



**A *LACTOBACILLUS* SPP. ÉS A *BIFIDOBACTERIUM* SPP. MENNYISÉGI
VIZSGÁLATA KÜLÖNBÖZŐ SERTÉS KORCSOPORTOK BÉLSÁR
MINTÁIBAN**

TEMPFLI KÁROLY – BÁRÁNDI BOGLÁRKA – LENCSES-VARGA ERIKA
Széchenyi István Egyetem, Albert Kázmér Mosonmagyaróvári Kar, Állattudományi
Tanszék,

ÖSSZEFOGLALÁS

A sertések emésztési sajátosságai és bélrendszerük mikroba összetétele az életkorral folyamatosan változnak. Az emésztőrendszer mikrobiótájának jelentős hatása lehet a sertések takarmány-értékesítő képességére és egészségi állapotára egyaránt, emiatt a mikrobiom összetételét feltáró kutatások jelentősége növekszik. Jelen vizsgálatban két sertéstelep különböző korcsoportjaitól (malac I. és II., hízó I. és II., valamint koca) gyűjtöttünk bélsár mintákat, amelyek segítségével megállapítottuk a *Lactobacillus* spp. és a *Bifidobacterium* spp. korcsoportonként kialakuló változásait. A baktériumok mennyiségi meghatározását valós-idejű PCR módszer segítségével végeztük. Eredményeink alapján összességében megállapítható, hogy a *Lactobacillus* spp. mennyisége mindkét vizsgált telepen a malac I. korcsoportban volt a legnagyobb. A telepek között figyelemre méltó eltérés mutatkozott a *Lactobacillus* spp. mennyiségi eloszlásában. A *Bifidobacterium* spp. mennyisége mindkét telepen a malac I. és II. korcsoportokban volt a legkisebb és általánosságban az életkor előrehaladtával fokozatosan növekedett.

**QUANTITATIVE ANALYSIS OF *LACTOBACILLUS* SPP. AND
BIFIDOBACTERIUM SPP. IN FAECAL SAMPLES OF PIGS FROM
DIFFERENT AGE GROUPS**

ABSTRACT

The digestive characteristics and the intestinal microbiota composition of pigs vary considerably with age. The microbiota of the digestive tract can have a remarkable impact on both the feed conversion efficiency and the health status of pigs, and therefore the importance of research on pig microbiome composition is increasing. In the present study, faecal samples were collected on two different farms from various age groups of pigs

(piglet I and II, grower I and II, and lactating sow) to determine the variation of *Lactobacillus* spp. and *Bifidobacterium* spp. quantities in different age groups. Bacteria were quantified by real-time PCR. Based on our results it was concluded that the piglet I group had the highest levels of *Lactobacillus* spp. on both analyzed farms. There was a remarkable difference in the quantitative distribution of *Lactobacillus* spp. between the two farms. *Bifidobacterium* spp. were the lowest in piglet groups I and II on both farms, and – in general – *Bifidobacterium* spp. increased parallel with age.

BEVEZETÉS

Jelenlegi ismereteink szerint a malacok bélrendszere közvetlenül a megszületés előtt még gyakorlatilag mikroba-mentes, majd rendkívül gyors változásokon megy át, míg a baktérium-koncentráció ugrásszerű növekedése mellett a kor előrehaladtával kialakul a viszonylag stabil, kifejlett egyedekre jellemző mikrobióta (Qi *et al.*, 2021). Amellett, hogy a tápanyagok felszívódását és emésztését elősegíti, a sertés mikrobiótának nagy jelentősége van az immunrendszer funkcióinak fejlődésében és szabályozásában, a takarmány energia-tartalmának értékesülésében, egyes szervek fejlődésében, valamint a sertés teljes szervezetét érintő betegségek kialakulásában (Duarte és Kim, 2022). A mikrobák a sertés béltraktusában rendkívül sokféle anyagcseretermék előállításáért felelősek, mint például rövid szénláncú zsírsavak, aminosav származékok, bakteriocinek (Wegh *et al.*, 2019).

A bélsár mikrobióta összetétele nagymértékű korrelációt (0,75) mutat a vastagbél összetételével, míg a vékonybél bakteriális flóráját illetően mérsékelt-közepes (0,38) a hasonlóság (Zhao *et al.*, 2015). Az emésztőrendszer kedvező egyensúlyi állapotát (eubiózis) a probiotikus hatással bíró *Lactobacillus* és *Bifidobacterium* spp. nagy aránya jellemzi (Herceg *et al.*, 2020).

A *Lactobacillus* fajok probiotikus célú felhasználásának a sertés takarmányozásában egyre növekvő jelentőséget tulajdonítanak, mivel kedvező hatásukat figyelték meg a növekedési erély és a hasított test minőségének javításában; fokozzák a béltraktus anyagcsere kapacitását, hozzájárulnak a mikrobiális egyensúly fenntartásához és általánosságban a mikrobióta biztonságos tagjainak tekinthetőek (Valeriano *et al.*, 2016). Számos *Bifidobacterium* faj szerepét hangsúlyozzák a megfelelő bélállapot kialakításában és fenntartásában. Pang *et al.* (2022) probiotikus *Bifidobacterium animalis* kiegészítés mellett választott malacok esetében jelentős mértékű növekedésről és a hasmenés kisebb arányú megjelenéséről számoltak be.

ANYAG ÉS MÓDSZER

A mintavételezést két nagy létszámú sertéstelepen végeztük. Mindkét telepen öt azonos korcsoportot választottunk ki és minden korcsoportból 5-5 friss bélsár mintát gyűjtöttünk. A csoportok kijelölésénél fontos szempont volt, hogy a korcsoportokat legalább két hete az adott takarmánykeverékkel etessék. A korcsoportokat mindkét telep esetében a

lehetőségekhez mérten azonos korú egyedekből választottuk ki. A korcsoportok alapján az öt mintavételi csoportot a malac I-II., hízó I-II., és koca elnevezések jelentik. Mindkét telep esetén ugyanazt az elnevezést használtuk a korcsoportokra, a telepeket pedig „A”-val és „B”-vel jelöltük. Az „A” és „B” telep állományát tekintve hasonló korú egyedek voltak fellelhetőek, az eltérések az egyes korcsoportokban minimálisak.

Az „A” telep esetén a malac I. csoport egyedei 6 hetesek, a malac II. csoport egyedei 10 hetesek, a hízó I. egyedei 21 hetesek, a hízó II. csoport egyedei pedig 26 hetesek voltak a mintavétel időpontjában. A kocák mintavételét úgy időzítettük az „A” telepen, hogy az a várható fialás előtt öt nappal történjen.

A „B” telep esetén a malac I. csoport egyedei 7 hetesek, a malac II. csoport egyedei 10 hetesek, a hízó I. egyedei 21 hetesek, a hízó II. csoport egyedei pedig 23 hetesek voltak. A kocák a „B” telep esetében a mintavételt megelőzően három nappal fialtak.

A DNS izolálást alapvetően *Machiels et al.* (2000) protokollja alapján, de kisebb mintamennyiséggel (0,5 g) végeztük, a további vizsgálatok kezdetéig az izolált DNS mintákat -20 °C-on tároltuk. Az izolált DNS-minták koncentrációját NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) spektrofotométerrel határoztuk meg. A mérések alapján mindegyik minta koncentrációját egységesen 200 ng/μl-re állítottuk be.

A vizsgált baktérium csoportok (összes baktérium, *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp.) relatív mennyiségi vizsgálatát kvantitatív, valós idejű polimeráz láncreakció (qPCR) segítségével végeztük el. A reakciók során felhasznált primerek szekvenciáját az 1. táblázatban mutatjuk be. A 25 μl-es reakciók összeállítása során 12,5 μl SYBR Green qPCR Master Mixet (Thermo Scientific), 1-1 μl forward és reverse primert (Integrated DNA technologies), 9,5 μl nukleázmentes vizet (Thermo Scientific), végül 1 μl izolált DNS-t (200 ng) használtunk fel. A reakciókat Bio-Rad CFX96 Real-Time PCR Detection System készülékben futtattuk a következő beállításokkal: kezdeti denaturáció 95 °C-on 10 percig, majd 40 cikluson át denaturáció 95 °C-on 30 másodpercig, kapcsolódás vagy annealing 15 másodpercig, és elongáció 72 °C-on 15 másodpercig. A specifikus PCR-termékek keletkezését a reakció végére beállított olvadási analízissel ellenőriztük.

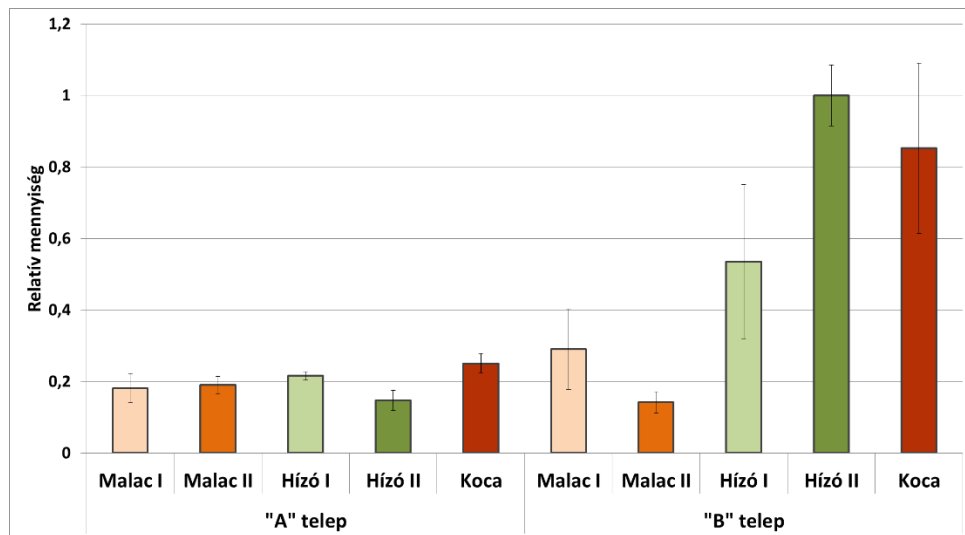
1. táblázat. A qPCR során alkalmazott primerek

	Primer szekvencia (F, R; 5'-3')	Annealing (°C)	PCR-termék hossza (bp)
Összes baktérium ¹	GTGSTGCAYGGYYGTCGTC, ACGTCRTCCMCNCCTTCCTC	55	147
<i>Bifidobacterium</i> spp. ²	CGCGTCCGGTGTGAAAG, CTTCCCGATATCTACACATTCCA	59	126
<i>Lactobacillus</i> spp. ³	AGAGGTAGTAACTGGCCTTTA, GCGGAAACCTCCCAACA	59	391

¹Fuller et al. (2007), ²Malinen et al. (2003), ³Xiang et al. (2011) alapján

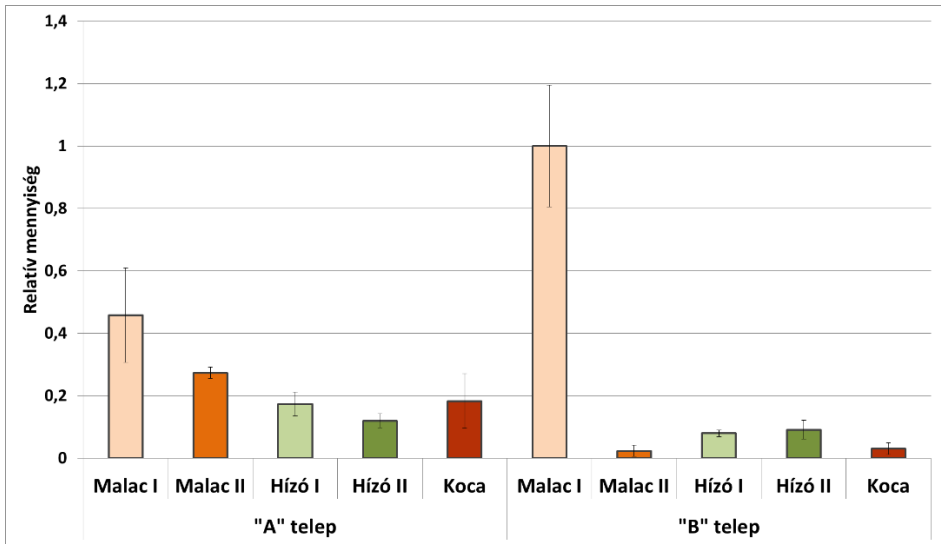
EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉS

Az „A” telepen az összes baktériumok relatív mennyisége valamennyi vizsgált korcsoportban kiegyenlítettnek tekinthető, illetve a kor előrehaladtával alapvetően enyhe növekedést mutatott, továbbá viszonylag kevés baktérium volt megtalálható a malac I., hízó I-II. és a koca csoportokban a „B” telep mintáival összevetve. Ugyanakkor az „A” telep malac II. csoportjában nagyobb összes baktérium mennyiség figyelhető meg a „B” telep hasonló csoportjához képest (1. ábra).



1. ábra. Az összes baktérium relatív mennyiségének alakulása a két vizsgált sertéstelep különböző korcsoportjaiban

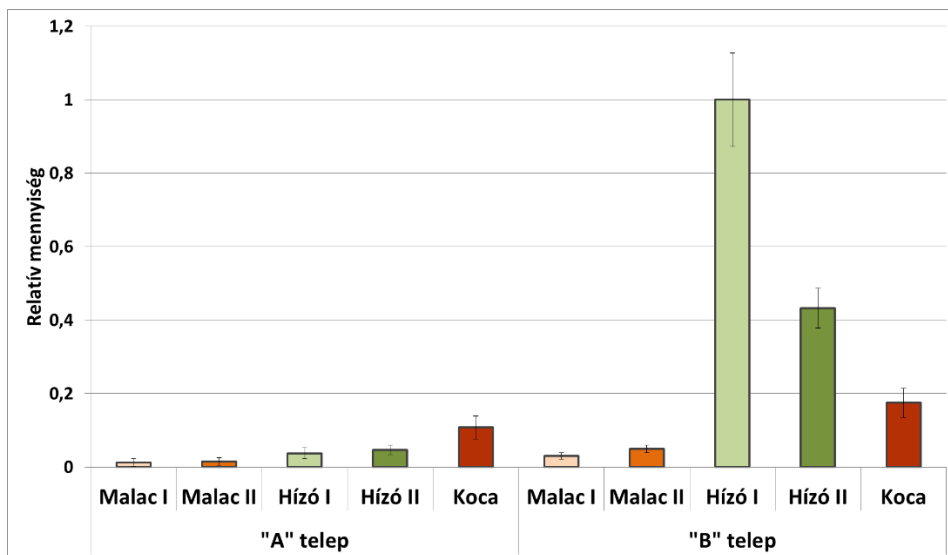
A *Lactobacillus* értékeket megfigyelve (2. ábra) elmondható, hogy az „A” telepen az életkor előrehaladtával általánosságban csökken a relatív mennyiség. A legnagyobb mennyiséget a malac I. csoport egyedeinél mértük, míg a második legmagasabb érték a malac II. csoport egyedeinél figyelhető meg. A hízó I-II. és a koca csoportoknál a *Lactobacillus* mennyiség közel azonos értékű. Weiss et al. (2016) kísérletéhez hasonló eredményt tapasztaltunk, ugyanis az „A” telep egyedei nagy mennyiségű árpát (20-37%) fogyasztottak a takarmánykeverékükben, amely jelentős nyersrosttartalma révén hozzájárulhat a magasabb *Lactobacillus* értékekhez, míg a „B” telepen nem szerepelt árpa a receptúrákban. Mindkét telep esetén a malac I. korcsoport egyedeinél volt a legnagyobb a *Lactobacillus* spp. értéke, ami részben azzal magyarázható, hogy a fiatal egyedekre a laktáz enzim kifejezett aktivitása jellemző, amely a szénhidrátok bontásakor savas közeget teremt, ezáltal kedvez a *Lactobacillus* spp. tagjainak.



2. ábra. A *Lactobacillus* spp. relatív mennyisége a két vizsgált sertéstelep különböző korcsoportjaiban

A *Bifidobacterium* spp. relatív mennyiségét tekintve mindkét telep malacainak esetében viszonylag alacsony értékeket figyeltünk meg (3. ábra). Az „A” telep esetében az életkor előrehaladtával, korcsoportonként nő a *Bifidobacteriumok* száma. A „B” telep esetén ez csak részben mondható el, mert a hízó I. korcsoport után a hízó II. és a koca korcsoportoknál nagyobb mértékű visszaesés tapasztalható. A *Bifidobacterium* spp. mennyisége jelentős mértékben függ a takarmány összetételének alakulásától, kifejezetten a nyersrost arányától. A nyersrost aránya a sertések takarmányozásában a választott malacok csoportjától kezdődően fokozatosan növekszik, míg a legnagyobb rosttartalmat jellemzően a vemhes kocák csoportjában szükséges biztosítani.

Saját megfigyeléseinkhez hasonlóan a takarmány nyersrost tartalmának növelése és a *Bifidobacterium* spp. mennyiségének növekedése közötti összefüggésről számoltak be Heinritz *et al.* (2016). Kísérletükben a nagy zsír- és kis rosttartalmú takarmány a *Lactobacillus* spp. mennyiségét csökkentette a kis zsír- és nagy rosttartalmú izokalorikus étrendhez viszonyítva.



3. ábra. A *Bifidobacterium* spp. relatív mennyisége a két vizsgált sertéstelep különböző korcsoportjaiban

KÖVETKEZTETÉS

Eredményeink alapján megállapítható, hogy az összes baktérium, a *Lactobacillus* spp. és a *Bifidobacterium* spp. mennyisége nagymértékű eltéréseket mutat a vizsgált korcsoportokban, továbbá jelentős különbség figyelhető meg az egyes telepi körülmények és takarmányozási protokoll mellett nevelt azonos korcsoportok között is. Az eltérő sertéstelepi körülményektől függetlenül megfigyelhető, hogy a *Lactobacillus* spp. legnagyobb mennyiségben a malac I. kategóriában mérhető, míg a *Bifidobacterium* spp. mennyisége a malac I. korcsoportnál a legkisebb. A korcsoportokra jellemző mikrobióta egyensúly megismerése és feltárása érdekében elengedhetetlen a különböző nemzetségek mennyiségi vizsgálata, aminek segítségével az általánosan jótékony hatással rendelkező nemzetségek, fajok külső forrásból (pl. mikrobióta transzplantáció) történő pótlásával, dúsításával lehetőség nyílik az eubiózis célzott fenntartására.

IRODALOMJEGYZÉK

- Duarte, M. E. – Kim, S. W. (2022): Intestinal microbiota and its interaction to intestinal health in nursery pigs. *Animal Nutrition*. 8, 169–184.
- Fuller, Z. – Louis, P. – Mihajlovski, A. – Rungapamestry, V. – Ratcliffe, B. – Duncan, A. J. (2007): Influence of cabbage processing methods and prebiotic manipulation of colonic microflora on glucosinolate breakdown in man. *British Journal of Nutrition*. 98, 364–372.
- Heinritz, S. N. – Weiss, E. – Eklund, M. – Aumiller, T. – Heyer, C. M. E. – Messner, S. – Rings, A. – Louis, S. – Stephan S. C. – Mosenthin, R. (2016): Impact of a high-fat or

highfiber diet on intestinal microbiota and metabolic markers in a pig model. *Nutrients*. 5, 1–16.

Herceg E. B. – Lencsés-Varga E. – Szalai K. – Tempfli K. – Bali Papp Á. (2020): Mikrobiom kutatások a sertés mint modellállat segítségével. *Acta Agronomica Óváriensis*. 61, 94–113.

Machiels, B. M. – Ruers, T. – Lindhout, M. – Hardy, K. – Hlavaty, T. – Bang, D. D. – Somers, V. A. – Baeten, C. – von Meyenfeldt, M. – Thunnissen, F. B. (2000): New protocol for DNA extraction of stool. *Biotechniques*. 28, 286–290.

Malinen, E. – Kassinen, A. – Rinttila, T. – Palva, A. (2003): Comparison of real-time PCR with SYBR Green I or 5'-nuclease assays and dot-blot hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes in quantification of selected faecal bacteria. *Microbiology*. 149, 269–277.

Pang, J. – Liu, Y. – Kang, L. – Ye, H. – Zang, J. – Wang, J. – Han, D. (2022): *Bifidobacterium animalis* promotes the growth of weaning piglets by improving intestinal development, enhancing antioxidant capacity, and modulating gut microbiota. *Applied and Environmental Microbiology*. 88, e0129622.

Qi, R. – Qiu, X. – Du, L. – Wang, J. – Wang, Q. – Huang, J. – Liu, Z. (2021): Changes of gut microbiota and its correlation with short chain fatty acids and bioamine in piglets at the early growth stage. *Frontiers in Veterinary Science*. 7, 617259.

Valeriano, V. D. V. – Balolong, M. P. – Kang, D. K. (2016): Probiotic roles of *Lactobacillus* sp. in swine: insights from gut microbiota. *Journal of Applied Microbiology*. 122, 554–567.

Wegh, C. A. M. – Geerlings, S. Y. – Knol, J. (2019): Postbiotics and their potential applications in early life nutrition and beyond. *International Journal of Molecular Sciences*. 20, 4673.

Weiss, E. – Aumiller, T. – Spindler, H.K. – Rosenfelder, P. – Eklund, M. – Witzig, M. – Jørgensen, H. – Bach Knudsen, K. E. – Mosenthin, R. (2016): Wheat and barley differently affect porcine intestinal microbiota. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 96, 2230–2239.

Xiang, Z. T. – Qi, H. W. – Han, G. Q. – Liu, J. – Huang, Z. – Yu, B. (2011): Real-time TaqMan polymerase chain reaction to quantify the effects of different sources of dietary starch on *Bifidobacterium* in the intestinal tract of piglets. *African Journal of Biotechnology*. 10, 5059–5067.

Zhao, W. – Wang, Y. – Liu, S. – Huang, J. – Zhai, Z. – He, C. – Ding, J. – Wang, J. – Wang, H. – Fan, W. – Zhao, J. – Meng, H. (2015): The dynamic distribution of porcine microbiota across different ages and gastrointestinal tract segments. *PLoS ONE*. 10, e0117441.