

DIPLOMADOLGOZAT

Jónás Regina Martina

2024



Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem

Szent István Campus

Genetika és Biotechnológia Intézet

Mezőgazdasági biotechnológia szak

**Növényi kivonatok bélmikrobiótára gyakorolt
hatásának vizsgálata**

Belső konzulens: Dr. Juhász Ákos
Tudományos főmunkatárs

**Belső konzulens
intézete/tanszéke:** Mikrobiológia és Alkalmazott
Biotechnológia Tanszék

Készítette: Jónás Regina Martina

1. Tartalom

1. Tartalom	1
2. Bevezetés.....	3
3. Célkitűzések	5
4. Irodalmi áttekintés	6
4.1. A bélrendszer meghatározása (Gastrointestinalis traktus [GIT]):.....	6
4.2. Mikrobiális közösségek	7
4.2.1. Bélmikrobiota	8
4.2.2. Bélmikrobiom homeosztázis.....	9
4.2.3. Diszbiózis	9
4.2.4. Az immunrendszer aktiválása	10
4.3. A bélmikrobiom működése és szerepe.....	11
4.3.1. Anyagcsere-aktivitás	11
4.3.2. Hormonális funkciójú metabolitok	12
4.3.3. A bélmikrobiótát befolyásoló tényezők	13
4.3.4. Plazmid-kódolt funkciók.....	13
4.4. Madarak	14
4.4.1. A baromfi bélmikrobiótájának sajátosságai.....	15
4.4.2. A vékonybél mikrobióta jellemzése a tyúk fajban	16
4.4.3. Vakbél mikrobióta jellemzése	17
4.4.4. A bél mikrobióta hatása a termelési paraméterekre	18
4.5. Takarmánykiegészítők.....	19
4.5.1. Antibiotikumok.....	19
4.5.2. Antibiotikumok alternatívái.....	20
4.5.3. Savanyítók	20
4.5.4. Probiotikumok.....	21
4.5.5. Prebiotikumok.....	22
4.5.6. Szimbiotikumok	23
4.5.7. Növényi kivonatok alkalmazása takarmány kiegészítőként.....	23
4.5.8. Polifenolok általános jellemzése	24
4.5.9. Szőlőmagkivonat.....	25
5. Anyag és módszerek	27
5.1. Bélsárminták homogenizálása, előkészítése és feldolgozása.....	27

5.2. Tenyésztett mikrobák csíraszám meghatározása.....	27
5.3. Alkalmazott táptalajok	28
5.4. A <i>Salmonella</i> táptalajok tesztelésére alkalmazott mikrobák	32
5.6. Statisztikai elemzés.....	33
6. Eredmények és értékelésük	34
6.1. <i>Salmonella</i> specifikus kimutatására alkalmas táptalajok tesztelése	34
6.2. <i>Salmonella</i> specifikus kimutatására bélsár mintákból	36
6.3. A különböző szőlőmagkivonat tartalmú takarmányok mikrobiótára gyakorolt hatásának vizsgálata broilercsirkékben.....	38
6.3.1. Begyminták eredményei:	38
6.3.2. Vakbélminták eredményei:	40
6.3.3. Székletminták eredményei:	42
6.3.4. Begy, vakbél és székletminták összehasonlítása:.....	45
7. Következtetések és javaslatok.....	46
8. Összefoglalás	47
9. Köszönetnyilvánítás	49
10. Források.....	50
11. Táblázatok	58
11. Hallgatói nyilatkozat	60
12. Konzulensi nyilatkozat	61

2. Bevezetés

Az állatok takarmányozása már a kezdetek óta jelentős szerepet tölt be az állattartásban, mely az gazdálkodók gyakorlati tapasztalataival, és az egyre intenzívebb genetikai potenciállal párhuzamosan fejlődött az évezredek során. Az elmúlt 20 évben a baromfitartás és takarmányozás robbanásszerű növekedést mutat, a baromfiágazat immár vezető pozíciót tölt be termelés, húsfogyasztás és jövedelmezőség tekintetében. A növekvő igények kielégítésére 1961 óta a világ baromfihústermelése majd 16-szorosára növekedett 2023-ra, 9 millió tonnáról 142 millió tonnára (Faostat, 2023). Hazánkban 2022-ben a hústermelés csaknem 60%-a baromfihús volt (KSH, 2022). A rendelkezésünkre álló termőterület mely a humán élelmiszer és gazdasági haszonállatok takarmányigényinek fedezésére hasznosíthatunk rendkívül limitált, új, termelésbe vonható terület már nem elérhető. Sőt, leginkább a termőterületek kimerülése a jellemző. Ebből kifolyólag fontos, hogy olyan új alapanyagokat, melléktermékeket, takarmánykiegészítőket keressünk és alkalmazzunk amik javítják a takarmányhasznosítást, segítik az egyedek genetikai potenciáljának kihasználását, emellett könnyen kezelhetőek, hozzáférhetőek, és nem hordoznak környezetre, állat, illetve humán egészségre veszélyt.

Az intenzív állati termék termelési körülmények több szempontból megnehezítik, hogy az állatok a genetikai potenciáljuk maximumát tudják adni. A zsúfolt és nem természetszerű telepi körülmények nagy stresszhatást jelentenek az állatok számára, ez több szempontból is negatív hatással van az állatok teljesítményére, immunrendszer alapállapotára és a bélmikrobiomra is. A patogén mikrobák elszaporodása, fertőzések, járványok kialakulása a nem megfelelő tartási körülmények között jelentősen csökkentik a termelékenységet. Állomány szinten a gyógyszerek alkalmazásának megelőzése kulcsfontosságú tényező. Nemcsak a környezeti terhelés csökkenthető ezáltal, hanem az állatgyógyászati költségek is. Általános probléma a gyakori és indokolatlan antibiotikum használata, melynek eredményeképpen a baktériumok antibiotikum érzékenysége csökken, rezisztencia alakul ki, ami mára már a humán gyógyászatban is komoly nehézségeket okoz. Az antibiotikumok használatának visszaszorítására, illetve kiváltására számos kutatás irányul. Egy egészséges állomány vagy egyed termelésben tartása mindig jövedelmezőbb lesz mint egy termelésből részben vagy egészben korlátozott állomány/egyed, ugyanis nemcsak a gyógyszerköltségek terhelik meg a vállalkozást, hanem a termelésekiesés is jelentős károkat okoz. A növényi kivonatok egészségre gyakorolt pozitív hatásainak megállapítása, és ennek megfelelő használata az állati takarmányozásban

immunrendszer erősítése és antibiotikumok visszaszorítása érdekében rendkívül hasznos eszköz lehet.

Munkám során egy magas polifenoltartalmú növényi kivonatot tartalmazó takarmánykiegészítő baromfi bélmikrobiótára gyakorolt hatásának vizsgálatában vettem részt a MATE GBI Mikrobiológia és Alkalmazott Biotechnológia Tanszékének laboratóriumában. A kísérlet, amibe bekapcsolódtam, egy úgynevezett biztonságossági vizsgálat volt, melynek célja, hogy a tesztelt hatóanyag nem károsítja-e az állatokat, illetve a mi esetünkben a bélrendszer különböző szakaszainak mikrobiótáját.

3. Célkitűzések

Munkám során alapvetően kétféle célt szeretünk volna megvalósítani.

Teszteltük a laboratóriumunkban rendelkezésre álló különböző *Salmonella* kimutatásra alkalmas táptalajokat. Korábban ezeket a táptalajokat nem használtuk és célunk volt annak megállapítása, hogy a háromféle táptalaj közül melyik a leginkább alkalmas a *Salmonella* szelektív kimutatására bélrendszerből származó minták esetében.

Másik célunk az volt, hogy a különböző polifenol tartalmú takarmányok broilercsirkék bélmikrobiótájára gyakorolt hatását kimutassuk tenyésztésen alapuló módszerekkel. Munkám során meghatároztuk a begy, vakbél és végbél minták esetében a teljes aerob csíraszámot illetve néhány fontos potenciálisan patogén mikrobacsoportot (*Enterobacteriaceae*, *Salmonella spp.* és *Campylobacter spp.*). Arra kerestük a választ, hogy a takarmányba különböző dózisban adagolt takarmány kiegészítő biztonságos-e, illetve befolyásolja-e a bélflórát. Elsősorban szeretünk volna kizárni, hogy a takarmánykiegészítő negatív hatása lehet a broilercsirkék egészségére és teljesítményére.

4. Irodalmi áttekintés

4.1. A bélrendszer meghatározása (Gastrointestinalis traktus [GIT]):

A tápcsatorna vagy emésztőkészülék feladata a szerves és szervetlen anyagok felvétele, fizikai és kémiai lebontása, az emésztés során keletkező anyagcseretermékek felszívása és a nem hasznosítható anyagok eltávolítása a szervezetből. A "bél" a pylorus és a végbélnyílás között található tápcsatornára utaló kifejezés, azonban a különböző állatfajokra való hivatkozáskor pontosabb meghatározás szükséges. A gerincesek esetében a tápcsatornát általában gasztrointesztinális traktusnak (GIT) nevezik. A tápanyagok a szervezetbe általában nagy molekulájú vegyület formájában kerülnek be, az emésztés során kisebb, a bélből felszívódásra képes molekulákká alakulnak, ez többnyire a gazdaállat emésztőenzimjei által történik, de jelentős szerepet tölt be az emésztés folyamatában a bélrendszerben élő mikroorganizmusok anyagcsere tevékenysége is. A bélcső hosszát több tényező befolyásolja, ilyen például a faj, testméret, életkor, azonban nagyságrendileg megállapítható, hogy húsevők esetében (pl. macskafélék) a testhossz ötszöröse, mindenevők (pl. sertés) esetében a testhossz tizenötszöröse, míg növényevők esetében (pl. kérődzők, nyúl) a testhossz huszonötszöröse (Babinszky és Halas, 2019).

Az emésztőrendszernek három fő szakasza van, ezek az előbél a középbél és az utóbél. Az előbél részei a szájüreg a garatüreg, a nyelőcső, és végül a gyomor (alacsony pH-val és általában alacsony mikrobiális populációval). A háziállatok gyomrának csoportosítása többféleképpen történhet. A gyomrot belülről borító nyálkahártya szempontjából létezik egyszerű gyomor (falát a gyomorszájtól kezdve egyrétegű hengerhám borítja ami mirigyeket tartalmaz), ilyen gyomruk van az embereknek és a húsevő állatoknak. A másik nagy csoport az összetett gyomorúak csoportja (a gyomor belső falát a nyelőcső betorkollásánál többretegű, el nem szarusodó laphám borítja, ezt követi az egyrétegű hengerhám), ilyen gyomruk van a lovaknak, sertéseknek és a kérődzőknek. Továbbá csoportosíthatjuk a háziállatok gyomrát az morfológiájuk szerint. Megkülönböztetünk monogasztrikus, más néven együregű gyomorral (pl. sertés, nyúl, ló) és poligasztrikus vagy többüregű gyomorral (szarvasmarha, juh, kecske) rendelkező állatokat. Poligasztrikus állatok esetében a gyomor előtt legalább egy nyelőcsőtágulat található. Kérődzők esetében négy üregű gyomorról beszélhetünk, melynek részei előgyomrok (bendő, a recés és százzrétű gyomor), valamint az oltógyomor, vagyis a valódi gyomor. Egy kifejlett szarvasmarha gyomrának kapacitása kb. 200 liter, melynek 85%-a bendőre jut, ezzel a bendő tekinthető a

legnagyobb előgyomornak. Kérődzés során az állat az elfogyasztott, és részben megrágott, majd nyeléssel a bendőbe juttatott takarmányt kisebb adagokban felkérődzi, újra megrágja, majd ismét lenyeli, ezáltal a bendőben élő mikroorganizmusok tovább tudják bontani a növényi sejtfalban található cellulózt, így cukrok, illó zsírsavak és gázok keletkeznek. A keletkező gázokat a kérődzés útján üríti az állat a környezetébe. Az előgyomrokon, majd az oltógyomron áthaladó táplálék emésztése a bél későbbi szakaszaiban, illetve a bélmikrobiota szerepe a kérődzőkben hasonló mint a monogasztrikus állatokban.

A középbél, vagy másnéven a vékonybél szakaszai az epésbél, éhbél és a csípőbél. Egy időben történnek itt a kiválasztási, lebontási és emésztési valamint felszívódási folyamatok. Többnyire itt történik az emésztés az epésbélbe ürülő nagy járulékos mirigyek (máj és hasnyálmirigy) váladékában található enzimek, epesavak és epesavas sók segítségével. A bél üregében halad tovább a bél perisztaltikus mozgásának segítségével a béltartalom. A bél nyálkahártyáját felületnövelő bélbolyhok borítják be, amiben enzimtermelő mirigyek és a szervezetet védő nyirokképletek vannak. A bélüregben a gazdaszervezet enzimjei, és a mikrobiota által bontott óriásmolekulákból (fehérjék, zsírok, poliszacharidok) felszívásra alkalmas anyagok képződnek, ilyenek az oligopeptidek és aminosavak, a monochacharidok és a gliceridek valamint a zsírsavak. A felületnövelő képletek feladata, hogy az oldott állapotban található tápanyagok minél jobb hatékonysággal diffúzió vagy aktív transzport útján felszívódjanak. A bélből az erek a tápanyagokat először a májba kerülnek.

Az utóbél részei a vakbél, vastagbél és végbél. Bizonyos növényevő fajoknál (pl. ló, nyúl) fontos táplálék bontási és felszívódási folyamatok történnek a vastagbélben, azonban a húsevőknél elhanyagolható jelentőségű emésztés és felszívódás történik itt. Többnyire már csak bakterriális tápanyag lebontás történik, itt a legintenzívebb a mikrobiota tevékenység, a szervezet számára esszenciális vitaminokat termelnek, valamint a nagyrészt megemésztett tápanyagokat tovább bontják. A vastagbélben elektrolitok, víz és a mikrobák által termelt vitamok (B-vitaminok, K-vitamin, biotin) felszívódása történik. A vízfelszívódás következtében a bélsár besűrűsödik, a bélsár továbbhaladását a vastagbél nyálkahártyájában található kehelysejtek által termelt nyálka segíti.

4.2. Mikrobiális közösségek

Az állatokhoz és az emberekhez komplex mikrobiális közösségek társulnak, melyek benépesítik a bőr külső rétegeit, a légzőrendszer bizonyos területeit valamint a tápcsatornát. A

szoros és hosszú távú szimbiotikus kapcsolat hatására ezek a mikrobiális közösségek nagyban befolyásolják a gazdaszervezet immunfunkcióit és fiziológiáját (Brown és Clarke 2016), valamint a mikrobiota számára is előnyös, hisz a gazdaszervezet biztosítja számára az állandó és védett környezeti körülményeket, a folyamatos tápanyag- és vízellátást.

4.2.1. Bélmikrobiota

Az emlősök bélrendszere összetett és állandóan változó ökoszisztéma, ahol baktériumok, archeák eukarióta sejtes organizmusok és vírusok élnek. (Gordon 2012). Az állatok és emberek tápcsatornájában élő baktériumközösségek összessége a bélmikrobiota, a mikrobiom elsősorban a bélben élő mikroorganizmusok teljes genetikai állománya.

A béltraktusban élő mikroorganizmusok száma és diverzitása általában folyamatosan nő a gyomor felől a vastagbél irányába, a vastagbélben található a legnagyobb koncentráció, itt a mikrobiális biomasza a teljes béltartalomnak akár az 50%-át is elérheti, az ember, mint monogasztrikus mindenevő az egyik legnagyobb és legösszetettebb mikrobiális populációval rendelkezik a béltraktusában. A különböző kóros folyamatokban játszott szerepük miatt a legismertebb mikroorganizmusok a patogén vagy fakultatív patogén mikroorganizmusok (pl. *Escherichia coli*). Az ember esetében a leggyakrabban előforduló baktériumtörzsek a Bacteroidetes és a Firmicutes ezeken kívül kisebb mértékben jelen vannak Actinobacteria-k, Cyanobacteria-k, Fusobacteria-k, Proteobacteria-k és Verrucomicrobia-k (Eckburg et al. 2005). A bélben élő mikrobajetek száma jelentősen meghaladja a gazdaszervezet összsejtszámát, ezért a bélmikrobiom anyagcsereaktivitása magas. A baktériumközösségek, melyek a mikrobiótát képezik, fajtól és élőhelytől függően változatos összetételűek lehetnek, azonban egyedi szinten hosszú időn keresztül stabilnak tekinthető. Fő befolyásoló tényező lehet az életkor és a takarmányozás/táplálkozás. A fertőzések, hirtelen takarmányváltás vagy antibiotikus kezelés negatív hatással van a bélmikrobiota stabilitására, és ez negatív hatással van a gazdaszervezet számára is. A mikrobák előnyöket élveznek a gazdaszervezet bélrendszere által biztosított környezeti körülményekből (hőmérséklet, pH, páratartalom, stb), valamint a folyamatosan rendelkezésre álló táplálékforrásokból, ezen felül a gazda fiziológiai működése által biztosított szabályozásból. A gazdaszervezet számára szintén több szempontból fontos a bélflóra, melynek segítségével biztosítja a xenobiotikus vegyületeket méregtelenítését, az emészthetetlen tápanyagok emésztését és felszívódását, esszenciális vitaminokat szintetizál,

véd a patogén mikroorganizmusok ellen, és nem utolsó sorban az immunrendszer fejlődését segíti elő (Walter és mtsai. 2011).

4.2.2. Bélmikrobiom homeosztázis

A gazdaszervezethez jellemzően tartozó mikrobiális taxonok határozzák meg az egészséges egyed bélflóráját. Az egészséges mikrobapopuláció feladata az élettani funkciók támogatása. A mikrobák közt vannak „semleges”, esszenciális és hasznos törzsek. A bél egészsége számos fiziológiai, mikrobiológiai és fizikai funkciót foglal magában, amelyek együttműködnek a bél homeosztázisának fenntartása érdekében. Az „egészséges” bél nemcsak a lokálisan a bélben szabályozza a bél fiziológiai homeosztázisát, hanem más szervrendszerekre is kihatással van, ezzel támogatja a gazdaszervezet azon képességét, hogy ellenálljon a környezeti és fertőző stresszorokkal szemben (Roto et al., 2015; Kogut, 2019). Az élettani funkciókat általában emberre vonatkozóan vizsgálják, azonban a legtöbb állatra is vonatkoztathatóak. Szerepük van az emésztőrendszerben a tápanyagok lebontásában, az immunrendszer erősítésében, az energiaháztartásban, valamint a gazdaszervezet összes élettani funkciójában (Turnbaugh és mtsai. 2009; Clarke és mtsai. 2014). Az egészséges felnőtt bélflórája kiegyensúlyozottnak tekinthető, azonban a környezeti tényezők hatással vannak rá, ilyenek a hormonális ciklusos változások, a fizikai aktivitás, diéta, stressz, utazás, táplálékok szezonálisitása, stb. A mikrobapopuláció egyensúlyában történő kilengés diszbiotikus állapotokhoz vezethet, ez a gazdaszervezet egészségére negatív hatással van. Az egészséges bélmikrobiota egyértelmű minőségi és mennyiségi meghatározása még ismeretlen, azonban vannak fontosabb mikrobiális csoportok a bélflórában, amik a bekövetkező káros változások előrejelzője lehet, többnyire az egészségben/betegségben feltételezett szerepük szerint (Clarke és mtsai. 2014; D'Argenio és Salvatore 2015; Wang és Roy 2016).

4.2.3. Diszbiózis

Mivel a bél környezete folyamatosan változik, a gazdaszervezet étrendje, a gyógyszerek (pl. antibiotikumok) a személyi és környezeti higiénia nagy hatással van a bélmikrobiótára (Sommer és Bäckhed 2013). A mikrobiális egyensúly felborulását, amely a bélmikrobióta diverzitásának, összetételének vagy funkcionalitásának változásából adódik, mikrobiális diszbiózisként definiálják (Wang és Roy 2016). A mikrobióta összetételében bekövetkező

zavarok hatására csökkentheti a ritkán előforduló de előnyös mikroorganizmusok számát, valamint ez az állapot az egyed betegségéhez vezethet (Montalban és mtsai, 2015). A mikrobiális egyensúlyhiány kapcsolatban áll több betegséggel, mint például elhízás, diabetes, autoimmun betegségek, neurológiai rendellenességek, allergiák, gyulladós és fertőző betegségek (Wang és Roy 2016). A haszonállatok, különösen az újszülöttek és az elválasztott egyedek állapotára számos környezeti tényező stresszorként hat. Fiziológiai stresszorok például a takarmányozás és a telepi körülmények, patogén mikroorganizmusok jelenléte és elszaporodása. Ezek a tényezők destabilizálják az egészséges bélflórát (Yang és mtsai. 2015; Yeo és mtsai. 2016). Fiatal egyedekben a bélmikrobióta egyensúlyának eltolódása több betegséggel illetve gyulladós állapottal hozható kapcsolatba, valamint az ezekből származtatható növekedési erény csökkenésével (Yeo és mtsai. 2016). A bélmikrobióta összetétel legnagyobb befolyásoló tényezője az állatoknál a takarmányozás (Montalban és mtsai. 2015). A takarmány összetevői előnyösen befolyásolhatják bizonyos mikrobacsoportokat, mivel olyan tápanyagellátási körülményeket teremtenek, amelyek támogatják ezeknek a mikrobáknak a szaporodását, és versenyelőnyt nyújtanak nekik más mikrobafajokkal szemben. A fertőzések leküzdésére alkalmazott antibiotikumok nem csak a kórokozókat pusztítják el, hanem a hasznos mikrobákat is pusztíthatja, vagy a számukat csökkentheti. A hasznos mikrobák mennyiségi csökkenése a tápanyagok anyagcseréjét és felszívódását is csökkentheti, valamint az esszenciális vitaminok termelésére is negatív hatással van, ezáltal kóros állapot léphet fel a gazdaszervezetben (McFarland 2014).

4.2.4. Az immunrendszer aktiválása

A gazdaszervezet immunválaszait folyamatosan és dinamikusan befolyásolja az emésztőrendszerben élő mikrobák tevékenysége. A mikrobiális kolonizáció már a szülőcsatornában megkezdődik a születés során, és egészen a felnőttkori stabil állapot bekövetkeztéig folytatódik. Az újszülött saját bélflórájának kialakítása szempontjából az élet első órái kulcsfontosságúak. A bélhomeosztázis erősen függ az immunaktiváció és -szabályozás közötti kényes egyensúlytól, és alapvető fontosságú a bélgyulladás megelőzésében. A bélfalban lévő számos önálló nyiroktüsző mellett egyéb nyirokképletek is találhatóak, ezek száma és mérete fajonként eltérő. A bélben az immunoglobulin A típusú elenanyagok a legfontosabbak, ezek már a bélüregben hatástalanítani tudják a kórokozókat. A gazda szervezet megfelelő immunválasza a káros és ártalmatlan mikrobák közötti megkülönböztetésen alapul, és eközben

a megfelelő gyulladási reakciók megkezdődnek és szabályozódnak. A bélflórát alkotó segítőkész baktériumok befolyásolják az immunrendszer működését, például a gyulladáshoz vezető mediátorok termelését és a helper illetve szabályozó T-sejtek aktiválódását. Az immunrendszer megfelelő reakciója, amely a patogén elleni védelmet biztosítja, a bélhez kötődő immunsejtek megfelelő működésén alapul, amint azt Brisbin és munkatársai is kimutatták a baromfi példáján (2007). Az állatok jóllétét és fejlődését több tényező, mint például a környezeti feltételek, étrend és fertőzések által okozott stresszhelyzetek befolyásolják, ezek hatással lehetnek a gyomor-bélrendszerrel összefüggő immunfunkciókra is. A legtöbb immunsejt az élőlények szervezetében a bélrendszerben található. Az itt élő mikroorganizmusok természetes módon előfordulnak a szervezetben, az adott területen állandóan jelen vannak, segítenek az emésztésben, védelmet nyújtanak kórokozók ellen, elősegítik az immunrendszer megfelelő működését és fenntartják a test mikrobiológiai egyensúlyát, a gazdaszervezetet nem károsítják, hanem szimbiotikus kapcsolatban élnek vele. Ez az egészséges populáció, különböző mechanizmusokkal, például a barrierimmunitás megerősítésével védi ökológiai részét (Belkán és Hand 2014). A bélflórában lévő mikrobák és a gazda immunrendszere közötti interakciók befolyásolják az immunrendszer kialakulását és működését, az immunrendszer felismeri a károsnak nem ítélt mikroorganizmusokat a patogénektől és az oportunistáktól. Ennek érdekében a gazda szervezetnek el kell fogadnia a normális bélflórát, hogy fenntartható legyen a belső egyensúly és elkerülhetőek legyenek a kóros gyulladáshoz vezető reakciók (Mann és csapata, 2013). A mikroorganizmusok, amelyeket korábban kórokozókként azonosítottak, ma már elengedhetetlen elemeknek tekintik a gazdaszervezet fiziológiai és immunológiai folyamatainak szabályozásában. Ebben a tekintetben a bélmikrobióta kulcsszerepet játszik a fertőzésekkel szembeni gazdaszervezeti védekező válaszban, ebben a mintafelismerő receptorok fontos szabályozó szerepet játszanak (Brown és Clarke 2016).

4.3. A bélmikrobiom működése és szerepe

4.3.1. Anyagcsere-aktivitás

A gazdaszervezet szimbiotikus baktériumai a bélhomeosztázis fenntartásával olyan alapvető élettani funkciókat töltenek be, mint például a tápanyagok emésztése, az immunválaszok modulálása és a bélhámsejtek fejlődésében való részvétel (Xing és mtsai., 2021). Hatalmas anyagcsere-kapacitásuk alapján a bélmikrobiótát "elhanyagolt endokrin szervként" (Clarke et

al. 2014) vagy "elfelejtett szervünként" (D'Argenio és Salvatore 2015) ismerik el. Ennek hatására az emberi, és a legtöbb gazdasági haszonállat mikrobiotájára külön figyelmet kezdtek fordítani a kutatók. A becslések szerint a humán bélrendszerben $>10^{14}$ mikrobiális sejt (körülbelül tízszer annyi, mint a testünk többi részében), és >1000 baktériumfaj található, ezáltal az emberi mikrobiom mintegy 150-szer több gént, mint amennyi a teljes emberi genomban van, ez a legtöbb gazdasági haszonállatra is igaz. A potenciálisan hasznos bélmikrobák felderítése és azonosítása átfedésben lehet a potenciális probiotikumok "felkutatásának" folyamatával.

4.3.2. Hormonális funkciójú metabolitok

A mikrobiális anyagcsere több termékét hormonális jellegűnek tekinthetünk, ezek a véráram útján a szervezetbe kerülve hatással lesznek a távoli szervek és szervrendszerek működésére. Szénhidrát-anyagcsere útján rövid szénláncú zsírsavak (pl. butirát és propionát) keletkeznek, így fontos tápanyagokat biztosítanak, és segítik a szervek szabályozását az enterális idegrendszer és az agy között.

A neurotranszmitterként ható biogén aminokat a bél mikrobiális aminosavdekarboxilázok alakítják át, ezek közé tartozik a szerotonin, a dopamin, a triptamin és a GABA (γ -aminovajsav). Potenciális hormonális funkcióval rendelkező metabolitok közé tartozik a kortizol, amely részt vesz a stresszválaszban, gyulladáscsökkentő tevékenységben, valamint anabolikus és katabolikus hatásokban a szervezet számos pontján, a ghrelin, amely a gazdaszervezet anyagcseréjében játszik szerepet, és a leptin, amely az étvágyat szabályozza (Clarke és mtsai. 2014; Sudo 2014; Smith 2015). A bélmikrobióta és az agy közötti kétirányú kommunikációról egyre több az információ, és lehetővé teszi a bél-mikrobióta-agy tengely fontos szerepének mélyebb megértését a különböző rendellenességekben, a depressziótól kezdve az elhízáson és az autizmuson át más neuropszichiátriai állapotokig. A kommunikációs utak közé tartozik a vagus-ideg, az immunrendszer, a neuroendokrin pályák és a baktériumokból származó metabolitok. Jelenleg azonban is nehéz meghatározni, hogy a bélflóra változása az oka vagy következménye-e az olyan állapotoknak, mint a coeliakia, a bél-agy tengely és a viselkedés (Sandhu és mtsai. 2017).

4.3.3. A bélmikrobiótát befolyásoló tényezők

A különböző és/vagy közeli rokonságban álló mikrobafajok közötti diverzitás és metabolikus kapacitás genetikai, környezeti és táplálkozási tényezők miatt eltérhet (Lozupone és mtsai. 2012). 71 gerinces állatfaj (beleértve emlősöket, madarakat és hüllőket is) székletmintáinak baktériumdiverzitását összehasonlítva Godon és munkatársai (2016) összefüggést találtak a bélrendszer térfogatának növekedése és a mikrobiális diverzitás között. Karasov és Douglas (2013) kimutatták, hogy a gerincesek bélmikrobióta változatossága egy nagyságrenddel nagyobb, mint a gerincteleneknél. Mind a gerincteleneknél, mind a gerinceseknél a bélmikrobióta kulcsszerepet játszik a gazdaszervezet anyagcseréjében, és alapvetően befolyásolja annak fiziológiáját, egészségét és jólétét, valamint funkcionalitását és teljesítményét. A tápanyagok és a mikrobióta közötti kölcsönhatás befolyásolja a mikrobapopuláció stabilitását és ezáltal a gazdaszervezet egészségi állapotát. Mind a magas zsírtartalmú, mind a magas zsírtartalmú és magas cukortartalmú étrendről azt jelentették, hogy a populációban a Firmicutes (különösen egyes *Clostridium*-csoportok, míg a magas szénhidrátartalmú étrend - ezen kívül - az *Erysipelotrichia*-k és a *Bacillusok* számát növeli) és a Proteobacteriumok számának növekedése, de a Bacteroidetesek számának csökkenése felé tolódik el (Turnbaugh et al. 2009).

4.3.4. Plazmid-kódolt funkciók

A plazmidok, vagyis a mobil genetikai elemek fontos szerepet játszanak az antibiotikum-rezisztencia gének terjedésében a környezetben (Jones és mtsai. 2010). Az antibiotikum-rezisztencia terjedése kulcsfontosságú szempont azokon a helyeken, ahol a terápiás vagy takarmányozási célokra történő antibiotikum-használat, valamint a kórházi és háztartási szennyvizek által okozott vízszennyezés miatt szelektív nyomás érvényesül. A szelektív nyomás (és annak visszafordítása) talán legjobban a glikopeptid antibiotikum (avoparcin) takarmányban növekedésserkentőként történő felhasználásával kapcsolatban a 1990-es években volt dokumentálva. Hollandiában, ahol a vankomicin használata korlátozott terápiás célra, a vankomicin-rezisztens *Enterococcus*-ok (VRE) gyakran előfordulnak mind az állati, mind az emberi bélflórában. Emellett jelentős mennyiségű avoparcint alkalmaztak állatokban növekedési erély fokozására, ami szerkezeti hasonlósága révén a vankomicinnel, szelektív nyomást gyakorolhatott az állatok, és azok környezetéhez tartozó *Enterococcus*-okra

rezisztencia kialakításában. Ezt támasztotta alá az a tény, hogy azokban az országokban, ahol az avoparcin használatát betiltották, nem mutattak ki VRE-t sem az állatokban, sem az állati eredetű élelmiszerekben, sem az egészséges emberekben. Svédországban 1986-ban betiltották az összes antibiotikum hozafokozó szerként való használatát, és ott nem mutattak ki VRE-t a haszonállatok bélsármikrobiótájában (Van den Bogaard és Stobberingh 1999). Miután Dániában 1995-ben betiltották az avoparcin használatát baromfi esetében, a VRE előfordulása az 1995-ös 80%-ról 1998-ra 5%-ra csökkent.

4.4. Madarak

A madaragnál rendkívüli változatosság megnehezíti a bélmikrobiótájukra vonatkozó általánosításokat, valamint a különböző madártípusokról rendelkezésre álló korlátozott információ is nehezítő tényező. Változatos étrendjükben a rovarok, magvak, gyümölcsök, növények, sőt, még kisebb állatok, köztük más madarak és rágcsálók is szerepelnek (Koutsos és mtsai. 2001). A fogak hiánya miatt a madarak gyomor- és bélrendszerét az egészben lenyelt, rágatlan táplálékrészek feldolgozására specializálódott. Emlősöktől eltérően, a madarak nem rendelkeznek fogakkal, ennek köszönhetően a táplálék mechanikai feltárás nélkül kerül a begybe, ahol órákon át tárolódik és nedvességet vesz fel, ha száraz tápot vagy magvakat fogyasztott az egyed. Ezt követően kerül a mirigyes gyomorba, és itt található emésztőenzimokkal. A zúzógyomorban történik a táplálék aprítása a zúzógyomor falának összehúzódnásai során. Innen az emésztőenzimokkal keveredett homogenizált táplálék a vékonybélbe kerül, az emésztési folyamatok az emlős állatokéhoz hasonló módon zajlanak. Gazdasági jelentőségük miatt a madarak csoportján belül valószínűleg a baromfi, például a csirke és a pulyka bélrendszerét vizsgálják a legintenzívebben. A keléskor csíramentesnek tekintett csirke érett béltraktusa - amely a begyet, a zúzógyomrot, vékonybelet és a vakbelet foglalja magában – az első 6 hétben gyorsan fejlődik, és több mint 900 fajból álló, változatos baktériumpopulációnak ad otthont, amelyben a Firmicutes (70%) dominál, és kisebb számban vannak jelen a Bacteroidetes és a Proteobacteria (Apajalahti és Vienola 2016). Az idősödő csirkében a baktériumközösségek közötti különbségek az ileum és a caecum között jelentékenyebbé válnak, a caecum-ban változatosabb a populáció. Úgy tűnik, hogy a tápanyagfelvétel és a bakteriális kolonizáció kulcsfontosságú tényezők, amelyek meghatározzák ezeket a különbségeket (Shaofi és mtsai. 2015). A tyúk faj mikrobiótája kommenzális és patogén baktériumfajokból áll, amelyek közül az utóbbiak hatással lehetnek

akár a csirkék (*E. coli* és *Clostridium*), akár az emberek (*Salmonella* és *Campylobacter*) egészségére. Az alomkezelés módja, az takarmányösszetétel, és a takarmány-adalékanyagok befolyásolhatják a csirkék bélmikrobiótáját. A csirke egészséges bélmikrobiótájának fenntartása továbbá pre- és probiotikumok alkalmazásával (a takarmányon belüli szubterápiás antibiotikum-adagolás alternatívájaként) elérhető, és ezáltal az állatok egészségének javulását eredményezheti (Oakley et al. 2014). A csirke bélmikrobiótája olyan specifikus enzimeket biztosít, amiknek a termelésére a csirke nem képes, azonban így lehetővé válnak a tápanyagból származó poliszacharidok depolimerizációja. Az így keletkező rövid szénláncú zsírsavak szerepe az egészséges bélrendszer fenntartásának elősegítése. Ilyen például a butirát, ami a vastagbélhám elsődleges energiaforrása, ami javítja és/vagy segíti a kolonociták homeosztázisát, a bélbolyhok morfológiai fejlettségét, javítja a növekedési erélyt, és a hasított test minőségi jellemzőit. Ezekon kívül a rövid szénláncú zsírsavak szabályozzák a bélrendszer véráramlását, serkentik az enterociták növekedését és proliferációját, regulálják a mucintermelést és befolyásolják a bélrendszeri immunválaszt (Chambers és Gong; 2011).

A *Salmonella* baromfiból való kiirtásáért folytatott küzdelem hosszú ideje tart, és részben még mindig tart. A takarmányba adott antibiotikumok csökkentésének/betiltásának egyidejű szükségessége különleges kihívásokat jelentett a csirke bélrendszerét célzó új stratégiák kifejlesztése és mikrobiótájának kedvező módosítása előtt. Ezek közé tartozik a probiotikumok, prebiotikumok (beleértve a mannán- és xilo-oligoszacharidokat), fitobiotikumok és a fágterápia alkalmazása, amelyek különböző szintű sikereket eredményeztek (Yang és mtsai. 2009; Chambers és Gong 2011; Pourabedin 2015).

4.4.1. A baromfi bélmikrobiótájának sajátosságai

A gazdasági haszonállatok termelékenységére szempontjából a bélrendszer és a bélflóra egészsége létfontosságú, az állategészségügy egyik sarokpontja. 1952-ben Mohr használta először a bélmikrobiom kifejezést, Whipps és munkatársai (1998) által megfogalmazott definíció szerint a mikrobiom egy jól definiálható élőhelyhez köthető mikróbaközösség, ami meghatározott fizikai-kémiai tulajdonságokkal rendelkezik. Ez a definíció nem csak a mikrobiótát foglalja magába, hanem az életterüket, a tevékenységük helyszínét és annak összetevőit is.

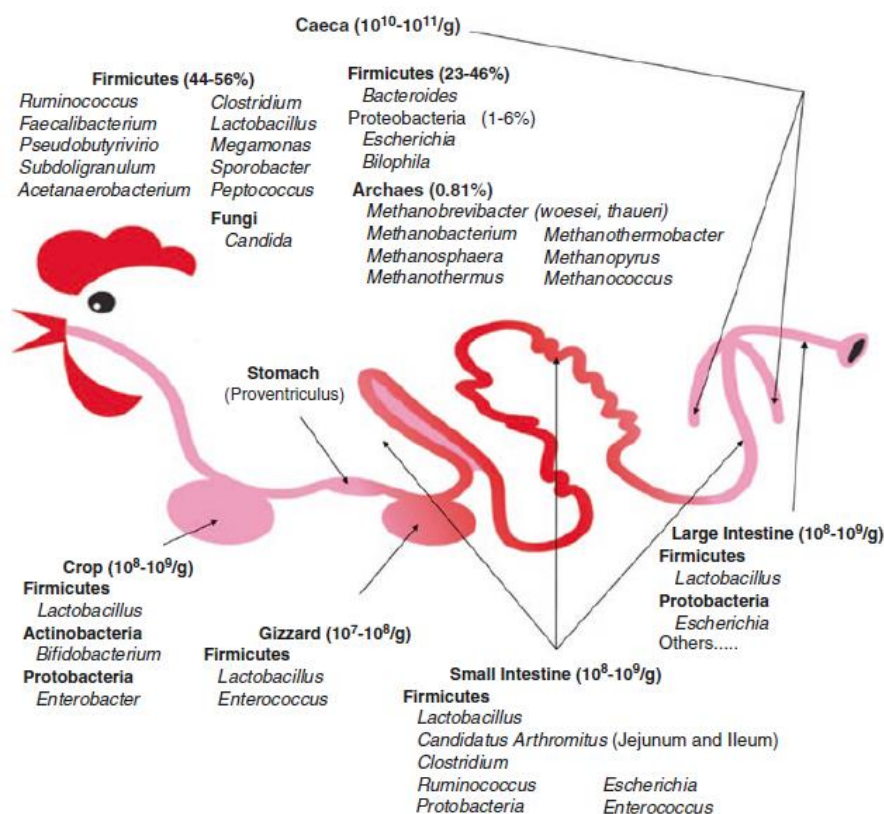
A baromfik esetében a kelés pillanatában az emésztőrendszer és a bélbolyhok fejlődése nem fejeződött be, a bélcsövük ekkor még steril, mikroorganizmusokkal csak a fizio

fejlőséssel párhuzamosan kolonizálódik (Kőrösi, 2019) A baromfi bélmikrobiomja meglehetősen összetett, több mint 600 különböző baktériumfaj, és akár 100 baktériumnemzetségből is állhat. Leggyakrabban általában a Firmicutes törzs, ezt a Proteobacteria és a Bacteroidetes törzsek követik. Jelen lehetnek még a Actinobacteria, Tenericutes, Cyanobacteria és Fusobacteria törzsek is (Pourabedin és Zhao, 2015). A tyúk faj bélrendszerének szakaszától függően a mikrobaközösségek nagy diverzitást mutatnak. A begy, a zúzógyomor és a duodenum hasonló mikrobiótával rendelkezik, itt többnyire *Lactobacillus* nemzetség található, akár 99%-ban (Gong és mtsai; 2007).

4.4.2. A vékonybél mikrobióta jellemzése a tyúk fajban

A vékonybélnek 3 fő szakasza van, amik a duodenum, a jejunum és az ileum. Ezek a szakaszok hasonló mikrobiótával rendelkeznek, valamint az ileális mikrobapopuláció némileg keveredhet a vakbélből származó mikrobákkal (Yan és mtsai, 2019). A vékonybélben élő mikrobák abszolút száma viszonylag alacsony, kb 10^5 CFU/g (colony-forming unit → telepképző egység), valamint a teljes ileális mikrobiom felét csak 1-5 nemzetség kolonizálja. Vékonybelet főként Firmicutes törzsek alkotják, ide tartoznak az *Enterococcus*, *Turicibacter*, *Clostridium sensu stricto* és a *Lactobacillus* fajok. A vékonybélben is élnek *Escherichia coli* vagy a Proteobacteria törzshöz tartozó *Helicobacter*, ezeknek az elszaporodása azonban a csirkék teljesítményének csökkenését okozza (Kollarcikova és mtsai. 2019). A jejunumot is főként a *Lactobacillus* fajok telepítik be, elsősorban *L. salivarius* és az *L. aviarius* (Gong és mtsai, 2007, Feng és mtsai, 2010). Az ileum bélmikrobiótája nagyobb változatosságot mutat, az itt lévő főbb nemzetségek a *Lactobacillus*, *Candidatus Arthromitus*, *Enterococcus*, *Escherichia coli* és *Clostridium* (Pourabedin és Zhao, 2015).

1. ábra A csirke gyomor-bélrendszeri traktusában található főbb baktériumtípusok (Yeoman és mtsai., 2012)



4.4.3. Vakbél mikrobióta jellemzése

A baromfinknak páros vakbele van, egymáshoz hasonló baktériumpopulációval (Stanley és mtsai, 2015). A vakbélben a baktériumok száma jelentősen megnő (10^{10} CFU/g), ez a terület a tyúk faj bélrendszerének a legsűrűbben kolonizált területe, és itt élnek a legnagyobb változatosságban a mikrobák. Itt történik a nem emészthető szénhidrátok bakteriális fermentációja, valamint a kórokozók kolonizációja is. A vékonybélben és a vakbélben is mintegy 1000 eltérő faj él, ezek főként a Gram-pozitív Firmicutes és Actinobacteria törzshöz, vagy a Gram negatív Bacteroidetes vagy Proteobacteria törzshöz tartoznak (Oakley és mtsai., 2014), és eltérő mértékben ugyan, de minden felnőtt csirke vakbelében megtalálhatóak. Léteznek olyan törzsek, és nemzetségek amelyek opcionálisan előfordulhatnak a kifejlett egyedek mikrobiótájában, ilyen például az *Elusimicrobia (Elusimicrobium sp.)*, a *Synergistetes (Cloacibacillus sp.)*, a *Spirochaetes (Treponema sp)* (Rychlik, 2020). A vakbélben előforduló három fő család a *Clostridiaceae*, *Lachnospiraceae* és *Ruminococcaceae*, továbbá jelen van még az *Enterococcaceae*, az *Enterobacteriaceae* és a *Bacteroidaceae* (Yin et al., 2009). Ezen kívül sok eddig ismeretlen és besorolatlan baktérium is nagy számban jelen lehetnek a

vakbélben, faj szinten például a *Bacteroides fragilis*, *L. crispatus*, *L. johnsonii*, *L. salivarius* és *L. reuteri* több mint 40% is kiteheti a vakbél mikrobiótának (Stanley mtsai., 2015).

A bél mikrobióta vizsgálata során esetben előfordult, hogy a könnyebb mintavétel miatt ürülékmintát használtak. A feces mikrobióta összetételére azonban jelentős hatással van a különböző bél szegmensekből származó mikrobióta eltérő részaránya, ennek leginkább a vakbél tartalom szakaszos ürülése az oka (Rychlik, 2020). Ezért baromfi kísérletekben ennek a használata nem jellemző. Stanley és munkatársai (2015) által megjelentetett kutatás szerint az összes működő taxonómiai egység (OTU) körülbelül 88%-a, (szekvenciák 99,25%-át teszi ki), megegyezés mutatkozott a brojlercsirkék vakbél- és ürülékmintái között.

4.4.4. A bél mikrobióta hatása a termelési paraméterekre

A termelési tényezőket igen nagy mértékben befolyásolja a bélrendszer általános egészsége, ami „a mikrobióta és a bélrendszer közötti szimbiotikus egyensúlyi állapot, mely során az állatok egészsége stabilnak tekinthető” (Celi és mtsai., 2019). A bél mikrobióta hatással van a gazdaállat anyagcsere folyamataira, egészségi állapotára, tápanyagok emésztésére, az állat növekedési erélyére (Wang és mtsai., 2017). Fontos megjegyezni, hogy a gazdaállatra ható tényezők befolyásolják a mikrobióta kialakulását és stabilitását. Baromfi esetében a takarmányok NSP (nem keményítő jellegű) szénhidrát anyagainak magas oldható rostfrakciói miatt a béltartalom viszkozitása nő, ezáltal rosszabb lesz a béltartalom keveredése, lassul a passzázs és romlik a táplálóanyagok emészthetősége (Smits és Annison, 1996). Ennek köszönhetően a mikrobiális aktivitás nő a vékonybélben, ami negatív hatással van a brojlercsirkék növekedési erélyére (Silva és Smithard, 2002). A baktériumok javíthatják a tápanyagok emészthetőségét és hasznosulását a gazdaszervezetben, ez javítja a termelési mutatókat is. A mikrobióta stabilitása hatással van az immunválasz reakciókra is, ami hatással lehet a takarmány-értékesítésre. A termelési paraméterek tekintetében az egyes bélszakaszokra vonatkozóan ideális mikroba összetételt nem lehet meghatározni, azonban kimondható, hogy a jobb teljesítménnyel olyan baktériumközösségek függenek össze, amik a különböző rostfrakciókat és a rezisztens keményítőt lebontják. Ilyen például a *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae* és *Erysipelotrichaceae* család tagjai. A teljesítményt negatívan befolyásoló baktériumközösségek a *Clostridiaceae* tenyésztetlen tagjai (Stanley és mtsai., 2016).

4.5. Takarmánykiegészítők

Takarmány-kiegészítőknek azokat a szerves vagy szervetlen anyagokat nevezzük, amelyeket annak érdekében kevernek a takarmányokhoz, hogy javítsák a takarmányok minőségét, a bél mikroflórájának stabilitását, az állatok termelését és ellenálló képességét, valamint a gyártástechnológiai folyamatok hatékonyságát. Az Európai Unió a következő öt főcsoportba sorolta: 1. technológiai adalékanyagok; 2. érzékszervi tulajdonságokat javító adalékanyagok; 3. tápértékkel rendelkező adalékanyagok; 4. állattenyésztésben alkalmazott adalékanyagok; 5. kokcidiosztatikumok és hisztomonosztatikumok (1831/2003/EK és 386/2009/EK rendelet). Fontos, hogy a takarmány-adalékok hatékonysága akkor lesz megfelelő, ha azokat okszerűen alkalmazzák, ehhez tudni kell, hogy az adott anyagot pontosan mire szeretnénk használni. Amennyiben az állatok termelésére vagy ellenálló képességére ható adalékanyagot alkalmazunk, ügyelni kell a fajra, korcsopatra és hasznosítási típusra, ezek a jellemzők határozzák meg az egyedek takarmányának táplálóanyag-szükségletét.

4.5.1. Antibiotikumok

Az állattenyésztésben széles körben elterjedt gyakorlat volt az antibiotikumok hozamfokozóként való alkalmazása, ezzel kihasználva azon tulajdonságukat, hogy csökkentik az emésztőrendszerben a mikrobák szaporodását, valamint javítják a tápanyagok emészthetőségét (Dublecz, 2011). Ennek következtében változik a bélmikrobióta, valamint kialakulhat a patogén baktériumok antibiotikum rezisztenciája (Aarestrup, 1999). Az agráriumban alkalmazott antibiotikumok növelik a humán gyógyászatban a rezisztens betegségek kockázatát (Cheng és mtsai., 2014). 2000 óta csökkentették a hozamfokozó antibiotikumok felhasználásának lehetőségét az állati termelésben (Dublecz, 2011), és 2006 január 1.-től kezdve be is tiltották a használatukat. Az antibiotikumok alkalmazása bizonyos körülmények között elengedhetetlen, viszont ez a béltraktusban élő mikroflórára, és a bélrendszerre hatást gyakorol. Csökkenthetik a tejsav-termelő fajok jelenlétét, a bélmikrobiom diverzitását, valamint a Clostridium fajok elszaporodását okozzák (Lu és mtsai., 2008). A bélmikrobióta egyensúlya az antibiotikum-kezelés után általában gyorsan rendeződik, egyes törzsek a kezelés után akár 6 hónappal sem. A bélmikrobióta homeosztázisának stabilitása igen fontos, lényegében egy összetett ökoszisztéma él ott. A tápanyagok, a mikrobióta és a

gazdaszervezet folyamatosan kapcsolatban vannak egymással (Azad és mtsai, 2018). Egészséges körülmények között a patogén és a hasznos baktériumok között egyensúly van az emésztőrendszerben, és számtalan szimbiotikus illetve kompetitív kölcsönhatás történik. Abban az esetben, amikor a bélmikroflóra stabilitása felborul, problémák lépnek fel a tápanyagok hasznosítása, ez hatással van az ásványi anyagok forgalmára is. Ezek a folyamatok hasmenéshez, a takarmányok tápanyagainak nem megfelelő emésztéséhez vezet, valamint nő a keletkező káros gázok mennyisége.

4.5.2. Antibiotikumok alternatívái

Sokféle antibiotikumot használtak takarmány-adalékanyagként a takarmányozásban a növekedési erély és az egészség javítása érdekében. Az 1940-es évek végén történt felfedezéstől kezdve az antibiotikumok takarmány-adalékanyagként való felhasználása a sertés- és baromfiiparban elterjedt alkalmazássá vált. Antibiotikumok hozamfokozásra való alkalmazásának betiltását követően alternatívákat kell keresni az elhullások és a megbetegedések megelőzésér, számos újszerű természetes helyettesítő anyagot vizsgáltak többek között probiotikumokat, prebiotikumokat, szerves savakat, növényi kivonatokat és illóolajokat alkalmaztak (Fulton és mtsai., 2002). Ilyenek például az antibakteriális vakcinák, bakteriofágok, pre- és probiotikumok, szimbiotikumok, növényi kivonatok, baromfitojásból származó antitestek, stb (Cheng és mtsai, 2014; Gadde és mtsai., 2017). Ezek a termékek jótékony hatása dokumentált ugyan, de telepenként és turnusonként eltérő eredményeket mutatnak. Ezen módszerek megfelelő kombinálása, a megfelelő gazdálkodási és tartási körülmények együtt elsődleges fontosságúak lehetnek az állattenyésztés fenntartásában és javításában (Gadde és mtsai., 2017).

Állatok takarmányozása során alkalmazott adalékanyagok közé sorolhatóak a bélflóra-stabilizáló anyagok, ide tartoznak a savanyítók, a probiotikumok és a prebiotikumok.

4.5.3. Savanyítók

Olyan szerves savak mely segítik a bélflóra eubiotikus állapotának fenntartását. (Papatsiros és Billinis, 2012). A savanyítók a pH savas irányba tolásával a baktériumok számára kedvezőtlen életfeltételeket biztosítanak, növelik a sejtek hidrogénion-tartalmát. A hangyasav és sói gátolják

a tejsavtermelő baktériumok tejsavtermelését, valamint csökkentik az *E.coli*- és a *Salmonella*-számat.

4.5.4. Probiotikumok

A WHO definíciója szerint a probiotikumok olyan mikroorganizmusok, amelyek megfelelő mennyiségben és élő állapotban adagolva javítják a gazdaszervezet egészségi állapotát, valamint javítják az emésztést, és a tápanyagok felszívódását. Csak olyan mikroorganizmusokat lehet probiotikumként alkalmazni, amelyek az eubiotikus flórára nincsenek negatív hatással, nem patogének vagy toxikusak, ellenállnak a gyomornedveknek, valamint a genomjuk nem tartalmaz antibiotikum-rezisztencia géneket (Wright, 2005), ezen kívül biztonságosan lehessen használni ételmszeriparban és klinikailag is, jó technológiai tulajdonságokkal rendelkezzen, emberi és állati szervezetre ne legyen negatív hatása (Havas, 2015). Legfrissebb kutatások szerint segíthetik a szérum koleszterin szabályozását az emberi vérben, csökkenthetik a laktóz intolerancia tüneteit, a vastagbélrák kockázatát (Zendeboodi és mtsai., 2020). Használatuk során a fő cél a patogén mikroorganizmusok kiszorítása a bélcsatornából oly módon, hogy a bélhámsejtek felületén lévő, baktériumok által telepalkotásra használható, korlátozott mértékben elérhető kötőhelyeket a kedvező baktériumok telepítsék be, ezzel kiszorítva a patogén mikroorganizmusokat, és javítva az egyedek teljesítményét (Jadhav és mtsai., 2015). Ily módon a bélsárral ürített patogének száma is csökkenthető. Három fő csoportjuk van. Az élesztők csoportjába a *Saccharomyces* fajok tartoznak, amiknek kompetitív hatásuk van, és az eubiotikus mikroflórának biztosítanak megfelelő környezetet (Schmidt, 2015). A spróráképző baktériumok (pl. *Bacillus* fajok) vegetatív formában kerülnek a tápcsatornába, a bélcsatornában kerülnek vegetatív állapotba, és gyorsan kolonizálnak. Ezek a baktériumok bakteriosztatikus anyagokat termelnek (ilyen például a *Bacillus toyonensis*, ami toyocerin termel (Juménez és mtsai, 2013). A toyocerin egyes patogének (pl. *E.coli*) számára mérgező, azonban a gazdaszervezetben nem szívódik fel, így nem okoz problémát. Ebbe a csoportba sorolható a *Bacillus subtilis* és a *Bacillus licheniformis* is. A harmadik csoportba elsősorban a tejsavat termelő fajok (*Lactobacillus*, *Enterococcus* és *Pediococcus*) tartoznak. Ezek a mikrobák tejsavtermelésüknek köszönhetően csökkentik a béltartalom pH-ját, serkentik a bélhámsejtek osztódását (így növelik a felszívódásra alkalmas felületet), gyorsan kolonizálnak, és kiszorítják a patogén baktériumokat a bélhámsejtek kötőhelyeiről, valamint aktiválják a bélcsatorna immunrendszerét.

Az EU-ban általában baktériumokat használnak takarmány-kiegészítőnek, ezek többnyire Gram-pozitív fajok (pl. *Bacillus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*), és néhány gomba (pl. *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces sp.*). Léteznek több komponensű termékek, ezek egyszerre több fajt tartalmaznak. Hatékonyságukat több tényező befolyásolja, például a törzsek megfelelő kiválasztása, dózisa (megfelelő mennyiségű életképes sejtet tartalmazzon). Fontos, hogy a termékeket a gyártó által előírt, megfelelő körülmények között tárolják és alkalmazzák. A probiotikum készítmények a gazdaállat fajától és korától függően alkalmazhatóak por, szuszpenzió, kapszula, pellet, gél vagy paszta formájában is, időszakosan vagy folyamatosan, közvetlenül vagy takarmányadalékként (Markowiak and Śliżewska, 2018). A probiotikumok és antibiotikumok egyaránt termelésnövekedést eredményeznek, annak ellenére, hogy működésük alapelve eltér egymástól. A probiotikumok hatékonyságát befolyásolja a kezelés hossza, a baktériumtörzsek koncentrációja és a választott törzsek.

4.5.5. Prebiotikumok

A prebiotikumok olyan nem emészthető, de a hasznos baktériumok által tápanyagként hasznosítható szénhidrátok, melyek többnyire oligoszacharidok (Gibson és Roberfroid, 1995), valamint energiaszolgáltató vegyületek a vastagbél hámsejtei számára. A probiotikus mikroorganizmusok tápanyagként tudják hasznosítani a prebiotikumokat, ezáltal felszaporodnak és így kiszorítják a patogén mikroorganizmusokat (Dublecz, 2011). A fő prebiotikus szénhidrátok közé tartoznak a fruktooligoszacharidok (FOS), oligofruktóz, inulin, galaktooligoszacharidok (GOS) és a xilooligoszacharidok (Azad és mtsai, 2018).

A prebiotikus komponensek kategóriájába sorolhatók a növényi eredetű kivonatok, a fehérjék lebontási termékei és a többértékű alkoholok is (Cheng és mtsai., 2014). Természetes prebiotikum források a hüvelyesek, a gabonafélék és a gyümölcsök (Markowiak and Śliżewska, 2018). Az ezekben lévő nem keményítő jellegű szénhidrátok növelik a vastagbélben lévő mikroorganizmusok számát, valamint a bélmikroflóra összetételét javítják, kiszorítva ezzel a patogén baktériumokat (Dublecz, 2011). A prebiotikumok hatásának értékelésekor figyelembe kell venni azt a tényt, hogy a gazdasági állatok mindegyike különbözik anatómiai, emésztés-fiziológiai és a bélmikrobióta összetétel szempontjából (Markowiak és Śliżewska, 2018). A prebiotikum kiegészítések esetén elengedhetetlen a megfelelő adagolás meghatározása, ugyanis túladagolásuk emésztési zavarokhoz vezethet. Ugyanakkor nagy előnyük, hogy hosszú ideig és megelőző jelleggel használhatók az enterális megbetegedések megelőzésére (Markowiak és Śliżewska, 2018).

4.5.6. Szimbiotikumok

Szimbiotikumokról egymással szinergikus kapcsolatban álló probiotikumok és a prebiotikumok együttes alkalmazásakor beszélünk. Azok a termékek szimbiotikumok, amikben a prebiotikus alkotóelem szelektíven segíti egy probiotikus mikroorganizmus működését (Markowiak and Śliżewska, 2018). A cél a bélflóra egyensúlyának fenntartása és javítása úgy, hogy tápanyagot biztosítunk a probiotikus törzs fermentációjához. Hatásuk függ a pre- és probiotikumok egyéni kombinációjától (Śliżewska és mtsai., 2020) Több olyan vizsgálatban azonban, ahol összehasonlították a pre- és probiotikumok hatását az együttes adagolással, a kombináció több esetben mégis felülmúlta a csupán pro- és prebiotikus kezelések eredményeit (Tayeri és mtsai., 2018).

4.5.7. Növényi kivonatok alkalmazása takarmány kiegészítőként

Az állati takarmányozás során az egyéb adalékok közé tartoznak a növényi kivonatok és az éterikus olajok. Az aktív hatóanyagaik a flavonoidok, a polifenolok és a katechol vegyületek. A növényekből származó számos természetes anyagok, illóolajok, melyeket a növények különböző részeiből nyernek ki alapvető szerepet játszhat az élelmiszerekben mint antimikrobiális és antioxidáns vegyületek. Ezek közül a leggyakoribbak a gyógynövények és a fűszerek. A növényi kivonatok főként fehérjékből, peptidekből, oligoszacharidokból, zsírsavakból, vitaminokból, mikro ásványi anyagokból állnak. A növényi kivonatok széleskörű bioaktivitással rendelkeznek, és aktív másodlagos növényi metabolitjaik jellemzően az izoprén-származékok és a flavonoidok osztályába tartoznak (Tajodini és mtsai., 2015). Vannak olyan növényi kivonatok, amik prebiotikus oligoszacharidokat is tartalmaznak, fermentációjukat követően elősegítik a propionsav-képződést, ezáltal csökkentik a patogének szaporodását (Alloui et al., 2014). Számos növényi extraktum tartalmaz antioxidáns, antimikrobiális, gyulladáscsökkentő, antikokcidális, és féreghajtó tulajdonságokkal rendelkező kémiai vegyületeket. A növényi kivonatok segítik a bélmikrobióta eubiotikus állapotának fenntartását (Lopez-Bote, 2004), mivel Gram pozitív és negatív baktériumokra egyaránt hat a baktericid illetve bakteriosztatikus hatásuk (Alloui et al., 2014). A termőterület, az éghajlati viszonyok, a vegetációs fázis, a genetikai módosítások befolyásolják kémiai és biológiai sokféleségüket. A növényi kivonatok a hatásukat a takarmányfelvétel növelésével, az endogén

váladékok serkentésével, javítják a táplálóanyag-felszívódást és a nitrogén-retenciót, illetve antioxidáns, antimikrobiális tevékenységük is van. Ezeken kívül fokozzák a bélcsatorna vérellátását is. Az oregánókivonatról Giannenas és munkatársai (2003) bizonyították, hogy kokcidiaellenes hatása van (*Eimeria tenella*, *E. acervulina*), éterikus olajokkal fokozható a hasnyálmirigy és a vékonybél enzimtermelése (Jamroz és mtsai., 2005), valamint a fokhagyma szerves kénvegyületei fokozzák az emésztőenzimek termelését és antibakteriális hatásuk is van (Peinado és mtsai., 2013). Több kutatás dokumentálta a növényi kivonatok jótékony hatását a baromfi teljesítményére (Tucker, 2002, Denli és mtsai., 2004). A növényi kivonatok vagy olajok javítják a bél mikrobiomot úgy, hogy szabályozzák a potenciális kórokozókat, és a vékonybélben lévő emésztési kapacitást segítik. Wenk és munkatársai (2000) megfigyelték, hogy a növényi kivonatok erős hatást gyakorolnak az endokrin rendszerre és serkentik a köztes tápanyag-anyagcserét. A növényi kivonatok takarmány-adalékanyagként való használata baromfi esetében értékes lehet, mert lehetővé teszi az általános teljesítmény maximalizálását és a baromfi emészthetőségének javítását. A baromfikísérletekben vizsgált növényi kivonatok többsége pozitív hatást mutatott a termelékenységre, és nem volt káros hatása az állatok egészségére és a kapott állati termékekre.

4.5.8. Polifenolok általános jellemzése

Humán és gazdasági haszonállatok esetében egyaránt több kutatás is foglalkozik a polifenolokban dús ételek fogyasztásának hatásait (Marranzano és mtsai., 2018, Silva-Guillen és mtsai., 2020, Hashem és mtsai., 2020). Ezek a vegyületek kémiaiilag változatos, másodlagos anyagcsere termékek, melyek legalább egy aromás gyűrűt tartalmaznak, és különböző funkciós csoportok (főként hidroxil csoport) kapcsolódik. A polifenolok funkciójuk szerint elsősorban a növény leveleiben, rügyeiben és a gyümölcsökben halmozódik (Lavola és mtsai., 2012). Fő feladatuk megvédeni a növényt a stresszhatásoktól antioxidánsként, színanyagokként vagy sztubsztátként (Berini és mtsai., 2018). A fenolos vegyületek emelkedését okozó stresszfaktor lehet a vízhiány, UV-B sugárzás és a kártevők jelenléte (Nascimento és mtsai., 2015, Kovalikova és mtsai., 2019). Polifenolos vegyületek előállítására az emberi és az állati szervezet nem képes, ezért ezek a vegyületek csak táplálékkal kerülhetnek a szervezetbe. Felszívódásuk és biológiai hasznosulásuk nagyban függ az adott vegyület kémiai felépülésétől, a polifenol molekulát körülvevő takarmányban lévő élelmi rostok, és a bélflóra (Marín és mtsai., 2015, Catalkaya és mtsai., 2020). Polifenolok biokémiai tulajdonsága az antioxidáns

hatás, ezt a kémiai szerkezete határozza meg. A fenolos gyűrű és a hidroxilcsoportok miatt jó elektron és hidrogéndonor, ezáltal a szabad gyököket képes semlegesíteni, valamint kelátokat tud képezni a fémionokkal (Leopoldini és mtsai., 2006). A polifenolok immunmoduláló hatással is bírnak. Hatással vannak az immunsejtek populációira, szabályozzák a gyulladást segítő gének kifejeződését, valamint szabályozzák a citokinek termelődését. A flavanoidoknak lehet közvetett é közvetlen antibakteriális hatásuk valamint gátolhatják a biofilmek képződését (Cushnie és Lamb, 2011). Xu és Lee antibiotikum rezisztens baktériumok ellen hatékonyan használható flavanoid molekulát kerestek (2001). Kimutatták, hogy a meticillin-rezisztens *Staphylococcus aureus* ellen négy flavanoid (miricetin, datiszcetin, kempferol és kvercetin) és két flavon (flavon és luteoin) is hatásos.

4.5.9. Szőlőmagkivonat

Az Élelmezésügyi és Mezőgazdasági Világszervezet (FAO) adatai alapján évente 67 millió tonna szőlőt terem, ezzel a világ egyik legjelentősebb gyümölcse, melynek nagy része borászati és gyümölcsleipar mellékterméke lesz a feldolgozás során. A keletkező szőlőtörköly (héj, magok és szár) egy kifejezetten olcsó, zúzott keverék. A beltartalmi mutatóit nagymértékben befolyásolja az éghajlat, az alkalmazott szőlőfajta, talaj és éghajlati adottságok, borkészítés technológiája. A szőlő összetételét és tulajdonságait széles körben vizsgálták, és arról számoltak be, hogy a szőlő nagy mennyiségű fenolos vegyületet tartalmaz (Somers és Ziemelis, 1985). A szőlőtörkölyből nyert kivonatok nagy mennyiségben tartalmaznak monomer fenolos vegyületeket, például (+)-catechineket, (-)-epicatechint és (-)-epicatechin-3-o-gallátot, valamint dimer, trimer és tetramer procianidineket (Saito és mtsai., 1998). A szőlőtörköly bioaktív vegyületei eltérnek a szőlőben és a borban találhatóaktól, a borászati melléktermékek patogén baktériumok, vírusok, gombák, toxinok és paraziták elleni aktivitása bizonyított (Friedman 2014). A szőlőtörkölyben lévő antioxidáns fenolos vegyületek, ezeket patogén betegségek elleni potenciális szerként ismerjük. Fontos, hogy ezek a fenolos vegyületek a borkészítés során rosszul oldódnak ki a borba, tehát a szőlőtörkölyben maradnak, ezáltal a szőlőtörköly polifenolokban nagyon gazdag (Friedman 2014). Az antioxidánsok olyan molakulák, melyek a célsejtben megakadályozzák vagy késleltetik az oxidatív károsodást. Hatásukat az élő szervezetekben alacsony koncentrációban, és eltérő módon fejtik ki. Ilyen például, ha redulálószerként működnek vagy génkifejeződést szabályozzák (Gutteridge és Halliwell 2010). Néhány példa az antioxidánsokra az aszkorbinsav, a húgysav és egyes polifenolok, mint a resveratrol. A szőlőtörkölykivonatok antioxidánst élelmi rostokat, valamint

kivonható és nem kivonható polifenolokat tartalmazó komplex összetétellel rendelkezik, ennek köszönhetően széles körű felhasználási lehetőségeket mutathatnak többek között a mezőgazdasági és takarmányiparban, valamint a gyógyszer és kozmetikai iparban (Tayengwa és Mapiye 2018). A szőlőtörkölyben lévő antioxidatív polifenolok a fenolsavak, a flavonoidok, a lignánok és a sztilbének. A különböző típusú szőlőpolifenolok egészségfejlesztő és betegségmegelőző hatásai jól dokumentáltak. A fehér szőlő törkölyének fő fenolos összetevői a fenolsavak, a flavan-3-olok és azok gallátjai, valamint a flavonolok és glikozidjai. Az antimikrobiális gyógyszerek kiterjedt használata az antimikrobiális rezisztenciák növekedését eredményezte, ami a jelen pillanatban aggasztó probléma. Az antimikrobiális képességgel rendelkező természetes kivonatok használata jó alternatíva lehet, amellyel elkerülhető a rezisztenciák kialakulása (Murphy és mtsai. 2017).

5. Anyag és módszerek

5.1. Bélsárminták homogenizálása, előkészítése és feldolgoása

A gödöllői laborban a fagyasztott állapotban lévő mintákból analitika mérleggel kb. 150 mg-ot mértünk ki steril, 2 ml-es Eppendorf csövekbe, majd annyi steril fiziológiás sóoldatot (8,5 g/l NaCl) adtunk hozzá, hogy a minta tízszeresre híguljon (kb. 1350 μ l-t). Ezután az elegyet homogenizáltuk, és törzsoldatot készítettünk. Ezt követően tízes léptékű hígítási sort készítettünk, ahol az első tag a törzsoldat volt az utolsó pedig ennek 10^7 -szeres hígítása. A hígított mintákból 25-25 μ l-t cseppentettünk szelektív táptalajokra, legnagyobb mértékű hígítással kezdve a csökkenő hígítások (növekvő sejtkoncentrációk) felé haladva. A hagyományos szélesztési technikával 100-100 μ l mintát kellett volna a különböző táptalajokra széleszteni, azonban ehhez a módszerhez rengeteg Petri-csésze lett volna szükség, valamint a jól elvégzett szélesztés folyamata rendkívül időigényes. A laboratóriumunk dolgozóinak korábbi vizsgálatai igazolták, hogy mindkét technika alkalmas a minták telepszámának meghatározására, és a kapott eredmények közt nincs szignifikáns eltérés, ezért idő és fogyóeszköz takarékoság céljából a foltban oltás technikájával határoztuk meg a baktériumok telepszámát minden esetben.

5.2. Tenyésztett mikrobák csíraszám meghatározása

A Petri-csészén egy-egy telep egy-egy telepképző egységnek, másnéven colony forming unit-nak (CFU) felel meg az eredeti mintában. Ez az érték baktériumok és élesztőgombák esetében megközelítőleg megegyezik a sejtszámmal, de nem minden esetben. A telepképző egységek meghatározása élő, növekedésre képes sejtek tenyésztésén alapszik. Az eredeti székletminta mikrobaszámának meghatározáshoz megszámoltuk, hogy egy táptalajon hány darab mikroba telep látható, majd a párhuzamos tenyésztések eredményét átlagoltuk és a kapott értéket megszoroztuk a hígítás mértékével és meg 40-nel, mivel a CFU értéket 1 g-ra kell megadni, és a táptalajra minden esetben csak 25-25 μ l-t mintát cseppentettünk. Ha a hígítás és a cseppentés megfelelő, akkor általában két hígítási tag esetében is leszámolható a telepszám, azonban az alábbi képlettel kell korrigálni az eredményeket:

Ahol,

- N: mikrobaszám 1 ml-re vagy egy g-ra
- $\sum C$: a két különböző hígítási táptalajain leszámolt telepek összege
- V: a szélesztésre használt inokulum térfogata ml-ben (jelen esetben ez 0,1 ml)
- d: a kevésbé hígított lemez hígítási foka.

$$N = \frac{\sum C}{V \times 1,1 \times d}$$

Az összcsíraszám meghatározása egyszerű, az összes mikrobatelepet meg kell számolni a táptalajon, azonban a szelektív táptalajok esetében ez komplikáltabb, mivel el kell különíteni a meghatározni kívánt baktériumot a táptalajon esetlegesen növekvő egyéb mikrobáktól.

5.3. Alkalmazott táptalajok

A **Nutrient agaron** az aerob összcsíraszám meghatározása történt. A Nutrient agar nem tartalmaz semmilyen gátló vagy szelektáló szert, elméletileg mindenféle mikroorganizmus képes rajta növekedni.

- **Összetétele:** 15 g/l agar, 1 g/l húskivonat, 5 g/l pepton, 5 g/l NaCl, 2 g/l élesztőkivonat.
- **Inkubációs idő:** aerob körülmények között, 24 órán keresztül
- **Inkubációs hőmérséklet:** 37 °C

Coliform és *E.coli* baktériumok (*Enterobacteriaceae*) kimutatása az élelmiszer és a vízmintákból kötelező, ezért ezek telepszámának meghatározására több táptalajt is kifejlesztettek a kutatók, ezekkel a táptalajokkal a coliform baktériumok szelektíven tenyésztethetők. Munkánk során a **ChromoBio Coliform Agar** táptalajt használtuk. A táptalajban lévő kromogén anyagok miatt nem autoklávozható. Az izopropil-béta-d-thiogalaktopiranozid a laktózt helyettesíti, ennek köszönhetően a laktózt fermentáló baktériumok laktóz bontó enzimjeinek a vizsgálatáért felelős. Tehát a táptalaj detektálja a β -D-glükuronidáz és a β -D-galaktozidáz aktivitást, a két anyag együttes jelenléte a telepeknek kék-sötétlila színt kölcsönöz. Azonban nem minden *E. coli* törzs (3-4%) rendelkezik β -D-glükuronidáz aktivitással, így ezek rózsaszín telepeket képeznek, a galaktozidáz enzim jelenléte miatt.

- **Összetétele** a következő: kazein pepton 1 g/l, élesztő kivonat 2 g/l, triptofán 1 g/l, szorbitol 1 g/l, nátrium- klorid 5,0 g/l, nátrium piruvát 1,0 g/l, 6-cloro-3-indolyil- β -D-galac-topyranoside 0,2 g/l, 5-bróm-4-klór-3-indolyil- β -D-glükuronid 0,1 g/l, izopropil-béta-d-thiogalaktopiranozid (X-gal) 0,1 g/l, Tergitol 7.

- **Inkubációs idő:** aerob körülmények között, 24 órán keresztül
- **Inkubációs hőmérséklet:** 37 °C

A *Lactobacillus*-ok Gram pozitív fakultatív anaerob vagy mikroaerofil spórát nem képző, pálcá alakú baktériumok. Szinte mindenütt előfordulnak, pl. növényeken, állatok testfelszínén, bélrendszerükben, stb. CO₂-vel dúsított atmoszférában tenyésztették a *Lactobacillus* izolátumokat. A laborban rendelkezésre áll néhány anaerob tenyésztőedény, és egy megfelelő csatlakozó, így egy egyszerű szódás szifon segítségével könnyedén tudunk CO₂-t juttatni a táptalajokat tartalmazó és már légmentesen lezárt tenyésztőedényekbe (2. ábra). A *Lactobacillus*-ok meghatározása De Man–Rogosa–Sharpe (MRS) táptalajon történt. Ez a

2. ábra A tejsavbaktériumok széndioxiddal dúsított légtérben történő tenyésztésének megvalósítására alkalmazott „berendezés”.



táptalaj kis mértékben szelektív (alacsony pH értéke miatt), és optimális körülményeket biztosít a *Lactobacillus*-ok számára. Összetétele szinte gyártónként eltér, egyik sem biztosít teljes szelektivitás *Lactobacillus* fajokra.

- **Az MRS táptalaj összetétel példa:** glükóz 20 g/l, agar 15 g/l, peptonok 10 g/l, húskivonat 10 g/l, élesztő kivonat 5 g/l, nátrium acetát 5 g/l, ammónium citrát 2 g/l, dikálium-hidrogénfoszfát 2 g/l, tween80 1.08 g/l, magnézium-szulfát 0.2 g/l, mangán-szulfát 0.05 g/l
- **Inkubációs hőmérséklet:** 37 °C
- **Inkubációs idő:** 3-4 napon keresztül.

A bélrendszerében élő Gram negatív mikrobák egyik jellegzetes családja az *Enterobacteriaceae*. Ezeket szokták „bélbaktériumoknak” vagy „coliform baktériumoknak” is nevezni. Számos különböző genus tartozik ide, egy része elsődlegesen patogén (*Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*), de a legtöbb faj nem vagy csak bizonyos körülmények közt számít kórokozónak (*Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Enterobacter*, *Morganella*, *Serratia*, *Providencia*, stb.). A *Salmonella* fajok jelentős kórokozók baromfi esetében, ezen felül potenciálisan humán patogének is, ezért a tervezett etetési kísérlet során kimutatásuk és mennyiségi meghatározásuk fontos, ennek megfelelően több táptalajt is kifejlesztettek a

kutatók. A gödöllői laborban három ilyen táptalaj elérhető volt ugyan, de korábban nem volt használva, ezért el kellett végezni a táptalajok összehasonlítását. Ezek a következők voltak:

SS: Salmonella–Shigella Agar:

- **Felhasználása:** szelektív és differenciáló táptalaj a patogén enterális baktériumok, különösen a *Salmonella* nemzetséghez tartozó baktériumok klinikai mintákból való izolálására.
- **Működési elve:** Gram-pozitív mikroorganizmusok és a *Salmonella* és a *Shigella* kivételével az *Enterobacteriaceae*-k gátlásának mértéke alapján közepesen szelektív táptalajnak számít, amelyet epesók, brilliantzöld és citrátok tartalma miatt gátol. A táptalajban lévő laktózzal az SS Agarban az enterális mikroorganizmusok megkülönböztethetőek, mivel a laktózt nem fermentáló mikroorganizmusok színtelen, míg a laktózt fermentálók által termelt sav miatt a neutrál vörös indikátor jelenlétében vörös telepek keletkeznek
- **Összetétel:** agar 13.5 g/l, marhahúskivonat 5 g/l, pankreatikusan emésztett kazein 2.5 g/l, peptikusan emésztett állati szövetek 2.5 g/l, laktóz 10 g/l, epesók 8.5 g/l, nátrium-citrát 8.5 g/l, nátrium-tioszulfát 8.5 g/l, vas-citrát 1 g/l, brilliantzöld 0.33 g/l, neutrál vörös 0.025 g/l
- **Inkubációs idő:** legalább 18–24 órán át vagy szükség esetén
- **Inkubációs hőmérséklet:** 35±2°C-on

XLD: Xylose Lysine Deoxycholate Agar:

- **Felhasználása:** mérsékelten szelektív és differenciáló táptalaj Gram-negatív enterális patogén (*Salmonella* és *Shigella*) klinikai mintákból való izolálására valamint differenciálására. *Shigella* sp. izolálására kifejezetten alkalmas.
- **Működési elve:** A patogéneket megkülönbözteti a nem patogén laktózfermentáló mikroorganizmusoktól, valamint számos, laktózt vagy szacharózt nem fermentáló, nem patogén mikroorganizmustól is. A tápközeget úgy állították össze, hogy segítse a *Shigella* szaporodását, mivel az számos más tápközegen az abban található toxikus inhibitorok miatt nem növekedett. Élesztőkivonatot tartalmaz tápanyag- és vitaminforrásként. A nátriumdeoxikolatot szelektáló anyagként funkcionál a gram-pozitív mikroorganizmusok gátlására. A táptalaj tartalmaz xilózt is, mivel azt a *Shigella* fajok kivételével gyakorlatilag az összes enterális mikroorganizmus fermentálja, így a *Shigella* fajok elkülöníthetőek. A hozzáadott lizin lehetővé teszi a *Salmonella* fajoknak a nem patogén fajoktól való elkülönítését

- **Összetétel:** agar 13.5 g/l, laktóz 7.5 g/l, szacharóz 7.5 g/l, nátrium-tioszulfát 6.8 g/l, lizin 5 g/l, nátrium-klorid 5 g/l, xilóz 3.5 g/l, élesztőkivonat 3 g/l, nátrium-dezoxikolát 2,5 g/l, vas-ammónium-citrát 0.8 g/l, fenolvörös 0.08 g/l
- **Inkubációs idő:** legalább 18–24 órán át, azonban előfordulhat, hogy a XLD Agar táptalajon lévő kolóniáknak 48 órás inkubációra van szükségük a teljes színfejlődéshez.
- **Inkubációs hőmérséklet:** 35+/-2°C-on

HE: Hektoen Enteric Agar:

- **Felhasználása:** mérsékelten szelektív és differenciáló táptalaj a Gram-negatív enterális mikroorganizmusok (elsősorban *Shigella* és *Salmonella* fajok) izolálására és tenyésztésére
- **Működési elve:** A korábbi HE agarhoz képest, már nincs benne nátrium-dezoxikolát, illetve kisebb az epesók koncentrációja, valamint annak érdekében, hogy ellensúlyozva legyen az epesók hatása, a pepton koncentrációját megemelték. Az epesók szelektívvé teszik a közeget, gátolják a Gram-pozitív szervezeteket, és csökkentik néhány, a *Salmonella* és a *Shigella* kivételével a Gram-negatív szervezetek növekedését. A táptalajban lévő vas-ammónium-citrát miatt kimutatható a *Salmonella* által termelt kénhidrogén. A laktózt, a szacharózt és a szalicint a kolóniák és a kolóniák melletti táptalaj színe alapján történő optimális megkülönböztetés érdekében tartalmazzák. A *Salmonella* és a *Shigella* nem bontja ezeket a szénvegyületeket, ezáltal nem okoznak színváltozást a pH-indikátorrendszerben. Azok a szervezetek (pl. *E.coli*) egyet, vagy többet savakká fementálnak sárga vagy narancssárga színváltozást okoz.
- **Összetétel:** agar 13.5 g/l, laktóz 12 g/l, szacharóz 12 g/l, peptikus emésztett állati szövetek 12 g/l, epesók 9 g/l, nátrium tioszulfát 5 g/l, nátrium klorid 5 g/l, élesztőkivonat 3 g/l, szalicin 2 g/l, vas-ammónium-citrát 1.5 g/l, fuchsin sav 0.1 g/l
- **Inkubációs idő:** 18–24 óra
- **Inkubációs hőmérséklet:** 35+/-2°C-on

A bélrendszerében élő Gram negatív mikrobák közé tartoznak *Campylobacter* nemzetség tagjai is, mikroaerofil körülményeket kedvelik. *Campylobacter* fajokról ismert, hogy több, intesztinális fertőzéseket okozó patogén faj is található közöttük. Broilercsirkék esetében a *Campylobacter jejuni* és *Campylobacter coli* fajok okozzák a legnagyobb problémát. Fontos megjegyezni, hogy nem megfelelő hőkezelést követően a *Campylobacter* fertőzés csirkehús fogyasztását követően emberre is áterjedhet. A kutatásunk során a *Campylobacter* Bloodfree Selective táptalajt használtuk.

Campylobacter Bloodfree Selective táptalaj

- **Felhasználása:** *Campylobacter* fajok székletmintából történő izolálására szolgáló szelektív táptalaj
- **Működési elve:** A marhahúskivonat és két különböző pepton biztosítja a nitrogénforrást. A vért aktív szén, vas-szulfát és nátrium-piruvát kombinációja helyettesíti. A szén abszorbálja a legtöbb toxikus anyagot, míg a vasszulfát és a piruvát kémiai redukálószerként van jelen. Kutatók kifejlesztették dezoxikolát és a cefoperazon olyan kombinációját, mely gátolja a normál flóra mikroorganizmusait, azonban nem gátolta a *C. jejuni*, a *C. fetus*, a *C. coli* és a *C. lari* fajok növekedését.
- **Összetétel:** agar 12 g/l, marhahúskivonat 10 g/l, pepton 10 g/l, nátrium-klorid 5 g/l, aktív szén 4 g/l, hidrolizált kazein 3 g/l, nátrium-dezoxikolát 1 g/l, vas-szulfát 0.25 g/l, nátrium-piruvát 0.25 g/l, cefoperazon 32 mg/l
- **Inkubációs idő:** 42–48 órán keresztül
- **Inkubációs hőmérséklet:** 35–37 °C-on, mikroaerob körülmények között

5.4. A *Salmonella* táptalajok tesztelésére alkalmazott mikrobák

A háromféle *Salmonella* táptalaj specifikusságának teszteléséhez 15 baktérium törzset alkalmaztunk, a baktériumokat Nutrient táptalajon tartottunk fent (1. táblázat)

1. táblázat *Salmonella* táptalaj specifikussági vizsgálat teszteléséhez alkalmazott baktériumok

azonosító	azonosító
<i>Salmonella enterica</i> ATCC 13076	<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048
<i>Salmonella enteritidis</i> 704	<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047
<i>Salmonella typhimurium</i> 208	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883
<i>Salmonella infantis</i> 1747	<i>Klebsiella oxytoca</i> ATCC 49131
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 6380
<i>Shigella boydii</i> ATCC 9207	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 29906
<i>Shigella sonnei</i> ATCC 9290	<i>Proteus hauseri</i> ATCC 13315
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022	

ATCC: American Type Culture Collection törzsgyűjtemény referencia izolátumai. Az ATCC számmal nem rendelkező *Salmonella* törzsek a MATE GBI törzsgyűjteményéből származnak.

5.5. Statisztikai elemzés

Minden kezelési csoportban 6-6 állat mintájából határoztuk meg a vizsgált baktériumok telepszámát két párhuzamos tenyésztés átlagolásával. A kapott telepszám értékeket ezután log₁₀ értékekké alakítottuk (az ábrázolhatóság érdekében) és a statisztikai elemzése során is a log₁₀ értékeket hasonlítottuk össze egyváltozós varianciaanalízis (ANOVA) segítségével, melyet Tukey utólagos teszt követett. Minden tesztben a P-érték < 0,05-öt tekintettünk statisztikai jelentőségnek.

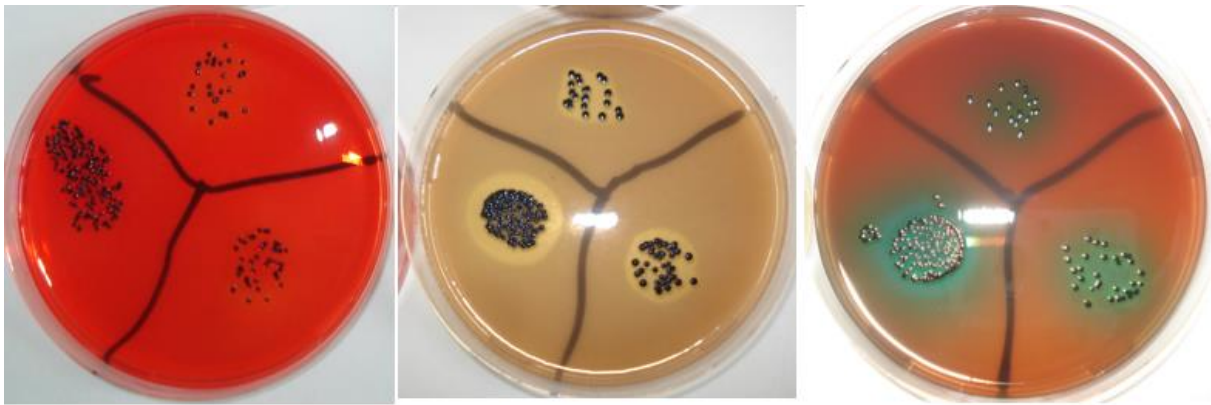
6. Eredmények és értékelésük

6.1. *Salmonella* specifikus kimutatására alkalmas táptalajok tesztelése

A *Salmonella* fajok jelentős kórokozók baromfi esetében, és mivel potenciálisan humán patogének is, a tervezett etetési kísérlet során kimutatásuk és mennyiségi meghatározásuk kiemelt fontosságú volt. Kiemelt fontosságuknak köszönhetően kimutatásukra és azonosításukra számos különböző táptalajt fejlesztettek, melyből háromféleképpen a laboratóriumunk is rendelkezik (SS: Salmonella–Shigella Agar; XLD: Xylose Lysine Deoxycholate Agar; HE: Hektoen Enteric Agar), de ezeket korábban még nem használtuk, így első lépésként a táptalajok összehasonlítását végeztük el. Teszteltük, hogy a különböző *Salmonella* izolátumok hogyan növekednek a táptalajokon, illetve azt is vizsgáltuk, hogy közel rokon egyéb *Enterobacteriaceae* családba tartozó baktériumok milyen telep morfológiát mutatnak ezeken a táptalajokon. Mindkét vizsgálat fontos, mivel egyrészt biztosnak kell lennünk abban, hogy a *Salmonella* telepeket azonosítani tudjuk, másrészt pedig a lehető lebiztosabban ki kell zárni minden fals pozitív találatot.

Munkánk első lépéseként tehát egy törzsgyűjteményes (*S. enterica* ATCC 13076) és három, az intézeti dolgozók által korábban izolált és azonosított, *Salmonella* izolátum (*S. enteritidis* 704, *S. typhimurium* 208, *S. infantis* 1747) alkalmazásával teszteltük a táptalajokat. Mind a négy baktériumból 0,5 McF töménységű (ez hozzávetőlegesen $1-2 \times 10^8$ CFU/ml baktériumnak fele meg) szuszpenziót készítettünk steril fiziológiás sóoldatban, majd ebből tízes léptékű hígítási sort készítettünk (szintén fiziológiás sóoldatban) és 25-25 µl-t foltban oltottunk a háromféle táptalajra három hígítási tagból, amiről feltételeztük, hogy jól elkülönülő telepeket kapunk. A táptalajokat 24 órán keresztül 37 °C-on inkubáltuk, majd az eredményt értékeltük (**3. ábra**). Mind a négy *Salmonella* izolátum a *Salmonellákra* jellemző telep morfológiát mutatta: XLD: fekete telepek, táptalaj piros marad a telepek körül; SS: fekete telepek, a táptalaj feltisztul a telepek körül; HE: sötét telep és a táptalaj elszíneződik (**2. táblázat**).

3. ábra Az *S. typhimurium* 208 izolátum növekedése és telepmorfológiája a három különböző táptalajon. Balról jobbra: XLD, SS és HE.



A *Salmonella* izolátumok mellett 11 egyéb *Enterobacteriaceae* családba tartozó baktériumot (ld. 2. táblázat) is teszteltünk a háromféle táptalajon, melyekről közismert, hogy képesek rajta növekedni és bizonyos esetekben akár *Salmonella*-szerű telepeket is képezhetnek. A kapott eredményt az 2. táblázat foglalja össze.

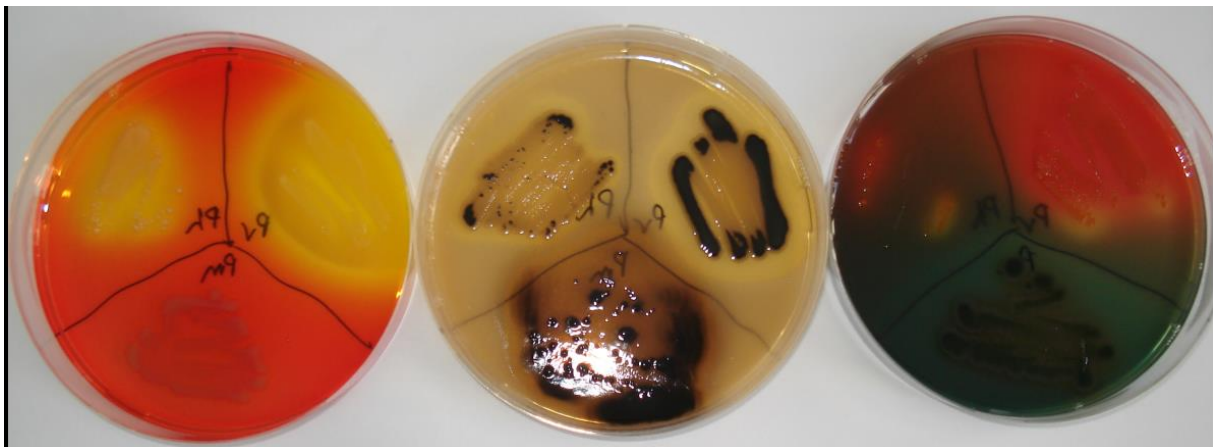
2. táblázat négy *Salmonella* és 11 egyéb izolátum telepmorfológiai sajátosságai a három különböző táptalajon

azonosító	SS	XLD	HE
<i>Salmonella enterica</i> ATCC 13076	fekete telepek, a táptalaj feltisztul	fekete telepek, táptalaj piros marad	sötét telep és a táptalaj elszíneződik
<i>Salmonella enteritidis</i> 704	fekete telepek, a táptalaj feltisztul	fekete telepek, táptalaj piros marad	sötét telep és a táptalaj elszíneződik
<i>Salmonella typhimurium</i> 208	fekete telepek, a táptalaj feltisztul	fekete telepek, táptalaj piros marad	sötét telep és a táptalaj elszíneződik
<i>Salmonella infantis</i> 1747	fekete telepek, a táptalaj feltisztul	fekete telepek, táptalaj piros marad	sötét telep és a táptalaj elszíneződik
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	rózsaszínes telep	fehér telep, táptalaj sárgul a telep körül	sárgás telep, táptalaj feltisztul
<i>Shigella boydii</i> ATCC 9207	rózsaszínes telep	rózsaszínes telep	sötét telep és a táptalaj elszíneződik
<i>Shigella sonnei</i> ATCC 9290	rózsaszínes telep	rózsaszínes telep	sötét telep és a táptalaj elszíneződik
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022	rózsaszínes telep	rózsaszínes telep	sötét telep és a táptalaj elszíneződik
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	rózsaszínes telep	fehér telep, táptalaj sárgul a telep körül	sárgás telep, táptalaj feltisztul
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047	rózsaszínes telep	fehér telep, táptalaj sárgul a telep körül	sötét telep, táptalaj feltisztul
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	rózsaszínes telep	fehér telep, táptalaj sárgul a telep körül	sárgás telep, táptalaj feltisztul
<i>Klebsiella oxytoca</i> ATCC 49131	rózsaszínes telep	fehér telep, táptalaj sárgul a telep körül	sárgás telep, táptalaj feltisztul
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 6380	fekete telepek, a táptalaj feltisztul	fehér telep, táptalaj sárgul a telep körül	sárgás telep, táptalaj feltisztul
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 29906	fekete telepek, a táptalaj feltisztul	rózsaszínes telep	sötét telep és a táptalaj elszíneződik
<i>Proteus hauseri</i> ATCC 13315	fehéres, rózsaszínes telep, kicsit feketedik	fehér telep, táptalaj sárgul a telep körül	sárgás telep, táptalaj feltisztul

A **2. táblázatban** a négy *Salmonella* és 11 egyéb izolátum telepmorfológiai sajátosságai a három különböző táptalajon. A piros színnel kiemelt telepmorfológia azokra a baktériumokra utal, melyek az adott táptalajon *Salmonella*-szerű vagy ahhoz nagyon hasonlóak (és kontroll nélkül nehezen elkülöníthetők).

Mindhárom *Proteus* izolátum *Salmonella*-szerű vagy ahhoz nagyon hasonló telepeket képzett SS táptalajon, a *P. mirabilis* HE táptalajon is (**4. ábra**). Ez utóbbi táptalajon a *Shigella* izolátumok és az egyik *Enterobacter* is sötét telepeket képzett. Ezen telepek részletesebb vizsgálattal elméletileg elkülöníthetők lennének a *Salmonella* telepektől, de amikor bélsár mintákból akarunk kimutatni *Salmonellát*, melyben rengeteg egyéb mikroba is megtalálható (többek közt az itt tesztelt egyéb *Enterobacteriaceae* izolátumok is) a nagyszámú egyéb telep mellett ezek pontosan nem azonosíthatók be további vizsgálatok nélkül. A három táptalaj közül a legjobbnak tehát az XLD táptalajt bizonyult (mivel a vizsgált baktériumok közül csak a *Salmonella* izolátumok mutattak ténylegesen *Salmonella*-szerű telepmorfológiát), így a későbbiekben ennek használatát részesítettük előnyben.

4. ábra Három *Proteus* izolátum növekedése és telepmorfológiája a három különböző táptalajon. Balról jobbra: XLD, SS és HE. Minden táptalajon a következő sorrendben található a baktériumok: balra fent: *P. hauseri*; jobbra fent: *P. vulgaris*; középen lent: *P. mirab*



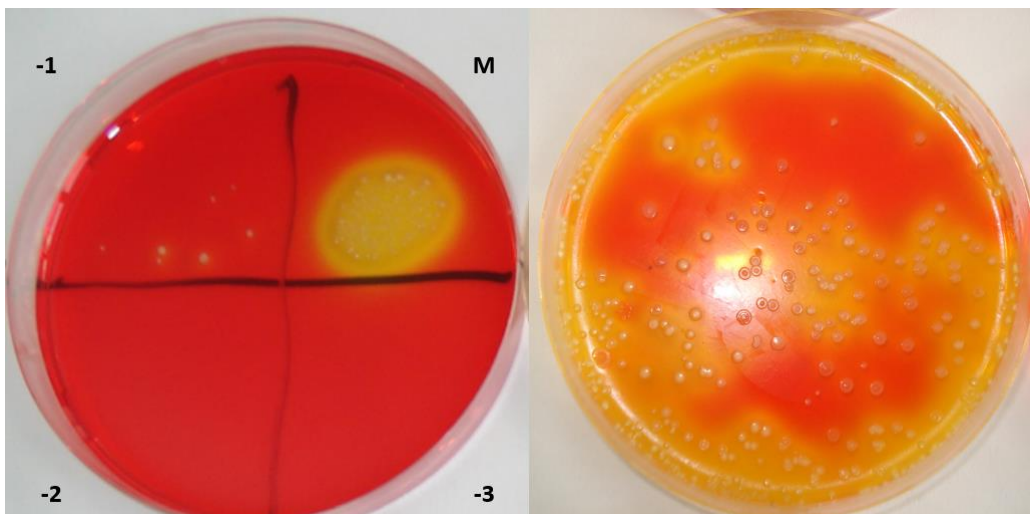
6.2. *Salmonella* specifikus kimutatására bélsár mintákból

Miután kiválasztottuk a megfelelő táptalajt teszteltük a *Salmonella* kimutatását valós bélsár mintákból. A teszt során egy korábbi kísérletből származó és azóta -80 °C-on tárolt sertés széklet mintát vizsgáltunk meg. A mintából hígítási sort készítettünk az anyagok és módszerek fejezetben leírtak alapján és a széklet szuszpenziót (M), valamint annak 10, 100 és 1000-szeres

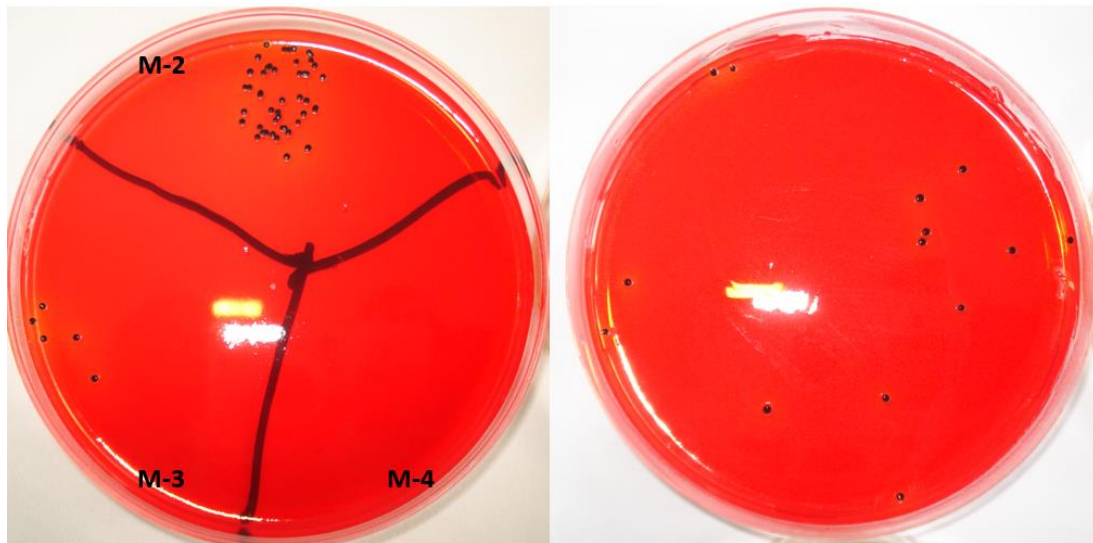
hígításából (-1, -2 és -3) 25-25 µl-t foltban oltottunk XLD táptalajra, illetve a tömény mintából (M) 100 µl-t hagyományos módon is szélesztettünk. Az inkubációt követően (24 óra, 37 °C) értékeltük az eredményt és megállapítottuk, hogy nincsenek fekete telepek, vagyis nem volt *Salmonella* a mintában, pontosabban a mintában kevesebb *Salmonella* található, mint a kimutatási érték alsó határa (100 CFU/g). Egyéb telepek, melyek feltehetően *Enterobacteriaceae* családba tartozó baktériumok lehetnek (pl. *E. coli*) növekedtek a táptalajon, de ez megfelel az előzetes elvárásainknak (**5. ábra**).

Következő lépésként ugyan ehhez a sertés bélsár mintához ismert mennyiségű (2.89×10^5 CFU/ml) *S. typhimurium* 208-at adtunk és széklet és *Salmonella* keverék szuszpenzióból hígítási sort készítettünk és meghatároztuk a keverék *Salmonella* mennyiségét foltban oltás és hagyományos szélesztés alkalmazásával (**6. ábra**), mindkét esetben két párhuzamos szélesztést készítettünk és a telepszámokat a két szélesztés átlagából számoltuk ki. Mindkét technikával sikerült kimutatni a széklet mintához adott *Salmonella* jelenlétét és a mennyiségét is megfelelő pontossággal határoztuk meg: a foltban oltás technikával a 2×10^5 CFU/ml míg a hagyományos szélesztéssel $1,37 \times 10^5$ CFU/ml kaptunk, ami jól megközelíti az elméleti $2,85 \times 10^5$ CFU/ml értéket. Összességében megállapíthatjuk tehát, hogy a kiválasztott XLD táptalaj *Salmonellát* tartalmazó széklet minta esetében megfelelő módon mutatta ki, illetve határozta meg a baktérium mennyiségét tehát valós minták esetében is megfelelő lesz a *Salmonella* fajok meghatározására.

5.ábra: A sertés széklet minta szélesztése XLD táptalajon. Balra: a tömény szuszpenzió (M) és 10-es léptékű hígításaiból (-1, -2 és -3) 25 µl-t foltban oltása. Jobbra: a tömény szuszpenzióból (M) 100 µl szélesztése. A *Salmonellára* utaló fekete telepeket egyik esetben sem növekedtek a táptalajokon.



6. ábra: A *Salmonellával* beoltott sertés széklet minta szélesztése XLD táptalajon. A tömény szuszpenzióból (M) négytagú tízes léptékű hígítási sirt készítettünk (-1, -2, -3 és -4). Balra: a az utolsó három hígítási tagból (-2, -3 és -4) 25 µl foltban oltása. Jobbra: a -3 hígítási tagból 100 µl szélesztése hagyományos módon.



6.3. A különböző szőlőmagkivonat tartalmú takarmányok mikrobiótára gyakorolt hatásának vizsgálata broilercsirkékben

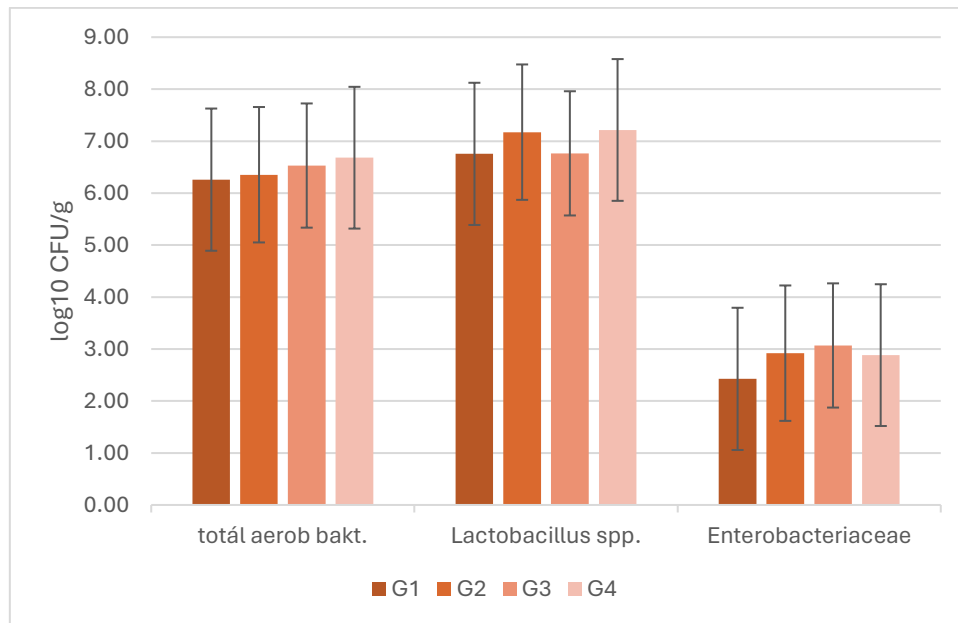
Munkánk során négy különböző mennyiségű polifenol tartalmú takarmánykiegészítő bélmikrobiótára gyakorolt hatáság vizsgáltuk három bélszakasz (begy, vakbél és vastagbél) esetében. A kontroll (G1) takarmány kiegészítő mentes volt, míg a három kezelési csoport alacsony (G2), közepes (G3), és magas (G4) polifenol tartalmú keverékek voltak. Kezelési csoportonként 6 (összesen 24) állat mintáját vizsgáltuk mindhárom bélszakaszban.

6.3.1. Begyminták eredményei:

Az adatok elemzését a begymintákkal kezdem. Itt vizsgáltuk a totál aerob CFU-t, *Lactobacillus spp.*, *Enterobacteriaceae spp.*, *Salmonella spp.* és *Campylobacter spp.* fajok számának változását.

Az **7. ábrán** a polifenol tartalomnak három baktériumcsoportra (totál aerob, LAB - tejsavbaktériumok, *Enterobacteriaceae*) gyakorolt hatását mutatom be a különböző kezelések szerint.

7. ábra Polifenol tartalom hatása a begyben az összes aerob baktériumra, tejsavbaktériumokra, és az *Enterobacteriaceae* fajokra vonatkozóan



A következőket láthatjuk:

- A totál aerob baktériumok átlagos mennyisége számottevően ($P > 0.05$) nem változik a polifenol tartalom növekedésével, de az megállapítható, hogy a polifenol tartalom növekedésével a baktériumok száma kis mértékben növekedik.
- A LAB (tejsavbaktériumok) esetében szintén mérsékelt növekedést láthatunk, különösen az alacsony és magas polifenol tartalmú kezeléseknél. Közepes polifenol tartalom esetében is kis mértékben növekedett a *Lactobacillus*ok száma, ez arra utal, hogy a közepes polifenol tartalom hatással van a populációra, azonban nem egyértelmű, hogy ez kedvező hatás-e. Az ábrán látható, hogy a polifenolok jelenléte statisztikailag nincs hatással a *Lactobacillus*ok populációjára ($P > 0.05$, 1.táblázat).
- A polifenol tartalom és az *Enterobacteriaceae* fajok kapcsolatának pontos elemzése nehéz, mert a kezelési csoportokon belül az egyes állatok CFU értékei közt igen jelentős, akár két nagyságrendnyi eltérés is volt. (7. ábra) A többi bélszakaszhoz képest az *Enterobacteriaceae* mennyisége jóval alacsonyabb volt, több mintában kimutatási határ alatti (vagyis < 200 CFU/g). Az *Enterobacteriaceae* mennyiségének átlagértéke a kontroll mintákban volt a legalacsonyabb és kezelt mintákban kissé növekedett, de a minták közti nagymértékű szórás miatt ez nem volt szignifikáns eltérés ($P > 0.05$). Az egy kezelési csoportba tartozó állatok CFU adatai között a szórás egyre nagyobb a magasabb polifenol tartalmú csoportokban. A polifenol tartalmú takarmány esetében az

Enterobacteriaceae baktériumok mennyiségének átlagértéke hozzávetőlegesen fél nagyságrenddel nagyobb, mint a kontroll állatoké. Elképzelhető, hogy ezt még jelentősen befolyásolta a takarmány mikrobiális összetétele és a külső környezet egyéb paraméterei (mivel a begy a tápcsatorna kezdeti szakaszában található és mikrobióta összetételét jelentősen befolyásolja a külső környezet, sokkal jobban, mint a bélrendszer későbbi szakaszai esetében).

- A begymintákon végzett *Campylobacter* és *Salmonella* kimutatására végzett tesztek eredménye negatív lett, nem nőtt egy telep sem egyik csoportban sem.
- Szignifikáns eltérést sehol nem tapasztaltunk ($P > 0.05$, 1.táblázat).

A begyminták ANOVA elemzése

Az **3. táblázatban** a varianciaanalízis összesített eredményei vannak, kiegészítve a szórásértékekkel a begyminták esetében

3. táblázat Begyminták varianciaanalízis összesített eredményei

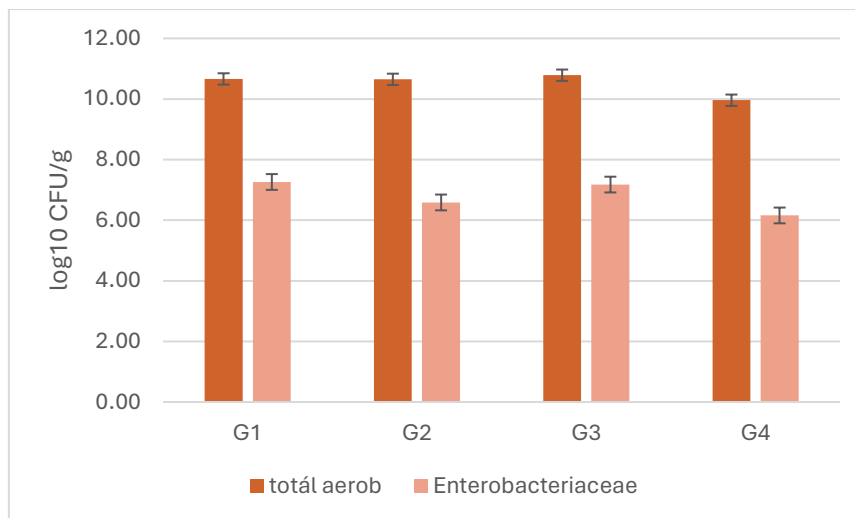
kezelés	totál aerob bakt.	<i>Lactobacillus</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>
G1	6.26±0.54a	6.75±0.34a	2.43±0.67a
G2	6.35±0.58a	7.17±0.38a	2.92±0.79a
G3	6.53±0.51a	6.76±0.65a	3.07±1.21a
G4	6.68±0.32a	7.21±0.27a	2.88±1.21a
p érték	0.48	0.15	0.71

A kezelések (G1-G4) nem mutattak statisztikailag szignifikáns hatást egyik baktériumcsoport számára sem, a különböző kezelések nem befolyásolták jelentősen a vizsgált baktériumcsoportok populációját ebben az etetési kísérletben.

6.3.2. Vakbélminták eredményei:

A következőkben a vakbélminták eredményeit ismertetem. A **8. ábrán** a polifenol tartalom hatását láthatjuk a vakbélben az összes aerob baktériumra, illetve az *Enterobacteriaceae* fajokra vonatkozóan. Az látszik, hogy a magasabb polifenol tartalom némileg csökkenti a mikrobatelepek számát, de szignifikáns hatás nem tapasztalható.

8. ábra Polifenol tartalom hatása a vakbélben az összes aerob baktériumra, illetve az *Enterobacteriaceae* fajokra vonatkozóan



A polifenol hatása az összes aerob baktériumra a vakbélmintákban (**8. ábra**):

- A totál aerob baktériumok átlagos száma számottevően nem változik a polifenol tartalom növekedésével
- A magas polifenol tartalmú takarmány esetében a legalacsonyabb az összes aerob mikroorganizmus száma.
- Látszik az adatokból, hogy a polifenol tartalom mérsékelt hatással van az aerob mikroorganizmusok számára. A magas polifenol tartalom csökkentheti az összes aerob mikroorganizmusok számát, de a minimális és maximális értékek változása jelzi, hogy a polifenolok komplex módon hatnak a különböző mikroorganizmusokra.

A polifenol hatása *Enterobacteriaceae* fajok számára (**8. ábra**):

A párhuzamos minták közti eltérés továbbra is jelentős, általában nagyobb, mint a totál aerob CFU esetében. Ennek oka az lehet, hogy a összes mikroba mennyisége viszonylag állandó és nem tér el jelentősen az egyedi állatok között, a potenciálisan patogén *Enterobacteriaceae* mennyisége egyedenként - akár a kezelések hatásától függetlenül is – jelentősen eltérhet. A takarmánykiegészítők hatását ezen mikroba csoportra a vakbél minták esetében az alábbiakban foglalhatjuk össze:

- A legmagasabb értékeket a polifenol mentes takarmány esetében láthatjuk
- Alacsony polifenol tartalmú takarmányt fogyasztó csirkék mintájában az *Enterobacteriaceae* fajok mennyisége csökken a kontrollhoz képest.

- Közepes polifenol tartalmú takarmányok esetében nő az *Enterobacteriaceae* CFU átlag értéke majdnem azonos a kontroll minták értékével. Úgy tűnik, hogy a közepes polifenol tartalom nem feltétlenül csökkenti az *Enterobacteriaceae* fajok mennyiségét.
- Magas polifenol tartalmú takarmányok esetében a legalacsonyabb az *Enterobacteriaceae* fajok mennyisége, ez utalhat arra, hogy a magas polifenoltartalom gátló hatással van az *Enterobacteriaceae* esetében.

A vakbélmintákon végzett *Campylobacter* és *Salmonella* kimutatására végzett tesztek eredménye negatív lett, nem nőtt egy telep sem egyik csoportban sem.

Vakbélminták ANOVA értékelése

A 4. táblázatban a varianciaanalízis összesített eredményei vannak, kiegészítve a szórásértékekkel a vakbélminták esetében

4. táblázat Vakbélminták varianciaanalízis összesített eredményei

Kezelés	total aerobic	<i>Enterobacteriaceae</i>
G1	10.66±1.23a	7.26±0.52a
G2	10.65±0.75a	6.57±0.89a
G3	10.78±0.58a	7.17±0.63a
G4	9.96±1.51a	6.16±0.73a
p érték	0.551	0.063

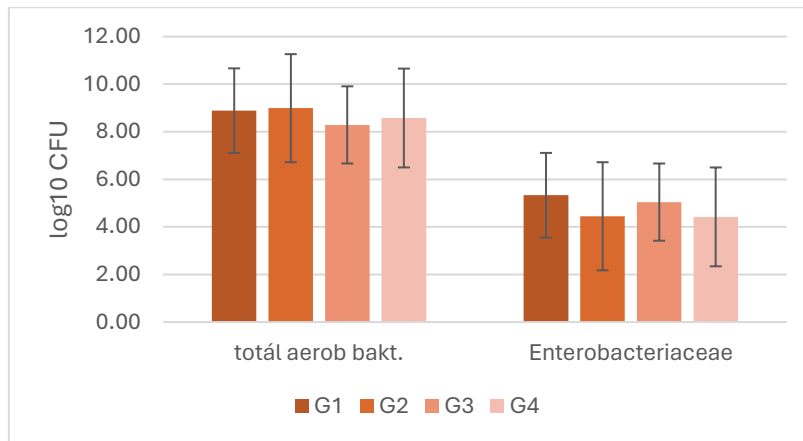
- Az összes aerob baktérium ($p=0.551$) és *Enterobacteriaceae* fajok ($p=0.063$) esetében sincs szignifikáns különbség a kezelések között.
- Szükséges megjegyezni, hogy G4-es csoport majdnem szignifikánsan tér el a többi csoporttól az *Enterobacteriaceae* baktériumok mennyiségének tekintetében.

6.3.3. Székletminták eredményei:

A 9. ábrán láthatjuk a polifenol tartalom különböző szintjeinek a hatását a széklet összes aerob mikroorganizmusra, valamint az *Enterobacteriaceae* családba tartozó baktériumokra. Elmondható, hogy a polifenolok hatással lehetnek mind az összes aerob mikroorganizmusra, valamint az *Enterobacteriaceae* családba tartozó baktériumokra, de a változások mértéke és iránya eltérő lehet a polifenol tartalom koncentrációjától függően. Az *Enterobacteriaceae*

családba tartozó mikroorganizmusok számát tekintve a magasabb polifenol tartalom úgy tűnik, hogy csökkenti a mennyiségüket.

2. ábra: Polifenol tartalom hatása a székletben az összes aerob baktériumra, illetve az *Enterobacteriaceae* fajokra vonatkozóan



A polifenol hatása az összes aerob baktériumra a széklet mintákban (9. ábra)

- Polifenolmentes takarmányt fogyasztó madarak mintáinak esetében látszik, hogy polifenolok hiányában a mikroorganizmusok száma viszonylag alacsony, és a minták minimum-maximum értékei között kicsi a különbség.
- Alacsony polifenol tartalmú takarmány esetében nő a minimum-maximum értékek közti különbség, ami arra utalhat, hogy a polifenolok hatással lehetnek a mikroorganizmusok számára.
- Közepes polifenol tartalmú takarmány esetében csökken az összes aerob mikroorganizmus száma.
- Magas polifenol tartalmú takarmány esetében látszik, hogy csökken a mikroorganizmusok száma és szórása csökken.

Összességében elmondható, hogy a polifenolok tartalmának növekedése általában csökkenti a minimális és maximális mikroorganizmus szintek közti különbséget, ami stabilabb mikrobiális közösségeket eredményezhet, azonban az aerob mikroorganizmusok száma nem mutat egyértelmű trendet.

A polifenol hatása az *Enterobacteriaceae* családban lévő baktériumokra a széklet mintákban:

- Az alacsony polifenol tartalmú takarmányt fogyasztó csirkék mintáiban az *Enterobacteriaceae* családba tartozó baktériumok száma csökken a kontrollcsoportéhoz képest.

- A magas polifenol tartalmú takarmányt fogyasztó csirkék mintában az *Enterobacteriaceae* családba tartozó baktériumok mennyisége tovább csökken, ez utalhat arra, hogy a magas polifenol tartalom gátló hatással van az *Enterobacteriaceae* baktériumokra..

Összességében az ábra azt sugallja, hogy a polifenolok jelenléte és koncentrációja befolyásolja az *Enterobacteriaceae* baktériumok mennyiségét.

A székletmintákon végzett *Campylobacter* és *Salmonella* kimutatására végzett tesztek eredménye negatív lett, nem nőtt egy telep sem egyik csoportban sem.

A székletminták ANOVA elemzése

Az **5. táblázatban** a varianciaanalízis összesített eredményei vannak, kiegészítve a szórásértékekkel a székletminták esetében

5. táblázat Vastagbélminták varianciaanalízis összesített eredményei

Kezelés	total aerob bakt.	<i>Enterobacteriaceae</i>
G1	8.89±0.64a	5.33±0.69a
G2	8.99±0.85a	4.45±1.33a
G3	8.29±0.76a	5.04±1.63a
G4	8.57±0.44a	4.42±1.12a
p érték	0.309	0.517

Az összes aerob baktérium ($p=0.309$) és *Enterobacteriaceae* fajok ($p=0.517$) a polifenolok jelenléte és koncentrációja befolyásolhatja a mikroorganizmusok populációját, azonban nem mutatható ki egyértelmű, szignifikáns eltérés a kísérleti csoportok között.

6.3.4. Begy, vakbél és székletminták összehasonlítása:

A 6. táblázat adatain látszik, hogy a szakirodalmi adatoknak megfelelően a vakbélben a legmagasabb a totál aerob mikrobaszám, és *Enterobacteriaceae* fajok átlaga, ez alátámasztja a tényt, hogy vakbél fontos szerepet játszik bizonyos emésztési folyamatokban és a mikrobiális populáció fenntartásában.

6. táblázat Különböző bélszakaszokból vett minták összehasonlítása

Totál aerob baktérium				<i>Enterobacteriaceae</i>			
kezelés	<i>Begy</i>	<i>Vakbél</i>	<i>Széklet</i>	kezelés	<i>Begy</i>	<i>Vakbél</i>	<i>Széklet</i>
G1	6.26	10.66	8.89	G1	2.43	7.26	5.33
G2	6.35	10.65	8.99	G2	2.92	6.59	4.45
G3	6.53	10.78	8.29	G3	3.07	7.18	5.04
G4	6.68	9.96	8.58	G4	2.88	6.16	4.42

7. Következtetések és javaslatok

Munkám során két célt küztünk ki. Első feladatunk az volt, hogy a rendelkezésre álló, *Salmonella* fajok kimutatására szolgáló három táptalaj közül kiválasszuk, hogy melyik táptalaj a legalkalmasabb a *Salmonella* azonosítására. Megállapítottuk, hogy *Salmonellák* tenyésztésére mindhárom táptalaj megfelel, azonban az XLD a legalkalmasabb a székletminták esetében. Ezen a táptalajon lehetőség van a *Salmonella* azonosítására, valamint a közel rokon egyéb fajok nem képeznek *Salmonella*-szerű telepeket, így nem kapunk hamis eredményeket. Dolgozatom ezen eredménye a laboratóriumunkban folyó többi hasonló jellegű munkára is pozitívan hatott, mivel ezen eredmények alapján alkalmazzák a kollégák a többi etetési kísérlet során az XLD táptalajt a baktériumok *Salmonella* kimutatására bélsár minták esetében.

Második feladatunk a polifenol kiegészítést tartalmazó takarmányokról bizonyítani, hogy nincs negatív hatása a madarak mikrobiotájára. Vizsgálati eredményeinkben sikerült igazolni a szakirodalmi adatokat, miszerint a vakbélben található a legtöbb baktérium. Ezen kívül a vizsgált szer nem volt szignifikáns hatással a bélmikrobiótára, bár a vakbél esetében a G4-es csoport majdnem szignifikánsan tér el a többi csoporttól az *Enterobacteriaceae* baktériumok mennyiségének tekintetében. Feltételezhető, hogy több állat vizsgálata esetén (vagyis ha nem 6-6, hanem 10-10 vagy még több egyedet vizsgálunk) az eltérés szignifikáns lett volna, de ha nem is akkor is biztató, hogy egy potenciálisan kórokozó csoport mennyisége csökkent.

A szabadalmi érdekeket is figyelembe véve a dolgozatomban annyi közülhetünk, hogy a G4-es csoport polifenol koncentrációja a normál takarmánykoncentrációnál jóval magasabb volt, ami problémát is okozhatott volna az bélmikrobiomnak, megállapíthattuk, hogy a takarmánykiegészítő alkalmas a további vizsgálatokra.

8. Összefoglalás

A *Salmonella* fajok jelentős kórokozók a baromfikban és potenciálisan az emberekben is, ezért kimutatásuk és mennyiségi meghatározásuk kulcsfontosságú. A *Salmonella* kimutatására és azonosítására különböző táptalajokat fejlesztettek ki, amelyek közül hárommal laboratóriumunk is rendelkezik (SS: Salmonella-Shigella Agar; XLD: Xylose Lysine Deoxycholate Agar; HE: Hektoen Enteric Agar). Összehasonlítottuk ezeket a táptalajokat, megvizsgálva, hogy a különböző *Salmonella*-izolátumok hogyan nőnek rajtuk, és hogy az *Enterobacteriaceae* családba tartozó, közeli rokon baktériumok milyen telepformológiát mutatnak ezeken a táptalajokon. Fontos, hogy a *Salmonella*-kolóniák azonosíthatók legyenek, és megbízhatóan ki lehessen zárni a hamis pozitív eredményeket.

Egy törzsgyűjtemény (*S. enterica* ATCC 13076) és három, az intézet munkatársai által korábban azonosított *Salmonella*-izolátum (*S. enteritidis* 704, *S. typhimurium* 208, *S. infantis* 1747) felhasználásával teszteltük a táptalajokat. Mind a négy baktériumot a háromféle táptalajon tenyésztettük, mindegyiket háromszoros hígításban, és 37 °C-on inkubáltuk 24 órán keresztül. A *Salmonella* izolátumok mindegyik táptalajon a *Salmonellára* jellemző kolóniamorfológiát mutattak. A táptalajok közül az XLD agar bizonyult a legalkalmasabbnak a *Salmonella* azonosítására, mivel csak a *Salmonella* izolátumok mutattak *Salmonella*-szerű kolóniamorfológiát.

A *Salmonella* izolátumokon kívül 11 másik *Enterobacteriaceae* baktériumot is teszteltünk a három táptalajon, amelyekről ismert, hogy azokon növekednek, és potenciálisan *Salmonella*-szerű kolóniákat képeznek. Az eredmények a kolóniamorfológia eltéréseit mutatták a baktériumok között a különböző táptalajokon. Az XLD agar volt a legmegbízhatóbb a *Salmonella* és a közeli rokon baktériumok megkülönböztetésében, ezért a további felhasználás során előnyben részesítettük.

A megfelelő tápközeg kiválasztása után teszteltük a *Salmonella* kimutatását valódi székletmintákban. Egy tárolt sertés ürülék-mintát vizsgáltunk, és a mintában nem mutattunk ki *Salmonella*-t, ami a kimutatási határ alatti mennyiséget jelzi. Más, valószínűleg az *Enterobacteriaceae* családba tartozó baktériumok a várakozásoknak megfelelően növekedtek a táptalajon. Ezt követően ismert mennyiségű *S. typhimurium* 208-at adtunk a sertésürülék-mintához, és a jelenlétét és mennyiségét foltban oltás és hagyományos szélesztéses módszerrel határoztuk meg, mindkettő az elméleti értékhez közeli eredményt mutatott.

Dolgozatomban négy különböző polifenoltartalmú takarmánykiegészítő hatását vizsgáltam brojlercsirkék három bélszakaszában (begy, vakbél, széklet) a bélmikrobiótára. A különböző

bélszakaszokban kapott telepszám értékek megfeleltek az irodalmi adatok alapján feltételezett értékeknek. A kontrollcsoport nem kapott takarmánykiegészítőt, míg a három kezelési csoport alacsony, közepes és magas polifenol tartalmú keverékeket kapott, megállapítottuk, hogy egyik bélszakasz mikrobiótájára sem volt szignifikáns hatással a polifenol kiegészítés. *Campylobacter* és *Salmonella* kimutatására végzett tesztek eredménye minden bélszakaszban negatív lett.

Megállapítható, hogy a biztonságossági vizsgálat eredményes volt, a tesztelt hatóanyag nem károsítja az állatok egészségét, és a bélrendszer különböző szakaszainak mikrobiótáját sem.

9. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet nyilvánítani a témavezetőmnek, Dr. Juhás Ákosnak a dolgozat elkészítése során nyújtott segítségéért, értékes tanácsaiért, türelméért és a lehetőségért, hogy a kutatásba becsatlakozhattam.

Köszönöm a MATE Biológiai Tudományi Intézet, Genetika, Mikrobiológia és Biotechnológia Tanszékének, Mikrobiológia laborjának, munkatársainak, hogy rendelkezésemre bocsátották a szükséges eszközöket, valamint, hogy kísérleteikkel és eredményeikkel nagyban hozzájárultak dolgozatom elkészüléséhez.

Gödöllő, 2024. április 29.

Jónás Regina

10. Források

1. Aarestrup, F. M. (1999) 'Association between the consumption of antimicrobial agents in animal husbandry and the occurrence of resistant bacteria among food animals', *International journal of antimicrobial agents*, 12(4), pp. 279–285.
2. Adamczyk-Sowa M, Medrek A, Madej P, Michlicka W, Dobrakowski P (2017) Does the gut microbiota influence immunity and inflammation in multiple sclerosis pathophysiology? *J Immuno Res* 2017:7904821., 14 p.
3. Alloui, M. N., A. Agabou, N. Alloui. 2014. Application of herbs and phytogetic feed additives in poultry production. A review. *Global Journal of Animal Scientific Research*. 3: 234–243.
4. Apajalahti J, Vienola K (2016) Interaction between chicken intestinal microbiota and protein digestion. *Anim Feed Sci Tech* 221:323–330.
5. Azad, M. A. K. et al. (2018) 'Probiotic Species in the Modulation of Gut Microbiota: An Overview', *BioMed Research International*. 8. 2018:9478630.
6. Babinszky L., Halas V (2019), 'Innovatív takarmányozás', Akadémia Kiadó, [mersz.hu/dokumentum/m538it__1/](https://metsz.hu/dokumentum/m538it__1/)
7. Benson AK, Kelly SA, Legge R, Ma F, Low SJ, Kim J, Zhang M, Oh PL, Nehrenberg D, Hua
8. Belkan Y, Hand T (2014) Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell* 157(1):121–141.
9. Berini J.L., Brockman S.A., Hegeman A.D., Reich P.B., Muthukrishnan R., Montgomery R.A., Forester J.D.: Combinations of abiotic factors differentially alter production of plant secondary metabolites in five woody plant species in the boreal-temperate transition zone, *Front. Plant Sci.*, 9. 1257, 2018.
10. Brown R, Clarke TB (2016) The regulation of host defences to infection by the microbiota. *Immunology* 150:1–6.
11. Brisbin JT, Gong J, Orouji S, Esufali J, Mallick AI, Parvizi P, Shewen PE, Sharif S (2011) Oral treatment of chickens with lactobacilli influences elicitation of immune responses. *Clin Vaccine Immunol* 18:1447–1455.
12. Buchon N, Broderick AN, Lemaitre B (2013) The gut microbiota—masters of host development and physiology. *Nat Rev Microbiol* 10:1038
13. Catalkaya G., Venema K., Lucini L., Rocchetti G., Delmas D., Daglia M., De Filippis A., Xiao H., Quiles J.L., Xiao J., Capanoglu E.: Interaction of dietary polyphenols and gut microbiota: Microbial metabolism of polyphenols, influence on the gut microbiota, and implications on host health, *Food Frontiers*, 1. 109–133, 2020.

14. Celi, P. *et al.* (2019) 'Biomarkers of gastrointestinal functionality in animal nutrition and health', *Animal Feed Science and Technology*. 250, pp. 9–31.
15. Chambers JR, Gong J (2011) The intestinal microbiota and its modulation for *Salmonella* control in chickens. *Food Res Int* 44:3149–3159
16. Cheng, G. *et al.* (2014) 'Antibiotic alternatives: the substitution of antibiotics in animal husbandry?', *Frontiers in Microbiology*. 5, pp. 217.
17. Clarke G, Stilling RM, Kennedy PJ, Stanton C, Cryan JF, Dinan TG (2014) Gut microbiota: the neglected endocrine organ. *Mol Endocrinol* 28:1221–1238.
18. Cushnie T.P., Lamb A.J.: Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids, *Int. J. Antimicrob. Agents.*, 38. 99–107, 2011
19. D'Argenio V, Salvatore F (2015) The role of the gut microbiome in the healthy adult status. *Clin Chim Acta* 451:97–102.
20. Denli M., Okan F., Uluocak A.N., 2004. Effect of dietary supplementation of herb essential oils on the growth performance, carcass and intestinal characteristics of quail (*Coturnixcoturnix japonica*). *South African Journal of Animal Science*, 34, 174-179.
21. Duplecz, K. (2011) 'Takarmányozásstan'. Debreceni Egyetem. Available at: 98 <http://dtk.tankonyvtar.hu/xmlui/handle/123456789/8640> (Accessed: 1 October 2021).
22. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill SR, Nelson KE, Relman DA (2005) Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 308:1635–1638
23. Feng, Y. *et al.* (2010) 'Identification of changes in the composition of ileal bacterial microbiota of broiler chickens infected with *Clostridium perfringens*', *Veterinary Microbiology*. 140(1–2), pp. 116–121.
24. Friedman M (2014) Antibacterial, antiviral, and antifungal properties of wines and winery byproducts in relation to their flavonoid content. *Agric Food Chem* 62:6025–6042.
25. Gadde, U. *et al.* (2017) 'Alternatives to antibiotics for maximizing growth performance and feed efficiency in poultry: a review', *Animal health research reviews*. 18(1), pp. 26–45.
26. Giannenas, I., P. Florou-Paneri, M. Papazahariadou, E. Christaki, N. A. Botsoglou, A. B. Spais. 2003. Effect of dietary supplementation with oregano essential oil on performance of broilers after experimental infection with *Eimeria tenella*. *Archives of Animal Nutrition*. 57: 99–106
27. Gibson, G. R., M. B. Roberfroid. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*. 125: 1401–1412.

28. Gordon JI (2012) Honor thy gut symbionts redux. *Science* 336:1251–1253
29. Godon J-J, Aulazhagan P, Steyer J-P, Hamelin J (2016) Vertebrate bacterial gut diversity: size also matters. *BMC Ecol* 16:12.
30. Gong, J. *et al.* (2007) ‘16S rRNA gene-based analysis of mucosa-associated bacterial community and phylogeny in the chicken gastrointestinal tracts: from crops to ceca.’, *FEMS microbiology ecology*, 59(1), pp. 147–57.
31. Gutteridge JMC, Halliwell B (2010) Antioxidants: molecules, medicines, and myths. *Biochem Biophys Res Commun* 393:561–564.
32. Hashem N.M., Gonzalez-Bulnes A., Simal-Gandara J.: Polyphenols in farm animals: Source of reproductive gain or waste?, *Antioxidants* (Basel), 9. 1023, 2020.
33. Havas, P. (2015) Kereskedelmi forgalomban kapható probiotikus baktériumok galaktozidáz enzimeinek tanulmányozása. Doktori értekezés, Élelmiszertudományi Doktori Iskola, Corvinus University of Budapest.
34. Jadhav, K. *et al.* (2015) ‘Probiotics in Brojler Poultry Feeds: A Review’, *International Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 2. pp. 4–16. Available at: www.jakraya.com/journal/ijavs (Accessed: 10 February 2022).
35. Jamroz, D., A. Wiliczkiwicz, T. Wartelecki, J. Orda, J. Scorupinska. 2005. Use of active substances of plant origin in chicken diets based on maize and domestic grains. *British Poultry Science*. 46: 485–493.
36. Jiménez, G., M. Urdiain, A. Cifuentes, A. López-López, A. R. Blanch, J. Tamames, P. Kämpfer, A. B. Kolstø, D. Ramón, J. F. Martínez, F. M. Codoñer, R. Rosselló-Móra. 2013. Description of *Bacillus toyonensis* sp. nov., a novel species of the *Bacillus cereus* group, and pairwise genome comparisons of the species of the group by means of ANI calculations. *Systematic and Applied Microbiology*. 36: 383–391.
37. Jones BV, Fung S, Marchesi JR (2010) Comparative metagenomic analysis of plasmid encoded functions in the human gut microbiome. *BMC Genomics* 11:46.
38. Karasov WH, Douglas AE (2013) Comparative digestive physiology. *Compr Physiol* 3(2):741–783.
39. K, Kachman SD, Moriyama EN, Walter J, Peterson DA, Pomp D (2010) Individuality in gut microbiota composition is a complex polygenic trait shaped by multiple environmental and host genetic factors. *PNAS* 107(44):18933–18938.
40. Kogut, M. H. (2019) ‘The effect of microbiome modulation on the intestinal health of poultry’, *Animal Feed Science and Technology*. 250, pp. 32–40.

41. Kollarcikova, M. *et al.* (2019) 'Use of 16S rRNA gene sequencing for prediction of new opportunistic pathogens in chicken ileal and cecal microbiota', *Poultry Science*. 98(6), pp. 2347–2353.
42. Koutsos EA, Matson KD, Klasing KC (2001) Nutrition of birds in the order of Psittaciformes: a review. *J Avian Med Surg* 15(4):257–275.
43. Kovalikova Z., Kubes J., Skalicky M., Kuchtickova N., Maskova L., Tuma J., Vachova P., Hejnak V.: Changes in content of polyphenols and ascorbic acid in leaves of white cabbage after pest infestation, *Molecules*, 24. 2622, 2019.
44. Körösi, L. (2019) 'A mikrobiom szerepe a baromfi egészséges emésztő szervrendszerének és általános egészségének fenntartásában', *Baromfiágazat*, 1(19), pp. 72–77.
45. Lavola A., Karjalainen R., Julkunen-Tiitto R.: Bioactive polyphenols in leaves, stems, and berries of Saskatoon (*Amelanchier alnifolia* Nutt.) cultivars, *J. Agric. Food Chem.*, 60, 1020–1027, 2012.
46. Lau JT, Whelan FJ, Herath I, Lee CH, Collins SM, Bercik P, Surette MG (2016) Capturing the diversity of the human gut microbiota through culture-enriched molecular profiling. *Genome Med* 8:72.
47. Leopoldini M., Russo N., Chiodo S., Toscano M.: Iron chelation by the powerful antioxidant flavonoid quercetin, *J. Agric. Food Chem.*, 54. 6343–6351, 2006.
48. Lopez-Bote, C. J. 2004. Bioflavonoid effects reach beyond productivity. *Feed Mix*. 12: 12–15.
49. Lozupone CA, Stombaugh JI, Gordon JI, Jansson JK, Knight R (2012) Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature* 489:220–230.
50. Lu, J. *et al.* (2008) 'Effects of feed additives on the development on the ileal bacterial community of the broiler chicken', *Animal : an international journal of animal bioscience*. 2(5), pp. 669–676.
51. Mann ER, Landy JD, Bernardo D, Peake STC, Hart AL, Al-Hassi HO, Knight S (2013) Intestinal dendritic cells: their role in intestinal inflammation, manipulation by the gut microbiota and differences between mice and men. *Immunol Lett* 150:30–40.
52. Marín L., Miguélez E.M., Villar C.J., Lombó F.: Bioavailability of dietary polyphenols and gut microbiota metabolism: antimicrobial properties, *Biomed. Res. Int.*, 2015. 905215, 2015.
53. Markowiak, P. and Śliżewska, K. (2018) 'The role of probiotics, prebiotics and synbiotics in animal nutrition', *Gut Pathogens*. 10(1), pp. 1–20.
54. Marranzano M., Rosa R.L., Malaguarnera M., Palmeri R., Tessitori M., Barbera A.C.: Polyphenols: Plant sources and food industry applications, *Curr. Pharm. Des.*, 24. 4125–4130, 2018.

55. McFarland LV (2014) Use of probiotics to correct dysbiosis of normal microbiota following disease or disruptive events: a systematic review. *Br Med J* 10:1136
56. Mohr, J. L. (1952) Protozoa as indicators of pollution. *The Scientific Monthly* 74, 7-9: 7. Ontario, Canada
57. Morgan XC, Huttenhower C (2012) Chapter 12: Human microbiome analysis. *PLoS Comput Biol* 8(12):e1002808
58. Murphy D, Ricci A, Auce Z et al (2017) EMA and EFSA joint scientific opinion on measures to reduce the need to use antimicrobial agents in animal husbandry in the European Union, and the resulting impacts on food safety (RONAFA). *EFSA J* 15.
59. Nascimento L.B.D.S., Leal-Costa M.V., Menezes E.A., Lopes V.R., Muzitano M.F., Costa S.S., Tavares E.S.: Ultraviolet-B radiation effects on phenolic profile and flavonoid content of *Kalanchoe pinnata*, *J. Photochem. Photobiol. B.*, 148. 73–81, 2015.
60. Oakley BB, Lillehoj HS, Kogut MH, Kim WK, Maurer JJ et al (2014) The chicken gastrointestinal microbiome. *FEMS Microbiol Lett* 360:100–112
61. Oakley, B. B. *et al.* (2014) ‘Successional changes in the chicken cecal microbiome during 42 days of growth are independent of organic acid feed additives’, *BMC Veterinary Research*, 10(1), pp. 1–8. Available at: (Accessed: 26 October 2021).
62. Papatsiros, V., C. Billinis 2012. The prophylactic use of acidifiers as antibacterial agents in swine. In: V. Bobbarala (ed.). *Antimicrobial agents*. InTech Europe, Rijeka. 105–123
63. Peinado, M. J., R. Ruiz, A. Echavarri, I. Aranda-Olmedo, L. A. Rubio. 2013. Garlic derivative PTS-O modulates intestinal microbiota composition and improves digestibility in growing broiler chickens. *Animal Feed Science and Technology*. 1: 87–92.
64. Pourabedin, M. and Zhao, X. (2015) ‘Prebiotics and gut microbiota in chickens’, *FEMS Microbiology Letters*. 362(15), p. 122.
65. Roto, S. M., Rubinelli, P. M. and Ricke, S. C. (2015) ‘An introduction to the avian gut microbiota and the effects of yeast-based prebiotic-type compounds as potential feed additives’, *Frontiers in Veterinary Science*. 2. 28.
66. Rychlik, I. (2020) ‘Composition and Function of Chicken Gut Microbiota.’, *Animals*, 10(1). pp. 103.
67. Sandhu KV, Sherwin E, Schellekens H, Stanton H, Dinan TG, Cryan JF (2017) Feeding the microbiota-gut- brain axis: diet, microbiome, and neuropsychiatry. *Transl Res* 179:223–244.
68. Saito, M., Hosoyama, H., Ariga, T., Kataoka, S. & Yamaji, N. (1998). Antiulcer activity of grape seed extract and procyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 1460–1464.

69. Schmidt, J. (2015) A takarmányozás alapjai. Budapest: Mezőgazda Lap- és Könyvkiadó Kft.
70. Shaufi MAM, Sieo CC, Chong CW, Gan HM, Ho YW (2015) Deciphering chicken gut microbial dynamics based on high-throughput 16S rRNA metagenomics analyses. *Gut Pathogens* 7:4.
71. Silva, S. S. P. and Smithard, R. R. (2002) 'Effect of enzyme supplementation of a rye-based diet on xylanase activity in the small intestine of broilers, on intestinal crypt proliferation and nutrient digestibility and growth performance of the birds', *British Poultry Science*, 43, pp. 274–282.
72. Silva-Guillen Y.V., Arellano C., Boyd R.D., Martinez G., van Heugten E.: Growth performance, oxidative stress and immune status of newly weaned pigs fed peroxidized lipids with or without supplemental vitamin E or polyphenols, *J. Anim. Sci. Biotechnol.*, 11. 22, 2020
73. Ślizewska, K. *et al.* (2020) 'The effect of synbiotic preparations on the intestinal microbiota and her metabolism in broiler chickens', *Scientific Reports*, 10(1), pp. 1–13.
74. Smits, C. H. M. and Annison, G. (1996) 'Non-starch plant polysaccharides in broiler nutrition—towards 203–221., physiologically valid approach to their determination', *World's Poultry Science Journal*, 52, pp. 203–221.
75. Sommer F, Bäckhed F (2013) The gut microbiota—masters of host development and physiology. *Nat Rev Microbiol* 10:1038
76. Somers, T.C. and Ziemelis, G. (1985). Spectral evaluation of total phenolic components in *Vitis vinifera*: grapes and wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 36, 1275–1284.
77. Stanley, D. *et al.* (2015) 'Comparison of fecal and cecal microbiotas reveals qualitative similarities but quantitative differences', *BMC Microbiology*. 15(1), pp. 1–11
78. Stanley, D. *et al.* (2016) 'Bacteria within the gastrointestinal tract microbiota correlated with improved growth and feed conversion: Challenges presented for the identification of performance enhancing probiotic bacteria', *Frontiers in Microbiology*, 7. 187.
79. Sudo N (2014) Microbiome, HPA axis and production of endocrine hormones in the gut. *Adv Exp Med Biol* 817:177–194.
80. Tajodini M., Saedi H.R., Moghbeli P., 2015. Use of black pepper, cinnamon and turmeric as feed additives in the poultry industry. *World's Poultry Science Journal*, 71(01), 175-183.
81. Tayengwa T, Mapiye C (2018) Citrus and winery wastes: promising dietary supplements for sustainable ruminant animal nutrition, health, production, and meat quality. *Sustain.* 10:3718

82. Tayeri, V. (2018) 'A comparison of the effects of antibiotics, probiotics, synbiotics and prebiotics on the performance and carcass characteristics of broilers', *Veterinary research communications*. 42(3), pp. 195–207.
83. Tucker L., 2002. Botanical broilers: Plant extracts enhance broiler performance. *Feed International* 23(9): 26–29
84. Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI (2007) The human microbiome project. *Nature* 449(7164):804–810
85. Turnbaugh PJ, Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, Knight R, Gordon JI (2009) The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. *Sci Transl Med* 1(6):6ra14.
86. Van den Bogaard AE, Stobberingh EE (1999) Antibiotic usage in animals: impact on bacterial resistance and public health. *Drugs* 58:589–607
87. Walter J, Britton RA, Roos S (2011) Host-microbial symbiosis in the vertebrate gastrointestinal tract and the *Lactobacillus reuteri* paradigm. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(Suppl 1):4645–4652. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1000099107
88. Wang F, Roy S (2016) Gut homeostasis, microbial dysbiosis, and opioids. *Toxicol Pathol* 45:150–156
89. Wang, Y. *et al.* (2017) 'Effect of probiotics on the meat flavour and gut microbiota of chicken', *Scientific Reports*. 7(1), pp. 1–13.
90. Wenk C., 2000. Why all the discussion about herbs? Biotechn. In the feed industry. Proc. Of Alltech's 16 thAnnu. Symp. Alltech Technical Publications, Nottingham University Pres. Nicholasville, KY, 79-96.
91. Whipps, J., Lewis, K., Cooke R. (1988) "Mycoparasitism and plant disease control". In *Fungi in Biological Control Systems*, Manchester University Press (Eds.: Burge M.), 161-187. ISBN 9780719019791
92. Wright, A. von. 2005. Regulating safety of probiotics – The European approach. *Current Pharmaceutical Research*. 1: 17–23.
93. Xing, Z. *et al.* (2021) 'Disequilibrium in chicken gut microflora with avian colibacillosis is related to microenvironment damaged by antibiotics', *Science of The Total Environment*. 762, p. 143058.
94. Yan, W. *et al.* (2019) 'Efficacy of Fecal Sampling as a Gut Proxy in the Study of Chicken Gut Microbiota', *Frontiers in Microbiology*. 10, p. 2126.
95. Yang F, Hou C, Zeng X, Qiao S (2015) The use of lactic acid bacteria as a probiotic in swine diets. *Pathogens* 4:34–45.

96. Yang Y, Iji PA, Choct M (2009) Dietary modulation of gut microflora in broiler chickens; a review of the role of six kinds of alternatives to in-feed antibiotics. *Worlds Poult Sci J* 65:97–114.
97. Yeo S, Lee S, Park H, Shin H, Holzapfel W, Huh CS (2016) Development of putative probiotics as feed additives: validation in a porcine-specific gastrointestinal tract model. *Appl Microbiol Biotechnol* 100:10043–10054.
98. Yin, Y. *et al.* (2009) ‘Exposure of different bacterial inocula to newborn chicken affects gut microbiota development and ileum gene expression’, *The ISME Journal*. 4(3), pp. 367–376.

11. Táblázatok

1. táblázat Salmonella táptalaj specifikussági vizsgálat teszteléséhez alkalmazott baktériumok

azonosító	azonosító
<i>Salmonella enterica</i> ATCC 13076	<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048
<i>Salmonella enteritidis</i> 704	<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047
<i>Salmonella typhimurium</i> 208	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883
<i>Salmonella infantis</i> 1747	<i>Klebsiella oxytoca</i> ATCC 49131
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 6380
<i>Shigella boydii</i> ATCC 9207	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 29906
<i>Shigella sonnei</i> ATCC 9290	<i>Proteus hauseri</i> ATCC 13315
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022	

2. táblázat négy Salmonella és 11 egyéb izolátum telepmorfológiai sajátosságai a három különböző táptalajon

azonosító	SS	XLD	HE
<i>Salmonella enterica</i> ATCC 13076	fekete telepek, a táptalaj feltisztul	fekete telepek, táptalaj piros marad	sötét telep és a táptalaj elszíneződik
<i>Salmonella enteritidis</i> 704	fekete telepek, a táptalaj feltisztul	fekete telepek, táptalaj piros marad	sötét telep és a táptalaj elszíneződik
<i>Salmonella typhimurium</i> 208	fekete telepek, a táptalaj feltisztul	fekete telepek, táptalaj piros marad	sötét telep és a táptalaj elszíneződik
<i>Salmonella infantis</i> 1747	fekete telepek, a táptalaj feltisztul	fekete telepek, táptalaj piros marad	sötét telep és a táptalaj elszíneződik
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	rózsaszínes telep	fehér telep, táptalaj sárgul a telep körül	sárgás telep, táptalaj feltisztul
<i>Shigella boydii</i> ATCC 9207	rózsaszínes telep	rózsaszínes telep	sötét telep és a táptalaj elszíneződik
<i>Shigella sonnei</i> ATCC 9290	rózsaszínes telep	rózsaszínes telep	sötét telep és a táptalaj elszíneződik
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022	rózsaszínes telep	rózsaszínes telep	sötét telep és a táptalaj elszíneződik
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	rózsaszínes telep	fehér telep, táptalaj sárgul a telep körül	sárgás telep, táptalaj feltisztul
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047	rózsaszínes telep	fehér telep, táptalaj sárgul a telep körül	sötét telep, táptalaj feltisztul
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	rózsaszínes telep	fehér telep, táptalaj sárgul a telep körül	sárgás telep, táptalaj feltisztul
<i>Klebsiella oxytoca</i> ATCC 49131	rózsaszínes telep	fehér telep, táptalaj sárgul a telep körül	sárgás telep, táptalaj feltisztul
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 6380	fekete telepek, a táptalaj feltisztul	fehér telep, táptalaj sárgul a telep körül	sárgás telep, táptalaj feltisztul
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 29906	fekete telepek, a táptalaj feltisztul	rózsaszínes telep	sötét telep és a táptalaj elszíneződik
<i>Proteus hauseri</i> ATCC 13315	fehéres, rózsaszínes telep, kicsit feketedik	fehér telep, táptalaj sárgul a telep körül	sárgás telep, táptalaj feltisztul

3. táblázat Begyminták varianciaanalízis összesített eredményei

kezelés	totál aerob bakt.	<i>Lactobacillus</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>
G1	6.26±0.54a	6.75±0.34a	2.43±0.67a
G2	6.35±0.58a	7.17±0.38a	2.92±0.79a
G3	6.53±0.51a	6.76±0.65a	3.07±1.21a
G4	6.68±0.32a	7.21±0.27a	2.88±1.21a
p érték	0.48	0.15	0.71

4. táblázat Vakbélminták varianciaanalízis összesített eredményei

Kezelés	total aerobic	<i>Enterobacteriaceae</i>
G1	10.66±1.23a	7.26±0.52a
G2	10.65±0.75a	6.57±0.89a
G3	10.78±0.58a	7.17±0.63a
G4	9.96±1.51a	6.16±0.73a
p érték	0.551	0.063

5. táblázat Vastagbélminták varianciaanalízis összesített eredményei

Kezelés	total aerob bakt.	<i>Enterobacteriaceae</i>
G1	8.89±0.64a	5.33±0.69a
G2	8.99±0.85a	4.45±1.33a
G3	8.29±0.76a	5.04±1.63a
G4	8.57±0.44a	4.42±1.12a
p érték	0.309	0.517

6. táblázat Különböző bélszakaszokból vett minták összehasonlítása

Totál aerob baktérium				<i>Enterobacteriaceae</i>			
kezelés	Begy	Vakbél	Széket	kezelés	Begy	Vakbél	Széket
G1	6.26	10.66	8.89	G1	2.43	7.26	5.33
G2	6.35	10.65	8.99	G2	2.92	6.59	4.45
G3	6.53	10.78	8.29	G3	3.07	7.18	5.04
G4	6.68	9.96	8.58	G4	2.88	6.16	4.42

11. Hallgatói nyilatkozat

NYILATKOZAT

Diplomadolgozat nyilvános hozzáféréséről és eredetiségéről

A hallgató neve:	Jónás Regina Martina
A Hallgató Neptun kódja:	HCOM6I
A dolgozat címe:	Növényi kivonatok bélmikrobiótára gyakorolt hatásának vizsgálata
A megjelenés éve:	2024
A konzulens intézetének neve:	Genetika és Biotechnológia Intézet
A konzulens tanszékének a neve:	Mikrobiológia és Alkalmazott Biotechnológia Tanszék

Kijelentem, hogy az általam benyújtott diplomadolgozat egyéni, eredeti jellegű, saját szellemi alkotásom. Azon részeket, melyeket más szerzők munkájából vettem át, egyértelműen megjelöltem, és az irodalomjegyzékben szerepeltettem.

Ha a fenti nyilatkozattal valótlan állítottam, tudomásul veszem, hogy a záróvizsga-bizottság a záróvizsgából kizár és a záróvizsgát csak új dolgozat készítése után tehetek.

A leadott dolgozat, mely PDF dokumentum, szerkesztését nem, megtekintését és nyomtatását engedélyezem.

Tudomásul veszem, hogy az általam készített dolgozatra, mint szellemi alkotás felhasználására, hasznosítására a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem mindenkori szellemitulajdon-kezelési szabályzatában megfogalmazottak érvényesek.

Tudomásul veszem, hogy dolgozatom elektronikus változata feltöltésre kerül a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem MATER Hallgatói Dolgozatok repozitóriumába. Tudomásul veszem, hogy a megvédett és

- nem titkosított dolgozat a védést követően
- titkosításra engedélyezett dolgozat a benyújtásától számított 5 év eltelte után

nyilvánosan elérhető és kereshető lesz az Egyetem MATER Hallgatói Dolgozatok repozitóriumában.

Kelt: 2024 év 04 hó 28 nap


Hallgató aláírása

12. Konzulensi nyilatkozat

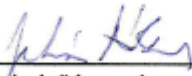
NYILATKOZAT

Jónás Regina Martina (hallgató Neptun azonosítója: HCOM6I) konzulenseként nyilatkozom arról, hogy a diplomadolgozatot áttekintettem, a hallgatót az irodalmi források korrekt kezelésének követelményeiről, jogi és etikai szabályairól tájékoztattam.

A diplomadolgozatot a záróvizsgán történő védeésre javaslom / nem javaslom¹.

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem^{*2}

Kelt: 2024 év 04 hó 28 nap


belső konzulens
Dr. Juhász Ákos

¹ A megfelelő aláhúzendó.

² A megfelelő aláhúzendó.