1. Einleitung und Zielsetzung

Eine wesentliche Voraussetzung für eine optimale Vormagenverdauung beim Wiederkäuer ist die Bildung und Aufrechterhaltung einer stabilen Digestaschichtung im Reticulorumen, die durch eine ausreichende Versorgung der Tiere mit Strukturfaser erreicht wird (Tafaj et al. 2004). Leistungsbedingt werden aufgrund der hohen Energie- und Nährstoffkonzentration häufig große Mengen Kraftfutter als Bestandteil der Diät angeboten, die sich durch Einschränkung der Grundfutteraufnahme antagonistisch zur ausreichenden Strukturversorgung verhalten und daher zu Fermentationsstörungen führen können. Die Partikellänge des Grundfutters sowie das Kraftfutterangebot sind entscheidend an der Qualität der Digestaschichtung beteiligt, die sich in Verdauungsintensität und –ausmaß der Faser widerspiegelt (Tafaj 1996; Zebeli 2006). Faser, das heißt Strukturkohlenhydrate, sind vorwiegende Komponenten der pflanzlichen Zellwand. Sie stellen eine primäre Energiequelle für den Wiederkäuer und für die Proteinsynthese im Pansen dar und werden sowohl in der flüssigen als auch in der festen Phase des Panseninhaltes durch mikrobielle Enzyme hydrolysiert (Chesson und Forsberg 1997). Der Faserabbau ist daher wesentlich von der mikrobiellen Eubiose im Pansen bedingt. Faserspaltende Bakterien nehmen nur einen geringen Anteil an der gesamten Pansenpopulation ein (Weimer et al. 1999; Michalet-Doreau et al. 2002) und gehören zur Gruppe der an Futterpartikeln anhaftenden Mikroorganismen (MO) (Cheng und McAllister 1997), die insgesamt 70-80% der Pansenbakterien umfasst (Legay-Carmier und Bauchart 1989; Yang et al. 2001b). Diese unterschiedliche Verteilung der Mikroorganismen in den Pansenkompartimenten manifestiert sich folglich auch in unterschiedlichen Enzymaktivitäten (Bowman und Firkins 1993; Cheng und McAllister 1997; Martin et al. 1999). Daraus ergibt sich eine begrenzte Aussagekraft von Studien an freier Pansenflüssigkeit für die mikrobielle Verdauung in der festen Phase des Panseninhaltes, die daher getrennt untersucht werden sollte.

Da ein großer Teil der Pansenmikroben unter Laborbedingungen bisher nicht kultivierbar ist (Krause und Russell 1996), besitzen traditionelle Arbeitsmethoden wie Isolationen und Reinkulturen nur eine limitierte Aussagekraft über die Biodiversität und die komplexen Interaktionen der Mikroorganismen im Pansen. Molekularbiologische Verfahren wie die Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) oder die Denaturierende Gradienten-Gel-Elektrophorese (DGGE) erweitern mittlerweile das Spektrum der herkömmlich angewandten Untersuchungsverfahren. Durch ihre hohe Sensitivität und breiten Einsatzmöglichkeiten bieten sie sich zur Untersuchung komplexer ökologischer Systeme, darunter auch des Pansens, an.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, durch Kombination verschiedener Faserlängen und Kraftfutteranteile in der Diät den Einfluss der Faserlänge auf die bakterielle Flora des Pansens, insbesondere jedoch der fibrolytischen Bakterienarten *Ruminococcus albus, Ruminococcus flavefaciens* und *Fibrobacter succinogenes,* in unterschiedlichen Pansenkompartimenten auf molekularbiologischer und enzymatischer Ebene zu untersuchen.

2. Literaturübersicht

Strukturkohlenhydrate, kurz als Faser bezeichnet, sind primäre Komponenten der pflanzlichen Zellwand und stellen eine wichtige Energiequelle für den Wiederkäuer und die mikrobielle Proteinsynthese im Pansen dar. Die Bedeutung der Faserverdauung nimmt insbesondere bei der Entwicklung tiergerechter Fütterungsstrategien für Hochleistungsmilchkühe zu, da hohe Energie- und Nährstoffkonzentrationen in der Ration in Ermangelung ausreichender Grundfutter- und damit Strukturfaseraufnahme zu fütterungsbedingten Stoffwechselstörungen führen können. Für eine optimale Vormagenverdauung wird eine stabile Schichtung der Futtermasse im Pansen angestrebt, die sowohl von der aufgenommenen Menge und Qualität der Strukturfaser als auch von Intensität und Ausmaß der Verdauung der Fasermatte selbst abhängt.

2.1 Wichtigste Fütterungsfaktoren, die den Faserabbau im Pansen beeinflussen

Fütterungsfaktoren beeinflussen das Pansen-Ökosystem. Diese Einflüsse können sich sowohl positiv als auch negativ auf die mikrobielle Aktivität und infolge auch auf die Produktionsleistung des Tieres auswirken (Moharrery und Das 2001).

Nach Mertens (1977) ist die ruminale Verdauung in vier Elemente gegliedert:

1. Verdauungsgeschwindigkeit (Abbaurate)
2. Verdauungs-Verzögerung („digestion lag“)
3. potentielles Ausmaß der Verdauung
4. Passagerate.

Dabei hat jedes dieser Elemente eine ausgeprägte Wirkung auf die Verdauung und wird ihrerseits durch bestimmte Faktoren beeinflusst.

2.1.1 *Beeinflussung der Abbaurate*

Die Abbaurate steht in direkter Beziehung zur scheinbaren Verdaulichkeit. Sie kann durch die morphologische, kristalline oder physikalische Natur der Faser sowie durch Faktoren, die das Wachstum der Pansenmikroben sowie deren faserspaltende Enzyme betreffen, beeinflusst werden (Mertens 1977).

2.1.1.1 *Morphologische, kristalline und physikalische Natur der Faser*

Trotz ihrer einfachen chemischen Zusammensetzung liegt Cellulose in mehreren kristallinen und amorphen räumlichen Strukturen vor. Für die Hydrolyse kristalliner Formen genügt trotz chemischer Homogenität kein einzelnes Enzym. Zum Abbau werden simultan interagierende

Enzym-Cluster oder Multienzymkomplexe benötigt. Hingegen werden lösliche Cellulose-Derivate durch eine endo-β-1,4-Glucanase leicht abgebaut (Schwarz 2001). Für *F. succinogenes* stellt das kristalline Substrat keinen limitierenden Wachstumsfaktor dar. Cellulose und Cellobiose werden mit gleicher Geschwindigkeit abgebaut (Fields et al. 2000). Reinkulturen von *R. flavefaciens* und *F. succinogenes* fermentieren jedoch amorphe Cellulose schneller als kristalline Formen (Weimer et al. 1991). Insgesamt scheint die Kristallinität der Cellulose eher von geringer Bedeutung für die ruminale Cellulose-Verdauung zu sein, die Anheftung einiger Arten variiert jedoch beträchtlich bei unterschiedlichen Cellulose-Allomorphen. Die Abbaurate von Cellulose scheint im Wesentlichen eine Funktion ihrer verfügbaren Oberfläche zu sein (Weimer et al. 1990; Weimer und Odt 1995), da von dieser eher als von der Cellulaseaktivität eine limitierende Wirkung vermutet wird (Fields et al. 2000). Maglione et al. (1997) kamen ebenfalls zu dem Schluss, dass die Kristallinität eine eher unwesentliche Bedeutung für die Abbaurate einnimmt. Bakterienstämme, die Xylan und isolierte Hemizellulosen abbauen, sind meist auch in der Lage, Hemicellulosen aus intaktem Grasheu abzubauen, wobei die Intensität je nach Reifestadium variieren kann (Coen und Dehority 1970).

2.1.1.2 *Ruminaler pH-Wert*

Cellulolytische Bakterienarten sind säureempfindlich (Jeroch et al. 1999). Ihr pH-Optimum liegt bei ca. 6,5-7 (Pfeil 2003). Wiederkäuer besitzen ein gut entwickeltes System, um über Futteraufnahme, Produktion endogener Puffer, Anpassung der Mikrobiota und Absorption von flüchtigen Fettsäuren den pH-Wert im Pansen in einem physiologischen Bereich zu halten (Krause und Oetzel 2006), der ungefähr zwischen pH 5,8-7,0 liegt (Drochner 2007). Schwankungen des ruminalen pH-Wertes im Tagesverlauf liegen im Bereich von 0,5-1 pH-Einheiten (Dado und Allen 1993; Nocek et al. 2002). Werden leicht hydrolysierbare Kohlenhydrate (KH) wie Stärke, Maltose, Saccharose, Monosaccharide, Cellobiose und auch schnell abbaubare Pectine gefüttert, so werden durch die hohe mikrobielle Fermentationsintensität der gärfähigen Substrate große Mengen an Säure im Pansen freigesetzt (Ulbrich et al. 2004). Übersteigt die Säureproduktion die Pufferkapazität, so ist eine Kompensation nicht möglich (Krause und Oetzel 2006). Wird z.B. durch die Fütterung großer Stärkemengen eine hohe Lactatproduktion durch Keime wie *Streptococcus bovis* und *Selenomonas ruminantium* hervorgerufen, so genügt die Abbaukapazität lactatverwertender Arten nicht mehr. Im Panseninhalt reichert sich Lactat an, wodurch der pH-Wert stark absinkt (Pfeil 2003), da das Lactat eine relativ starke Säure (pK_s-Wert 3,8) darstellt (Poole und

Halestrap 1993). Dies kann eine Abnahme der Anzahl säureempfindlicher, cellulolytischer Bakterien hervorrufen, wohingegen die Proliferation säuretoleranter Arten zunimmt, wodurch sich die proportionalen Anteile der Arten verschieben. Im Allgemeinen führen raufutterreiche Rationen zu geringeren Gesamtkeimzahlen als stärkereiche Rationen (Jeroch et al. 1999). Durch Fütterung schnell fermentierbarer und hochverdaulicher KH wird je Zeiteinheit die größte Menge an Pansenmikroben gebildet (Pfeil 2003).

Martin et al. (2001) untersuchten den Einfluss einer Gerstenzulage zu einer Heu-Stroh-Diät an vier pansenfistulierten Kühen und stellten einen Rückgang der Heuabbaurate sowie der Polysaccharidaseaktivität der partikelassoziierten Bakterien (solid associated bacteria, SAB) fest. Dabei wirkte sich die Gerstenzulage negativ auf die fibrolytische Aktivität der SAB, jedoch nicht auf das proportionale Verhältnis der drei wichtigsten Cellulolytenarten, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens* und *Fibrobacter succinogenes*, aus.

Sowohl die Abbaurate als auch das Ausmaß des Celluloseabbaus durch diese fibrolytischen Arten wurden *in vitro* von einem pH-Wert von 6,3 oder darunter teilweise gehemmt. Dabei zeigte *R. albus* eine geringere Sensitivität gegenüber dem sauren Milieu als *R. flavefaciens* und *F. succinogenes* (Hiltner und Dehority 1983). Hoover beschrieb 1986 eine geringe Abnahme der Faserverdauung durch eine moderate pH-Depression bis ca. 6,0, die jedoch ohne Folge auf die Anzahl fibrolytischer Organismen blieb. Erst stärkere Abnahmen auf 5,5 bis 5,0 wurden hier als Grund für ein vermindertes Wachstum und den Rückgang faserabbauender Mikroben sowie die evtl. vollständige Hemmung des Faserabbaus angegeben. In kontinuierlichen Kulturen werden *R. flavefaciens*-Zellen bei einem pH von 6,15 ausgewaschen, gefolgt von *F. succinogenes* bei pH 6,0 und *R. albus* bei pH 5,9 (Russell und Dombrowski 1980), für *R.albus* wurde bei pH-Werten unter 5,0 eine Verminderung der Anheftungsfähigkeit beobachtet, die im pH-Bereich von 5,5 bis 8,0 nicht gegeben war (Morris 1988). Hungate (1966) beschrieb hingegen für eine Cellulase, die aus kontinuierlicher Kultur von *R. albus* gewonnen wurde, ein Aktivitätsmaximum bei pH-Werten zwischen 5,8 und 6,3.

Chow und Russell (1992) beobachteten eine Einstellung des Wachstums von *F. succinogenes* bei pH-Werten unter 5,5. Eine deutliche Beeinträchtigung der Fähigkeit zum Celluloseabbau durch längere Einwirkung eines niederen pH-Wertes konnte nicht festgestellt werden (Hiltner und Dehority 1983). Die Vielzahl der Ergebnisse legt nahe, dass die Aktivität der untersuchten cellulolytischen Bakterien durch geringere Schwankungen des pH-Wertes beeinflusst wird, als deren Wachstum, auf das sich erst deutlich tiefere pH-Werte auswirken.

2.1.1.3 *Ruminale Pufferkapazität*

Kühe sezernieren beim Kauen große Mengen Speichel, die reich an Natrium, Kalium, Bicarbonaten und Phosphaten sind (Van Soest 1994). Aus dem Speichel wird ungefähr die Hälfte des Bicarbonates im Pansen gedeckt (Owens et al. 1998). Die Kauaktivität wird durch verschiedene Charakteristika des Futters wie Volumen, Rohfasergehalt, Futterhärte, Benetzbarkeit, Wassergehalt und Partikelgröße bestimmt (Jeroch et al. 1999). Eine Abschwächung der Pufferkapazität kann durch die Fütterung von Rationen mit ungenügender Strukturwirksamkeit und daraus folgender verminderter Speichelsekretion infolge geringer Wiederkautätigkeit hervorgerufen werden (Mertens 1997; Ulbrich et al. 2004). So wurde bei Verkürzung der Partikellänge (PL) in einer TMR (total mixed ration)-Fütterung ein Rückgang der Wiederkauzeit festgestellt (Grant et al. 1990). Als Folge sind Änderungen des Fermentationsmusters, resultierend in einem engen Acetat:Propionat-Verhältnis, zu beobachten, häufig verstärkt durch Nicht-Faser-Kohlenhydrate (NFC) oder Nicht-Struktur-Kohlenhydrate (NSC) in der Ration (Mertens 1997). Tafaj et al. (1999) maßen bei *ad libitum*-Fütterung von Schafen mit einem geringen Kraftfutter (KF)-Anteil bis 20% der Ration bei Heulängen zwischen 28,7 und 2,9 mm ruminale pH-Werte zwischen 6,2 und 7,3, das heißt Werte in einem für cellulolytische Bakterien physiologischen Bereich (Van Soest 1994). Eine Erhöhung des KF-Niveaus auf 32-40% der Ration führte drei Stunden nach der Fütterung zu negativen Auswirkungen auf pH-Wert und Bicarbonatreserven. Dies wurde über ungünstige Wirkungen des hohen Niveaus auf die Pansenschichtung, die Kauaktivität und daraus folgend auch auf die Speichelsekretion begründet (Tafaj et al. 1999).

Ein weiterer Faktor, der sich auf die Pufferung im Pansen auswirken kann, ist die Fütterungsfrequenz. Wird die KF-Gabe auf mehrere Fütterungszeitpunkte verteilt, können die pH-Stabilisierung sowie der Fermentationsverlauf im Pansen verzögert werden (Jeroch et al. 1999). Andererseits können extreme pH-Schwankungen vermieden werden. Dehority und Tirabasso (1998) glichen durch häufigere Fütterung und Zusatz von Bicarbonat pH-Bedingungen unterschiedlicher Diäten aneinander an. Generell wird bei hoher Fütterungsfrequenz insbesondere schnell fermentierbarer Rationen eine Stabilisierung der Pansenverhältnisse erwartet (Varga und Kolver 1997).

2.1.2 *Beeinflussung der Lag-Phase*

Ein inverser Bezug ist zwischen der Lag-Phase und der scheinbaren Verdaulichkeit gegeben. Die zeitliche Verzögerung des Futterabbaus kann im Zusammenhang mit Einflüssen auf die mikrobiellen Populationen, deren Anheftung an Faserbestandteile oder chemischen und

physikalischen Veränderungen der Faser als Voraussetzung für die beginnende Verdauung stehen. So wurden die Entfernung limitierender Substanzen oder das Quellen der Fasern sowie die Entwicklung einer ausreichend hohen mikrobiellen- und Enzymkonzentration als verzögernde Faktoren vermutet. Mertens (1977) schlug als Erklärung vor, dass die Lag-Phase der Zeitspanne limitierender Enzymkonzentration entsprechen und beim überschüssigen Anstieg der Enzymmenge, einer Kinetik erster Ordnung folgend, in eine zur Substratmenge proportionale Verdauung übergehen könne.

Die Anlagerung cellulolytischer Bakterien an Faserpartikel kann durch die Verkittung der Faserschicht infolge der Fütterung von Stärke in Kombination mit speziellen verkleisternden Proteinen oder durch Fette, die sich als Coating über die Strukturfaser legen und somit die Flüssigkeitsumspülung erschweren, stark beeinträchtigt werden (Jeroch et al. 1999). Zusätzlich scheint die Dauer der Lag-Phase von vielfältigen Interaktionen der bakteriellen Spezies im Pansen abzuhängen (siehe auch Kapitel 2.5.1.1), die um Nährstoffe und Wachstumsfaktoren konkurrieren und dadurch Einfluss auf die cellulolytischen Bakterien nehmen. So wurden lösliche KH in der Diät ebenfalls als mögliche Quelle einer verzögerten Faserverdauung beschrieben. Als Gründe hierfür wurden sowohl deren präferentieller Abbau als auch eine kompetitive Hemmung faserabbauender Mikroorganismen durch einen raschen Anstieg kohlenhydratnutzender Arten in Betracht gezogen (Mertens 1977). Hiltner und Dehority (1983) beschrieben jedoch eine Verkürzung der Lag-Phase der Celluloseverdauung durch die Zugabe eines löslichen KH zur Kultur von *F. succinogenes, R. flavefaciens* und *R. albus* in Cellulose-Bouillon. Dies führten sie auf eine Erhöhung der faserspaltenden Bakterienzahl zurück, da bei Verwendung eines größeren Inokulums das gleiche Ergebnis eintrat. Ebenfalls *in vitro* ergab sich eine erhöhte Lag-Phase der Grünfutterverdauung infolge der Zugabe von Stärke, jedoch keine Beeinflussung der Abbaurate (Mertens und Loften 1980). Mertens (1977) vermutete eine Verkürzung der Lag-Phase durch eine hohe Fütterungsfrequenz, aufgrund derer mikrobielle Populationen durchgehend auf einem hohen Niveau gehalten werden sollen. Bei einer Diät mit hohem Grundfutter (GF)-Anteil konnte jedoch kein Einfluss der Fütterungsfrequenz auf cellulolytische Bakterien festgestellt werden (Dehority und Tirabasso 2001).

2.1.3 *Beeinflussung des potentiellen Ausmaßes der Verdauung und der Passagerate*

Das Ausmaß der Faserverdauung ist das Ergebnis des Gegenspiels von Abbaurate und Passage (Varga und Kolver 1997). Potentielle und scheinbare Verdaulichkeit hängen direkt zusammen und werden in erster Linie von der Faserzusammensetzung bestimmt, wobei

Lignin und Silicat limitierend wirken. Passagerate und potentielle Verdaulichkeit der Faserpartikel konkurrieren miteinander, weshalb Passagerate und Verdaulichkeit ebenfalls invers korrelieren. Auf die Passagerate wirken sowohl die Höhe der Futteraufnahme als auch die Partikelgröße, jedoch auch die Abbaubarkeit des Futters und Physiologie des Tieres (Mertens 1977). Rate und Ausmaß der Faserverdauung hängen in großem Maße von der Populationsgröße cellulolytischer Bakterien ab (Shi et al. 1997).

2.1.3.1 *Partikelgröße und -dichte*

Die Partikelgröße spielt die Schlüsselrolle für die Partikelpassage. Die physikalische Zerkleinerung von Faser hängt primär von der Kau- und Wiederkauaktivität ab (Martin et al. 1999). Die Effizienz der Zerkleinerung während des Wiederkauens wird zusätzlich von der mikrobiellen Fermentation erhöht, die einen wesentlichen Beitrag zur erhöhten Fragilität der Partikel leistet (Chai et al. 1984; Chai et al. 1988). Dickwandige Zellen sind oft so stark lignifiziert, dass eine Verdauung nur vom Zellinneren her ablaufen kann. Der Zugang zum Zell-Lumen ist jedoch häufig bei einer großen PL stark begrenzt (Buxton und Redfearn 1997). Die Resistenz gegenüber der Pansenpassage steigt mit der Partikelgröße (Poppi und Norton 1980), teils als Folge des inversen Bezugs derselben zur Dichte (Sutherland 1988). Aufgrund der Annahme, dass nach der Pansenpassage keine wesentliche Größenreduktion der Partikel mehr stattfindet, wurde mit Siebtechniken anhand von Partikeln aus Kotproben eine kritische Größe für die Pansenpassage bei Rindern und Schafen bestimmt (Poppi et al. 1985). Partikel, die länger als 1,18mm sind, weisen den größten Widerstand gegenüber der Passage auf. Mit dem Überschreiten dieser kritischen Größe tragen sie maßgeblich zur Stimulierung des Kauens und Wiederkauens bei (Poppi und Norton 1980). Auch die Dichte der Partikel spielt für die Passage eine Rolle. Ist die spezifische Dichte zwischen 1,2 und 1,5, so besteht die höchste Passagerate (Murphy et al. 1989). Bei geringerer oder höherer Dichte sind die Partikel schwimmfähig oder sinken ab (Murphy et al. 1989; Kaske und von Engelhardt 1990). Die funktionelle spezifische Dichte der Partikel kann durch Prozesse im Pansen wie Flüssigkeitsaufnahme und die Reduktion der PL vergrößert werden. Aus dem Pansen wandern Partikel ab, die unter der Schwellengröße für die Retention liegen, bzw. die eine höhere Dichte als die Pansenflüssigkeit aufweisen. Dabei steht die Verdaulichkeit in inversem Bezug zur Freisetzungsrate von Partikeln aus der Fasermatte und der Passage aus dem Pansen (Teimouri Yansari et al. 2004). Laut Kaske und Engelhardt (1990) ist die Funktionelle Spezifische Dichte (FSG) geeigneter als Indikator für die mittlere Retentionszeit im Pansen

als die PL. Größere Partikel benötigen jedoch stets mehr Zeit zur Passage des Pansens als kleine.

2.1.3.1.1 *Kraftfutterniveau*

Das Verhältnis von Grundfutter zu Kraftfutter (GF:KF) in einer Ration nimmt Einfluss auf die Passagerate (Colucci et al. 1982). Die Bestandteile des Kraftfutters bestehen für gewöhnlich aus kleineren und schwereren Partikeln als Grundfutter. Daher werden sie mit einer schnelleren Passage assoziiert. Ein Teil dieser höheren Geschwindigkeit ist dabei häufig auch auf eine höhere Futteraufnahme zurückzuführen (Van Soest 1994). Über die Verringerung des potentiellen Ausmaßes der Verdauung von Faser bei Kühen, die Rationen mit hohem KF-Niveau gegenüber Rationen mit hohem GF-Anteil bekamen, wurde berichtet (Van Milgen et al. 1992).

2.1.3.2 *Futteraufnahme*

Physikalische und chemische Charakteristika der Futterbestandteile können einen großen Effekt auf die Trockenmasseaufnahme (Dry Matter Intake, DMI) haben. Als Einflussfaktoren werden Fasergehalt, Hydrolysierbarkeit von Stärke und Faser, Fragilität der Partikel, Silage-Fermentationsprodukte, Fettcharakteristika und –konzentration sowie die Menge an ruminalem Protein und dessen Abbauintensität genannt (Allen 2000).

Die totale DMI wird bei hohem KF-Anteil durch die physiologische, bei hohem GF-Anteil durch physikalische Regulation limitiert (Conrad et al. 1964). Die physiologische Regulation der Futteraufnahme ist jedoch stark leistungsabhängig. Ziel dieser Regulation ist die Aufrechterhaltung einer ausgeglichenen Energiebilanz (Wangsness und Muller 1981). Im Falle eines Energiedefizits reagieren die Tiere daher auf hohe Energiekonzentrationen im GF und KF mit einer Erhöhung der Futteraufnahme (Gruber et al. 2001). Futtermittel mit schneller Fermentationsrate lassen eine kürzere Dauer und geringere Menge der Futteraufnahme erwarten. Wird die DMI mechanisch durch Dehnung des Pansens limitiert, so kann über eine Reduzierung der GF-PL die Aufnahme infolge der höheren Dichte des Futters im Pansen oder die längere für Wiederkauen zur Verfügung stehende Zeitspanne erhöht werden (Allen 2000).