

DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

KAPOSVÁRI EGYETEM
AGRÁR ÉS KÖRNYEZETTUDOMÁNYI KAR
Élettani, Biokémiai és Állategészségügyi Intézet

Doktori iskola vezetője:
Dr. Kovács Melinda
az MTA levelező tagja

Témavezető:
Dr. Kovács Melinda
az MTA levelező tagja

Társ-témavezető:
Dr. Sylvie Combes
PhD, INRA-TANDEM tudományos főmunkatársa

**A VAKBÉL-FERMENTÁCIÓT BEFOLYÁSOLÓ EGYES
TÉNYEZŐK HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA NYÚLBAN**

Készítette:
BÓNAI ANDRÁS

KAPOSVÁR
2014

DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

KAPOSVÁRI EGYETEM
AGRÁR ÉS KÖRNYEZETTUDOMÁNYI KAR
Élettani, Biokémiai és Állategészségügyi Intézet

Doktori iskola vezetője:
Dr. Kovács Melinda
az MTA levelező tagja

Témavezető:
Dr. Kovács Melinda
az MTA levelező tagja

Társ-témavezető:
Dr. Sylvie Combes
PhD, INRA-TANDEM tudományos főmunkatársa

**A VAKBÉL-FERMENTÁCIÓT BEFOLYÁSOLÓ EGYES
TÉNYEZŐK HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA NYÚLBAN**

Készítette:
BÓNAI ANDRÁS

KAPOSVÁR
2014

1. A KUTATÁSI TÉMA ELŐZMÉNYEI, CÉLKITŰZÉSEK

A fiatal nyúl rendkívül érzékeny a multifaktoriális oktanú emésztőszervi megbetegedésekre, melyek gyakran halálos kimenetelűek. A veszteségek negyede a választás körüli időszakra tehető. A nagyarányú megbetegedések és elhullások nagy mértékben befolyásolják a hústermelés gazdaságosságát és negatívan hatnak az állatok jólétére is.

Az antibiotikumokat széles körben alkalmazták a növendék nyulak felnevelési veszteségeinek csökkentésére. Köszönhetően az antibiotikum használat korlátozásának az állati termék előállításánál, a korábban megszokott hozamok csökkenésére kell számítani, melynek fontos gazdasági következményei vannak. A nyúltenyésztőknek kisebb hozamokkal kell szembenézniük és a kutatóknak megoldásokat kell találniuk az antibiotikumok helyettesítésére.

Számos tanulmány foglalkozott különböző takarmánykiegészítőkkel az antibiotikumok kiváltására. A probiotikumok élő mikroorganizmusok, melyek elősegítik a bélbaktérium populáció egyensúlyának fenntartását. A prebiotikumok koncepciója azon alapul, hogy a jótékony hatású baktériumok szelektíven támogathatók a nem emészthető, de erjeszhető szénhidrátok etetésével. Ezeket az alternatív takarmány kiegészítőket intenzíven vizsgálták az állattenyésztésben, de hatásuk sok esetben nem egyértelmű. A korai választási kor gyakran használt módszer a nyúltenyésztésben és befolyásolhatja az emésztőcsatorna és a nyúl vakbél mikrobiota fejlődését.

Munkám során vizsgáltam a házinyulak emésztőszervi működését a választás körüli időszakban, és megoldásokat kerestem az antibiotikum használat kiváltására a felnevelés során. Próbáltam meghatározni a mikrobiológiai szempontból optimális választási időpontot és kísérleteket

végeztem, hogy meghatározzam a takarmányhoz kevert pro- és prebiotikum hatását.

A kutatómunka során kitűzött céljaink a következők voltak:

- 1.) Különböző választási időpontok hatásainak vizsgálata a növekedésére és bizonyos emésztési paraméterek meghatározása nyúlban.
- 2.) A probiotikus *Bacillus cereus* var. *toyoi* és a prebiotikus inulin hatásának vizsgálata a vakbél mikrobiotára és a fermentációs aktivitásra nyúlban a választás körüli időszakban.
- 3.) Objektív, komplex biomonitoring vizsgálati módszerek kidolgozása a házinyúl vakbél mikrobiota és a fermentációs folyamatok jellemzésére, valamint a módszerek alkalmazása a fent említett kutatásban.

2. ANYAG ÉS MÓDSZER

Kísérleteinket Pannon Fehér anyanyulakkal és azok almaival végeztük. Az emésztőkészülék működését jelző paraméterek mellett minden kísérletben mértük a főbb termelési paramétereket: a testsúlyt hetente, a takarmányfogyasztást hetente kétszer. A testtömeggyarapodást és a takarmányértékesítést kiszámítottuk. A mortalitást naponta, míg a morbiditást hetente állapítottuk meg.

Kísérleteink elvégzéséhez rendelkezünk állatkísérleti engedéllyel (Protocol No. 00618/007/SOM/2003).

2.1. Az eltérő választási korok hatása

A kísérlet célja annak meghatározása volt, hogy a korai elválasztás, az emésztőkészülék kevésbé fejlett volta következtében, jelent-e nagyobb kockázatot az emésztőszervi megbetegedések kialakulásában.

Az egynapos, átlagos születési súlyú kisnyulakat nyolcasával csoportosítottuk és az almákat véletlenszerűen három csoportra osztottuk a választási időpontok alapján (21, 28 és 35 napos választás). A nyulakat *ad libitum* takarmányoztuk. Az alom tejfogyasztását mértük.

A 14., 21., 28., 35. és 42. életnapon csoportonként, véletlenszerűen 6 egészséges állatot választottunk ki, melyeket CO₂-os túlaltatást követően elvéreztettünk. Az emésztő rendszert azonnal kiemeltük és elkülönítettük a vakbelet. Mintákat vettünk a laboratóriumi vizsgálatok elvégzéséhez. A máj, a szív, a vesék és a tüdő, az üres gyomor, a vékonybél és a vakbél tömegét megmértük. Az emésztőrendszer szerveinek relatív tömegét és az üres szervek tömegét kiszámítottuk és az emésztőrendszer teljes tömegének százalékában fejeztük ki.

2.2. A *Bacillus cereus* var. *toyoi* (Toyocerin®) hatása

A vizsgálat célja az volt, hogy meghatározzuk a probiotikus *Bacillus cereus* var. *toyoi* hatását a vakbél mikrobiota összetételére és a fermentációs aktivitásra a választás körüli időszakban. Megvizsgáltuk, hogy van-e különbség abban az esetben, ha a kisnyulak már a választás előtt, az anyanyulak takarmányába kevert probiotikumból is fogyasztanak, vagy csak a választást követően jutnak a takarmánykiegészítőhöz.

Az anyanyulak egy csoportja (T) a 0,05% Toyocerin-nel (200 ppm, $2 \cdot 10^5$ *Bacillus cereus* var. *toyoi* spóra /g takarmány, Asahi Vet. S. A., Barcelona, Spain) kiegészített takarmányt fogyasztotta. Az anyanyulak másik csoportja (C) antibiotikummentes takarmányt kapott az előbbivel azonos kémiai összetételben.

A kisnyulak az anyanyulak takarmányát fogyaszthatták a választásig, amely a 28. napon történt. Ezt követően minden almot két csoportra osztottunk. Az egyik csoport ugyanolyan takarmányt kapott, mint korábban, míg a másik csoport takarmányát lecseréltük, azaz a kontoll takarmányt fogyasztó kisnyulak csoportjának fele a választást követően a Toyocerinnel® kiegészített takarmányt kapott, míg a korábban kiegészített takarmánnyal etetett kisnyulak csoportjának fele azt követően kontroll takarmányt fogyasztott.

A 21., 28. és 35. napon minden csoportból 6 egészséges állatot a CO₂-os túlaltatást követően elvéreztettünk. Az emésztő rendszert azonnal kiemeltük és elkülönítettük a vakbelet. Mintákat vettünk a laboratóriumi vizsgálatok elvégzéséhez.

2.3. Az inulin kiegészítés hatása

Ennek a kísérletnek a célja az volt, hogy tanulmányozza az életkor és az inulin kiegészítés hatását a nyulak növekedési teljesítményére és egyes

emésztésélettani paraméterekre, főként a vakbél ökoszisztémára és a fermentációra.

Az almokat 21 napos korban véletlenszerűen 3 csoportra osztottuk. A kontroll (C) csoport takarmánya nem tartalmazott kiegészítést. A második csoport (M) takarmányát antibiotikummal, míg a harmadik csoport (I) takarmányát 4% inulinnal (Frutafit, HD, Brenntag, Budapest) egészítettük ki. A 28., 35. és 42. életnapon, csoportonként 6 egészséges állatot választottunk ki, melyeket CO₂-os túlaltatást követően elvégeztettünk. Az emésztőrendszert azonnal kiemeltük és a vakbelet elkülönítettük. Mintákat vettünk a laboratóriumi vizsgálatok elvégzéséhez.

2.4. Az inulin metabolizmusa vakbél mikrobák által, *in vitro* kísérletben vizsgálva

A korábbi *in vivo* kísérletünkben a növendék nyulak gyógyszermentes, gyógyszeres és inulinnal (4%) kiegészített takarmányt fogyasztottak. Korábbi szakirodalmi eredményekkel ellentétben, kísérletünkben nem tapasztaltuk az inulin pozitív hatását sem a termelésre sem a vakbél fermentációra. Ezért két *in vitro* kísérletet végeztünk el, hogy elemezzük a vakbél tartalom és az inulin inkubációjának hatását a mikrobiota összetételére és a rövid szénláncú zsírsavak (VFA) termelésére.

Mindkét kísérletben a nyulak (n=3) kereskedelmi forgalomban kapható tápot fogyasztottak. Az állatok az első kísérletben 10, míg a másodikban 12 hetesek voltak. A vakbél tartalmat homogenizáltuk és két részre osztottuk. Az első minta volt a kontroll, míg a második mintához 4% inulint adtunk. A mintákat tenyésztő edényekbe tettük, melyekben az anaerob körülményeket gázfejlesztő tasak segítségével biztosítottuk. A mintákat 37 °C-on, 6 és 12 órán keresztül inkubáltuk. Az inkubáció kezdetekor (0 h), majd 6 és 12 óra elteltével mintákat vettünk laboratóriumi

vizsgálatok elvégzéséhez.

2.5. Laboratóriumi vizsgálatok

A gyomor-, a vékonybél- és a vakbél tartalom pH-értékét OP-110 (Radelkis, Magyarország) típusú pH-mérővel megmértük.

Közvetlenül a mintavétel után a vakbél tartalom 1 g-ját használtuk fel mikrobiológiai tenyésztéshez. Meghatároztuk az aerob összcsíraszámot, az *E. coli* és egyéb coliformok számát, valamint az obligát anaerob baktériumok számát. Az inkubációs idők leteltével, a telepek számát Acolyte telepszámláló segítségével határoztuk meg. A minták telepképző egységeinek (CFU, Colony Forming Unit) számát \log_{10} -ban fejeztük ki a minták 1 grammjára vonatkoztatva.

A VFA koncentrációt gázkromatográffal (Shimadzu GC 2010, Japan) határoztuk meg.

A vakbél baktériumok fibrolitikus aktivitásának elemzése során vizsgáltuk a celluláz-, a xilanáz-, és a pektináz enzimek aktivitását.

Az inulin kiegészítés hatását vizsgáló kísérletben, a vakbél tartalom mintákból a teljes genomiális DNS-t QIAamp[®] DNA Stool Mini kit segítségével kivontuk és tisztítottuk. Ezt a kivonatot használtuk fel a kapilláris elektroforézis egyszálú DNS konformációs polimorfizmus (CE-SSCP) és a valós idejű polimeráz láncreakciós (RT-PCR) vizsgálatokhoz. A mikrobiális genomikai vizsgálatokat a franciaországi INRA-TANDEM kutatóintézetében végeztem el.

2.6. Statisztikai elemzés

A kapott eredmények statisztikai elemzését a 10.0 verziós számú SPSS (2002) programcsomag segítségével végeztem. Az egy tényezős variancia analízist (ANOVA) alkalmaztam a választási kor, a probiotikus

kísérlet és az RT-PCR vizsgálatok eredményeinek értékelésekor. A prebiotikus kísérletben a takarmány, a kor és ezek interakciójának hatását vizsgáltam a general linear model (GLM) alkalmazásával. Az különbségek szignifikanciáját LSD és Tukey's post hoc teszttel igazoltam. A csoportok mortalitását és morbiditását Chi-négyzet próbával hasonlítottam össze.

3. EREDMÉNYEK

3.1. Az eltérő választási korok hatása

A 35. életnapon, a 35 naposan választott nyulak testtömege (940 g) 14, illetve 10%-kal volt nagyobb, mint a 21. és a 28. életnapon választott nyulaké (826 és 850 g, $P < 0,05$).

Négy hetes korban a korán elválasztott nyulak (G21) takarmányfelvétele 75%-kal több volt a G28 és G35 csoportokhoz viszonyítva ($P < 0,05$).

Az átlagos takarmányértékesítés a 22-28. nap között 1,4 g/g, majd a 29-35. nap között 1,9-2,1 g/g volt. Ezt követően, a 36-42. nap között elérte a 2,6-3,0 g/g értéket. A választási idő alapján kialakított csoportok között nem volt különbség a takarmányértékesítést tekintve.

Az emésztő rendszer testtömeghez viszonyított részaránya 5,5 % volt 14 napos korban, majd közel kétszeresére növekedett a 42. életnapra a G21-es csoportban. A 28. és a 35. napon szignifikáns különbség volt a csoportok között, azonban a különbség eltűnt a 42. életnapra.

A kísérlet során az üres gyomor tömegének részaránya az emésztőrendszer tömegéhez képest csökkent (33%-ról 18%-ra) a korán választott csoport esetén. A vékonybél részaránya szintén csökkent 44%-ról 33%-ra. A vakbél részaránya megduplázódott a kísérlet során (10%-ról 20%-ra). A mért értékek alapján számított arányok hasonlóképpen alakultak a másik csoportok esetén is.

A gyomor-, és a vakbél tartalom pH-értékében nem találtunk szignifikáns különbséget a csoportok között. A gyomortartalom pH-értéke a 21.-42. nap között 1,6 alá csökkent minden csoportban. Kéthetes korban a vékonybél tartalom pH-értéke 6,8 volt, majd 7,6-ra és 8,4-re növekedett a 21., illetve a 28. napra a G21 csoport esetén ($P < 0,05$). A vakbél tartalom pH-

értéke a 14. életnapon 7,1 volt, majd a 21. életnapra 6,4-re csökkent a G21-es csoportban.

Az obligát anaerob baktériumok nagy számban (\log_{10} 8) voltak jelen a vakbélben, már a 14. életnapon. Számuk a 21. életnapra átmenetileg növekedett (\log_{10} 9,5), majd a 42. életnapra \log_{10} 7,8-as értékre csökkent a G21-es csoportban ($P < 0,05$). A coliform baktériumok száma \log_{10} 2,8-ről 1,9-re, míg az összes aerob baktérium száma \log_{10} 6,9-ről 4,6-ra csökkent a 14.-42. életnap között a G21-es csoportban. A másik két csoport esetén a mért értékek hasonlóak.

A korai választás szignifikánsan magasabb összes VFA koncentrációt eredményezett a kísérlet teljes időtartalma alatt, mint a később választott csoportok esetén. A propionsav-vajsav aránya (C3/C4) 1,3 volt a kéthetes nyulak esetén a G21-es csoportban, majd a harmadik hétre 0,5-re csökkent. Ez az érték szignifikánsan kisebb volt a másik csoportokhoz viszonyítva a 28., 35. és 42. napon: a G28-as csoport esetén 0,6-0,7, míg a G35-ös csoportban 0,5-0,6 volt a jellemző arányszám.

3.2. A *Bacillus cereus* var. *toyoi* (Toyocerin[®]) hatása

Az anyanyulak takarmányának kiegészítése jelentősen elősegítette a kisnyulak növekedését. A harmadik héten a T nyulak testtömege szignifikánsan nagyobb volt (462 ± 12 g), mint a kontroll (C) nyulaké (389 ± 8 g). Ez feltehetően a T anyanyulak nagyobb tejtermelésének volt köszönhető, ezen keresztül több tápanyaghoz juthattak a csoport kisnyulai. A csoportok testtömegeinek különbsége még a negyedik élethéten is látszott. A TC és TT csoport nyulainak testtömege 717 g és 653 g, míg a CC és CT csoport nyulainak testtömege 610 g és 543 g volt.

A teljes kísérlet időtartalmát nézve a CT csoport nyulai érték el a legnagyobb testtömeget (1301 g) a 42. életnapra és ennek a csoportnak volt a legjobb a takarmányértékesítése is (2,0 g/g).

A választást követően kiegészített takarmányt fogyasztó nyulak egészségügyi státusza jobb volt, mint a többi csoport esetén (1. táblázat).

Az elhullott állatok vakbél tartalmában, nagy számban (\log_{10} 6-7/g) voltak jelen az *E. coli* baktériumok. A 21. életnapon szignifikánsan nagyobb számban (\log_{10} 5,9) voltak jelen a coliform baktériumok a kontroll csoportban, mint a T csoportban (\log_{10} 4,3). A különbség eltűnt a 29. napra, azonban a 35 napon a Toyocerin szignifikánsan alacsonyabb coliform számot eredményezett a CT és a TT (\log_{10} 2,0) csoportban.

A coliform baktériumok száma \log_{10} 3-4 baktérium/g vakbél tartalom volt a TC csoportban. Ez fiziológias értéknek tekinthető, azonban a CC csoportban mért \log_{10} 5-es érték nagy kockázatot jelenthet az állatok egészségének szempontjából.

1. táblázat: Egészségügyi kockázat értéke a választás után (%)

Csoport	Kor (napok)	
	28-35	36-42
	HRI* (%)	
CC	2.7	35.5
CT	0	6.20
TC	6.8	8.35
TT	0	2.85

*HRI=health risk index (a morbiditás és a mortalitás összege)

3.3. Az inulin kiegészítés hatása

Az inulinnal kiegészített (I) takarmányt fogyasztó nyulak takarmányfelvétele 11%-kal kisebb volt (76 g/nap), mint a gyógyszeres (M)

takarmányt fogyasztó nyulaké (85 g/nap, $P < 0,05$). A növekedést nem befolyásolta a takarmányozási csoport a 28-35. nap között, azonban az I csoport nyulai esetén 24%-kal csökkent a 36-42. nap között.

A morbiditás nagyobb volt az I csoportban (3,3%, $P < 0,05$), mint a másik két csoport állataiban. Az életkornak és a kezelésnek nem volt szignifikáns hatása a mortalitásra. A takarmányozás nem hatott szignifikánsan a vakbél tartalom pH-értékére, a baktériumok számára, a celluláz és a pektináz aktivitásra. Az inulin kiegészítés ugyanakkor csökkentette a xilanáz aktivitást (18%-kal, $P < 0,05$) a kontroll és a gyógyszeres takarmányt fogyasztó csoportokhoz képest.

Az összes VFA koncentrációt nem befolyásolta a takarmányozás, kivéve a 35. napon a kontroll csoport esetén, ahol átmenetileg 40%-kal kisebb (52-ről 31 mmol/kg-ra csökkent) értéket mértünk ($P < 0,05$).

Az összes illózsírsav tartalomban az ecetsav aránya a gyógyszeres takarmányt fogyasztó nyulak (M) vakbél tartalmában kisebb volt (75%), mint a kontroll (80%) és az inulinos (82%) csoportban. A propionsav (9%) és a vajsav (12%) aránya az M csoportban nagyobb volt, mint az I csoport mintáiban (7% és 9%, $P < 0,05$).

A kísérlet ideje alatt, pozitív korreláció találtunk a vakbél tartalom *E. coli* száma és a pH-érték között ($r = 0,32$, $P = 0,019$, $n = 54$), amely a 35. napon volt a legszorosabb ($r = 0,612$, $P < 0,007$, $n = 18$).

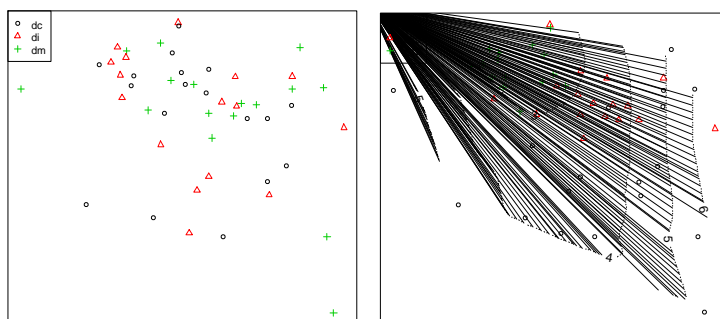
Az obligát anaerob baktériumok száma kb. 10%-ra csökkent (\log_{10} 9,6-ről 8,9-ra), míg a celluláz és a xilanáz aktivitás 25%, illetve 29%-kal növekedett ($P < 0,005$) a 28. és 42. életnap között.

A CE-SSCP technika segítségével a nyúl vakbél bakteriális közösségéről kaptam kvalitatív információkat. Az ujjlenyomat technika lényege, hogy egy csúcs egy baktérium fajt jelent a grafikonon. A tendencia szerint a vakbél bakteriális közössége egyre inkább hasonlít egymásra a kor

előrehaladtával. Az nMDS (Multy Dimensional Scaling) ábrán látszik, hogy a takarmányozási csoportnak nincs hatása a vakbél bakteriális közösségre (1. ábra). A konvencionális tenyésztési technika, hasonló eredményt adott.

A propionsav koncentráció szignifikánsan korrelált a bakteriális közösség szerkezetével ($r = -0,407$, $p < 0,01$) (2. ábra). A Simpson index szintén a kor hatását mutatja ($P < 0,001$), de a kezelés hatását nem. A diverzitás index a kísérlet kezdetétől fogva növekedett 4,6-ról 5,2-re.

Az RT-PCR mérés eredményei szerint szignifikáns különbség van a korcsoportok között. A 28 és a 42. életnapok között az összes baktérium-, és a *Bacteroides-Prevotella* kópia száma csökkent 2,5%- ($\log_{10}12,3$ -ról $11,9$ -re), illetve 16%-kal ($\log_{10}10,2$ -ről $8,6$ -ra). Még a *Bacteroides-Prevotella* arány is 0,1% alá csökkent az összes baktérium kópia részarányán belül 42 napos korra, a 28 napos korhoz viszonyítva (1,3%).



1. Ábra: nMDS teszt - A takarmány hatása

dc: kontroll -, di: inulin -, dm: gyógyszeres csoport

2. Ábra: A propionsav és a bakteriális közösség összefüggése

° 28. nap, ^ 35. nap, + 42. nap

Eredményeinket összefoglalva, a 21.- 42. életnap között a 4% inulin kiegészítésnek nem volt pozitív hatása a vakbél baktériumok közösségre, a mért baktériumok számára, a bakteriális aktivitásra, valamint az állatok

egészségügyi státuszára. Ennek oka lehetett az inulin részleges emésztése az emésztőcsatorna felsőbb szakaszaiban. Az inulin főként az intracelluláris szénhidrát bontás végző *Bifidobacterium*-ok szaporodásának kedvez, ezek a baktériumok azonban nem jellemző alkotói a házinyúl vakbél mikrobiotának. A *Bacteroides*-ek szénhidrát bontása extracellulárisan történik, és mivel a bontás végtermékeinek egy része elveszik a baktérium számára, az inulin bontása a *Bacteroides*-ek esetén rosszabb hatásfokkal történik.

Az inulin hatásának további vizsgálatára, két *in vitro* kísérletet állítottam be.

3.4. Az inulin metabolizmusa vakbél mikrobák által, *in vitro* kísérletben vizsgálva

A 6, illetve 12 órás inkubáció végére az össz-VFA koncentráció mindkét kísérletben növekedett, az elsőben 75%-kal (50,1-ről 87,6 mmol/kg-ra) és a másodikban 126%-kal (36,6-ről 82,9 mmol/kg-ra). Az ecetsav aránya kissé csökkent (79-ről 64 %-ra), míg a propionsav megközelítőleg azonos szinten maradt (kb. 5-7%) az első és második kísérletben. A vajsav arány jelentősen növekedett (17-ről 27%-ra) mindkét kísérletben.

Az összes VFA termelés kisebb volt az inulinnal kiegészített minában (60 mmol/kg) a kontrol csoporthoz (86 mmol/kg) viszonyítva az első kísérletben. Az ecetsav és propionsav arány kisebb, míg a vajsav arány nagyobb volt az inulin kiegészítés hatásának köszönhetően.

Mindkét kísérletben az obligát anaerob mikrobák száma kismértékben csökkent, 7%-kal (\log_{10} 7,5-ről 7,0-re) az első, míg 5,5%-kal (\log_{10} 7,6-ről 7,2-re) a második kísérletben. A coliform baktériumok száma ezzel ellentétesen változott; az első kísérletben 4,6%-kal növekedett (\log_{10}

4,4-ről 4,6-ra), míg a második kísérletben 9%-kal csökkent (\log_{10} 4,4-ről 3,9-re). Az összes aerob baktérium szám kis mértékben emelkedett, azonban ez a változás csak az első kísérletben volt szignifikáns (\log_{10} 4,7-ről 4,9-re).

Az inulin hatása nem volt következetes a két *in vitro* kísérlet során. A kísérletek eredményei közti eltérés talán az állatok különböző életkorának tulajdonítható, figyelembe véve azt, hogy az állatok 9 hetes korukig gyógyszerrel kiegészített takarmányt fogyasztottak. Az első kísérletben a mintavétel egy héttel a gyógyszermentes takarmány fogyasztását követően történt, míg a második kísérletben az állatoknak három hét állt rendelkezésre az új takarmányhoz való alkalmazkodáshoz.

4. KÖVETKEZTETÉSEK, JAVASLATOK

A nyúltenyésztés során a választás körüli időszak a legkritikusabb, amikor az állatok rendkívül érzékenyek az emésztőrendszert érintő megbetegedésekre.

A választás időpontja szignifikánsan befolyásolta a nyulak növekedését. A hagyományosan (35 napos korban) választott nyulak tejfogyasztása és szilárd takarmány felvétele nagyobb arányú növekedést eredményezett. A választási kor nem okozott szignifikáns változást a tenyésztett baktériumok számát tekintve, habár a VFA termelést befolyásolta. A korai (21 napos) választás nem okozott figyelemre méltó változást a mért emésztésfiziológiai paraméterekben, de csökkentette a nyulak növekedésének mértékét (kb. 10%-kal). Kísérleti körülmények között a korai választás nem okozott növekedést sem a morbiditásban, sem a mortalitásban, ezért úgy tűnik, hogy a nyulak 21 napos választása javasolható, gyógyszer vagy takarmány kiegészítő használata nélkül, amennyiben jók a higiéniés viszonyok és a telepi menedzsment.

A *Bacillus cereus* var. *toyoi* kiegészítés a választást megelőzően pozitívan hatott a termelésre. Az anyanyulak takarmány kiegészítése következtében a kisnyulak gyorsabban növekedtek, mivel a 21-28. életnap között a kisnyulak is hozzáfértek a takarmányhoz egészen a választásig. Habár a teljes kísérleti periódust figyelembe véve a testtömeg gyarapodás és a takarmányértékesítés a CT csoport nyulai (kiegészített takarmányt fogyasztottak a választás után) esetén volt a legjobb, ami azt jelenti, hogy korábban tudták kompenzálni a kismértékű lemaradásukat a választást követően.

A választást követően a probiotikus takarmányt fogyasztó nyulak esetén szignifikánsan kisebb volt a coliform baktériumok száma a többi

kísérleti állathoz képest. Ez lehetett az oka a jobb egészségügyi státusznak (szignifikánsan kisebb morbiditás és mortalitás) és növekedésnek.

Az EU Közösségi Végrehajtási Szabályozás 288/2013. számú rendelet után a *Bacillus cereus* törzset tartalmazó termékeket visszavonták az EU élelmiszer- és takarmány piacáról.

Kísérletünkben a 4% inulinnal való takarmánykiegészítés hatására csökkent a takarmányfelvétel (11%-kal a gyógyszeres takarmányt fogyasztó nyulakhoz képest). Ez csökkentette a növekedési arányt, míg növekedett a morbiditás, a mortalitásra nem hatott. Az inulin fogyasztás hatására csökkent a vakbél tartalom xilanáz aktivitása, a propionsav és vajsav aránya, míg növekedett az ecetsavtermelés. A mikrobiota összetételére kifejtett hatását nem lehetett kimutatni. A klasszikus tenyésztéses mikrobiológiai vizsgálatok eredményeit RT-PCR technika alkalmazásával egészítettük ki.

Az inulinnak nem volt egyértelmű hatása a vakbél mikrobiotára és fermentációra az *in vitro* kísérletekben sem. Az inulin kiegészítés kisebb össz VFA termelést és nagyobb vajsav arányt eredményezett. Az aerob és obligát anaerob baktériumok száma csökkent, míg a coliformok számának változása nem volt azonos a két kísérletben.

A *Bifidobaktérium*-ok nem dominánsak, azonban a *Bacteroides*-ek fontosak a nyúl vakbél mikrobiota kialakításában, azonban ezek számát nem befolyásolta az inulinos kezelés. Tehát, az ilyen típusú prebiotikum alkalmazása nem javasolható a nyúlhús előállítás során, további vizsgálatok szükségesek a nyúl mikrobiota interakcióinak felderítésére.

Eredményeink elősegíthetik a nyulak felnevelése során alkalmazott antibiotikumok mennyiségének csökkentését, és hozzájárulhatnak az antibiotikumok kiváltásához a nyúl termék előállítás során.

5. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. A korai (21 napos) választás 10%-kal kisebb növekedést, az emésztőcsatorna korábbi fejlődését, nagyobb mennyiségű rövid szénláncú zsírsavtermelést, azon belül nagyobb ecetsav és vajsav-, valamint kisebb arányú propionsav termelést eredményezett a vakbélben, a 35 - 42. életnap között, Pannon Fehér nyulak esetén.
2. Az életkorral összefüggő változások befolyásolták a máj, a gyomor, a vékonybél és a vakbél tápcsatornához viszonyított relatív tömegét, csakúgy, mint tápcsatorna relatív súlyát, tekintet nélkül a választási korra.
3. Az életkorral összefüggő változások hatására az összes baktérium és a *Bacteroides-Prevotella* csoport SSCP-vel megjelenített és qPCR-val meghatározott kópiaszáma csökkent (60,2 és 97,5%-kal) a vakbél tartalom minták esetén, a 28- 42. életnap között. A *Bacteroides-Prevotella* csoport részaránya kevesebb volt, mint 1% volt, míg a nem *Bacteroides-Prevotella* baktériumok részaránya 2%-kal növekedett (97%-ról 99%-ra) az összes vakbél baktérium mennyiségéhez képest a 28- 42. nap között.
4. Az anyanyulak takarmányának *Bacillus cereus* var. *toyoi* kiegészítése szignifikánsan (19%-kal) javította a kisnyulak növekedését. A választást követően kiegészített takarmányt fogyasztó nyulaknak szignifikánsan jobb volt az egészségügyi státusza és (65% és 250%-kal) kisebb coliform baktériumszám volt

kimutatható a vakbél tartalomból a probiotikummal nem kiegészített takarmányt fogyasztó nyulakhoz képest, a választást követően.

5. A takarmány 4% inulinnal való kiegészítése nem hatott pozitívan a növekedésre, csökkentette a takarmány felvételt (11%-kal), nagyobb arányú morbiditást és mortalitást okozott. Az inulin kiegészítés csökkentette a xilanáz aktivitást (18%-kal), és kisebb vajsav arányt eredményezett, míg nem befolyásolta a vakbél mikrobióta tenyésztéssel, CE-SSCP-vel valamint qPCR-val vizsgált összetételét.

6. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBŐL ÍRT TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK

6.1. Közlemények idegen nyelvű referált folyóiratban

M. Kovács, Zs. Szendrő, G. Milisits, B. Bóta, E. Bíró Németh, I. Radnai, R. Pósa, A. Bónai, F. Kovács, P. Horn.: Effect of nursing methods and faeces consumption on the development of the bacteroides, lactobacillus and coliform flora in the caecum of the newborn rabbits. *Reproduction, Nutrition, Development*, 2006. 46:(2) 205-210. (ISSN: 09265287) (IF=1.817)

A. Bónai, Zs Szendrő, Zs. Matics, H. Fébel, L. Kametler, G. Tornyos, P. Horn, F. Kovács, M. Kovács: Effect of inulin supplementation and age on growth performance and digestive physiological parameters in weaned rabbits. *World Rabbit Science*, 2010. 18:(3) 121-129. (ISSN: 12575011) (IF= 0.660)

M. Kovács, A. Bónai, Zs. Szendrő, G. Milisits, H. Lukács, J. Szabó-Fodor, G. Tornyos, Zs. Matics, F. Kovács, P. Horn: Effect of different weaning age (21, 28 or 35 days) on production, growth and certain parameters of the digestive tract in rabbits. *Animal*, 2012. 6:(6) 894-901. (ISSN: 17517311) (IF=1.744)

6.2. Közlemény magyar referált folyóiratban

Bónai A., Szendrő Zs., Matics Zs., Fébel H., Pósa R., Tornyos G., Horn P., Kovács F., Kovács M.: Effect of *Bacillus cereus* var. *toyoi* (Toyocerin®) on

caecal microflora and fermentation in rabbits (in Hungarian). Magyar Állatorvosok Lapja, 2008. 130:(2) 87-95. (ISSN: 0025-004X) (IF=0.088)

6.3. Konferencia kiadványban idegen nyelven megjelent közlemények

M. Kovács, G. Milisits, Zs. Szendrő, H. Lukács, A. Bónai, R. Pósa, G. Tornyos, F. Kovács: Effect of different weaning age (days 21, 28 and 35) on caecal microflora and fermentation in rabbits. In: Xiccato G, Trocino A, Lukefahr SD (szerk.) Proceedings of the 9th World Rabbit Congress. Verona, Olaszország, 2008.06.10-2008.06.13. Brescia: 701-704. (ISBN: 9788890281464)

A. Bónai, Zs. Szendrő, L. Maertens, Zs. Matics, H. Fébel, L. Kametler, G. Tornyos, P. Horn, F. Kovács, M. Kovács: Effect of inulin supplementation on caecal microflora and fermentation in rabbits. In: Xiccato G, Trocino A, Lukefahr SD (szerk.) Proceedings of the 9th World Rabbit Congress. Verona, Olaszország, 2008.06.10-2008.06.13. Brescia: 555-560. (ISBN: 9788890281464)

A. Bónai, Zs. Szendrő, Zs. Matics, H. Fébel, R. Pósa, G. Tornyos, P. Horn, F. Kovács, M. Kovács: Effect of Bacillus cereus var. toyoi on caecal microflora and fermentation in rabbits. In: Xiccato G, Trocino A, Lukefahr SD (szerk.) Proceedings of the 9th World Rabbit Congress. Verona, Olaszország, 2008.06.10-2008.06.13. Brescia: 561-566. (ISBN: 9788890281464)

A. Bónai, K. Horvatovich, V. Rajli, L. Kametler, M. Kovács: In vitro metabolism of inulin by rabbit microbiota. In: Hoy ST (szerk.) 16th International Symposium on Housing and Diseases of Rabbits, Furbearing Animals and Pet Animals, Celle, Németország, 2009. 05. 13-14. 80-87. (ISBN 978-3-941703-04-9)

6.4. Konferencia kiadványban magyar nyelven megjelent közlemények

Lukács H., Szendrő Zs., Bóta B., Bónai A., Fébel H., Pósa R., Kovács M.: Eltérő korban történő elválasztás hatása a vakbélflóra összetételére és a fermentációra. In: Szendrő Zs. (szerk.) 18. Nyúltenyésztési Tudományos Nap, Kaposvár, 2006. 05. 24. 139-145. (ISBN 963 86794 5 X)

Bónai A., Szendrő Zs., Maertens L., Matics Zs., Fébel H., Kametler L., Tornyos G., Horn P., Kovács F., Kovács M.: Az inulin kiegészítés hatása a vakbélflóra összetételére és a fermentációra nyúlban. In: Szendrő Zs. (szerk.) 20. Nyúltenyésztési Tudományos Nap. Kaposvár, 2008. 05. 21. 115-120. (ISBN: 9789639821057)

Bónai A., Horvatovich K., Rajli V., Kametler L., Kovács M.: Inulin kiegészítés hatása nyulak vakbél ökoszisztémájára in vitro kísérletben vizsgálva. In: Szendrő Zs. (szerk.) 22. Nyúltenyésztési Tudományos Nap, Kaposvár, Magyarország, 2010. 05. 26. 97-101. (ISBN 978-963-9821-16-3)

Kovács M, Bónai A., Tornyos G, Zsolnai A, Pósa R, Blochné Bodnár Zs, Toldi M, Horvatovich K, Kametler L, Szabó-Fodor J, Bóta B, Bagóné Vántus V.: A nyúlhústermelés biztonságát szolgáló környezet-élettani

kutatások a Kaposvári Egyetemen. In: Matics Zsolt, 25. Nyúltenyésztési Tudományos Nap, Kaposvár, Magyarország, 2013. 04. 25. 79-94. (ISBN: 978-963-9821-60-6)

Bónai A., Bagóné Vántus V.: Az elválasztási kor, valamint pro- és prebiotikumok alkalmazásának hatása a növendék házinyúl vakbél mikrobiotára. IV. Gödöllői Állattenyésztési Tudományos Napok, Gödöllő, Magyarország, 2013. október 25-26. (nyomtatás alatt)