

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**Bioaktív komponensekben gazdag nutraceutikumok
hatásának vizsgálata broiler csirke tápcsatorna
mikrobiomra újgenerációs szekvenálással**

Szilágyi-Tolnai Emese

Témavezető: Prof. Dr. Biró Sándor



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS SEJT- ÉS IMMUNBIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2023

Tartalomjegyzék

1. Az értekezésben előforduló rövidítések jegyzéke	5
2. Bevezetés	6
3. Irodalmi áttekintés	9
3.1 A mikrobiom vizsgálatára alkalmazott NGS technikák	9
3.1.1 <i>Amplikon gén szekvenálás</i>	9
3.1.2 <i>Shotgun metagenomikai szekvenálás</i>	11
3.1.3 <i>16 S rRNS gén long read szekvenálás</i>	12
3.2 A 16 S rRNS gén amplikon szekvenálás eredményét torzító biológiai és technikai tényezők	14
3.2.1 <i>Mintavétel és tárolás</i>	14
3.2.2 <i>DNS izolálás hatékonysága</i>	15
3.2.3 <i>PCR inhibitorok</i>	18
3.2.4 <i>Kontamináció/Reagens szennyeződés/Kitome</i>	19
3.3 A mikrobiom és a gazdaszervezet kölcsönhatása	20
3.3.1 <i>SCFA termelés</i>	21
3.3.2 <i>Epesav szintézis</i>	24
3.3.3 <i>Vitamin szintézis</i>	24
3.3.4 <i>A mikrobiom endokrin funkciói</i>	25
3.3.5 <i>A bél integritásának fenntartása</i>	26
3.3.6 <i>Az egyensúlyi és diszbiotikus mikrobiom jellemzése</i>	27
3.3.7 <i>Mikrobiális ökoszisztémák jellemzésére alkalmazott diverzitási mutatók</i>	29
3.4 A broiler csirke mikrobiom vizsgálatának jelentősége gazdasági szempontból	30
3.4.1 <i>GIT mikrobiom szerepe és fontossága a bél egészségének fenntartásában és a tápanyagok felvételének szempontjából</i>	31
3.4.2 <i>A mikrobióta összetétele és megoszlása a csirke béltraktus különböző részeiben</i>	32
3.5 Antibiotikumok különböző célú alkalmazásának kockázatai	33
3.6 A tápcsatorna mikrobiom regenerációját szolgáló alternatív stratégiák	35
3.6.1 <i>Nutraceutikumok</i>	35
4. Célkitűzés	40
5. Anyagok és módszerek.....	43
5.1 A szekvenálás eredményét torzító technikai tényezők vizsgálata	43
5.1.1 <i>Mintagyűjtés</i>	44
5.1.2 <i>Minta homogenizálás</i>	44

5.1.3	<i>A sejtek feltárása</i>	45
5.1.4	<i>DNS izolálás</i>	46
5.1.5	<i>Az izolált DNS minták mágneses gyöngy alapú újra tisztítása sikertelen amplikon PCR-t követően</i>	47
5.2	Természetes eredetű bioaktív komponensekben gazdag nutraceutikumok hatásának vizsgálata broiler csirkék bél-mikrobióta összetételére és diverzitására	47
5.2.1	<i>A kísérlet kivitelezése, tartási körülmények és mintagyűjtés</i>	48
5.2.2	<i>Természetes eredetű növényi hatóanyagok előállítás</i>	50
5.2.3	<i>Minták homogenizálása, bakteriális sejtek feltárása és DNS izolálás</i>	50
5.3	A DNS izolátumok mennyiségi és minőségi ellenőrzése	51
5.4	Negatív és pozitív kontrollok a DNS izolálás és könyvtárkészítés hatékonyságának vizsgálatára	52
5.5	A 16 S rRNS gén metagenomikai könyvtárkészítés (V3-V4 régió amplifikálása) és szekvenálás	52
5.6	Bioinformatikai analízis	54
5.7	Szekvenálási nyersadatok elérhetősége	55
5.8	Statisztikai analízis	55
6.	Eredmények	56
6.1	A szekvenálás eredményét torzító technikai tényezők hatásának vizsgálata	56
6.1.1	<i>A különböző metagenomikai DNS izolálási módszerek hatása a DNS hozamra, minőségre és a biodiverzitási mutatókra</i>	56
6.1.2	<i>A különböző DNS izolálási technikák hatásának vizsgálata a szekvenálási és biodiverzitási mutatók értékeire</i>	59
6.1.3	<i>A metagenomikai DNS izoláló módszerek hatása a béta diverzitási mutatókra</i>	61
6.1.4	<i>A különböző lízis protokollok hatása az alfa diverzitási mutatók értékeire</i>	63
6.1.5	<i>A bakteriális sejtfeltáró protokollok hatása a DNS hozamra, tisztaságra és a közösségi diverzitási mutatókra</i>	64
6.1.6	<i>A különböző DNS izoláló metagenomikai stratégiák alapvetően befolyásolják a mintában a Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumok eloszlásának arányait</i>	66
6.1.7	<i>A különböző DNS izolálási technikák hatása az egyensúlyi (core) mikrobiom összetételére</i>	67
6.1.8	<i>A metagenomikai DNS izoláló módszerek eltérő hatást gyakorolnak a különböző bakteriális taxonok feltárására</i>	70
6.1.9	<i>A taxonómiai adatbázisok hatása a szekvenálás felbontóképességére</i>	72
6.2	Természetes eredetű bioaktív komponensekben gazdag nutraceutikumok hatása a broiler csirkék bél-mikrobióta összetételére és diverzitására	74
6.2.1	<i>A nutraceutikumok hatása a madarak súlygyarapodására</i>	74

6.2.2	<i>Mikrobiom súlykorreláció</i>	74
6.2.3	<i>A különböző kísérleti paraméterek (madarak életkora és nutraceutikum kezelés) és a bél-mikrobiom diverzitása közötti összefüggések vizsgálata</i>	76
6.2.4	<i>A madarak korának és a nutraceutikum kezelések hatásása az egyensúlyi „core” mikrobiom összetételére</i>	78
6.2.5	<i>Nutraceutikumok által okozott mikrobiális ujjlenyomatok</i>	80
6.2.6	<i>A nutraceutikumok hatása az SCFA termelő baktériumok mennyiségére</i>	82
6.2.7	<i>A nutraceutikumok által előidézett különbségek a lipid anyagcserében részt vevő baktériumok mennyiségében</i>	83
6.2.8	<i>A nutraceutikumok hatása a szénhidrát-anyagcserében részt vevő mikroorganizmusok mennyiségére</i>	84
6.2.9	<i>Diéta specifikus mikrobiális interakciók</i>	87
7.	Megbeszélés	90
7.1	A 16 S rRNS gén alapú ampikon szekvenálás eredményét torzító technikai tényezők vizsgálatának áttekintése	90
7.2	Természetes bioaktív komponensekben gazdag nutraceutikumok hatásainak áttekintése broiler csirke bél-mikrobiom összetételére és diverzitására	99
8.	Összefoglalás	111
9.	Summary	112
10.	Az értekezés új megállapításai	113
10.1	A 16 S rRNS gén alapú ampikon szekvenálás eredményét torzító technikai tényezők vizsgálata	113
10.2	Nutraceutikumok hatásainak vizsgálata broiler csirke bél-mikrobiom összetételére és diverzitására	114
11.	Irodalomjegyzék	115
12.	Tárgyszavak	128
13.	Key words	129
14.	Köszönetnyilvánítás	130
15.	Függelék	132
15.1	Kiegészítő táblázatok	132
15.2	Saját közlemények jegyzéke	135

1. Az értekezésben előforduló rövidítések jegyzéke

16S rRNS 16S riboszómális RNS
18S rRNS 18S riboszómális RNS
ANT antocianin
ARB antibiotikum rezisztens baktérium
ARG antimikrobiális rezisztencia gén
ASVs amplikon szekvencia variánsok (amplicon sequence variants)
ATL szöveti lízis puffer (a tissue lysis buffer)
AUC görbe alatti terület (area under the curve)
BLB bakteriális lízis puffer (bacterial lyses buffer)
BS bakteriális sejtszuspenzió
BSH epesav hidroláz (bile salt hydrolase)
CTAB cetil-trimetil-ammónium-bromid
DIN DNS integritás (DNA integrity number)
DL direkt lízis
F/B *Firmicutes*, *Bacteroidetes* arány
FOS fruktooligoszacharid
GABA γ -aminovajsav
GAPDH glicerin aldehid-3-foszfát-dehidrogenáz
GG GreenGenes
GIT gasztrointesztinális traktus
GOS galaktooligoszacharid
HMW nagy molekulásúly (high molecular weight)
HPLC nagyhatékonyságú folyadékromatográfia (High-performance liquid chromatography)
HSDH hidroxiszteroid dehidrogenáz
IFN- γ interferon gamma
ITS internal transcribed spacer
KAR karotinoid
KEGG Kyoto Encyclopaedia of Genes and Genomes
KIR központi idegrendszer
LMW kis molekulásúly (low molecular weight)
MOS mannán-oligoszacharid
NF- κ B nuclear factor kappa-light-chain enhancer of activated B cells
NGS új generációs szekvenálás
NK negatív kontrol csoport
ORF nyitott leolvasási keret (open reading frame)
PacBio Pacific Biosciences
PBS foszfát pufferelt sóoldat (phosphate-buffered saline)
PCoA fő koordináta elemzés (principal coordinates analyses)
PERMANOVA permutational multivariable of variance analysis
PK pozitív kontrol
ROC receiver operating characteristic
RT-PCR valós idejű polimeráz láncreakció (real-time polymerase chain reaction)
S Silva
SCFAs rövidláncú zsírsavak (short-chain fatty acids)
SDS nátrium-dodecyl-szulfát (sodium dodecyl-sulfate)
SMRT egymolekula valós idejű szekvenálása (single-molecule, real-time sequencing)
SZIM szimbiotikum

2. Bevezetés

A mikrobák mindenütt jelen vannak. Számtalan szimbiotikus, patogén és kommenzalista mikroba kolonizálja az emberi, állati és növényi szervezeteket, amelyek együttesen alkotják a mikrobiomot (1).

Az új generációs szekvenálási (NGS) technológiák széles körű elterjedésének köszönhetően robbanásszerűen nőtt az érdeklődés a mikrobiom megismerésére (2). Az NGS technológiák megjelenésével lehetővé vált az adott mikrobiomot tartalmazó egyes tagok átfogó feltérképezése, valamint annak vizsgálata, hogy a mikrobiális közösségek hogyan működnek és hogyan befolyásolják a gazda-patogén kölcsönhatásokat (3).

Jelenleg azonban a különböző NGS módszereknek is meg vannak a maga technikai buktatói, amelyek befolyásolhatják a kapott szekvenálási eredményeket.

A különböző metagenom izolálási stratégiák egyes taxonok túlzott reprezentációjához és az alacsony előfordulású fajok elvesztéséhez vezethetnek, ezáltal befolyásolják a mikrobák relatív előfordulását és a közösségi diverzitásokat (4). Folyamatosan jelennek meg DNS izolálással kapcsolatos újabb és újabb módszerek, azonban olyan univerzálisan elfogadott protokoll, amely alkalmas lehetne a 16 S riboszómális RNS (16 S rRNS) amplikon gén alapú szekvenáláshoz továbbra sem elérhető (5).

Továbbá, a diverz bélsár mikroflórák esetén nem könnyű olyan DNS izolálási protokollt alkalmazni, amely alkalmas az eltérő sejtfalösszetétellel, membránszerkezettel rendelkező mikroorganizmusokat reprezentáló genomok teljes kinyerésére. Számos tanulmány igazolta, hogy adott mikrobiális környezetben többszörös extrakciós eljárások kombinációja segít csökkenteni az egyes módszerekhez kapcsolódó taxon reprezentációs torzításokat (6).

A fentebb felsorolt tények miatt a pontos mikrobiális összetétel meghatározásának szempontjából alapvető fontosságú a különböző DNS izoláló protokollok összehasonlítása, valamint azok előnyeinek és hátrányainak meghatározása.

A jelen dolgozatomban bemutatandó kutatás keretein belül vizsgáltam, hogy a különböző kísérleti faktorok (minta homogenizálás, sejtfeltárás, DNS extrakció) milyen mértékben befolyásolják a kapott 16 S rRNS gén amplikon szekvenálások eredményeit (szekvenálási és diverzitási mutatók, mikrobiális összetétel).

Továbbá, munkám során összehasonlítottam a 16 S rRNS gén amplikon szekvenálás során leggyakrabban használt taxonómiai adatbázisok (Silva, GreenGenes) alkalmasságát a felbontóképességre.

A mikrobiális ökoszisztémák kutatása fontos tudományterület, vizsgálatok folynak annak érdekében, hogy a közösségi összetételek gazdaszervezetre gyakorolt élettani hatásait megismerjük. Mind ez idáig a legjobban feltérképezett terület az emberi és állati bélrendszerben élő baktériumok sokasága, intenzív kutatások tárgyát képezi továbbá a bélben élő gombák, archeák és vírusok összetétele, diverzitása és kapcsolata egymással (7).

A mikrobiom kutatásnak kiemelkedő jelentősége van az állattenyésztésben is (8, 9). Az intenzív állattartás során alkalmazott tartás és takarmányozási technológia eredményeként az állatok súlygyarapodása a piac igényeihez kialakítottan extrém gyors. Erre az egyik legjobb példa a Ross 308 broiler csirke, amelynek teljes fejlődési szakasza átlagosan 42 nap. Ez idő alatt eléri a ~3 kg-os súlygyarapodást is (10). Ennek az intenzív növekedésnek valamint az állattartás okozta stressz faktoroknak számos negatív hatása figyelhető meg az állatállományban, mint például különböző gyulladósos és metabolikus eredetű betegségek (10–14). Nem elhanyagolható az állatok antibiotikumos kezelése a tartás stresszből adódóan.

Továbbá, a nagyüzemi állattartás során nagy egyedszámú állatállományt tartanak viszonylag kis területen, így a fertőzőes megbetegedések gyakorisága is nagyobb, amelyet az állattenyésztők kisebb/nagyobb mértékű antibiotikumos kezeléssel próbálnak elkerülni. A folyamatos kezelés hatására széles spektrumú antibiotikum rezisztencia, valamint a bél-mikrobióta egyensúlyának megbomlása alakulhat ki (15). Évente hétszáz ezer ember hal meg antibiotikum rezisztens fertőzések következtében. Ha nem történik lényegi változás az antibiotikumok felhasználásában, akkor a jövőben a világ vezető halálozási okai közé fog tartozni (16–18).

Mindezen tényezőket figyelembe véve kiemelt jelentőséggel bír a nagyüzemi állattartás során fellépő tartástechnológiából eredő negatív hatások minimalizálása és az antibiotikumokat helyettesítő lehetőségek kidolgozása.

Megfelelő ismeretek birtokában a bél-mikrobiom összetételének és/vagy biológiai potenciáljának szelektív befolyásolása elősegíti az egyensúlyi mikrobiom helyreállítását, amely pozitív hatást fejt ki az állatok egészségi állapotára, immunstátuszára.

Nagy a jelentősége az olyan élelmiszerek fejlesztésének, amelyek valamilyen innovatív egészségvédő összetevővel támogatják a bél-mikrobióta normális funkcióit.

Jelenleg a növényi bioaktív vegyületekben gazdag hatóanyagokat (nutraceutikumokat) széles körben alkalmazzák az emberek és állatok egészségének megőrzése érdekében (19).

A Debreceni Egyetem kutatói olyan extrakciós technológiát dolgoztak ki, amely alkalmas élelmiszeripari „melléktermékekből” bioaktív komponensekben gazdag természetes hatóanyagok (nutraceutikumok) kivonására. Ezen nutraceutikumok takarmányadalékanyagként jótékony hatást fejtenek ki monogasztrikus haszonállatokban.

A broiler csirkék gyors növekedése miatt testi fejlettségét jellemzően 42 nap alatt éri el. A csirkék fejlődése során a gyomor-bél mikrobiom összetételében és diverzitásában jelentős változások figyelhetők meg. Ezen tulajdonságai miatt a csirkék jó modellállatoknak tekinthetők a mikrobiom vizsgálatok során. Az állatok különböző növekedési és fejlődési szakaszaiban tudjuk vizsgálni a nutraceutikumok mikrobiális összetételre és diverzitásra kifejtet hatását.

Dolgozatom második felében *in vivo* intenzív tartástechnológia mellett nevelt haszonállat etetési kísérlet során 16 S rRNS amplikon gén szekvenálás alkalmazásával vizsgáltam különböző természetes bioaktív komponensekben gazdag nutraceutikumok (karotinoidok, fruktooligoszacharidok, szimbiotikumok és antocianinok) bél-mikrobiomra gyakorolt hatását broiler csirke modell állatban. Kutatásunk célja a nagyüzemi állattartás során protokollszerűen alkalmazott antibiotikumok mennyiségének csökkentése volt, az állatok egészségi állapotának javítása által.

3. Irodalmi áttekintés

3.1 A mikrobiom vizsgálatára alkalmazott NGS technikák

A gasztrointesztinális traktus (GIT) mikrobáinak (mikrobióták) és azok kollektív genomjainak (metagenomok) kutatása számos tudományterületet érint a humán orvoslástól az állatgyógyászaton át az állattenyésztésig.

A bél-mikrobióta kezdeti tanulmányozása során a klasszikus mikrobiológiai tenyésztést alkalmazták összetételének meghatározásához, azonban ezzel a módszerrel csupán a baktériumok töredékét tudták azonosítani (20).

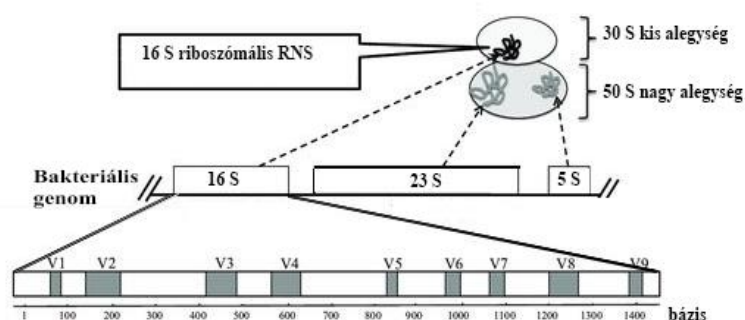
A tenyészhető mikrobák arányát a különböző tanulmányok eltérő szintre helyezik, leggyakrabban 20-40% (21) érték olvasható, de egyes tudományos becslések alapján a közösségalkotó fajoknak ez csupán a 0,1-1%-a (22). A hagyományos módszerekkel nem azonosítható mikroorganizmusok nagy száma késztette arra a kutatókat, hogy tenyésztéstől független molekuláris biológiai módszereket fejlesszenek és alkalmazzanak. Ma már számos különféle technológia áll rendelkezésre a mikrobiom összetétele, biológiai aktivitása és rezisztencia terheltségének vizsgálatára. Ezek között a nukleinsav alapú módszerek a legelterjedtebbek, de számos nem nukleinsav alapú módszer is létezik (például a foszfolipid/zsírsvav analízis nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC) alkalmazásával). A nukleinsav alapú módszerek elvi alapja a mikroorganizmusok örökítőanyagának szekvencia alapú azonosítása, illetve mennyiségi analízise. Így az elpusztult mikrobák is kimutathatók, mivel örökítő anyaguk még jelen van a mintában (23). A mikrobiom fő kvalitatív és kvantitatív tulajdonságai, funkcionális aktivitása, valamint rezisztencia státuszának meghatározása a különböző NGS alapú technológiák – célzott ampikon gén (16 S és 18 S rRNS gén), a shot gun metagenom és a 16 és 18 S rRNS gén long read szekvenálás – alkalmazásával egyre pontosabban vizsgálható (20, 24, 25).

3.1.1 Ampikon gén szekvenálás

Az ampikon gén szekvenálás relatíve gyors és költséghatékony módszer a komplex mikrobiális összetételű minták tanulmányozására, ehhez a könyvtárkészítés során a célszekvenciára specifikus primereket használnak. Az ampikon gén alapú szekvenálást gyakran alkalmazzák a bakteriális közösségek összetételének időbeli és térbeli változásának monitorozása céljából. A baktériumok, archeák és gombák esetében számos specifikus célgént azonosítottak, amelyeket széles körben használnak (26).

A gombafajok mikrobiális azonosítására legelterjedtebben a riboszómális RNS kódoló géneket (18 S, 28 S) és a köztük elhelyezkedő „*internal transcribed spacer*” (ITS) régiókat használják. A baktériumok és archeák azonosításához a leggyakrabban használt célgén a **16 S rRNS** (vagy 16 S rDNS gén) (27, 28), ami a prokarióta riboszóma komplex 30 S kis alegységét kódolja (26). A 16 S rRNS gén meghatározó szerepet játszik a sejtek működésében, túlélésében, valamint a fehérjeszintézis elengedhetetlenül fontos alkotórésze. A 16 S rRNS gén alapú szekvenálás több okból vált a baktériumok molekuláris filotipizálásának „Gold Standard” technikájává. Rövid mérete (~1542 bp) miatt a 16 S rRNS géneket rendkívül nagy mintamérettek mellett is viszonylag könnyű szekvenálni. Továbbá, a nyilvános rRNS génszekvencia adatbázisok jelentősen megnövekedtek, ami megkönnyíti a taxonómiai besorolást (26).

A 16 S rRNS génszekvenciája az evolúció során erősen konzervált területekből (primerkötő helyekből) áll, valamint kilenc variábilis régióval (V1 – V9) rendelkezik. A konzervált területei közötti variábilis régiók DNS szekvenciája a különböző baktériumfajok között eltérő és fajspecifikus. A konzervált régiókhoz kötődő univerzális primerek alkalmazása által lehetőségünk nyílt a bakteriális összetétel meghatározására (29, 30). Annak ellenére, hogy a 16 S rRNS gén evolúciósan konzerválódott, megvan annak az esélye, hogy a kiválasztott primerek nem illeszkednek megfelelően a mintában található bizonyos fajok DNS szekvenciájára. Ezáltal a variábilis régió(k) megválasztása és az „univerzális” PCR primerek tervezése hatással van a filotipizálás érzékenységére. Jelenleg a 16 S rRNS gén alapú szekvenálás során a protokollok többsége V3– V4, V5 – V6 vagy V4 variábilis régiókra specifikus primereket alkalmaznak a baktériumok azonosításához (31, 32).



1 ábra: A riboszóma komplex és a 16 S rRNS gén (Fukuda és mtsai, 2016 (33)). A prokarióták 70 S riboszómájának két összetevője a 30 S kis alegység és az 50 S nagy alegység. A 16S rRNS gén a 30S riboszómális RNS molekulákat kódolja. A 16 S rRNS gének tíz evolúciósan erősen konzervált és kilenc variábilis régióból állnak. Míg a konzervált régiók lehetővé teszik egyes szakaszok univerzális amplifikációját a könyvtárkészítés során, addig a variábilis régiók szekvenciáinak megismerése a taxonómiai vizsgálatok elvégzésére alkalmasak.

Az amplikon gén alapú szekvenálás egyik hátránya, hogy nem alkalmas a virális közösségek meghatározására, ugyanis nem létezik univerzálisan konzerválódott marker gén a vírusok esetében. Ezért a vírusok kimutatására shotgun szekvenálást alkalmazzák (34).

3.1.2 Shotgun metagenomikai szekvenálás

Az NGS technológiák fejlődése a metagenomika területének létrehozását eredményezte (26, 30, 35, 36), ami lehetővé teszi a komplex mikrobiális közösségek pontos összetételének meghatározását, valamint információt nyújt a mikrobák együttműködéséről és a közösségi szintű anyagcsere folyamatokról is (3).

A metagenomika a kinyert genomok sokaságának (metagenomok) átfogó vizsgálatát jelenti shotgun szekvenálás alkalmazásával (37). A shotgun metagenomika átfogóan katalogizálja az összes mikroorganizmust (vírusok, gombák, baktériumok) a komplex mintákban (35, 38). A metagenom szekvenálás részletesebb genomialis információt és taxonómiai felbontást eredményez, mint önmagában az amplikon gén szekvenálás (39). A módszer előnye, hogy képes azonosítani a nagyfokú genetikai sokféleséggel rendelkező vírusokat is (34). Emellett alkalmas lehet eddig még ismeretlen mikrobák azonosítására is (40). A metagenomikai megközelítés információt nyújt arról, hogy az adott környezeti mintában milyen organizmusok milyen relatív gyakorisággal fordulnak elő és megjósolható azok biokémiai aktivitása, metabolikus útvonalai (funkcionális metagenomika), illetve akár a gazdaszervezet és mikrobák közötti komplex interakciók is (41). A metagenomikai szekvenálást alkalmazzák a közösségek funkcionális képességének meghatározása céljából is. A közösségi összetételek biológiai funkciók meghatározása során mintavételezést követően DNS-t izolálnak, majd Shotgun szekvenálás alkalmazásával meghatározzák a szekvenciák bázisrendjét. Ezt követően a leolvasott szekvenciákat összeillesztik és megállapítják a nyitott leolvasási kereteket (open reading frame, ORF) és ezek biológiai funkcióit adatbázisok alkalmazásával (41). Az azonosított biológiai funkciókat és géneket meglévő biológiai hálózatokhoz (például, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) illesztik (42). Ezáltal arról is kapunk információt, hogy a meghatározott metabolikus útvonalak alul vagy felül reprezentálódnak, ami szintén a bakteriális közösségek funkcionális képességeiről árulkodik (42).

A shotgun szekvenálást nem korlátozzák a primer szekvenciák alkalmazásával kapcsolatos problémák, ezáltal pontosabb képet ad a közösségek összetételéről és diverzitásáról, mint az amplikon szekvenálás. A metagenomikai megközelítést alkalmazzák az antibiotikum rezisztencia gének kimutatására is (43).

Az antimikrobiális rezisztencia jelentős globális közegészségügyi probléma, amely akkor alakul ki, amikor a kórokozók antimikrobiális rezisztencia géneket (ARG) szereznek, elsősorban a kommenzális és patogén mikrobák közötti genetikai rekombináció révén (17).

A metagenomikai szekvenálási technológiák használata lehetővé tette az ARG szekvenciák azaz a rezisztom elemzését, valamint a közösség alapú antimikrobiális rezisztencia azonosítását (43).

Természetesen ennek a módszernek is megvannak a maga technika korlátjai, például a mikrobiális mintába a gazda eukarióta DNS-e is bekerülhet a DNS izolálás során, ami a szekvenálás eredményére torzító hatást fejthet ki (26). A legtöbb esetben a minta (például, széklet) túlságosan is komplex ahhoz, hogy teljes vagy akár részleges genomösszerakást lehessen végezni, így annak csak részeit lehet azonosítani. A költségeket tekintve drágább mint, az amplikon szekvenálás és sokkal bonyolultabb számítástechnikai analízist igényel (44).

3.1.3 16 S rRNS gén long read szekvenálás

A harmadik generációs szekvenálási technológiák – Pacific Biosciences (PacBio) és az Oxford Nanopore – képesek a 16 S rRNS gén teljes hosszúságú szekvenálására ezáltal lehetővé válik a releváns fajok elfogulatlan, specifikusabb azonosítása. Ezek a szekvenáló platformok a korábbi technológiákkal szemben hosszabb leolvasást képesek produkálni, ebből kifolyólag növelik a taxonómiai felbontást, csökkentik a target gén amplifikációjából, valamint a rövid olvasási hosszából eredő torzításokat. Azonban mind a PacBio mind az Oxford Nanopore technológia esetében a hibarány 5–15% tartományba esik (45–47). Bizonyos esetekben (például alacsony biomasszájú minták elemzésénél) a hibarány magasabb lehet, mint az organizmusok közötti különbség (48).

PacBio az első szekvenáló platform, amely egymolekula valós idejű szekvenálásán (single-molecule real-time sequencing; SMRT) alapszik. Ez a szekvenálási platform az egyik legelterjedtebb harmadik generációs szekvenálási technológia. A szekvenálás a komplementer szál szintézisén alapul. A Pacific Biosciences ugyanazokat a fluoreszcens festékeket használja, mint más NGS technológiák (48). Azonban ahelyett, hogy a nukleotid amplifikációs ciklusokat ugyanolyan módon hajtaná végre, mint más szekvenálási technológiák a nukleotidok beépülésével kibocsátott jeleket valós időben detektálják. Egy üreges lap segítségével végzik a szekvenálást, minden üreg egy lapra rögzített polimeráz enzimet tartalmaz, amit folyamatosan gerjesztenek (45).

A szekvenálás során pirofoszfát csoporton fluoreszcens festékkel jelölt nukleotidokat helyeznek a lapra, amiket a komplementer szál szintézisére használ fel a polimeráz enzim. A beépülésük ideje alatt a készülék le tudja mérni a fluoreszcens festékeket a nukleotidokon.

A módszer hosszú leolvasásokat képes generálni, viszont hátránya, hogy a folyamatos gerjesztés következtében a polimeráz destabilizálódik, ami szintézis hibákhoz vezet (25).

A PacBio technológia másik hátránya az áteresztőképessége, vagyis a platformon egyszerre és elfogadható költségek mellett futtatható minták száma jóval alacsonyabb, mint a MiSeq rendszer esetében (49, 50).

Oxford Nanopore által fejlesztett szekvenáló berendezés az élen jár a nanopórusos szekvenálási technológia kifejlesztésében. A módszer elődjétől teljesen eltérően nem a komplementer szál szintézisén alapszik. A Nanopore platform nem igényel amplifikációs lépést a könyvtár előkészítése részeként. Ennek a megközelítésnek az újdonsága, hogy a szekvenálandó DNS-szál közvetlenül elemezhető. A nanopórusos szekvenálási stratégia a négy bázis különböző elektromos tulajdonságaira épül. Ennél a szekvenálási stratégiánál az egyszálú DNS darabokat nanopórusokon vezetik át, melyeknek átmérője 1 nm nagyságú (51). A különböző nukleotidok a pórusokon átmenő áramerőséget különböző mértékben változtatják meg áthaladásukkor. Minden egyes szál egyenként kerül leolvasásra, nincs szükség DNS sokszorosításra (52). A nanopórusos szekvenálás akár 2 Mb hosszúságú olvasatokat is képes produkálni. A módszer hátránya az alacsonyabb áteresztő képesség, valamint a magasabb hibaaránya (kb. 10%) a második generációs szekvenáló berendezésekhez képest. A módszer előnye, hogy egyetlen másik platform sem teszi lehetővé a minta valós idejű elemzését, miközben a szekvenálás folyamatban van (53).

Habár az újabb technológiáknál a hibaarány jóval magasabb a második generációs szekvenálási technológiákhoz képest, ez a probléma megoldható a szekvenálási mélység növelésével. Jelenleg is folyik ezen új technológiák fejlesztése, tökéletesítése. Schloss és mtsai. képesek voltak csökkenteni a 16 S rRNS gén V1 - V9 régiójában megfigyelt hibaarányt 0,69-ről 0,027%-ra a PacBio szekvenálás esetében (54). A harmadik generációs szekvenáló rendszerek a jövőben izgalmas és új lehetőségeket kínálnak a mikrobiális konzorciumok ökológiájával kapcsolatos kérdések megválaszolásához.

3.2 A 16 S rRNS gén amplikon szekvenálás eredményét torzító biológiai és technikai tényezők

Mivel mindegyik tenyésztés független mikrobiális összetétel vizsgáló módszernél több lépéses eljárásról van szó az eredményt számos kísérleti faktor (például mintagyűjtés, DNS izolálás, sejtlízis, szekvenálási stratégia/platform, primerek, bioinformatikai elemzés) befolyásolja és torzítja (49).

3.2.1 Mintavétel és tárolás

A **mintavétel** az egyik kulcsfontosságú technikai tényező a mikrobaközösségek összetételének és diverzitásának összehasonlítására szolgáló nukleinsav alapú szekvenálási módszerek alkalmazása során (55). A különböző mintavételi típusok között jelentős különbségek figyelhetők meg (49). A mintavétel történhet invazív módon *biopszia* vételével, vagy kevésbé invazív módon *steril tampon* alkalmazásával a végbélből, illetve a mikrobiális konzorciumok vizsgálhatók a *széklet mintákból* közvetlenül (56–58).

Mintagyűjtés során a különböző környezeti tényezők (hőmérséklet, páratartalom) befolyásolják a bél-mikrobiom összetétel meghatározását. A környezeti forrásból származó DNS szennyezés sem hagyható figyelmen kívül a kísérlet megtervezése során. A mikrobiális DNS szennyezés jelentősen torzíthatja a kapott szekvenálási eredményeket, a taxonómiai eloszlásokat, baktériumok relatív gyakoriságát, ezáltal téves következtetések levonását eredményezheti a kutatás során. A mintavétel idejének minimalizálásával és aszeptikus laboratóriumi eszközök (köztük kesztyűk, maszkok és hajháló) használatával csökkenthető a DNS kontamináció (59).

A minta gyűjtés időtartalma és a **szállítási** körülmények szintén befolyásolhatják az izolált nukleinsavak minőségét és mennyiségét ennek következtében hatással vannak a későbbi szekvenálás eredményére is. A mikrobiális összetétel instabil, ezért az azonnali fagyasztás jelentősen a legoptimálisabb körülményt, de ez nem minden esetben megvalósítható. Jelenleg számos kémiai tartósítási módszert alkalmaznak a mintavétel és szállítás során, amelyek a mikroba összetétel stabilitását hivatottak fentartani (60).

A **minta tárolási körülménye** szintén befolyásolja a szekvenálás eredményét (61–63). A minta fagyasztása során a *Firmicutes/Bacteroidetes* baktérium törzsek arányának növekedése figyelhető meg (64). Továbbá, a mikrobiális minták hosszantartó tárolása során jelentősen csökken a mikrobaközösségek diverzitása és emelkedik bizonyos baktériumok mennyisége (például *Lactobacillus*) (49).

3.2.2 DNS izolálás hatékonysága

Minden tenyésztés független nukleinsav alapú molekuláris genetikai módszer alkalmazása során elengedhetetlen lépés a DNS kivonása a mintákból (6). Az alkalmazott DNS izolálási protokollok kritikusan befolyásolják a bél-mikrobiom vizsgálatok eredményeit, hatással vannak a mikrobiális közösségek reprezentációjára (58, 65, 66).

A nem megfelelően megválasztott, illetve kivitelezett nukleinsav kinyerési protokollokra épülő szekvenálások eredményei között jelentős különbségek tapasztalhatók még adott laboratóriumon belül is. Nagyon gyakori, hogy a kis relatív előfordulású fajokat, amelyek a teljes mikrobiom 0,1%-át alkotják, egyáltalán nem képesek detektálni. Habár ezek a mikrobák meglehetősen csekély hatással bírnak a teljes mikrobiomra, mégis jelentőséget nyerhetnek a megváltozott környezeti feltételek mellett. Gyakoriságuk, előfordulásuk megnőhet, ezáltal változhat a mikrobiom variabilitása, összetétele, a gazda fitnessze és így módon fontos evolúciós tényezőt jelenthetnek (67).

A DNS extrakció hatékonyságát befolyásolja a minta homogenizálása a sejtlízis (mechanikai, kémiai, enzimatis és ezek kombinációja) a bélsár összetétele (benne található anyagok nukleinsav abszorpciós tulajdonsága) a mintában található PCR inhibitorok koextrakciója, valamint az izolálható DNS mennyisége és a lízis során fellépő töredezettségéből adódó minősége (5, 49, 55).

A szakirodalom bőven taglalja, hogy az izolált DNS kihozatala és tisztasága fontos tényező mikrobiális ökoszisztémák vizsgálata során (67). A különböző DNS izolálási metodikák széklet minták esetén eltérő mennyiségű DNS-t eredményeznek és gyakran számottevő mennyiségű szennyező anyag is található az izolátumban.

A kísérő szennyező anyagok elsősorban a székletben található élelmiszer bomlástermékekből származnak (glikánok), valamint epesót és poliszacharidokat is tartalmaznak, ezek gátolják a DNS izolálás hatékonyságát, valamint az enzimatis reakciókat, így gyakran PCR inhibitorok is lehetnek. A DNS utólagos akár több lépcsős tisztítása hatásos megoldás lehet a szennyező anyagok eliminálására (68). Hatékony DNS utótisztítási lépés a DNS agaróz gélen történő visszaizolálása, a DNS szelektív kötése szilika membránhoz, valamint különböző mágneses gyöngyökhöz. Azonban a DNS utólagos tisztítása során a DNS mennyisége gyakran drasztikusan lecsökken, mely a mikrobiális ökoszisztémában az alacsony egyedszámban megtalálható fajok detektálását nehezíti meg.

Ez komoly dilemma elé állítja a kutatót, abból a szempontból, hogy melyik módszer a legalkalmasabb a vizsgált mikrobiális minta feldolgozására. Mivel vagy nagy mennyiségű (úgynevezett multitemplátot hordozó), de szennyezett DNS mintát használnak, vagy egy nagy tisztaságú, de a valósánál jóval kisebb mikrobiális diverzitást tartalmazó mintából kell következtetéseket levonni az eredeti mikrobiális populációra.

További gondot jelent, hogy a különböző módszerekkel eltérő mértékben reprodukálható az izolált DNS minősége/mennyisége. A reprodukálhatóság biztosításához ma már számos kereskedelmi forgalomban beszerezhető DNS izoláló kit áll rendelkezésünkre, amelyek többségben szilícium-dioxid-alapú oszlopot vagy mágneses gyöngy alapú technikát alkalmaznak. A szilícium-dioxid-alapú membrános izolálás esetében a DNS magas pH és só koncentráció mellett kötődik a szilárd fázishoz. A mágneses izolálás során mágneses mezőt alkalmaznak a mikrométer nagyságú paramágneses részecskék elválasztásához a szuszpenziótól (5). A molekuláris biológiában a mágneses gyöngyök egyszerű és megbízható módszert nyújtanak a különféle típusú biomolekulák köztük genomi DNS, plazmidok, mitokondriális DNS, RNS és fehérjék tisztítására (69).

A kereskedelmi forgalomban beszerezhető DNS izoláló kitek előnye, hogy nagy mintaszám esetében alkalmazhatóak automatizált DNS izoláló robotokra (70). A legtöbb kereskedelmi forgalomban kapható kit fő hátrányának tartják, hogy a mikrobiális eredetű mintákból a DNS-nek alacsony koncentrációjú a kihozatala. Így előfordulhat, hogy főként a dominánsan előforduló fajokat képes csak izolálni és a kis egyedszámú közösség szempontjából fontos szereppel bíró fajok nem észlelhetők (71).

Ezenkívül a különböző DNS extrakciós kitek eltérő tulajdonságaiból adódóan eltérő hatékonysággal izolálnak ugyanazon mintából, ami eltérő összetételű minőségű DNS izolátumokat eredményez (6, 72).

Számos tanulmány a konvencionális fenol-kloroform-izoamilalkoholos (25:24:1) DNS izoláló módszerre támaszkodik, amelynek mennyiségi kihozatala nagyságrendekkel nagyobb, mint a kereskedelmi forgalomban kapható izoláló kitek esetében, ellenben a kitek alkalmazásával jobb DNS tisztaság és diverzebb mikrobióta profil érhető el (73).

A minta homogenizálása

A székletmátrixban található baktériumok nem szabadon lebegő egyedek, inkább felszínhez társult közösségekben élnek, ahol táplálkozási és védelmi előnyök alapján ragaszkodnak a biomaszához. Mivel a széklet minták jelentősen különböznek egymástól a minta homogenizálása alapvető fontosságú. A DNS izolálás első lépéseként ki kell vonnunk és fel kell tárnunk a székletben jelen lévő, a bélflóra mikrobiális közösséget reprezentáló baktériumokat. Ennek során olyan eljárás optimalizálása a cél, amelyben a kapott extraktum a legnagyobb számban tartalmazza a különböző baktérium sejtekből a DNS-t. A székletmintából történő DNS izolálást vagy a széklettel együtt végzik (direkt lízis), vagy a vizsgált bakteriális sejteket előbb leválasztják a szennyező forrásoktól, úgynevezett centrifugálásos lépésekkel bakteriális sejtszuszpenziót készítenek (indirekt módszer). A megfelelő centrifugálási eljárás kidolgozása nagymértékben befolyásolja a székletből kiülepített mikrobiom összetételét. Előnye, hogy az ezáltal kapott bakteriális sejtszuszpenzió szennyező forrásoktól mentes lesz. Azonban jóval alacsonyabb DNS kihozatalt eredményez a direkt lízishez képest, így a valósnál jóval kisebb diverzitású mintát kapunk (74).

Lízis/Sejtek feltárása

A mikrobiális konzorciumok vizsgálatánál egy másik kritikus pont a sejtek feltárásának hatékonysága (6). Bizonyos baktérium-csoportokból sejtfalösszetételükből adódóan (Gram-pozitív) nehezebben nyerhető ki a DNS, egy gyengébb lízis alkalmazása során ezek a fajok alulreprezentálva jelennek meg a szekvenálás során (4, 75). A bakteriális burkok között a legkifejezettebb különbség a Gram-pozitív és Gram-negatív sejtfalak között van (73).

A székletben található bakteriális sejtek feltárhatók kémiai, mechanikai vagy enzimatis uton, valamint a hatékony sejtfeltárás érdekében gyakran ezek kombinációit alkalmazzák (49).

A kémiai sejtfeltárást detergens vegyületekkel (nátrium-dodecil-szulfát (SDS), cetil-trimetil-ammónium-bromid (CTAB)) proteináz K jelenlétében, az enzimatis lízist lizozimmal, pronázzal (bakteriális eredetű aspecifikus proteináz) a mechanikus lízis esetében pedig kerámia vagy rozsdamentes acélgyöngyöket alkalmaznak (6).

A Gram-pozitív baktériumok sejtfalának feltárásához a szakirodalom a mechanikai sejtfeltárást (üveggyöngy, kerámiagyöngy, „bead beating”) javasolja.

Azonban a mechanikai lízis növelheti az izolált DNS töredezettségét, mely a PCR amplifikáció során műtermékek kimérák keletkezéséhez vezethet (64).

Másrészt egy enyhébb kezelés részleges lízist eredményezhet, ezáltal a vastagabb peptidoglikán sejtfallal rendelkező baktériumok esetében a DNS nem szabadul fel, így nem járul hozzá a 16 S rRNS gén amplikon szekvenálás eredményéhez, ami torzítja a mikrobiális összetétel meghatározását (49). Ezért is fontos a sejtlízis optimalizálása, hogy olyan DNS-t nyerjünk ki, ami a különböző sejtfalösszetétellel rendelkező baktériumok képviselőit reprezentatívan tartalmazza (71).

3.2.3 PCR inhibitorok

A PCR egy enzimátikus reakció és ebből következik, hogy érzékeny azon anyagok jelenlétére, melyek gátolják az enzim működését. A PCR inhibitorok részlegesen vagy akár teljes mértékben gátolhatják az enzimátikus reakciókat. A PCR inhibitor komponensek leggyakoribb forrása a minta mátrixa, mely együtt extrahálódik a DNS-el a minta feltárását követően. A 16 S rRNS gén amplikon szekvenálás többlépéses PCR reakciókat tartalmaz, mely során a mintában található inhibitor komponensek jelenléte a PCR minden lépésében kifejtethet gátló hatásukat. A gátló anyagok jellege és mennyisége mintánként változó, hatásuk jellemzően koncentrációfüggő, a kit-alapú DNS-extrakciós módszerek alkalmazása csökkenti a mennyiségüket (5).

Az inhibitorok között megkülönböztettünk szervetlen anyagokat, és szerves anyagokat (huminsav, epesók és poliszacharidok) (49). A szervetlen inhibitorok közül a leggyakoribbak a kationok (K^+ , Na^+ , Mg^{2+} és Ca^{2+}). A kalciumion kétértékű kation, képes a PCR reakciókat gátolni azáltal, hogy kompetítora a polimeráz enzimek kofaktorának a magnéziumionnak. A PCR inhibitorok jelentős része szerves vegyület, amelyek az izolálás során kerülnek a DNS izolátumot tartalmazó oldatba. A széklet különféle PCR inhibitorokat tartalmaz, amelyek közvetlenül befolyásolják a DNS extrakciót és a 16 S rRNS gén amplikon könyvtárkészítés során alkalmazott PCR reakciók hatékonyságát (76).

A széklet összetett biológiai minta számos mikroorganizmus és különböző típusú élelmiszer bomlástermék található meg benne, például glikánok, amelyek befolyásolják a molekuláris vizsgálatok érzékenységét (68). A glikánok elsősorban zöldségfogyasztás bomlástermékeiből kerülnek a székletbe. A glikánok szerkezetükből adódóan hasonló fizikai-kémiai tulajdonsággal rendelkeznek, mint a nukleinsavak, emiatt a DNS-t kiszoríthatják az abszorpciós helyekről izolálási lépések során, ami csökkenti a DNS extrakció hatékonyságát. A PCR reakciókat is gátolhatják, mivel képesek a szabad DNS molekulákhoz kötődni és ezáltal csökkentik a DNS-DNS hibridizáció hatékonyságát (68, 77).

Korábbi tanulmányok kimutatták, hogy a baktériumok a székletben még nagyon magas koncentrációban is észlelhetetlenek maradhatnak ezeknek a PCR inhibitorok jelenléte miatt (65, 77, 78).

A bél-mikrobiomban előforduló *Escherichia coli* és *Enterococcus* baktériumok exopoliszacharidokat termelnek (79, 80). A baktériumok által termelt a székletben jelen lévő exopoliszacharidok szintén gátolják az enzimatikus reakciókat és torzíthatják a bél-mikrobióta összetételére vonatkozó eredményeket (79, 80).

Különböző módszereket fejlesztettek ki az inhibitorok székletből történő eltávolítására vagy inaktíválására, amivel nagy tisztaságú DNS állítható elő. Azonban korlátozott mennyiségben rendelkezésre álló minták analízisekor, vagy alacsony egyedszámban jelenlévő mikrobák vizsgálata során, nem biztos, hogy a DNS tisztítási módszer alkalmazásával a bél-mikrobióta valódi összetételét kapjuk meg (79, 80).

3.2.4 Kontamináció/Reagens szennyeződés/Kitome

A DNS extrakciós kitekben és a laboratóriumi reagensekben található DNS szennyezés jelentősen befolyásolhatja a mikrobióta vizsgálatok eredményeit. A DNS szennyezés lehetséges forrásai a molekuláris biológiai tisztaságú víz, PCR-reagensek a DNS-extrakciós kitek, valamint a laboratóriumi környezet is (81).

A reagens mikrobiom („Kitome”) jelentőségének figyelmen kívül hagyása fokozott diverzitást eredményezhet a biológiai mintákban, ami a 16 S rRNS gén alapú ampikon szekvenálás eredményét nagymértékben befolyásolja. Eddig számos olyan mikrobiális DNS szennyezést sikerült azonosítani a kutatóknak, amelyek elsősorban talajban és vízben élő nitrogénkötő baktérium nemzetségekhez tartoznak, mint az *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Herbaspirillum*, *Legionella*, *Leifsonia*, *Mesorhizobium*, *Methylobacterium*, *Microbacterium*, *Novosphingobium*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Sphinganthom* (59).

Ennek egyik lehetséges magyarázata az, hogy az ultratiszta víz előállítása során gyakran nitrogént használnak (82).

Számos módszert dolgoztak ki a reagensek kezelésére a lehetséges szennyeződés csökkentése érdekében, ideértve a gamma- vagy UV-sugárzást, DNáz-kezelést, restriktációs emésztést, cézium-klorid-sűrűség-gradiens centrifugálást, DNS-interkalációt és keresztkötetést 8-metoxi-pszoralénnel, propidium-monoaziddal vagy etidium-monoaziddal.

Azonban a javasolt módszerek egyike sem bizonyult teljes mértékben alkalmasnak a reagens DNS szennyeződésének megbízható csökkentésére (83).

A szennyező DNS jelenléte különös kihívást jelent az alacsony mikrobiális biomasszát tartalmazó mintákkal dolgozó kutatók számára (84). A kiindulási anyag alacsony abszolút mennyiségét meghaladhatja a minta feldolgozásához használt reagensekből vagy laboratóriumi eszközökből származó DNS szennyezés, így a mikrobiális eredmények egy része vagy egésze környezeti forrásokból származhat (59, 84).

Mivel a DNS extrakciós kitek olyan torzításokat vezetnek be, amelyek az összes mintát egyformán érintik, ezek a torzítások szabályozhatóak és mérsékelhetőek ugyanazon reagens használatával a megfelelő negatív és pozitív technikai kontrok bevezetése által (81).

3.3 A mikrobiom és a gazdaszervezet kölcsönhatása

A **mikrobióta** magába foglalja a patogén és nem-patogén mikroorganizmusok (baktériumok, archeák, vírusok, gombák és protozoonok) összességét, amelyek számukra lakhelyet és tápanyagforrást egyaránt biztosító gazdaszervezettel együtt élnek. A **mikrobiom** a gazdaszervezet egy adott régióján élő mikroorganizmusok kollektív genomját és géntermékeit jelenti (85). Összetett és diszkrét ökoszisztémát alkot a gazdaszervezeten belül és kívül, alkalmazkodik az egyes élőhelyek környezeti feltételeihez. A mikrobiom és a gazdaszervezet közötti koegzisztencia nem csupán együtt létezést, hanem kölcsönös kapcsolatot is jelent (30).

A szimbióta mikroorganizmusaink mintegy „szuperszervként” lényeges befolyással bírnak a gazdaszervezet működésére, tömegük és az általuk szolgáltatott genetikai információk miatt. Az emlősök emésztőrendszeri mikrobiomja genetikailag rendkívül heterogén és nagymértékű. Becslések szerint mintegy 500-1000 különböző baktérium fajt tartalmaz (86). Sokáig tartotta magát az a nézet, hogy az emberi sejtek számához ($\sim 10^{13}$) képest a mikrobiális sejtek száma egy nagyságrenddel nagyobb a humán szervezetben ($\sim 10^{14}$), valamint a mikrobiom génkészlete százszor több mint, az emberi genomé (87).

Ezek az adatok az NGS technológiák megjelenésével és fejlődésével dőltek meg. Jelenlegi kutatások alapján úgy gondolják hogy, a humán és mikrobiális sejtek aránya sokkal inkább 1:1, a korábban vélt 1:10-hez képest (88).

A különböző testrészekben a mikrobák száma és fajgazdagsága eltérő, a mikrobiom legnagyobb mikroorganizmus populációja a bélben lokalizálódik.

A bél-mikrobióta olyan, mint egy ujjlenyomat, minden gazda bélrendszerében egyedi összetételű, rá jellemző mikrobanépeség, mikrobiom él.

A bél-mikrobióta a gazdaszervezettel valódi szimbiózisban él és számos egészséget befolyásoló funkciót lát el, egyebek között közreműködik a kórokozó baktériumok megtelepedésének kivédésében azáltal, hogy fizikai gátat képez. Fokozza a bélrendszer immunrendszerének hatékonyságát, védi a bélnyálkahártya integritását (89). A jól működő bél-mikrobióta fontos szerepet tölt be az emésztésben, epesav szintézisben, valamint fontos vitaminokkal, nyomelemekkel látja el a gazdaszervezetet (90). A Metabolikus aktivitása egy szerv működéséhez hasonlítható, „elfelejtett szervként” is említik. Emészthetetlen szénhidrátok és fehérjék fermentációja útján energiát termelnek, és elősegítik a rövidláncú zsírsavak [short-chain fatty acids (SCFAs)] keletkezését és felszívódását, amelyeket a vastagbél a májsejtek és izomszövetek használnak fel.

A bél-mikrobióta egyensúlya a gazdaszervezet számára számos előnnyel jár, míg egyensúlyának megbomlása (diszbiózis) számos anyagcserével és immunrendszerrel összefüggő betegség kialakulásához vezet (91).

3.3.1 SCFA termelés

A bél-mikrobiom baktériumai emészthetetlen szénhidrátok (leginkább rostok) fermentációja során energiát termelnek, és elősegítik a rövidláncú zsírsavak termelődését és felszívódását. Ez a folyamat biztosítja a gazdaszervezet számára, hogy hasznosítani tudja azt az energiát, ami a GIT felsőbb részeiben nem emészthető szénhidrátokból (jellemzően rostokból) és fehérjékből szabadul fel. Az SCFA-k telített nyílt láncú monokarbonsavak, szénláncuk hat szénatomnál rövidebb (92). A legfontosabb ilyen zsírsavak az acetát (ecetsav), propionát (propionsav) és a butirát (vajsav), ezek moláris aránya a vastagélben 60:20:20 (93–95). Az acetátot és a propionátot főként a *Bacteroidetes*, míg a butirátot a *Firmicutes* baktérium törzsek termelik (96).

Az **acetát** termelésére a baktérium fajok széles skálája képes a legtöbb enterális baktérium termeli, például *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Akkermansia muciniphila*, *Bacteroides* spp., *Prevotella* spp., *Ruminococcus* spp. és a *Streptococcus* (96).

A propionát és butirát szintézis útvonalai konzerváltak, és szubsztrát specifikusak csak bizonyos baktériumok tudják előállítani őket (96, 97).

A **propionátot** a *Phascolarctobacterium succinatutens*, *Bacteroides* spp., *Dialister* spp., *Megasphaera elsdenii*, *Veillonella* spp., *Coprococcus catus*, *Roseburia inulinivorans*, *Ruminococcus obeum* és *Akkermansia muciniphila* baktériumok termelik (96, 97).

A legfontosabb **butirát** termelő baktériumok; a *Roseburia* spp., *Ruminococcus* spp., *Subdoligranulum* spp., *Eubacterium rectale*, *Clostridium leptum*, *Eubacterium hallii*, *Coprococcus eutactus*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Anaerostipes caccae*, *Butyrococcus pullicaecorum*, *Blautia obeum* és *Coprococcus catus* (96, 97).

A megtermelt SCFA-k akár 95%-a felszívódik a vastagbélsejtekben és ezt követően eltérően hasznosulnak.

A **butirát** vitathatatlanul a legfontosabb SCFA a gazdaszervezet egészsége szempontjából (95), a bél sejtek (kolonociták) energiaforrásai, elősegítik a bél-epithelialis sejteinek differenciálódását. Potenciális rákellenes aktivitással is rendelkezik, mivel képes a sejtek apoptózisát indukálni, valamint hiszton-deacetilázok gátlásával a génexpresszió szabályozására (98). A butirát cAMP-függő mechanizmus révén aktiválja a bélben a glükoneogenezist, ezáltal fontos hatása van az energia homeosztázisra. Továbbá, csökkenti a bélnyálkahártya gyulladását azáltal, hogy gátolja az NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain enhancer of activated B cells) transzkripciós faktor és az interferon gamma termelődését (IFN- γ) (99).

Az **acetát** a májban a koleszterin és a zsírsavak szintézisének szubsztrátuma, serkenti a bél véráramlását és az oxigén felvételét, valamint a bél motilitását is fokozza. Az acetát a legnagyobb mennyiségben kimutatható SCFA a vérben és elengedhetetlen kofaktor a többi baktérium szaporodásához, például a *Faecalibacterium prausnitzii* nem tenyészhető acetát hiányában (100). Az acetát bélhámsejteken történő felszívódását követően a perifériás szövetekbe szállítódik, ahol koleszterin anyagcsere és lipogenezis egyik szubsztrátja, valamint jelentős szerepet játszik a központi étvágy szabályozásban is (101).

A **propionát** csökkenti a lipogenezist (zsírsejtek szintézise), a szérum koleszterinszintjét, antikarcinogén hatású, valamint telítettség érzést vált ki. A propionát szintén a hámsejtek energiaforrása, de átkerül a májba is, ahol a glükoneogenezisben is szerepet játszik (102).

Bizonyos *Bacteroidetes* és *Firmicutes* törzshöz tartozó fajok képesek aminosav fermentációja által butirát és propionát szintézisére.

Az SCFA-k nagyon fontos szerepet játszanak a pH szabályozásában ezáltal kedvezőtlen feltételeket teremtenek a másodlagos epesavak (7-dezoxikolát és litokolát) létrejöttének (103), növelik a kalcium, a vas és a magnézium felszívódását (103). Ezenkívül, ezek a savak befolyásolják a belek normál szerkezetének, integritásának és működésének fenntartását. Gyulladásgátló aktivitásuk van, amely magában foglalja a gyulladásos mediátorok aktivitásának gátlását a bélhamban (104).

Ezenkívül az SCFA-k termelődése olyan körülményeket teremt a vastagbélben, ami a jótékony bél-mikrobióták szaporodását segíti elő, ezáltal gátolják a patogén mikroorganizmusok, például az *Escherichia coli*, a *Salmonella* vagy a *Campylobacter* növekedését, amelyek versengenek a kolonizációs helyekért (105).

Az SCFA-k a szisztémás lipid- és a glükóz/inzulin anyagcsere szabályozásában is részt vesznek, mint jelátviteli molekulák (106). Hatásaikat részben a specifikus G-fehérje-kapcsolt zsírsavreceptor-2 és -3 (GPR41/FFAR2 és GPR43/FFAR3) aktiválása útján fejtik ki. Ezen receptorok a bélepithéliumban, a zsírszövetekben és a hasnyálmirigy szigetsejtekben is expresszálódnak (107). A rövid láncú zsírsavak javítják a metabolikus funkciókat 2-es típusú cukorbetegségben. Továbbá, az SCFA-k csökkentik a zsírszövetben a pro-inflammatorikus citokinek termelődését. Ezen antiinflammatorikus hatásaik által elősegítik a glükóz felvételt és csökkentik a vércukorszintet, ezáltal csökkentik az inzulinrezisztenciát (107).

A bél-mikrobióta, az általa termelt rövidláncú zsírsavak útján részt vesz a vérnyomás szabályozásában is. G-fehérjékhez kapcsolt receptorok (Olf78 receptor) találhatóak a vesék juxtaglomerularis apparátusában, amelyek szabályozzák a renin szekréciót, válaszul a jelenlévő SCFA-ra. A Gpr41, ami szintén egy G-fehérjéhez kapcsolt receptor kifejeződik az erek simaizom sejtjeiben és szintén érzékenyek az SCFA-ra (108). A propionátok ezzel a mechanizmussal okoznak értágulatot ezáltal csökkentik a vérnyomást. Korábbi tanulmányban kimutatták, hogy az antibiotikum adagolása emelte a vérnyomást egerekben, amit az antibiotikum hatására sérült bélflórával magyaráztak.

A tápanyagok megfelelő összeállításával a rövidláncú zsírsavak szintézise jelentősen befolyásolható és az élettanilag kedvező hatások fokozhatók. Rostban gazdag étrend elősegíti a szénhidrátok fermentációját, az SCFA-k képződését, amelyeknek gyulladás gátló hatásuk van. Az SCFA-nak a gyulladásos bélbetegségek prevenciójában is fontos szerepe van.

3.3.2 *Epesav szintézis*

A gerinceseknél az epesavak alapvető szerepet játszanak a zsíryanycserében. Az epesavak a máj hepatocitáiban szintetizálódnak koleszterinből (109).

Detergens tulajdonságúak, étkezés után a vékonybélbe szekretálódnak, ahol elősegítik a zsírok és zsíroldékony vitaminok (A, D, E és K) emésztését és enterociták általi felszívódását.

Az epesavak hormonszerű hatásokat is kiváltanak, szabályozzák a tápanyagcserét (110), specifikus magreceptorok és G-fehérjéhez kapcsolt receptorok (GPCR) aktiválódása által (110).

A bélbaktériumok az epesók számos biotranszformációját képesek végrehajtani enterohepatikus körforgásuk során (111). Az epesavak biotranszformációját a hidroxiszteroid dehidrogenáz (HSDH) és az epesav hidroláz (BSH) végzik, melyeket a bélbaktériumok állítanak elő (112). A másodlagos epesavak (dezoxikólsav és litokólsav) bakteriális $7\ \alpha/\beta$ -dehidroxilációjával képződnek (113). A Gram-pozitív bélbaktériumok rendelkeznek leggyakrabban BSH aktivitással, beleértve a *Clostridium*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium* és *Lactobacillus* (114-115), míg a Gram-negatív baktériumok esetében eddig csak a *Bacteroides* nemzetség tagjaiban mutatták ki (115).

Az epesavak antimikrobiális hatásúak, amit a detergens és hidrofób tulajdonságuk eredményez. Az epesavak növekvő koncentrációja a bélben a membrán réteg bontását és az integrált membránfehérjék disszociációját okozzák, ami az intracelluláris tartalom szivárgását eredményezi. Az epesók még szubmicelláris koncentrációknál is hatással lehetnek a membrán lipid összetételére (115). A bélbaktériumok számos mechanizmus révén ellenállnak az epesóknak, többek között különböző efflux pumpák, membrán lipid és protein expressziós mintázatok változása által (115).

Az epesavak bélbaktériumok által végzett különféle biotranszformációja befolyásolja a bél mikrobiomjának összetételét, diverzitását és a gazdaszervezetre. Összefüggést találtak a másodlagos epesavak megnövekedett szintje és GI-rendszerhez kapcsolódó betegségek között.

3.3.3 *Vitamin szintézis*

Több mint 40 éve ismert, hogy a bél-mikrobióta baktériumai, mint például a *Lactobacillus* és a *Bifidobacterium de novo* képesek szintetizálni a K-vitamint és a B-komplexhez tartozó vitaminokat (a biotint a kobalamin, a folsav, a niacin, pantoténsav, piridoxin, riboflavin és tiamin) (87).

Ezek a vitaminok egyértelműen fontos szerepet játszanak a baktériumok anyagcseréjében, valamint az emlősök metabolikus útvonalaira is hatással vannak (87). Elsősorban enzimatikus kofaktorként vagy a kofaktorok prekursoraként működnek (116), például a butirát termelés közvetlenül két vitamin jelenlététől függ, ezek a tiamin és a riboflavin (117, 118). A vitaminokkal kapcsolatos kofaktorok anyagcseréje energiaigényes folyamat; ezért végső formáikat vagy előfutáraikat általában a mikrobiális közösség tagjai szolgáltatják (87).

A riboflavin és a biotin vitaminok szintézise esetében a *Bacteroidetes*, *Fusobacteria* és *Proteobacteria* törzsek gyakorlatilag minden mikrobája, a *Firmicutes* és *Actinobacteria* tagjainak jóval kisebb hányada képes a B-vitamin bioszintézisére (119).

3.3.4 A mikrobiom endokrin funkciói

A mikrobiom közvetlen hatást fejt ki a bél nyálkahártyájára és az enterális idegrendszerre. Több vegyületet termel és szabályoz, amelyek eljutnak a keringésbe és befolyásolják a távolabbi szervek és rendszerek működését. A mikrobióta metabolikus teljesítménye jóval túlmutat a helyi gasztrointesztinális rendszeren, működése egy endokrin szerv működéséhez hasonlít. A mikrobióták által termelt metabolitok hatásaikat az enterális idegrendszeren kívül, számos más szervben, például az agyon is kifejtik (120).

A mikrobiomnak közvetett szerepe van a komplex endokrin hálózatok szabályozásában. A hormonális metabolitok az intersticiális szöveteken keresztül bejutnak a vér- és nyirokkeringésbe, majd a disztális célszerveken és szöveteken fejtik ki hatásukat alacsony koncentrációban.

Ellentétben más endokrin rendszerekkel vagy szervekkel – amelyek egyetlen vagy legfeljebb kis számú humorális ágenszt választanak ki – a bél-mikrobióta több száz metabolit előállítására képes. A bél-mikrobiom bizonyos baktérium törzsei képesek neurotranszmittereket szintetizálni, például γ -aminovajsavat (GABA), noradrenalin, dopamint és szerotonint, ezek hatásukat elsősorban a központi idegrendszerben (KIR) fejtik ki (121–123).

A bélbaktériumok által termelt SCFA-k klasszikus endokrin jelátvitel révén hormonális hatásokat fejtenek ki. Az SCFA-k szabályozzák mind az enteroendokrin szerotonin szekrécióját, mind a peptid YY felszabadulását, valamint a glukagonszerű peptid-1, a grelin és a leptin hormonok termelését (121–123).

Közvetett módon és egyelőre ismeretlen mechanizmusok révén a bél-mikrobióta kontrollt gyakorol a hipotalamusz-hipofízis-mellékvese tengelyre (121–123).

3.3.5 A bél integritásának fenntartása

A gyomor-bél traktus egy speciális szerv, amelyben az étel emésztése mellett dinamikus kölcsönhatások lépnek fel a gazdasejtek és a komplex mikrobiális környezet között. A bélhámréteg (intesztinalis epithelium) fizikai és kémiai (nyálkahártyaréteg) gátjával, valamint a sejtes immunrendszerrel együtt kulcsfontosságú szerepet tölt be, mint első védőfal a külső tényezőkkel szemben.

A bélhámréteg szimbiotikus kapcsolatot tart fenn a bél-mikrobiomot alkotó mikrobióta tagokkal. A gyomor-bél traktus kommenzális baktériumai részt vesznek az emésztésben és az immunrendszer fejlődésében (124).

A bél integritásának fenntartásában alapvető szerepe van az epithel sejteknek. Az epithel sejtek szoros kölcsönhatásban vannak a bélben élő mikrobákkal és hatást gyakorolnak az immunrendszer toleranciájának kialakulásában, ezáltal hozzájárulnak a gazdaszervezet normális működéséhez (125).

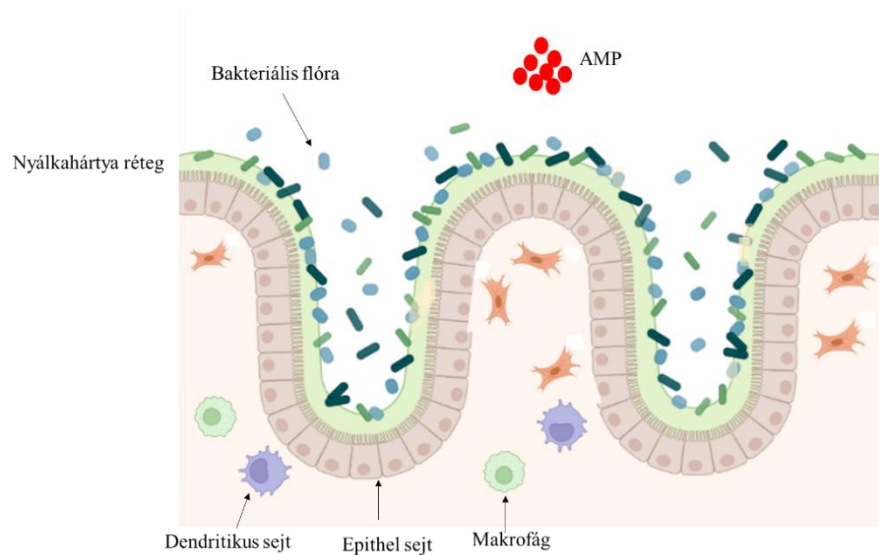
Az epithel sejtek integritásának fenntartásában az úgynevezett „tight junction” fehérjék (occludin, claudin és a zonula occludin) vesznek részt (126). Ezek a fehérjék keresztül a káros anyagok transzportja korlátozott. Az esszenciális molekulák transzportja, intracelluláris jelátviteli transzdukciós rendszeren keresztül valósul meg, amelyet számos extracelluláris inger, például citokinek, GTPázok és poszttranszlációs módosítások is aktiválhatnak.

Ha a transzport rendszer egyensúlya megbomlik az a gát integritásának sérüléséhez vezet, amely számos kóros állapottal, például gyulladással, bélbetegséggel és anyagcsere zavarokkal függ össze (127).

Az SCFA-k fontos szerepet játszanak az epithelialis gát integritásának szabályozásában a „tight junction” fehérjék keresztül (92). A vastagbélben termelt SCFA-k közül a butirát a Claudin-1 és a Zonula Occludens-1 expresszióját indukálja (126).

A belet nyálkahártya béleli, amely rendkívül hatékony első védelmi mechanizmust jelent a külső környezettel szemben (128). Csak néhány speciális baktérium, mint az *Akkermansia*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Helicobacter* és *Enterococcus* képesek a nyákréteghez kapcsolódni és ez által hozzáférni a hámréteghez. Az egészséges vastagbélben nagy mennyiségű *Akkermansia* és *Lactobacillus* található, míg különböző patológias folyamatokban (például gyulladás, Crohn betegség) mennyiségük csökken. Ez arra utal, hogy ezek a baktériumok kulcsfontosságú szerepet játszanak a bél gát integritásának fenntartásában (127).

A bélhámrendszer immunsejteknek is otthont ad, beleértve a dendritikus sejteket, a T-sejteket, a B-sejteket és a makrofágokat, amelyek az epithel sejtekkel szoros kapcsolatban működnek a bél homeosztázisának fenntartása érdekében (127).



2. ábra: A bélfal különböző rétegei. A bél-mikrobióták közvetlenül a bél nyálkahártyájához tapadnak. A bél-epithel sejtek képezik a legfontosabb gátat a belső és a külső környezet között. A Paneth sejtek antimikrobiális fehérjéket (AMP) termelnek, amelyek gátolják a baktériumok megtapadását a hámfelszínen. A bél immunológiai gátja szabályozza az immuntoleranciát és a patogén baktériumokra adott választ.

3.3.6 Az egyensúlyi és diszbiotikus mikrobiom jellemzése

Egyensúlyi bél-mikrobiomban a gazdaszervezet számára előnyös egészségvédő hatással rendelkező jótékony mikroorganizmusok vannak túlsúlyban számban és aktivitásban a potenciálisan patogén fajok felett, ezt az állapotot nevezzük eubiózisnak (vagy normobiózisnak) (129).

Szimbiomnak nevezzük a gazdaszervezetre kölcsönösen előnyös hatást kifejtő mikrobák összességét (3). A szimbionta mikrobák mennyisége tág határok között változik, nincsenek stacioner állapotok a fajok állandó versengésben vannak egymással a tápanyagokért és a kolonizációs helyekért.

A mikrobiális ökoszisztémára a kaotikus dinamika a jellemző az összetételében bekövetkező kis módosulások is hatványozottan felnagyítódnak, ezt nevezzük „pillangó hatásnak”. A csoportok tagjai amellet, hogy versengenek az erőforrásokért, képesek arra, hogy összehangolják az anyagcseréjüket, bizonyos tulajdonságaikat és funkciójukat, mivel közösen hatékonyabb működésre képesek, mint az egyes egyedek önállóan. Ezáltal képesek új életterek birtokba vételére és olyan tápanyag források felhasználására, amelyekre magukban képtelenek lennének (130).

A kolónia tagjai folyamatosan érzékelik a környezetüket és reagálnak is annak változásaira. A mikrobiom a külső hatásokkal szemben ellenállóbb és többféle funkció ellátására is képes, mint az alkotó egyedek bármelyike. Egyes fajok magasabb szintű viselkedési rugalmassággal rendelkeznek a változó környezettel szemben, ennek eredményeképp sikeresebben megbirkóznak a különböző környezeti hatásokkal. Azokban az esetekben amikor bizonyos mikrobiális fajok előnyhöz jutnak, a többi fajnak is alkalmazkodni kell a megváltozott környezeti feltételekhez, különben kipusztulhatnak (131). A mikrobiom tagjainak összehangolt működése több szinten különböző koordinációs mechanizmuson keresztül valósul meg. Egyik ilyen koordinációs mechanizmus amikor a mikrobiom tagjai összehangolják rezisztencia génkészleteiket horizontális géntranszferen keresztül, ezáltal képessé válnak egymás tolerálására és más sejtek elleni hatékony fellépésre. A mikrobiális ökoszisztéma tagjai metabolizmus szintű koordinációt is alkalmaznak, amikor is a sejtek a környező sejtsűrűség függvényében összehangoltan változtatják meg működésüket, ezt nevezzük „*quorum sensing-nek*” (132).

Számos faktor (étrend, környezet, stressz, antibiotikum, toxinok, gyógyszerek és kórokozók) a bél-mikrobiom összetételében és így működésében is komoly módosulásokat eredményezhet, amely a gazdaszervezet számos funkcióját befolyásolhatja (128).

Ha a bélflórát alkotó baktériumok diverzitása csökken, bizonyos baktérium törzsek elszaporodhatnak, ezáltal a mikrobiális egyensúly károsodik, **diszbiózis** alakul ki. A széklet mikrobiom konzorciumának NGS-technológiákkal történő meghatározása során a bél-mikrobiomot alkotó fajok identifikálása és filogenetikai azonosítása révén meghatározható a diverzitás változása.

Továbbá, azonosítható a diszbiózis következtében bizonyos baktériumok túlnövekedése, illetve csökkenése, tehát meghatározható **diszbiom** összetétele. Diszbiomról beszélünk minden olyan mintázat esetében, amelyek szignifikánsan eltérnek az egyensúlyi mikrobiom összetételétől. A mikrobiális ökoszisztéma zavarai során az egészséges gazdaszervezetek bél-mikrobiomjára jellemző anaerob baktériumok (*Firmicutes*, *Bacteroidetes*) mennyisége csökken a fakultatív anaerob (*Proteobacteria*) közösségek javára (91).

A fakultatív anaerob baktériumok mennyiségének növekedésével a bél lumenben emelkedik az oxigén szint, ami káros metabolitok termelődését eredményezheti (például, másodlagos epesavak). A mikrobiális ökoszisztéma egyensúlyának felborulása során az anaerob SCFA termelő baktériumok száma is jelentősen csökken (133).

A patogén baktériumok túlzott elszaporodása csökkenti a tápanyagok felszívódását, növeli a nyálkahártya vastagságát, a bélfal átjárhatóságát és a tápanyagok áthaladásának sebeségét a béltraktusban (133).

Továbbá, a bél fokozott permeabilitása miatt, a patogén baktériumok vagy azok sejtfal komponensei a bélnyálkahártyán keresztül kijutnak a bél lumenéből (transzlokáció) és akumulálódhatnak a szövetek közötti térben (134). Ebben az esetben a hasznos baktériumok is ártalmassá válhatnak a gazdaszervezetre a béltraktusból kikerülve (91).

A gazdaszervezet és a bélflóra közötti egyensúly megbomlása leggyakrabban a GIT kapcsolatos betegségeket okoz, amelyekben a gazdaszervezet (immunrendszer) és bél-mikrobiom együttműködésében bekövetkező változások a lumenből származó ingerekkel és antigénekkkel ellenőrizetlen gyulladást indítanak el és/vagy állandósítanak a bél nyálkahártyájában és egyes esetekben az extraintesztinális szövetekben is (134).

A diszbiózis nem csak lokális gyulladással jár, hanem számos más betegség kiváltó oka is lehet például, az irritábilis bél-szindróma, Crohn-betegség, colitis ulcerosa, 2-es típusú diabétesz, hipertónia, elhízás (134). Számos tudományos publikáció foglalkozik a diszbiózis okozta patológias folyamatok kialakulásával a **pathobiom** összetételével.

A pathobiom azon gazdaszervezethez társított mikroorganizmusokat tartalmazza, amelyek csökkent egészségi állapotot eredményeznek a gazdaszervezettel való kölcsönhatás eredményeként és különböző patológias folyamatok megjelenésével függenek össze.

3.3.7 Mikrobiális ökoszisztémák jellemzésére alkalmazott diverzitási mutatók

Az egyik fontos vizsgálati aspektus a mikrobiom diverzitása, amit alfa és a béta diverzitási mutatók alkalmazásával határoznak meg. A mikrobiom annál egészségesebb ellenállóbb, minél nagyobb biodiverzitás jellemezi. A biodiverzitásnak azért is van nagy jelentősége, mert minél több baktérium törzs található az adott ökoszisztémában, annál többféle funkciót tudnak ellátni. Egy diverz mikrobiom több mindenre képes és jobban tud alkalmazkodni a környezeti változásokhoz. A nagyobb diverzitás funkcionális redundanciát is jelent, tehát minél több faj van jelen, annál nagyobb a valószínűsége annak, hogy két faj ugyanazt a feladatot látja el. Ez azért is fontos, mert ha az egyik faj kihalna a másik továbbra is képes ugyanazt a funkciót ellátni. Minél diverzebb a mikrobiom annál nagyobb az ellenálló képességük a külső támadásokkal szemben, mivel egy jól működő komplex rendszerben a különböző fajok az összes rendelkezésre álló erőforrást felhasználják, ezért a külső patogén

mikroorganizmusoknak nincs lehetősége kolonizációra (30). A mikrobiom komplexitásának meghatározására számos alfa és béta diverzitási mutató áll rendelkezésünkre.

Az **alfa diverzitás** alkalmazásával bélflóra gazdagságát és egyenletességét határozzuk meg (30, 135). A leggyakrabban alkalmazott alfa diverzitási mutatók a *megfigyelt OTU-k*, *Chao1*, *Shannon* és *Simpson indexek* (30, 136). Ezek közül az OTU és Chao1 index a mintában található fajgazdagságát a Shannon és a Simpson indexek mind a fajok gazdagságát, mind az egyenletességét mérik. A diverzitás mérésének ritkább módja a filogenetikai gazdagság becslése, például *Faith filogenetikai diverzitási* mutatóval (37).

A **béta diverzitás** a közösségek egymásközötti változatoságának mérőszáma. A gének közötti különbségek meghatározásához az összes mintapár között távolságmátrixot számol (137). A béta diverzitás meghatározására alkalmazzák a kvantitatív *Bray–Curtis eltérést*, ami a két közösség összehasonlításakor figyelembe veszi a taxonok mennyiségét is. A *súlyozott Unifrac* diverzitási mutató esetében a taxon bőség mellett információt kapunk a filogenetikai rokonságról is (138). Ezzel szemben a *súlyozatlan Unifrac* távolság egy kvalitatív mérőszám, amely csak a taxonok jelenlétét és hiányát veszi figyelembe a taxonok mennyiségéről nem kapunk információt. Mindkét Unifrac méréshez filogenetikai fa szükséges, mivel a diverzitási értékeket a filogenetikai fán a megosztott és a meg nem osztott baktériumok közötti teljes elágazási távolság kiszámításával kapjuk meg. A *Jaccard-index* vagy a hasonlósági együttható egy másik kvalitatív mérés, amely nem veszi figyelembe a relatív bőséget, de a taxonok jelenlét/hiányát igen. A taxonok jelenlétének, hiányának és bőségének kiértékelésével megvizsgálhatjuk a minták közötti közösségek összetétele közötti különbség mértékét. A rokonsági kapcsolat hozzáadása lehetővé teszi az evolúciós divergencia felmérésének lehetőségét. Fontos figyelembe venni, hogy bár a taxonok megkülönböztethetőek, a rokon organizmusok valószínűleg hasonló funkciókat töltenek be (139).

3.4 A broiler csirke mikrobiom vizsgálatának jelentősége gazdasági szempontból

A baromfifajták és különböző a hibridek jelentősége laboratóriumi modellállatként, valamint gazdasági szempontból egyaránt növekszik (140). A broiler csirkék teljes fejlődési szakasza viszonylag rövid, tipikusan 42 nap, ez idő alatt az ivarérettségen kívül testi fejlettségét eléri.

A csirkék gyomor-bél mikrobiomjának taxonómiai összetételében jelentős változások figyelhetők meg a különböző növekedési szakaszokban, ezért nagyon jól modellezhető és nyomon követhető a különböző életciklusok hormonális és mikrobiális változása (141).

A globális népesség folyamatosan növekszik, és 2050-re várhatóan eléri a 9,6 milliárdot. Ezzel a rohamos növekedéssel igyekszik az élelmiszeripar lépést tartani, melynek egyenes következménye az extrém módon megnövekedett húsfogyasztás (10). A növekvő fogyasztói igények kielégítése nagymértékben függ a csirkehús előállításától (10). Az elmúlt 2 évtized során a baromfiipar (broiler csirke) az egyik leghatékonyabb hús előállító ágazattá vált, és ez képezi a globális fehérjetermelés alapját (142). Az intenzív tenyésztés olyan hibrideket eredményezett, amelyek hatékonyabban alakítják át a takarmányt izomtömeggé, mint a hagyományos fajták (143). A modern hibridek, mint például a Ross 308, kevesebb takarmányt igényelnek a kívánt súlynövekedés eléréséhez (körülbelül 2,5–3 kg) a nevelési időszak alatt (35–42 nap) (10).

Ez az extrém növekedési sebesség azonban, számos kóros állapot kialakulásához vezet (10–12), mint például a magas vérnyomás, a szívelégtelenség, az inzulinrezisztencia és a különböző fertőzésekkel szembeni fokozott hajlam (10–12).

3.4.1 GIT mikrobiom szerepe és fontossága a bél egészségének fenntartásában és a tápanyagok felvételének szempontjából

Napjainkban a tudományos érdeklődés középpontjában áll a gazdasági haszonállatok vastagbél-mikrobiótájának filotipizálása és metabolikus aktivitásának feltérképezése, mivel pozitív hatást fejt ki az immunrendszerre (144), a GIT fiziológiájára (8), a táplálkozásra (9), bizonyos vegyületek méregtelenítésére és a természetes mutatókra (9, 145).

A bél-mikrobióta egyensúlya a gazdaszervezet számára számos előnnyel jár, míg egyensúlyának megbomlása számos anyagcserével és immunrendszerrel összefüggő betegség kialakulásához vezet (146).

Egyre több bizonyíték áll rendelkezésre arra vonatkozóan, hogy a baromfi GIT-mikrobióta összetételének megváltozása kulcsfontosságú szerepet játszik az anyagcserezavarok kialakulásában.

A baromfitartás során az elhalásos bélgyulladás és a diszbakteriózis állományszintű növekedése figyelhető meg. A diszbakteriózis vagy más néven diszbiózis bizonyítottan hatással van a broilerek egészségére és teljesítményére.

A bélcsatorna a madarak legnagyobb szerve, melynek normál működéséhez kiegyensúlyozott bélflóra fenntartása szükséges. Ha a bélcsatorna egészségi állapota romlik az alábbi hatások figyelhetők meg: a tápanyagok nem megfelelő felszívódása (nem megfelelő emésztés), ami az állatok csökkent növekedését eredményezi. Továbbá, kevésbé lesz egyöntetű az állomány, valamint számos állategészségügyi probléma merül fel, például fertőzésekre való fokozott érzékenység (147, 148).

Az elmúlt 80 évben az antibiotikumokat széles körben alkalmazták a baromfik fertőző betegségekkel szembeni immunvédelmének támogatására (149). A nagyüzemi állattartás esetében az antibiotikumok szubterápiás dózisének alkalmazása javította az egészségi állapotukat, valamint a növekedési paramétereikre is pozitív hatással volt (149). Az ilyen adalékanyagok rutinszerű és felelőtlen alkalmazása nemkívánatos következményekkel járt, például a jótékony bél-mikrobióta számának csökkenésével és az antibiotikumokkal szemben rezisztens mikrobiális kórokozók megjelenésével (15, 16).

Élelmiszerbiztonsági és humán egészségügyi kockázatuk miatt indokolt az antibiotikumok mennyiségének csökkentése (149, 150).

A mikrobióta sokfélesége az egyik meghatározó tényező a betolakodó kórokozókkal szembeni rezisztenciában (2). A mikrobiális közösség nagyobb diverzitása az egészségesebb gazdaszervezettel kapcsolódik, míg a komplexitás jelentős csökkenése különféle betegségekkel és a kórokozók kolonizációra való fokozott hajlamával jár (151). A GIT-mikrobióta elmozdulása a hasznos baktériumok felé javíthatja a gazda egészségi állapotát.

A GIT-mikrobiom kutatása területén kiemelten fontos a természetes bioaktív komponensekben gazdag takarmánykiegészítők – antibiotikumokat helyettesítő – alkalmazási lehetőségek kidolgozása.

3.4.2 A mikrobióta összetétele és megoszlása a csirke béltraktus különböző részeiben

A baromfik szervezetében közel 800 féle baktérium található, amelyek segítik az emésztést és támogatják a szervezet védekezőképességét (140).

A gyomor-bél traktusban található mikrobiális közösségek fontos emésztési funkciókat látnak el. A táplálék először a **begyben** emésztődik, itt történik a keményítő lebontása és a laktát fermentációja.

A begyben a mikrobiális konzorciumok sejt sűrűsége 10^9 g⁻¹ és döntően *Lactobacillus* spp., *Bifidobaktérium*, valamint *Enterobaktérium* kolonizálja (8).

Többségben *Lactobacillusok* találhatóak a vastag falú **elő-** és a **zúzógyomorban** is, amelynek mikrobiális sejtszáma (10^8 g^{-1}) alacsony a gyomornedv sósav és pepszin tartalma miatt (152). A zúzát a gyomor-bél traktus „fogaként” jellemzik, ahol a takarmány mechanikai és kémiai lebontása történik (153).

A tápanyagok felszívódása a **vékonybélben** történik. Ebben a szakaszban nagy (10^9 – 10^{11} sejt g^{-1}) baktérium sejt sűrűség található, amelyet nagymértékben *Lactobacillus*, kisebb mértékben pedig különböző butirát termelő baktériumok, mint például az *Enterococcus*, *Streptococcus* és *Clostridium* baktériumok népesítenek be (8).

A **ceca (vakbél)** a legmagasabb mikrobasejt-sűrűséggel rendelkezik (10^{11} sejt g^{-1}), a táplálék itt emésztődik leghosszabb ideig (12–20 óra). A vakbélben legnagyobb mennyiségben a *Firmicutes*, *Bacteroides* és a *Proteobaktériumok* vannak jelen, míg az *Actinobaktériumok* száma kevesebb (153). Továbbá, *Megamonas*, *Helicobacter*, *Campylobacter*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Clostridium* nemzetségbe tartozó baktériumok találhatóak meg nagy számban. Komplex szubsztrátok, például cellulóz, keményítő és más poliszacharidok fermentálása és emésztése a vakbélben történik, amely a legváltozatosabb bélszakasz. A broilerek növekedése során a vakbél mikrobiótája változatosabbá diverzebbé válik. A kelés után körülbelül 50 nemzetség, míg a 42. napon több mint 200 baktérium nemzetség mutatható ki a csirkék ceca mikrobiomjában (154) .

3.5 Antibiotikumok különböző célú alkalmazásának kockázatai

Nagyüzemi állattartás során az állatok fokozott stressznek vannak kitéve, amit növekedésük és fejlődésük során számos tényező indukálhat. Ezen stressz faktoroknak hatása van a szervezet működésének számos folyamatára, többek között képes befolyásolni a viselkedést, az immunrendszer, a kardiovaszkuláris és a gasztrointesztinális rendszer működését.

Hatással van a KIR és a hormon háztartás működésére is (155). A stressz által kiváltott molekuláris mechanizmusok hatására jelentősen csökkenthet az állatok takarmányfelvétele és testtömeggyarapodása, előfordulhatnak enterális megbetegedések, súlyosabb esetben nő az elhullás (156).

Mivel nagy egyedszámú állatállományt tartanak viszonylag kis területen, így a fertőzéses megbetegedések gyakorisága is nagyobb. Fertőzések leküzdésére bevett protokoll az antibiotikumok alkalmazása.

Az antibiotikumokat az állattenyésztésben a huszadik század közepétől preventív és terápiás alkalmazása mellett hozzamfokozóként is használták egészen 2006-ig, amikor is Európai unió betiltotta ezen irányú alkalmazását.

A világ számos részén (India) azonban, továbbra is használják az állattenyésztésben hozzamfokozásra az antibiotikumokat, alacsony dózisban hosszú távon, rendszerint a takarmányba keverve (157, 158).

Az antibiotikumok alkalmazása számos nemkívánatos következménnyel járhat, például a jótékony bél-mikrobióta populáció számának csökkenésével és az antibiotikumokkal szemben rezisztens mikrobiális kórokozók megjelenésével (159).

Az antibiotikum rezisztencia korunk egyik legnagyobb és legégetőbb problémája. Évente 700 ezer ember hal meg antibiotikumrezisztens fertőzések következtében a világon. Pesszimista becslések szerint ez a szám 2050-re 10 millióra nőhet (160). Amennyiben nem történik érdemi változás, akkor a világ vezető halálozási okai közé fog tartozni az antibiotikum rezisztens baktériumok okozta fertőzések. A 2000-es évek eleje óta világszinten 65 százalékkal emelkedett az antibiotikumok alkalmazása. A legnagyobb antibiotikumfogyasztó azonban nem az egészségügy, hanem az állattenyésztés, a fent említett indokok miatt. További problémát jelent, hogy az állattenyésztésben alkalmazott antibiotikumok 70 százaléka a humángyógyászatban használt antibiotikumcsoportokba tartozik (159).

Az antibiotikum rezisztenciát hordozó baktériumok állatról emberre terjedhetnek közvetlen érintkezés, például nem megfelelően kezelt hús vagy az állati bélsárral kontaminálódott haszonnövények elfogyasztásával. Ennek legnagyobb veszélye a humángyógyászatban jelentkezik, amikor a rezisztens baktériumok által okozott fertőzés kezelése nehézkes, az adott antibiotikum hatástalanná válik (159).

Antibiotikumrezisztencia esetén a baktériumok ellenállnak az elpusztításukra alkalmazott antibiotikumoknak.

A rezisztencia kialakulása baktériumok antibiotikum okozta stressz hatására kialakult természetes válaszreakciója egyfajta védekezési mechanizmus az életben maradásukhoz (161).

Az antibiotikum kezelésnek a mikrobiom összetételére is jelentős hatása van. A mikrobiom képes meggátolni a patogén antibiotikumrezisztens baktériumok (ARB) megtelepedését, de ennek a mechanizmusnak az antibiotikumrezisztencia terjedésére gyakorolt hatásai még nem teljesen ismertek.

Az antibiotikumok bizonyos bakteriális kórokozókat céloznak meg, azonban hatásuknak a társkolonizáló mikrobióta is ki van téve (161). Ez akaratlanul is destabilizálhatja az egészséges mikrobiális közösségeket, ami diszbiózishoz, populációdinamikai egyensúlyának megbomlásához vezet.

Továbbá, az antibiotikum által kiváltott diszbiózis az antibiotikumrezisztencia géneket hordozó baktériumok fokozott expresszióját eredményezi. Ezen gének horizontális transzferének megnövekedett aránya, valamint az antibiotikum kezelés hatására felszabadult ökológiai teret, összességében növelik a gazdaszervezet ARB kolonizációra való érzékenységét. Ezek az összefüggések különösen fontosak lehetnek az egészségügyi intézményekben és az állattenyésztésben is, ahol az antibiotikumok használata széles körben elterjedt (162).

Klinikai szempontból ez olyan közegészségügyi beavatkozások szükségességét motiválja, amelyek minimalizálják vagy visszafordítják az antibiotikum kezeléstől károsodott állatok és emberek mikrobiom összetételében és diverzitásában bekövetkező kedvezőtlen változásokat.

Az állattenyésztésben kiemelten fontos olyan természetes bioaktív komponensekben gazdag takarmány kiegészítők nutraceutikumok (pre- probiotikumok, szimbiotikumok) kidolgozása, amelyek a jövőben az antibiotikumok kiváltására alkalmasak lehetnek.

3.6 A tápcsatorna mikrobiom regenerációját szolgáló alternatív stratégiák

3.6.1 Nutraceutikumok

Ahogy a bél-mikrobiom homeosztázis fenntartásában betöltött különféle szerepeiről ismereteink gyarapodnak, és ahogy egyre többet tudunk meg arról, hogy a mikrobiom egyensúlyának megbomlása hogyan járulhat hozzá a különböző betegségek kialakulásához egyre vonzóbbá válnak azon terápiás stratégiák, amelyek mikrobiális útitársainkat célozzák meg (163).

Manapság a tudományos érdeklődés középpontjában áll a növényi bioaktív vegyületekben gazdag hatóanyagok más néven **nutraceutikumok** emberi és állati egészségre kifejtett hatásainak tanulmányozása (164). A nutraceutikumok olyan élelmiszerek vagy élelmiszer komponensek, amelyek jótékony hatást fejtenek ki az emberi és állati szervezetek egészségére. A nutraceutikum szó az angol eredetű „nutrition” táplálkozás és „pharmaceutical” gyógyszer szavak kombinációjából származik (165).

Alkalmasak lehetnek korunk legjelentősebb egészségügyi problémáinak, mint például a metabolikus szindróma, az elhízás, a szív- és érrendszeri betegségek, a csontritkulás és a cukorbetegség megelőzésére kezelésére (165).

Továbbá, pozitív hatást fejtenek ki a GIT-mikrobiom összetételére, diverzitására, elősegítik az egyensúlyi mikrobiom fenntartását és a különböző faktorok (antibiotikum, stressz) hatására károsodott diszbiotikus mikrobiom helyreállítását.

Ennek eredményeként a mikrobiális és növényi alapú vegyületek és származékaik fokozott kutatási és kereskedelmi figyelmet kaptak az elmúlt években (19).

A nutraceutikumok alkalmazása az állattenyésztésben, egy lehetséges megoldást jelent a bélrendszer egészségi állapotának megőrzésében, az állatok teljesítményének fokozásában, az immunstátuszuk javulásában és a fertőzésekkel szembenni csökkent érzékenységében. Tehát összességben jelentős pozitív hatást fejtenek ki az állatok általános egészségi állapotára és alkalmazásukkal elkerülhető lehet az antibiotikumok túlzott alkalmazása.

A nutraceutikumok közé a pre-, pro- és szimbiotikumokat, fitonutrienseket (például, polifenol vegyületek), alkaloidokat és a különböző gyógynövényeket soroljuk (166).

Pre- és probiotikumok

A **prebiotikumok** többnyire vízben oldódó rostok, lehetnek monoszacharidok, vagy egyszerű cukrok, amelyeket a gazdaszervezet nem tud emészteni, de a bél-mikrobiótát alkotó baktériumok igen. Kedvező hatást gyakorolnak a gazdaszervezetre azáltal, hogy serkentik a szervezetre jótékony hatású hasznos baktériumok növekedését és aktivitását az alsó bélrendszerben. A prebiotikumoknak az alábbi kritériumoknak kell megfelelniük: gazdaszervezet emésztőenzimeivel szemben rezisztensnek kell lenniük, azonban a bélbaktériumoknak képesnek kell lenniük fermentálni őket, olyan módon, hogy ennek során a kedvező baktériumok életképessége és aktivitása növekedjen meg (167, 168).

A legismertebb prebiotikumok a fruktooligoszacharidok (FOS), az élesztő sejtfal hidrolízise során keletkező mannán-oligoszacharidok (MOS), valamint a kevésbé használt galakto-oligoszacharidok (GOS). A MOS fő összetevője a mannóz, kötődik az 1-es típusú fimbriához, ami az enterális baktériumok gazdasejthez való megtapadásában vesz részt. Ezáltal a mannóz gátolja nemkívánatos baktériumok kolonizációját. Továbbá, a MOS fokozza az immunglobulin A szekrécióját, ezáltal gátolja a baktériumok megtapadását a bélhámsejtekben, növeli a nyálka termelését és gátolja a hámszövet károsodását okozó gyulladós folyamatok kialakulását.

A prebiotikumok közvetlen hatása a baktériumok megkötése. Közvetett hatásuk abban nyilvánul meg, hogy egyes baktériumok számára tápanyagként szolgálnak (10).

Alkalmazásuk számos jótékony hatást fejt ki a gazdasági haszonállatok emésztő rendszerére, egyebek közt stimulálják a hasznos baktériumok (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Faecalibacterium*) szaporodását, a takarmány felszívódását, és megakadályozták a korokozó baktériumok (*Clostridium perfringes*) szaporodását. A FOS nem emészthető oligoszacharid, amely rövid szénláncú szénhidrátokból áll (169, 170).

Korábbi kutatások kimutatták, hogy az FOS diétás kezelése javította az állatok a növekedési teljesítményét, a bél egészségét és pozitívan módosította a bél-mikrobióta összetételét. Ezen túlmenően a közelmúltban végzett vizsgálatok kimutatták, hogy a FOS diétás kezelése fokozza a bélfermentációt, serkenti a jótékony baktériumok (SCFA-termelő baktériumok) szaporodását, miközben gátolja a patogén baktériumok, például *Clostridia*, *Escherichia*, *Salmonella* növekedését (169, 170).

A bélcsatorna egészségi állapotát **probiotikumok** alkalmazásával is javíthatjuk. A probiotikumok élő mikroorganizmusokat tartalmazó készítmények, melyek képesek stabilizálni az emberek és állatok bél-mikrobiomját, azáltal, hogy gátolják a potenciálisan patogén baktériumok (*E.coli*, *Sallmonela* spp.) elszaporodását, elősegítik a jótékony kedvező baktériumok számának növelését és fenntartását, valamint képesek olyan enzimek termelésére, amelyek támogatják az emésztési folyamatokat (171).

A leggyakrabban használt probiotikus nemzetségek a *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, amelyek közül *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. delbrueckii*, *L. rhamnosus*, *B. bifidum*, *B. longnum*, *B. breve*; *S. thermophilus* és *S. salivarius* fajokat alkalmazzák leggyakrabban a probiotikus készítményekben. A probiotikus kultúrának számos kritériumnak kell megfelelnie, például, hogy kifejtse jótékony hatását mint például, legyenek stabilak ellenállóak az emésztőenzimekkel, gyomorsavval és epesavval szemben, fogyasztáskor élő sejtformában, minél nagyobb de legalább 10^8 cfu/g mennyiségben kell hogy legyenek. Továbbá kellőképpen tapadjanak a bélhámhoz, legyenek kolonizációra képesek. A probiotikumok a patogén baktériumokkal versenyeznek a bélhám tapadási helyeiért, baktericid fehérjék szintézisét indukálják a Paneth sejtekben. A probiotikumok elősegítik a bél nyálkahártyája épségének megőrzését, azáltal hogy, epiteliális sejtek proliferációját és differenciációját indukálják, valamint fokozzák a Tight junction fehérjék expresszióját (172).

Szimbiotikum

A **szimbiotikumok** a pre- és probiotikumok hatásait kombinálják. A nem emészthető oligoszacharidok prebiotikus szubsztrátként szolgálnak, amelyeket a probiotikus törzsek (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*) fermentálnak, ezáltal javítják a bevitt probiotikumok kolonizációját és túlélését a GIT-ben. Additív vagy szinergikus hatást fejtenek ki, képesek a bél mikrobiális egyensúlyának helyreállítására, javítják gazdaszervezet anyagcsere folyamatainak hatékonyságát a GIT egészségi állapotát. A szimbiotikumok alkalmazása elősegíti az SCFA termelő baktériumok növekedését (19).

A szimbiotikumok használata támogatja a bél egyensúlyi állapotának fenntartását, egyfajta intervenció lehetőségét jelenthet különböző GIT kapcsolatos betegségek mérséklésében vagy akár megelőzésében (19). A szimbiotikumok gátolják a potenciálisan patogén baktériumok megtelepedését, mint pl. *Clostridium*, *Escherichia* és elősegítik a jótékony gazdaszervezet szempontjából előnyös baktériumok szaporodását, mint a *Lactobacillus*, *Faecalibacterium*, *Akkermansiaceae*. A szimbiotikumok csökkentik a *C. jejuni* mennyiségét, amely gyakran bélgyulladást és zoonózist okoz a baromfiban (173).

A probiotikus baktériumok által szintetizált metabolitokat „**posztbiotikumoknak**” nevezzük. Egyfajta alternatívát jelentenek, mivel a probiotikumok pozitív hatását élő sejtek alkalmazása nélkül fejtik ki. Például a *Lactobacillus* sp. képesek szerves savakat és bakteriocint előállítani, amelyek elősegítik a tejsavbaktériumok kolonizációját (174).

Fitonutriensek

A **fitonutriensek** olyan természetes eredetű vegyületek, amelyek a növények épségéért és egészségéért felelnek (védik őket a túlzott napfénytől és a bogaraktól). Potenciális terápiás alkalmazásuk az antioxidáns, gyulladásgátló és antimikrobiális tulajdonságaikból ered (175).

A polifenol vegyületek a fitonutriensek családját képviselik, ide tartoznak a fenolsavak, flavonoidok, stilbének és a lignok. A természetben a növények polifenolokat szintetizálnak egyrészt védekezési mechanizmusként az exogén kórokozók ellen, másrészt a sejtek ultraibolya sugárzás elleni védelmére. A fenolos vegyületek gazdag forrásai közé tartoznak a gyümölcs- és zöldségtermékek sokasága, mint például a citrusfélék, a gránátalma, a zöld tea, a szőlő, meggy és a zöld zöldségek. Az antioxidáns státuszt és az immunrendszer működését is pozitívan befolyásolják, azáltal hogy, a szabadgyököket megkötik és a gyulladást okozó citokinek fokozott szekrécióját gátolják (176).

A polifenolok képesek a bél-mikrobiom összetételében fluktuációt, változásokat okozni, prebiotikus és antimikrobiális hatásuk van, fermentálhatóak és változatlan formában jutnak el a vastagbélig, ahol serkentik a jótékony hatású baktériumok szaporodását (177). A legjelentősebb polifenolok, a bogyós gyümölcsökben nagy mennyiségben megtalálható **antocianinok**. Alkalmazásukról kimutatták, hogy pozitív hatást fejtenek ki az egészségre, csökkentik a szív- és érrendszeri és neurodegeneratív betegségek kialakulásának kockázatát. Továbbá gátolják az oxidatív stressz kialakulását hatásuk van a lipid és szénhidrát metabolizmusra is. Az eddigi eredmények arra utalnak, hogy az antocianinok befolyásolják a táplálék anyagok felszívódásának mértékét a bél-mikrobiom összetételének modulációja által (178).

A **karotinoidok** zsírban oldódó természetes pigmentek, antioxidáns és immunstimuláló hatásúak (179). Az állatok nem képesek *de novo* karotinoidokat szintetizálni, hanem táplálkozással kell felvenniük. A karotinoidok gyulladáscsökkentő hatásúak, alkalmazásukkal csökkenthető a szív- és érrendszeri betegségek, a stroke és a különböző típusú rákbetegségek kialakulásának a kockázata. A karotinoidokat a vastagbél-mikrobiom fermentálhatja. Ennek ellenére a karotinoidok mikrobióta általi tényleges hasznosítását nem igazolták és tanulmányozták alaposan (179).

4. Célkitűzés

A mikrobiom tagjai (vírusok, gombák, baktériumok) az egész szervezetet benépesítik, megtalálhatók a felső légutakban, bőrön és a GIT-ben. Alapvetően a legtöbb mikroba a gazdaszervezettel szimbiotikus kapcsolatban él, megvédik a szervezetet a patogén mikroorganizmusok behatolásától, ezenkívül számos más a gazdaszervezet szempontjából hasznos funkciót is betöltenek. A bél-mikrobióta egyensúlya a gazdaszervezet számára számos előnnyel jár, míg egyensúlyának megbomlása számos anyagcserével és immunrendszerrel összefüggő betegség kialakulásához vezet.

Noha a bél-mikrobiom funkciója, összetétele alaposan tanulmányozott, az eddigi eredmények csupán részben fedik le e hatalmas területet, számtalan kérdés megválaszolatlan maradt. A bél-mikrobiom működésének a gazdaszervezetre kifejtett hatásának pontos megismeréséhez kiemelkedő fontosságú összetételének alapos ismerete.

Napjainkban az új-generációs szekvenáláson alapuló technikák (NGS) alkalmazása egyre nagyobb teret hódítanak a mikrobiális összetétel vizsgálatok során. NGS használatával lehetőségünk nyílik arra, hogy információt kapjunk a klasszikus mikrobiológiával, tenyésztéses módszerrel nem vizsgálható mikroorganizmusokról és azok tulajdonságairól. Azonban a kapott eredményt számos egymást követő módszer összessége határozza meg.

A bélsárminták diverz mikroflórájából adódóan nem könnyű olyan DNS izolálási protokollt alkalmazni, amely alkalmas az eltérő sejtfalösszetétellel, membránszerkezettel eltérő egyedszámban lévő mikroorganizmusok DNS-ének teljes kinyerésére. A minta pontos összetétele szintén befolyásolhatja az alkalmazott protokollok teljesítményét. Ebből következik, hogy a különböző metagenomikai DNS izolálási módszerek alkalmazása eltérő mikrobiális összetételt eredményez. Ezért fontos a különböző DNS izoláló protokollok összehasonlítása, valamint azok előnyeinek és hátrányainak meghatározása. A szekvenálási adatokból meghatározott mikrobiom összetételét alapvetően befolyásolja a minta homogenizálása, a sejtek feltárásának hatékonysága, DNS extrakció és az izolátumok tisztasága és mennyisége és nem utolsósorban a szekvenálási adatok bioinformatikai analízisének módja különös tekintettel a taxonómiai adatbázisokra.

Mindezek figyelembevételével a jelen dolgozat alapjául szolgáló kísérletek első felében célul tűztük ki a különböző technikai torzító tényezők (minta homogenizálás, sejtfeltárás, DNS izolálás, taxonómiai adatbázis) hatásának vizsgálatát a 16 S rRNS gén amplikon szekvenálás eredményére (minőségi olvasatok, diverzitási mutatók, mikrobiális összetétel). Vizsgáltuk továbbá a technikai torzító tényezők hatását az izolátumok DNS koncentrációjára és minőségi paramétereire. Kétféle homogenizálási stratégiát, a direkt lízist és a bakteriális sejtszuszpenziót hasonlítottunk össze. A sejtek feltárására mechanikai, kémiai lízist és ezek kombinációit alkalmaztuk. A nukleinsavak kinyerésére automatizált rendszerű robotikus módszert, kereskedelmi forgalomban kapható izolációs kiteket és fenol-kloroform-izoamilalkohol elven alapuló konvencionális izolálási technikákat hasonlítottunk össze. Vizsgáltuk a 16 S rRNS gén amplikon szekvenálás során leggyakrabban használt taxonómiai adatbázisok (Silva, GreenGenes) alkalmasságát a felbontóképességre.

A témafelvetéshez kapcsolódóan az alábbi célokat tűztük ki:

- A metagenomikai DNS izoláló módszerek hatásának vizsgálata az izolátumok DNS koncentrációjára (ng/ μ L), minőségi paramétereire (230/280, 260/280) és az integritására (HMW, LMW).
- A DNS izoláló módszerek hatékonyságának értékelése a könyvtárkészítés során alkalmazott PCR reakciók végbemenetelére (sikerült, nem sikerült).
- A különböző technikai torzító tényezők összehasonlítása a szekvenálási mutatók és a mikrobiális diverzitási értékek tekintetében.
- A metagenomikai DNS izolálási stratégiák a Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumok eloszlására kifejtett hatásának elemzése.
- A különböző technikai faktorok hatásának vizsgálat az egyensúlyi „core” mikrobiom összetételére.
- A különböző technikai faktorok milyen mértékben befolyásolják a mikrobiom taxonómiai összetételét. Annak felderítése, hogy vannak e olyan bakteriális taxonok, amelyek egymással korrelálnak. A különböző technikai tényezők hatásának vizsgálata ezen korrelációkra.
- A taxonómiai adatbázisok (GreenGenes, Silva) értékelése, taxonómiai összetételben megfigyelt különbségek leírása.

Kutatásunk másik fő célja annak kimutatása volt, hogy a különböző bioaktív komponensekben gazdag nutraceutikumok (karotinoidok, fruktooligoszacharidok, szimbiotikumok, antocianinok) milyen hatást fejtenek ki a broiler csirkék mikrobiom összetételére és diverzitásának alakulására. Vizsgáltuk, hogy melyek azok a bakteriális taxák, amelyek mennyisége szignifikánsan változik a nutraceutikum kezelés hatására. Meghatároztuk, hogy melyek azok a hatóanyagok, amelyek alkalmazásával a legnagyobb mikrobiális fajgazdaság érhető el. Célunk egy olyan eljárás optimalizálása volt, amivel a nagyüzemi állattartás során a fokozott stressz és súlygyarapodás következtében károsodott mikrobiom egyensúlyi állapota helyreállítható és fenttartható. További célunk a nagyüzemi állattartás során protokollszerűen alkalmazott antibiotikum kezelések minimalizálása volt, az állatok egészségi állapotának javítása által.

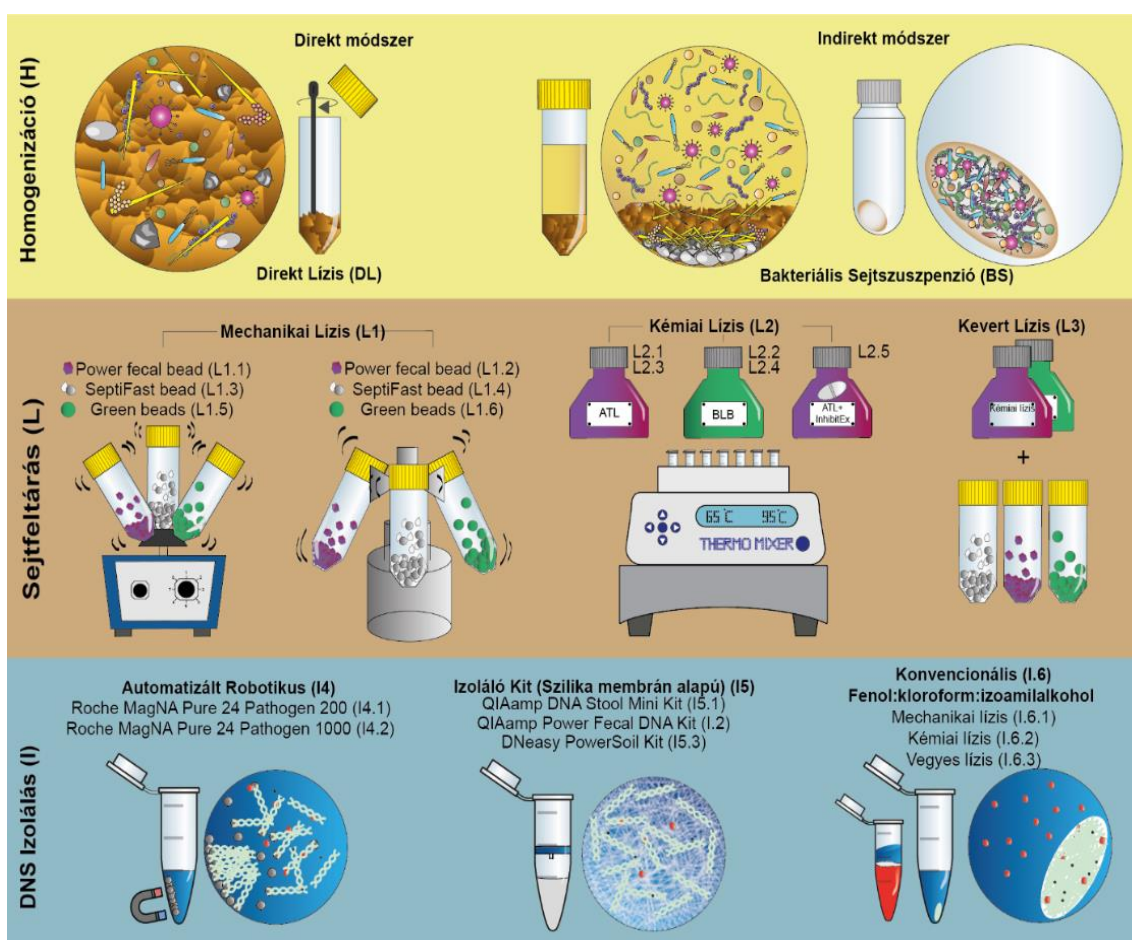
Vizsgálataink során az alábbi célkitűzéseket fogalmaztuk meg:

- A bioaktív komponensekben gazdag hatóanyagoknak természetes mutatókra kifejtett hatásainak meghatározása.
- A különböző kísérleti beállítások (életkor, nutraceutikum) hatására megfigyelhető összefüggések leírása az állatok súlygyarapodása és a mikrobiális ökoszisztéma összetétele között.
- A mikrobiális diverzitási mutatók értékeiben tapasztalható különbségek értékelése nutraceutikumok és az állatok életkorának vonatkozásában.
- Az állatok életkorának és a nutraceutikumok hatásának vizsgálata a bél egészségi állapotát tükröző SCFA baktériumok relatív mennyiségére.
- Intenzív tartástechnológiai paraméterek mellett, a különböző kísérleti beállítások (madarak kora, nutraceutikum kezelés) hatásának vizsgálata az egyensúlyi „core” mikrobiom összetételére.
- A lipid és szénhidrát metabolizmusban szerepet játszó fontosabb bakteriális taxák mennyiségi összetételének meghatározása a nutraceutikum kezelés és az állatok korának figyelembevételével.
- Az egyensúlyi mikrobiomban fellelhető kapcsolatok leírása a különböző baktériumok között, amelyek a későbbiekben indikatívak lehetnek az állatok egészségi állapotának felmérésére.
- Filotípusok vonatkozásában egyedi diéta specifikus baktériumok közötti korrelációk leírása.

5. Anyagok és módszerek

5.1 A szekvenálás eredményét torzító technikai tényezők vizsgálata

Kutatásunk egyik fő tárgyát képezte a különböző minta homogenizáló (**H**), sejtfeltáró (lízis) (**L**) és DNS izoláló (**I**) protokollok hatékonyságának összehasonlítása elsősorban a 16 S rRNS ampikon gén szekvenálás eredményei alapján. Kísérleteink során kétféle homogenizálási stratégiát, a direkt (direkt lízisz, **DL**) és indirekt (bakteriális sejtszuszpenzió, **BS**) módszert hasonlítottunk össze. A sejtek feltárására mechanikai (**L1**), kémiai lízist (**L2**) és ezek kombinációját (**L3**) alkalmaztuk. A nukleinsavak izolálásához automatizált rendszerű robotikus (**I4**), kereskedelmi forgalomban kapható DNS izolációs kitek (**I5**) és fenol-kloroform-izoamilalkohol (25:24:1) (**I6**) elven alapuló konvencionális DNS izolálási technikákat hasonlítottunk össze. A módszerek leírását a **3. ábra** (kiegészítő táblázat 1) foglalja össze. A DNS izolálást követően a mintákon 16 S rRNS gén alapú metagenomikai könyvtár készítettünk az Illumina könyvtár készítési protokollja alapján. A mintáinkon kétoldalról történő (paired-end) (2x301 nukleotid) szekvenálást végeztünk Illumina MiSeq platformon.



3. ábra: Különböző DNS izolálási stratégiák összefoglaló ábrája

5.1.1 Mintagyűjtés

A különböző DNS tisztítási stratégiáknak a 16 S rRNS gén amplikon szekvenálás eredményére gyakorolt hatásának vizsgálatához 31 napos broiler Ross 308 hibrid csirkéktől (8 db) származó székletmintát használtunk. A mintákat a Nagisz Zrt. nádudvari telephelyéről gyűjtöttük. Nyolc random kiválasztott baromfitól gyűjtöttünk székletmintákat (4 kakas, 4 jérce). A frissen gyűjtött bélsár mintákat specifikus steril DNS, RNS, LPS mentes mintatárolóba gyűjtöttük, amit jégen szállítottunk és a visszaérkezést követően a szárazanyagból DNS-t izoláltunk. Az izolálást megelőzően a mintákat összekevertük egymással és a továbbiakban a különböző minták elegyét tartalmazó mintával dolgoztunk.

A mintagyűjtést: Szilágyi-Tolnai Emese és Dr. Fidler Gábor végezte.

5.1.2 Minta homogenizálás

Kutatásunk során kétféle minta homogenizáló stratégiát (direkt és indirekt módszer) hasonlítottunk össze. Az **indirekt módszernél**, bakteriális sejtszuspenziót (**BS**) készítettünk, ahol a székletből kivontuk és feltártuk a székletben jelen lévő, a bélflóra mikrobiális közösségét reprezentáló baktériumokat. A bélsár mintából a mikrobákat a szennyező forrásoktól (szalma, valamint alomanyag) steril foszfát pufferelt sóoldattal (PBS-sel) történő centrifugálás alkalmazásával választottuk el. Ebben az esetben az előzetes homogenizálást követően a púlozott mintából 15 g székletet mértünk ki, amihez ekvivalens mennyiségben adtunk steril PBS puffer oldatot. Vortex készüléket alkalmaztunk a minták homogenizálására (300 rpm-en 3 percig) majd a mintákat centrifugáltuk (300 g) 5 percig. A felülúszókat összegyűjtöttük steril 50 ml-es Falcon csövekbe, a mosási lépést háromszor ismételtük meg. Ezt követően a felülúszókat speciális centrifuga csövekbe (Nalgene, Sigma-Aldrich, Missouri, USA) gyűjtöttük össze, majd 30 percig centrifugáltuk őket (13 000 g). A felülúszót eltávolítottuk és a bakteriális üledéket pedig minden esetben 5 ml steril PBS pufferrel felszuszpendáltuk. A sejtek feltáráshoz 250 µL sejtszuspenziót használtunk. A **direkt módszer** (direkt lízis) során a bélsár mikrobáit a bélsár egyéb alkotóitól nem választottuk el. A homogenizálást követően 250 mg mennyiséget vettünk ki a púlozott mintából és ezt követően lizáltuk a mintákat (**DL**).

A kísérletet: Szilágyi-Tolnai Emese és Dr. Fidler Gábor végezte.

5.1.3 A sejtek feltárása

Mechanikai lízis

A mechanikai lízis során három a kereskedelmi forgalomban beszerezhető kerámia gyöngyöt – Power Fecal Bead (L1.1, L1.2) (Qiagen, Hilden, Németország), LightCycler® SeptiFast Lysis kit (L1.3, L1.4) és MagNa Lyser Green beads (L1.5, L1.6) (Roche Diagnostics, Risch-Rotkreuz Svájc) – alkalmaztunk. Továbbá a sejtek feltárásához standard laboratóriumi vortexet (L1.1, L1.3, L1.5) (10 perc 10-es fokozaton vagy 3 perc 10-es fokozaton) és/vagy MagNa Lyser (L1.2, L1.4, L1.6) (30 másodperc 5000 rpm) (Roche Diagnostic Kft.) készüléket használtunk. A kísérlet során a reakcióelegy összetétele az alábbi volt (mind a sejtszuszpenzió, (200 μ L) mind a direkt lízis (250 mg) esetében).

- Mintákhoz 800 μ L steril PBS puffert, valamint az alábbi lízis gyöngyök egyikét Power Fecal/ SeptiFast/ Green beads adtunk, majd 10 percig vortexeltük 10-es fokozaton.
- Mintákhoz 800 μ L steril PBS puffert, valamint az alábbi lízis gyöngyök egyikét Power Fecal/ SeptiFast/ Green beads adtunk, majd 3 percig vortexeltük 10-es fokozaton, ezt követően MagNa Lyser készüléket alkalmaztunk (30 másodperc 5000 rpm).
- Mintákhoz 800 μ L steril PBS puffert, valamint az alábbi lízis gyöngyök egyikét adtunk Power Fecal/ SeptiFast/ Green beads lízis gyöngyök, majd MagNa Lyser készüléket alkalmaztunk a sejtfeltáráshoz (30 másodperc 5000 rpm).

Az sejtfeltárást követően a mintákat 16000 g-n 1 percig 4°C-on centrifugáltuk, ezután a felülúszót átpipettáztuk egy steril eppendorf csőbe.

Kémiai lízis

A kémiai lízis esetében ATL (Tissue lyses buffer) (L2.1, L2.3), ATL+Inhibitex tablettát (L2.5) (Qiagen) és BLB (Bacterial lyses buffer) (L2.2, L2.4) (Roche Diagnostic Kft.) lízis puffert használtunk. A sejtek feltárásához (mind a sejtszuszpenzió (250 μ L) mind a direkt lízis (250 mg) esetében az alábbi protokollokat alkalmaztuk.

- Mintákhoz 500 μ L ATL lízis puffert és 60 μ L proteináz K-t adtunk (L2.1), ezt követően 15 percig 200 rpm-en 65 °C-on, majd 15 percig 200 rpm-en 95 °C-on inkubáltuk őket (Eppendorf ThermoMixer® C készüléken, Eppendorf GmbH, Bécs, Ausztria).
- Mintákhoz 500 μ L BLB lízis puffert és 60 μ L proteináz K-t adtunk (L2.2), ezt követően 15 percig 200 rpm-en 65 °C-on, majd 15 percig 200 rpm-en 95 °C-on inkubáltuk (Eppendorf ThermoMixer® C készüléken).

- Mintákhoz 500 µL ATL lízis puffert, 1 darab InhibitEx tablettát és 60 µL proteináz K-t adtunk (L2.5), 15 percig 200 rpm-en 65 °C-on majd 15 percig 200 rpm-en 95 °C-on inkubáltuk (Eppendorf ThermoMixer® C készüléken).
- Mintákhoz 500 µL ATL lízis puffert és 60 µL proteináz K-t mértünk (L2.3), ezt követően 16 órán át 56°C-on inkubáltuk (Eppendorf ThermoMixer® C készüléken).
- Mintákhoz 500 µL BLB lízis puffert és 60 µL proteináz K-t adtunk (L2.4), majd 16 órán keresztül 56°C-on inkubáltuk (Eppendorf ThermoMixer® C készüléken).

Az inkubálást követően, a mintákat centrifugáltuk 16000 g-n 1 percig 4°C-on. A centrifugálás után a felülúszót átpipettáztuk egy steril eppendorf csőbe.

Kémiai és mechanikai lízisek kombinációja:

Kísérleteink során a sejtfeltárás hatékonyságának növelése érdekében vizsgáltuk a két alapvető lízis együttes hatását is a mikrobiom taxonómiai profilozására is. Ebben az esetben az általam fentebb részletezett mechanikai és kémiai lízisek kombinációit hajtottuk végre.

A kísérletet: Szilágyi-Tolnai Emese és Dr. Fidler Gábor végezte.

5.1.4 DNS izolálás

Automatizált rendszerű izoláló robot

Kutatásunk során a bélsármintákból automatizált robotikus DNS izolálást is alkalmaztunk MagNa Pure 24 készüléken (Roche-Diagnostic Kft.). Az izoláláshoz Pathogén 200 (I4.1) (200 µL kezdeti minta térfogat) és Pathogen 1000 (I4.2) (500 µL kezdeti minta térfogat) protokollokat alkalmaztunk a gyártó utasításai szerint. A gyártó által javasolt mintaelőkészítési protokoll mellett a fent részletesen (5.1.3 fejezet) taglalt lízis protokollokat (kémiai, mechanikai, kémiai+mechanikai) is alkalmaztuk a mintáinkon.

DNS izoláló kit használata

A bélsármintákból történő DNS izoláláshoz három kereskedelmi forgalomban beszerezhető DNS-tisztító kittet: QIAamp DNA Stool Mini Kit (I5.1), QIAamp PowerFecal Pro DNA Kit (I5.2) és DNeasy PowerSoil (I5.3) (Qiagen) alkalmaztunk a gyártó utasításai szerint. Az izolálásokat sejtszuszpenzió és 250 mg kiindulási térfogatú bélsár mintán is elvégeztük minden esetben.

Konvencionális fenol-kloroform-izoamil alkoholos DNS izolálás

A bakteriális DNS izolálásához konvencionális fenol-kloroform-izoamil alkohol (25:24:1) módszert is alkalmaztunk.

Ennek során minden esetben 800 µL sejtlízátumhoz (5.1.3 fejezetben leírtak alapján) 800 µL molekuláris tisztaságú fenol-kloroform-izoamil alkoholt (Thermo Fisher Scientific, Maryland, USA) adtunk. A mintákat alaposan vortexeltük körülbelül 20 másodpercig, majd inkubáltuk három percig szobahőn. Ezután a mintákat 10 percig 16 000 g-n 4 °C-on centrifugáltuk. A centrifugálást követően a vizes fázist átpipettáztuk steril DNáz, RNáz mentes eppendorf csövekbe. A DNS precipitációja 1 µL 20 µg/µL glikogén (Thermo Fisher Scientific), 7.5 M ammónium-acetát (0,5X térfogat egység) (Sigma-Aldrich) és 100 % etanol (2,5 X térfogat egység) (Sigma-Aldrich) hozzáadásával történt -20°C-on egész éjszakás inkubáció során. Másnap a mintákat 10 percig 16 000 g-n, 4 °C-on centrifugáltuk és a felülúszót eltávolítottuk, majd a DNS-t kétszer 500 µL 70 %-os etanollal (Sigma-Aldrich) mostuk. Ezt követően a DNS-t steril lamináris fülke alatt szárítottuk, és 30 µL steril nukleáz mentes vízben (Thermo Fisher Scientific) oldottuk fel. A mintákat - 20°C-on tároltuk.

A kísérletet: Szilágyi-Tolnai Emese és Dr. Fidler Gábor végezte.

5.1.5 Az izolált DNS minták mágneses gyöngy alapú újra tisztítása sikertelen amplikon PCR-t követően

Bizonyos DNS izolátumok esetében az amplikon PCR sikertelen volt az Agilent 4200 TapeStation (Agilent Technologies, California, USA) automatizált mikrokapilláris gélelektroforézis készüléken történő mérés alapján. Feltételeztük, hogy az izolátumok PCR inhibitorokat tartalmaztak, ezért a mintákat tisztítottuk mágneses elven alapuló KAPA Pure gyöngyökkel (Roche Diagnostic) a gyártó által javasolt protokoll alapján. A tisztítást követően az amplikon PCR minden esetben sikeres volt, a DNS veszteség is minimális volt (<10%).

A kísérletet: Szilágyi-Tolnai Emese és Dr. Fidler Gábor végezte.

5.2 Természetes eredetű bioaktív komponensekben gazdag nutraceutikumok hatásának vizsgálata broiler csirkék bél-mikrobióta összetételére és diverzitására

Kutatásunk másik fő tárgyát képezte a különböző természetes bioaktív komponensekben gazdag hatóanyagok (karotinoid, fruktooligszacharid, szimbiotikum, antocianin) hatásának vizsgálata a mikrobiom összetételére és diverzitására broiler csirkében (Ross 308).

Különböző természetes hatóanyagokat tartalmazó takarmányokkal etettük az állatokat. Bélsár mintát gyűjtöttünk tőlük, amelyből DNS-t izoláltunk.

A DNS izolátumokon 16 S rRNS gén alapú metagenomikai könyvtárat készítettünk az Illumina könyvtár készítési protokollja alapján. A mintáinkon kétoldalról történő (paired-end) (2x301 nukleotid) szekvenálást végeztünk Illumina MiSeq platformon. A kutatási protokollt a Debreceni Egyetem etikai bizottsága vizsgálta és hagyta jóvá (DEMAB/12-7/2015).

5.2.1 A kísérlet kivitelezése, tartási körülmények és mintagyűjtés

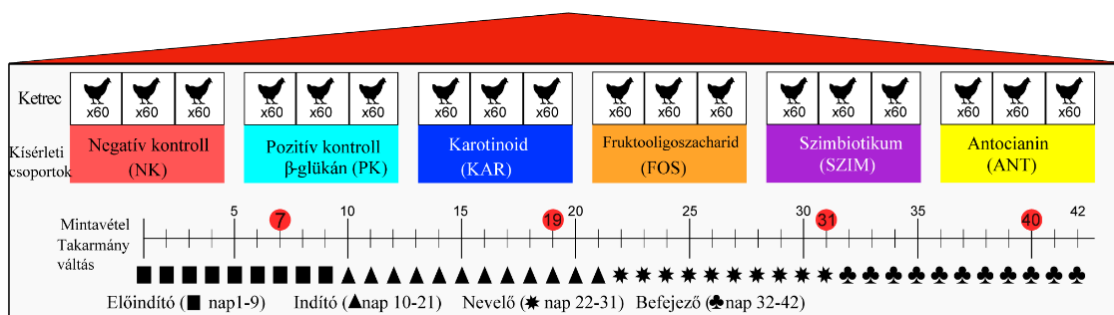
Az etetési kísérletet a Debreceni Egyetem Kismacsi Állattenyésztési Kísérleti Telepén végeztük. A kísérlethez összesen 1250 db broiler ROSS 308 típusú hibridet telepítettünk és 0. napos kortól a 42. napos korig vizsgáltuk őket. A csirkék telepítése a broiler csirke tartástechnológiájának megfelelően a kelést követő 24 órában történt. A csirkéket véletlenszerűen egyenlő arányban osztottuk szét a kísérleti csoportoknak megfelelően (60 db/ketrec). A NAGISZ Zrt. bocsátotta rendelkezésünkre a kísérleti állatokat, és az általuk alkalmazott takarmányozási és tartástechnológiát alkalmaztuk.

A különböző természetes bioaktív komponensekben gazdag hatóanyagok mikrobiom összetételére kifejtett hatásának vizsgálatára egy negatív (NK), egy pozitív (PK) kontroll csoportot és négy darab kezelési csoportot (KAR, FOS, SZIM, ANT) állítottunk be hármas ismétlésben. Az adalékanyagokat 0.5%-ban adagoltuk az alaptakarmányhoz.

- **NK:** negatív kontroll csoport az alaptakarmányt kapta hozzáadott hatóanyagok nélkül
- **PK:** pozitív kontroll csoport az alaptakarmányt kapta, ami 0,5 %-ban hozzáadott β -glükánt tartalmazott
- **KAR:** karotinoid kezelt csoport az alaptakarmányt kapta, ami 0,5 %-ban hozzáadott karotinoidot tartalmazott
- **FOS:** fruktooligoszacharid kezelt csoport az alaptakarmányt kapta, ami 0,5 %-ban hozzáadott fruktooligoszacharidot tartalmazott
- **SZIM:** szimbiotikum kezelt csoport az alaptakarmányt kapta, ami 0,5%-ban hozzáadott szimbiotikumot tartalmazott
- **ANT:** antocianin kezelt csoport az alaptakarmányt kapta, ami 0,5% hozzáadott antocianint tartalmazott.

A broiler csirkék fejlődésüknek megfelelően 4 fázisú takarmányt (előindító: 1-9 nap, indító: 10-21 nap, nevelő: 22-31 nap és befejező: 32-42 nap) kaptak (**1. táblázat**). A természetes bioaktív komponensekben gazdag nutraceutikumokat az állatok mind a négy takarmányozási fázis során az alaptakarmányhoz 0,5%-ban adagolva kapták.

A takarmány és az ivóvíz *ad libitum* állt rendelkezésre. A takarmányváltás a technológiai utasításnak megfelelően történt. A broiler csirkék súlyát 1, 10, 21, 32 és 42 napos korban mértük (4. ábra).



4. ábra: Nutraceutikumok hatásának vizsgálata broiler csirkék bél-mikrobióta összetételére.

Beltartalmi paraméterek	Takarmányozási protokoll			
	Előindító (1-9 nap)	Indító (10-21 nap)	Nevelő (22-31 nap)	Befejező (32-42 nap)
Száranyag %	89.06	89.03	89.15	89.15
Nyers fehérje %	21.58	20.28	19.05	18.28
Nyers zsír %	4.61	4.83	6.22	6.83
Nyers rost %	3.37	3.51	3.70	3.88
ME MJ/kg	12.23	12.47	12.81	13.01
Lizin %	1.37	1.27	1.17	1.09
Methionin %	0.57	0.54	0.53	0.49
Methionin+ Cisztin %	0.94	0.90	0.87	0.83
Kalcium %	0.85	0.73	0.71	0.67
Foszfor %	0.63	0.55	0.52	0.49
Foszfor haszn. %	0.45	0.42	0.40	0.35
Nátrium %	0.17	0.16	0.16	0.16
Nátrium-klorid %	0.282	0.252	0.242	0.244
A-vitamin mg/kg	12.500	12.500	12.500	87.50
D3-vitamin mg/kg	3.000	3.000	3.000	2.100
E-vitamin mg/kg	50.001	50.001	50.001	35.000
Lazalocid-Na mg/kg	82.500	82.500	82.500	
Összetétel				
Kukorica %	33	34	33	32
Búza %	27	29	31	32
Napraforgó préselvény %	-	1	3	4
Szójaliszt %	29	24	20	16
Extrudált szójaliszt %	4	6	4	4
Takarmány élesztő %	1	-	-	-
Növényi zsír %	2	1	3	4
Premix %	4	4	3	3

1. táblázat: Alaptakarmány összetétele. ME, metabolizálható energia

A bélsármintákat négy alkalommal 7, 19, 31 és 40 napon gyűjtöttük (4. ábra). Minden kísérleti csoportból összesen 10 egyedről gyűjtöttünk széklet mintát, amit a későbbiekben púloztunk (alaposan homogenizáltuk). A kísérletünk során, egyedi nyomon követést is végeztünk, ehhez ketrecenként 2-2 (2 kakas, 2 jérce) egyedre jelöltünk meg amelyektől minden alkalommal vettünk bélsár mintát. A mintákat steril DNS, RNS mentes mintatárolóba gyűjtöttük, jégen szállítottuk és a visszaérkezést követően a szárazanyagból DNS-t izoláltunk.

A kísérletett: Szilágyi-Tolnai Emese, Dr. Fidler Gábor és Szilágyi Endre végezte.

5.2.2 Természetes eredetű növényi hatóanyagok előállítása

Kutatásunkhoz használt természetes adalékanyagok előállítását a Debreceni Egyetem Élelmiszertechnológia Intézet kutatói végezték. Mivel PhD munkám tárgyát nem képezte ezen hatóanyagok előállítása, ezért dolgozatomban nem fejtem ki az előállításuk részletes protokollját.

A zöldség- és gyümölcsfeldolgozó ipar nagy mennyiségű mellékterméket (úgynevezett passzírmaradványt) termel, amelyek feldolgozása nagyrészt megoldatlan és drága.

Ezek az élelmiszeripari melléktermékek ugyanakkor nagy mennyiségű, igen értékes biológiailag fontos aktív komponenseket (karotinoidok, antocianinok, flavonoidok, likopinek és prebiotikus hatású fruktó- és galakto-oligoszacharidok) tartalmaznak. Az Élelmiszertechnológia Intézet kutatói olyan zöld extrakciós technológia fejlesztését kezdték el, amely alkalmazásával élelmiszeripari melléktermékeket feldolgozva bioaktív komponensekben gazdag hatóanyagok állíthatók elő. A technológia előnye, hogy a kis mennyiségben jelenlévő komponensek feldúsulnak olyan dózissá, amely már hatásos. Az eljárás során melléktermék képződés nincs, veszélyes hulladék nem képződik, tartósítószer és adalékanyag nélkül eltartható több évig. A karotinoidokat és fruktooligoszacharidokat kápia paprika, az antocianint tartalmazó adalékanyagokat pedig meggy extraktumból állították elő. A szimbiotikum probiotikus baktériumokat (*Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *L. salivarius*, and *Lactobacillus lactis*), prebiotikumokat (frukto-, xilo- és manooligoszacharidok és arabinogalaktán), vitaminokat (B vitamin komplex C, D2, D3, E, ésK2), telítetlen zsírsavakat, továbbá ásványi anyagokat és nyomelemeket (nátrium, kálium, kalcium, jód és foszfor), valamint laktózt tartalmazott.

Az adalékanyagokat: Szilágyi Endre és Pesti-Asbóth Georgina, állította elő.

5.2.3 Minták homogenizálása, bakteriális sejtek feltárása és DNS izolálás

A torzító technikai tényezők vizsgálatának eredménye alapján a legalkalmasabbnak tartott minta homogenizáló, sejtfeltáró és DNS izoláló protokollokat alkalmaztuk a nutraceutikumok broiler csirkék bél-mikrobiomjára kifejtett hatásának vizsgálatára.

A mintákból bakteriális sejtszuszpenziót készítettünk. Előzetes homogenizálást követően 7 g székletet mértünk ki, amihez 7 ml steril PBS puffer oldatot adtunk. A mintákat vortexeltük (alacsony fokozaton, 3 percig), majd centrifugáltuk (300 g, 5 percig). A felülúszókat összegyűjtöttük steril 50 ml-es csövekbe és a mosási lépést háromszor megismételtük. Ezt követően a mintákat üleptítettük a felülúszókat speciális centrifuga csövekbe (Nalgene, Sigma-Aldrich) gyűjtöttük össze, majd 30 percig centrifugáltuk őket (13 000 g), a felülúszót eltávolítottuk, a bakteriális üledéket pedig minden esetben 5 ml steril PBS pufferrel szuszpendáltuk fel.

A sejtek feltárásához mechanikai lízist alkalmaztunk. A mintákat Power fecal bead (Qiagen) lízis kerámia gyöngyökre pipettáztuk, majd három percig maximum fordulatszámon vortexeltük azokat. Ezt követően a sejtek feltárásához MagNa Lyser (Roche Diagnostics) (30 másodpercig 5000 rpm-en) készüléket alkalmaztunk. A lízátumokat centrifugáltuk 16000 g-n 1 percig, majd a felülúszót átpipettáztuk steril eppendorf csőbe.

A mintákból a DNS-t konvencionális fenol-kloroform-izoamil alkohol (25:24:1) izolálási eljárással nyertük ki. Ennek részletes leírását az 5.1.4 fejezet tartalmazza.

A kísérletet: Szilágyi-Tolnai Emese végezte.

5.3 A DNS izolátumok mennyiségi és minőségi ellenőrzése

A DNS mennyiségét és tisztaságát fotometriás úton Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific) készülékkel határoztuk meg. A PCR reakciók előtt a DNS mennyiségét Qubit 2.0 fluoriméterrel megmértük, Qubit dsDNA HS (High Sensitivity) (Thermo Fisher Scientific) assay kisset alkalmazva a gyártó utasításai szerint. A DNS integritásának meghatározásához 4200 TapeStation automatizált mikrokapilláris gélelektroforzis készüléket (Agilent Technologies), Genomi DNA ScreenTapes (5067–5365) és Agilent Genomic DNA reagenst alkalmaztunk a gyártó utasításai szerint. A minőségi és mennyiségi ellenőrzést követően a mintákat 5µg/µL kezdeti térfogatra hígítottuk nukleáz mentes (Thermo Fisher Scientific) vízzel.

A kísérletet: Szilágyi-Tolnai Emese végezte.

5.4 Negatív és pozitív kontrollok a DNS izolálás és könyvtárkészítés hatékonyságának vizsgálatára

Annak érdekében, hogy csökkentjük a laboratóriumi kontaminációt steril kesztyűt és maszkot használtunk a minták gyűjtése és a DNS izolálás során. A DNS izolálások alkalmával minden esetben használtunk negatív izolációs kontrollt, ahol minta helyett nukleáz mentes vízen végeztük el a DNS izolálást, az esetleges környezeti kontamináció kiszűrése végett. Az izolációs kontrollok elvégeztük a könyvtárkészítési protokoll minden lépését.

A gazda háttér DNS szennyezés meghatározásához az izolált DNS mintákon kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakciót végeztünk (RT-PCR) Roche LightCycler 480 System készüléken gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (GAPDH) primert használva. A szekvenálás minőségi ellenőrzéshez a mintánkhoz 5% PhiX kontrollt (PhiX Control kit v3-FC-110-3001, Illumina, California, USA) alkalmaztunk.

Az izolálásokat steril vagy sterilizált eszközökkel nukleáz mentes eppendorfokkal II típusú lamináris fülkében végeztük, a környezeti kontamináció elkerülése céljából.

A kísérletet: Szilágyi-Tolnai Emese végezte.

5.5 A 16 S rRNS gén metagenomikai könyvtárkészítés (V3-V4 régió amplifikálása) és szekvenálás

16 S rRNS gén alapú metagenomikai könyvtárat készítettünk az Illumina (Illumina) könyvtár készítési protokollja (15044223 Rev.B.) alapján. Ennek során 16 S riboszómális RNS gén V3 és V4 hipervariábilis régióit célzottan amplifikáltuk. Az alkalmazott primerek 5' vége egy túlnyúló részt tartalmazott, amelyhez adaptert kapcsoltunk.

A PCR reakcióhoz az alábbi univerzális primereket alkalmaztuk (Sigma-Aldrich, Missouri, USA): Forward Primer, 341 F-5' TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG CCTACGGGNGGCWGCAG, adapter szekvenciája 5' TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG. A Reverse primer, 785R-5' GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC, adapter szekvenciája 5' GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG.

A PCR reakciót Roche LC480 II-es készülékkel végeztük a protokoll szerinti hőmérsékleti paraméterekkel. PCR reakciót követően a mintáinkat KAPA Pure gyöngyökkel (Roche Diagnostic) tisztítottuk (primer dimer eltávolítása) és méret szerint (~550 bp) szétválasztottuk.

A PCR reakció minőségét és az amplikonhosszt (~550 bp) Agilent TapeStation készüléssel ellenőriztük (D1000 reagenssel, 5067-5583, Agilent Technologies).

A minták koncentrációjának meghatározásához fluorometriás dsDNA assay kittet (Thermo Fisher Scientific) és Clariostar mikroplate leolvasót (BMG Labtech, Ortenberg, Németország) alkalmaztunk. Az amlikon PCR-t követően a mintáink indexálását végeztük el. Ennél a lépésnél egyedi dual indexeket kapcsolunk az adapterekhez (Illumina Nextera XT index kit, FC-131-1001/2). A mintákat 20 ng/ μ L-re hígítottuk ki a PCR reakcióhoz. A PCR reakciót Roche LC480 II készülékkel végeztük a gyártó által javasolt hőmérsékleti paraméterekkel.

A PCR reakció minőségét és az amplikonhosszt (~630 bp) Agilent 4200 TapeStation készülékkel ellenőriztük (D1000 reagenssel, 5067-5583, Agilent Technologies) a gyártó utasításai alapján. A minták koncentrációjának meghatározásához fluorometriás dsDNA assay kittet (Thermo Fisher Scientific) és Clariostar mikroplate leolvasót (BMG Labtech) alkalmaztunk. A mintáink koncentrációját qPCR módszerrel is meghatároztuk.

A mintákat két lépésben negyvenezeresére hígítottuk. A PCR reakcióhoz a KAPA Library Quantification kittet (Roche Diagnostic) használtunk a gyártó ajánlása szerint. A könyvtár végső koncentrációjának meghatározásához figyelembe vettük mind a PCR, mind az Agilent 4200 TapeStation és Fluoresszens qubit méréseket. A mintákat egységnyire hígítottuk a legkisebb koncentrációjú minta figyelembevételével, ezt követően a mintákat összemértük egy steril eppendorf csőbe. Az elkészült könyvtárunk koncentrációjának meghatározására fluorometriás dsDNA assay kittet (Thermo Fisher Scientific) és Clariostar mikroplate készüléket (BMG Labtech) alkalmaztunk. A könyvtárunkat 4nM-os koncentrációra hígítottuk ki, majd 0,2 M NaOH oldatot adtunk hozzá, ezt követően 1 percre vortexeltük és 5 percre szobahőn állni hagytuk, ennél a lépésnél denaturálódik a DNS. A könyvtárat 4pM-os koncentrációra hígítottuk hibridizációs pufferrel. A szekvenálás hatékonyságának ellenőrzésére PhiX kontrollt is alkalmaztunk. A PhiX könyvtárat 4 nM-os koncentrációra hígítottuk (2 μ l 10nM-os PhiX könyvtár + 3 μ l 10nM-os Tris pH 8.5), ezt követően 5 μ l 4nM-os PhiX könyvtárhoz 5 μ l 0.2M-os NaOH oldatot adtunk. A mintát vortexeltük, majd szobahőn inkubáltuk 5 percre. A PhiX könyvtárat 4pM-os koncentrációra hígítottuk. A könyvtárakat egybeöntöttük az alábbiak szerint, 30 μ l hígított és denaturált PhiX könyvtárat mértünk 570 μ l hígított és denaturált amplikon (minta) könyvtárhoz. Az oldatot vortexeltük, majd 96°C-on inkubáltuk 2 percre, ezt követően a mintát jeges vízfürdőben inkubáltuk 5 percre, majd az Illumina MiSeq reagens kazettába (MiSeq Reagent kit V3-618 ciklus, Illumina) betöltöttük. Illumina MiSeq platformon „paired-end” szekvenálást (2x301 nt) végeztünk.

A kísérletet: Szilágyi-Tolnai Emese végezte.

5.6 Bioinformatikai analízis

Adatok minőségi ellenőrzése

A nyers adatok feldolgozásának első lépése a minőségi ellenőrzés és a könyvtárkészítésnél használt indexszekvenciák levágása. Ezt a folyamatot az Illumina MiSeq szekvenáló platformba integrált szoftver végzi. A szekvenálás eredményét FastQ formátum tartalmazza, amit a Qiime 2 (ver 2019.7) programba importáltunk (az „Atacama Soil microbiome” oktató anyag instrukciói szerint).

A legfontosabb minőségi paramétereket ellenőriztük, mint a leolvasások száma, átlagos minősége, a leolvasott bázisok pozíció szerinti minőségi eloszlása, valamint a GC bázisok aránya. Az adapter szekvenciák (CTGTCTCTTATACATCT) jelenlétét is vizsgáltuk és ha maradt még az olvasatokban (3' vég) akkor levágtuk (trimming) azokat a Qiime 2 programba integrált Cutadapt szoftvert alkalmazva.

Az alacsony minőségű bázisok levágására dada 2 szoftver használtunk. A különböző metagenomikai DNS izoláló módszerek összehasonlítása esetében az alábbi paraméterek szerint történt a rossz minőségű olvasatok nyírása; a „forward” olvasatok kezdetéről 13 bázist vágtunk így a teljes hossza 290 bázis pár lett, a „reverse” olvasatok kezdetéről 8 bázist vágtunk le így a teljes hossza 280 bázispár lett. Az etetési kísérlet esetében alábbi paraméterek szerint történt az alacsony minőségű bázisok levágása; a „forward” olvasatok kezdetéről 1 bázist vágtunk le, így a teljes hossza 300 bázis pár lett, a „reverse” szál kezdetéről 9 bázist vágtunk le a 3' végéről így a teljes hossza 223 bázispár lett.

A leolvasások illesztése

A többszörös szekvencia illesztést Mafft szoftwerrel végeztük, a szekvenciákat Silva (ver132) és GreenGenes (ver13_8) referencia adatbázisokhoz illesztettük. A filogenetikai fát a fastTree program alkalmazásával készítettük el.

Biodiverzitás analízis

Az alfa és beta diverzitási adatokat a qiime 2 szoftver segítségével kaptuk meg. A mintákat normalizáltuk, a metagenomikai DNS izoláló módszerek összehasonlítása esetében szekvenálási mélységét 25 000 olvasatra állítottuk be. A különböző természetes hatóanyagok mikrobiom összetételére kifejtett hatásának vizsgálatára végzett szekvenálás esetében pedig 12500 read-re állítottuk be a szekvenálási mélységet.

Az alfa diverzitásnál a Shannon, Simpson, Chao-1 és Faith's filogenetikai diverzitási adatokkal dolgoztunk. A béta diverzitás elemzésére súlyozatlan Unifrac távolságot és Bray-Curtis különbséget számoltunk. A béta diverzitási mátrixokat (PCoA) Emperor program segítségével készítettük el.

Adatok vizualizálása

Az ábrák vizualizációjához a Qiime adat elemzés során kapott biom fájlokat TSV fájlkká konvertáltuk és a továbbiakban azokkal dolgoztunk. Az ábrák elkészítéséhez R és Python programokat alkalmaztunk.

5.7 Szekvenálási nyersadatok elérhetősége

Az elemzések során felhasznált összes szekvenanciaadat a „Sequence read Archive” (SRA) honlapra (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>) került feltöltésre PRJNA633979 és PRJNA533250B néven.

A bioinformatikai analízist: *Szilágyi-Tolnai Emese, Dr. Fidler Gábor, Fauszt Péter Zsombor és Dr. Paholcsek Melinda* végezte.

5.8 Statisztikai analízis

Az adatokat GraphPad Prism (Graph-pad V8szoftver, San Diego, CA) statisztikai szoftver segítségével elemeztük. A vizsgált valószínűségi változók esetében Shapiro-Wilk teszttel ellenőriztük, hogy az adatok a normális eloszlást követik-e és alkalmazható-e varianciaanalízis a csoportátlagok összehasonlítására. $P < 0,05$ értéket tekintettük szignifikánsnak. A nyers adatokat átlag és \pm szórás formában adtuk meg. Az alfa diverzitás esetében a különbségeket Kruskal-Wallis teszttel határoztuk meg, mivel az adatok nem mutattak normál eloszlást. A csoportok közötti béta diverzitás különbségét „Permutational multivariable of variance analysis” (PERMANOVA) pszeudo F statisztikai teszttel határoztuk meg. A „heat trees” analízis esetében a különbségeket Wilcoxon teszttel számoltuk ki. A dolgozatban szereplő további mérések esetében egyutas ANOVA-t követő Bonferroni post hoc tesztekkel (többszörös összehasonlítás) vizsgáltuk a különbségeket.

A statisztikai analíziseket: *Szilágyi-Tolnai Emese, Dr. Fidler Gábor, Fauszt Péter Zsombor és Dr. Paholcsek Melinda* végezte.

6. Eredmények

6.1 A szekvenálás eredményét torzító technikai tényezők hatásának vizsgálata

Kísérleteinket a különböző DNS izolálási módszerek 16 S rRNS gén alapú amplikon szekvenálás (Illumina MiSeq platformon) eredményére kifejtet hatásának vizsgálatával kezdtük. Munkánk során optimalizáltuk a különböző módszereket, vizsgáltuk a DNS kinyerési hatékonyságukat, valamint a szekvenálás eredményeként kapott mikrobiális konzorciumok összetételét, diverzitását. Meghatároztuk az egyes módszerek előnyeit és hátrányait. Kutatásunk jelentőségét az adja, hogy az általunk kidolgozott metagenomikai izolálási technikák irányt adhatnak a kutatóknak jövőbeni mikrobiom összetételének meghatározását célzó vizsgálatokhoz a megfelelő DNS izolálási technika kiválasztásához.

6.1.1 A különböző metagenomikai DNS izolálási módszerek hatása a DNS hozamra, minőségre és a biodiverzitási mutatókra

A 16 S rRNS gén alapú amplikon szekvenálás eredményét számos tényező befolyásolhatja. Ilyen többek között a nukleinsav kinyerésének hatékonysága (DNS mennyiségi, minőségi paraméterei). Munkánk első részében azt vizsgáltuk, hogy a bélsár minták esetében a különböző minta homogenizáló, sejtfeltáró és DNS izoláló protokollok alkalmazása hogyan befolyásolja az izolált minták DNS koncentrációját (ng/μL), minőségi paramétereit (230/280, 260/280) és az integritását (HMW, LMW) (**5. ábra**).

Az izolált DNS minták 16,6 %-ban a könyvtárkészítés során alkalmazott amplikon PCR nem ment végbe (**5/a ábra**). Ezen minták 87,5%-ban konvencionális DNS izolálást alkalmaztunk. A sikertelen amplikon PCR-t követően a mintákat mágneses elven alapuló KAPA Pure gyöngyökkel tisztítottuk (a veszteség minimális volt (<10%), az újra tisztított izolátumok koncentrációját az 4/a ábrán piros színnel jelöltük). Tisztítást követően az amplikon PCR sikeresen végbe ment minden minta esetében.

Kétféle minta homogenizáló stratégia a bakteriális sejtszuszpenzió (BS) és Direkt lízis (DL) hatékonyságát hasonlítottuk össze (**5/a-b, d**). A DL 1,5 X nagyobb DNS kihozattal (ng/μL) eredményezett a BS-hez képest, azonban ezzel a módszerrel a DNS tisztasága gyengébb volt. A DNS integritásának tekintetében nem tapasztaltunk számottevő különbséget a két módszer között.

Vizsgáltuk a különböző sejtfeltáró módszerek hatékonyságát is, mint a kémiai (L1), mechanikai (L2) és ezen lízisek kombinációit (L3) **(5/a-b)**.

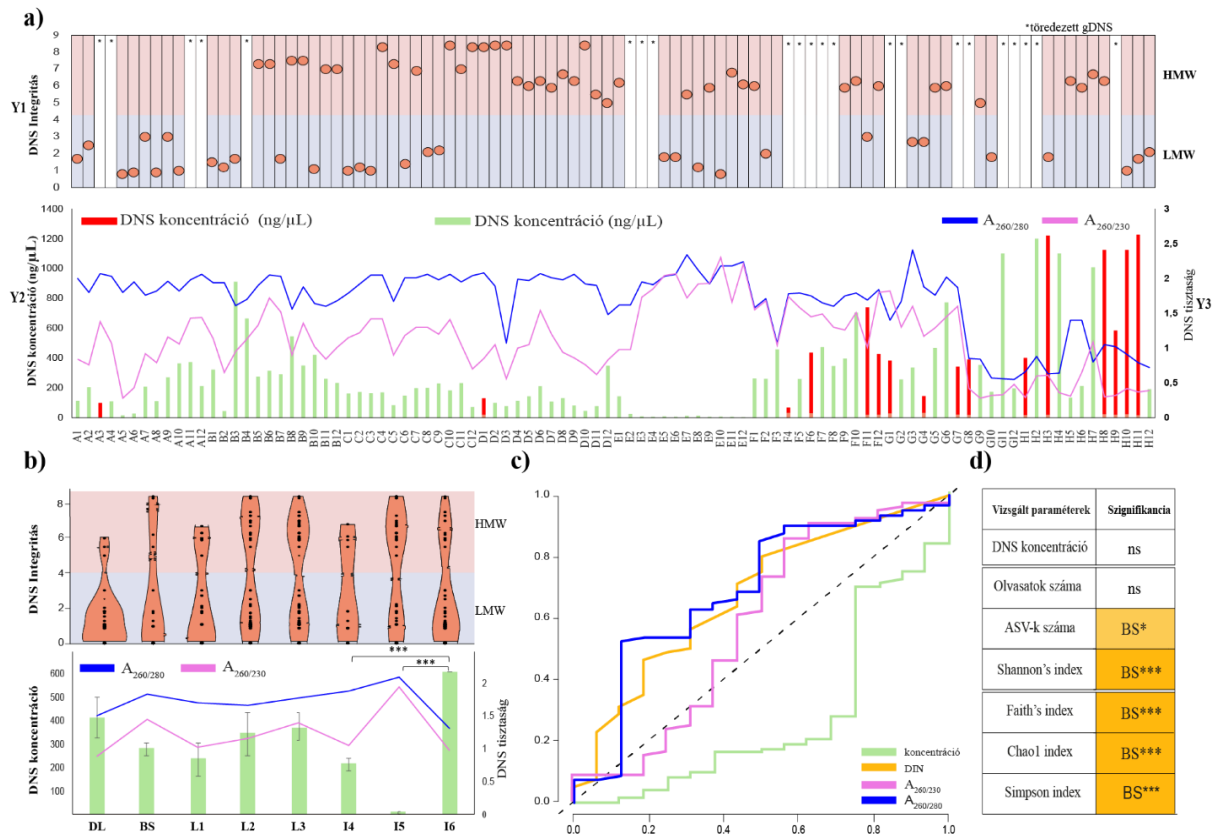
A három féle lízis összehasonlítása során nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget a DNS koncentrációja, tisztasága és integritása tekintetében. Az adataink alapján azonban elmondható, hogy a mechanikai és kémiai lízisek kombinációjával nagyobb DNS kihozatal és tisztaság érhető el a többi sejtfeltáró módszerhez képest **(5/a-b)**.

Kísérleteink során különböző DNS izoláló módszer a MagNa Pure 24 automatizált rendszerű izoláló robot (P4), három kereskedelmi forgalomban beszerezhető Qiagen izoláló kit (P5), és fenol-kloroform-izoamilalkohol (25:24:1) (P6) elven alapuló konvencionális izolálási technikák hatékonyságát hasonlítottunk össze **(5/a-b)**. A konvencionális DNS izolálási módszer eredményezte a legnagyobb DNS-hozamot ($P < 0,0001$). Azonban ennél az izolálási módszernél azokban a mintákban, ahol a minta homogenizáció direkt lízissel történt ott rosszabb DNS minőségi paramétereket kaptunk (A260 / A230 $1,3 \pm 0,55$). A MagNa Pure 24 automatizált robotikus platform nagy mennyiségű és jó minőségű (A260 / A280 $1,8 \pm 0,21$ – A260/A230 $1,89 \pm 0,2$) DNS kinyerésére volt alkalmas. A Qiagen kitek alkalmazása eredményezte a legalacsonyabb DNS koncentrációt, ellenben a DNS minősége ezzel a módszerrel bizonyult a legjobbnak. A különböző izolálási technikák között nem találtunk szignifikáns különbséget a DNS integritása (nagy molekulásúlyú (high molecular weight, HMW) ($DIN \geq 4,5$) és a töredezett kis molekulásúlyú (low molecular weight, LMW) ($DIN < 4,5$)) között.

Mivel a széklet komplex és kiemelkedő mikrobiális diverzitással rendelkező mátrix, számos olyan komponenst tartalmaz, ami az enzimátikus PCR reakciók végbemenetelét gátolhatja. Ezek a PCR inhibitorok a DNS izolálása során együtt extrahálódhatnak a minta mátrixával. Kutatásunk során kíváncsiak voltunk, hogy az általunk alkalmazott DNS izolálási metodikáknak milyen hatása van a könyvtárkészítés során alkalmazott amplikon PCR végbemenetelére (sikerült, nem sikerült) **(5/c ábra)**. Ehhez Receiver operating characteristic (ROC) analízist alkalmaztunk. A görbe alatti területet (Area Under the Curve, AUC) 95 % konfidencia intervalummal (95% Ci) és szórással ($\pm SD$) ábrázoltuk. Eredményeink alapján elmondható, hogy a DNS tisztasága és integritása 2,4-szer nagyobb AUC-t eredményezett (AUC $0,64 \pm 0,0822$) a DNS koncentrációhoz képest ($0,2746$). A 260/280 abszorbancia arány $0,69$ AUC- t a 260/280 esetében pedig $0,58$ AUC értéket kaptunk. A DNS integritás $0,67$ AUC értéket eredményezett. Adataink alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a DNS tisztasága és integritása nagy mértékben befolyásolja az amplikon PCR sikeres végbemenetelét.

Kutatásunk további tárgyát képezte a különböző minta homogenizációs módszerek hatékonyságának összehasonlítása a mikrobiális diverzitás (Shannon, Faith's, Chao-1 és Simpson index) tekintetében (5/d ábra).

A BS alkalmazása szignifikánsan magasabb bakteriális diverzitást eredményezett a mintánkban a DL-hez képest. Az olvasatok számában és a DNS kinyerés hatékonyságában nem találtunk szignifikáns különbséget a két módszer között.

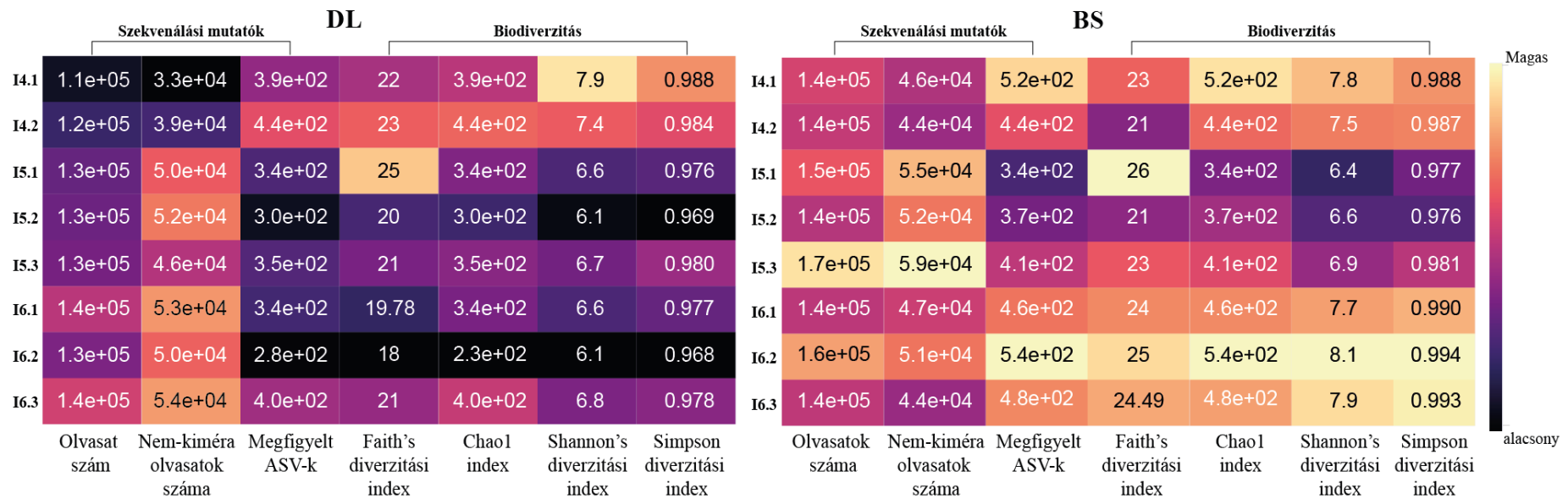


5. ábra: A DNS izoláló módszerek hatásának vizsgálata a DNS kinyerés hatékonyságára és a diverzitási mutatókra. (a) Minden egyes minta (A1-H12) esetében külön is értékeltük a vizsgált paramétereket (kiegészítő ábra 1). (Y1) DNS integritás meghatározása (DNA integrity number (DIN)). Megkülönböztettünk nagy molekulatömegű (High molecular weight (HMW) (piros sáv)), alacsony molekulatömegű (low molecular weight (LMW) (kék sáv)), valamint töredezett DNS mintákat (x). Az Y2 tengely a mintánkénti teljes DNS-hozamot jelöli (ng / μL) (oszlopdiagramm). A mágneses elven újra tisztított DNS izolátumok DNS koncentrációját piros színnel tüntettük fel. Az Y3 tengely a A260/A280 és a A260/A230 abszorbancia arányokat tartalmazza (vonaldiagramok). (b) Értékeljük a különböző módszerek hatását a DNS koncentrációjára és minőségi paramétereire. A kapott értékeket átlag±SD alakban ábrázoltuk. (c) Receiver operating characteristic (ROC) analízis. (d) BS (bakteriális sejtszuspenzió) és a DL (direkt lízis) mintahomogenizáló stratégiák összehasonlítása, ahol a szignifikánsan jobban teljesített módszer rövidítését tüntettük fel (jelen esetben a BS). A csillagok statisztikai szignifikanciát jelentenek; * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$. BS: bakteriális sejtszuspenzió, DL: direkt lízis, L1: mechanikai lízis, L2: kémiai lízis, L3: vegyes lízis, I4: MagNaPure 24 izoláló robot, I5: Qiagen izoláló kit, I6: Konvencionális izolálás.

6.1.2 A különböző DNS izolálási technikák hatásának vizsgálata a szekvenálási és biodiverzitási mutatók értékeire

Kísérleteink során arra kerestük a választ, hogy a nukleinsav kinyeréséhez alkalmazott izolálási technikák befolyásolják-e a 16 S rRNS gén alapú ampliton szekvenálásnál a végeredményként kapott szekvenálási mutatók és az alfa diverzitási mérőszámok értékeit (**6. ábra**).

Az általunk alkalmazott kísérleti rendszerben a **BS** homogenizált konvencionális DNS izolálási módszer eredményezte a legnagyobb biodiverzitást, különösen a kémiai (**I6.2**) és a vegyes (**I6.3**) sejteltárás alkalmazásával (kivéve a Faith's filogenetikai diverzitási index esetében). A BS kapcsolt QIAamp DNA Stool Mini Kit (**I5.1**) módszer esetében kaptuk a legmagasabb Faith's filogenetikai diverzitási mutatót. A QIAamp Power Fecal DNA (**I5.2**) és DNeasy PowerSoil Kit (**I5.3**) módszerek eredményezték a legalacsonyabb diverzitási értékeket és ezzel ellentétesen a legmagasabb read és nem-kiméra read számot. A MagNa Pure 24 automatizált DNS izoláló robot Pathogen 200 (**I4.1**) protokoll alkalmazásánál magasabb diverzitási és szekvenálási értékeket tapasztaltunk, mint a Pathogén 1000 protokoll estében (**I4.2**). Továbbá, konvencionális izolálás után a Pathogen 200 (**I4.1**) protokoll esetében kaptuk a legmagasabb diverzitási mutatókat (Chao-1, Shannon és Simpson). A DL homogenizált minták tekintetében is jelentős különbségeket tapasztaltunk a különböző módszerek között. A konvencionális kémiai lízissel társított DNS izoláló módszer (**I6.2**) estében kaptuk a legalacsonyabb biodiverzitási értékeket. Érdekes, hogy ugyanezen módszer sejtszuspenzióval társított mintahomogenizálással a legjobb eredményt érte el. A Pathogén 200 protokoll (**I4.1**) a legmagasabb diverzitási értékeket, ugyanakkor a legkisebb read számot eredményezte.



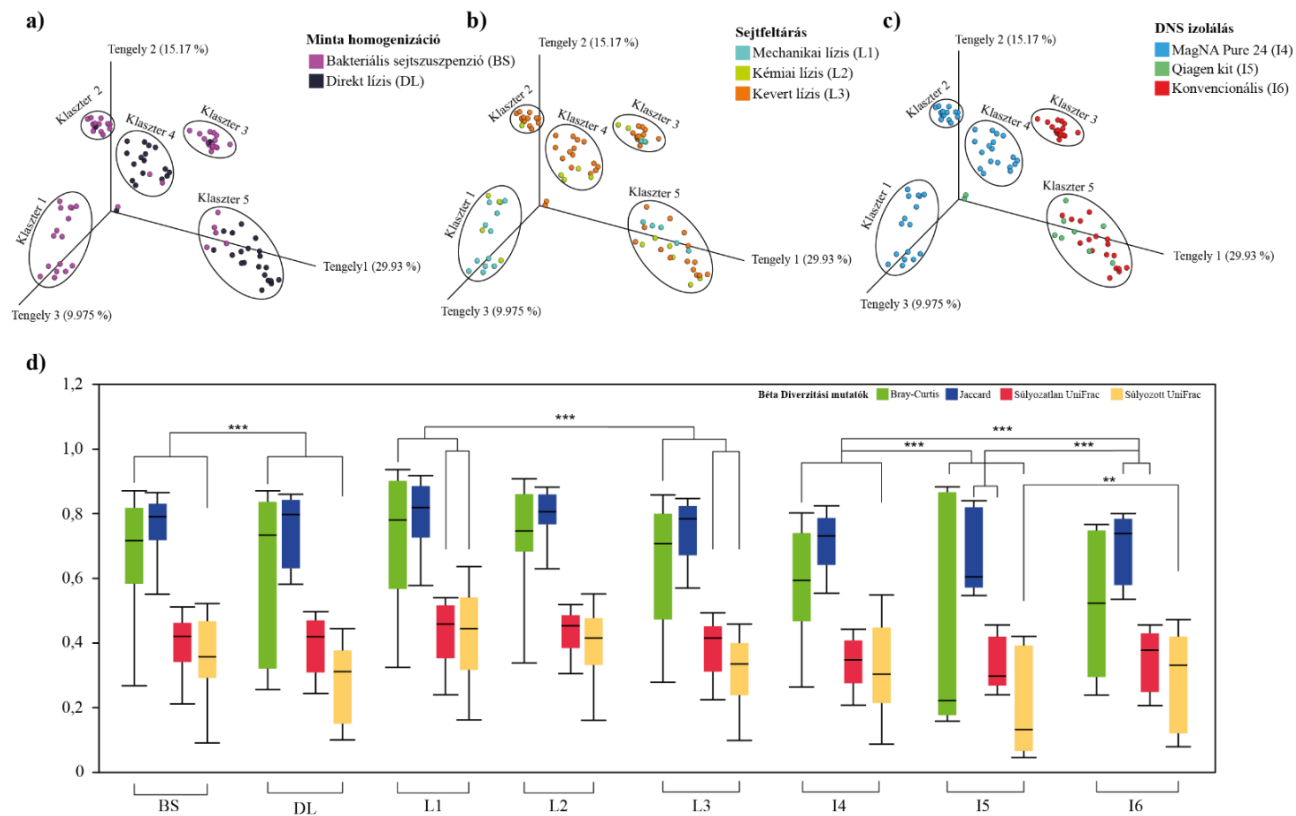
6. ábra: A különböző DNS izolációs megközelítések hatása a szekvenálási és a diverzitási mutatók eredményére. A standard DNS tisztítási módszereket hasonlítottuk össze szekvenálási és biodiverzitási mutatók tekintetében. A DNS izolálást direkt lízis (DL) vagy bakteriális sejtszúszenzió (BS) módszerrel homogenizált mintákon végeztük. Vizsgáltuk a MagNa Pure 24 izoláló robot Pathogen 200 (I4.1) és Pathogen 1000 (I4.2) protokollját. A kereskedelmi forgalomban kapható - QIAamp DNA Stool mini (I5.1), QIAamp Power fecal (I5.2), Qiagen DNeasy Power Soil (I5.3) – Kit-eket a gyártó utasításainak megfelelően alkalmaztuk. A konvencionális DNS izolálás hatékonyságát különböző lízis protokollokkal (I6.1-mechanikai; I6.2-kémiai lízis; I6.3-kevert lízis) párosítva vizsgáltuk. A szekvenálási mutatók közül értékeltük a read számot, nem-kiméra read számot és az amplicon szekvencia variánsokat (amplicon sequence variants, ASVs). Továbbá, elemeztük az alfa diverzitási mutatók (a Faith's filogenetikai, Chao-1, Shannon és Simpson) értékeit

6.1.3 A metagenomikai DNS izoláló módszerek hatása a béta diverzitási mutatókra

Kutatásunk során vizsgáltuk, hogy a különböző DNS izoláló módszerek hogyan befolyásolják a mikrobiális béta diverzitási mutatókat. Eredményeinket a **7. ábra** szemlélteti. A közösségek egymásközötti változatosságának meghatározásához fő koordináta elemzést (principal coordinates analyses, PCoA) végeztünk. A minták közötti távolságmátrix kiszámításához Bray-curtis analízist alkalmaztunk. A fő koordináta elemzés öt klasztercsoportot eredményezett (klaszter1 - klaszter5) különböző térbeli koordinációkkal (**7/a, 7/b, 7/c**). Az egyes klasztereken belüli adatok valamilyen dimenzió szerint hasonlítanak egymáshoz, és e dimenzió mentén különböznek a többi klaszter elemeitől.

A homogenizációs stratégiák alkalmazása esetében különböző klaszter csoportokat határoztunk meg a BS (1., 2., 3. klaszter) és a DL (4., 5. klaszter) minták esetében (**7/a. ábra**). Általánosságban elmondható, hogy az általunk alkalmazott lízis protokolloknak nem volt számottevő hatásuk a klaszter profilokra (**7/b ábra**), kivéve a MagNa Pure 24-alapú izoláló módszerrel kapcsolt mechanikai (klaszter1) és a kevert lízis (klaszter2, 4) alkalmazása esetében. A konvencionális és a Qiagen DNS izoláló kitek tekintetében a különböző sejtfeltáró protokollok nem befolyásolták jelentősen a közösségi összetételek különbségeit (**7/b, 7/c ábra**). A 3. klaszter szoros összefüggést mutat a baktériumszuszpenziók (**7/a ábra**) és a konvencionális DNS izoláló (**7/c ábra**) módszerek között. Továbbá, megfigyeltük, hogy az általunk alkalmazott izolációs kiteknek nem volt prominens hatása a béta diverzitási profilokra (**7/c ábra**). A robotikus MagNa Pure 24 izoláló módszerek esetében három különböző klasztert azonosítottunk (klaszter1, 2, 4). A 2. klaszter mintái kizárólag BS kapcsolt MagNa Pure 24 izoláló robot Pathogen 200 protokollal izolált DNS mintákból származnak (**7/c ábra**).

A különböző módszerek közötti statisztikai különbségeket oszlopdiagramon ábrázoltuk (**7/d ábra**). A bélsár minták mikrobiális közösségei közötti különbségek meghatározásához kvantitatív (Bray-Curtis, súlyozott UniFrac) és a kvalitatív (Jacquard, súlyozatlan UniFrac) béta diverzitási analíziseket végeztünk. Eredményeink alapján elmondható, hogy a különböző minta homogenizációs stratégiák jelentősen befolyásolják a mikrobiális közösségek közötti különbséget. A BS és a DL homogenizált minták szignifikánsan különböznek egymástól. A sejtfeltáró protokollok közül a mechanikai és kombinált lízisek alkalmazása esetében figyelhető meg szignifikáns különbség. A különböző DNS izoláló módszerek között számottevő különbségeket találtunk a statisztikai analízis során.

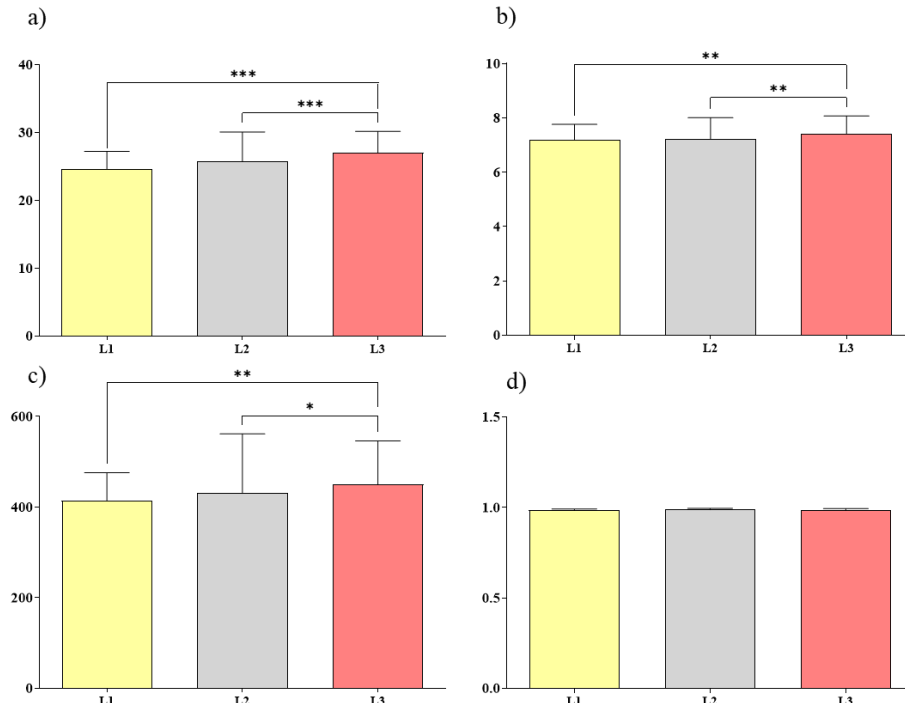


7. ábra: DNS izoláló metagenomikai módszerek hatása a béta diverzitási mutatókra. Kutatásunk során vizsgáltuk a (a) minta homogenizáló, (b) baktérium sejtfeltáró és a (c) különböző DNS izoláló technikák hatásait a béta diverzitási mutatókra. A módszerek és a béta diverzitási mutatók közötti összefüggéseket háromdimenziós PCoA ábrákon mutatjuk be. (d) Vizsgáltuk a különböző módszerek közötti statisztikai különbségeket. Eredményeinket kvantitatív (Bray-Curtis (zöld), súlyozott UniFrac (sárga)) és a kvalitatív (Jacquard (kék), súlyozatlan UniFrac (piros)) eltérésen alapuló statisztikák alapján számoltuk ki. Az oszlop diagramm az interkvartilis tartományok a minimum/maximum és a medián értékeit tartalmazza. A csillagok statisztikai szignifikanciát jelentenek; ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$.

6.1.4 A különböző lízis protokollok hatása az alfa diverzitási mutatók értékeire

Munkánk során vizsgáltuk a különböző sejtfeltáró protokollok [mechanikai (L1), kémiai (L2) és vegyes (L3) lízis] hatását a bakteriális alfa diverzitási mutatók értékeire. Eredményeinket a **8. ábra** szemlélteti.

Vizsgáltuk a különböző lízis protokollok hatását a Faith's filogenetikai (**8/a ábra**) diverzitási mutató értékeire. A mechanikai és kémiai lízisek kombinációja ($27,02 \pm 3,16$) (L3) szignifikánsan magasabb értéket eredményezett, mint a kémiai (L2) ($25,78 \pm 4,3$) illetve mechanikai (L1) ($24,65 \pm 2,58$) lízisek önmagukban. A Shannon (**8/b ábra**) és a Chao-1 (**8/c ábra**) alfa diverzitási értékek esetében is ugyanez a tendencia figyelhető meg [Shannon: mechanikai ($7,2 \pm 0,56$), kémiai ($7,22 \pm 0,78$) és vegyes ($7,42 \pm 0,42$), Chao-1: mechanikai ($413,42 \pm 62,49$), kémiai ($430,325 \pm 131,25$) és vegyes ($450,03 \pm 96$)]. A Simpson diverzitási index (**8/d ábra**) esetében nem tapasztaltunk különbséget az egyes bakteriális sejtek feltárására alkalmazott lízisek összehasonlítása során mechanikai ($0,985 \pm 0,005$), kémiai ($0,986 \pm 0,007$) és vegyes ($0,986 \pm 0,007$). Eredményeink alapján összességben elmondható, hogy a mechanikai és kémiai lízisek kombinációja eredményezte a legmagasabb alfa diverzitási mutatókat összehasonlítva a többi sejtfeltáró technikával.



8. ábra: Különböző sejtfeltáró protokollok hatékonyságának vizsgálata a bakteriális alfa diverzitási mutatók értékeire. A bakteriális sejtek feltárására mechanikai (L1), kémiai (L2) és ezek kombinációit (L3) alkalmaztuk. (a) Faith's filogenetikai (b) Shannon (c) Chao-1 (d) Simpson diverzitási index. A csillagok statisztikai szignifikanciát jelentenek; ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$. A kapott értékeket átlag \pm SD alakban ábrázoltuk.

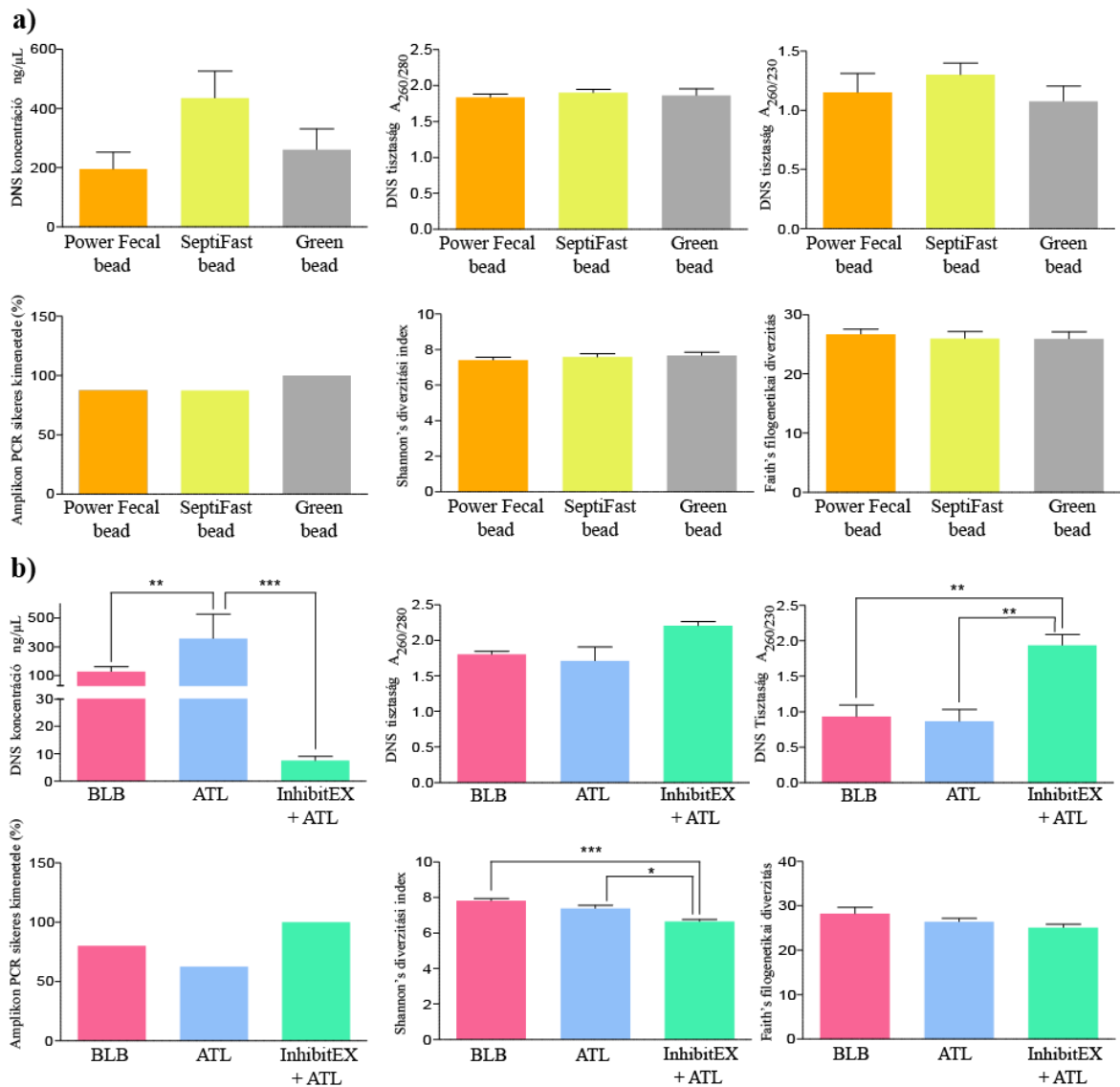
6.1.5 A bakteriális sejtfeltáró protokollok hatása a DNS hozamra, tisztaságra és a közösségi diverzitási mutatókra

Összehasonlítottuk a mechanikai és kémiai lízisek esetében alkalmazott különböző protokollok hatását az izolátumok DNS koncentrációjára, könyvtárkészítés során alkalmazott amplikon PCR végbemenetelére és a Shannon és a Faith's filogenetikai diverzitási mutatókra (**9. ábra**).

A mechanikai lízis során a sejtfeltáráshoz különböző kereskedelmi forgalomban kapható lízis gyöngyök (PowerFecal, SeptiFast és Green beads) hatásait hasonlítottuk össze (**9/a ábra**). A kémiai lízishez ATL, BLB, valamint InhibitEx tablettát ATL pufferben beoldva alkalmaztunk (**9/b ábra**). Azt tapasztaltuk, hogy a különböző lízis gyöngyök megválasztása nem eredményezett statisztikailag kimutatható szignifikáns különbséget az általunk vizsgált paraméterekre. Azonban a mért adatokból elmondható, hogy a SeptiFast lízis gyöngyök alkalmazásával tudtuk a legnagyobb mennyiségű DNS-t kinyerni (SeptiFast: $435,075 \pm 258,09$ kontra Power Fecal: $194,75 \pm 162,68$ kontra Green beads $260,5 \pm 141,1$).

Számottevő különbség figyelhető meg a DNS mennyiségében a mechanikai (326 ± 110 ng / μ l) és a kémiai lízisek (101 ± 148 ng / μ l) alkalmazása között.

A kémiai lízis esetében az ATL puffer alkalmazása során kaptuk a legmagasabb DNS koncentrációt (ATL: $356,91 \pm 537,66$ BLB: $129,4 \pm 91,89$ és InhibitEX: $6,15 \pm 1,06$). Az InhibitEX tablettá előkezelése meglehetősen jó minőségű tisztított DNS-t eredményezett [(260/280: $2,18 \pm 0,002$) (260/230: $1,98 \pm 0,45$)], amelyek összességében pozitív hatást gyakoroltak a PCR reakciók sikeres végbemenetelére (100%), azonban ezzel a módszerrel alacsony mennyiségű DNS-t kaptunk. Továbbá, az InhibitEX tablettá alkalmazása alacsonyabb Shannon ($6,76 \pm 0,25$) diverzitási indexet eredményezett, mint az ATL ($7,208 \pm 0,59$) és BLB ($7,8165 \pm 0,35$) puffer alkalmazása. Mind az ATL, mind a BLB pufferek használata nagy mennyiségű DNS kinyerését eredményezte, ami magas alfa diverzitási értékekkel társult.



9. ábra: Különböző sejteltáró protokollok hatékonyságának összehasonlítása.

Vizsgáltuk a (a) mechanikai és (b) kémiai lízis protokollok hatását a DNS-hozamra (ng/μL), a tisztaságra (260/280, 260/230), az amplikon PCR amplifikációjára, valamint az alfa diverzitási mutatók értékeire (Shannon-index, ChaoI-index, Faith PD). Mechanikai sejteltárás esetében PowerFecal bead (narancssárga), SeptiFast (citromsárga) és Green Bead (szürke) lízis gyöngyöket alkalmaztunk. A kémiai sejteltárás esetében BLB (rózsaszín) és ATL (kék) puffert, valamint InhibitEX tablettát (zöld) ATL pufferben beoldva használtunk. A csillagok statisztikai szignifikanciát jelentenek; ** P ≤ 0,01, *** P ≤ 0,001. A kapott értékeket átlag±SD alakban ábrázoltuk.

6.1.6 A különböző DNS izoláló metagenomikai stratégiák alapvetően befolyásolják a mintában a Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumok eloszlásának arányait

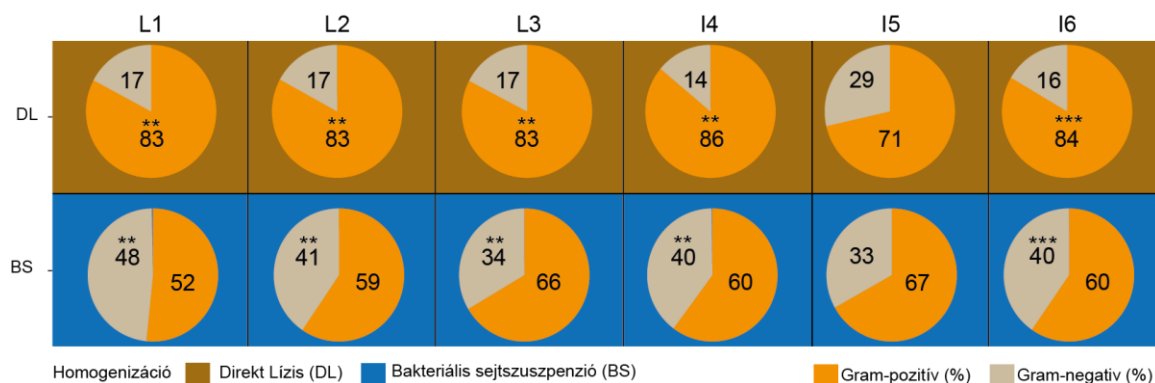
Munkánk során vizsgáltuk a különböző DNS izolálási technikák hatását a Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumok eloszlására, amelynek eredményét a **10. ábra** szemlélteti. A Direkt (DL) és indirekt (BS) mintahomogenizáló stratégiák jelentős különbségeket eredményeztek ugyanazon módszerek alkalmazása során a bakteriális profilokban.

A **DL** módszerrel homogenizált minták esetében a különböző sejteltávolító technikák (**L1**, **L2**, **L3**) ugyanazon Gram megoszlásokat eredményezték (G-pozitív: 83%, G-negatív: 17%). A DNS izoláló módszerek összehasonlítása során különböző Gram eloszlásokat figyeltünk meg [**I4** (G-pozitív: 86%, G-negatív: 14%), **I5** (G-pozitív: 71%, G-negatív: 29%) és **I6** (G-pozitív: 84% kontra G-negatív: 16%)].

Fontos megjegyezni továbbá, hogy a DL mintahomogenizáció alkalmazásával a Gram-pozitív baktériumok szignifikánsan nagyobb mennyiségben nyerhetők ki, mint a Gram-negatív baktériumok.

A **BS** minták esetében a mechanikai lízis (**L1**) kiegyensúlyozott Gram-pozitív (52%) és Gram-negatív (48%) arányokat eredményezett. Az automatizált robotikus (**I4**) és a konvencionális (**I6**) DNS extrakciós módszer esetében ugyanazon Gram eloszlásokat (G-pozitív: 40% kontra G-negatív: 60%) figyeltünk meg.

A minta homogenizálásának megválasztása nem fejtett ki jelentős hatást a székletbaktériumok Gram-eloszlására, amikor a DNS-t szilícium-dioxid-oszlopon alapuló módszerekkel (**I5**) nyertük ki (Gram-negatív: DL 29%, BS 33%, Gram-pozitív: DL 71%, BS 67%).



10. ábra: DNS izoláló módszerek hatásának vizsgálata a Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumok eloszlásának arányaira. Direkt lízis (DL) és bakteriális sejtuszpenzió (BS) mintahomogenizáló módszerek. Sejteltávolító (mechanikai (L1), kémiai (L2) és vegyes (L3)) és a DNS izoláló protokollok (izoláló robot (I4), izoláló kit (I5) és konvencionális izolálás (I6)) hatásának vizsgálata. A csillagok statisztikai szignifikanciát jelentenek; ** P ≤ 0,01, *** P ≤ 0,001.

6.1.7 A különböző DNS izolálási technikák hatása az egyensúlyi (core) mikrobiom összetételére

Kísérleteink során vizsgáltuk, hogy a különböző módszerek hogyan befolyásolják a mintában található „core” mikrobiom összetételét. Eredményeinket a **11. ábra (Kiegészítő táblázat 2)** szemlélteti. A „core” mikrobiom eloszlásának komplex összehasonlítását törzs és osztály rendszertani kategóriában végeztük el. A 16 S rRNS gén alapú amplitikon szekvenálás eredménye alapján a különböző technikai tényezők (homogenizálás, lízis, DNS izolálás) esetében a prokarióta doménen belüli főbb törzsek és osztályok azonosak voltak, de a relatív mennyiségekben eltérések figyelhetők meg.

A különböző minta homogenizáló módszerek (BS, DL) összehasonlítása során az alábbi különbségeket tapasztaltuk: A **DL** homogenizálás a Gram-pozitív *Firmicutes* törzs hatékony kivonását eredményezte (DL: 81,4%, BS: 60%). A **BS** alkalmazásával pedig nagyobb mennyiségben vonhatók ki a Gram-negatív *Bacteroidetes* (BS: 28,68%, DL: 12,62 %), *Proteobacteria* (BS: 6,57%, DL: 3,06%) és *Epsilonbacteraeota* baktérium törzsek (BS: 1,9%, DL: 0,69%), mint a DL esetében. A BS és a DL homogenizálás hasonló relatív mennyiségeket eredményezett az *Actinobacteria* (DL: 1,14%, BS: 1%) és a *Tenericutes* (DL: 0,2%, BS: 0,16%) baktérium törzseknél.

Összehasonlítottuk a különböző sejtfeltáró módszerek hatását a „core” mikrobiomot alkotó bakteriális törzsek relatív mennyiségeire. A mechanikai lízis (**L1**) a *Bacteroidetes* hatékony kivonására volt alkalmas (L1: 16,2%, L2: 12,3% és L3: 9,38 %). A *Proteobacteria* baktérium törzset kémiai (**L2**) sejtfeltárás alkalmazásával (L2: 6,1%) nagyobb mennyiségben nyertük ki, a többi sejtfeltárási technikával (L1: 0,39%, L2: 3,39%) összehasonlítva. A mechanikai és kémiai lízisek együttes (**L3**) alkalmazása bizonyult a legjobbnak a *Firmicutes* törzs kivonására. Az *Actinobacteria*, *Cyanobacteria*, *Tenericutes*, *Verrucomicrobia* és *Epsilonbacteraeota* baktériumok relatív mennyiségeiben nem figyeltünk meg szignifikáns különbséget a különböző sejtfeltárási technikák összehasonlítása során.

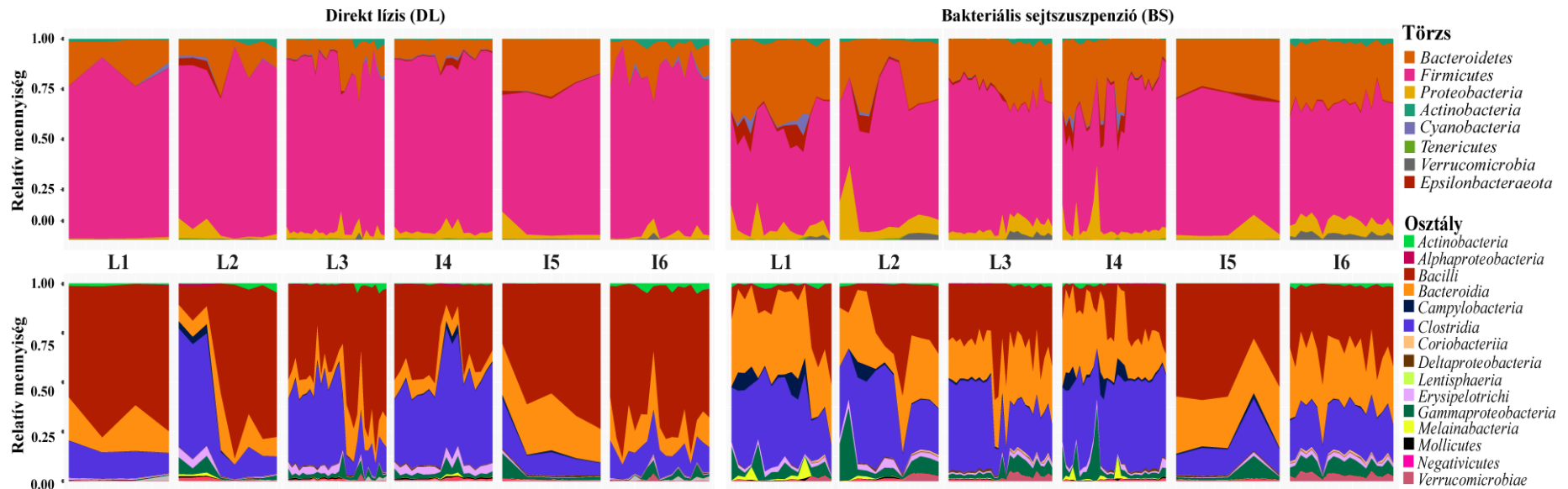
A különböző DNS izolálási módszerek kifejezett különbséget eredményeztek a „core” mikrobiomot alkotó baktériumok relatív mennyiségeiben törzs rendszertani kategóriában. Eredményeink alapján elmondható, hogy a MagNa Pure 24 izoláló robot alkalmazása (**I4**) a *Firmicutes* (I4: 85%, I5: 82% és I6: 80%) és *Tenericutes* (I4: 5,48%, I5: 0,8% és I6: 1,1 %) törzseket nagyobb mennyiségben nyerte ki, mint a többi DNS izoláló módszer. A Qiagen izolációs kiték (**I5**) alkalmazása esetében a *Bacteroidetes* (I5: 12,1%, I4: 8,3 % és I6: 1%) törzs

hatékonyabb kivonását figyeltük meg a többi izolációs technikához képest. A konvencionális izolálás (**I6**) alkalmazásával a *Verrucomicrobia* (I6: 2,62 %, I4: 1,11% és I5: 0,3%) és *Proteobacteria* (I6: 5,48 %, I4: 1,4% és I5: 0,27%) bakteriális törzsek nagyobb relatív gyakorisággal alkották a „core” mikrobiomot, mint a többi izolálási technika esetében.

Osztály taxonómiai szinten a *Bacilli*, *Bacteroidia*, *Clostridia* és *Gammaproteobacteria* relatív mennyiségeiben figyeltünk meg számottevő különbséget a különböző minta homogenizáló módszerek hatására. A **BS** alkalmazásával a *Clostridia* (BS: 32,12%, DL: 23,43%), a *Bacteroidia* (BS: 28,68 %, DL:12,62%) és a *Gammaproteobacteria* (BS:5,78%, DL:2,41%) nagyobb mennyiségű kivonását értük el. A **DL** homogenizált mintákban a *Bacilli* baktériumok jelentős mennyisége figyelhető meg (DL: 56%, BS: 25,54%).

A különböző sejtfeltáró módszerek összehasonlítása során az alábbi különbségeket figyeltük meg a „core” mikrobiomot osztály taxonómiai szinten alkotó baktériumok relatív mennyiségeiben. A mechanikai lízis (**L1**) *Bacilli* (L1: 16,2%, L2: 0,4% és L3: 0,62%) és *Bacteroidia* (L1: 69,48%, L2: 23,41% és L3: 23,76%) osztályok nagyobb mennyiségű kivonását eredményezte a többi sejtfeltárási technikához képest. *Coriobacteriia* (L2: 12,31%, L1: 0,22% és L3: 9,38%) és *Erysipelotrichi* (L2: 0,46%, L1: 0,20% és L3: 0,22%) baktériumok jelentősen magasabb relatív gyakorisággal mutathatók ki a kémiai lízis (**L2**) alkalmazásával. A mechanikai és kémiai lízisek kombinációja hatékonynak bizonyult a *Gammaproteobacteria*, a *Deltaproteobacteria* és a *Verrucomicrobiae* kinyerésére. A „core” mikrobiomot alkotó *Actinobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Camplylobacteria*, *Clostridia*, *Lentisphaeria*, *Melainabacteria*, *Mollicutes* és *Negativicutes* baktériumok relatív mennyiségeiben nem figyeltünk meg jelentős különbségeket a különböző sejtfeltáró technikák összehasonlítása során.

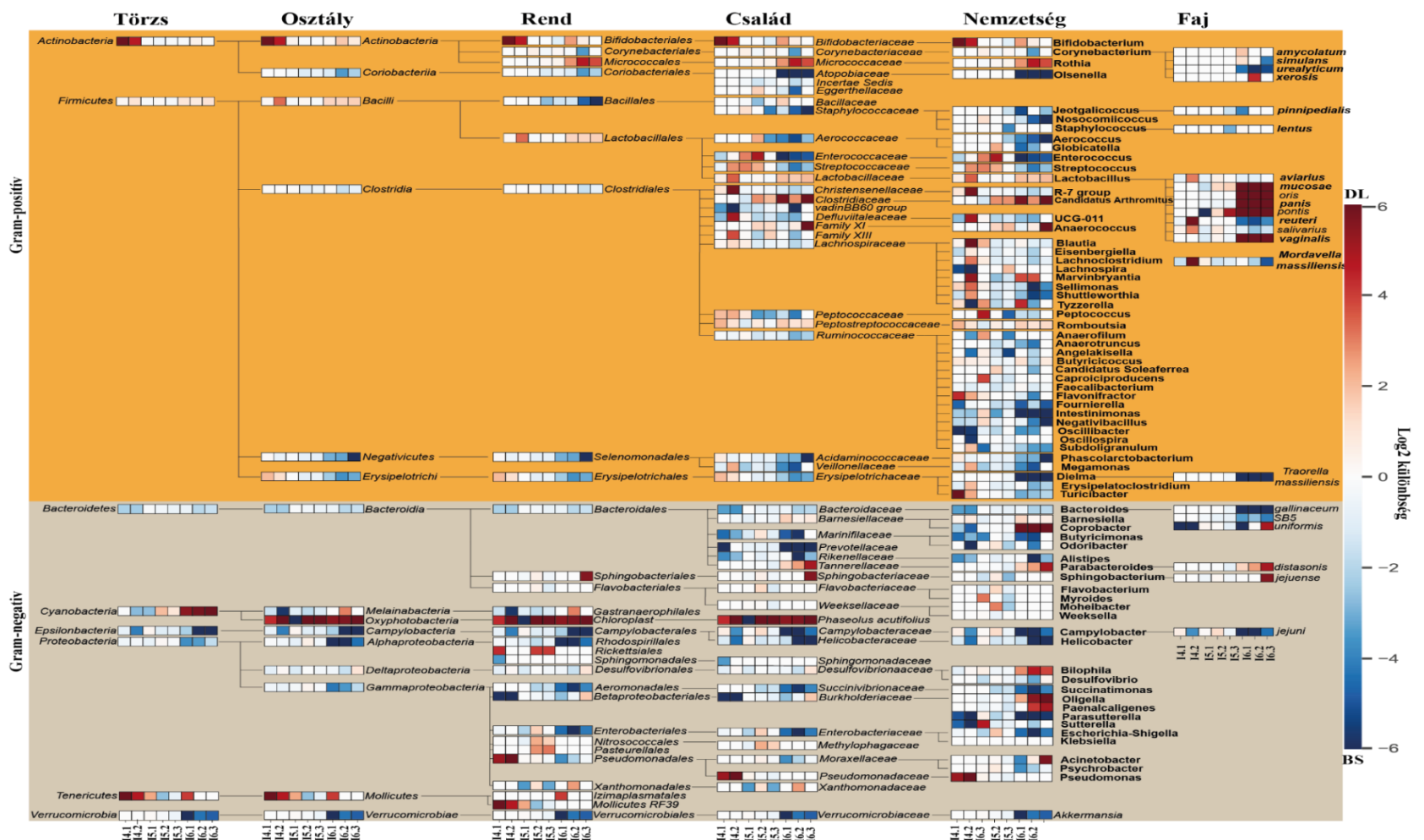
Vizsgáltuk a különböző DNS izoláló módszerek hatását a „core” mikrobiomot alkotó baktériumok mennyiségi összetételére osztály rendszertani kategóriában. A MagNa Pure 24 izoláló robot (**P4**) alkalmazásával nagyobb mennyiségben azonosíthatók *Coriobacteriia* (P4: 8,3%, P5: 0,05% és P6: 0,142%) és *Negativicutes* (P4: 3,1%, P5: 1,8% és P6: 0,1%) bakteriális osztályok a többi izolációs módszerrel összehasonlítva. Az *Actinobacteria* (P5: 24,34%, p4: 0,148% és P6: 1,96%) és *Bacteroidia* (P5: 62%, p4: 0,25% és P6: 12,9%) magasabb relatív gyakorisággal mutathatók ki az izolációs kitek (**P5**) alkalmazásával, mint a többi módszer esetében. A konvencionális DNS izoláló módszer hatékonynak bizonyult a *Clostridia* (P6: 8,61%, P4: 0,44% és P5: 0,09%) és *Bacilli* P6: 74%, P4: 39% és P5: 0,09%) kivonására.



11. ábra: A „Core” mikrobiom összetételének változása a különböző metagenomikus DNS izoláló módszerek hatására. Vizsgáltuk az egyensúlyi mikrobiom összetételében bekövetkező változásokat a különböző protokollok hatására törzs és osztály rendszertani kategóriában. A kiértékeléshez relatív frekvencia adatokat alkalmaztunk azon taxonok figyelembevételével, amelyek a minták legalább 50%-ban jelen vannak. A különböző sejtfeltáró és DNS izoláló módszerek hatékonyságát a direkt lízis (DL) és a bakteriális sejtszuszpenzió (BS) homogenizáló protokoll függvényében mutatom be. A sejtek feltárására mechanikai (L1), kémiai (L2) és vegyes lízist alkalmaztunk (L3). A DNS kivonását MagNa Pure 24 izoláló robot (I4), Qiagen izoláló kit (I5) és konvencionális (I6) izoláló módszerekkel végeztünk.

6.1.8 A metagenomikai DNS izoláló módszerek eltérő hatást gyakorolnak a különböző bakteriális taxonok feltárására

Kutatásunk során arra a kérdésre kerestük a választ, hogy az egyes DNS extrakciós módszerek, mely baktériumfajok kimutatására alkalmazhatóak a leghatékonyabban. Ennek megválaszolására értékeltük a különböző DNS izolálási technikák hatásait a mikrobiális ökoszisztéma összetételére a minta homogenizáló (DL vs. BS) módszerek függvényében. Eredményeinket a **12. ábra** szemlélteti. Kísérleteink során összesen 8 törzs, 15 osztály, 29 rend, 47 család, 72 nemzetség és 22 faj mennyiségi különbségeit követtük nyomon. Jelentősen eltérő taxonómiai profilokat kaptunk, amikor a DL és a BS homogenizált minták részhalmozait összehasonlítottuk. Továbbá, a különböző izolációs stratégiák is számottevő különbségeket eredményeztek a mikrobiális ökoszisztémát alkotó baktériumok relatív frekvencia mennyiségeiben. Az automatizált rendszerű MagNa Pure24 izoláló robot pathogén 200 (**I4.1**) és 1000 (**I4.2**) protokollok összehasonlítása során nem tapasztaltunk számottevő különbséget a minták bakteriális összetételében. A **DL** kapcsolt MagNa Pure24 izoláló robot (I4.1 és I4.2) alkalmazása az *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Tenericutes* (törzs), *Actinobacteria* (osztály), *Bifidobacteriales* (rend), *Bifidobacteriaceae* (család), *Bifidobacterium* (nemzetség) kimutatására volt a legalkalmasabb. A **BS** kapcsolt MagNa pure24 izoláló robot hatékonynak bizonyult a *Bacteroidetes*, *Epsilonbacteria* (törzs) a *Lachnospira*, *Anaerofilum*, *Oscillibacter*, *Oscillospira*, *Bacteroides*, *Coprobacter*, *Butyricimonas*, *Alistipes* (nemzetség) baktériumok kivonására. A konvencionális izolálási technikák (**I6**) esetében a különböző mintahomogenizáló és sejtfeltárási technikák jelentősen befolyásolták a módszer hatékonyságát a bakteriális filotipizálás tekintetében. A **BS** kapcsolt konvencionális izolálási technikák alkalmazása számtalan baktérium eredményes kivonására alkalmazható (mint például *Epsilonbacteria*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia* (törzs) *Bacillales*, *Selenomonadales*, *Erysipelotrichales*, *Bacteroidales*, *Campylobacteriales*, *Rhodospirillales*, *Aeromonadales*, *Enterobacteriales*, *Verrucomicrobiales* (rend), *Olsenella*, *Intestinimonas*, *Negativibacillus*, *Phascolarctobacterium*, *Megamonas*, *Dielma*, *Butyricimonas*, *Alistipes*, *Campylobacter*, *Helicobacter*, *Succinatimonas*, *Escherichia*, *Akkermansia*, *Faecalibacterium* (nemzetség)). A **DL** kapcsolt konvencionális izolálási technika a *Cyanobacteria* törzs kimutatására volt alkalmas. Értékeltük a különböző kereskedelmi forgalomban beszerezhető Qiagen izoláló kitek hatékonyságát is. Azt tapasztaltuk, hogy a DNS izolációs kitek alkalmazásával a *Bacteroidetes* (törzs) és *Bactroidia* (osztály) baktériumok nagy mennyiségben nyerhetők ki.

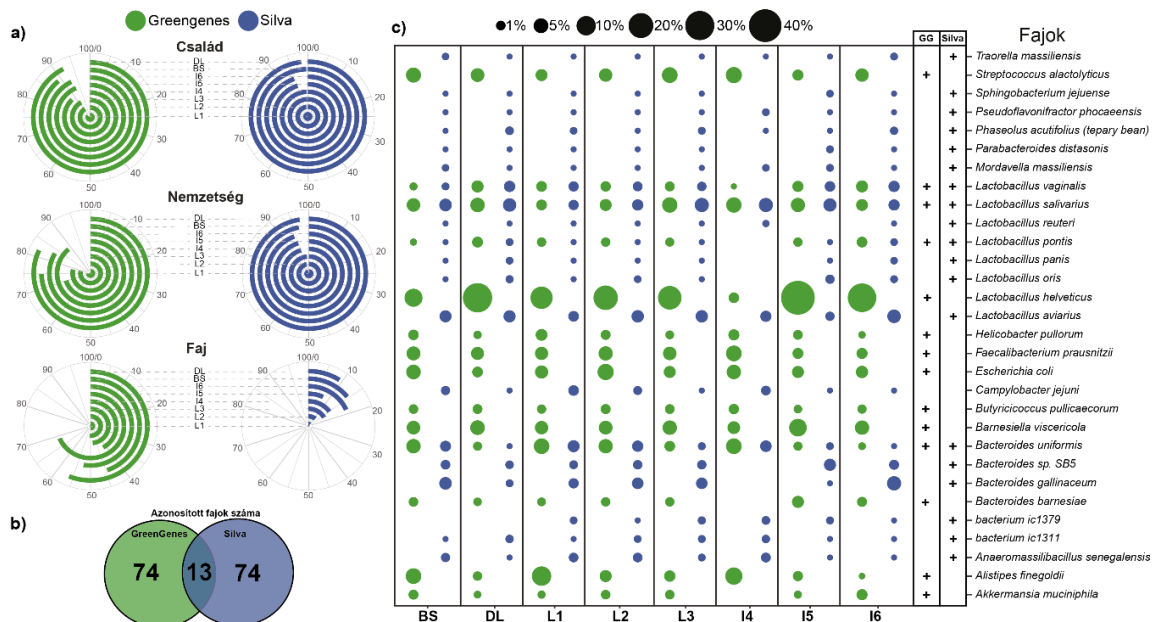


12. ábra: A különböző DNS izolálási módszerek hatása a bakteriális filotipizálásra. Eredményeink a DL (direkt lízisz) és BS (bakteriális sejtszuspenzió) kapcsolt metagenomikai DNS izolálási megközelítések közötti relatív frekvenciák logaritmus 2 hányados ($\log_2(DL/BS)$) értékeit tartalmazzák. Az egyes módszerek okozta különbségek mértékét a kompozit hőtésképen gradiens színekkel szemléltetjük. A piros szín a DL technikával homogenizált mintákhoz ($\log_2(DL/BS) > 0$), míg a kék szín a BS mintákhoz kapcsolódó taxonok dominanciáját jelenti ($\log_2(DL/BS) < 0$). Magna Pure 24 Pathogén 200 (I4.1), Pathogen 1000 (I4.2) protokoll, QIAamp DNA Stool Mini Kit (I5.1), QIAamp PowerFecal DNA Kit (I5.2), DNeasy PowerSoil Kit (I5.3) Konvencionális DNS izolálás mechanikai (I6.1), kémiai (I6.2) és vegyes (I6.3) sejteltárás.

6.1.9 A taxonómiai adatbázisok hatása a szekvenálás felbontóképességére

DNS izolálási módszerek mellett az *in silico* bioinformatikai elemzések technikai vonatkozásai is jelentős torzításokat vezethetnek be a mikrobiális konzorciumok összetételének meghatározása során. Munkánk során két referencia adatbázist a GreenGenes-t (GG) és a Silvat (S) hasonlítottuk össze (**13. ábra**) (**Kiegészítő táblázat 3**). Mindkét referencia adatbázis az olvasatok (read) több mint 99%-át sikeresen besorolta törzs, osztály és rend taxonómiai szinten. Család szinten a két adatbázis közül a Silva alkalmazásával átlagosan több olvasatot tudtunk azonosítani ($97,95 \pm 2,03\%$), mint a GreenGenes ($90,28 \pm 2,84\%$) esetében (**13/a ábra**). A különbség nemzetség szintjén jelentősebb volt, ahol a Silva adatbázis az olvasatok $95,99 \pm 1,42\%$ -át, míg a GG $78,86 \pm 5,8\%$ -át tudta azonosítani. Kíváncsiak voltunk, hogy a különböző mintahomogenizációs és DNS izoláló stratégiáknak van-e számottevő hatása az adatbázisok rangsorolási képességére (**13/a. ábra**). A **Silva adatbázis** estében a minta feldolgozásának megválasztása (BS kontra DL) nem volt szignifikáns hatással a rangsorolt olvasatainak arányára család és nemzetség taxonómiai szinten (család: BS $99,49 \pm 1,19\%$ kontra DL $98,13$, nemzetség: BS $96,69 \pm 2,95$ kontra DL $97,41$). Ellenben a faji szintű azonosítás során a BS minták ($14,42\%$) esetében az olvasatok nagyobb százalékát tudtuk sikeresen beazonosítani, mint a DL homogenizáció ($9,16\%$) esetében. Vizsgáltuk a sejtlízáló protokollok hatékonyságát is. Azt tapasztaltuk, hogy család és nemzetség szinten nincs jelentős különbség a sejtfeltáró protokollok között, ellenben faji szinten nem teljesítettek egyformán. A vegyes lízis (L3) ($16,72\%$) alkalmazásával kaptuk a legjobb eredményt a mechanikai (L1) ($10,71\%$) és kémiai lízissel (L2) ($11,48\%$) összehasonlítva. A metagenomikai DNS izoláló módszer megválasztása nem befolyásolta szignifikánsan az azonosított read számokat. A **GreenGenes adatbázis** esetében a mintahomogenizáló stratégiák számottevő különbségeket eredményeztek a beazonosított olvasatok számában. A DL homogenizált mintáknál az olvasatok nagyobb százalékát tudtuk beazonosítani, mint a BS homogenizált minták esetében (család: BS $88,81\%$, DL $92,16\%$; nemzetség: BS $74,81$, DL $81,99$; faj: BS $44,49\%$, DL $56,15\%$). Eredményeink alapján elmondható, hogy a sejtfeltárás megválasztása jelentősen befolyásolta az azonosított read-ek mennyiségét. Az általunk alkalmazott kísérletes rendszerben a mechanikai sejtfeltárással (L1) kaptuk a legrosszabb eredményt nemzetség és család taxonómiai szinten (család: mechanikai 85% , kémiai $91,5\%$, vegyes $91,6\%$; nemzetség mechanikai $74,35\%$, kémiai $78,7\%$, vegyes $78,6\%$). A faji szintű azonosítás esetében pedig a vegyes lízis (L3) teljesített a legrosszabbul (mechanikai $50,63\%$, kémiai $51,3\%$, vegyes 48%). Vizsgáltuk a különböző metagenomikai izolálási stratégiák hatékonyságát.

Eredményeink alapján elmondható, hogy a Qiagen izoláló kitek (P5) alkalmazásával értük el a legjobb eredményt minden taxonómiai szinten, utána pedig a konvencionális DNS izolálás (P6) következett. Figyelemre méltó különbségeket figyeltünk meg a két adatbázis faji szintű rangsorolási képesége között is. A Silva átlagosan a fajok $12,88 \pm 3,86\%$ -át, míg a GreenGenes $51,74 \pm 8,22\%$ -át tudta azonosítani. A rangsorolt értékek nem mutattak összefüggést az azonosított fajok számával (**13/b ábra**). A Silva és a GG is összesen 87 fajt tudtak azonosítani, ezek közül 13 olyan faj volt, amelyet mindkét adatbázis azonosított. A **13/c ábra** a két adatbázis által megtalált 30 legelterjedtebb fajt ábrázolja, amelyek közül 4 olyan fajt (*Lactobacillus vaginalis*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus pontis*, *Bacteroides uniformis*) találtunk, amelyeket mind a S, mind a GG adatbázis legnagyobb mennyiségben azonosított fajai között megtalálható. Ezen baktériumok esetében hasonló relatív frekvencia mennyiségeket kaptunk a két adatbázis esetében. A **GG** adatbázis alkalmazásával meghatározhatjuk számos mikrobiális konzorciumban fontos szerepet játszó baktérium mennyiségét, mint például a *Streptococcus alactolyticus*, a *Lactobacillus helveticus*, a *Faecalibacterium prausnitzii*, az *Escherichia coli*, a *Barnesiella viscericola*, *Butyricoccus pullicaecorum* és az *Alistipes finegoldii*. A **Silva** adatbázis alkalmazásával több *Lactobacillus* nemzetséghez tartozó fajt, mint például a *Lactobacillus reuteri*, *panis*, *oris*, *aviarius* tudtunk azonosítani, mint a GG esetében.



13. ábra: A Green Genes (zöld) és Silva (lila) adatbázisok hatása a taxonómiai besorolásra. (a) A polár ábrákon bemutatjuk az azonosított leolvások százalékos arányát család, nemzetség és faji taxonómiai szinteken. Direkt lízis (DL), Bakteriális sejtszuszpenzió (BS). Mechanikai (L1), kémiai (L2) és vegyes lízis (L3). MagNa Pure24 izoláló robot (P4), Qiagen izoláló kit és konvencionális DNS (P6) izolálási technika **b)** A két taxonómiai adatbázis által meghatározott fajok száma. **(c)** A Silva és GreenGenes adatbázisok által azonosított 30 leggyakoribb faj.

6.2 Természetes eredetű bioaktív komponensekben gazdag nutraceutikumok hatása a broiler csirkék bél-mikrobióta összetételére és diverzítására

Kísérleteink második felében a különböző természetes bioaktív komponensekben gazdag nutraceutikumok (antocianinok, szimbiotikumok, karotinoidok, fruktooligoszacharidok) hatásainak vizsgálatát végeztük el a mikrobiom összetételére és diverzítására broiler csirkében (Ross 308).

6.2.1 A nutraceutikumok hatása a madarak súlygyarapodására

Kutatásunk során vizsgáltuk a nutraceutikumok hatását a madarak növekedési teljesítményére (2. táblázat). A kísérlet kezdetén az állatok átlagos testtömeg értéke $38,4 \pm 1,6$ g volt, míg a kísérlet végére a madarak átlagosan $2693 \pm 64,8$ g súlyt érték el. Nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget a kezelt [karotinoid (KAR), fruktooligoszacharid (FOS), szimbiotikum (SZIM), antocianin (ANT)] és a kontrollcsoportok [negatív kontroll (NK), pozitív kontrol β -glükán (PK)] összehasonlításakor. Azonban a madarak produktív élettartamának végére mérsékelt, de nem szignifikáns testtömegcsökkenés figyelhető meg az antocianin tartalmú takarmánykiegészítés (ANT 2590 ± 264 g) hatására az NK csoporthoz képest (2758 ± 222 g).

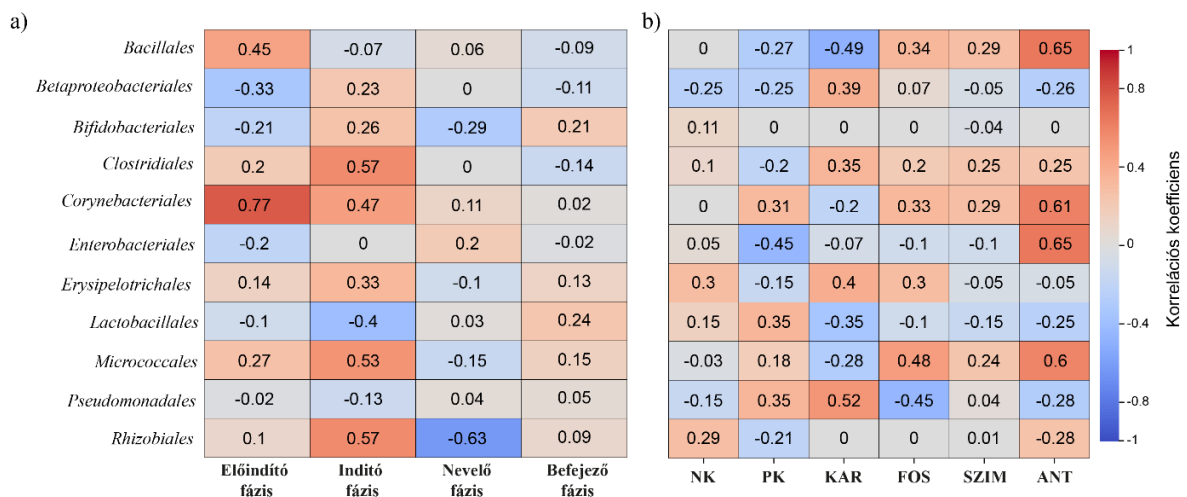
Kezelések	NK	PK	KAR	FOS	SZIM	ANT
	testsúly (g)					
1. nap	38,9 \pm 12,35	37,9 \pm 12,86	38,6 \pm 25,57	38,6 \pm 25,42	38,9 \pm 29,73	38,5 \pm 20,24
10. nap	232 \pm 23,78	226 \pm 15,79	222 \pm 39,28	222 \pm 16,21	225 \pm 25,47	227 \pm 22,24
21. nap	759 \pm 89,34	795 \pm 70,03	769 \pm 85,85	715 \pm 66,75	742 \pm 88,74	726 \pm 106,50
32. nap	1713 \pm 280	1767 \pm 231	1709 \pm 176	1735,3 \pm 233	1676,3 \pm 134	1705,3 \pm 264
42. nap	2758 \pm 222	2727 \pm 216	2748 \pm 202	2618 \pm 183	2717 \pm 253	2590 \pm 264

2. Táblázat: Madarak testsúly eloszlása. A madarak súlyát 1, 10, 21, 32 és 42 napos korban mértük. Összesen hat kísérleti csoportunk volt: **NK** (alap takarmány), **PK** (pozitív kontroll, alaptakarmány β -glükán kiegészítéssel), **KAR** (alaptakarmány karotinoid kiegészítéssel), **FOS** (alaptakarmány fruktooligoszacharid kiegészítéssel), **SZIM** (alaptakarmány szimbiotikum kiegészítéssel) és **ANT** (alaptakarmány antocianin kiegészítéssel).

6.2.2 Mikrobiom súlykorreláció

Az állatok bél-mikrobiótájában jelentős összefüggéseket figyeltünk meg a súlygyarapodással 11 rend esetében a különböző fejlődési növekedési szakaszokban (előindító, indító, nevelő, befejező) és a kezelések (NK, PK, KAR, FOS, SZIM, ANT) hatására (14. ábra).

Vizsgáltuk az életkor hatását a bélbaktériumok és a súlygyarapodás közötti összefüggésekre (14/a ábra). A broiler csirkék fejlődési stádiumának kezdetén (előindító fázis) pozitív korrelációt mutattunk ki a súlygyarapodás és a *Corynebacteriales* ($r > 0,77$) valamint *Bacillales* ($r > 0,45$) baktériumok között. Az indító fázisban (10-21 nap) figyeltük meg a legtöbb pozitív korrelációt mutató baktériumot a testsúllyal *Clostridiales* ($r > 0,57$), *Corynebacteriales* ($r > 0,47$), *Micrococcales* ($r > 0,53$), *Rhizobiales* ($r > 0,57$). Az állatok fejlődési stádiumának a végén csak gyenge pozitív korrelációt tudunk azonosítani a baktériumok és a testsúly között. Ellenben a *Rhizobiales* ($r > 0,57$) baktérium és a testsúly között negatív korrelációt figyeltünk meg az állatok növekedési fázisának a végén. Munkánk során vizsgáltuk a nutraceutikumok hatását ezen rendek és a testsúly közötti korreláció értékeire (14/b ábra). Az **NK** csoport esetében nem kaptunk jelentős összefüggéseket a baktériumok és a testsúly között. A **PK** csoport esetében pedig mérsékelt negatív (r érték $< -0,4$) korrelációt találtunk a testsúly és az *Enterobacteriales* között. A **FOS** kezelt mintáknál közepesen pozitív korrelációt figyeltünk meg a *Micrococcales* baktériumokkal. Érdekes módon a *Pseudomonadales* mérsékelt pozitív korrelációt mutatott a **KAR** csoportban és mérsékelt negatív korrelációt a **FOS** kezelt madarakban. A **KAR** csoportban *Bacillales* és a testsúly között mérsékelt negatív asszociációt mutattunk ki. Az **ANT** kezelt csoport esetében erős pozitív (r érték $> 0,6$) összefüggést találtunk a *Bacillales* ($r > 0,65$), *Corynebacteriales* ($r > 0,61$), *Enterobacteriales* ($r > 0,65$) és *Micrococcales* ($r > 0,6$) rendek és a testsúly között.

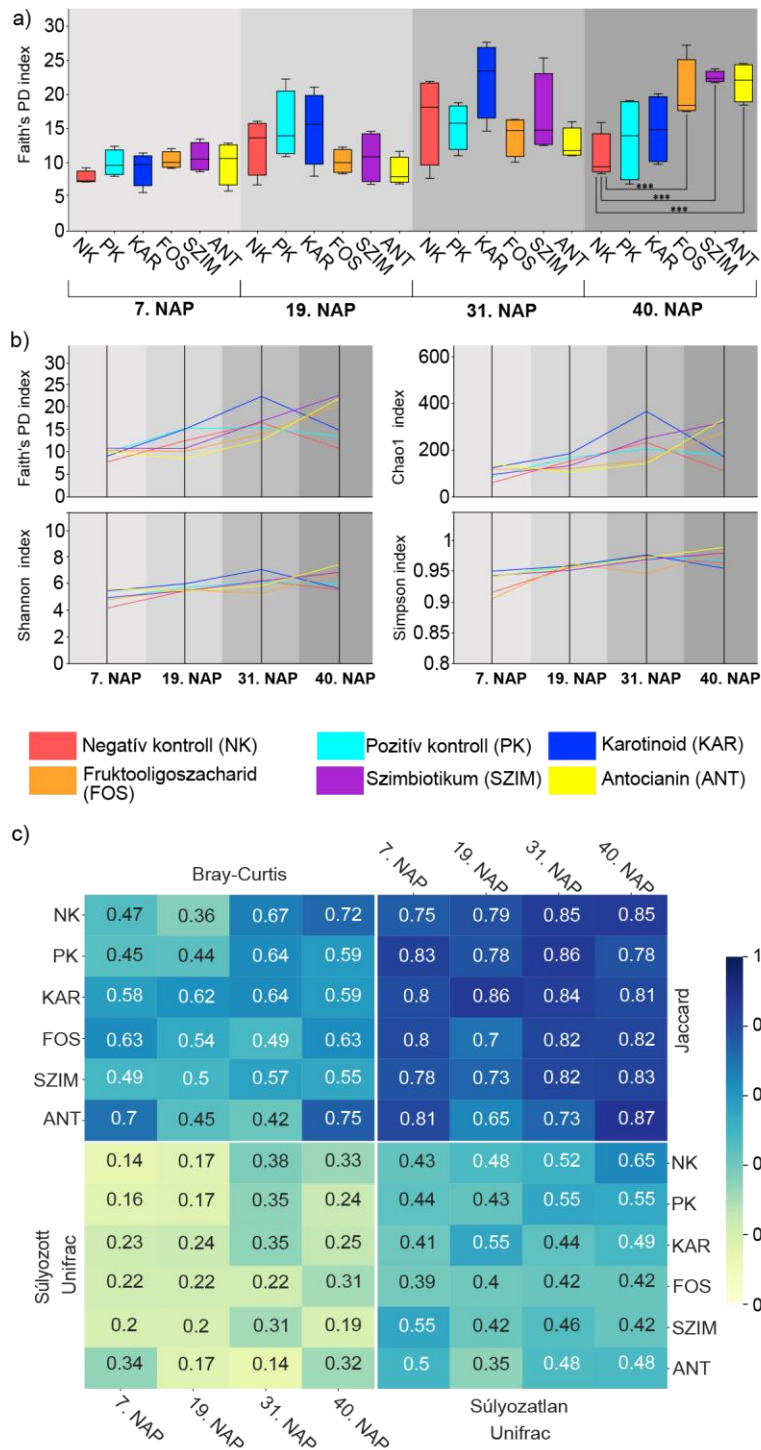


14. ábra: A nutraceutikumok és az állatok életkorának hatásai a bélbaktériumok és a testsúly közötti összefüggésekre. Spearman-korrelációkat számoltunk a mikrobióta és testsúly közötti összefüggések számszerűsítésére. Kutatásunk során külön vizsgáltuk az (a) állatok fejlődési stádiumának (előindító (1-9 nap), indító (10-21 nap), nevelő (22-31 nap), befejező fázis (32-42 nap) (b) és a különböző kezeléseknek a hatását (NK, PK, KAR, FOS, SZIM, ANT). A korrelációk értéke -1 és $+1$ között változott, a pozitív ($R \geq 0$ piros) és negatív ($R < 0$ kék). **NK** (alap takarmány), **PK** (pozitív kontrol, alaptakarmány β -glükán kiegészítéssel), **KAR** (alaptakarmány karotinoid kiegészítéssel), **FOS** (alaptakarmány fruktooligszacharid kiegészítéssel), **SZIM** (alaptakarmány szimbiotikum kiegészítéssel) és **ANT** (alaptakarmány antocianin kiegészítéssel).

6.2.3 A különböző kísérleti paraméterek (madarak életkora és nutraceutikum kezelés) és a bél-mikrobiom diverzitása közötti összefüggések vizsgálata

Meghatároztuk az egyes kísérleti beállítások – kontroll csoportok (NK, PK) és a kezelt csoportok (KAR, FOS, SZIM, ANT) – hatásait a mikrobiális diverzitási mutatókra az idő függvényében. Eredményeinket a **15. ábra** mutatja be. Az alfa diverzitás esetében a Faith filogenetikai (**15/a-b ábra**), Chao-1, Shannon és Simpson (**15/b ábra**) diverzitási indexeket alkalmaztuk a broiler csirkék GIT-mikrobióta fajszerkezetének, gazdagságának és egyenletességének meghatározására. Egy általános növekedési tendencia figyelhető meg a mikrobiális ökoszisztéma diverzitási mutatóiban egészen a madarak 31 napos koráig, ezt követően a diverzitási értékek csökkennek. Az általunk alkalmazott kísérleti rendszerben a természetes hatóanyagok pozitív hatását fedeztük fel az állatok növekedési fázisának a végén az NK csoport egyedeihez képest. Ez a pozitív hatás a Faith filogenetikai diverzitás esetében szignifikáns volt a **FOS** ($20,3 \pm 4,6$), **SZIM** ($22,5 \pm 0,8$) és **ANT** ($21,8 \pm 2,9$) kezelés hatására összehasonlítva a negatív kontroll csoportokkal (NK: $11,2 \pm 4,0$) (**15/a-b ábra**). A Shannon és Simpson diverzitási indexek esetében nem mutattunk ki szignifikáns változást a nutraceutikumok hatására az NK csoporthoz képest (**15/b ábra**). Azonban elmondható, hogy a Faith filogenetikai diverzitási mutató esetében leírt diverzitási trendek ezen diverzitási mérőszámok esetében is megfigyelhetők, szignifikáns különbség nélkül. A legnagyobb közösségi diverzitási értéket az állatok 31 napos korában a karotinoid (KAR) kezelt csoportban mértük (**15/a-b ábra**).

Kutatásunk további tárgyát képezte a különböző természetes hatóanyagok és az állatok korának hatására bekövetkező változások vizsgálata a béta diverzitási mérőszámok értékeire (**15/c ábra**). Négy béta diverzitási hőtérképet készítettünk a Bray-Curtis, Jaccard, valamint súlyozott és súlyozatlan UniFrac távolságok meghatározásával a különböző kísérleti csoportok (NK, PK, KAR, FOS, SZIM, ANT) között az állatok életkorának figyelembevételével. A távolság alapú különbségi mátrixok azt mutatták, hogy az állomány fejlődése lényeges befolyást gyakorolt az általános közösségbeli eltéréseire így a közösségek diverzitásának fokozatos növekedése a GIT-mikrobióta megnövekedett heterogenitásával járt együtt. A nutraceutikumok alkalmazásának nem volt jelentős hatása az állatok béta diverzitási értékeire. Eredményeink alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy az életkor kifejezettebb közösségi eltolódást fejtett ki, mint az étrend.



15. ábra: Különböző kísérleti paraméterek hatásának vizsgálata a diverzitási mérőszámok értékeire. (a) Faith filogenetikai diverzitás. A csillagok statisztikai szignifikanciát jelölnek $***P \leq 0,001$. A kapott értékeket átlag \pm SD alakban ábrázoltuk. **(b)** Az alfa diverzitási mérőszámok eloszlása. **(c)** A béta diverzitás (Bray-Curtis, súlyozott UniFrac, Jaccard és súlyozatlan UniFrac). **NK** (alap takarmány), **PK** (pozitív kontroll, alaptakarmány β -glükán kiegészítéssel), **KAR** (alaptakarmány karotinoid kiegészítéssel), **FOS** (alaptakarmány fruktooligoszacharid kiegészítéssel), **SZIM** (alaptakarmány szimbiotikum kiegészítéssel) és **ANT** (alaptakarmány antocianin kiegészítéssel).

6.2.4 A madarak korának és a nutraceutikum kezelések hatásása az egyensúlyi „core” mikrobiom összetételére

Kutatásunk során vizsgáltuk, hogy milyen bakteriális taxák alkotják a madarak egyensúlyi mikrobiomját és hogy a különböző kísérleti beállítások hogyan befolyásolják azok relatív mennyiségeit (16. ábra). A kiindulási GIT-mikrobióta összetétele az állatállomány dinamikus egyensúlyát tükrözi. A „core” mikrobiom összetételét rend és nemzetség taxonómiai szinteken határoztuk meg, úgy, hogy azokat a bakteriális taxonokat vettük figyelembe, amelyek az összes minta legalább 50%-ban képviseltetik magukat.

A 16 S rRNS gén alapú amplitikon szekvenálás eredménye alapján a különböző kísérleti paraméterek esetében a prokarióta doménen belüli főbb rendek és nemzetségek azonosak voltak, de a relatív mennyiségekben eltérések figyelhetők meg. Az állatok kora és a különböző természetes bioaktív komponensekben gazdag nutraceutikumok alkalmazása kifejezett különbségeket eredményeztek a „core” mikrobiomot alkotó baktériumok relatív mennyiségeiben.

Rend taxonómiai szinten az egyensúlyi mikrobiomot a *Lactobacillales* (82%±23), *Clostridiales* (9%±20), *Erysipelotrichales* (1,1%±22) és *Enterobacteriales* (6%±8,2) baktériumok alkották.

A *Lactobacillales* a „core” mikrobiom legdominánsabb mennyiségben kimutatható baktériuma volt. Az állatok hét napos korában mértük a legnagyobb relatív gyakoriságát (97,5% ± 3,3%), valamint a nutraceutikumoknak nem volt jelentős hatása a mennyiségére.

A *Clostridiales* kisebb mennyiségben volt kimutatható a β-glükán (PK: 7,4% ± 10,4%), a fruktooligoszacharid (FOS: 7,7% ± 6,0%) és az antocianin (ANT: 7,0%) kezelt állatokban, mint a negatív kontroll csoport egyedeiben (NK: 23,3% ± 40,4%) (31napos).

Az *Erysipelotrichales* a „core” mikrobiom alkotója, azonban a madarak korai életszakaszában a baktériumok kevesebb mint, 1%-át képviselte. Az állatok növekedésével mennyisége emelkedett, fejlődési ciklusuk végén (40 nap) az egyensúlyi mikrobiom 6,6%-át alkotta.

Az *Enterobacteriales* mennyisége az állatok növekedésével emelkedett, 40 napos állatokban az egyensúlyi mikrobiom 7,1%-át alkotta. Legnagyobb mennyiségét (NK: 9,2%) a kontroll alaptakarmánnyal etetett állatok bél-mikrobiomjában mértük.

Nyolc nemzetséget – *Lactobacillus* (55,7% ± 27,3%), *Enterococcus* (19,0% ± 23,8%), *Streptococcus* (7,7% ± 6%), *Escherichia-Shigella* (6,9% ± 7,9%), *Faecalibacterium* (3,5% ± 7,1%), *Turicibacter* (1,1% ± 2,5%), *Romboutsia* (1,7% ± 2,6%) és *Aerococcus* (5% ± 1,1%) – azonosítottunk az állatok egyensúlyi mikrobiomjában.

Lactobacillus egyértelmű dominanciát mutatott a kísérlet során, legmagasabb szintjét a karotinoid kezelt 31 napos állatokban (KAR: 79% ± 0,6) figyeltük meg.

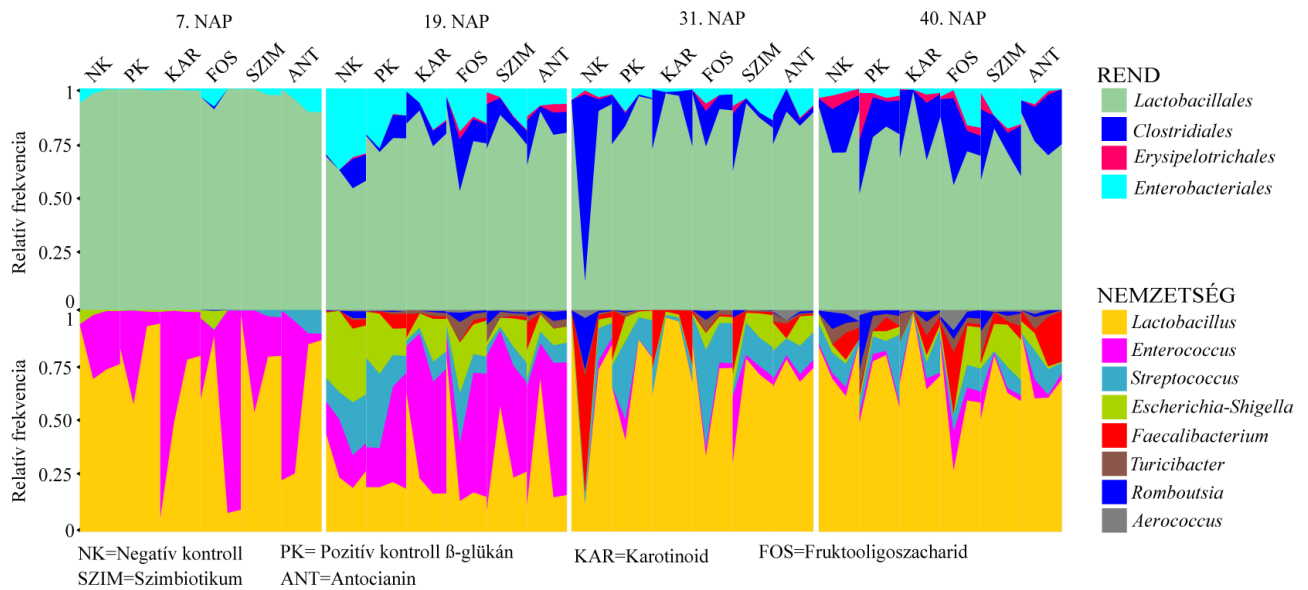
A nemzetség szintjén az állatok fejlődése fejtette ki a legkifejezettebb hatást az *Enterococcus* relatív előfordulására. Az állatok korai életszakaszában ez a nemzetség volt a második legelterjedtebb (7 napos: 34,7% ± 24,9%), míg az idősebb állatoknál drasztikus csökkenését figyeltünk meg (31 és 40 napos: 3,2% ± 4,9%). Az állatok növekedési stádiumának a végén (41 nap) a fruktooligoszacharidok növelték az *Enterococcus* relatív mennyiségét [FOS: 6,8% ± 6,4%, szemben a többi kezelési csoporttal (2,5% ± 2,2%)].

A *Streptococcus* mennyisége az állatok fejlődésével növekedett, legnagyobb mennyisége a FOS etetett állatok bél-mikrobiomjában volt kimutatható (FOS: 38,83%).

Az *Escherichia-Shigella* nagyobb mennyiségben volt kimutatható a szimbiotikum (SZIM: 12 ± 0,3) és karotinoid (KAR: 9,1 ± 0,1) hatóanyaggal dúsított takarmányt fogyasztott állatok bél-mikrobiomjában, mint a negatív kontroll csoport (NK: 2,23 ± 0,28) egyedeiben (40 napos állat).

A *Faecalibacterium* fontos szerepet játszik a bél egészségének fenntartásában. Az állatok növekedési ciklusának a vége felé (31 nap) a karotinoid (KAR: 13 ± 0,08), szimbiotikum (SZIM: 6,8 ± 0,02) és antocianin (ANT: 12 ± 0,2) csoportok esetében emelkedett mennyiségét mértük a negatív kontroll csoporthoz (NK: 3,12% ± 0,018) képest.

Turicibacter, *Romboutsia* és *Aerococcus* baktérium genusok az egyensúlyi mikrobiomot alacsony mennyiségben alkották. A nutraceutikum kezelésnek nem volt jelentős hatása a mennyiségükre.



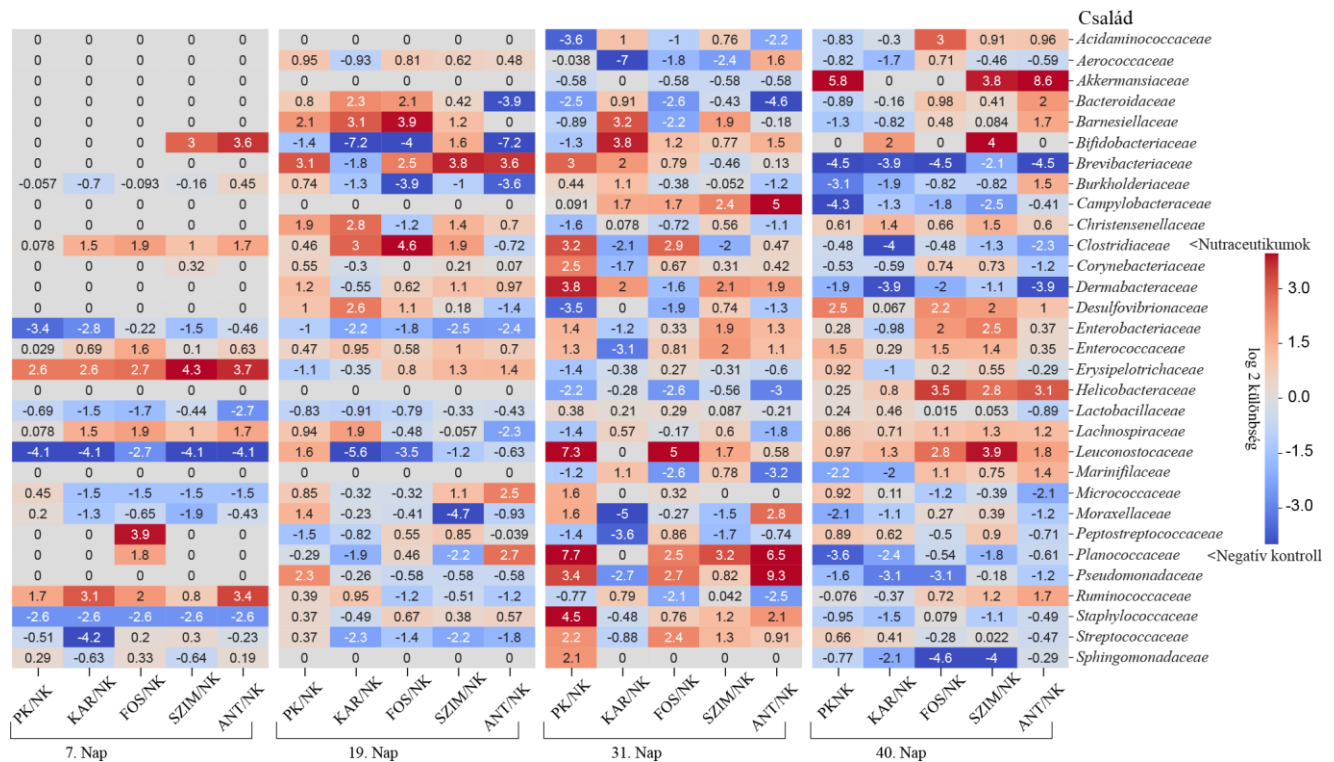
16. ábra: A különböző kísérleti paraméterek hatása a broiler csirke „core” mikrobiom összetételére. A core mikrobiomot rend és nemzetség taxonómiai szinten határoztuk meg, az állatok életkorának (7, 19, 31 és 40 nap) és a különböző kísérleti csoportok (NK, PK, KAR, FOS, SZIM és ANT) figyelembevételével. A különböző kísérleti csoportok az alábbiak voltak, **NK**: negatív kontroll (alapdiéta), **PK**: pozitív kontroll (β -glükán), **KAR**: karotinoid, **FOS**: fruktooligoszacharid, **SZIM**: szimbiotikum és **ANT**: antocianin. A bioaktív komponensekben gazdag nutraceutikumokat 0,5 %-ban adtuk az alap takarmányhoz.

6.2.5 Nutraceutikumok által okozott mikrobiális ujjenyomatok

Vizsgáltuk a nutraceutikumok hatását a bél-mikrobióta összetételére család taxonómiai szinten (**17. ábra**). A negatív kontroll (NK) és a különböző hatóanyagokkal (PK, KAR, FOS, SZIM, ANT) kezelt különböző fejlődési stádiumú madarak összehasonlításakor jelentős különbségeit sikerült feltárnunk a taxonómiai eloszlásokban.

Megfigyeltük, hogy a **karotinoidok** (KAR) pozitív hatást fejtettek ki a *Bifidobacteriaceae* (7, 31 és 40 nap), *Lachnospiraceae* (7 és 19 nap), *Ruminococcaceae* (7, 19 és 31 nap), *Erysipelotrichaceae* (7 nap), *Bacteroidaceae* (31 és 19 nap), *Barnesiellaceae* (19 és 31 nap) és *Christensenellaceae* (19 és 40 nap) baktériumok mennyiségére a negatív kontroll csoporthoz képest. A **β -glükán** (PK) kiegészítés pozitívan befolyásolta a *Ruminococcaceae* (7 nap), *Erysipelotrichaceae* (7 és 40 nap) és *Desulfovibrionaceae* (19 és 40 nap) egyedszámát. Az eredményeink azt mutatták, hogy az *Erysipelotrichaceae* (7 és 40 nap), a *Lachnospiraceae* (7 és 19 nap), a *Ruminococcaceae* (7, 19 és 31 nap) aránya nőtt, míg a *Staphylococcaceae* (a teljes növekedési fázis), *Aerococcaceae* (31 és 19, 40 nap), a *Lactobacillaceae* (7 nap) száma csökkent **fruktooligoszacharid** (FOS) kezelés hatására.

Az **antocianin** (ANT) alkalmazása növelte a *Bifidobacteriaceae* (7 és 19 nap), a *Lachnospiraceae* (7 és 40 nap), a *Ruminococcaceae* (7 és 40 nap), az *Akkermansiaceae* (40 nap) szintjét, és némi gátló hatással volt a *Helicobacteraceae* (7 nap) és *Campylobacteraceae* (40 nap) mennyiségére. A **szimbiotikumok** (SZIM) használata növelte a *Bifidobacteriaceae* (teljes produktív élettartam), a *Lachnospiraceae* (7 és 40 nap) és a *Christensenellaceae* (7 és 40 nap) egyedszámát.



17. ábra: A nutraceutikumok hatása a bél-mikrobióta összetételére. Vizsgálatainkhoz a 31 leggyakrabban előforduló családot vettük figyelembe. Az annotált hőtérkép a nutraceutikumokhoz kapcsolódó közösségi struktúrák hasonlóságait és különbségeit mutatja be család taxonómiai szinten. Eredményeink a nutraceutikumok (PK, KAR, SZIM, FOS, ANT) és a negatív kontroll csoport (NK) közötti relatív frekvenciák logaritmus 2 hányados (log₂ (PK, KAR, FOS, SZIM, ANT/NK)) értékeit tartalmazzák. Az egyes módszerek okozta különbségek mértékét a kompozit hőtérképen gradiens színekkel szemléltetjük. A piros szín a nutraceutikumok okozta dominanciát (log₂ (nutraceutikumok/NK) >0), míg a kék szín a NK csoport okozta dominanciát jelöli (log₂ (nutraceutikumok/NK) <0). **NK:** negatív kontroll (alapdiéta), **PK:** pozitív kontroll (β-glükán), **KAR:** karotinoid, **FOS:** fructooligoszacharid, **SZIM:** szimbiotikum és **ANT:** antocianin.

6.2.6 A nutraceutikumok hatása az SCFA termelő baktériumok mennyiségére

A jótékony GIT-mikrobióta által termelt metabolitok közül az SCFA-k fontos szerepet játszanak a bél egészségének fenntartásában a betegségek megelőzésében és gyógyulásában. Éppen ezért, munkánk során vizsgáltuk a különböző természetes bioaktív komponensekben gazdag hatóanyagok hatását az SCFA termelő baktériumok mennyiségi összetételére az állatok korának figyelembevételével (**18. ábra**). Ebben a kísérletben az SCFA termeléshez kapcsolódó egyes nemzetségek arányaiban szignifikáns változásokat tapasztaltunk.

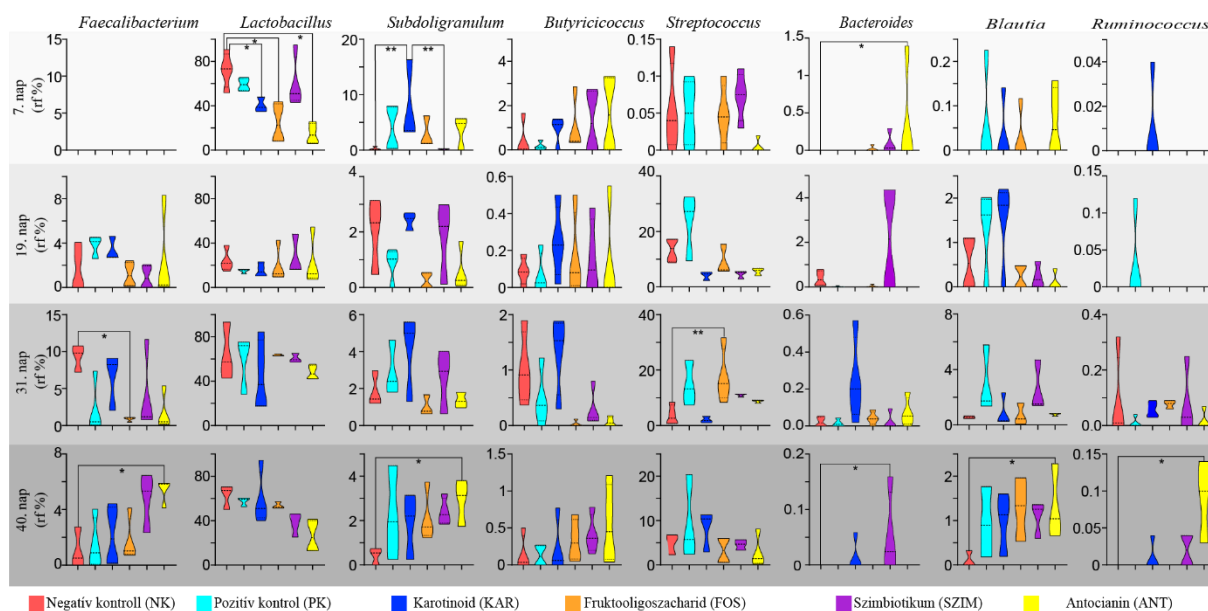
A *Faecalibacterium* nemzetség mennyiségének jelentős csökkenését ($P < 0,05$) figyeltük meg a 31 napos állatokban a fructooligoszacharid kezelés hatására negatív kontroll csoporthoz képest (FOS: $0,9\% \pm 0,3\%$, NK: $9,3\% \pm 1,8\%$). Továbbá, az antocianin kezelt csoport egyedeiben mennyisége szignifikánsan emelkedett az állatok fejlődési stádiumának a végén (40 nap) a negatív kontroll csoporthoz képest (ANT: $5,2\% \pm 1,4\%$, NK: $1,6\% \pm 0,6\%$).

A *Lactobacillus* relatív gyakoriságában bekövetkezett változások ($38,8\% \pm 24,1\%$) inkább az életkorral, semmint a nutraceutikum kezelés hatásával voltak kapcsolatosak. Az állatok 7 napos korában a *Lactobacillus* nemzetség szignifikánsan magasabb szintet mutatott az alaptakarmányon etetett (NK: $72,2\% \pm 15,9\%$) mint, a karotinoid (KAR: $31,1\% \pm 19,4\%$) fructooligoszacharid (FOS: $24,3\% \pm 18,1\%$) és antocianin (ANT: $14,7\% \pm 9,0\%$) tartalmú takarmánnyal etetett madarakban.

A *Subdoligranulum* nemzetség számottevő emelkedését figyeltük meg a karotinoid kezelést kapott (KAR: $5,8\% \pm 7,1\%$) 7 napos állatokban a negatív kontroll csoporttal (NK: $0,2\% \pm 0,3\%$) összehasonlítva. A broiler csirkék 40 napos korában további szignifikáns növekedést tapasztaltunk a *Subdoligranulum* relatív gyakoriságában az antocianin kezelés következtében (ANT: $2,8\% \pm 1,6\%$, NK: $0,8\% \pm 0,9\%$).

A madarak növekedési stádiumának a kezdetén *Streptococcus*, *Blautia* és *Ruminococcus* nemzetségek kis relatív gyakorisággal ($<0,25\%$) voltak kimutathatók a mikrobiális ökoszisztémában, szintjük az állatok fejlődésével fokozatosan emelkedett. Az állatok fejlődési stádiumának a végén (40 nap) az antocianin kezelés szignifikánsan növelte a *Blautia* (ANT: $1,3\% \pm 0,4\%$, NK: $0,1\% \pm 0,2\%$) és a *Ruminococcus* (ANT: $0,1\% \pm 0,05\%$, NK: $0\% \pm 0\%$) baktériumok relatív mennyiségeit.

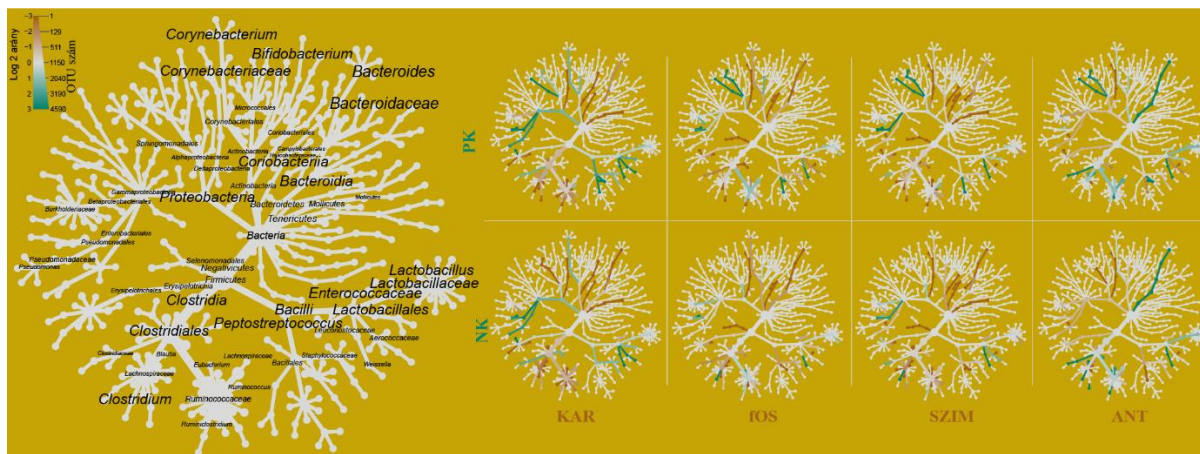
A szimbiotikumok jótékony hatást gyakoroltak a *Bacteroides* populáció mennyiségére. E nemzetség relatív arányának jelentős növekedése volt megfigyelhető az állatok 19 (SZIM: $2,2\% \pm 2,3\%$, NK: $0,1\% \pm 0,3\%$) és 41 napos (SZIM: $0,09\% \pm 0,08\%$, NK: 0%) korában.



18. ábra: Nutraceutikumok hatása a SCFA termelő baktériumok relatív mennyiségére. A *Faecalibacterium*, *Lactobacillus*, *Subdoligranulum*, *Butyricoccus*, *Streptococcus*, *Bacteroides*, *Blautia* és *Ruminococcus* SCFA termelő baktériumok relatív mennyiségeiben bekövetkező változásokat vizsgáltuk. A csillagok statisztikai szignifikanciát jelölnek: * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$. **NK**: negatív kontroll (alapdiéta), **PK**: pozitív kontroll (β -glükán), **KAR**: karotinoid, **FOS**: fructooligoszacharid, **SZIM**: szimbiotikum és **ANT**: antocianin.

6.2.7 A nutraceutikumok által előidézett különbségek a lipid anyagcserében részt vevő baktériumok mennyiségében

Kutatásunk tárgyát képezte a nutraceutikumok hatásának vizsgálata a lipid anyagcserében fontos szerepet betöltő bakteriális taxák mennyiségi összetételére. Eredményeinket a **19. ábra** szemlélteti. A *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Bacteroides* és *Peptostreptococcus* baktériumok komplex kapcsolatai által szabályozzák a primer epesó szintézist és a gazdaszervezet másodlagos epesav anyagcseréjében is szerepet játszanak. Az elsődleges és másodlagos epesav anyagcserével összefüggő nutraceutikum kezelés eredetű közösségi eltolódások vizsgálatára taxonómiai hőfákat készítettünk. A *Bacterodia* (osztály) mennyiségét jelentősen csökkentette az antocianin (ANT) kezelés, míg a karotinoid (KAR), fructooligoszacharid (FOS) és szimbiotikum (SZIM) kísérleti csoportokban szignifikánsan emelkedett mennyiségét mutattuk ki negatív kontroll (NK) és pozitív kontroll csoportokhoz képest (PK). Kimutattuk, hogy a *Lactobacilaceae* (család) relatív mennyisége csökkent az antocianin kísérleti csoport esetében a negatív kontroll csoportéhoz (NK) képest. Az *Enterococcaceae* emelkedett relatív mennyiségét figyeltük meg a nutraceutikumok hatására. Továbbá, a fructooligoszacharidok (FOS), szimbiotikumok (SZIM) és antocianinok (ANT) jelentősen csökkentették *Clostridium* relatív mennyiségét a negatív kontroll csoportéhoz (NK) képest.



19. ábra: A nutraceutikumoknak a lipid anyagcserében részt vevő bélbaktériumokra gyakorolt hatása. A „Metacoder” differenciálhőfa a mikrobiom összetételének eltéréseit szemlélteti a kísérleti csoportok között. A bal oldali taxonómiai nevekkal ellátott fa tartalmazza az összehasonlítás során vizsgált baktériumokat. Az elágazások nagysága a baktériumok relatív frekvencia mennyiségeivel korrelál. A nutraceutikumok által kifejtett hatások meghatározására az egyes kísérleti csoportok (KAR, FOS, SZIM, ANT) és a két kontroll csoport (NK, PK) log₂ különbségek mértékét alkalmaztuk. A zöld szín az NK, illetve a PK a barna pedig a természetes hatóanyagokkal (KAR, FOS, SZIM, ANT) kezelt csoportok esetében emelkedett bakteriális taxákat reprezentálja. **NK:** negatív kontroll (alapdiéta), **PK:** pozitív kontroll (β-glükán), **KAR:** karotinoid, **FOS:** fructooligoszacharid, **SZIM:** szimbiotikum és **ANT:** anthocianin.

6.2.8 A nutraceutikumok hatása a szénhidrát-anyagcserében részt vevő mikroorganizmusok mennyiségére

Vizsgáltuk a különböző kísérleti beállítások (nutraceutikumok, életkor) hatásait a mikrobiális konzorciumok, különös tekintettel a szénhidrát-anyagcserében részt vevő baktériumok összetételére. Eredményeinket a **20. ábra** mutatja be. A broiler csirkék bél-mikrobiótájában összesen 7 törzset azonosítottunk. Ezek közül a *Firmicutes* (89,5% ± 7,8%), a *Proteobacteria* (7,3% ± 7,0%) és a *Bacteroidetes* (1,3% ± 2,7%) voltak a legdominánsabbak, ezeket követték az *Actinobacteria*, *Tenericutes* és *Verrucomicrobia* baktériumok (**20/a ábra**).

Kiszámoltuk a *Firmicutes*, *Bacteroidetes* (F/B) baktérium törzsek Log₂ arányait a különböző kísérleti csoportok között (NK, PK, KAR, FOS, SZIM, ANT) az állatok életkorának (7, 19, 31 és 40. nap) figyelembevételével (**20/a ábra**). A F/B arányban mutatkozó különbségek az állományok (poli)szacharid felhasználásának változásait tükrözik. A csirkék életkorának szignifikáns (P<0,05) hatása volt a log₂ F/B arányokra. A legmagasabb értékeket az állatok 7 napos korában kaptuk (10,59), majd a log₂ F/B arányok jelentős csökkenését tapasztaltuk az állatok növekedése során [(19. nap:9,02), (31. nap:5,25), (40. nap:5,05)].

A különböző kísérleti csoportok esetében a legmagasabb log₂ F/B arány a pozitív kontroll csoportban (PK: 7,14), míg a legalacsonyabb érték az antocianin (ANT: 4,89) kezelt mintákban volt kimutatható. Továbbá, az antocianin kezelés növelte, míg a karotinoid csökkentette a *Proteobaktériumok* mennyiségét. Az *Epsilonbacteraeota*, *Tenericutes* és *Verrucomicrobia* baktérium törzsek szintén kimutathatók voltak, de nagyon alacsony relatív gyakorisággal ($\leq 1\%$) fordultak elő az állatok bél-mikrobiotájában.

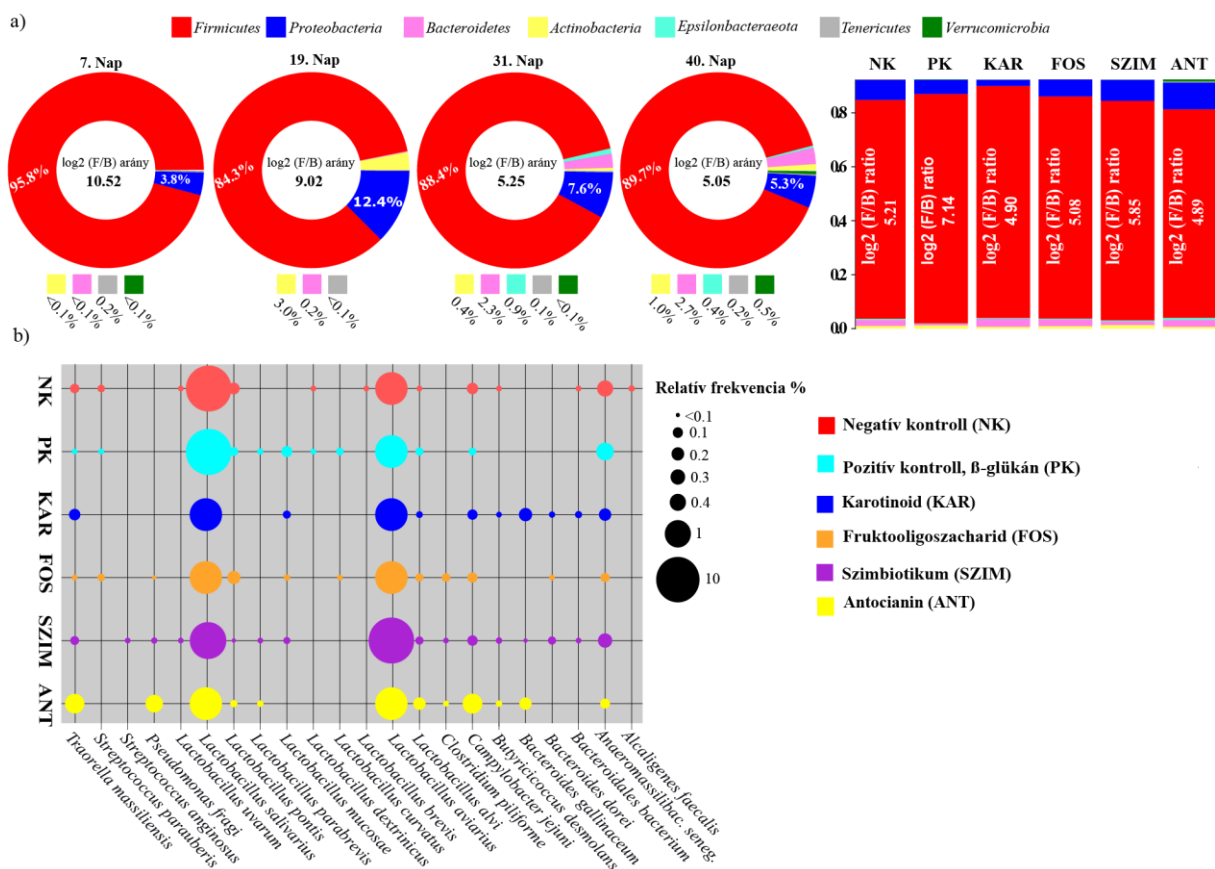
Kutatásunk során célul tűztük ki a nutraceutikumok hatásainak a vizsgálatát a mikrobiom összetételére faji szinten (**20/b ábra**). Összesen 22 fajban bekövetkező összetételbeli változásokat követtük nyomon. Munkánk során különös figyelmet fordítottuk a lipid és szénhidrát anyagcserében, valamint a különböző fertőzőes megbetegedések kialakulásáért felelős releváns fajok relatív mennyiségeiben bekövetkező változások vizsgálatára. Az általunk alkalmazott kísérleti rendszerben az alacsony relatív gyakorisággal előforduló fajokat is elemeztük.

A jótékony probiotikus hatású *Lactobacillus aviarius* és a *Lactobacillus salivarius* baktériumok minden kísérleti csoport esetében kimutathatók voltak, ezen baktériumoknak fontos szerepük van a lipid homeosztázisban és a különböző patogén baktériumok kolonizációjának kivédésében. A *L. salivarius* minden kísérleti csoportban magas relatív gyakorisággal volt kimutatható, valamint emelkedett mennyiségét figyeltük meg a β -glükán (PK: $15,2\% \pm 17,8\%$) kezelt állatokban a negatív kontroll csoporthoz (NK: $7,5\% \pm 9,2\%$) képest. A *L. aviarius* jelentős növekedését tapasztaltuk a szimbiotikum (SZIM: $14,6\% \pm 14,7\%$) és az antocianin (ANT: $6,8\% \pm 9,2\%$) kísérleti csoport egyedeinek bél-mikrobiotájában. A *Lactobacillus alvi* számottevő emelkedését figyeltük meg az antocianinnal kezelt állatok bél-mikrobiotájában (ANT: $1,1\% \pm 0,2\%$) a negatív kontroll egyedeihez képest (NK: $0,01\% \pm 0,04\%$).

A bakteriális hasmenéses gastroenteritist okozó *Campylobacter jejuni* kis relatív előfordulási gyakorisággal ($< 1\%$) volt kimutatható az állatok mikrobiális konzorciumában. Az antocianin kezelt csoport egyedeiben mutattuk ki a legnagyobb mennyiségben (ANT: $0,5\% \pm 1,6\%$, többi kezelési csoport $0,05\% \pm 0,1\%$).

Minden kísérleti csoportunkban hasonló alacsony relatív gyakorisággal ($0,1\% \pm 0,4\%$) mutattuk ki az anaerob *Anaeromassilibacillus senegalensis* baktériumot.

A bél egészségének fenntartásában fontos szerepet játszó *Bacteroides gallinaceum* csak a karotinnal (KAR: 0,1% ± 0,3%) és az antocianinnal (ANT: 0,1% ± 0,2%) etetett csirkékben volt nyomon követhető. A butirátot termelő *Butyricoccus desmolans* az összes kísérleti csoportban alacsony relatív gyakorisággal volt kimutatható (különbségek nélkül). Az újonnan leírt anaerob, nem spóráképző, zsírsav anyagcserében fontos szerepet játszó *Traorella massiliensis* nagyobb mennyiségben volt kimutatható az antociannal (ANT: 0,4% ± 0,9%) kezelt madarak bél-mikrobiotájában, mint a többi kezelési csoport (0,03% ± 0) esetében. Ezenkívül a SCFA termelő *Pseudomonas fragi* az antocianin (ANT: 0,3% ± 0,5%) kezelt állatokban volt csak megfigyelhető.



20. ábra: Az állatok életkorának és a nutraceutikumok hatásának vizsgálata a mikrobiális ökoszisztéma összetételére. Vizsgáltuk a különböző kísérleti paraméterek (kor, nutraceutikumok) hatását a mikrobiom összetételére törzs taxonómiai szinten. **(a)** Vizsgáltuk a *Firmicutes/Bacteroidetes* baktériumok log₂ arányainak (relatív frekvencia adatok alapján) eltolódását a kísérleti beállítások között. **(b)** Kutatásunk tárgyát képezte a mikrobiális ökoszisztéma releváns fajainak vizsgálata. 22 faj mennyiségi változásait követtük nyomon, a buborék mérete a relatív frekvencia mennyiséggel korrelál. **NK:** negatív kontroll (alapdiéta), **PK:** pozitív kontroll (β-glükán), **KAR:** karotinoid, **FOS:** fruktooligoszacharid, **SZIM:** szymbiotikum és **ANT:** antocianin.

6.2.9 Diéta specifikus mikrobiális interakciók

Vizsgáltuk, hogy melyek, azok a baktériumok, amelyek a különböző kísérleti beállítás hatására együtt változnak korrelálnak egymással (**21. és 22. ábra**). Spearman korrelációt számoltunk a családok relatív frekvenciája között a különböző kísérleti beállítások figyelembevételével. Különböző mennyiségi mintázattokat azonosítottunk a 15 leggyakrabban előforduló család esetében a nutraceutikum kezelt csoportokban (KAR, FOS, SZIM, ANT) az állatok különböző fejlődési stádiumában (7, 19, 31 és 40 napos) (**21. ábra**). Általánosságban elmondható, hogy a karotinoid, szimbiotikum kezelt és a fructooligoszacharid, antocianin kezelt csoportok között hasonló korrelációs mintázatok mutatkoztak.

Összefüggéseket kerestünk a családok között az állatok különböző életkorának figyelembevételével. Ennek eredményeként, 13 statisztikailag szignifikáns pozitív (**7. nap: 5; 31. nap: 2; 40. nap: 6**) és 15 negatív (**7. nap: 4, 19. nap: 2, 31. nap: 1, 40. nap: 8**) asszociációt találtunk a kísérlet során (**22/a ábra**).

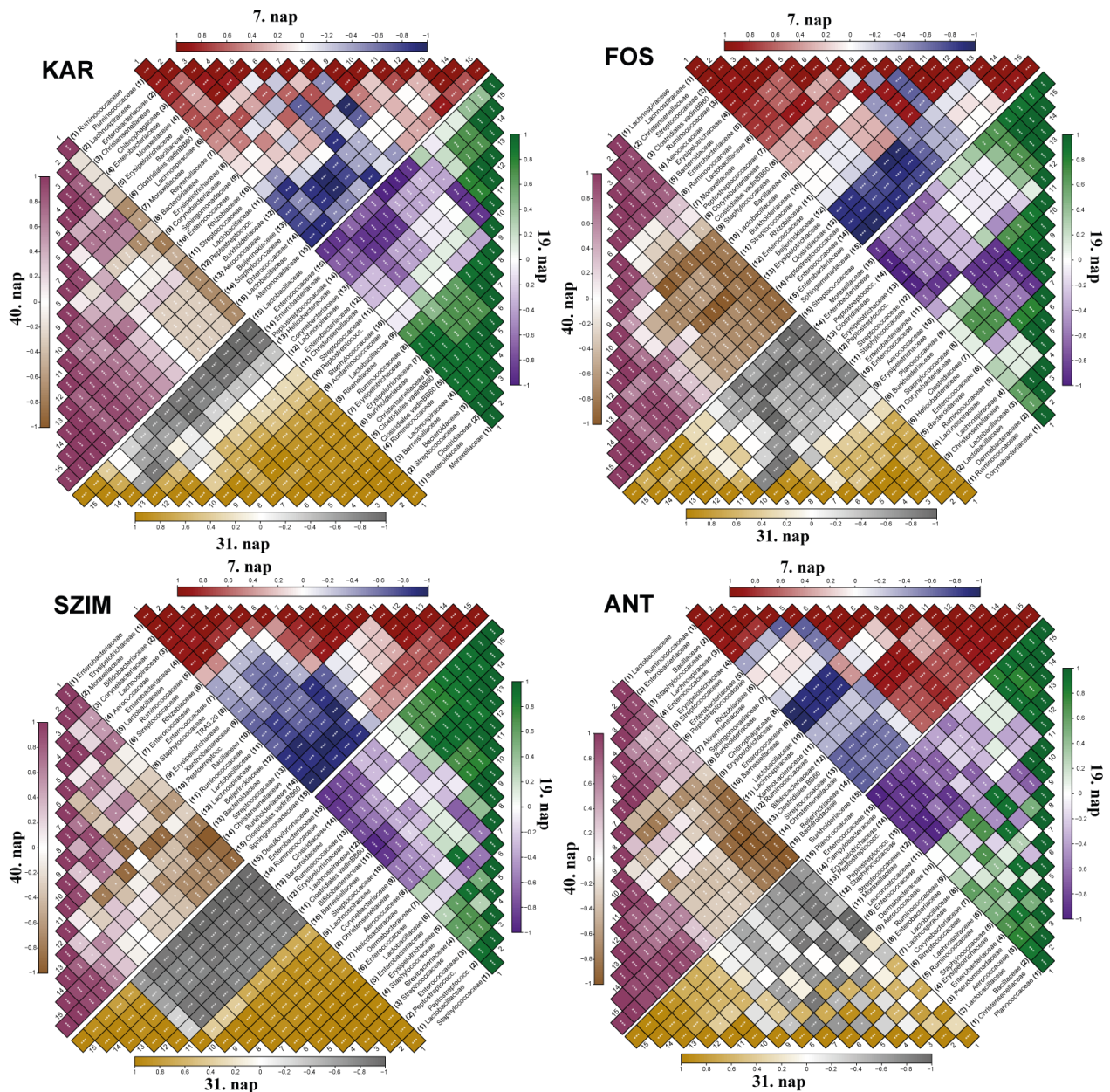
A nutraceutikumok hatását is vizsgáltuk a családok közötti összefüggésekre (**22/b ábra**). Az **antocianinnal** (ANT) kezelt minták mutatták messze a legtöbb egyedi családi egyezést (8 pozitív és 6 negatív korreláció). A *Desulfovibrionaceae* nagyon erős negatív korrelációt mutatott a *Lactobacillaceae* (r-érték: -0,97), a *Streptococcaceae* (r-érték: -0,97) és a *Peptostreptococcaceae* (r-érték: -0,97) baktériumokkal az ANT kezelt mintákban. Ezzel párhuzamosan a *Desulfovibrionaceae* család nagyon erős korrelációt mutatott a *Bacteroidaceae* (r: 0,97), a *Barnesiellaceae* (r: 0,97), a *Clostridiaceae* (r-érték: 0,97), az *Erysipelotrichaceae* (r-érték: 0,97) és a *Ruminococcaceae* (r: 0,97) baktériumokkal.

A **szimbiotikumok** hatására erős negatív összefüggést találtunk a *Sphingomonadaceae* és a *Streptococcaceae* között (r: -1).

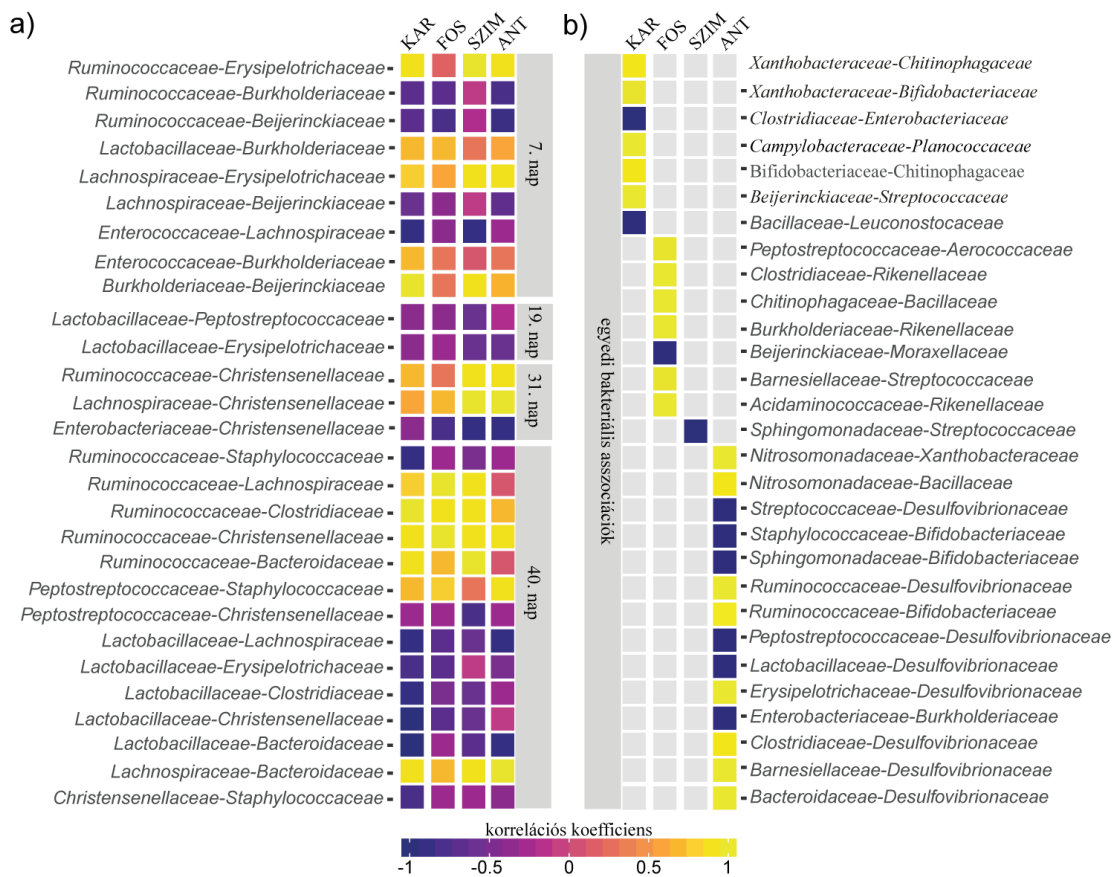
A **fructooligoszacharid** (FOS) kiegészített takarmány hatására nagyon erős negatív kapcsolatot fedeztünk fel a *Moraxellaceae* és a *Beijerinckiaceae* között (r: -0,97).

Továbbá, a **FOS** etetett állatokban nagyon erős pozitív összefüggést mutattunk ki a *Rikenellaceae* és a *Clostridiales* (r: 0,97), a *Rikenellaceae* és a *Burkholderiaceae* (r: 0,97), valamint a *Acidaminococcaceae* (r érték: 0,97) a *Streptococcaceae* és a *Barnesiellaceae* (r: 0,97), a *Aerococcaceae* és a *Peptostreptococcaceae* (r: 1), valamint a *Chitinophagaceae* és a *Bacillaceae* (r: 0,97) baktériumok között.

A **karotinoid** kezelt csoportra jellemző ujjlenyomat nagyon erős pozitív korrelációt mutatott a *Xanthobacteraceae* és *Chitinophagaceae* ($r: 0,91$), *Xanthobacteraceae* és *Bifidobacteriaceae* ($r: 1$), valamint *Beijerinckiaceae* és *Streptococcaceae* között ($r: 0,97$). Ezenkívül, a *Bifidobacteriaceae* család erős pozitív kapcsolatot mutatott a *Chitinophagaceae*-vel KAR kezelt madarakban ($r: 0,91$).



21. ábra Az állatok életkorának és a különböző nutraceutikumok alkalmazásának jelentős hatása volt a tápcsatorna mikrobiom alkotók közötti összefüggések kialakulására. Spearman korrelációt végeztünk a GIT-mikrobióta tagjai közötti kapcsolatok feltárására a különböző nutraceutikumok és az állatok életkorának figyelembevételével. A színintenzitások a korrelációs együtthatók értékeit jelzik, vagyis a családok közötti asszociációk erősségét. Az értékek -1 és $+1$ között változnak, jelezve a pozitív ($r > 0$) és negatív ($r < 0$) korrelációk erősségét. (a) Családok közötti asszociációk vizsgálata a nutraceutikumok és az életkor figyelembevételével. **KAR**: karotinoid, **FOS**: fructooligoszacharid, **SZIM**: szimbiotikum és **ANT**: antocianin.



22. ábra A tápsatorna mikrobiom alkotók közötti összefüggések vizsgálata. Spearman korrelációt számoltunk az értékek -1 és $+1$ között változnak, pozitív ($r > 0$) és negatív ($r < 0$). **(a)** Családok közötti asszociációk a nutraceutikumok és életkor esetében. **(b)** Egyedi, nutraceutikum specifikus egyezések amelyek erős korrelációt mutatnak a családok között. **KAR**: karotinoid, **FOS**: fructooligoszacharid, **SZIM**: szimbiotikum és **ANT**: antocianin.

7. Megbeszélés

Az elmúlt néhány évben a mikrobiom kutatások drámai módon átalakították az emberi, állati és növényi biológiával kapcsolatos eddigi ismereteinket (2). A gazda asszociált mikrobiális közösségek szerepet játszanak különféle gazdaszervezetek működésének szinte minden területén. Következésképpen óriási elvárásokat támasztottak az új klinikai, mezőgazdasági, állattenyésztési és biotechnológiai alkalmazások kifejlesztésével szemben (7).

A mikrobiom kutatás fontossága az eddigi ismereteink alapján megkérdőjelezhetetlen, a különböző molekuláris biológiai technikák fejlődése és alkalmazása várhatóan egyre közelebb visz minket a funkciójának és működésének megértéséhez. Jelenleg a tudományos érdeklődés középpontjában olyan terápiás stratégiák kidolgozása áll amelyek az állati és emberi bél-mikrobiomot alkotó egyes mikrobákat célozzák meg, ami által az egyensúlyi mikrobiom helyreállítható, illetve fentartható (82, 180–182). A jövőben a mikrobiom kutatások izgalmas perspektívákat kínálnak mind az állattenyésztési alkalmazások mind a különböző humán patológiás folyamatok (például cukorbetegség, magasvérnyomás, gyulladásoz bélbetegség) kezelésének kifejlesztésében.

7.1 A 16 S rRNS gén alapú ampikon szekvenálás eredményét torzító technikai tényezők vizsgálatának áttekintése

NGS használatával lehetőségünk nyílik arra, hogy információt kapjunk a klasszikus mikrobiológiai tenyésztéssel nem vizsgálható mikroorganizmusokról és azok tulajdonságairól (5). Azonban a kísérletünk végeredményét számos egymást követő módszer összessége határozza meg, a mintázatot alapvetően befolyásolja a DNS izolálásának módja, a sejtfeltárás hatékonysága, az izolátumok tisztasága és mennyisége (183). Különösen fontos ezt figyelembe venni olyan vizsgálatok során, ahol különböző faktorok (táplálkozás, kor, stressz) hatását vizsgáljuk a mikrobiom összetételére (49).

A széklet mikrobiális összetételének meghatározása esetében alapvető fontosságú a különböző DNS izoláló protokollok optimalizálása az eltérő sejtfallösszetétellel, membránszerkezettel és különböző mennyiségben lévő mikrobák teljes vagy a valódi összetételhez nagyon hasonló kinyeréséhez. A mikrobiális sejtek DNS kinyerésének folyamata a minta homogenizálását, a sejtlízist és magát a DNS extrakciót foglalja magába (73).

Mindezek figyelembevételével a jelen dolgozat alapjául szolgáló kísérletek első felében a különböző metagenomikai DNS izoláló protokollok paramétereit értékeltük és hasonlítottuk össze néhány módszertani szempontra összpontosítva, beleértve a mintahomogenizálást, sejtlízist és a DNS izolálást. Meghatároztuk ezen módszerek hatásait a 16 S rRNS gén amplikon szekvenálás eredményére (szekvenálási és diverzitási mutatók, mikrobiom összetétele). Kutatásunk során összehasonlítottuk a GreenGenes és a Silva taxonómiai adatbázisok hatásait a 16 S rRNS gén amplikon szekvenálás felbontóképeségére.

A szakirodalom a mai napig újabb és újabb DNS izolálási módszereket ismertet, amelyek eltérő tisztaságú és mennyiségű DNS kinyerését teszik lehetővé (67). A mikrobiális közösségek felmérésének különböző DNS izoláló módszerei eltérő eredményeket hozhatnak létre, ami megnehezíti a hasznos következtetések levonását a különböző tanulmányok között. A DNS extrakciós módszerek helyes kiválasztása során több szempontot is figyelembe kell venni, mint például a DNS hozamot, tisztaságot, töredezettséget, a PCR inhibitorok jelenlétét, a reprodukálhatóságot és hogy mennyire reprezentatív képes kinyerni a mikrobák DNS-ét az adott mintából (6).

Kutatásunk tárgyát képezte a különböző technikai torzító tényezők hatásainak vizsgálata az izolátumok DNS koncentrációjára, tisztaságára, fragmentációjára és a PCR reakciók hatékonyságára. **Eredményeink alapján elmondható, hogy a mintahomogenizáló stratégia megválasztásának jelentős hatása van az izolátumok DNS koncentrációjára és minőségi paramétereire. A Direkt lízis (DL) 1,5 X nagyobb DNS kihozattal eredményezett, mint az indirekt mintahomogenizáló stratégia (BS) alkalmazása. Azonban fontos megjegyezni, hogy a DL mintahomogenizálás esetében alacsony tisztaságú DNS izolátumokat kaptunk.** A széklet összetett biológiai minta. A számtalan mikroorganizmus és makroorganizmus mellett glikánokat, epesókat és különböző komplex poliszacharidokat is tartalmaz. Mindezek a vegyületek kötődhetnek nukleinsavakhoz a DNS-kivonási folyamat során, és csökkentik az extrahált DNS hozamát és tisztaságát. A fehérjékkel, poliszacharidokkal, sókkal vagy fémekkel szennyezett DNS akadályozhatja a későbbi elemzéseket, például a polimeráz láncreakció (PCR) amplifikációját és/vagy a DNS könyvtár készítését (79, 80). Éppen ezért a DNS tisztaság fontos vizsgálati szempont a különböző DNS izolálási technikák hatékonyságának összehasonlítása során.

A Qiagen kitek alkalmazása esetében alacsony DNS koncentrációkat figyeltünk meg, ellenben a DNS minősége ezzel a módszerrel bizonyult a legjobbnak. A MagNa Pure 24 izoláló robot alkalmazása során magas DNS koncentrációt és minőségi paramétereket tapasztaltunk. Korábbi tanulmányok eredményeivel összehangban, a konvencionális fenol-kloroform-izoamilakohol izolálási módszer eredményezte a legnagyobb DNS koncentrációt ($P < 0,0001$) (6). Fontos megjegyeznünk azonban, hogy a konvencionális DNS izolálási technika alkalmazása esetében alacsony DNS minőségi paramétereket kaptunk a többi módszerrel összehasonlítva. Eredményeink alapján érdemes kiemelni, hogy a DNS minőségi paramétereire az előzetes minta homogenizálásnak van a legjelentősebb hatása, különösen a konvencionális DNS izolálás esetében.

A bélsár mintákból kinyert DNS minőségét és mennyiségét a sejtlízis hatékonysága mellett a mintában található PCR inhibitorok koextrakciója, valamint a lízis hatására fellépő DNS töredezettsége is alapvetően befolyásolja. Az eltérő módszerek, minta homogenizálás, sejtfeltárás és DNS izolálás eltérő mennyiségű PCR inhibitor komponens eredményeznek a mintákban (76). A PCR inhibitorok a könyvtárkészítés során alkalmazott PCR reakciókat gátolhatják ezáltal hatásuk van a mikrobiális összetétel meghatározására (184). **Kutatásunk során a DNS mennyiségének ellentétes hatásait figyeltük meg a PCR amplifikáció sikerességi arányára. A könyvtárkészítés során alkalmazott amplitikon PCR az összes minta 16,6%-ban volt sikertelen, amelyek 87,5%-a konvencionális izolálás során nyert mintákból származtatható.** Ennek oka részben a PCR-inhibitorok és nukleázok magasabb koncentrációja lehet a konvencionális izolálással kinyert mintákban, mint a többi módszer esetében. **Fontosnak tartjuk megjegyezni, hogy a sikertelen PCR a konvencionális izolálás esetében a DL minta homogenizációval társított mintákban volt jelentősen megfigyelhető (70 %).** Hatékony megoldás lehet ezen minták mágneses gyöngy alapú újra tisztítása, azonban ebben az esetben számolnunk kell a DNS veszteséggel is.

A metagenomikai vizsgálatoknál az egyik legnagyobb technikai kihívást a kiváló minőségű, nagy molekulású (HMW, high molecular weight) bakteriális genomi DNS hatékony kivonása jelenti, főleg olyan mikrobiális fajokat hordozó állati, humán vagy környezeti eredetű mintából, ahol csak korlátozott mennyiség áll rendelkezésünkre (71). **Kutatásunk során nem figyeltünk meg jelentős különbségeket a DNS töredezettségében a különböző DNS izolációs módszerek összehasonlítása során.**

A prokarióta sejtek DNS kinyerését nagymértékben befolyásolja a sejtfeltárás hatékonysága. A széklet mintában Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumok egyaránt megtalálhatóak. A Gram-pozitív baktériumokból vastag peptidoglikán sejtfa miatt rosszabb hatékonysággal nyerhető ki a DNS (64). Ennek eredményeként egy gyengébb lízis alkalmazása során, ezek a fajok az eredeti összetételhez képest alulreprezentálva jelennek meg (73). A szakirodalom a mechanikai lízist javasolja a Gram-pozitív baktériumok feltárására. A mechanikai lízis nagyobb mennyiségű DNS kinyerését teszi lehetővé. Azonban egyes kutatások alapján ez a technika az izolált DNS töredezettségét növeli, ami a későbbi PCR reakciók során kimérák képződéséhez vezet (73). **Ezen megfigyelések ellentétben állnak saját eredményeinkkel, miszerint a mechanikai lízis alkalmazása nem eredményezett számottevő DNS töredezettséget. Megállapítottuk továbbá, hogy a különböző sejtfeltáró technikák között nincs szignifikáns különbség a DNS koncentrációja és tisztasága tekintetében. Azonban fontos megjegyezni, hogy a mechanikai és kémiai lízisek kombinációja eredményezte a legnagyobb DNS koncentrációt. A nagyobb DNS koncentráció pedig magasabb alfa diverzitási értékekkel társult összehasonlítva a többi sejtfeltáró technikával.** Ezen megfigyelésünk ellentétben áll azon kutatások eredményeivel, ahol a magasabb DNS koncentráció ellentétes hatását írták le az alfa diverzitási mutatók értékeire (6). Feltételezzük, hogy azokban az esetekben a magasabb DNS koncentráció magasabb PCR inhibitor jelenlétét eredményezte az izolátumokban, ami gátolta a 16 S rRNS gén alapú ampikon könyvtárkészítés hatékonyságát és ezáltal torzító hatása volt a szekvenálás eredményére.

Munkánk során értékeltük az InhibitEx tablettá hatékonyságát, ami a mintában található PCR inhibitor komponenseket hivatott eltávolítani a DNS izolálás során. **Eredményeink alapján a sejtfeltárás során alkalmazott InhibitEx tablettá alkalmazása kedvezően befolyásolta a DNS tisztaságot, amelyek összességében pozitív hatást gyakorolt a PCR reakciók sikeres végbemenetelére. Azonban ezzel a módszerrel alacsony mennyiségű DNS-t nyertünk ki. Továbbá az inhibitEx tablettá alkalmazása során alacsonyabb Shannon diverzitási értékeket figyeltünk meg a többi módszerhez képest.** Feltételezzük, hogy a tablettához a nukleinsavak abszorbeálódtak ezáltal csökkent a DNS kinyerésének hatékonysága. A sejtekből nem felszabaduló DNS pedig nem járul hozzá a diverzitás végső elemzéséhez, ami nagy valószínűséggel torzítja a mikrobiális diverzitás összetételének meghatározását.

Az izolációs technikák Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumok eloszlására kifejtett hatásának vizsgálatakor megállapítottuk, hogy a DL minta homogenizálás a Gram-pozitív baktériumtörzsek felülreprezentációját eredményezte a BS-hez képest ($P < 0,001$).

Ezek a különbségek valószínűleg összefüggésben állnak azzal, hogy a Gram-pozitív baktériumok (például, *Enterococcus*, *Staphylococcus*) különböző felszíni struktúrákhoz erősen kötődnek, amely baktériumok bakteriális sejtszuszpenzió készítése során a mosási lépésben elveszhetnek. Bizonyos megfigyelések szerint a Gram-pozitív baktériumok alacsony relatív előfordulási gyakorisága a bakteriális diverzitás jelentős csökkenését eredményezi (185–187). Ezen megfigyelések ellentétben állnak eredményeinkkel, miszerint a BS magasabb diverzitási mutatókat eredményezett, mint a DL mintahomogenizáció alkalmazása. Fontos megjegyezni továbbá, hogy a BS mechanikai lízis esetében kiegyensúlyozott Gram-pozitív (52%) és Gram-negatív (48%) arányokat eredményezett.

Úgy gondoljuk, hogy a bakteriális sejtek feltárására a legjobb megközelítés az olyan módszerek alkalmazása, amelyek a lehető legmagasabb DNS hozamot és minőséget eredményezik anélkül, hogy a módszer bizonyos bakteriális taxák javára tolódna el. A BS homogenizálás standardizálható eljárás, a sejtek száma könnyen megbecsülhető, így az eredmények könnyebben összehasonlíthatók, ezáltal elősegítik a több paraméteres konzorcium vizsgálatokat.

A DNS hozamot gyakran használják kritériumként a mikrobiális közösségekből történő genomi DNS izolálására az egyes DNS izoláló módszerek hatékonyságának értékelésére (69, 78, 188). A mikrobiális diverzitás reprezentációját azonban, amely gyakran a közösségi elemzés fő célja, általában nem tekintik a DNS kivonási módszerek értékelési kritériumának (6). A DNS hatékony kinyerése lényeges lépés a mikrobiális diverzitás jellemzésére szolgáló valamennyi tenyésztéstől független megközelítésben (6). Annak megállapítására, hogy a magasabb DNS-hozam biztosítja-e a mikrobiális diverzitás jobb reprezentációját fontos a különböző metagenomikai DNS izoláló protokollok hatékonyságának vizsgálata az alfa diverzitási mutatók tekintetében (6). Vizsgálataink tárgyát képezte a különböző technikai torzító tényezők hatásainak vizsgálata az alfa diverzitási és szekvenálási mutatók értékeire. **A kapott eredményeink alapján elmondható, hogy a minta homogenizáló stratégiák közül a bakteriális sejtszuszpenzió készítésével érhető el a legnagyobb faj gazdagság és a szekvenálási mutatók tekintetében is jól teljesített. A BS mintákon kémiai vagy vegyes lízist követően végzett konvencionális DNS izolálás eredményezte a legnagyobb alfa diverzitási értékeket az alkalmazott DNS extrakciós módszerek közül.** Ez azzal magyarázható, hogy a vegyes lízissel a vastag peptidoglikán sejtfallal rendelkező Gram-pozitív baktériumok is feltárhatók.

Úgy gondoljuk, hogy a vegyes lízis alkalmazása lehetővé teszi a székletben található poliszacharidok lebontását, ami a DNS nagyon jó felszabadulását eredményezi. Továbbá, a konvencionális izolálás során nagy mennyiségű DNS nyerhető ki, amely reprezentatívabban tartalmazza az adott mikrobiomot alkotó egyes fajokat (72, 75). Az alacsony egyedszámban előforduló baktériumok nagyobb valószínűséggel vonhatók ki a mikrobiális mintákból ezzel az izolációs technikával. Eredményeink ellentétben állnak azon megfigyelésekkel, ahol arról számoltak be, hogy a konvencionális izolálásnál tapasztalt magasabb DNS koncentráció ellentétes hatást fejtett ki a diverzitási mutatók értékeivel (6). **Eredményeink alapján elmondható, hogy az automatizált DNS izoláló robot magas read számot és diverzitási értékeket eredményezett homogenizálási stratégiától függetlenül. A MagNa Pure 24 automatizált DNS izoláló robot Pathogen 200 protokolljával magasabb diverzitási értékeket kaptunk, mint a Pathogen 1000 protokoll alkalmazása esetében. A kereskedelmi forgalomban beszerezhető izoláló kitek a szekvenálási mutatók tekintetében jól teljesítettek, azonban a többi izolációs technikával összehasonlítva alacsonyabb diverzitási értékeket eredményeztek, amely megfigyelésünk összefüggésben áll korábbi tanulmányok eredményeivel (70). Összességben elmondható, hogy a DNS izoláló módszerek hatékonyságát nagyban befolyásolja az előzetes mintahomogenizáló stratégia. Az indirekt módszerrel (Bakteriális sejtszuszpenzió készítése) kapcsolt DNS izolálások magasabb diverzitási és szekvenálási mutatókat eredményeztek a direkt lízishez képest. Az izolálások közül a konvencionális izolálás bizonyult a legjobbnak, azonban fontos megjegyezni, hogy ez az izolálás csak BS mintahomogenizálás esetében alkalmas diverzitási mutatók vizsgálatára.**

A béta diverzitás megmutatja a különböző környezetből származó mikrobiális közösségek közötti különbséget (137). A csoportok minél homogénebbek (azaz nagyobb az elemeik hasonlósága), és minél nagyobb közöttük a különbség, annál pontosabbnak mondható a klaszteranalízis maga. A csoportosítás alapját különböző távolság- vagy hasonlóságmértékek képezik. A fő hangsúly a különböző minták taxonómiai bőségprofiljainak különbségén van. Vizsgáltuk a különböző DNS izolálási technikák hatását a bakteriális béta diverzitási mutatók értékeire. **Eredményeink alapján elmondható, hogy mind a homogenizáció mind a sejtfeltárás (mechanikai, vegyes) és a DNS izolálás is jelentős különbségeket eredményezett a béta diverzitási mutatók értékeiben.**

Mivel a széklet minták rendkívül diverzek jelentősen különböznek egymástól ezért a különböző minta homogenizálási technikák optimalizálása is alapvető fontosságú.

Az általunk alkalmazott kísérleti rendszerben kétféle minta homogenizációs stratégia a BS és a DL hatékonyságát hasonlítottuk össze. Eredményeink egyértelműen azt mutatják, hogy a mintahomogenizációs stratégiák jelentős hatást gyakorolnak a közösségi taxonómia profilokra. Figyelemre méltó különbségeket tapasztaltunk a Gram-pozitív *Lactobacillaceae* (DL: 52%, BS: 19%), *Ruminococcaceae* (BS: 20%, DL: 12%), *Enterobacteriaceae* (BS: 5%, DL: 1,4%) és Gram-negatív *Bacteroidacea* (BS: 14%, DL: 6%), *Prevotellaceae* (BS: 2%, DL: <0,1%) baktériumok relatív frekvencia mennyiségeiben a DL és BS minta homogenizáció összehasonlítása során.

A különböző DNS izolálási technikák eltérő mennyiségű és minőségű DNS izolátumokat eredményezhetnek, valamint az izolált DNS eltérő mértékben reprodukálható a különböző módszerek által és jelentős mennyiségű szennyeződés is része lehet a mintának, amelyek gátolhatják a PCR reakciókat könyvtárkészítés során. Továbbá, a kettős szálú DNS fizikailag törékeny és emellett nagyon érzékeny a különböző exo- és endonukleázokra, amelyek aktív formái jelen vannak a környezetben, és széleskörben megtalálhatóak a vizsgált minták többségének mátrixában. Ezért fontos a DNS izolálási protokollba beépíteni a nukleázok inaktiválását, denaturáló kelátképző szerek alkalmazásával (2). Ezenkívül, a széklet különféle PCR inhibitorokat tartalmaz, amelyek közül néhány jelentősen gátolhatja a 16 S rRNS-amplikonok előállításához használt PCR reakciókat. Ezeknek a gátló anyagoknak a természete a székletmintákban változó, és a kitalapú DNS izolálási módszerekkel mennyiségük csökkenthető (5). Jelenleg számos kereskedelmi forgalomban beszerezhető DNS izoláló kit kapható, ami nagy tisztaságú és reprodukálható DNS izolátumot eredményez, viszont ezen izoláló kitek kihozatala alacsony (67). A kisebb DNS mennyiség miatt az eredmények torzulhatnak, ami a mikrobiális konzorciumban a kis egyedszámban jelenlévő fajok azonosítását nehezíti meg (4). **Ezt alátámasztja azon megfigyelésünk, hogy az izolációs kitek alkalmazásával magas tisztaságú de alacsony DNS koncentrációjú izolátumokat kaptunk. Továbbá, ezen mintákban a többi izoláláshoz képest alacsonyabb diverzitási paramétereket figyeltünk meg. Érdekes továbbá, hogy ezzel a technikával az olvasatok 95,04%-át család, 94,74%-át pedig nemzetség szintjén sikeresen azonosítottuk.** Úgy gondoljuk, hogy az olvasatok magas azonosítási arányának és az alacsony diverzitási mutatók értékeinek háttérében az állhat, hogy ezen izolációs technikával csak a dominánsan előforduló taxákat nyerjük ki, viszont a közösség szempontjából releváns, fontos szereppel bíró alacsony mennyiségben előforduló fajok kisebb hatékonysággal vagy egyáltalán nem mutathatók ki.

Ezen feltételezésünket alátámasztja azon megfigyelésünk, hogy a jótékony bélflóra egyensúlyának fenntartásában fontos szerepet játszó alacsony mennyiségben előforduló *Akkermansia* és *Faecalibacterium* nem mutathatók ki ezen izolációs technológia alkalmazásával. Eredményeink alapján elmondható továbbá, hogy a kit alapú módszerekkel érhető el a legkonzisztensebb eredmény. Ez akkor fontos, ha a vizsgálat célja a környezet, kezelés vagy időskálák közötti különbségek nyomon követése. Azonban, ha a cél az összes élőlény teljes katalogizálása, vagy az élőlények relatív mennyiségének biztos ismerete a mintában, eredményeink arra utalnak, hogy a kit alapú DNS izolálási módszerek adják a legrosszabb eredményt a jelen dolgozatban tesztelt módszerek közül.

Tudomásunk szerint ez volt az első eset, amikor a Roche MagNA Pure 24 DNS-tisztító rendszert metagenomikai célokra alkalmazták. Eredményeink alapján összességben elmondható, hogy az automatikus DNS izoláló robot esetében a mikrobiális mintákból nagy mennyiségű jó minőségű DNS nyerhető ki a minta homogenizációs stratégiától függetlenül. A Pathogen 200 és Pathogen 1000 protokollok között nem figyeltünk meg releváns különbséget sem az izolátumok DNS koncentrációjában, minőségében sem a mikrobiális minták összetételében. A Pathogen 200 protokoll magasabb diverzitási értékeket eredményezett, mint a Pathogen 1000 protokoll, azonban a különbség nem volt szignifikáns. A módszer alkalmazásának előnyét növeli, hogy standardizálható és a manuális izolálás során bevezetett torzítások kiküszöbölhetőek. Az izoláló robot széles körű használatát gátolja a magas anyagköltsége.

Munkánk során összehasonlítottuk a GreenGenes és Silva taxonómiai adatbázisok hatását a felbontóképésre. Megállapítottuk, hogy mindkét adatbázis az olvasatok több mint 99 %-át azonosította törzs, osztály és rend taxonómiai szinteken. Család és nemzetség szinten a Silva referencia adatbázis alkalmazása az olvasatok nagyobb százalékát azonosította, mint a GreenGenes (család S:97,95%, GG:90,28), (nemzetség S:95,99%, GG:78,86). A faji szintű azonosítás tekintetében pedig a GreenGenes jobban teljesített, az olvasatok 51,74%-át míg a Silva 12,88%-át tudta azonosítani. Fontos megjegyezni, hogy az alacsony faji szintű azonosítás háttérében az állhat, hogy a különböző bakteriális fajok között a 16 S rRNS gén V3-V4 variábilis régiói között nagyfokú a hasonlóság, ami megnehezíti a faji szintű azonosítást.

Jelenleg számos kutatás a költséghatékony konvencionális fenol-kloroform DNS izoláló módszert alkalmazza mikrobiális sejtek DNS tartalmának kinyerésére (4, 58, 67, 75).

A konvencionális DNS izolálással nagy mennyiségű DNS nyerhető ki, amely reprezentatívan tartalmazza a mikrobiomot alkotó alacsony mennyiségben és dominánsan előforduló tagjait is. **Ezt alátámasztja azon eredményünk, hogy ezzel az izolálással érhető el a legnagyobb bakteriális diverzitási érték. Továbbá, a béllóra releváns kis mennyiségben jelen lévő baktériumai is kimutathatók, mint például a *Phascolarctobacterium*, *Akkermansia*, *Butyricimonas*, *Faecalibacterium*. A módszer hátránya, hogy alacsony minőségi paramétereket eredményezett, ami gátolja a későbbi PCR reakciók sikeres végbemenetelét, különösen a DL mintahomogenizáció esetében.**

A technikai vizsgálatok eredményeként megfogalmazódott egy olyan DNS izolálási stratégia, amellyel a nutraceutikumok broiler csirke bél-mikrobiom összetételére kifejtett hatását a legoptimálisabban tudjuk vizsgálni. A módszerek kiválasztása során alapvető szempont volt, hogy az adott módszer mennyire reprezentatívan tartalmazza az adott mikrobiomot alkotó egyes fajokat. Egy olyan eljárás optimalizálása volt a cél, amely a bél-mikrobiomot alacsony egyedszámban alkotó baktériumait, mint például a *Phascolarctobacterium*, *Akkermansia*, *Butyricimonas*, *Faecalibacterium* is detektálja a mikrobiális mintákból. Ezen baktériumok a bél-mikrobiomban számos jótékony a gazdaszervezet szempontjából előnyös folyamatokat látnak el (például, SCFA és vitamin szintézis). A DNS izolálási módszerek kiválasztása során értékeltük azok hatását a DNS izolátumok minőségi és mennyiségi paramétereire, továbbá vizsgáltuk a költséghatékonyságukat. Fontos értékelési szempont volt a különböző DNS izolálási stratégiák esetében a mikrobiális diverzitás és szekvenálási mutatók értékeiben tapasztalt különbségek összehasonlítása. Mindezen tényezők figyelembevételével, a homogenizálási stratégiák közül a bakteriális sejtszuszpenziót választottuk ki, mivel nagyobb diverzitást eredményezett, mint a DL és standardizálható eljárás. A sejtfeltáró technikák közül a mechanikai lízist alkalmaztuk. Ezzel a technikával nagy mennyiségű és jó minőségű DNS nyerhető ki és magas mikrobiális diverzitási értékeket eredményezett. Továbbá költségeket tekintve olcsóbb, mint a kémiai és mechanikai lízisek kombinációja.

Az izolációs technikák közül a konvencionális fenol-kloroform-izoamilalkohol izolálásra esett a választásunk. A konvencionális izolálás költséghatékony eljárás nagy mennyiségű DNS eredményezett, ami magas bakteriális diverzitással társult. Továbbá a bél-mikrobiomot dominánsan és kis mennyiségben alkotó baktériumai egyaránt hatékonyan kimutathatók ezen izolációs technika alkalmazása esetén.

Jelen kutatás eredményei rávilágítanak arra, hogy a széklet DNS kivonási módszerek optimalizálása alapvető fontosságú a pontos mikrobiális összetétel meghatározása során. Kutatásunk jelentőségét az adja, hogy az általunk alkalmazott kísérleti rendszer más állatok esetében is alkalmazható és a humán bél-mikrobióta összetételét célzó vizsgálatokra is átültethető.

7.2 Természetes bioaktív komponensekben gazdag nutraceutikumok hatásainak áttekintése broiler csirke bél-mikrobiom összetételére és diverzitására

Az elmúlt két évtized során a baromfi ipar az egyik leghatékonyabb fehérjetermelő ágazattá vált (142). A modern csirke hibridek, mint például a ROSS 308 broiler csirke extrém gyorsan növekednek, az átlagos nevelési időszak 35-42 nap, ami alatt a 2,5-3 kg-os súlynövekedést is elérnek (143). Ez az extrém növekedés azonban számos patológias folyamat kialakulását eredményezi az állatokban, mint például magas vérnyomást, szívelégtelenséget, inzulinrezisztenciát. A broiler csirkék a különböző fertőzőes megbetegedésekre is fokozottan érzékenyek, részben az intenzív növekedésükkel összefüggésbehozható csökkent immunstátuszuk miatt, részben amiatt, hogy az intenzív nagyüzemi állattartás során sok állatot tartanak viszonylag kis helyen (15). Ezen fertőző betegségek kezelésére rutinszerűen antibiotikumot kapnak az állatok (18).

Az antibiotikum terápia alkalmazása azonban számos nemkívánatos következménnyel járhat, mint például a bél-mikrobióta egyensúlyának megbomlásával, valamint az antibiotikum rezisztens baktériumok megjelenésével (150).

A fentebb taglalt tényezőket figyelembe véve kiemelt jelentőséggel bír a nagyüzemi állattartás során fellépő tartástechnológiából eredő negatív hatások minimalizálása és az antibiotikumokat helyettesítő lehetőségek kidolgozása. Igény mutatkozik olyan bioaktív komponensekben gazdag természetes hatóanyagok előállítására és vizsgálatára, amelyek számos jótékony élettani (antioxidáns, antibakteriális) hatással bírnak, ezáltal elősegítik a bél-mikrobióta egyensúlyának és normális funkciójának helyreállítását.

Az utóbbi években rohamosan nő azon tudományos közlemények száma, amelyek a nutraceutikumok élettani hatásival foglalkoznak. Egyre több bizonyíték áll rendelkezésre arra vonatkozóan, hogy ezen komplex bioaktív vegyületekben gazdag növényi kivonatok antibakteriális tulajdonságúak és pozitív hatást fejtenek ki a bél-mikrobiom összetételére (19).

Kutatásaink második felében érdeklődésünk középpontjában a különböző bioaktív komponensekben gazdag nutraceutikumok – karotinoid, fruktooligoszacharid, szimbiotikum és antocianin – hatásainak vizsgálata állt a bél-mikrobiom összetételére, diverzitására Ross 308 broiler csirke modell állatban.

Az általunk vizsgált hatóanyagokat a Debreceni Egyetem kutatói állították elő, élelmiszeripari melléktermékekből, amelyek feldolgozása nagyrészt megoldatlan és drága. Ezen melléktermékek nagy mennyiségű, igen értékes, biológiailag fontos aktív komponenseket (karotinoidok, antocianinok, FOS) tartalmaznak, amelyek számtalan jótékony élettani (immunrendszert erősítő, antioxidáns, antibakteriális, antiallergén, rákellenes stb.) hatást fejtenek ki a szervezetre. Ezen hatóanyagok egy részét az állati szervezet nem képes előállítani, tehát a táplálékkal együtt kell, hogy felvegyék.

Emberi és állati mikrobiom vizsgálatok bebizonyították, hogy a bél-mikrobióta nagyon fontos szerepet játszik a tápanyagok felszívódásában (8, 189–198). Az állatok növekedési teljesítménye függ a bél-mikrobiom összetételétől és diverzitásától (199). Így működésének megértése az egyes baktériumok pontos funkciójának felderítése segíthet annak tisztázásában, hogy az összetételében bekövetkezett változások hogyan befolyásolhatják az energiaanyagcserét és a növekedési teljesítményt a gazdaszervezetben (199).

Számos kutatás alapján feltételeztük, hogy a nutraceutikumok, különösen a szimbiotikumok alkalmazása fokozza az állatok testtömegnövekedését (200, 201). **Ezen feltételezésünket eredményeink nem támasztották alá, a nutraceutikum kezelésnek nem volt pozitív hatása az állatok tömeg gyarapodására.** Ennek a különbségnek hátterében a különböző környezeti tényezők (elhelyezés, tartástechnológia, alaptakarmány összetételének különbségei), a gazdaszervezet eltérő genetikája és életkorra is állhat (200). Fontos megjegyezni, hogy célunk nem az állatok növekedési ütemének fokozása volt, hanem olyan takarmányadalékanyagok előállítása, ami javítja az álltalanos egészségi állapotukat a bél-mikrobióta modulációja által. **Érdemes azonban megemlíteni, hogy a broiler csirkék növekedési fázisának a végén mérsékelt testtömegcsökkenés figyelhető meg az antocianin tartalmú takarmány kiegészítést kapott állatokban a kontroll csoporthoz képest.**

Az antocianin testtömegre kifejtett negatív hatását megfigyelték eddig humán, sertés és egér vizsgálatokban is (202, 203). Noha eddig kevés információnk van arra vonatkozóan, hogy az antocianin milyen molekuláris mechanizmusok által fejt ki ezen hatását, úgy gondoljuk, hogy

a bél-mikrobiom összetételében olyan módosulások következhetnek be, amelyek mind a lipid anyagcserére mind a tápanyagok felszívódásának mértékére hatással lehetnek.

A bél-mikrobiomban a *Firmicutes* törzs mennyiségének emelkedése a tápanyagok felszívódásának fokozódásával jár együtt, míg a *Bacteroidetes* törzs mennyiségének növekedése csökkent tápanyag-felszívódást eredményez (204). A *F/B* törzsek arányának meghatározásával információt kapunk a tápanyagok felszívódásának mértékéről, az *F/B* arányban mutatkozó különbségek az állomány poliszacharid felhasználásainak különbségeit is tükrözik. A *Bacteroidetes* törzs tagjai a keményítő és a glükán lebontásban vesznek első sorban részt (199). A *F/B* törzsek arányának növekedése esetében fokozott súlygyarapodás figyelhető meg a gazdaszervezetben, amivel párhuzamosan az adipociták száma a koleszterin, a triglicerid és az LDL mennyisége is emelkedik (205). A *F/B* törzsek arányának emelkedését megfigyelték magas vérnyomás és cukorbetegségben szenvedők esetében is (205). Jelenleg azonban nincsen arra vonatkozóan információnk, hogy a bél-mikrobióta változásai vezethetnek az elhízáshoz, vagy a súlygyarapodás következményeként változik a bél-mikrobióta összetétele (177). **Kutatásunk során meghatároztuk a Ross 308 broiler csirkék bél-mikrobiom összetételét. Más kutatások eredményeivel összehangban a *Firmicutes* volt a legnagyobb mennyiségben kimutatható törzs, amit a *Proteobacteria*, *Bacteroides*, *Actinobacteria*, *Tenericutes* és *Verrucomicrobia* baktériumok követtek (206). Eredményeink alapján elmondható, hogy az állatok életkorának jelentős hatása volt a *F/B* arányára. Legmagasabb értékét az állatok 7 napos korábban mértük majd jelentős csökkenését tapasztaltuk az állatok növekedése fejlődése során. Noha a β -glükán kezelési csoport esetében mértük a legmagasabb *F/B* arányt, ezzel ellentétben nem figyeltük meg az állatok fokozott súlynövekedését a kontroll csoporttal összehasonlítva. A legalacsonyabb *F/B* arányt pedig az antocianin adalékanyagot tartalmazó takarmányt fogyasztott állatokban mértük. Eredményeink alapján felmerül, hogy az antocianin kezelt csoport esetében megfigyelt mérsékelt súlycsökkenés és alacsony *F/B* arányok között összefüggés van.**

Az *Akkermansia* egy mucin lebontó baktérium, mennyiségének emelkedése a bélrendszer egészségével függ össze, mivel szelekciós nyomást fejt ki azon baktériumokra, amelyek nem tudnak megtapadni a nyálkahártya felszínén. Fontos butirát és propionát termelő baktérium, számának csökkenését a tápcsatorna mikrobiomban leírták már elhízás, gyulladós bélbetegség, 2-es típusú cukorbetegség kapcsán (207). Szerepet játszik a bélhám integritásának fenntartásában is (208). Mindezek mellett az *Akkermansia* mennyiségének emelkedése és a zsigeri zsírlerakódás így a testtömeg között negatív korrelációt figyeltek meg (208).

Eredményeink alapján elmondható, hogy a β -glükán, szimbiotikum és antocianin kezelések jelentősen növelték az *Akkermansiaceae* mennyiségét a csirke bél-mikrobiomban a kontroll csoporttal összehasonlítva. Eredményeink feltételezik továbbá, hogy a β -glükán, szimbiotikum és az antocianin kezelésnek pozitív hatása van a bélhám integritásának fenntartásában a bél gyulladási folyamatok kialakulásának gátlásában azáltal, hogy növelik a jótékony *Akkermansiaceae* mennyiségét a csirkék bél-mikrobiomjában.

Kimutattuk, hogy az antocianin kezelés jelentősen csökkentette a *Bacteroides* mennyiségét. A *Bacteroides* mennyiségének csökkenésével párhuzamosan csökken a dekonjugált epesavak mennyisége is, aminek hatása van a gazdaszervezet lipid metabolizmusára is (209, 210).

Az eddigi szakirodalmi adatok alapján a *Corynebacteriaceae* mennyiségének emelkedése összefüggésbe hozható emelkedett triglicerid szinttel aminek következménye lehet a jelentős súlygyarapodás is (211). **Eredményeink alapján elmondható, hogy a *Corynebacteriaceae* mennyisége jelentősen alacsonyabb volt az antocianin kezelést kapott, mint a kontroll alaptakarmányt kapott csoport egyedeiben.**

Kimutattuk, hogy a bioaktív komponensekben gazdag nutraceutikumok hatására a jótékony bél-hám integritásának fenntartásában szerepet játszó *Bacillales*, *Rhizobiales*, *Corynebacteriales* baktériumok és a testsúly között pozitív korrelációk figyelhetők meg. **Megállapítottuk továbbá, hogy *Lactobacillales* negatívan befolyásolta a súlygyarapodást, ami tökéletes összhangban van a korábbi tanulmányok eredményeivel (109, 212).** Ezen eredményünk összefüggésben állhat azzal, hogy a *Lactobacillus* szabályozza a primer epesó szintézist és a másodlagos epesav képződését, ezáltal hatása van a lipid metabolizmusra (109, 212). **Érdekes továbbá, hogy a tápanyagok hatékonyabb felszívódását eredményező *Bacteroidaceae* és *Barnesiellaceae* taxák (213) számának jelentős emelkedését figyeltük meg az antocianin kezelési csoportban.**

Feltételezhető, hogy a baromfik különböző anyagcsere betegségeinek kialakulásában a GIT-mikrobióta összetételében kialakuló változások döntő szerepet játszanak. A mikrobiom diverzitása az egyik legfontosabb tényező a behatoló korokozókkal szembeni rezisztencia kialakulásában. A mikrobiális közösség nagyobb diverzitása egészségesebb gazdaszervezetet eredményez, míg komplexitásának jelentős csökkenése különféle betegségekkel és a korokozók fokozott kolonizációra való hajlamával társul (214, 215).

A GIT-mikrobiom elmozdulása a jótékony, hasznos baktériumok felé javíthatja a gazdaszervezet egészségi állapotát (214, 215).

Munkánk során vizsgáltuk a különböző természetes bioaktív komponensekben gazdag hatóanyagok hatását a mikrobiális közösségek komplexitására az állatok életkorának figyelembevételével. **Jelentős különbségeket figyeltünk meg a GIT mikrobiom diverzitásában a különböző kísérleti csoportok között.** Korábbi kutatások kimutatták, hogy a csirkék növekedésével, fejlődésével a mikrobiom egyre diverzebbé komplexebbé válik (216). Eredményeink összhangban vannak ezen korábbi eredményekkel. **Egy általános növekedési tendencia figyelhető meg az alfa diverzitási mutatók értékeiben egészen az állatok 31 napos koráig, azonban életciklusuk végén a diverzitási mutatók értékei csökkennek.** Ez összefüggésbe hozható a madarak egészségi állapotának romlásával és a bél-mikrobiom diszbiózis kialakulásával. **A természetes hatóanyagok pozitív hatását mutattuk ki az alfa diverzitási mutatók értékeire az állatok növekedési stádiumának a végén.** Eredményeink alapján elmondható, hogy a fruktooligoszacharid, szimbiotikum és az antocianin kezelt csoport egyedeiben jelentősen magasabb Faith's filogenetikai diverzitási értékeket mértünk, mint a kontroll csoport esetében. A fruktooligoszacharid és a szimbiotikum kezelés esetében kapott eredményeink összhangban vannak korábbi kutatások eredményeivel (217). Továbbá fontos megjegyezni, hogy tudomásunk szerint ez volt az első eset, amikor az antocianinok hatását vizsgálták a broiler tápcsatorna mikrobiom diverzitására. Jelenleg kevés tudományos publikáció áll rendelkezésre, arra vonatkozóan, hogy az antocianinok hogyan befolyásolják a bél-mikrobiom összetételét diverzitását.

Érdemes kiemelni, hogy a nutraceutikumok a broiler csirkék produktív élettartamának végén fejtették ki hatásukat, amikor a bél mikrobiális diverzitása csökkenni kezdett. Ez arra utalhat, hogy az általunk vizsgált nutraceutikumok kevésbé befolyásolják a változatosabb, komplex, eubiotikus bél-mikrobiomot. A bél-mikrobiom összetételének kiegyensúlyozatlansága a diverzitás jelentős csökkenése gyakran a jótékony baktériumok részhalmozásának eliminációjához vezet, miközben a patogén baktériumok mennyisége megnő.

A broiler csirkékben a bél-mikrobiom diverzitásának jelentős csökkenése, a patogén *Clostridium perfringens* baktérium fokozott kolonizációját eredményezi, ami súlyos krónikus nekrotikus bélgyulladást okoz a csirkékben (9, 151, 218).

Eredményeink alapján úgy gondoljuk, hogy a nutraceutikumok ígéretes megoldást nyújthatnak a diszbiotikus mikrobiom helyreállítására a bél-mikrobiom diverzitásának fokozásával, ez által gátolják a kóros folyamatok kialakulását a gazdaszervezetben.

Az egészséget elősegítő probiotikus baktériumok képesek a gazdaszervezet számára emészthetetlen szénhidrátokat és fehérjéket fermentálni, és tejsavvá, valamint rövid láncú zsírsavakká (SCFA) átalakítani. Az SCFA-k kiemelkedő szerepet játszanak a gazdaszervezetben, például energiaforrást biztosítanak az izmoknak, szabályozzák a lipid- és szénhidrátanyagcserét, helyi és szisztémás gyulladáscsökkentő hatást fejtenek ki, valamint bél hámsejtek növekedését és differenciálódását is aktiválják. Az acetátot és propionátot elsősorban a *Bacteroidetes*, míg a butirátot a *Firmicutes* törzs tagjai termelik. A SCFA-k termelődése hatására a bélben olyan körülmények jönnek létre, ami a jótékony bélhám integritásának fenntartásában fontos szerepet játszó baktériumok kolonizációjának kedvez, míg a káros patogén baktériumok túlzott elszaporodását gátolja (103). Az SCFA-termelő baktériumok közvetlenül fokozhatják egyes tápanyagok felszívódását, és így közvetlen hatást fejtenek ki az anyagcsere metabolizmusra is (103).

Mivel az eddigi tudományos eredmények arra utalnak, hogy a nutraceutikumok hatékonyan növelik a különböző SCFA termelő baktériumok mennyiségét (107, 163, 164), munkánk során a nutraceutikumok SCFA termelő baktériumok mennyiségére kifejtett hatását is górcső alá vettük. **Eredményeink alapján elmondható, hogy mind a bioaktív komponensekben gazdag természetes hatóanyagoknak, mind az állatok életkorának is jelentős hatása volt az SCFA termelő baktériumok relatív mennyiségére.**

A *Faecalibacterium* az egyik fő butirát termelő baktérium, mennyiségének csökkenését, illetve hiányát megfigyelték eddig gyulladással, cukorbetegségben, és magas vérnyomásban. Az általa termelt metabolitok fontos energiaforrásként szolgálnak az enterocitáknak és a bél lumen pH csökkentése által gátolja a patogén kórokozók megtelepedését. Mennyiségének vizsgálata biomarkerként szolgálhat a bél egészségi állapotának meghatározására (219). **Kutatásunk során azt tapasztaltuk, hogy a madarak korai élet stádiumában (7 nap) *Faecalibacterium* egyetlen kísérleti csoport esetében sem volt kimutatható a bél-mikrobiomban. Az állatok fejlődésével mennyisége emelkedett egészen az állatok 31 napos koráig, majd ezt követően számuk csökkenő tendenciát mutatott.**

Ami tökéletes összhangban van a mikrobiális diverzitás csökkenő tendenciájával. Úgy gondoljuk, hogy a csirkék bél-mikrobiális diverzitásának és a *Faecalibacterium* számának csökkenő tendenciája között összefüggés van. **Eredményeink alapján elmondható, hogy az antocianin pozitív hatását figyeltük meg a *Faecalibacterium* mennyiségére a kontroll csoport egyedeihez képest az állatok fejlődési stádiumának a végén.**

A butirát termelő *Subdoligranulum* mennyisége pozitívan korrelál a mikrobiális gazdagsággal és a HDL-koleszterinszinttel, valamint a zsírtömeggel. Továbbá, a zsírsejtek átmérőjével, a leptin-, inzulin-, CRP- és IL6-szintekkel pedig negatív összefüggéseket figyeltek meg. *Subdoligranulum* baktérium pozitív hatást fejt ki a bélhám sejtekre, ezenfelül gátolja a patogén baktériumok kolonizációját (182). **Az általunk alkalmazott kísérleti rendszerben az antocianin és karotinoid kezelés hatékonyan növelte a *Subdoligranulum* mennyiségét a többi csoporthoz képest. Legnagyobb relatív mennyiségét a karotinoid kezelt csoport egyedeiben mértük.**

Megállapítottuk, hogy a jótékony *Bifidobacteriaceae* mennyiségére a szimbiotikum és karotinoid kezelésnek pozitív hatása volt.

A szintén jótékony butirát termelő *Ruminococcaceae* család tagjai az antocianin és szimbiotikum kezelések hatására nagyobb számban voltak kimutathatók a csirkék bél-mikrobiomjában, mint a kontroll csoport egyedeiben.

Ezen eredményeink azért fontosak, mivel a butirát a bélhámsejtek fő energiaforrása elősegíti a bél-epiteliális sejteinek differenciálódását (207). Továbbá, ezen baktériumok mennyisége a bél egészségi állapotával korrelál. Feltételezéseink szerint ezen eredményeink összefüggésbe hozhatók az epiteliális bélgát funkciójának javulásával.

A *Ruminococcus* nemzetség tagjai termelik a butirát jelentős részét, ezért számos jótékony hatásuk van, például a bél lumen pH csökkentésével gátolják a savérzékeny kórokozók szaporodását (207). **Kutatásunk tárgyát képezte a *Streptococcus*, *Blautia* és *Ruminococcus* nemzetségek relatív mennyiségeinek vizsgálata a csirkék bél-mikrobiomjában a nutraceutikum kezelés hatására. Mindhárom nemzetség esetében azt tapasztaltuk, hogy a madarak növekedési stádiumának a kezdetén alacsony relatív gyakorisággal voltak csak kimutathatók, majd az állatok fejlődésével szintjük emelkedett különösen a nutraceutikumokkal etettet csirkék bél-mikrobiomjában.**

Az antocianin kezelt csoport egyedeiben az állatok fejlődési stádiumának végén szignifikáns emelkedést tapasztaltunk a mennyiségében a kontroll csoport egyedeihez képest.

Egy korábbi tanulmányban megállapították, hogy a *Bacteroides gallinaceium* és *Bacteroides dorei* mennyisége és a csirke bél egészsége között pozitív összefüggés van (220). **Eredményeink alapján elmondható, hogy az antocian és karotinoid kezelésnek pozitív hatása volt a *Bacteroides gallinaceium* mennyiségére. A *Bacteroides dorei* csak a karotinoid, fruktooligoszacharid és szimbiotikum csoportban volt kimutatható.**

A *Lactobacillus* nemzetség tagjai részt vesznek az epesavak dekonjugációjában. Mennyiségük emelkedése összefüggésbe hozható a zsírsavak felszívódásának csökkenésével, aminek negatív hatása van a testtömegre. A különböző gazdaszervezetek mikrobiom elemzése kimutatta, hogy a *Lactobacillus* fajok jelenlétének hatása van a mikrobiom összetételére és csökkentik a bél gyulladós folyamatok kialakulásának kockázatát (109, 212). A *Lactobacillus* nemzetség tagjai széleskörben befolyásolják a bélrendszer egészségét, hatással vannak a bél-mikrobiom összetételére, diverzitására, mivel közvetlenül módosítják a bél morfológiáját, a mucin összetételét és fenntartják a mikrobiális egyensúlyt, gátolják a patogén baktériumok kolonizációját és fontos szerepük van az enterális fertőzések leküzdésében is. Ezen tulajdonságai miatt széleskörben alkalmazzák probiotikus kezelések során (221). **Eredményeink alapján elmondható, hogy különösen az állatok fejlődési stádiumának a végén (40 nap) a fruktooligoszacharid, szimbiotikum és antocianin kezelés hatására a *Lachnospiraceae* család relatív mennyisége emelkedett a kontroll alaptakarmányt kapott állatok bél-mikrobiomjával összehasonlítva. Megállapítottuk, hogy a *Lactobacillus* nemzetség mennyiségében megfigyelhető különbségek inkább életkorral semmint a nutraceutikum kezelés hatásával voltak kapcsolatosak.** Ezen eredményeinkből kiindulva megvizsgáltuk a *Lactobacillus* nemzetséget alkotó fajok relatív mennyiségeiben feltárható különbségeket a nutraceutikumok hatására. **Habár nemzetség szinten a nutraceutikum kezelésnek nem volt hatása a *Lactobacillus* relatív mennyiségére, faji szintű azonosítás során jelentős különbségeket tapasztaltunk mennyiségeiben a különböző kísérleti csoportok összehasonlítása során.** A *Lactobacillus aviarius*, *Lactobacillus salivarius* és *Lactobacillus alvi* epesó-hidroláz (BSH) enzim aktivitással rendelkeznek védelmet nyújtanak a Salmonella és más kórokozók kolonizációja ellen (222). Korábbi tanulmányok kimutatták, hogy a súlynövekedés hatására csökken a mennyiségük a bél-mikrobiomban.

Kísérleteink során megállapítottuk, hogy a *Lactobacillus aviarius* és *salivarius* baktérium fajok minden kísérleti csoport esetében kimutathatók voltak az állatok bél-mikrobiomjában. A *L. salivarius* relatív mennyiségét a β -glükán kezelés növelte a kontroll csoporthoz képest, ezen eredményünk hasonló korábbi tanulmányok eredményével (223). A *L. aviarius* relatív mennyiségének jelentős emelkedését figyeltük meg az antocianin és szimbiotikum kísérleti csoport egyedeiben. Az antocianin takarmány adalékanyaggal etetett állatok bél-mikrobiomjában a *L. alvi* jelentős növekedését figyeltük meg a kontroll csoport egyedeivel összehasonlítva. Eredményeink alapján felmerül, hogy az antocianin csoport mérsékelt súlycsökkenése és a *Lactobacillus aviarius* és *alvi* relatív mennyiségeinek emelkedése között összefüggés van, ezen baktériumok lipid metabolizmusban betöltött szerepének következményeként. Továbbá, úgy gondoljuk, hogy a nutraceutikumoknak *Lactobacillus* nemzetségbe tartozó fajokra kifejtett pozitív hatásával is magyarázható az állatok fejlődési stádiumának a végén megfigyelt mikrobiális diverzitás emelkedése (SZIM, FOS és ANT kezelt csoportban), mivel ezen baktérium nemzetségbe tartozó fajok köztudottan pozitív hatást fejtenek ki a mikrobiális diverzitási mutatók értékeire.

Egy további érdekes összefüggés miszerint az állatok fejlődési stádiumának végén a diverzitás csökkenésével a jótékony SCFA termelő baktériumok relatív mennyiségeiben is csökkenő tendencia figyelhető meg. Ez összefüggésbe hozható az állatok egészségi állapotának romlásával. A Ross 308 broiler csirkék egészségi állapota a nevelési időszakának utolsó két hetében rohamosan romlik, gyakoriak a lokális és szisztémás bakteriális fertőzések, aminek következtében növekszik az elhullás és csökkennek a természetes mutatók értékei (224). Feltételezhető, hogy a patológiás folyamatok kialakulása és a bél-mikrobiom összetételének és diverzitásának változása között összefüggés van.

Kutatásunk jelentőségét növeli, hogy a különböző természetes bioaktív komponensekben gazdag hatóanyagoknak pozitív hatása van mind az állatok alfa diverzitási mutatóira mind a gazdaszervezet szempontjából előnyös baktériumok mennyiségére.

Ezen eredményeinkből kiindulva megvizsgáltuk a szakirodalmi adatok alapján kiválasztott patogén baktériumok mennyiségi összetételének változását a különböző kísérleti csoportok egyedeinek bél-mikrobiomjában. **Fontos megjegyezni, hogy az általunk végzett nagyüzemi állattartást szimuláló kísérlet során minimális volt az állatok elhullása (0,5 %) a kontroll és kezelési csoportok között nem volt különbség. Az állomány a nevelés alatt fertőző betegségektől mentes volt.**

A jótékony és patogén baktériumok azonosítása nem egyszerű feladat. Nincsenek egyértelmű „jó és rossz fiuk” a mikrobiomban a határ nem ennyire éles. A mikrobiális ökoszisztémák megfelelő egyensúlyi működése a jótékony és patogén baktériumok szoros együttműködésén alapszik (225). Az egyensúlyi bél-mikrobiomban a mikrobák elenyésző kisebbsége patogén, amelyek semleges vagy szimbiotikus kapcsolatban élnek a gazdaszervezettel. Egy jól működő diverz mikrobiom esetében a jótékony baktériumok gátolják a patogén baktériumok túlzott mértékű elszaporodását és negatív hatásainak kifejtését. Továbbá, egy egészséges mikrobiomban ezen patogén baktériumok számos jótékony metabolit, mint például SCFA, immunglobulin A, vitaminok szintézisében is részt vesznek. Azonban a mikrobiális egyensúly nagyon instabil, számos külső tényező (stressz, antibiotikum, táplálkozás) hatására csökken a bél-mikrobiom sokszínűsége, ami diszbiózis kialakulásához vezet. Ebben az esetben a bél-mikrobiomban a patogén baktériumok elszaporodhatnak, ami káros metabolitok termelődéséhez és a jótékony baktériumok számának csökkenéséhez vezet, ezáltal gyulladós folyamatok és a bélbarrier károsodása alakul ki a bélben.

A *Clostridium* nemzetség számos tagja fontos jótékony hatással bír, vitaminokat, mikrotápanyagokat (tiamin, riboflavin, nikotinamid, pantoténsav, biotin) és neurotranszmittereket szintetizálnak a gazdaszervezet számára (225-226). Noha a *Clostridium* bizonyos tagjairól ismert, hogy antioxidáns hatású polifenolok metabolizmusában szerepet játszanak, ezáltal csökkentik a bélgyulladást, azonban egyes tagjai megváltozott környezeti feltételek mellett nagyobb mennyiségben kolonizálhatják a bél-mikrobiomot és súlyos megbetegedéseket képesek okozni. A *Clostridium perfringens* túlzott mértékű elszaporodása például súlyos nekrotikus enteritis kialakulását eredményezi a csirkében (227). **Érdekes, hogy a *Clostridium* alacsony relatív gyakorisággal volt kimutatható a mintáinkban és az állatok egyensúlyi „Core” mikrobiomjának nem volt alkotója. Munkánk során megállapítottuk, hogy a szimbiotikum, antocianin és fruktooligoszacharid kezelés csökkentette mennyiségét a csirkék bél-mikrobiomjában a kontroll csoporttal összehasonlítva.**

Az *Enterococcus* nemzetség tagjairól kimutatták, hogy lipoglikánokat termelnek, amelyek a tápcsatornában gyulladós folyamatok kialakulását eredményezhetik. Mennyiségük emelkedése pozitívan korrelál a cukorbetegség kialakulásának kockázatával (228). **Kutatásunk során megállapítottuk, hogy az *Enterococcus* mennyiségére az állatok fejlődése fejtette ki a legkifejezettebb hatást.**

A csirkék korai életszakaszában (7 és 19 nap) ez a nemzetség volt a második leggyakoribb, míg az idősebb állatokban drasztikus csökkenését figyeltük meg a bél-mikrobiomban. Fontos megjegyezni, hogy az állatok növekedési stádiumának a végén (41 nap) a FOS kezelés hatására emelkedett a mennyisége a kontroll csoporthoz képest.

Korábbi tanulmányok szerint a FOS és KAR kezelés csökkenti a *Campylobacter* kolonizációját, ami tökéletes összhangban áll a mi megfigyeléseinkkel (229). **Megfigyeltük a patogén *Campylobacteriaceae* és a *Helicobacteriaceae* családok mennyiségének csökkenését az antocianin, karotinoid, FOS és β -glükán kezelési csoport esetében a kontroll csoporthoz képest.**

A Gram-negatív oportunistá korokozó *Alcaligenes faecalis* (230) alacsony relatív gyakorisággal alkotta az alaptakarmánnyal etettet állatok bél-mikrobiomját, ezzel szemben a nutraceutikumokkal etettet állatok mintáiban egyáltalán nem volt kimutatható.

Az SCFA termelő baktériumok csökkentik a bél pH értékét, az *Enterobacteriaceae* savérzékeny és eubiotikus mikrobiomban alacsony relatív gyakorisággal fordul elő (231). **Jelen kutatásban az *Enterobacteriaceae* alulreprzentálódva volt kimutatható a karotinoid kezelési csoportban, azonban a FOS és SZIM kezelési csoportok esetében emelkedett mennyiségét figyeltük meg az állatok bél-mikrobiomjában a kontroll csoporttal összehasonlítva. Ezen eredményünk nincs összhangban Olnood és mtsai eredményével, miszerint a FOS és SZIM kezelés csökkenti az *Enterobacteriaceae* relatív mennyiségét a bél-mikrobiomban (232).**

Kutatásunk további tárgyát képezte a nutraceutikumok hatásának vizsgálata a béta diverzitási mérőszámok értékeire az állatok korának figyelembevételével. **Eredményeink alapján elmondható, hogy az állomány fejlődése lényeges befolyást gyakorolt a közösségbeli alkotók eltéréseire. A mikrobiális közösségek fokozatos növekedése a GIT-mikrobióta megnövekedett heterogenitásával járt együtt. A nutraceutikumok alkalmazásának nem volt jelentős hatása az állatok béta diverzitási mutatóira. Eredményeink alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy az életkor kifejezetebb közösségi eltolódást eredményezett, mint a kezelés.**

Kísérletünk során vizsgáltuk, hogy az intenzív tartástechnológiai paraméterek mellett, hogyan befolyásolják a kísérleti paraméterek az esszenciális, „core-mikrobióta” alkotók arányát rend és nemzetség taxonómiai szinteken. **A 16 S rRNS gén alapú ampikon szekvenálás eredménye alapján megállapítottuk, hogy a prokarióta doménon belüli főbb rendek és nemzetségek azonosak voltak, de a relatív mennyiségekben eltérések figyelhetők meg.**

A „core” mikrobiomot a *Lactobacillales*, *Clostridiales*, *Erysipelotrichales* és *Enterobacteriales* baktériumok alkották rend taxonómiai szinten.

A kísérleti időszak alatt a *Lactobacillales* az egyensúlyi mikrobiom a legnagyobb mennyiségben kimutatható taxája volt. A nutraceutikum kezelésnek nem volt számottevő hatása a relatív gyakoriságára.

Az *Erysipelotrichales* a madarak korai életszakaszában a „core” mikrobiom kevesebb mint egy százalékát alkotta, majd az állatok növekedésével emelkedett a mennyisége a fejlődési ciklusuk végén az egyensúlyi mikrobiom 6,6 %-át alkotta. Az *Erysipelotrichales* megnövekedett mennyiségét bakteriális diszbiózis során írták le, ahol a diverzitás csökkenésével párhuzamosan emelkedett szintjét mérték (233). Munkánk során kimutattuk, hogy az *Erysipelotrichales* baktérium az állatok növekedési stádiumának a végén az alaptakarmányt kapó állatok bél-mikrobiomjában nagyobb mennyiségben voltak kimutathatók, mint a többi kísérleti csoport esetében.

A gazdaszervezet és a gyomor-bél mikrobiom közötti kölcsönhatások döntő szerepet játszanak a gazda fiziológiai fejlődésében, az egészségben, a táplálkozásában és az élelmiszerbiztonságban (140). A csirke mikrobiom modell és rendszer alapú vizsgálata fontos lehetőségeket kínál mind az alapkutatás, mind az alkalmazott kutatás számára (140).

Eredményeink alapján felmerül, hogy a mikrobiális közösség diverzitásának romlása és az ezzel összefüggő SCFA termelő baktériumok mennyiségének csökkenése helyreállíthatók alternatív kezelési stratégiákkal, természetes hatóanyagok alkalmazása által. Úgy gondoljuk, hogy a mikrobiom restitúciója hatékony terápiás eszköz lehet az antibiotikumok alkalmazásának csökkentésére. Ehhez természetesen megfelelő mélységben kell megismernünk a mikrobiális közösségek együttműködését és az alkalmazni kívánt természetes bioaktív komponensekben gazdag nutraceutikumoknak a bél-mikrobiomra kifejtett hatását.

8. Összefoglalás

Munkám egyik célja az volt, hogy meghatározzam a különböző technikai torzító tényezők hatásait a 16 S rRNS gén amplikon szekvenálás eredményére. Két mintahomogenizáló módszert vizsgáltunk (DL, BS). Kimutattuk, hogy a DL alkalmazásával nagyobb DNS kihozatal érhető el, azonban ezzel a módszerrel gyengébb minőségű DNS-t kaptunk, mint a BS esetében. Megállapítottuk, hogy a BS nagyobb alfa diverzitási és szekvenálási mutató értékeket eredményezett. A DL alkalmazásával nagyobb mennyiségben nyerhetők ki a Gram-pozitív baktériumok, míg a BS esetében kiegyensúlyozott Gram profilokat kaptunk. Összehasonlítottuk a különböző sejtfeltáró és DNS izoláló módszereket. Kimutattuk, hogy a mechanikai és kémiai lízisek kombinációjával érhető el a legnagyobb alfa diverzitási mutató. Eredményeink alapján elmondható továbbá, hogy a kit alapú DNS izolálási módszerek eredményezték a legkonzisztensebb eredményt. A MagNa Pure 24 automatizált platform alkalmazásával nagy mennyiségű és jó minőségű DNS nyerhető ki, standardizálható eljárás, jól alkalmazható mikrobiom összetételben bekövetkező változások nyomon követésére. A konvencionális DNS izolálási eljárással nyertük ki a legnagyobb mennyiségű, azonban legrosszabb minőségű DNS-t. Mindazonáltal ez a módszer kiemelkedőnek bizonyult a mikrobióta közösségek mélyreható elemzésére. Ezzel a módszerrel érhető el a legnagyobb bakteriális diverzitás.

Munkám másik fő célja, a különböző bioaktív komponensekben gazdag nutraceutikumok (karotinoidok, fruktooligoszacharidok, szimbiotikumok, antocianinok) és a bél-mikrobióta közötti kölcsönhatások vizsgálata volt broiler csirkében. Megállapítottuk, hogy az állomány fejlődése során lényegesen változott a bél-mikrobiom összetétele. A nutraceutikumok alkalmazása pozitív hatást fejtett ki az állatok bél-mikrobiom diverzitására. Továbbá a nutraceutikumokkal történő kezelés serkentette számos jótékony SCFA termelő baktérium (*Bifidobacteriaceae*, *Subdoligranulum*, *Faecalibacterium*, *Akkermansia*, *Butyricoccus*, *Blautia*, *Ruminococcus*) mennyiségét a csirkék bél-mikrobiomjában. Munkánk során számos pozitív és negatív korrelációt sikerült feltárnunk a mikrobiális összetétel és súlygyarapodás között. Kimutattuk, hogy a patogén *Campylobacteriaceae*, *Helicobacteriaceae* és *Enterobacteriaceae* mennyisége csökkent a nutraceutikum kezelést kapott állatok bél-mikrobiomjában. Eredményeink alapján úgy gondoljuk, hogy a nutraceutikum kezelés ígéretes megoldás lehet bizonyos bélbaktériumok túlszaporodásával kapcsolatos egészségügyi problémák leküzdésére és potenciálisan alternatív kezelési stratégiák lehetnek az antibiotikumok alkalmazásának helyettesítésére, csökkentésére.

9. Summary

In the first part of our experiments, we aimed to investigate the effects of various technical distortion factors on the results of 16 S rRNA gene amplicon sequencing. We have shown that a higher DNA yield can be obtained by using direct lyses (DL), however poor DNA quality was observed in the majority of samples comparison to bacterial cell suspension (BS). We found that BS resulted in higher alpha diversity and sequencing index values than DL sample homogenization. Using DL, Gram-positive bacteria can be recovered in greater quantities than Gram-negative bacteria. In the case of BS highly balanced Gram distributions were obtained. We have revealed that the combination of mechanical and chemical lysis results the highest alpha diversity index. We observed that the kit-based DNA isolation methods produced the most consistent results. Using the MagNa Pure 24 automated platform, a large amount and high-quality DNA can be extracted, and well suited for monitoring changes in microbiome composition on a large scale. We obtained the largest amount, but the worst quality DNA, using the conventional DNA isolation protocol. Nevertheless, it proved to be prominent for the in-depth analysis of the microbiota communities as well. The greatest bacterial diversity was achieved with this method.

Another goal of our research was to investigate the interactions between nutraceuticals rich in various bioactive components (carotenoids, fructooligosaccharides, symbiotics, anthocyanins) and the intestinal microbiota in broiler chickens. We concluded that the development of the animal exerted a great influence on the chicken microbial community structure. The use of nutraceuticals had a positive effect on the gut microbiome diversity of the animals. Furthermore, treatment with nutraceuticals stimulated the growth of many beneficial SCFA-producing bacteria (*Bifidobacteriaceae*, *Subdoligranulum*, *Faecalibacterium*, *Akkermansia*, *Butyricoccus*, *Blautia*, *Ruminococcus*) in the gut microbiome of the chickens. We managed to reveal several positive and negative correlations between the microbial composition and weight gain. We showed that the amount of pathogenic *Campylobacteriaceae*, *Helicobacteriaceae* and *Enterobacteriaceae* decreased in the intestinal microbiome of animals treated with bioactive compound enriched nutraceuticals. Based on our results, we believe that nutraceutical treatment can be a promising solution to overcome health problems related to the overgrowth of intestinal bacteria and can potentially be alternative treatment strategies to replace and reduce the use of antibiotics.

10. Az értekezés új megállapításai

10.1 A 16 S rRNS gén alapú amplitikon szekvenálás eredményét torzító technikai tényezők vizsgálata

- Megállapítottuk, hogy a mintahomogenizáló stratégia megválasztásának jelentős hatása van mind az DNS izolátumok koncentrációjára és minőségi paramétereire mind pedig a 16 S rRNS gén amplitikon szekvenálás eredményére. A DL homogenizálási módszer nagyobb mennyiségű, ellenben rosszabb minőségi DNS kinyerését eredményezte a mintáinkban. Alkalmazása során a Gram-pozitív baktériumok felülreprezentációját és a Gram-negatív baktériumok alulreprezentációját figyeltük meg. A BS mintahomogenizálás alkalmazása magasabb bakteriális diverzitást eredményezett a mintákban, mint a DL mintahomogenizálás. Továbbá, kiegyensúlyozott Gram-eloszlásokat tapasztaltunk a BS minták esetében.
- A mechanikai és kémia lízisek alkalmazása eredményezte a legnagyobb DNS koncentrációt, ami magasabb alfa diverzitási értékekkel társult a többi sejtfeltárási technikához képest. Továbbá nem figyeltünk meg számottevő DNS töredezettséget ezen mintákban.
- A kereskedelmi forgalomban kapható Qiagen kitek használata során tapasztalt rossz DNS kinyerési hatékonyság érdekes módon magas read számot ellenben alacsonyabb diverzitási értékeket eredményezett a többi izolációs technikával összehasonlítva. Alkalmazásával a mikrobiomot dominánsan nagy mennyiségben alkotó baktériumok nyerhetők ki, azonban az unikális alacsony relatív gyakorisággal előforduló (*Akkermansia* és *Faecalibacterium*) baktériumok kimutatására nem alkalmas. Mindazonáltal, a kit alapú módszerekkel érhető el a legkonzisztensebb eredmény.
- Tudomásunk szerint ez volt az első eset, amikor Roche MagNa Pure 24 automatizált DNS izoláló rendszert metagenomikai célokra alkalmaztak. Ezen izolációs módszer esetében nagy mennyiségű jó minőségű DNS izolátumokat kaptunk, amelyek összességben magas diverzitási értékekkel és read számokkal társultak.
- A konvencionális DNS izolálás esetében az előzetes mintahomogenizáló módszer nagyban befolyásolja az izolálás hatékonyságát. A BS mintahomogenizálással társított konvencionális DNS izolálás eredményezte a legnagyobb bakteriális diverzitást. Alkalmazásával a bél-mikrobiomot alkotó jótékony releváns alacsony mennyiségben jelenlévő baktériumok is hatékonyan kimutathatók.

10.2 Nutraceutikumok hatásainak vizsgálata broiler csirke bél-mikrobiom összetételére és diverzitására

- A nutraceutikumok kezelésével magasabb bakteriális diverzitás érhető el a csirkék bél-mikrobiomjában a kontroll csoporthoz képest. A természetes hatóanyagok pozitív hatása a csirkék növekedési stádiumának a végén figyelhető meg, amikor a kontroll takarmányt fogyasztott állatok bél mikrobiális diverzitása csökkenni kezdett. A nutraceutikumok kevésbé befolyásolják a változatosabb, komplex mikrobiomot.
- A csirkék nutraceutikumokkal kiegészített takarmánnyal történő etetése pozitív hatást fejtett ki a madarak GIT-mikrobiótájára mivel serkentette számos jótékony SCFA termelő baktérium relatív mennyiségét.
- A karotenoid kezelt madarak bél-mikrobiomjában jelentősen emelkedett a jótékony *Bifidobacteriaceae*, *Barnesiellaceae*, *Subdoligranulum*, *Faecalibacterium* a *Bacteroides gallinecum* és *dorei* mennyisége.
- Az antocianin kezelés hatékonyan fokozta a *Faecalibacterium*, *Akkermansia*, *Butyricoccus*, *Blautia*, *Ruminococcus*, *Subdoligranulum*, *Lactobacillus saviarius*, *Bacteroides gallinaceium* és *Bacteroides dorei* arányát a csirkék bél-mikrobiomjában.
- A szimbiotikum az *Akkermansia*, *Bifidobacteriaceae*, *Lachnospiraceae* a FOS kezelés pedig a *Lachnospiraceae*, *Bifidobacteriaceae*, *Ruminococcaceae*, *Streptococcus*, *Blautia* és *Ruminococcus* baktériumok mennyiségére fejtett ki pozitív hatást.
- A Gram-negatív opportunistá *Alcaligenes faecalis* baktérium a nutraceutikum kezelést kapott csoportokban egyáltalán nem volt kimutatható.
- A patogén *Campylobacteriaceae*, *Helicobacteriaceae* és *Enterobacteriaceae* mennyisége csökkent a nutraceutikum kezelést kapott állatok bél-mikrobiomjában a kontroll csoporttal összehasonlítva.
- A legmagasabb F/B arányt a β -glükán, legalacsonyabbat pedig az antocianin kezelt csoportba mértük.
- Az állatok növekedési fázisának a végén mérsékelt testtömeg csökkenés figyelhető meg az antocianin tartalmú takarmányt kapott állatokban a kontroll csoporthoz képest.
- A bioaktív vegyületekkel dúsított takarmány a testtömeg és a *Bacillales*, *Rhizobiales*, *Corynebacteriales* jótékony baktériumok közötti pozitív összefüggéseket találtunk, amelyek a bélhám integritásának javításával a tápanyagok fokozott felszívódásával járnak.

11. Irodalomjegyzék

1. Dominguez-Bello MG, Godoy-Vitorino F, Knight R, Blaser MJ. 2019. Role of the microbiome in human development. *Gut* 68:1108–1114.
2. Sadowsky MJ, Staley C, Heiner C, Hall R, Kelly CR, Brandt L, Khoruts A. 2017. Analysis of gut microbiota - An ever changing landscape. *Gut Microbes* 8:268–275.
3. Malla MA, Dubey A, Kumar A, Yadav S, Hashem A, Abd_Allah EF. 2019. Exploring the Human Microbiome: The Potential Future Role of Next-Generation Sequencing in Disease Diagnosis and Treatment. *Front Immunol* 9.
4. Morgan JL, Darling AE, Eisen JA. 2010. Metagenomic Sequencing of an In Vitro-Simulated Microbial Community. *PLOS ONE* 5:e10209.
5. Hart ML, Meyer A, Johnson PJ, Ericsson AC. 2015. Comparative Evaluation of DNA Extraction Methods from Feces of Multiple Host Species for Downstream Next-Generation Sequencing. *PLoS ONE* 10.
6. Yuan S, Cohen DB, Ravel J, Abdo Z, Forney LJ. 2012. Evaluation of Methods for the Extraction and Purification of DNA from the Human Microbiome. *PLOS ONE* 7:e33865.
7. Weinstock GM. 2012. Genomic approaches to studying the human microbiota. 7415. *Nature* 489:250–256.
8. Stanley D, Hughes RJ, Moore RJ. 2014. Microbiota of the chicken gastrointestinal tract: influence on health, productivity and disease. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:4301–4310.
9. Stanley D, Denman SE, Hughes RJ, Geier MS, Crowley TM, Chen H, Haring VR, Moore RJ. 2012. Intestinal microbiota associated with differential feed conversion efficiency in chickens. *Appl Microbiol Biotechnol* 96:1361–1369.
10. Borda-Molina D, Seifert J, Camarinha-Silva A. 2018. Current Perspectives of the Chicken Gastrointestinal Tract and Its Microbiome. *Comput Struct Biotechnol J* 16:131–139.
11. Tickle PG, Hutchinson JR, Codd JR. 2018. Energy allocation and behaviour in the growing broiler chicken. *Sci Rep* 8:1–13.
12. Bornelöv S, Seroussi E, Yosefi S, Benjamini S, Miyara S, Ruzal M, Grabherr M, Rafati N, Molin A-M, Pendavis K, Burgess SC, Andersson L, Friedman-Einat M. 2018. Comparative omics and feeding manipulations in chicken indicate a shift of the endocrine role of visceral fat towards reproduction. *BMC Genomics* 19:295.
13. Wideman RF, Chapman ME, Hamal KR, Bowen OT, Lorenzoni AG, Erf GF, Anthony NB. 2007. An inadequate pulmonary vascular capacity and susceptibility to pulmonary arterial hypertension in broilers. *Poult Sci* 86:984–998.
14. Shiraishi J-I, Yanagita K, Fukumori R, Sugino T, Fujita M, Kawakami S-I, McMurtry JP, Bungo T. 2011. Comparisons of insulin related parameters in commercial-type chicks: Evidence for insulin resistance in broiler chicks. *Physiol Behav* 103:233–239.
15. Allen HK, Stanton TB. 2014. Altered egos: antibiotic effects on food animal microbiomes. *Annu Rev Microbiol* 68:297–315.
16. D'Costa VM, King CE, Kalan L, Morar M, Sung WWL, Schwarz C, Froese D, Zazula G, Calmels F, Debruyne R, Golding GB, Poinar HN, Wright GD. 2011. Antibiotic resistance is ancient. *Nature* 477:457–461.
17. Giedraitienė A, Vitkauskienė A, Naginienė R, Pavilonis A. 2011. Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. *Med Kaunas Lith* 47:137–146.
18. Shea KM. 2003. Antibiotic resistance: what is the impact of agricultural uses of antibiotics on children's health? *Pediatrics* 112:253–258.
19. Ballou MA, Davis EM, Kasl BA. 2019. Nutraceuticals: An Alternative Strategy for the Use of Antimicrobials. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 35:507–534.

20. Gupta S, Mortensen MS, Schjørring S, Trivedi U, Vestergaard G, Stokholm J, Bisgaard H, Krogfelt KA, Sørensen SJ. 2019. Amplicon sequencing provides more accurate microbiome information in healthy children compared to culturing. *Commun Biol* 2:291.
21. Dave M, Higgins PD, Middha S, Rioux KP. 2012. The human gut microbiome: current knowledge, challenges, and future directions. *Transl Res J Lab Clin Med* 160:246–257.
22. Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* 59:143–169.
23. Greub G. 2012. Culturomics: a new approach to study the human microbiome. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis* 18:1157–1159.
24. Moss EL, Maghini DG, Bhatt AS. 2020. Complete, closed bacterial genomes from microbiomes using nanopore sequencing. *Nat Biotechnol* 38:701.
25. Earl JP, Adappa ND, Krol J, Bhat AS, Balashov S, Ehrlich RL, Palmer JN, Workman AD, Blasetti M, Sen B, Hammond J, Cohen NA, Ehrlich GD, Mell JC. 2018. Species-level bacterial community profiling of the healthy sinonasal microbiome using Pacific Biosciences sequencing of full-length 16S rRNA genes. *Microbiome* 6:190.
26. Walker-Daniels J. 2020. Microbiome Research Methodologies. *Mater Methods*.
27. Pel J, Leung A, Choi WWY, Despotovic M, Ung WL, Shibahara G, Gelinas L, Marziali A. 2018. Rapid and highly-specific generation of targeted DNA sequencing libraries enabled by linking capture probes with universal primers. *PloS One* 13:e0208283.
28. Baker GC, Smith JJ, Cowan DA. 2003. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *J Microbiol Methods* 55:541–555.
29. Di Bella JM, Bao Y, Gloor GB, Burton JP, Reid G. 2013. High throughput sequencing methods and analysis for microbiome research. *J Microbiol Methods* 95:401–414.
30. Galloway-Peña J, Hanson B. 2020. Tools for Analysis of the Microbiome. *Dig Dis Sci* 65:674–685.
31. Janda JM, Abbott SL. 2007. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *J Clin Microbiol* 45:2761–2764.
32. Woo PCY, Lau SKP, Teng JLL, Tse H, Yuen K-Y. 2008. Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis* 14:908–934.
33. Fukuda K, Ogawa M, Taniguchi H, Saito M. 2016. Molecular Approaches to Studying Microbial Communities: Targeting the 16S Ribosomal RNA Gene. *J UOEH* 38:223–232.
34. Kristensen DM, Mushegian AR, Dolja VV, Koonin EV. 2010. New dimensions of the virus world discovered through metagenomics. *Trends Microbiol* 18:11–19.
35. Handelsman J. 2004. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR* 68:669–685.
36. Riesenfeld CS, Schloss PD, Handelsman J. 2004. Metagenomics: genomic analysis of microbial communities. *Annu Rev Genet* 38:525–552.
37. Knight R, Vrbanac A, Taylor BC, Aksenov A, Callewaert C, Debelius J, Gonzalez A, Kosciulek T, McCall L-I, McDonald D, Melnik AV, Morton JT, Navas J, Quinn RA, Sanders JG, Swofford AD, Thompson LR, Tripathi A, Xu ZZ, Zaneveld JR, Zhu Q, Caporaso JG, Dorrestein PC. 2018. Best practices for analysing microbiomes. 7. *Nat Rev Microbiol* 16:410–422.
38. Gilbert JA, Dupont CL. 2011. Microbial metagenomics: beyond the genome. *Annu Rev Mar Sci* 3:347–371.
39. Quince C, Walker AW, Simpson JT, Loman NJ, Segata N. 2017. Shotgun metagenomics, from sampling to analysis. 9. *Nat Biotechnol* 35:833–844.

40. Rinke C, Schwientek P, Sczyrba A, Ivanova NN, Anderson IJ, Cheng J-F, Darling A, Malfatti S, Swan BK, Gies EA, Dodsworth JA, Hedlund BP, Tsiamis G, Sievert SM, Liu W-T, Eisen JA, Hallam SJ, Kyrpides NC, Stepanauskas R, Rubin EM, Hugenholtz P, Woyke T. 2013. Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter. *Nature* 499:431–437.
41. Pérez-Cobas AE, Gomez-Valero L, Buchrieser C. 2020. Metagenomic approaches in microbial ecology: an update on whole-genome and marker gene sequencing analyses. *Microb Genomics* 6.
42. Wooley JC, Ye Y. 2009. Metagenomics: Facts and Artifacts, and Computational Challenges*. *J Comput Sci Technol* 25:71–81.
43. de Abreu VAC, Perdigão J, Almeida S. 2021. Metagenomic Approaches to Analyze Antimicrobial Resistance: An Overview. *Front Genet* 11:575592.
44. Walsh AM, Crispie F, O’Sullivan O, Finnegan L, Claesson MJ, Cotter PD. 2018. Species classifier choice is a key consideration when analysing low-complexity food microbiome data. *Microbiome* 6:50.
45. Fichot EB, Norman RS. 2013. Microbial phylogenetic profiling with the Pacific Biosciences sequencing platform. *Microbiome* 1:10.
46. Mosher JJ, Bernberg EL, Shevchenko O, Kan J, Kaplan LA. 2013. Efficacy of a 3rd generation high-throughput sequencing platform for analyses of 16S rRNA genes from environmental samples. *J Microbiol Methods* 95:175–181.
47. Babauta JT, Atci E, Ha PT, Lindemann SR, Ewing T, Call DR, Fredrickson JK, Beyenal H. 2014. Localized electron transfer rates and microelectrode-based enrichment of microbial communities within a phototrophic microbial mat. *Front Microbiol* 5:11.
48. Xie H, Yang C, Sun Y, Igarashi Y, Jin T, Luo F. 2020. PacBio Long Reads Improve Metagenomic Assemblies, Gene Catalogs, and Genome Binning. *Front Genet* 11.
49. Pollock J, Glendinning L, Wisedchanwet T, Watson M. 2018. The Madness of Microbiome: Attempting To Find Consensus “Best Practice” for 16S Microbiome Studies. *Appl Environ Microbiol* 84.
50. Jain M, Fiddes IT, Miga KH, Olsen HE, Paten B, Akeson M. 2015. Improved data analysis for the MinION nanopore sequencer. *Nat Methods* 12:351–356.
51. Ashikawa S, Tarumoto N, Imai K, Sakai J, Kodana M, Kawamura T, Ikebuchi K, Murakami T, Mitsutake K, Maesaki S, Maeda T 2018. Rapid identification of pathogens from positive blood culture bottles with the MinION nanopore sequencer. *J Med Microbiol* 67:1589–1595.
52. Carter J-M, Hussain S. 2017. Robust long-read native DNA sequencing using the ONT CsgG Nanopore system. *Wellcome Open Res* 2:23.
53. Petersen LM, Martin IW, Moschetti WE, Kershaw CM, Tsongalis GJ. 2019. Third-Generation Sequencing in the Clinical Laboratory: Exploring the Advantages and Challenges of Nanopore Sequencing. *J Clin Microbiol* 58.
54. Schloss PD, Jenior ML, Koumpouras CC, Westcott SL, Highlander SK. 2016. Sequencing 16S rRNA gene fragments using the PacBio SMRT DNA sequencing system. *PeerJ* 4:e1869.
55. Bharti R, Grimm DG. 2019. Current challenges and best-practice protocols for microbiome analysis. *Brief Bioinform* <https://doi.org/10.1093/bib/bbz155>.
56. Araújo-Pérez F, McCoy AN, Okechukwu C, Carroll IM, Smith KM, Jeremiah K, Sandler RS, Asher GN, Keku TO. 2012. Differences in microbial signatures between rectal mucosal biopsies and rectal swabs. *Gut Microbes* 3:530–535.
57. Glendinning L, Wright S, Tennant P, Gill AC, Collie D, McLachlan G. 2017. Microbiota in Exhaled Breath Condensate and the Lung. *Appl Environ Microbiol* 83.

58. Henderson G, Cox F, Kittelmann S, Miri VH, Zethof M, Noel SJ, Waghorn GC, Janssen PH. 2013. Effect of DNA extraction methods and sampling techniques on the apparent structure of cow and sheep rumen microbial communities. *PloS One* 8:e74787.
59. Salter SJ, Cox MJ, Turek EM, Calus ST, Cookson WO, Moffatt MF, Turner P, Parkhill J, Loman NJ, Walker AW. 2014. Reagent and laboratory contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses. *BMC Biol* 12:87.
60. Choo JM, Leong LEX, Rogers GB. 2015. Sample storage conditions significantly influence faecal microbiome profiles. *Sci Rep* 5:16350.
61. McKain N, Genc B, Snelling TJ, Wallace RJ. 2013. Differential recovery of bacterial and archaeal 16S rRNA genes from ruminal digesta in response to glycerol as cryoprotectant. *J Microbiol Methods* 95:381–383.
62. Rubin BER, Gibbons SM, Kennedy S, Hampton-Marcell J, Owens S, Gilbert JA. 2013. Investigating the impact of storage conditions on microbial community composition in soil samples. *PloS One* 8:e70460.
63. Fouhy F, Deane J, Rea MC, O’Sullivan Ó, Ross RP, O’Callaghan G, Plant BJ, Stanton C. 2015. The effects of freezing on faecal microbiota as determined using MiSeq sequencing and culture-based investigations. *PloS One* 10:e0119355.
64. Bahl MI, Bergström A, Licht TR. 2012. Freezing fecal samples prior to DNA extraction affects the Firmicutes to Bacteroidetes ratio determined by downstream quantitative PCR analysis. *FEMS Microbiol Lett* 329:193–197.
65. Mirsepasi H, Persson S, Struve C, Andersen LOB, Petersen AM, Krogfelt KA. 2014. Microbial diversity in fecal samples depends on DNA extraction method: easyMag DNA extraction compared to QIAamp DNA stool mini kit extraction. *BMC Res Notes* 7:50.
66. McOrist AL, Jackson M, Bird AR. 2002. A comparison of five methods for extraction of bacterial DNA from human faecal samples. *J Microbiol Methods* 50:131–139.
67. Gerasimidis K, Bertz M, Quince C, Brunner K, Bruce A, Combet E, Calus S, Loman N, Ijaz UZ. 2016. The effect of DNA extraction methodology on gut microbiota research applications. *BMC Res Notes* 9.
68. Angelakis E, Bachar D, Henrissat B, Armougom F, Audoly G, Lagier J-C, Robert C, Raoult D. 2016. Glycans affect DNA extraction and induce substantial differences in gut metagenomic studies. *Sci Rep* 6:26276.
69. Azimi SM, Nixon G, Ahern J, Balachandran W. 2011. A magnetic bead-based DNA extraction and purification microfluidic device. *Microfluid Nanofluidics* 11:157–165.
70. Brooks JP, Edwards DJ, Harwich MD, Rivera MC, Fettweis JM, Serrano MG, Reris RA, Sheth NU, Huang B, Girerd P, Vaginal Microbiome Consortium, Strauss JF, Jefferson KK, Buck GA. 2015. The truth about metagenomics: quantifying and counteracting bias in 16S rRNA studies. *BMC Microbiol* 15:66.
71. Bag S, Saha B, Mehta O, Anbumani D, Kumar N, Dayal M, Pant A, Kumar P, Saxena S, Allin KH, Hansen T, Arumugam M, Vestergaard H, Pedersen O, Pereira V, Abraham P, Tripathi R, Wadhwa N, Bhatnagar S, Prakash VG, Radha V, Anjana RM, Mohan V, Takeda K, Kurakawa T, Nair GB, Das B. 2016. An Improved Method for High Quality Metagenomics DNA Extraction from Human and Environmental Samples. 1. *Sci Rep* 6:26775.
72. Desneux J, Pourcher A-M. 2014. Comparison of DNA extraction kits and modification of DNA elution procedure for the quantitation of subdominant bacteria from piggery effluents with real-time PCR. *MicrobiologyOpen* 3:437–445.
73. Wesolowska-Andersen A, Bahl MI, Carvalho V, Kristiansen K, Sicheritz-Pontén T, Gupta R, Licht TR. 2014. Choice of bacterial DNA extraction method from fecal material influences community structure as evaluated by metagenomic analysis. *Microbiome* 2:19.

74. Branda SS, Vik S, Friedman L, Kolter R. 2005. Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol* 13:20–26.
75. Scupham AJ, Jones JA, Wesley IV. 2007. Comparison of DNA extraction methods for analysis of turkey cecal microbiota. *J Appl Microbiol* 102:401–409.
76. Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L, Johne R. 2012. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *J Appl Microbiol* 113:1014–1026.
77. Monteiro L, Bonnemaïson D, Vekris A, Petry KG, Bonnet J, Vidal R, Cabrita J, Mégraud F. 1997. Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: *Helicobacter pylori* model. *J Clin Microbiol* 35:995–998.
78. Claassen S, du Toit E, Kaba M, Moodley C, Zar HJ, Nicol MP. 2013. A comparison of the efficiency of five different commercial DNA extraction kits for extraction of DNA from faecal samples. *J Microbiol Methods* 94:103–110.
79. Vogeleeer P, Tremblay YDN, Mafu AA, Jacques M, Harel J. 2014. Life on the outside: role of biofilms in environmental persistence of Shiga-toxin producing *Escherichia coli*. *Front Microbiol* 5:317.
80. Almohamad S, Somarajan SR, Singh KV, Nallapareddy SR, Murray BE. 2014. Influence of isolate origin and presence of various genes on biofilm formation by *Enterococcus faecium*. *FEMS Microbiol Lett* 353:151–156.
81. Glassing A, Dowd SE, Galandiuk S, Davis B, Chiodini RJ. 2016. Inherent bacterial DNA contamination of extraction and sequencing reagents may affect interpretation of microbiota in low bacterial biomass samples. *Gut Pathog* 8:24.
82. Kulakov LA, McAlister MB, Ogden KL, Larkin MJ, O’Hanlon JF. 2002. Analysis of bacteria contaminating ultrapure water in industrial systems. *Appl Environ Microbiol* 68:1548–1555.
83. Champlot S, Berthelot C, Pruvost M, Bennett EA, Grange T, Geigl E-M. 2010. An efficient multistrategy DNA decontamination procedure of PCR reagents for hypersensitive PCR applications. *PLoS One* 5.
84. Kim D, Hofstaedter CE, Zhao C, Mattei L, Tanes C, Clarke E, Lauder A, Sherrill-Mix S, Chehoud C, Kelsen J, Conrad M, Collman RG, Baldassano R, Bushman FD, Bittinger K. 2017. Optimizing methods and dodging pitfalls in microbiome research. *Microbiome* 5:52.
85. Qian X-B, Chen T, Xu Y-P, Chen L, Sun F-X, Lu M-P, Liu Y-X. 2020. A guide to human microbiome research: study design, sample collection, and bioinformatics analysis. *Chin Med J (Engl)* 133:1844–1855.
86. Bleich A, Fox JG. 2015. The Mammalian Microbiome and Its Importance in Laboratory Animal Research. *ILAR J* 56:153–158.
87. Rowland I, Gibson G, Heinken A, Scott K, Swann J, Thiele I, Tuohy K. 2018. Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. *Eur J Nutr* 57:1–24.
88. Sender R, Fuchs S, Milo R. 2016. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biol* 14:e1002533.
89. Shi N, Li N, Duan X, Niu H. 2017. Interaction between the gut microbiome and mucosal immune system. *Mil Med Res* 4:14.
90. Deleu S, Machiels K, Raes J, Verbeke K, Vermeire S. 2021. Short chain fatty acids and its producing organisms: An overlooked therapy for IBD? *EBioMedicine* 66:103293.
91. Kriss M, Hazleton KZ, Nusbacher NM, Martin CG, Lozupone CA. 2018. Low Diversity Gut Microbiota Dysbiosis: Drivers, Functional Implications and Recovery. *Curr Opin Microbiol* 44:34–40.
92. Morrison DJ, Preston T. 2016. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. *Gut Microbes* 7:189–200.

93. Hallert C, Björck I, Nyman M, Pousette A, Grännö C, Svensson H. 2003. Increasing fecal butyrate in ulcerative colitis patients by diet: controlled pilot study. *Inflamm Bowel Dis* 9:116–121.
94. Topping DL, Clifton PM. 2001. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol Rev* 81:1031–1064.
95. Hamer HM, Jonkers D, Venema K, Vanhoutvin S, Troost FJ, Brummer R-J. 2008. Review article: the role of butyrate on colonic function. *Aliment Pharmacol Ther* 27:104–119.
96. Feng W, Ao H, Peng C. 2018. Gut Microbiota, Short-Chain Fatty Acids, and Herbal Medicines. *Front Pharmacol* 9.
97. Louis P, Flint HJ. 2017. Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. *Environ Microbiol* 19:29–41.
98. Steliou K, Boosalis MS, Perrine SP, Sangerman J, Faller DV. 2012. Butyrate histone deacetylase inhibitors. *BioResearch Open Access* 1:192–198.
99. Inan MS, Rasoulpour RJ, Yin L, Hubbard AK, Rosenberg DW, Giardina C. 2000. The luminal short-chain fatty acid butyrate modulates NF-kappaB activity in a human colonic epithelial cell line. *Gastroenterology* 118:724–734.
100. Duncan SH, Holtrop G, Lopley GE, Calder AG, Stewart CS, Flint HJ. 2004. Contribution of acetate to butyrate formation by human faecal bacteria. *Br J Nutr* 91:915–923.
101. Frost G, Sleeth ML, Sahuri-Arisoylu M, Lizarbe B, Cerdan S, Brody L, Anastasovska J, Ghourab S, Hankir M, Zhang S, Carling D, Swann JR, Gibson G, Viardot A, Morrison D, Louise Thomas E, Bell JD. 2014. The short-chain fatty acid acetate reduces appetite via a central homeostatic mechanism. *Nat Commun* 5:3611.
102. Reichardt N, Duncan SH, Young P, Belenguer A, McWilliam Leitch C, Scott KP, Flint HJ, Louis P. 2014. Phylogenetic distribution of three pathways for propionate production within the human gut microbiota. *ISME J* 8:1323–1335.
103. Hijova E, Chmelarova A. 2007. Short chain fatty acids and colonic health. *Bratisl Lek Listy* 108:354–358.
104. Markowiak-Kopeć P, Śliżewska K. 2020. The Effect of Probiotics on the Production of Short-Chain Fatty Acids by Human Intestinal Microbiome. *Nutrients* 12:E1107.
105. Havenaar R. 2011. Intestinal health functions of colonic microbial metabolites: a review. *Benef Microbes* 2:103–114.
106. den Besten G, van Eunen K, Groen AK, Venema K, Reijngoud D-J, Bakker BM. 2013. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *J Lipid Res* 54:2325–2340.
107. Layden BT, Angueira AR, Brodsky M, Durai V, Lowe WL. 2013. Short chain fatty acids and their receptors: new metabolic targets. *Transl Res J Lab Clin Med* 161:131–140.
108. Tazoe H, Otomo Y, Kaji I, Tanaka R, Karaki S-I, Kuwahara A. 2008. Roles of short-chain fatty acids receptors, GPR41 and GPR43 on colonic functions. *J Physiol Pharmacol Off J Pol Physiol Soc* 59 Suppl 2:251–262.
109. Ren J, Sun K, Wu Z, Yao J, Guo B. 2011. All 4 bile salt hydrolase proteins are responsible for the hydrolysis activity in *Lactobacillus plantarum* ST-III. *J Food Sci* 76:M622–628.
110. Ridlon JM, Harris SC, Bhowmik S, Kang D-J, Hylemon PB. 2016. Consequences of bile salt biotransformations by intestinal bacteria. *Gut Microbes* 7:22–39.
111. Hardison WG. 1978. Hepatic taurine concentration and dietary taurine as regulators of bile acid conjugation with taurine. *Gastroenterology* 75:71–75.
112. Ridlon JM, Kang D-J, Hylemon PB. 2006. Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *J Lipid Res* 47:241–259.

113. Wijaya A, Hermann A, Abriouel H, Specht I, Yousif NMK, Holzapfel WH, Franz CMAP. 2004. Cloning of the bile salt hydrolase (bsh) gene from *Enterococcus faecium* FAIR-E 345 and chromosomal location of bsh genes in food enterococci. *J Food Prot* 67:2772–2778.
114. Jarocki P, Targoński Z. 2013. Genetic diversity of bile salt hydrolases among human intestinal bifidobacteria. *Curr Microbiol* 67:286–292.
115. Gómez Zavaglia A, Kociubinski G, Pérez P, Disalvo E, De Antoni G. 2002. Effect of bile on the lipid composition and surface properties of bifidobacteria. *J Appl Microbiol* 93:794–799.
116. Soto-Martin EC, Warnke I, Farquharson FM, Christodoulou M, Horgan G, Derrien M, Faurie J-M, Flint HJ, Duncan SH, Louis P. 2020. Vitamin Biosynthesis by Human Gut Butyrate-Producing Bacteria and Cross-Feeding in Synthetic Microbial Communities. *mBio* 11.
117. Gibson MI, Chen PY-T, Drennan CL. 2016. A structural phylogeny for understanding 2-oxoacid oxidoreductase function. *Curr Opin Struct Biol* 41:54–61.
118. Buckel W, Thauer RK. 2018. Flavin-Based Electron Bifurcation, A New Mechanism of Biological Energy Coupling. *Chem Rev* 118:3862–3886.
119. Magnúsdóttir S, Ravcheev D, de Crécy-Lagard V, Thiele I. 2015. Systematic genome assessment of B-vitamin biosynthesis suggests co-operation among gut microbes. *Front Genet* 6:148.
120. Evans JM, Morris LS, Marchesi JR. 2013. The gut microbiome: the role of a virtual organ in the endocrinology of the host. *J Endocrinol* 218:R37-47.
121. Lyte M. 2013. Microbial endocrinology in the microbiome-gut-brain axis: how bacterial production and utilization of neurochemicals influence behavior. *PLoS Pathog* 9:e1003726.
122. Barrett E, Ross RP, O'Toole PW, Fitzgerald GF, Stanton C. 2012. γ -Aminobutyric acid production by culturable bacteria from the human intestine. *J Appl Microbiol* 113:411–417.
123. Lyte M. 2011. Probiotics function mechanistically as delivery vehicles for neuroactive compounds: Microbial endocrinology in the design and use of probiotics. *BioEssays News Rev Mol Cell Dev Biol* 33:574–581.
124. Koch S, Nusrat A. 2012. The Life and Death of Epithelia During Inflammation: Lessons Learned from the Gut. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 7:35–60.
125. De Mey JR, Freund J-N. 2013. Understanding epithelial homeostasis in the intestine. *Tissue Barriers* 1.
126. Wang H-B, Wang P-Y, Wang X, Wan Y-L, Liu Y-C. 2012. Butyrate enhances intestinal epithelial barrier function via up-regulation of tight junction protein Claudin-1 transcription. *Dig Dis Sci* 57:3126–3135.
127. Chelakkot C, Ghim J, Ryu SH. 2018. Mechanisms regulating intestinal barrier integrity and its pathological implications. *Exp Mol Med* 50.
128. Yu Y, Sitaraman S, Gewirtz AT. 2004. Intestinal epithelial cell regulation of mucosal inflammation. *Immunol Res* 29:55–68.
129. Belkaid Y, Hand T. 2014. Role of the Microbiota in Immunity and inflammation. *Cell* 157:121–141.
130. Bauer MA, Kainz K, Carmona-Gutierrez D, Madeo F. 2018. Microbial wars: Competition in ecological niches and within the microbiome. *Microb Cell Graz Austria* 5:215–219.
131. Ghoul M, Mitri S. 2016. The Ecology and Evolution of Microbial Competition. *Trends Microbiol* 24:833–845.

132. Mukherjee S, Bassler BL. 2019. Bacterial quorum sensing in complex and dynamically changing environments. *Nat Rev Microbiol* 17:371–382.
133. Schnabl B, Brenner DA. 2014. Interactions between the intestinal microbiome and liver diseases. *Gastroenterology* 146:1513–1524.
134. Carding S, Verbeke K, Vipond DT, Corfe BM, Owen LJ. 2015. Dysbiosis of the gut microbiota in disease. *Microb Ecol Health Dis* 26:10.3402/mehd.v26.26191.
135. Kuczynski J, Lauber CL, Walters WA, Parfrey LW, Clemente JC, Gevers D, Knight R. 2012. Experimental and analytical tools for studying the human microbiome. 1. *Nat Rev Genet* 13:47–58.
136. Kim B-R, Shin J, Guevarra R, Lee JH, Kim DW, Seol K-H, Lee J-H, Kim HB, Isaacson R. 2017. Deciphering Diversity Indices for a Better Understanding of Microbial Communities. *J Microbiol Biotechnol* 27:2089–2093.
137. Barwell LJ, Isaac NJB, Kunin WE. 2015. Measuring β -diversity with species abundance data. *J Anim Ecol* 84:1112–1122.
138. Lozupone C, Knight R. 2005. UniFrac: a New Phylogenetic Method for Comparing Microbial Communities. *Appl Environ Microbiol* 71:8228–8235.
139. Barwell LJ, Isaac NJB, Kunin WE. 2015. Measuring β -diversity with species abundance data. *J Anim Ecol* 84:1112–1122.
140. Oakley BB, Lillehoj HS, Kogut MH, Kim WK, Maurer JJ, Pedroso A, Lee MD, Collett SR, Johnson TJ, Cox NA. 2014. The chicken gastrointestinal microbiome. *FEMS Microbiol Lett* 360:100–112.
141. Lu J, Idris U, Harmon B, Hofacre C, Maurer JJ, Lee MD. 2003. Diversity and succession of the intestinal bacterial community of the maturing broiler chicken. *Appl Environ Microbiol* 69:6816–6824.
142. Clavijo V, Flórez MJV. 2018. The gastrointestinal microbiome and its association with the control of pathogens in broiler chicken production: A review. *Poult Sci* 97:1006–1021.
143. Lan Y, Versteegen MWA, Tamminga S, Williams BA. 2005. The role of the commensal gut microbial community in broiler chickens. *Worlds Poult Sci J* 61:95–104.
144. Sommer F, Bäckhed F. 2013. The gut microbiota--masters of host development and physiology. *Nat Rev Microbiol* 11:227–238.
145. Nava GM, Bielke LR, Callaway TR, Castañeda MP. 2005. Probiotic alternatives to reduce gastrointestinal infections: the poultry experience. *Anim Health Res Rev* 6:105–118.
146. Kers JG, Velkers FC, Fischer EAJ, Hermes GDA, Stegeman JA, Smidt H. 2018. Host and Environmental Factors Affecting the Intestinal Microbiota in Chickens. *Front Microbiol* 9.
147. Diaz Carrasco JM, Casanova NA, Fernández Miyakawa ME. 2019. Microbiota, Gut Health and Chicken Productivity: What Is the Connection? *Microorganisms* 7.
148. Li X, Cao Z, Yang Y, Chen L, Liu J, Lin Q, Qiao Y, Zhao Z, An Q, Zhang C, Li Q, Ji Q, Zhang H, Pan H. 2019. Correlation between Jejunal Microbial Diversity and Muscle Fatty Acids Deposition in Broilers Reared at Different Ambient Temperatures. *Sci Rep* 9:1–12.
149. Lin J. 2014. Antibiotic growth promoters enhance animal production by targeting intestinal bile salt hydrolase and its producers. *Front Microbiol* 5.
150. van der Waaij D, Nord CE. 2000. Development and persistence of multi-resistance to antibiotics in bacteria; an analysis and a new approach to this urgent problem. *Int J Antimicrob Agents* 16:191–197.
151. Moore RJ. 2016. Necrotic enteritis predisposing factors in broiler chickens. *Avian Pathol J WVPA* 45:275–281.

152. Yeoman CJ, Chia N, Jeraldo P, Sipos M, Goldenfeld ND, White BA. 2012. The microbiome of the chicken gastrointestinal tract. *Anim Health Res Rev* 13:89–99.
153. Rehman HU, Vahjen W, Awad WA, Zentek J. 2007. Indigenous bacteria and bacterial metabolic products in the gastrointestinal tract of broiler chickens. *Arch Anim Nutr* 61:319–335.
154. Oakley BB, Buhr RJ, Ritz CW, Kiepper BH, Berrang ME, Seal BS, Cox NA. 2014. Successional changes in the chicken cecal microbiome during 42 days of growth are independent of organic acid feed additives. *BMC Vet Res* 10:282.
155. de Castro Júnior SL, Silva IJO da. 2021. The specific enthalpy of air as an indicator of heat stress in livestock animals. *Int J Biometeorol* 65:149–161.
156. Oke OE, Uyanga VA, Iyasere OS, Oke FO, Majekodunmi BC, Logunleko MO, Abiona JA, Nwosu EU, Abioja MO, Daramola JO, Onagbesan OM. 2021. Environmental stress and livestock productivity in hot-humid tropics: Alleviation and future perspectives. *J Therm Biol* 100:103077.
157. Singer RS, Hofacre CL. 2006. Potential Impacts of Antibiotic Use in Poultry Production. *Avian Dis* 50:161–172.
158. Lekagul A, Tangcharoensathien V, Liverani M, Mills A, Rushton J, Yeung S. 2021. Understanding antibiotic use for pig farming in Thailand: a qualitative study. *Antimicrob Resist Infect Control* 10:3.
159. Manyi-Loh C, Mamphweli S, Meyer E, Okoh A. 2018. Antibiotic Use in Agriculture and Its Consequential Resistance in Environmental Sources: Potential Public Health Implications. *Mol Basel Switz* 23:E795.
160. Antimicrobial Resistance Collaborators. 2022. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet Lond Engl* 399:629–655.
161. Smith DR, Temime L, Opatowski L. 2021. Microbiome-pathogen interactions drive epidemiological dynamics of antibiotic resistance: A modeling study applied to nosocomial pathogen control. *eLife* 10:e68764.
162. Sorbara MT, Pamer EG. 2019. Interbacterial mechanisms of colonization resistance and the strategies pathogens use to overcome them. *Mucosal Immunol* 12:1–9.
163. Quigley EMM. 2020. Nutraceuticals as modulators of gut microbiota: Role in therapy. *Br J Pharmacol* 177:1351–1362.
164. Díaz-Orozco LE, Méndez-Sánchez N. 2021. Nutraceuticals and microbiota. *Minerva Gastroenterol* 67:326–338.
165. Santini A, Novellino E. 2017. Nutraceuticals in hypercholesterolaemia: an overview. *Br J Pharmacol* 174:1450–1463.
166. Sachdeva V, Roy A, Bharadvaja N. 2020. Current Prospects of Nutraceuticals: A Review. *Curr Pharm Biotechnol* 21:884–896.
167. Ricke SC. 2021. Prebiotics and alternative poultry production. *Poult Sci* 100:101174.
168. Pourabedin M, Zhao X. 2015. Prebiotics and gut microbiota in chickens. *FEMS Microbiol Lett* 362:fnv122.
169. Swiatkiewicz S, Arczewska-Wlosek A. 2012. Prebiotic fructans and organic acids as feed additives improving mineral availability. *Worlds Poult Sci J* 68:269–279.
170. Sengor E, Yardimci M, Cetingul S, Bayram I, Sahin H, Dogan I. 2007. Short Communication Effects of short chain fatty acid (SCFA) supplementation on performance and egg characteristics of old breeder hens. *South Afr J Anim Sci* 37:158–163–163.
171. Yang J, Qian K, Wu D, Zhang W, Wu Y, Xu Y. 2017. Effects of different proportions of two *Bacillus* sp. on the growth performance, small intestinal morphology, caecal microbiota and plasma biochemical profile of Chinese Huainan Partridge Shank chickens. *J Integr Agric* 16:1383–1392.

172. Wieërs G, Belkhir L, Enaud R, Leclercq S, Philippart de Foy J-M, Dequenne I, de Timary P, Cani PD. 2019. How Probiotics Affect the Microbiota. *Front Cell Infect Microbiol* 9:454.
173. Slawinska A, Plowiec A, Siwek M, Jaroszewski M, Bednarczyk M. 2016. Long-Term Transcriptomic Effects of Prebiotics and Synbiotics Delivered In Ovo in Broiler Chickens. *PLOS ONE* 11:e0168899.
174. Kareem KY, Loh TC, Foo HL, Akit H, Samsudin AA. 2016. Effects of dietary postbiotic and inulin on growth performance, IGF1 and GHR mRNA expression, faecal microbiota and volatile fatty acids in broilers. *BMC Vet Res* 12:163.
175. Gessner DK, Ringseis R, Eder K. 2017. Potential of plant polyphenols to combat oxidative stress and inflammatory processes in farm animals. *J Anim Physiol Anim Nutr* 101:605–628.
176. Tedeschi LO, Muir JP, Naumann HD, Norris AB, Ramírez-Restrepo CA, Mertens-Talcott SU. 2021. Nutritional Aspects of Ecologically Relevant Phytochemicals in Ruminant Production. *Front Vet Sci* 8:628445.
177. Corrêa TAF, Rogero MM, Hassimotto NMA, Lajolo FM. 2019. The Two-Way Polyphenols-Microbiota Interactions and Their Effects on Obesity and Related Metabolic Diseases. *Front Nutr* 6.
178. Putta S, Yarla NS, Peluso I, Tiwari DK, Reddy GV, Giri PV, Kumar N, Malla R, Rachel V, Bramhachari PV, Reddy D RS, Bade R, Mannarapu M, Barreto GE, Lu D-Y, Tarasov VV, Chubarev VN, Ribeiro FF, Scotti L, Scotti MT, Kamal MA, Ashraf GM, Aliev G, Perry G, Sarker SD, Rao CV, Bishayee A. 2017. Anthocyanins: Multi-Target Agents for Prevention and Therapy of Chronic Diseases. *Curr Pharm Des* 23:6321–6346.
179. Lyu Y, Wu L, Wang F, Shen X, Lin D. 2018. Carotenoid supplementation and retinoic acid in immunoglobulin A regulation of the gut microbiota dysbiosis. *Exp Biol Med* 243:613–620.
180. Collado MC, Gueimonde M, Hernández M, Sanz Y, Salminen S. 2005. Adhesion of Selected Bifidobacterium Strains to Human Intestinal Mucus and the Role of Adhesion in Enteropathogen Exclusion. *J Food Prot* 68:2672–2678.
181. Eeckhaut V, Van Immerseel F, Croubels S, De Baere S, Haesebrouck F, Ducatelle R, Louis P, Vandamme P. 2011. Butyrate production in phylogenetically diverse Firmicutes isolated from the chicken caecum. *Microb Biotechnol* 4:503–512.
182. Eeckhaut V, Van Immerseel F, Teirlynck E, Pasmans F, Fievez V, Snauwaert C, Haesebrouck F, Ducatelle R, Louis P, Vandamme P. 2008. *Butyricoccus pullicaecorum* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, butyrate-producing bacterium isolated from the caecal content of a broiler chicken. *Int J Syst Evol Microbiol* 58:2799–2802.
183. Pankoke H, Maus I, Loh G, Hüser A, Seifert J, Tilker A, Hark S, Sczyrba A, Pelzer S, Kleinbölting J. 2021. Evaluation of commercially available DNA extraction kits for the analysis of the broiler chicken cecal microbiota. *FEMS Microbiol Lett* 368:fnz033.
184. Zhou J, Bruns MA, Tiedje JM. 1996. DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl Environ Microbiol* 62:316–322.
185. Guo F, Zhang T. 2013. Biases during DNA extraction of activated sludge samples revealed by high throughput sequencing. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:4607–4616.
186. Maukonen J, Simões C, Saarela M. 2012. The currently used commercial DNA-extraction methods give different results of clostridial and actinobacterial populations derived from human fecal samples. *FEMS Microbiol Ecol* 79:697–708.
187. Walker AW, Martin JC, Scott P, Parkhill J, Flint HJ, Scott KP. 2015. 16S rRNA gene-based profiling of the human infant gut microbiota is strongly influenced by sample processing and PCR primer choice. *Microbiome* 3:26.

188. Mills DK, Fitzgerald K, Litchfield CD, Gillevet PM. 2003. A comparison of DNA profiling techniques for monitoring nutrient impact on microbial community composition during bioremediation of petroleum-contaminated soils. *J Microbiol Methods* 54:57–74.
189. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. 2006. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 444:1027–1031.
190. Hou Q, Kwok L-Y, Zheng Y, Wang L, Guo Z, Zhang J, Huang W, Wang Y, Leng L, Li H, Zhang H. 2016. Differential fecal microbiota are retained in broiler chicken lines divergently selected for fatness traits. *Sci Rep* 6:37376.
191. Samuel BS, Hansen EE, Manchester JK, Coutinho PM, Henrissat B, Fulton R, Latreille P, Kim K, Wilson RK, Gordon JI. 2007. Genomic and metabolic adaptations of *Methanobrevibacter smithii* to the human gut. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:10643–10648.
192. Larsen N, Vogensen FK, Berg FWJ van den, Nielsen DS, Andreasen AS, Pedersen BK, Al-Soud WA, Sørensen SJ, Hansen LH, Jakobsen M. 2010. Gut Microbiota in Human Adults with Type 2 Diabetes Differs from Non-Diabetic Adults. *PLOS ONE* 5:e9085.
193. Zhang C, Zhang M, Wang S, Han R, Cao Y, Hua W, Mao Y, Zhang X, Pang X, Wei C, Zhao G, Chen Y, Zhao L. 2010. Interactions between gut microbiota, host genetics and diet relevant to development of metabolic syndromes in mice. *ISME J* 4:232–241.
194. Palau-Rodriguez M, Tulipani S, Isabel Queipo-Ortuño M, Urpi-Sarda M, Tinahones FJ, Andres-Lacueva C. 2015. Metabolomic insights into the intricate gut microbial–host interaction in the development of obesity and type 2 diabetes. *Front Microbiol* 6.
195. Toivanen P. 2003. Normal intestinal microbiota in the aetiopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 62:807–811.
196. Ley RE, Bäckhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI. 2005. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci* 102:11070–11075.
197. Zhang C, Zhang M, Pang X, Zhao Y, Wang L, Zhao L. 2012. Structural resilience of the gut microbiota in adult mice under high-fat dietary perturbations. *ISME J* 6:1848–1857.
198. Bäckhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, Semenkovich CF, Gordon JI. 2004. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:15718–15723.
199. Dev K, Mir NA, Biswas. 2021. Community composition of cecal microbiota in commercial yellow broilers with high and low feed efficiencies. *Poult Sci* 100.
200. Sarangi NR, Babu LK, Kumar A, Pradhan CR, Pati PK, Mishra JP. 2016. Effect of dietary supplementation of prebiotic, probiotic, and synbiotic on growth performance and carcass characteristics of broiler chickens. *Vet World* 9:313–319.
201. Dev K, Mir NA, Biswas A, Kannoujia J, Begum J, Kant R, Mandal A. 2020. Dietary synbiotic supplementation improves the growth performance, body antioxidant pool, serum biochemistry, meat quality, and lipid oxidative stability in broiler chickens. *Anim Nutri* 6:325–332.
202. Liu J, Hao W, He Z, Kwek E, Zhu H, Ma N, Ma KY, Chen Z-Y. 2021. Blueberry and cranberry anthocyanin extracts reduce bodyweight and modulate gut microbiota in C57BL/6 J mice fed with a high-fat diet. *Eur J Nutr* 60:2735–2746.
203. Sivamaruthi BS, Kesika P, Chaiyasut C. 2020. The Influence of Supplementation of Anthocyanins on Obesity-Associated Comorbidities: A Concise Review. *Foods* 9:687.
204. Lozupone CA, Stombaugh JI, Gordon JI, Jansson JK, Knight R. 2012. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature* 489:220–230.

205. Magne F, Gotteland M, Gauthier L, Zazueta A, Pesoa S, Navarrete P, Balamurugan R. 2020. The Firmicutes/Bacteroidetes Ratio: A Relevant Marker of Gut Dysbiosis in Obese Patients? *Nutrients* 12:E1474.
206. Mohd Shaufi MA, Sieo CC, Chong CW, Gan HM, Ho YW. 2015. Deciphering chicken gut microbial dynamics based on high-throughput 16S rRNA metagenomics analyses. *Gut Pathog* 7.
207. Louis P, Young P, Holtrop G, Flint HJ. 2010. Diversity of human colonic butyrate-producing bacteria revealed by analysis of the butyryl-CoA:acetate CoA-transferase gene. *Environ Microbiol* 12:304–314.
208. Derrien M, Vaughan EE, Plugge CM, de Vos WM. 2004. Akkermansia muciniphila gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* 54:1469–1476.
209. Rossocha M, Schultz-Heienbrok R, von Moeller H, Coleman JP, Saenger W. 2005. Conjugated bile acid hydrolase is a tetrameric N-terminal thiol hydrolase with specific recognition of its cholyl but not of its tauryl product. *Biochemistry* 44:5739–5748.
210. Jones BV, Begley M, Hill C, Gahan CGM, Marchesi JR. 2008. Functional and comparative metagenomic analysis of bile salt hydrolase activity in the human gut microbiome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:13580–13585.
211. Petrov VA, Fernández-Peralbo MA, Derks R, Knyazeva EM, Merzlikin NV, Sazonov AE, Mayboroda OA, Saltykova IV. 2020. Biliary Microbiota and Bile Acid Composition in Cholelithiasis. *BioMed Res Int* 2020:1242364.
212. Gu X-C, Luo X-G, Wang C-X, Ma D-Y, Wang Y, He Y-Y, Li W, Zhou H, Zhang T-C. 2014. Cloning and analysis of bile salt hydrolase genes from *Lactobacillus plantarum* CGMCC No. 8198. *Biotechnol Lett* 36:975–983.
213. Yoshii K, Hosomi K, Sawane K, Kunisawa J. 2019. Metabolism of Dietary and Microbial Vitamin B Family in the Regulation of Host Immunity. *Front Nutr* 6:48.
214. Bäckhed F, Fraser CM, Ringel Y, Sanders ME, Sartor RB, Sherman PM, Versalovic J, Young V, Finlay BB. 2012. Defining a Healthy Human Gut Microbiome: Current Concepts, Future Directions, and Clinical Applications. *Cell Host Microbe* 12:611–622.
215. Sommer F, Anderson JM, Bharti R, Raes J, Rosenstiel P. 2017. The resilience of the intestinal microbiota influences health and disease. *Nat Rev Microbiol* 15:630–638.
216. Yin Y, Lei F, Zhu L, Li S, Wu Z, Zhang R, Gao GF, Zhu B, Wang X. 2010. Exposure of different bacterial inocula to newborn chicken affects gut microbiota development and ileum gene expression. *ISME J* 4:367–376.
217. Shang Y, Kumar S, Thippareddi H, Kim WK. 2018. Effect of Dietary Fructooligosaccharide (FOS) Supplementation on Ileal Microbiota in Broiler Chickens. *Poult Sci* 97:3622–3634.
218. Antonissen G, Eeckhaut V, Van Driessche K, Onrust L, Haesebrouck F, Ducatelle R, Moore RJ, Van Immerseel F. 2016. Microbial shifts associated with necrotic enteritis. *Avian Pathol J WVPA* 45:308–312.
219. Lopez-Siles M, Duncan SH, Garcia-Gil LJ, Martinez-Medina M. 2017. *Faecalibacterium prausnitzii*: from microbiology to diagnostics and prognostics. *ISME J* 11:841–852.
220. Irisawa T, Saputra S, Kitahara M, Sakamoto M, Sulistiani null, Yulineri T, Dinoto A, Ohkuma M. 2016. *Bacteroides caecicola* sp. nov. and *Bacteroides gallinaceum* sp. nov., isolated from the caecum of an Indonesian chicken. *Int J Syst Evol Microbiol* 66:1431–1437.
221. Meehan CJ, Beiko RG. 2014. A phylogenomic view of ecological specialization in the Lachnospiraceae, a family of digestive tract-associated bacteria. *Genome Biol Evol* 6:703–713.

222. Meimandipour A, Shuhaimi M, Hair-Bejo M, Azhar K, Kabeir BM, Rasti B, Yazid AM. 2009. In vitro fermentation of broiler cecal content: the role of lactobacilli and pH value on the composition of microbiota and end products fermentation. *Lett Appl Microbiol* 49:415–420.
223. Jonsson E, Hemmingsson S. 1991. Establishment in the piglet gut of lactobacilli capable of degrading mixed-linked beta-glucans. *J Appl Bacteriol* 70:512–516.
224. Weerts EAWS, Matthijs MGR, Bonhof J, van Haarlem DA, Dwars RM, Gröne A, Verheije MH, Jansen CA. 2021. The contribution of the immune response to enhanced colibacillosis upon preceding viral respiratory infection in broiler chicken in a dual infection model. *Vet Immunol Immunopathol* 238:110276.
225. Round JL, Mazmanian SK. 2009. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat Rev Immunol* 9:313–323.
226. Masuda M, Ide M, Utsumi H, Niuro T, Shimamura Y, Murata M. 2012. Production potency of folate, vitamin B(12), and thiamine by lactic acid bacteria isolated from Japanese pickles. *Biosci Biotechnol Biochem* 76:2061–2067.
227. Xu W, Wang H, Chen S, Chen Y, Liu L, Wu W. 2021. Tracing *Clostridium perfringens* strains along the chicken production chain from farm to slaughter by multilocus sequence typing. *Zoonoses Public Health* 68:431–442.
228. Teng P-Y, Kim WK. 2018. Review: Roles of Prebiotics in Intestinal Ecosystem of Broilers. *Front Vet Sci* 5.
229. Shikh EV, Makhova AA, Astapovskiy AA, Perkov AV. 2021. [Prospects of probiotic strains of bifidobacteria and enterococcus in treatment and prevention of diseases in gastroenterology]. *Vopr Pitan* 90:15–25.
230. Berkhoff HA, McCorkle FM, Brown TT. 1983. Pathogenicity of various isolates of *Alcaligenes faecalis* for broilers. *Avian Dis* 27:707–713.
231. Baldelli V, Scaldaferrri F, Putignani L, Del Chierico F. 2021. The Role of Enterobacteriaceae in Gut Microbiota Dysbiosis in Inflammatory Bowel Diseases. *Microorganisms* 9:697.
232. Olnood CG, Beski SSM, Choct M, Iji PA. 2015. Use of *Lactobacillus johnsonii* in broilers challenged with *Salmonella* sofia. *Anim Nutr* 1:203–212.
233. Carter JK, Bhattacharya D, Borgerding JN, Fiel MI, Faith JJ, Friedman SL. 2021. Modeling dysbiosis of human NASH in mice: Loss of gut microbiome diversity and overgrowth of Erysipelotrichales. *PLoS One* 16:e0244763.

12. Tárgyszavak

Mikrobiom, Nutraceutikum, Antocianin, Fructooligoszacharid, Karotinoid, Szimbiotikum, β -glükán, GIT-mikrobióta, Broiler csirke, Antibiotikum, 16 S rRNS amplikon szekvenálás

13. Key words

Microbiome, Nutraceutical, Anthocyanin, Fructooligosaccharide, Carotenoid, Symbiotic, β -glucan, GIT microbiota, Broiler chicken, Antibiotic, 16 S rRNA amplicon sequencing

14. Köszönetnyilvánítás

Ezúton mondok köszönetet azoknak, akik bármilyen módon hozzájárultak az értekezésem létrejöttéhez. Mindenekelőtt hálásan köszönöm témavezetőmnek **Prof. Dr. Biró Sándornak** és **Dr. Paholcsek Melindának** a belém vetett bizalmukat, hogy munkámat lehetővé tették a Humángenetikai Tanszéken, biztosították munkámhoz szükséges feltételeket. Számomra mind szakmai, mind emberi szempontból fontos példát adtak és sokat tanulhattam tőlük.

Köszönöm **Dr. Gálné Dr. habil Remenyik Judit** tanárnőnek és **Prof. Dr. Stündl Lászlónak**, hogy biztosították munkámhoz szükséges szakmai és anyagi feltételeket.

Köszönet illeti a DE-MÉK Élelmiszertechnológiai Intézet korábbi és jelenlegi dolgozóit, PhD hallgatóit, akik, ha szükséges volt, mindig önzetlenül siettek segítségemre. Köztük is különösen köszönöm **Dr. Fidler Gábor** és **Fauszt Péter Zsombor** önzetlen segítségét a bioinformatikai analízisek kivitelezésében. Hálásan köszönöm **Szilágyi Endrének**, **Pesti-Asbóth Georginának**, hogy előállították az általam vizsgált bioaktív komponensekben gazdag nutraceutikumokat. Köszönöm **Dr. Stágel Anikó** szakmai iránymutatását.

Hálás vagyok a velem együtt dolgozó kollegák, **Dávid Péter**, **Szilágyi-Rácz Anna Anita**, **Szőke Zsombor**, **Dr. Antal Ferenc**, **Bíróné Molnár Piroska**, **Dr. Homoki Judit Rita**, **Dr. Kun-Nemes Andrea**, **Szóllósi Erzsébet**, **Dr. Fazekas Mónika**, **Szabó Szabolcs**, **Dr. Biró Attila**, **Szarvas Mária Magdolna** segítségéért.

Köszönöm **Dr. Markovics Arnold** szakmai iránymutatását, segítségét.

Köszönöm kollaborációs partnereink **Prof. Dr. Babinszky László**, **Dr. Szabó Judit** és **Prof. Dr. Kónya József** értékes szakmai segítségét. Köszönöm a DE-ÁOK Humángenetikai Tanszék minden munkatársának a támogatását. Köszönöm **Dr. Kiss János** szakmai segítségét.

Szeretném megköszönni családom és barátaim támogatását, biztatását, akik mindvégig mellettem álltak és kitartóan támogattak. Külön köszönöm a családom **Édesanyám a testvéreim** és a **Szilágyi család** önzetlen támogatását, biztatását.

Kiemelt hálával tartozom férjemnek **Szilágyi Endrének**, a közös munkáink során nyújtott szakmai segítségért, valamint az évek alatti végtelen szeretetért, támogatásáért és hogy mindig bátorított céljaim elérésében. A disszertációmát drága kislányomnak **Szilágyi Emmának** ajánlom, aki bearanyozza az életünk minden egyes másodpercét. Köszönöm, hogy ilyen jó, türelmes és megértő gyermek vagy.

15. Függelék

15.1 Kiegészítő táblázatok

Kiegészítő táblázat 1: A különböző izolációs technikák összefoglaló ábrája. Minta előkészítés: **BS** (bakteriális sejtszuszpenzió), **DL** (direkt lízis). Mechanikai lízis: **1.1** (Power fecal beads, vortex), **1.3** (SeptiFast bead, vortex), **1.5** (Green beads, vortex), **1.2** (Power fecal beads, MagNa Lyser), **1.4** (SeptiFast bead, MagNa Lyser), **1.6** (Green bead, MagNa Lyser). Kémiai Lízis: **2.1** (ATL puffer 65 és 95 °C-on), **2.2** (BLB puffer 65 és 95 °C-on), **2.5** (ATL és InhibitEx tableta), **2.3** (ATL 56 °C-on, 16 h), **2.4** (BLB 56 °C-on, 16 h). DNS izolálás: **I4.1** (MagNa Pure 24 izoláló robot Pathogen 200) (**I4.2**) Pathogen 1000 protokoll. **I5.1** (QIAamp DNA Stool mini), **I5.2** (QIAamp Power fecal), **I5.3** (Qiagen DNeasy Power Soil), **I6.1** (mechanikai lízis konvencionális izolálás), **I6.2** (kémiai lízis, konvencionális izolálás), **I6.3** (kevert lízis konvencionális izolálás).

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	BS 1.1 4.1	BS 1.5 4.2	BS 1.6+2.1 4.1	DL 2.2 4.2	BS 2.2 4.2	BS 1.2 6	BS 2.2 1.3 6	DL 2.2 6
2	BS 1.2 4.1	BS 2.2 4.2	BS 2.2 1.2 4.1	DL 2.2 4.2	BS 2.5 5.1	BS 1.3 6	BS 1.1 2.2 6	DL 2.3 6
3	BS 1.3 4.1	BS 2.5 4.2	BS 2.2 1.4 4.1	DL 2.3 4.2	DL 2.5 5.1	BS 1.4 6	BS 1.3 2.2 6	DL 2.4 6
4	BS 1.4 4.1	BS 2.2 4.2	BS 2.2 4.1	DL 2.1 1.4 4.1	BS 2.1 1.1 5.2	BS 2.5 6	BS 1.1+2.1 6	DL 2.1 1.1 6
5	BS 1.5 4.1	BS 2.1 1.2 4.1	BS 2.4 4.1	DL 1.2 2.1 4.1	BS 2.1 1.2 5.2	BS 2.2 6	BS 1.3+2.1 6	DL 2.1 1.3 6
6	BS 1.6 4.1	BS 2.1 1.4 4.1	DL 2.1 1.2 4.2	DL 1.4 2.1 4.1	DL 2.1 1.1 5.2	BS 2.3 6	BS 1.1+2.2 6	DL 1.1 2.1 6
7	BS 2.1 4.1	BS 2.1 1.6 4.1	DL 2.1 1.4 4.2	DL 1.2+2.1 4.1	DL 2.1 1.2 5.2	BS 2.4 6	BS 1.3+2.2 6	DL 1.1 2.1 6
8	BS 2.2 4.1	BS 1.2 2.1 4.1	DL 1.2 2.1 4.2	DL 1.4 2.1 4.1	BS 2.1 1.1 5.3	BS 2.1 1.1 6	DL 1.1 6	DL 2.2 1.1 6
9	BS 1.1 4.2	BS 1.4 2.1 4.1	DL 1.4 2.1 4.2	DL 2.2 4.1	BS 2.1 1.2 5.3	BS 2.1 1.3 6	DL 1.2 6	DL 2.2 1.3 6
10	BS 1.2 4.2	BS 1.6 2.1 4.1	DL 1.2+2.1 4.1	DL 2.2 4.1	DL 2.1 1.1 5.3	BS 1.1 2.1 6	DL 1.3 6	DL 1.1 2.2 6
11	BS 1.3 4.2	BS 1.2+2.1 4.1	DL 1.4+2.1 4.1	DL 2.4 4.1	DL 2.1 1.2 5.3	BS 1.3 2.1 6	DL 1.4 6	DL 1.3 2.2 6
12	BS 1.4 4.2	BS 1.4+2.1 4.1	DL 2.2 1.2 4.2	BS 2.1 4.2	BS 1.1 6	BS 2.2 1.1 6	DL 2.1 6	DL 1.1+2.1 6

Kiegészítő táblázat 2: A csirke bél-mikrobiom összetételének vizsgálata, a tíz leggyakoribb bakteriális taxa relatív frekvenciájában bekövetkező változások vizsgálata a bakteriális sejtszuszpenzió és direkt lizált mintákban törzs, osztály, rend, család, nemzetség és faj rendszertani kategóriákban.

Törzs	Osztály	Rend	Család	Nemzetség					
BS									
<i>Actinobacteria</i>	1.1020979882	<i>Clostridia</i>	32.100664176	<i>Clostridiales</i>	32.08896673	<i>Ruminococcaceae</i>	19.5283391	<i>Lactobacillus</i>	18.9450832
<i>Bacteroidetes</i>	28.688718888	<i>Bacteroidia</i>	28.686742912	<i>Bacteroidales</i>	28.62921766	<i>Lactobacillaceae</i>	18.9450832	<i>Bacteroides</i>	14.1091148
<i>Cyanobacteria</i>	0.6418643311	<i>Bacilli</i>	25.548865867	<i>Lactobacillales</i>	25.18859237	<i>Bacteroidaceae</i>	14.1091148	<i>Unknown</i>	9.52379486
<i>Epsilonbacteraeota</i>	1.9119322117	<i>Gammaproteobacteria</i>	5.7824991659	<i>Enterobacteriales</i>	4.643268449	<i>Lachnospiraceae</i>	7.42733638	<i>Alistipes</i>	6.25301334
<i>Firmicutes</i>	59.941162436	<i>Campylobacteria</i>	1.9118005247	<i>Campylobacterales</i>	1.911800524	<i>Rikenellaceae</i>	6.25316725	<i>Streptococcus</i>	4.98307141
<i>Lentisphaerae</i>	0.0048870965	<i>Erysipelotrichia</i>	1.7904010952	<i>Erysipelotrichales</i>	1.790401095	<i>Streptococcaceae</i>	4.99869365	<i>Escherichia-Shigella</i>	4.62510663
<i>Patescibacteria</i>	0.00019240537	<i>Verrucomicrobiae</i>	0.9621145279	<i>Verrucomicrobiales</i>	0.962114527	<i>Enterobacteriaceae</i>	4.64326844	<i>Ruminococcaceae UCG-014</i>	4.16882947
<i>Proteobacteria</i>	6.57260609232	<i>Actinobacteria</i>	0.7717232831	<i>Gastranaerophilales</i>	0.631623339	<i>Barnesiellaceae</i>	3.30529667	<i>Faecalibacterium</i>	3.78900894
<i>Tenericutes</i>	0.17435775085	<i>Melainabacteria</i>	0.6316233393	<i>Pseudomonadales</i>	0.629122241	<i>Unknown</i>	3.09835970	<i>Barnesiella</i>	2.41613723
<i>Verrucomicrobia</i>	0.96218079948	<i>Negativicutes</i>	0.4939475362	<i>Corynebacteriales</i>	0.575829623	<i>Prevotellaceae</i>	2.18026449	<i>Prevotellaceae UCG-001</i>	2.17964883
Törzs	Osztály	Rend	Család	Nemzetség					
DL									
<i>Actinobacteria</i>	1.3776821185	<i>Bacilli</i>	56.004035651	<i>Lactobacillales</i>	55.86466177	<i>Lactobacillaceae</i>	52.0731793	<i>Lactobacillus</i>	52.0731793
<i>Bacteroidetes</i>	12.627088818	<i>Clostridia</i>	23.436784551	<i>Clostridiales</i>	23.43405173	<i>Ruminococcaceae</i>	11.4854888	<i>Unknown</i>	5.80891780
<i>Cyanobacteria</i>	0.5814475562	<i>Bacteroidia</i>	12.626525430	<i>Bacteroidales</i>	12.42518902	<i>Lachnospiraceae</i>	6.41248084	<i>Bacteroides</i>	5.64176955
<i>Epsilonbacteraeota</i>	0.5006863033	<i>Gammaproteobacteria</i>	2.4160368629	<i>Erysipelotrichales</i>	1.603775531	<i>Bacteroidaceae</i>	5.64176955	<i>Barnesiella</i>	3.61200857
<i>Firmicutes</i>	81.435174314	<i>Erysipelotrichia</i>	1.6037755316	<i>Enterobacteriales</i>	1.349623177	<i>Barnesiellaceae</i>	3.84374064	<i>Streptococcus</i>	3.51223272
<i>Fusobacteria</i>	0.0011154869	<i>Actinobacteria</i>	1.2297694558	<i>Pseudomonadales</i>	0.722580184	<i>Streptococcaceae</i>	3.51245580	<i>Romboutsia</i>	3.21876120
<i>Lentisphaerae</i>	0.0007250664	<i>Campylobacteria</i>	0.5006639639	<i>Micrococcales</i>	0.643161059	<i>Peptostreptococcaceae</i>	3.38306509	<i>Faecalibacterium</i>	2.89338819
<i>Patescibacteria</i>	0.0002788717	<i>Oxyphotobacteria</i>	0.4671450776	<i>Campylobacterales</i>	0.500663963	<i>Unknown</i>	2.11146674	<i>Ruminococcaceae UCG-014</i>	1.85848560
<i>Proteobacteria</i>	3.06876028	<i>Negativicutes</i>	0.3863316562	<i>Chloroplast</i>	0.467145077	<i>Erysipelotrichaceae</i>	1.60377553	<i>[Ruminococcus] torques</i>	1.64577174
<i>Tenericutes</i>	0.217966143	<i>Deltaproteobacteria</i>	0.3846585005	<i>Corynebacteriales</i>	0.463017960	<i>Christensenellaceae</i>	1.35726392	<i>Subdoligranulum</i>	1.42117847

Kiegészítő táblázat 3: Silva és GreenGenes hatékonyságának vizsgálata a felbontó képességre.

Silva taxonómiai adatbázis								
<i>Család</i>			<i>Nemzetség</i>			<i>Faj</i>		
módszer	azonosított	nem azonosított	módszer	azonosított	nem azonosított	módszer	azonosított	nem azonosított
BS	99.49	0.51	BS	96.69	3.31	BS	14.42	85.58
DL	98.13	1.87	RF	97.41	2.59	RF	9.16	90.84
L1	99.71	0.29	L1	95.11	4.89	L1	10.71	89.29
L2	97.85	2.15	L2	96.41	3.59	L2	11.48	88.52
L3	99.50	0.50	L3	98.27	1.73	L3	16.72	83.28
I4	99.25	0.75	P4	94.98	5.02	P4	15.09	84.91
I5	95.04	4.96	P5	94.79	5.21	P5	7.16	92.84
I6	94.65	5.35	P6	94.23	5.77	P6	18.28	81.72
átlag	97.95	2.05	átlag	95.99	4.01	átlag	12.88	87.12
SD	2.03	2.03	SD	1.42	1.42	SD	3.86	3.86
GreenGenes taxonómiai adatbázis								
<i>Család</i>			<i>Nemzetség</i>			<i>Faj</i>		
módszer	azonosított	nem azonosított	módszer	azonosított	nem azonosított	módszer	azonosított	nem azonosított
BS	88.81	11.19	BS	74.81	25.19	BS	44.49	55.51
DL	92.16	7.84	RF	81.99	18.01	RF	56.15	43.85
L1	85.00	15.00	L1	74.35	25.65	L1	50.63	49.37
L2	91.50	8.50	L2	78.77	21.23	L2	51.33	48.67
L3	91.63	8.37	L3	78.65	21.35	L3	48.08	51.92
I4	87.64	12.36	P4	70.31	29.69	P4	41.81	58.19
I5	93.04	6.96	P5	88.59	11.41	P5	68.68	31.32
I6	92.48	7.52	P6	83.46	16.54	P6	52.71	47.29
átlag	90.28	9.72	átlag	78.86	21.14	átlag	51.74	48.26
SD	2.84	2.84	SD	5.80	5.80	SD	8.22	8.22

15.2 Saját közlemények jegyzéke



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/23/2023.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Szilágyi-Tolnai Emese
Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10060120

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Szilágyi-Tolnai, E.**, Fauszt, P., Fidler, G., Pesti-Asbóth, G., Szilágyi, E., Stágel, A., Kónya, J., Szabó, J., Stündl, L., Babinszky, L., Gálné Remenyik, J., Biró, S., Paholcsek, M.: Nutraceuticals Induced Changes in the Broiler Gastrointestinal Tract Microbiota. *mSystems*. 6 (2), 1-25, 2021.
DOI: <https://doi.org/10.1128/mSystems.01124-20>
IF: 7.324
2. Fidler, G., **Szilágyi-Tolnai, E.**, Stágel, A., Gálné Remenyik, J., Stündl, L., Gál, F., Biró, S., Paholcsek, M.: Tendentious effects of automated and manual metagenomic DNA purification protocols on broiler gut microbiome taxonomic profiling. *Sci. Rep.* 10 (1), 1-16, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-020-60304-y>
IF: 4.379

További közlemények

3. Fidler, G., Szilágyi-Rácz, A. A., Dávid, P., **Szilágyi-Tolnai, E.**, Rejtő, L., Szász, R., Póliska, S., Biró, S., Paholcsek, M.: Circulating microRNA sequencing revealed miRNome patterns in hematology and oncology patients aiding the prognosis of invasive aspergillosis. *Sci. Rep.* 12 (1), 1-17, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-022-11239-z>
IF: 4.996 (2021)
4. Fehér, M., Fauszt, P., **Szilágyi-Tolnai, E.**, Fidler, G., Pesti-Asbóth, G., Stágel, A., Szűcs, I., Biró, S., Gálné Remenyik, J., Paholcsek, M., Stündl, L.: Effects of phytonutrient-supplemented diets on the intestinal microbiota of *Cyprinus carpio*. *PLoS One*. 16 (4), 1-24, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0248537>
IF: 3.752





5. **Szilágyi-Tolnai, E.**, Fidler, G., Szász, R., Rejtő, L., Nwozor, K. O., Biró, S., Paholcsek, M.: Free circulating mircoRNAs support the diagnosis of invasive aspergillosis in patients with hematologic malignancies and neutropenia.
Sci. Rep. 10 (1), 1-12, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-020-73556-5>
IF: 4.379
6. Balogh, E., **Szilágyi-Tolnai, E.**, Nagy, B. J., Nagy, B., Balla, G., Balla, J., Jeney, V.: Iron overload inhibits osteogenic commitment and differentiation of mesenchymal stem cells via the induction of ferritin.
Biochim. Biophys. Acta-Mol. Basis Dis. 1862 (9), 1640-1649, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.06.003>
IF: 5.476
7. Balogh, E., Tóth, A., **Szilágyi-Tolnai, E.**, Bodó, T., Bányai, E., Szabó, D. J., Petrovski, G., Jeney, V.: Osteogenic differentiation of human lens epithelial cells might contribute to lens calcification.
Biochim. Biophys. Acta. Mol. Basis Dis. 1862 (9), 1724-1731, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.06.012>
IF: 5.476

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 35,782

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
11,703**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2023.03.23.

