasse (TM) vor allem für solche Landwirte interessant, die ohnehin bereits Siliertechnik auf hohem Qualitätsniveau praktizierten. Im Hinblick darauf ergeben sich gewisse Parallelen zur Spitzengruppe unserer hiesigen Milchproduzenten, deren Erfolg darauf beruht, die quotenabhängig zulässigen Mengen mit möglichst wenigen Kühen, jedoch bei maximaler tierindividueller Leistung zu erzeugen und dafür auch »fine-tuning« zu betreiben. Gelingen kann dies, wie bereits erwähnt, nur mit strukturwirksamem Grundfutter bester Qualität auch unter Ausschöpfung aller durch geeignete Siliermittel erzielbaren Verbesserungen. Durch systematische Steigerung der Energiedichte konnte die Silageerzeugung bei nahezu konstanter Milchproduktion in den letzten Jahren mengenmäßig sogar leicht zurückgehen, ohne die Differenz vollständig über Kraftfutter schlie-

Abbildung 2: Perspektiven der Qualitätsentwicklung von Grassilagen (1. Schnitt) bis 2010



ßen zu müssen. Diesen Zusammenhang belegen achtzehnjährige Auswertungen meines FAL-Kollegen Dr. Klaus Walter aus dem Institut für Betriebstechnik und Bauforschung für Grassilagen aus dem ersten Schnitt, von denen die allerbesten schon seit Jahren den Wert von 7 MJ NEL/kg TM erreichen bzw. überschreiten. Die Verbesserungen betragen über diesen Zeitraum in den 70 untersuchten Betrieben ziemlich stetig jeweils 1 bis 2 Prozentpunkte gegenüber dem Vorjahr.

Seine Prognose für den Zeitraum bis 2010 lässt in der Spitzengruppe Silagen erwarten, die in ihrem Energiewert Kraftfutter nahe kommen. Dazu müssten allerdings die Hauptursachen für mindere Qualität, vor allem der falsche Schnittzeitpunkt durch eine treffsichere Vorab-Qualitätsanalyse zuverlässig ausgeschlossen werden. Die praktischen Voraussetzungen für diesen Schritt in Richtung »precision farming« sind in Form der NIRS-Technik gegeben und werden u.a. in der Reifeprüfung Grünland auch bereits für die Praxis verfügbar gemacht. Wenn es dadurch gelänge, praktisch nur noch Silagen höchster Qualität zu erzeugen, ließen sich nach WALTER damit über 8.000 l Milch allein aus dem Grundfutter gewinnen.

Tabelle 1 zeigt anhand einer aktuellen Auswertung den prozentualen Anteil der Hauptfutterarten, die derzeit mit Siliermittelzusatz bereitet werden.

Tabelle 1: Aktueller Stand des Siliermitteleinsatzes (Wilkinson und Toivonen, 2003)

Futterart	% Silagen mit Siliermittelzusatz		
	Chemisch	Biologisch	Gesamt
Mais	3	10	13
Gras	5	20	25
Leguminosen	25	25	50

Die für die Silagebereitung als aktiver Bestandteil von Siliermitteln genutzten Mikroorganismen lassen sich sinnvoll in zwei Gruppen teilen:

### Gruppe I

Impfzusätze aus **Milchsäurebakterien** (Lactobacillus, Pediococcus, Enterococcus, Lactococcus)

### Gruppe II

Impfzusätze aus **sonstigen Mikroorganismen** (Propionibacterium, Bacillus, Serratia, Phagen, »Killer-Hefen«)

### Gruppe III

Eine weitere Entwicklung, die in den letzten Jahren spürbar an Bedeutung gewonnen hat, sind Mischungen aus **Milchsäurebakterien und Chemikalien**. Da diese Komponenten prinzipiell keinen Direktkontakt vertragen, erfordert Ihre Handhabung spezielle Schutzmaßnahmen.

Am bedeutendsten sind unverändert die Präparate der Gruppe I. Sie bestehen aus einer oder mehreren der o.g. vier Milchsäurebakteriengattungen. Ihr Anteil an den biologischen Siliermitteln beträgt ca. 90%. Die Auslese und Weiterentwicklung geeigneter Arten und Stämme orientiert sich bis heute an folgendem Katalog wünschenswerter Merkmale eines optimalen Silageimpfzusatzes. Die Ursprünge dieser Liste stammen aus den 60er Jahren. Seitdem wurde sie mehrfach ergänzt (Tab. 2).

Natürlich erfüllt kein Einzelstamm all diese Kriterien gleichzeitig. Außerdem hat sich durch neuere Erfahrungen die Einschätzung bestimmter Merkmale

Tabelle 2: Merkmale eines optimalen Impfstammes zur Silagebereitung

- Homofermentativer Gärungstyp
- Weites Gärspektrum verwertbarer Kohlenhydrate
- Rasches Säuerungsvermögen und pH - Toleranz bis <4
- Große Temperaturtoleranz von 5 bis 50 °C
- Hohe Vermehrungsrate und Durchsetzungsvermögen gegen vorhandene Flora
- Wachstum bei geringer Wasserverfügbarkeit (Osmotoleranz)
- Kein Eiweißabbau über den Eigenbedarf hinaus
- Säurebildung auch schon unter aeroben Bedingungen
- Hemmwirkung auf Hefen und Schadbakterien
- Gute Haltbarkeit als gefriergetrocknetes Produkt

geändert. Daraus ergeben sich für die Produktoptimierung des Jahres 2004 durchaus Abweichungen von Tabelle 2, u. a. bei dem an erster Stelle genannten homofermentativen Gärungstyp.

Nennenswerte Verbreitung in der landwirtschaftlichen Praxis erlangten die Produkte aus MSB erst zu Beginn der 80er Jahre als sie in gefriergetrocknetem Zustand verfügbar wurden. Die meisten gibt es sowohl zur Trocken- als auch zur Flüssigapplikation. In der Praxis hat sich speziell in den Großbetrieben erfreulicherweise die Flüssigvariante durchgesetzt. Als kleinvolumiges Konzentrat abgepackt lässt sie sich auch problemlos im normalen Kühlschrank lagern, wodurch Aktivitätseinbußen sicher vermieden werden. Das ist bei 25-Kilo-Säcken mit streufähigem Granulat kaum möglich. Der generelle Einsatzzweck und die Funktionsweise dieser Produktgruppe in Form einer Gärungsverbesserung durch höhere Säuerungsgeschwindigkeit kann inzwischen als bekannt vorausgesetzt werden.

Vergleichsweise neu sind dagegen die Erkenntnisse über osmotolerante MSB sowie das spezielle Wirkungsprinzip heterofermentativer MSB.

### Osmotoleranz von Milchsäurebakterien

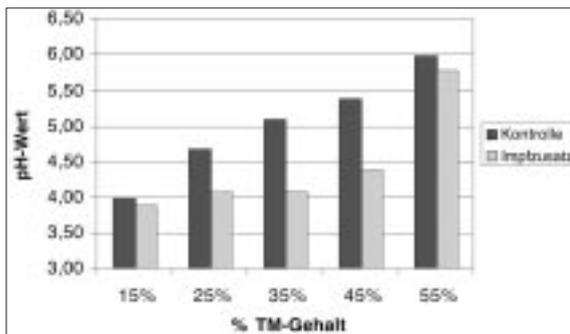
Mit Osmotoleranz wird die besondere Eignung von Impfzusätzen auch für TM-reiches Siliergut gekennzeichnet (Pahlow und Weissbach, 1996). Dies Merk-

mal ist für Anwelksilagen äußerst wichtig, wurde aber bei der Auswahl geeigneter Silagestämme ursprünglich nicht ausreichend beachtet. Das hat folgende Gründe:

1. Natürlicherweise kommen MSB vor allem auf Milch- und Fleischprodukten vor, sowie auf pflanzlichen Geweben mit Saftaustritt. Feuchtemangel existiert dort praktisch nie. Auch Stämme für Siliermittel, die zunächst im Labor ausgewählt wurden, stammen meist aus solcher Umgebung. Es ist deshalb keinesfalls sicher, dass sie ihre dort i. d. R. auf wasserreichen Nährmedien gezeigten günstigen Eigenschaften wie rasches Wachstum und hervorragende Säurebildung auch bei stark verminderter Wasserverfügbarkeit wie z. B. in Anwelkgut beibehalten.
2. Auch bei der praktischen Erprobung in Futter wurde diese Eigenschaft früher nicht genügend berücksichtigt, weil viele dieser Siliermittel in Ländern mit vorwiegender Feuchtsilagebereitung entwickelt wurden. Trockenmassegehalte bis zu 30 % schränken jedoch das Wachstum der MSB noch kaum ein. Dagegen erreichen nach eigenen Erfahrungen etwa 90 % der auf Futterpflanzen natürlich vorkommenden MSB bei der Silierung von trockenem Halmgut im TM-Bereich um 50 % eine markante Wachstumsgrenze, weil sich im Pflanzensaft von Anwelkgut die löslichen Zucker, Proteine nebst Abbauprodukten sowie Mineralstoffe so weit aufkonzentrieren dass es ihnen an freiem Wasser fehlt. Nur etwa 10 % der epiphytischen MSB wachsen auch noch unter diesen Bedingungen und sind demnach osmotolerant.

Weil in der Praxis der allgemein empfohlene Wert von 35 % TM-Gehalt beim Einsilieren zumindest in Teilpartien des Futters oft überschritten wird, sollten Siliermittel grundsätzlich auch den TM-Bereich inklusive 45 % sicher mit abdecken können. Dies ist deshalb so wichtig, weil der osmotische Druck im Silierprozess durch den Abbau hochmolekularer zu niedermolekularen Substanzen gegenüber dem Ausgangsmaterial generell noch zunimmt. Aus diesem Grund erhält kein biologisches Siliermittel für den

Abbildung 3: pH-Wert-Absenkung in Silagen (3. Tag) in Abhängigkeit vom TM-Gehalt



Einsatz in TM-reichem Futter das DLG-Gütezeichen, wenn es im wichtigen Merkmal Osmotoleranz versagt.

#### Heterofermentative Milchsäurebakterien

Wie die Liste in Tabelle 2 zeigt, kamen als Silage-Impfzusätze ursprünglich überhaupt nur MSB-Arten des homofermentativen Gärtyps in Frage. Aus der Glucose (oder Fructose) des Siliergutes erzeugen sie ohne CO<sub>2</sub>-Bildung und dementsprechend mit nur minimalen TM- und Energieverlusten überwiegend Milchsäure. Die heterofermentative Vergärung derselben Kohlenhydrate ergibt dagegen außer Milchsäure und CO<sub>2</sub> unter den üblichen Silierbedingungen auch eine gewisse Menge an Essigsäure (ES). Bei Konzentrationen von mehr als 0,8 % undissoziierter ES in der Frischmasse wirkt diese pilzhemmend und unterdrückt die Hefen als die wichtigsten Verursacher der Nacherwärmung. Eine Besonderheit ist das spezifische Auftreten von 1,2-Propandiol (oder Propylenglykol) in Silagen mit Zusatz des heterofermentativen *Lactobacillus buchneri*. Dieses Gärungsprodukt entsteht neben Essigsäure und Ethanol aus einem Teil der zunächst gebildeten Milchsäure (Driehuis et al., 1999; Oude Elferink, 2001). Der anaerobe Abbau tritt i. d. R. erst nach 4 bis 6 Wochen Silierdauer auf. Diese Verzögerung beruht sehr wahrscheinlich auf der im Vergleich zu anderen MSB geringeren Teilungsrate von *Lb. buchneri*.

Langzeitstudien an behandelten Maissilagen zeigen inzwischen, dass auch das zunächst gebildete 1,2-Propandiol während der Lagerung in seiner Konzentration wieder abnimmt und stattdessen 1-Propanol sowie Propionsäure entstehen. Als Verursacher dieses weiteren Umbauschrittes wurde inzwischen die neue Art *Lactobacillus diolivorans* sp. nov. identifiziert (Kroneman et al. 2002). Wahrscheinlich ist diese Spezies normalerweise nur unterhalb der üblichen Nachweisgrenze vorhanden. Sie entwickelt sich jedoch spontan in solchen Silagen, die infolge der Behandlung mit *L. buchneri* nennenswerte Mengen an 1,2-Propandiol enthalten. Weil sie zu dessen Verwertung speziell befähigt ist, wirken solche Silagen dann praktisch als natürliche Anreicherungskultur für *L. diolivorans*.

Eindeutig im Vordergrund steht jedoch das siliertechnische Interesse an *L. buchneri* wegen der pilzhemmenden Wirkung der undissoziierten Essigsäure. Fallweise hinzuzurechnen ist die Propionsäure aus der Folgeaktivität von *L. diolivorans*. Weil beide Gärprodukte im sauren Bereich das Wachstum von Hefen und Schimmelpilzen unterdrücken, erweitert sich erstmalig der mögliche Anwendungsbereich biologischer Siliermittel über die prinzipielle Gärungsförderung hinaus auch auf die Stabilisierung von Silagen unter Lufteinfluss.

Aus Sicht der Tierernährung ist eventuell auch eine positive Begleitwirkung des 1,2-Propandiol auf hochleistende, ketosegefährdete Tiere zu erwarten. Wie weit das jedoch in dieser Verabreichungsform und Dosierung gilt, lässt sich noch nicht abschließend beurteilen.

#### Trockenmasse- und Energieverluste bei der heterofermentativen Gärung

Ziemlich kontrovers diskutiert und auch kritisiert wurden nach der Markteinführung von *L. buchneri* die generell bei der heterofermentativen Vergärung entstehenden Verluste. Diese machen im Falle der Glucose während der Silierung 24% der umgesetzten Menge dieses Zuckers aus, also je nach Ausgangssituation etwa 3 bis 5% der Silage-TM. Dafür bilden die

Tabelle 3: Temperaturerhöhung und Verluste aerob instabiler Silagen, abhängig vom TM-Gehalt

TM-Gehalt des Futters	Erhöhung über Umgebungstemperatur				
	5 °C	10 °C	15 °C	20 °C	25 °C
	Tägliche TM-Verluste in %				
20 %	1,6	3,2	–	–	–
30 %	1,2	2,3	3,5	–	–
50 %	0,7	1,5	2,2	2,9	3,7

heterofermentativen MSB in Form des Ethanol, das pro Gewichtseinheit fast doppelt so viel Energie enthält wie Milchsäure. Wird die in Gräsern z.T. reichlicher vorkommende Fructose anstelle von Glucose vergoren, so sinken die TM-Verluste unter 5% der umgesetzten Substratmenge. Gleichzeitig entsteht in diesem Fall neben Milch- und Essigsäure auch Mannitol, das wie der Alkohol sehr energiereich ist, allerdings ebenfalls nicht direkt zur Säuerung beiträgt. Die parallel dazu auftretenden Verluste an Bruttoenergie liegen in beiden Fällen unterhalb von 2%. Die eventuelle energetische Bedeutung des dabei jeweils mit anfallenden Adenosintriphosphates bleibt hier außer Betracht, weil dessen Wertigkeit für die Pansenflora der Wiederkäuer unzureichend bekannt ist.

Demnach beträgt die tatsächliche Verluststeigerung durch den heterofermentativen Gärtyp wie oben erwähnt nur 3–5% insgesamt, und das im Laufe einer oft mehrmonatigen Silierdauer. Dagegen können bei aerob instabilen Silagen in den betroffenen Partien bereits innerhalb eines einzigen Tages 3–4% an TM-Verlusten auftreten (Tab. 3). Dies bedeutet, dass ein Schutz vor derartigen hohen Einbußen durch Nachwärmungsprozesse die durch *L. buchneri* nur in engen Grenzen erhöhten Gärungsverluste mehr als aufwiegt.

#### Sonstige Mikroorganismen

Die wirtschaftliche Bedeutung aller übrigen in biologischen Siliermitteln verwendeten Organismen ist bei einem Gesamtanteil unter 10 Prozent bislang relativ gering. Einige besitzen jedoch interessante und

auch durchaus plausible Wirkungsmechanismen, deren Betrachtung sich lohnt. Beim Leistungsniveau und der Einsatzsicherheit der verwendeten Stämme besteht derzeit jedoch z. T. noch erheblicher Optimierungsbedarf (Kung et al., 2003, Rees, 1997).

**Propionsäurebakterien** (PSB) sind in einzelnen Produkten aus homofermentativen MSB zusätzlich enthalten. Als Gärsubstrat ziehen sie den Pflanzenzuckern die Milchsäure in der Silage vor, die sie zum Teil in Propionsäure umwandeln. Im sauren Bereich reduziert diese erfolgreich die Hefen. Wegen der begrenzten Säuretoleranz der PSB kommen diese positiven Effekte jedoch mit fortschreitender pH-Absenkung zum Erliegen. Für einige Stämme von *Propionibacterium jensenii* wurde die Bildung von Bacteriocinen nachgewiesen. Dadurch werden auch schädliche Bakterien gehemmt. Die relativ geringe Teilungsgeschwindigkeit der PSB begrenzt ihr Durchsetzungsvermögen gegen die übrige Silagemikroflora.

**Bacillusarten** sowie *Serratia* zielen durch ihre antagonistische Aktivität gegen Pilze gleichfalls auf eine Verbesserung der aeroben Stabilität von Silagen. Bei *Bacillus subtilis* erfolgt dies durch Lipopeptide, die zur Gruppe der sogenannten Iturine zusammengefasst werden. Sie wirken sowohl gegen phytopathogene Pilze als auch Bakterien. Iturin A z. B. setzt an der Plasmamembran an, deren Permeabilität die Substanz durch die Bildung von Ionenkanälen erhöht. Über K<sup>+</sup>-Verluste führt dies letztlich zur Zellauflösung. Besonders reichlich wird Iturin aus Mannitol und Fructose gebildet.

*Serratia rubidaea* gehört zur Gruppe der Enterobakterien und bildet oberflächenaktive Glycolipide, sogenannte »wetting agents« die in extrazellulären Vesikeln vorkommen (z. B. Rubiwettin R1). Sie spielen möglicherweise eine Rolle bei der bakteriellen Besiedlung von Oberflächen. Weiterhin wird die Fähigkeit zur Bildung von Chitinasen diskutiert, die pilzliche Zellwände auflösen können. Von der verwandten Art *Serratia marcescens* ist bekannt, dass sie ein außerordentlich hohes Aneignungsvermögen für

Sauerstoff besitzt, welcher damit der luftabhängigen Pilzflora entzogen wird. *S. rubidaea* gehört wie *Enterococcus faecium* zur Risikogruppe 2 der potentiell für den Menschen riskanten Bakterien. Für technisch genutzte Stämme muss daher die Unbedenklichkeit in jedem Einzelfall, also auf Stammebene nachgewiesen werden. Unerlässlich ist eine genaue Typisierung, um Identität und Verbleib bei Bedarf stets zuverlässig nachweisen zu können.

**Phagen** (z. B. »Clostridiophagen«) sind Bakterienviren, mit denen eine Art biologischer Bekämpfung von Gärschädlingen angestrebt wird. Gemeinsam mit einem herkömmlichen Impfpräparat zugesetzt, infizieren die Phagen z. B. die Buttersäureclostridien, bringen deren Zellen durch eigene Massenvermehrung zum Platzen und befallen neue Wirte, solange diese vorhanden sind. Leider sind die bisher verfügbaren Phagenstämme hoch spezialisiert, und wirken daher nur gegen einzelne der in Silagen vorkommenden Clostridien. Zudem befallen sie nur die wachsenden Zellen, nicht die Sporen. Schließlich müssen die Phagen zur Wirkung gelangen, bevor der pH-Wert unter 5 gefallen ist, weil sie danach inaktiviert werden.

**Killerhefen** sind besondere Stämme z. B. der Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*), bei denen eine Virusinfektion dazu führt, dass sie ein antibiotisches Toxin ausscheiden. Dies kann nicht mit dem Virus befallene Hefen durch Hemmung ihrer DNS-Synthese abtöten. Es erscheint vorstellbar, solche Stämme von einer ausschließlich Zucker verwertenden, unschädlichen Art, die über ein möglichst breites Wirkungsspektrum speziell gegen milchsäureabbauende Schädhefen verfügen, gezielt in Silagen einzusetzen. – Dabei bleibt jedoch der mögliche Einwand bestehen, dass selbst »harmlose« Hefen in Gärfutter generell weniger erwünscht sind.

Mischungen aus **Milchsäurebakterien und pilzhemmenden Chemikalien** befinden sich erst seit neuerer Zeit mit mehreren Produkten auf dem Markt (Kung et al., 2003). Haupteinsatzgebiet dieser Präparate ist die gezielte Verbesserung der aeroben Stabilität durch pilzhemmende Wirkstoffe wie z. B. Sorbat, Benzoat

und Propionat. Wegen des relativ hohen Preises dieser Salze möchte man die hemmwirksame Dosis möglichst gering halten. Dazu wird der im tiefen pH-Bereich zunehmende, pilzhemmende Anteil der Chemikalien durch gleichzeitig applizierte, stark säuernde, homofermentative MSB erhöht. Weil der unverdünnte chemische Wirkstoff bei Direktkontakt die MSB schädigen würde, müssen bei Flüssiganwendung beide Komponenten getrennt verpackt, eventuell auch separat appliziert werden oder die Bakterien durch geeignete Verkapselung geschützt werden. In der Praxis kommen beide Möglichkeiten vor.

### **Silageschädlinge und hygienerrelevante Keimgruppen**

In diese Rubrik fallen die Buttersäureclostridien als Verursacher der anaeroben Instabilität oder Fehlgärung sowie die milchsäureabbauenden Hefen und Essigsäurebakterien als Auslöser der aeroben Instabilität oder Nacherwärmung. Daneben kommen fallweise hygienisch bedenkliche oder sogar eindeutig pathogene Mikroorganismen wie z.B. Listerien oder Erreger des Botulismus sowie toxinogene Pilze in Silage vor. Ihr Auftreten steht meist in Verbindung mit Frühstadien des Futterverderbs mit pH-Anstieg und kennzeichnet technische Mängel und Fehler beim Silagemanagement. Sie sind grundsätzlich vermeidbar. Dabei spielen sorgfältige Siliertechnik und laufende Kontrolle der Silodichtigkeit die wichtigste Rolle.

Aus mikrobiologischer Sicht sind die unerwünschten Mikroorganismen mit Ausnahme der ausgesprochen säuretoleranten Hefen und Schimmel sowie Essigsäurebakterien (*Acetobacter*) am zuverlässigsten durch die intensive, nachhaltige Milchsäurebildung einer optimalen Gärflora unter Kontrolle zu halten. Eine so geschützte Silage bleibt auch ausreichend lange stabil, um den Lufteinfluss während der Entnahmephase unbeschadet zu überstehen. Eine zusätzliche Schutzwirkung gegen die Gram-positiven Listerien und Clostridien aber auch Streptokokken und Bacillusarten können Nisin bildende Stämme von *Lactococcus lactis* bieten, die auch in einigen Impfsätzen enthalten sind (Mantovani et al.). Diese

Substanz ist ein lebensmittelrechtlich unbedenklicher, antibakterieller Zusatzstoff, der bereits in einer Konzentration von 250 ppm gegen die o.g. Organismen wirkt. Auch für *Lactobacillus rhamnosus* und *Lactobacillus reuteri* (Reuterin) wurden antimikrobielle bzw. probiotische Effekte nachgewiesen. Gleichfalls von Interesse könnten Substanzen sein, die durch bestimmte Stämme von *Lb. plantarum* produziert werden und eine außerordentlich gute antimykotischen Breitbandwirkung aufweisen. Dabei handelt es sich um cyclische Dipeptide sowie Hydroxyfettsäuren (Sjögren et al., 2003). Wirksam gehemmt bzw. abgetötet wurden die meisten der in Silage vorkommenden Hefe- und Schimmelpilze, einschließlich des sehr verbreiteten *Penicillium roqueforti*. Mit dem Hemmstoff produzierenden Stamm als Starterzusatz in Sauerteig ließ sich z.B. das Verschimmeln von Brot entscheidend hinauszögern (Lavermicocca et al., 2000). Für die Mehrzahl dieser Substanzen steht die Bewährung in Silagen jedoch noch aus.

### **Impfdichte von Siliermitteln**

Da der ständig gewachsene Markt für Siliermittel aus MSB entsprechend umkämpft ist, wird die Frage der Impfdosis in Beziehung zum Preis der Präparate lebhaft diskutiert. Der Landwirt kann in Deutschland wählen zwischen Mitteln, deren effektive Dosis sich weit stärker unterscheidet als ihr Preis. Ob er mit 100.000 oder 1.000.000 vermehrungsfähigen Keimen pro Gramm Siliergut sein Ziel erreicht, den natürlich vorhandenen Keimbesatz gegen die spezialisierten Silagestämme weitestgehend auszutauschen und den Gärverlauf zu optimieren, hängt von verschiedensten Gegebenheiten ab. Zum Teil sind sie vorher nicht ausreichend bekannt oder nicht zu beeinflussen. Das gilt z.B. für Substratverfügbarkeit, Witterung und die Höhe des natürlichen Keimbesatzes.

Folgendes ist dabei zu bedenken: Gleich, für welche Impfdosis man sich entscheidet, dem Futter wird zum Start nur ein Millionstel der Bakterienmenge hinzugefügt, die mit 10 Billionen MSB pro Gramm Futter i. d. R. nach ca. 3–5 Tagen im intensiv gären-

den Futter erreicht wird. Deshalb lohnt es stets, diesem Ziel von vornherein möglichst nahe zu kommen, um dadurch die Konkurrenzbedingungen günstig zu gestalten. Doch das lässt sich nicht über die Impfdosis allein erreichen. Auch eine raschere Zellteilung kann zahlenmäßige Unterlegenheit bei den astronomischen Vermehrungsraten der Bakterien in kurzer Zeit mehr als wettmachen, sofern die siliertechnischen und gärungsbiologischen Ansprüche erfüllt werden. Benötigt ein vergleichsweise niedrig dosierter Stamm pro Teilung nur eine anstatt zwei Stunden, dann werden in 24 Stunden aus 1 Zelle nicht ca. 4.000 sondern mehr als 16 Millionen Zellen. Dazwischen liegt ganz erheblich mehr als der Faktor 10, der sich bei den verschiedenen o.g. Impfdichten ergibt. Andererseits kann auch beim Merkmal Teilungsgeschwindigkeit die Rangfolge zwischen Produkten rasch wechseln, wenn die Siliertemperatur nur 15 statt 25 °C beträgt, die jeweiligen Impfstämme aber unterschiedliche Temperaturoptima haben. Selbst der hoch zu bewertende Vorteil guter Osmotoleranz eines Stammes kann bedeutungslos werden, wenn das Produkt zur Silierung relativ nassen Futters eingesetzt wird. Grundsätzlich lässt sich jedoch das Risiko suboptimaler Gärverläufe durch möglichst hohe Impfdichte und gute Anpassung der Stämme an das Siliergut vermindern.

### Entwicklung und Anerkennung von Siliermitteln

Zur Entwicklung bestmöglicher Produkte werden unterschiedliche Wege beschritten. Sie können von der Auslese eines »Universalstammes« über vielfältige Stammmischungen aus mehreren Gattungen und Arten von MSB, bis zu »Spezialisten« für bestimmte Futterarten reichen. Mit der Stammauswahl erfolgt eine schwerwiegende Festlegung hinsichtlich der Zertifizierung, die bei später vorgenommenen Veränderungen am Präparat erlischt. Über die amtliche Registrierung und EU-einheitliche Zulassung sind wir durch den Beitrag von Herrn Prof. Gropp eingehend informiert worden. Aber auch die bislang in Deutschland praktizierte, freiwillige Form der Produktanerkennung über das DLG-Gütezeichen für Siliermittel ist für den Antragsteller mit Aufwand verbunden. Die

obligate Stammhinterlegung bei nationalen Sammlungen und der erhebliche Finanzbedarf insbesondere für die Wirkungsnachweise in den Kategorien Milch- und Mastleistung führten zu einer weitgehenden Bindung an die einmal getroffene Entscheidung. Der zuweilen geäußerte Vorwurf, diese Konstruktion sei ein Innovationshemmnis, lässt sich nicht völlig von der Hand weisen. Sie stellte aber die einzige Möglichkeit dar, den Landwirt vor unkontrollierbaren Produktveränderungen zu bewahren und das Angebot überschaubar zu halten. Von der o.g. EU-Zusatzstoffrichtlinie ist gleichfalls zu erwarten, dass sie Hürden errichtet sowie Kosten für den Antragsteller verursacht, die möglicherweise zu einer Reduzierung der Anzahl heute am Markt befindlicher Mittel führen.

### Zusammenfassung

Selbst nach mehr als 20 Jahren intensiver Bearbeitung hat die Entwicklung biologischer Siliermittel noch keinesfalls einen Endzustand erreicht. Die Möglichkeiten zur Gärungsverbesserung durch Impfsätze werden zunehmend genutzt und mit Erfolg angewandt. Die heutigen Bemühungen konzentrieren sich vermehrt darauf, auch den aeroben Verderb der in vielen Betrieben qualitativ erheblich besser gewordenen Silagen zu verhindern und dazu ebenfalls Produkte aus Mikroorganismen einzusetzen. Auch damit ist man nach Überwindung anfänglicher Schwierigkeiten zunehmend erfolgreich. Aber weitere Fortschritte auch unter Ausschöpfung probiotischer Wirkungen sind unerlässlich. Dazu zwingt uns der hohe Stellenwert bester Silagequalität für die Fütterung der in ihren Milch- und Mastleistungen immer noch zunehmenden Rindviehbestände.

### Literatur

Driehuis, F., Oude Elferink, S.J.W.H. and Spoelstra, S. 1999. Anaerobic lactic acid degradation during ensilage of whole crop maize inoculated with *Lactobacillus buchneri* inhibits yeast growth and improves aerobic stability. *Journal of Applied Microbiology*, 87, 583–594

Krooneman, J. et al., 2002: *Lactobacillus diolivorans* sp. nov., a 1,2-propanediol-degrading bacterium isolated from aerobically stable maize silage. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 52, 639–646

- Kung, L. (jr.), Stokes, M. and Lin, C. J. 2003: Silage additives. In: Silage Science and Technology, 305-360, Agronomy Monograph no. 42, American Society of Agronomy
- Lavermicocca, P., Valerio, F., Evidente, A., Lazzaroni, S., Corsetti, A. and Godetti, M. (2000) Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B. Applied and Environmental Microbiology 66, 9, 4084 – 4090
- Mantovani, H., Kam, D.K., and Russell J. Bacteriocins as an alternative to antibiotics. Section of Microbiology, Cornell University. [www.dfr.cornell.edu/posters/Russel\\_Madison](http://www.dfr.cornell.edu/posters/Russel_Madison)
- Oude Elferink, S.J.W.H., 2001: Anaerobic conversion of lactic acid to acetic acid and 1,2-propanediol by *Lactobacillus buchneri*. Applied and Environmental Microbiology, 67, 125 – 132
- Pahlow, G., Muck, R., Driehuis, F., Oude Elferink, S., and Spoelstra, S., (2003): Microbiology of Ensiling. In: Silage Science and Technology, 31–93, Agronomy Monograph no. 42, American Society of Agronomy
- Pahlow, G. and Weissbach, F. 1996: Effect of numbers of epiphytic lactic acid bacteria (LAB) and of inoculation on the rate of pH-decline in direct cut and wilted grass silages (pp.104–105) In: Proceedings of the 11. Int. Silage Conference, Aberystwyth, 8.–11. September 1996
- Rees T. J. 1997: The development of a novel antifungal silage inoculant. (Doctoral Research Thesis), Cranfield University Biotechnology Centre, UK
- Sjögren, J., Magnusson, J., Broberg, A., Schnürer, J. and Kenne, L. (2003) Antifungal 3-hydroxy fatty acids from *Lactobacillus plantarum* MiLAB 14. Applied and Environmental Microbiology, 69, 12, 7554–7557

## Diskussion



SCHWARZ

Sie haben die heterofermentativen Bakterien ja hier besonders vorgestellt. Meine Frage zielt danach: Sehen Sie da eine gewisse Ablösung der homofermentativen Bakterien? Ich denke da an die von Ihnen auch genannten Kombinationsprodukte, weil bei Homofermentativen zuweilen das Problem auftritt, dass wir durch diese schnelle pH-Wert-Absenkung auch relativ hohe Glukose-Restmengen oder vergärbare Kohlehydrate als Restmengen haben, und dann beim Öffnen des Silos in der Praxis Schwierigkeiten auftreten, so dass sich hier vielleicht eine Neuentwicklung in stärkerem Maße darstellt.

PAHLOW

Ich leugne nicht, dass diese Beobachtung gemacht werden kann. Wenn die Argumente, die zunächst in's Feld geführt wurden, nämlich dass wir uns diese heterofermentativen Stämme wegen der Verlustbildung nicht leisten könnten, weitgehend entkräftet werden können, und wenn wir dazu gelernt haben, nicht mehr in einem Bereich, wo die Chancen dieser Produkte gut sind, damit etwas zu versuchen, halte ich eine teilweise Ablösung durchaus für denkbar.

ROTH-MAIER

Herr Pahlow, Sie haben darüber gesprochen, dass die heterofermentativen Milchsäurebakterien Pentosen abbauen. Mich würde interessieren, wie hoch ist der Anteil des Pentose-Abbaus und welche Pentosen sind das?

Und die zweite Frage: Sie haben erwähnt, dass die Öffnung des Silos bei Verwendung von *Lactobacillus buchneri* später erfolgen sollte. Wie lange sollte das dauern, vergleichsweise zu sonst?

PAHLOW

Zu den Pentosen sehr kurz: Mir sind Daten im Wesentlichen für Xylose, also als Abbauprodukt-Baustein der Hemizellulosen, bekannt. Ich habe keine Daten über die Rate, kann mir aber nicht vorstellen, dass, wenn Xylose vorliegt, und ein Pentosen-Abbauer dort vorhanden ist, es da eine Limitierung gäbe.

In dem Punkte stimmten ja die von mir erwähnten Beispiele überein. Pentoseabbau ist eine Möglichkeit, die die fakultativ Heterofermentativen und die obligat Heterofermentativen eint. Nur die Homofermentativen, oder obligat Homofermentativen, kommen an diese Zucker nicht heran.

Und die zweite Frage nach einer Empfehlung im Hinblick auf die Mindestwartezeit, bevor man solche Buchneri-Silagen öffnet. Das ist sicherlich eine Frage der Umgebungstemperatur. Es soll dieser Prozess, der Schritt von der zunächst erfolgenden Milchsäurebildung durch teilweisen Abbau von Milchsäure zu Essigsäure, abgelaufen sein. Erfahrungswerte unter den Temperaturbedingungen hier in Mitteleuropa sprechen dafür, Geduld doch mindestens für 4–6 Wochen aufzubringen! Ich gebe diese Frage auch gerne noch mal ins Auditorium zurück zu denen, die schon längerfristige Erfahrungen damit haben.

Unsere eigenen Untersuchungen idealisieren das natürlich, denn in meiner Silierkammer herrschen 25 °C konstante Temperatur; das ist unrealistisch, wenn wir an Nachttemperaturen nach der Maissilierung denken.

WÜRZNER

Ich hätte auch einige Fragen zu den heterofermentativen Milchsäurebakterien. Da war mir Einiges nicht ganz klar. Sie sagten ja, sie dienen zur Stabilisierung, bzw. eben die Nacherwärmung zu verhindern oder zu vermindern. Gleichzeitig haben Sie Ergebnisse dargestellt, wo es Verluste gab bei der Trockenmasse um 25 %, bei der Energie wesentlich weniger.

PAHLOW

Ja, bezogen auf Glukose. Schon wenn man Fruktose, die ja auch eine maßgebliche Rolle spielt, besonders in Gräsern, vergärt, wird auch dieser Wert für die Trockenmasseverluste über Gas bereits deutlich gesenkt. Ich gebe auch zu bedenken, dass es praktisch kaum Anwendungsfälle gibt, wo man sich nicht zunächst auf die Basisformulierung von Präparaten mit uns vertrauten Homofermentativen stützt, und dann sich sehr gut überlegt, in welcher gleichzeitigen Impfdichte man die Heterofermentativen mit einsetzt. In einer normalen Silage hat man ja Zeit, und damit ist es kein Nachteil, wenn der Effekt der begrenzt erhöhten Essigsäurebildung auch erst zu einem späteren Zeitpunkt während der Silierphase erfolgt.

WÜRZNER

Ja, jetzt anschließend: Diese Produkte sind also eigentlich erst in der Versuchsphase. Es gibt, glaube ich, nicht viele, oder keine Erfahrungen im praktischen Einsatz.

PAHLOW

Das gilt heute nicht mehr. Soweit ist man auf jeden Fall, dass man auch in nennenswertem Umfang bereits praktische Erfahrungen hat.

WÜRZNER

Gibt es da auch Erfahrungen in der Fütterung. Gibt es da einen Einfluss?

Weil der Alkoholgehalt ja relativ hoch ist, oder der Propandiolgehalt, der sich hier bildet. Gibt es hier in der Futteraufnahme irgendwelche Unterschiede?

PAHLOW

Alkoholgehalte kann ich mir nicht in verzehrseinschränkenden Mengen vorstellen. Zum Propandiolgehalt hätte ich Ihnen mehr Zeit geben sollen, diese Grafiken zu sehen. Dort war der Maßstab um den Faktor 10 geringer, um es Ihnen überhaupt demonstrieren zu können, im Vergleich zu den aufgeführten Essigsäuremengen. Propandiol ist in vielen Fällen nur ein Intermediärprodukt. Andererseits muss ich zurückgeben, es wird sogar gezielt für die Ketose-Prophylaxe, glaube ich, eingesetzt. Ob es da eine Rolle spielt, vermag ich nicht zu beurteilen.

Auf Ihre Frage zur verzehrshemmenden Wirkung: Dazu müsste die Silage entgleisen, wie hier bei dem Sonderfall. Und es müssten Essigsäurekonzentrationen auftreten, die in der Tat die Tiere davor zurückschrecken lassen. Dazu liegen mir keine in größerer Zahl vorhandenen Beweise vor.

KRAMER

Herr Professor Pahlow, auch die Größenordnungen muss man ganz genau anschauen, was die Verluste mit den Heterofermentativen anbelangt.

Zur Frage von Herrn Würzner vielleicht eine Anmerkung:

Diese 24 % beziehen sich eben auf die Glukose. Wenn wir jetzt annehmen, da sind 5 % Glukose in einer Silage, heißt das, in Wirklichkeit reden wir nicht von 24 %, sondern von 1–1½ %, wenn zu 100 % dieser Stoffwechselweg eingeschlagen wird. Wenn aber nur, wie es normalerweise der Fall ist, ein Drittel davon in diese Richtung geht, reden wir nur mehr über kleine Mengen, bezogen auf die gesamte Silage, d.h. 1 %, aber nicht mehr an Trockenmasse und praktisch keine Energieverluste.

STEINHART

Wir haben noch ein paar Minuten Zeit, dann darf ich auch noch eine Frage stellen.

Unsere Ministerin, auch Ihre, die sagt ja, wir wollen Lebensmittelqualität vom Acker bis zum Tisch durchorganisieren, und da fällt mir jetzt auf, dass Sie eine ganze Reihe von Mikroorganismen genannt haben, von denen offensichtlich noch nicht die strengen Sicherheitsprüfungen vorliegen, über die uns heute Herr Gropp berichtet hat.

Gibt es hier möglicherweise in Zukunft Einschränkungen, dass also auch hier darauf geachtet werden muss, dass diese Organismen, die auch für diese Silagebereitung eingesetzt werden, so eine Art Gras (Generally recognized as safe)-Status haben.

Dann darf ich vielleicht eine zweite Frage kurz abschließen, die ich als Chemiker habe. Sie haben die Hydroxi-Fettsäuren erwähnt, die einen positiven Einfluss haben oder einen Unterdrückungsmechanismus, und da kommt mir natürlich sofort in den Sinn, dass die sich ableiten von einer ganz schwierigen Gruppe, nämlich den Epoxifettsäuren und Peroxifettsäuren. Wenn solche Dinge auftauchen in irgendwelchen Futter- oder Lebensmitteln, dann gehen die Alarmglocken, weil die natürlich die stärksten Oxidationsmittel sind, die es überhaupt gibt. Gibt es denn da Erfahrungen, ob noch solche Epoxifettsäuren irgendwo auftreten, oder Peroxisäuren, deren Endprodukte dann diese Hydroxisäuren sind, die Sie abgeleitet haben.

Und eine dritte kurze Frage: Gibt es Diskussionen über den Einsatz von GMOs (Genetisch veränderte Mikroorganismen) oder wie wäre dann die rechtliche Situation zu bewerten, wenn solche GMOs eingesetzt werden würden in Zukunft, um die Silagen zu verbessern?

PAHLOW

Zu meiner obersten Dienstherrin: Den Prüfungen aufgrund neuer Futtermittel- oder Zusatzmittel-Richtlinien werden wir unterworfen werden. Es wird dann in erster Linie S2 Stämme treffen. Mir fällt auf Anhib Enterococcus faecium ein, in dem wird auf Stammebene der Nachweis der Unbedenklichkeit im Einzel-

fall geführt werden. Jeder, der in einem Präparat Stämme dieser Einordnung hat, ist gut beraten, eine saubere Nachweisteknik seines Einzelstammes zu führen, der ja dann auch in der Regel hinterlegt wird in der deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, oder einer anderen nationalen Sammlung, um fallweise nachweisen zu können, der als unbedenklich eingestufte Stamm ist derjenige, von dem man redet.

Die Sache mit den Fettsäuren ist wirklich brandneu und hat meines Wissens noch keine Silage erreicht. Man denkt aber darüber nach, weil dieses so faszinierend ist und auch Penicillium roqueforti als Prüforganismen zumindest in Konidienkeimhemmtests zu denen gehörte, die verwundbar waren. Ich teile Ihre Vorstellung, dass, sobald ich diese Substanz dort hätte, ich sofort wieder eine arbeitsplatzbezogene Dienstanweisung schreiben müsste für den Umgang und die Entsorgung so einer Substanz. Dann müssen wir auch über die Konzentrationen sprechen, die in Silagen auftreten.

Und die dritte Frage nach den GMOs: Wir haben es bisher, zum Glück, noch nicht nötig gehabt. Das Genom der Lactobakterien ist so groß, dass wir rechnerisch, das ist die Zahl eines Spezialisten, mindestens 15.000 Merkmale darauf unterbringen können, bei denen sich sogar auf Stammebene immer noch Merkmalsunterschiede finden. Und wir sind noch längst nicht am Ende unserer Screening-Verfahren. Die sind gut beraten, die ihr Screening-Verfahren leistungsfähiger machen, und damit eine große Anzahl von Stämmen nach neuen Kriterien durchsuchen können, um noch in die Vielfalt von Mutter Natur zu greifen, bevor man dort etwas tut. Ich habe einige Literaturangaben, wo es Interessen gegeben hat, Speicherkohlehydrate oder auch Strukturkohlehydrate von Futtermitteln gleich mit in eine gärfähige Form abbauen zu können. Das sind ganz begrenzte Fälle, nach meinem Wissen nicht auf dem deutschen Markt.

# Einflüsse von Fütterungsgestaltung und Fütterungsmanagement auf die Lebensbedingungen der Pansenflora



## 1 Einleitung

Fütterungsgestaltung und Fütterungsmanagement bei Wiederkäuern sind ein Mittel, die Lebensbedingungen der Pansenmikroorganismen – Pansenflora (Eubakterien und Methanbildner), Protozoen und Pilze – so zu beeinflussen, dass eine möglichst stabile Populationszusammensetzung gewährleistet wird, die es dem Wiederkäuer ermöglicht, das jeweilige Produktionsziel (Bildung von Milch oder Körpermasse) zuverlässig zu erreichen. Die jeweilige Population liefert dem Wiederkäuer durch den Abbau von Futternährstoffen energiereiche Verbindungen in Form kurzkettiger Fettsäuren und durch die Synthese mikrobieller Masse vor allem Protein. Beides soll möglichst effizient und »optimal« für den Wirt, d.h. den produktiven Wiederkäuer, erfolgen.

Grundsätzliche Einflussgrößen auf die Lebensbedingungen der Mikroorganismen im Pansen auf sind seit langem bekannt. Faserreiche, strukturwirksame Futtermittel in der Ration begünstigen mit der durch Kauen und Wiederkauen erfolgenden physikalischen Zerkleinerung der faserreichen Futtermittel eine hohe Speichelsekretion und die Aufrechterhaltung eines nur schwach sauren pH-Werts im Pansen, wodurch eine hohe Populationsdichte von an den Futterpartikeln anhaftenden, zellwandabbauenden Bakterien gefördert wird. Zucker- und stärkehaltige Rationen reduzieren demgegenüber die Speichelsekretion durch verringertes Wiederkauen und begünstigen Mikroorganismen, die verstärkt Butter- und Propionsäure bilden. Da zudem der Abbau dieser Nährstoffe

rascher als der von Zellwandbestandteilen verläuft, besteht prinzipiell die Gefahr einer Pansenacidose. Diese ist mit massiven Veränderungen in der Zusammensetzung der Pansenflora verbunden, im Extremfall mit der Dominanz von Milchsäurebildnern wie bei der Silierung von Futtermitteln. Zwischen den beiden Extremen sehr faser- und sehr stärkehaltiger Rationen gibt es zahlreiche Möglichkeiten, die Lebensbedingungen der Pansenmikroorganismen so zu gestalten, dass hohe Leistungen der Tiere und eine spezifische Produktzusammensetzung (z.B. Milchfettgehalt) und -beschaffenheit (z.B. Fettsäuremuster) realisiert werden können.

## 2 Optimierung der Lebensbedingungen der Pansenmikroorganismen

In allgemeiner Form kann das in der Kapitelüberschrift formulierte Ziel durch drei grundlegende Prozesse beschrieben werden, die auf das Fermentationsgeschehen im Pansen Einfluss nehmen (Nagaraja et al. 1997). Diese werden jeweils durch ein Beispiel illustriert:

- (1) Verstärkung günstiger Fermentationsprozesse – z.B. Abbau von Zellwandkohlenhydraten;
- (2) Minimierung, Veränderung oder Ausschaltung ineffizienter Fermentationsvorgänge – z.B. Stickstoff-Umsatz im Pansen, besonders durch Protozoen;
- (3) Minimierung, Veränderung oder Ausschaltung für den Wirt (Wiederkäuer) oder Menschen

schädlicher Prozesse – z.B. Reduzierung der Anzahl und Aktivität pathogener Keime.

Des Weiteren muss bekannt sein, anhand welcher variablen Größen im Pansen Manipulationen und Modifikationen der Lebensbedingungen von Mikroorganismen quantitativ beschrieben werden können und welche Zusammenhänge zwischen diesen Größen und den Mikroorganismen sowie bestimmten Futterinhaltsstoffen bestehen. So kann eine quantitative Charakterisierung der Pansenfermentation durch folgende Größen erfolgen (Nagaraja et al. 1997):

- (1) Die Menge an fermentierter organischer Masse wird durch die Zusammensetzung der Mikrobenpopulation beeinflusst;
- (2) Die Konzentrationen und relativen Anteile an Fermentationsprodukten (kurzkettige Fettsäuren, Ammoniak) werden von der Art der Kohlenhydrate und Proteine in der Ration beeinflusst;
- (3) Die Menge und Effizienz der mikrobiellen Proteinsynthese hängt von der Energie- und Proteinversorgung der Mikroorganismen ab.

Es wird hoffentlich deutlich, dass trotz des Versuches, drei separate Faktorengruppen darzustellen, diese untereinander in vielfältiger Weise Interaktionen ausgesetzt sind. So übt etwa die Geschwindigkeit des Nährstoffabbaus im Pansen potenziell auf alle drei Größen einen Effekt aus. Dennoch soll nachfolgend der Versuch unternommen werden, anhand der obigen Auftrennung den Einfluss von Fütterungs-gestaltung und Fütterungsmanagement auf die Lebensbedingungen der Pansenmikroorganismen näher zu charakterisieren. Dabei stehen – aufbauend auf den eingangs erwähnten generellen Zusammenhängen – aktuelle Entwicklungen im Vordergrund.

Neben Maßnahmen der Tierernährung, die das eigentliche Thema des Vortrags bilden, dürfen bestimmte Entwicklungen in der Mikrobiologie nicht unerwähnt bleiben, weil von dort – unter anderem bedingt durch enorme Fortschritte innerhalb weniger

Jahre bei gentechnischen Methoden – erfolgreiche Bemühungen zur Verbesserung der generellen Effizienz des Nährstoffumsatzes im Pansen oder spezieller Vorgänge (z.B. Detoxifikationsprozesse) schon berichtet wurden oder noch zu erwarten sind.

### 3 Manipulation der Mikrobenpopulation im Pansen

#### 3.1 Bakterien

Ein Rückblick in die 80er Jahre des letzten Jahrhunderts verdeutlicht, dass damals viele Erwartungen und Hoffnungen in die Nutzung rekombinanter Pansenbakterien gesetzt wurden (Tabelle 1). Diese waren jedoch häufig noch sehr vage und wenig spezifisch formuliert und verschwanden zumindest vorübergehend aus dem Blickfeld. In den vergangenen Jahren hat es – vor allem bedingt durch die oben erwähnten methodischen Fortschritte – erneute intensive Bemühungen gegeben, Bakterienstämme zu isolieren und zu modifizieren, die Eigenschaften aufweisen, welche

Tabelle 1: Ideen zur Nutzung rekombinanter Pansenbakterien in den 1980ern (nach Kobayashi 2003).

Ideen	Beschreibung	Zielbakterium	Zieltier
Umfangreichere Faserverdauung	Höhere Enzymaktivität	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	Keine Angabe
	Höhere pH-Toleranz (< 6)	<i>Prevotella ruminicola</i>	Mastrinder
Bessere Proteinversorgung	Produktion limitierender Aminosäuren	<i>B. fibrisolvens</i>	Milchkühe
	Reduzierte Proteolyse und Desaminierung	Keine Angabe	Keine Angabe
Gesteigerte Laktatverwertung	Bakterien, die mehr Laktat abbauen	<i>Megasphaera els-denii</i>  <i>Selenomonas ruminantium</i>	Mastrinder
Erhöhte Entgiftungsleistung	Toxinabbauende Bakterien	Keine Angabe	Keine Angabe
Produktion von Vitaminen, Hormonen, Antibiotika	Produktion von Nährstoffen und Wachstumsfaktoren sowie Kontrolle der Mikroflora	Keine Angabe	Keine Angabe

eine verbesserte Effizienz spezifischer Prozesse im Pansen erwarten lassen.

### **Verbesserung der Faserverdauung**

Mittlerweile ist es gelungen, für ausgewählte anaerobe Bakterienarten den Prozess der Verdauung von Cellulose als dem wesentlichen Kohlenhydrat pflanzlicher Zellwände durch einen Multienzymkomplex (Cellulosom), der in unmittelbarem Kontakt mit Pflanzenfragmenten aktiv ist, weitgehend aufzuklären. Pionierspezies ist die nicht im Pansen vorkommende thermophile (wärmeliebende) Art *Clostridium thermocellum* (Lynd et al. 2002; Doi et al. 2003). Fortschritte wurden jedoch auch bei im Pansen vertretenen Arten erzielt und es werden Erwartungen geäußert, nach vollständiger Charakterisierung dieses Enzymkomplexes in der Lage zu sein, die für den Enzymkomplex verantwortliche genetische Information auch auf bisher weniger cellulosespaltend aktive Arten wie *Butyrivibrio fibrisolvens* übertragen zu können, die gegenüber dem dominanten Celluloseverdauender *Fibrobacter succinogenes* den Vorteil größerer Beweglichkeit aufweisen, womit ein tieferes Eindringen in die Oberflächen von Pflanzenpartikeln und eine effizientere Verdauung gewährleistet werden könnten. Es muss jedoch bedacht werden, dass offensichtlich weder die Konzentration cellulosespaltender Bakterien (Dehority und Tirabasso 1998) noch die Geschwindigkeit der Besiedelung von Pflanzenpartikeln (Koike et al. 2003) für den Zellwandabbau im Pansen limitierend sind.

Vielmehr wird eine Begrenzung eher in Futterfaktoren zu suchen sein, so dass Maßnahmen wie Auswahl und züchterische Weiterentwicklung geeigneter Futterpflanzen für Wiederkäuer, Enzymzusätze und physikalische Verfahren zur Verbesserung des hydrolytischen Abbaus faserreicher Futtermittel (weiterhin) von vorrangiger Bedeutung sind. Letztere Faktoren können alle einem umfassenden Fütterungsmanagement zugeordnet werden, das demnach auch weiterhin gegenüber einer Manipulation und Modifikation der Pansenbakterien zur Erhöhung des Abbaus pflanzlicher Zellwände größere Bedeutung genießt.

### **Verbesserung der Versorgung mit essentiellen Aminosäuren**

Auch bei hochproduktiven Wiederkäuern wie Milchkühen oder schnell wachsenden Schaf- und Ziegenlämmern wird zunehmend diskutiert, dass bestimmte essentielle Aminosäuren wie Methionin oder Lysin leistungsbegrenzend wirken könnten. Ein Ansatz zur Verbesserung der Aminosäurenversorgung könnte deshalb sein, in Pansenbakterien Gene zu etablieren, welche die Synthese von Proteinen mit verbessertem Aminosäuremuster bei gleichzeitig reduziertem intraruminalen Abbau dieser Proteine bewirken. Bei einer nicht im Pansen vorkommenden Spezies gelang es bereits, eine Erhöhung des Anteils der essentiellen Aminosäuren Methionin, Threonin, Lysin und Leucin auf 60 % der gesamten Aminosäuren zu erreichen und zudem eine Stabilisierung des Proteins zu bewirken, die ein weitgehend unbeschädetes Überstehen der Pansenpassage erwarten lässt (Beauregard et al. 1995; MacCallum et al. 1997). Bisher wurde dieses Protein jedoch noch in keiner Pansenbakterienart etabliert. Es muss auch hier bedacht werden, dass eine verbesserte Aminosäurezusammensetzung des bakteriellen Proteins zwar attraktiv wäre, gleichzeitig jedoch der Erfolg dadurch geschmälert würde, dass im Mittel 20 % des gesamten Stickstoffs in Bakterien in Nucleinsäuren gebunden ist und damit für den Wiederkäuer nicht als Aminosäurenlieferant zur Verfügung steht. Demgegenüber besteht im Pansen unabgebautes Futterrohprotein fast vollständig aus Proteinen, weshalb Maßnahmen der Reduzierung des häufig unerwünscht hohen Futterrohproteinabbaus im Pansen durch Maßnahmen der Futterbehandlung weiterhin erfolgversprechend sind. Exemplarisch seien hier nur einige chemische (Formaldehyd, Xylose), physikalische (trockene oder feuchte Hitze) und biologische (Tannine, ätherische Öle) Verfahren genannt, die bei richtiger und standardisierter Prozessführung Produkte ergeben können, deren Proteine weitgehend vor dem mikrobiellen Abbau im Pansen geschützt sind, ohne dass die Verdaulichkeit des Proteins im Dünndarm merklich reduziert wird.

## Toleranz gegenüber unerwünschten/toxischen Faktoren

Dass die Verträglichkeit antinutritiver oder sogar toxischer Futterinhaltsstoffe mit spezifischen Bakterienspezies assoziiert ist, konnte erstmals für die Abbauprodukte der nicht in Proteinen vorkommenden Aminosäure Mimosin, welche in der tropischen Leguminosengattung *Leucaena* verbreitet ist, gezeigt werden. Ziegen auf Hawaii waren gegenüber Wiederkäuern an anderen Standorten wesentlich toleranter gegenüber Mimosin. Als Ursache konnte die Entgiftung der Mimosin-Abbauprodukte durch *Synergistis jonesii* nachgewiesen werden (Allison et al. 1990). In zahlreichen nativen Sträuchern und Bäumen der südlichen Hemisphäre kommt Monofluorazetat vor, dass durch Dehalogenase entgiftet werden kann. Dieses Enzym kommt natürlicherweise z.B. in Bodenbakterien der Gattung *Moraxella* vor, konnte aber inzwischen auch in Pansenbakterien etabliert werden (Gregg et al. 1998). Derzeit sind umfangreiche Feldstudien in Australien geplant, um die ökologischen Gesamtwirkungen dieser Maßnahme auf Flora und Fauna zu untersuchen. Als drittes Beispiel kann das Vorkommen tannintoleranter Bakterien bei vielen (Wild-)Wiederkäuerarten (Nelson et al. 1998) angeführt werden. Obwohl Tannine in geringeren Konzentrationen durch eine Verringerung des ruminalen Rohproteinabbaus bei konstanter Verdaulichkeit im postruminalen Verdauungstrakt positive Auswirkungen auf den Proteinwert von Futtermitteln für Wiederkäuer ausüben können, haben hohe Konzentrationen auch bei Wiederkäuern negative Effekte auf Futteraufnahme und Verdauungsgeschehen. Mit den angeführten Beispielen kann gezeigt werden, dass Mikroorganismen, die über Mechanismen verfügen, toxische Verbindungen zumindest partiell abzubauen zu können, einen erheblichen Selektionsvorteil besitzen und ökologische Nischen besetzen können. Deshalb ist eine Etablierung entweder dieser Spezies selbst oder ihrer Entgiftungsmechanismen in anderen Pansenbakterienspezies ein attraktives und realisierbares Ziel geworden. Maßnahmen der Fütterungsgestaltung und des Fütterungsmanagements treten demgegenüber in den Hintergrund.

## 3.2 Protozoen

### Negative Effekte durch Protozoen – Verringerung der Effizienz des N-Umsatzes

Protozoen, vor allem Ziliaten, sind reguläre Besiedler der Vormägen von Wiederkäuern. Es ist vielfach belegt, dass Protozoen aufgrund hoher proteolytischer Aktivität gegenüber dem Futterprotein sowie der Aufnahme und Lysis von Bakterienzellen verantwortlich für ein umfangreiches intraruminales N-Recycling und damit eine ineffiziente N-Nutzung sind. Entsprechend konnte gezeigt werden, dass sich die Effizienz der N-Nutzung durch Wiederkäuer durch eine Entfernung von Protozoen aus dem Pansen (Defaunierung) steigern lässt. Weiterhin begünstigen die Protozoen die Methanbildung, indem sie als Wirt für Methanbildner dienen, die auf der Oberfläche von Protozoen siedeln. Zu dem ersten Aspekt wurde kürzlich eine Studie zum Ganzkörper-N-Umsatz von Schafen publiziert, aus der in Tabelle 2 einige Daten zusammengefasst sind.

Es wird deutlich, dass die Defaunierung durch eine dramatische Verringerung des N-Recyclings auf 33 bzw. 12% im Ganzkörper bzw. Pansen eine Erhöhung des mikrobiellen N-Flusses in den Dünndarm um fast 50% ermöglichte. Aus diesen und ähnlichen Daten könnte geschlossen werden, dass eine Defaunierung die Maßnahme der Wahl für eine effizientere Nutzung der knappen Ressource Stickstoff in der

Tabelle 2: Auswirkungen einer Defaunierung des Pansens von Schafen auf ausgewählte Kenngrößen des N-Umsatzes (Wallace et al. 2001)

	Defauniert	Refauniert	Defauniert: Refauniert (%)
Mikrobieller N-Fluss aus dem Pansen (g/Tag)	13,3	8,9	149
N-Recycling (g/Tag)	4,1	12,4	33
N-Recycling im Pansen (g/Tag)	0,8	6,6	12

Wiederkäuerernahrung sein müsste. Dem steht zum einen seit langem entgegen, dass die meisten Maßnahmen, Protozoen etwa durch chemische Agenzien abzutöten, auch die Gesundheit und Leistungsfähigkeit des Wiederkäuers deutlich beeinträchtigen können. Nachfolgend soll demonstriert werden, dass Protozoen zudem eine Reihe positiver Eigenschaften aufweisen, die es lohnenswert erscheinen lassen, mittels Fütterungsgestaltung und Fütterungsmanagement eine stabile Protozoenpopulation im Pansen zu etablieren und aufrecht zu erhalten.

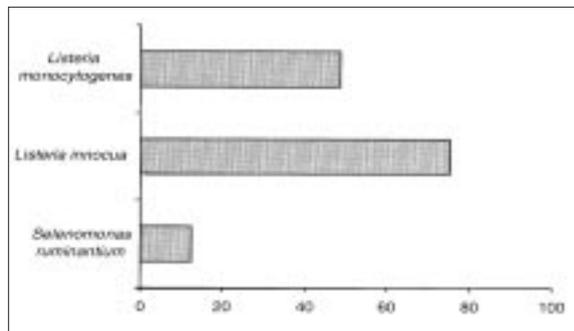
### Positive Effekte durch Pansenprotozoen - Förderung des Zellwandabbaus

Protozoen fördern den Zellwand(kohlenhydrat)abbau auf verschiedene Arten. Sie produzieren Hemicellulasen und tragen damit direkt zum Zellwandkohlenhydratabbau bei. Protozoen stabilisieren darüber hinaus den ruminalen pH-Wert dadurch, dass sie vorübergehend Stärke aufnehmen und speichern können (Mathieu et al. 1996). Dies verschafft zellwandabbauenden Bakterien bessere Lebensbedingungen. Diese Eigenschaft von Protozoen ist deshalb bedeutsam, weil höchste Populationsdichten bei 40–60% Konzentratfütterung in der Gesamtration beobachtet wurden (Dehority und Orpin 1988; Towne et al. 1988) und solche Anteile an Konzentratfütterung in der intensiven Milchviehhaltung häufig vorkommen. Eine Illustration des Beitrages der Protozoen zum gesamten ruminalen Pool an »Stärke« ( $\alpha$ -Glucan = Stärke plus protozoeneigene  $\alpha$ -glycosidisch gebundene Glucose) liefern eigene Versuche, in denen *in vivo* der auf Protozoen entfallende Anteil an der gesamten Stärke im

Tabelle 3: Organische Masse, Stärke und Rohprotein in Protozoen beim Rind (% des Pansenpools mit Phosphatidylcholin als Protozoenmarker; Südekum und Schröder 1998)

	Stärkegehalt der Silagen (g/kg Trockenmasse)		
	127	200	254
Organische Masse	1,5	1,3	1,0
<b>Stärke</b>	<b>41,2</b>	<b>26,3</b>	<b>15,3</b>
Rohprotein	4,4	3,6	2,7

Abbildung 1: *In vitro*-Abbau von *Listeria monocytogenes*, *L. innocua* und *Selenomonas ruminantium* durch *Polyplastron multivesiculatum* relativ zum Abbau durch *Entodinium caudatum* (=100; Newbold und Jouany 1997).



Pansen bei Rationen mit variierenden Stärkegehalten untersucht wurde (Tabelle 3). Die Trockenmasse der Rationen bestand zu 90% aus Winterweizen-Ganzpflanzensilage.

### Positive Effekte durch Pansenprotozoen - Barriere gegen die Verbreitung pathogener Keime

Es ist schon länger postuliert worden, dass eine stabile Pansenfermentation mit einer großen Vielfalt an Mikroorganismen dazu beitragen kann, die Belastung für das Tier und den Menschen – über den Verzehr von tierischen Lebensmitteln – durch pathogene Keime zu reduzieren. Für eine spezifische Rolle der Protozoen in diesem Geschehen gibt es erst seit einigen Jahren Hinweise. Newbold und Jouany (1997) beobachteten Unterschiede zwischen Protozoenarten in ihrer Fähigkeit, die Zahl an Listerien sowie einer Pansenbakterienart in der Pansenflüssigkeit zu reduzieren (Abbildung 1).

In einer weiteren Arbeit von Newbold et al. (2001) war der Abbau zweier Listerienarten in protozoenfreier Pansenflüssigkeit vernachlässigbar gering, während in Pansenflüssigkeit mit Protozoen innerhalb von drei Stunden etwa 25% der Listerien verschwanden (Abbildung 2).

Abbildung 2: *In vitro*-Abbau von *Listeria monocytogenes* und *Listeria innocua* bei Inkubation mit filtrierter Pansenflüssigkeit (SRF) oder protozoenfreier Pansenflüssigkeit (PFRF; Newbold et al. 2001).

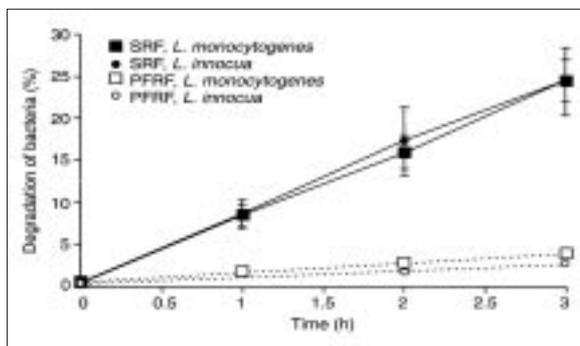
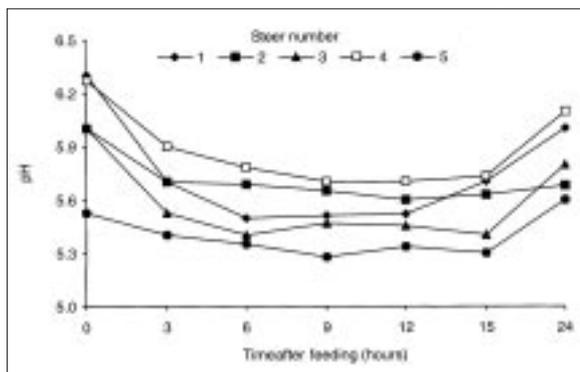


Abbildung 3: pH-Werte in der Pansenflüssigkeit bei Ochs (Mittelwert von vier Beobachtungen für jedes Tier (2 Rationen mit 100% Konzentratfutter, 2 Rationen mit 10% Grobfutter; Franzolin und Dehority 1996)



Diese wenigen Beispiele mögen verdeutlichen, dass eine weitere Charakterisierung und Quantifizierung der Bedeutung von Protozoen für das Ökosystem Pansen vor allem unter *in vivo*-Bedingungen eine Herausforderung für Tierernährer und Mikrobiologen darstellt. Hierbei können neue Techniken, z.B. PCR mit zuvor nicht verfügbaren protozoenspezifischen DNA-Fragmenten (Karnati et al. 2003), eine äußerst

hilfreiche und sinnvolle Ergänzung zu den bisherigen, überwiegend mikroskopischen Techniken, bilden.

Abschließend soll anhand einer weiteren Arbeit, in der die Auswirkungen extrem konzentratfutterreicher Rationen (90 und 100%) auf das Milieu im Pansen und das Schicksal von Protozoen unter diesen Bedingungen untersucht wurden (Franzolin und Dehority 1996), noch ein Aspekt ganz anderer Art angesprochen werden. Es ist ein übliches Ziel von Ernährungsexperimenten, eine möglichst geringe Streuung zwischen Tieren in ihrer Reaktion auf bestimmte Behandlungen zu erhalten, um damit tatsächliche Behandlungseffekte sicherer erfassen zu können.

Andersherum ist es natürlich bei extremen Rationstypen wie im obigen Beispiel äußerst interessant zu beobachten, dass Tiere sehr unterschiedlich reagieren können, wie Abbildung 3 illustriert. Während eines der Tiere durchgehend pH-Werte von unter 5,6 aufwies, zeigte ein anderes Tier über den gesamten Tag Werte knapp unter oder über pH 6. Wenn es gelänge, Faktoren wie z. B. Futteraufnahme- und Passageraten, Speichelproduktion, Wiederkauaktivitäten oder Morphologie und Kapazität des Pansenepithels als Ursachen kausal ableiten zu können, könnten in Kooperation mit anderen Disziplinen Tierhaltungssysteme so gestaltet werden, dass Tiere besser mit unvermeidlichen Stressfaktoren umgehen könnten.

#### 4 Erhöhung des Proteinflusses aus den Vormägen

##### 4.1 Reduzierung des Protein- und Aminosäureabbaus in den Vormägen

Während im vorhergehenden Kapitel im Vordergrund stand, wie die Modifikation von Lebensbedingungen oder spezifischen Eigenschaften der Mikroorganismen im Pansen sich auf den Umsatz an Nährstoffen und unerwünschten Inhaltsstoffen auswirkt, soll in diesem Kapitel die Fragestellung andersherum gewählt werden: Wie kann der (häufig unerwünscht schnelle und hohe) Abbau des Futterrohproteins im Pansen so beeinflusst werden, dass eine effizientere Nutzung des Rohproteins ermöglicht wird?

Es gibt inzwischen klare Befunde, dass für den exzessiven Abbau des Rohproteins in Grünfütter, das weltweit einen erheblichen Teil der von Wiederkäuern aufgenommenen Nahrung ausmacht, auch im Pansen in erheblichem Maße noch pflanzliche Enzyme verantwortlich sind (Kingston-Smith und Theodorou 2000). Des Weiteren ist belegt, dass bei getreidereicheren Rationen – vor allem wenn schnell fermentierbare Getreidearten wie z. B. Gerste verwendet werden – die proteolytische Aktivität im Pansen höher ist als bei faserreicheren Rationen (Hristov et al. 2002). Zur Reduzierung dieses sehr hohen Rohproteinabbaus im Pansen können Fütterungsgestaltung und Fütterungsmanagement sowie diesen vorgelagerte Maßnahmen genutzt werden. Der Rohproteinabbau von Grünfütter im Pansen kann durch Züchtungsmaßnahmen an Gräsern und Leguminosen reduziert werden oder es können Futterpflanzen, vor allem Leguminosen, mit natürlicherweise geringerem ruminalen Rohproteinabbau eingesetzt werden. Dies kann wie z. B. in *Lotus*-Arten durch höhere Tanningehalte und damit verbundene Tannin-Protein-Komplexe verursacht sein. Die proteolytische Aktivität in getreidereicheren Rationen kann vermutlich durch reduzierte Stärkeabbauraten reduziert werden. Hierzu können entweder Stärketräger mit geringerer Abbaurate im Pansen (Mais, Sorghum) oder geeignete Behandlungsverfahren der Stärketräger (z. B. Weizen mit Xylose unter erhöhten Temperaturen; Bildung reversibler früher Maillard-Produkte; Südekum et al. 2004) verwendet werden.

Ebenso ist bekannt, dass die aus dem Proteinabbau im Pansen hervorgehenden Peptide und Aminosäuren durch Bakterien äußerst rasch weiter abgebaut werden. Für die Freisetzung von Dipeptiden sorgt vor allem die Gattung *Prevotella* (Wallace und McKain 1991), während sogenannte »Ammonia hyper-producing« (HAP) Arten wie *Clostridium aminophilum* und *C. sticklandii* für die exzessive Ammoniakfreisetzung aus Aminosäuren verantwortlich sind (Floret et al. 1999). Weil eine Reihe von Bakterienarten im Pansen kurzkettige Peptide und Aminosäuren gegenüber Ammoniak als N-Quelle für die Eigensynthese

bevorzugen, hat der schnelle Abbau von Peptiden und Aminosäuren unter anderem zu der Hypothese (Wallace et al. 2001; siehe auch Demeyer und Vievez 2004) geführt, die mikrobielle Syntheseleistung insgesamt könnte durch die Verfügbarkeit von Aminosäuren oder Peptiden begrenzt sein. Deshalb lag es nahe, nach Wegen zu suchen, diese ruminalen Prozesse zu verlangsamen. Dabei wurden in den vergangenen Jahren einige neue Futterzusatzstoffe untersucht und damit wiederum typische Maßnahmen der Fütterungsgestaltung und des Fütterungsmanagements angewandt.

Wallace et al. (2001) berichteten, dass die Dipeptidabspaltung aus längeren Peptidketten bei *Prevotella albensis* durch gewisse Strukturanaloga von Dipeptiden verringert werden konnte. Die durch die oben erwähnten HAP-Spezies bewirkte Ammoniak-Freisetzung aus Aminosäuren konnte durch ein synthetisches Aminosäurederivat (LY29) wirksam gehemmt werden (Floret et al. 1999). Schließlich zeigten Newbold et al. (1999), dass auch etherische Öle (»essential oils«) eine spezifisch suppressive Wirkung auf die HAP-Spezies aufweisen. Auch wenn es sicherlich noch weiterer Versuche zur Quantifizierung und Absicherung der geschilderten Effekte bedarf, scheint hier doch ein erhebliches Potential zu liegen, regulierend in den Pansenstoffwechsel zur Verbesserung der ruminalen N-Nutzung einzugreifen.

#### 4.2 Erhöhung der mikrobiellen Syntheseleistung

Eine erhöhte mikrobielle Syntheseleistung kann unter sonst gleichen Bedingungen auch durch eine zeitgleiche (gleichzeitige), d. h. synchrone, Bereitstellung von energie- und stickstoffliefernden Verbindungen, erreicht werden. Das Konzept des Synchronismus beruht darauf, daß Informationen hinsichtlich Menge und zeitlichem Verlauf des Kohlenhydrat- und Rohproteinabbaus im Pansen so aufeinander abgestimmt (»synchronisiert«) werden, daß eine maximale Effizienz der mikrobiellen Synthese, ausgedrückt in Gramm mikrobiellen Rohproteins pro Kilogramm im Pansen fermentierter organischer Masse oder Koh-

lenhydrate, erreicht wird (Blank et al. 1998). Es gab in den letzten Jahren weltweit eine ganze Reihe von Versuchen zu diesem Thema mit teils widersprüchlichen Ergebnissen, so dass abschließend über die Tragfähigkeit des Konzeptes noch nicht befunden werden kann. Es liegen aber auch aus neuerer Zeit Hinweise aus Milchkuhversuchen mit hohen Futteraufnahmen vor, in denen bei synchroner gegenüber asynchroner Gestaltung des Nährstoffabbaus in den Vormägen eine erhöhte mikrobielle Proteinsynthese erzielt werden konnte (siehe Steingass et al. 2003), während andere Autoren bei geringeren Futteraufnahmen sowohl erhöhte als auch verringerte mikrobielle Syntheseleistungen ermittelten (Kaswari et al. 2003).

Ein etwas überraschender Befund wurde kürzlich von Abreu et al. (2004) berichtet. In Versuchen an Schafen mit Früchten einer Saponine enthaltenden *Sapindus*-Art (*S. saponaria*) wurde erstaunlicherweise zwar nicht die aufgrund der grenzflächenaktiven, seifenähnlichen Eigenschaft von Saponinen erwartete Reduzierung der Protozoenpopulation im Pansen bewirkt, aber dennoch kam es zu einer effizienteren Nutzung des Futter-Rohproteins. Dies manifestierte sich in einer Erhöhung der mikrobiellen Nettosyntheseleistung. Es ist sicherlich lohnend, diesen Befunden weiter nachzugehen.

## 5 Fazit

In der Zusammenschau der obigen Ausführungen und im Hinblick auf das Generalthema der Tagung »Mikrobiologie und Tierernährung« lässt sich folgendes Fazit ziehen. »Klassische« Fütterungsmaßnahmen zur Optimierung der Pansenfermentation (Rationszusammensetzung, Stärkeart, Fermentierbarkeit der Faser, Proteinbeschaffenheit) sind weiter zu entwickeln und sollten vernetzt werden mit modernen Ansätzen der Mikrobiologie, die auf gezielte Veränderungen der Zusammensetzung und Leistungsfähigkeit der Mikroflora hinzielen, sowie der Futtermittelkunde, z.B. Futtermittel mit verbesserten Fermentations-eigenschaften der Faser zu erzeugen.

## Literatur

- Abreu, A., J. E. Carulla, C. E. Lascano, T. E. Díaz, M. Kreuzer und H. D. Hess, 2004. Effects of *Sapindus saponaria* fruits on ruminal fermentation and duodenal nitrogen flow of sheep fed a tropical grass diet with and without legumes. J. Anim. Sci. 82, 1392–1400.
- Allison, M. J., A. C. Hammond und R. J. Jones, 1990. Detection of ruminal bacteria that degrade toxic dehydroxypyridine compounds produced from mimosine. Appl. Environ. Microbiol. 56, 590–594.
- Beaugerard, M., C. Dupont, R. M. Teather und M. A. Hefford, 1995. Design, expression, and initial characterization of MBI, a de novo protein enriched in essential amino acids. Biotechnol. (N. Y.) 13, 974–981.
- Blank, R., K.-H. Südekum, I. Immig, und J. Kleinmans, 1998. Synchroner Abbau von Kohlenhydraten und Rohprotein in den Vormägen - eine neue Variable für die Rationsgestaltung? Übers. Tierernähr. 26, 157–188.
- Dehority, B. A. und C. G. Orpin, 1988. Development of, and natural fluctuations in, rumen microbial populations. In: P. N. Hobson (Ed.) The Rumen Microbial Ecosystem, 151–183. Elsevier Applied Science, London.
- Dehority, B. A. und P. A. Tirabasso, 1998. Effect of ruminal cellulolytic bacterial concentrations on in situ digestion of forage cellulose. J. Anim. Sci. 76, 2905–2911.
- Demeyer, D. und V. Fievez, 2004. Invited commentary. Is the synthesis of rumen bacterial protein limited by the availability of pre-formed amino acids and/or peptides? Br. J. Nutr. 91, 175–176.
- Doi, R. H., A. Kosugi, K. Murashima, Y. Tamaru und S. O. Han, 2003. Minireview. Cellulosomes from mesophilic bacteria. J. Bacteriol. 185, 5907–5914.
- Floret, F., L. C. Chaudhary, W. C. Ellis, S. El Hassan, N. McKain, C. J. Newbold und R. J. Wallace, 1999. Influence of 1-[(E)-2-(2-methyl-4-nitrophenyl)diaz-1-enyl]pyrrolidine-2-carboxylic acid and diphenyliodonium chloride on ruminal protein metabolism and ruminal microorganisms. Appl. Environ. Microbiol. 65, 3258–3260.
- Franzolin, R. und B. A. Dehority, 1996. Effect of prolonged high-concentrate feeding on ruminal protozoa concentrations. J. Anim. Sci. 74, 2803–2809.
- Gregg, K., B. Hamdorf, K. Henderson, J. Kopecky und C. Wong, 1998. Genetically modified ruminal bacteria protect sheep from fluoracetate poisoning. Appl. Environ. Microbiol. 64, 3496–3498.
- Hristov, A., T. A. McAllister, Z. Xu und C. J. Newbold, 2002. Proteolytic activity in ruminal fluid from cattle fed two levels of barley grain: a comparison of three methods of determination. J. Sci. Food Agric. 82, 1886–1893.
- Karnati, S. K. R., Z. Yu, J. T. Sylvester, B. A. Dehority, M. Morrison und J. I. Firkins, 2003. Technical note: Specific PCR amplification of protozoal 18S rDNA sequences from DNA extracted from ruminal samples of cows. J. Anim. Sci. 81, 812–815.
- Kaswari, T., P. Lebzién, U. ter Meulen und G. Flachowsky, 2003. Effects of synchronization of protein and energy availability in the rumen on microbial protein synthesis in dairy cows. Proc. Soc. Nutr. Physiol. 12, 86 (Abstr.).

- Kingston-Smith, A. H. und M. K. Theodorou, 2000. Post-ingestion metabolism of fresh forage. *New. Phytol.* 148, 37–55.
- Kobayashi, Y., 2003. Recombinant rumen bacteria: problems and opportunities. *Nutr. Abstr. Rev. Ser. B* 73, 51R–59R.
- Koike, S., J. Pan, Y. Kobayashi und K. Tanaka, 2003. Kinetics of in sacco fiber-attachment of representative ruminal cellulolytic bacteria monitored by competitive PCR. *J. Dairy Sci.* 86, 1429–1435.
- Lynd, L. R., P. J. Weimer, W. H. van Zyl und I. S. Pretorius, 2002. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol. Molec. Biol. Rev.* 66, 506–577.
- MacCallum, J. D., M. A. Hefford, S. Omar und M. Beauregard, 1997. Prediction of folding stability and degradability of the de novo designed protein MB-1 in cow rumen. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 66, 83–93.
- Mathieu, F., J. P. Jouany, J. Senaud, J. Bohatier, G. Bertin und M. Mercier, 1996. The effect of *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae* on fermentations in the rumen of faunated and defaunated sheep; protozoal and probiotic interactions. *Reprod. Nutr. Dev.* 36, 271–287.
- Nagaraja, T. G., C. J. Newbold, C. J. van Nevel und D. I. Demeyer, 1997. Manipulation of rumen fermentation. In: P. N. Hobson und C. S. Stewart (Eds.) *The Rumen Microbial Ecosystem*, 2nd Ed, 522–632. Blackie Academic & Professional, London.
- Nelson, K. E., M. L. Thonney, T. K. Woolston, S. H. Zinder und A. N. Pell, 1998. Phenotypic and phylogenetic characterization of ruminal tannin-tolerant bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3824–3830.
- Newbold, C. J. und J. P. Jouany, 1997. The contribution of individual genera in a mixed protozoal population to the breakdown of bacteria in the rumen. *Reprod. Nutr. Dev.* 88, 46 (Abstr.).
- Newbold, C. J., F. M. McIntosh, R. J. Wallace, P. Williams und J. D. Sutton, 1999. Effects of essential oils on ammonia production by rumen fluid in vitro. *Book of Abstracts of the VIIIth International Symposium on Protein Metabolism and Nutrition*, 63 (Abstr.).
- Newbold, C. J., C. S. Stewart und R. J. Wallace, 2001. Developments in rumen fermentation – the scientist's view. In: P. C. Garnsworthy und J. Wiseman (Eds.) *Recent Advances in Animal Nutrition*, 251–279. Nottingham University Press, Nottingham.
- Steingass, H., S. Keller und W. Drochner, 2003. Das Konzept synchroner Rationsgestaltung für Milchkühe. Umsetzungsmöglichkeiten in Beratung und Praxis. In: Bundesanstalt für alpenländische Landwirtschaft Gumpenstein (Hrsg.) 30. Viehwirtschaftliche Fachtagung »Rinderaufzucht, Milchviehfütterung, Schafhaltung, Ökonomik«, 17–24. BAL Gumpenstein, Irnding.
- Südekum, K.-H., M. Klein und M., Paschke-Beese, 2004. Ruminal nutrient degradation of untreated and chemically treated wheat grain. *Proc. Soc. Nutr. Physiol.* 13, 77 (Abstr.).
- Südekum, K.-H. und A. Schröder, 1998. Evaluation of phosphatidylcholine as a marker of protozoal mass in the rumen of steers fed wheat silage diets. *J. Dairy Sci.* 81 (Suppl. 1), 308 (Abstr.).
- Towne, G., T. G. Nagaraja und K. E. Kemp, 1988. Ruminal ciliated protozoa in bison. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 2733–2736.
- Wallace, R. J. und N. McKain, 1991. A survey of peptidase activity in rumen bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 137, 2259–2264.
- Wallace, R. J., C. J. Newbold, B. J. Bequette, J. C. MacRae und G. E. Lobley, 2001. Increasing the flow of protein from ruminal fermentation – review. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 14, 885–893.

## Diskussion



### BREVES

Ich möchte noch mal kurz auf den Punkt eingehen, der ja einen bestimmten Teil Deines Vortrages beinhaltet und den wir gestern auch schon diskutiert haben, sprich, die Möglichkeiten und Perspektiven über veränderte Mikroorganismen. Ich fand das sehr gut, nochmals die Ideen der 80er Jahre aufzugreifen.

Es ist ja unstrittig, dass wir heute aufgrund erheblich fortgeschrittener mikrobiologischer Methoden im Stande sind, da noch mehr an Möglichkeiten anzubieten als noch vor 25 Jahren. Aber ich meine, das Grundproblem liegt darin, dass wir immer noch nicht wissen, welche Ursachen letztendlich dafür sorgen, dass alle Mikroorganismen, die in dieses Ökosystem hineingebracht worden sind, bislang innerhalb kürzester Zeit auch wieder eliminiert wurden. Das heißt, die eigenen Mechanismen, die in diesem System vorhanden sind, sind offensichtlich von uns noch nicht gut genug verstanden, um hier wirklich einen Fortschritt zu erzielen.

Nur als kleines Beispiel noch: Du hast das angeschnitten mit den frei beweglichen Bakterien mit erhöhter zellulolytischer Aktivität. Dies ist, ehrlich gesagt, für mich ein Ansatz, den ich nicht so ganz nachvollziehen kann, weil eigentlich die metabolische Funktion eines frei beweglichen Bakteriums sicherlich nicht die eines vermehrten Zelluloseabbaus ist.

### SÜDEKUM

Hinter diesem Beispiel steckt die Vorstellung, dass der Umfang des Zelluloseabbaus möglicherweise be-

grenzt ist, dass die vorhandene Mikrobenflora nicht alle vorhandenen Plätze, die da sind zum Andocken, besetzt.

Ich habe ja mit dem, was ich dazu nachfolgend ausgeführt habe, versucht, zu sagen, dass das ganz offensichtlich nicht der Fall ist. Das Problem scheint eher zu sein, dass eigentlich Aktivität und Anzahl der Zellulose abbauenden Mikroorganismen ausreichen, dass aber die Oberflächen gar nicht vorhanden sind, und dass unter den Bedingungen unserer Fütterungssituationen im Milchviehbereich insbesondere, die Pilze, die dazu dienen könnten, Spaltöffnungen einigermaßen schnell zu besiedeln und auseinander zu drücken, um damit die inneren Oberflächen zu vergrößern, gar nicht zum Tragen kommen.

Ich möchte auch nochmals betonen, es waren vor allen Dingen, von der Seite der einzelnen Spezies her, auch Hoffnungen, die geäußert wurden. Ich war nur selbst ein bisschen überrascht bei der Vorbereitung, wie massiv in der Literatur der letzten 3 bis 4 Jahre, diese Dinge wieder, auch mit der scheinbaren Aussicht auf kurzfristige Umsetzbarkeit, vorgetragen wurden. Ich persönlich bin da auch nicht so optimistisch. Ich hielt es nur für meine Pflicht, das hier nebeneinander zu stellen.

### MEYER

Erstens: Aus den 80er Jahren kommt die Anmerkung, Hormone im Pansen zu produzieren. Als Endokrinologe muss ich sagen, dass Hormone kein Spielzeug sind, sondern sie sind sehr wirksam und

man sollte sie dort lassen, wo sie hingehören, nämlich in das Endokrinium.

Zweitens: Als Wildtierbiologe möchte ich anmerken, dass der Umgang mit den verschiedensten Tanninen und Saponinen der verschiedensten Struktur für Wiederkäuer kein Problem ist. Die Frage ist nur, über welche Wiederkäuer spricht man.

Es gibt da viele Vorbilder, also das Reh oder die Elche, die Giraffe oder auch die Ziege, die im Parotispeichel Polyproline produzieren, damit die Tannine binden und damit auf einem vernünftigen Niveau halten, so dass alle die Effekte, die sie ansprechen, dann auch wirksam werden, und vielleicht hat man da ein viel besseres Vorbild. Hinzu kommt auch, dass, wenn man über Tannine spricht, man ja nicht nur den Pansen, sondern insbesondere die Folgewirkungen bei der weiteren Verdauung im Auge haben muss, so dass man vielleicht diesbezüglich dort mit nachschaut. In der Ziege hätte man wahrscheinlich auch ein sehr gutes Vorbild, da sie z.B. im Vergleich zum Rind eine relativ große Parotis-Speicheldrüse hat.

SÜDEKUM

Zum Ersten: Ich stimme Ihnen da völlig zu. Ich habe diese Tabelle ja auch ganz bewusst als Rückblick auf Hoffnungen der 80er Jahre deklariert, und so war sie auch in der Quelle überschrieben. Es gab damals tatsächlich Leute, die meinten, man könnte in die Richtung gehen. Ich denke nicht, dass ich das zu meinem eigenen Anliegen gemacht habe.

Auch im 2. Punkt stimme ich Ihnen zu. Die Aufgabe, die hinsichtlich Tanninen und Saponinen besteht, unter Produktionsbedingungen in Mitteleuropa, liegt aus meiner Sicht eher darin, bestmöglich die einzelnen chemischen Strukturen zu nutzen, um ein Verhältnis hinzubekommen, das eine bestmögliche Nährstoffausnutzung ermöglicht. Dass man dazu von Ziegen, und auch von vielen Wildwiederkäuern, eine ganze Menge lernen kann, ist auch meine Meinung.

STEINHART

Zur Frage des Zellulose-Abbaus im Pansen: Wir beschäftigen uns seit 5 Jahren mit der Strukturaufl

klärung von Nahrungsfaser – nutritional fiber – und da ist noch lange nicht alles bekannt, weil es die Methoden, die man dazu verwendet, erst seit 2–3 Jahren gibt, nämlich 2- und 3-dimensionale NMR. Wir haben herausgefunden, dass diese Nahrungsfaser, je nachdem, was Sie für eine Pflanze nehmen, total unterschiedlich ist. Da spielen zum Beispiel Phenolkarbonsäuren eine große Rolle, und die sind ja auch physiologisch von großer Bedeutung. Man sollte sich daher mehr mit diesem Substrat »nutritional fiber«, die ja im Pansen eine sehr große Rolle spielt, beschäftigen. Ich bin immer ein bisschen skeptisch, wenn ich höre: Nahrungsfaser, Ballaststoffe, Zellulose, zum Beispiel auch Lignin. Lignin, das gibt's nämlich gar nicht, das ist verknüpft mit dem, was wir als Nahrungsfaser bezeichnen. Da ist noch etwas von Seiten der Substrate offen, die möglicherweise die Tätigkeit der Mikroorganismen beeinflussen könnten. Wir beginnen gerade ein Projekt, wo wir uns die Wechselwirkungen von diesen komplexen Strukturen mit bestimmten Mikroorganismen genauer angucken.

SÜDEKUM

War ein Kommentar, denke ich, nehme ich so als Kommentar auch hin.

FLACHOWSKY

Zwei kleine Fragen, die eine: BM-Hybriden, die werden ja nun schon lange diskutiert. Ich hatte gestern auch Milokorn noch erwähnt.

Nun muss man feststellen, wenn man in's richtige Leben geht, dass das die Pflanzen sind, die am ehesten umfallen, weil eben die Stabilität fehlt. Wieweit ist man da eigentlich? Stunden wir da auch wieder nur in 20 Jahren, retrospektiv betrachtend: Das hatten wir damals gedacht und es hat nichts gebracht? Die zweite Anmerkung: Synchronisation. Mich überrascht ein bisschen die Aussage, dass Sie erwarten, dass man bei höheren Futteraufnahmen dort was bringt. Ich würde es eher andersherum sehen, bei selteneren Verzehr oder geringeren Futtergaben ist es doch viel wichtiger, die Dinge abzustimmen, weil die nächste Futtergabe in der größten Zeit erst mal kommt. Wenn

die Fütterungsfrequenz sehr hoch ist, die Tiere ad libitum-Zugang haben, ist doch eigentlich zu erwarten, dass immer was Fermentierbares und auch irgendein Stickstoff vorhanden ist, der dann mikrobiell genutzt werden kann. Also mich überrascht diese Aussage, dass Sie erwarten, wenn die Kuh 30 kg Trockenmasse frisst, dann die Synchronisation wichtiger wird.

Was ist der Hintergrund für diese Aussage?

#### SÜDEKUM

Ich fange mit der zweiten Frage an. Der Hintergrund dieser Aussage ist, dass es Messungen gibt, z. B. von Herrn Steingass aus Hohenheim, der gezeigt hat, dass auch bei Fütterung einer totalen Mischration und entsprechend hohen Futteraufnahmen zwischen 60 und 70% der Gesamtfutteraufnahme in zwei großen Mahlzeiten erfolgt.

Sie mögen andere Daten haben, aber ich kenne solche Zahlen. Und dann spielt natürlich, gerade bei ganz hohen Futteraufnahmen, der Synchronismus mehr eine Rolle. Der andere Grund ist, dass insgesamt für den Nährstoffabbau pro Einheit Stärke, Protein, was auch immer, weniger Zeit zur Verfügung steht und damit dann temporäre Mangelsituationen, die bei niedrigeren Futteraufnahmen auszugleichen sind, eine größere Rolle spielen.

Ich denke, ein Beleg dafür, dass vielleicht mit dem Synchronismus was dran sein könnte, kam von intensiv wachsenden Schaflämmern, die ja auch, bezogen auf die Stoffwechselmasse, eine außerordentlich hohe Leistung erbringen müssen. Deshalb bin ich nach wie vor davon überzeugt, dass tatsächlich das Thema des Synchronismus am hochleistenden Tier mit hohen Futteraufnahmen zu prüfen ist, und nicht bei niedrigen Aufnahmen.

Zum Ersten: Die verringerte Standfestigkeit von Sorten, die im Halm weniger Lignin haben, ist ja ein generelles Problem. Das haben wir ja auch, wenn wir an die Hirse denken, im Hinblick auf Fütterung von Geflügel. Tanninarme Hirsesorten werden zwar besser gefressen, und können in höheren Anteilen eingesetzt werden, haben aber den Nachteil, dass leider auch die Vögel, die bereits auf dem Feld Zugang zu

dieser Hirse haben, die wesentlich lieber aufnehmen als die tanninreichen Sorten. Insofern gibt es da einen Zielkonflikt, der möglicherweise noch ganz andere Maßnahmen erfordert. Dieser Zielkonflikt spielt weniger eine Rolle, wenn wir an die Nutzung von Futterpflanzen in vegetativen oder frühgenerativen Stadien denken, also die klassischen Grünfütter. Dort ist Standfestigkeit weniger ein Problem, obwohl auch dort offenere Zellwandstrukturen bedingen könnten, dass Pflanzenpathogene leichter in die Strukturen eindringen. Das ist aber ein Zielkonflikt, den man nicht einfach am grünen Tisch lösen kann, sondern unter konkreten Bedingungen prüfen muss.

#### SCHWARZ

Ich möchte noch mal auf den Punkt der Protozoen zu sprechen kommen, der auch ein Teil deines Vortrages war.

Wie weit ist denn eigentlich mit einer Fluktuation der Protozoenpopulation unter unseren normalen Rationen, die wir heute an Hochleistungskühe verfüttern, zu rechnen. Ist da eine große Variation gegeben?

Ein weiterer Punkt: Gibt es Wechselwirkungen zu Fett als Futterzusatzstoff oder als Fett? Das ist ja gar nicht im Vortrag vorgekommen.

#### SÜDEKUM

Das Problem bei den Protozoen ist, dass es erschütternd wenig Messungen mit Protozoen an Milchkühen gibt. Das kann man fast an einer Hand abzählen. Dazu kommt, dass ja auch das Arbeiten mit Protozoen in Reinkultur ein anderes Problem ist als mit Bakterien. Insgesamt beruht ein großer Teil der Erkenntnisse über Protozoen auf mikroskopischen Techniken. Die funktionieren ganz gut, weil die Protozoen dankenswerter Weise ja erheblich größer sind als Bakterien, aber was dort an quantitativer Information vorhanden ist, sind eigentlich relativ wenige Versuche. Ich hatte den Bereich ja abgegriffen, wo wir mit der höchsten Protozoendichte zu rechnen haben, 40–60% Konzentratfutter. Die Speziesvielfalt ist wesentlich geringer, als bei Bakterien, sowohl insgesamt, als auch, wenn man sich das einzelne Tier anschaut.

Es kommen in einem Individuum immer nur wenige Arten nebeneinander vor. Das können aber bei 2 Genossinnen im gleichen Stall unterschiedliche Arten sein.

Der letzte Punkt: Fett hat natürlich Auswirkungen, und bei größeren Mengen von Fetten in ungeschützter Form, die dann im Pansen entsprechend hydrolytisch gespalten werden, haben die freien Fettsäuren eine Wirkung auf die Membrane der Protozoen mit dem Nettoeffekt, dass die Protozoenzahl reduziert ist. Deshalb kann man ja auch im Extremfall mit einer Kombination aus Stärke oder Getreide plus Fett einen Pansen deformieren.

PFEFFER

Ich würde gern noch eine Frage anhängen: Was passiert eigentlich genau mit der Stärke der Protozoen?

SÜDEKUM

Die wird wohl, sofern es sich um die Aufnahme ganzer Stärkegranula oder komplexer Zusammenballungen einzelner Granula handelt, auch im Laufe der Zeit wieder freigegeben und steht dann dem ganz normalen hydrolytischen Abbau und der Fermentation zur Verfügung. Es ist dann tatsächlich ein vorübergehendes Herausnehmen aus dem Geschehen.

Und zusätzlich synthetisieren die Protozoen selbst auch eine stärkeähnliche Verbindung, ein  $\alpha$ -Glukan, das dann im Zuge der Lysis von Protozoenzellen auch freigesetzt wird, oder über die Passage mit dem Darminhalt in den Dünndarm gelangt.

PFEFFER

Ja, das war meine Frage, wie viel davon kommt denn in den Dünndarm und wie viel ist nur vorübergehend im Pansen da?

Schwanken da die Konzentrationen sehr stark? Wie sieht es aus in der Literatur? Gibt es dazu Antworten oder sind es nur solche Fragen?

SÜDEKUM

Ich würde im Analogieschluss zu dem, was bekannt ist, vom in Protozoen gebundenen Protein

schließen, dass die Bedeutung für die vorübergehende Speicherung von  $\alpha$ -Glukan in den Vormägen wesentlich größer ist, als die Bedeutung des Beitrages der Protozoen für die Stärkemenge, die in den Dünndarm gelangt. Auch beim Protein ist es ja so, dass, je nach Fütterungssituation, von unter 5 bis hin zu 50% des gesamten Mikrobenproteins in Protozoen vorliegen kann, dass aber bei Messungen des Chymusflusses in den Dünndarm hinein dieser Anteil in aller Regel unter 10% liegt.

BREVES

Nur als kurze Ergänzung zu diesem Thema:

Aufgrund des Phänomens der selektiven Retention der Protozoen ist ja eigentlich vor langer Zeit schon gezeigt worden, dass zumindest auf der Ebene der untersuchten Arten einige nur zu einem verschwindend geringen Teil in distale Darmabschnitte kommen. Deswegen denke ich, dass die Verfügbarkeit für ruminale Stoffwechselprozesse letztendlich das Dominierende ist. Das gilt für Stärke ebenso wie für Proteine.

SÜDEKUM

Ich möchte aber darauf hinweisen, dass diese selektive Retention insbesondere für Arten gezeigt ist, die ein so langes Generationsintervall haben, dass sie eigentlich gar nicht im Pansen mehr vorhanden sein dürften. Es gibt ja einige neuere Studien, die zeigen, dass andere Arten sich erheblich schneller reproduzieren, als man bisher angenommen hat, und für die auch diese selektive Retention nicht beschrieben ist.

Aber das trägt sicherlich dazu bei, dass insbesondere innerhalb der Vormägen die Bedeutung der Protozoen zu sehen ist.

PFEFFER

Ich würde gern noch einen anderen Punkt ansprechen, das ist das Aminosäuremuster. Wir tun ja immer so seit Langem, als ob das in den Mikroorganismen sehr einheitlich und konstant sei, und wenn man genauer hinguckt, stimmt das gar nicht. Da ist in erheblichem Maße Varianz drin. Du hattest auch

gesagt, darauf könnte man ja achten, aber dann ist an die Nukleinsäuren zu denken. Gibt es denn da Unterschiede? Das ist doch gleich mit den etwa 20 % in den Nukleinsäuren? Also da habe ich nicht ganz verstanden, worauf Du hinaus willst.

SÜDEKUM

Nein, mir geht es darum, dass dieser Weg einer Verbesserung des Aminosäuremusters der Pansenbakterien, zumindest theoretisch, etwas Interessantes ist. Wir müssen aber berücksichtigen, dass gegenüber einem etwa Gräserprotein, das unabgebaut die Vormägen überlebt, das ja fast 100 % Reinprotein ist. Weit über 90 % ist tatsächlich Protein. Die Bakterien liefern aufgrund des hohen Anteils an Stickstoff in Nukleinsäuren immer einen geringeren Reinproteinanteil, und das verdünnt natürlich auch das Aminosäure-Lieferungsvermögen insgesamt.

Die Variation des Aminosäuremusters der Pansenbakterien ist belegt. Dass wir das in unseren Systemen als konstant annehmen, hat ja andere Ursachen, unter Anderem eigene Unzulänglichkeit, und den Mangel, das tatsächlich rationsabhängig oder futteraufnahmeabhängig sauber zuordnen zu können.

BAUER

Herr Südekum, Sie haben gesagt, dass Listerien von Protozoen, ich will mal sagen, gefressen werden. Damit suggeriert man natürlich auch eine gewisse Infektionsabwehr. Kann es nicht so sein, dass diese Listerien aufgenommen werden, intrazellulär weiter leben und dann hernach wieder abgegeben werden. Wir kennen das von der Pathogenität von Listerien, die von Makrophagen aufgenommen werden, durch den Körper schwimmen und sich ansiedeln. Kann nicht ein ähnlicher Mechanismus bei den Protozoen vorhanden sein?

SÜDEKUM

Dieser Mechanismus kann vorhanden sein und kann, so lange man in vitro nur mit Pansenflüssigkeit arbeitet, auch nicht ausgeschlossen werden. Es gibt aber infolge dieser ersten Untersuchungen, zu

denen ich Ihnen die Abbildung gezeigt habe, eine Folgestudie, in der tatsächlich der Listerienfluss in den Dünndarm hinein quantifiziert wurde. Und da war auch tatsächlich die Menge reduziert. Inwieweit die Eigenschaften der übrig gebliebenen Listerien die gleichen waren oder verändert, das ist nicht untersucht worden. Aber es ist zumindest gezeigt worden, dass es sich nicht nur um eine vorübergehende Aufnahme und Wiederabgabe gehandelt hat, sondern dass tatsächlich die Menge reduziert wurde. Insofern nehme ich diese Daten schon als relativ positiv auf.

WOLFRAM

Du hast in Deinem Vortrag die Veränderung oder Verbesserung des Aminosäuremusters im mikrobiellen Protein im Hinblick auf einen höheren Gehalt an essentiellen Aminosäuren angesprochen. Wie sicher sind denn eigentlich inzwischen wissenschaftliche Daten zur Zufuhr von essentiellen Aminosäuren beim Wiederkäuer? Ist da wirklich ein Bedarf?

SÜDEKUM

Dass der Wiederkäuer den Bedarf hat, ist ja unstrittig. Was den zusätzlichen Bedarf angeht, hängt es sicherlich von den Bedingungen ab. Wenn wir uns europa- und weltweit umschauen, gibt es ja Systeme, wie das in Frankreich, die schon seit vielen Jahren, zumindest für Lysin und Methionin, sehr klare Empfehlungen abgeleitet, und jetzt in den letzten Jahren auch die anderen, als essentiell angenommenen, mit einbezogen haben. Das mag aber auch mit den besonderen Fütterungsbedingungen in Frankreich zu tun haben. Die haben ja dort weite Regionen, die extrem maislastig sind. Dort kann man relativ schnell einen Mangel an Lysin, Methionin, auch anderen essentiellen Aminosäuren, finden.

Bei der bei uns doch weiter verbreiteten sehr gemischten Fütterung ist das sicherlich schwieriger. Aber auch in dem Bereich gilt es nach wie vor, dass es keine ausreichenden experimentellen Befunde gibt, um das sauber abzuleiten.

PFEFFER

Ich möchte nur noch mal sagen, ich habe den Eindruck, vor 30 Jahren hätte der eine oder andere wahrscheinlich ungestraft äußern können, mit der Mikrobiologie im Pansen, das haben wir fast im Griff, und da ist eigentlich nicht mehr viel offen. Wir haben gerade gesehen, das Gegenteil ist der Fall. Wir könnten noch stundenlang weiter diskutieren, und es ist bei Weitem nicht alles klar. Dass uns das hier noch mal so deutlich geworden ist, ist sehr gut. Herzlichen Dank!

# Ernährung und intestinale Mikrobiota bei Schwein und Geflügel



## Einleitung

Die Nährstoffverdauung bei monogastrischen Tieren wird im Allgemeinen so dargestellt, dass die Nahrung im Magen und Dünndarm durch körpereigene Enzyme verdaut wird und darüber hinaus eine mikrobielle Verdauung im Dickdarm stattfindet. Dies ist auch für den größten Teil des Nährstoffumsatzes im Verdauungstrakt zutreffend.

Andererseits wissen wir aber, dass der gesamte Verdauungstrakt mit Bakterien besiedelt ist. So liegen im Mageninhalt von Schweinen pro Gramm  $10^7$  bis  $10^9$  Bakterien vor (vor allem Laktobazillen). Im weiteren Verlauf des Verdauungstraktes erhöht sich die Keimzahl bis auf  $10^{12}$  und mehr Keime pro Gramm im Dickdarm. Bezüglich funktioneller Gruppen dominieren im vorderen Dünndarm Milchsäurebakterien und Enterobakterien, während Ende Dünndarm und im Dickdarm die überwiegende Zahl den strikt anaeroben Bakterien zuzuordnen ist. Dabei ist zu berücksichtigen, dass mit der Ermittlung der luminalen Bakterien nicht alle Keime erfasst werden, da ein Anteil der Bakterien mit der Darmschleimhaut assoziiert ist, häufig Anheftungsfaktoren besitzen und in enger Wechselwirkung mit der Darmschleimhaut stehen.

Im Gegensatz zur allgemeinen Lehrmeinung sind Bakterien bereits im Dünndarm signifikant am Nährstoffumsatz beteiligt. Dies ist am teilweisen oder vollständigen Abbau von Substraten zu erkennen, für welche der tierische Organismus keine Verdauungsenzyme bildet (Pektine, 1-3,1-4- $\beta$ -Glucane, Arabino-

xylane). Darüber hinaus ist auch die Dekonjugation von Gallensäuren im Dünndarm eine bakterielle Stoffwechselleistung.

Seit Jahrzehnten werden bei verschiedenen Tierarten Leistungsförderer in Form von Antibiotika eingesetzt, deren Effekt unter bestimmten Voraussetzungen in einer Reduzierung der Durchfallhäufigkeit sowie auch einer Verbesserung von Leistungsparametern in einer Größenordnung bis zu 5% besteht. Diese Effekte werden auf eine Modifizierung der intestinalen Mikrobiota und deren Wechselwirkung mit dem tierischen Organismus zurückgeführt. Dazu gehören Interaktionen mit der Darmschleimhaut (Proliferation und Apoptose von Epithelzellen, Oberflächencharakteristika – Mucinbildung und Sekretion, Invasionen und Läsionen) und mit dem Immunsystem (Beeinflussung der epithelialen Lymphozytenpopulation und der Sekretion von Immunglobulinen).

Demnach ist die intestinale Mikrobiota nicht nur am Nährstoffumsatz im Verdauungstrakt beteiligt, sondern beeinflusst auch die Tiergesundheit. Auf diese Weise wird verständlich, dass unter bestimmten Voraussetzungen Modifikationen der Darmflora günstige Effekte für das Tier haben können, die auch in verbesserten Leistungsparametern ihren Ausdruck finden.

Mit dem bevorstehenden Verbot von Antibiotika als Futterzusatzstoffe in der Europäischen Union rückt das Interesse an anderen Futterzusatzstoffen, die durch Modifikation der Darmflora positive Effekte haben sollen, in den Vordergrund. Dazu gehören

Probiotika und Präbiotika, deren Wirkung in diesem Beitrag dargestellt wird. Aber auch die Wirkung anderer Nahrungsfaktoren wird in diese Betrachtung einbezogen.

## Methodische Aspekte zur Charakterisierung der intestinalen Mikrobiota

### Charakterisierung durch Kultivierung

Unsere Kenntnisse zu den im Verdauungstrakt vorkommenden Bakterienarten basieren im Wesentlichen auf Kultivierungsmethoden. Hierbei lässt man Proben aus dem Verdauungstrakt auf Selektivnährmedien wachsen, gewinnt daraus Reinkulturen und nimmt anschließend eine taxonomische Zuordnung mit Hilfe von biochemischen Kriterien vor. Auf diese Weise können Bakterien mit konventionellen Techniken bis auf die Spezies- bzw. Subspeziesebene bestimmt werden. Bei einfacher Zählung der koloniebildenden Einheiten auf Selektivnährmedien werden zudem meist auch Bakterien verschiedener Gattungen gemeinsam erfasst. So können beispielsweise mit einem Selektivmedium für Enterobakterien (McConkey-Medium) Bakterien der Gattungen *Escherichia spp.*, *Salmonella spp.*, *Enterobacter spp.* und *Shigella spp.* gemeinsam auf einer Platte erfasst werden. Demnach können mit dieser Vorgehensweise nur Aussagen zur Keimzahl von Bakteriengruppen gemacht werden, die ähnliche Wachstumsbedingungen benötigen.

Selbst wenn es gelingt, Reinkulturen zu gewinnen und taxonomisch zuzuordnen, wird mit kulturellen Methoden lediglich ein Teil der tatsächlich im Verdauungstrakt vorhandenen Arten erfasst. Dies ist darin begründet, dass außerhalb des Verdauungstraktes nicht alle Bakterien kultivierbar sind, weil möglicherweise unbekannte essentielle Wachstumsfaktoren fehlen, die möglicherweise von symbiotischen Partnern produziert werden oder eine physikalische Wechselwirkung mit der Darmschleimhaut für das Wachstum notwendig ist.

Daher kann heute nur geschätzt werden, dass über 400 Bakterienarten im Verdauungstrakt vorkommen. Schätzungen über noch unbekannte Bakterienarten

differieren je nach Berechnung zwischen 10 und 90 % der gesamten intestinalen Mikrobiota.

Aus dem bisher Gesagten wird deutlich, dass die konventionelle Mikrobiologie nicht die ausschließliche Methode zur Erforschung der intestinalen Mikrobiota sein kann. Andererseits haben Kultivierungsmethoden eine essentielle Bedeutung für die Charakterisierung neuer Bakterien, da StoffwechsellLeistungen bislang nur mit wachsenden Reinkulturen untersucht werden können.

### Charakterisierung mit Hilfe der Molekularbiologie

Die molekularbiologische Untersuchung von Darmbakterien bzw. deren spezifischer Nukleotidsequenzen hat unser Wissen über das Vorkommen bestimmter Mikroorganismenpopulationen erheblich erweitert. Insbesondere Nukleotidsequenzen von Ribosomen eignen sich zur Zuordnung von Bakterien gemäß ihrem phylogenetischen Ursprung (Lane et al., 1985). Dabei können zur Analyse sowohl Sequenzen der für die ribosomale RNA codierenden DNA (rDNA) herangezogen werden, als auch der ribosomalen RNA (rRNA) selbst. Mit sogenannten Gruppensonden lassen sich z.B. alle Bakterien einer Gattung erfassen. Darüber hinaus gelingt es in vielen Fällen auch, Sonden zu entwickeln, die artspezifisch sind. Das metho-

Abbildung 1: Methodik zum Nachweis bakterieller rRNA



dische Vorgehen ist in Abbildung 1 dargestellt. Da die Ribosomen die Orte der Proteinsynthese sind, ist die Quantifizierung der rRNA gleichzeitig ein Maß für die Stoffwechselaktivität eines Bakteriums. Besonders geeignet für derartige Untersuchungen sind Sequenzen der 16S Untereinheit der Ribosomen. Die Analyse der 16S rDNA der Mikrobiota des Ileums und des Dickdarmes von Schweinen hat ergeben, dass viele Sequenzen bisher noch nicht bekannt waren. Darüber hinaus konnten Bakterienarten identifiziert werden, die davor nicht zur Mikrobiota von Schweinen gezählt wurden (Leser et al., 2002).

Über die mikrobielle Besiedlung des Dünndarms ist noch weniger bekannt, weil ein erheblicher Anteil der Bakterien sich an der Schleimhautoberfläche ansiedelt, die ein sehr komplexes und für die Kultivierung nur schwer zu simulierendes Habitat darstellt.

### Beispiele für die Beeinflussung der intestinalen Mikrobiota durch Nahrungsfaktoren

#### *Nicht-Stärke-Polysaccharide (NSP) und NSP-hydrolysierende Enzyme*

Arabinoxylane (Pentosane) gehören zu den NSP und kommen in relativ hohen Konzentrationen in Roggen, aber auch in Weizen vor. Sowohl lösliche

Abbildung 2: Effekt der Xylanase Supplementierung auf die ileale Verdaulichkeit von Arabinoxylanen in Ferkeln (Bartelt et al., 2002) RW = Roggen/Weizen; RWX = Roggen/Weizen + Xylanase

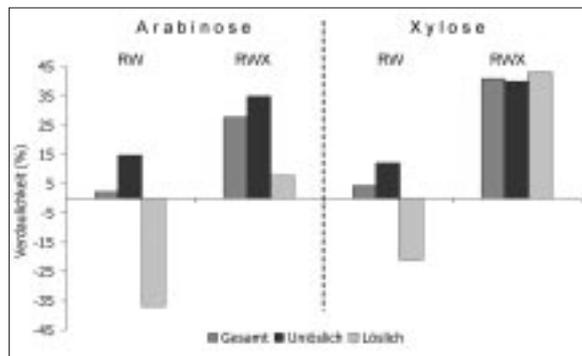
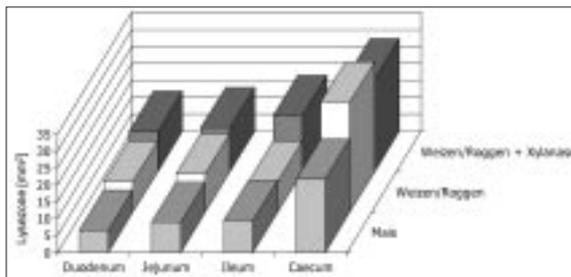


Abbildung 3: Bakterielle Beta-Glucanaseaktivität im Darm von 4 Wochen alten Broilern



als auch unlösliche Fraktionen dieser Kohlenhydrate können nicht durch körpereigene Enzyme abgebaut werden. Misst man allerdings die praecaecale Verdaulichkeit der Arabinoxylane bei Ferkeln, stellt man eine Verdaulichkeit der unlöslichen Fraktion von 10 bis 15% fest, während die der löslichen Fraktion negativ ist (Abb. 2). Diese Solubilisierung unlöslicher Arabinoxylane ist auf die Stoffwechselleistung der Bakterien im Dünndarm zurück zu führen. Bei Supplementierung der Diät mit einer Xylanase erhöht sich die Verdaulichkeit aller Arabinoxylanfraktionen. Dafür kann einerseits die Zufuhr des exogenen Enzyms direkt verantwortlich sein, der Effekt kann aber auch durch die Förderung von Bakterien, die in der Lage sind diese NSP zu hydrolysieren und zu verwerten, verstärkt werden.

Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zur Beeinflussung der Darmflora durch NSP und den Zusatz von Xylanasen bei Broilern haben zu der Erkenntnis geführt, dass durch den Zusatz des exogenen Enzyms NSP-abbauende Bakterien im Verdauungstrakt proximal gelegene Abschnitte kolonisieren. Verabreichung einer NSP-reichen Roggen/Weizen Ration bewirkte im Vergleich zu einer Ration auf Maisbasis vor allen Dingen einen Anstieg der bakteriellen  $\beta$ -Glucanaseaktivität im Caecum. Wurde der Roggen/Weizenration eine Xylanase zugesetzt, kam es insbesondere zu einem Anstieg der  $\beta$ -Glucanaseaktivität im Ileum, aber auch in den anderen Abschnitten des Dünndarms (Abb. 3). Dabei scheint es sich in erster

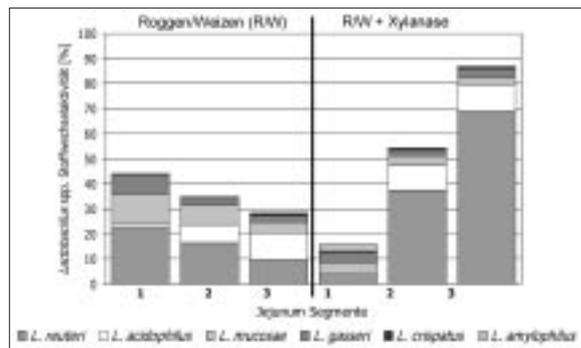
Linie um Enterokokken zu handeln, die  $\beta$ -Glucanasen bilden. Darüber hinaus wurde mit kulturellen Methoden gezeigt, dass durch Xylanasezusatz im Dünndarm von Broilern die Keimzahl von Enterobakterien und Gram positiven Kokken signifikant abnahm, während die der Milchsäurebakterien gegenüber Kontrolltieren erhöht war (Vahjen et al., 1998).

Die primäre Wirkung NSP-hydrolysierender Enzyme (Viskositätssenkung in der Digesta) ist bei Ferkeln weniger ausgeprägt als bei Broilern. Dennoch findet auch bei Ferkeln eine Beeinflussung der intestinalen Mikrobiota statt, wenn Enzyme als Futterzusatzstoff eingesetzt werden.

In einer Untersuchung zu Stoffwechselaktivitäten von *Lactobacillus* spp. im Dünndarmlumen von Ferkeln wurden eine Reihe einzelner Arten dieser Bakteriengruppe bei Zusatz einer Xylanase zu einer Roggen/Weizen-Ration mit Hilfe spezifischer 16S rRNA-Sonden untersucht.

Das Ergebnis des Enzymeinsatzes war eine drastische Verschiebung der Relation einzelner *Lactobacillus*-Arten zueinander sowie deren Stoffwechselaktivität in den einzelnen Dünndarmsegmenten insgesamt (Abb. 4). Auffällig ist die sehr hohe Stoffwechselaktivität von *L. reuteri* in der Digesta des mittleren

Abbildung 4: Einfluss der Xylanase Supplementierung auf die Stoffwechselaktivität verschiedener *Lactobacillus* spp. Species im Dünndarm von Ferkeln.  
\* = % der gesamten *Lactobacillus* spp. Aktivität



und letzten Segmentes des Jejunums von Tieren, die Xylanase-supplementiertes Futter erhielten. Diese *Lactobacillus*-Art ist für die Bildung des Bacteriocins Reuterin bekannt, welches im Gegensatz zu vielen anderen Bacteriocinen ein breites Wirkspektrum aufweist. Eine weitere Auffälligkeit ist die relativ hohe Stoffwechselaktivität von *L. mucosae* im Darmlumen der Kontrolltiere, was ein Hinweis auf einen erhöhten Anteil an abgeschilferten Mukosazellen sein könnte, da dieser Stamm für seine gute Adhäsion an Epithelzellen bekannt ist.

Abschließend zu dieser Fragestellung kann festgestellt werden, dass sowohl die Art und Menge der NSP im Futter als auch der Zusatz NSP-hydrolysierender Enzyme die Darmflora beeinflussen. Basis für den Einfluss der Enzymzusätze auf die Bakterienpopulation können verschiedene Effekte sein, wie Beschleunigung der Digestapassage, Verschiebung der Hauptorte der Nährstoffresorption in vordere Segmente, reduzierte Viskosität und Mucinbildung sowie Solubilisierung und partielle Hydrolyse von NSP.

### Präbiotika

Nach Gibson (1995) sind Präbiotika Kohlenhydrate, die durch körpereigene Enzyme nicht hydrolysiert werden können, daher in den Dickdarm gelangen und dort spezifisch durch erwünschte, gesundheitsfördernde Bakterienarten (z.B. Bifidobakterien) verwertet werden und sie auf diese Weise fördern. Präbiotische Effekte sind insbesondere für Inulin sowie für Fruktose oder Mannose enthaltende Oligosaccharide beschrieben worden. Das Konzept der Präbiotika ist für die Humanernährung entwickelt worden und es ist nicht sicher, ob es auch für die Ernährung von Nutztieren Gültigkeit hat. Zu dieser Fragestellung sind im Rahmen einer Dissertation an unserem Institut einige Untersuchungen durchgeführt worden. Zunächst wurde geprüft, inwiefern verschiedene Arten der Gattung *Bifidobacterium* zum Wachstum in einem Nährmedium mit einem Inulinpräparat als alleiniger Kohlenhydratquelle fähig sind. Dabei zeigte sich, dass *B. thermophilum* sehr gut zur Inulinverwertung fähig ist

Tabelle 1: Anzahl von Isolaten aus dem Darm von Broilern mit der Fähigkeit auf einem Inulinpräparat zu wachsen [%]

Segment	Enterobakterien Wachstum	Streptokokken Wachstum
Kropf	30 (n = 10)	80 (n = 10)
Magen	(0)*	100 (n = 11)
Jejunum	(0)*	100 (n = 16)
Ileum	100 (n = 6)	100 (n = 7)
Caecum	83 (n = 12)	100 (n = 19)

\* = keine Isolate

und *B. adolscens*, *B. bifidum* und *B. longum* unter diesen Bedingungen ebenfalls Wachstum aufweisen. Dagegen kann *B. suis* offensichtlich kein Inulin verwerten.

In einem weiteren Test wurde geprüft, ob andere Bakterien des Verdauungstraktes ebenfalls zur Verwertung des Inulinpräparats fähig sind. Zu diesem Zweck wurden Enterobakterien- und Streptokokkenisolate aus verschiedenen Abschnitten des Verdauungstraktes von Broilern gewonnen und in gleicher Weise geprüft. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 dargestellt und zeigen, dass fast alle Isolate Wachstum im Inulinmedium aufwiesen. Nach diesen Voruntersuchungen war nicht zu erwarten, dass Bifidobakterien im Verdauungstrakt bei Futter mit 1 % Inulinpräparat spezifisch gefördert werden würde. Bei Ermittlung der Stoffwechselaktivität verschiedener Bakteriengruppen im Dünndarminhalt von Broilern konnte allerdings ein Trend einer erhöhten Stoffwechselaktivität ermittelt werden, der für keine andere Bakteriengruppe vorlag. Auch die Konzentration mikrobieller Stoffwechselprodukte wurde beeinflusst, indem die Propionatkonzentration erhöht, Lactat sowie Stoffwechselprodukte strikt anaerober Bakterien (Butyrat und Valeriat) reduziert waren – alles nicht signifikant. Dieser Trend stellte sich aber erst nach 4 Wochen ein, was auf die Notwendigkeit einer langen Adaptationsperiode hinweist. Leistungsparameter wurden nicht beeinflusst.

### Probiotika

Probiotika sind lebensfähige Formen von Mikroorganismen, die in der Human- und Tierernährung

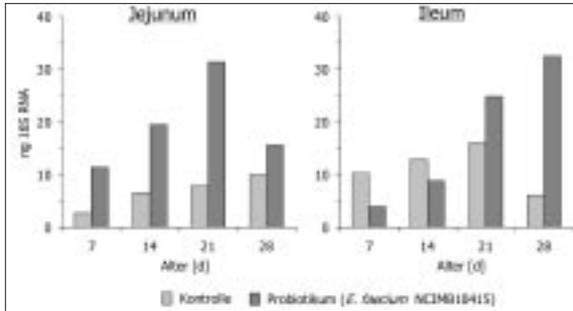
als Zusatzstoffe angewendet werden. Fuller (1989) hat für die Tierernährung Probiotika als Mikroorganismen definiert, die auf Grund eines verbesserten intestinalen mikrobiellen Gleichgewichts positive Effekte für das Wirtstier haben. Auch wenn diese Definition wenig genau ist, wird deutlich, dass die günstigen Effekte in erster Linie von einer Modifikation der mikrobiellen Besiedlung im Verdauungstrakt ausgehen sollen.

In der Europäischen Union haben gegenwärtig 19 Mikroorganismenpräparate eine Zulassung als Futterzusatzstoff. Für die Anwendung bei monogastrischen Tieren handelt es sich in erster Linie um Bakterienstämme der Gattungen *Enterococcus* und *Bacillus*. Zu deren Wirksamkeit bei Ferkeln gibt es zahlreiche Untersuchungen, die meist einen Trend zu verbesserten Leistungsparametern zeigen (nur in wenigen Fällen statistisch gesichert); dagegen geht aus fast allen Untersuchungen eine signifikante Reduzierung der Durchfallhäufigkeit hervor (Simon et al., 2003), woraus sich bereits eine Beeinflussung intestinaler Bakterien ableiten lässt.

Voraussetzung für eine probiotische Wirkung eines Bakteriums ist die Fähigkeit, im Verdauungstrakt seine Stoffwechselfunktionen auszuüben. Der Nachweis eines aktiven probiotischen Bakteriums im Verdauungstrakt gestaltet sich sehr schwierig und ist bisher nur durch indirekte Beweise möglich. Werden probiotische Bakterien eingesetzt, welche der autochtonen Flora angehören, wie es z. B. für Stämme der Bakterienart *Enterococcus faecium* zutrifft, ist ein Nachweis nur über molekularbiologische Methoden möglich.

Im Falle des probiotischen Stamms *Enterococcus faecium* NCIMB 10415, mit dem bei uns zahlreiche Versuche mit Schweinen und Geflügel durchgeführt wurden, ist dieser Nachweis mit einer spezifischen Sonde und Koloniehybridisierung gelungen. Mit dieser Technik konnte gezeigt werden, dass bei Saugferkeln, deren Mütter supplementiertes Futter erhielten, der probiotische Keim im Verdauungstrakt bereits zu einem Zeitpunkt nachweisbar war, zu dem die Ferkel selbst noch gar kein Ergänzungsfutter erhalten hatten

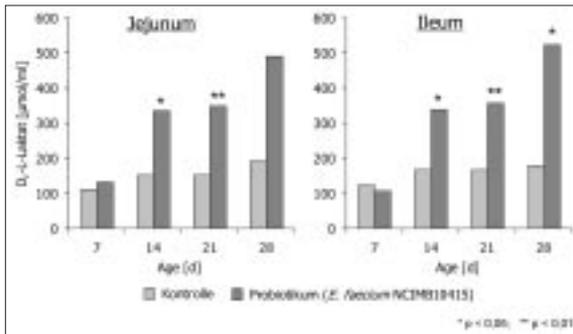
Abbildung 5: Stoffwechselaktivität thermophiler *Lactobacillus* spp. im Dünndarm von Mastputen bei Einsatz eines *E. faecium* Probiotikums



und dass auch nach Aufnahme des probiotikahaltigen Futters durch die Ferkel die Konzentration des Keimes relativ niedrig blieb (unter 1% der Enterokokken). Dennoch gibt es nachhaltige Einflüsse auf die intestinale mikrobielle Besiedlung, was anhand einiger Beispiele gezeigt werden soll.

Da Milchsäurebakterien besonders der Gattung *Lactobacillus* als »erwünschte« Bakterien im Verdauungstrakt betrachtet werden, galt in einem Versuch mit Mastputen das besondere Augenmerk der Beeinflussung dieser Keimgruppe durch Verwendung von *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 als Futterzusatz-

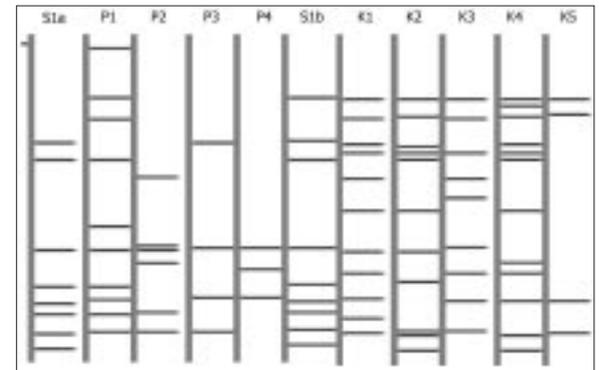
Abbildung 6: Laktatkonzentrationen im Dünndarm von Mastputen bei Einsatz eines *E. faecium* Probiotikums



stoff (Vahjen et al., 2002). Wurde zur Prüfung eine konventionelle Methode zur Erfassung von Milchsäurebakterien (MRS Medium) eingesetzt, konnte kein Einfluss des Probiotikums auf die Keimzahl dieser Bakteriengruppe im Dünndarm detektiert werden. Bei Einsatz einer 16S rRNA-Sonde, die gruppenspezifisch für thermophile Lactobacillen war, lag im Jejunum zu allen geprüften Zeitpunkten eine höhere Stoffwechselaktivität bei Aufnahme des probiotischen Keimes vor. Im Ileum stellte sich diese Relation erst nach drei Wochen ein (Abb. 5). Die stimulierte Stoffwechselaktivität von Lactobacillen spiegelte sich auch in der signifikanten Erhöhung der Laktatkonzentration in denselben Proben wider (Abb. 6). Anhand dieses Methodenvergleiches wird deutlich, dass weiterführende Studien zur Prüfung und zum Verständnis der Wirkung von Probiotika den Einsatz hochspezifischer Nachweismethoden erfordern.

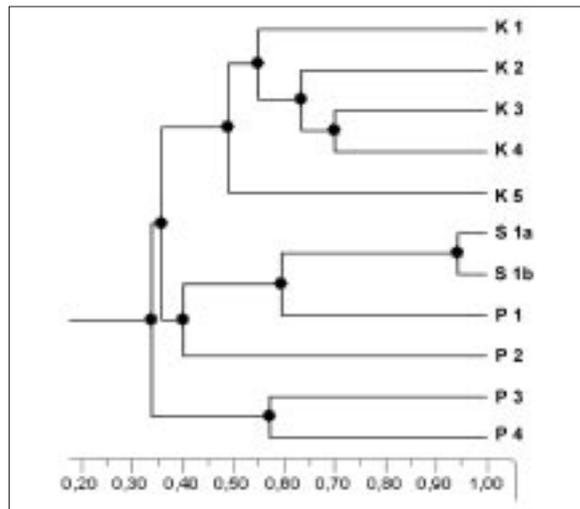
Im Rahmen einer interdisziplinären DFG-Forschergruppe wird der Einfluss des gleichen Probiotikums auf pathogene und apathogene Bakterien von Ferkeln untersucht. Eine der geprüften Fragestellungen war, ob die Applikation des Probiotikums an die Sauen bereits einen prägenden Effekt auf die Mikrobiota

Abbildung 7: Denaturierende-Gradienten-Gel-Elektrophorese zur Analyse der bakteriellen Populationen im Colon von 14 Tage alten Saugferkeln bei Einsatz eines *E. faecium* Probiotikums (abstrahierte Darstellung)



der Ferkel in den ersten Lebenswochen hat. Auf die sehr frühe Anwesenheit des probiotischen Keimes im Verdauungstrakt der Ferkel wurde bereits hingewiesen. Zur Darstellung der Biodiversität der Mikrobiota in Faeces von Sauen bzw. Coloninhalt von Ferkeln wurde die Denaturierenden-Gradienten-Gel-Elektrophorese (DGGE) eingesetzt. Hierbei wird die Ähnlichkeit von bakteriellen DNA-Bandenmustern verglichen, wobei theoretisch jede Bande die DNA einer Bakterienart repräsentiert (Abb. 7). Mit Hilfe dieser Technik konnte nachgewiesen werden, dass sich bei Sauen, die während der Trächtigkeit das Probiotikum erhielten, das mikrobiologische Muster der Faecespopulation stärker veränderte als dasjenige von Kontrollsauen im gleichen Zeitraum (Soerensens-Ähnlichkeitsindex  $0,49 \pm 0,07$  vs.  $0,78 \pm 0,12$ ;  $p=0,07$ ). Auch die Bandenmuster von Proben aus dem Colon der Ferkel am 14. Lebenstag waren bei Probiotikaferkeln und Kontrolltieren unterschiedlichen Clustern zuzuordnen (Abb. 8).

Abbildung 8: Dendrogramm zur Ähnlichkeitsanalyse der bakteriellen Populationen im Colon von Ferkeln bei Einsatz eines *E. faecium* Probiotikums. Proben von Kontroll- (K1-K5) und Probiotikaferkeln (P1-P5) bzw. Standards (S)

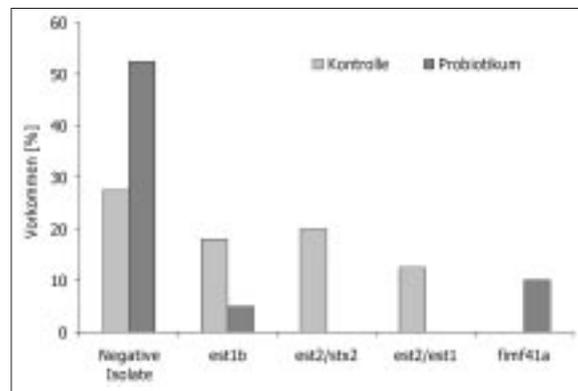


Daraus lässt sich ableiten, dass einerseits bei den Sauen durch die langfristige Aufnahme des probiotischen Bakteriums die Mikroorganismenpopulationen einer Modifikation unterliegen und dass andererseits diese Modifikation eine maternale Prägung der intestinalen Mikrobiota der Ferkel bewirkt.

Auch Untersuchungen zur *E. coli*-Population des gleichen Tiermaterials wiesen auf die Notwendigkeit hochspezifischer Nachweismethoden hin. Eine Bestimmung der Zahl coliformer Keime im Colon von Ferkeln, geprüft vom 14. Lebenstag an bis 6 Wochen nach dem Absetzen, wies zwischen Tieren mit und ohne Probiotikazusatz keine Unterschiede auf.

Erst eine differenzierte Analyse der Häufigkeit des Auftretens spezifischer Serovare führte zu einem differenzierten Bild. So wurden bei Tieren die das Probiotikum erhielten gesamte haemolytische *E. coli* und Vertreter des Serovars O141 lediglich mit einer Häufigkeit von unter 50% im Vergleich mit Kontrolltieren nachgewiesen (Schierack et al., 2003). Zusätzlich wurde eine Multiplex-PCR-Technik (Göbel, 2003) eingesetzt, mit deren Hilfe 9 Pathogenitätsgene in *E. coli* Isolaten erfasst werden können. Auch hierbei war ein Einfluss des Probiotikums erkennbar (Abb. 9). Danach konnten bei über 50% der Isolate von 14 Tage

Abbildung 9: Verteilung von *E. coli* Pathogenitätsfaktoren in Isolaten aus Ferkeln bei Einsatz eines *E. faecium* Probiotikums



alten Saugferkeln, welche von Probiotikum gefütterten Muttersauen stammten, keines der Pathogenitätsgene nachgewiesen werden, während dies bei den Kontrolltieren nur bei unter 30 % der Isolate der Fall war. Die Kombination der Pathogenitätsgene *est2/stx2e* und *est2/est1b* war nur bei Kontrolltieren nachweisbar, weiterhin trat das Gen für das hitzestabile Toxin Estb1 in höherer Häufigkeit bei Isolaten von Kontrolltieren auf. Andererseits wurde das Adhäsinen *fimf41a* nur in Isolaten von Probiotikatieren detektiert.

Abschließend lässt sich bezüglich des *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 sagen, dass nachhaltige Einflüsse sowohl auf apathogene als auch pathogene Bakterien bei Ferkeln vorliegen, zu der Charakterisierung allerdings hochspezifische Techniken erforderlich sind. Mögliche gesundheitsfördernde Effekte zeichnen sich ab, die in einer geringeren Belastung durch pathogene Keime und einer geringeren Durchfallhäufigkeit bestehen.

### Zusammenfassung

Der gesamte Verdauungstrakt monogastrischer Tiere ist von Bakterien besiedelt, die für sehr unterschiedliche Stoffumsetzungen verantwortlich sind. Sowohl Keimzahlen als auch Stoffwechselaktivitäten sind im Enddarm am höchsten, allerdings finden auch bedeutende bakterielle Stoffumwandlungen im Dünndarm statt, der gleichzeitig Hauptort der Immunantwort ist. Daraus ergeben sich Wechselwirkungen zwischen Nahrung, mikrobieller Besiedlung, Immunsystem sowie der Tiergesundheit.

Auf Grund methodischer Schwierigkeiten sind unsere Kenntnisse zur Biodiversität der intestinalen Mikrobiota von Schwein und Geflügel noch sehr begrenzt. Allerdings fördert die zunehmende Verfügbarkeit molekularbiologischer Arbeitstechniken in Ergänzung zu den konventionellen Methoden den Erkenntniszuwachs auf diesem Gebiet in erheblichem Maße.

In diesem Beitrag wurde anhand verschiedener Beispiele gezeigt, in welcher Weise Nahrungskomponenten die intestinale Mikrobiota beeinflussen können. So können Nicht-Stärke-Polysaccharide eine

Bakterienpopulation stimulieren, die zur Hydrolyse dieser Substrate in der Lage sind. Zusatz von Xylanasen zu einem Futter mit hohem Gehalt an Arabinoxylanen bewirkt eine Translokation der zur Verwertung dieser Substrate befähigten Bakterienpopulationen in proximal gelegene Segmente.

Untersuchungen mit dem Probiotikum *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 haben gezeigt, dass sowohl bei Geflügel als auch bei Ferkeln (und Sauen) eine nachhaltige Beeinflussung apathogener als auch pathogener Bakterien erfolgt. Allerdings wurde auch deutlich, dass das Studium des Einflusses von Nahrungsfaktoren auf die intestinale Mikrobiota den Einsatz hochspezifischer Bestimmungsmethoden erfordert.

### Anmerkung

In diesem Beitrag wurden im Wesentlichen Ergebnisse aus der Arbeit unseres Institutes dargestellt. Neben den Autoren des Beitrages waren an der Erarbeitung dieser Ergebnisse folgende Mitarbeiter und Doktoranden beteiligt: Anke Jadamus, Kathrin Hübener, Sandra Göbel, Lutz Beckmann und Moritz Macha.

### Literaturverzeichnis

- Bartel, J., Jadamus, Wiese, F., Swiech, E., Buraczewska, L. and Simon, O. (2002) Apparent precaecal digestibility of nutrients and level of endogenous nitrogen in digesta of the small intestine of growing pigs as affected by various digesta viscosities. *Arch. Anim. Nutr.* 56, 93–107
- Gibson, G.R.; Roberfroid, M.B. (1995): Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *J. Clin. Nutr.* 125 (2), 1401–1412
- Göbel, S. (2003). Multiplex-Polymerase-Ketten-Reaktion (MPCR) zum Nachweis ausgewählter Virulenzfaktoren schweinepathogener *Escherichia coli*. Dissertation am Fachbereich Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin, Journal-Nr.: 2733
- Fuller, R. (1989) Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, 66, 365–378.
- Lane, D. J., Pace, B., Olsen, G. J., Stahl, D. A., Sogin, M. L. und N. R. Pace (1985). Rapid determination of 16S ribosomal RNA Sequences for phylogenetic analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 6955–6959.
- Leser, T. D., J. Z. Amenuvor, T. K. Jensen, R. H. Lindecrona, M. Boye, and K. Moller (2002). Culture-independent analysis of gut bacteria: the pig gastrointestinal tract microbiota revisited. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 673–90.

Schierack, P., Nordhoff, M., Pollmann, M., Schwerk, P., Tölke, C., Wieler, L. und K. Tedin (2003). A cellular microbiology approach for the study of effects of probiotics in veterinary medicine. *Int. J. Med. Microbiol.* 293 (S36): 115

Simon, O., Vahjen, W. and Scharek, L. (2003). Micro-organisms as feed additives – probiotics. Proceedings, 9<sup>th</sup> International Symposium on Digestive Physiology in Pigs, Banff, Canada. Vol. 1, 295 – 318

Vahjen, W, Glaeser, K. und O. Simon (1998). Influence of xylanase supplemented feed on the development of selected bacterial groups in the intestinal tract of broiler chicks. *J. Agr. Sci.* 130: 489 – 500.

Vahjen, W., Jadamus, A. and Simon, O. (2002). Influence of a probiotic *Enterococcus faecium* strain on selected bacterial groups in the small intestine of growing turkey poults. *Archives of Animal Nutrition* 56, 419 – 429.

## Diskussion



STEINHART

Herr Simon, selbst auf die Gefahr, dass ich mich unbeliebt mache: Es wird ja von den Arabinoxylanen gesprochen, die gibt's aber eben nicht, sondern das sind dann Co-Polymere, die da entstehen. Wenn Sie Xylanasen einsetzen, dann spalten Sie glykosidische Bindungen, aber die Polymeren, die dann vorhanden sind, enthalten Äther- und Esterbindungen, die können nun diese Glykosidasen nicht spalten. Das ganze System ist viel komplexer, als das mit diesen Arabinoxylasen immer dargestellt wird. Ich könnte mir schon vorstellen, dass wir sagen, das ist ja nicht so tragisch, weil das nicht so viele Quervernetzungen sind, aber das Entscheidende ist, dass durch diese Quervernetzungen auch die Tertiär- und die Quartärstruktur von solchen Verbindungen geändert werden und damit wiederum Glukosidasen beeinflusst werden. Und neben diese Ferulasäurerederivate kommen noch Zyklobutansäuren, die dann noch mal die ganze Sache komplizieren. Ich finde schon, dass das ganz interessant ist, aber man sollte diese komplexen Dinge in Zukunft noch mehr in Betracht ziehen.

SIMON

Sie haben natürlich Recht, dass Arabinoxylane, dass alle diese Nichtstärke-Polysaccharide nicht eine Verbindung sind. Sie sind vernetzt und enthalten auch noch andere Kohlenhydratkomponenten, andere Monosaccharide. Wenn Sie allerdings solche Arabinoxylane, wie sie im Getreide vorkommen, isolieren und hydrolisieren, dann eine Monosaccharidanalytik ma-

chen, dann finden Sie fast ausschließlich Xylose und Arabinose. Insofern glaube ich nicht, dass wir ganz falsch liegen, wenn wir das hier so darstellen.

Es ist auch klar, dass das Endoenzyme sind, und wenn die Spaltprodukte entstehen, dann sind das eventuell sogar noch Polymere oder es sind Oligomere.

Fakt ist natürlich, für die Mikroorganismen, dass a) sich die Löslichkeit dieser Substrate erhöht, und damit wahrscheinlich auch die Zugänglichkeit für eine darauf spezialisierte Flora, und dass b) kleinere Bruchstücke entstehen, die schneller mikrobiell umgesetzt werden können, und dass wahrscheinlich damit dann auch diese Verschiebung der Population zusammenhängt.

ROTH-MAIER

Sie haben in Ihrem Vortrag erwähnt, dass für die Präbiotika die Definition von Gibson und Roberfroid für das Schwein nicht angewendet werden kann, so in dem Ausmaß. Wie würden Sie das dann für das Schwein definieren?

SIMON

Ich bin nicht unbedingt der Meinung, dass man die Definition nicht anwenden kann. Sie wissen ja, dass Inulin beim Schwein auch bis Ende Dünndarm weitestgehend abgebaut wird. Ich glaube, dass dieses Konzept, wie es für die Humanernährung entwickelt wurde und angedacht ist, vermutlich für unsere Nutztiere nicht zutrifft. Das ist mein Ansatz. Wie jetzt die Definition ist, an welcher Stelle die abgebaut werden,

da kann man natürlich noch die Definition ein bisschen modifizieren. Wenn die nicht im Caecum und Colon abgebaut werden, sondern weiter vorne, und trotzdem diese Wirkung haben, ist das ja auch in Ordnung. Es ist also nicht so, dass ich diese Definition in Frage stelle. Ich zweifle, dass dieses Konzept greift, wenn wir das im Nutztierbereich anwenden.

Es wird ja alles Mögliche als präbiotische Substanzen getestet, alle möglichen Oligosaccharide. Nun frage ich mich, wenn wir zum Beispiel NSP-Enzyme einsetzen, produzieren wir ja auch Oligosaccharide, die normalerweise an diesen Stellen nicht da sind. Vielleicht ist es ein indirekter Effekt, dass wir selber Substanzen produzieren, die präbiotisch wirken, und das natürlich, weil Getreidebasis da ist, permanent und bei allen Tieren vorhanden ist. Es ist nicht wie z.B. bei einer Diät, die der Mensch zu sich nimmt, die sehr arm ist an solchen Komponenten.

ROTH-MAIER

Warum ich das jetzt frage, ist, weil natürlich die entsprechenden Hersteller dieser Präbiotika das jetzt auch für die Nutztiere so deklarieren.

SIMON

Na ja, Deklaration und Nachweis sind häufig 2 verschiedene Dinge.

BLAUT

Sie hatten ja Experimente hier vorgestellt, in denen untersucht wurde, inwieweit das Wachstum von bestimmten Bifido-Bakterien durch Inulin stimuliert wird. Nun ist es natürlich aus meiner Sicht, zumindest wie ich die Literatur gelesen hab', zu einfach, anzunehmen, dass einzig und allein die Verwertbarkeit oder die bevorzugte Verwertung von Oligofruktose und Inulin durch Bifido-Bakterien diesen Effekt auslöst. Nach Allem, was wir wissen, sieht es so aus, dass zusätzliche Effekte dazu kommen müssen, damit man diesen Effekt beobachtet.

Man beobachtet, parallel dazu, sehr häufig, beim Menschen zumindest auch, eine verstärkte Butyrat-Produktion, und die kann man ja gar nicht erklären

mit dem Wachstum der Bifido-Bakterien, weil die gar kein Butyrat machen. Und es ist eine weitere Sache, es gibt eben kooperative Interaktionen zwischen verschiedenen Populationsgruppen innerhalb dieses Ökosystems. Viele Dinge sind meistens nicht nur mit einer Erklärung zu beantworten.

SIMON

Diese in vitro-Untersuchungen haben ja zunächst dem Ansatz gedient, ob dies wirklich so ist, dass nur die Bifidos das verwerten, oder tun das ganz normale andere Bakterien, die wir im Verdauungstrakt haben, auch, und das tun sie fast alle.

Selektive Förderung einer bestimmten Gruppe geht ja eigentlich daraus hervor, dass wir bei Arbeiten mit den Sonden bei der Stoffwechselaktivität dann einen leichten Effekt feststellen, obwohl der nicht signifikant war. Aber keine andere Gruppe von Bakterien hat reagiert, nur die Bifidos waren in der Stoffwechselaktivität etwas erhöht. Die Frage ist, ob das dann Dimensionen annimmt, die bei Tieren einen gesundheitsfördernden Effekt, oder irgendetwas in dieser Art bewirken. Das heißt, man kann auch nur auf dieser Ebene weiter untersuchen. Wir können uns nicht bei diesem allgemeinen Denken mit Bakteriengruppen aufhalten, wenn wir da weiterkommen wollen.

WENK

Ortwin, Du hast Ergebnisse aus Versuchen mit Ferkeln und mit Broilern gezeigt. Da stellt sich ja immer die Frage, wie einfach kann man von einer Spezies zur anderen springen. Ich möchte konkret fragen: Das Geflügel hat ja den Kropf als zusätzliches Verdauungsorgan. Weiß man überhaupt, was mikrobiell im Kropf passiert? Ich frage aus einem konkreten Grund. Aufgrund verschiedener Versuche gibt es Hinweise, dass Geflügel mit Lignin besser umgehen kann als das Ferkel. Wäre da möglicherweise die Mikroflora im Kropf ein Schlüsselpunkt?

SIMON

Wir haben nachträglich auch festgestellt, dass wir den Kropf immer etwas vernachlässigt haben, wenn

wir Proben gezogen haben. Was man allgemein sagen kann, dass es in erster Linie Umsetzungen durch Laktobazillen gibt im Kropf. Wir haben es aber bisher versäumt, da so gezielt und spezifisch nachzuschauen.

Dass das hier wie Springen von Tierart zu Tierart aussieht, hat natürlich damit zu tun, dass das alles einzelne Komplexe großer Untersuchungen sind, jeweils an einer Tierart, wobei ich jetzt einzelne Beispiele rausgezogen habe. Aber natürlich finden wir bestimmte Reaktionsmechanismen sowohl bei den Ferkeln, als auch bei dem Geflügel. Wir haben ja auch mit Puten Einiges gemacht, und finden in der Tendenz die gleichen Veränderungen.

LEIBETSEDER

Ich möchte zurückkommen zur Präbiotika-Thematik, zur Frage von Frau Roth-Maier. Ich stimme Dir zu, Ortwin, dass dieses Thema in der Tierernährung nicht diesen Stellenwert hat wie in der Humanernährung. Ich glaube, dass in der Humanernährung diese Frage »Präbiotika« sehr stark verknüpft ist mit der Nahrungsfaser, dietary fiber, wovon man einfach zu wenig aufnimmt, und wo man bemüht ist, über Zubereitungstechniken diese Fraktion in der Nahrung zu erhöhen. Ich denke an die resistente Stärke, aber auch verschiedene andere Zubereitungsarten, die dann dazu führen, dass solche präbiotisch wirkenden Stoffe im Gehalt erhöht werden. Dazu die alte Geschichte: Nicht jeder von uns weiß noch, dass altbackenes Brot eine gewisse diätetische Wirkung hat, die möglicherweise auch darauf zurückzuführen ist, dass Präbiotika durch das Lagern zunehmen. Ich glaube, dass im humandiätetischen Bereich die Bedeutung liegt, aber sehr viel weniger in der Tierernährung.

SIMON

Ja, der Meinung bin ich auch, vor allen Dingen, weil wir durch die Getreidebasis immer verschiedene Nichtstärke-Polysaccharide in größeren Mengen im Futter der Nutztiere drin haben.

KNEIFEL

Ich denke, man sollte es sich auch nicht so einfach machen, hier diese einzelnen Mikroorganismen-

Gruppen per se auf ihre Reaktionen, auf ihre Wirkung durch bestimmte Präbiotika, anzusehen. Wenn man die Studien anschaut, die es dazu gibt, dann findet man auch jene Mikroorganismen aus dem Humanbereich unter Enterobacteriaceen usw., die sich ebenfalls ganz gut stimulieren lassen oder zumindest auf präbiotischen Substraten wachsen. Ich glaube, man sollte vielmehr das Ganze im Gesamtkontext der Mikroflora sehen, und zurückkommen zu den Nahrungsbestandteilen, die wir regelmäßig zuführen, und sich überlegen, wie präbiotisch möglicherweise diese Nahrungsinhaltsstoffe, die wir täglich zu uns nehmen, sind.

Dazu müssen wir feststellen, dass sich zum Beispiel der Spanier 3-mal oder 4-mal mehr präbiotisch ernährt, als der andere Mitteleuropäer, oder der Amerikaner nur ein Zehntel davon aufnimmt, was z. B. der Europäer aufnimmt durch die ganzen Gemüse und solche Produkte.

Ein zweiter Punkt ist, dass die präbiotischen Präparate, die es jetzt im Handel gibt, natürlich nicht ganz rein präbiotisch sind, sondern auch eine Vielfalt von Zuckern enthalten, z. B. auch Glukose, Fruktose. Die werden natürlich als Erstes verwertet und zeigen beim Wachstum einzelner Mikroorganismen auch gewisse Peaks, die aber letztlich nicht auf das Stamm-Präbiotikum zurückzuführen sind.

SIMON

Wir haben ja für diese Zwecke auch entsprechende Analysen der Produkte machen lassen, und lassen es auch nachträglich noch machen, um einfach mehr zu wissen über die Anteile der verschiedenen Oligomere und Polymere und Monosaccharide, die drin sind.

FLACHOWSKY

Ortwin, ich möchte noch mal auf die Arabinoxylane zurückkommen und den Enzymzusatz. Es war ja beeindruckend, wenn man mal einen Strich zieht, praktisch von Verdaulichkeit null, wenn ich mal löslich/unlöslich betrachte, zu etwa 30. Nun hast Du eine ganze Menge anderer Umsetzungen dargestellt. Habt Ihr mal versucht, das energetisch zu bilanzie-

ren? Was bleibt denn da eigentlich für das Tier übrig, wenn man diesen Effekt per se betrachtet?

SIMON

Wir haben das nicht durchgerechnet. Wir haben nur gemessen, wieviel Arabinose ist verschwunden bei der Passage bis an diese Stelle, und wieviel Xylose ist verschwunden, ohne zu wissen, ob die Mikroorganismen diese verstoffwechselt haben, oder welcher Anteil resorbiert ist. Xylose oder Arabinose, eine von beiden kann intermediär nur begrenzt verwertet werden, d. h. über 5 % hinaus wird sie quantitativ im Harn ausgeschieden. Das heißt also, der Effekt für das Tier kann nicht groß sein.

LETTNER

Sie haben sehr eindrucksvoll gezeigt, dass Sie den *Enterococcus faecium* nachweisen können im Darminhalt. Haben Sie denn auch eine Idee, wie lange der dort bleibt, wenn man die Fütterung absetzt?

SIMON

Ja, Untersuchungen dazu haben wir durchgeführt. Vielleicht sollte mein Coautor David Taras, er koordiniert diese ganzen Versuche, dazu etwas sagen.

TARAS

Also, eigentlich hat die Untersuchungen ja Herr Macha gemacht. Den werde ich mal vertreten.

Bei den Sauen, die das *Enterococcus faecium* – Präparat bekommen haben, ist festzustellen, dass schon wenige Tage, nachdem das Präparat abgesetzt worden ist, kein *Enterococcus faecium* mehr im Kot nachweisbar ist. Da haben wir natürlich keinen Darminhalt untersucht, weil das ein bisschen teuer wird. Bei den Ferkeln scheint es sehr stark davon abzuhängen, seit wann das Ferkel in seiner Entwicklung besiedelt ist. Wenn wir Ferkel haben, die schon von der Geburt an besiedelt worden sind, scheint die Persistenz des Organismus im Darmtrakt sehr viel länger anzudauern. Da haben wir zum Teil bei Saugferkeln, die nur durch den Sauenkot inokuliert sein können, auch am 70. Tag noch *Enterococcus faecium*

nachweisen können, obwohl die nie welche mit dem Futter aufgenommen haben. Bei anderen Ferkeln, die erst später Futter bekommen haben, sieht's dann eher wieder tendenziell so aus wie bei den Sauen, dass die Persistenz kürzer ist. Also scheint der Besiedlungszeitpunkt große Bedeutung zu haben.

GREIFE

Ortwin, erst einmal freut mich, dass Ihr so tief in die Mikrobiologie eingestiegen seid. Ich glaube, da seid Ihr ganz bestimmt auf dem richtigen Weg. Nachdem ernährungsphysiologische Aspekte breit diskutiert worden sind, möchte ich die Verbindung wieder ziehen zu Antibiotika. Dort ist ganz unbestritten, dass diese einen Einfluss haben auf die Mikroflora des Darmes, ob sie nun, wie, ich kann fast sagen, in der Vergangenheit, eingesetzt wurden über das Futter, oder ob sie, was natürlich weiterhin einen Sinn hat, zur Therapie eingesetzt werden. Zur Sicherheitsbewertung ist es schon seit einigen Jahren erforderlich, neben der toxikologischen Bewertung auch eine mikrobiologische Bewertung vorzunehmen, also eine mikrobiologisch akzeptable Tagesdosis zu bestimmen.

Im Rahmen dieser Bewertung ist es erforderlich, den Einfluss auf die Humanflora – human gut flora – zu bestimmen, und das macht man, mit wechselhaftem Erfolg, rein mikrobiologisch in vitro, oder aber auch mit Tiermodellen, z.B. Maus und Ratte. Hier würde mich interessieren, ob man nicht das Schwein besser als Modell nehmen könnte als diese Nager. Ist Dir darüber etwas bekannt?

SIMON

Kann ich einfach beantworten: Nein! Da könnte ich nicht kompetent antworten, ob das dann soviel besser sein kann als diese Nagermodelle.

# Mikroorganismen in der Ernährung des Menschen



## 1 Einleitung

Mikroorganismen sind ubiquitär. Ihre Artenvielfalt spiegelt sich in einer ungeheuren Vielfalt besiedelter Lebensräume und stoffwechsel-physiologischer Leistungen wider. Auf Grund ihrer weiten Verbreitung sind Mikroorganismen daher auch für die Ernährung des Menschen von großer Relevanz.

Ohne entsprechende Vorkehrungen werden Lebensmittel rasch von Mikroorganismen besiedelt. Die mikrobielle Besiedlung von Lebensmitteln kann unterschiedliche Konsequenzen haben: Einerseits können Mikroorganismen Lebensmittel ungenießbar machen, indem sie Inhaltsstoffe in unerwünschte Substanzen umwandeln. Dabei kann es sich um Stoffe handeln, die den Geschmack negativ beeinflussen wie beispielsweise Bitterstoffe, oder sogar um Toxine, die bei Verzehr die Gesundheit gefährden. Als Beispiele seien hier das von *Clostridium botulinum* gebildete Botulinus-Toxin sowie die durch Darmpathogene gebildeten Enterotoxine genannt. Um daraus resultierende mögliche Gefahren für die menschliche Gesundheit zu verringern, werden bei der Lebensmittelherstellung und -verarbeitung Anstrengungen unternommen mit dem Ziel, das Wachstum von Mikroorganismen in und auf Lebensmitteln zu verhindern bzw. zu minimieren. Andererseits kann die Besiedlung von Lebensmitteln durch Mikroorganismen zu einer verbesserten Haltbarkeit und sogar zu einer erwünschten Änderung des Geschmacks führen. Insbesondere Milchsäure-bakterien werden von jeher zur Verlängerung der Haltbarkeit bestimmter

Lebensmittel eingesetzt. Beispiele sind fermentierte Milchprodukte wie Joghurt und Kefir, sowie Sauerkraut. Die Fermentation führt zu einer Ansäuerung, die das Wachstum von unerwünschten Bakterien eine gewisse Zeit lang unterdrücken kann. Darüber hinaus geht dieser Prozess mit der Bildung von Milchsäure und Aromastoffen einher, wodurch der Genusswert des Lebensmittels steigt.

## 2 Probiotische Bakterien in fermentierten Lebensmitteln

Die Herstellung fermentierter Milchprodukte erfreut sich in verschiedenen Regionen der Welt einer langen Tradition. Dies trifft besonders auf den süd-osteuropäischen Raum zu. Die vergleichsweise lange Lebensdauer der dort lebenden Bevölkerung veranlassten Ilja Metschnikoff 1908 einen Zusammenhang zwischen der Lebenserwartung und dem regelmäßigen und hohen Konsum fermentierter Sauermilch zu vermuten. Im Grundsatz steckt diese Idee auch hinter dem Konzept der probiotischen Lebensmittel. Nach einer Definition von Fuller sind Probiotika lebende Mikroorganismen, die die Gesundheit des Wirtes günstig beeinflussen, indem sie die normale Darmflora verbessern. Im Unterschied zu den traditionell für die im Lebensmittelbereich eingesetzten Bakterien, handelt es sich bei Probiotika um Mikroorganismen, die anhand bestimmter Kriterien selektiert wurden. Während klassische Starterkulturen in der Milchindustrie auf den Fermentationsprozess optimiert wurden, wird bei probiotischen Bakterien darauf geachtet, dass sie an den Gastrointestinaltrakt des

Menschen optimal angepasst sind, dass sie auch nach der Passage durch den Magen eine möglichst hohe Lebensfähigkeit aufweisen und dass sie stoffwechselaktiv bleiben. Grundsätzlich dürfen Probiotika keine Eigenschaften besitzen, die die Gesundheit negativ beeinflussen könnten. Bei der Mehrzahl der für Probiotika postulierten gesundheitsfördernden Eigenschaften wird davon ausgegangen, dass sich diese über eine Beeinflussung der Aktivität und Zusammensetzung der Darm-Mikrobiota manifestieren. Ausgehend von der Erkenntnis, dass die Darm-Mikrobiota den Wirt auf vielfältige Weise beeinflusst, entwickelte sich das Konzept der Probiotika.

### 3 Die Darm-Mikrobiota des Menschen

Etwa  $10^{14}$  Mikroorganismen besiedeln den Darm des Menschen, die schätzungsweise mehr als vierhundert verschiedenen Spezies zuzuordnen sind. Mehr als 99% dieser Bakterien sind strikte Anaerobier. Die bakterielle Zelldichte steigt vom Magen zum Dickdarm hin an: Während im Magen eines gesunden Menschen bis zu  $10^3$  Bakterien pro ml Darminhalt gefunden werden (bestimmt als koloniebildende Einheiten: KBE), steigt die Bakteriendichte in Duodenum und Jejunum auf bis zu  $10^5$  KBE/ml, in Ileum und Caecum auf bis zu  $10^9$  KBE/ml und im Colon schließlich auf bis zu  $10^{11}$  KBE pro Gramm Darminhalt an. Auf Grund jeweils unterschiedlicher Bedingungen, unterscheiden sich die einzelnen Darmabschnitte auch hinsichtlich der jeweils dominanten Bakteriengruppen. Während in den oberen Abschnitten des Gastrointestinaltraktes eher säuretolerante Bakterien wie Laktobazillen dominieren, sind im Colon vor allem Spezies der Gattungen *Bacteroides*, *Eubacterium* und *Bifidobacterium* dominant.

#### 3.1 Diversität der intestinalen Mikrobiota

Die Vielfalt der im Darm des Menschen vorkommenden Bakterienarten ist vermutlich größer als die ursprünglich auf der Grundlage kultivierungsabhängiger Daten geschätzte Zahl von 400 bis 500. Molekularbiologische Verfahren haben gezeigt, dass eine Vielzahl von Bakterien mit den klassischen mi-

krobiologischen Methoden nicht erfasst werden. Die letztgenannten Methoden setzen voraus, dass alle Mikroorganismen einer gegebenen Probe auf den jeweils verwendeten Nährböden wachsen. Letzteres ist jedoch bei einer Vielzahl von Bakterienarten nicht der Fall. Trotz der großen Vielfalt wird der überwiegende Anteil (99%) der im Darm vorkommenden Bakterien durch etwa 30–40 dominante Arten abgedeckt.

Die Analyse der Sequenz ribosomaler RNA-Gene ermöglicht die kultivierungs-unabhängige Identifizierung von Darmbakterien und die Bestimmung ihrer phylogenetischen Position. Hierzu wird in erster Linie die zur kleinen Untereinheit des Ribosoms gehörende 16S rRNA herangezogen. Das 16S rRNA-Gen umfasst sowohl hoch konservierte als auch variable Sequenzbereiche. Durch die Verwendung von Primern, die an die konservierten Bereiche der 16S rRNA binden, können die dazwischen liegenden variablen Bereiche mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert werden. Die systematische Analyse von Stuhlproben ergab eine Vielzahl von rRNA-Sequenzen, die nur geringe Ähnlichkeit mit denen bereits bekannter Spezies aufweisen. Daraus muss geschlossen werden, dass es sich bei den zu Grunde liegenden Spezies um bislang nicht beschriebene Darmbakterien handelt.

#### 3.2 Kultivierungsunabhängige Verfahren zur Identifizierung von Darmbakterien

Auf der Grundlage bekannter Sequenzdaten ist es nun möglich, Oligonukleotide zu konstruieren, die mit charakteristischen Erkennungsregionen der 16S rRNA hybridisieren können. Bei solchen Regionen handelt es sich um sogenannte diagnostische Sequenzen, die es erlauben, Bakterien auf den unterschiedlichen taxonomischen Ebenen wie Domäne, Familie, Genus und Spezies anzusprechen. In der Praxis werden die Bakterien zunächst mittels Paraformaldehyd oder Ethanol fixiert und permeabilisiert. Alle Bakterien, die eine entsprechende Zielsequenz in ihrer 16S rRNA tragen, werden markiert, sobald die fluoreszenzmarkierte Sonde an die Zielsequenz bindet und ein DNA/RNA-Hybrid ausbildet. Da jede Bakterienzelle mehrere tausend Ribosomen enthält, führt

die Bindung einer fluoreszenzmarkierten Sonde an die Ziel-RNA dazu, dass die ganze Zelle fluoresziert und im Epifluoreszenz-Mikroskop detektiert werden kann. Bei Verwendung von Oligonukleotidsonden unterschiedlicher Spezifität, die mit unterschiedlichen Fluoro-chromen markiert sind, lassen sich verschiedene Zielorganismen parallel erfassen.

Für die Erfassung von humanen Darmbakterien steht inzwischen eine ansehnliche Kollektion von Oligonukleotidsonden zur Verfügung, mit denen sich diese auf verschiedenen phylogenetischen Ebenen erfassen lassen. Da die manuelle Auszählung von fluoreszenzmarkierten Bakterien sehr zeit- und arbeitsaufwändig ist, wurden automatisierte Verfahren entwickelt, die die Bakterienauszählung vereinfachen. Die mit der Epifluoreszenzmikroskopie gekoppelte automatische Bildanalyse einerseits und die Flusszytometrie andererseits vereinfachen die Auszählung fluoreszenzmarkierter Bakterien in komplexen Proben erheblich.

Diese Methoden wurden kürzlich zur Analyse von 91 Stuhlproben von gesunden Erwachsenen aus 5 europäischen Ländern (Dänemark, Deutschland, England, Frankreich, Niederlande) eingesetzt. In dieser Studie wurden insgesamt 18 Oligonukleotidsonden für die Analysen eingesetzt, die jedoch keine geschlechts- oder länderspezifischen Unterschiede in der Fäkalflora-Zusammensetzung zu Tage förderte, wohl aber eine große individuelle Variabilität zwischen den Probanden. Im Vergleich zu einer Sonde, die alle Bakterien erfasst, deckte die Summe aller mit den gruppenspezifischen Sonden erfassten Bakterien durchschnittlich 76 % aller Bakterien ab. Demnach entgingen 24 % aller Bakterien der Detektion mit den eingesetzten Gruppen-Sonden. Der relative Anteil der Bakteriengruppen an der Gesamtzahl der Bakterien nahm in folgender Reihenfolge ab: *Eubacterium rectale-Clostridium coccooides*-Gruppe, *Clostridium leptum*-Gruppe, *Bacteroides*-Gruppe, *Bifidobacterium*-Gruppe.

### 3.3 Aktivitäten und Funktionen der intestinalen Mikrobiota

Der normalen Darmflora werden eine Reihe von Wirkungen bzw. Aktivitäten zugesprochen. An erster

Stelle steht die Verhinderung des Wachstums pathogener Bakterien, die vermutlich darauf beruht, dass das für das Wachstum der Pathogenen erforderliche Nährstoffangebot auf Grund der Konkurrenz der normalen Darmflora um Nährstoffe nicht ausreichend verfügbar ist, dass die Adhäsion an das Darmepithel auf Grund der bereits bestehenden hohen Zelldichten im Darm verhindert wird, dass Darmbakterien antibakterielle Substanzen bilden oder dass sie die Bildung solcher Substanzen durch den Wirt induzieren.

Eine weitere wichtige Funktion der Darm-Mikrobiota liegt darin, Nahrungsinhaltsstoffe, die im Dünndarm nicht resorbiert wurden, zu fermentieren. Dies geschieht in erster Linie im Colon. Zu den potenziellen Substraten der Darmbakterien zählen die sogenannten Ballaststoffe, insbesondere resistente Stärken und Zellwand-Polysaccharide. Diese werden in einem mehrstufigen Prozess, an dem viele unterschiedliche Bakteriengruppen beteiligt sind, zunächst depolymerisiert und die gebildeten Oligo- und Monomere werden dann letztlich zu den kurzkettingen Fettsäuren Acetat, Propionat und Butyrat umgewandelt, die dem Wirt zur weiteren Nutzung zur Verfügung stehen. Darüber hinaus führt die Fermentation im Colon zur Bildung von molekularem Wasserstoff, Kohlendioxid, und bei etwa 30 – 40 % der erwachsenen Bevölkerung zur Bildung von Methan. Als Intermediate treten Lactat, Succinat und Ethanol auf, die aber rasch durch andere Darmbakterien zu den oben genannten Endprodukten umgesetzt werden.

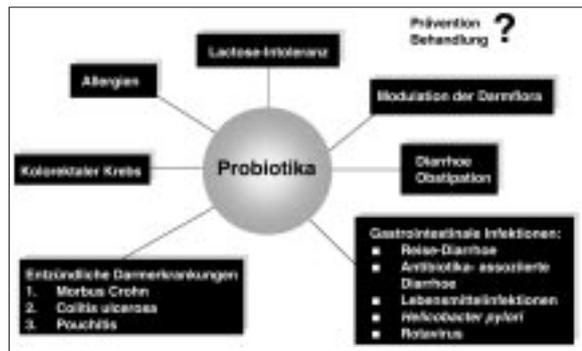
Auch Proteine, die teils aus unverdauten Nahrungspoteinen und teils aus Verdauungsenzymen und abgeschilferten Darmzellen stammen, unterliegen insbesondere im distalen Colon dem bakteriellen Abbau. Proteine werden zunächst zu Peptiden und Aminosäuren depolymerisiert. Deren Fermentation führt schließlich zur Bildung von Ammonium, Aminen, Acetat, Propionat und Butyrat. Charakteristische Produkte der Aminosäurefermentation im Colon sind verzweigtkettige Fettsäuren sowie Indole und Phenole. Letztere stammen aus der Fermentation der aromatischen Aminosäuren.

Auf Grund ihres großen katalytischen Potenzials können Darmbakterien auch zur Bildung von potenziell schädlichen Substanzen beitragen. Beispielsweise katalysieren sie die Umwandlung primärer in sekundäre Gallensäuren. Letztere werden als Tumorpromotoren angesehen. Durch die Hydrolyse von Pflanzenglykosiden, die Reduktion von Azoverbindungen oder die Reduktion von Nitrat zu Nitrit, können Darmbakterien zur Bildung von toxischen, mutagenen und karzinogenen Verbindungen beitragen. Durch die Hydrolyse von sulfatierten und glucuronidierten Verbindungen, die mit der Galle in den Darm gelangen, wird einer erneuten Resorption der daraus resultierenden dekonjugierten Verbindungen und dadurch einem längeren Verbleib im Organismus Vorschub geleistet. Andererseits können Darmbakterien durch die Aktivierung potenziell protektiver Verbindungen, wie z. B. Lignane und Phytoöstrogene, einen positiven Beitrag zur Gesundheit des Wirtes leisten.

#### 4 Gesundheitsrelevante Wirkungen von Probiotika

Für Probiotika wird ein breites Spektrum an gesundheitsrelevanten Wirkungen postuliert (Abbildung 1). Die postulierten Wirkungen reichen von der Verbesserung der Lactoseintoleranz, über die Verhinderung von gastrointestinalen Infektionen und allergischen Erkrankungen bis hin zur Vorbeugung gegen das kolorektale Karzinom. Allerdings wird nur

Abbildung 1: Mögliche Wirkungen von Probiotika



ein kleiner Teil der postulierten Wirkungen durch ernst zu nehmende Studien gestützt. Darüber hinaus muss darauf hingewiesen werden, dass wohl kaum davon ausgegangen werden kann, dass ein probiotisches Bakterium das gesamte Spektrum möglicher Wirkungen abdeckt. Bei realistischer Betrachtung ist davon auszugehen, dass jeder Stamm ein charakteristisches, aber eingeschränktes Wirkungsspektrum aufweist. Bei den in Lebensmitteln eingesetzten probiotischen Bakterien handelt es sich überwiegend um Milchsäurebakterien (Bifidobakterien, Laktobazillen, Laktokokken, Enterokokken).

Aufgrund ihrer Fähigkeit, das Enzym  $\beta$ -Galactosidase zu bilden, können Milchsäurebakterien nachweislich zur Verminderung von Lactoseintoleranz-Symptomen beitragen. Diese Fähigkeit ist jedoch nicht auf probiotische Bakterien beschränkt, sondern gilt auch für herkömmliche Milchsäurebakterien, die z. B. als Starterkulturen Verwendung finden. Allerdings könnte auf Grund der besseren Überlebensfähigkeit probiotischer Bakterien bei der Magenpassage der Effekt bei letzteren ausgeprägter sein.

Interventionsstudien zur Untersuchung der Wirksamkeit einer prophylaktischen Aufnahme von Laktobazillen zur Verhinderung von Durchfällen bei Reisen in die Türkei, nach Ägypten sowie in den Mittelmeerraum waren widersprüchlich, was eventuell auf die Verwendung unterschiedlicher probiotischer Bakterien zurückzuführen sein könnte. Eindeutig positive Befunde zum Einsatz von Probiotika gibt es dagegen bei der Vorbeugung gegen Säuglingsdiarrhöen, die durch Rotaviren verursacht wurden. Eine mit *Bifidobacterium bifidum* und *Streptococcus thermophilus* angereicherte Säuglingsnahrung reduzierte im Vergleich zu einer Kontrollnahrung ohne diese Bakterien die Erkrankungshäufigkeit von 65 % auf 13 %. Zwei Meta-Analysen zum Einsatz von Probiotika zur Verhinderung von durch Antibiotika ausgelösten Diarrhöen zeigten die Wirksamkeit von Probiotika. Allerdings wurden in der Mehrzahl der für die Meta-Analyse genutzten humanen Studien keine Milchsäurebakterien verwendet sondern die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (boulardii).

Probiotika wurden auch erfolgreich zur Remissionserhaltung bei entzündlichen Darmerkrankungen eingesetzt. Allerdings handelte es sich in zwei Studien zur Remissionserhaltung bei Colitis ulcerosa nicht um probiotische Milchsäurebakterien, sondern um einen apathogenen *Escherichia coli*-Stamm. In einer weiteren Humanstudie wurde ein Gemisch von insgesamt acht verschiedenen Milchsäurebakterien erfolgreich bei Patienten mit chronischer Pouchitis eingesetzt.

Es wurde auch postuliert, dass Probiotika einen Beitrag zur Absenkung des kolorektalen Krebsrisikos leisten können. Es muss allerdings klar festgestellt werden, dass es bislang keine einzige experimentelle Studie am Menschen gibt, in der nachgewiesen wurde, dass Probiotika einen solchen Effekt haben können. Auf Grund der geringen Kenntnisse zu den genauen Ursachen der Entstehung des kolorektalen Karzinoms und auch auf Grund der vermutlich langen Zeit, die von der Auslösung bis zur Detektion eines Karzinoms vergeht, dürfte dies aber ebenso schwierig sein wie der experimentelle Nachweis eines durch falsche Ernährung bedingten Karzinoms. Im Tiermodell hatte die orale Zufuhr von Milchsäurebakterien allerdings einen inhibitorischen Effekt auf die durch Azoxymethan induzierte Tumorbildung.

Probiotika wurden auch bei Risikokindern zur Verringerung des Auftretens von atopischer Dermatitis eingesetzt, wobei die Probiotika sowohl den Müttern während der Schwangerschaft als auch den Kindern während der ersten zwei Lebensjahre verabreicht wurden. Die Probiotika-Gabe führte zu einer signifikanten Verringerung des Auftretens der Erkrankung in der Interventionsgruppe im Vergleich zu der Kontrollgruppe.

## 5 Mögliche Wirkmechanismen von Probiotika

Die den gesundheitsrelevanten Wirkungen von Probiotika zu Grunde liegenden Mechanismen sind weitgehend unbekannt. Unter anderem wird spekuliert, dass die aufgenommenen Probiotika schädliche Bakterien in ihrem Wachstum inhibieren und diese somit aus dem Darm verdrängen können. In der Tat wurde für eine Reihe von probiotischen Bakterien die Fähigkeit zur Bildung von Bacteriocinen berichtet, die das Wachstum pathogener Bakterien hemmen. Des Weiteren können probiotische Bakterien den bakteriellen Stoffwechsel im Darm beeinflussen, so dass sich der pH ändert oder das Spektrum gebildeter Fermentationprodukte verschiebt. Es ist auch gezeigt worden, dass bestimmte Milchsäurebakterien sowohl eine Abnahme kanzerogener Verbindungen im Stuhl bewirken können als auch eine Verringerung der Aktivität von Enzymen, die zur Bildung mutagener Verbindungen beitragen können. Einige der berichteten Wirkungen von Probiotika stehen vermutlich mit der Fähigkeit dieser Bakterien im Zusammenhang, das Immunsystem zu modulieren, doch auch hier sind genaue Mechanismen nach wie vor unbekannt.

## 6 Schlussfolgerungen

Der Einsatz von Mikroorganismen in Lebensmitteln zur Erzielung gesundheitlicher Wirkungen ist ein Ansatz, der bezüglich einiger Anwendungen vielversprechend erscheint. Allerdings müssen angepriesene probiotische Wirkungen durch die Ergebnisse seriös durchgeführter Studien unterstützt werden. Große Lücken bestehen auch noch in dem Verständnis möglicher Wirkmechanismen. Fortschritte auf diesem Gebiet wären für die Glaubwürdigkeit des probiotischen Konzeptes förderlich.

## Diskussion



### BREVES

Zunächst eine Anmerkung zur antibiotika-assoziierten Diarrhoe, die ja klinisch vor Allem im Zusammenhang mit Clindamycin erstmalig identifiziert wurde. Es gibt aus den letzten zwei, drei Jahren eine in vitro-Studie mit einem Fermentationsmodell, wo man zeigen konnte, dass ein Mechanismus des Clindamycins darin besteht, die Fermentation von Butyrat praktisch auf Null zu setzen. Das heißt, angesichts der Funktion als trophischer Faktor ist dies natürlich ebenfalls eine sehr gute Erklärungsmöglichkeit für die Entstehung der Diarrhoe, wenn ich den Dickdarmenterozyten das Substrat entziehe. Interessanterweise konnte in dieser Studie festgestellt werden, dass durch Anwesenheit von *Saccharomyces boulardii* dieser Effekt partiell kompensiert werden konnte. Das würde auch eine gute Basis sein, die klinische Wirksamkeit bei der Behandlung der Antibiotika-assoziierten Diarrhoe zu erklären.

Als Frage: Sie haben auf den Komplex Rotavirus-Infektionen und Wirksamkeit von Probiotika hingewiesen. Ich sehe das jetzt mehr vom Tier aus und denke nicht nur an Rotavirus-, sondern auch an Coronavirus-Infektionen. Das sind ja beide welche, die auf histologischer Ebene drastische Veränderungen hervorrufen, und gerade da ist für mich fraglich, ob, und wenn ja, wie Probiotika hier überhaupt Wirkungen entfalten können. Das würde für den Menschen dann auch gelten.

Und nur noch einen ganz kleinen Kommentar: Sie stellten die Frage, wer isst schon Fleisch mit Joghurt? In der Türkei ist das eine sehr beliebte Speise.

### BLAUT

Ah, sehr interessant. Erst mal vielen Dank für den Kommentar und die Hinweise. Ich denke mir, nach dem Vortrag, den Sie gestern gehalten haben, wird man sein Augenmerk vielleicht auch auf andere Möglichkeiten richten. Ich habe jetzt nur die genommen, die bislang in der Literatur vorgeschlagen worden sind, aber Sie haben ja gestern gezeigt, es gibt Effekte, durch Nisse, durch *Boulardii*, direkt auf das Epithel. Es wird ja angenommen, dass Effekte von solchen Organismen über die normalen Darmbakterien vermittelt werden. Ich könnte mir vorstellen, dass der Effekt, den man bei den Rotaviren beobachtet, auch etwas damit zu tun hat, wie sich das Epithel selber ändert. Sie haben ja durch Ihre elektrophysiologischen Untersuchungen Änderungen im Ionenflux gezeigt. Ich könnte mir vorstellen, dass solche Effekte Diarrhoeen verhindern können.

### ZENTEK

In der Ernährung von Tieren arbeiten wir immer sehr quantitativ, auch was die Dosierung von Probiotika angeht. Wenn ich mir die Humansituation vorstelle, ist das ja völlig unregelt. Wie beurteilen Sie die Wichtigkeit der Frage der Dosierung?

### BLAUT

Es gibt leider nur sehr wenige Arbeiten, in denen man Dosis-Wirkungs-Beziehungen bestimmt hat. Ich sollte dazu sagen, dass man in den Studien, die z. B. bei den entzündlichen Darmerkrankungen gemacht

worden sind, definierte Zellzahlen zugegeben hat. Die waren auch Placebo-kontrolliert, doppelblind, haben also die Kriterien guter klinischer Studien erfüllt. Weil es so viel Kritik an denen gegeben hat, die dieses Konzept so stark propagieren, ist man sich bewusst geworden, dass gute Experimente und Kriterien wichtig für die Glaubwürdigkeit sind, dass man z.B. die Dosis beachten muss. Aber bei den meisten Humanexperimenten, die ich Ihnen gezeigt habe, hat man sich auf eine Dosis konzentriert.

Was die Lebensmittel angeht, muss man sich vor Augen halten, dass z.B. Joghurts bis zum Ende ihrer Haltbarkeit 2 Größenordnungen ihrer Konzentration an Bakterien verlieren. Die sterben einfach ab. Auch, wenn man die Probiotika isst, überleben trotz Auswahl und Resistenz gegenüber Gallensäuren, Gallenseifen und Magensäure weniger als 50%, die man dann hinterher im Stuhl nachweisen kann.

ELLENDORFF

Sie hatten in einer Folie gezeigt, dass in der Mikroflora auch biologisch aktive Phytoöstrogene gebildet werden. Welche biologische Relevanz haben die im Organismus, insbesondere bei 3 Teilfragen:

Gelangen sie, oder verbleiben sie, im enterohepatischen Kreislauf und rezirkulieren immer, werden dann abgebaut, oder, wenn nein, wo wirken sie?

Wie werden sie dann verstoffwechselt und wie lange dauert das?

Gibt es überhaupt Ansätze oder Beobachtungen, dass bei abnormaler, hoher Bildung tatsächlich dann auch Effekte im Menschen entstehen, bei der Reproduktion, beim Wachstum oder Ähnlichem.

BLAUT

Die sekundären Pflanzenmetabolite sind ja in den letzten Jahren sehr in den Mittelpunkt wissenschaftlichen Interesses gerückt, weil sie in der Regel aufgrund ihrer Struktur als antioxidative Substanzen bezeichnet werden können. Nun gibt es verschiedene Klassen von diesen Substanzen, und die Fragen sind teilweise beantwortet worden. Ich kann sie Ihnen nur nicht so aus dem Stegreif beantworten. Die Arbeits-

gruppe von Herrn Adlerkreuz in Helsinki hat sich mit den Phytoöstrogenen beschäftigt, und da ist relativ gut bekannt, wenn man sie verzehrt, in welcher Konzentration sie im Serum auftreten, und wie sie dann allmählich wieder verschwinden.

BISPING

Ich habe nur noch eine Anmerkung zur Reduktion durch die Magenpassage, zumindest für den Stamm *Lactobacillus Johnsonii*, der im LC1 eingesetzt wird. Es ist nachgewiesen, dass die Reduktion nur 30% beträgt, also der schafft wesentlich mehr.

Dann noch eine kleine humorvolle Einlage zu Herrn Breves: Die Türken essen natürlich gerne ihren Zazik, genauso wie die Griechen ihren Zaziki, aber wir dürfen nicht vergessen, dass da Knoblauch drin ist, und Allicin tötet alles ab.

STEINHART

Herr Blaut, ich wollte zurückkommen auf die Allergien, die Sie genannt haben. Ich habe nicht erkennen können, wie Probiotika mit den Allergien zusammen hängen. Unter Allergie versteht man ja eigentlich immer immungeleitete Effekte, und was damit auch sogar in Gesetzesform durcheinander gebracht wird, sind die Unverträglichkeitsreaktionen. Ich habe den Eindruck, dass das, was Sie uns erzählt haben, mit Unverträglichkeitsreaktionen zu tun hat, und weniger mit den immunglobulingesteuerten Effekten.

BLAUT

Ich bin kein Immunologe, aber Frau Isolauri ist Paediater, und ich denke schon, dass sie fachkundig über atopische Dermatitis spricht. Bekannt sind Untersuchungen, die in jüngerer Zeit an Tiermodellen gezeigt haben, dass z.B. bei keimfreien Tieren, wenn man sie besiedelt mit Mikroorganismen, man zunächst erst mal eine Inflammationsantwort erhält, und dass dann in der 2. Phase, zeitversetzt über TGF- $\beta$  laufend, die Entzündung wieder zurückreguliert wird. Insbesondere dieser 2. Teil könnte möglicherweise eine Erklärung dafür sein, dass man eine Verbesserung bekommt.

STEINHART

Das bezweifle ich nicht. Mir geht es um Unverträglichkeitsreaktionen und echte Allergien. Der Hintergrund ist ein sehr praktischer, nämlich bei echten Allergien mit immunvermittelten Effekten, dann sind sie konzentrationsunabhängig. Wenn ein Keim da ist, der irgendwas macht, dann reicht das schon aus. Unverträglichkeitsreaktionen haben eine Konzentrationsabhängigkeit, und das kann ein tödlicher Unterschied sein. Die Erdnussallergie, wo wir jedes Jahr Tote haben, bewirkt echte immunvermittelte Reaktionen. Dagegen, wenn glutamat-leidende Leute sagen, sie hätten eine Allergie, dann hat das mit Allergie gar nichts zu tun, sondern die Reaktion hängt von der aufgenommenen Menge ab.

BLAUT

Da bin ich nicht Ihrer Meinung, denn was die in dieser Studie beobachteten, sind typische Immunantworten. Denn ich meine, wenn TNF  $\alpha$  hoch geht, muss es ja von irgendwas gebildet werden, und zwar Immunzellen. Wenn es gebildet wird, dann muss es auch zu einer Proliferation von Immunzellen kommen. Die Kinder reagieren ja in typischer Weise auf Kuhmilch, und das ist doch eine echte Allergie und keine Unverträglichkeit, oder?

STEINHART

Mein Zweifel bleibt, dass das wirklich echte Allergien sind. Die Kuhmilch-Allergie, das ist  $\beta$ -Laktoglobulin, das ist völlig was Anderes. Das kann man nicht damit vergleichen.

PFEFFER

Sie sprachen von dem Oxalobacter. In welchem Abschnitt des Darms fühlt er sich wohl, und wo wird die Oxalsäure absorbiert?

BLAUT

Oxalobacter wurde zunächst gar nicht aus dem Humandarm isoliert, sondern ganz woanders gefunden. Man fand dann hinterher heraus, dass er auch im Humandarm vorkommt. Wo genau, könnte man mittels einer Sonde klären, mit der man in verschiedenen Abschnitten des Darms Proben entnehmen könnte, oder indem man bei Toten schnell Proben entnehmen würde, worauf ja die Daten beruhen, die ich anfangs gezeigt habe, was die Darmabschnitte angeht. Ich kann Ihnen die Frage, wo sie vorkommen, zur Zeit nicht beantworten. Interessant ist aber, dass eine Arbeitsgruppe in Aberdeen durch eigene Versuche, indem sie Oxalobacter eingenommen haben, nachweisen kann, dass sich der Oxalatspiegel änderte. Das finde ich sehr beeindruckend.

# Grundlagen der Risikoabschätzung und Sicherheitsbewertung von Lebensmitteln\*



Ich freue mich sehr, dass ich eingeladen worden bin, bei dieser Veranstaltung teilzunehmen und einen Vortrag zu halten. Ich bin kein Mikrobiologe, kein Tierernährer oder Tierphysiologe, habe aber die heutigen Vorträge mit besonderem Interesse verfolgt.

Meine sehr verehrten Damen und Herren, jetzt würde ich Sie aber gerne mitnehmen in die Toxikologie.

Lassen Sie uns Sicherheitsbewertung, oder Risikoabschätzung, als iterativen Prozess zunächst einmal angehen.

Zunächst sind die Probleme zu identifizieren. Damit im Zusammenhang steht das Prüfen von Vorwissen. Besteht beispielsweise bei einem lebensmittelgetragenen Schadstoff eine nennenswerte Exposition? Besteht eine Schädigungsmöglichkeit? Wichtige, aber häufig schwer zu beantwortende Fragen. Unmittelbar damit verbunden ist die Frage, ob eine Risikoabschätzung notwendig bzw. überhaupt durchführbar ist? Und das mündet dann in der Regel in eine detaillierte Sammlung und Wertung aller verfügbaren Informationen, und häufig wird man bei diesen Studien dann feststellen, es ist viel zu wenig bekannt und wir müssen erstmal Forschung betreiben, um erfolgreich Risikoanalysen vornehmen zu können (Abbildung 1).

Das klassische Paradigma der Risikobeurteilung, oder des Umganges mit Risiken, sieht folgende Stufen vor:

Ein breites Spektrum an Testsystemen zur Erfassung von Schädigungspotenzial in verschiedenen

Lebensphasen, zunächst ohne Berücksichtigung der Dosis ist verfügbar.

Es folgt der Nachweis der wichtigsten toxischen Wirkung, die Analyse von Dosiswirkungsbeziehungen und die Herausarbeitung einer Dosis ohne nachteilige Wirkung, der sogenannten NOAEL, oder NOEL, also des »non observed adverse effect level«, ein wichtiger Begriff in der Toxikologie. Für die meisten Wirkungen gibt es eine Auslöseschwelle, das heißt, damit existiert auch eine Dosis ohne nennenswerte toxische Schädigung. Sie ist die Grundlage für die Abschätzung des sogenannten »acceptable daily in-

Abbildung 1



\* nach Tonbandaufzeichnung angefertigt.

take« (ADI), der annehmbaren täglichen Aufnahme, nachfolgenden Kriterien:

- Abschätzung der möglichen täglichen Aufnahme, basierend auf vorgesehener Verwendung und Einsatzhöhe
- Vergleich der zu erwartenden täglichen Aufnahme mit dem ADI
- Empfehlungen zur Verwendung und Einsatzhöhe, um sicherzustellen, dass die tägliche Aufnahme unter dem ADI bleibt.

Das wäre so der Vorgang, wie er sich für reversibel toxische Effekte mit Schwellenwert eingebürgert hat. Seit etwa 50 Jahren besteht das ADI-Konzept und ich denke, wir sind damit insgesamt gut gefahren, was den Schutz des Verbrauchers vor Schädigungen angeht.

Es gibt natürlich auch irreversible toxische Effekte, zum Beispiel

- Schädigung des zentralen/peripheren Nervensystems
- Katarakte
- Missbildungen (Zelltod während Organbildung)
- Kanzerogenität (Erbgutschädigung, Störung der Zell-Zell-Kommunikation)
- Mutagenität (Erbgutschädigung)

Ich will ein paar Worte sagen zur Kanzerogenität. Die Erbgutschädigung, möglicherweise die Störung der Zell-Zell-Kommunikation, die damit einhergehen kann, die Mutagenität, machen eine andere Herangehensweise bei der Bewertung nötig.

Bei Stoffen ohne Schwellenwert kann man nicht eine akzeptable tägliche Aufnahme als Konzept verfolgen, sondern verwendet ein so genanntes Minimierungskonzept. Das heißt man muss das Schädigungspotenzial so minimieren, dass es auf ein gesellschaftlich tolerables Niveau abgesenkt werden kann.

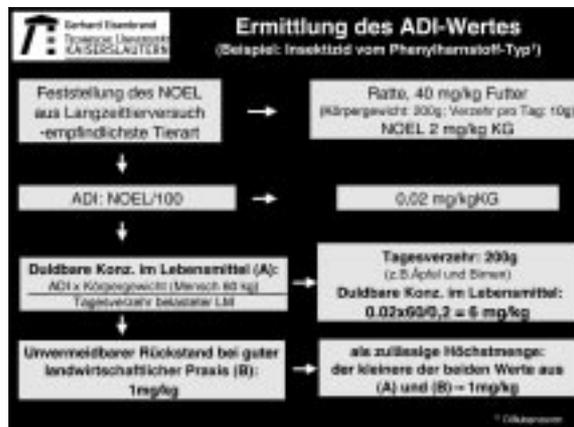
Die Identifizierung einer annehmbaren täglichen Aufnahme (ADI) beinhaltet die Festlegung einer Aufnahmehöhe, die auch bei lebenslanger Aufnahme als sicher angesehen werden kann. Umgekehrt

ergibt diese keinen Hinweis auf eine als unsicher anzusehende Aufnahmehöhe. ADI wird in der Regel abgeleitet aus dem NOEL/NOAEL (No observed adverse effect level) aus Langzeitversuchen am Tier. Dann erfolgt, um jetzt auf die Höhe der annehmbaren täglichen Aufnahme für den Menschen zu extrapolieren, die Verwendung eines Sicherheitsfaktors, der in der Regel den Wert von 100 hat. Es ist ein konventioneller Faktor, der unterschiedliche Empfindlichkeiten von Spezies zu Spezies berücksichtigt, und auch individuelle Unterschiede mit einschließt.

Am Beispiel eines Insektizids vom Phenylharnstoff-Typ wird die Ermittlung des ADI-Wertes verdeutlicht (Abbildung 2).

Zunächst wird der Tierversuch durchgeführt, dann hat man einen Wert für die maximale Dosierung über 2 Jahre, die zu keinerlei nachteiligen Effekten führt. Das wird dann mit dem Faktor 1 : 100 berechnet als 0,02 mg/kg Körpergewicht und Tag. Wenn man dies auf den Menschen umrechnet und den Tagesverzehr am potenziell belasteten Lebensmitteln zugrunde legt, dann würde man auf eine duldbare Konzentration im Lebensmittel kommen, die in der Größenordnung dieses Wertes hier bei 6 mg/kg liegt. Und dann gibt es noch eine weitere Betrachtung, nämlich wenn sich

Abbildung 2



zeigt, dass bei guter landwirtschaftlicher Praxis dieser Wert unterschritten werden kann, wie hier in diesem Beispiel, dann gilt der kleinere Wert als zulässige Höchstmenge. Ein Verfahren, das sich weltweit bewährt hat und eingebürgert ist.

Bei den genotoxischen Kanzerogenen sieht die Sache anders aus, und wir müssen die Minimierung der Exposition, soweit das möglich ist, auf ein gesellschaftlich tolerierbares Risiko bewerkstelligen. Man legt bei krebserregenden Substanzen als Richtgröße das Auftreten von Krebs, bedingt durch die Einnahme einer solchen Substanz, zugrunde, das nun mit einem spezifischen Gefährdungsrisiko verbunden wird. Man nimmt als Zielgröße dann das Risiko in der Bevölkerung, an einem zusätzlichen Tumor beispielsweise auf  $10^5$  oder  $10^6$  Populationsgröße zu erkranken.

Dies wird auch als »As Low as Reasonably Achievable« bezeichnet, als ALARA-Konzept. Diese unterschiedlichen Größenordnungen sind eigentlich nicht so sehr von Bedeutung, wenn man bedenkt, dass die Krebshäufigkeit in der Regel als Häufigkeit pro 100.000 gemessen wird. Viel wichtiger ist, dass diese rein rechnerische Extrapolation klassisch linear vorgenommen wird, das heißt, man geht von der Dosis aus, die im Tierversuch noch signifikant Tumoren über ein Langzeitexperiment von 2 Jahren hervorruft, beispielsweise in 50% der Tiere. Dann wird von dieser 50 %igen Häufigkeit auf Zielhäufigkeiten von  $1:10^5$  oder  $1:10^6$  heruntergerechnet. Eine einfache mathematische Extrapolation über 3 oder 4 Größenordnungen, die unterstellt, dass über diese vielen Größenordnungen die Dosis-Wirkungsabhängigkeit linear bleibt. Das ist die wesentliche und sehr vereinfachende Annahme, die bei diesem Verfahren gemacht wird.

Ein weiteres Konzept arbeitet mit einem »Schwellenwert für toxikologische Besorgnis«, abgekürzt TTC (Threshold of Toxicological Concern). Das ist jetzt sehr stark in der Diskussion, und es hat mehrere große Publikationen über dieses Thema gegeben. Getrieben wird diese Diskussion von der Notwendigkeit, dass man die erforderlichen Ressourcen für Langzeit-tierversuche auf die wirklich relevanten zu untersu-

chenden Probleme konzentriert. Dazu gibt es einen Vorschlag in Form eines solchen Entscheidungsbaumes (decision tree) (Abbildung 3), der bestimmte Entscheidungsschritte vorsieht. Man sagt von vornherein, Substanzen wie polyhalogenierte Dibenzodioxine, Dibenzofurane auf alle Fälle einer Sonderbewertung unterzogen werden. Weiter wird gefragt, ob es möglicherweise Strukturelemente gibt, die darauf hindeuten, dass diese Substanz vielleicht genotoxisch ist. Wenn ja, fragt man, ob das eines der starken Kanzerogene, wie flatoxinge Azoxy- oder- Nitrore-Verbin-

Abbildung 3



dungen ist. Wenn diese Fragen bejaht werden, dann muss die Substanz in einer spezifischen, speziellen, stofforientierten Risikobewertung betrachtet werden.

Werden die Fragen verneint, ergibt sich auf der linken Seite des Entscheidungsbaumes die Frage, ob die tägliche Aufnahme (daily intake) 1,5 Mikrogramm/Person/Tag überschreitet.

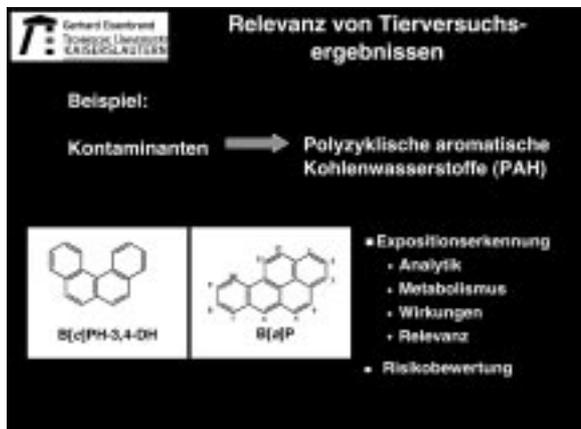
Wenn das zu verneinen ist, fällt die Kontamination in der Bewertung nicht in die Kategorie »toxikologisch besorgnisauslösend«. Und so geht das hier schrittweise durch einen solchen Entscheidungsbaum, nach bestimmten strukturellen Klassen.

Dieser Wert von 1,5 Mikrogramm Gesamtaufnahme/Tag, den ich Ihnen gerade vorgestellt habe, gilt also als Schwellenwert zur Auslösung toxikologischer Besorgnis. Wenn der in der Abschätzung unterschritten wird, braucht man sich zunächst mal nicht weiter um vertiefende Untersuchungen prioritär zu kümmern, sondern kann das mit einer geringeren Priorität betrachten.

Jetzt möchte ich an 2 Beispielen darstellen, dass es auch ganz besonders wichtig ist, die Plausibilität toxikologischer Risikoabschätzung für den Menschen zu belegen.

Ich will Ihnen ein erstes Beispiel vorstellen (Abbildung 4). Das sind 2 polyzyklische Kohlenwasser-

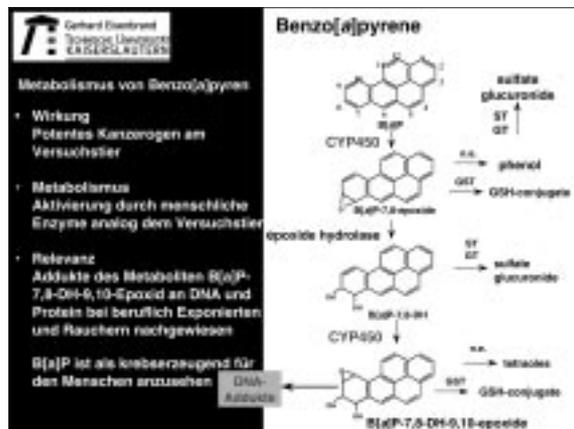
Abbildung 4



stoffe. Links das Benzo(c)phenanthren (B(c)Ph) und rechts das Benzolapyren (B(a)P), ist eine Leitsubstanz für die Gruppe der krebserzeugenden polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe, und im Tierversuch ein ausgesprochen starkes Kanzerogen. Dieser Stoff links, auch ein polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoff, ist als nicht kanzerogen und nicht mutagen beschrieben. Da muss man, um das plausibel zu machen, in den Metabolismus dieser Stoffe schauen. Beim Benzo(c)pyren ist das sehr gut untersucht, da weiß man, dass das in mehreren Stufen verläuft (Abbildung 5). Die erste Stufe ist die Epoxidierung an Position 7, 8 hier. Das Epoxid wird dann enzymatisch, hydrolytisch geöffnet, und dann erfolgt eine 2. Epoxidierung, zu eigentlich kanzerogenen Verbindung, die letztlich dann zur Auslösung von Mutationen führt über die Bildung von DNA-Addukten. Gleichzeitig läuft auf der rechten Seite auch immer ein entgiftender Metabolismus ab. Wenn aber eine ausreichend hohe Dosis gegeben wird, dann werden diese Prozesse überlaufen und es kommt zur Auslösung von Mutationen und von Krebs.

Beim Benzo(c)phenanthren hat sich in einer vergleichenden Studie herausgestellt, dass die Ratte ganz anders metabolisiert als der Mensch. Bei der Ratte läuft im Wesentlichen ein inaktivierender Metabolis-

Abbildung 5





Stoff, der für die Arbeitsplatzsicherheit von Bedeutung ist. Da misst man die Reaktion dieser Substanz mit Hämoglobin(Hb) und kann auf diese Weise Expositionen mithilfe der HbAddukte im Erythrozyten verfolgen. Der Erythrozyt hat ja in etwa eine 3monatige Lebensdauer, und man kann dann eine Integration über die Exposition in dieser Zeit durchführen.

Das wäre die eine Seite und dann gibt es natürlich noch andere metabolische Vorgänge. Der eigentlich mutationsauslösende Prozess ist im Wesentlichen diese Bildung von kovalenten Addukten an der DNA. In einem Projekt, das vom Arbeitskreis Ernährungsindustrie gefördert wird, geht es, in Zusammenarbeit mit anderen Zentren, die im Wesentlichen an der Prävention der Acrylamid-Bildung in Lebensmitteln arbeiten, auch um die toxikologische Bewertung, und das ist unser Teil. Wir fragen uns, was zu erwarten ist im Blut, wenn Acrylamid nach Resorption über den Darm im Humanblut auftritt. Wie können wir quantitativ an diese Frage herankommen? Wird die Abfangreaktion durch das Hämoglobin in Erythrozyten, oder durch die Blutplasmaproteine bevorzugt? Oder sieht man schon bei sehr kleinen Expositionskonzentrationen auch Parallelschädigungen der DNA in den kernhaltigen weißen Blutkörperchen?

Im Zusammenhang damit steht die Frage nach der Konzentrationsabhängigkeit dieser Reaktionen, und dahinter steht die Frage, ob es möglicherweise einen praktischen Schwellenwert gibt, der dazu führen würde, dass man erst eine bestimmte Blutkonzentration überschreiten muss, um Genotoxizität zu sehen. Das machen wir mit verschiedenen Techniken, zum Beispiel hier mit dem sogenannten Cometassay. Dies ist im Prinzip eine Einzelzellelektrophorese, bei der Sie die Zelle auf dem Objektträger einer Elektrophorese unter denaturierenden Bedingungen unterziehen.

Was man erkennen kann, ist, dass ungeschädigte Zellen die DNA komplett in diesem elektrischen Feld im Kern behalten, während geschädigte Zellen durch die auftretenden DNA-Brüche die DNA wandern lassen. Das sieht dann aus wie ein Komet, daher der Name Cometassay. Um ein Maß für die Exposition

zu bekommen, wird die Adduktbildung am terminalen Valin des Hämoglobins gemessen. Damit kann man letztlich dann auch auf die Exposition im Menschen schließen. Wir können noch keine endgültigen Ergebnisse anbieten, dazu ist diese Untersuchung noch nicht weit genug gediehen, aber Einiges sehen wir schon.

Erstens gibt es einen klaren Unterschied zwischen Acrylamid AA und dem Stoffwechselprodukt, dem Glycidamid GA. Wir sehen mit dem Acrylamid keinerlei DNA-schädigende Wirkung in verschiedenen Zelltypen und humanen Lymphozyten, wohl aber mit dem Glycidamid. Konzentrationen, bei denen die Schädigung beginnt, liegen in der Größenordnung von 300 Mikromolar (Abbildung 7).

Wenn man jetzt Extremsituationen berechnet, dann würde man etwa bei 6 l Blutvolumen mit dem, was über eine Portion von Chips (300 g zum 3.500 ppb an Acrylamid) aufgenommen würde, etwa maximal eine Konzentration von etwa 1αM im Blut erwarten können.

Wir haben die Lücke bisher noch nicht ganz schließen können, und wir arbeiten deswegen jetzt mit 14 C-markierten Acrylamid (bzw. Glycidamid), um an die direkte kovalente Bindungsknüpfung mit der

Abbildung 7

**Zusammenfassung**

- +AA:**
  - keine signifikante Induktion von DNA-Schäden und Mikrokernen in humanen Lymphozyten
  - keine signifikante Induktion von Mutationen in Lungenfibroblasten des Chinesischen Hamsters (V79)
- +GA:**
  - signifikante Induktion von DNA-Schäden in humanen Lymphozyten ab 300μM nach 4h Inkubation
  - signifikante Induktion von Mikrokernen in humanen Lymphozyten ab 1mM nach 23h Inkubation
  - in V79-Zellen Dosis-abhängige Induktion Mutationen (≥ 600 μM)
- >** In Humanblut bindet <sup>14</sup>C-AA bevorzugt an Erythrozyten / Plasmaprotein (10-3,3 mM; 1h; 37°C/ 4°C)
- >** AA bildet Hb-Valin-Addukte (≈10 x „background“ bei 30μM, 6h)
- >** GA reagiert langsamer mit Hb unter den getesteten Bedingungen
- >** Bei Extremexposition → max 1-2 μM im Blut zu erwarten!
- >** Risikobewertung braucht weitere Daten!

DNA heranzukommen. So ist diese Untersuchung eine, wie ich glaube, vernünftige Art und Weise, vorzugehen, um die Plausibilität dieser Risikoannahmen besser zu begründen.

Die DFG-Senatskommission zur Beurteilung der ges. Unbed. von LM (SKLM), die vorhin erwähnt worden ist, kümmert sich besonders um solche lebensmittelgetragenen Stoffe und ihre Sicherheitsbewertung, aber sie befasst sich auch mit anderen Themen. Ein solches Thema sind die funktionellen Lebensmittel. Der Begriff »Funktionelle Lebensmittel« (FLM) wird für solche Lebensmittel verwendet, für die über den reinen Ernährungszweck hinaus gesundheitlich vorteilhafte Wirkungen beansprucht werden (SKLM 2004). Dazu ist gerade ein Symposiumsband erschienen, mit Mindestanforderungen, die nach Meinung führender Wissenschaftler aus aller Welt zur Bewertung von funktionellen Lebensmitteln hinsichtlich gesundheitlicher Unbedenklichkeit und Funktionalität erforderlich sind.

Diese funktionellen Lebensmittel sind ja, vielleicht sogar im unmittelbaren Sinne des Wortes, in aller Munde. Was nach Ansicht unserer Senatskommission etwas zu kurz gekommen ist in dieser ganzen Diskussion, das sind eben die Sicherheitsaspekte. Das gilt natürlich, außer für funktionelle Lebensmittel, auch noch für andere neue Bereiche der Sicherheitsbewertung wie:

- Nahrungsergänzungsmittel (NEM), also Lebensmittel, die aus Einfach- oder Mehrfachnährstoffkonzentraten bestehen, in dosierter Form in den Verkehr gebracht werden und dazu bestimmt sind, die Zufuhr dieser Nährstoffe im Rahmen der normalen Ernährung zu ergänzen (Richtlinie des Europäischen Parlaments und des Rates 2002/46/EG).
- Angereicherte Lebensmittel (ALM), das sind Lebensmittel, denen essentielle Nährstoffe, d.h. Stoffe, für die allgemein akzeptierte Zufuhrempfehlungen vorliegen, in Form einer Anreicherung oder Ergänzung zugesetzt wurden mit dem Ziel, einen

Mangel an einem oder mehreren Nährstoffen in der Bevölkerung oder bestimmten Bevölkerungsgruppen vorzubeugen (Codex Alimentarius, General Principles for the addition of essential nutrients to feeds 1987, amended 1989, 1991).

- Neuartige Lebensmittel/Gentechnisch veränderte Lebensmittel.

#### **Ich fasse zusammen:**

Die Risikobewertung erfordert eine wissenschaftlich begründete Plausibilität für den Menschen, und zwar insbesondere zur Untermauerung der Basis für die Risikobewertung und der Annahmen, die zur Extrapolation erforderlich sind. Man kann sagen, dass das ADI-Konzept, das ich Ihnen eingangs vorgestellt habe, zusammen mit dem Minimierungskonzept im Grunde seit vielen Jahren ein hohes Maß an Verbrauchersicherheit gewährleistet.

Lebensmittel enthalten natürlicherweise Stoffe mit hoher biologischer Wirksamkeit, nur sind die Konzentrationen in der Regel so niedrig, dass sie nicht als Wirkung signifikant in Erscheinung treten. Deswegen hat man mit ausgeglichener Ernährung in aller Regel auch neben hohem Nutzen ein vernachlässigbares Risiko.

Für Nahrungsergänzungsmittel, funktionelle Lebensmittel, angereicherte und neue Lebensmittel sind wissenschaftlich fundierte Nutzen/Risiko-Analysen unabdingbar notwendig für die Sicherheit des Verbrauchers.

Damit, meine Damen und Herren, möchte ich schließen und danke Ihnen für Ihre Aufmerksamkeit.

## Diskussion



FLACHOWSKY

Ich habe eine Frage zu diesem decision-tree, den Sie da vorgeschlagen haben. Wenn ich das richtig verstanden habe, haben Sie gesagt, über 1,5 Mikrogramm pro Tag fangen wir an, über was nachzudenken. Sie hatten auch Substanzgruppen erwähnt, Dioxine, Furane, Toxaphene, also chlorierte Verbindungen, von denen man weiß, dass sie sich ganz unterschiedlich in der Absorption und im Carry over verhalten. Wie berücksichtigen Sie diesen Effekt?

EISENBRAND

Das Wichtige ist, dass diese Gruppe, die ja ganz am Eingang dieses sogenannten decision-trees steht, von vornherein ausgenommen ist. Jeder dieser Stoffe, dieser chlorierten Dibenzodioxine oder Dibenzofurane oder Verwandten muss gesondert und als eigene Substanz bewertet werden. Das heißt, die unterliegen nicht diesem decision-tree. Es gibt noch ein paar sehr starke Kanzerogene, wie beispielsweise Aflatoxine, die unterliegen nicht dem decision-tree, das muss getrennt bewertet werden. Aber dann gibt es eine Riesengruppe an Stoffen, die man einfach zunächst mal diesem Entscheidungsbaum unterwerfen kann. Die Autoren, die das über viele Jahre schon verfolgt haben, auch mit sehr viel statistischem Material aus Tierversuchen, das sind ja über 700 Langzeitversuche, die da zugrunde gelegt werden, die orientieren das an strukturellen Elementen, mit entsprechenden Mengen dazu. Die Idee dahinter finde ich sehr gut, dass man versucht, das zu gruppieren in Stoffgruppen und mit

einer vernünftigen Argumentation zu unterlegen. Die sagen also, wenn das den und den Level nicht überschreitet, dann hat das geringe Priorität in der toxikologischen Untersuchung. Aber ausgenommen sind diese sehr stark wirksamen Stoffe, und echt genotoxische Kanzerogene müssen auch getrennt betrachtet werden.

SCHWERIN

Welche gesetzlichen oder rechtlichen Verbindlichkeiten sind mit diesen Entwürfen verbunden? Welche Vorhaben sind damit verbunden? Die zweite Frage: Sie setzen biologisches Material ein, z.B. humane Zellen. Wie berücksichtigen Sie dort die biologische Variabilität?

EISENBRAND

Die erste Frage ist schnell zu beantworten. Das ist zunächst ein publizierter Vorschlag, mit dem setzen sich jetzt auf der europäischen Ebene die Behörden und die einzelnen Panels auseinander. Das wird irgendwann auch in eine gesetzliche oder Verordnungsform gegossen werden, möglicherweise modifiziert und vereinfacht. Keine Verbindlichkeit bisher, bis auf Stoffe aus Verpackungsmaterialien, da gibt es eine FDA-Regelung, die diese 1,5 Mikrogramm Gesamtaufnahme als Schwellenwert definiert hat. Das ist die einzige bisher bestehende Regelung.

Die zweite Frage bezüglich der Variabilität des biologischen Materials kennzeichnet ein großes Problem! In diesen vergleichenden Untersuchungen mit

den polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen hatten wir 20 Proben humaner Lebergewebe aus Exzisionen untersucht, und natürlich sieht man Unterschiede. Wir haben das dann korreliert, jeweils mit den einzelnen Enzymen und konnten zeigen, dass bestimmte Isoenzyme der Zytochrome P 450, 1A2 und 3A4 wesentlich sind, und zwar für die beiden Schritte der metabolischen Aktivierung in unterschiedlichem Maß. Man kann also schon sehr weit gehen, wenn man den Mechanismus kennt, der wichtig ist.

#### BREVES

Ich habe eine Frage, die sich anschließt an das, was Herr Schwerin angeschnitten hat. Sie haben dies Modell vorgestellt, Lymphozyten im Zusammenhang mit Acrylamid. Man kann, wenn man nach dem Sinn dieses Modells fragt, natürlich sagen, Lymphozyten gehören mit zu den ersten Zellen, die mit diesen Substanzen konfrontiert werden. Also macht so ein System durchaus Sinn. Aber wenn ich mal davon ausgehen würde, dass auf der Ebene dieser Zellen keine Effekte gezeigt werden, ist ja die Leber als dann bald folgendes Organ möglicherweise ganz anders in der Reaktion. Wie ist die Strategie oder die Ideologie bei der Auswahl von Testsystemen?

#### EISENBRAND

Natürlich ist das Blut zunächst das erste Kompartiment nach der Aufnahme, das über das Portalblut den Stoff in die Leber bringt, und in der Leber arbeiten wir einfach radioaktiv. Wir schauen, ob wir Bindungen an der DNA feststellen können, damit kommen wir noch mal eine Größenordnung mindestens weiter runter. Was also die primäre Löschreaktion mit Blutbestandteilen übersteht, kommt relativ schnell dann in die Leber, und das muss genauer untersucht werden. Tumoren treten allerdings in der Leber nicht auf. Das sind ja sehr merkwürdige Tumoren, die durch Acrylamid induziert werden, diese aus der inneren Auskleidung des Hodensackes entstehenden Theka-Tumoren und ähnliche, also Uterustumoren und, zum Teil, Adenome in der Mamma, also keine Karzinome.

Gleichwohl weiß man auch nicht, wie das eigentlich beim Menschen aussehen könnte. Ob die Ratte dann ein präduktives Modell ist, wird sich zeigen müssen, und man wird das anhand der Mutationen, die in den Organen oder in der Leber ausgelöst werden, untersuchen müssen.

Die erste Relevanzfindung, Dosisfindung, haben wir auf die Blutbestandteile konzentriert, weil sich zeigt, dass rund 80% des ankommenden Acrylamids in kürzester Zeit binden an Blutbestandteile, an Erythrozyten, und Hb, also im Wesentlichen an das Albumin. Die Bioverfügbarkeit des eigentlich relevanten Anteiles an Acrylamid, der dann in die Leber kommt, ist relativ stark reduziert.

Zu Ihrer Frage der Standards, des Testpanels, da gibt es Konventionen, dass auf der Mutagenitätsseite bestimmte Testsysteme benutzt werden sollten, bakteriell, Warmblütertest, und mindestens ein in vivo-System. Bei der Langzeituntersuchung auf kanzerogene Wirksamkeit gibt es ja die bindenden OECD-Vorschriften, wie man ein Kanzerogeneseexperiment lege artis durchführen sollte, eben 2 Jahre tägliche Gabe, und möglichst in einem Bereich, wo noch keine wesentliche Toxizität auftritt.

#### STEINHART

Ich habe jetzt gelernt, dass bei Migraten diese 1,5 Mikrogramm pro kg vorgesehen sind. Jetzt gibt es aber bei den Migraten einige Probleme. Wenn wir das Batch nehmen, bekommen wir keine Verstoffwechslung, aber Reaktionsprodukte, und wir bekommen Addukte, beispielsweise mit Aminosäuren, mit Proteinen. Diese Addukte kann man ja gar nicht erfassen mit diesen 1,5 Mikrogramm pro kg, weil die einfach fest gebunden sind, aber irgendwann werden sie wieder frei gesetzt. Das haben wir auch gefunden bei diesen Batch-Untersuchungen. Gibt es da schon Überlegungen, wie man mit diesen Migraten umgeht, die dann mit der Matrix Reaktionen eingehen, die dann chemisch verändert werden oder Addukte bilden?

EISENBRAND

Also da ist die Überlegung auch wieder struktureller Art. Das Batch ist ja eine alkalierende, das ist ja ein Epoxid, und damit ist es ein genotoxisches Mutagen. Damit wäre es aus dieser TTC-Betrachtung von vornherein ausgeschlossen. Aber ich denke, die Konzentrationen, die man tatsächlich aus Verpackungsmaterial sehen würde, sind auch außerordentlich niedrig.

BLAUT

Ich habe eine Frage zu dem negativen Test, den man bei dem Acrylamid hatte im Ames-Test. Wie kann man sich das erklären? Reagieren die reaktiven Komponenten gleichab mit bakteriellem Protein, oder wie erklären Sie sich das?

EISENBRAND

Nicht untersucht, aber genau das würde ich erwarten. Im Wesentlichen, wenn Sie S9-Fractionen, Mikrosomen, Leberhomogenat oder so etwas zusetzen, kriegen Sie einfach eine primäre Reaktivität mit den ganzen Proteingruppen, die da vorhanden sind.

# Mikrobiologie und Tierernährung

## – Herausforderungen aus Sicht der Ernährung landwirtschaftlicher Nutztiere –



### 1 Einleitung

Mikrobiologie und Tierernährung sind zwei Fachdisziplinen, deren beider Kenntnisse für den Erfolg der tierischen Produktion im landwirtschaftlichen Betrieb besonders wichtig sind. Die vorausgehenden Beiträge, die sich dazu grundlegend mit den mikrobiologischen Fragestellungen auseinandergesetzt haben, zeigen vielfältig und detailliert Funktion und Bedeutung von Mikroorganismen z.B. in der Silagebereitung und aufgrund ihres Vorkommens im Gastrointestinaltrakt von Monogaster und Wiederkäuer. Damit wird deutlich, dass diese Kenntnisse Bestandteil des Wissens bei Maßnahmen zur Futterbereitstellung und Beurteilung des Futterwertes von einzelnen Rationskomponenten oder bei der Rationsoptimierung für Rind und Schwein sein sollten. Allerdings ist die Vermittlung mikrobiologischen Wissens in den landwirtschaftlichen Betrieb hinein eher schwierig. Darüber hinaus sieht sich der Landwirt aber auch vermehrt mit mikrobiologischen Produkten konfrontiert, die z.B. im Bereich der Silagebereitung oder im Zukaufsfutter z.B. als Probiotika eingesetzt werden. Da damit auch Kosten entstehen, richtet sich das vorrangige Interesse nach der Wirkungssicherheit bzw. nach einer möglichst erfolgreichen d.h. leistungsorientierten Verwendung. Daraus erwächst aber wiederum der Bedarf einer Rückkopplung zu notwendigen mikrobiologischen Kenntnissen, um hier orientierend einzugreifen. In der Folge sollen einige Beispiele dargestellt werden, wie aus Sicht der Ernährung unserer landwirtschaftlichen Nutztiere Herausforderungen

für die Mikrobiologie zu sehen sind. Dabei wird entsprechend der Vortragstagung eine Untergliederung in die Teilbereiche Futtermittelbereitstellung sowie Mikroorganismen im Verdauungstrakt von Schwein und Rind vorgenommen.

### 2 Mikrobiologie und Futtermittel

Mikroorganismen spielen bei der Futterkonservierung, aber auch beim Futtermittelverderb die entscheidende Rolle. Auch wenn Mikroorganismen vorrangig im Zusammenhang mit der Silagebereitung diskutiert werden, so ist für die Beurteilung der Futterqualität verschiedener lagerfähiger Einzelkomponenten (z.B. Heu, Stroh, Getreide, industrielle Nebenprodukte u. a.) oder von Mischfutter der jeweilige Keimbesatz zu berücksichtigen. Gerade neuere Daten zeigen bei Heu und Stroh einen verstärkten mikrobiellen Keimbesatz, wobei die Erntetechnik von besonderer Bedeutung ist. Eine mangelhafte Futterhygiene kann in Abhängigkeit der Spezies (z.B. Pferd, Schwein) zu einem zunehmenden gesundheitlichen Problem werden. So bestätigen Untersuchungen zur Qualität von Pferdefuttermitteln am landwirtschaftlichen Betrieb eine hohe Variabilität in der mikrobiellen Belastung (Sliwinski et al. 2003). Unter der Maßgabe von Qualitätssicherungssystemen auch in der Landwirtschaft ist es als eine wesentliche Herausforderung anzusehen, in Zusammenarbeit mit der Mikrobiologie die Futterqualität in Verbindung mit der Produktions- und Lagerungstechnik zu optimieren und Verfahren einer schnellen, einfachen Überprüfbarkeit zu erarbeiten.

*Tabelle 1:* Wirkungsnachweis von biologischen Silierzusatzstoffen mit DLG-Gütezeichen

	Anzahl, gelistet* (n)	
Verbesserung der Vergärung von mittelschwer bis leicht vergärbarem Futter (gesamter Trockensubstanzbereich) und Verbesserung der aeroben Stabilität	33	
Verbesserung der Verdaulichkeit	17	(52 %)
Futteraufnahme	16	(48 %)
Milchleistung	11	(33 %)
Mastleistung	7	(21 %)

\* auch Identprodukte möglich

Um diese »Produktsicherheit« zu erreichen, werden in der Silagebereitung verstärkt mikrobielle Silierzusätze für eine verbesserte, stabilere Gärqualität und geringere Trockenmasseverluste eingesetzt (siehe Bauer 2004, Pahlow 2004, Driehuis 2004). Allerdings liegt das Interesse des Landwirts vorrangig an einer Erhöhung des Futterwertes (= Verdaulichkeit, Energiegehalt), der Futteraufnahme und/oder der Milch- und Mastleistung, so dass der Erfolg eines Silierzusatzes auch ökonomisch leichter kalkulierbar wird. Eine Arbeitsgruppe der DLG nimmt auf Antrag der jeweiligen Vertriebsfirma eine Zertifizierung marktfähiger Produkte hinsichtlich ihres Siliererfolges vor (siehe Tab. 1). Derzeit liegen für ein Drittel bis für die Hälfte der mit einem DLG-Gütezeichen versehenen biologischen Silierzusätzen – und damit bereits zertifizierter Produkte – gesicherte experimentelle Nachweise einer Leistungsverbesserung am Tier vor. Unter Berücksichtigung neuerer publizierter Daten (siehe Tab. 2, Kung et al. 2003) ist der relative Anteil –

*Tabelle 2:* Wirkungsnachweis von biologischen Silierzusatzstoffen (Literaturauswertung, Kung et al. 2003)

	Publikationen (n) (n) (%)	Anzahl der Verbesserungen
Zur Verdaulichkeit	82	27 (33)
Zur Futteraufnahme	67	19 (28)
Zur Milchleistung	36	17 (47)
Zur Mastleistung	15	8 (53)

je nach Untersuchungsparameter – etwas niedriger. Allerdings geht aus den tierexperimentellen Arbeiten häufig nicht hervor, auf welchen ursächlichen Zusammenhängen die Leistungsänderung beruht. So sind die Inhaltsstoffe des Ausgangsmaterials, die quantitativen und qualitativen Veränderungen des Futters während des Siliervorganges bzw. nach der Entnahme meist nur unzureichend beschrieben. Jochmann et al. (1998) kommen in ihrem Übersichtsreferat zum Einfluss von Milchsäurebakterien als Siliermittel zu ähnlichen Schlussfolgerungen. Bei Grassilagen dürfte gerade der Rohproteinfraktion im Hinblick auf den proteolytischen Abbau größere Aufmerksamkeit gewidmet werden (Steidlova und Kalac 2003). Auch wenn Siliermittel aufgrund ihrer Zielrichtung den »technologischen Futterzusatzstoffen« zuzuordnen sind, sind begleitende tierexperimentelle Untersuchungen notwendig. In diese Arbeiten sind jedoch vertiefende futtermittelanalytische Parameter stärker einzubinden.

Als ein weiteres Beispiel für die Bedeutung mikrobieller Vorgänge hinsichtlich Futterhygiene und tierischer Leistung kann die Flüssigfütterung bzw. die Verfütterung »fermentierter Futtermittel« als Nebenprodukte der Lebensmittelindustrie im Rahmen der Flüssigfütterung bei Schweinen herangezogen werden. Die Flüssigfütterung wird in der Regel nur von ihrer fütterungstechnischen Seite aus beleuchtet. Praxisrelevante Arbeiten weisen zumeist auf Probleme mangelnder Futterhygiene hin, die zu Nährstoffverlusten und Leistungsminderungen führen (Nagel 1997). Wichtig dazu wäre die Erarbeitung einfacher, schneller Beurteilungskriterien für die Futterqualität. Demgegenüber zeigt die Arbeitsgruppe von Brooks (Brooks et al. 2003) erhebliche positive Effekte in Verbindung mit der Flüssigfütterung auf. Dabei kann insbesondere die Produktsicherheit durch eine deutliche Verringerung von Salmonellen-Infektionen beim Mastschwein erhöht werden (siehe Tab. 3). Hinweise über Wirkungsmechanismen z.B. aufgrund einer raschen pH-Absenkung im Futter geben verschiedene neuere Arbeiten (van der Wolf et al. 1999, van Winsen et al. 2000, Beal et al. 2002). Bei Mastschweinen sind

Tabelle 3: Einfluss der Flüssigfütterung von Mastschweinen auf das Auftreten von Salmonellen-Infektionen (Brooks et al. 2003)

Fütterungssystem	Häufigkeit von Salmonellen-Infektion (%)
Trockenfutter	
pelletiert	8,2
nicht pelletiert	4,2
Flüssigfütterung	1,0

weiterhin positive gesundheitliche Aspekte aufgrund der Minderung von pathogenen *E. coli* und insgesamt eine Leistungsverbesserung zu erwähnen (Brooks et al. 2003). Aber auch die Verfütterung an hochtragende und laktierende Zuchtsauen führt zu einer Reduzierung coliformer Keime im Faeces und weiterhin zu einer Verbesserung der Kolostrumqualität (Demeckova et al. 2002). Diese positiven Ergebnisse können für Saug- und Aufzuchtferkel weitergeführt werden (Demeckova et al. 2002, Scholten et al. 2002). Damit könnte ein verfahrensspezifisches System unter Einbeziehung von Zuchtsau, Ferkel und Mastschwein hinsichtlich besserer Gesundheit, einer Leistungsstabilität und einer höheren Produktsicherheit aufgebaut werden. Allerdings ist die Voraussetzung der Einsatz von Milchsäurebakterien bzw. entsprechender Starterkulturen für eine gezielte mikrobielle Fermentation im Rahmen der Flüssigfütterung. Dazu sind jedoch auch die futtermittelrechtlichen Voraussetzungen zu erfüllen.

### 3 Mikrobiologie und Gastro-Intestinaltrakt

#### 3.1 Monogaster

Zielort einer gemeinsamen Interessenlage von Mikrobiologen und Tierernährern am Tier ist der Gastro-Intestinaltrakt. Dabei ist die Bedeutung der Mikroorganismen beim Monogaster im Unterschied zum Wiederkäuer in neuerer Zeit – vor allem fokussiert durch den möglichen Einsatz von Probiotika bzw. unterstützt durch intensive Forschungstätigkeit in der Humanernährung – stärker wissenschaftlich bearbeitet worden. Grundlagenorientierte Beiträge

dazu wurden auf der vorliegenden Tagung bereits vorgestellt (Breves 2004, Bisping 2004, Simon et al. 2004, Blaut 2004). Voraussetzung eines zielgerichteten Eingreifens in die mikrobielle Tätigkeit durch Einsatz von Probiotika und/oder Präbiotika sind Kenntnisse über Aufgaben und Funktion von Mikroorganismen bei gesunder, normaler Darmfunktion und bei einem gleichzeitig gesunden Gesamtorganismus. Dabei liegt der wesentliche Fortschritt in einer genaueren Charakterisierung und Identifizierung der Mikrobenpopulation, wobei sich dazu erhebliche neuere methodisch-analytische Entwicklungen ergeben haben (Salminen et al. 1998, Harmsen und Welling 2002). Allerdings ist auf das häufig wenig beschriebene Problem der Probengewinnung sowie der zeitlichen und lokalen Zuordnung hinzuweisen. Insgesamt findet sich in mehreren Arbeiten zur Mikrobiologie des Gastro-Intestinaltraktes die Zielvorstellung für ein »Konzept einer gesunden Mikroflora« (Salminen et al. 1998, Tannock 2002). Diese »gesunde Mikroflora« ist deutlich von toxinbildenden Mikroorganismen, die gravierende gesundheitliche Probleme auslösen, abzugrenzen. Die Herausforderungen für die Tierernährung bestehen dabei vor allem darin, Maßnahmen zum Erhalt, zur Stärkung und Unterstützung einer »gesunden Mikroflora« vorzunehmen. Die Maßnahme der Unterstützung kann im wesentlichen mit dem Einsatz von Probiotika gleichgesetzt werden. Dabei ist vor allem abzuklären, unter welchen Bedingungen ein positiver Effekt des Probiotika-Einsatzes auf Gesundheit und Leistung des Tieres zu erwarten ist.

In den Abb. 1–3 sind mögliche Interaktionen, die zwischen verschiedenen Einflussgrößen und der Mikroflora des Gastro-Intestinaltraktes auftreten können, aufgeführt. Dabei ergeben sich wiederum Zusammenhänge zum Probiotika-Einsatz, deren Auswirkungen hier mit »Wirkungssicherheit für Probiotika« apostrophiert sind. So liegen z.B. verschiedene Hinweise einer Beeinflussung der Mikroflora des Jungtieres (Ferkels) durch das Muttertier (Sau), Abhängigkeiten zu Haltungssystemen, den Stallbedingungen oder der Fütterungstechnik vor (Morein und Ke-Fei Hu 2001, Demeckova et al. 2002). Von

Abbildung 1: Mögliche tier- und haltungsspezifische Interaktionen zur Mikroflora des Gastro-Intestinaltraktes



unmittelbarer Bedeutung sind jedoch die Zusammenhänge zur nutritiven Versorgung des Tieres und die Auswirkungen, die die Nährstoffe bzw. Inhaltsstoffe der Ration auf die Nährstoffbereitstellung für die Mikroorganismen im Gastro-Intestinaltrakt ausüben. Eine Einbeziehung der Notwendigkeiten für Mikroorganismen in die gesamte Rationsgestaltung wäre wünschenswert. Dies setzt jedoch verstärkte Kenntnisse über die Besonderheiten der Mikroorganismen einerseits (siehe Simon 2001) und wesentlich exaktere Kenntnisse der Inhaltsstoffe der einzelnen Rationskomponenten andererseits voraus (Buddington 2001, Naughton 2001). Dabei ist auch der Hinweis auf den Einsatz von Präbiotika zu geben, wobei im

Abbildung 2: Mögliche nutritive Interaktionen zur Mikroflora des Gastro-Intestinaltraktes

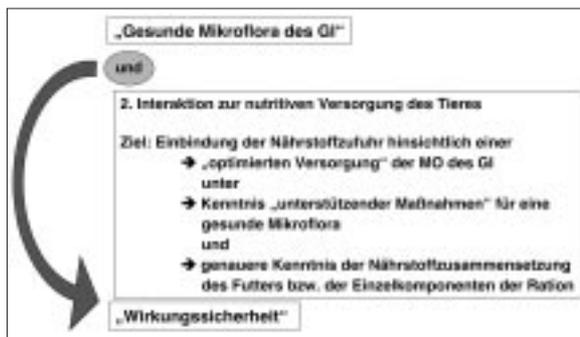
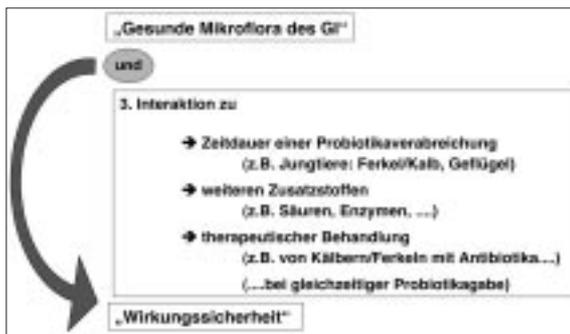


Abbildung 3: Mögliche weitere Interaktionen zur Mikroflora des Gastro-Intestinaltraktes

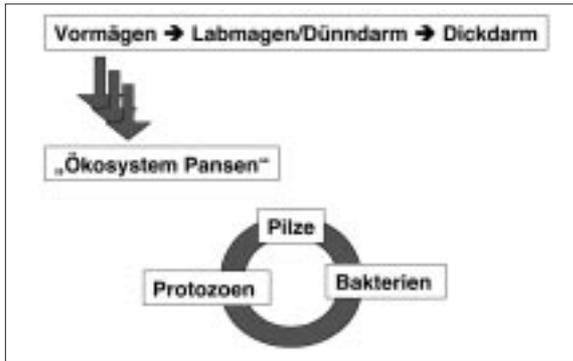


Einzelfall auch natürliche Rationskomponenten einen »präbiotischen Effekt« ausüben können. In Abb. 3 sind darüber hinaus einige weitere Gesichtspunkte zusammengestellt, mit denen sich der Versuchsansteller bzw. der Landwirt beim praktischen Einsatz von Probiotika konfrontiert sieht. Als Gesamtfazit dieser Auflistung von Einflussgrößen ist festzuhalten, dass nur mit einem deutlich verbesserten Kenntnisstand der Erfolg zielgerichteter Veränderungen der gastro-intestinalen Mikroflora, z.B. auch über Probiotika-Einsatz, zu beurteilen ist.

### 3.2 Wiederkäuer

Im Unterschied zum Monogaster ist die Ernährung des Wiederkäuers vorrangig durch eine optimierte »Fütterung« der Mikroorganismen in den Vormägen des Wirtstieres geprägt. Dabei ist das Zusammenspiel von Bakterien, Protozoen und anaeroben Pilzen in einem »Ökosystem Pansen« Versorgungsgrundlage für den Stoffwechsel des Wirtstieres (siehe Abb. 4). Allerdings sollte nicht übersehen werden, dass auch im Dünndarm, vor allem jedoch im Dickdarm, mikrobielle Aktivitäten vorzufinden sind. Detaillierte Ausführungen zu mikrobiellen Umsetzungen im Pansen und Einflüssen der Fütterung wurden bereits von Flachowsky und Strobel (2004) bzw. Südekum (2004) vorausgehend vorgenommen. Als zentrale Herausforderungen für die Tierernährung ist weiter-

Abbildung 4: Zur Mikrobiologie im Gastro-Intestinaltrakt des Wiederkäuers



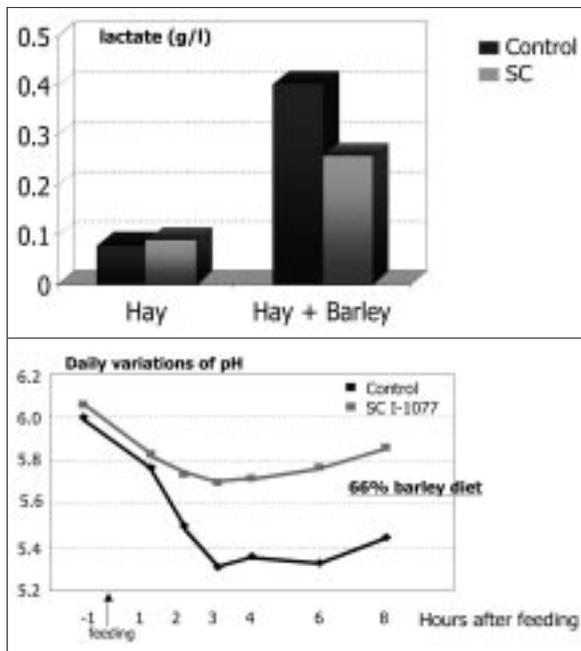
hin die Optimierung der Lebensbedingungen der Mikroorganismen im »Ökosystem Pansen« anzusehen. Dabei spielen bereits diskutierte Punkte wie die Höhe und Art der Nährstoffzufuhr, das Ausmaß und die Geschwindigkeit des ruminalen Nährstoffabbaues, die zeitliche Folge im Nährstoffabbau oder die physikalische Strukturierung des Futters eine entscheidende Rolle. Zukünftige Forschungsarbeiten sollten jedoch verstärkt als Messgröße die quantitativen Veränderungen der Mikroorganismenzusammensetzung miteinbeziehen, um daraus die Optimierung unmittelbar an den Mikroorganismen bzw. deren Enzymaktivitäten auszurichten. Erste Ansätze finden sich in einigen neueren Arbeiten (Schwarz 2003, Zverlov et al. 2003, Strobel et al. 2004). Gleichzeitig ist als weitere Zielvorstellung die genauere Quantifizierung der Syntheseleistung des »Ökosystems Pansen« anzudiskutieren, um bei Kenntnis der Syntheseleistung die Versorgungssituation des Wiederkäuer-Stoffwechsels bedarfsorientierter einzuschätzen. Natürlich dürfen die Zusammenhänge nicht zu simplifiziert gesehen werden, da sich weitere Abhängigkeiten z.B. mit der Höhe der Futteraufnahme bzw. der Passagerate ergeben.

Ein weiterer Ansatz, die Mikroorganismen-Zusammensetzung zu modifizieren, besteht in einer direkten Einbringung von einzelnen Mikroorganismen-Spezies

in den Pansen. Obwohl diese Herausforderung vielfach angenommen wurde, ist der Erfolg beim Wiederkäuer von wenigen Ausnahmen abgesehen, sehr bescheiden. Eine der wenigen Ausnahmen besteht in der erfolgreichen Etablierung von *B. fibrisolvens* zur Detoxifizierung von *Leucaena leucocephala* (Allison et al. 1983, Gregg et al. 1998). Auch der Übertragung von genetisch modifizierten Bakterien in ein künstliches Pensensystem oder in vivo werden derzeit aufgrund des kurzen Überlebenszeitraumes bzw. der geringen Überlebenschancen dieser Bakterien und wegen des insgesamt eher niedrigen positiven Leistungseffekts nur sehr geringe Chancen eingeräumt (Krause et al. 2003). Damit wird nochmals verdeutlicht, dass das »Ökosystem Pansen« insgesamt als ein sehr stabiles, robustes, gleichzeitig jedoch auch sehr adaptives Gesamtsystem anzusprechen ist. Mit dieser im Einzelfall sehr spezifischen Situation sind auch die Arbeiten zum Einsatz von Direct-fed-microbials (DFM), d.h. Arbeiten, die eine beständige, tägliche Zufuhr von Mikroorganismen über das Futter notwendig machen, konfrontiert. Dazu sollte unmittelbar eine Äußerung von Newbold (2003) wie folgt zitiert werden: » ... research on microbial feed additives for ruminants is often frustrating, because responses are small and often highly variable ...«.

Eine besondere Stellung nehmen jedoch Lebendhefen (z.B. *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus oryzae*) ein, die nach einer neueren Untersuchung in über 50 % aller amerikanischen Hochleistungsherden als Futterzusatzstoff eingesetzt werden. Dabei sind verschiedene Ansatzpunkte für den Wirkungsmechanismus in zahlreichen Arbeiten beschrieben. So dürfte durch eine sauerstoffverbrauchende Wirkung das Bakterienwachstum gefördert werden – möglicherweise verknüpft durch eine zusätzliche Substratlieferung. Weiterhin werden laktat-erarbeitende Bakterien (*M. elsdenii*, *S. ruminantium*) stimuliert, was zu einer Stabilisierung des ruminalen pH-Wertes führen kann (siehe Abb. 5). In der Folge sind wiederum günstigere Lebensbedingungen für die hemicelluloseabbauenden Bakterien gegeben. Insgesamt führt dies auch zu einer höheren duodenalen Mikrobenprote-

Abbildung 5: Laktatreduktion und pH-Verlauf im Pansen bei einer gerstenreichen Ration nach Zulage von *S. cerevisiae* (Michalet-Doreau und Morand, 1996)



inanflutung. Nähere Details und Literaturangaben dazu finden sich in einer neueren Übersichtsarbeit von Newbold (2003). So konnten auch Ettle und Schwarz (2002) bei frischlaktierenden Milchkühen (Laktationswoche 2/3 bis 9/10) einen positiven Effekt auf die Milchmenge und den Futterverzehr nach Zulage von *S. cerevisiae* beobachten (siehe Abb. 6 und 7). Allerdings waren die Fütterungsbedingungen geprägt durch eine im Vergleich zur Milchleistung deutlich zu geringe Futter- bzw. Energieaufnahme, wobei die Gesamtration gleichzeitig einen eher niedrigen Grundfutteranteil aufwies. Damit liegen möglicherweise spezifische Versorgungsbedingungen vor, die einen Leistungseffekt bei Zugabe von *S. cerevisiae* sichtbar machen. Van Vuuren (2003) hat aus 12 Publikationen die Ergebnisse von 22 Versuchen

Abbildung 6: Milchleistung nach Verabreichung von Lebendhefe (SC) bei frischlaktierenden Kühen (Ettle und Schwarz, 2002)

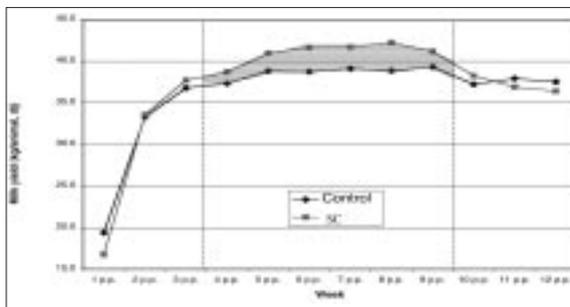
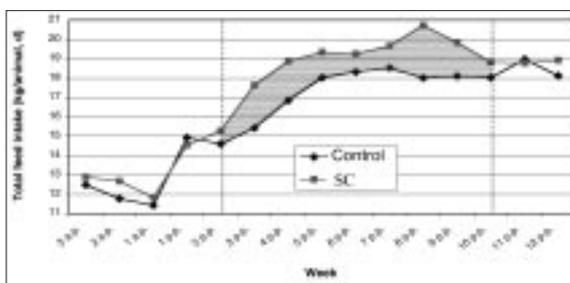


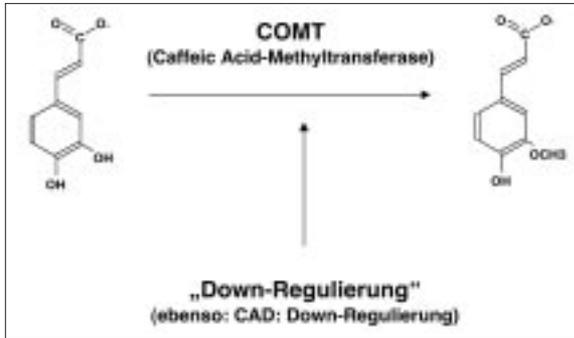
Abbildung 7: Futteraufnahme nach Verabreichung von Lebendhefe (SC) bei frischlaktierenden Kühen (Ettle und Schwarz, 2002)



zur Beeinflussung von Leistungsmerkmalen bei der Milchkuh nach Zulage von Lebendhefe zusammengestellt. Demnach deutet sich insgesamt eine Erhöhung der Milchleistung durch den Zusatz an, wobei jedoch eine enge, positive Interaktion zu stärkereichen, strukturarmeren Rationen zu erkennen ist. Damit kann dies als ein Beispiel dafür angesehen werden, dass eine »Wirkungssicherheit« mikrobieller Zusätze nur unter spezifischen Bedingungen vorliegen wird.

Anaerobe Pansenpilze sind an der gesamten Mikrobenmasse des Pansens quantitativ von geringerer Bedeutung. Allerdings ergibt sich eine sehr enge Abhängigkeit zur Zusammensetzung der Futterration bzw. zum Anteil an pflanzlichen Gerüstsubstanzen

Abbildung 8: Veränderte Enzymaktivität im Bereich der Lignifizierung bei Brown-midrib-Mutanten (bm<sub>3</sub>-Mais, bm<sub>6</sub>-Hirse)



und lignifiziertem Material im Futter. Pansenpilze sind hoch aktiv im Abbau kristalliner Cellulose, synergistisch zu Bakterien, da sie den Aufschluss pflanzlichen Materials vorbereiten und besitzen modulare Enzymsysteme im Hinblick auf Bakterien (Krause et al. 2003). Aufgrund der starken Substrat- und Milieuabhängigkeit erscheinen die Möglichkeiten einer gezielten Optimierung eher begrenzt. Allerdings liegen für eine Gesamtbeurteilung der tatsächlichen Bedeutung von anaeroben Pansenpilzen noch zu wenige Daten vor. Einzelergebnisse zeigen jedoch auch, dass bei einer gezielten, beständigen Applikation von anaeroben Pilzkulturen in den Pansen die Verdaulichkeit der Ration und die Anflutung flüchtiger Fettsäuren deutlich erhöht werden können (Lee et al. 2000).

Abschließend sollte bei der Thematik »Herausforderungen aus Sicht der Tierernährung« der Brücken-

Tabelle 4: In situ Abbaubarkeit und Futteraufnahme von Maissilage einer bm<sub>3</sub>-Mutante (Kurtz et al. 2004)

	Ruminale Abbaubarkeit (k = 0,08) (%)	Futteraufnahme (kg T/Tier, Tag)
„Normalvariante“	64,7	5,60
„bm <sub>3</sub> -Mutante“	71,1 (+9,9 %)*	6,28 (+12,1 %)*

\* Relative Veränderung

schlag zur Pflanzenzüchtung nicht vergessen werden. So könnte durch Bereitstellung von entsprechendem pflanzlichen Material, d.h. von Futterpflanzen, unter Einbeziehung der mikrobiologischen Erfordernisse die Substratversorgung im Pansen deutlich verbessert werden. Einer der wichtigsten, limitierenden Faktoren für den mikrobiellen Abbau im Pansen ist das Ausmaß der Lignifizierung pflanzlicher Zellwände. Diese Lignifizierung ist sehr heterogen, da die Höhe des Ligningehaltes und/oder die Vernetzungsstruktur (»cross-links«) die mikrobiellen Angriffsmöglichkeiten beeinflussen. Erweiterte Kenntnisse der Ligninbiosynthese (Whetten et al. 1998) eröffnen Chancen, durch eine Reduzierung bestimmter Enzymaktivitäten in die Synthese bis hin zu einer Minderung der Vernetzung einzugreifen. Erste Verdauungsversuche mit transgener Luzerne zeigen höhere in situ-Abbauraten gegenüber herkömmlicher Luzerne (Baucher et al. 1999). Allerdings sind seit langem in der Mais- und Hirsezüchtung Mutanten mit entsprechend veränderten Enzymaktivitäten im Bereich der Lignifizierung bekannt (siehe Abb. 8). Dieser bm<sub>3</sub>-Mais weist eine deutlich bessere ruminale Abbaubarkeit und bei Verfütterung an Wiederkäuer eine deutlich höhere Futteraufnahme auf (Kurtz et al. 2004, siehe Tab. 4). Auch wenn insbesondere bei den derzeitigen bm<sub>3</sub>-Mutanten der Masseertrag und die Standfestigkeit der Pflanzen noch nicht als optimal anzusehen sind,

Abbildung 9: Möglichkeiten und Herausforderungen für die Mikrobiologie



so sind hier doch zusätzliche, sehr vielversprechende Wege aufgezeigt, den mikrobiellen Erfolg im Pansen durch die verbesserte Substratbereitstellung signifikant zu erhöhen.

#### 4 Schlussbemerkungen

In Abb. 9 sind nochmals zusammenfassend die Möglichkeiten und Herausforderungen für die Mikrobiologie im Hinblick auf die Ernährung landwirtschaftlicher Nutztiere dargestellt. Dabei wird deutlich, dass sich sehr vielschichtige, gemeinsame Aufgabebereiche für Mikrobiologen und Ernährer ergeben. Damit verbindet sich der Wunsch einer stärkeren Einbindung der Mikrobiologie in die systemorientierte Ernährungsforschung. Die Tierernährung zeigt sich dabei als ein integratives Fachgebiet, das somit auch verstärkt mit Partnern aus den angesprochenen Disziplinen kooperieren muss.

#### Literaturverzeichnis

Allison, M.J., Cook, H.M. and Jones, R.J. (1983) Detoxification of 3-hydroxy-4(1H)-pyridone, the goitrogenic metabolite of mimosine, by rumen bacteria from Hawaiian goats. XVII Conference on Rumen Function, Chicago, IL

Baucher, M., M.A. Bernard-Vailhe, B. Chabbert, J.-M. Besle, C. Opsomer, M. Van Montagu and Botterman, J. (1999) Down-regulation of cinnamylalcohol dehydrogenase in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.) and the effect on lignin composition and digestibility. *Plant Molecular Biology*, 39, 437–447.

Beal, J.D., Niven, S.J., Campbell, A. and Brooks, P.H. (2002) The effect of temperature on the growth and persistence of *Salmonella* in fermented liquid pig feed. *Int. J. Food Microbiol.* 79, 99–104

Brooks, P.H., Beal, J.D., Demeckova, V. and Niven, S. (2003) Probiotics for pigs – and beyond. In: Van Vuuren, A.M. and B. Rochet (Eds.): Role of probiotics in animal nutrition and their link to the demands of European consumers. ID-Lelystad report 03/0002713, pp. 49–59

Buddington, R.K. (2001) The use of nondigestible oligosaccharides to manage the gastrointestinal ecosystem. In: Piva, A., Bach Knudsen, K.E. and Lindberg, J.E. (Eds.): Gut environment of pigs. Nottingham University Press, pp. 133–148

Demeckova, V., Kelly, D., Coutts, A.G.P., Brooks, P.H. and Campbell, A. (2002) The effect of fermented liquid feeding on the faecal microbiology and colostrums quality of farrowing sows. *Int. J. Food Microbiol.* 79, 85–97

Ettle, T. and Schwarz, F.J. (2002) Effect of yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*, *Levucell*) on performance of beef and dairy cattle. *Proc. Soc. Nutr. Physiol.* 11, 116.

Gregg, K., Hamdorf, B., Henderson, K., Kopečný, J. and Wong, C. (1998) Genetically modified ruminal bacteria protect sheep from fluoroacetate poisoning. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3496–3498.

Harmsen, H.J.M. and Welling, G.W. (2002) Fluorescence in situ hybridisation as a tool in intestinal bacteriology. In: Tannock, G.W. (Ed.): Probiotics and prebiotics: Where are we going? Caister Academic Press, pp. 41–58

Jochmann, K., Lebzién, P. und Flachowsky, G. (1998) Einfluss von Milchsäurebakterien als Siliermittel auf pansenphysiologische Parameter, die Verdaulichkeit der Silagen sowie Leistung von Milchkühen. *Übers. Tierernährg.* 26, 123–155

Krause, D.O., Denman, S.E., Mackie, R.I., Morrison, M., Rae, A.L., Attwood, G.T. and McSweeney, C.S. (2003) Opportunities to improve fiber degradation in the rumen: microbiology, ecology and genomics. *FEMS Microbiol. Reviews*, 27, 663–693.

Kung, L., Jr., Stokes, M.R. and Lin, C.J. (2003) Silage additives. In: Buxton, D.R., Muck, R.E. and Harrison, J.H. (Eds.): Silage science and technology. Amer. Soc. Agr., Crop Sci. Soc., Soil Sci. Soc., Agronomy Monograph no. 42, Madison, pp. 305–360

Kurtz, H., F. Flaßhoff and Schwarz, F.J. (2004) Effects of brown midrib 3 mutation in silage corn on ruminal degradability, digestibility and performance of beef cattle. *Proc. Soc. Nutr. Physiol.*, 13, 82.

Lee, S.S., Ha, J.K. and Cheng, K.-J. (2000) Influence of an anaerobic fungal culture administration on in vivo ruminal fermentation and nutrient digestion. *Anim. Feed Sci. Technol.* 88, 201–217.

Michalet-Doreau, B. and Morand, D. (1996) Effect of yeast culture, *Saccharomyces cerevisiae*, on ruminal fermentation during adaptation to high-concentration feeding. *Annales de Zootechnie*, 45, Suppl. 1, 337

Morein, B. and Ke-Fei Hu (2001) Microorganisms exert bioactive and protective effects through the innate immunessystem. In: Piva, A., Bach Knudsen, K.E. and Lindberg, J.E. (Eds.): Gut environment of pigs. Nottingham University Press, pp. 105–112

Nagel, M. (1997) Hygieneprobleme in flüssigen Futtermitteln. Hochschule Bremerhaven, pp. 1–10

Naughton, P.J. (2001): Lectin microbial interactions in the gut. In: Piva, A., Bach Knudsen, K.E. and Lindberg, J.E. (Eds.): Gut environment of pigs. Nottingham University Press, pp. 149–164

Newbold, C.J. (2003) Probiotics. Principles for use in ruminant nutrition. In: Van Vuuren, A.M. and B. Rochet (Eds.): Role of probiotics in animal nutrition and their link to the demands of European consumers. ID-Lelystad report 03/0002713, pp. 29–39

Salminen, S., Bonley, C., Bouton-Ruault, M.-C., Cummings, J.H., Franck, A., Gibson, G.R., Isolauri, E., Moreau, M.-C., Roberfroid, M. and Rowland, I. (1998): Functional food science and gastrointestinal physiology and function: *Brit. J. Nutr.* 80, Suppl. 1, S 147 – S 171

Scholten, R.H.J., Peet-Schwering van der, C.M.C., Hartog den, L.A., Balk, M., Schrama, J.W. and Verstegen, M.W.A. (2002) Fermented wheat in liquid diets: Effects on gastrointestinal characteristics in weanling piglets. *J. Anim. Sci.* 80, 1179–1186

- Schwarz, W.H. (2003) Das Cellulosom – Eine Nano-Maschine zum Abbau von Cellulose. *Naturwiss. Rundschau* 56, 121–128
- Simon, O. (2001) The influence of feed composition on protein metabolism in the gut. In: Piva, A., Bach Knudsen, K.E. and Lindberg, J.E. (Eds.): *Gut environment of pigs*. Nottingham University Press, pp. 63–84
- Sliwinski, H., Schuster, M., Krabisch, P., Rosenberger, E. und Schwarz, F.J. (2003) Untersuchungen zu Inhaltsstoffen und zur hygienischen Beschaffenheit von Pferdefuttermitteln. 115. VDLUFA-Kongress Saarbrücken, S. 99–100
- Steidlova, S. and Kalac, P. (2003) The effects of using lactic acid bacteria inoculants in maize silage on the formation of biogenic amines. *Arch. Anim. Nutr.* 57, 359–368
- Strobel, E., Wesolowski, J., Flachowsky, G. and Tebbe, C.C. (2004) Genetic profiles of rumen microbial communities: A cultivation independent technique to study the effect of feeding. *Proc. Soc. Nutr. Physiol.* 13, 81
- Tannock, G.W. (2002) Probiotics and prebiotics: Where are we going? In: Tannock, G.W. (Ed.): *Probiotics and prebiotics: Where are we going?* Caister Academic Press, pp. 1–40
- Van der Wolf, P.J., Bongers, J.H. Elbers, A.R.W., Franssen, F.M.M.C., Hunne-man, W.A., van Exsel, A.C.A. and Tielen, M.J.M. (1999) Salmonella infections in finishing pigs in The Netherlands: bacteriological herd prevalence, serogroup and antibiotic resistance of isolates and risk factors for infection. *Vet. Microbiol.* 67, 263–275
- Van Vuuren, A.M. (2003) Effect of live yeast on the performance of dairy cows: In: Van Vuuren, A.M. and B. Rochet (Eds.): *Role of probiotics in animal nutrition and their link to the demands of European consumers*. ID-Lelystad report 03/0002713, pp. 41–47
- Van Winsen, R.L., Lipman, L.J.A., Biesterveld, S., Urlings, B.A.P., Sniijders, J.M.A. and van Knapen, F. (2000) Mechanism of *Salmonella* reduction in fermented pig feed. *J. Sci. Food Agric.* 81, 342–346
- Whetten, R.W., MacKay, J.J. and Sederoff, R.R. (1998) Recent advances in understanding lignin biosynthesis. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49, 585–609
- Zverlov, V.V., Höll, W. and Schwarz, W.H. (2003) Enzymes for digestion of cellulose and other polysaccharides in the gut of longhorn beetle larvae, *Rhagium inquisitor* L. (Col. Cerambycidae). *Int. Biodet. Biodegr.* 51, 175–179

## Diskussion



MEYER

Sie haben anfangs ausgeführt, dass Mikroben bei einem Einsatz bei Mastkälbern keine oder kaum eine Wirkung haben. Könnten Sie das mal weiter erörtern, denn das ist ein Bereich, der wieder mehr auf sich aufmerksam macht, auch weil man hier neue Qualitätskriterien diskutiert.

SCHWARZ

Wenn ich das Kalb zitiert habe, habe ich im Wesentlichen das Aufzuchtkalb gemeint. Hier spielt der Probiotika-Einsatz ja eine entscheidende Rolle, und es ist auch den meisten Milchaustauschern ein Probiotikum zugesetzt. Die Frage ist, wie der Wirkungsnachweis erbracht wird. Wenn man das nur auf die Leistung projiziert, im Sinne von täglichen Zunahmen, dann hat man erhebliche Schwierigkeiten. Daher muss man, wie von Herrn Breves für das Schwein berichtet, andere Parameter suchen, diesen Wirkungsnachweis zu erbringen.

Das Mastkalb ist als Monogastrier ganz anders zu sehen, weil hier beim Einsatz großer Mengen an Milchprodukten oder Nebenprodukten der Probiotika-Einsatz nicht so aktuell zu sehen ist, im Vergleich zum Aufzuchtkalb. Dazu kann ich aber weniger sagen, weil ich mich mit dem Mastkalb nicht auseinandergesetzt habe.

LEIBETSEDER

Ich komme auf die Salmonellen zurück. Ich war erstaunt, dass beim pelletierten Futter doppelt so häufig

Salmonellen gefunden wurden als beim nicht pelletierten. Normalerweise würde man das Umgekehrte sehen. Ich glaube, dass hier andere Faktoren eher eine Rolle spielen als Pelletieren oder Nichtpelletieren. Hier sollte diesbezüglich kein falscher Eindruck entstehen.

SCHWARZ

Ich habe mich hier auf Zitate verlassen. Das ist nicht mein Arbeitsgebiet, aber es ist in der Literatur sehr gut beschrieben. Im Zusammenhang mit der Flüssigfütterung spielen zwei Faktoren eine Rolle in der Hemmung der Entwicklung der Salmonellen, nämlich die rasche pH-Absenkung, und eine gewisse Konzentration an Milchsäure, neben einer Temperaturabhängigkeit. Beim pelletierten Futter war das eher im Sinne einer Reinfektion zu sehen, dass durch die Erhitzung eine Abtötung erfolgt, aber dann eine rasche Reinfektion das Problem auslöst. So ist das zumindest beschrieben.

STEINHART

Du hast ja mehr die praktischen Aspekte beschrieben. Gibt es Daten, Untersuchungen, wie viel der dort eingesetzten Mikroorganismen den Magen und die oberen Abschnitte des Dünndarms lebend überstehen, und welche Spezies sind das? Gibt es da Spezies-Unterschiede und wie viele von diesen Mikroorganismen braucht man, um die beschriebenen Effekte erklären zu können?

SCHWARZ

Hier muss man differenzieren zwischen dem Monogastrier und dem Wiederkäuer. Wenn ich den Wiederkäuer als leichteres Beispiel bringe, dann haben wir ja die unmittelbare Einbringung in den Pansen. Hier brauchen wir keine weitere Schranke zu überwinden. Die Mengen sind, z.B. bei *Saccharomyces*, sehr unterschiedlich. In unserem Fall haben wir 4 g eingesetzt, also eine sehr geringe Menge.

Bei weiteren Produkten haben wir einen großen Schwankungsbereich in der Menge, die direkt und unmittelbar den Pansen erreicht. Beim Kalb oder beim Ferkel muss ich mich auf die Ausführungen vorausgegangener Redner berufen, nämlich dass Stämme ausgewählt werden, die schon darauf geprüft sind, die Magenschranke zu überwinden und das Zielorgan zu erreichen.

KALM

Sie haben die genetisch modifizierten Bakterien angesprochen und die ein bisschen zurückhaltend diskutiert. Wird die Forschung auf dem Gebiet gar nicht weiter vorangetrieben? Innerhalb einer Spezies existieren Unterschiede, beispielsweise bei Schafen, wenn wir Fleischschafe mit Heidschnucken vergleichen. Da haben wir ein Fütterungs-Experiment gemacht mit 50 % Bagasse in der Ration. Die Fleischschafe haben nachher gar nichts zugenommen, während die Heidschnucken immer noch 100–150 g/Tag zugenommen haben. Die konnten das also aufschließen. Diese Variabilität könnte man doch vielleicht in irgendeiner Form nutzen. Wie sehen Sie das?

SCHWARZ

Die Bearbeitung gentechnisch modifizierter Bakterien erfolgt, wenn, dann am Ehesten in USA und Australien. Das sind die Standorte, wo man sich etwas näher damit beschäftigt. Europa ist sicher sehr zurückhaltend. In unserem engeren Bereich wüsste ich keine Arbeitsgruppe, die sehr intensiv darüber arbeitet.

Bei der Nutzung der von Ihnen angesprochenen Variabilität sind wir bei einem Kernproblem, nämlich

dass wir über die Mikrobenpopulationen zu wenig wissen, um sie tatsächlich ausschöpfen zu können in ihrer Bedeutung für die Nährstoffversorgung. Wenn z.B. die Heidschnucken solche Bakterien hätten, könnten wir die dann ohne Weiteres auf Fleischschafe übertragen? Andere Bakterien zu installieren, ist ein großes Problem, weil das System so stabil ist. Ich sehe da eher die Möglichkeit, das innerhalb der Spezies und in Verbindung mit der Nährstofflieferung zu optimieren.

BREVES

Vielleicht darf ich einen Punkt noch ergänzen zu dem, was Sie angesprochen haben, Herr Kalm. Dieses Beispiel berührt die Adaptationsfähigkeit des Gastrointestinaltraktes in Abhängigkeit von der Rasse. In unterschiedlichen älteren Untersuchungen wurde für Heidschnucken gezeigt, dass die physiologischen Adaptationsmechanismen, mit extrem rohfaserreichen Rationen fertig zu werden, klare Vorteile aufweisen gegenüber Schafrassen, die züchterisch relativ intensiv bearbeitet worden sind. Man kann im Umkehrschluss folgern, das durch züchterische Maßnahmen auch physiologische Prozesse der Adaptation an veränderte Ernährungsbedingungen verloren gehen. Auch daraus ergeben sich relevante Optionen.

Herr Schwarz, Sie haben im Zusammenhang mit den Starterkulturen, also mit den Milchsäurebakterien, auf günstige Effekte auf die Proliferation der Mucosa hingewiesen. Können Sie sagen, wie das gemessen worden ist?

SCHWARZ

Es wurde im Prinzip die gesamte Entwicklung des Gastrointestinaltraktes der Ferkel, unter Anderem das Villus-Krypten-Verhältnis, überprüft, und aus den Ergebnissen auf positive Effekte auf die Oberfläche geschlossen. Die damit verbundene allgemeine Aussage habe ich übernommen.

BREVES

Also, wenn ich das richtig verstehe, ist praktisch die Schleimhautarchitektur genauer histomorphome-

trisch untersucht worden. Da muss man natürlich sehr vorsichtig sein, was das letztendlich wirklich bedeutet, weil sowohl die Proliferation wie auch eine Veränderung der Apoptose-Rate mit eingehen kann.

STEINHART

Du hast gesagt, man könnte auch das Substrat so verbessern, dass z.B. die Crosslinks weniger werden und damit der Aufschluss schon natürlicherweise erfolgt. Wenn man so etwas gentechnisch verändert, macht man starke Eingriffe in den Isoprenstoffwechsel, das ist ja die Ausgangssituation von allen diesen Crosslinkern. Ist denn schon was bekannt, ob da nicht möglicherweise an ganz anderen Stellen Schäden gesetzt werden? Diese Biochemie ist auf Pflanzen beschränkt und aus dieser Chemie entstehen ja nun eine ganze Reihe von Substanzzweigen, die möglicherweise essenziell sind für den gesamten Stoffwechsel. Ich wäre da ein bisschen skeptisch, wenn ich in die Isoprenchemie eingreifen würde. Gibt es da irgendwas, das diese Mais-Macken hat?

SCHWARZ

Ich kann nicht in die Isoprenchemie einsteigen, aber ich kann auf Grund der Erfahrung im Anbau dieser Produkte sagen, dass bei der Vernetzung die Problematik der Standfestigkeit der Pflanzen hier im Vordergrund des Interesses steht. Derzeitig ist auch die Ertragslage noch nicht befriedigend. Wir haben bei eigenem Anbau von BM3-Mais etwa 30% geringere Erträge gehabt, und die Pflanzen waren auch in der Chlorophyllausprägung sehr stark beeinflusst. Diese BM3-Gruppen haben nahezu gelb ausgeschaut vergleichsweise zu der gleichen Sorte, einem Helix-Typ, der normal ausgeprägt war. Aber trotzdem könnte das eine Alternative sein, und es wird sehr intensiv daran gearbeitet. In der normalen Züchtung nutzt man natürlich ähnliche Richtungen.

STEINHART

Wenn ich das noch ergänzen darf, das ist ja genau diese Isopren-Terpenoid-Schiene, die da verändert wird. Ich würde von der Theorie erwarten, dass alles

Mögliche passieren kann. Hast Du ja auch damit bestätigt.

PAHLOW

Ein kurzer Kommentar zur Gestaltung von Negativkontrollen, um Unterschiede zu zeigen, bei denen es manchmal schwer fällt. Es klang beinahe wie ein Rechtfertigungsbedarf, wenn von einem Futter berichtet wurde, dass nach der Behandlung für 2 Tage zwischengelagert wurde. Ich kann mir durchaus Betriebe vorstellen, die Freitag entnommenes Futter gern bis ins Wochenende hinein verbrauchen wollen, um dann zu sehen, dass die Maßnahme etwas gefruchtet hat. Dieselbe Frage tat sich auf im Hinblick auf unsere Prüfbedingungen für Siliermittel, die Stabilität verbessern oder Gärverläufe beeinflussen sollen. Hier müssen wir einfach davon Abstand nehmen, unsere allzu idealen Bedingungen bei dem kleinen Maßstab mit schnellerem Arbeiten so zu wählen, dass plötzlich eine Kontrolle optimal da steht. Dann ist es praktisch ausgeschlossen, ein Potenzial eines Zusatzmittels zu zeigen, das dort Verbesserungen bringt. Wir sind als Versuchsansteller gezwungen, uns nicht zu weit von der Praxis zu entfernen, wenn wir Problemlösungen erproben wollen, die Schwierigkeiten beseitigen können.

ZENTEK

Ich fand Ihre Beobachtungen zu den Futteraufnahmen der Milchkühe bei Fütterung der Lebendhefe interessant. Konnten Sie sich Unterschiede in der Pansenfermentation anschauen, oder wie würden Sie den Effekt erklären?

SCHWARZ

Wir haben keine näheren pansenphysiologischen Untersuchungen oder Fermentationsuntersuchungen gemacht, sondern ich würde das aus den Literaturdaten interpretieren. Aber wir haben auch Lebendhefe bei wachsenden Tieren, also in der Mast eingesetzt, hatten hier auch positive Effekte und haben markergestützte Verdaulichkeitsversuche dazu gemacht. Wir konnten zeigen, dass die Rohfaser bei einer sehr

kraftfutterreichen Ration, die Verdaulichkeit der Faser war in einem Bereich von 50 %, eine um 10 % höhere Faser-Verdaulichkeit durch den Einsatz von Lebendhefen erfährt. Das würde diese verbesserten Fermentationsbedingungen im Pansen beschreiben.

#### BREVES

Als gängiges Konzept können wir wohl davon ausgehen, dass bei rohfasernarmen oder kraftfutterreichen Rationen durch die Sauerstoffverwertung eine direkte oder indirekte Begünstigung der Zellulose verdauenden Bakterien erreicht wird, und so vielleicht gewisse Effekte erklärbar sind, in aller Vorsicht.

#### PETERSEN

Sie hatten in einem Bild die DLG-Gütezeichen-Arbeit zitiert und zum Beispiel auch zur Bewertung der Siliermittel darauf hingewiesen, dass man dort Tierleistungen mit herausstellt. Nun haben wir zukünftig ja die Silierzusatzstoffe als technologische Zusatzstoffe definiert. Halten Sie es für sinnvoll, bei der Bewertung solche Sekundäreffekte herauszustellen,

und wie soll man das reproduzierbar im Zulassungsmodell umsetzen?

#### SCHWARZ

Ich beginne bei der Umsetzung und gehe dann auf die Sinnhaftigkeit ein. Die Umsetzung könnte genau so erfolgen wie ein Wirkungsnachweis bei Probiotika oder sonstigen Zusatzstoffen. Also der Wirkungsnachweis wäre ganz klassisch zu erbringen. Zur Sinnhaftigkeit muss man verstehen, warum diese Wirkungsrichtung hier mit aufgenommen wurde, weil der Landwirt hinterfragt, ob er über die reine Gärqualität hinaus einen weiteren Erfolg verbucht. Natürlich hat er zunächst den Erfolg, dass der Trockenmasse-Verlust verringert ist, aber das sieht er nicht. Er will eine höhere Futteraufnahme, eine bessere Leistung sehen. Deshalb ist diese Wirkungsrichtung mit aufgenommen. Wenn ich die Sinnhaftigkeit nehme, dann meine ich, muss das nicht im Rahmen der neuen Zulassung enthalten sein, sondern es ist eigentlich ein zusätzlich beschreibendes Merkmal, das natürlich den Einsatz positiv beeinflusst.

# Über das Wachstum von Mikroorganismen\*



Ich bedanke mich für die Einladung, hier über das Wachstum von Mikroorganismen zu reden, natürlich aus der Sicht des Ingenieurs. Es werden sich hoffentlich einige gemeinsame Interessen ergeben.

Ich möchte erstmal erklären, über was ich reden werde:

1. Wachstum in Membranreaktoren
2. Quorum Sensing
3. Flowcytometrie
4. Mathematische Modellbildung

Wenn man Mikroorganismen züchtet, dann nimmt man z.B. einen Schüttelkolben oder einen Bioreaktor, tut Substrat rein und impft an. Dann wachsen die Organismen, bis das Substrat verbraucht ist, und dann hört das Wachstum auf. Das nennt man Batch-Kultur.

In der Technik möchte man in der Regel höhere Organismen-Dichten, und deswegen macht man es so, dass man auch Substrat vorlegt, animpft, und wenn das Substrat verbraucht ist, füttert man nach. Das nennt man Fedbatch-Kultur, und zwar füttert man mit hoch konzentrierten Nährmedien nach, damit das Volumen nicht gleich mit steigt und das wieder verdünnt. Interessanterweise ist es so, dass die Organismen hoch wachsen, aber obwohl Substrat da ist, hören sie zu wachsen auf. Dieser Punkt ist technisch sehr wichtig. Wir wissen nicht, warum die aufhören und wie man das beeinflussen kann.

\* nach Tonbandaufzeichnung angefertigt.

Wenn man Mikroorganismen in Membran-Reaktoren züchtet, kann man diese Bremse, die ich noch nicht genau definieren kann, lockern. Ich werde über das Thema »Quorum Sensing« reden, dann eigene Arbeiten über Flowcytometrie vorstellen, wo man auch sehen kann, was passiert, wenn Mikroorganismen zu wachsen aufhören. Weil die Ingenieure gerne versuchen, über mathematische Strukturen den Dingen näher zu kommen, werde ich abschließend über mathematische Modellbildung berichten.

## 1. Wachstum in Membranreaktoren

Das ist so ein Bioreaktor, ein Dialyse-Reaktor, beziehungsweise ein Membran-Reaktor, den habe ich vor einigen Jahren entwickelt. Das ist so ein 10 Liter-Laborreaktor. Die Außenwand ist eine Polyamidfolie, und die Wand des Innenreaktors ist eine Membran. Dieser Apparat wird in Serie gebaut und ist mittlerweile weltweit verbreitet (Abbildung 1).

Die Funktion ist so, dass man einen Außenbereich mit einer Röhre drin hat, und einen Innenbereich, auch mit einer Röhre, und eine Membran. Wenn hier Mikroorganismen wachsen, dann können zum Beispiel Stoffe mit einem kleinen Molekulargewicht nach außen weggehen. Möglicherweise sind es solche, die inhibieren. Man kann diesen Außenbereich auch noch austauschen, so dass man ein großes Potenzial für die Dialyse hat (Abbildung 2).

Das System ähnelt einem Kuhmagen oder Verdauungstrakt, wo man auch über eine Membran Stoffe

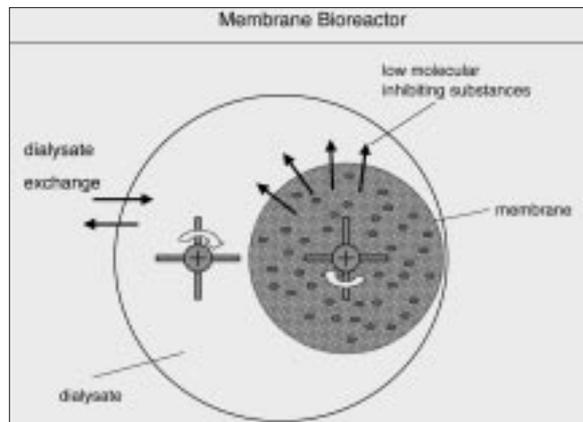
abzieht. Man kann auch über die Membran füttern, zum Beispiel, wenn man innen ein Enzym produziert, und man nicht will, dass sich das miteinander vermischt, weil man hinterher das Enzym nicht so leicht von anderen Komponenten trennen kann, dann kann man über die Membran füttern.

Mit diesem Apparat wird z.B. in Südafrika Botulinum-Toxin produziert für veterinärmedizinische Zwecke, und da sind 10 Liter schon Produktionsmaßstab.

Abbildung 1: Dialysis Reactor (Bioengineering, CH Wald)



Abbildung 2

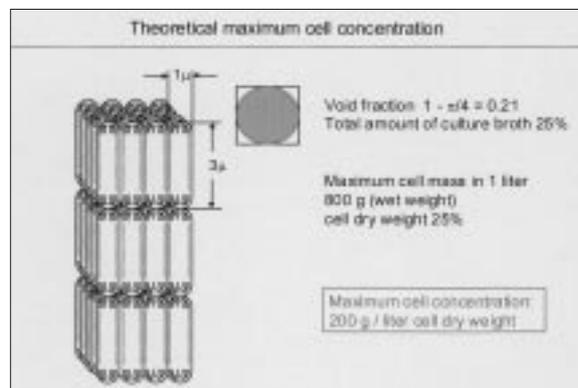


Wir haben bald herausgefunden, dass man mit diesem Reaktor diese Wachstumsbremse wegnehmen, also in Richtung hoch zelldichter Kulturen gehen kann. Für hoch zeldichte Kulturen kann man sagen, eine Größenordnung von 200 g/Liter müsste so die obere Grenze sein (Abbildung 3).

Bei dieser Fermentation sieht man, dass man zu Größenordnungen von 170 g, 180 g, kommt. Das ist eines meiner Lieblingsbilder, weil das die erste E-coli-Fermentation war, die wir mit diesem Apparat gemacht haben. Mittlerweile haben wir auch noch Fermentationen, wo wir ein bisschen höher kommen. Diese Kurve ist ein mathematisches Modell. Wir haben über die Membran gefüttert, und, um dieses richtig zu machen, kann man sich mathematischer Modelle bedienen. Wir haben also über ein mathematisches Modell vorausberechnet, wie man den Apparat füttern muss, bevor wir das Experiment gemacht haben (Abbildung 4).

Man kann in unterschiedlichen Maßstäben arbeiten. Im hier gezeigten Beispiel wird ein 2 Liter-Reaktor mit einem 300 Liter-Reaktor verglichen. Das ist jetzt E-coli, ein rekombinanter Industriestamm. Da geht man nicht auf so hohe Zell-Trockengewichte, aber immerhin auf 100 g/Liter. Die Dichte ist so ungefähr um den Faktor 2 höher als es in konven-

Abbildung 3



tionellen Reaktoren gemacht wird, aber die Proteinproduktion, ein wichtiges pharmazeutisches Protein, wird  $3\frac{1}{2}$  mal so groß. Man sieht also ein Potenzial für die Produktion mit rekombinanten Organismen (Abbildung 5).

Ich komme jetzt auf einen anderen Organismus zu sprechen, nämlich *Pyrococcus furiosus*. Übrigens kann der sehr gut Polymere abbauen, da kann man auch noch mal drüber reden. Sie müssten allerdings die Kühe auf  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  oder  $90\text{ }^{\circ}\text{C}$  bringen. Aber diese

Abbildung 4

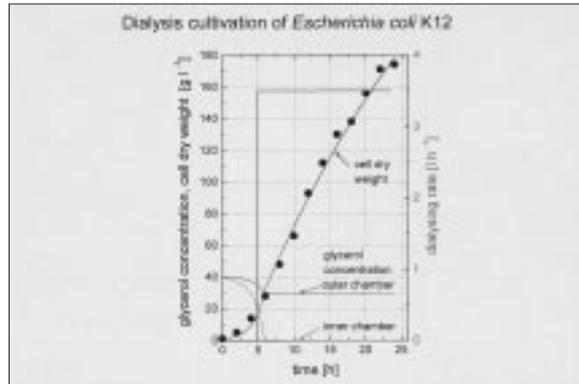
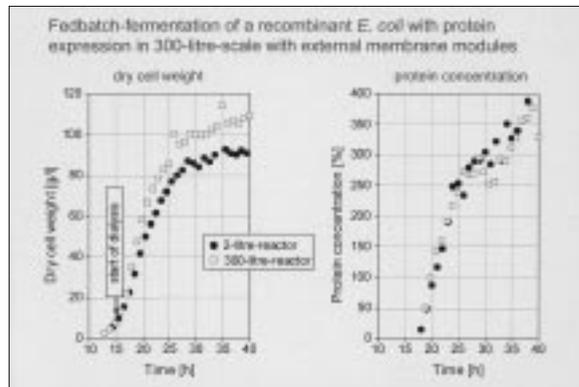


Abbildung 5

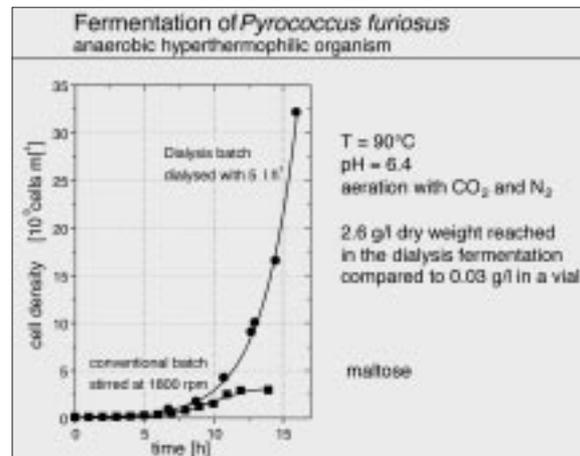


Organismen haben ein sehr hohes Potenzial, Stroh und so etwas zu verdauen. Der Organismus baut zum Beispiel Maltose ab und macht  $\text{CO}_2$ , organische Säuren, Biomasse, und auch noch Wasserstoff. Man muss allerdings mit Stickstoff drücken, damit der Wasserstoff rausgeht. Ich zeige Ihnen jetzt, wie der im Membranreaktor wächst. Gemessen an den besten Werten, die man in einer normalen Kultur kriegt, ohne Membran, sind die Ergebnisse mit einer Membran wesentlich besser. Allerdings sind das auch hier erst  $2,6\text{ g/Liter}$  gegenüber  $0,03\text{ g/Liter}$ . Es ist so, dass diese Organismen nicht so leicht wachsen, aber man kann ein bisschen was machen (Abbildung 6).

Ich zeige Ihnen noch zwei andere Extremophile. Das ist *Sulfolobus*, das betrifft eine Kooperation mit Ladenstein in Stockholm und Mario de Rosa in Nepal. Es ist die beste Fedbatch-Kultur, die wir damals hatten, und mit Membranen kommt man in dem Fall schon über  $100\text{ g/Liter}$ . *Sulfolobus* wächst bei  $\text{pH } 3,5$  und  $75\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Abbildung 7).

Und dann habe ich noch ein Beispiel, einen Mikroorganismus, der bei hohen Salzgehalten wächst, bei  $100\text{ g Natriumchlorid/Liter}$ . Er macht Ectoin, das ist mittlerweile auch industriell wichtig. Das ist eine Ko-

Abbildung 6



operation mit Galinski, und da sieht man auch diese deutliche Verbesserung (Abbildung 8).

Nun könnte man sagen, eigentlich haben wir ja eine Lösung mit diesen Membranen, aber das ist so doch keine gute Lösung. Das ist nämlich technisch sehr komplex und kompliziert, und man braucht große Mengen von dieser Dialyseflüssigkeit. Eigent-

Abbildung 7

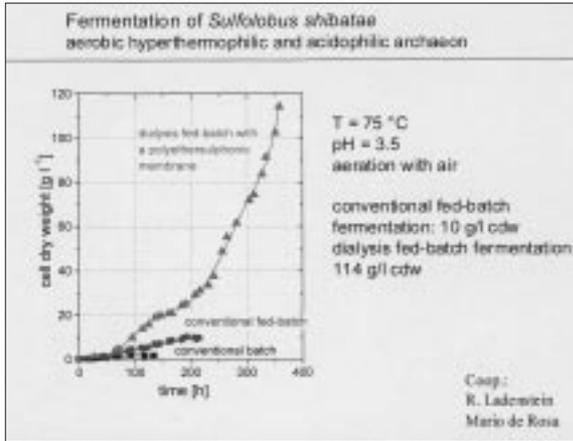
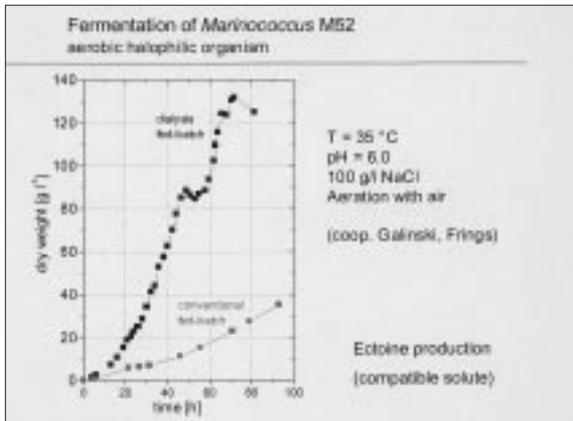


Abbildung 8



lich müsste man wissen, was man da dialysiert, dann könnte man vielleicht auch gezielte Methoden entwickeln mit Absorbieren oder so etwas. Und deswegen versuchen wir seit einiger Zeit, herauszufinden, was da im Detail passiert bei unseren Reaktoren, um dieses Wissen technisch zu nutzen.

## 2. Quorum Sensing

Quorum Sensing ist die Möglichkeit der Mikroorganismen, zu kommunizieren. Eventuell finden sie auch darüber raus, wie dicht sie sind, und man sieht, dass in den letzten Jahren da sehr viel publiziert wurde. Mittlerweile gibt's in Pubmed 718 Treffer. Also sehr viele Leute interessieren sich dafür, hauptsächlich aus dem Gebiet der Medizin (Abbildung 9).

Wir haben uns im Wesentlichen für E-coli interessiert. Bei Extremophilen findet man noch gar nichts, aber bei E-coli-Stämmen kann man z.B. durch Zugabe von Indol den Aminosäurestoffwechsel beeinflussen. Autoinducer 2, wesentlicher Teil davon ist Methylhydroxyfuranon, ändert nach Zugabe einen großen Teil des Genoms, das aktiviert oder angesteuert wird. Man weiß aber noch nicht, was das alles dann im Endeffekt bedeutet (Abbildung 10).

Das Problem ist bei diesen Untersuchungen, soweit wir das anwenden wollen, dass wir andere Stämme ha-

Abbildung 9

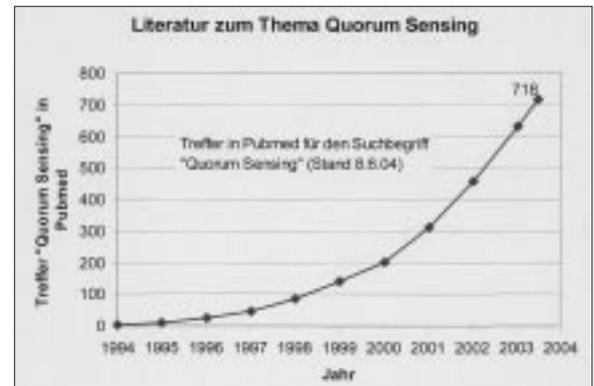


Abbildung 10

	<i>E. coli</i> 37°C, gram negativ		
	DH5α	MG 1683	MG 1683
Strain	Info	Methylophilum	Dimethylchloracetat
Wirkung	117	114	50
Konzentration [g/L]	20	0,8	0,8
Medium	Komplexmedium	Komplexmedium	Komplexmedium
Zellgröße [μm]	1,2	0,8	0,8
Autor	Wang et al. J Biol July 2001 & 4115-4218	Winder et al. Microbiol Sep 1988 169:483-492	Delisa et al. J Biol Sep 2001 & 3239-3247

Eigene Arbeit

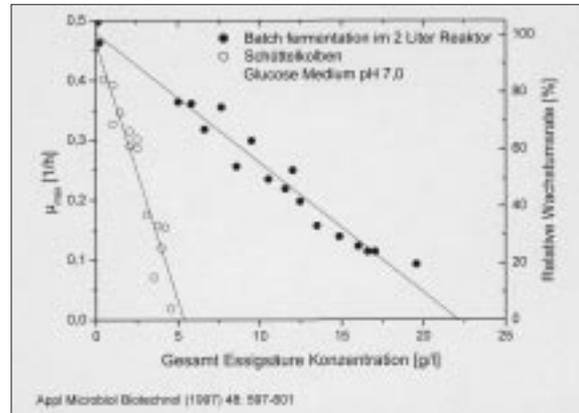
*E. coli*, rekombinante Industriestamm, 37°C, Minimalmedium, Zellgröße 0,8 μm, (Folbach), keine Informationen  
*E. coli* W3110 (Wildtyp), 37°C, Minimalmedium, Zellgröße 0,8 μm, (Folbach), keine Informationen  
*Pyrococcus furiosus* (Wildtyp), 90°C, Archaen, Komplexmedium, Zellgröße 1 μm, keine Informationen

ben. Wir interessieren uns zum Beispiel für einen Industriestamm und einen E-coli-Wildtyp, der sich auch von denen unterscheidet. Aber der wesentliche Unterschied ist, dass wir bei ganz anderen Zelldichten arbeiten. Also bei uns spielen erst Zelldichten über 60 g/Liter eine Rolle, und hier sind es 0,2 g/Liter.

Dann arbeiten die Versuchsansteller in der Regel im Schüttelkolben, und ich werde Ihnen gleich zeigen, das ist auch ein Riesenunterschied. Und, was noch stärker einschlägt, ist, dass die Mediziner oder Mikrobiologen, woher die Arbeiten stammen, in der Regel mit Komplex-Medium arbeiten. In der Industrie werden ausschließlich Minimalmedien genommen, also Medien, die rein nur aus Salzen bestehen und einer ganz genau definierten Kohlenstoffquelle.

Ich zeige Ihnen gleich, wo da die Unterschiede liegen. Essigsäure hemmt natürlich auch, und Essigsäure wird in der Endphase, wenn das Wachstum der Mikroorganismen aufhört, auch gebildet. Deshalb hat man am Anfang gedacht, Essigsäure spielt schon bei kleinen Essigsäurekonzentrationen sehr stark gehemmt, aber im Fermenter ist das wesentlich abgemildert. Die Konzentrationen, die da tatsächlich auftreten, sind so in Größenordnungen um 5 bis 6 g/Liter, und man sieht, ein bisschen hemmt das schon, aber das ist nicht der Punkt, warum das abgeschaltet wird (Abbildung 11). Wir wissen nicht, warum das so unterschiedlich ist, und das ist auch eine Frage, die wir noch weiter verfolgen wollen.

Abbildung 11



### 3. Flowcytometrie

Eine Möglichkeit, sich anzuschauen, was das ist, ist Flowcytometrie. Hier haben wir das bei einer normalen Batch-Fermentation. Das ist auch ein Industriestamm, der macht ein Protein und wächst auch ohne Membran auf etwa 40 g/Liter. Wir haben in den verschiedenen Phasen Proben genommen und im Flowcytometer angesehen. Man sieht, mit zuneh-

Abbildung 12

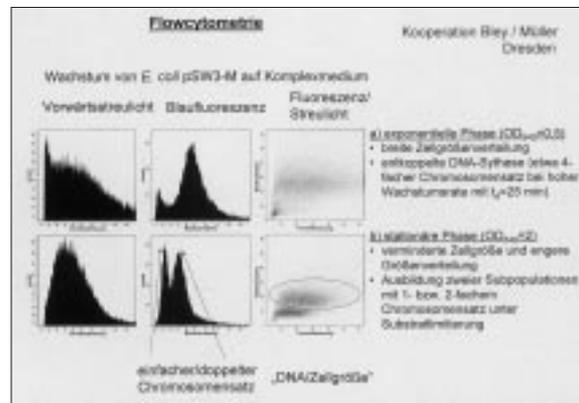


Abbildung 13

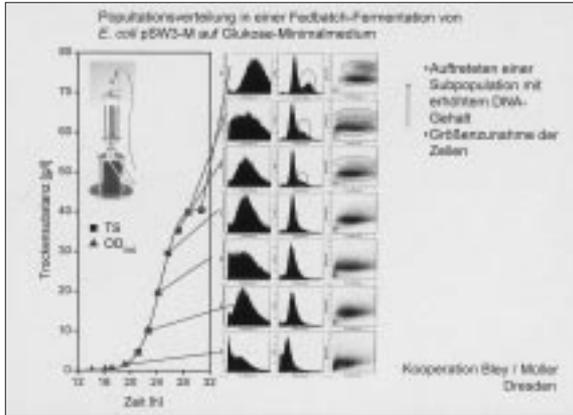
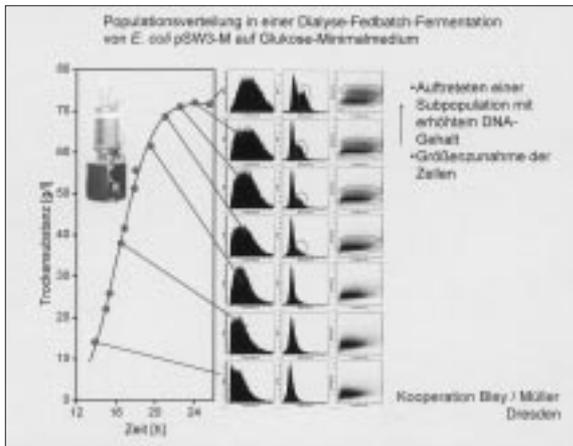


Abbildung 14



mentem Alter nimmt die Zellgröße dramatisch zu, verdoppelt sich mehr oder weniger im Durchmesser. Das heißt aber, dass das Volumen um den Faktor 8, oder so etwas, zunimmt. Auch der DNA-Gehalt wird immer mehr. Das heißt: Der Stoffwechsel des Organismus geht weiter. Er wird immer größer, dicker, aber er kann sich offenbar nicht teilen. Auch die DNA-Synthese geht weiter, und das Einzige, was

nicht funktioniert, ist die Zellteilung. Das ist sogar noch stärker ausgeprägt, wenn man das im Membranfermenter macht, nur bei höherem Niveau.

Und im Schüttelkolben und mit Vollmedium ist offenbar die DNA-Synthese komplett entkoppelt von der Teilung. Erst in der Phase, wo die Kohlenstoffquelle zurückgeht, also nicht nachgefüttert wird, erst dann fängt er an, die Größe etwas zurückzunehmen. Die Verhältnisse sind also im Schüttelkolben komplett anders, als bei einer Fedbatch-Kultur. Und deswegen ist es sehr schwer, aus diesen Schüttelkolbenexperimenten zu sagen, was bei einer Fedbatchkultur passiert (Abbildung 12, 13, 14).

#### 4. Mathematische Modellbildung: E-coli

Jetzt noch zur mathematischen Modellierung. Mit dieser mathematisch definierten Voraussage kann ich Voraussagen für das Verhalten des Systems machen, und das kann man im Experiment überprüfen.

Das führt natürlich dazu, dass man das, was nicht den Voraussagen entspricht, in einer zweiten Hypothese formuliert, und dann kann man das Ganze weiter machen. Wenn die Experimente die erforderliche hohe Qualität haben, wird man mit der Zeit auch etwas dazulernen (Abbildung 15).

Für den Substratverbrauch ist das so aufgebaut, dass wir das Substrat messen, und dann die Kinetik

Abbildung 15

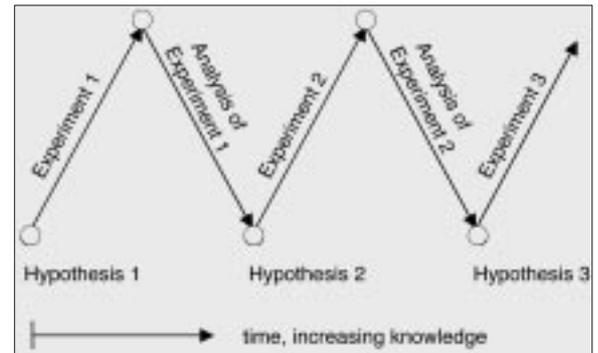
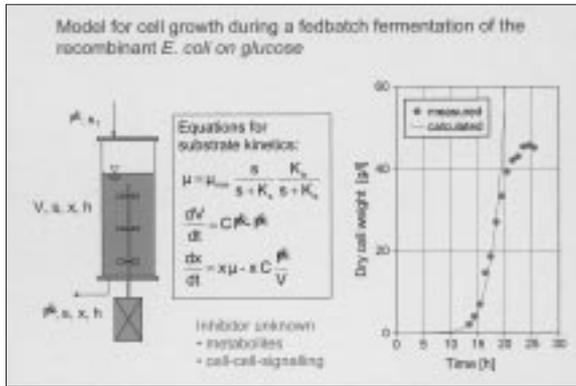
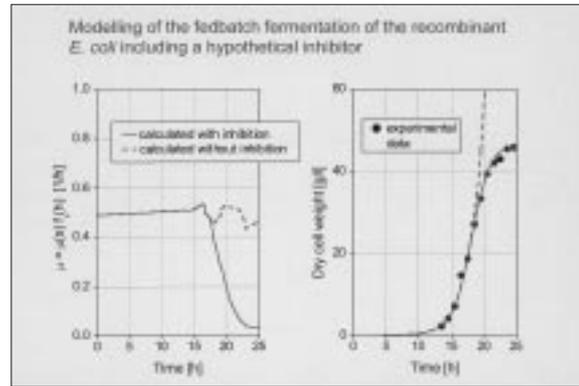


Abbildung 16



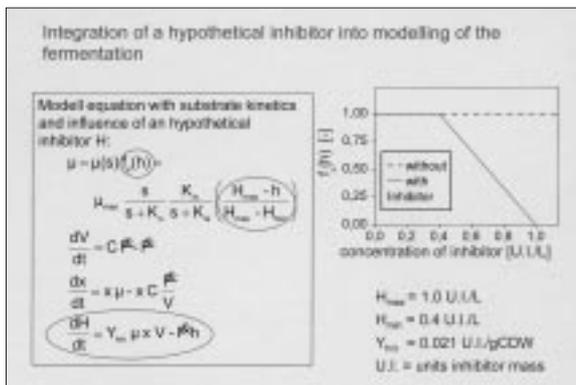
berechnen. Die Kinetik ist, wie das Wachstum, abhängig von der Substratkonzentration. Die Substratkonzentration kann ich messen und muss noch sehen, wie sich das Volumen verändert. Eine Rolle spielen auch die Fütterung, Probenahmen, das Wachstum von Mikroorganismen, die Verdünnung durch das Fedbatch. Das alles kann man im Modell berücksichtigen. Also im Endeffekt sieht man, eine Linie ist das, was man rechnet, und dem wird gegenübergestellt, was man beobachtet (Abbildung 16).

Abbildung 18



Man nimmt einen Hemm-Ansatz dazu, da ist ein hypothetischer Stoff, der hemmt. Hemmkurven sind, so dass bei sehr kleiner Konzentration in der Regel nichts passiert, und bei bestimmten Konzentrationen hat man die komplette Hemmung. Das ist ein hypothetischer Ansatz, den man damit einführt. Man kann das mathematisch beschreiben, nur ist die Frage dann hinterher, ob man Voraussagen damit machen kann, die tragfähig sind. Aber die kann man machen, und man kann jetzt auch eine zumindest hypothetische Hemmstoffkonzentration rechnen (Abbildung 17, 18).

Abbildung 17



Ich kann jetzt das Ganze auch noch auf diesen Membran-Reaktor transformieren, da treten zusätzliche Ströme über die Membran auf, die man mathematisch formulieren und berücksichtigen kann. Und dann kann man jetzt auch Voraussagen über diesen Reaktor machen. Da haben wir eine Fermentation, das ist gemessen, und haben jetzt drei Rechnungen. Eine Membran ist gar nicht durchlässig, und dann schaltet das natürlich sehr schnell ab, weil der Hemmstoff das hemmt. Eine andere Membran hat eine hohe Durchlässigkeit der Membran, und wir haben eine weitere genommen durch Anpassung, die gerade das am besten beschreibt (Abbildung 19, 20).

Die Membranpermeabilität kann man in Verbindung bringen mit der Molekülgröße. Nach entspre-

Abbildung 19

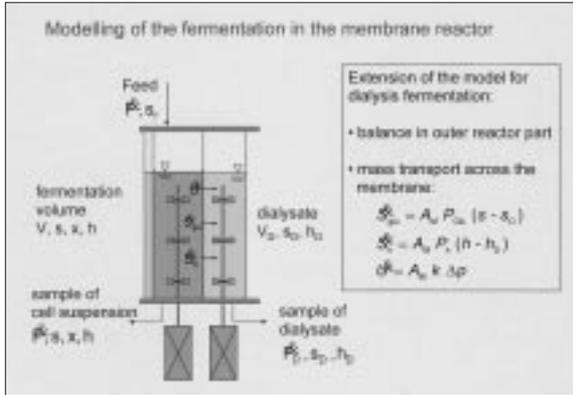


Abbildung 21

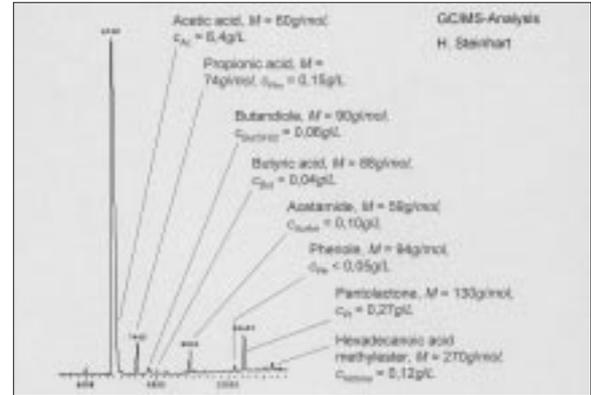


Abbildung 20

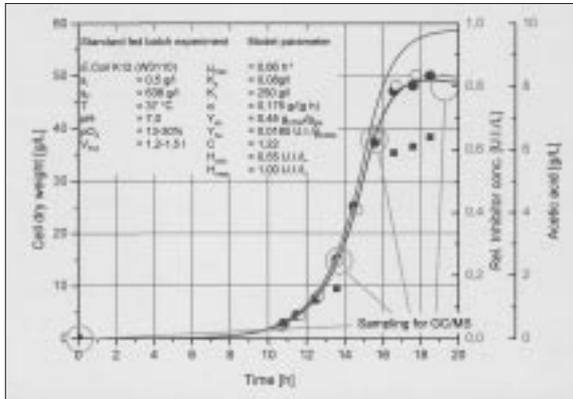
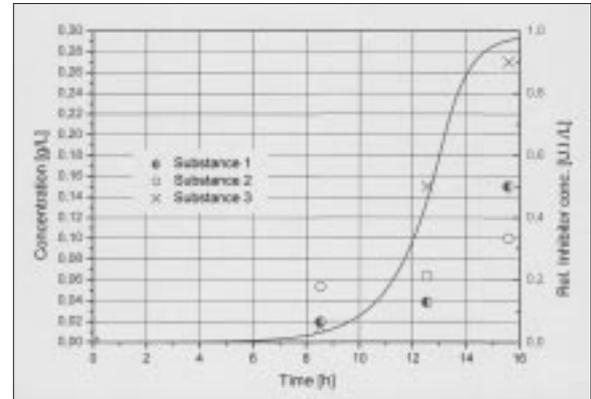


Abbildung 22



chenden Analysen, die in Kooperation mit Herrn Steinhart durchgeführt wurden, haben wir uns auf Stoffe mit Molekülgrößen von etwa 90-130 Dalton spezialisiert. Ein gemessener Stoff folgt der hypothetischen Linie der Inhibitor-Konzentration sehr gut. Zwei andere zeigen eine völlig andere Charakteristik (Abbildung 21, 22).

Man sieht, dass man sich mit mathematischen Modellen Hinweise erarbeiten kann, die dann auch zu tragfähigen Ergebnissen führen.

#### 4.1 Mathematische Modellbildung: Pyrococcus

Zum Schluss zeige ich beim Pyrococcus noch einen sehr interessanten Effekt. Ich habe ja gezeigt, dass man den mit einer Membran zu hohen Dichten kriegt. Wenn man den also im normalen Batch kultiviert, dann wächst er wahnsinnig schnell. Innerhalb von Stunden ist der dann ganz oben. Wenn das Substrat zu Ende ist, bricht das Ganze zusammen. Wir hatten ursprünglich schon an Viren und alles Mögliche gedacht und konnten uns das nicht erklären. Es

Abbildung 23

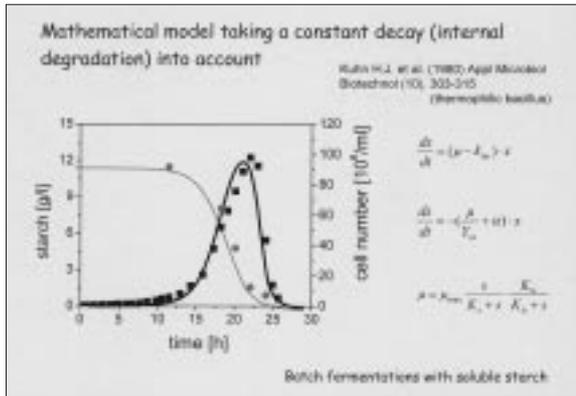
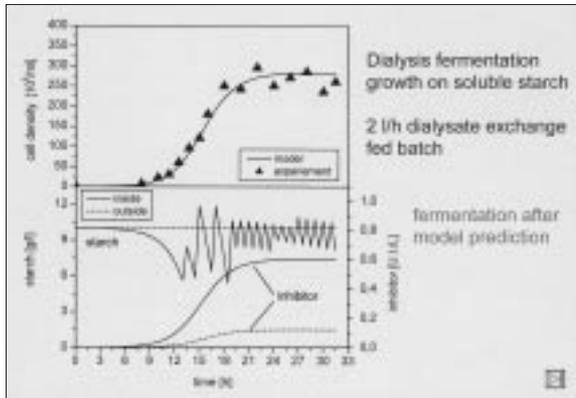


Abbildung 24



war aber reproduzierbar. Es bricht immer zusammen (Abbildung 23).

Anhand eines in der Literatur aufgrund von Versuchen mit thermophilen Bazillen beschriebenen Gedankenkonzepts haben wir ein entsprechendes Konzept auch für Pyrococcus angewandt. In einer Fedbatch-Kultur mit immer nachgefütterter Stärke zeigt sich, dass man den Abstieg wegriegt.

Und hier haben wir nun aufgrund des mathematischen Modells mal eine Strategie vorausberechnet,

dass wir in eine kontinuierliche Phase kommen. Man sieht tatsächlich, dass man das so vorausberechnen kann, dass man auch diesen Organismus künstlich erziehen kann. Die Hemmstoff-Konzentration geht auf 60 %, bei eins schaltet er komplett ab (Abbildung 24). Das heißt, hier müsste man sehr stark noch weiter dialysieren, und wir haben das auch vorausberechnet, man bräuchte wesentlich mehr Membranfläche, wenn man dem mit so hohen Dichten kommen will. Und wenn man jetzt nochmal den Pyrococcus mit E-coli vergleicht, kann man bei E-coli das Konzept auch anwenden, bloß dieser Abbau ist sehr niedrig. Bei Pyrococcus ist er um mehr als den Faktor 10 höher, und auch die Produktionsrate von diesem hypothetischen Hemmstoff ist um mehr als den Faktor 10 höher bei dem Pyrococcus. Das heißt, diese Extremophilen kann man nur züchten, wenn man sehr viel von diesen Hemmstoffen wegnimmt und eben auch diesen Absturz im Auge hat.

### Zusammenfassung

Mikroorganismen wachsen in Flüssigkultur gewöhnlich bis zu einer bestimmten für den Organismus typischen Dichte und stellen dann das Wachstum ein. Es wird gezeigt, dass mit Hilfe von Membranen, die das Wachstum hemmenden Stoffe, abgeführt und damit die Wachstumsblockade beseitigt wird. Bei E coli lassen sich auf diese Weise eine Organismendichte von ca. 200 g Trockengewicht pro Liter erzeugen. Der erfolgreiche Einsatz von Membranbioreaktoren wird auch anhand der Fermentation von extremophilen Mikroorganismen demonstriert.

Unbekannt ist zunächst die genaue Ursache dieses Verhaltens. Untersuchungen in einem Flow-Cytometer zeigen, dass bei stagnierenden Kulturen tatsächlich nicht das Wachstum, sondern lediglich der Zellteilungsvorgang behindert wird. Mit Hilfe eines mathematischen Modells wird schließlich gezeigt, dass die beobachteten Wachstumsphänomene durch das Auftreten einer hypothetischen wachstumshemmenden Substanz sowie deren Abtransport durch

eine Membran in jedem Fall quantitativ beschrieben werden können. Auf diese Weise wird die genaue Dimensionierung entsprechender Apparaturen für die technische Produktion von Organismen in Membranreaktoren ermöglicht. Zusätzlich werden mit Hilfe der dargestellten Modellvorstellung nähere Aussagen über die Natur der Hemmstoffe erarbeitet.

*Literatur:*

Fuchs C., Köster D., Wiebusch S., Mahr K., Eisbrenner G., Märkl H. Scale-up of dialysis fermentation for high cell density cultivation of *Escherichia coli*. *J Bact* 93 (2002) 243–251

Krahe M., G. Antranikian, H. Märkl: Fermentation of extremophilic microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews* 18 (1996) 271–285.

Märkl H., Lechner M., Götz, F. A New Dialysis Fermentor for the Production of High Concentrations of Extracellular Enzymes. *J Ferm Bioengineering* Vol69 No. 4, 244–249 (1990)

Nakano K., Rischke M., Sato S., Märkl H. Influence of acetic acid on the growth of *Escherichia coli* K12 during high-cell-density cultivation in a dialysis reactor. *Appl Microbiol Biotechnol* (1997) 48: 597–601

Ogbonna J. C. and H. Märkl: Nutrient-Split Feeding Strategy for Dialysis Cultivation of *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 41, Pp. 1092–1100 (1993).

Pörtner P. and H. Märkl: Dialysis cultures. *Appl Microbiol Biotechnol* (1998) 50: 403–414.

## Diskussion



### BREVES

Herzlichen Dank, Herr Märkl, für Ihre Ausführungen. Ich bin sicher, der *Pyrococcus furiosus* wird uns im Zusammenhang mit der kochenden Kuh allen vergessen bleiben. Aber vielleicht zum Einstieg in die Diskussion einen sehr interessanten Aspekt, den Sie am Anfang angesprochen haben, wo Sie über den Zusammenhang zwischen Stoffwechselaktivität und Zelldichte gesprochen haben. Das ist ein Thema, was wir aus der Vormagenphysiologie sehr gut kennen, und was auf Ebene des Vormagenstoffwechsels anzusetzen ist im Zusammenhang zwischen Flüssigkeitsumsatz im oberen Gastrointestinaltrakt und Fermentationsintensität. Man weiß, dass beispielsweise die Produktionsrate an kurzkettigen Fettsäuren durch die Zunahme des Flüssigkeitsumsatzes stimuliert werden kann, aber wissen nicht die genauen Erklärungen dafür. Man diskutiert, dass entweder das Verhältnis zwischen alten und jungen Mikroorganismen verändert wird, oder dass durch den höheren Flüssigkeitsumsatz die Stoffwechselprodukte, die von Mikroorganismen abgegeben werden, leichter abgespült werden, und somit die Stoffwechselintensität beeinflusst wird. Das ist im Zusammenhang mit dem, was Sie ausgeführt haben, ein sehr interessantes Diskussionsgebiet.

### WOLFRAM

Ich habe eine Frage zur pH-Stabilisierung in Ihrem System. Verwenden Sie gepufferte Medien, oder geht die pH-Stabilisierung nur über einen großen Austausch von Dialyse-Flüssigkeit?

### MÄRKL

Alle Fermentationen erfolgen bei stabilem pH. Wir haben da eine pH-Regelung, eine pH-Sonde und einen Regler, und Natronlauge wird zutitriert, und da bleibt der pH konstant. Das ist eine unbedingte Voraussetzung, weil bei den Säuren, die da auch vorkommen, wenn die undissoziierten Anteile hemmen, und da der pH schwankt, ist da ein Riesenunterschied. Da muss man sehr präzise sein, wenn man vernünftige Ergebnisse haben will.

### SCHWARZ

Sie haben Ähnlichkeiten mit dem Pansen angesprochen. Im Pansen werden die Bakterien ständig abgeführt. Gibt es Arbeiten, die nahelegen, um das Wachstum nicht zu begrenzen, zu sagen, ich führe nicht das Produkt ab, sondern die Bakterien, um ein unendliches Wachstum zu erzielen?

### MÄRKL

Bei dem letzten Bild war es so. Das ist eine kontinuierliche Kultur, da werden die Organismen abgeführt. Wir lassen den Stärkepegel gleich, und die Organismen werden kontinuierlich abgeführt. Das ist genau dasselbe System, kombiniert mit einer Membran. Ohne Membran geht's nicht, da würde der Input einfach nach oben gehen, und dann hört das Wachstum auf, wie bei der Silage. Hier kann man das kontinuierlich machen, also insofern ist das schon so ein Modell.

KRAMER

Ich komme zurück zu dem pH-Wert. Sie haben uns die Abhängigkeit der Wachstumsrate von der Essigsäurekonzentration gezeigt, einmal im Schüttelkolben, einmal im Bioreaktor. Wurden diese Versuche bei konstantem pH-Wert durchgeführt, vor allem im Schüttelkolben?

MÄRKL

Ja, in dem Fall hat man mit einem starken Puffer gearbeitet. Aber im Schüttelkolben ist das schwierig, weil man ja keine Sonde drin hat, das genau zu überprüfen. Wir haben am Anfang gemessen und zum Schluss, und haben gesehen, dass der pH einigermaßen konstant blieb. Aber so präzise, wie das im Fermenter möglich ist, ist das hier nicht möglich.

KRAMER

Noch eine Zusatzfrage: Die Wachstumsgeschwindigkeit ist ja auch sehr stark von der Dichte abhängig, vor allem im Schüttelkolben. Ich denke da an den Sauerstofftransfer. In welchen Konzentrationen wurde das gemessen?

MÄRKL

Im Schüttelkolben haben wir niedrige Konzentrationen genommen, um ausreichend Sauerstoffversorgung zu machen. Aber auch da ist es so, dass wir keine Sauerstoffsonde im Schüttelkolben haben und so genau nicht wissen, wie die Sauerstoffversorgung ist. Wir haben das nur rechnerisch eben so eingestellt, dass es ausreichen müsste, aber das ist auch ein schwacher Punkt. Was auch unterschiedlich ist, ist die mechanische Belastung. Nicht dass die Zellwand direkt Schaden nimmt. Bei E-coli ist die sehr stabil, aber es können sich irgendwelche Schutzschichten oder so etwas aufbauen. Wir wissen es nicht.

KRAMER

Sie haben gerade zum Anfang die hoch zellgedichte Fermentation E-coli gezeigt. Was ist da eher ins Limit gekommen, die Sauerstoffversorgung oder die Zufuhr der Nährstoffe und die Abfuhr der Stoffwechselprodukte.

MÄRKL

Also, bei Sauerstoffversorgung muss man eben so versorgen, dass das nicht limitiert, sonst würde man das ja nicht mathematisch beschreiben können. Wir machen das so, dass wir erst mit Luft begasen, und dann mit zunehmender Dichte graduell auf Sauerstoff umstellen und in der letzten Phase wird dann mit reinem Sauerstoff begast. Das Experiment, das wir hier gesehen haben, habe ich selber abgesetzt und habe die letzte halbe Stunde noch zugeschaut. Ich habe dann beobachtet, dass bei dieser Dichte, bei über 175 g/Liter, plötzlich die Sauerstoffblasen Schwierigkeiten haben, hochzusteigen. Da fängt dann, wenn man von unten begast, eine gewisse Flotationsneigung an, und dann haben wir abgebrochen.

BLAUT

Ich fand das sehr faszinierend, was Sie uns hier vorgestellt haben. Wissen Sie schon mehr, ob dieser Faktor, auch wenn Sie ihn einsetzen bei einer normalen Kultur, die eine niedrige Dichte hat, das Wachstum begrenzen kann? Ist das eine Signalsubstanz? Es gibt ja dieses Quorum Sensing. Es werden bestimmte Gene an- und abgeschaltet in den zellulären Prozessen. Können Sie mit diesem Faktor, den Sie ja wahrscheinlich inzwischen isoliert haben, wenn Sie den in eine Kultur geben, die noch keine hohe Dichte hat, ein Stoppen des Wachstums auslösen?

MÄRKL

Das ist genau das Vorgehen, dass wir erst versuchen, rauszukriegen, was es ist. Dann schmeißen wir den Stoff in eine Kultur, die noch ganz gut wächst, und schauen, was passiert. Das ist auch bei den Leuten, die das Quorum Sensing messen, ähnlich. Mit E-coli haben wir solche Versuche schon gemacht. Bei dem Pyrococcus ist es so, dass das Ganze sich ohnehin bei niedrigen Zelldichten abspielt, weil dort die Produktion von diesem hypothetischen Stoff so stark ist, dass man nicht zu hohen Zelldichten kommt, da dieses limitierende Quorum Sensing-Signal schon viel früher kommt. Ob jetzt der Stoff mengenmäßig größer ist oder ob die Wirkung größer ist, kann man nicht auseinander halten.

PAHLOW

Eins Ihrer ersten interessanten Beispiele bezog sich auf die Produktion von Botulinum-Toxin in Südafrika. Könnten Sie preisgeben, mit welchem Serotyp das lief und ob das auf eine Impfstoffherzeugung zielt, den man auch später mal importieren könnte?

MÄRKL

Ja, das ist eine Impfstoffproduktion, aber den Typ weiß ich nicht, aber Sie kennen ja wahrscheinlich die klassische Produktionsmethode. Man hat eine Nährstoffflasche, in die man einen Dialyse-Sack hängt. Das Ganze läuft ja anaerob ab, wird einfach in einen klimatisierten Raum gestellt, und dort vielleicht 1 oder 2 Wochen stehen gelassen. Diese Membran ist so, dass das Toxin nicht weggeht. Dann wird das abgeerntet, und weil es ziemlich unkontrolliert ist, müssen die für jeden Ansatz hinterher über die Wirkung, die haben Pferdeherden dort, das erst wieder kalibrieren. Daher sind sie jetzt auch auf die Idee gekommen, das reproduzierbarer zu machen, und das kann man mit einem Reaktor eben machen, da man die Bedingungen sehr gut einstellen kann.

BREVES

Letztlich ein System am Tier zu kalibrieren, kann natürlich auch ein sehr rüdes Verfahren sein, ohne das hier näher auszuführen.

MÄRKL

Aber ich glaube, das ist bisher die einzige Möglichkeit in dem Fall.

SCHWERIN

Als biologisch Interessierten bringt mich Ihre Interpretation, in der Sie das Verhältnis der DNS-Peaks oder der Zellpeaks als anormal in der exponentiellen Phase beschrieben haben, zu der Frage: Könnte das nicht auch ganz einfach daran liegen, dass Sie eine starke Disproportionalität haben zwischen Zellteilung und Zellwachstum? Das heißt, hohe DNS-Menge/Zellteilung und geringes Größenwachstum der Zelle und damit eine Verminderung dieses anderen Peaks?

MÄRKL

Ich habe die Interpretation der Kollegen in Dresden übernommen. Also noch ganz interessant ist in dem Zusammenhang, dass die Wachstumsgeschwindigkeit extrem hoch war, also 25 Minuten Verdoppelungszeit. Dagegen haben Medien, die von der Industrie angesetzt werden, diese Mineralsalzmedien, Minimalmedien, eine Verdoppelungszeit von einer Stunde oder 75 Minuten.

Tatsache ist, dass eben diese hohen Kopiezahlen der Chromosomen da auftreten.

ZENTEK

Meine Frage hat sich fast schon erledigt, vielleicht noch ein Zusatz: Ist das spezifisch für E-coli, oder ist das bei anderen Bakterienarten auch so? Wie ist es bei mehr semikontinuierlicher oder kontinuierlicher Kultur, würde das dort auch auftreten, oder ist das die Folge dieses rasanten Wachstums in der Batchkultur?

MÄRKL

Ja, also wir haben im Augenblick nur die Fedbatchkultur im Auge, weil eben die industriellen Prozesse zur Produktion von rekombinanten Proteinen in diesem Batchsystem ablaufen. Wir haben Erfahrung mit kontinuierlichen Kulturen bei Pyrococcus, aber nicht bei E-coli, weil es industriell nicht nachgefragt wird.

ZENTEK

Könnte man aber auch machen, ja?

MÄRKL

Wir machen da noch eine kontinuierliche Kultur, aber nur, um die kinetischen Parameter zu vermessen. Aber sonst haben wir da keine wirkliche Erfahrung mit kontinuierlicher Kultur.

MEYER

Um zu der Kuh zurück zu kommen, als morphologische Besonderheit hat die Kuh eine Hirnkühlung, und kann damit den Stoffwechsel um 1–2° hochfahren, so dass also Ihre Anmerkung zur heißen

Kuh diesbezüglich gar nicht so unsinnig war, aber vielleicht reichen diese 41 °C da auch nicht. Von Herrn Schwarz aus Weihenstephan habe ich gelernt, dass die Schmelzung oder Ausschmelzung auch bei der Zellulose ein Aspekt ist, es aufzuschließen. Kann man darüber nachdenken, diese thermophilen Bakterien einzusetzen, um das zumindestens leichter zugänglich zu machen?

MÄRKEL

Ich freue mich über diese Frage, weil ich das zuerst in meinen Vortrag mit eingebaut hatte. Es tritt so ein Problem auf im Zusammenhang mit der humanen Weltraumfahrt. Wir haben ein Vorhaben bei der ESA. Wenn man im Weltraum ist, muss man, wenn man längerfristig dort bleibt, irgendwie ein Recycling machen. Man muss sich das Nahrungsmittel herstellen, und die Endprodukte, z.B. Stroh, oder auch die Ausscheidungen des Menschen, müssen wieder in den Stoffkreislauf zurück. Man hat einmal das Problem CO<sub>2</sub>/Sauerstoff, den Gasstoffwechsel, aber man hat auch das Problem, den stofflichen Kreislauf zu schließen. Man hat es erst einmal mit der Methan-gärung probiert, aber da hat man typischerweise nur Umsätze um 60%. Wir haben jetzt ein Konsortium von Hyperthermophilen, und wir machen diese Spaltung von so einem Substrat, einer Mischung u. a. aus Stroh, Algen. Verschiedene Dinge wurden einfach als Standardsubstrat zusammengemischt, mit sehr gutem Erfolg, und ich zeige Ihnen gerade die Maschine, mit der das passiert. Hier, das ist dieser Kreislauf, liquifying compartment, das ist der bottle neck. Das andere dann, z.B. Photosynthese, solche Apparate laufen schon, z.B. in Barcelona. Wir haben hier einen Fermenter, der bei 90 °C läuft, über eine Membran wird jetzt dialysiert und dieses Dialysat geht dann zu anderen Reaktionen. Da sind dann nur noch Molekülgrößen unter 4.000 Dalton drin. Franzosen, Leute aus Ihrem Bereich, sind dabei, das, was man dort nicht klein kriegt, noch mit Fibrobacter zu behandeln. Man kann mit dieser hyperthermophilen Hydrolyse, mit einer Verweilzeit in dem Fall von 48 Stunden, Umsätze in der Größenordnung von 85/

90% machen. Das ist bei diesen stark lignininkrustierten Substraten ein Wert, der mit keinem anderen System jetzt erreicht wurde. Wenn sich das bestätigt, könnte man sich überlegen, ob man nicht irgendwann auch andere Substrate auf die Art aufbereitet.

LETTNER

Sie rechnen sehr viel mit Modellen, bevor Sie das Experiment machen. In der Industrie schaut man immer, die Prozesse einfach zu halten, das heißt, man geht eigentlich immer auf den Batch-Prozess. Das Nächstkompliziertere wäre die kontinuierliche Kultur, das Nächstkompliziertere ein Dialyse-Reaktor. Haben Sie auch ein Modell dafür, wie die Betriebskosten steigen in Abhängigkeit vom Maßstab, je nach Equipment?

MÄRKEL

Da machen wir uns weniger Sorgen. Das ist Sache der Industrie. Wir entwickeln Alternativen, und die sollen sich überlegen, ob das einen Sinn macht. Aber dieser Dialyse-Prozess ist kompliziert und sehr aufwendig, und wir müssen unbedingt rausbringen, was da genau abläuft. Wir haben das auch schon patentiert, dass wir da einen Absorber reinmachen, bloß dann müsste er sehr spezifisch ausgerichtet sein auf den Stoff, den wir rausholen wollen. Dazu müssen wir aber ganz genau wissen, was das ist, und wenn man den Stoff kennt, kann man die Mikrobiologen fragen, ob sie nicht die Produktion von diesem Stoff unterbinden können. Man weiß aber gar nicht, was in diesen industriellen Prozessen eigentlich hemmt.

GÄBEL

Ich habe noch mal eine Frage zu Ihrem Inhibitor. Das ist ja anscheinend eine sehr niedermolekulare Substanz. Ist bekannt, ob das Kreuzreaktionen gibt, das heißt, ob, was bei E-coli hemmt, auch bei den anderen Spezies hemmt?

MÄRKEL

Also ich weiß bloß, dass das, was bei E-coli hemmt, beim Pyrococcus nicht hemmt, da sind sie weit aus-

einander. Wenn ich mal vermuten darf, glaube ich, dass das sehr spezifisch ist. Organismen schauen ja auf sich selber, auf ihre eigene Art, und wollen damit etwas steuern. Es kann sein, dass die auch Andere mit steuern, dann hat die Sache mehr den Charakter eines Antibiotikums. Wenn man die Literatur ansieht, gibt es da allerlei Varianten. Es ist auch möglich, dass es nicht nur ein definierter Stoff ist, sondern mehrere. Wenn man den Faktor, den wir da gefunden haben, so einsetzt, wie der Organismus das macht, also in einer gewissen verunreinigten Form, ist das viel wirksamer, als wenn man die Hauptkomponente einsetzt. Und da sieht man schon, dass das komplexer ist als man sich wünschen würde.

#### STANGASSINGER

Sie arbeiten ja bei Ihren mikrobiologischen Ansätzen mit Mikroorganismen in Reinkultur. Könnten Sie spekulieren, wie viel Jahre oder Jahrzehnte es dauern wird, bis Sie solche Berechnungen mit einer Mischkultur machen können? Reinkulturen im Verdauungstrakt gibt es ja eigentlich nicht, sondern das ist eine ständige Auseinandersetzung von verschiedenen Mikroorganismen. Ich wollte damit nur andeuten, wie schwierig es wahrscheinlich sein wird, Voraussagen zu treffen, wie es im Verdauungstrakt möglicherweise aussieht. Schafft man irgendwann einmal für Mischkulturen aus z.B. 200 Spezies Berechnungen anzustellen, wie Sie sie uns gezeigt haben?

#### MÄRKL

Ich bin skeptisch, ob man das irgendwann auch schaffen würde, aber es gibt natürlich schon Bemühungen, z.B. zusammen mit der Methangärung. Das ist ja auch ein vielstufiger Prozess, und mittlerweile gibt es auch ein mehr oder weniger offiziell zugelassenes mathematisches Modell, wo aber das Problem besteht, die Koeffizienten zu finden. Da spielen Transportprozesse zwischen den Organismen eine Rolle, und dieses Modell basiert darauf, dass man erst einmal sieht, welcher Organismus den Takt vorgibt. Bei der Methangärung ist es so, dass der Schritt

von der Essigsäure zum Methan das Ganze stark dominiert. Dieser Schritt wird auch beeinflusst, z.B. von der Propionsäurekonzentration, oder von  $H_2S$ , das kann man auch mit ins mathematische Modell reinbringen. Da spielt dann wieder das Gleichgewicht der Gasphase und der Flüssigphase eine Rolle, oder die Ammoniumkonzentration. Man muss da sehr stark einsteigen in die Transportbeziehungen, obwohl man nur einen einzigen Organismus und eine einzige Reaktion im Auge hat. Da sehen Sie, wie weit man noch weg ist, um das komplett zu modellieren. Wir haben versucht, auch noch den azidogenen Schritt von Propionsäure zu Essigsäure zu modellieren. Man kann alles machen, es fragt sich nur, ob man dann tragfähige Aussagen machen kann, und dieses konnten wir nicht. Das heißt, dieses erweiterte mathematische Modell hat uns nicht mehr gebracht als das reduzierte.

#### BREVES

Herr Märkl, ich möchte Ihnen herzlich danken. Ich habe Ihren Beitrag auch deswegen als sehr stimulierend empfunden, weil er wieder einmal gezeigt hat, wie wertvoll derartige Interdisziplinarität sein kann, und ich denke, das ist für uns alle etwas ausgesprochen Wichtiges. Das ist ja mehrfach angeklungen, und das ist ja auch ein Element dieser Tagung gewesen.

Bevor ich nun das Wort Herrn Smidt übergebe, um die Zusammenfassung der Tagung zu machen, möchte ich es nicht versäumen, mich an dieser Stelle bei den beiden Gesellschaftern der Firma Schaumann und bei der Schaumann-Stiftung ganz herzlich dafür zu bedanken, dass wir Gelegenheit hatten, an der diesjährigen Tagung, an den 20. Hülsenberger Gesprächen teilzunehmen. Ich denke, ich kann davon ausgehen, dass ich Sie alle in diesen Dank einschließen möchte. Ich glaube, es ist eine sehr stimulierende und eine sehr interessante Tagung gewesen, die durch sehr interessante Beiträge und auch durch sehr stimulierende und interessante Diskussionen geprägt worden ist, und in diesem Sinne möchte ich mich noch mal sehr herzlich bedanken.

# Zusammenfassung



Die in den 20. Hülsenberger Gesprächen vorgestellten und diskutierten mikrobiologischen Systeme und Populationen im Gastrointestinaltrakt und bei der Silagebereitung wurden durchweg als sehr komplex und in ihren Funktionen vielfach als noch nicht vollständig erforscht und geklärt charakterisiert.

Ich werde versuchen, aus den vielfältigen, einschlägigen und sehr informativen Beiträgen einige mir wichtig erscheinende Ergebnisse und Zusammenhänge schlaglichtartig zu beleuchten.

Emotional bin ich fasziniert von den  $10^{14}$  Mikroorganismen, die durchschnittlich unseren Darm besiedeln. Das sind bei mir – rechnerisch – etwa eine Milliarde Mikroorganismen je Gramm Körpergewicht. Diese quantitativ überwältigende Relation verliert dadurch an Eindruck und Gewicht, dass z.B. Bakterien nur über eine Masse von  $10^{-12}$  g verfügen.

Es spricht für die Aktualität der Hülsenberger Gespräche, dass sich bereits die 4. Veranstaltung mit der Anwendung von Antibiotika in der Tierernährung, unter Anderem mit Rückstandsrisiken und Rückstandsnachweisen, befasst hat. In den seitdem vergangenen 3 Jahrzehnten haben sich die Perspektiven verschoben, so dass wir uns in den 20. Hülsenberger Gesprächen den Probiotika, Präbiotika und Synbiotika zugewandt haben, da Antibiotika zur Leistungsförderung bei landwirtschaftlichen Nutztieren ab 2005 praktisch nicht mehr zur Verfügung stehen werden.

Wir haben es also unter Anderem mit 3 Begriffen zu tun, denen im Verlauf unserer Tagung in etwa folgende Inhalte sinngemäß zugeordnet wurden:

**Probiotika** sind lebende oder lebensfähige Mikroorganismen, die im Gastrointestinaltrakt von Mensch und Tier günstige Effekte entfalten beziehungsweise vermitteln können.

**Präbiotika** sind spezifische unbelebte, unverdauliche Stoffe, die selektiv Mikroorganismen in ihrem Wachstum fördern und dadurch positive gesundheitliche Wirkungen erzielen.

**Synbiotika** entfalten gemeinsame Wirkungen von Probiotika und Präbiotika in kombinierter Funktion.

Klare Begriffsbestimmungen erscheinen mir nicht nur formal wichtig. Vielmehr helfen sie auch zu vermeiden, dass die Begriffe politisch, gegebenenfalls auch ideologisch, vereinnahmt, verfremdet, okkupiert und entsprechend vermarktet und vermittelt werden.

Das Generalthema **Mikrobiologie und Tierernährung** wurde in 4 inhaltlichen Blöcken abgehandelt:

- I Die Bedeutung von Mikroorganismen in der Tierernährung
- II Verfahren der Silierung von Futtermitteln
- III Mikroorganismen in der Ernährung
- IV Perspektiven und Herausforderung für die Forschung

## I Die Bedeutung von Mikroorganismen in der Tierernährung

Probiotische Mikroorganismen haben wir ja schon mit der Muttermilch eingesogen, in Form des Bacterium bifidum. Das ist aber nur ein Beispiel aus dem Spektrum probiotisch wirksamer Mikroorganismen,

die wir in dieser Tagung vorgestellt bekommen haben.

Die probiotische Wirkung erfolgt über Zellfunktionen, die konsequenterweise am Anfang des Programms sehr eindrucksvoll dargestellt wurden. Die dabei erläuterten und diskutierten Erklärungsansätze reichten von Kolonisation und Wachstum von Probiotika im Verdauungstrakt über Beeinflussungen im Wechselspiel mit Elementen und Funktionen des Darmepithels bis zu Interaktionen mit dem darmassoziierten Immunsystem.

Diese Ansätze müssen zum Teil noch experimentell verifiziert werden, um in entsprechenden Anwendungen nutzbar werden zu können.

Die Kenntnis gastrointestinaler Wirkungen von Mikroorganismen stellt in sich schon die Frage nach Anwendungsmöglichkeiten in der Tierernährung zwecks Förderung von Leistung und Gesundheit der Nutztiere. Parallel zu den Chancen wurden auch die unterschiedlich bedingten Grenzen umrissen und aus beiden, Möglichkeiten und Grenzen, Zukunftsperspektiven abgeleitet.

Am Beispiel der mikrobiellen Umsetzungen im Pansen konnten wir erkennen, dass den damit verbundenen Möglichkeiten, wie Zelluloseabbau, Protein- und Vitaminsynthese, Abbau unerwünschter Stoffe, auch Begrenzungen gegenüber stehen. Dazu gehören beispielsweise Nährstoffverluste durch intraruminalen Ab- oder Umbau, Umweltbelastungen durch Methanbildung oder Gesundheitsstörungen durch Ernährungsfehler.

Die Erörterung der Zukunftsperspektiven wurde eng verknüpft mit zu verfolgenden Forschungsansätzen, die zu einem besseren Verständnis der mikrobiellen Aktivitäten im Pansen führen sollen. Diese Zielsetzung können wir erweitern auf gastrointestinale Wirkungen von Mikroorganismen insgesamt.

Im Zusammenhang mit den Zukunftsperspektiven erscheint wichtig, dass es sich bei der Eubiose im Verdauungstrakt um ein komplexes System von Wirkungen, Reaktionen und Wechselwirkungen handelt.

Daraus darf man schließen, dass eindimensionale Maßnahmen wahrscheinlich in ihren Wirkungsmöglichkeiten begrenzt bleiben.

Interessant waren auch zwei eher beiläufig erwähnte Fakten, nämlich dass Wiederkäuer weltweit mit einem Gesamtpansenvolumen von geschätzten 150 Mio m<sup>3</sup> über ein riesiges Umwandlungspotential von Pflanzen in hochwertige Nahrungsmittel verfügen, und dass etwa 70% der Wiederkäuer in den Tropen und Subtropen gehalten werden, die nur ein Viertel des von Wiederkäuern erzeugten essbaren Proteins erbringen, aber für drei Viertel der damit verbundenen Schadgasausscheidungen stehen, die ja meistens nur in Verbindung mit intensiver Rinderhaltung kritisch herangezogen werden.

Für Tiere, insbesondere Monogastrier, wurden den Probiotika leistungsfördernde Wirkungen zugeschrieben, die in ihren Größenordnungen denen der Antibiotika in etwa entsprechen.

Nun wird zwar beim Menschen häufig von Leistung gesprochen, z.B. von Bezahlung nach Leistung für Professoren, aber von Leistungsförderern als Nahrungszusätze spricht man, glaube ich, so wörtlich nicht, wenn auch der Begriff »functional food« teilweise in dieser Richtung zu interpretieren ist. Den Probiotika werden somit in der Humanernährung auch eher gesundheitsrelevante Wirkungen zugeschrieben, z.B. bessere Verträglichkeit bei Lactoseintoleranz, eine deutlich geringere Durchfallhäufigkeit, Immunmodulation, Absenkung krebsfördernder Enzyme im Colon, Einstellung eines mikrobiellen Gleichgewichtes im Darm, Mobilitätsregulierung bei Obstipation, Senkung des Cholesterinspiegels und eine verbesserte Mineralresorption.

Präbiotika – z.B. in Form von Fructooligosacchariden – sind im gleichen Sinne wirksam durch Förderung der Vermehrung entsprechender intestinaler Mikroorganismen, z.B. von *Bacterium bifidum*.

Da viele Faktoren Einfluss auf die Darmflora nehmen können, sind sie jeweils auch differentiell zur Wirkung von Präbiotika zu bewerten.

Auf die Humanernährung kommen wir in einem späteren Themenblock noch einmal zurück und wenden uns vorerst wieder den Tieren zu, und zwar mit einem zum zweiten Themenblock überleitenden Beitrag über Vorgaben und Regelungen in der EU in Verbindung mit Mikroorganismen in der Tierernährung.

## II Verfahren der Silierung von Futtermitteln

In einem umfassenden, klaren Überblick wurden Zuständigkeiten in der EU, relevante Leitlinien und Verordnungen sowie die in Betracht kommenden Bewertungskriterien vorgestellt.

Die als Darmflorastabilisatoren der Kategorie »Zootechnische Zusatzstoffe« zugeordnete Mikroorganismen müssen als Zulassungsvoraussetzung die Tierproduktion, die Leistung oder das Wohlbefinden der Tiere positiv beeinflussen, insbesondere durch Einwirkung auf die Magen- und Darmflora der Tiere oder die Verdaulichkeit von Nährstoffen. Sie dürfen sich dabei nicht schädlich auf die Gesundheit von Tier und Mensch oder auf die Umwelt auswirken und nicht für den Anwender irreführend dargeboten werden.

Zu den Bewertungskriterien zählen Eigenschaften und Kennwerte der interessierenden Mikroorganismen selbst, Anwendungsbedingungen, Analytik, Wirksamkeit, Zieltiertoleranz, Wirkung auf die Darmflora, Toxizität, Resistenztransfer, Anwender- und Umweltsicherheit.

Hierzu wurden in der Diskussion Fragezeichen gesetzt hinsichtlich der Problematik für Antragsteller, geforderte Nachweise überhaupt erbringen zu können, z. B. bezüglich der Wirksamkeit von Zusatzstoffen.

Unterschiedliche Vorschriften werden für Lebensmittel liefernde Tiere einerseits und Heimtiere andererseits gelten.

Regelungen wird es ebenfalls für die Zulassung und Anwendung von Siliermitteln als technologische Zusatzstoffe geben.

Vieles ist offensichtlich noch im Fluss, und es wurden erhebliche Zeiträume genannt, bis alle vorgesehenen Regelungen greifen können.

Da EU-Leitlinien und EU-Verordnungen im Allgemeinen auf der Grundlage gesicherter wissenschaftlicher Erkenntnisse entwickelt werden, sind, wie von mehreren Referenten betont, noch erhebliche Forschungsarbeiten notwendig. Es ist zu hoffen, dass entsprechende Mittel zur Verfügung stehen werden, und es erscheint logisch, dass sich die EU mit Projektmitteln daran beteiligt.

»Dass sie von dem Sauerkohle eine Portion sich hole, wofür sie besonders schwärmt, wenn er wieder aufgewärmt!«

Diese von Wilhelm Busch in »Max und Moritz« beschriebene Vorliebe der Witwe Bolte ist wohl eines der bekanntesten Literaturzitate zum Thema Silage, in diesem Fall solche für die menschliche Ernährung. Ob er eine Vorstellung von den mikrobiologischen Abläufen bei der Fermentierung gehabt hat, ist meines Wissens nicht überliefert. Dafür sind wir hier einschlägig über die Rolle der Mikrobiologie in der Silierung, in diesem Fall zur Tierernährung, in's Bild gesetzt worden.

Interessant fand ich zunächst einmal, dass Silier-techniken sich einer 1½-tausendjährigen Tradition erfreuen. Silierung, ist, wie es hieß, kompliziertes Zusammenspiel biologischer Prozesse, die sich im Siliergut in 4 Phasen vollziehen, nämlich

- Übergang vom aeroben zum anaeroben Status,
- Fermentierung,
- Stabile Phase
- Partielle Labilität durch Öffnung und Anschnitt des Silos.

In allen Phasen können Störungen und unerwünschte Abläufe auftreten, so dass die Optimierung der beteiligten Vorgänge für die Qualität der Silage und damit auch für Gesundheit und Produktbeschaffenheit bei den damit ernährten Tieren sehr wichtig ist.

Große Bedeutung kommt in diesem Zusammenhang den Siliermitteln zu, mit denen mikrobiologi-

sche »Nützlinge« zum Einsatz kommen, die einen optimalen Verlauf der bereits genannten Silierphasen gewährleisten sollen. Aus Anfängen vor etwa 100 Jahren haben Fortschritte in der »Silagemikrobiologie« zur verbreiteten Anwendung von Siliermitteln und deren Produktion im industriellen Maßstab geführt.

Die Leistungsfähigkeit mikrobiologischer Silierzusatzstoffe kann möglicherweise durch gentechnologische Maßschneiderei durchaus noch gezielte Steigerungen erfahren, obwohl das zurzeit nicht als aktuell dringlich angesehen wird, da das Spektrum verfügbarer Mikroorganismen noch ergiebig genug ist.

Wie bei allen Problemlösungen, ist ein Blick über Grenzen immer sinnvoll. In diesem Sinne waren die Informationen über Technologien in den Niederlanden besonders wertvoll.

Ich greife hier die interessanten Ausführungen über das Sporenvorkommen von Buttersäurebakterien in Gras- und Maissilagen heraus. Diese Sporen verlassen den Verdauungstrakt von Milchkühen unversehrt, gelangen über kontaminierte Euter in die Milch, und wirken sich dann störend in der Käseproduktion aus. Die vorgestellte systematische Untersuchung von Vorkommen, Ursachen und Vermeidung ist ein gutes Beispiel für die wissenschaftliche Integration von mikrobiologischen Problemen bei der Futtermittelkonservierung, in der Tierernährung und in der Prozess- und Produktqualität bei der landwirtschaftlichen Nutztierhaltung. Solches Vorgehen ist sicher auch kennzeichnend für ein Institut wie NIZO, das seine Einkünfte nur über die Akquisition von Projektaufträgen bezieht.

### III Mikroorganismen in der Ernährung

Dieser Themenblock befasste sich mit anwendungsbezogenen mikrobiologischen Aspekten der Ernährung von Mensch und Tier.

Es ist sofort einleuchtend, dass ein über lange Zeiträume entwickeltes System, wie die Pansenflora, in seiner Komplexität mittels verschiedener Faktoren, unter anderem durch Futtermittel und Fütterungsge-

staltung, beeinflussbar ist. Dies beinhaltet auch Möglichkeiten, das System durch Fütterungsmaßnahmen zu optimieren. Auf diese Weise kann nicht nur die ruminale mikrobielle Populationszusammensetzung stabil gehalten werden, sondern auch auf Produktionsziele, z. B. Milch oder Bildung von Körpermasse, ausgerichtet werden. Einen Schritt weiter geht die Vorstellung, über die Fütterungsgestaltung die Pansenflora zielgerichtet an besondere Pansenfunktionen anzupassen. Zu solchen Zielsetzungen könnten z. B. die Barrierefunktion gegen die Verbreitung pathogener Keime oder der Abbau toxischer Substanzen gehören.

Nicht nur der Rationsgestaltung, sondern auch der Beschaffenheit der Futtermittel kommt Bedeutung zu, auf diese Weise auch in Aufgaben der Pflanzenzüchtung hinein reichend.

Auch bei Monogastriern gibt es deutliche Interaktionen zwischen Nahrungsfaktoren und intestinalen Bakterien, hier dargestellt an Beispielen bei Schweinen und Geflügel. Fütterungsgestaltung und -management sind daher auch bei Monogastriern wichtige Faktoren zur Erhaltung der Eubiose im Gastrointestinaltrakt. Die Biodiversität intestinaler Mikrobiota ist erst in Teilen bekannt und bedarf weiterer Klärung, wobei moderne molekulargenetische Methoden hilfreich sind. Solche Erkenntnisfortschritte sind notwendig, um das zurzeit noch recht hypothetische Verständnis der Wechselwirkungen zwischen Mikrobiota im Darm und Aspekten der Tiergesundheit zu verifizieren. Entsprechende Projekte sind in Arbeit.

Bleibt noch festzuhalten, dass auch Präbiotika, z. B. in Form von Nicht-Stärke-Polysacchariden spezifische Gruppen von Bakterien im Verdauungstrakt von Monogastriern stimulieren. Interessant erschien mir noch der Hinweis, dass offensichtlich nicht von jeder Veränderung der Darmflora Auswirkungen auf Produktionsleistungen zu erwarten sind.

Auch in der Ernährung des Menschen werden Probiotika mit der Erwartung einer Reihe positiver Wirkungen eingesetzt.

Die normale Darmflora soll vor der Ansiedlung pathogener Bakterien schützen, die Energieausnutzung verbessern, die Bildung kurzkettiger Fettsäuren fördern, toxische Nahrungsbestandteile inaktivieren, und das Immunsystem modulieren.

Probiotika in der Humanernährung sollen, laut Genesis, bereits Abraham zu einem hohen Alter verholfen haben. Wir haben hier gehört, dass es nach dieser biblischen Fundstelle viele weitere Hinweise auf positive Wirkungen entsprechender Mikroorganismen auf Gesundheit und Wohlbefinden gibt.

Für gesundheitsrelevante Wirkungen, die bei Menschen eingesetzten Probiotika zugeschrieben werden, wurden in der Diskussion viele Fragen aufgeworfen, ob diese Effekte tatsächlich durch wissenschaftliche Forschungsergebnisse gestützt werden, und ob ihre Wirkungsmechanismen hinreichend bekannt sind. Dies im Blick, erscheint es etwas überraschend, dass Probiotika beim Menschen bereits ein Anwendungsstadium erlangt haben, hinter dem eine Produktion im industriellen Maßstab steht.

Wie den EU – Regelungen für den Einsatz von Mikroorganismen als Futterzusatzstoffe und Siliermittel auch Risikobewertungen zugrunde liegen, hat die Sicherheitsbewertung von Lebensmitteln einen hohen Stellenwert, da nur sichere Nahrungsmittel Vertrauen schaffen und erhalten können.

Toxikologische Kenngrößen, wie die »Dosis ohne nachteilige Wirkung«, die Anwendung von Sicherheitsfaktoren, zum Beispiel »tolerierbare tägliche Aufnahmemenge« und das sogenannte »Risiko-Minimierungskonzept« für kanzerogene Stoffe sind wichtige operationale Instrumentarien in der Sicherheitsbewertung von Lebensmitteln.

Besondere Anforderungen ergeben sich bei funktionellen Lebensmitteln, denen besondere gesundheitlich relevante Effekte zugeschrieben werden.

Grenzen werden offenbar auch dabei gesetzt durch Defizite im Wissen um biologische Wirkprofile und Dosisabhängigkeiten entsprechender Inhaltsstoffe, z. B. Probiotika, Präbiotika und Synbiotika. Dies rundet

das Bild im Hinblick auf diesbezüglichen Forschungsbedarf, was eine gute Überleitung zum letzten Themenblock ist.

#### **IV Perspektiven und Herausforderung für die Forschung**

Wie ein roter Faden zog sich die Erkenntnis durch fast alle Referate, dass im Bereich des Generalthemas »Mikrobiologie und Tierernährung« erheblicher Forschungsbedarf besteht.

In der Zielorientierung wurden unter Anderem folgende Bereiche angezogen:

- Erfassung, Beschreibung und Quantifizierung der mikrobiologischen Biodiversität im Gastrointestinaltrakt einschließlich der Frage, wie Mikroorganismen kommunikativ miteinander verkehren.
- Mikrobiologische Beschreibung der Eubiose in verschiedenen Funktionsbereichen des Organismus.
- Wissenschaftlich – experimentelle Klärung von Wirkungen und ihnen zu Grunde liegenden Mechanismen und Funktionen bei Probiotika und Präbiotika, vor allem im Hinblick auf die Förderung von Leistung und Gesundheit landwirtschaftlicher Nutztiere. Dabei kommt der Wirkung in definierten Infektionsmodellen besondere Bedeutung zu.
- Optimierung mikrobiologischer Voraussetzungen für hohe Silagequalität.
- Weitere wissenschaftliche Untermauerung von Bewertungskriterien in der Lebensmittelsicherheit.
- Vorantreiben innovativer Perspektiven, die sich beispielsweise aus gentechnologischen Möglichkeiten ergeben.
- Nutzung von Probiotika als Vektoren, um Wirkstoffe zu Zielorganen zu befördern.

Zu den diesbezüglichen Herausforderungen aus Sicht der Ernährung landwirtschaftlicher Nutztiere wurde zunächst noch einmal die zentrale Bedeutung der Mikrobiologie für die Bereiche Futterkonservierung und Futterhygiene, für den Nahrungsaufschluss und die Nährstoffbereitstellung sowie für die Tiergesundheit unterstrichen.

Es wurde betont, dass diese Probleme nur im interdisziplinären Verbund von Mikrobiologen und Ernährungswissenschaftlern gelöst werden können. Die Tierernährung sollte diesbezüglich als integrative Disziplin fungieren und anerkannt werden.

Die erwachsenden Aufgaben wurden an Beispielen aus den Bereichen Futterkonservierung mit Bakterienzusätzen, Flüssigfütterung bei Schweinen mit fermentierten Futtermitteln sowie mikrobiologische Aspekte der Pansenfunktion verdeutlicht.

Als generelle Zielsetzung wurde das erkennbare Erreichen und Erhalten einer »gesunden Mikroflora« bei Monogastriern und Wiederkäuern herausgestellt, die auch Maßnahmen der Rationsgestaltung, der Haltung und Umweltgestaltung sowie der Pflanzenzüchtung einbeziehen müssen.

Wichtig erschien mir auch der Hinweis auf die Bedeutung eines entsprechenden Verständnisses und Bewusstseins bei Landwirten und Tierhaltern für die dargestellten Zusammenhänge, was entsprechende Beratung erfordert.

Die Betrachtungen zu wissenschaftlichen Ansätzen und Forschungsbedarf wurden eindrucksvoll mit Ausführungen zum Wachstum von Mikroorganismen und dabei wirksamen Gesetzmäßigkeiten abgerundet. Für mich war dies eine überzeugende Demonstration dafür, wie aus Kenntnissen über mikrobiologische Gegebenheiten industrielle Verfahren auf der Grundlage ingenieurwissenschaftlicher Arbeiten entwickelt werden können. Ein Paradebeispiel für Interdisziplinarität und erfolgreichen Technologietransfer!

Die Thematik der diesjährigen Hülsenberger Gespräche mag zunächst ein wenig speziell ausgesehen haben. Es wurde aber sehr schnell klar, dass die Mikrobiologie in alle Bereiche der Tierernährung und deren Umfeld hineinreicht und damit eine sehr zentrale Rolle im Gesamtfeld der Tierproduktion und Tiergesundheit einnimmt.

Die Veranstaltung reiht sich damit, angesichts ihrer Bedeutung für Mensch, Tier und Umwelt, als jubiläumswürdiges Ereignis in die Serie der Hülsenberger Gespräche ein.

## Schlusswort



Zunächst bedanke ich mich bei allen Teilnehmern dafür, dass Sie unserer Einladung gefolgt sind und 3 Tage ihrer knappen und kostbaren Zeit dieser Tagung gewidmet haben! Mein Dank gilt insbesondere den Referenten, von denen ich Herrn Kollegen Märkl von der TU Hamburg-Harburg erwähnen möchte, der kurzfristig für den erkrankten Kollegen Katinger aus Wien eingesprungen ist. Ferner danke ich den Diskussionsleitern und den Diskutanten.

Wie bei den vorhergehenden »Hülsenberger Gesprächen«, so beehrten uns die Gesellschafter der Schaumann-Gruppe, die Brüder Charles A. Seiller und Olivier M. Seiller, sowie der Leiter des Agrarbereichs, Herr Rudolf Buchleitner, wieder mit ihrer steten Anwesenheit und ihr Interesse an der Thematik. Den Mitarbeitern der Schaumann-Firmen gebührt wieder Dank und Anerkennung für die reibungslose Organisation dieser Veranstaltung!

Herr Heinrich Wilhelm Schaumann, der Großvater der Gebrüder Seiller, wäre vor 5 Tagen 100 Jahre alt

geworden. Wäre er noch unter uns, wie würde ihn die Entwicklung der »Hülsenberger Gespräche« in 40 Jahren erfreuen! Seine Idee der interdisziplinären Fachgespräche fiel auf sehr fruchtbaren Boden und wird auch weiterhin leben. Gleichmaßen galt sein Interesse der Förderung des wissenschaftlichen Nachwuchses. Für das Jahr 2005 ist wieder eine Auszeichnung der besten Habilitationen, Dissertationen und Prüfungsleistungen vorgesehen, wozu die einschlägigen Hochschulen, Fakultäten und Institute nach entsprechender Aufforderung Vorschläge einreichen können.

Die nächsten »Hülsenberger Gespräche« werden in 2006 stattfinden, wobei ich um Verständnis bitte, dass sich die Einladungen wieder an Persönlichkeiten richten werden, die dem Generalthema fachlich verbunden sind.

Nunmehr wünsche ich Ihnen eine unbeschwertere Heimreise und ein erholsames Wochenende!

## 20 Hülsenberger Gespräche 1965 – 2004



Verehrter Herr Charles Seiller, verehrter Herr Olivier Seiller, Herr Dr. Melosch, Herr Kollege Gravert, sehr geehrte Teilnehmerinnen und Teilnehmer der 20. Hülsenberger Gespräche, verehrte Festgäste,

anlässlich der 20. Hülsenberger Gespräche eine Würdigung dieser Veranstaltungsreihe vornehmen zu dürfen, empfinde ich als besondere Ehre und reizvolle Aufgabe.

»Gespräche« sind laut Duden definiert als »Unterhaltung« oder »Längere Rede und Gegenrede«.

Auf die Hülsenberger Gespräche treffen beide Bedeutungen zu: In Rede und Gegenrede wurden 19-mal und werden 2004 zum 20. Mal wichtige Fragen und Problembereiche der Ernährung, Haltung, Züchtung und Gesundheit von landwirtschaftlichen Nutztieren, einschließlich ihrer Bedeutung für die Wirtschaftlichkeit, für die Produktqualität und damit für den Konsumenten, interdisziplinär diskutiert.

Was die Unterhaltung anbetrifft, so haben Rahmen und Geselligkeit der Hülsenberger Gespräche auch dieser Bedeutung des Begriffs immer optimal entsprochen, ganz abgesehen davon, dass auch das wissenschaftliche Gespräch durchaus einen gewissen Unterhaltungswert haben kann.

Dafür, dass Reden und Gegenreden in einer konstruktiven Ordnung aufeinander folgen, sorgen die Kuratoren der Stiftung als Diskussionsleiter. Die Diskussionsbeiträge werden im Tagungsbericht veröf-

fentlicht, da sie Wert und Charakter der Hülsenberger Gespräche wesentlich mit prägen.

Die ersten Hülsenberger Gespräche fanden 1965 in Hülsenberg statt. 1965 war sozusagen das Geburtsjahr, während die geistige Zeugung schon 2 Jahre früher datiert. Es war, wenn ich die Dokumentationen richtig interpretiere, kein »Urknall«, sondern eine Art Ideenkaskade, die zur Einrichtung der Hülsenberger Gespräche führte. Entscheidende Inspirationen ergaben sich anlässlich einer 25-Jahrfeier der Firma Schaumann, zu der Herr Schaumann führende Tierwissenschaftler zwecks Zusammenführung, wie er das genannt hat, nach Hülsenberg eingeladen hatte.

Eine wichtige Rolle für die Realisierung wird auch einem Gespräch zugeschrieben, das Herr Dr. Kühn, Firma Schaumann, mit Herrn Prof. Wöhlbier, damals Vorsitzender der Gesellschaft für Ernährungsphysiologie der Haustiere, geführt hat. Mir liegt zwar der Inhalt des Gespräches nicht vor, aber ich könnte mir vorstellen, dass es sich unter Anderem um folgende Gegebenheiten der frühen 60er Jahre gedreht hat:

Agrar- und Veterinärwissenschaften in Deutschland haben erfreulicherweise wieder Anschluss gefunden an internationale Standards und Entwicklungen.

Neue Wissensgebiete, Denkmodelle und Methoden wurden in die Arbeit der relevanten wissenschaftlichen Institute integriert. Dadurch hat sich der Erkenntnisfortschritt erheblich beschleunigt, so dass dessen Vermittlung in die Fachwelt und interes-

sierte Öffentlichkeit damit häufig nicht gebührend Schritt halten kann.

Die zunehmende Komplexität von Problemen und Lösungsperspektiven erfordert Teamarbeit und Interdisziplinarität in der Forschung und in der Verwertung ihrer Ergebnisse, die noch nicht optimal realisiert sind.

Wohl werden die immer umfangreicher erarbeiteten Forschungsergebnisse in diversen Fachzeitschriften veröffentlicht sowie auf Kongressen vorgestellt und diskutiert. Oft genug sind aber dabei die Vertreter eines engeren Fachgebietes unter sich und erörtern spezielle fachwissenschaftliche Fragen.

Die Umsetzung wissenschaftlicher Erkenntnisse in praktische Entwicklungen und Anwendungen wirft eine Fülle von Problemen auf, die unter anderem auch im Versuchsgut Hülsenberg bearbeitet werden.

Das Fazit des Gespräches zwischen Prof. Wöhlbier und Dr. Kühn darf man sich in etwa so vorstellen:

Es ist an der Zeit, interdisziplinäre Experten-Gespräche zu organisieren, in denen gemeinsam interessierende Themenbereiche anhand des aktuellen Wissensstandes ohne den üblichen Zeitdruck ausdiskutiert werden können!

Die weitere Unterhaltung hat wahrscheinlich dann strategischen, organisatorischen, finanziellen, vielleicht auch noch personellen Fragen gegolten. Zum Abschluss werden die Gesprächspartner wohl noch den Namen »Hülsenberger Gespräche« kreiert und auf einen erfolgreichen Start des Vorhabens angestoßen haben.

Wenn auch im Prinzip Diskussionsveranstaltungen in den beteiligten Fachgebieten nicht neu erfunden zu werden brauchten, denn wir erinnern uns wohl alle an die bereits seit Jahren an agrarwissenschaftlichen und veterinärmedizinischen Hochschulstandorten organisierten »Kolloquien«, so schälte sich doch sehr bald der besondere Charakter der Hülsenberger Gespräche heraus.

Die ersten Hülsenberger Gespräche 1965 waren noch sehr vom Hochschulstandort des Mit-Initiators Prof. Wöhlbier geprägt. Unter seiner Leitung trugen 8 Referenten aus Hohenheim Probleme und Erkenntnisse aus analytischen und stoffwechselphysiologischen Bereichen vor, die vom geladenen, interdisziplinär zusammengesetzten Teilnehmerkreis diskutiert wurden.

Die ersten Hülsenberger Gespräche waren so erfolgreich, und wurden in einem Maße als »Neuererscheinung« empfunden, dass die Fortsetzung programmiert war.

Enge Wechselwirkungen zwischen den ersten Hülsenberger Gesprächen und der Gründung der Heinrich Wilhelm Schaumann-Stiftung werden in entsprechenden Dokumenten konstatiert. Die Gründung der Schaumann-Stiftung erfolgte im März 1967, womit auch ein Gremium installiert wurde, dass fortan die Hülsenberger Gespräche thematisch konzipieren und die Durchführung planen und begleiten sollte, nämlich das Kuratorium der Stiftung. Hier sind nun wiederum Namen zu nennen, deren Inhaber als frühe Kuratoriumsmitglieder hervorragenden Anteil an der Begründung, inhaltlichen Gestaltung und konzeptionellen Entwicklung hatten, nämlich die Professoren Brüggemann, Lenkeit und Kirsch. Alle Anwesenden wissen wohl um die großen wissenschaftlichen Verdienste der genannten Herren. Mir erscheint auch wichtig, dass sie bereits die verschiedenen in den Hülsenberger Gesprächen behandelten fachlichen Aspekte repräsentierten, nämlich Agrarwissenschaften und Veterinärmedizin, Tierernährung und Ernährungsphysiologie, Tierzucht und Genetik.

Für die Folgezeit haben die Kuratoren, die ich jetzt aus Zeitgründen nicht alle namentlich nennen kann, mit ihren jeweiligen Vorsitzenden – derzeit Herr Dr. Melosch – einen erheblichen Teil ihrer Kuratoriumsarbeit dem Erfolg der Hülsenberger Gespräche gewidmet. Die jeweilige Findung des thematischen Konzepts und dessen inhaltliche Ausgestaltung gehörten immer zu den anregendsten Beratungsgegenständen des Kuratoriums.

Hervorragenden Anteil am Erfolg und Gelingen der Hülseberger Gespräche hatten und haben stets die 1. Vorsitzenden der Stiftung, Prof. Heigener und, seit 1992, Prof. Gravert. An dieser Stelle verdient auch besondere Erwähnung, dass der Stiftungs-Vorstand einige Monate vor den Hülseberger Gesprächen die Referenten aufsucht, um sich in Gesprächen über deren Vortragskonzept zu informieren und ihnen die mit der Veranstaltung und dem jeweiligen Generalthema verbundenen Intentionen zu vermitteln.

Womit haben sich nun die 20 Hülseberger Gespräche befasst?

Die ersten 5 Hülseberger Gespräche standen noch nicht unter einem Generalthema, befassten sich aber schon schwerpunktmäßig mit den unterschiedlichen Problemfacetten der Ernährung, Zucht, Haltung und Gesundheit bei Rindern und Schweinen, sowie mit Qualitätsproblemen bei den Produkten Milch und Fleisch.

Die Generalthemen der 15 Hülseberger Gespräche seit 1976 konzentrierten sich auf folgende Inhalte:

4 Generalthemen waren auf die interdisziplinären Aspekte der Erzeugung von Milch, Fleisch und Ferkeln ausgerichtet. Mit Fragen der Tiergesundheit und Fruchtbarkeit der Nutztiere befassten sich 3 Hülseberger Gespräche. 3 Termine waren jeweils der Lebensmittelsicherheit, dem Verbraucherschutz und dem Umweltschutz gewidmet. Je eines der Hülseberger Gespräche hatte das wirtschaftseigene Futter, Tierhaltung und Tierschutz, Biotechnologie und Ökonomie als inhaltliches Generalthema. Und in diesen Tagen befassen sich die 20. Hülseberger Gespräche mit mikrobiologischen Fragen der Tierernährung.

Die Hülseberger Gespräche spiegeln mit ihrer jeweiligen Thematik auch wesentliche Entwicklungen und Perspektiven im Agrarbereich wider. So läuft die fachliche Spur von anfänglich mehr tierernährungs- und produktionsbezogenen Themen weiter über Fragen der modernen Züchtung, der Tiergesundheit, der Lebensmittelqualität und -sicherheit, hin zu Fragen

der tier- und umweltgerechten Tierhaltung und der Biotechnologie bis zu den integrativen und globalen ökonomischen Perspektiven in den 19. Hülseberger Gesprächen.

Der zunehmenden Interdisziplinarität der Agrarforschung wurde unter Anderem Rechnung getragen durch einschlägige Beiträge von Molekularbiologen, Ethologen und Ethikwissenschaftlern, Psychologen, Informatikern und auch von Medienexperten. Dementsprechend erweiterte sich auch die institutionelle Beteiligungspalette, und zudem wurden Referenten aus fachrelevanten Ministerien und Administrationen, aus der Lebensmittelindustrie oder aus der Beratungspraxis, gewonnen.

Es versteht sich fast von selbst, dass eine Veranstaltung wie die Hülseberger Gespräche sich auch international orientiert. Immer waren Teilnehmer und Referenten aus dem benachbarten Ausland, ebenso auch von der EU-Administration oder der FAO, beteiligt. Auch die 20. Hülseberger Gespräche werden durch internationale Präsenz bereichert.

Ich möchte an dieser Stelle auch die stets sehr substantiellen Grußworte hervorheben, mit denen kompetente und prominente Persönlichkeiten die Hülseberger Gespräche bedacht haben.

Wie sind nun die 20 Hülseberger Gespräche zu bewerten? Dazu möchte ich einige Kriterien kurz kommentieren. Meine Berechtigung, das zu tun, leite ich auch daraus ab, dass ich bereits an den 2. Hülseberger Gesprächen 1967 als Referent teilgenommen habe, und seitdem, bis auf wenige Ausnahmen, dabei war:

1. Die Hülseberger Gespräche zeichnen sich durch einen hohen Grad an Aktualität aus. Mit der Aktualität war oft auch agrarpolitische Brisanz verbunden, durch die den Tagungsergebnissen häufig zusätzliche Bedeutung zukam. Generalthemen und Beiträge sind wichtig für Erzeuger und Verbraucher, für vor- und nachgelagerte Bereiche, und nicht zuletzt, unter den Stichworten Tiergesundheit und Tierschutz, für die gehaltenen Tiere.

2. Referate und Diskussionsbeiträge sind durch Authentizität gekennzeichnet. Dafür stehen Vortragende und Teilnehmer, die stets zu den führenden Fachleuten ihrer Disziplin zu rechnen sind. Ich will hier auch erwähnen, dass alle diese hervorragenden Experten für ihre Referate keine Honorare verlangen. Ich deute das dahingehend, dass Geben und Nehmen sich bei der Teilnahme an den Hülsenberger Gesprächen die Waage halten, und dass die fachlichen Anregungen und Informationen auch für die Referenten einen hohen Stellenwert haben.
3. Die einzelnen Themenbereiche und Probleme können erschöpfend und ohne Zeitdruck diskutiert werden. Im Allgemeinen herrscht auch eine erfreuliche Disziplin hinsichtlich der Kürze von Fragen und Antworten, so dass viele zu Wort kommen, und sich auf diese Weise echte Gespräche um einen Problembereich entwickeln können.
4. Ich habe es immer als sehr wohltuend empfunden, dass sich die Hülsenberger Gespräche auch durch eine gepflegte Gesprächskultur auszeichnen. Nie habe ich, bei aller Härte und allem Nachdruck in der Sache, Diskussionsbeiträge erlebt, die einen Kontrahenten herabsetzen oder kränken könnten. Zu der angenehmen Tagungsatmosphäre trägt, neben Tagungsort und Tagungscharakter, sicherlich auch die integrierende Funktion der die Tagung einrahmenden und begleitenden Geselligkeit bei, die durch die daran teilnehmenden Gäste und Begleitpersonen zusätzlich bereichert wird.
5. Durch die Veröffentlichung der Referate und Diskussionsbeiträge in einem Tagungsband, und neuerdings auch im Internet, wird eine große Breitenwirkung erzielt. Die Nachfragen dokumentieren das intensive und fachlich breit gefächerte Interesse.

Insgesamt kann man feststellen, dass die Hülsenberger Gespräche ihren festen Platz im Beziehungsgefüge *Wissenschaft – Erzeugung – Verarbeitung – Verbrauch* von Nahrungsmitteln, vor allem tierischer Herkunft, einnehmen. Sie haben wissenschaftliche Kontakte gefördert und auf diese Weise zur Kooperation angeregt.

Sicherlich gehen auch manche Forschungsansätze und Projektkonzeptionen in den letzten 40 Jahren auf aus den Hülsenberger Gesprächen mitgenommene Inspirationen zurück. Es ist wohl auch nicht zu vermessen, zu glauben, dass die Beteiligung an den Hülsenberger Gesprächen für manche Kollegin und manchen Kollegen einen Mosaikstein zur wissenschaftlichen Entwicklung und Karriere beigetragen hat. Nicht unerwähnt bleiben darf natürlich der fördernde Einfluss auf gegenseitige Befruchtungsvorgänge zwischen Wissenschaft und Praxis.

Vielleicht bringe ich die Bewertung der Gespräche am Besten auf den Punkt, indem ich aus der Festrede von Herrn Kollegen Karg anlässlich des 25jährigen Bestehens der Schaumann-Stiftung seine Feststellung übernehme, dass wir ohne diesen mit den Hülsenberger Gesprächen verbundenen Brückenschlag alle um einen Erfahrungshorizont ärmer wären. Oder, um es ins Positive zu transformieren: die Hülsenberger Gespräche haben uns alle reicher gemacht.

Zum Ende meiner Betrachtungen möchte ich einen herzlichen Dank abstatten an die Gesellschafter der Unternehmensgruppe Schaumann für die Förderung der Hülsenberger Gespräche über die H. W. Schaumann-Stiftung.

Wir wissen es hoch zu schätzen, verehrte Herren Olivier und Charles Seiller, dass diese Veranstaltung sich auch in Ihrer Einschätzung eines hohen Stellenwertes erfreut. In diesen Dank einbezogen ist natürlich die Management- und Leitungsebene, aus der ich auch, stellvertretend für alle weiteren verdienstvoll Beteiligten, Herrn Buchleitner herzlichen Dank sage.

Gerne möchte ich auch noch einmal bewusst machen, dass die Hülsenberger Gespräche untrennbar mit Namen und Persönlichkeit von Heinrich Wilhelm Schaumann verbunden sind. Von seinem Hülsenberg sind die Gespräche einst ausgegangen, und als Firmen- und Stiftungsgründer hat H. W. Schaumann unter Anderem auch die materielle Basis für die Durchführung der Hülsenberger Gespräche gelegt. Als Vorsitzender des Kuratoriums hat er viele Jahre die Hülsenberger Gespräche eröffnet.

Ihm zur Seite stand in diesen Aktivitätsbereichen Frau Irene Schaumann, auch in ihrer Funktion im Stiftungsvorstand.

So schließt die Würdigung der 20 Hülsenberger Gespräche auch ein dankbares Gedenken an das Ehepaar Schaumann ein.

Prof. Brüggemann hat in seiner Eröffnungsrede 1967 den Hülsenberger Gesprächen einen festen Platz in der Zukunft der wissenschaftlichen Kommu-

nikationsmöglichkeiten gewünscht. Wir können heute erfreut feststellen, dass seine Hoffnung sich erfüllt hat, und fühlen gleichzeitig eine große Verpflichtung, der Veranstaltung diesen Platz auch weiterhin zu sichern. Dazu können Sie alle auch in Zukunft durch Ihr dankenswertes Interesse und ihre aktive Mitwirkung nachhaltig beitragen. In diesem Sinne wünsche ich den Hülsenberger Gesprächen viele weitere erfolgreiche Auflagen.

# Teilnehmer an den 20. HÜLSENBERGER GESPRÄCHEN 2004

ABEL, Prof. Dr. Hansjörg	Institut für Tierphysiologie und Tierernährung, Göttingen
BAUER, Prof. Dr. Dr. Johannes	Lehrstuhl für Tierhygiene, Freising
BAUMGARTNER, Prof. Dr. Walter	II. med. Universitätsklinik für Klautiere, Wien
BISPING, Prof. Dr. Bernward	Institut für Gewerblich-Technische Wissenschaften, Hamburg
BLAUT, Prof. Dr. Michael	Deutsches Institut für Ernährungsforschung, Bergholz-Rehbrücke
BOESER, Dipl.-Ing. agr. Uschi	Institut für Tierernährung, Bonn
BREVES, Prof. Dr. Gerhard	Institut für Veterinärphysiologie, Hannover
BRUCKMAIER, Prof. Dr. Rupert M.	TUM Lehrstuhl für Physiologie, Freising
BUCHLEITNER, Rudolf	Union Agricole Holding AG, Hamburg
BULLA, Dr. Hans Joachim	H. Wilhelm Schaumann GmbH, Pinneberg
DOPPELREITER, Dipl. Ing. Franz	Bundesamt für Ernährungssicherheit, Wien
DRIEHUIS, Dr. Frank	NIZO food research, Ede, Niederlande
EINSPANIER, Prof. Dr. Dr. Ralf	Institut für Veterinär-Biochemie, Berlin
EISENBRAND, Prof. Dr. Gerhard	Fachbereich Lebensmittelchemie und Umwelttoxikologie, Kaiserslautern
ELLENDORF, Prof. Dr. Dr. Franz	Institut für Tierzucht, Neustadt

ERHARDT, Prof. Dr. Dr. Georg	Institut für Tierzucht und Haustiergenetik, Gießen
FLACHOWSKY, Prof. Dr. Gerhard	Institut für Tierernährung, Braunschweig
GABELL, Prof. Dr. Gotthold	Institut für Veterinär-Physiologie, Leipzig
GRAVERT, Prof. Dr. Dr.h.c. Hans Otto	H. Wilhelm Schaumann Stiftung, Hamburg
GREIFE, Prof. Dr. H. A.	Bayer AG, GB Tiergesundheit, Leverkusen
GROPP, Prof. Dr. Jürgen	Institut für Tierernährung, Ernährungsschäden und Diätetik, Leipzig
HAMMERER, Dr. Johann	Schaumann Agri International GmbH, Brunn, Österreich
HENDERSON, Gemma	Deutsches Institut für Ernährungsforschung, Bergholz-Rehbrücke
HOFFMANN, Prof. Dr. Bernd	Gynäkologische u. Ambulat. Veterinärklinik, Gießen
HOLZER, Dr. Michaela	Lactosan Starterkulturen GmbH & Co. KG, Kapfenberg, Österreich
ISLAM, Khan Md. Shaiful	Vet.-med. Fakultät, Leipzig
JANKNECHT, Dipl. Ing. agr. Gregor	Forschungszentrum Hülsenberg GmbH, Wahlstedt
KALM, Prof. Dr. Dr.h.c. mult. Ernst	Institut für Tierzucht und Tierhaltung, Kiel
KNEIFEL, Prof. Dr. Wolfgang	Institut für Milchforschung und Bakteriologie, Wien
KOCH, Dipl. Ing. agr Knud	H. Wilhelm Schaumann GmbH, Pinneberg
KOOB, Dr. Cornelia	Institut für Gewerblich-Technische Wissenschaften, Hamburg
KRAMER, Dr. Walter	Lactosan Starterkulturen GmbH & Co.KG, Kapfenberg, Österreich
KÜNKEL, Dr. Andreas	BASF AG, Ludwigshafen
KURTZ, Dipl. Ing. agr. Holger	Department für Tierwissenschaften, Freising
KÜTHER, Dr. Klaus	Lohmann Animal Health GmbH & Co. KG, Cuxhaven

LEIBTSEDER, Prof. Dr. Dr.h.c. Josef	Institut für Ernährung, Wien
LETTNER, Dr. Hans-Peter	Lactosan Starterkulturen GmbH & Co. KG, Kapfenberg, Österreich
LIEBERT, Prof. Dr. Frank	Institut für Tierphysiologie und Tierernährung, Göttingen
LOH, Dr. Gunnar	Forschungsbereich Ernährungsphysiologie, Dummerstorf
LÜHRS, Dr. Friedrich	UNA-HAKRA Hanseatische Kraftfuttergesellschaft m.b.G., Hamburg
LUKOWICZ, Ltd.RD. Dr. Mathias von	Bayerische Landesanstalt für Fischerei, Starnberg
MÄRKEL, Prof. Dr. Ing. Herbert	Biotechnologie I, TU Hamburg-Harburg, Hamburg
MARTENS, Prof. Dr. Holger	Institut für Veterinärphysiologie, Berlin
MATHIES, Dr. Edmund	Forschungszentrum Hülsenberg GmbH, Pinneberg
MELOSCH, Dr. Viktor	H. Wilhelm Schaumann Stiftung, Hamburg
METGES, PD Dr. Cornelia	Institut für die Biologie landwirtschaftlicher Nutztiere, Dummerstorf
MEYER, Prof. Dr. Dr. Heinrich D.	Institut für Physiologie, Freising
MEYER, Dr. Joachim	BASF AG, 67056 Ludwigshafen
MULL, Dipl. Ing. agr. Jutta	EWM Euro Werbe- und Marketing GmbH, Pinneberg
MÜLLER, Dr. Armin	Lohmann Animal Health GmbH & Co. KG, Cuxhaven
PAHLOW, Dir. und Prof. Dr. Günter	Institut für Pflanzenbau und Grünlandwirtschaft, Braunschweig
PALLAUF, Prof. Dr. Josef	Institut für Tierernährung und Ernährungsphysiologie, Gießen
PECHER, Dr. Hans-Peter	H. Wilhelm Schaumann GmbH, Pinneberg
PETERSEN, MR Dr. Uwe	BMVEL, Bonn
PFEFFER, Prof. Dr. Ernst	Institut für Tierernährung H. Wilhelm Schaumann Stiftung, Bonn

PRICKER, Dr. Hermann	Union Agricole Holding AG, Pinneberg
RAAB, Dr. Leonhard	Forschungszentrum Hülsenberg GmbH, Pinneberg
RADEWAHN, GF Peter	Deutscher Verband Tiernahrung e.V., Bonn
RAMBECK, Prof. Dr. Dr. Walter	Institut für Tierphysiologie, Oberschleißheim
RAMHOLD, Dipl. Ing. Dietmar	IS Forschungsgesellschaft, Wahlstedt
RIMBACH, Prof. Dr. Gerald	Institut für Humanernährung und Lebensmittelkunde, Kiel
ROTH, Prof. Dr. Franz X.	Department für Tierwissenschaften, Freising
ROTH-MAIER, Prof. Dr. Dora A.	Department für Tierwissenschaften, Freising
RÜHLE, Dr. Robert	BASF AG, Ludwigshafen
SAUERWEIN, Prof. Dr. Dr.habil. Helga	Institut für Physiologie, Biochemie und Hygiene der Tiere, Bonn
SCHNEEBERGER, DI Eduard	Forschungszentrum Hülsenberg GmbH, Pinneberg
SCHRAMM, RA Rüdiger	H. Wilhelm Schaumann Stiftung, Hamburg
SCHUH, Prof. Dr. Maximilian	II. med. Universitätsklinik für Klautiere, Wien
SCHWARTING, Prof. Dr. Gerhard	Fachhochschule, Nürtingen
SCHWARZ, Prof. Dr. Frieder	Department für Tierwissenschaften, Freising
SCHWERIN, Prof. Dr. Manfred	Institut für die Biologie landwirtschaftlicher Nutztiere, Dummerstorf
SEILLER, Dipl.-Kfm., M.B.A. Charles A.	H. Wilhelm Schaumann-Stiftung, Hamburg
SEILLER, M.B.A. Olivier M.	H. Wilhelm Schaumann-Stiftung, Hamburg
SIMON, Prof. Dr. Ortwin	Institut für Tierernährung, Berlin
SMIDT, Prof. Dr. Dr.h.c. Dietrich	H. Wilhelm Schaumann Stiftung, Hamburg
SMIDT, Dr. Hauke	Laboratory of Microbiology, Wageningen, Niederlande

SPIEKERS, Dr. Hubert	Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Poing
STANGASSINGER, Prof. Dr. Manfred	Institut für Physiologie, Physiol. Chemie und Tierernährung, München
STEINBERG, Dr. Wolfgang	Research Center for Animal Nutrition, Saint-Louis, Frankreich
STEINHART, Prof. Dr. Dr. Hans	Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie, H. Wilhelm Schaumann Stiftung, Hamburg
STROBEL, Dr. Egbert	Institut für Tierernährung, Braunschweig
SÜDEKUM, Prof. Dr. Karl-Heinz	Institut für Tierernährung und Stoffwechselfysiologie, Kiel
TARAS, Dr. David	Institut für Tierernährung, Berlin
WEISTHOFF, Dr. Wilhelm	H. Wilhelm Schaumann GmbH, Pinneberg
WENK, Prof. Dr. Caspar	Institut für Nutztierwissenschaften, Zürich, Schweiz
WESJOHANN, Markus	Lohmann Animal Health GmbH & Co. KG, Cuxhaven
WINDISCH, Prof. Dr. Dr. habil W.	Abt. Tierische Lebensmittel, Tierernährung und Ernährungsphysiologie, Wien
WINKELMANN, Dr. Jörg	Schaumann Agri International GmbH, Pinneberg
WOLFFRAM, Prof. Dr. Siegfried	Institut für Tierernährung und Stoffwechselfysiologie, Kiel
WÖLGER, DI Reinhold	H. Wilhelm Schaumann GmbH & Co. KG, Brunn, Österreich
WÜRZNER, Dr. Herbert	Bundesamt für Ernährungssicherheit, Wien
ZENTEK, Prof. Dr. Jürgen	Institut für Ernährung, Wien
ZIERENBERG, Dr. Brit	Laves Futtermittelinstitut, Stade





