

## 6. ZUSAMMENFASSUNG

Vor dem Hintergrund des Verbots/Verzichts auf verschiedene Leistungsförderer sowie zu erwartender Beschränkungen beim Einsatz antibiotischer Therapeutika sind andere Maßnahmen (v.a. diätetischer Art) erforderlich, mit denen das gerade in der Absetzphase labile Gleichgewicht der Intestinalflora von Ferkeln stabilisiert bzw. die Haftung und Vermehrung pathogener Mikroorganismen gehemmt werden kann.

In der vorliegenden Untersuchung an Absetzferkeln wurde der Einsatz von K-Diformiat, einer in kristalliner Form vorliegenden Verbindung (Formi<sup>TM</sup>LHS, Fa. Norsk Hydro) auf verschiedene Parameter des mikrobiellen Stoffwechsels sowie den Keimbefall im Chymus verschiedener Abschnitte des Verdauungskanals untersucht.

Dazu wurde pelletiertes Ferkelaufzuchtfutter (Ø 14,2 MJ ME, 184 g Rp je kg) an 30 im Alter von 21-25 Tagen abgesetzte Ferkel (Ø KM. 6,7 kg, 3 Durchgänge) ad libitum angeboten (Versuchsfutter: 1,8 % K-Diformiat [~70 % Formiat], Austausch gegen Maisstärke). Nach 5-tägiger Gabe von Kontrollfutter erfolgte die Tötung von 6 Ferkeln, die als „Basistiere“ bezeichnet wurden (um Basiswerte bezüglich verschiedener Chymusparameter, Metabolitkonzentrationen und Keimzahlen zu gewinnen). Die verbliebenen Ferkel wurden in Kontroll- (n = 12) und Versuchsgruppe (n = 12, Futter mit 1,8 % K-Diformiat) aufgeteilt und nach 6-10-tägiger Fütterung getötet, um entsprechende Chymusproben (Magen, Dünndarm [1., 2., 3. Drittel], Caecum, Colon und Rektum) zur Bestimmung von Gesamteinhalt, Trockensubstanzgehalt und pH-Wert sowie Parametern des mikrobiellen Stoffwechsels (biogene Amine, Ammoniak, Laktat, flüchtige Fettsäuren, Formiat) zu entnehmen. In den Abschnitten Magen, Dünndarm 3 und Colon wurde der LPS-Gehalt ermittelt, ebenso die Keimzahlen verschiedener Indikatorkeime (*E. coli*, *Streptokokken*, *Enterokokken*, *Laktobazillen*, gramnegative Anaerobier sowie aerobe Gesamtkeimzahl) bestimmt. Zusätzlich erfolgte eine Punktion der Harnblase zur Bestimmung des pH-Wertes in Hara.

Die Analysemethoden umfassen für Chymusproben etablierte Verfahren: Ammonium-sensitive Elektrode - Ammoniak; coulometrische Titration - Chlorid; ionensensitive Elektrode - Natrium, Kalium; enzymatischer Nachweis - L- Laktat, Formiat, Harnstoff; Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test - Lipopolysaccharide; Gaschromatographie - flüchtige Fettsäuren; High Performance Liquide Chromatography (HPLC) - biogene Amine sowie Standardmethoden der qualitativen und quantitativen Keimbestimmung (Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen).

Die verschiedenen Abschnitte des Magen-Darm-Traktes zeigten keine Unterschiede in Füllung, Trockensubstanz-Gehalt und pH-Wert des Chymus. Die höchsten Konzentrationen an Keimen und Metaboliten mikrobieller Herkunft wurden fünf Tage nach dem Absetzen (Basistiere) bestimmt. Die Gehalte der wichtigsten Säuren (Dünndarm: L-Laktat, Colon: flüchtige Fettsäuren) blieben nicht beeinflusst vom K-Diformiat-Zusatz, allerdings wurde auch keine erhöhte Formiatkonzentration ab dem mittleren Dünndarm ermittelt, während die Ammoniak-Konzentrationen im Magen und cranialen Dünndarm durch den K-Diformiatzusatz signifikant reduziert wurden, ebenso wie der Cadaverin-Gehalt (Lysin-Decarboxylierung ↓) im Inhalt von Magen und caudalem Dünndarm. Die Keimzahlen aller untersuchten Arten/Gruppen (aerobe und anaerobe Gesamtkeimzahl, *Laktobazillen*, *Streptokokken*, *Enterokokken*, *E. coli*) wurden

im letzten Drittel des Dünndarms deutlich verringert. Im Colon waren die Keimzahlen an *E. coli* ebenfalls noch tendenziell niedriger. Diese Ergebnisse sowie die Effekte auf die Keimzahlen sind nachfolgender Tabelle (Angaben:  $\bar{x} \pm s$ ) zu entnehmen:

Zusammenfassende Darstellung der wichtigsten Parameter der mikrobiellen Aktivität bzw. Besiedlung des Chymus von Ferkeln der Basis-, Kontroll- und Versuchsgruppe

Gruppe/Behandlung: Tage nach dem Absetzen:	Basis (n = 6) 5	Kontrolle (n=12) 11-15	Versuch (n=12) 11-15
Ammoniak, Dünndarm 2 (mmol/kg uS)	4,67 <sup>a</sup> ± 3,78	3,21 <sup>a</sup> ± 1,71	0,81 <sup>b</sup> ± 0,44
Cadaverin, Magen (nmol/g uS)	320 <sup>a</sup> ± 389	104 <sup>ab</sup> ± 125	31,2 <sup>b</sup> ± 28,3
Cadaverin, Dünndarm 3 (nmol/g uS)	317 ± 272	245 ± 265	97,3 ± 41,2
Mikroflora, Dünndarm 3 (log/g uS)			
- Aerobier (Gesamtkeimzahl)	8,73 <sup>a</sup> ± 0,39	8,37 <sup>a</sup> ± 0,44	7,63 <sup>b</sup> ± 0,54
- Anaerobier (Gesamtkeimzahl)	8,93 <sup>a</sup> ± 0,39	8,69 <sup>a</sup> ± 0,43	7,93 <sup>b</sup> ± 0,62
- Laktobazillen	8,83 <sup>a</sup> ± 0,39	8,44 <sup>a</sup> ± 0,66	7,54 <sup>b</sup> ± 0,72
- Streptokokken/Enterokokken	7,52 ± 1,25	7,29 ± 1,01	6,73 ± 0,75
- <i>E. coli</i> <sup>1)</sup>	8,07 <sup>(ab)</sup> ± 1,07	7,35 <sup>(ab)</sup> ± 1,22	6,12 <sup>(b)</sup> ± 1,90

<sup>1)</sup> Basis vs. Versuch. p = 0,055

Diese Ergebnisse belegen deutlich antimikrobielle Effekte von K-Diformiat im Darmkanal, die sowohl zu Reduzierung mikrobiell bedingter Nährstoffverluste (forcierte N-Retention) als auch zum Schutz vor einer übermäßigen Vermehrung von Keimen genutzt werden können und im Sinne einer Stabilisierung des intestinalen Milieus in der Absetzphase wirken.

Im zweiten Teil der vorliegenden Untersuchung wurden unter den Bedingungen einer experimentellen oralen Infektion von Absetzferkeln mit potentiell pathogenen Keimen (*Salmonella derby*) mögliche prophylaktische Auswirkungen einer Zulage von 1,8 % K-Diformiat zum Ferkelaufzuchtfutter untersucht. Dabei interessierte insbesondere der Einfluss des K-Diformiats auf die Anhaftung, Vermehrung und Elimination von *Salmonella derby*. Dazu wurde (in Anlehnung an Versuch 1) pelletiertes Ferkelaufzuchtfutter (∅ 14,2 MJ ME, 184 g Rp je kg) an 20 im Alter von 26-27 Tagen abgesetzten Ferkeln (∅ KM: 7,1 kg) ad libitum angeboten (Versuchsfutter 1,8 % K-Diformiat). Die Tiere wurden in Kontroll- (n = 10) und Versuchsgruppe (n = 10, Futter mit 1,8 % K-Diformiat) aufgeteilt und nach 5-tägiger Fütterung oral infiziert (10 ml Bouillonkultur, 4,4 × 10<sup>8</sup> KBE/ml *S. derby*). In wöchentlichen Abständen erfolgte eine Tötung von je 2 Tieren aus der Kontroll- und Versuchsgruppe. Zusätzlich erfolgte eine Entnahme von Rektaltupferproben, Chymusproben aus caudalem Dünndarm und Colon sowie von Dünndarmlymphknoten für einen kulturellen Salmonellennachweis.

K-Diformiat hatte in der vorliegenden Untersuchung jedoch keinen Einfluss auf die Anhaftung, Vermehrung und Translokation von *S. derby*. Die Ausscheidung von *S. derby* über den Kot schien allerdings beschleunigt zu sein.

## 7. SUMMARY

Stefan Kulla.

### Effects of K-diformate on the intestinal microflora and parameters of microbial metabolism as well as various digestive processes in chyme of weaned piglets

Both prohibition of several growth promoters and future restrictions in the use of antibiotic therapeutics make the search for alternatives necessary. It is especially important in weaning piglets to stabilize the intestinal microflora and to prevent adhesion and multiplication of pathogenic microorganisms.

In this study, effects of using K-diformate (crystalline form, Formi<sup>TM</sup>LHS, Norsk Hydro) on various parameters of microbial metabolism as well as effects on the germ content in different parts of the intestinal tract were analysed.

A pelleted feed (Ø 14.2 MJ ME, 184 g crude protein/kg) was fed to 30 piglets weaned at the age of day 21-25 (Ø body weight: 6.7 kg, 3 runs, treatment diet 1.8 % K-diformate [70 % formate] in exchange for maize starch). The animals were fed with control feed for five days. Then „basis animals“ (n = 6) were sacrificed to obtain diverse parameters (counts of bacteria). Thereafter the remaining animals were randomly divided into control piglets (n = 12) and treatment animals (n = 12, diet with 1.8 % K-diformate). After a feeding period of 6-10 days the piglets were sacrificed and the digestive tract was removed (divided into stomach, small intestine 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> part, caecum, colon and rectum). Analyses made were: content, dry matter, pH-value, parameters of bacterial activity (biogenic amines, ammonia, l-lactate, volatile fatty acids, formate). In the stomach, small intestine (3<sup>rd</sup> part) and colon, LPS and bacterial content (*E. coli*, *Streptococci*/*Enterococci*, *Lactobacilli*, gramnegative anaerobes as well as total aerobes) were obtained. In the urine, pH-value was determined. Analyses were made including ammonia (electrode, ion-sensitive), Cl (electrode), Na (electrode), K (electrode), l-lactate (enzymatic determination), formate (enzymatic determination), LPS (LAL-Test), volatile fatty acids (gas chromatography), biogenic amines (HPLC), germ counts (standard methods of quantitative and qualitative determination, Institute of Microbiology and Animal Epidemics).

Content, dry-matter and pH-value in chyme showed no differences in several parts of the intestinal tract. Highest concentrations of germs and microbial metabolites were analysed five days after weaning (basis animals). Contents of most important organic acids (small intestine: l-lactate, colon: volatile fatty acids) were not influenced by addition of K-diformate. Also the concentration of formate in the middle part of small intestine was not increased. Reduction occurred in ammonia in the stomach and proximal small intestine as well as in the concentrations of cadaverin (lysine-decarboxylation) in the content of stomach and distal small intestine. Germ counts (total anaerobes and aerobes, *Streptococci*/*Enterococci*, *Lactobacilli*, *E. coli*) were decreased severely in the distal part of the small intestine, while germ counts in the colon showed only tendentious reduction of *E. coli*. Results and effects on counts of bacteria are listed in the following table ( $\bar{x} \pm s$ ).

Survey of essential parameters of microbial activity respectively intestinal flora in basis, control, and treatment animals

Group/treatment : Day after weaning.	basis (n = 6) 5	control (n=12) 11-15	treatment (n=12) 11-15
Ammonia, small intestine 2 (mmol/kg FM)	4.67 <sup>a</sup> ± 3.78	3.21 <sup>a</sup> ± 1.71	0.81 <sup>b</sup> ± 0.44
Cadaverin, stomach (nmol/g FM)	320 <sup>a</sup> ± 389	104 <sup>ab</sup> ± 125	31.2 <sup>b</sup> ± 28.3
Cadaverin, small intestine 3 (nmol/g FM)	317 ± 272	245 ± 265	97.3 ± 41.2
Microflora, small intestine 3 (log/g FM)			
- aerobes (total)	8.73 <sup>a</sup> ± 0.39	8.37 <sup>a</sup> ± 0.44	7.63 <sup>b</sup> ± 0.54
- anaerobes (total)	8.93 <sup>a</sup> ± 0.39	8.69 <sup>a</sup> ± 0.43	7.93 <sup>b</sup> ± 0.62
- <i>Lactobacilli</i>	8.83 <sup>a</sup> ± 0.39	8.44 <sup>a</sup> ± 0.66	7.54 <sup>b</sup> ± 0.72
- <i>Streptococci</i> <i>Enterococci</i>	7.52 ± 1.25	7.29 ± 1.01	6.73 ± 0.75
- <i>E. coli</i> <sup>(1)</sup>	8.07 <sup>(ab)</sup> ± 1.07	7.35 <sup>(ab)</sup> ± 1.22	6.12 <sup>(b)</sup> ± 1.90

<sup>(1)</sup> basis vs treatment. p = 0.055 FM = fresh matter

Significant antimicrobial effects of K-diformate in the intestinal tract and reduced microbial protein degradation (forced N-retention) were observed. Protection against an excessive increase of germs and stabilisation of intestinal microflora in the weaning period were seen.

In the second part of the study, weaned piglets were infected orally with potential pathogenic *Salmonella derby*. Addition of K-diformate to piglet feed for possible prophylactic effects (adhesion, multiplication and elimination) of *S. derby* was analysed. For this purpose weaned piglets (n = 20; age 26-27 days, Ø body weight 7.1 kg) were fed a pelleted diet (Ø 14.2 MJ ME, 184 g crude protein/kg) ad libitum. The animals were divided into control and treatment group (n = 10, feed with 1.8 % K-diformate) and infected orally (10 ml bouillon, 4.4 x 10<sup>8</sup> cfu/ml of *S. derby*) on the fifth day of feeding. Weekly two animals from the control and treatment group were sacrificed. For the microbial evidence of *Salmonella* rectal swabs, chyme from distal small intestine, colon and small intestinal lymph nodes were taken.

No effects on adhesion, increase and translocation of *S. derby* were observed in this study. The elimination of *S. derby* via faeces seemed to be increased.