

Arch. Tierz., Dummerstorf **46** (2003) Sonderheft, 101-106

Institut für die Biologie landwirtschaftlicher Nutztiere (FBN), FB Ernährungsphysiologie „Oskar Kellner“, Dummerstorf, Deutschland; * Wageningen University, Laboratory of Microbiology, Wageningen, Niederlande

JEANNETTE KLÜSS, ANTOON AKKERMANS*, SERGEY KONSTANTINOV*,
MANFRED KWELLA, SIEGFRIED KUHLA, WOLFGANG-BERNHARD SOUFFRANT

Untersuchungen zur mikrobiellen Flora im Ileum von Absatzferkeln

Summary

Title of the paper: **Investigations on ileal microbial flora in weaning piglets**

To characterize ileal microbial flora in weaning piglets a slaughter trial was conducted. 224 German Landrace piglets of both genders were allocated to four different feeding regimes (with or without avilamycin, 3 resp. 8 % crude fibre content). At predefined times pre- and postweaning piglets were sacrificed, the whole intestinal tract was removed and its content collected separately for each section.

The microbial community was examined applying classical plate counting (selective agar plates) and molecular techniques (DGGE, 16SrDNA-sequencing). Furthermore a range of microbial metabolites was determined. Changes in ileal microflora – rather due to age than to diet - were observed pre- and postweaning.

Key Words: weaning piglets, ileal microflora, lactic acid, VFA

Zusammenfassung

Zur Charakterisierung der ilealen mikrobiellen Flora von Absatzferkeln wurde ein Schlachtversuch mit 224 Ferkeln der Deutschen Landrasse durchgeführt. Nach dem Absetzen wurden die Versuchstiere in vier Gruppen aufgeteilt, die unterschiedliches Starterfutter (mit und ohne Avilamycin; 3 bzw. 8 % Rohfasergehalt) erhielten. Zu verschiedenen Zeitpunkten vor und nach dem Absetzen erfolgte die Schlachtung, das Darmkonvolut wurde entnommen und der Inhalt der einzelnen Darmabschnitte gesammelt. Die mikrobiologische Besiedlung des Chymus sowie ausgewählte Metaboliten wurden mittels klassischer Plattenkultivierung, molekularbiologischer Techniken (DGGE, 16SrDNS-Sequenzanalyse) und chemischer Methoden untersucht. Es konnten Unterschiede in der Mikroflora vor und nach dem Absetzen festgestellt werden, die eher alters- als diätabhängig begründet sind.

Schlüsselwörter: Absatzferkel, ileale Mikroflora, Milchsäure, FFS

Einleitung

In der Schweineproduktion ist das Absetzen der Ferkel eine der einschneidendsten Maßnahmen in deren Leben. Um eine hohe Effektivität der Schweineproduktion zu gewährleisten, sind Ferkel immer früher abgesetzt worden, so dass das heute übliche Absatzalter in Europa zwischen 21 und 28 Tagen liegt. Die damit einhergehenden Probleme (erhöhtes Auftreten von Diarrhoe und Atemwegserkrankungen) sind mit Stagnation bzw. Reduzierung der Gewichtsentwicklung und dadurch mit finanziellen Verlusten für den Landwirt (längere Mastdauer, Tierverluste, erhöhte Tierarzkosten) verbunden. Um dem entgegen zu wirken, kamen vielfach Antibiotika im Ferkelstarterfutter zum Einsatz.

Internationale Studien und Untersuchungen haben das vermehrte Auftreten von Kreuzresistenzen (WEGENER et al., 1998) zwischen Futterantibiotika und den in Human- und Veterinärmedizin verwendeten Antibiotika und Chemotherapeutika nachgewiesen. Als Konsequenz kam es EU-weit zum Verbot von Antibiotika als Futterzusatzstoff in der Tierproduktion.

Innerhalb der EU wurde die Suche nach akzeptablen Alternativen bzw. Strategien notwendig (JENSEN, 1998). Um deren Wirkung eindeutig beurteilen zu können, ist die Kenntnis der zum Absatzzeitpunkt im Gastrointestinaltrakt (GIT) der Ferkel auftretenden Veränderungen – speziell der intestinalen Mikroflora - von besonderem Interesse.

Die vorliegenden Untersuchungen hatten die Charakterisierung der ilealen Mikroflora von Ferkeln zum Zeitpunkt des Absetzens zum Ziel.

Material und Methoden

Versuchstiere und Fütterung: Der Versuch wurde in der institutseigenen Schweinezuchtanlage mit Ferkeln der Deutschen Landrasse beiderlei Geschlechts unter konstanten Haltungsbedingungen (26 bis 28°C und natürliches Licht) durchgeführt. Bis zum Absetzen am 28. Lebenstag wurden die Tiere konventionell an der Sau ohne Beifütterung aufgezogen. Am Absatztag wurden sie gewogen und in Gruppenbuchten zu je 8 Tieren eingestallt. Bei ad libitum Fütterung und freiem Wasserzugang kamen folgende Diäten zum Einsatz: zwei Mischungen gleicher Zusammensetzung mit (Fr+AB) und ohne (Fr-AB) Avilamycin (40 ppm) und zwei auf Getreide und Leguminosen basierende Mischungen mit unterschiedlichem Rohfasergehalt (NF, 3% RFA; HF, 8% RFA). Die Mischungen wurden so berechnet, dass sie den Empfehlungen des NRC (1998) für Absatzferkel entsprechen.

Versuchsanstellung, Probengewinnung und Analysen: Jeweils 2 x 8 Ferkel wurden sechs Tage vor, am Absatztag oder einen, fünf und 15 Tage nach dem Absetzen getötet. Der komplette GIT wurde entnommen. Der Dünndarm wurde von proximal nach distal in drei gleiche Teile geteilt, die als Duodenum, Jejunum bzw. Ileum definiert wurden. Von jedem Abschnitt wurde der gesamte Darminhalt entnommen und von jeweils vier Tieren gepoolt.

Zur klassischen Bestimmung der Mikroflora wurden Verdünnungsreihen der Proben angefertigt, auf Selektivnährböden (Sifin®) Laktobazillen und Enterobakterien kultiviert und die koloniebildenden Einheiten [log KBE/g] ausgezählt.

Die molekularbiologischen Untersuchungen Denaturing-Gradient-Gel-Electrophoresis (DGGE) und 16SrDNS-Sequenzanalyse erfolgten nach den methodenspezifischen Verfahren (SANGUINETTI et al., 1994). Die flüchtigen Fettsäuren wurden mittels Gaschromatographie (GEISSLER et al., 1976) und Milchsäure nach dem modifizierten kolorimetrischen Verfahren (HAACKER et al., 1983) bestimmt.

Ergebnisse

Versuchstiere:

Über den gesamten Versuch zeigten die Tiere keine äußeren Anzeichen von Erkrankungen, Tierverluste traten nicht auf. Zum jeweiligen Schlachtzeitpunkt waren die Lebendmassen zwischen den Versuchsgruppen nicht signifikant unterschiedlich.

Metabolite:

Ein Anhaltspunkt über die im Verdauungstrakt ablaufenden mikrobiellen Prozesse kann mit der Bestimmung der mikrobiellen Stoffwechselprodukte im Chymus der jeweiligen Darmabschnitte erhalten werden.

Der Gehalt an Milchsäure spiegelt die Aktivität der Laktobazillen wider (Tab. 1). In den vorliegenden Untersuchungen sank die Milchsäurekonzentration bis einen Tag

nach dem Absetzen und stieg danach allmählich wieder an. Ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Diäten war nicht erkennbar. Die Konzentration der flüchtigen Fettsäuren (FFS) im Ileum war erwartungsgemäß niedrig, da sie bei gesunden Tieren vorwiegend von den Dickdarmbakterien produziert werden. Die in Tabelle 1 dargestellten konstanten Werte zeigen, dass die Bildung der FFS unabhängig von Alter und Fütterungsregime war.

Tabelle 1

Gehalt an Milchsäure und flüchtigen Fettsäuren im ilealen Chymus von Ferkeln vor und nach dem Absetzen bei unterschiedlicher Fütterung (Mittelwert \pm Standardabweichung) (Content of lactic acid and volatile fatty acids in ileal digesta of piglets pre- and postweaning and fed different diets; mean \pm SD)

Tag vor und nach dem Absetzen	Sauenmilch (SM)	Diät 1 (Fr+AB)	Diät 2 (Fr-AB)	Diät 3 (NF)	Diät 4 (HF)
Milchsäure (mmol/l)					
- 6	21,1 \pm 9,4				
0	8,2 \pm 2,7				
1		7,7 \pm 1,7	7,9 \pm 3,3	17,4 \pm 19,7	7,5 \pm 4,5
5		9,7 \pm 4,3	26,3 \pm 10,5	30,1 \pm 26,2	25,0 \pm 28,3
15		28,2 \pm 7,4	21,3 \pm 22,5	35,9 \pm 24,3	23,9 \pm 35,8
Flüchtige Fettsäuren (mmol/l)					
- 6	12,3 \pm 7,1				
0	8,3 \pm 0,6				
1		9,3 \pm 4,0	9,0 \pm 7,9	5,8 \pm 4,4	17,4 \pm 15,0
5		4,9 \pm 2,3	8,2 \pm 7,7	3,0 \pm 4,1	4,8 \pm 4,1
15		9,3 \pm 2,9	5,5 \pm 4,9	6,5 \pm 4,5	5,1 \pm 2,9

Mikrobiologie:

Die bakteriellen Metabolite Milchsäure und flüchtige Fettsäuren geben keine direkte Auskunft über die tatsächliche mikrobielle Besiedlung des Ileums. Eine Methode zur direkten Erfassung der intestinalen Mikroflora ist die klassische Mikrobiologie, deren Ergebnisse in Tabelle 2 zusammengefasst sind. Die höchste Besiedlung mit Laktobazillen konnte im Ileumchymus vor dem Absetzen festgestellt werden. Der weitere Verlauf der Besiedlung mit Milchsäurebakterien ist komplementär zu dem der beobachteten Milchsäurekonzentration. Ein leichter Anstieg der Besiedlung des Ileums mit Enterobakterien war bis fünf Tage nach dem Absetzen zu verzeichnen. Anschließend reduzierte sich deren Anzahl wieder auf das Ausgangsniveau (sechs Tage vor dem Absetzen; Tab. 2). Während am ersten Tag nach dem Absetzen für Enterobakterien signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen beobachtet wurden, konnte im weiteren Verlauf kein signifikanter Einfluss der Futtermischungen auf die Enterobakterien und Laktobazillen im Ileum festgestellt werden. Ähnliche Angaben zu Enterobakterien und Laktobazillen im Ileum von Saug- und Absatzferkeln wurden von DECUYPERE und VAN DER HEYDE (1972), KOVACS et al. (1972), GEDEK et al. (1993) und MIKKELSEN und JENSEN (1998) mitgeteilt.

Um einen Überblick über die Diversität der mikrobiellen Ileumflora zu bekommen, wurde ein „fingerprint“ mittels DGGE angefertigt. Das DGGE-Profil der untersuchten Tiere (Abb.) ist relativ einheitlich und somit weitestgehend unabhängig vom Alter der Tiere und der aufgenommenen Nahrung. Das erhaltene Profil weist nur drei dominante Banden auf: eine untere und eine obere in den Proben vor und nach dem Absetzen, sowie eine mittlere. Diese mittlere Bande konnte nur nach dem Absetzen im Chymus

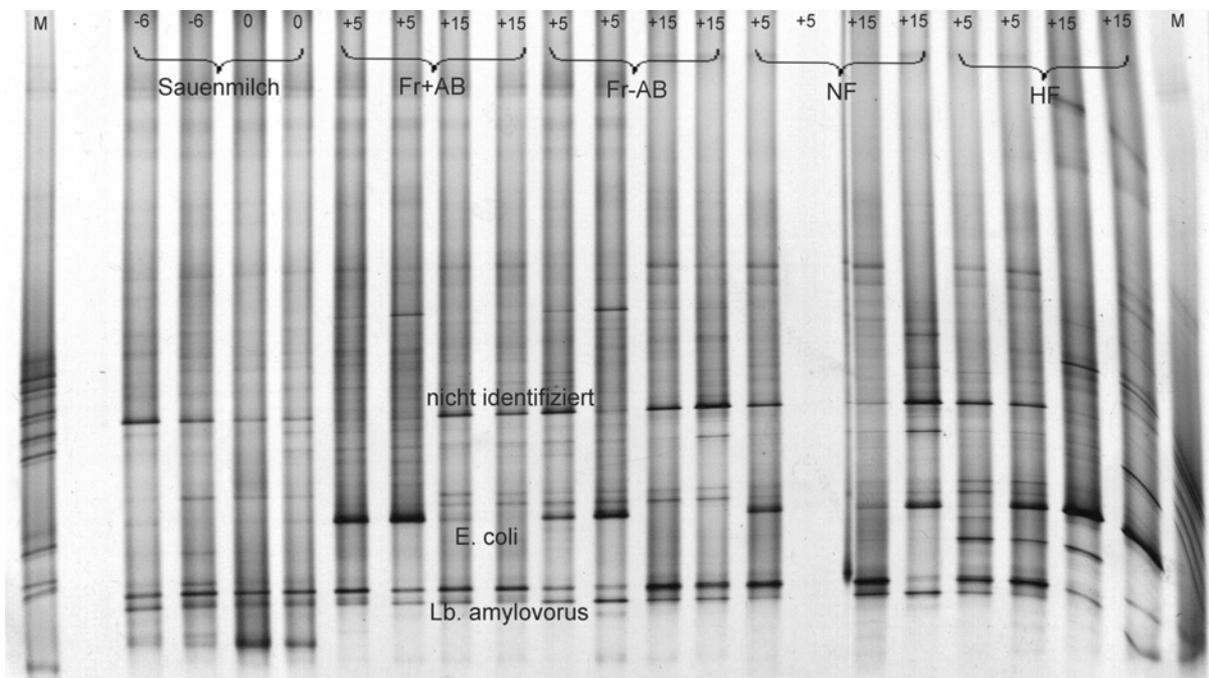
gefunden werden. Zur Identifizierung der dominanten Banden wurden diese einer 16SrDNS-Sequenz-Analyse unterzogen. Während uns bis jetzt die Sequenzierung der oberen Bande nicht gelungen ist, konnte festgestellt werden, dass es sich bei den anderen Banden um nicht-kultivierbare Bakterien-Klone handelt.

Tabelle 2

Mikrobielle Besiedlung des ilealen Chymus von Ferkeln mit Enterobakterien und Laktobazillen vor und nach dem Absetzen bei unterschiedlicher Fütterung (Mittelwert \pm und Standardabweichung) (Microbial counts in ileal digesta of piglets pre- and postweaning and fed different diets; mean \pm SD)

Tag vor und nach dem Absetzen	Sauenmilch (SM)	Diät 1 (Fr+AB)	Diät 2 (Fr-AB)	Diät 3 (NF)	Diät 4 (HF)
Enterobakterien (log KBE/g)					
- 6	6,8 \pm 0,8				
0	7,4 \pm 1,3				
1		6,8 \pm 0,5 ^a	7,7 \pm 0,7	7,5 \pm 0,5	8,4 \pm 0,6 ^a
5		7,8 \pm 0,8	8,3 \pm 0,3	7,8 \pm 0,5	8,2 \pm 0,1
15		7,1 \pm 1,0	6,4 \pm 1,4	8,2 \pm 0,6	6,8 \pm 1,6
Laktobazillen (log KBE/g)					
- 6	8,9 \pm 0,4				
0	8,7 \pm 0,2				
1		6,7 \pm 1,0	7,8 \pm 0,6	7,6 \pm 0,9	6,9 \pm 1,3
5		8,1 \pm 0,5	8,7 \pm 0,3	8,5 \pm 0,5	8,1 \pm 0,7
15		8,7 \pm 0,2	8,0 \pm 1,2	8,5 \pm 0,7	7,6 \pm 1,5

^a Signifikanz ($p > 0,05$); ^a significance ($p > 0,05$)



M: DGGE-Marker; -6, 0, +5 und +15 Tage vor bzw. nach dem Absetzen
(M: DGGE marker; -6, 0, +5, +15 days pre- resp. postweaning)

Abb.: DGGE-Profil des Ileumchymus von Ferkeln zu verschiedenen Zeitpunkten der Absetzphase und bei Fütterung unterschiedlicher Diäten (DGGE profile of ileal digesta of weaning piglets receiving different diets)

Die untere Bande repräsentiert Klone (p-3301-23G2, p-37-a5, p-3443-SwA2), die nach LESER et al., (2002) der *Lb. amylovorus*-Gruppe zuzuordnen sind. Bis jetzt wurden gleiche Stämme nur aus Dünn- und Dickdarminhalt von Schweinen sowie aus Maissi-

lage isoliert. Die Untersuchung der mittleren Bande dagegen ergab, dass der identifizierte Stamm S4D der *E. coli*-Gruppe zugeordnet werden kann (FAVIER et al., 2002), der bisher bei mit Muttermilch ernährten Säuglingen gefunden werden konnte.

Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Untersuchungen bestand in der Charakterisierung der ilealen Mikroflora bei Ferkeln zum Zeitpunkt des Absetzens sowie der Prüfung des Einflusses von Futtermischungen mit und ohne Antibiotika bzw. unterschiedlichen Rohfasergehalten.

Die vorgestellten Untersuchungen haben gezeigt, dass unter den beschriebenen Versuchsbedingungen die mikrobielle Besiedlung – und damit auch die Gehalte an mikrobiellen Metaboliten – im Ileumchymus der Ferkel zum Zeitpunkt des Absetzens weitestgehend konstant waren. Die dominierenden Bakterien im Untersuchungszeitraum waren die Gruppe der Laktobazillen, die im Verlauf des Absetzens zahlenmäßig abnahmen, aber innerhalb weniger Tage, unabhängig von der verabreichten Diät, wieder die Werte vor dem Absetzen erreichten. Wie die DGGE und 16SrDNS-Sequenzanalyse zeigten, waren die Laktobazillen vorwiegend der *Lb. amylovorus*-Gruppe zugehörig. Diese Gruppe scheint spezifisch für den GIT von Schweinen zu sein, da sie bisher nur in porcinen Darminhalten beobachtet werden konnte. Auch LESER et al. (2002) wiesen in ihren Untersuchungen an dänischen Schweinen verschiedenen Alters und unterschiedlicher Fütterung diese zur *Lb. amylovorus*-Gruppe gehörigen Laktobazillen nach.

Im DGGE-Profil konnte der *E. coli*-Klon S4D im Ileumchymus nur nach dem Absetzen festgestellt werden. Dies steht jedoch im Widerspruch zu den Ergebnissen der klassischen Mikrobiologie, mit der Enterobakterien auf VRBD-Agar bereits bei den Saugferkeln nachgewiesen wurden. Um diesen Widerspruch klären zu können, wird das Probenmaterial gegenwärtig zusätzlichen Analysen (z.B. Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH)) unterzogen.

Aufbauend auf den erhaltenen Ergebnissen kann geschlussfolgert werden, dass sich - entgegen den Erwartungen - die Veränderungen der ilealen Mikroflora während des Absetzens weitaus weniger gravierend darstellen. Dabei ist nicht auszuschließen, dass die unter den Bedingungen der landwirtschaftlichen Praxis während des Absetzens auftretenden Stressfaktoren (Trennung von Sau und Wurfgeschwistern, Umgebungsveränderung, Veränderung des sozialen Umfeldes, plötzliche Futterumstellung, etc.) durch die während des Versuches herrschenden konstanten hygienischen Bedingungen gemildert wurden. Diese Interpretation wird dadurch unterstützt, dass kein Effekt durch die Verabreichung von antibiotisch wirkenden Futterzusatzstoffen (Avilamycin) bei Absatzferkeln beobachtet werden konnte. Die Anwendung von antimikrobiellen Futteradditiven zur Verminderung des Absatzstresses ist bei Einhaltung der guten landwirtschaftlichen Praxis mit konsequentem Hygienemanagement unbegründet.

Literatur

DECUYPERE, J.; VAN DER HEYDE, H.:

Study of the gastro-intestinal microflora of suckling piglets and early weaned piglets reared using different feeding systems. Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene, I. Abt. Orig. A **221** (1972), 492-510

- FAVIER, C.F.; VAUGHAN, E.E.; DE VOS, W.M.; AKKERMANS, A.D.L.:
Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. *Applied and Environmental Microbiology* **68** (2002) 1, 219-226
- GEDEK, B., KIRCHGESSNER, M.; WIEHLER, S.; BOTT, A.; EIDELSBURGER, U., ROTH, F.X.:
Zur nutritiven Wirksamkeit von *Bacillus cereus* als Probiotikum in der Ferkelaufzucht. *Archives of Animal Nutrition* **44** (1993), 215-226
- GEISSLER, Ch.; HOFFMANN, M.; HICKEL, B.:
Ein Beitrag zur gaschromatischen Bestimmung flüchtiger Fettsäuren. *Archives of Animal Nutrition* **26** (1976), 123-129
- HAACKER, K.; BLOCK, H.-J.; WEISSBACH, F.:
Zur kalorimetrischen Milchsäurebestimmung in Silagen mit p-Hydroxydiphenyl. *Archives of Animal Nutrition* **33** (1983), 505-512
- JENSEN B.B.:
The impact of feed additives on the microbial ecology of the gut in young pigs. *Journal of Animal and Feed Sciences* **7** (1998), 45-64
- KOVACS, F.; NAGY, B.; SINKOVICS, G.:
The gut bacterial flora of healthy early weaned piglets, with special regard to factors influencing its composition. *Acta veterinaria Academiae Scientiarum Hungaricae* **22** (4) (1972), 327-338
- LESER, T.D.; AMENUVOR, J.Z.; JENSEN, T.K.; LINDECORONA, R.H.; BOYE, M.; MØLLER, K.:
Culture-independent analysis of gut bacteria: the pig gastrointestinal tract microbiota revisited. *Applied and Environmental Microbiology* **68** (2002) 2, 673-690
- MIKKELSEN, L.L.; JENSEN, B.B.:
Performance and microbial activity in the gastrointestinal tract of piglets fed fermented liquid feed at weaning. *Journal of Animal and Feed Sciences* **7** (1998), 211-215
- NRC 1998:
Nutrient Requirements of Swine: 10th Revised Edition (1998). National Academy Press, Washington D.C.
- SANGUINETTI, C.J.; DIAS NETO, E.; SIMPSON, A.J.:
Rapid silver staining and recovery of PCR products separate on polyacrylamide gels. *Biotechniques* **17** (1994) 5, 914-921
- WEGENER, H.C.; AARESTRUP, L.B.; HAMMERUM A.M.; BAGER, F.:
The association between the use of antimicrobial growth promoters and development of resistance in pathogenic bacteria towards growth promoting and therapeutic antimicrobials. *Journal of Animal and Feed Sciences* **7** (1998), 7-14

Anschriften der Verfasser

JEANNETTE KLÜSS, Dr. MANFRED KWELLA, Dr. SIEGFRIED KUHLA,
Dr. WOLFGANG-BERNHARD SOUFFRANT
Institut für die Biologie landwirtschaftlicher Nutztiere (FBN)
FB Ernährungsphysiologie „Oskar Kellner“
Wilhelm-Stahl-Allee 2
D-18196 Dummerstorf

Prof. Dr. ANTOON AKKERMANS, SERGEY KONSTANTINOV
Wageningen University
Laboratory of Microbiology
Wageningen
Niederlande