

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**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

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

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az Elméleti orvostudományok tudományágban

Írta: **Szilágyi-Tolnai Emese** okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Sejt- és Immunbiológia doktori iskolája
keretében

Témavezető: Prof. Dr. Biró Sándor

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Szöllősi János, akadémikus
tagok: Gálné Dr. Miklós Ida, PhD
Dr. Kocsubé Sándor, PhD

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet.
2023. június 22. 10 óra

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Fekete Erzsébet, PhD
Dr. Szekeres András, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Szöllősi János, akadémikus
tagok: Prof. Dr. Fekete Erzsébet, PhD
Dr. Szekeres András, PhD
Gálné Dr. Miklós Ida, PhD
Dr. Szekeres András, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, In Vitro Diagnosztikai Tömb
előadóterme, 2023. június 22. 12.00 óra

1. Bevezetés és irodalmi áttekintés

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

Az új generációs szekvenálási (NGS) technológiák széles körű elterjedésének köszönhetően robbanásszerűen nőtt az érdeklődés a mikrobiom megismerésére. 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.

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. 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.

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.

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 mikrobiális ökoszisztémák kutatása fontos tudományterület, intenzív vizsgálatok folynak annak érdekében, hogy a közösségi összetételek gazdaszervezetre gyakorolt élettani hatásait megismerjük. Mind ez ideig a legjobban feltérképezett terület az emberi és állati bélrendszerben élő baktériumok sokasága, de egyrészt az itt élő gombák, archeák és vírusok mintázata és kapcsolata egymással, illetve ezek kölcsönhatása a változó környezeti és életmódtényezőkre is intenzív kutatás tárgya.

A mikrobiom kutatásnak kiemelkedő jelentősége van az állattenyésztésben is.

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. Ennek az intenzív növekedésnek, valamint az állattartás okozta stressz faktoroknak számos negatív hatása figyelhető meg az állatállományban, mint például különböző gyulladós és metabolikus eredetű betegségek. Nem elhanyagolható az állatok antibiotikus kezelése a tartás stresszből adódóan.

Továbbá, a nagyüzemi állattartás során nagy egyedszámú állatállományt tartanak viszonylag kis területen, így a fertőzéses megbetegedések gyakorisága is nagyobb, amelyet az állattenyésztők kisebb/nagyobb mértékű antibiotikus kezeléssel próbálnak elkerülni. A folyamatos kezelés hatására széles spektrumú antibiotikum rezisztencia, valamint a bél-mikrobióta egyensúlyának megbomlása alakulhat ki. 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.

Mіндеzen 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. 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.

2. Célkitűzés

- Munkám egyik célja volt, a különböző technikai torzító tényezők (minta homogenizálás, sejteltárás, DNS izolálás, taxonómiai adatbázis) hatásának vizsgálata a 16 S rRNS gén amplikon szekvenálás eredményére (minőségi olvasatok, diverzitási mutatók, mikrobiális összetétel). Célul tűztük ki a különböző metagenomikai DNS izoláló módszerek optimalizálását. Továbbá, munkám során összehasonlítottam a 16 S rRNS gén amplikon szekvenálás során leggyakrabban használt taxonómiai adatbázisok (Silva, GreenGenes) alkalmasságát, hatását a felbontóképességre.

- Kutatásom másik fő célja, *in vivo* intenzív tartástechnológia mellett nevelt haszonállat etetési kísérlet során a nutraceutikumok (karotinoidok, fruktooligoszacharidok, szimbiotikumok és antocianinok) bél-mikrobiomra gyakorolt hatásának vizsgálata volt broiler csirke modell állatban, 16 S rRNS amplikon gén szekvenálás alkalmazásával. Vizsgáltam, 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.

3. Anyagok és módszerek

3.1 A szekvenálás eredményét torzító technikai tényezők vizsgálata

Kísérleteink során kétféle homogenizálási stratégiát, a direkt (direkt lízis (DL) és indirekt (bakteriális sejtszuszpenzió (BS) módszert hasonlítottunk össze. A sejtek feltárására mechanikai, kémiai lízist és ezek kombinációját alkalmaztuk. A nukleinsavak izolálásához automatizált rendszerű robotikus, kereskedelmi forgalomban kapható izolációs kit-ek és fenol-kloroform-izoamilalkohol (25:24:1) elven alapuló konvencionális izolálási technikákat hasonlítottunk össze. A DNS izolálást követően a mintákon 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.

3.1.1 Bélsár mintagyűjtés a szekvenálás eredményét torzító technikai tényezők vizsgálatára

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 szállítottuk és a visszaérkezést követően a szárazanyagból gDNS-t izoláltunk.

Az izolálást megelőzően a mintákat összekevertük egymással és a továbbiakban a különböző minták elegyét tartalmazó mintával dolgoztunk.

3.1.2 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 készülék alkalmazásával mixeltem a mintát 300 rpm-en, majd centrifugáltuk (300 g) 5 percig. A felülúszókat összegyűjtöttük steril 50 ml-es csövekbe, a mosási lépést háromszor ismételtük meg. Ezt követően a felülúszókat összegyűjtöttük, 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 μ L sejtszuspenziót használtunk minden esetben. 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**).

3.1.3 A sejtek feltárása

Mechanikai lízis: A mechanikai lízis során három a kereskedelmi forgalomban beszerezhető kerámia gyöngyöt – Power Fecal Bead LightCycler®, SeptiFast Lysis kit és MagNa Lyser Green beads – alkalmaztunk. Továbbá a sejtek feltáráshoz standard laboratóriumi vortexet (10 perc 10-es fokozaton vagy 3 perc 10-es fokozaton) és/vagy MagNa Lyser (30 másodperc 5000 rpm) készüléket használtunk. A sejtek feltáráshoz a mintákból a sejtszuspenzió esetében 250 μ L-t a direkt lízis esetében 250 mg alkalmaztunk. 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, ATL+Inhibitex tablettát és BLB lízis puffert használtunk. A sejtek feltáráshoz a sejtszuspenzió esetében 250 μ L-t a direkt lízis esetében 250 mg alkalmaztunk. Az sejtfeltárást követően a mintákat 16000 g-n 1 percig 4°C-on centrifugáltuk, ezután a felülúszót átpipettáztuk egy steril eppendorf csőbe.

Kémiai és mechanikai lízisek kombinációja: Kísérleteink során a sejtfeltárási 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.

3.1.4 DNS izolálás

Automatizált rendszerű izoláló robot: Kutatásunk során a bélsármintákból automatizált robotikus DNS izolálást is alkalmaztunk MagNa Pure 24 készüléken. Az izoláláshoz Pathogén 200 (200 µL kezdeti minta térfogat) és Pathogén 1000 (500 µL kezdeti minta térfogat) protokollokat alkalmaztunk a gyártó utasításai szerint.

DNS tisztító 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) 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 800 µL molekuláris tisztaságú fenol-kloroform-izoamil alkoholt 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, 7.5 M ammónium-acetát (0,5X térfogat egység) és 100 % etanol (2,5 X térfogat egység) 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 mostuk. Ezt követően a DNS-t steril lamináris fülke alatt szárítottuk, és 30 µL steril nukleáz mentes vízben feloldottuk. A mintákat - 20°C-on tároltuk.

3.1.5 Az izolált gDNS minták mágneses gyöngy alapú újra tisztítása sikertelen amplikon PCR-t követően

Bizonyos DNS izolátumok esetében az amplikon PCR sikertelen volt az Agilent 4200 TapeStation automatizált mikrokapilláris gélelektroforézis készüléken történő mérés alapján. Feltételeztük, hogy az izolátumok PCR inhibitorokat tartalmaztak, ezért a mintákat tisztítottuk mágneses elven alapuló KAPA Pure gyöngyökkel a gyártó által javasolt protokoll alapján.

A tisztítást követően az amplikon PCR sikeres volt, a DNS veszteség is minimális volt (<10%).

3.2 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, fruktooligoszacharid, 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, amelyekből 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).

3.2.1 A kísérlet kivitelezése, tartási körülmények, 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).

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. 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.

A bélsármintákat négy alkalommal 7, 19, 31 és 40 napon gyűjtöttük. 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) egyedet jelöltünk meg amelyektől minden alkalommal vettünk bélsár mintát.

A mintákat steril DNS, RNS mentes mintatárolóba gyűjtöttük, jégen szállítottuk és a visszaérkezést követően a szárazanyagból gDNS-t izoláltunk.

3.2.2 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.

3.2.3 Minták homogenizálása, bakteriális sejtek feltárása és DNS izolálás

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

A mintákból bakteriális sejtuszpenziót 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 50ml-es csövekbe és a mosási lépést háromszor ismételtük meg. Ezt követően a mintákat üleptítettük a felülúszókat összegyűjtöttük, majd 30 percig centrifugáltuk őket (13 000 g), a bakteriális üledéket pedig minden esetben 5 ml steril PBS pufferrel szuszpendáltuk fel.

A sejtek feltárásához mechanikai lízist alkalmaztunk. A mintákat Power fecal bead lízis kerámia gyöngyökre pipettáztuk, majd három percig maximum fordulatszámon vortexeltük azokat. Ezt követően a sejtek feltárásához MagNa Lyser (30 másodpercig 5000 rpm-en) készüléket alkalmaztunk. A lizátumokat centrifugáltuk 16000 g-n 1 percig, majd a felülúszót átpipettáztuk steril eppendorf csöbe. A székletmintákból konvencionális fenol-kloroform-izoamil alkohol (25:24:1) izolálási eljárással nyertük ki a DNS-t (3.1.4 fejezet szerint).

3.3 A DNS izolátumok mennyiségi és minőségi ellenőrzése

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

3.4 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 glicerinaldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (GAPDH) primert használva. A szekvenálás minőségi ellenőrzéshez a mintánkhoz 5% PhiX kontrollt alkalmaztunk. Az izolálásokat steril vagy sterilizált eszközökkel nukleáz mentes eppendorffokkal II típusú lamináris fülkében végeztük, a környezeti kontamináció elkerülése céljából.

3.5 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 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 kapcsolunk.

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

A minták koncentrációjának meghatározásához fluorometriás dsDNA assay kitet alkalmaztunk. Az amlikon PCR-t követően a mintáink indexálását végeztük el. A PCR reakció minőségét és az amplikonhosszt (~630 bp) Agilent 4200 TapeStation készülékkel ellenőriztük a gyártó utasításai alapján. A minták koncentrációjának meghatározásához fluorometriás dsDNA assay kitet alkalmaztunk. A mintáink koncentrációját qPCR módszerrel is meghatároztuk. A mintákat két lépésben negyvenezeresére hígítottuk. A PCR reakcióhoz a KAPA Library Quantification kitet használtunk a gyártó ajánlása szerint. A könyvtár végső koncentrációjának meghatározásához figyelembe vettük mind a PCR, mind az Agilent 4200 TapeStation és Fluoreszens qubit méréseket. Az elkészült könyvtárunk koncentrációjának meghatározására fluorometriás dsDNA assay kitet használtunk. A könyvtárunkat 4nM-os koncentrációra hígítottuk ki, majd 0,2 M NaOH oldatot adtunk hozzá, ezt követően 1 percig vortexeltük és 5 percig 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, ezt követően 5 µl 4nM-os PhiX könyvtárhoz 5 µl 0.2M-os NaOH oldatot adtunk. A mintát vortexeltük, majd szobahőn inkubáltuk 5 percig. A PhiX könyvtárat 4pM-os koncentrációra hígítottuk. A könyvtárat egybeöntöttük az alábbiak szerint, 30 µl hígított és denaturált PhiX könyvtárat mértünk 570 µl hígított és denaturált ampikon (minta) könyvtárhoz. Az oldatot vortexeltük, majd 96°C-on inkubáltuk 2 percig, ezt követően a mintát jeges vízfürdőben inkubáltuk 5 percig, majd az Illumina MiSeq reagens kazettába betöltöttük. Illumina MiSeq platformon „paired-end” szekvenálást (2x301 nt) végeztünk.

3.6 Bioinformatikai analízis

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

Az alfa és beta diverzitási adatokat a qiime 2 szoftver segítségével kaptuk meg. A béta diverzitási mátrixokat (PCoA) Emperor program segítségével készítettük el. Az ábrák elkészítéséhez R és Python programokat alkalmaztunk.

3.7 Szekvenálási nyersadatok elérhetősége

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

3.8 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. A csoportok közötti béta diverzitás különbségét „Permutational multivariable of variance analysis” (PERMANOVA) pseudo 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.

4. Eredmények

4.1 A szekvenálás eredményét torzító technikai tényezők hatásának vizsgálata

Kísérleteinket a különböző DNS izolálási módszerek 16 S rRNS gén alapú ampikon szekvenálás (Illumina MiSeq platformon) eredményére kifejtet hatásának vizsgálatával kezdtük meg. 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.

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

A 16 S rRNS gén alapú ampikon 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 ($\text{ng}/\mu\text{L}$), minőségi paramétereit (230/280, 260/280) és az integritását (HMW, LMW).

Az izolált DNS minták 16,6 %-ban a könyvtárkészítés során alkalmazott ampikon PCR nem ment végbe. Ezen minták 87,5%-ban konvencionális DNS izolálást alkalmaztunk. A sikertelen ampikon PCR-t követően a mintákat mágneses elven alapuló KAPA Pure gyöngyökkel tisztítottuk (a veszteség minimális volt ($<10\%$). Tisztítást követően az ampikon PCR sikeresen végbe ment minden minta esetében.

Kétféle minta homogenizáló stratégia a bakteriális sejtszuszpenzió (BS) és Direkt lízis (DL) hatékonyságát hasonlítottuk össze. A DL 1,5 X nagyobb DNS kihozatalt ($\text{ng}/\mu\text{L}$) 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, mechanikai és ezen lízisek kombinációit is. 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.

Kísérleteink során különböző DNS izoláló módszerek – a MagNa Pure 24 automatizált rendszerű izoláló robot, három kereskedelmi forgalomban beszerezhető Qiagen izoláló kit és fenol-kloroform-izoamilalkohol (25:24:1) elven alapuló konvencionális izolálási technikák – hatékonyságát hasonlítottunk össze. 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. A MagNa Pure 24 automatizált robotikus platform nagy mennyiségű és jó minőségű 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 enzimatikus 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 technikáknak milyen hatása van a könyvtárkészítés során alkalmazott amplicon PCR végbemenetelére (sikerült, nem sikerült). 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. Adataink alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a DNS tisztasága és integritása nagymértékben befolyásolja az amplicon PCR sikeres végbemenetelét.

4.1.2 A különböző DNS izolálási technikák hatása 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 amplicon szekvenálásnál a végeredményként kapott szekvenálási mutatók és az alfa diverzitási mérőszámok értékeit.

Az általunk alkalmazott kísérleti rendszerben a BS homogenizált konvencionális DNS izolálási módszer eredményezte a legnagyobb biodiverzitást, különösen a kémiai és a vegyes sejtfeltárás alkalmazásával (kivéve a Faith's filogenetikai diverzitási index esetében). A BS kapcsolt QIAamp DNA Stool Mini Kit módszer esetében kaptuk a legmagasabb Faith's filogenetikai diverzitási mutatót. Az QIAamp Power Fecal DNA és DNeasy PowerSoil Kit 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 protokoll alkalmazásánál magasabb diverzitási és szekvenálási értékeket tapasztaltunk, mint a Pathogén 1000 protokoll esetében. Továbbá, konvencionális izolálás után a Pathogen 200 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 estében kaptuk a legalacsonyabb biodiverzitási értékeket. Érdekes, hogy ugyanezen módszer sejtszuspenzióval társított mintahomogenizálással a legjobb eredményt érte el. A Pathogén 200 protokoll a legmagasabb diverzitási értékeket, ugyanakkor a legkisebb read számot eredményezte.

4.1.3 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. A közösségek egymásközötti változatoságának 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. 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. Általánoságban elmondható, hogy az általunk alkalmazott lízis protokolloknak nem volt számottevő hatásuk a klaszter profilokra, 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. A 3. klaszter szoros összefüggést mutat a baktériumszuspenziók és a konvencionális DNS izoláló módszerek között. Továbbá, megfigyeltük, hogy az általunk alkalmazott izolációs kiteknek nem volt prominens hatása a béta diverzitási profilokra. 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.

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.

4.1.4 A különböző lízis protokollok hatása az alfa diverzitási mutatók értékeire

Vizsgáltuk a különböző lízis protokollok hatását a Faith's filogenetikai diverzitási mutató értékeire. A mechanikai és kémiai lízisek kombinációja szignifikánsan magasabb értéket eredményezett, mint a kémiai, illetve mechanikai lízisek önmagukban. A Shannon és a Chao-1 alfa diverzitási értékek esetében is ugyanez a tendencia figyelhető. A Simpson diverzitási index esetében nem tapasztaltunk különbséget az egyes bakteriális sejtek feltárására alkalmazott lízisek összehasonlítása. Eredményeink alapján összeségben elmondható, hogy a mechanikai és kémiai lízisek kombinációja eredményezte a legmagasabb alfa diverzitási mutatókat összehasonlítva a többi sejteltáró technikával.

4.1.5 A bakteriális sejteltáró protokollok hatása a DNS hozamra, tisztaságra és a közösségi diverzitási mutatókra

Összehasonlítottuk a mechanikai és kémiai lízisek esetében alkalmazott különböző protokollok hatékonyságát az izolátumok DNS koncentrációjára, könyvtárkészítés során alkalmazott amplitikon PCR végbemenetelére és a Shannon és a Faith's filogenetikai diverzitási mutatókra.

A mechanikai lízis során a sejteltáráshoz különböző kereskedelmi forgalomban kapható lízis gyöngyök (PowerFecal, SeptiFast és Green beads) hatásait hasonlítottuk össze. A kémiai lízishez ATL, BLB, valamint InhibitEx tablettát ATL pufferben beoldva alkalmaztunk. 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.

Számottevő különbség figyelhető meg továbbá a DNS mennyiségében a mechanikai és a kémiai lízisek alkalmazása között.

A kémiai lízis esetében az ATL puffer alkalmazása során kaptuk a legmagasabb DNS koncentrációt.

Az InhibitEX tablettá előkezelése meglehetősen jó minőségű tisztított DNS-t eredményezett, amelyek összességében pozitív hatást gyakoroltak a PCR reakciók sikeres végbemenetelére, azonban ezzel a módszerrel alacsony mennyiségű DNS-t kaptunk. Továbbá, az InhibitEX tablettá alkalmazása alacsonyabb Shannon diverzitási indexet eredményezett, mint az ATL és BLB puffer alkalmazása.

Mind az ATL, mind a BLB pufferek használata nagy mennyiségű DNS kinyerését eredményezte, ami magas alfa diverzitási értékekkel társult.

4.1.6 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. 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 sejtfeltáró technikák ugyanazon Gram megoszlásokat eredményeztek. A DNS izoláló módszerek összehasonlítása során különböző Gram eloszlásokat figyeltünk meg.

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 kiegyensúlyozott Gram-pozitív és Gram-negatív arányokat eredményezett. Az automatizált robotikus és a konvencionális DNS extrakciós módszer esetében ugyanazon Gram arányokat figyeltünk meg.

A minta homogenizálásának megválasztása nem fejtett ki jelentős hatást a székletbaktériumok Gram-eloszlására, amikor a DNS-t szilícium-dioxid-oszlopon alapuló módszerekkel nyertük ki.

4.1.7 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. A „core” mikrobiom eloszlásának komplex összehasonlítását törzs és osztály rendszertani kategóriában végeztük el.

A különböző minta homogenizáló módszerek (BS, DL) kifejezett különbségeket eredményeztek a „core” mikrobiomot alkotó baktériumok relatív mennyiségeiben. 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.

Verrucomicrobia mennyisége szignifikánsan magasabb volt a BS kapcsolt kevert lízis (L3) (BS: 1,27%, DL: 0,18%) és konvencionális DNS izolálás (I6) (BS: 2,62%, DL: 0,3%) esetében, mint ugyanezen módszerek DL homogenizált mintáiban. Az *Actinobacteria* (DL: 1,14%, BS: 1%) és a *Tenericutes* (DL: 0,2%, BS: 0,16%) baktérium törzsek között számottevő különbségek nem mutathatók ki a különböző módszerek között.

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 és DNS izoláló módszereknek nem volt jelentős torzító hatása az egyensúlyi mikrobiom összetételére.

4.1.8 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. 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 részhalmazait 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 és 1000 protokollok összehasonlítása során nem tapasztaltunk számottevő különbséget a minták bakteriális összetételében.

A DL kapcsolt MagNa Pure24 izoláló robot 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 esetében a különböző mintahomogenizáló és sejtfeltáró technikák jelentősen befolyásolták a módszer hatékonyságát a bakteriális filotipizálás tekintetében.

A BS kapcsolt konvencionális izolálási technikák alkalmazása számtalan baktérium eredményes kivonására alkalmazható (mint például *Bacteroidetes*, *Epsilonbacteria*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia* (törzs) *Bacillales*, *Selenomonadales*, *Erysipelotrichales*, *Bacteroidales*, *Campylobacterales*, *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. Értékeltek a különböző kereskedelmi forgalomban beszerezhető Qiagen izoláló kitek hatékonyságát is. Azt tapasztaltuk, hogy a DNS izolációs kitek alkalmazása nem eredményezett jelentős különbségeket az egyes bakteriális taxák meghatározása során.

4.1.9 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 Silva-t (S) hasonlítottuk össze. 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. 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. A Silva adatbázis esetében a minta feldolgozásának megválasztása (BS kontra DL) nem volt szignifikáns hatással a rangsorolt olvasatainak arányára család és nemzetség taxonómiai szinten.

Ellenben a faji szintű azonosítás során a BS minták (14,42%) esetén 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. 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. Eredményeink alapján elmondható, hogy a sejtfeltárás megválasztása jelentősen befolyásolta az azonosított read-ek mennyiségét.

Az általunk alkalmazott kísérletes rendszerben a mechanikai sejtfeltárással kaptuk a legrosszabb eredményt nemzetség és család taxonómiai szinten. A faji szintű azonosítás esetében pedig a vegyes lízis teljesített a legrosszabbul. Vizsgáltuk a különböző metagenomikai izolálási stratégiák hatékonyságát. Eredményeink alapján elmondható, hogy a Qiagen izoláló kitek alkalmazásával értük el a legjobb eredményt minden taxonómiai szinten, utána pedig a konvencionális DNS izolálás következett. Figyelemre méltó különbségeket figyeltünk meg a két adatbázis faji szintű rangsorolási képessége 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. A Silva és GG összesen 87 fajt tudtak azonosítani, ezek közül 13 olyan faj volt, amelyet mindkét adatbázis azonosított. A két adatbázis által azonosított 30 legerjedtebb faj közül 4 olyan faj (*Lactobacillus vaginalis*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus pontis*, *Bacteroides uniformis*) volt, amelyek mindkét adatbázisban hasonló relatív frekvenciával megtalálhatók.

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

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

4.2.1 A nutraceutikumok hatása a madarak súlygyarapodására

Kutatásunk során vizsgáltuk a nutraceutikumok hatását a madarak növekedési teljesítményére. 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 kontroll csoportok [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).

4.2.2 Mikrobiom súlykorreláció

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

A *Bacillales*, *Clostridiales*, *Corynebacteriales*, *Enterobacteriales*, *Micrococcales*, *Rhizobiales* esetében közepesen pozitív (életkor- és/vagy kezelés-specifikus) asszociációt találtunk a testtömeggel (r érték $> 0,4$).

Vizsgáltuk az életkor hatását a bélbaktériumok és a súlygyarapodás közötti összefüggésekre. A broiler csirkék fejlődési stádiumának kezdetén 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. 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.

4.2.3 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. Az alfa diverzitás esetében a Faith filogenetikai, Chao-1, Shannon és Simpson 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 a kontroll csoport egyedeihez képest.

Ez a pozitív hatás a Faith filogenetikai diverzitás esetében szignifikáns volt a FOS, SZIM és ANT kezelés hatására összehasonlítva az alapdiétát kapó csoportokkal. A Shannon és Simpson diverzitási indexek esetében nem mutattunk ki szignifikáns változást a nutraceutikumok hatására az NK csoporthoz képest. Azonban elmondható, hogy a Faith filogenetikai diverzitási mutató esetében leírt diverzitási trendek ezen diverzitási mérőszámok esetében is megfigyelhetőek, szignifikáns különbség nélkül. A legnagyobb közösségi diverzitási értéket az állatok 31 napos korában a karotinoid szuplementált csoportban mértük.

Kutatásunk további tárgyát képezte a különböző természetes hatóanyagok és az állatok korának hatására bekövetkező változások vizsgálata a béta diverzitási mérőszámok értékeire. 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.

4.2.4 A madarak korának és a nutraceutikum kezelések hatásának vizsgálata 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. 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 amplikon szekvenálás eredménye alapján a különböző kísérleti paraméterek esetében a prokarióta doménon belüli főbb rendek és nemzetségek azonosak voltak, de a relatív mennyiségekben eltérések figyelhetőek 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 *Enterobacterales* (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 ($97,5\% \pm 3,3\%$), valamint a nutraceutikumoknak nem volt jelentős hatása a mennyiségére. A *Clostridiales* kisebb mennyiségben volt kimutatható a β -glükán (PK: $7,4\% \pm 10,4\%$), a fruktooligoszacharid (FOS: $7,7\% \pm 6,0\%$) és az antocianin (ANT: $7,0\%$) kezelt állatokban, mint a negatív kontroll csoport egyedeiben (NK: $23,3\% \pm 40,4\%$) (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 mikrobiomban az egyensúlyi mikrobiom 7,1%-át alkotta. Legnagyobb mennyiségét (NK: 9,2 %) a kontroll alaptakarmánnyal etetett állatok mintáiban mértük.

Nyolc nemzetséget – *Lactobacillus* ($55,7\% \pm 27,3\%$), *Enterococcus* ($19,0\% \pm 23,8\%$), *Streptococcus* ($7,7\% \pm 6\%$), *Escherichia-Shigella* ($6,9\% \pm 7,9\%$), *Faecalibacterium* ($3,5\% \pm 7,1\%$), *Turicibacter* ($1,1\% \pm 2,5\%$), *Romboutsia* ($1,7\% \pm 2,6\%$) és *Aerococcus* ($5\% \pm 1,1\%$) – azonosítottunk az állatok egyensúlyi mikrobiomjában. A *Lactobacillus* egyértelmű dominanciát mutatott a kísérlet során, legmagasabb szintjét a karotinoid kezelt 31 napos állatokban (KAR: $79\% \pm 0,6$) 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: $34,7\% \pm 24,9\%$), míg az idősebb állatoknál drasztikus csökkenését figyeltünk meg (31 és 40 napos: $3,2\% \pm 4,9\%$). Az állatok növekedési stádiumának a végén (41 nap) a fruktooligoszacharidok növelték az *Enterococcus* relatív mennyiségét (FOS: $6,8\% \pm 6,4\%$, szemben a többi kezelési csoporttal, $2,5\% \pm 2,2\%$).

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

Az *Escherichia-Shigella* nagyobb mennyiségben volt kimutatható a szimbiotikum ($12 \pm 0,3$) és karotinoid ($9,1 \pm 0,1$) hatóanyaggal dúsított takarmányt fogyasztott állatok bél-mikrobiomjában, mint a kontroll csoport ($2,23 \pm 0,28$) 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: $13 \pm 0,08$), szimbiotikum (SZIM: $6,8 \pm 0,02$) és antocianin ($12 \pm 0,2$) csoportok esetében emelkedett mennyiségét mértük a kontroll csoporthoz (NK: $3,12\% \pm 0,018$) képest.

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

Aerococcus az állatok korai életszakaszában (7 napos) nem volt kimutatható, legnagyobb mennyiségét a 40 napos (5,8 %) állatok bél-mikrobiomjában mértük. A nutraceutikum kezelésnek nem volt számottevő hatása a mennyiségére.

4.2.5 Nutraceutikumok által okozott mikrobiális ujjlenyomatok

Vizsgáltuk a nutraceutikumok hatását a bél-mikrobióta összetételére család taxonómiai szinten. A negatív kontrol (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.

4.2.6 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.

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. Továbbá, az antocianin kezelt csoport egyedeiben mennyisége szignifikánsan emelkedett az állatok fejlődési stádiumának a végén (40 nap) kontroll csoporthoz képest.

A *Lactobacillus* relatív gyakoriságában bekövetkezett változások 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, mint, a karotinoid, fructooligoszacharid és antocianin tartalmú takarmánnyal kezelt madarakban.

A *Subdoligranulum* nemzetség számottevő emelkedését figyeltük meg a karotinoid kezelést kapott 7 napos állatokban a negatív kontroll csoporttal összehasonlítva. A broiler csirkék 40 napos korában további szignifikáns növekedést tapasztaltunk a *Subdoligranulum* relatív gyakoriságában az antocianin kezelés következtében.

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* és a *Ruminococcus* baktériumok relatív mennyiségeit.

A szimbiotikumok jótékony hatást gyakoroltak a *Bacteroides* populáció mennyiségére.

4.2.7 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. A *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Bacteroides* és *Peptostreptococcus* baktériumok komplex kapcsolataik 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 csoporthoz (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 csoporthoz (NK) képest.

4.2.8 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. A broiler csirkék bél-mikrobiótájában összesen 7 törzset azonosítottunk.

Ezek közül a *Firmicutes* ($89,5\% \pm 7,8\%$), a *Proteobacteria* ($7,3\% \pm 7,0\%$) és a *Bacteroidetes* ($1,3\% \pm 2,7\%$) voltak a legdominánsabbak, ezeket követték az *Actinobacteria*, *Tenericutes* és *Verrucomicrobia* baktériumok.

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. 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, majd a log₂ F/B arányok jelentős csökkenését tapasztaltuk az állatok növekedése során.

A különböző kísérleti csoportok esetében a legmagasabb log₂ F/B arány a β -glükán (7,14) kezelt madarakban, míg a legalacsonyabb érték az antocianin (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. 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.

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 kezelt állatokban a negatív kontroll csoporthoz képest. A *L. aviarius* jelentős növekedését tapasztaltuk a szimbiotikum és az antocianin kísérleti csoport egyedeinek bél-mikrobiótájában. A *Lactobacillus alvi* számottevő emelkedését figyeltük meg az antocianinnal kezelt állatok bél-mikrobiótájában a negatív kontroll egyedeihez képest.

A bakteriális hasmenéses gasztroenteritist okozó *Campylobacter jejuni* kis relatív előfordulási gyakorisággal (<1%) volt kimutatható az állatok mikrobiális konzorciumában.

Minden kísérleti csoportunkban hasonló alacsony relatív gyakorisággal mutattuk ki az anaerob *Anaeromassilibacillus senegalensis* baktériumot.

A bél egészségének fenntartásában fontos szerepet játszó *Bacteroides gallinaceum* csak a karotinoiddel és az antocianinnal etetett állatokban volt nyomon követhető. A butirátot termelő *Butyricoccus desmolans* az összes kísérleti csoportban alacsony relatív gyakorisággal volt kimutatható (különbségek nélkül). Az újonnan leírt anaerob, nem spóraképző, zsírsav anyagcserében fontos szerepet játszó *Traorella massiliensis* nagyobb mennyiségben volt kimutatható az antociannal kezelt madarak bél-mikrobiótájában, mint a többi kezelési csoport esetében. Ezenkívül a SCFA termelő *Pseudomonas fragi* az antocianin kezelt állatokban volt csak megfigyelhető.

4.2.9 Diéta specifikus mikrobiális interakciók

Vizsgáltuk, hogy melyek, azok a baktériumok amelyek a különböző kísérleti beállítás hatására együtt változnak korrelálnak egymással. Spearman korrelációt számoltunk a családok relatív frekvenciája között a különböző kísérleti beállítások figyelembevételével. Általánosságban elmondható, hogy a karotinoid, szimbiotikum kezelt és a fruktooligoszacharid, antocianin kezelt csoportok között hasonló korrelációs mintázatok mutatkoztak.

A nutraceutikumok hatását is vizsgáltuk a családok közötti összefüggésekre. 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).

5. Megbeszélés

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

Napjainkban az NGS technikák alkalmazása egyre nagyobb teret hódít 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 tényező befolyásolhatja. Ilyenek többek között a nukleinsav kinyerésének hatékonysága az izolátumok minősége, mennyisége és töredezettsége, valamint az adatelemzés során alkalmazott bioinformatikai analízis, melyek döntően meghatározzák a vizsgálat végeredményét.

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 kihozatalt eredményezett, mint az indirekt mintahomogenizáló stratégia (BS) alkalmazása. Azonban fontos megjegyezni, hogy a DL mintahomogenizálás esetében alacsony tisztaságú DNS izolátumokat kaptunk. 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. Fontos megjegyeznünk azonban, hogy a konvencionális DNS izolálási technika alkalmazása esetében alacsony DNS minőségi paramétereket kaptunk a többi módszerrel összehasonlítva.

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 komponenszt eredményeznek a mintákban. A PCR inhibitorok a könyvtárkészítés során alkalmazott PCR reakciókat gátolhatják, ez által hatásuk van a mikrobiális összetétel meghatározására. 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 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 sejtfala miatt rosszabb hatékonysággal nyerhető ki a DNS. Ennek eredményeként egy gyengébb lízis alkalmazása során, ezek a fajok az eredeti összetételhez képest alulreprezentálva jelennek meg. 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. Ezen megfigyelések ellentétben állnak saját eredményeinkkel, miszerint a mechanikai lízis alkalmazása nem eredményezett számottevő DNS töredezettséget. Megállapítottuk továbbá, hogy a különböző sejtfeltárási 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 sejtfeltárási technikával.

A DNS hozamot gyakran használják kritériumként a mikrobiális közösségekből történő genomi DNS izolálására az egyes DNS izolálási módszerek hatékonyságának értékelésére. A mikrobiális diverzitás reprezentációját azonban, amely gyakran a közösségi elemzés fő célja, általában nem tekintik a DNS kivonási módszerek értékelési kritériumának. A DNS hatékony kinyerése lényeges lépés a mikrobiális diverzitás jellemzésére szolgáló valamennyi tenyésztéstől független megközelítésben. Annak megállapítására, hogy a magasabb DNS-hozam biztosítja-e a mikrobiális diverzitás jobb reprezentációját fontos a különböző metagenomikai DNS izolálási protokollok hatékonyságának vizsgálata az alfa diverzitási mutatók tekintetében. Vizsgálataink tárgyát képezte a különböző technikai torzító tényezők hatásainak vizsgálata az alfa diverzitási és szekvenálási mutatók értékeire.

A diverzitás a vizsgált minta komplexitását tükrözi, minél nagyobb az értékük annál gazdagabb a minta. A kapott eredményeink alapján elmondható, hogy a minta homogenizáló stratégiák közül a bakteriális sejtszuszpenzió alkalmazásával érhető el a legnagyobb fajgazdagság 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 lízis alkalmazásával a vastag peptidoglikán sejtfallal rendelkező Gram-pozitív baktériumok is feltárhatók. Úgy gondoljuk, hogy a vegyes lízis alkalmazása lehetővé teszi a széklétben 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. Eredményeink alapján elmondható, hogy az automatizált DNS izoláló robot magas read számot és diverzitási értékeket eredményezett homogenizálási stratégiától függetlenül.

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. Összeségben 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.

Jelenleg számos kereskedelmi forgalomban beszerezhető DNS izoláló kit kapható, ami nagy tisztaságú és reprodukálható DNS izolátumot eredményez, viszont ezen izoláló kitek kihozatala alacsony. A kisebb DNS mennyiség miatt az eredmények torzulhatnak, ami a mikrobiális konzorciumban a kis egyedszámban jelenlévő fajok azonosítását nehezíti meg. 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.

Tudomásunk szerint ez volt az első eset, amikor a Roche MagNA Pure 24 DNS-tisztító rendszert metagenomikus célokra alkalmaztak. 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.

Jelenleg számos kutatás a költséghatékony konvencionális fenol-kloroform DNS izoláló módszert alkalmazza mikrobiális sejtek DNS tartalmának kinyerésére. 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 leoptimálisabban 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 kivonja 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 és a költséghatékonyságukat. Továbbá fontos értékelési szempont volt a különböző DNS izolálási stratégiák esetében a mikrobiális diverzitás és szekvenálási mutatók értékeinek tapasztalt különbségek összehasonlítása. Mindezen tényezők figyelembe vételével, a homogenizálási stratégiák közül a bakteriális sejtszuszpenziót választottuk ki, mivel nagyobb diverzitást eredményezett, mint a DL és standardizálható eljárás. A sejteltávolító 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 által.

5.2 Természetes bioaktív komponensekben gazdag nutraceutikumok hatásainak vizsgálata broiler csirke bél-mikrobiom összetételére és diverzitására

Az elmúlt két évtized során a baromfi ipar az egyik leghatékonyabb fehérjetermelő ágazattá vált. 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. Ez az extrém növekedés azonban számos patológiás 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. Ezen fertőző betegségek kezelésére rutinszerűen antibiotikumot kapnak az állatok. Az antibiotikum terápia alkalmazása azonban számos nemkívánatos következménnyel járhat, mint például a bél-mikrobióta egyensúlyának megbomlásával, valamint az antibiotikum rezisztens baktériumok megjelenésével.

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.

Számos kutatás alapján feltételeztük, hogy a nutraceutikumok, különösen a szimbiotikumok alkalmazása fokozza az állatok testtömegnövekedését. Ezen feltételezésünket eredményeink nem támasztották alá, a nutraceutikum kezelésnek nem volt pozitív hatása az állatok tömeggyarapodására. Ennek a különbségnek hátterében a különböző környezeti tényezők (elhelyezés, tartástechnológia, alaptakarmány összetételének különbségei), a gazdaszervezet eltérő genetikája és életkorra is állhat.

Fontos megjegyezni, hogy célunk nem az állatok növekedési ütemének fokozása volt, hanem olyan takarmányadalékanyagok előállítását, ami javítja az általános egészségi állapotukat a bél-mikrobióta modulációja által. Érdekes 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. Noha eddig kevés információ van arra vonatkozóan, hogy az antocianin milyen molekuláris mechanizmusok által fejti 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.

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. Kutatásunk során meghatároztuk a Ross 308 broiler csirkék bél-mikrobiom összetételét. Más kutatások eredményeivel összhangban a *Firmicutes* volt a legnagyobb mennyiségben kimutatható törzs, amit a *Proteobacteria*, *Bacteroides*, *Actinobacteria*, *Tenericutes* és *Verrucomicrobia* baktériumok követték. 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 szelektív 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. Szerepet játszik a bélhám integritásának fenntartásában is. Mindezek mellett az *Akkermansia* mennyiségének emelkedése és a zsigeri zsírlerakódás így a testtömeg között negatív korrelációt figyeltek meg. 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 gyulladós folyamatok kialakulásának gátlásában azáltal, hogy növelik a jótékony *Akkermansiaceae* mennyiségét a csirkék bél-mikrobiomjában.

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 kórokozók fokozott kolonizációra való hajlamával társul. A GIT-mikrobiom elmozdulása a jótékony, hasznos baktériumok felé javíthatja a gazdaszervezet egészségi állapotát.

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. Eredményeink összefüggésben 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.

Mivel az eddigi tudományos eredmények arra utalnak, hogy a nutraceutikumok hatékonyan növelik a különböző SCFA termelő baktériumok mennyiségét, 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 gyulladós bélbetegségben, 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 meghatározása céljából. Eredményeink alapján elmondható, hogy az antocianin pozitív hatását figyeltük meg a *Faecalibacterium* mennyiségére a kontroll csoport egyedeihez képest az állatok fejlődési stádiumának a végén.

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 kezelésekre hatására nagyobb számban voltak kimutathatók a csirkék bél-mikrobiomjában, mint a kontroll csoport egyedeiben.

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. Feltételezhető, hogy a patológias folyamatok kialakulása és a bél-mikrobiom összetételének és diverzitásának változása között jelentős összefüggés van. Megvizsgáltuk a szakirodalmi adatok alapján kiválasztott patogén baktériumok mennyiségi összetételének változását a különböző kísérleti csoportok egyedeinek bél-mikrobiomjában.

A *Clostridium* nemzetség számos tagja fontos jótékony hatással bír, vitaminokat, mikrotápanyagokat (tiamin, riboflavin, nikotinamid, pantoténsav, biotin) és neurotranszmittereket szintetizálnak a gazdaszervezet számára. 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.

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.

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 opportunista korokozó *Alcaligenes faecalis* alacsony relatív gyakorisággal alkotta az alaptakarmánnyal etettet állatok bél-mikrobiomját, ezzel szemben a nutraceutikumokkal etettet állatok mintáiban egyáltalán nem volt kimutatható.

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 amplikon szekvenálás eredménye alapján megállapítottuk, hogy a prokarióta doménen 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.

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.

6. Összefoglalás

Kutatási 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 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.

Kutatásunk 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*, *Butyricicoccus*, *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.

7. Köszönetnyilvánítás

Ezúton mondok köszönetet azoknak, akik bármilyen módon hozzájárultak az értekezésem létrejöttéhez. Mindenekelőtt hálásan köszönöm témavezetőmnek **Prof. Dr. Biró Sándornak** és **Dr. Pahalcsék 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** segítségét, szakmai tanácsait. Köszönöm **Oláh Zsuzsanna** PhD referensnek, hogy bármilyen problémám volt mindig számíthattam a segítségére.

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.

Szeretném megköszönni családom és barátaim támogatását, biztatását, akik mindvégig mellettem álltak és kitartóan támogattak. Külön köszönöm **édesanyám**, **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 disszertációmak drága kislányomnak **Szilágyi Emmának** ajánlom, aki bearanyozza az életünk minden egyes másodpercét. Köszönöm, hogy ilyen jó, türelmes és megértő gyermek vagy.

8. Függelék - 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., Pólska, 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, B., 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 microRNAs 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

Total IF of journals (all publications): 35,782

Total IF of journals (publications related to the dissertation): 11,703

The Candidate's publication data submitted to the iDEa Tudóstér have been validated by DEENK on the basis of the Journal Citation Report (Impact Factor) database.

18 January, 2023

