

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Vántus Viola

KAPOSVÁRI EGYETEM

AGRÁR-ÉS KÖRNYEZETTUDOMÁNYI KAR

2018

KAPOSVÁRI EGYETEM
AGRÁR-ÉS KÖRNYEZETTUDOMÁNYI KAR

Doktori Iskola vezetője
Prof. Dr. KOVÁCS MELINDA
az MTA levelező tagja

Témavezető
Dr. ZSOLNAI ATTILA
tudományos tanácsadó

**NYÚLVAKBÉL-MIKROBIÓTA ÉS T-2-, FUMONIZIN B₁-
MIKOTOXINOK KÖLCSÖNHATÁSÁNAK, VALAMINT
EGYES PRE-ÉS PROBIOTIKUMOK SZEREPÉNEK
VIZSGÁLATA MIKROBIÁLIS GENOMIKAI
MÓDSZERREL**

készítette
VÁNTUS VIOLA
KAPOSVÁR

DOI: 10.17166/KE2019.005

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék.....	3
Rövidítések jegyzéke.....	6
1. Bevezetés.....	9
1. Irodalmi áttekintés.....	15
1.1 A házi nyúl emésztés-élettani sajátosságai.....	15
2.2 A nyúlvakbél-mikrobióta	19
2.2.1 A nyúlvakbél-mikrobióta összetétele és kialakulása.....	19
2.2.2 A nyúlvakbél-mikrobióta szerepe	22
2.2.3 A választás hatása a nyúlvakbél-mikrobiótára, eubiosis – dysbiosis	24
2.2.4 A mikrobióta vizsgálati módszerei.....	25
2.2.4.1 Hagyományos mikrobiológiai tenyésztés	26
2.2.4.2 Molekuláris genetikai módszerek	27
2.3 Antibiotikumok preventív és hozamfokozó alkalmazása.....	34
2.4 Antibiotikumok kiváltása természetes takarmány-kiegészítővel .	36
2.4.4 Prebiotikumok és probiotikumok, mint természetes takarmány-	37
kiegészítők.....	
2.4.5 A spirulina (<i>Arthrospira platensis</i>) és a kakukkfű (<i>Thymus</i>	48
<i>vulgaris</i> L.), mint természetes takarmány-kiegészítők.....	
2.5 Mikotoxinok	50
2.5.4 Mikotoxinnal szennyezett takarmány fogyasztása, a T-2 és a	51
fumonizin B ₁ káros hatásai házi nyúlban	
2.5.5 A mikotoxinok hatása a bélmikrobiótára	54
2. A disszertáció célkitűzései	57
3. Anyag és módszer	58
3.1 Kísérleti állat, tartási körülmények, takarmányozás	58
3.2 Kísérleti elrendezések	59
3.2.1 A spirulina- és/vagy a kakukkfű-kiegészítés hatásának vizsgálata	59
a vakbél mikrobiális közösségére.....	
3.2.2 A T-2-mikotoxin bélmikrobiótára gyakorolt hatásának	62
vizsgálata, a pro- és prebiotikum esetleges védő hatásának kimutatása	

3.2.3	A fumonizin B ₁ -mikotoxin- és/vagy mannán-oligoszacharid- kiegészítés hatásának <i>in vitro</i> vizsgálata a nyúlvakbél-mikrobióta összetételére	65
3.3	Quantitative PCR.....	66
3.3.1	A bakteriális DNS kivonása, amplifikációja	68
3.3.2	A PCR fragmentek plazmidba építése	70
3.3.3	Kalibrációs görbék felvétele mennyiségi meghatározáshoz	72
3.3.4	Az egyes baktériumcsoportok mennyiségi meghatározása a kísérleti mintákból.....	74
3.4	Statisztikai analízis.....	75
4.	Eredmények és értékelésük	76
4.1	A spirulina- és/vagy a kakukkfű-kiegészítés hatása a vakbél mikrobiális közösségre	76
5.1.1.	Eredmények értékelése.....	82
5.2.	A T-2-mikotoxin bélmikrobiótára gyakorolt hatása, pro- és prebiotikum esetleges védő hatásának kimutatása	86
5.2.1.	Eredmények értékelése.....	93
5.3.	A fumonizin B ₁ -mikotoxin- és/vagy mannán-oligoszacharid- kiegészítés hatása a nyúlvakbél-mikrobióta összetételére <i>in vitro</i>	95
5.3.1.	Eredmények értékelése.....	98
6.	Következtetések, javaslatok	102
6.1.	A spirulina- és/vagy a kakukkfű-kiegészítés hatása a vakbél mikrobiális közösségre	102
6.2.	A T-2-mikotoxin bélmikrobiótára gyakorolt hatása, pro- és prebiotikum esetleges védő hatásának kimutatása	104
6.3.	A fumonizin B ₁ -mikotoxin- és/vagy mannán-oligoszacharid- kiegészítés hatása a nyúlvakbél-mikrobióta összetételére.....	105
7.	Új tudományos eredmények.....	106
8.	Összefoglalás.....	108
9.	Summary	116
10.	Köszönetnyilvánítás	122
11.	Irodalomjegyzék.....	124
12.	A disszertáció témaköréből megjelent publikációk	157

13. A disszertáció témakörén kívüli publikációk	161
14. Rövid szakmai életrajz	162

Rövidítések jegyzéke

ADF - Acid Detergent Fibre	Savdetergens Rost
ADL - Acid Detergent Lignin	Savdetergens Lignin
AGP - antibiotic growth promoter	hozamfokozó antibiotikumok
ALT	alanin aminosztransferáz (májenzim)
AST	aszpartát aminosztransferáz/ glutamát-oxálacetát-transzamináz (májenzim)
CE-SSCP -Capillary Electrophoresis - Single Strand Conformation Polimorphism	kapilláris elektroforézis-egyszálú DNS-konformációs polimorfizmus
CFU - Colony Forming Units	kolóniaképző egység
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
EFSA - European Food Safety Authority	Európai Élelmiszerbiztonsági Hatóság
ERE - epizootic rábbit enteropathy	járványos nyúl-enteropathia
FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations	Az ENSZ Élelmezési és Mezőgazdasági Szervezete
FB₁	fumonizin B ₁ -mikotoxin
FISH	fluoreszcens in situ hibridizáció
FOS	frukto-oligoszacharidok
GALT - gut associated lymphoid tissue	bélhez kapcsolódó limfoid szövet
GGT	gamma-glutamil transzferáz (májenzim)
GIT - gastrointestinal tract	emésztő-szervrendszer
GMM - genetically modified microorganisms	géntechnológiával módosított mikroorganizmusok

GOS	galakto-oligoszacharidok
GRAS - Generally Regarded as Safe	„általánosan biztonságos” (USA)
HTP - High Throughput	nagy áteresztő képesség
IgA	immunglobulin A
IMO	isomalto-oligoszacharidok
LBP - Live Biotherapeutic Products	élő bioterápiás termékek
LOD - limit of detection	kimutatási határérték
MALT - mucosa associated lymphoid tissue	nyálkahártyához kapcsolódó limfoid szövet
MOS	mannán-oligoszacharidok
NDF - Neutral Detergent Fiber	Neutrális Detergens Rost
NGP - Next Generation Probiotics	új generációs probiotikumok
NGS - Next Generation Sequencing	újgenerációs szekvenálás
OTU - operational taxonomic unit	kezelhető taxonómiai egység
PCR - Polymerase Chain Reaction	polimeráz-lánreakció
PCR-CE-SSCP -Capillary Electrophoresis - Single Strand Conformation Polimorphism	polimeráz-lánreakció-kapilláris elektroforézis-egyszálú DNS-konformációs polimorfizmus
PCR-DGGE - Denaturing Gradient Gel Electrophoresis	denaturálógrádiens-gélelektroforézis
PCR-RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism	restrikciós enzimek által létrehozott fragmenthossz-polimorfizmus
qPCR – Quantitative Polymerase Chain Reaction	valós idejű, mennyiségi meghatározást lehetővé tevő polimeráz-lánreakció
RSD - relative standard deviation	relatív standard deviáció
RT-PCR - Reverse Transcriptase PCR	reverz transzkriptáz PCR

RT-MPCR - Reverse Transcriptase Multplex PCR	reverz transzkriptáz multplex PCR
SOLiD – Sequencing by Oligonucleotid Ligation and Detection	szekvenálás oligonukleotid ligálással és detektálással
SPF - specific pathogen free	adott, meghatározott patogéneket nem hordozó állat
TBE - Trisz/Borát/EDTA	
TSMS - True Single Molecule Sequencing	valódi egymolekulás szekvenálás
T-2	T- 2-mikotoxin (trichotecén)
OTA	ochratoxin-A
VFA - volatile fatty acids	illó zsírsavak
XOS	xylo-oligoszacharidok

1. Bevezetés

A házi nyúl (*Oryctolagus cuniculus* var. *domestica*) jelentősége laboratóriumi modellállatként (táplálkozás-élettan, toxikológia stb.) valamint gazdasági szempontból (húsnyúl-előállítás) egyaránt növekszik. A húsnyúl-előállítás jelentős szerepet játszhat az élelemhiány problémájának megoldásában a világ sok részén. A nyulaknak rövid a nemzedékváltásuk, nagy szaporodási teljesítménnyel, gyors növekedési sebességgel, széles táplálkozási spektrummal, korlátozott nagyságú élettérigénnyel rendelkeznek és viszonylag könnyen felnevelhetők. Azonban az értékesítésig bekövetkező, főleg a választás előtti és utáni elhullás – a felnevelési veszteség – miatt csökken az eladható húsmennyiség és ezáltal a termelésből származó jövedelem is (Rashwan és Marai, 2000).

Növendéknyulaknál a választást (28-35 nap) követően jelentősen megemelkedhet a mortalitás, amely legtöbbször valamilyen emésztőszervi megbetegedésre vezethető vissza (Bennegadi és mtsai., 2003). A nyulak gyomor-bélrendszeri egészsége meglehetősen érzékeny – nagymértékben függ a normál mikrobióta egyensúlyától (eubiosis). Az emésztési folyamatban fellépő rendellenesség, amely többnyire valamilyen takarmányozási problémához vagy stresszhez köthető, bélbetegséghez vezet (Harcourt-Brown, 2004).

A felnevelési veszteségek csökkentése érdekében jelentős és hatásos a terápiás célú (állatorvosi rendelvényre adott) antibiotikum-felhasználás. A választás előtti szopós (21-25 naptól) és a választási utáni növendék nyulak részére a gyógyszerrel kiegészített takarmány jelentős védelmet nyújthat a megbetegedésekkel szemben. Azonban élelmiszerbiztonsági és humán-egészségügyi kockázatok miatt indokolt volna az antibiotikumok mennyiségének csökkentése. Az emésztőszervi megbetegedések megelőzése területén kiemelten fontos a természetes takarmány kiegészítők – antibiotikumokat helyettesítő – alkalmazási lehetőségének kidolgozása (Gidenne és mtsai., 2012). Ezen terület ismereteinek bővítése céljából, *in vivo* kísérletben vizsgáltam két természetes takarmány-kiegészítőt, a spirulina (*Arthrospira platensis*) és a kakukkfű (*Thymus vulgaris* L.) vakbél-mikrobiótára gyakorolt hatását növendéknyulakban, molekuláris genomikai módszer (qPCR) alkalmazásával.

A házinyúl tápcsatornája nagy mennyiségű rostdús takarmány feldolgozására adaptálódott, a vékonybélben emésztetlenül áthaladó táplálóanyagok mikrobiális fermentációja a vakbélben zajlik (Harcourt-Brown, 2004). A nyulak estében a bélmikrobióta kialakulását és összetételét befolyásoló tényezők megismerése kulcsfontosságú kérdés. Az emésztési zavarok és megbetegedések kialakulásában közvetlenül vagy közvetve, a

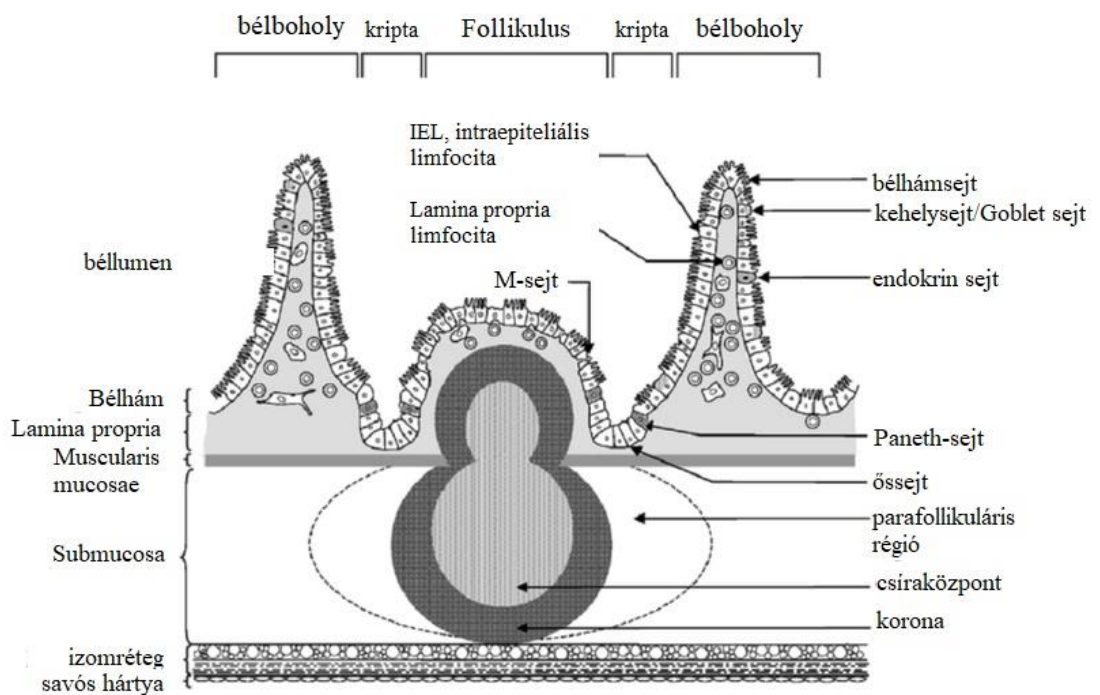
kórok mellett a mikroorganizmusok egyensúlyának felborulása (dysbiosis) is szerepet játszik.

A bélmikrobióta ökoszisztémát alkot a gazdaszervezeten belül, amely a mikroorganizmusok számára élettér és táplálék-forrás. Azonban ez egy kölcsönös kapcsolat: a bélmikrobióta metabolikus aktivitása egy szerv működéséhez hasonlítható, „elfelejtett szervként” is említik (Bocci, 1992., O’Hara és Shanahan, 2006).

Az egészség meglétének alapvető tényezője emberben és gazdasági állatfajainkban is a normál mikrobióta jelenléte és egyensúlya (eubiosis) a gasztrointesztinális rendszerben (GIT). Az egészségmegőrző szerep háttérében egy kiemelten fontos kölcsönhatás áll, a bélbaktériumok és az immunrendszer; különösen a bélhez- (GALT) (1. ábra) és nyálkahártyához kapcsolódó (MALT) limfoid szövet között. Ez egy általánosan elfogadott elmélet, amely kiegészül a probiotikumok és prebiotikumok befolyásoló/regeneráló tulajdonságával. Összességében, a bélmikrobióta összetételének egyensúlya számos előnnyel jár a gazdaszervezet számára; míg a mikrobiális egyensúly megbomlása számos anyagcserével és immunrendszerrel összefüggő betegség kialakulásához vezet (Laparra és Sanz, 2010).

A toxikus anyagok pl. a takarmányban előforduló mikotoxinok jelentős része a tápcsatornán keresztül, főként a takarmánnyal/élelmiszerrel jut be a

szervezetbe. A GIT szerepe kettős: a táplálóanyagok emésztésének és felszívódásának fő helye, valamint barriert képez a külső-belső környezet között (homeosztázis védelme). A táplálékkal bejutó toxikus anyagok esetében is a GIT az első védelmi vonal, ami azt is jelenti, hogy jelentős a GIT toxikus terhelése.



1. ábra. A bélhez kapcsolódó nyirokszövet (GALT) sematikus ábrázolása. (Fortun-Lamothe és Boullier, 2007 alapján)

A mikotoxinok a mikroszkopikus gombák másodlagos anyagcsere-termékei, humán vonatkozásban közegészségügyi veszélyforrások, valamint jelentős veszteséget okoznak a növénytermesztésnek és az állattenyésztésnek.

A szervezetbe bekerülő mikotoxinok felszívódása a GIT-ben történik, ezáltal befolyásolhatják más anyagok felszívódását, továbbá módosíthatják a GALT működését. A GIT ökoszisztémáját alkotó mikroorganizmusok átalakíthatják a mikotoxinokat, így azok változatlan, vagy metabolizált formában kiválasztódhatnak az epével.

A mikotoxinoknak a bélre, a GIT-mikrobióta összetételére és működésére gyakorolt hatásaival kapcsolatos ismereteink hiányosak. Az említett összefüggések és hatásmechanismusok felderítésének céljából két (egy *in vivo* és egy *in vitro*) kísérletben vizsgáltam a táplálékláncból egyelőre ki nem iktatható mikotoxinok hatását: hogyan befolyásolják egyes mikotoxinok a bélmikrobióta összetételét és működését. Ezzel összefüggésben azt is vizsgáltam, hogy a takarmány-kiegészítőként használt egyes pro- és prebiotikus hatású készítmények az eubiosis elősegítésével preventív hatást biztosítanak-e hosszantartó toxikus expozíció esetén. A vizsgálatok a *Fusarium* toxinok közül a T-2-toxinra és a fumonizin B₁-re (FB₁) terjednek ki, tekintettel arra, hogy ezek a Magyarországon gyakran előforduló mikotoxinok, amelyeknek súlyos állat- és humán-egészségügyi hatásai vannak.

A bélmikrobióta több száz baktériumból álló közösség, melyeknek csupán 25-40%-a tenyészthető a klasszikus mikrobiológiai eljárásokkal (Tannock és mtsai., 2000). A mikrobiális genomikai módszerek terjedésével egyre nyilvánvalóbbá vált, hogy az élő, de nem tenyészthető, szigorúan

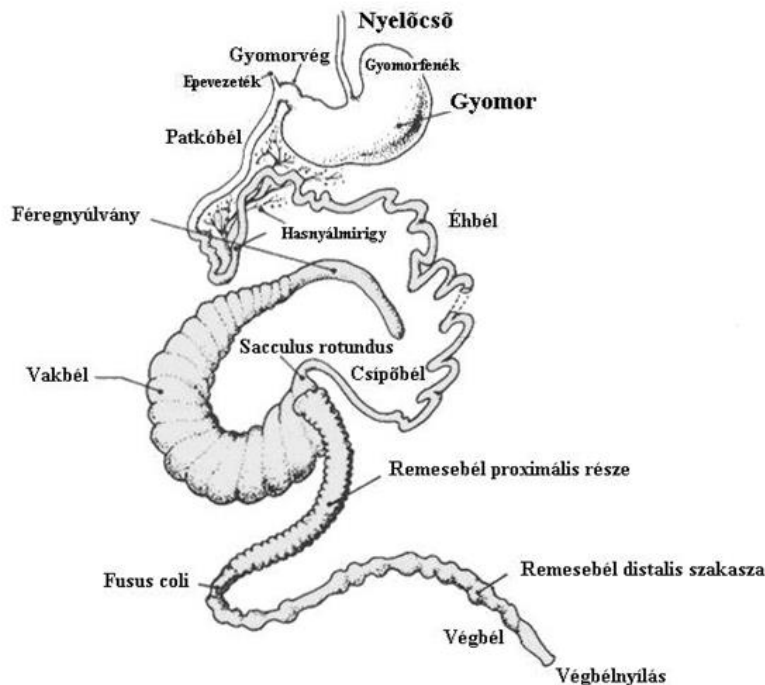
anaerob mikrobák fontos szerepet játszhatnak a mikrobiális metabolizmusban, valamint a mikrobák és a gazdaszervezet közötti kölcsönhatásokban. Ezek többsége 16S rRNS génelemzésen alapul, alkalmazásukkal gyakran tízszer annyi mikroba mutatható ki, mint a klasszikus tenyésztéssel (Carabano és mtsai., 2006).

Ezen eredmények és módszerek fejlődésének hatására egy új kutatási terület jött létre, amelyet "molekuláris mikrobiális ökológia" -nak neveztek el. Ez által lehetőség nyílik a GIT-t benépesítő mikrobiális ökoszisztéma minél teljesebb leírására és monitorozására. Az *in vivo* és *in vitro* kísérleteimben molekuláris genomikai módszer (qPCR) alkalmazásával vizsgáltam két különböző takarmány-kiegészítő (pre- és probiotikumok) valamint mikotoxinok vakbél-mikrobiótára gyakorolt hatásait.

1. Irodalmi áttekintés

1.1 A házi nyúl emésztés-élettani sajátosságai

A nyúl emésztőrendszerének (2. ábra) fontos egysége a gyomor; amely jellemzően gyengén izmos falú és mindig részlegesen telített; a többi gazdasági állatfajjal összehasonlítva relatíve nagy, az emésztőcsatorna úrtartalmának kb. 34%-át teszi ki (Portsmouth, 1977). A gyomor fundusa a caecotroph számára tárolóüreget képez. A szintén nagy méretű vakbéllel összehasonlítva, szopóskorban a gyomor, a növendék és a kifejlett állatokban a vakbél tömege a nagyobb. A pylorusnál kezdődő és a vakbél alapjánál végződő vékonybél (epés-, éh- és csípőbél) körülbelül 3 m hosszú és 1 cm átmérőjű.



2. ábra. A nyúl emésztőrendszere (FAO 1997)

A házinyúl emésztő-szervrendszerének jellegzetessége, a más fajokhoz viszonyítva relatív nagy jelentőségű vastagbél (Portsmouth, 1977). A vastagbél (vakbél, remesebél, végbél) legterjedelmesebb része a vakbél az emésztőcsatorna mintegy 50%-át teszi ki, gyenge izomréteg és 200 g/kg szárazanyag-tartalom jellemzi (García és mtsai., 2002).

A házi nyúl emésztésében a vakbél-mikrobióta és a vakbélben zajló fermentációs folyamatok kulcsszerepet játszanak az emésztés és a táplálóanyag-hasznosítás szempontjából, valamint az emésztőszervi megbetegedésekkel szembeni védelem terén.

A növendéknyúl emésztőrendszerének a tejalapú táplálásról – egy alkalmazkodási időszakon keresztül – át kell állnia a szilárd takarmányozásra. A növendéknyulaknak, a tejről a szilárd takarmány fogyasztására történő áttérése időszakában nő a hasnyálmirigy és a bélnedv emésztőenzim-termelése, elkezdődik a caecotrophia, ami tulajdonképpen egy „táplálóanyag-újrafelvételi” folyamat. Ebben az időszakban – különösen választás után – nagy az emésztőszervi problémák, a hasmenéssel együtt járó betegségek kialakulásának az esélye. Az említett alkalmazkodási folyamat nem csupán az emésztést érinti, hanem a mikrobák kolonizációját és a „barrier” mechanizmusok kialakulását, amelyek védik az állatot az emésztőrendszeri betegségektől (Carabano és mtsai., 2010).

A nyúl viszonylag magas rosttartalmú takarmányt igényel (minimum 15%), melynek 2/3-ad részben emészthetetlen rostot kell tartalmaznia. Ez a magas rost tartalom – közvetlenül vagy közvetve - az emésztőszervi betegségek, a hasmenés kialakulásának megelőzésében játszik szerepet. A gyomorban és a vékonybélben emészthetetlen rost fenntartja a normális bélperisztaltikát, közreműködik a béltartalom bélcsatornán való megfelelő sebességű áthaladásában (lignin), emellett energiát ad (illó zsírsavak). A hemicellulózoknak toxinmegkötő szerepe is van, a cellulózból képződő ecetsav pedig csökkenti a vakbél pH-ját, ezzel megakadályozva a káros baktériumok elszaporodását. Megakadályozza - különösen az angóryanulakban -, hogy a tisztálkodás során gyomorba kerülő szőr szőrlabdává (trichobezoár) tömörüljön, valamint telítettségi érzést okoz (Szendrő és mtsai., 2010).

A takarmányfelvétel ritmusa első sorban attól függ, hogy *ad libitum* vagy adagolt takarmányellátást biztosítunk. *Ad libitum* etetés esetében szilárd takarmányt és vizet (a szopással ellentétben) napjában több alkalommal is fogyasztanak a nyulak. A napi táplálkozási (35-40) és ivási alkalmak száma (30-35) állandó, viszont életkorral nő az egy alkalommal, illetve az egy perc alatt elfogyasztott takarmány és víz mennyisége. Az etetési idő korlátozása vagy napi fejadag kiosztása előnyös lehet a választás utáni időszakban a hasmenéses betegségek kivédése céljából, illetve hízónyulaknál javítható a

takarmányértékesítés ezzel a módszerrel. A szárazanyag- és vízfogyasztás közötti arány kb. 1:2 (Szendrő és mtsai., 2010).

A nyúl gyomor-bél rendszerének fő anatómiai jellegzetességei tehát a vékony falú, nagy gyomor és az igen terjedelmes vakbél; emésztésének sajátosságai pedig a gyomorban és a vakbélben lejátszódó – szekréción és fermentációs - folyamatokra és a caecotrophiára vezethetők vissza.

A caecotrophia, a házinyúl bélcsatornájában a táplálkozás és kiválasztás ritmikus mintázata szerint képződő kétféle bélsár (lágú és normál) közül, a lágú bélsár rendszeres elfogyasztása. Ezáltal a nyúl fehérjéhez (aminosavakhoz), vitaminokhoz és ásványi anyagokhoz jut.

A caecotrophia az optimális táplálóanyag-hasznosítás érdekében mikrobiális emésztést tesz szükségessé. A házinyúl tápcsatornája nagy mennyiségű (65-80 g/kg testtömeg) rostos táplálék feldolgozására adaptálódott, viszonylag magas alapanyagcserearáta a jellemző; az aminosav szükséglet fedezésében nagy jelentőségű a mikrobák által termelt fehérje.

A vakbélben több órás mikrobiális fermentáció zajlik, melynek eredményeképp nagy mennyiségű illó zsírsav (VFA) keletkezik, majd felszívódik a véráramba. Az illó zsírsavak energiaforrásként szolgálnak a nyúl számára, előállításuk függ a vakbél-mikrobióta összetételétől, valamint az elfogyasztott takarmány típusától (Bokori és mtsai., 2003).

2.2 A nyúlvakbél-mikrobióta

A házinyúl vakbelét benépesítő mikrobióta legfőbb jellemzői Gidenne (1997) szerint: a lassú kialakulás (a megszületést követő első 3 napban szinte steril a vakbél), és a viszonylag egyszerű összetétel. A nyulak - háziasított haszonállatok közt egyedülálló – emésztés-élettanának egyik fő sajátossága a mikrobiális fehérjéknek a vakbélből történő újrahasznosítása caecotrophia útján. Az emésztési folyamatokra a vakbélben élő bakteriális populáció - egyedülálló módon - közvetlen hatást gyakorol (Abeica és mtsai., 2007).

2.2.1 A nyúlvakbél-mikrobióta összetétele és kialakulása

A házinyúl vakbél-mikrobióta kialakulását, összetételét és egyensúlyát befolyásoló tényezők megismerése alapvető kutatási cél, ugyanis az emésztési zavarok és emésztőszervi megbetegedések kialakulásában közvetlenül vagy közvetve, egyéb kórokok mellett a mikrobióta egyensúlyának felborulása (dysbiosis) is szerepet játszik; akár az állomány 30-50%-os elhullását is okozhatja, valamint a gyógyult állatok teljesítménye is lényegesen csökken. (Lelkes és Chang, 1987).

A nyulak bélrendszerében a mikrobiális kolonizáció a születéssel kezdődik, az anya ivarszerveiről kitenyészett *Bacteroides*-ek alapján már a szülőútban megtörténik. Tehát az elsőként megtelepedő bélbaktériumok anyai eredetűek. A bélmikrobióta fejlődése fokozatos folyamat (Fortun-Lamothe és

Boullier, 2007). Az első kolonizáció szerepe meghatározó a végső (stabil) ökoszisztéma kialakulásában (Guarner és Malagelada, 2003). Az “úttörő” baktériumok képesek befolyásolni a gazdaszervezet epiteliális sejtjeiben a génextpressziót. Ez által kedvező környezeti feltételeket teremtenek maguk számára, megakadályozhatják a később betelepülő baktériumfajok szaporodását (Fortun-Lamothe és Boullier, 2004). Az egyensúlyi állapotban lévő, folyamatosan felépülő egyéni bakteriális összetétel (klimax stádium) (Combes és mtsai., 2011) bizonyos körülmények között ingadozhat; például akut hasmenéses megbetegedések, antibiotikum-kezelés vagy kisebb mértékben a táplálkozás hatására, azonban a mikrobiális közösség összetételének mintázata nagyrészt állandó (Simon és Gorbach, 1984).

A vakbél-mikrobióta jelentős részét alkotó baktériumok tehát már egészen korán megtelepednek a vakbélben. Szerepük a kizárólagos tejtáplálás időszaka alatt valószínűleg a patogénekkal szembeni védelem mielőbbi kialakítása (kötőhelyek lefedése), valamint a bél fejlődésének (nyálkahártya szöveti szerkezete, immunrendszere) elősegítése.

A molekuláris a módszerek elterjedésével az elmúlt években szinte „átrendeződött” a bélmikrobióta összetételéről alkotott kép. Korábban a *Bacteroides*-eket szinte kizárólagos baktériumcsoportként tartották számon a nyúl vakbelében (Gouet és Fonty, 1973), a molekuláris analízisek 30%-os jelenlétről számolnak be (Abecia és mtsai., Smith és mtsai., 2006). Az első

héten a nyúl emésztőrendszerét szigorú anaerobok, elsősorban *Bacteroides* nemzetség kolonizálja (Carabano és mtsai., 2010). A tejfelvétel késleltetheti a cellulolitikus baktériumok kolonizációját, de közvetlenül nem befolyásolja az *E. coli*-populáció kialakulását (Padilha és mtsai., 1996).

Kovács és mtsai. (2006) vizsgálták az anyai bélsár elfogyasztásának és a szoptatás módjának (egyszeri vagy szabad szoptatás) hatásait a *Bacteroides* nemzetségnek a vakbélbe történő betelepülésére. A vakbél tartalom mikrobiológiai vizsgálatának eredményei azt mutatták, hogy a *Bacteroides*-ek kolonizációja már a 3. napon megkezdődik, függetlenül a szoptatási módtól és a bélsárhoz való hozzáféréstől. Azonban szabadon szoptatott és az anya bélsarához hozzáférő kisnyulakban betelepülésük gyorsabban ment végbe. Az anyai bélsár elfogyasztásának megakadályozása tehát csupán késleltette a normál mikrobióta kialakulását.

A mikrobiális populációban bekövetkező korrallal összefüggő változások következtében az illó zsírsavak (VFA-k) termelése növekszik az idő előrehaladtával (Bellier és mtsai., 1995; Padilha és mtsai., 1995).

Combes és mtsai. (2011) házi nyúlban vizsgálták a vakbél-mikrobióta fejlődését, összetételét és aktivitását a 2. életnaptól egészen a 70.-ig. A baktériumok azonosítása 16S rRNS génszekvencia alapján történt. A 2. életnapon a nyulak vakbél tartalmából kimutatott mikroba mennyiségek: 8,4; 7,2 és 7,4 log₁₀ kópiaszám/g a teljes baktériumtartalom, a *Bacteroides*-

Prevotella és a *Firmicutes* csoportokat illetően. Ezen baktériumcsoportok maximális mennyisége a következők szerint alakult: a *Firmicutes*ek esetében a 14. nap a (10,8 log₁₀ kópiaszám/g vakbél-tartalom) az összes baktériumtartalom és a *Bacteroides-Prevotella* csoportoknál pedig a 21. napon (11,4 és 10,7 log₁₀ kópiaszám/g vakbél-tartalom). A felnőtt nyúl vakbelében élő mikrobiális populáció fő nemzetsége a *Bacteroides* (10⁹ - 10¹⁰ g/vakbél-tartalom). Más nemzetségek, mint például a *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Streptococcus* és *Enterobacter* egészítik ki ezt a populációt (Szendrő és mtsai., 2011).

2.2.2 A nyúlvakbél-mikrobióta szerepe

Mára általánosan elfogadott az emésztő-szervrendszert benépesítő mikrobiális közösség fontossága. A GIT-t benépesítő nagy fajszámú baktériumpopuláció fontos szerepet játszik számos anyagcsere-, és immunfolyamatban, valamint jelentős hatással van a gazdaszervezet táplálóanyag-ellátottságára - különösen a növényevő fajokban - valamint a gazdaszervezetnek a kórokozók elleni védelemében (Combes és mtsai., 2011).

A bélmikrobióta által kifejtett metabolikus aktivitás hozzájárul a táplálékösszetevők emésztéséhez, az energiaraktározáshoz. Szerepe van a mikrotáplálóanyagokkal való ellátásban és a xenobiotikumok (bármely, a baktérium számára idegen anyag) átalakításában.

A bélmikrobióta dinamikus ökoszisztémaként működik a gazdaszervezet gasztrointesztinális rendszerében, azzal nem pusztán koegzisztenciális viszonyban van (együtt létezés), hanem kölcsönös kapcsolat áll fenn. A bélmikrobióta szerkezete és összetétele tükrözi a természetes szelekciót - mind a mikrobiális közösség, mind a gazdaszervezet szintjén - ami elősegíti az együttműködést és a komplex ökoszisztéma működésének stabilitását (O'Hara és Shanahan, 2006). A bélmikrobióta metabolikus aktivitása egy szerv működéséhez hasonlítható, „elfelejtett/elhanyagolt szervként” is említik (O'Hara és Shanahan, 2006); „szerv a szervben” (Bocci, 1992).

A mikrobiális populáció jelenléte a vakbélben, valamint annak caecotrophiaival való újbóli elfogyasztása lehetővé teszi a nyúl számára további energia, aminosavak és vitaminok felvételét. A cellulózbontó baktériumok jelenlétét már az 1950-1960-as években leírták (Hall, 1952; Davies, 1965). Később, Emaldi és mtsai. (1979) tanulmányozták a mikrobióta enzimatikus aktivitását, és a következő főbb emésztési tevékenységeket írták le (csökkenő sorrendben): ammóniahasználtság, ureolitikus, proteolitikus és cellulolitikus aktivitás. A Forsythe és Parker (1985), Marounek és mtsai. (1995) valamint Sirotek és mtsai. (2003) által végzett vizsgálatok szerint más tevékenységek (pl. xilanolitikus, pektinolitikus, mucinolitikus) is nagy jelentőséggel bírnak.

2.2.3 A választás hatása a nyúlvakbél-mikrobiótára, eubiosis – dysbiosis

A fiatal nyulaknak a tejről a szilárd takarmányra való áttérése jelentősen befolyásolja a tápcsatorna érését, fejlődését (a vakbél ökoszisztémája, a nyálkahártya helyi immunrendszere, enzimaktivitás stb.), és meghatározza az állatnak az enteropatogénekkal szembeni ellenálló képességét. A választás körüli időszak tehát különösen fontos a fiatal nyulak emésztőszervi megbetegedésekkel szembeni ellenálló képességének kialakítása szempontjából (Marlier és mtsai., 2003). A házinyúl esetében az eubiosis fenntartása rendkívül összetett, három alappillére: az étrend, a nyálkahártya és a normál mikrobióta (Montagne és mtsai., 2003).

Az emésztési zavarok megelőzése érdekében a gazdaszervezet, a mikrobióta és a környezet egyensúlyának stabilizálása a kulcs. Ez kiemelt jelentőségű a növendéknyulakban, hiszen egy még nem stabilizálódott összetételű mikrobapopuláció mellett történik a folyékonyról (anyatej) szilárd takarmányra való átállás.

A hámsejtek, a GALT és a kommenzális mikrobióta kölcsönhatása egy dinamikus, de finom egyensúlyt eredményez; ami elengedhetetlen a táplálóanyagok felszívódásának biztosításában, és a kórokozók elleni védekezésben. Az egyensúly kialakulásában és fenntartásában szerepe van az emésztőrendszerbe kerülő tápláléknak, a fizikai és kémiai környezet megteremtése révén, valamint az emésztő-szervrendszeren való áthaladási

sebességen keresztül. A fiatal nyulakban (15-35 napos korban) a bélnyálkahártya (abszorptív hám és GALT) és a bélmikrobióta közötti egyensúly különösen törékeny. A bélmikrobióta összetétele még korántsem stabil, az immunrendszer még fejletlen és az antitest sokféleség kialakulása később - a választás időszakában - megy végbe (Fortun-Lamothe és Boullier, 2004). A mikrobiális ökoszisztéma zavara (dysbiosis) számos kórfolyamat kialakulását segítheti elő, elsősorban szisztémás vagy helyi gyulladásokat, melyek éppen a mikrobiom és az immunfunkciók kapcsolata következtében jönnek létre (Bíró, 2014).

Összességében elmondható, hogy a bélmikrobióta összetételének egyensúlya (eubiosis) számos előnnyel jár a gazdaszervezet számára, miközben a mikrobiális egyensúly zavara (dysbiosis) immunrendszerrel kapcsolatos betegségekhez vezethet (Laparra és Sanz, 2010).

2.2.4 A mikrobióta vizsgálati módszerei

Az emésztő-szervrendszer mikróbapopulációinak és genetikai jellemzésüknek kutatása egyre nagyobb teret nyer mind a humán orvoslás, mind az állatgyógyászat-állattenyésztés területein. A bélcsatorna mikróbapopulációinak nagy része nem tenyésztethető (maximum 25-40%) a klasszikus mikrobiológiai módszerekkel (Tannock és mtsai., 2000); azonosításukat a genomjaik teszik lehetővé. A klasszikus bakteriális

tenyésztési módszereken túl fluoreszcens in situ hibridizáció (FISH), molekuláris fingerprinting, qPCR, microarray technikák, nagy áteresztőképességű 16S rRNS génszekvencia-analízis (stb.) és a metagenomikus megközelítések fedhetik fel a mikróbapopulációk struktúráját az erősen kolonizált bélnyálkahártyán (Stecher és Hardt, 2008). Az eddig elért eredmények csupán töredékét fedik le e hatalmas területnek, mégis utalnak a mikrobióta és a GIT működésének és egyes kórfolyamatainak összefüggésére. Mindezekon túlmutat a bél-barrier elégtelen működése: növeli az extraintesztinális, anyagcsere- és immunrendszerrel kapcsolatos betegségek kockázatát is. A molekuláris technológiával megszerzett ismeretek növelhetik a betegség-megelőzés, és a kezelések hatékonyságát (Bíró, 2014).

Mennyiségi meghatározás esetén a hagyományos vizsgálatok eredményei (CFU/ gramm) és a molekuláris biológiai eljárásokkal szerzett adatok (copy number/gramm) nem, vagy nehezen vethetők össze egymással.

2.2.4.1 Hagományos mikrobiológiai tenyésztés

A házi nyúl GIT mikrobiális közösségének részletes vizsgálata az 1970-es évek óta zajlik, klasszikus mikrobiológiai eljárások alkalmazásával (Gouet és Fonty, 1973, 1979). Egészen a 2000-es évekig, minden tanulmány - bármilyen céllal is vizsgálta a nyúl bélmikrobiótát – az ezen leírásokból származó módszertant alkalmazta.

A steril mintavételt és hígítási sor készítését követően - laboratóriumi körülmények között - különböző differenciáló és/vagy szelektív táptalajokon (pl. *E. coli* – Chromocult), megfelelő inkubációs körülmények (idő, hőmérséklet) mellett tenyésztik az egyes mikroorganizmusokat. Az eredményeket colony forming unit-ban (CFU) fejezik ki. A módszer egyik legnagyobb korlátja, hogy a szigorúan anaerob mikróbák tenyésztésénél gondot jelent az aerob körülmények között készített hígítási sorozat (Gouet és Fonty, 1979), így jelentősen torzulnak az eredmények.

Bár a klasszikus eljárásokkal nem lehetséges a mikrobióta teljes felmérése (mennyiség, diverzitás, fajgazdagság stb.), létjogosultságuk a mai napig megkérdőjelezhetetlen: egyes patogének kimutatása, vagy szintenyészet készítése molekuláris genetikai vizsgálatokra (pl. szekvenálás).

2.2.4.2 Molekuláris genetikai módszerek

A molekuláris genetikai módszerek elvi alapja a mikroorganizmusok DNS-szekvencia (pl. 16S rRNS gén) alapú azonosítása, illetve mennyiségi analízise. Nem kizárólag az élő, hanem a már elpusztult (örökítő anyaga még jelen van) mikróbák is kimutathatóak. Tehát lehetővé teszi mind a qualitative (identifikáció), mind a quantitative (mennyiségi) meghatározást, akár metagenom szinten.

A steril mintavételt követő első lépés a DNS/RNS **tisztítása**. Létezik speciálisan béltartalomtól való baktérium-DNS tisztítására alkalmas kit, melynek használatával a néhány órás eljárás eredményeképp víztiszta DNS-oldatot kapunk.

A **PCR** – polimeráz-lánreakció lehetővé teszi: 1.) egy adott DNS-szakasz, in vitro amplifikációját, a további analízishez (pl. szekvenálás) szükséges felszorzosítását, 2.) specifikus primer párokkal célzott baktériumcsoportok jelenlétének, illetve mennyiségének meghatározását. A PCR elemei: DNS-templát (szorzosítani kívánt rész), primer pár (a kiválasztott, amplifikálandó DNS-szakasz 5' és 3' végeinek szintetikusan előállított komplementerei), dNTP-k (adenin, timin, citozin, guanin), hőstabil DNS-polimeráz enzim, reakciópuffer, MgCl₂. A PCR mikrobiológiai alkalmazása: a felszaporítani kívánt DNS-szakasz (templát) tetszőlegesen választható ki (nemzetség, fajspecifikus régió), a reakció specifikussága szekvencia alapú, a specifikitást a megfelelően kiválasztott primer pár adja. Fajon belüli – akár patogén törzsek – kimutatása is lehetséges, ha az azonosítandó törzs tartalmaz rá jellemző, konzervatív szekvenciaszakaszokat.

A **Quantitative PCR** (qPCR) valós idejű PCR, amelyet sikeresen alkalmaztak a gasztrointesztinális-minták különböző fajainak meghatározására. Ezzel a módszerrel nagyon alacsony koncentrációjú

baktérium-örökítőanyag mennyiségi analízise lehetséges, ami nehéz más (klasszikus) eljárások alkalmazásával (Zoetendal és mtsai., 2004). A qPCR valós időben történő nyomon követése a reakció során képződő jel intenzitásának megfigyelésével lehetséges. Minden amplifikációs ciklusban történik detektálás egy speciális fluoreszcens festék (pl. a dupla szálú DNS-be beékelődő SYBR® Green) alkalmazásával, melynek gerjesztés hatására kibocsátott jelintenzitása arányos a képződő termék mennyiségével, ezáltal mennyiségi kimutatást tesz lehetővé (Navidshad és mtsai., 2012).

A mennyiségi meghatározást egyrészt a qPCR valós időben mérhető jelintenzitás növekedése, másrészt a PCR-termékek korábban plazmidba vitt, ismert koncentrációjú hígítási sora fogja lehetővé tenni. A kópiaszám sejtszámra történő extrapolációját nehezíti, hogy a 16S rRNS-riboszómák sejtenkénti mennyisége folyamatosan változik (Rigottier-Gois és mtsai., 2003a); valamint befolyásoló tényezők a bakteriális fajok közti különbségek, a növekedési fázis, a sejtek aktivitása, a genom mérete és a 16S-rRNS gén kópiaszáma és mérete genomon belül.

Bennegadi és mtsai. (2003) a hagyományos- és SPF-nyulakban vizsgálta a vakbél mikrobiális közösségének szerkezetét, dot-blot hibridizációval **16S rRNS célzott oligonukleotid próbákkal**. A vakbél-mikrobióta változását az életkor, táplálkozás és a nyúl egészségi állapota (egészséges vagy hasmenéses) szerint értékelte. A vakbél-mikrobióta a 25-28

nap körül stabilizálódott. A baktériumok és az archaeák a mikrobiális közösségek 73%- és 22%-át képviselték a választás után (28 nap). Cellulóz-bontó baktériumok részaránya kevesebb, mint 7% volt hagyományos és SPF-nyulakban egyaránt. 97%-os azonossági küszöbérték alapján Abecia és mtsai. (2005) 44 fajról számolt be. A 16S rRNS-gének fragmenseit a kivont DNS-ből PCR-rel amplifikálták, "univerzális" bakteriális primerekkel.

RT-PCR (reverz transzkriptáz PCR): RNS-minták reverz transzkriptáz enzimmel cDNS-re történő átírása, majd e cDNS szolgál a PCR templátjául. A technika az élő és elhalt sejtek elkülönítésére alkalmas, ugyanis a mRNS-szintézis az elpusztult sejtekben leáll, a mRNS molekulák pedig gyorsan lebomlanak.

Multiplex PCR esetében több primerpár használata valósul meg egyidejűleg, a termékek méret szerint vagy jelöléssel különíthetők el. Egyik primerpár faj- vagy nemzetségspecifikus, a másik a kimutatni kívánt génre specifikus. Sharma (2006) RT-MPCR módszer alkalmazásával mutatott ki enterohemorragiás *Escherichia coli* törzseket (EHEC) bélsár-mintából, valamint az eljárást alkalmasnak találta a bélsárban való életképesség vizsgálatára.

PCR-RFLP: a PCR-termékeket restrikciós enzimekkel hasítják, a keletkező fragmentumok szeparálása gél-elektroforézissel történik. A

létrejövő mintázatokból következtetnek a PCR-termékek azonosságára vagy különbözőségére. Alkalmas tipizálásra, faj alatti kategória elkülönítésére.

PCR-DGGE: a PCR-ral amplifikált DNS-célszekvenciák elválasztása denaturáló-grádiens gélben történik. Az elektroforézis kétféle, kémiai denaturáló- és/vagy hőmérséklet-grádiens mentén, poliakrilamidgélben megy végbe. A kémiai- és hőmérsékleti-grádiens mentén részlegesen denaturálódnak a kétszálú DNS-molekulák, így mobilitásuk a gélben a szekvenciájuknak megfelelően különbözik. Alkalmas a mikrobapopulációk összetételének elemzésére. A módszer lehetővé teszi akár az 1–2 bázisban eltérő molekulák szétválasztását, továbbá az azonos fajhoz tartozó, hasonló törzsek elkülönítését (tipizálását) is. Huybens és mtsai. (2008) a járványos nyúl-enteropathia (ERE) estében a feltételezett bakteriális etiológiáját vizsgálták. Eredményeik a 16S rDNS-gén, restrikciós fragmenthossz polimorfizmus (RFLP) és denaturáló gradiens gélelektroforézis (DGGE) segítségével történő elemzése alapján, megerősítik a baktériumok potenciális szerepét az ERE etiológiájában.

PCR-CE-SSCP-technika is a 16S rRNS-gén alapú azonosítást tesz lehetővé. Az amplifikálás során konzervatív régiókra tervezett primereket alkalmaznak, a cél DNS szekvenciabeni különbségeket mutat az egyes baktériumfajoknál. A puffer oldatban az egyszálú-DNS térbeli konformációt vesz fel, ami szekvenciaspecifikus. Az elválasztás kapillárisban történik, a tömeg, a térbeli konformáció és felületi töltéssűrűség alapján. Használni lehet

faj szintű azonosításra vagy „csupán” diverzitási és fajgazdagsági adatok nyerésére.

Michelland és mtsai. (2010) azt vizsgálták, hogyan reagál a hagyományos takarmányon tartott növendéknyúl vakbél-ökoszisztémája, ha alacsony rosttartalmú diétára váltanak. A bakteriális közösség karakterizációja **CE-SSCP**-technikával történt, az összes baktérium mennyiséget pedig **real-time PCR**-ral határozták meg. A takarmány rosttartalmának csökkentése megváltozott CE-SSCP-profilt ($P \leq 0,001$) eredményezett, de a diverzitási index nem változott. Az összbaktérium 16S rRNS-gén kópiaszáma csökkent ($P \leq 0,01$) az alacsony rosttartalom hatására. Szignifikáns összefüggést figyeltek meg a vakbél bakteriális közösség és a környezetének változása között, ami arra utal, hogy a mikrobióta gyors alkalmazkodóképességgel rendelkezik.

DNS-szekvenálás: meghatározzák egy DNS-molekula nukleotid-sorrendjét. Az 1970-es években dolgoztak ki két fő eljárástípust a Maxam és Gilbert-féle kémiai szekvenálást és a Sanger-féle láncterminációs módszert. Az utóbbi terjedt el, hosszú ideig szinte kizárólag ezt a módszert alkalmazták. Az 1990-es években automatizálták az alaplómódszert, nagyban meggyorsítva a szekvenálási folyamatot. Az ezredfordulóra tehető az **NGS** technológiák megjelenése, melyek nagy előrelépést jelentettek azáltal, hogy lehetővé teszik egy kísérletben akár 10^5 - 10^6 különböző DNS-fragmentum párhuzamos és

gyors, automatizált leolvasását (HTP-módszerek). Az NGS gyűjtőfogalom, magába foglal több különböző eljárást (pl. piro szekvenálás; SOLiD, TSMS stb.).

Monteils és mtsai. (2008) egy bakteriális könyvtárat készítettek hagyományosan tartott nyúl vakbél tartalmából. A teljes 16S rRNS-gént szekvenálták. A kapott 228 klónt 70 kezelhető taxonómiai egységre (OTU) osztották. Az egységek nagy része (94%) a *Firmicutes phylum* képviselői közt oszlott meg. Csupán három szekvencia kapcsolódott a *Bacteroides* nemzetséghez. A filogén fán kilenc klasztert határoztak meg. A vakbél tartalom bakteriális közösségének nagyfokú diverzitását mutatták ki, ami arra utal, hogy a növényevők emésztőképzőlektét benépesítő mikrobiális-ökoszisztémák igen változatosak. Csak egyetlen szekvencia volt több mint 97% -ban hasonló valamilyen kitenyészhető fajéhoz, a *Variovorax* sp. (talaj ökoszisztémából azonosított). Az összes többi szekvencia nem tenyészhető baktériumokhoz tartozott, és nagyfokú egyezést mutatott az adatbázisban regisztrált szekvenciákkal.

A **DNS Chip/Microarray** egy négyzetcentiméternyi vagy tárgylemeznyi üveglapra szintetizált különböző, ismert szekvenciájú DNS-darabokat tartalmazó, genom szintű vizsgálatokra alkalmas eszköz. A chipeknek különböző formái léteznek előállítási módjuk szerint (nyomtatott vagy szintetizált nukleinsavat tartalmazó DNS chipek), illetve a vizsgálati mód

szerint ezek lehetnek egyszínű vagy kétszínűek microarrayek. Rhee és mtsai. (2004) tanulmányukban a normál mikrobióta szerepét vizsgálták a GALT fejlődésében. A baktériumok azonosítása microarray technikával, 16S rRNS-gének alapján, a Ribosomal Database Project II használatával történt. Arra a következtetésre jutottak, hogy a normál mikrobióta specifikus tagjai a stresszválaszok egy bizonyos részhalmazán keresztül irányítják a GALT fejlődését nyúlban.

2.3 Antibiotikumok preventív és hozamfokozó alkalmazása

Az antibiotikumok, mint hozamfokozók (AGP) használata az állattenyésztésben a huszadik század közepén egy véletlen megfigyeléssel vette kezdetét. Stokstad és Jukes (1949) a klórtetraciklin-termelés maradványát csirke takarmányhoz adta, B₁₂-vitamin-forrásként. Azonban a növekedést serkentő mértéke túl nagy bizonyult ahhoz, hogy magyarázható legyen csupán a vitamin hatásaként (Brezoen és mtsai., 1999). A szinte nyilvánvaló ok a klórtetraciklin antibiotikus aktivitásában rejlik. Ezt a megfigyelést gyorsan kiterjesztették más antibiotikumokra és más állatfajokra is; széles körben elterjedt az AGP-vel kiegészített takarmányok alkalmazása az állattenyésztésben (Falcao és mtsai., 2007).

Az antibiotikumok terápiás alkalmazása tipikusan nagy dózisú, rövid távú. A hatóanyag bejuttatása injekcióval, vagy szájon át beadva (takarmány,

ivóvíz) történik. A hozamfokozóként való használat általában ezzel szemben alacsony dózisú, hosszú távú adagolást jelent, rendszerint a takarmányba keverve. Természetesen létezik bizonyos mértékű átfedés a két felhasználás között (Falcao és mtsai., 2007).

Az intenzív nyúltermelésben jelentkező emésztőszervi megbetegedések problémája az antibiotikumok gyakori alkalmazásához vezetett. Az uniós jogszabályok a hozamfokozó célú felhasználást 2006-óta tiltják (Abeica és mtsai., 2007.; Bovera és mtsai., 2015). Az antibiotikumok azonban nem csupán a fertőzések kockázatát csökkentik, hanem befolyásolhatják az emésztőrendszer szimbiotikus baktérium-populációját is (Abecia és mtsai., 2005).

Az antibiotikumok folyamatos kis dózisú (terápiás adagnál jóval kisebb koncentráció) alkalmazásának nyilvánvaló veszélye, hogy a kórokozó baktériumok ellenállóvá válnak (rezisztens törzsek kialakulása) velük szemben. Később, a klinikai tünetekkel járó megbetegedések esetén terápiás dózisban is hatástalanok lesznek az adott hatóanyagra rezisztens kórokozókkal szemben. Már az 1970-es években felismerték az AGP-k ilyen irányú kockázatát, majd fokozatosan korlátozták a humán gyógyászatban alkalmazott antibiotikumok hozamfokozóként történő felhasználását.

2.4 Antibiotikumok kiváltása természetes takarmány-kiegészítőkkel

A felnevelési veszteség (9-15%) csökkentése érdekében történő antibiotikum-felhasználás élelmiszerbiztonsági és humán-egészségügyi kockázata miatt indokolt a gyógyszerek, gyógyszeres takarmányok csökkentett használata. Kiemelten fontos tehát a természetes takarmány-kiegészítők alkalmazási lehetőségének kidolgozása, az antibiotikumok kiváltásának céljából (Bovera és mtsai., 2015).

A probiotikumok és prebiotikus hatású vegyületek alkalmazása az állattenyésztésben, egy lehetséges megoldást jelent a bélrendszer egészségi állapotának megőrzésében és az állatok teljesítményének fokozásában, a hozamfokozó antibiotikumok elhagyásával (Kim és mtsai., 2011). Az antibiotikumok kiváltásnak céljából számos takarmány-adalékanyagot (például növényi kivonatokat, pro- és prebiotikumokat) vizsgáltak házinyúlban (Assan, 2018) Kokcidiózis elleni védekezésben eredményesen alkalmaztak vöröshagyma, fokhagyma és oregánó takarmány kiegészítőket; miközben az nyulak reprodukciós és növekedési teljesítménye is javult, kedvezőbb vágási súllyal kerülhettek értékesítésre. Élesztővel (*Saccharomyces cerevisiae*) történő takarmány kiegészítés hatására módosul a választás utáni vakbél-mikrobióta összetétel. Az oregánó, a fokhagyma és a rozmaryng, mint takarmány kiegészítők hozzáadásával nagyobb testtömeg értékeket értek el, a kokcidiosztatikummal táplált nyulakéhoz képest. A szelídgesztenye kivonat

módosította a gyomor-bélrendszert benépesítő mikrobióta stabilitását. Propolisz-kivonat (etanolos) és egy növényi keverék (sóska, pimpó és madárkeserűfű) ivóvízben adagolva mérsékeli a nyulak krónikus hasmenéses megbetegedésének időtartamát. Megállapították, hogy a propolisz kedvező antibakteriális tulajdonságai Gram-pozitív baktérium törzsek (például *S. aureus*) gátlásán keresztül valósulnak meg, a Gram-negatív *E. coli* ellen nem tapasztalták a gátló hatást.

2.4.4 Prebiotikumok és probiotikumok, mint természetes takarmány-kiegészítők

A **probiotikumok** iránti érdeklődés visszavezethető Elie Metchnikoff (1908) huszadik század elején végzett tanulmányaira, amelyekben a fermentált tejek lehetséges előnyeit értékelte az emberi táplálkozásban. Maga a probiotikus/probiotikum kifejezés később jelent meg. A probiotikumok operatív definíciója napjainkig vita tárgya, de széles körben elfogadott a következő meghatározás: olyan élő mikroorganizmusokat tartalmazó készítmény, amely megfelelő mennyiségben történő beadásakor jótékony hatást fejt ki az ember vagy az állat egészségére (Hamilton és mtsai., 2003). A probiotikumok tehát a hasznos és életképes mikroorganizmusokat tartalmazó takarmány-kiegészítők, amelyek kedvező hatással vannak a gazdaállat bélmikrobiótájának egyensúlyára, és korábban klinikai vizsgálatokkal

bizonyították a jótékony egészségügyi hatásukat. Alkalmazásuk célja a legkedvezőbb mikrobapopulációk számának növelése és fenntartása, valamint a potenciálisan patogén fajok minél hatékonyabb kiszorítása (3. ábra).



3. ábra. A probiotikumok hatásmechanizmusai (Kaur és mtsai., 2002 alapján)

Az elmúlt évtized rengeteg változást és fejlődést hozott a probiotikumok kutatása és felhasználása területén. Egy tanulmány (Falcao és mtsai., 2007) szerint a probiotikumokban leggyakrabban a következő csoportokhoz tartozó baktériumokat alkalmazták: Bacillus nemzetség (*B. cereus*, var. *toyoi*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*) Enterococcus nemzetség (*E. faecium*), Lactobacillus nemzetség (*L. acidophilus*, *L. casei*, *L. farciminis*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*), Pedicoccus nemzetség (*P. acidilactici*) és

Streptococcus nemzetség (*S. infantarius*), az élesztők közül pedig a *Saccharomyces cerevisiae* törzset.

Egy vizsgálat (O'Toole és mtsai., 2017) alapján a kutatásban felhasznált és a kereskedelemben értékesített probiotikumok többségében *Lactobacillus* spp. és a *Bifidobacterium* spp. törzsek/fajok képviselői találhatók meg; aminek egyik fő oka, hogy az Egyesült Államokban ezeket minősítették „általánosan biztonságosnak” (GRAS), illetve ezek a törzsek/fajok rendelkeznek az EFSA minősítésével. A piacon jelenleg elérhető probiotikumokban az előbbieken túl a *Saccharomyces*, *Bacillus* spp., *Escherichia coli*, *Enterococcus* nemzetség és a *Wiesellé* spp. képviselőit találhatjuk meg.

A jobb tenyésztési módszerek, a megfizethetőbb genom- és metagenom-szekvenciák, valamint a bakteriális genomok módosítására szolgáló hatékonyabb eszközök kifejlesztésével a probiotikum-kutatás új korszakának csúcspontján vagyunk. Mindezek által lehetővé vált a testre szabott probiotikumok kidolgozása, melyek illeszkednek a specifikus fogyasztói igényekhez. Az humán bélcsatorna mikrobiológiai összetételének és működésének megismerése - amelyet a tömeges párhuzamos szekvenálás is felgyorsított - drámai módon terjesztette ki a potenciális egészségügyi előnyöket hordozó organizmusok körét, bár sok közülük még a vizsgálat korai szakaszában van (O'Toole és mtsai., 2017). Ezeket a szervezeteket néha új

generációs probiotikumoknak (NGP) nevezik, de az Egyesült Államok új szabályozási keretével összefüggésben élő bioterápiás termékeként (LBP) is szerepelnek (Sun és mtsai., 2016).

Az NPG/LBP-k természetesen megfelelnek a probiotikumok korábbi definíciójának (1. tartalmaz élő szervezeteket, például baktériumokat; 2. alkalmazható emberi betegség megelőzése, kezelése vagy gyógyítása céljából 3. nem oltóanyag), azonban géntechnológiával módosított mikroorganizmusokat is tartalmaznak (genetically modified microorganisms - GMM).

A **probiotikumokat** nagy gyakorisággal alkalmazzák a kedvtelésből tartott **nyulakban** előforduló gyomor-bélrendszeri megbetegedések kezelésére. Használatuk a készítményeknek tulajdonított előnyös hatásokon alapszik, ám az egészségre vagy betegségre gyakorolt befolyásukat vizsgáló tudományos eredmények közül viszonylag kevés áll rendelkezésünkre (Benato és mtsai., 2014).

Amber mtsai. 2004-es tanulmánya szerint a probiotikumok alkalmazása szignifikánsan megnövelte a nyulak cellulitikus baktériumainak a számát (CFU/ml), miközben csökkent az ureolitikus baktériummennyiség. Ebben a vizsgálatban a probiotikum nem befolyásolta a vakbél pH-ját. A hatásmechanizmusok felderítése érdekében, valamint nyulakban eredményesebben alkalmazható nyúl-probiotikumok tervezése céljából

elengedhetetlen lenne további vizsgálatok elvégzése, amelyek emberek, laboratóriumi modellállatok és más gazdasági állatfajok esetében már elérhetőek (Falcao és mtsai., 2007).

Turner és mtsai. (2002) megállapították, hogy a *Bacillus subtilis*, mint probiotikum sertések esetében az immunfunkció támogatásával hozzájárult a választási stressz csökkentéséhez, nyulaknál pedig a növekedési teljesítményének javításához. Li és mtsai. (2009) szerint, csirkéken végzett vizsgálataikban a *Bacillus cereus* növelte a hasznos baktériumok mennyiségét, a károsakét pedig csökkentette. Egy házi nyúlra folytatott kísérlet eredményei kimutatták, hogy a *Bacteroides* és a *Clostridium* relatív borítása jelentősen csökkent, a *Ruminococcus* mennyisége pedig megemelkedett a *Bacillus subtilis* etetését követően (Guo és mtsai., 2017). A *Ruminococcus* nemzetség fontos szerepet játszik a növényi eredetű takarmányok emésztésében (Richards és mtsai., 2005); gyarapodásuk ezáltal elősegítheti a nyulak növekedési teljesítményét. A *Bacteroides* és a *Clostridium* bélben történő növekedése kolitiszhez és karcinogenezishez vezet (Tannock, 2002).

1995-ben Gibson és Roberfroid a következő definíciót alkotta meg: a **prebiotikus vegyületek** a gyomorban és a vékonybélben emészthetetlen élelmiszer-összetevők, melyeket a bélmikrobióta hasznosít, ezáltal kedvező hatással van a gazdaszervezetre. Ezt a meghatározást azóta többször is megvitatták és finomították. Azonban a legtöbb definíció eddig egyetértett

azzal a követelménnyel, hogy a prebiotikumoknak "specifikusnak" vagy "szelektívnek" kell lenniük az egészségmegőrző tulajdonságú taxonómiai csoportok vagy a hasznos anyagcsere-tevékenységek szempontjából (Roberfroid és mtsai., 2010; Rastall és Gibson, 2014).

Roberfroid és mtsai. (2010) a specifikusságot tekintették a legfontosabb feltételnek, amelyet *in vivo* kísérletekkel szükséges alátámasztani, állati/humán bélmikrobiótában - a legmegfelelőbb módszereket alkalmazva - a mikroba közösséget alkotó nemzetségek/fajok széles skálájának számszerűsítésére.

A prebiotikum-konceptió hatalmas mennyiségű kutatást indított el, és jelentős szerepet játszott a gasztrointesztinális mikrobiológia terén elért új ismeretek feltárásában. Felismerték, hogy a hatásukra a bél mikrobiális közösségben bekövetkező változások kedvező élettani hatással járhatnak. Ez a felismerés nagyban hozzájárult ahhoz, hogy a bélmikrobiótát terápiás célként értékeljük különböző kórélettani összefüggésekben (Roberfroid és mtsai., 2010; Rastall és Gibson, 2014).

A jelenlegi prebiotikus koncepció tipikusan olyan emészthetetlen élelmiszer-összetevőkre vagy anyagokra vonatkozik, amelyek a gyomor-bél traktus felső szakaszán tovább haladnak, és a vastagbél kolonizációját elősegítő hasznos/egészségbarát baktériumok növekedését és/vagy aktivitását serkentik (Bindels és mtsai., 2015).

A prebiotikum-koncepció történetének és változásainak áttekintése olvasható az 1. táblázatban.

1. Táblázat: A prebiotikum-koncepció fejlődése (Bindels és mtsai., 2015 alapján)

Évszám	Definíció	A prebiotikumnak tekintett összetevők	Változás	Forrás
1995	Emészthetetlen táplálék-összetevő, amely kedvező hatását a gazdaszervezetre azáltal, hogy szelektíven serkentik egy vagy korlátozott számú baktériumok növekedését és/vagy aktivitását a vastagbélben.	FOS	-	Gibson és Roberfroid (1995)
2003	Emészthetetlen anyagok, amelyek kedvező élettani hatást fejtenek ki a gazdaszervezetre úgy, hogy szelektíven serkentik bizonyos baktériumok növekedését vagy aktivitását.	FOS tGOS Laktulóz	Az eredeti definíció kiterjesztése más testrészekre - nem csak a vastagbéltre. Megváltozott "kedvező hatás a gazdaszervezetre", helyette "kedvező élettani hatás" szerepel	Reid és mtsai. (2003) ISAPP alapító találkozó
2004	Szelektíven fermentált összetevők, amelyek lehetővé teszik a gasztrointesztinális mikroflóra összetételében és/vagy aktivitásában bekövetkező egyedi változásokat, amelyek előnyösek a gazdaszervezet jóléte és egészsége szempontjából.	Inulin FOS tGOS Laktulóz	Az eredeti meghatározás kiterjesztése a teljes gyomor-bél traktusra. Az első alkalom, amikor az "összetétel" változása és a "jólét" szerepeltek	Gibson és mtsai. (2004)

Évszám	Definíció	A prebiotikumnak tekintett összetevők	Változás	Forrás
2007	Szelektíven fermentált összetevők, amelyek lehetővé teszik a gasztrointesztinális mikroflóra összetételében és/vagy aktivitásában bekövetkező egyedi változásokat, amelyek előnyösek a gazdaszervezet jóléte és egészsége szempontjából.	Inulin tGOS	Nem változott a definíciót, de kifejezetten megállapították, hogy csak két étkezési oligoszacharid felel meg a prebiotikus besorolás kritériumainak	Roberfroid (2007)
2008	Életképtelen táplálék-komponens, amely egészségügyi szempontból előnyös a gazdaszervezet számára a mikrobióta összetételének változtatásán keresztül.	Inulin FOS, GOS, SOS, XOS, IMO, laktulóz, pyrodextrinek, élelmi rostok, ellenálló keményítők, más emészthetetlen oligoszacharidok	Kivették szelektivitási kritériumot és a bélrendszerre való korlátozást. Nem követeli meg, hogy a prebiotikum fermentált legyen vagy a bélmikrobióta által metabolizálódjon, ezért nem különbözteti meg azokat a hatóanyagokat, amelyek a bélmikrobióta összetételét csak gátló hatással befolyásolják.	FAO gyűlés (2008)
2010	Étrendi prebiotikum: szelektíven fermentált összetevő, amely a gasztrointesztinális mikrobióta összetételében és/vagy aktivitásában bekövetkező specifikus változásokat eredményez, ezáltal előnyös a gazdaszervezet számára.	Inulin FOS tGOS Laktulóz prebiotikum jelöltek	Étrendi prebiotikumokra vonatkozik, amelyek a gasztrointesztinális traktusra hatnak. Az egészségre összpontosít, a "jólét" kimarad. Ragaszkodik a "szelektív fermentációhoz" a FAO definícióval ellentétben	Gibson és mtsai. (2010) 6. ISAPP találkozó

A prebiotikumok hatásmechanizmusa a következő: megakadályozzák a patogén mikrobák nyálkahártyához való kötődését, valamint táplálóanyagul szolgálnak a normál mikrobiótát alkotó baktériumok számára, ezzel elősegítik a szaporodásukat. A legismertebb prebiotikumok az oligoszacharidok. A leggyakrabban vizsgált prebiotikus oligoszacharidok a frukto-oligoszacharidok (FOS), természetes összetevői bizonyos gabonakultúráknak, hagymáknak (Bailey és mtsai., 1991); valamint az élesztősejtfal hidrolízise során keletkező mannán-oligoszacharidok (MOS).

A frukto-oligoszacharidokat a bifidobaktériumok és a laktobacillusok fermentálhatják (Bouhnik és mtsai., 1994; Gibson és Roberfroid, 1995), amelyeket általában hasznos baktériumokként tartanak számon (Gibson és Wang, 1994). A FOS szerepe a káros baktériumok - például a nekrotikus bélgyulladást okozó *Clostridium perfringens* - növekedésének szabályozásában vagy mennyiségének csökkentésében rejlik (Hofacre és mtsai., 2005).

A mannóz a MOS fő összetevője; egyedülálló tulajdonsága, hogy kötődik az 1-es típusú fimbriával, amelyet sok enterális baktérium használ a gazdasejthez való megtapadásban. Ezáltal a mannóz elősegíti a nemkívánatos baktériumok kolonizáció nélküli áthaladását a bélcsatornán. A MOS egyben immunmoduláló hatású is, MOS-kiegészítés hatására IgA-szint-emelkedést mutattak ki tojótúrákban (Kim és mtsai., 2009), patkányokban (Kudoh és

mtsai., 1999) és kutyákban (Swanson és mtsai., 2002a,b). Az IgA gátolja a baktériumok megtapadását a bélhámsejteken, növeli a nyálka termelését (McKay és Perdue, 1993), és meggátolja a hámszövet-károsodást okozó gyulladást (Russell és mtsai., 1989).

Nyulakban a prebiotikumok segítik a kedvező baktériumok elszaporodását, amelyek kompetitíve gátolhatják a kórokozó mikroorganizmusok szaporodását a vakbélben. Morisse és mtsai., (1992) eredményei alátámasztják a FOS vakbélben kifejtett kedvező hatását. A vakbél tartalomban nőtt a szaprofita *E. coli* populáció és a VFA-termelés, ugyanakkor csökkent az ammónia szintje.

Ami az egyéb prebiotikumokat illeti: a GOS (galakto-oligoszacharid) (Peeters és mtsai., 1992) és a MOS (Mourao és mtsai., 2006) alkalmazása megemelkedett VFA-szinteket eredményezett a vakbél tartalomban. Gidenne vizsgálatai (1995) azonban ellentétes eredményre vezettek, a GOS adagolásának nem volt pozitív hatása a vakbél tartalom VFA-szintjére.

A kisebb polimerizációs fokú fruktánokat hidrolizálhatják a bélcsatornában lévő mikrobák, különösen aktív caecotrophia mellett (Carabano és mtsai., 2001). A MOS nyulaknál ígéretes prebiotikumnak tekinthető, amely sokkal inkább a patogén kolonizáció megelőzésével, mintsem a kedvező mikroorganizmusok serkentésével hat (Kocher, 2006). MOS-al végzett kísérleteik során Fonseca és mtsai. (2004), valamint Mourao

és mtsai. (2006) a prebiotikum működését és hatását az AGP-kel kapott eredményekkel vetették össze. Ami a bélmorfológiai hatását illeti, Mourao és mtsai. (2006) arról számoltak be, hogy a MOS növelte a bélbolyhok hosszát és csökkentette a mikrobák számát.

A prebiotikumokkal végzett kísérletek igen eltérő eredményeket mutatnak, ami Falcao és mtsai. (2007) szerint a kísérleti protokollok különbözőségével (pl. az állatok száma, higiéniai körülmények, a prebiotikum természete, a takarmányhoz hozzáadott prebiotikum mennyisége) magyarázható. A megfelelő prebiotikum-koncentráció problémájának hangsúlyos voltára világítanak rá Murao és mtsai. (2006): ha a kedvező hatás elérése érdekében túl nagy mennyiségben szükséges a bevitel, a magas költségek határt szabnak a gyakorlati alkalmazásnak. Mindezekon túl, nem szabad megfeledkeznünk arról, hogy a nyúltakarmány természetes módon rostban gazdag, amelyek közül néhány önmagában is jelentős mennyiségű oligoszacharidot tartalmaz, ezért a kereskedelmi prebiotikum-készítmények egyik lehetséges alternatívája a nyúl életének minden fázisában a legkívánatosabb oligoszacharidokat tartalmazó takarmány kiválasztása lenne (Falcao és mtsai., 2007).

A **szimbiotikum** a prebiotikum és probiotikum keveréke (Gibson és Roberfroid, 1995), amely additív vagy szinergikus hatást fejt ki. A nem emészthető oligoszacharidok fermentálható prebiotikus szubsztrátként

szolgálnak a probiotikus *Laktobacillusok* és *Bifidobaktériumok* számára. Melyek ezáltal képesek a bél mikrobiális-egyensúlyának helyreállítására, továbbá javítják a gazdaszervezet anyagcsere-folyamatainak hatékonyságát (Mohan és mtsai., 2017).

2.4.5 A spirulina (*Arthrospira platensis*) és a kakukkfű (*Thymus vulgaris* L.), mint természetes takarmány-kiegészítők

A spirulina egy kék-zöld alga, amely gazdag fehérjében, vitaminokban, ásványi anyagokban és karotinoidokban. Táplálék-kiegészítőt több mint 20 éve használnak; magas a B komplex vitamin, a béta-karotin, az E-vitamin, a mangán, a cink, a réz, a vas, a szelén és a gamma-linolénsav tartalma (Belay és mtsai., 1996). Számos tanulmány kimutatta a spirulina hasznos biológiai aktivitását az immunrendszer szabályozása területén; valamint igazolták antioxidáns, rákellenes, antimikrobiális és probiotikus hatásait is (Belay, 2002).

A spirulinával történő takarmány-kiegészítést széles körben tanulmányozták házi nyúlban az elmúlt évtizedben. Ezen kutatások részletes eredményekkel szolgáltak a spirulina teljesítményre és a táplálóanyagok emészthetőségére gyakorolt hatásairól (Peiretti és Meineri, 2008, Dalle Zotte és mtsai., 2013, Gerencsér és mtsai., 2014). Továbbá a húsminőségre és a hús zsírsav-összetételére (Peiretti és Meineri, 2011), a karkassz összetételére-, a

B12-vitamin felszívódására-, a hús reológiai tulajdonságaira és a csontok fejlődésére kifejtett hatásokról (Dalle Zotte és mtsai., 2014 a.), valamint a húszsír-sav-profiljáról és oxidatív státuszáról (Dal Bosco és mtsai., 2014; Dalle Zotte és mtsai., 2014b); szérumbiokémiai, immunválasz és antioxidáns paramétereket illetően (Kovács és mtsai., 2016). Az oxidatív stressz (Kim és mtsai., 2010) és atherosclerosis esetében (Cheong mtsai., 2010), valamint a magas zsírtartalmú diétákban gyakorolt különböző hatásokról (Meineri és mtsai., 2009; Peiretti és Meineri, 2009). Rasmussen és mtsai. (2009) bizonyították, hogy a spirulinával történő takarmány-kiegészítés az egerek bélmikrobióta összetételének megváltozásához vezetett.

A kakukkfűnek antimikrobiális és antioxidáns tulajdonságokat tulajdonítanak (Dorman és Deans, 2000). Placha és mtsai. (2013) szerint 5 g kakukkfű illóolaj / kg szárazanyag takarmány-kiegészítés javíthatja a nyulak bélfal-integritását (sértetlenségét) és antioxidáns hatású lehet. A kakukkfű illóolaj növelte a *Lactobacillus* és csökkentette az *E. coli* számot a japán fűrj ileumában (Khaksar és mtsai., 2012); azonban (egy másik tanulmányban) nem volt hatással a csirkék GIT bakteriális közösségére a 7.-28. napig (Cross és mtsai., 2007). Egy újabb tanulmány szerint kakukkfű levél-por adagolása 14 és 28 napos kor között a tejsavbaktérium-populáció megerősítésével javította a bélmikrobióta összetételét brojlercsirkében (Sadek és mtsai., 2014).

2.5 Mikotoxinok

A mikroszkopikus penészgombák a természetben széleskörűen előforduló (obligát aerob heterotróf) élőlények. Gabonafélékből nyerik a számukra szükséges táplálóanyagokat. A mikotoxinok a mikroszkopikus gombák kedvezőtlen feltételek közötti szaporodása közben termelődő másodlagos anyagcsere-termékei, amelyek főként takarmánnyal - a tápcsatornán keresztül - jutnak be a szervezetbe. A GIT barriert képez a külső-belső környezet között (homeosztázis védelme). A táplálékkal bejutó toxikus anyagok (pl. mikotoxinok) esetében is ez az első védelmi vonal, tehát jelentős toxikus hatásoknak lehet kitéve.

A mikotoxin-termelő penészgombák elszaporodásának mértékét a szubsztrátumok (pl. gabonafélék) érzékenysége, az oxigén jelenléte, az optimális hőmérséklet és nedvességtartalom határozza meg (Jávori és Szigeti, 2011).

Az elsődleges mezőgazdasági termelés (takarmánynövények, növényi eredetű élelmiszerek stb.) előállítása során főként a nagyobb víztartalmat (>20%) igénylő, úgynevezett szántóföldi penészgombák, a tárolás során pedig a kisebb nedvességtartalom (<20%) mellett az úgynevezett raktári penészgombák szaporodnak el. A szántóföldi penészgombák csoportjába tartoznak a *Fusarium* fajok, amelyeknek állat- és humán-egészségügyi szempontból fontosabb toxinjaik a zearalenon (F-2 toxin, ZEA), a

trichotecének - T-2 toxin, HT-2 toxin, nivalenol (NIV), deoxynivalenol (DON), diacetoxyscirpenol (DAS), fusarenon-X (FX) - és a fumonizinek (FB₁ – FB₆). A legjelentősebb raktári penészgombák az *Aspergillus* és a *Penicillium* fajok, amelyek a következő fontosabb toxinokat termelik: aflatoxinok, ochratoxin-A, citrinin, patulin, rubratoxin B, és ergot toxinok.

A szántóföldi penészgombák toxintermelését a természetben lévő gabonafajták/ hibridek fogékonysága (rezisztencia-hiánya) mellett az agrotechnikai hibák, a növényváltás hiánya (monokultúras termesztés), a talajsavanyodás, a növénytáplálási és növényvédelmi hiányosságok is elősegítik. A raktári penészgombák szaporodása és toxintermelése szinte kizárólag tárolástechnikai hibákra utal (Jávori és Szigeti, 2011).

2.5.4 Mikotoxinnal szennyezett takarmány fogyasztása, a T-2 és a fumonizin B₁ káros hatásai házi nyúlban

A házi nyúl takarmány-összetevői különböző eredetű nyersanyagokból származnak. A takarmány-alapanyagok mikotoxinnal való potenciális szennyezettsége jelentős veszélyt jelenthet, ugyanis fogyasztásuk számos állategészségügyi kockázattal jár. A mikotoxikózis lehet akut vagy krónikus, az elfogyasztott (szennyezett) takarmány mennyiségétől függően. A szervek károsodása hosszú távú fogyasztás esetén kumulatív lehet (Mézes és Balogh, 2009).

Deoxynivalenol által okozott gyakori klinikai tünetek a súlyos hasfájó fájdalom és puffadás (Fioramonti és mtsai.,1993). Aflatoxikózis hatására előfordulhat hipotermia és számos eltérés a házinyúl vérparamétereiben, pl. magas karbamid- és kreatinin szint, a kalcium-foszfor-egyensúly zavara, abnormális májenzim-szintek (AST, ALT, GGT) (Sahoo és mtsai.,1993); valamint a xenobiotikum transzformáló rendszer enzimjeinek (citokrómok) fokozott termelődése (Guerre és mtsai., 2000). T-2 toxikózis esetén jelentkezhet alacsony hematokrit- és vörösvértestszint, fekélyek a szájüregben, a gyomorban és a nyelőcsőben; takarmány-elutasítás, fogyás és petefészkek-rendellenességek (Fekete és mtsai., 1992).

A mikotoxinok mérgező hatása a bélrendszerben történő megjelenésen, felszívódáson keresztül valósul meg. Az egészségének károsodása intesztinális (és szisztémás) fertőzésekre hajlamosít, rontja a táplálóanyagok hatékony emésztését és az állatok termelését (Broom, 2015). A caecotrophia (lágymű bélár újra föl vétel) útján a mikotoxinok újra a nyúl gyomrába kerülhetnek, ez magyarázhatja a nyúl (mint faj) nagyobb érzékenységét a mikotoxikózisok iránt (Vetési, 1990).

Az élelmiszerekben és takarmányokban előforduló természetes eredetű trichothecének közül, legmagasabb toxicitása miatt kiemelten vizsgálták a **T-2 mikotoxint** (A-típusú trichothecén), amely citotoxikus hatású másodlagos metabolit, amelyet a *Fusariumok* különböző fajtái termelnek (Li és mtsai.,

2011). A T-2 termelését jelentősen befolyásolhatják a termelő gombák genetikai adottságai, a környezeti feltételek – például a hőmérséklet, páratartalom – és a rendelkezésre álló szubsztrát típusa (Mateo és mtsai., 2002). Egy vizsgálat szerint az Európai Unió területén leggyakrabban a kukorica (41%), a búza (21%) és a zab (21%) esetében mutatták ki szennyezett mintákat (Li és mtsai., 2011).

A T-2 toxin, miután a takarmánnyal/élelmiszerrel a szervezetbe kerül, akut és krónikus toxicitású – apoptózist indukál az immunrendszerben és a magzati szövetekben. A toxin gyakorta metabolizálódik, ami több mint 20-féle metabolitot eredményezhet. Általánosságban elmondható, hogy a T-2 vízben oldódik, és a fő metabolikus utak általában hidrolízis, hidroxilezés, epoxidálás és konjugáció (Dohnal és mtsai., 2008).

A T-2 az egyik legfontosabb akutan mérgező trichothecén; leggyakoribb tünetei hányás, hasmenés, letargia, súlycsökkenés, vérzés, immunszuppresszió, nekrosis, a porcszövetek károsodása, apoptózist és elhullást okozhat (Fairhurst és mtsai., 1987.; Glávits és mtsai., 1989)

A T-2 toxicitása függ az állatfajtól, az életkortól (a növényedék érzékenyebbek), az expozíció módjától és az adagolástól. Az LD₅₀ érték (medián halálos adag) házinyúlban - intramuszkuláris bejuttatás esetén – 1.1 mg/kg testtömeg (Li és mtsai., 2011).

A **fumonizineket** először *Fusarium verticillioides* tenyészetekből izolálták (Gelderblom és mtsai., 1988), elsődleges izoformáik a fumonizin B₁ (FB₁) és B₂ (FB₂). Kimutatták, hogy a fumonizinek biokémiai hatásmechanizmusa a szfingozinéhoz hasonló kémiai szerkezetüknek köszönhető; akadályozzák a szfingolipid bioszintézist, ami a szfingozin N-acetil-transzferáz enzim gátlásával valósul meg a legtöbb állatfajban (házinyúlban is) (Wang és mtsai., 1991). Az FB₁ nefrotoxikusnak és hepatotoxikusnak bizonyult nyulakban (Gumprecht és mtsai., 1995) és kimutatták, hogy káros hatással van a hematopoietikus szervekre (Mariscal-Quintanar és mtsai., 1997). Az FB₁ teratogén hatását igazolták Kovács és mtsai. (2003), 300 mg/nap dózis 14 napon keresztül alkalmazásával.

2.5.5 A mikotoxinok hatása a bélmikrobiótára

A mikotoxinok képesek befolyásolni a GIT számos kulcsfontosságú működését. Hatással lehetnek a táplálóanyag-forgalomra és a bélhám barrier szerepére. Továbbá egyes mikotoxinok megkönnyítik a kórokozók megtelepedését a béltraktusban és fokozzák a bélgyulladás veszélyét (Grenier és Applegate, 2013).

A mikotoxinok metabolizmusa történhet a májban és a GIT-ben egyaránt. Amennyiben a bélrendszerben történik, legyen szó akár bélhámról, vagy a béltraktust benépesítő mikroorganizmusokról, az általában csökkentheti

a mikotoxinok toxikus hatásait. Ez a folyamat tipikusan megfigyelhető a kérődzőknél, melyek számos mikotoxint képesek átalakítani nem toxikus metabolitokká. Monogasztrikus állatok esetében a mikotoxinok bélben történő biotranszformációja elsősorban a vastagbélben zajlik, így a felszívódást megelőző detoxifikáció mértéke igen csekély (Grenier és Applegate, 2013).

A kórokozók bejutásának legfőbb felülete a GIT, ugyanakkor pl. a baromfifélék vakcinázása is leggyakrabban ezen keresztül történik. A kórokozók bejutása, illetve az antigén beoltása előidézzi a bél immunrendszerének aktiválódását, ami immunsejtek proliferációját eredményezi. A mikotoxinok fő „célpontjai” az aktívan osztódó sejtek, tehát a mikotoxinnal szennyezett takarmányt fogyasztó állatok fogékonyabbak lehetnek az enterális fertőzésekre (Grenier és Applegate, 2013).

Tenk és mtsai. (1982) beszámoltak arról, hogy a T-2 növelte a bélben az aerob bélbaktériumok számát sertésben. A DON kis dózisú krónikus expozíciója sertésekben szintén növelte az aerob bélbaktériumok mennyiségét (Waché és mtsai., 2009). Devriendt és mtsai. (2009) FB₁-gyel kezelt sertésekben a GIT patogén baktériumokra való nagyobb érzékenységet mutatták ki, a megfigyelés *Salmonellára* nem volt igaz.

Két külön tanulmányban is elemezték az FB₁ (5-15 mg/kg dózisok) hatását 6-10 napig az *Escherichia coli* patogén törzsek (ETEC, Enterotoxigenic *E. coli* és ExPEC, Extraintesztinális patogén *E. coli*) bélben

történő kolonizációjára, valamint a fellépő nyálkahártya-válaszreakciókat. Devriendt és mtsai. (2009) elhúzódó fertőzöttségről számoltak be, amely összhangban volt az Oswald és mtsai. (2003) által megfigyelt nagyfokú kolonizációval.

Ouethrani és mtsai. (2013) kimutatták, hogy az ochratoxin-A (OTA) jelentősen csökkentette az ecetsav és a vajsav koncentrációját humán vastagbél dinamikus szimulációs modelljükben. Ez azt jelzi, hogy az OTA képes befolyásolni a vastagbél-mikrobióta összetételét és / vagy metabolikus aktivitását. Az eredményük alátámasztására Ouethrani és mtsai. (2013) kiiktatták a (konstans mikrobióta-alkotó) *Lactobacillus reuteri* törzset a leszálló vastagbél mikrobiótából. A bakteriocint termelő *L. reuteri* kulcsfontosságú szerepet tölthet be a GIT-ben, mivel kimutatták, hogy pozitív hatással van az immunválaszra, illetve a bél rendellenességeivel és fertőzéseivel szembeni védekezésre (Broom, 2015).

Az előzőekben bemutatott eredményekből látható, hogy a bélrendszert benépesítő mikrobacejtek érzékenyek a mikotoxin-fertőzésre. A mikotoxinok befolyásolhatják a bél-mikrobióta összetételét és / vagy fermentációs termékeit, ezáltal pedig az állat egészségi állapotát és növekedését (Broom, 2015). Mindenképpen szükséges tehát a különböző mikotoxinok – dózis és adagolási idő függő – hatásának monitorozására, különös tekintettel a gazdasági haszonállatok bélmikrobiótájában bekövetkező változásokra.

2. A disszertáció célkitűzései

A kísérletek során a következő kérdésekre kerestem választ:

1. Hatásosan alkalmazható-e az antibiotikumok preventív célú, illetve hozamfokozó felhasználásának alternatívájaként a spirulina (*Arthrospira platensis*) és a kakukkfű (*Thymus vulgaris L.*), milyen hatásuk van ezeknek a természetes takarmány-kiegészítőknek a vakbél-mikrobiótára növendéknyulakban?
2. Preventív hatást biztosítanak-e a takarmány-kiegészítőként használt probiotikum (*Bacillus cereus var. Toyoi* spórák) és prebiotikum (mannán-oligoszacharid) az eubiosis elősegítésével, hosszantartó toxikus expozíció esetén nyúlban?
3. Hogyan hatnak a T-2-, és a fumonizin B1-mikotoxinok a nyúlvakbél-mikrobióta összetételére és működésére *in vivo*, illetve *in vitro*?

3. Anyag és módszer

A doktori munkám során végzett kísérletek megegyező körülményeinek és módszereinek leírásait egy általános részben mutatom be. Az egyes kísérletek sajátosságait külön alfejezetekben taglalom.

3.1 Kísérleti állat, tartási körülmények, takarmányozás

A vizsgálatokat a Kaposvári Egyetemen tenyésztett (Pannon Fehér) nyulakkal végeztük. A kísérleti állatok 3 hetes kortól *ad libitum* fogyasztottak kereskedelmi forgalomban kapható (hízó) tápot, súlyszelepes önitatókból tetszés szerint ihattak. A választás után (5 hetesen) a nyulakat dróthálóból készült ketrecekben helyeztük el (0,61×0,32 m, 3 nyúl/ketrec). A hőmérséklet 15-18 °C volt, a napi világítás pedig 16 óra.

A kísérleti állatok 3 hetes kortól 170-176 g/kg nyersfehérje- és 10,14 MJ/kg emészthető energiatartalmú (DE), gyógyszeres kiegészítés nélküli (még kokcidiosztatikumot sem tartalmazó) kontrolltakarmányt fogyasztottak, amely 10% keményítőt, 5% oldható rostot, 22,6% savdetergens rostot tartalmazott.

3.2 Kísérleti elrendezések

3.2.1 A spirulina- és/vagy a kakukkfű-kiegészítés hatásának vizsgálata a vakbél mikrobiális közösségére

A kísérleti takarmányok kiegészítőinek, összetevőinek és tápanyagtartalmának kémiai összetételét az 2. és 3. táblázat foglalja össze.

2. Táblázat: A spirulina (*Arthrospira platensis*) és a kakukkfű (*Thymus vulgaris*) kémiai összetétele (g/kg)

Kémiai összetétel	<i>Arthrospira platensis</i>	<i>Thymus vulgaris</i>
Száranyag	945	890
Nyersfehérje	658	52,3
Nyerszsír	8,6	31,9
Nyersrost	nm ¹	182
Hamu	65,1	65,9
Keményítő	35,6	58,4
Neutrális Detergens Rost (NDF)	2,4	298
Savdetergens Rost (ADF)	4,8	210
Savdetergens Lignin (ADL)	0,6	68,1
Ca	2,2	13,6
P	9,2	0,7
Ca/P	0,2	18,7
Emészthető energia (DE), MJ/kg	10,19	10,19

¹ nem meghatározott

3. Táblázat: Kísérleti takarmányok összetevői és kémiai összetétele (g/kg)

Összetevők	Takarmányok			
	Kontroll	Spirulina	Kakukkfű	Spirulina+Kakukkfű
Spirulina	-	50	-	50
Thyme	-	-	30	30
Szójabab 46%	130	55	140	60
Szárított lucerna	400	397	370	397
Árpa	247	262	237	262
Búzaszalma	120	110	120	90
Szárított	40	40	40	40
Zsír por (40%)	35	35	35	35
Monokalcium-	3	3	3	3
Só (NaCl)	5	5	5	5
DL-Metionin	1	1	1	1
L-lizin HCL	4	6	4	6
Vitamin-Ásványi	5	5	5	5
Zeolit	10	30	10	15
Kémiai összetétel				
Szárazanyag	896	898	898	896
Nyersfehérje	176	170	175	172
Nyerszsír	25	26	27	28
Nyersrost	160	162	157	158
Keményítő	163	181	170	178
Hamu	86	75	84	77
Neutrális Detergens	323	316	314	301
Savdetergens Rost	212	205	208	195
Savdetergens Lignin	53	45	53	46
Emészthető energia	10,14	10,19	10,19	10,11

¹Premix 1 kilogramm takarmányra vonatkoztatva: A-vitamin-3.6 mg; D3-vitamin-25 µg; E-vitamin acetát-50 mg; K3-vitamin-2 mg; biotin-0.1 mg; tiamin-2 mg; riboflavin-4 mg; B6-vitamin-2 mg; B12 vitamin-0.1 mg; niacin-40 mg; pantoténsav-12 mg; folsav-1mg; kolin-klorid-300 mg; Fe-100 mg; Cu-20 mg; Mg-50 mg; Co-2 mg; I-1 mg; Zn-100 mg; Se-0.1 mg.

A választott nyulakat véletlenszerűen négy csoportba osztottuk (n = 42):

C: kontroll takarmány

S: kontroll takarmány + 5% spirulina (*Arthrospira platensis*)

T: kontroll takarmány + 3% kakukkfű (*Thymus vulgaris* L.)

ST: kontroll takarmány + 5% spirulina + 3% kakukkfű

A takarmány-kiegészítés a kezelt csoportokban 5-11 hetes korban, Olaszországban kereskedelmi forgalomban kapható spirulinával és/vagy kakukkfűvel történt. A kezelés során, a 49., 63., és 77. napos korban (1, 2, 3 mintavételi pontok); véletlenszerűen kiválasztott 6 egészséges állat (1 állat/ketrec) került levágásra minden csoportból, 14:00 órakor. Az emésztőrendszer azonnali eltávolítását követően elkülönítettük a vakbelet. A friss vakbél tartalom tömegének mérése után a mintát -80°C-on tároltuk a feldolgozásig. A minták előkészítése (a bakteriális DNS tartalom tiszta formában való kinyerése) után a teljes baktériumtartalom, a *Bacteroides*, *Clostridium leptum* és *Clostridium coccooides* csoportok mennyiségét kvantitatív valós idejű PCR-el (qPCR) határoztuk meg, MxPro 3000P qPCR készülékkel (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornia).

A kutatási protokollt az Állategészségügyi Hivatal vizsgálta és az Agrár Közigazgatási Hatóság hagyta jóvá (23.1 / 02322/006/2008 számú jegyzőkönyv).

3.2.2 A T-2-mikotoxin bélmikrobiótára gyakorolt hatásának vizsgálata, a pro- és prebiotikum esetleges védő hatásának kimutatása

A nagytestű (n = 180), szopós nyulakat véletlenszerűen a következő csoportokba osztottuk:

K:	kontroll takarmány
Pro:	kontroll takarmány + probiotikum
Pre:	kontroll takarmány + prebiotikum
Propre:	kontroll takarmány + pro- és prebiotikum

A kísérleti tápokot a nyulak az anyjuk alatt elkezdték fogyasztani, az első szilárd takarmány felvétel megkezdésével. Ezt a tápot fogyasztották 11 hetes korukig. Probiotikumként 0,2% (2×10^5 /g) *Bacillus cereus* var. *toyoi* (Toyocerin, Asahi Vet. S.A., Barcelona, Spain) spórákat, prebiotikumként pedig 2% mannán-oligoszacharidot (MOS) (Bio-Mos, Alltech Hungary, Budapest) alkalmaztunk.

A választás 35 napos korban történt. Választáskor (1. mintavétel) és 10 hetes korban (2. mintavétel) 6-6 állat/csoport került vizsgálatra (összesen 24-24 állat). A 8.-10. hét között a négy csoportból (K, Pro, Pre, Propre) 6-6 nyulat 2 mg/tak.kg T-2-vel kiegészített tápon tartottunk.

A mikotoxinos csoportok:

K_M	kontroll takarmány + T-2
Pro_M	kontroll takarmány + probiotikum +T-2
Pre_M	kontroll takarmány + prebiotikum + T-2
Propre_M	kontroll takarmány + pro- és prebiotikum + T-2

A mikotoxinos csoportok is vágásra és vizsgálatra kerültek (6 állat/csoport, összesen 24 állat) 3 hetes toxin-kiegészítést követően, azaz 11 hetes korban.

A T-2 toxint kísérleti úton állítottuk elő a *Fusarium sporotrichioides* NRRL 3299 törzs felhasználásával kukoricaacsírán, Fodor és mtsai. (2006) szerint. A gombatenyészetet a kísérleti állatok alaptakarmányába kevertük, így a szennyezett takarmányok 2 mg/kg takarmány T-2 toxin tartalmúak voltak. A kontroll- és a kísérleti takarmányok mikotoxin koncentrációját LC-MS-el (Shimadzu, Kyoto, Japan) határoztuk meg. A T-2 kimutatási határértéke (LOD) 10 ng/kg volt. A kontroll takarmány nem tartalmazott detektálható mennyiségű T-2-t, és egyik takarmány sem tartalmazott detektálható mennyiségű deoxinivalenolt és zearalenont.

A mintavételek során az emésztőrendszer azonnali eltávolítását követően elkülönítettük a vakbelet. A friss vakbél tartalom tömegének mérése után a mintát -80 °C-on tároltuk a feldolgozásig. A minták előkészítése (a

bakteriális DNS tartalom tiszta formában való kinyerése) után az egyes baktériumcsoportok mennyiségét qPCR-rel határoztuk meg, MxPro 3000P qPCR készülékkel (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornia).

A kutatási protokollt az Állategészségügyi Hivatal vizsgálta és az Agrár Közigazgatási Hatóság hagyta jóvá (SOI/31/254-3/2013 számú jegyzőkönyv).

3.2.3 A fumonizin B₁-mikotoxin- és/vagy mannán-oligoszacharid- kiegészítés hatásának *in vitro* vizsgálata a nyúlvakbél-mikrobióta összetételére

Módszerünk alapját a Fodor és mtsai. (2007) által a fumonizin B₁ mikrobiális metabolizmusának meghatározása során alkalmazott eljárás adta.

A vakbéltartalom 42 napos korban frissen leölt állatoktól (n=3) származott, amelyeket megelőzőleg De Blas és Mateos (2010) ajánlásai szerint takarmányoztak. A vakbéltartalmát homogenizáltuk, majd egy-egy kémcsőben 3.33 g béltartalmat (szárazanyag: kb. 30%) preinkubált (24h/37° C/anaerob körülmények) McDougall (pH 8,3) pufferben (9,8 g NaHCO₃, 9,3 g Na₂HPO₄ × 12H₂O, 0,57 g KCl, 0,47 g NaCl, 0,12 g MgSO₄ × 7H₂O, 0,04 g CaCl₂ and 1000 ml desztillált víz; pH 8.3) szuszpendáltunk (10%-os szuszpenzió). Egy újabb 4 órás preinkubációs (37 °C/anaerob körülmények) periódust követően minden kémcső tartalmához hozzáadtuk a vizsgált anyagokat, a kísérleti összeállításban az alábbi csoportokat kialakítva:

- (1) kontroll (vakbéltartalom + McDougall puffer)
- (2) toxin kezelés (vakbéltartalom + McDougall puffer + FB₁)
- (3) MOS kezelés (vakbéltartalom + McDougall puffer + MOS)
- (4) kombinált kezelés (vakbéltartalom + McDougall puffer + FB₁ + MOS).

A FB₁ (F1147; Sigma Aldrich, Germany) (2-es és 4-es csoport) dózisa 0,05 mg/3,33g vakbél tartalom, míg a MOS (Alltech Hungary Kft. Budapest, Hungary) (3-as és 4-es csoport) 10 mg/3,33g vakbél tartalom volt. Homogenizálást követően a kémcsöveket ismét anaerob inkubátorba helyeztük. Inkubálás előtt (1. mintavétel, abszolút kontroll), majd 12, 24 és 36 óra inkubációs idő elteltével (2., 3. és 4. mintavétel) 1,5 g (n = 4) keveréket steril Eppendorf csövekbe helyeztünk, majd fagyasztottuk és -80° C-on tároltuk a DNS extrakcióig.

A minták előkészítése (a bakteriális DNS tartalom tiszta formában való kinyerése) után a teljes baktériumtartalom, az *E. coli*, valamint a *Bacteroides* csoport mennyiségét qPCR-rel határoztuk meg, MxPro 3000P qPCR készülékkel (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornia).

3.3 Quantitative PCR

A vakbél tartalomból vett minták előkészítése (a bakteriális DNS tartalom tiszta formában való kinyerése) után a teljes baktériumtartalom, illetve a különféle phylumokhoz tartozó baktériumok (Firmicutes; Bacteroidetes; Actinobacteria), illetve az *E. coli* (Proteobacteria) mennyiségét qPCR-rel határoztuk meg.

A szakirodalom áttekintése, módszertani, elméleti tájékozódás után következett a kiválasztott primerek *in silico* ellenőrzése, PCR primerek optimalizálása, lehetőség szerinti uniformizálása (részletekért lásd 3.3.1. bekezdést).

A következő lépés minden kísérlet esetében a baktériumonkénti target szekvencia felszaporítása volt a Kaposvári Egyetem Molekuláris biológia laboratóriumában található MxPro 3000P qPCR készülékkel (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornia).

Az amplifikált PCR-termékek plazmidban való klónozása külső megrendeléssel (Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet) valósult meg. A plazmid oldatok koncentráció-meghatározása után, az oldatokból hígítási sort készítettem. A PCR-termékeket ismert koncentrációban tartalmazó plazmidok hígítási sorából nyert kalibrációs egyenesekből számoltam ki a minta baktériumterhelését. A PCR termék akkumulálódását SYBR[®] Green festékkel követtük nyomon, amelyet a PCR Master Mix (Brilliant II SYBR[®] QPCR Low Rox Master Mix; Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornia) tartalmazott. A SYBR[®] Green festék interkalálódó molekula, amely a dupla szálú (ds) DNS-hez kötődik. Fluoreszcenciája kb. 2000-szer magasabb kettős szálú DNS-hez kötötten, mint szabadon. Gerjesztési maximuma 494 nm, emisszós maximuma 521 nm, melynek intenzitása a PCR folyamán szaporodó dsDNS mennyiségével arányosan növekszik. A Real-Time PCR-ben a SYBR[®] Green

fluoreszcenciájának detekciója minden ciklusban a lánchosszabbítási lépés végén történik.

A technikai triplikátumok alkalmazása módszertani követelmény minden minta esetében. A mintánkénti koncentrációk kiszámítása után az értékek normalizálása következett az adott minta összes baktériumtartalmára. Ezt követően a kísérletből nyert adatok statisztikai értékelésére került sor.

A mennyiségi meghatározást egyrészt a qPCR valós időben mérhető jelintenzitás növekedése, másrészt a PCR-termékek korábban plazmidba vitt, ismert koncentrációjú hígítási sora tette lehetővé. A mennyiségeket kifejezhetjük kiindulási kópiaszámban, koncentrációban vagy CFU értékre való átszámítással. A minták összehasonlítására a teljes baktérium mennyiségre normalizált értékeket is használhatunk. A qPCR specifikusságát a használt primerek biztosították.

3.3.1 A bakteriális DNS kivonása, amplifikációja

A teljes DNS tartalom kivonása 200 mg vakbél-tartalomról történt; a tisztítást QIAamp® DNA Stool Mini Kit (QIAGEN, Duesseldorf, Németország) felhasználásával, a gyártó utasításai szerint végeztük. A DNS koncentrációt Smart Spec Plus Spektrofotométeren (BioRad, Berkeley, Kalifornia) mért A260/280 arányból számítottuk; majd az összes minta esetében 60 ng/μl-re állítottuk be. A következő lépésként a vizsgálni kívánt baktériumokra jellemző target szekvencia felszaporítása történt Stratagene

MxPro 3000P qPCR készülékkel (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornia). A primerek (4. táblázat) és a vizsgált bakteriális csoportok kiválasztása az emésztésélettani vagy gasztrointesztinális betegségekben játszott szerepük alapján történt; releváns források felhasználásával (Mariat és mtsai., 2009; Angelakis és Raoult, 2010; Xu és mtsai., 2011), amelyekben a kísérleteimben alkalmazottal megegyező technikai háttér és módszereket használtak a mikrobióta monitorozására, különböző állatfajokban.

4. táblázat: Oligonukleotid szekvenciák (primer párok)

Vizsgált baktériumcsoport	Oligonukleotid szekvenciák (5'–3')	Ta (°C) ¹	Irodalom
Össz. Baktérium (Ba)			
Forward (27F_a)	AGA GTT TGA TYM TGG	60	Fierer és mtsai. (2008)
Reverse (338R_a)	GCT GCC TCC CGT AGG		
<i>Clostridium coccooides</i> (Cc)			
Forward (Cc1)	GAC GCC GCG TGA AGG A	60	Firmesse és mtsai. (2008)
Reverse (Cc2)	AGC CCC AGC CTT TCA		
<i>Clostridium leptum</i> (Cl)			
Forward (Cl8)	CCT TCC GTG CCG SAG	60	Firmesse és mtsai. (2008)
Reverse (Cl9)	GAA TTA AAC CAC ATA		
<i>Bacteroides</i> (Bs)			
Forward (Bs1)	CCT WCG ATG GAT AGG	60	Firmesse és mtsai. (2008)
Reverse (Bs2)	CAC GCT ACT TGG CTG		
<i>E.coli</i> (E)			
Forward (E.coli F)	CAT GCC GCG TGT ATG	60	Furet és mtsai. (2009)
Reverse (E.coli R)	CGG GTA ACG TCA ATG		
<i>Bifidobacterium</i> (Bi)			
Forward (F_Bifid)	CGG GTG AGT AAT GCG	60	Furet és mtsai. (2009)
Reverse (R_Bifid)	TGA TAG GAC GCG ACC		

¹Ta – annealing/kapcsolódási hőmérséklet.

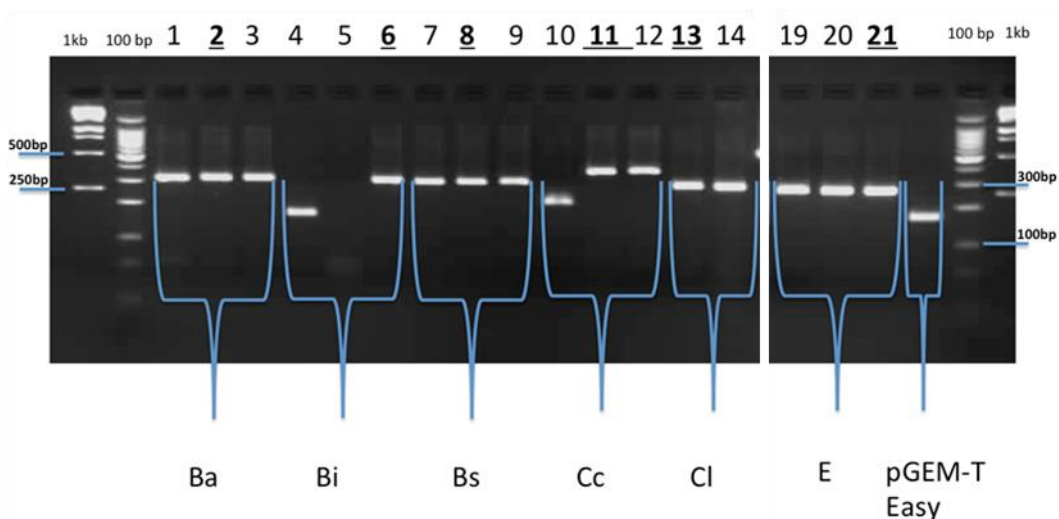
3.3.2 A PCR fragmentek plazmidba építése

A PCR fragmentek plazmidba építése külső megrendeléssel (MTA Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet, Budapest) készült. A specifikus primer párok felhasználásával amplifikált PCR fragmentek agaróz gélen történő futtatása után (1,5% w/v agaróz, 1x Trisz/Borát/EDTA, 8 V/cm) a specifikus PCR-termékek (inszertek, fragmentek) kivágása és izolálása (Gel /PCR DNA Fragment Extraction Kit, Geneaid) megtörtént. Az izolálás után az inszert DNS koncentrációjának meghatározása (5. táblázat) következett, NanoDrop (Thermo Scientific, Wilmington, USA) spektrofotométerrel. A DNS fragmentek pGEM-T Easy vektorba (Promega, Mariland, USA) kerültek beépítésre. A ligálási reakciók a gyártó utasításai szerint történtek. A ligátumot *E. coli* DH5a kompetens sejtekbe transzformálták (Hanahan, 1983). A transzformáns kolóniák szelektálása ampicillin és X-gal tartalmú LB táptalajon (LB Agar, Fluka, Buchs, Switzerland) történt. A kék-fehér szelekció után a világoskék, illetve fehér kolóniákat egy új lemezre oltották át, majd az újra kinőtt kolóniák közül kolónia PCR-al (T7 és SP6 primerek felhasználásával), illetve gél elektroforézissel különítették el az üres és rekombináns plazmidokat (4. ábra). A rekombináns plazmidokat tartalmazó kolóniákat egy telepről indítva leoltották, majd a plazmidot izolálták a felnőtt sejtekből (Plasmid Mini Kit, Geneaid, New Taipei City, Taiwan). A tisztított rekombináns plazmidokról génspecifikus, illetve T7 és SP6 primerek (plazmidspecifikus

primerek) felhasználásával ellenőrző PCR-t végeztek. Ezt követően a rekombináns plazmidot tartalmazó *E. coli* DH5a kolóniákat nagy térfogatú folyékony komplett tápfolyadékban (LB Broth, Fluka, ampicillin (100 microgram/ml) felnövesztették és nagy mennyiségű, magas tisztaságú plazmidot izoláltak (Qiagen Plasmid Midi Kit) a gyártó utasításai szerint. A kapott tisztasági és mennyiségi értékeket a 6. táblázat tartalmazza. A tisztított termékből ellenőrző PCR-t végeztek a specifikus primerek és a pGem T Easy plazmidspecifikus primereinek (T7 és SP6) felhasználásával.

5. táblázat: A gélből izolált DNS fragmentek koncentrációja.

Fragment	használt primerpár	ng/μl
Ba	27F_a-338R_a	191,2
Bi	F_Bifid 09c - R_Bifid 06	154,0
Bs	Bs1-Bs2	171,6
Cc	Cc1-Cc2	222,6
Cl	Cl8-Cl9	190,8
E	E.coli F- E.coli R	176,2



4. ábra. Kolónia PCR elektroforetikus mintázata az alul jelölt primerpárokkal. A kép két oldalán molekulalétrák találhatóak. A fent aláhúzott és megvastagított sorszámú kolóniákat használtuk fel további szaporításra. A pGEM-T Easy jellemzői az 1. sz. mellékletben láthatóak

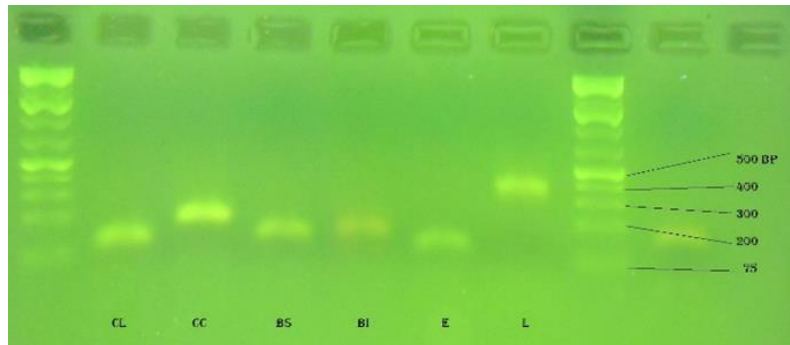
6. táblázat Az előállított rekombináns plazmidok tisztasági és mennyiségi adatai

Minta ID	fragment ID	ng/μl	A260	A280	260/280	260/230	Mennyiség (μg)
1	Ba	1679,09	33,582	17,586	1,91	2,34	171,27
2	Bi	772,78	15,456	8,153	1,9	2,26	78,82
3	Bs	1041,95	20,839	10,971	1,9	2,23	106,28
4	Cc	1226,08	24,522	12,939	1,9	2,22	125,06
5	Cl	1247,46	24,949	13,037	1,91	2,31	127,24
6	E	1415,18	28,304	14,783	1,91	2,32	144,35

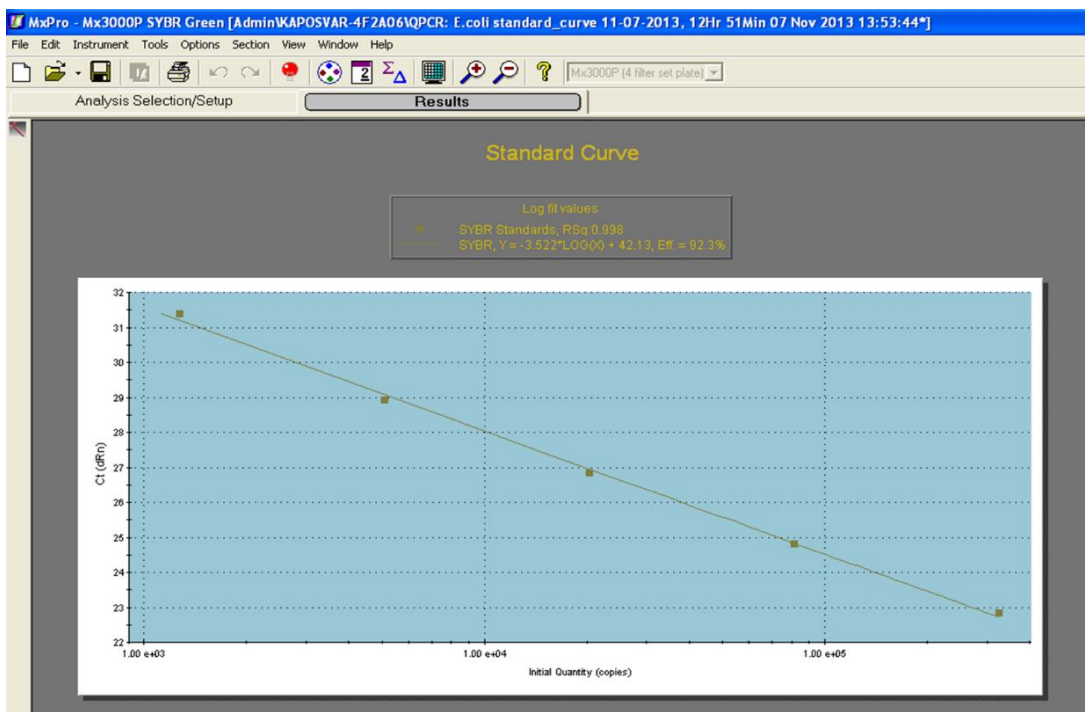
3.3.3 Kalibrációs görbék felvétele mennyiségi meghatározáshoz

Az amplifikált PCR-termékek (5. ábra) klónozása és plazmidba építése után, az ismert koncentrációjú plazmid oldatból készített hígítási sor

amplifikálása adja meg a kópiaszám meghatározásához szükséges standard egyenest (6. ábra)



5. ábra. Targetspecifikus primerpárokkal amplifikált termékek agaróz gélen futtatva, UV megvilágításban.



6. ábra. Kalibrációs egyenes baktérium kópiaszám mennyiségi meghatározásához

3.3.4 Az egyes baktériumcsoportok mennyiségi meghatározása a kísérleti mintákból

A mintaelőkészítés után (bakteriális DNS kivonása), a baktériumok (összes baktériumtartalom és kiválasztott törzsek) mennyiségének meghatározása qPCR-rel történt. A qPCR kivitelezése során minden PCR cső 25 µl reakcióelegyet tartalmazott: 12,5 µl Brilliant II SYBR® qPCR Low Rox Master Mix (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornia), 0,2 µM mindkét primerből (3. táblázat), 10,5 µl steril desztillált víz és 1 µl DNS extraktum (60 ng/µl). PCR program: 10 perc 95 °C (denaturálás); 30 másodperc 95 °C, 1 perc 60 °C – 40 cikluson keresztül. A lánchosszabbítási plató (72 °C) a PCR-termék rövidege, illetve a kapcsolódás/annealing 60 °C hőmérsékleten is bekövetkező láncnövekedés miatt kimaradt.

Az amplifikált PCR-termékek klónozását követően, a klónozott termékből hígítási sort készítettünk (6. ábra); ennek segítségével történt a minták kiindulási kópiaszámának (baktériumtartalmának) kiszámítása. Az így kapott kópiaszámokat vonatkoztattuk 1 gramm vakbél tartalom mennyiségére.

3.4 Statisztikai analízis

Az eredmények statisztikai elemzését SPSS (20. verzió) programcsomaggal végeztem. A többtenyezős varianciaanalízisben (GLM – General Linear Model) a takarmányozási csoportok (diéta), valamint a vizsgálati időpontok voltak a faktorok és a baktérium kópiaszámok a függő változók.

A GLM képlete:

$$y_{ij} = \mu + \text{mintavételi pont}_i + \text{diéta}_j + \text{mintavételi pont}_i \times \text{diéta}_j + e_{ij}$$

ahol y a vizsgált baktériumcsoport kópiaszáma (pl. *Bacteroides*), μ fő átlag, a **mintavételi pont** a vakbél-tartalom-vétel (boncolás) időpontja (pl. 1, 2, 3). A takarmányozási csoportok/**diéta** a különböző takarmány-kiegészítőkre utalnak (pl. C, S, T, ST) és e a maradék hiba. A gyakorisági eloszlások szignifikancia vizsgálatát LSD post hoc teszttel végeztem.

4. Eredmények és értékelésük

4.1 A spirulina- és/vagy a kakukkfű-kiegészítés hatása a vakbél mikrobiális közösségére

Eredményeim szerint, a vizsgált csoportok kópiaszám adatai a következők:

- teljes baktériumtartalom	$2,75 \times 10^{12}$ - $2,24 \times 10^{13}$
- <i>C. leptum</i>	$5,25 \times 10^{11}$ - $1,82 \times 10^{12}$
- <i>Bacteroides</i>	$5,89 \times 10^{10}$ - $1,10 \times 10^{12}$.
- <i>C. coccooides</i>	$2,5 \times 10^{10}$ - $6,91 \times 10^{11}$

A *Clostridium leptum* szerepelt a legnagyobb mennyiségben a teljes baktériumtartalomhoz viszonyítva, ezt követte a *Bacteroides* nemzetség, majd a *Clostridium coccooides*. A vizsgált baktériumcsoportok mennyiségi adatai a 7-10. táblázatokban láthatóak, takarmány-kiegészítés és mintavételi idő szerint.

A spirulina (5%) takarmány-kiegészítés (S) 49 és 63 napos korban szignifikánsan magasabb teljes baktériumtartalmat eredményezett (7. táblázat) – a kontroll csoporthoz (C) viszonyítva -, azonban a 3. mintavétel során (77 életnap), a vágási kor idején nem találtam jelentős kezeléshatást. A kombinált kezelés (ST) és a kakukkfű önmagában (T) nem befolyásolta a teljes baktériumtartalmat.

7. táblázat. A nyúl vakbél teljes baktériumtartalmának¹ mennyiségi változása mintavételi idő és takarmány-kiegészítés szerint (n=72)

Takarmány- kiegészítés ²	Mintavételi idő			RSD	P-érték (mintavételi idő)
	1 (49. életnap)	2 (63. életnap)	3 (77.életnap)		
C	13,2 ± 0,3 ^{a,A}	13,3 ± 0,4 ^{a,B}	13,6 ± 0,2 ^B	0,252	0,008
S	14,1 ± 0,4 ^{b,A}	14,4 ± 0,5 ^{b,B}	13,5 ± 0,7 ^A	0,277	0,001
T	12,4 ± 1,2 ^{a,A}	13,0 ± 0,3 ^{a,A}	13,8 ± 0,5 ^B	0,453	0,000
ST	13,1 ± 0,7 ^{a,A}	13,3 ± 0,8 ^{a,B}	13,3 ± 0,5 ^B	0,437	0,000
RSD	0,660	0,573	0,095		
P-érték	0,000	0,000	0,177		

¹ 1 gramm vakbél tartalom mintában mért kópiaszám átlagok log₁₀ értéke és ezek szórása (± SEM)

² Rövidítések – kontroll (C), spirulina (S), kakukkfű/thyme (T), spirulina és kakukkfű/thyme (ST)

^{a,b,c} Ugyanazon mintavételi időn belül (oszlop) a kezelések közti szignifikáns eltérések jelölése P<0,05

^{A,B,C} Kezelésen belül (sorok), a mintavételi idők közötti szignifikáns eltérések P<0,05

A *Bacteroides* mennyisége (8. táblázat) a spirulinával kezelt csoportban (S) ideiglenes emelkedést mutatott, a 63. napos korban szignifikánsan nagyobb volt, mint a kontroll (C) csoportban. A kakukkfűvel történő kezelés (T) az első mintavétel idején kevesebb, a harmadik mintavétel idején több *Bacteroides* számot eredményezett, mint a kontroll csoportban. A kombinált kezelés (ST) hatására a kísérlet végén magasabb volt a *Bacteroides*-mennyiség, mint a C és S csoportokban.

8. táblázat. A nyúl vakbél *Bacteroides*¹ tartalmának mennyiségi változása mintavételi idő és takarmány-kiegészítés szerint (n=72)

Takarmány- kiegészítés ²	Mintavételi idő			RSD	P-érték (mintavételi idő)
	1 (49. életnap)	2 (63. életnap)	3 (77. életnap)		
C	11,2 ± 0,3 ^{a,c}	11,3 ± 0,5 ^{a,B}	11,7 ± 0,3 ^{a,B}	0,185	0,035
S	11,6 ± 0,3 ^{a,A}	12,0 ± 0,2 ^{b,B}	11,7 ± 0,2 ^{a,A}	0,364	0,000
T	10,8 ± 0,1 ^{b,A}	11,1 ± 0,6 ^{a,A}	12,0 ± 0,3 ^{b,B}	0,511	0,000
ST	11,2 ± 0,2 ^{c,A}	11,4 ± 0,2 ^{a,A}	12,0 ± 0,6 ^{c,B}	0,634	0,000
RSD	0,371	0,476	0,401		
P-érték	0,000	0,000	0,000		

¹ 1 gramm vakbél-tartalom mintában mért kópiaszám átlagok log₁₀ értéke és ezek szórása (± SEM)

² Rövidítések – kontroll (C), spirulina (S), kakukkfű/thyme (T), spirulina és kakukkfű/thyme (ST)

^{a,b,c} Ugyanazon mintavételi időn belül (oszlop) a kezelések közti szignifikáns eltérések jelölése P<0,05

^{A,B,C} Kezelésen belül (sorok), a mintavételi idők közötti szignifikáns eltérések P<0,05

A kakukkfű önmagában (T) és spirulinával kombinálva (ST) is csökkentette a *Firmicutesek* (*Clostridium leptum* és *Clostridium coccoides*) mennyiségét a 49. és a 63. napokon a kontrollhoz (C) képest (9-10. táblázat). Míg a spirulinával történő kiegészítés (S) 63 és 77 napos korban fejtette ki antimikrobiális hatását. A teljes kísérlet során kevesebb (átlagosan 14 %-kal) *C. coccoides* volt jelen a vakbél-tartalomban, mint *C. leptum*.

9. táblázat. A nyúl vakbél *Clostridium leptum*¹ tartalmának mennyiségi változása mintavételi idő és takarmány-kiegészítés szerint (n=72)

Takarmány- kiegészítés ²	Mintavételi idő			RSD	P-érték (mintavételi idő)
	1 (49. életnap)	2 (63. életnap)	3 (77. életnap)		
C	12,1 ± 0,3 ^a	12,1 ± 0,3 ^a	12,1 ± 0,3 ^a	0,010	0,845
S	12,1 ± 0,2 ^{a,A}	11,9 ± 0,3 ^{b,B}	11,8 ± 0,2 ^{b,A}	0,296	0,001
T	11,7 ± 0,2 ^{b,A}	11,7 ± 0,2 ^{b,A}	12,3 ± 0,2 ^{a,B}	0,605	0,000
ST	11,7 ± 0,2 ^{b,A}	11,8 ± 0,1 ^{b,A}	12,2 ± 0,2 ^{a,B}	0,509	0,000
RSD	0,371	0,267	0,344		
P-érték	0,000	0,003	0,000		

¹ 1 gramm vakbél tartalom mintában mért kópiaszám átlagok log₁₀ értéke és ezek szórása (± SEM)

² Rövidítések – kontroll (C), spirulina (S), kakukkfű/thyme (T), spirulina és kakukkfű/thyme (ST)

^{a,b,c} Ugyanazon mintavételi időn belül (oszlop) a kezelések közti szignifikáns eltérések jelölése P<0,05

^{A,B,C} Kezelésen belül (sorok), a mintavételi idők közötti szignifikáns eltérések P<0,05

10. táblázat. A nyúl vakbél *Clostridium coccooides*¹ tartalmának mennyiségi változása mintavételi idő és takarmány-kiegészítés szerint (n=72)

Takarmány- kiegészítés ²	Mintavételi idő			RSD	P-érték (mintavételi idő)
	1 (49. életnap)	2 (63. életnap)	3 (77. életnap)		
C	11,3 ± 0,3 ^{a,A}	11,5 ± 0,4 ^{a,A}	11,8 ± 0,4 ^{a,B}	0,258	0,007
S	11,3 ± 0,3 ^{a,A}	10,7 ± 0,4 ^{b,B}	10,5 ± 0,2 ^{b,B}	0,593	0,000
T	10,4 ± 0,2 ^{b,A}	10,6 ± 0,3 ^{b,A}	11,1 ± 0,2 ^{b,B}	0,507	0,000
ST	10,4 ± 0,2 ^{b,A}	10,6 ± 0,1 ^{b,A}	11,0 ± 0,2 ^{b,B}	0,555	0,000
RSD	0,544	0,437	0,507		
P-érték	0,000	0,000	0,000		

¹ 1 gramm vakbél tartalom mintában mért kópiaszám átlagok log₁₀ értéke és ezek szórása (± SEM)

² Rövidítések – kontroll (C), spirulina (S), kakukkfű/thyme (T), spirulina és kakukkfű/thyme (ST)

^{a,b,c} Ugyanazon mintavételi időn belül (oszlop) a kezelések közti szignifikáns eltérések jelölése P<0,05

^{A,B,C} Kezelésen belül (sorok), a mintavételi idők közötti szignifikáns eltérések P<0,05

Az idő előrehaladtával a vakbél teljes baktériumtartalma kissé megnövekedett (C, T és ST), vagy nem változott (S) a kísérlet során. Megfigyelhető a *Bacteroidesek* és a *Firmicutesek* kópiaszámának kor (azaz mintavételi pont) szerinti növekedése, kivéve az S csoportot, amelyben változatlanul maradt, illetve a 63. napon csökkent.

A 11. táblázatban a vizsgált baktériumcsoportok arányát mutatom be az összes baktériumtartalomhoz viszonyítva. A vizsgált baktériumok mennyisége a teljes baktériumtartalom 0,6-13,4%-át tette ki, a legmagasabb (1-7,4%) a kontrollban, míg a spirulina csoportban a legalacsonyabb (0,02-1,33%) arányban volt jelen. Az idő előrehaladtával (életkor) a *Clostridium leptum* aránya szignifikánsan, 7,42-ről 2,84%-ra csökkent a kontrollcsoportban, valamint a kakukkfű és a spirulina kombinált alkalmazása esetén. A kakukkfű-kiegészítés hatására a *C. leptum* és a *C. coccoides* aránya is csökkent.

11. táblázat. A vizsgált baktériumcsoportok aránya az összes baktériumtartalomhoz viszonyítva, százalékában kifejezve, a kezelés és a mintavételi idő vonatkozásában (n=288)

Takarmány- kiegészítés ¹	Mintavételi idő			RSD	P-érték (mintavételi idő)
	1 (49. életnap)	2 (63. életnap)	3 (77. életnap)		
<i>Bacteroides</i>					
C	1,54 ± 0,8	0,96 ± 0,4	1,23 ± 0,3	0,057	0,368
S	0,21 ± 0,1	0,27 ± 0,1	0,72 ± 0,4	0,030	0,647
T	1,11 ± 0,4 ^a	1,69 ± 1,1 ^b	2,80 ± 0,5 ^c	0,441	0,000
ST	2,82 ± 0,8	3,60 ± 1,7	4,26 ± 1,7	0,214	0,210
<i>Clostridium leptum</i>					
C	7,42 ± 3,0 ^a	4,95 ± 1,0 ^{a,b}	2,84 ± 0,9 ^b	0,215	0,004
S	0,73 ± 0,2	0,33 ± 0,3	1,33 ± 0,8	0,079	0,305
T	7,66 ± 1,1 ^a	6,58 ± 1,8 ^b	5,50 ± 1,3 ^c	0,466	0,000
ST	10,02 ± 3,4 ^a	8,14 ± 1,8 ^{a,b}	5,40 ± 1,2 ^b	0,263	0,050
<i>Clostridium coccooides</i>					
C	1,09 ± 0,3	1,42 ± 0,6	1,11 ± 0,5	0,036	0,536
S	0,15 ± 0,1	0,02 ± 0,0	0,06 ± 0,0	0,039	0,559
T	0,46 ± 0,1 ^a	0,51 ± 0,1 ^{a,b}	0,34 ± 0,1 ^b	0,181	0,014
ST	0,51 ± 0,2	0,56 ± 0,1	0,29 ± 0,0	0,162	0,317

¹ Rövidítések jelentése – kontroll (C), spirulina (S), kakukkfű/thyme (T), spirulina és kakukkfű/ thyme (ST)

^{a,b,c} Ugyanazon takarmánykiegészítővel történő kezelésen belül (sor) a mintavételi alkalmak közti szignifikáns eltérések jelölése P<0,05

5.1.1. Eredmények értékelése

Az idő előrehaladtával a vakbélben található baktériumok száma növekedett a kontroll csoportban, valamint a kakukkfű és kombinált kezelés esetén is, spirulina takarmány-kiegészítés mellett pedig - néhol ideiglenes emelkedés után - minden esetben csökkenést tapasztaltam.

Nyúl vakbél-vastagbél szakaszán a bakteriális közösség mennyisége Michelland és mtsai. (2011) szerint $12,1 \pm 0,05 \log_{10}$ kópia/ g vakbél-tartalom volt a 49-88 napos korban. Kísérletemben ennél magasabb baktériumtartalmat mutattam ki, $13,2 \pm 0,3 - 13,6 \pm 0,2 \log_{10}$ kópia/ g vakbél-tartalom (49. nap és 77. nap).

Combes és mtsai. (2011) a nyúl vakbél-mikrobióta fejlődését tanulmányozták 16S rRNS gén alapú molekuláris biológiai vizsgálati módszerrel; az identifikációt kapilláris elektroforézis egyszálú konformációs polimorfizmus (CE-SSCP) és qPCR kombinációjával valósították meg. Eredményeik szerint a teljes baktériumszám a kor előrehaladtával növekedett, a *Bacteroides-Prevotella* kópiaszám a 14.-től a 21. napig emelkedett, míg 35-70 napos korban csökkent. A *Firmicutes*ek a születést követő második héten jelentek meg, majd jelenlétük stabilizálódott, a kópiaszámuk a 14. és 70. nap között nem változott. A teljes baktérium mennyiség és a *Bacteroides* csoport mennyisége az eredményeimhez képest kisebb volt; ez a különbség adódhat a különböző nyúl hibridek használatából, a takarmányozás és tartás eltéréseiből,

illetve a PCR-hez használt különböző oligonukleotid szekvenciákból, eltérő hatékonyságú minta-előkészítésből.

A vakbél-mikrobióta összetétele fiatal nyulakban nagymértékben változó egészen 49 napos korig, azonban 70 napos korukra egészen homogén lesz (Combes és mtsai., 2011). Ez alapján 49 napos kor után a takarmány-kiegészítés alkalmazásával kevésbé avatkozhatunk be a mikrobióta összetételébe, mennyiségébe. Kísérletem eredményeiből azonban megállapítható, hogy a spirulina és / vagy a kakukkfű takarmány kiegészítők alkalmazása jelentős hatással volt a vizsgált baktériumok kópiaszámára a 49. és a 77. napok közti intervallumban is. Ugyanakkor a teljes baktériumszámra gyakorolt hatásuk csak ideiglenes volt (lásd a spirulina-kiegészítést a 63. napon), és a 77. napon nem mutatott eltérést a kontrollhoz viszonyítva. Időbeni változást is észleltem, a 77. napon magasabb volt az összes baktérium kópiaszám, mint a 49. napon, az S csoport kivételével.

A spirulina kevésbé ismert, mint pro- vagy prebiotikus takarmány-kiegészítő. Rasmussen és mtsai. (2009) kísérletükben 5%-os *Spirulina platensis*-kiegészítést alkalmaztak, amely módosította az egér bélmikrobióta összetételét, de a mikrobiális közösség körülbelül 70% -a megegyezett az kontroll állatokéval.

Kísérleteim során a spirulinával történő takarmány-kiegészítés magasabb *Bacteroides*-kópiaszámot eredményezett a 63. napon, azonban a

*Firmicutes*ek száma 63 és 77 napos korban szignifikánsan alacsonyabb értéket mutatott. A kísérletben szereplő baktériumcsoportok arányának vizsgálata során - a teljes baktériumtartalomhoz belül -, arra a következtetésre jutottam, hogy a spirulina, mint takarmány kiegészítő a *Bacteroides*, a *C. leptum* és a *C. coccooides* baktériumok összes baktériumtartalomhoz viszonyított arányát az idő előrehaladtával növelte, míg a másik három kezelés általam nem vizsgált baktériumcsoportok aránynövekedéséhez vezetett.

A kakukkfű antimikrobiális hatása a *Firmicutes*ek kópiaszámára csak átmeneti, a 63. napon volt érvényes. Másrészt a kakukkfű, a *C. leptum* és a *C. coccooides*, összes baktérium mennyiséghez viszonyított arányát 77 napos korra szignifikánsan csökkentette. Az eredményeim tehát összhangban állnak a korábbi adatokkal, amelyek szerint a kakukkfű (a benne lévő illó olajok révén) antimikrobiális hatást fejt ki.

Dorman és Deans (2000) kimutatták, hogy az általuk vizsgált illó olajok között a *Thymus vulgaris* olaj (timol) rendelkezik a legszélesebb antibakteriális spektrummal. A timol fenolos szerkezetű, erőteljes gátló hatást fejtett ki a Gram-pozitív baktériumok ellen, beleértve a *Clostridium*okat is.

Összességében elmondható, hogy a már elválasztott, 35 és 77 napos kor közötti nyulak esetében a spirulina és kakukkfű, külön-külön vagy kombinálva, mint takarmány-kiegészítők hatással voltak a vakbél-mikrobióta összetételére. Hatásuk kiterjedt az összes baktérium mennyiségre, a

Bacteroides, a *C. leptum* és a *C. coccoides* csoportok kópiaszámára, valamint az említett baktériumok arányára a teljes bakteriális közösséghez viszonyítva. A spirulina takarmány-kiegészítés ideiglenesen megnövelte a teljes baktériumtartalmat és a *Bacteroides*ek mennyiségét, miközben kisebb *Clostridium* kópiaszámot eredményezett. A kakukkfű a *Clostridium*okon kifejtett antimikrobiális hatását csak 63 napos korig gyakorolta.

5.2. A T-2-mikotoxin bélmikrobiótára gyakorolt hatása, pro- és prebiotikum esetleges védő hatásának kimutatása

A probiotikumként alkalmazott *Bacillus cereus var. toyoi* spórák a *Bacteroides* (13. táblázat) és *E. coli* (17. táblázat) baktériumok mennyiségét szignifikánsan növelték, a teljes baktériumtartalom csökkent (12. táblázat), a többi vizsgált baktériumcsoport mennyisége nem változott jelentősen.

A mannánoligoszacharid (MOS) mint prebiotikum hatására a *Clostridium leptum* és a *Bifidobaktérium*-kópiaszámok a második mintavételi időpontban szignifikánsan magasabb értéket mutattak (15. és 16. táblázat) a kontrollcsoporthoz viszonyítva; ezen baktériumcsoportok esetén igazolódott a kedvező prebiotikus hatás.

A prebiotikumként alkalmazott mannán-oligoszacharid (MOS) és a probiotikumként alkalmazott *Bacillus cereus var. toyoi* spórák együttes fogyasztása esetén nem észleltem jelentős, tartós változást az egyes baktériumcsoportok mennyiségét illetően.

A takarmányba kevert T-2 mikotoxin a vakbél tartalom *E. coli* mennyiségét szignifikánsan, 86,4 %-kal csökkentette (17. táblázat). A teljes baktérium mennyiségre (12. táblázat), illetve a *Bacteroides*, *Clostridium coccooides*, *Clostridium leptum* és a *Bifidobaktérium* csoportok mennyiségére (13.,14.,15.,16. táblázat) nem volt szignifikáns hatással.

A **csak mikotoxinnal** (mesterségesen) szennyezett tápot fogyasztó csoporthoz viszonyítva, szignifikánsan magasabb volt a teljes baktériummennyiség a **toxin mellett prebiotikummal, illetve pre- és probiotikummal** kiegészített takarmányt fogyasztókban (12. táblázat).

12. táblázat. A nyúl vakbél teljes baktériumtartalmának¹ mennyiségi változása mintavételi idő és takarmány-kiegészítés szerint (n=72)

Takarmány- kiegészítés ²	Mintavételi idő		RSD	P-érték (mintavételi idő)
	1	2		
K	12,9 ± 0,2 ^{a,A}	12,3 ± 0,4 ^{b,B}	0,771	0,000
Pro	12,2 ± 0,2 ^{b,A}	12,0 ± 0,1 ^{a,B}	0,447	0,009
Pre	12,7 ± 0,1 ^{c,A}	12,5 ± 0,3 ^{b,B}	0,465	0,015
ProPre	12,7 ± 0,1 ^{c,A}	12,3 ± 0,3 ^{b,B}	0,706	0,001
K_M		12,0 ± 0,1 ^b		
Pro_M		12,2 ± 0,1 ^b		
Pre_M		12,5 ± 0,3 ^{a,b}		
ProPre_M		12,5 ± 0,4 ^c		
RSD	0,705	0,615		
P-érték (diet)	0,000	0,000		

¹ 1 gramm vakbél tartalom mintában mért kópiaszám átlagok log₁₀ értéke és ezek szórása (± SEM)

² Rövidítések – kontroll (K), probiotikum (Pro), Prebiotikum (Pre), Pro- és Prebiotikum (ProPre), mikotoxinnal kiegészített (_M)

^{a,b,c} Ugyanazon mintavételi időn belül (oszlop) a kezelések közti szignifikáns eltérések jelölése P<0,05

^{A,B,C} Kezelésen belül (sorok), a mintavételi idők közötti szignifikáns eltérések P<0,05

13. táblázat. A nyúl vakbél *Bacteroides*¹ tartalmának mennyiségi változása mintavételi idő és takarmány-kiegészítés szerint (n=72)

Takarmány- kiegészítés ²	Mintavételi idő		RSD	P-érték (mintavételi)
	1	2		
K	9,9 ± 0,1 ^{a,A}	9,7 ± 0,0 ^{a,B}	0,902	0,000
Pro	10,2 ± 0,2 ^b	10,1 ± 0,5 ^b	0,000	0,955
Pre	10,1 ± 0,1 ^a	9,8 ± 0,2 ^a	0,167	0,186
ProPre	10,1 ± 0,2 ^{a,b,A}	9,8 ± 0,1 ^{a,B}	0,516	0,009
K_M		9,5 ± 0,1 ^a		
Pro_M		9,6 ± 0,0 ^a		
Pre_M		9,9 ± 0,2 ^a		
ProPre_M		9,6 ± 0,3 ^a		
RSD	0,520	0,369		
P-érték (diet)	0,001	0,014		

¹ 1 gramm vakbél-tartalom mintában mért kópiaszám átlagok log₁₀ értéke és ezek szórása (± SEM)

² Rövidítések – kontroll (K), probiotikum (Pro), Prebiotikum (Pre), Pro- és Prebiotikum (ProPre), mikotoxinnal kiegészített (_M)

^{a,b,c} Ugyanazon mintavételi időn belül (oszlop) a kezelések közti szignifikáns eltérések jelölése P<0,05
^{A,B,C} Kezelésen belül (sorok), a mintavételi idők közötti szignifikáns eltérések P<0,05

14. táblázat. A nyúl vakbél *Clostridium coccooides*¹ tartalmána mennyiségi változása mintavételi idő és takarmány-kiegészítés szerint (n=72)

Takarmány- kiegészítés ²	Mintavételi idő		RSD	P-érték (mintavételi)
	1	2		
K	9,8 ± 0,1 ^{a,A}	9,1 ± 0,1 ^{a,B}	0,911	0,000
Pro	9,5 ± 0,1 ^{b,A}	9,1 ± 0,3 ^{a,B}	0,419	0,012
Pre	9,4 ± 0,2 ^b	9,2 ± 0,3 ^{a,c}	0,055	0,462
ProPre	9,3 ± 0,2 ^b	9,2 ± 0,2 ^{b,c}	0,062	0,563
K_M		9,2 ± 0,1 ^{a,c}		
Pro_M		9,2 ± 0,2 ^{b,c}		
Pre_M		9,2 ± 0,2 ^a		
ProPre_M		9,2 ± 0,1 ^a		
RSD	0,638	0,191		
P-érték (diet)	0,000	0,320		

¹ 1 gramm vakbél tartalom mintában mért kópiaszám átlagok log 10 értéke és ezek szórása (± SEM)

² Rövidítések – kontroll (K), probiotikum (Pro), Prebiotikum (Pre), Pro- és Prebiotikum (ProPre), mikotoxinnal kiegészített (_M)

^{a,b,c} Ugyanazon mintavételi időn belül (oszlop) a kezelések közti szignifikáns eltérések jelölése P<0,05

^{A,B,C} Kezelésen belül (sorok), a mintavételi idők közötti szignifikáns eltérések P<0,05

15. táblázat. A nyúl vakbél *Clostridium leptum*¹ tartalmának mennyiségi változása mintavételi idő és takarmány-kiegészítés szerint (=72)

Takarmány- kiegészítés ²	Mintavételi idő		RSD	P-érték (mintavételi idő)
	1	2		
K	10,5 ± 0,1 ^A	10,2 ± 0,1 ^{c,B}	0,574	0,004
Pro	10,5 ± 0,2 ^a	10,2 ± 0,3 ^b	0,168	0,146
Pre	10,4 ± 0,2 ^b	10,4 ± 0,0 ^b	0,113	0,286
ProPre	10,5 ± 0,2 ^{a,A}	10,2 ± 0,0 ^{b,B}	0,807	0,000
K_M		10,5 ± 0,2 ^a		
Pro_M		10,3 ± 0,1 ^b		
Pre_M		10,4 ± 0,0 ^b		
ProPre_M		10,2 ± 0,2 ^d		
RSD	0,231	0,789		
P-érték (diet)	0,117	0,000		

¹ 1 gramm vakbél tartalom mintában mért kópiaszám átlagok log₁₀ értéke és ezek szórása (± SEM)

² Rövidítések – kontroll (K), probiotikum (Pro), Prebiotikum (Pre), Pro- és Prebiotikum (ProPre), mikotoxinnal kiegészített (_M)

^{a,b,c} Ugyanazon mintavételi időn belül (oszlop) a kezelések közti szignifikáns eltérések jelölése P<0,05

^{A,B,C} Kezelésen belül (sorok), a mintavételi idők közötti szignifikáns eltérések P<0,05

16. táblázat. A nyúl vakbél Bifidobacterium¹ tartalmának mennyiségi változása mintavételi idő és takarmány-kiegészítés szerint (n=72)

Takarmány- kiegészítés ²	Mintavételi idő		RSD	P-érték (mintavételi idő)
	1	2		
K	9,5 ± 0,3 ^{a,A}	9,1 ± 0,3 ^{b,B}	0,322	0,040
Pro	9,2 ± 0,2 ^b	9,2 ± 0,1 ^b	0,083	0,944
Pre	9,0 ± 0,1 ^{b,A}	9,6 ± 0,3 ^{a,B}	0,396	0,017
ProPre	9,1 ± 0,2 ^b	9,1 ± 0,4 ^b	0,019	0,394
K_M		9,0 ± 0,2 ^b		
Pro_M		9,1 ± 0,1 ^b		
Pre_M		9,2 ± 0,0 ^b		
ProPre_M		9,3 ± 0,0 ^b		
RSD	0,520	0,518		
P-érték (diet)	0,001	0,000		

¹ 1 gramm vakbél-tartalom mintában mért kópiaszám átlagok log₁₀ értéke és ezek szórása (± SEM)

² Rövidítések – kontroll (K), probiotikum (Pro), Prebiotikum (Pre), Pro- és Prebiotikum (ProPre), mikotoxinnal kiegészített (_M)

^{a,b,c} Ugyanazon mintavételi időn belül (oszlop) a kezelések közti szignifikáns eltérések jelölése P<0,05

^{A,B,C} Kezelésen belül (sorok), a mintavételi idők közötti szignifikáns eltérések P<0,05

17. táblázat. A nyúl vakbél *E.coli*¹ tartalmának mennyiségi változása mintavételi idő és takarmány-kiegészítés szerint (n=72)

Takarmány- kiegészítés ²	Mintavételi idő		RSD	P-érték (mintavételi)
	1	2		
K	5,9 ± 0,4 ^{a,A}	7,3 ± 0,4 ^{b,B}	0,508	0,014
Pro	6,8 ± 0,4 ^{b,A}	8,4 ± 0,4 ^{a,B}	0,594	0,001
Pre	6,5 ± 0,4 ^{a,b,A}	6,9 ± 0,2 ^{b,B}	0,396	0,017
ProPre	6,8 ± 0,3 ^{a,b,A}	6,0 ± 0,3 ^{b,B}	0,376	0,020
K_M		6,5 ± 0,4 ^b		
Pro_M		6,8 ± 0,5 ^b		
Pre_M		6,2 ± 0,2 ^b		
ProPre_M		7,1 ± 0,3 ^b		
RSD	0,268	0,692		
P-érték (diet)	0,072	0,000		

¹ 1 gramm vakbél-tartalom mintában mért kópiaszám átlagok log₁₀ értéke és ezek szórása (± SEM)

² Rövidítések – kontroll (K), probiotikum (Pro), Prebiotikum (Pre), Pro- és Prebiotikum (ProPre), mikotoxinnal kiegészített (_M)

^{a,b,c} Ugyanazon mintavételi időn belül (oszlop) a kezelések közti szignifikáns eltérések jelölése P<0,05

^{A,B,C} Kezelésen belül (sorok), a mintavételi idők közötti szignifikáns eltérések P<0,05

Az **időbeni változásokat** szintén a 12.-17. táblázatokban figyelhetjük meg. A kontrollcsoportban csökkent a teljes baktériumtartalom, a *Bacteroidesek*, a *Firmicutesek* és a *Bifidobaktériumok* mennyisége, míg az *E. coli* kópiaszám az idő előrehaladtával nőtt. A probiotikumot fogyasztó csoportban a teljes baktériumtartalom és a *Clostridium coccides* kópiaszám csökkent, míg az *E. coli* mennyiség növekedett az idő előrehaladtával. A MOS-kiegészítést kapó csoportban az idő előrehaladtával szignifikánsan csökkent a teljes baktériumtartalom, viszont a *Bifidobaktériumok* és az *E. coli* mennyisége nőtt.

5.2.1. Eredmények értékelése

Saint-Cyr és mtsai. (2013) orálisan beadott Fusarium toxin (DON) hatását vizsgálták emberben a bélmikrobióta alkotókra; széklet mintából domináns és szubdomináns bakteriális csoportok valós idejű PCR-mennyiségi meghatározásával. Az orális DON expozíció során a *Bacteroides/Prevotella* csoportban a beadást követő első 3 hét során jelentős, 0,5 log₁₀ növekedést figyeltek meg. Az *Escherichia coli* mennyiségében jelentős csökkenést (0,9 log₁₀ CFU / g) figyeltek meg.

Kísérletemben azonos molekuláris genetikai módszerrel vizsgáltam a T-2 expozíció bélmikrobiótára gyakorolt hatását, amely szintén az *Escherichia coli* mennyiségének jelentős mértékű (0,8 log₁₀ kópiaszám/g) csökkenéséhez vezetett. Az említett tanulmányban kimutatták, hogy a DON orális expozíció jelentős hatással van a bélmikrobióta összetételére. Ezen kutatás adatait - a Fusarium toxinok egy más képviselőjének vizsgálatával – kiegészítve; eredményeim alapján elmondható, hogy a T-2 mikotoxin szájon át (takarmánnyal/élelmiszerrel) bejutva jelentősen befolyásolja a bélmikrobióta összetételét.

A probiotikumként alkalmazott *Bacillus cereus* var. *toyoi* spórák a *Bacteroides* és *E. coli* baktériumok mennyiségét szignifikánsan növelték; az öszbaktérium tartalom pedig szignifikáns csökkent, tehát molekuláris genetikai vizsgálatokon alapuló eredményeimmel alátámasztom a korábban

már – más állatfajokban, illetve nyúlban hagyományos tenyésztési eljárással - megállapított következtetést (Scharlek és mtsai., 2007; Bónai és mtsai., 2008; Gisbert és mtsai., 2013), hogy takarmányhoz adagolva képes változtatni a bélmikrobióta összetételét.

5.3. A fumonizin B₁-mikotoxin- és/vagy mannán-oligoszacharid-kiegészítés hatása a nyúlvakbél-mikrobióta összetételére in vitro

A **FB₁** alkalmazása az összes mintavételi pontnál kisebb összesbaktérium mennyiséget eredményezett, a kontrollmintákhoz képest. A 12 órás inkubáció 66,5%-os összesbaktérium-tartalom csökkenést eredményezett. A mikotoxin hozzáadása 80%-kal kisebb *E. coli* mennyiségét eredményezett a kontrollcsoporthoz viszonyítva 12 órás inkubáció után, 36 óra elteltével a különbség nem volt szignifikáns. A 36 órás inkubáció után, más kezelésekhez képest a **MOS** kezelés eredményezte a legmagasabb baktériumszámot (18. táblázat).

A *Bacteroides*ek mennyiségének növekedése 36 óra elteltével lassabb volt, mint a kontrollmintákban; de a kombinált kezelés esetén ez fokozottan mutatkozott. Az *E. colit* mennyiségét minden kezelés (MOS és **FB₁** önmagában, illetve kombinációban), 12 és 24 órás inkubáció után egyaránt visszaszorította, de a különbség a kísérlet végén (36 órás inkubáció után) nem volt szignifikáns.

A MOS kezeléshez, illetve a kontrollcsoporthoz hasonlítva a **MOS és az **FB₁** kombinált** alkalmazása során az összes baktériumtartalom kevesebb volt, azonban ez a kezelés eredményezte a legmagasabb *Bacteroides* mennyiséget. *E. coli* esetében az együttes hatás hasonló kópiaszámot eredményezett, mint a MOS és az **FB₁** kezelés önmagukban.

Az inkubációs idő hatása

A kontrollcsoportban csökkent az teljes baktériumtartalom és a *Bacteroides*ek mennyisége, míg az *E. coli* kópiaszám az idő előrehaladtával nőtt.

A MOS kezelés az idő előrehaladtával fenntartotta a teljes baktériumtartalom növekedését, ezzel szemben toxinnal történő és a kombinált kezelés esetében csökkent.

Az FB₁ hatására gyorsabban és erőteljesebben csökkent a baktériumok száma, mint amikor a MOS + FB₁ kezelést alkalmaztam.

18. táblázat. Kezelés és időhatás a vizsgált bakteriális csoportok kópiaszám változása alapján

Mintavételi idő	Kópiaszámok ¹			
	1. mintavétel	2. mintavétel	3. mintavétel	4. mintavétel
(Inkubációs idő, óra)	(0)	(12)	(24)	(36)
Össz.				
Baktérium				
Kontroll	13,35±0,1 ^A	13,52±0,1 ^{aA}	13,36±0,1 ^{aB}	13,24±0,1 ^{aC}
FB ₁	13,35±0,1 ^A	12,90±0,1 ^{bB}	13,01±0,1 ^{bC}	12,90±0,1 ^{cB}
MOS	13,35±0,1 ^A	13,45±0,1 ^{aB}	13,50±0,1 ^{aB}	13,51±0,1 ^{bB}
FB ₁ +MOS	13,35±0,1 ^A	13,16±0,1 ^{bB}	13,12±0,1 ^{bB}	13,08±0,1 ^{cB}
<i>Bacteroides</i>				
Kontroll	11,27±0,0 ^A	11,27±0,1 ^{aA,B}	11,26±0,1 ^{aB}	11,18±0,1 ^{aB,C}
FB ₁	11,27±0,0	11,33±0,3 ^a	11,42±0,2 ^a	11,44±0,2 ^b
MOS	11,27±0,0	11,35±0,2 ^a	11,46±0,0 ^a	11,39±0,2 ^b
FB ₁ +MOS	11,27±0,0 ^A	11,65±0,1 ^{bB}	11,67±0,1 ^{bB}	11,68±0,1 ^{cB}
<i>E. coli</i>				
Kontroll	9,15±0,1 ^A	11,12±1,0 ^{aB}	11,20±0,5 ^{aA,B}	11,44±0,4 ^{aB}
FB ₁	9,15±0,1 ^A	8,81±0,1 ^{bA,C}	9,72±0,6 ^{bB}	10,04±0,2 ^{aC}
MOS	9,15±0,1 ^A	9,33±0,1 ^{bA,B}	9,39±0,1 ^{bA,B}	9,47±0,2 ^{aB}
FB ₁ +MOS	9,15±0,1 ^A	9,65±0,1 ^{bA}	10,76±0,2 ^{a,bB}	10,98±0,1 ^{aC}

¹ 1 gramm inkubációs mixben mért kópiaszám átlagok log₁₀ értéke és ezek szórása (± SEM)
a,b,c Ugyanazon mintavételi időn belül (oszlop) a kezelések közti szignifikáns eltérések jelölése
P<0,05

^{A,B,C} Kezelésen belül (sorok), a mintavételi idők közötti szignifikáns eltérések P<0,05

5.3.1. Eredmények értékelése

Ebben a kísérletemben, a teljes baktérium-, a *Bacteroides* és az *E. coli* mennyiségét a korábbiakkal megegyezően bakteriális célszekvencia-specifikus qPCR-el vizsgáltam. Eredményeimet összehasonlítva Combes és mtsai. (2011) tanulmányával, a következő különbségek állapíthatók meg: a teljes baktériumtartalom és a *Bacteroides*ek kezdeti mennyisége magasabb volt az inkubációs keverékben (háromszorosára hígított vakbél-tartalom), mint Combes és mtsai. (2011) vizsgálata során teljes vakbél-tartalomból kimutatott baktérium mennyiségek. Az összes baktériummennyiség a 35. életnapon kópiaszámban kifejezve $13,35 \pm 0,1 \log_{10}$ volt 1g inkubációs keverékben; ezzel szemben Combes és mtsai. (2011) $11,35 \pm 0,15 \log_{10}$ kópiaszámot állapított meg 1g hígítatlan vakbél-tartalomban. A *Bacteroides*ek mennyisége a 35. életnapon $11,27 \pm 0,0 \log_{10}$ példány volt 1g inkubációs keverékben, szemben a $10,58 \pm 0,15 \log_{10}$ kópiaszám értékkel 1g teljes vakbél-tartalomból, amelyet a Combes és mtsai. (2011) állapított meg.

A mikotoxinok esetében lehetséges bizonyos mértékű mikrobiális metabolizáció a béltraktusban, de - más mechanizmusokon keresztül – akár befolyásolhatják a mikrobióta összetételét is. Egyes toxinok mikrobaellenes hatást fejthetnek ki (Grenier és Applegate, 2013). A mikotoxinok nemcsak a közösségi struktúrát, hanem a bélmikrobióta alkotók funkcionális gén összetételét is befolyásolhatják (Guo és mtsai., 2014). Azonban csupán néhány

vizsgálatot végeztek ezidáig, a szájon át bejutó mikotoxin expozíció mikrobiális közösségre gyakorolt hatásának megismerésére.

A FB₁ bakteriális növekedésre gyakorolt hatásával kapcsolatos első tanulmányt 1997-ben publikálták (Becker és mtsai., 1997). A humán bélmikrobiótát tipikusan reprezentáló baktériumokat inkubálták *in vitro* 50-1000 µM FB₁ jelenlétében. A bakteriális növekedés gátlása nem volt megfigyelhető, ami arra engedett következtetni, hogy az FB₁ nem toxikus a vizsgált baktériumok számára. Antonissen és mtsai. (2015) *in vitro* vizsgálata szintén nem mutatta ki a FB₁ gátló hatását a bakteriális növekedésre nézve (különböző koncentrációkban); nem találtak különbséget a mikrobióta összetételében a kontrol- illetve a toxinnal szennyezett takarmányt fogyasztó csirkék között.

Vizsgálatomban az FB₁ kisebb össz-baktérium- és *E. coli* mennyiséget eredményezett, de a kísérlet végén (utolsó mintavétel) több *Bacteroides* volt a kontroll kezeléshez képest. Ezen eredményeim összhangban vannak Saint-Cyr és mtsai. (2013) eredményeivel, akik az orális DON expozíció hatását vizsgálták az emberi bélmikrobiótán. A szájon át történő DON expozíció után jelentős növekedés volt tapasztalható a *Bacteroides* / *Prevotella* csoportban, miközben csökkent az *E. coli* koncentráció.

A kísérletemben sikeresen demonstráltam a mannán-oligoszacharid (MOS) kedvező élettani hatását az össz-baktériumszám és a *Bacteroides*ek

számának szignifikáns növekedésével, ezt alátámasztotta az *E. coli* baktériumok számának csökkenése is a kontrollcsoporthoz képest. Ezen eredményeim összhangban állnak Spring és munkatársai (2000) által csirkével végzett in vivo vizsgálat eredményeivel és Oso és mtsai. (2013) által nyulakon végzett kísérlet eredményeivel is. A MOS jellemző tulajdonsága, hogy képes kötődni az 1-es típusú fimbriákat expresszáló patogén baktériumokhoz, például az *E. coli*hoz, ezáltal a MOS növelheti a korán elválasztott nyulak rezisztenciáját az emésztési megbetegedésekkel szemben.

Kombinált alkalmazás esetén a MOS korlátozza a FB_1 negatív hatását a teljes baktériumtartalomra nézve (a különbség nem szignifikáns, de figyelemre méltó $p = 0,058$).

A teljes baktériumtartalom és a *Bacteroides*ek mennyiségének csökkenése az inkubációs idő előrehaladtával, a szubsztrát kimerülésével magyarázható. A baktériumok növekedési üteme közvetlenül arányos a rendelkezésre álló tápanyag mennyiségével (Monod, 1949). A nem hasznos *E. coli* baktériumok kópiaszáma az inkubációs idővel párhuzamosan nőtt, ami magyarázható a baktériumcsoportot jellemző nagyon rövid generációs idővel, valamint a más baktériumcsoportok mennyiségének csökkenése kedvező lehet számukra. Ez esetben a forrás-kompetíciós modell (resource ratio competition model) lép érvénybe, amely szerint a fogyasztható tápanyagok elérhetősége és

aránya meghatározza a különböző bakteriális fajok arányát a bakteriális közösségen belül (Hibbing és mtsai., 2010).

6. Következtetések, javaslatok

6.1. A spirulina- és/vagy a kakukkfű-kiegészítés hatása a vakbél mikrobiális közösségére

A kísérletemben alkalmazott módszer - Quantitative Real-time PCR és SYBR® Green – alkalmazásával azonos életkorban magasabb teljes baktériumtartalmat mutattam ki, mint a Michelland és mtsai. (2011) által alkalmazott eljárás - ABI Prism 7900HT sequence detection system with TaqMan® universal PCR master mix.

A kísérletben szereplő baktériumcsoportok arányának vizsgálata során - a teljes baktériumtartalomon belül -, arra a következtetésre jutottam, hogy a spirulina, mint takarmány kiegészítő a *Bacteroides*, a *C. leptum* és a *C. coccoides* baktériumok összes baktériumtartalomhoz viszonyított arányát az idő előrehaladtával növelte, míg a másik három kezelés általam nem vizsgált baktériumcsoportok aránynövekedéséhez vezetett.

Az a mechanizmus, amellyel a spirulina befolyásolja a vakbél-mikrobióta összetételét, és amellyel közvetlenül vagy közvetve csökkenti ezeknek a baktériumoknak az arányát, még nem ismert. Eredményeim alapján és szakirodalmi adatok (Rasmussen és mtsai., 2009) szerint is valószínűsíthető a spirulina szelektív antimikrobiális aktivitása, vagy az, hogy bizonyos mikrobák számára szubsztrátként szolgálhat.

Combes és mtsai. (2011) szerint 49 napos kor után a takarmánykiegészítés alkalmazásával kevésbé avatkozhatunk be a mikrobióta összetételébe, mennyiségébe. Kísérletem eredményei szerint – ezzel ellentétben - a spirulina és/vagy a kakukkfű takarmánykiegészítők hatással voltak a vizsgált baktériumok kópiaszámára a 49. és a 77. napok közti intervallumban is: 63 és 77 napos korban is voltak szignifikáns különbségek.

Kísérleteim eredményei bizonyítják a vizsgált takarmánykiegészítők (spirulina, kakukkfű) gyakorlati alkalmazásának megalapozottságát a vakbélmikrobióta összetételének módosítására a kísérletben alkalmazott dózisokban.

A saját eredményeimem túl egy közelmúltban megjelent tudományos összefoglaló közlemény (Assan, 2018) alátámasztja számos takarmánykiegészítő kedvező élettani hatását. Mindezek alapján elmondható, hogy a nyúltenyésztők sokféle lehetőség közül választhatnak, döntésüket befolyásolhatja a kezelési, illetve megelőzési célterület, az étrendkiegészítő jellege (takarmánnyal, ivóvízzel, kivonatként vagy teljes növényi részként adagolva), elérhetősége. A spirulina és kakukkfű alkalmazásának terén további vizsgálatokat javasolnék. Az eubiosis elősegítésének szempontjából fontos lenne az optimális arányuk minél pontosabb kidolgozása.

6.2. A T-2-mikotoxin bélmikrobiótára gyakorolt hatása, pro- és prebiotikum esetleges védő hatásának kimutatása

A T-2 -mikotoxin takarmánnyal bejutva jelentős hatással van a bélmikrobióta összetételére, azonban prebiotikum, illetve pre- és probiotikum együttes alkalmazásával a toxin – baktérium mennyiséget csökkentő – hatása mérsékelhető. A mannán-oligoszacharidot (MOS) mint prebiotikum, a teljes baktériummennyiséget önmagában nem befolyásolta; azonban MOS-sal történő takarmány-kiegészítés hatására a *Clostridium leptum* és a *Bifidobaktérium*-kópiaszámok szignifikánsan magasabb értéket mutattak, a kontrollcsoporthoz viszonyítva; ezen baktériumcsoportok esetén igazolódott a kedvező prebiotikus hatás. Utóbbi eredményem számos korábbi – egyéb állatfaj, technika, baktériumcsoport - tanulmány eredményeivel összehangban áll. Molekuláris genetikai vizsgálatokon alapuló eredményeim alátámasztják a korábban más állatfajokban, illetve nyúlban csupán hagyományos tenyésztési eljárással megállapított következtetést, hogy a probiotikumként alkalmazott *Bacillus cereus var. toyoi* spórák takarmányhoz adagolva hatással van a bélmikrobióta összetételére.

Eredményeim alapján javasolható a pre- és probiotikumok gyakorlati alkalmazása a takarmányozásban, azok preventív és eubiosist elősegítő hatásai miatt.

6.3. A fumonizin B₁-mikotoxin- és/vagy mannan-oligoszacharid- kiegészítés hatása a nyúlvakbél-mikrobióta összetételére

A vizsgált mikotoxin a FB₁ káros hatással van a nyúlvakbél-ökoszisztémára, ami a baktériumszám jelentős, 66,5%-os csökkenésén keresztül nyilvánult meg.

A mannan-oligoszacharid (MOS) kedvező élettani hatása bebizonyosodott, az összbaktériumszám és a *Bacteroidesek* számának szignifikáns növekedésével, illetve az *E. coli* baktériumok számának csökkenésével. Az eubiosis elősegítésén túl, kombinált alkalmazás esetén a MOS korlátozta a FB₁ negatív hatását a teljes baktériumtartalomra nézve.

A vizsgálat további jelentősége, hogy az alkalmazott prebiotikum és mikotoxin hatásait *in vitro* körülmények között - közvetlenül a mikrobiótára – értékelhettük; így nem érvényesülhettek a szervezet (és bizonyos élettani mechanizmusok) esetleges befolyásoló körülményei.

7. Új tudományos eredmények

Az elvégzett kísérletek eredményei alapján az alábbi öt új tudományos eredmény fogalmazható meg:

1. A spirulina (5%) takarmány-kiegészítés 49 és 63 napos korban szignifikánsan magasabb összbaktérium-tartalmat eredményez, a *Bacteroidesek* kópiaszámát időlegesen megemeli (63 napos korban magasabb). A spirulina (5%) önmagában és (3%) kakukkfűvel kombinálva is csökkenti a *Firmicutesek* mennyiségét.

3. A (2 mg/kg) T-2-toxin tartalmú takarmány (2%) prebiotikummal (MOS), valamint a prebiotikummal és probiotikummal történő együttes (2% MOS + 0,2% (2×10^5 /g) *Bacillus cereus* var. *toyoi*) kiegészítése szignifikánsan ($p < 0,05$) növeli a nyúl vakbelében található baktériumok mennyiségét, a csak mikotoxinnal kiegészített takarmányt fogyasztó csoportéhoz képest.

3. A takarmánnyal bevitt (2 mg/kg) T-2 mikotoxin jelentősen, 86,4%-kal csökkenti a nyúl-vakbél-tartalom *Escherichia coli* mennyiségét.

4. A nyúl vakbél-tartalomhoz *in vitro* adott FB1 mikotoxin (0,05 mg/3,33g vakbél-tartalom) 12 órás inkubációt követően jelentősen csökkenti a baktériumok teljes mennyiségét (66,5%), valamint az *Escherichia coli* kópiaszámot (80%), megváltoztatja vakbél-mikrobióta mennyiségét és összetételét.

5. A nyúl vakbél tartalomhoz *in vitro* adott FB1 mikotoxin (0,05 mg/3,33g vakbél tartalom) teljes baktérium tartalomra gyakorolt negatív hatását korlátozza az együttesen alkalmazott MOS prebiotikum (10 mg/3,33g vakbél tartalom) ($p = 0,058$).

8. Összefoglalás

Első, *in vivo* kísérletemben azt vizsgáltam, milyen hatása van a spirulina és kakukkfű természetes takarmány kiegészítőknek a vakbél-mikrobiótára növendéknyulakban. Kísérleteim során alkalmazott molekuláris genetikai módszerek elvi alapja a mikroorganizmusok DNS-szekvencia (pl. 16S rRNS gén) alapú azonosítása, illetve a mennyiségi analízise kvantitatív valós idejű PCR-el (qPCR - Quantitative Real-time PCR). Combes és mtsai. (2011) a nyúlvakbél-mikrobióta - a születés utáni - fejlődését tanulmányozták 16S rRNS gén alapú molekuláris biológiai vizsgálati módszerrel; eredményeik szerint a teljes baktériumszám a kor előrehaladtával növekedett, a *Bacteroides-Prevotella* kópiaszám a 14.-től a 21. napig emelkedett, míg 35-70 napos korban csökkent. A Firmicutesek kópiaszáma a 14. és 70. nap között nem változott. A teljes baktérium mennyiség és a *Bacteroides* csoport mennyisége az eredményimhez képest kisebb volt; ez a különbség adódhat a különböző nyúl hibridek használatából, a táplálás és tartás eltéréseiből, illetve a PCR-hez használt különböző oligonukleotid szekvenciákból.

Kísérletemben a kópiaszámban bekövetkező időbeli (mintavételi alkalom) változásokra hatással voltak a takarmány kiegészítőkkel történt kezelések. A kópiaszámok emelkedtek; kivéve, ha spirulinával egészítettük ki a takarmányt. A vakbél-mikrobióta összetétele fiatal nyulakban nagymértékben változó egészen 49 napos korig, azonban 70 napos korukra

egészen homogén lesz (Combes és mtsai., 2011). Ez alapján 49 napos kor után a takarmány-kiegészítés alkalmazásával kevésbé avatkozhatunk be a mikrobióta összetételébe, mennyiségébe.

Kísérletem eredményeiből megállapítható, hogy a spirulina és / vagy a kakukkfű takarmány kiegészítők alkalmazása hatással volt a vizsgált baktériumok kópiaszámára a 49. és a 77. napok közti intervallumban is. A spirulina kevésbé ismert, mint pro- vagy prebiotikus takarmány-kiegészítő. Rasmussen és mtsai. (2009) kísérletükben 5%-os *Spirulina platensis* - kiegészítést alkalmaztak, amely módosította az egér bélmikrobióta összetételét, de a mikrobiális közösség körülbelül 70% -a megegyezett az kontroll állatokéval.

Kísérleteim során a spirulinával történő takarmány-kiegészítés magasabb *Bacteroides* kópiaszámot eredményezett a 63. napon, azonban a *Firmicutes*ek száma 63 és 77 napos korban szignifikánsan alacsonyabb értéket mutatott. A kísérletben szereplő baktériumcsoportok arányának vizsgálata során - a teljes baktériumtartalomon belül -, arra a következtetésre jutottam, hogy a spirulina, mint takarmány kiegészítő a *Bacteroides*, a *C. leptum* és a *C. coccooides* baktériumok összes baktériumtartalomhoz viszonyított arányát az idő előrehaladtával növelte, míg a másik három kezelés általam nem vizsgált baktériumcsoportok aránynövekedéséhez vezetett.

Az a mechanizmus, amellyel a spirulina befolyásolja a vakbél-mikrobióta összetételét, és amellyel közvetlenül vagy közvetve csökkenti ezeknek a baktériumoknak az arányát, még nem ismert. Valószínűsíthető a spirulina szelektív antimikrobiális aktivitása, vagy annak szubsztrátként való felhasználása bizonyos mikrobák által (Rasmussen és mtsai., 2009).

A kakukkfű antimikrobiális hatása a *Firmicutesek* kópiaszámára csak átmeneti, a 63. napon volt érvényes. Másrészt a kakukkfű, a *C. leptum* és a *C. coccoides*, összes baktérium mennyiséghez viszonyított arányát 77 napos korra szignifikánsan csökkentette. Az eredményeim tehát összhangban állnak a korábbi adatokkal, amelyek szerint a kakukkfű (a benne lévő illó olajok révén) antimikrobiális hatást fejt ki.

Összességében elmondható, hogy a már elválasztott, 35 és 77 napos kor közötti nyulak esetében a spirulina és kakukkfű, külön-külön vagy kombinálva, mint takarmány-kiegészítők hatással voltak a vakbél-mikrobióta összetételére. Hatásuk kiterjedt az összes baktérium mennyiségre, a *Bacteroides*, a *C. leptum* és a *C. coccoides* csoportok kópiaszámára, valamint az említett baktériumok arányára a teljes bakteriális közösséghez viszonyítva. A spirulina takarmány-kiegészítés ideiglenesen megnövelte a teljes baktériumtartalmat és a *Bacteroidesek* mennyiségét, miközben kisebb *Clostridium* kópiaszámot eredményezett. A kakukkfű a *Clostridiumokon* kifejtett antimikrobiális hatását csak 63 napos korig gyakorolta.

Kísérleteim eredményei bizonyítják a vizsgált takarmány-kiegészítők (spirulina, kakukkfű) gyakorlati alkalmazásának megalapozottságát a vakbél-mikrobióta összetételének módosítására a kísérletben alkalmazott dózisokban. A spirulina és kakukkfű alkalmazásának terén további vizsgálatokat javasolnék. Az eubiosis elősegítésének szempontjából fontos lenne az optimális arányuk minél pontosabb kidolgozása.

Második kísérletemben a korábbiakkal azonos molekuláris genetikai módszerrel vizsgáltam a T-2 expozíció bélmikrobiótára gyakorolt hatását, amely az *Escherichia coli* mennyiségének jelentős mértékű ($0,8 \log_{10}$ kópiaszám/g) csökkenéséhez vezetett, ami összhangban áll Saint-Cyr és mtsai. (2013) eredményeivel. Az említett tanulmányban kimutatták, hogy a DON orális expozíció jelentős hatással van a bélmikrobióta összetételére. Ezen kutatás adatait - a *Fusarium* toxinok egy más képviselőjének vizsgálatával – kiegészítve; eredményeim alapján elmondható, hogy a T-2 mikotoxin szájon át (takarmánnyal/élelmiszerrel) bejutva jelentősen befolyásolja a bélmikrobióta összetételét.

A probiotikumként alkalmazott *Bacillus cereus var. toyoi* spórák a *Bacteroides* és *E. coli* baktériumok mennyiségét szignifikánsan növelték; az össz-baktérium tartalom pedig szignifikáns csökkent, tehát molekuláris genetikai vizsgálatokon alapuló eredményeimmel alátámasztom a korábban már – más állatfajokban, illetve nyúlban hagyományos tenyésztési eljárással -

megállapított következtetést (Scharlek és mtsai., 2007; Bónai és mtsai., 2008; Gisbert és mtsai., 2013), hogy takarmányhoz adagolva képes befolyásolni a bélmikrobióta összetételét.

A mannán-oligoszacharidot (MOS) mint prebiotikum, a teljes baktérium mennyiséget önmagában nem befolyásolta; azonban MOS-sal történő takarmány-kiegészítés hatására a *Clostridium leptum* és a *Bifidobaktérium*-kópiaszámok szignifikánsan magasabb értéket mutattak, a kontrollcsoporthoz viszonyítva; ezen baktériumcsoportok esetén igazolódott a kedvező prebiotikus hatás. Utóbbi eredményem számos korábbi – egyéb állatfaj, technika, baktériumcsoport - tanulmány eredményeivel összhangban áll.

Harmadik, in vivo kísérletemben, a teljes baktérium, a *Bacteroides* és az *E. coli* mennyiségét a korábbiakkal megegyezően bakteriális célszekvencia-specifikus qPCR-el vizsgáltam. Eredményeimet összehasonlítva Combes és mtsai. (2011) tanulmányával, a következő különbségek állapíthatók meg: a teljes baktériumtartalom és a *Bacteroides*ek kezdeti mennyisége magasabb volt az inkubációs keverékben (háromszorosára hígított vakbél tartalom), mint Combes és mtsai. (2011) vizsgálata során teljes vakbél tartalomból kimutatott baktérium mennyiségek. A mikotoxinok esetében lehetséges bizonyos mértékű mikrobiális metabolizáció a béltraktusban, de - más mechanizmusokon keresztül – akár befolyásolhatják a mikrobióta összetételét is. Egyes toxinok

mikróba ellenes hatást fejthetnek ki (Grenier és Applegate, 2013). A mikotoxinok nemcsak a közösségi struktúrát, hanem a bélmikrobióta alkotók funkcionális gén összetételét is befolyásolhatják (Guo és mtsai., 2014). Azonban csupán néhány vizsgálatot végeztek ezidáig, a szájon át bejutó mikotoxin expozíció mikrobiális közösségre gyakorolt hatásának megismerésére.

Az FB₁ bakteriális növekedésre gyakorolt hatásával kapcsolatos első tanulmányt 1997-ben publikálták (Becker és mtsai., 1997). A humán bélmikrobiótát tipikusan reprezentáló baktériumokat inkubálták in vitro 50-1000 µM FB₁ jelenlétében. A bakteriális növekedés gátlása nem volt megfigyelhető, ami arra engedett következtetni, hogy az FB₁ nem toxikus a vizsgált baktériumok számára. Antonissen és mtsai. (2015) in vitro vizsgálata szintén nem mutatta ki a FB₁ gátló hatását a bakteriális növekedésre nézve (különböző koncentrációkban); nem találtak különbséget a mikrobióta összetételében a kontroll- illetve a toxinnal szennyezett takarmányt fogyasztó csirkék között.

Vizsgálatomban az FB₁ kisebb össz-baktérium- és *E. coli* mennyiséget eredményezett, de a kísérlet végén (utolsó mintavétel) több *Bacteroides* volt a kontroll kezeléshez képest. Ezen eredményeim összhangban vannak Saint-Cyr és mtsai. (2013) eredményeivel, amelyek az orális DON expozíció hatását vizsgálták az emberi bélmikrobiótán. A szájon át történő DON expozíció után

jelentős növekedés volt tapasztalható a *Bacteroides* / *Prevotella* csoportban, miközben csökkent az *E. coli* koncentráció.

A kísérletemben sikeresen demonstráltam a mannán-oligoszacharid (MOS) kedvező élettani hatását az összbaktériumszám és a *Bacteroides*ek számának szignifikáns növekedésével, ezt alátámasztotta az *E. coli* baktériumok számának csökkenése is a kontrollcsoporthoz képest. Ezen eredményeim összhangban állnak Spring és mtsai. (2000) által csirkével végzett in vivo vizsgálat eredményeivel és Oso és mtsai. (2013) által nyulakon végzett kísérlet eredményeivel is. A MOS jellemző tulajdonsága, hogy képes kötődni az 1-es típusú fimbriákat expresszáló patogén baktériumokhoz, például az *E. coli*hoz, ezáltal a MOS növelheti a korán elválasztott nyulak rezisztenciáját az emésztési megbetegedésekkel szemben. Kombinált alkalmazás esetén a MOS korlátozza a FB₁ negatív hatását a teljes baktériumtartalomra nézve ($p = 0,058$).

A teljes baktériumtartalom és a *Bacteroides*ek mennyiségének csökkenése az inkubációs idő előrehaladtával, a szubsztrát kimerülésével magyarázható. A baktériumok növekedési üteme közvetlenül arányos a rendelkezésre álló tápanyag mennyiségével (Monod 1949). A nem hasznos *E. coli* baktériumok kópiaszáma az inkubációs idővel párhuzamosan nőtt, ami magyarázható a baktériumcsoportot jellemző nagyon rövid generációs idővel, valamint a más baktériumcsoportok mennyiségének csökkenése kedvező lehet

számukra. Ez esetben a forrás-kompetíciós modell (resource ratio competition model) lép érvénybe, amely szerint a fogyasztható tápanyagok elérhetősége és aránya meghatározza a különböző bakteriális fajok arányát a bakteriális közösségen belül (Hibbing és mtsai., 2010).

9. Summary

The development of the rabbit caecal microbiota after birth has been thoroughly studied using 16S rRNA gene approaches coupled with capillary electrophoresis single-stranded conformation polymorphism (CE-SSCP) and qPCR by Combes et al. (2011). According to their results the total bacteria and *Bacteroides-Prevotella* copy number increased with age. The copy number of *Firmicutes* did not change between 14 and 70 days of age. The amount of total bacteria and *Bacteroides* was less in their investigation when compared to my results, likely due to the different hybrids used, to rabbit nutrition and management, and also to different oligonucleotide sequences used for PCR. Age (sampling time) related changes in the copy number were influenced by the dietary treatments, i.e. copy numbers increased except when spirulina was added to the diet.

The composition of the caecal microbiota in young rabbits is highly variable between individuals up to 49 days of age, whereas it becomes homogenous by 70 days of age (Combes et al. 2011). According to this statement after 49 days of age it is less possible to modify the microbiota, through nutritional factors.

In my **first experiment**, the use of spirulina and / or thyme supplements influenced the amount of the copy number of the individual bacteria examined between 49 and 77 days of age. There were more bacteria (total bacteria

number) at 77 compared to 49 days of age, except in group S, where no increase was observed.

Several pro- and prebiotics have been described to modify the composition of the gut microbiota, however the modulation appears to be restricted usually only to certain bacterial groups (Macfarlane et al. 2008). Spirulina is less known as a pro- or prebiotic feed supplement. According to Rasmussen et al. (2009) feeding 5% *Spirulina platensis* induced changes in the murine gut microbiota, but the microbial community remained around 70% similar to that of the control animals. In my experiment dietary inclusion of spirulina resulted in more *Bacteroides* on day 63 but significantly lower amount of Clostridia at 63 and at 77 days of age. Investigating the ratio of the examined bacterial groups within total bacteria, I can conclude that spirulina increased the ratio of the sum of *Bacteroides*, *C. leptum* and *C. coccoides* as time went by, while the other three treatments led to the increase of the ration of other, not identified bacteria. The mechanism by which spirulina modulates microbiota composition, and by which directly or indirectly decreased the ratio of these bacteria is not known yet, it is suggested to be due to selective antimicrobial activity, or it may serve as substrate for certain microbes (Rasmussen et al. 2009).

The antimicrobial effect of thyme on the absolute Clostridia number was only temporary, prevailing on day 63. On the other hand thyme resulted

in significantly decreasing percentage ratio (within total bacteria) of *C. leptum* and *C. coccoides* by 77 days of age. Results support previous data according to which thyme (due to its volatile oils) exerts antimicrobial effects. In this study in the potential use of these additives to modify the composition of the microbiota has been demonstrated, but further research is advisable to optimize effects on rabbits' microbial balance before any practical recommendation.

In my **second experiment**, I studied the effect of T-2 exposure on intestinal microbiology using the same molecular genetic method, which also led to a significant reduction in the amount of *Escherichia coli* ($0.8 \log_{10}$ copies / g), in accordance with Saint-Cyr et al., (2013).

As a probiotic, *Bacillus cereus var. toyoi* spores increased the amount of *Bacteroides* and *E. coli* bacteria significantly; and the total bacterial content is significantly decreased, so I conclude with my results based on molecular genetic studies the established conclusion (Scharlek et al., 2007; Bónai et al., 2008; Gisbert et al., 2013) that, by feeding it can influence the microbial composition of the intestine.

The mannan oligosaccharide (MOS) as a prebiotic, did not affect the total bacterial count; however, with the addition of MOS to feed supplements, the *Clostridium leptum* and Bifidobacterium copy numbers showed significantly higher values compared to the control group; for these bacterial groups the favorable prebiotic effect was confirmed. My result is in line with

the results of a number of previous studies - other animal species, techniques and bacterial groups.

Investigation of intestinal microbiota by molecular genetic tools is in the focus of recent researches in rabbits. In my **third study** the amount of total bacteria, *Bacteroides* and *E. coli* was examined by bacterial target sequence specific qPCR. Comparing our results with those of Combes et al. (2011), the following differences could be checked: the initial amount of total bacteria and *Bacteroides* were higher in the incubation mix (three-fold diluted caecal content) than Combes et al. (2011) detected in their study in full caecal contents.

Mycotoxins may undergo microbial metabolism in the intestine, but may also affect the composition of the microbiota. Some toxins may exert antimicrobial effects (Grenier and Applegate, 2013). Mycotoxins may alter not only the community structure but the functional gene composition of the gut microbiota as well (Guo et al., 2014). However, there are only a few investigations on the effect of oral mycotoxin exposure on the microbial community shift. The first study related to the effect of FB₁ on bacterial growth was published in 1997 (Becker et al., 1997). Bacteria typical representatives of the human intestinal microbiota were incubated in vitro in the presence of 50 to 1000 µM FB₁. They observed no inhibition of bacterial growth concluding that FB₁ is non-toxic for the bacteria investigated. Results of Antonissen et al.

(2015) showed no influence of different concentrations of FB₁ on the bacterial growth in vitro, they could not show a difference in microbiota composition between chickens fed the control or the FBs contaminated diet as well.

In my study FB₁ resulted in less total bacteria and *E. coli*, but more *Bacteroides* compared to the control treatment by the end of the experiment. This is similar to the results of Saint-Cyr et al (2013) who investigated the impact of oral DON exposure on the human gut microbiota. After oral DON exposure a significant increase for the *Bacteroides/Prevotella* group, while decrease in *E. coli* concentration was described.

MOS has successfully demonstrated its beneficial physiological effect via significant increase of the total bacterial count and number of *Bacteroides*, while reduction of number of *E. coli* bacteria compared to the control group. These results are in accordance with the in vivo results of Spring et al. (2000) in chicken and Oso et al. (2013) in rabbits. MOS has the ability to bind pathogenic bacteria expressing type-1 fimbriae such as *E. coli*, so MOS may increase resistance of early weaned rabbits to digestive troubles as well.

In case of combined application MOS fend off the negative effect of FB₁ on total bacteria ($p=0,058$).

The reduction in the amount of total bacteria and *Bacteroides* during incubation could be explained by substrate depletion. The growth rate of the bacteria is directly proportional to the amount of food available (Monod,

1949). The copy number of nonadvantageous *E. coli* increased significantly in parallel the incubation time. These bacteria have very short generation time and conceivably decline of other groups of bacteria is favourable for them. The resource ratio competition model can be applied, suggesting that the availability and rate of consumption of nutrients will determine the predominance of different bacterial species (Hibbing et al., 2010).

10. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném köszönetemet és hálámat kifejezni **Kovács Melinda** akadémikus asszonynak a doktori képzésben való részvétel lehetőségéért; a kísérletek tervezésében, kiértékelésében, a publikációk és a disszertáció elkészítésében nyújtott segítségéért, szakmai irányításáért. Köszönöm továbbá a szakmai továbbképzéseken, tudományos konferenciákon való részvétel lehetőségét, baráti támogatását.

Köszönöm **Dr. Zsolnai Attila** témavezetőmnek a mikrobiális genomikai módszerek és azok kiértékelésének elsajátításában, valamint a publikációk és a disszertáció elkészítésében nyújtott segítségét.

Köszönöm **Dr. Tornyos Gábornak** az állatkísérletekben való aktív részvétel és az egyetemi oktatásba való „betekintés” lehetőségét; **Bóta Brigittának** és **Dr. Szabó-Fodor Juditnak** és a tanszék összes dolgozójának a kísérletek elvégzésében nyújtott segítségüket és támogatásukat.

Köszönettel tartozom **Dr. Szendrő Zsoltnak**, **Dr. Matics Zsoltnak**, **Dr. Gerencsér Zsoltnak**, **Dr. Nagy Istvánnak**, továbbá a nyúltelep összes dolgozójának a kísérletek elvégzésében nyújtott segítségükért.

Köszönöm **Dr. Ferenczi Szilamérnak** a molekuláris genetikai munka során elengedhetetlen lépés, a PCR fragmentek plazmidba építése során végzett munkáját.

A szöveg gondozásában nyújtott baráti segítségéért köszönetet mondok
Árvai Leventének.

Végül, de nem utolsó sorban hálás köszönettel tartozom **Családomnak**
(Fiaimnak, Férjemnek és Szüleinknek) valamint barátaimnak, akik munkám
során messzemenőig kitartottak mellettem és támogattak abban, hogy véghez
vihessem terveimet.

11. Irodalomjegyzék

- Abecia L, Fondevila F, Balcells J, Edwards J.E, Newbold C.J, McEwan N.R. 2007. Effect of antibiotics on the bacterial population of the rabbit caecum. *FEMS Microbiology Letters* vol:272, p:144–153.
- Abeica L, Fondevila M, Balcells J, Edwards J.E, Newbold C.J, Mcdewan N.R. 2005. Molecular profiling of bacterial species in the rabbit caecum. *FEMS Microbiology Letters* vol:244 p:111–115.
- Alexander F, Chowdhury A.K. 1958. Digestion in the rabbit's stomach. *British Journal of Nutrition* 1 vol:2. p:65–73.
- Amber K.H, Yakout H.M, Hamed Rawya S. 2004. Effect of feeding diets containing yucca extract or probiotic on growth, digestibility, nitrogen balance and caecal microbial activity of growing new zealand white rabbits. In *Proc.: 8th World Rabbit Congress, Puebla, México*, p:737-741.
- Angelakis E, Raoult D. 2010. The increase of *Lactobacillus* species in the gut flora of newborn broiler chicks and ducks is associated with weight gain. *PLoS ONE* 5:e10463. doi:10.1371/journal.pone.0010463.

- Antonissen G, Croubels S, Pasmans F, Ducatelle R, Eeckhout V, Devreese M, Verlinden M, Haesebrouck F, Eeckhout M, Saeger S, Antlinger B, A Novak B, Martel A, Immerseel F. 2015. Fumonisin affect the intestinal microbial homeostasis in broiler chickens, predisposing to necrotic enteritis. *Veterinary Research* 23, 46:98
- Assan N. 2018. Plant based feed additives (phytogenic) as a primary solution to an antibiotic free nutritional program and feeding strategy in rabbit production. *Scientific Journal of Animal Science* 7(3) p: 493-503.
- Bailey J.S, Blankenship L.C, Cox N. A. 1991. Effect of fructo-oligosaccharides on *Salmonella* colonization of the chicken intestine. *Poultry Science*. vol:70 p:2433–2438.
- Becker B, Bresch H, Schillinger U, Thiel P G. 1997. The effect of fumonisin B1 on the growth of bacteria. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* vol:13 p: 539-543.
- Belay A, Kato T, Ota Y. 1996. *Spirulina (Arthrospira)*: potential application as an animal feed supplement. *Journal of Applied Phycology*. vol:8 p:303–311.

- Belay A. 2002. The potential application of *Spirulina (Arthrospira)* as a nutritional and therapeutic supplement in health management. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. vol:2 p:27-48.
- Bellier R, Gidenne T, Collin M. 1995. In vivo study of circadian variations of the caecal fermentation pattern in postweaned and adult rabbits. *Journal of Animal Science* 73, 128–135.
- Benato L, Hastie P, O'Shaughnessy P, Murray J.-A, Meredith A. 2014. Effects of probiotic *Enterococcus faecium* and *Saccharomyces cerevisiae* on the faecal microflora of pet rabbits. *Journal of Small Animal Practice*. 55/9 p:442-446.
- Bennegadi N, Fonty G, Millet L, Gidenne T, Licois D. 2003. Effects of age and dietary fibre level on caecal microbial communities of conventional and specific pathogen-free rabbits. *Microbial Ecology in Health and Disease* vol:5 p:23-32.
- Bindels L.B, Delzenne N.M, Cani P.D, Walter J. 2015. Towards a more comprehensive concept for prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. vol:12 p: 303–310.
- Bíró Gy. 2014. A bélmikrobióta kapcsolata az egészséggel és betegséggel. Irodalmi áttekintés. *Egészségtudomány*. 58/3 p: 27-40.

- Bocci V. 1992. The neglected organ: bacterial flora has a crucial immunostimulatory role. *Perspectives in Biology and Medicine*. vol:35(2) p:251-60.
- Bokori J, Gundel J, Herold I, Kakuk T, Mézes M, Szigeti G, Vincze L, Kovács G. szerk: Schmidt János. 2003. A takarmányozás alapjai. A nyúl emésztésének sajátosságai. Mezőgazda Kiadó. p:66-68.
- Bónai A, Szendrő Zs, Matics Zs, Fébel H, Pósa R, Tornyos G, Horn P, Kovács F, Kovács M. 2008. *Bacillus cereus* var. *toyoi* (Toyocerin®) kiegészítés hatása a nyulak vakbélflórájának összetételére és vakbél-fermentációjára. *Magyar Állatorvosok Lapja*. vol:130 p:87-95.
- Bouhnik Y, Flourie B, Ouarne F, Riottot M, Bisetti N, Bornet F, Rambaud F. 1994. Effects of prolonged ingestion of fructo-oligosaccharides on colonic Bifidobacteria, fecal enzymes and bile acids in humans. *Nutrition and Cancer* vol:26 p:21–29.
- Bovera F, Lestingi A, Iannaccone F, Tateo A, Nizza A. 2015. Use of dietary mannanoligosaccharides during rabbit fattening period: Effects on growth performance, feed nutrient digestibility, carcass traits, and meat quality. *Journal of Animal Science*. Vol. 90 No. 11, p:3858-3866.

- Brezoen A, Van Haren W, Hanekamp J.C. 1999. Emergence of a debate. AGPs and Public Health. Human Health and Antibiotic Growth Promoters (AGPs): Reassessing the risk. Heidelberg Appeal Nederland Foundation, 131 pp.
- Broom L. 2015. Mycotoxins and the intestine. A review article. *Animal Nutrition* vol:1 p:262-265.
- Carabano R, Badiola I, Licois D, Gidenne T. 2006. The digestive ecosystem and its control through nutritional or feeding strategies. In: *Recent Advances in rabbit sciences* (Eds.: Maertens, L., Coudert, P.) p:211-229.
- Carabano R, Piquer J, Menoyo D, Badiola I. 2010. Nutrition of the Rabbit, 2nd Edition. (eds C. de Blas and J. Wiseman). *The Digestive System of the Rabbit*. p:1-19.
- Chamorro S, Gómez-Conde M.S, Pérez de Rozas A.M, Badiola, I, Carabano R. and de Blas, J.C. 2007, Effect on digestion and performance of dietary protein content and of increased substitution of lucerne hay with soya-bean protein concentrate in starter diets for young rabbits. *Animal*. vol:1 p:651–659.
- Cheong S.H, Kim M.Y, Sok D.E, Hwang S.Y, Kim J.H, Kim H.R, Lee J.H, Kim Y.B, Kim M.R. 2010. Spirulina prevents atherosclerosis by reducing hypercholesterolemia in rabbits fed

- a high-cholesterol diet. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*. vol:56 p:34-40.
- Combes S, Michelland R.J, Monteils V, Cauquil L, Soulié V, Tran N.U, Gidenne T, Fortun-Lamothe L. 2011. Postnatal development of the rabbit caecal microbiota composition and activity. *FEMS Microb Ecol*. vol:77 p:680–689.
- Cross D.E, McDevitt R.M, Hillman K, Acamovic T. 2007. The effect of herbs and their associated essential oils on performance, dietary digestibility and gut microflora in chickens from 7 to 28 days of age. *British Poultry Science*. vol:48 p:496-506.
- Dal Bosco A, Gerencsér Zs, Szendrő Zs, Mugnai C, Cullere M, Kovács M, Ruggeri S, Mattioli S, Castellini C, Dalle Zotte A. 2014. Effect of dietary supplementation of *Spirulina (Arthrospira platensis)* and Thyme (*Thymus vulgaris*) on rabbit meat appearance, oxidative stability and fatty acid profile during retail display. *Meat Science*. vol:96 p:114-9.
- Dalle Zotte A, Cullere M, Sartori A, Dal Bosco A, Gerencsér Zs, Matics Zs, Kovács M, Szendrő Zs. 2014a. Effect of Dietary supplementation of *Spirulina (Arthrospira platensis)* and Thyme (*Thymus vulgaris*) on carcass composition, meat

- physical traits and vitamin B12 content of growing rabbits. World Rabbit Science. vol:22 p:11-19.
- Dalle Zotte A, Cullere M, Sartori A, Szendrő Zs, Giaccone V, Kovács M, Dal Bosco A. (2014b). Dietary Spirulina (*Arthrospira platensis*) and Thyme (*Thymus vulgaris*) supplementation to growing rabbits: effects on raw and cooked meat quality, nutrient true retention and oxidative stability. Meat Science. vol:98 p:94-103.
- Dalle Zotte A, Sartori A, Bohatir P, Rémignon H, Ricci R. 2013. Effect of dietary supplementation of Spirulina (*Arthrospira platensis*) and Thyme (*Thymus vulgaris*) on the growth performance, apparent digestibility and health status of companion dwarf rabbits. Livestock Science. vol:152 p:182–191.
- Davies M.E. (1965) Cellulolytic bacteria in some ruminants and herbivores as shown by fluorescent antibodies. Journal of General Microbiology vol:39 p:139–141.
- De Blas C, Mateos G.G. 2010. Feed formulation. In: Nutrition of the Rabbit – 2nd edition. de Blas C, Wiseman J (Eds). CAB International, UK.
- Devriendt B, Gallois M, Verdonck F, Wache Y, Bimczok D, Oswald I.P, Goddeeris B.M, Cox E. 2009. The food contaminant

- fumonisin B-1 reduces the maturation of porcine CD11R1(+) intestinal antigen presenting cells and antigen-specific immune responses, leading to a prolonged intestinal ETEC infection. *Veterinary Research*. vol:40 p:40 doi:10.1051/vetres/2009023.
- Dohnal V, Jezkova A, Jun D, Kuca K. 2008. Metabolic pathways of T-2 toxin. *Current Drug Metabolism*. vol:9 p:77–82.
- Dorman H.J.D, Deans S.G. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*. vol:88 p:308–316.
- Emaldi O, Crociani F, Matteuzi D. and Proto V. 1979. A note on the total viable counts and selective enumeration of anaerobic bacteria in the caecal content, soft, and hard faeces of rabbit. *Journal of Applied Bacteriology* vol:46 p:169–172.
- Fairhurst S, Marrs T. C, Parker H. C, Scawin J. W, Swanston D. W. 1987. Acute toxicity of T-2 toxin in rats, mice, guinea pigs, and pigeons. *Toxicology*. vol:43 p:31–49.
- Falcao-e-Cunha L, Castro-Solla L, Maertens L, Marounek M, Pinheiro V, Freire J, Mourao J.L. 2007. Alternatives to antibiotic growth promoters in rabbit feeding: a review. *World Rabbit Science*. vol:15 p:127-140.

- Fekete S, Huszenica G, Szilágyi M, Albert M, Szilágyi A. 1992. Effect of long-term feeding of sublethal quantities of T-2 toxin upon the ovarian activity of the rabbit. *Journal of Applied Rabbit Research*. vol:15 p:583-593.
- Fierer N, Hamady M, Lauber C.L, Knight R. 2008. The influence of sex, handedness, and washing on the diversity of hand surface bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. vol:46 p:17994-17999.
- Fioramonti J, Dupuy C, Dupuy J, Bueno L. 1993. The mycotoxin, deoxynivalenol, delays gastric emptying through serotonin-3 receptors in rodents. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. vol:266 p:1255-1260.
- Firmesse O, Mogenet A, Bresson J.L, Corthier G, Furet J.P. 2008. *Lactobacillus rhamnosus* R11 consumed in a food supplement survived human digestive transit without modifying microbiota equilibrium as assessed by real-time polymerase chain reaction. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. vol:14 p:90–99.
- Fodor J, Kametler L, Kovács M. 2006. Practical aspects of fumonisin production under laboratory conditions. *Mycotoxin Research* vol:22 p:211-216.

- Fodor J, Meyer K, Gottschalk C, Mamet R, Kametler L, Bauer J, Horn P, Kovacs F, Kovacs M. 2007. In vitro microbial metabolism of fumonisin B1. *Food Additives and Contaminants* vol:24(4) p:416–420.
- Fonseca A.P, Falcao-e-Cunha L, Kocher A, Spring P. 2004. Effects of dietary mannan oligosaccharide in comparison to oxytetracyclin on performance of growing rabbits. In Proc.: 8th World Rabbit Congress, Puebla, México. p:829-833.
- Forsythe S.J, Parker D.S. (1985) Nitrogen metabolism by the microbial flora of the rabbit caecum. *Journal of Applied Bacteriology* vol:58 p:363–369.
- Fortun-Lamothe L, Boullier S. 2004. Interactions between gut microflora and digestive mucosal immunity, and strategies to improve the health of young rabbits. *Proceedings - 8th World Rabbit Congress – September 7-10, 2004 – Puebla, Mexico.*
Invited Paper
- Fortun-Lamothe L, Boullier S. 2007. A review on the interactions between gut microflora and digestive mucosal immunity. Possible ways to improve the health of rabbits. *Livestock Science* vol:107 p:1–18.

- Furet J-P, Firmesse O, Gourmelon M, Bridonneau C, Tap J, Mondot S, Doré J, Corthier G. 2009. Comparative assessment of human and far animal faecal microbiota using real-time quantitative PCR. *FEMS Microbiology Ecology*. vol:68(3) p:351-362.
- García J, Gidenne T, Falcao E Cunha L. and de Blas J.C. 2002. Identification of the main factors that influence caecal fermentation traits in growing rabbits. *Animal Research*. vol:51 p:165–173.
- Gelderblom W.C.A, Jaskiewicz K, Marasas W.F.O, Thiel P.G, Horak M.J, Vlegaar R, Kriek N.P.J. 1988. Fumonisin – novel mycotoxins with cancer promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Applied Environmental Microbiology*. vol:54 p:1806-1811.
- Gerencsér Zs, Szendrő Zs, Matics Zs, Radnai I, Kovács M, Nagy I, Cullere M, Dal Bosco A, Dalle Zotte A. 2014. Effect of dietary supplementation of *Spirulina (Arthrospira platensis)* and Thyme (*Thymus vulgaris*) on apparent digestibility and productive performance of growing rabbits. *World Rabbit Science*. vol:22 p:1-9.

- Gibson G. R, Wang X. 1994. Inhibitory effects of bifidobacteria on other colonic bacteria. *Journal of Applied Bacteriology*. vol:77 p:412–420.
- Gibson G.R, Roberfroid M.B. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *The Journal of Nutrition* vol:125 p:1401-1412
- Gibson G.R, Probert H. M, Loo J. V, Rastall R. A, Roberfroid, M. B. 2004. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutrition Research Reviews*. vol:17 p:259–275.
- Gibson, G. R, Scott K. P, Rastall R. A, Tuohy K. M, Hotchkiss A, Dubert-Ferrandon A, Gareau M, Murphy E. F, Saulnier D, Loh G, Macfarlane S, Delzenne N, Ringel Y, Koziowski G, Dickmann R, Lenoir-Wijnkook I, Walker C, Buddington R. 2010. Dietary prebiotics: current status and new definition. *Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods* vol:7 p:1–19.
- Gidenne T. 1997. Caeco-colic digestion in the growing rabbit: impact of nutritional factors and related disturbances. *Livestock Production Science*. vol:51 p:73-88.

- Gidenne T, Combes S, Fortun-Lamothe L. 2012. Feed intake limitation strategies for the growing rabbit: effect on feeding behaviour, welfare, performance, digestive physiology and health: a review. *Animal*. vol:6 p:1407–1419.
- Gidenne T, Lebas F. 2006. Feeding behaviour in Rabbits. In Bels V. Feeding in domestic vertebrates, from structure to behaviour. Cab international Ed. Wallingford UK. p:179-194
- Gisbert E, Castillo M, Skalli A, Andree K.B, Badiola I. 2013. *Bacillus cereus* var. *toyoi* promotes growth, affects the histological organization and microbiota of the intestinal mucosa in rainbow trout fingerlings. *Journal of Animal Science*. vol:91(6) p:2766-2774.
- Glávits R, Ványi A, Fekete S, Tamás J. 1989. Acute toxicological experiment of T-2 toxin in rabbits. *Acta Veterinaria Hungarica*. vol:37 p:75-79.
- Gómez-Conde M.S, Pérez de Rozas A, Badiola I, Pérez-Alba L, de Blas C, Carabano, R, García J. 2009. Effect of neutral detergent soluble fibre on digestion, intestinal microbiota and performance in twenty-five-day-old weaned rabbits. *Livestock Science*. vol:125 p:192–198.

- Gouet P, Fonty G. 1973. Evolution de la microflore digestive du lapin holox'énique de la naissance au sevrage. *Annales De Biologie Animale, Biochimie et Biophysique*. vol:13 p:733–735.
- Gouet P, Fonty G. 1979. Changes in the digestive microflora of holoxenic rabbits from birth until adulthood. *Annales de Biologie Animale, Biochimie et Biophysique*. vol:19 p:553–556.
- Grenier B, Applegate T.J. 2013. Modulation of Intestinal Functions Following Mycotoxin Ingestion: Meta-Analysis of Published Experiments in Animals. *Toxins*. vol:5 p:396-430.
- Griffiths M, Davies D. 1963. The role of soft pellets in the production of lactic acid in the rabbit stomach. *Journal of Nutrition* vol:80 p:171–180.
- Grobner M.A. 1982. Diarrhea in the rabbit. A review. *Journal of Applied Rabbit Research*. vol:5 p:115–127.
- Guarner F, Malagelada J.R. 2003. Gut flora in health and disease. *The Lancet*. vol:360 p:512 –519.
- Guerre P, Eeckhoutte C, Burgat V, Galtier P. 2000. The effects of T-2 toxin exposure on liver drug metabolizing enzymes in rabbit. *Food Additives & Contaminants*. vol:17 p:1019 – 1026.

- Gumprecht L.A, Marcucci A, Weigel R.M, Vesonder R.F, Riley R.T, Showker J.L, Beasley V.R, Haschek W.M. 1995. Effects of intravenous fumonisin B1 in rabbits: Nephrotoxicity and sphingolipid alterations. *Journal of Natural Toxins*. vol:3 p:395-403.
- Guo M, Huang K, Chen S, Qi X, He X, Cheng W, Luo Y, Xia K, Xu W. 2014. Combination of Metagenomics and Culture-Based Methods to Study the Interaction Between Ochratoxin A and Gut Microbiota. *Toxicological Science*. vol:141 p:314-323.
- Guo M, Wu F, Hao G, Qi Q, Li R, Li N, Wei L, Chai T. 2017. *Bacillus subtilis* Improves Immunity and Disease Resistance in Rabbits. *Frontiers in Immunology* vol:8 p:354.
- Gutierrez I, Espinosa A, Garcia J, Carabano R, de Blas J.C. 2002 Effect of levels of starch, fiber, and lactose on digestion and growth performance of early-weaned rabbits. *Journal of Animal Science*. vol:80 p:1029–1037.
- Gutierrez I, Espinosa A, Garcia J, Carabano R, de Blas J.C. 2003. Effect of protein source on digestion and growth performance of early-weaned rabbits. *Animal Research*. vol:52 p:461–471.

- Hall E.R. 1952 Investigations on the microbiology of cellulose utilization in domestic rabbits. *Journal of General Microbiology*. vol:7 p:350–357.
- Hamilton-Miller J.M.T, Gibson G.R, Bruck W. 2003. Some insights into the derivation and early uses of the word “probiotic”. *British Journal of Nutrition*. vol:90 p:845.
- Hanahan D. 1983 Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*. vol:166(4) p:557-580.
- Harcourt-Brown F. 2004. *Textbook of Rabbit Medicine*. Oxford: Elsevier Science; p. 410.
- Hibbing M.E, Fuqua C, Parsek M.R, Peterson S.B. 2010. Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nature Reviews Microbiology*. vol:8(1) p:15–25.
- Hofacre C. L, Mathis G. F, Quiroz M. A. 2005. Natural alternatives to prevent necrotic enteritis. *International Poultry Production*. vol:13 p:7–9.
- Huybens N, Houeix J, Szalo M, Licois D, Mainil J, Marlier D. 2008. Is epizootic rabbit enteropathy (ERE) a bacterial disease. 9 th World Rabbit Congress. Verona-Italy. section: Pathology and Hygiene. p:971-976.

- Jávori A, Szigeti J. 2011. A takarmányokban esetlegesen előforduló mikotoxinok jelentősége. In: Termékminősítés és termékhigiéna. Debreceni Egyetem, Nyugat-Magyarországi Egyetem, Pannon Egyetem p:18-21
- Kaur I.P, Chopra K, Saini A. 2002. Probiotics: potential pharmaceutical applications. European Journal of Pharmaceutical Sciences. vol:15 p:1–9.
- Khaksar V, Marinus K, Hamideh H, Mohammad P. 2012. Effects of Thyme Essential Oil on Performance, Some Blood Parameters and Ileal Microflora of Japanese Quail. Japan Poultry Science Association. vol:49 p:106-110.
- Kim M.Y, Cheong S.H, Lee J.H, Kim M.J, Sok D.E, Kim M.R. 2010. Spirulina improves antioxidant status by reducing oxidative stress in rabbits fed a high-cholesterol diet. Journal of Medicinal Food. vol:13(2) p:420-426.
- Kim C.H, Shin K.S, Woo K.C, Paik I.K. 2009. Effect of dietary oligosaccharides on the performance, intestinal microflora and serum immunoglobulin contents in laying hens. Korean Journal of Poultry Science. vol:36 p:125–131.
- Kim G-B, Seo Y.M, Kim C.H, Paik I.K. 2011. Effect of dietary prebiotic supplementation on the performance, intestinal

- microflora, and immune response of broilers. Poultry Science
vol:90 p:75–82
- Kovács M, Romvári R, Orova Z, Kovács F, Horn P. 2003.
Investigations on the foetotoxic effect of fumonisin B₁ in pig
and rabbit. Acta Agraria Kaposváriensis, vol:7 p:9-17.
- Kovács M, Szendrő Zs, Milisits G, Bóta B, Bíró-Németh E, Radnai I,
Pósa R, Bónai A, Kovács F, Horn P. 2006. Effect of nursing
methods and faeces consumption on the development of the
bacteroides, lactobacillus and coliform flora in the caecum of
the newborn rabbits. Reproduction, Nutrition, Development.
vol:46 p:205–210.
- Kovács M, Tuboly T, Mézes M, Balogh K, Gerencsér Zs, Matics Zs,
Dal Bosco A, Szendrő Zs, Tornyo G, Hafner D, Milisits G,
Balogh-Zándoki E, Dalle Zotte A. 2016. Effect of dietary
supplementation of Spirulina (*Arthrospira platensis*) and thyme
(*Thymus vulgaris*) on serum biochemistry, immune response
and antioxidant status of rabbits. Annals of Animal Science.
vol:16(1) p:181-195.
- Kudoh K, Shimizu J, Ishiyama A, Wada M, Takita T, Kanke Y, Innami
S. 1999. Secretion and excretion of immunoglobulin A to
cecum and feces differ with type of indigestible saccharides.

- Journal of Nutritional Science and Vitaminology. vol:45 p:173–181.
- Laparra J.M, Sanz Y. 2010. Interactions of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals. Pharmacological Research. vol:61 p:219–225.
- Lebas F, Coudert P, Rouvier R, de Rochembau H. 1986. The rabbit husbandry, health and production. FAO Animal Production and Health Series No. 21.
- Lelkes L, Chang C.L. 1987. Microbial dysbiosis in rabbit mucoid enteropathy. Laboratory Animal Science. vol:36 p:757-764.
- Li Y, Wang Z, Beier R.C, Shen J, Smet D.D, Saeger S.D, Zhang S. 2011. T-2 Toxin, a Trichothecene Mycotoxin: Review of Toxicity, Metabolism, and Analytical Methods. Journal of Agricultural and Food Chemistry. vol:59 p:3441–3453.
- Li S.P, Zhao X.J, Wang J.Y. 2009. Synergy of Astragalus polysaccharides and probiotics (*Lactobacillus* and *Bacillus cereus*) on immunity and intestinal microbiota in chicks. Poultry Science. vol:88 p:519–25.
- Maertens L, Aerts J, De Boever J. 2004. Degradation of dietary oligofructose and inulin in the gastro intestinal tract and the

- effects on pH and volatile fatty acids. *World Rabbit Science*.
vol:12 p:235-246.
- Maertens L, Van Renterghem R, De Groote G. 1994. Effects of dietary inclusion of Paciflor® (*Bacillus CIP 5832*) on the milk composition and performances of does and on caecal and growth parameters of their weanlings. *World Rabbit Science*.
vol:2 p:67-73.
- Mariat D, Firmesse O, Levenez F, Guimarães V.D, Sokol H, DoréJ, Corthier G, Furet J.P. 2009. The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. *BMC Microbiology*.
vol:9 p:123.
- Mariscal-Quintanar M.G, Garcia-Escamilla R.M, Garcia-Escamilla N, Torres-Lopez J, Bautista-Ordóñez J.A, Rosiles-Martínez R. 1997. Effect of ingesting *Aspergillus flavus* and *Fusarium moniliforme* on the cytology of bone marrow and blood and on serum albumin and globulin concentrations. *Veterinaria Mexico*. vol:28 p:75–81.
- Marlier D, Dewree R, Delleur V, Licois D, Lassence C, Poulipoulis A, Vindevogel H. 2003. A review of the major causes of digestive disorders in the European rabbit. *Annales De Medecine Veterinaire*. vol:147 p:385-392.

- Marounek M, Vovk S.J. and Skrinova V. (1995) Distribution of activity of hydrolytic enzymes in the digestive tract of rabbits. *British Journal of Nutrition*. vol:73 p:463–469.
- McKay D.M. and Perdue M.H. 1993. Intestinal epithelial function: The case for immune physiological regulation. *Digestive Diseases and Sciences*. vol:38 p:1377–1387.
- Meineri G, Ingravalle F, Radice E, Aragno M, Peiretti P.G. 2009. Effect of high-fat diets and *Spirulina platensis* supplementation in New Zealand White Rabbits. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. vol:8 (12) p:2735-2744.
- Metchnikoff E. 1908. *The prolongation of life: Optimistic Studies*. G. P. Putnam's sons. New York & London.
- Mézes M, Balogh K. 2009. Mycotoxins in rabbit feed: A review. *World Rabbit Science*. vol:17 p:53 - 62
- Michelland R. J, Combes S, Monteils V, Cauquil L, Gidenne T, Fortun-Lamothe L. 2010. Molecular analysis of the bacterial community in digestive tract of rabbit. *Anaerobe*. vol:16 p:61–65
- Michelland R.J, Combes S, Monteils V, Cauquil L, Gidenne T, Fortun-Lamothe L. 2011. Rapid adaptation of the bacterial

- community in the growing rabbit caecum after a change in dietary fibre supply. *Animal*. 5:11, p:1761–1768.
- Mohan A, Quek S-Y, Gutierrez-Maddox N, Gao Y, Shu G. 2017. Effect of honey in improving the gut microbial balance. *Food Quality and Safety*. vol:1 p:107–115.
- Monod J. 1949. The growth of bacterial cultures. *Annual Review of Microbiology*. vol3 p:371-394.
- Montagne L, Pluske J.R, Hampson D.J. 2003. A review of interactions between dietary fibre and the intestinal mucosa, and their consequences on digestive health in young nonruminant animals. *Animal Feed Science and Technology*. vol:108 p:95-117.
- Monteils V, Cauquil L, Combes S, Godon J.J, Gidenne T. 2008. Potential core-species and satellite-species in the bacterial community within the rabbit caecum. *FEMS Microbiology Ecology*. vol:66 p:620–629.
- Morisse J.P, Maurice R, Boilletot E, Cotte J.P. 1992. Assessment of the activity of a fructo-oligosaccharides on different caecal parameters in rabbit experimentally infected with *E. coli* 0.103. *Annual Zootechnology*. vol:42 p:81-87.

- Mourao J.L, Alves A, Pinheiro V. 2004. Effects of fructooligosaccharides on performances of growing rabbits. In Proc.:8th World Rabbit Congress, Puebla, México. p:915-921.
- Navidshad B, Liang J.B, Jahromi M.F. 2012. Correlation coefficients between different methods of expressing bacterial quantification using real time PCR. *International Journal of molecular Sciences*. vol:13 p:2119–2132.
- Nicodemus N, García J, Carabano R, de Blas J.C. 2002. Effect of inclusion of sunflower hulls in the diet on performance, disaccharidase activity in the small intestine and caecal traits of growing rabbits. *Animal Science*. vol:75 p:237–243.
- O’Hara A.M, Shanahan F. 2006. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO reports* vol: p:688-693.
- O’Toole P, Marchesi J.R, Hill C. 2017. Next-generation probiotics: the spectrum from probiotics to live biotherapeutics. *Nature Microbiology*. vol:2 p:17057.
- Orengo O, Gidenne T. 2007. Feeding behavior and caecotrophy in the young rabbit before weaning: An approach by analysing the digestive contents. *Applied Animal Behaviour Science*. vol:102 p:106–118.

- Oso A.O, Idowu O.M.O, Haastrup A.S, Ajibade A.J, Olowonefa K.O, Aluko A.O, Ogunade I.M, Osho S.O, Bamgbose A.M. 2013. Growth performance, apparent nutrient digestibility, caecal fermentation, ileal morphology and caecal microflora of growing rabbits fed diets containing probiotics and prebiotics. *Livestock Science*. vol:157 p:184–190.
- Oswald I.P, Desautels C, Laffitte J, Fournout S, Peres S.Y, Odin M, le Bars P, le Bars J, Fairbrother J.M. 2003. Mycotoxin fumonisin B-1 increases intestinal colonization by pathogenic *Escherichia coli* in pigs. *Applied Environmental Microbiology*. vol:69 p:5870–5874.
- Ouethrani M, Van De Wiele T, Verbeke E, Bruneau A, Carvalho M, Rabot S. 2013. Metabolic fate of ochratoxin A as a coffee contaminant in a dynamic simulator of the human colon. *Food Chemistry*. vol:141 p:291-300.
- Padilha M.T.S. Licois D, Gidenne T, Carré B, Fonty G. 1995. Relationships between microflora and caecal fermentation in rabbits before and after weaning. *Reproduction Nutrition Development*. vol:35 p:375–386.
- Padilha M.T.S, Licois D, Gidenne T, Carré B, Coudert P, Lebas F. 1996. Caecal microflora and fermentation pattern in exclusively

- milk-fed young rabbit. In: Lebas, F. (ed.) Proceedings of the 6th World Rabbit Congress, Toulouse. Association Française de Cuniculture, Lempdes, France, p:247–251.
- Peeters J.E, Maertens L, Geeroms R. 1992. Influence of galactooligosaccharides in zootechnical performance, cecal biochemistry and experimental colibacillosis O103/8+ in weanling rabbits. *Journal of Applied Rabbit Research*. vol:15 p:1129-1136.
- Peeters J.E, Pohl P, Charlier C, Geeroms R, Glorieux B. 1984. Infectious agents associated with diarrhoea in commercial rabbits, a field study. *Proc. 3rd World Rabbit Congress; Roma, Italy*. p:265-272.
- Peiretti P.G, Meineri G. 2008. Effects of diets with increasing levels of *Spirulina platensis* on the performance and apparent digestibility in growing rabbits. *Livestock Science*. vol:118 p:173–177.
- Peiretti P.G, Meineri G. 2009. Fat and Meat Fatty Acid Profile of Rabbits Fed Different Fat Content and Dehydroepiandrosterone Supplementation Diets. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. vol:8 p:172-176.

- Peiretti P.G, Meineri G. 2011. Effects of diets with increasing levels of *Spirulina platensis* on the carcass characteristics, meat quality and fatty acid composition of growing rabbits. *Livestock Science*. vol:140 p:218–224.
- Placha I, Chrastinova L, Laukova A, Cobanova K, Takacova J, Strompfova V, Chernkova M, Formelova Z, Faix S. 2013. Effect of Thyme oil on small intestine integrity and antioxidant status, phagocytic activity and gastrointestinal microbiota in rabbits. *Acta Veterinaria Hungarica*. vol:61 p:197-208.
- Portsmouth J.I. 1977. The nutrition of the rabbits. In: Haresign, W., Swan, H. and Lewis, D. (eds) *Nutrition and the Climatic Environment*. Butterworths, London, UK. p:93–111.
- Rashwan A.A, Marai I.F.M. 2000. Mortality in young rabbits: a review. *World Rabbit Science*. vol:8 (3) p:111-124.
- Rasmussen H.E, Martínez I, Lee J.Y, Walter J. 2009. Alteration of the gastrointestinal microbiota of mice by edible blue-green algae. *Journal of Applied Microbiology*. vol:107 p:1108–1118.
- Rastall R. A, Gibson G. R. 2014. Recent developments in prebiotics to selectively impact beneficial microbes and promote intestinal health. *Current Opinion in Biotechnology*. vol:32 p:42–46.

- Rees Davies R, Rees Davies J.A.E. 2003. Rabbit gastrointestinal physiology. *Veterinary Clinics of North America*. vol:6 p:139–153.
- Reid G, Sanders M.E, Gaskins H.R, Gibson G.R, Mercenier A, Rastall R, Roberfroid M, Rowland I, Cherbut C, Klaenhammer T.R. 2003. New scientific paradigms for probiotics and prebiotics. *Journal of Clinical Gastroenterology*. vol:37(2) p:105-118.
- Rhee K-J, Sethupathi P, Driks A, Lanning D.K, Knight K.L. 2004. Role of Commensal Bacteria in Development of Gut-Associated Lymphoid Tissues and Preimmune Antibody Repertoire. *The Journal of Immunology*. vol:172 (2) p:1118-1124.
- Richards J.D, Gong J, de Lange C.F.M. 2005. The gastrointestinal microbiota and its role in monogastric nutrition and health with an emphasis on pigs: current understanding, possible modulations, and new technologies for ecological studies. *The Canadian Veterinary Journal*. vol:85(4) p:421–435.
- Rigottier-Gois L, Le Bourhis A-G, Gramet G, Rochet V, Doré J. 2003a. Fluorescent hybridization combined with flow cytometry and hybridization of total RNA to analyse the composition of microbial communities in human faecal

- samples using 16S rRNA probes. *FEMS Microbiology Ecology*. vol:43 p:237-245.
- Roberfroid M. 2007. Prebiotics: the concept revisited. *Journal of Nutrition*. vol:137(3 Suppl. 2), p:830–837.
- Roberfroid M, Gibson G.R, Hoyles L, McCartney A.L, Rastall R, Rowland I, Wolvers D, Watzl B, Szajewska H, Stahl B, Guarner F, Respondek F, Whelan K, Coxam V, Davicco M.J, Léotoing L, Wittrant Y, Delzenne N.M, Cani P.D, Neyrinck A.M, Meheust A. 2010. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *British Journal of Nutrition*. vol:104 (Suppl. 2) p: S1–S63.
- Russell M.W, Reinholdt J, Kilian M. 1989. Anti-inflammatory activity of human IgA antibodies and their Fab α fragments: Inhibition of IgG-mediated complement activation. *European Journal of Immunology*. vol:19 p:2243–2249.
- Sadek K.M, Ahmed H.A, Ayoub M, Elsabagh M. 2014. Evaluation of Digestarom and thyme as phytogenic feed additives for broiler chickens. *European Poultry Science*. 78.
- Sahoo P.K, Chattopadhyay S.K, Charan K. 1993. Biochemical alterations in experimentally induced chronic aflatoxicosis in rabbits. *Indian Veterinary Journal*. vol:70 p:909-913.

- Saint-Cyr M,J, Perrin-Guyomard A, Houée P, Rolland J.G, Laurentie M. 2013. Evaluation of an Oral Subchronic Exposure of Deoxynivalenol on the Composition of Human Gut Microbiota in a Model of Human Microbiota-Associated Rats. PLOS ONE. vol:8(11) p: e80578
- Scharek L, Altherr B.J, Tölke C, Schmidt M.F. 2007. Influence of the probiotic *Bacillus cereus* var. *toyoi* on the intestinal immunity of piglets. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. vol:120 p:136-147.
- Simon G.L, Gorbach S.L. 1984. Intestinal flora in health and disease. *Gastroenterology*. vol:86 p:174–193.
- Sirotek K, Santos E, Benda V, Marounek M. 2003. Isolation, identification and characterization of rabbit caecal mucinolytic bacteria. *Acta Veterinaria Brno*. vol:72 p:365–370.
- Sharma V.K. 2006. Real-time reverse transcription-multiplex PCR for simultaneous and specific detection of *rfbE* and *eae* genes of *Escherichia coli* O157:H7. *Molecular and Cellular Probes*. vol:20 p:298-306.
- Smith C.J, Rocha E.R, Paster B.J. 2006. The Medically Important *Bacteroides* spp. in Health and Disease. *Prokaryotes*. vol:7 p:381-427.

- Spring P, Wenk C, Dawson K.A and Newman K.E. 2000. The effects of dietary mannan oligosaccharides on cecal parameters and the concentrations of enteric bacteria in the ceca of salmonella-challenged broiler chicks. *Poultry Science*. vol:79 p:205-211.
- Stecher B, Hardt W.D. 2008. The role of microbiota in infectious disease. *Trends in Microbiology*. vol:16 p:107–114.
- Stokstad E. L. R, Jukes T. H. 1949. Informal Poultry Nutrition Conference. Federation Meetings. Detroit.
- Sun X, Fiala J.L, Lowery D. 2016. Patent watch: modulating the human microbiome with live biotherapeutic products: intellectual property landscape. *Nature Reviews Drug Discovery*. vol:15 p:224–225.
- Swanson K.S, Grieshop C.M, Flickinger E.A, Bauer L.L, Healy H.P, Dawson K.A, Merchen N.R, Fahey Jr G.C. 2002a. Supplemental fructooligosaccharides and mannanoligosaccharides influence immune function, ileal and total tract nutrient digestibilities, microbial populations and concentration of protein catabolites in the large bowel of dogs. *Journal of Nutrition*. vol:132 p:980–989.
- Swanson K.S, Grieshop C.M, Flickinger E.A, Merchen N.R, Fahey Jr.G.C. 2002b. Effect of supplemental fructo-oligosaccharides

- and mannan-oligosaccharides on colonic microbial populations, immune function and fecal odor components in the canine. *Journal of Nutrition*. vol:132 p:1717–1719.
- Szendró Zs, Barna J. Some factors affecting mortality of suckling and growing rabbits. 1984. Proc. 3rd World Rabbit Congress; Roma, Italy. p:166–173.
- Szendró Zs, Matics Zs, Gerencsér Zs, 2011. Húsnyulak takarmányozása. (E Tankönyv) Kaposvári Egyetem.
- Szendró Zs, Matics Zs, Gerencsér Zs, Radnai I, Hullár I. 2010. Nyúltenyésztés. (E Tankönyv) Kaposvári Egyetem.
- Szendró Zs. 2000. Nyúltenyésztés. In: Sertés, nyúl prémesállatok, hal. Szerk: Horn P. Mezőgazda Kiadó. Budapest. p:279-324.
- Tannock G.W, Munro K, Harmsen H.J, Welling G.W, Smart J, Gopal P.K. 2000. Analysis of the faecal microflora of human subjects consuming a probiotic product containing *Lactobacillus rhamnosus* DR20. *Applied Environmental Microbiology*. vol:66 p:2578-2588.
- Tannock G.W. 2002. Molecular methods for exploring the intestinal ecosystem. *British Journal of Nutrition*. vol:87(S2) p: S199–201. doi:10.1079/BJNBJN/2002538

- Tenk I, Fodor E, Szathmáry C. 1982. The effect of pure Fusarium toxins (T-2, F-2, DAS) on the microflora of the gut and on plasma glucocorticoid levels in rat and swine. *Zentralblatt Fur Bakteriologie, Mikrobiologie, Und Hygiene*. vol:252 p:84-93.
- Turner J.L, Dritz S.S, Higgins J.J, Minton J.E. 2002. Effects of *Ascophyllum nodosum* extract on growth performance and immune function of young pigs challenged with *Salmonella typhimurium*. *Journal of Animal Science*. vol:80 p:1947–53. doi:10.2527/2002.8071947x
- Vetési F. 1990. *Házinyúl - egészségtan*. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest
- Waché Y.J, Valat C, Postollec G, Bougeard S, Burel C, Oswald I.P. 2009. Impact of deoxynivalenol on the intestinal microflora of pigs. *International Journal of Molecular Science*. vol:10 p:1-17.
- Wang E, Norred W.P, Bacon C.W, Riley R.T, Merrill A.H. 1991. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins: implications for diseases associated with *Fusarium moniliforme*. *The Journal of Biological Chemistry*. vol:266 p:14486-14492.
- Xu J, Zhao J, Wang J, Zhao Y, Zhang L, Chu M, Li N. 2011. Molecular-based environmental risk assessment of three varieties of

genetically engineered cows. *Transgenic Research*. vol:20
p:1043-1054.

Zoetendal E.G, Collier C.T, Koike S, Mackie R.I, Gaskins H.R. 2004.
Molecular Ecological Analysis of the Gastrointestinal
Microbiota: A Review. *The Journal of Nutrition*. vol:134
p:465-472.

12. A disszertáció témaköréből megjelent publikációk

Tudományos közlemények angol nyelven

Bónai A, Bagóné Vántus V. 2013. Az elválasztási kor, valamint pro- és prebiotikumok alkalmazásának hatása a növendék házinyúl vakbél-mikrobiotára. *Animal Welfare, Etológia és Tartástechnológia*. Vol 9. No 3. p.99-109.

Bagóné Vántus V, Kovács M, Zsolnai A. 2014. The rabbit caecal microbiota: development, composition and its role in the prevention of digestive diseases – a review on recent literature in the light of molecular genetic methods. *Acta Agraria Kaposváriensis*, Vol 18 No 1, p.55-65

Bagóné Vántus V., Dalle Zotte A, Cullere M, Bónai A, Dal Bosco A, Szendrő Zs, Tornyos G, Pósa R, Bóta B, Kovács M, Zsolnai A. 2017. Quantitative PCR with 16S rRNA-Gene-Targeted Specific Primers for Analysis of Caecal Microbial Community in Growing Rabbits after Dietary Supplementation of thyme (*Thymus vulgaris*) and spirulina (*Arthrospira platensis*). *Italian Journal of Animal Science*. DOI:10.1080/1828051X.2017.1400413. Impact Faktor: 0,95.

Kézirat közlésre beadva

Bagóné Vántus V, Szabó-Fodor J, Gathira S. P. M, Kovács M, Ferenczi Sz, Stéger V, Zsolnai A. 2018. The effect of fumonisin B1 mycotoxin and/or mannan oligosaccharide supplementation on rabbit caecal microbiota in vitro. (*World Rabbit Science*)

Külföldi konferencia-kiadvány

Vántus V, Bónai A, Zsolnai A, Dal Bosco A, Szendrő Zs, Tornyos G, Bodnár Zs, Morsy W.A, Pósa R, Toldi M, Bóta B, Kovács M, Dalle Zotte A. 2012. Single and combined effect of dietary thyme (*Thymus vulgaris*) and Spirulina (*Arthrospira platensis*) on bacterial community in the caecum and caecal fermentation of rabbits. 20th Int. Symp. „Animal Science Days”, Krajnska gora, Slovenia, Sept. 19-21, 2012. Acta agriculturae Slivenica, Supplement 3, p. 77-81.

Vántus V, Dalle Zotte A, Kovács M, Dal Bosco A, Szendrő Zs, Zsolnai A. 2012. Dietary supplementation of spirulina (*Arthrospira platensis*) and thyme (*Thymus vulgaris* L.). Part 3: Effect on caecal bacterial community in growing rabbits. 10th WRSA World Rabbit Congress, 3-6. September 2012, Sharm El Sheikh, Egypt, p. 84. pp. 669-672.

Bónai A, Dalle Zotta A, Kametler L, Vántus V, Morsy W. A, Matics Zs, Dal Bosco A, Szendrő Zs, Kovács M. 2012. Dietary supplementation of spirulina (*Arthrospira platensis*) and thyme (*Thymus vulgaris* L.). Part 2: Effect on gastrointestinal growth, caecal microbiota and fermentation in rabbits. 10th WRSA World Rabbit Congress, 3-6. September 2012, Sharm El Sheikh, Egypt, pp. 707-711.

Hazai idegen nyelvű konferencia-kiadvány

Vántus V, Dalle Zotte A, Kovács M, Dal Bosco A, Szendrő Zs, Zsolnai A. Preliminary results on the Effect of Spirulina (*Arthrospira platensis*) and thyme (*Thymus vulgaris*) on bacterial diversity in the caecum of rabbits. Budapest, 2. June 2012. CEELA-II- 2012 Conference Budapest. p. 132-134.

Hazai magyar nyelvű konferencia-kiadvány

Vántus V, Dalle Zotte A, Kovács M, Dal Bosco A, Szendrő Zs, Zsolnai A. Spirulina kiegészítés hatása a vakbél mikrobióta összetételére nyúlban. 24. Nyúltenyésztési Tudományos Nap, Kaposvár, 2012. p.117-120.

Bónai A, Dalle Zotte A, Vántus V, Morsy W. A, Kametler L, Matics Zs, Dal Bosco A, Szendrő Zs, Kovács M. Spirulina és kakukkfű kiegészítés hatása a nyulak vakbélfermentációjára. 24. Nyúltenyésztési Tudományos Nap, Kaposvár, 2012. p.111-114.

Konferencia előadások

Bagóné Vántus Viola: Vakbél mikrobióta-mikotoxin kölcsönhatás meghatározása mikrobiális genomikai módszerrel. PhD Kerekasztal Konferencia. Kaposvári Egyetem Állattenyésztési tudományok Doktori iskola. 2014.03.03.

Bagóné Vántus Viola: Genomiális szelekció nyúlban: aktuális tenyésztési programok. Beszámoló a Genomic selection in rabbit breeding training school (Valencia, 2013. június 24-28.) továbbképzés anyagáról (célok és kritériumok, modellek és módszerek, a BLUPF90 programcsalád alkalmazási lehetőségei) "Szakmai beszámolók továbbképzésekről 2013" témájú workshop. Kaposvári Egyetem Agrár- és Környezettudományi Kar Élettani, Biokémiai és Állategészségügyi Intézet, 2013. november 27.

Bagóné Vántus Viola: Effect of Spirulina and/or thyme supplementation on the caecal microbiota, Workshop. gut microbiota – methodologies, Kaposvári Egyetem, Élettani és Állathigiéniai Tanszék, 2013. 04. 24. (Angol nyelvű előadás)

Vántus Viola: Single and combined effect of dietary thyme (*Thymus vulgaris*) and Spirulina (*Arthrospira platensis*) on bacterial community in the caecum and caecal fermentation of rabbits. 20th Int. Symp. „Animal Science Days”, Krajnska gora, Slovenia, Sept. 19-21, 2012. (Angol nyelvű előadás)

Poszterek

Vántus V, Dalle Zotte A, Kovács M, Dal Bosco A, Szendrő Zs, Zsolnai A. Dietary supplementation of spirulina (*Arthrospira platensis*) and thyme (*Thymus vulgaris* L.). Part 3: Effect on caecal bacterial community in growing rabbits. 10th WRSA World Rabbit Congress, 3-6. September 2012, Sharm El Sheikh, Egypt. p. 84. (poszter)

Bónai A, Dalle Zotta A, Kametler L, Vántus V, Morsy W. A, Matics Zs, Dal Bosco A, Szendrő Zs, Kovács M. Dietary supplementation of spirulina (*Arthrospira platensis*) and thyme (*Thymus vulgaris* L.). Part 2: Effect on gastrointestinal growth, caecal microbiota and fermentation in rabbits. 10th WRSA World Rabbit Congress, 3-6. September 2012, Sharm El Sheikh, Egypt. (poszter)

Vántus V, Dalle Zotte A, Kovács M, Dal Bosco A, Szendrő Zs, Zsolnai A.
Preliminary results on the Effect of Spirulina (*Arthrospira platensis*)
and thyme (*Thymus vulgaris*) on bacterial diversity in the caecum of
rabbits. Budapest, 2. June 2012. CEELA-II- 2012 Conference
Budapest. 132-134. (poszter)

13. A disszertáció témakörén kívüli publikációk

Bónai A, Bagóné Vántus V. Az elválasztási kor, valamint pro- és prebiotikumok alkalmazásának hatása a növendék házinyúl vakbél-mikrobiotára, IV. Gödöllői Állattenyésztési Tudományos Napok: Gödöllő, 2013. október 24-26. Előadások és poszterek összefoglaló kötete, Gödöllő. SZIE Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar Állattenyésztés-tudományi Int., 2013. p.48-49

Kovács M, Bónai A, Tornyos G, Zsolnai A, Pósa R, Blochné Bodnár Zs, Toldi M, Horvatovich K, Kametler L, Szabó-Fodor J, Bóta B, Bagóné Vántus V. A nyúlhústermelés biztonságát szolgáló környezet-életlani kutatások a Kaposvári Egyetemen. 25. Nyúltenyésztési Tudományos Nap, Kaposvár, 2013. p. 79-94

14. Rövid szakmai életrajz

Tanulmányok:

2011- PhD hallgató, Kaposvári Egyetem Állattenyésztési tudományok Doktori Iskola. Téma: Vakbél mikrobióta – mikotoxin kölcsönhatás meghatározása mikrobiális genomikai módszerrel

2009-2011: Pécsi Tudományegyetem Természettudományi Kar Biológus MSc, Molekuláris-, immun-, mikrobiológia szakirány

2006-2009: Pécsi Tudományegyetem Természettudományi Kar Biológia BSc diploma, Szupraindividuális szakirány

2000-2006: Ciszterci Rend Nagy Lajos Gimnáziuma, Biológia fakultáció

Szakmai tapasztalat:

2011- A Kaposvári Egyetem Állattudományi, Kar Élettani és Állathigiéniai Tanszék, Molekuláris Biológia laborjában dolgozom, ahol különböző állati eredetű mintákból végzek genomiális vagy bakteriális DNS kivonást, annak kvalitatív vagy kvantitatív analízisét – PCR, QPCR, szekvenálás, gél elektroforézis. A munka során némely esetben manuális beméréssel dolgozom, máskor minta bemérő robotot használok. A tanszék más laborjaiban volt alkalmam elsajátítani – elméletben és részben gyakorlatban –

különböző in vitro eljárásokat pl. MTT assay (ELISA plate reader), Comet assay.

2010-2011: Pécsi Tudományegyetem ÁOK, Farmakognóziái Tanszék szakdolgozója. Diplomamunka címe: Mézek és gyógynövényzirupok analitikai vizsgálata, gyógyászati alkalmazása

2007-2009: Pécsi Tudományegyetem ÁOK, Farmakognóziái Tanszék szakdolgozója. Szakdolgozat címe: A bakonybéli monostor gyógynövényei.

TDK, OTDK:

2013.04.05. XXXI. Országos Tudományos Diákköri Konferencia, Agrártudományi Szekció, Bíráló Bizottságban, Hallgatói Tagként való részvétel

2009. Pécsi Tudományegyetem, Természettudományi Kar, Biológiai Intézet, BSC Tudományos Diákköri Konferencia, részvétel előadás címe?

Ösztöndíjak:

Genomic selection in rabbit breeding Trainig School (2013.06.24.-28., Instituto de Ciencia y Tecnología Animal. Edificio de Ciencia Animal (7G). Universidad Politécnica de Valencia.) részvételre, előzetes pályázat útján nyert ösztöndíj (1000 Euro támogatás)

Köztársasági Ösztöndíj a 2010/2011 tanévre Kiemelkedő tanulmányi eredményért, szakmai területen végzett kimagasló munkáért, Nemzeti Erőforrás Minisztérium

pGem T Easy vector Technical Manual (www.promega.com)

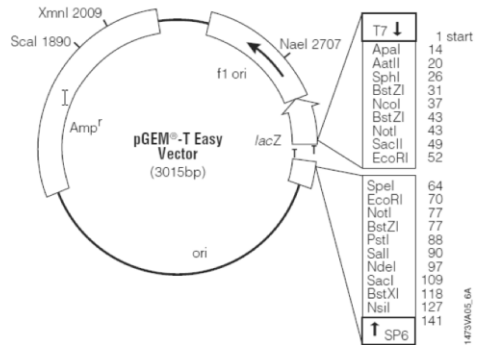


Technical Manual

pGEM[®]-T and pGEM[®]-T Easy Vector Systems

INSTRUCTIONS FOR USE OF PRODUCTS A1360, A1380, A3600 AND A3610.

5.D. pGEM[®]-T Easy Vector Map and Sequence Reference Points



The pGEM[®]-T Vector is derived from the pGEM[®]-5Zf(+) Vector (GenBank[®] Accession No. X65308). The pGEM[®]-T Vector was created by linearizing the pGEM[®]-5Zf(+) Vector with EcoRV at base 51 and adding a T to both 3'-ends. The EcoRV site will not be recovered upon ligation of the vector and insert.

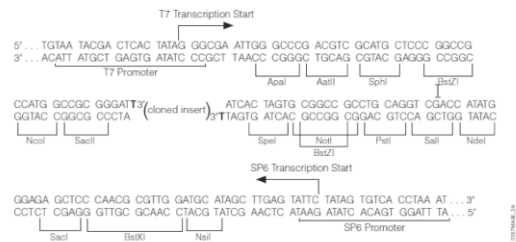


Figure 1. The promoter and multiple cloning sequence of the pGEM[®]-T Vector. The top strand corresponds to the RNA synthesized by T7 RNA polymerase. The bottom strand corresponds to the RNA synthesized by SP6 RNA polymerase.

A pGEM-T Easy vektor klónozó helye.