

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

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

1. A kutatás előzményei

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-bélrendszere 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

kórokok 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 hátterében 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.

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.

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.*), illetve 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*?

2. Anyag és módszer

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.

2.1 Spirulina és/vagy kakukkfű kiegészítés hatásának vizsgálata a vakbél mikrobiális közösségére

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).

2.2 A T-2 mikotoxin bélfőrára 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, Proper) 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 kukoricacsírán 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 készüléssel (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).

2.3 Fumonizin B₁ mikotoxin és/vagy mannán oligoszacharid kiegészítés hatásának vizsgálata a nyúl vakbél mikrobióta összetételére

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

A vakbél tartalom 42 napos korban frissen leölt állatoktól (n=3) származott, amelyeket megelőzőleg De Blas és Mateos (2010) ajánlásai szerint takarmányoztak. A vakbél tartalmát homogenizáltuk, majd egy-egy kémcsőben 3,33 g bél tartalmat (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 (vakbél tartalom + McDougall puffer)
- (2) toxin kezelés (vakbél tartalom + McDougall puffer + FB₁)
- (3) MOS kezelés (vakbél tartalom + McDougall puffer + MOS)
- (4) kombinált kezelés (vakbél tartalom + 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).

2.4 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.

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 (Brillant 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.

2.5 Statisztikai analízis

Az eredmények statisztikai elemzését SPSS (20. verzió) programcsomaggal végeztem. A többszintű variációanalízisben (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.

3. Eredmények és értékelésük

3.1 Spirulina- és/vagy 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 1-4. táblázatokban láthatóak, takarmány-kiegészítés és mintavételi idő szerint.

A spirulina (5%) takarmány-kiegészítés (S) 49 és 63 napos korban szignifikánsan magasabb teljes baktériumtartalmat eredményezett (1. 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.

1. 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*ek mennyisége (2. 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.

2. 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 (3-4. 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*.

3. 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

4. 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 5. 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 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. coccooides* aránya is csökkent.

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

3.1.1 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.

3.2 A T-2 mikotoxin bélfőrára gyakorolt hatása, pro- és prebiotikum esetleges védő hatásának kimutatása

A **probiotikumként** alkalmazott *Bacillus cereus var. toyoi* spórák a *Bacteroides* (7. táblázat) és *E. coli* (17. táblázat) baktériumok mennyiségét szignifikánsan növelték, a teljes baktériumtartalom csökkent (6. 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 (9. és 10. 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 (11. táblázat). A teljes baktérium mennyiségre (6. táblázat), illetve a *Bacteroides*, *Clostridium coccooides*, *Clostridium leptum* és a *Bifidobaktérium* csoportok mennyiségére (7.,8.,9.,10. 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 (6. táblázat).

6. 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

7. 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

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

| Takarmány- kiegészítés ² | Mintavételi idő | | RSD | P-érték (mintavételi |
|--|--------------------------|--------------------------|-------|-------------------------|
| | 1 | 2 | | |
| K | 9,8 ± 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), mikotoxinallal 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

9. 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

10. 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

11. 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 kezeléseket 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 6.-11. 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.

3.2.1 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.

3.3 Fumonizin B₁ mikotoxin- és/vagy mannánoligoszacharid- kiegészítés hatása a nyúl vakbél-mikrobióta összetételére

A **FB₁** alkalmazása az összes mintavételi pontnál kisebb összesbaktérium mennyiséget eredményezett, a kontrollmintákhoz képest. A 12 órás inkubáció 66,5%-os összbaktérium-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 (12. táblázat). A *Bacteroides*ek mennyiségének növekedése 36 óra elteltével lassabb volt, mint a kontrollmintákban; de a kombinált kezelés esetén ez fokozattan 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.

12. 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

3.3.1 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 összehangban 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).

4. Következtetések, javaslatok

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

A kísérletben 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. 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. 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 takarmány-kiegészítés alkalmazásával kevésbé avatkozhatunk be a mikrobióta

összetételébe, mennyiségébe. Kísérletem eredményei szerint – ezzel ellentétben - a spirulina és/vagy a kakukkfű takarmány kiegészítők 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 takarmány-kiegészítők (spirulina, kakukkfű) gyakorlati alkalmazásának megalapozottságát a vakbél-mikrobióta összetételének módosítására a kísérletben alkalmazott dózisokban.

A saját eredményeimen túl egy közelmúltban megjelent tudományos összefoglaló közlemény (Assan, 2018) alátámasztja számos takarmány-kiegészítő 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.

4.2 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 kontrollcsoportéhoz viszonyítva; ezen baktériumcsoportok esetén igazolódott a kedvező prebiotikus hatás. Utóbbi eredményem számos korábbi – egyéb állatfaj, technika, baktériumcsoport - tanulmány eredményeivel összhangban 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.

4.3 Fumonizin B₁ mikotoxin- és/vagy mannánoligoszacharid-kiegészítés hatása a nyúl vakbél-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 mannán-oligoszacharid (MOS) kedvező élettani hatása bebizonyosodott, az összbaktériumszám és a *Bacteroides*ek 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.

5. 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.

2. 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) ($p = 0,058$).

6. 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 leadva

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. (Kézirat közlésre beadva – World Rabbit Science)

Külföldi konferencia-kiadvány

- Vántus V, Bónai A, Zsolnai A, Dal Bosco A, Szendrő Zs, Tornyoş 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)