

# **DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI**

**SUCH NIKOLETTA AMANDA**

**GEORGIKON CAMPUS  
KESZTHELY**

**2022**



MAGYAR AGRÁR ÉS ÉLETTUDOMÁNYI  
EGYETEM

GEORGIKON CAMPUS

**PRE- ÉS PROBIOTIKUS  
TAKARMÁNYKIEGÉSZÍTŐK HATÁSÁNAK  
KOMPLEX ÉRTÉKELÉSE BROJLERCSIRKE  
KÍSÉRLETEKBEN**

**Such Nikoletta Amanda**

Keszthely

2022

**A doktori iskola megnevezése:** Festetics Doktori Iskola

**tudományága:** Állattenyésztési tudományok

**vezetője:** Dr. Anda Angéla DSc, egyetemi tanár, MTA doktora  
Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Georgikon Campus,  
Növénytermesztési-tudományok Intézet, Agronómia Tanszék

**Témavezető:** Dr. Dublecz Károly CSc, egyetemi tanár  
Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Georgikon Campus, Élettani és  
Takarmányozástani Intézet, Takarmányozási és Takarmányozás-élettani  
Tanszék

A jelölt a Magyar Agrár-és Élettudományi Egyetem Doktori Szabályzatában előírt valamennyi feltételnek eleget tett, az értekezés műhelyvitájában elhangzott észrevételeket és javaslatokat az értekezés átdolgozásakor figyelembe vette, ezért az értekezés védési eljárásra bocsátható.

.....  
Az iskolavezető jóváhagyása

.....  
A témavezető jóváhagyása

## **1. A munka előzményei, célkitűzések**

A baromfi emésztőkészülékét baktérium-, gomba- és protozoonfajok sokféle csoportja kolonizálja, baktériumok esetében ez több mint 900 fajt is jelenthet (Apajalathi, 2004). A gazdaszervezet és a mikrobiom közötti szimbiotikus kapcsolatnak számos jótékony hatása van. A bélmikrobióta segíti a táplálóanyagok emésztését és védelmet nyújt a kórokozó baktériumok ellen, az állat immunrendszerének meghatározó részét jelenti (Thompson, 2013; Oakley, 2014). A kiegyensúlyozott bélmikrobióta kialakulásának és fenntartásának elősegítése érdekében számos takarmány-adalékanyag használata terjedt el. Ilyenek például a szerves savak, prebiotikumok vagy probiotikumok. (Popova, 2017; Al-Khalaifah, 2018). A baromfi esetében kiemelt figyelmet érdemel a bélflóra támogatása, hiszen a keltetőben a tojásokból kikelő csibék nem érintkeznek a tojótyúkokkal, természetes anyai forrás helyett mesterséges környezetben kolonizálódik a béltraktusuk (Kers, 2018). Ezért fontos, hogy a fiatal madarak milyen mikroflórával kerülnek kapcsolatba életük első napjaiban. A nagyszámú irodalmi adatok alapján nem egyértelmű, hogy a takarmánykiegészítőkkel tartós és lényegi változásokat lehet-e elérni a brojlercsirkék bél mikrobióta összetételében. Viszonylag kevés információ áll rendelkezésre arról, hogy a pre- és probiotikumok alkalmazása befolyásolja-e az ürülék mikroflóra ureáz aktivitását, ezáltal az alomból elillanó N-tartalmú anyagok mennyiségét.

**A fentiek alapján a dolgozat célkitűzései a következőkben foglalhatók össze:**

Egyes pre- és probiotikumok önmagukban, kombinálva, valamint különböző módon etetve hogyan befolyásolják a brojlercsirkék termelési paramétereit, a bél mikrobióta összetételét, a csirkék immunválasz reakcióit és az ürüleből távozó ammónia mennyiségét.

Először célunk annak megállapítása volt, hogy két különböző anyagcsereterméket előállító probiotikus tulajdonságú baktériumfaj (*Lactobacillus farciminis*, *Clostridium butyricum*) önmagában, vagy a működését támogató prebiotikus hatású takarmánykomponenssel (búzakorpa) képes-e pozitív változást előidézni a brojlercsirkék bél mikrobióta összetételében. Ennek során a termelési paraméterekre, a vékonybél enzimaktivitásra és a vakbél illózsírsav koncentrációra gyakorolt hatás mellett, a csípőbél és vakbél morfológiai paramétereit, továbbá a vakbél mikrobióta összetételét vizsgáltuk. Ezen felül a baromfi ürülék szárazanyag tartalmát, a különböző nitrogénformák arányát, valamint a kezelések ammónia emisszióra gyakorolt hatását is meghatároztuk.

Ezt követően arra voltunk kíváncsiak, hogy befolyásolható-e a csirkék béltraktusában az életkor változásával összefüggésben a baktériumflóra összetétele. Ezúttal tyúkok vakbeléből izolált többszáz szelektált baktériumot tartalmazó készítménnyel végeztünk egyszeri kezelést napos állatokon. Emellett egy *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae* és inulin tartalmú szimbiotikum kezelést állítottunk be. A hagyományos kukorica alapú tápsor mellett búza alapú és búzakorpát is tartalmazó tápot is etettünk az arabinoxilán hatásának vizsgálata érdekében. A kísérlet során a termelési paraméterek vizsgálata mellett célunk volt a vakbél béltartalom, a csípőbél béltartalom és bélhám mikrobióta összetétel változásának tanulmányozása a csirkék életkorával. Célunk volt továbbá a kezelések hatásának vizsgálatát kiterjeszteni az immunfolyamatokra is, mely során a Gumboro betegség elleni vérplazma ellenanyag szintek változását mértük. A kezelések ürülék összetételére gyakorolt hatását ebben a kísérletben is elvégeztük.

## 2. Anyag és módszer

### 2.1. Első kísérlet

Az első kísérletben probiotikum (*Lactobacillus farciminis*, *Clostridium butyricum*), valamint búzakorpa kiegészítés hatását vizsgáltam a brojlercsirkék termelési eredményeire, a vékonybél hisztomorfológiai paramétereire, enzimaktivására, a vakbél hisztológiájára, bakterióta-összetételére, a vakbél tartalom rövid szénláncú zsírsav (SCFA) koncentrációjára, valamint az ürülék tulajdonságaira.

#### 2.1.1. Állatok és kezelések

Az állatkísérletet az Intézményi Etikai Bizottság (Állatvédelmi Bizottság, Georgikon Kar, Pannon Egyetem) a MÁB-5/2018 engedélyszám alatt hagyta jóvá. A kísérletet összesen 574 darab Ross 308 típusú szexált kakassal végeztük. A napos állatokat kereskedelmi keltetőből szereztük be, majd 6 kezelési csoportra osztottuk, kezelésként 4 ismétléssel, 24 állat/ketrec sűrűséggel (10 állat/m<sup>2</sup>). Az alkalmazott kezelések: Kontroll kezelés (K), *Clostridium butyricum*, vajsavtermelő baktérium kezelés (K+VB), *Lactobacillus farciminis*, tejsavtermelő baktérium kezelés (K+TB), búzakorpa kiegészítés (BK), búzakorpa + *C. butyricum* kezelés (BK+VB), búzakorpa + *L. farciminis* (BK+TB) kezelés. A kontroll táp kukorica és szója alapú volt. A tápok három fázisban etettük, az indító szakasz az 1. naptól a 10. napig, a nevelő a 11. naptól a 24. napig és a befejező a 25. naptól a 40. napig tartott. Az állatoknak ad libitum hozzáférést biztosítottunk a takarmányhoz és az ivóvízhez a kísérlet teljes ideje alatt. A dercés formátumú kísérleti tápokot úgy állítottuk össze, hogy azonos energia- és fehérjetartalommal rendelkezzenek, valamint, hogy megfeleljenek a választott genotípus igényeinek. A két kiválasztott

probiotikum a *Clostridium butyricum*, ecetsav és vajsav termelő (Miya-Gold®, Huvepharma, Sofia, Bulgária  $2,5 \times 10^9$  CFU/kg), valamint *Lactobacillus farciminis* CNMA67-4R, tejsavtermelő baktériumtörzset tartalmazott (Biacton,  $5 \times 10^9$  CFU/kg). A búzakupát fogyasztó csoportok takarmányához az indító fázisban 3, a nevelő és befejező fázisban 6-6% búzakupát kevertünk.

### 2.1.2. Mintavétel

A nevelési időszak alatt, a takarmányozási fázisok utolsó napján egyedileg megmértük az állatok súlyát és a fülkénként elfogyasztott takarmány mennyiségét. A mért adatokból kiszámítottuk az átlagos súlygyarapodást és a fajlagos takarmány értékesítést. A nevelés 40. napján ketrecenként 2 állatot (kezelésenként 8 egyed, tehát 8 minta) CO<sub>2</sub>-os kábítás alatt nyaki véna átvágásával kivérettünk. Ezt követően az elvéreztetett állatok testüregét megnyitottuk, és a bélcsövet eltávolítottuk. Az enzimaktivitás vizsgálathoz a jejunum Meckel-diverticulumhoz közeli, disztális részéből gyűjtöttünk mintát. A baktériumtenyésztéshez az ileum proximális részéből, az illózsírsav vizsgálathoz és a pH méréshez a vakbél bal oldali zsákjából vettünk mintát. A vakbélből steril körülmények között mintát gyűjtöttünk szekvenálási vizsgálathoz is. A további vizsgálatokhoz a minták egyedi homogenizálást követően -20 °C-on, szekvenáláshoz -80 °C-on kerültek tárolásra. Csípőbél szövetmintákat vettünk a Meckel-diverticulum-tól 1 cm-re a vakbél irányában, valamint a vakbélből a bal vakbélzsák csúcs közeli részéből. A szövetrészeket 2% -os foszfát pufferelt sóoldattal (PBS) mostuk, majd 5% -os foszfát tartalmú formalinnal fixáltuk további tárolás céljából. A kísérlet végén minden kezeléssel 4 állatot egyedi ketrecbe telepítettünk, ahol az állatok ezt követően ugyanazt a

takarmányt fogyasztották, amit a kísérlet teljes ideje alatt. Az ürülék mintavételt 43 napos korban. Minden állattól 200 g ( $\pm$  1 g) mintát gyűjtöttünk, amit megfelelő homogenizálás után -20 °C-on fagyasztva tároltunk a további vizsgálatokig. Meghatároztuk az ürülék minták szárazanyag, pH, összes N, ammónium-N ( $\text{NH}_4^+$ -N) és húgysav-N tartalmát, valamint megmértük az ammónia képződés dinamikáját.

### 2.1.3. DNS kivonás, 16S rRNS gén PCR amplifikáció, és Illumina MiSeq sequenálás

A vakbél teljes mikrobiális genom meghatározását 4 kezelés esetében (K, K+VB, BK, BK+VB) végeztük el. A bakteriális DNS-t jelzett primerekkel amplifikáltuk amely a bakteriális 16S rRNS gén V3 – V4 régióját fedi le. A PCR könyvtárakat számszerűsítését és minősítését követően, a könyvtárak ekvimoláris koncentrációit egyesítettük és IlluminaMiSeq platformon szekvenáltuk, aMiSeq Reagent Kit v3 (600 ciklus; Illumina Inc., San Diego, CA, USA) protokoll használatával. A nyers szekvenciák analíziséhez a Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME2) 2020.2 verziószámú szoftverét használtuk. Az operatív taxonómiai egységek (Operational Taxonomy Unit; OTU) klaszterezését nyílt referencia-stratégia segítségével végeztük. Az OTU-k csoportosítása 97%-os hasonlósági szinten történt Greengenes adatbázis (13.8 verzió) felhasználásával. A taxonómiai azonosítást Ribosomal Database Project (RDP) Naïve Bayes-i osztályozóval (Naïve Bayesian Classifier) 0,8-as konfidencia küszöbértékkel végeztük (Wang et al., 2007).



#### 2.1.4. Béltartalomból végzett vizsgálatok

A pH méréshez a friss béltartalmat desztillált vízzel (1: 5) hígítottuk közvetlenül a mintavétel után, és kézzel ráztuk 1 percig. A pH-mérést SNEX elektródával (pH200A) végeztük, hordozható pH -mérővel, CS1068 SNEX pH -érzékelővel felszerelve (CLEAN Instruments, Shanghai, Kína). A rövid szénláncú zsírsavak méréséhez gázkromatográfiás (TRACE 2000, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) módszert alkalmaztunk. A kalibráláshoz szabványos SCFA-k (1, 4, 8 és 20 mM) keverékeit használtuk, amelyek külső standardként acetátot, propionátot, n-butirátot és n-valerátot tartalmaztak. Az enzimaktivitás vizsgálatokat a mintavétel másnapján végeztük el. Az  $\alpha$ -amiláz aktivitás meghatározását Dahlqvist (1962), a lipáz aktivitást Schön et al. (1961), a tripszin aktivitást Kakade et al. (1969) módszere alapján végeztük.

#### 2.1.5. Hisztomorfológiai vizsgálatok

A szövetminták feldolgozása sorozatos dehidratálásból, tisztításból és viasz -impregnálásból állt. A szövetmetszeteket 5  $\mu\text{m}$  vastagságban 3 ismétlésben szeleteltük kezelésként 8 madár mintáját felhasználva, így kezelésként 24 metszettel dolgoztunk tovább. A metszeteket mikrotommal vágtuk és tárgylemezre rögzítettük. Rutinszerű festési eljárást végeztünk hematoxylinnel és eozinnal. A lemezeket digitális videokamerával felszerelt Leica DMi8 mikroszkóp alatt (Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar, Németország) fényképeztük. A képeket ImageJ szoftverrel (1.47 -es verzió) elemeztük. Összesen 10 ép, jó minőségű boholy-kriptaeget választottunk ki három ismétlésben minden bélmetszetből.

#### 2.1.6. Ürülékminta vizsgálatok

Az összes N meghatározást a magyar szabvány szerint (MSZ EN ISO 5983-2) Kjeldahl, blokkroncsolásos/vízgőz-desztillációs módszerrel végeztük Foss-Kjeltec 8400-as fehérjemeghatározó készülékkel. Az ammónium-N meghatározást a Peters és mtsai. (2003) által leírt módszer alapján, a húgysav-N mérést Marquardt és mtsai. (1983) szerint, az in vitro ammónia emissziós vizsgálatot pedig Santosó és mtsai. (1999) alapján történt. Az ammónium-N és húgysav-N összegét vettük vizelet nitrogénnek. Az in vitro ammónia felszabadulás méréséhez Draeger X-am 5600 (Drägerwerk AG & Co. KGaA, Lübeck, Németország) készüléket használtunk. Az ürülékben jelen lévő ureáz enzim termelő baktérium számot a Fujita (2010) munkája alapján a MPN módszerrel (Most Probable Number) becsültük meg ureáz táptalaj (Urea Broth Base, Scharlab) segítségével.

#### 2.1.7. Takarmányanalitikai vizsgálatok

A kísérleti tápoknak meghatároztuk a szárazanyag (ISO 6496), nyersfehérje (ISO 5983-1: 2005), nyerszsír (ISO 6492), nyersrost (ISO 6865: 2001), teljes P (ISO 6491: 2001) és Ca (ISO 6869: 2001) tartalmát. A keményítőtartalom mérésére a 152/2009 európai irányelvnek megfelelően polarimetriai módszert alkalmaztunk.

#### 2.1.8. Statisztikai értékelés

A termelési paraméterek, SCFA, pH, hisztomorfológia és ürülék vizsgálatok eredményeit kéttényezős varianciaanalízissel értékeltük az SPSS 24.0 szoftver segítségével. A különbségeket  $p < 0,05$  szinten tekintettük szignifikánsnak, és trendnek tekintettük a  $0,1 > p \geq 0,05$  értékeket. A minták mikrobiális összetételének statisztikai elemzése MicrobiomAnalyst program segítségével történt. A mintákat az OTU-k

átlagos gyakorisága alapján alacsony szűrésű szekvenciákra (<4) és alacsony variabilitásra (<10%) szűrtük, interkvantilis tartományértékeléssel. Szűrés után az OTU-bőségeket relatív log expresszióval transzformáltuk. A hamis felfedezési arányt (FDR) Benjamini és Hochberg módszerrel számítottuk ki, és a 0,05-nél kisebb q-értékeket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak. A mikrobiális taxonok számát az összes 16S rRNS génszekvencia százalékában fejeztük ki.

## **2.2. Második kísérlet**

A második kísérletben a kukorica-szója alapú kontrolltáp etetésekor egészséges tojótyúk vakbélből izolált baktériumkultúra (Broilact), szimbiotikus kezelés (*Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, inulin) és búza alapú és búzakorpával kiegészített táp hatásait értékeltük. A Broilactot a kísérlet 1. és 2. napján alkalmaztuk, míg a többi kezelést a teljes termelési időben. A termelési tulajdonságok mellett a bél mikroflóra fejlődését a csirkék életkorának függvényében értékeltük csípőbél tartalom, csípőbél nyálkahártya és vakbél tartalom mintából.

### **2.2.1. Állatok és kezelések**

Az állatok tartási és kísérleti körülményei megegyeztek az előző kísérletben leírtakkal. A kísérlet engedélyszáma MÁB-9/2019 volt. Ezúttal egy kontroll és három kezelési csoportot alkalmaztunk, kezelésként 6 ismétléssel, ami 6 ketrecet jelent, amelyekben 24 állat került elhelyezésre. Az alkalmazott kezelések: kukorica-, szójaalapú kontroll táp (K), búzaalapú + búzakorpa-kiegészítést tartalmazó táp (B), kontroll táp Broilact kiegészítéssel (BR), kontroll táp szimbiotikus kiegészítővel (SZ). Az indító, nevelő és befejező etetési fázisok időtartama a következő volt: 1-10., 11-24. és 25-40 nap. A B kezelés esetében az indító 3%, a nevelő és

a befejező táp 6% búzakupát tartalmazott. A Broilact készítmény (Broilact, Europharmvet Kft., Budapest) SPF-tyúkok vakbélflórájából származó élőcsírás, liofilizált probiotikum-készítmény volt, amelyet a csibék egy és két napos korban begybe fecskendezve kaptak 2 részletben, összesen  $1,25 \times 10^7$  CFU/0,5 ml adagban. A szimbiotikus kezelés 3 készítményt tartalmazott: *Bacillus subtilis*, DSM17299 probiotikus baktériumtörzset (0,4 g/kg,  $1,6 \times 10^6$  CFU/g; Gallipro, Biochem GmbH, Lohne, Németország), inulint (5g/kg, Oratfi HSI, Beneo GmbH, Tienen, Belgium) és élesztőtölgombát (*Saccharomyces cerevisiae boulardii*,  $1 \times 10^9$  CFU/kg Levucell SB 20, Lallemand GmbH., Bécs, Ausztria). A takarmányhoz minden kezelés esetében Econase XT (béta 1-4, endoxilanáz) enzimet adtunk (AB Vista Ltd., Marlborough, Anglia). Az állatok tartása megegyezett előző kísérletben leírtakkal.

### 2.2.2. Mintavétel

A termelési paraméterek vizsgálata megegyezett előző kísérlet során leírtakkal. A nevelés 7., 14., 21. és 40. napján kezelésként 12 állatot CO<sub>2</sub>-gázzal történő kábítását követően a nyak átvágásával kivéztettünk és béltartalom, valamint vérmintát gyűjtöttünk elemzésre. A vért centrifugacsövekben fogtuk fel, 20 percen keresztül állni hagytuk, majd a szérumot hűtött centrifugában 10 °C-on 10 percen keresztül 5000/perc fordulatszámra elkülönítettük. A szérumot a vizsgálatokig hűtőszekrényben 5 °C-on tároltuk. A gyűjtött szérumminták ellenanyagtiter-meghatározását a VIRION Kereskedelmi és Szolgáltató Bt. végezte ELISA-módszerrel ID Screen – IBD Indirect Kit (IDVet, Grabels, Franciaország) alkalmazásával, ami IgG és IgM antitesteket mér. Az ileális béltartalom (ileal chymus; IC) és az ileális nyálkahártya (ileal mucosa, IM)

mintákat egy 10 cm hosszú vékonybél szakaszból vettük, 3 cm -rel a Meckel diverticulum után. A vakbél béltartalom mintát (caecal chymus; CC) a bal oldali zsákból vettük. A csípő- és vakbéltartalmat óvatosan, a bél szerkezetének károsodása nélkül toltuk ki steril tárolóba körülbelül 2 g mennyiségben, majd steril szélesztőbotokkal homogenizáltuk. Ezt követően az ileális szakaszt steril, jéghideg foszfátpuffer oldattal (PBS) lemostuk a béltartalom eltávolítása érdekében, majd a nyákot sterilizált üveglappal lekapartuk a bélhám belső faláról. A mintákat homogenizáltuk, majd az összes mintát azonnal lefagyasztottuk folyékony nitrogénben, és körülbelül -80 °C-on tároltuk a vizsgálatokig. A DNS kivonás előtt mintavételi helyenként a 12 mintából ugyanazon ketrec két madarának mintáját egyesítettük. Ennek eredményeként az egyes bélszegmensek mikrobióta elemzését 6 ismétlésben végeztük (Xenovea Kft., 6726 Szeged, Jobb fásor 23. B. ép.). Emellett a Broilact készítmény tényleges mikróba összetételét is meghatároztuk. A kísérlet 40. napján a ketrecek aljára nejlonfóliát terítettünk. Ilyen módon minden ketrecből körülbelül 200 g friss ürüléket gyűjtöttünk, amit megfelelő homogenizálás után -20 °C-on fagyasztva tároltunk a további vizsgálatokig.

### 2.2.3. Vizsgálatok

A mikrobiom és ürülékvizsgálatok menete megegyezett az előző kísérlet során leírtakkal.

### 2.2.4. Statisztikai és bioinformatikai analízis

A termelési paramétereket, a Gumboro-titer értékeket, valamint ürülékminták vizsgált paramétereit kéttényezős varianciaanalízissel elemeztük SPSS 24.0 szoftver (IBM Corp. Released 2015) segítségével, mely során Tukey tesztet használtunk ( $p \leq 0.05$ ). A szekvenciákat a

Quantitative Insights Into Microbial Ecology 2 (QIIME2), 2020.2 verziójú szoftvercsomag (Bolyen et al., 2019) segítségével elemeztük, további feldolgozásunk megegyezett az első kísérlet során leírtakkal. A szekvenciákat operatív taxonómiai egységekbe (OTU) csoportosítottuk vsearch algoritmus nyílt referencia klaszterezéssel, 97% -os hasonlóság alapján a SILVA (132. kiadás) referencia-adatbázissal (Quast et al, 2013). Az alfa-diverzitás-mutatókat (Chao1, Shannon és Simpson) és a béta-diverzitás-mutatókat (Bray – Curtis dissimilarity) a QIIME2-diverzitás és a Calypso (San Francisco, CA, USA) online szoftver (8.84. Verzió; Zakrzewski et al., 2017) segítségével becsültük meg. A minták közötti bakteriótaközösség szerkezetének különbségeinek vizsgálatához a Calypso online szoftver segítségével végeztünk fő koordináta-elemzést (PCoA) Bray–Curtis módszerrel. Az alfa diverzitás mutatóit és a bakterióta összetételt különböző taxonómiai szinteken és különböző bélmintákban (IC, IM és CC) kéttényezős varianciaanalízis segítségével hasonlítottuk össze Tukey HSD teszt használatával, ahol a fő tényezőkként a takarmánykezeléseket (K, B, Br és Sz) és a madarak életkorát (7, 14, 21 és 40 napos) alkalmaztuk. Az egyes mintavételi időpontokat alkalmazó takarmánykezeléseket egytényezős varianciaanalízissel is értékeltük. A szignifikáns különbségnek az FDR  $p < 0,05$  értéket, míg az 0,05 és 0,10 közötti értéket trendnek tekintettük.

### 3. Eredmények és azok értékelése

A termelési paraméterek egyikében sem okoztak változást a kísérleti kezelések az sem indító, sem a nevelő, sem a befejező takarmányozási fázisban. A bélmorfológiai paraméterek tekintetében azonban a búzakorpa kezelés változást okozott, mind a csípőbélben, mind a vakbélben megnövelte a kripták mélységét és az izomréteg vastagságát. A probiotikum kezelések, a búzakorpa és ezek kombinációja sem befolyásolta szignifikánsan a jejunum béltartalom tripszin, lipáz és amiláz aktivitását.

**1. táblázat:** A baktérium nemzetségek relatív gyakorisága 40 napos brojlercsirkék vakbél tartalmában.

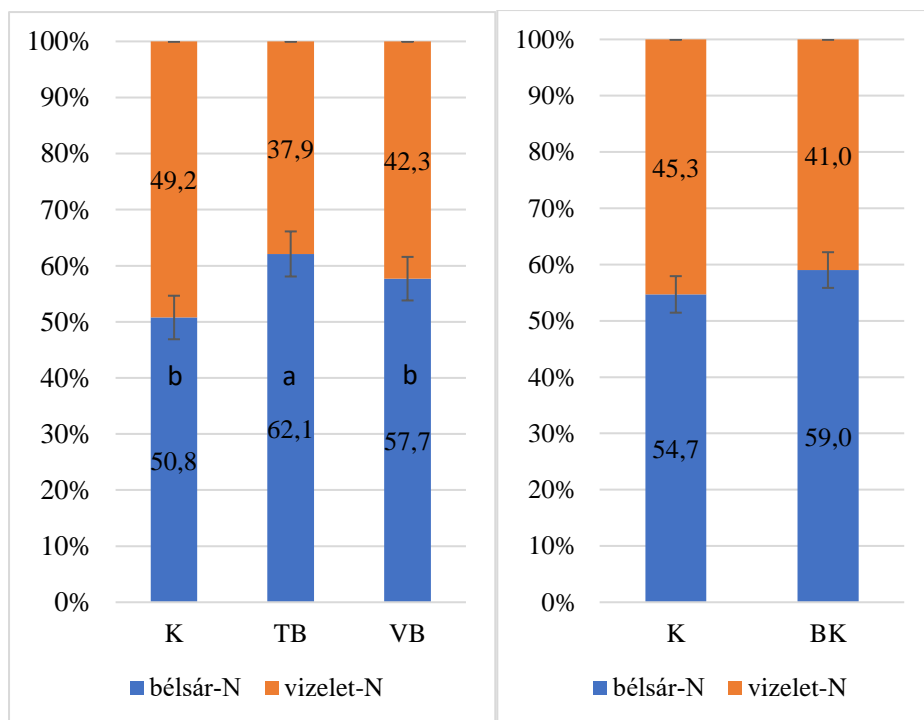
	K	K+VB	BK	BK+VB	SEM	p-érték	q-érték
<i>Bacteroides</i>	54,1	48,1	46,8	48,9	2,37	0,865	0,956
<i>Oscillospira</i>	2,57	1,91	1,43	2,12	0,201	0,521	0,956
<i>Akkermansia</i>	2,17 <sup>a,b</sup>	0,02 <sup>c</sup>	7,77 <sup>a</sup>	1,17 <sup>b</sup>	1,071	<0,001	<b>0,004</b>
<i>Faecalibacterium</i>	2,09	1,88	0,77	1,72	0,25	0,936	0,956
<i>Ruminococcus</i>	1,83	1,5	1,33	1,78	0,143	0,667	0,956
<i>Streptococcus</i>	1,24	1,37	0,9	0,91	0,181	0,813	0,956
<i>Lactobacillus</i>	0,55	0,89	0,94	0,42	0,142	0,469	0,956
<i>Dehalobacterium</i>	0,52	0,71	0,77	0,51	0,1	0,606	0,956
<i>Anaeroplasm</i>	0,11	0,6	0,24	0,31	0,086	0,016	0,106
<i>Clostridium</i>	0,2	0,17	0,31	0,32	0,04	0,895	0,956
<i>Coprococcus</i>	0,24	0,16	0,22	0,22	0,022	0,43	0,956
<i>Butyricoccus</i>	0,31	0,16	0,18	0,19	0,027	0,133	0,663
<i>Turicibacter</i>	0,27	0,23	0,14	0,17	0,028	0,856	0,956
<i>Anaerotruncus</i>	0,41	0,06	0,2	0,09	0,065	0,007	0,072
<i>Blautia</i>	0,2	0,19	0,12	0,15	0,019	0,956	0,956

Az a,b jelzések az átlagok közötti szignifikáns különbséget jelölik. (K) kontroll, (K+VB) vajsavtermelő probiotikum, (BK) búzakorpa, (BK+VB) búzakorpa+vajsavtermelő probiotikum. A q-érték a hamis felfedezési arány (FDR), a p-érték korrekciója Benjamini-Hochberg módszerrel (q<0,05). A statisztikailag szignifikáns értékek félkövér betűvel vannak szedve.

Hasonlóképpen, a kezelések nem változtatták meg a vakbél tartalom illószénsav-tartalmát és pH-ját sem. A csípőbél és a vakbél *Lactobacillus* száma és a vakbél coliform baktérium tartalma nem változott. Másrészt új generációs 16S rRNS szekvenálási technikával vélhetőleg először sikerült kimutatni, hogy brojlercsirkék vakbélében a búzakorpa növelheti az *Akkermansia* nemzetség gyakoriságát.

Mindkét probiotikum kezelés növelte az ürülék szárazanyag-tartalmát és a bélsár-N arányát, míg a búzakorpa jelentősen csökkentette az  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  mennyiségét. Emellett a búzakorpa kiegészítés növelte az ureolitikus baktérium számot, és ez növelte az ammónia felszabadulásának sebességét az ürüleből.

**1. ábra.** Kezelések hatása a bélsár és vizelet N arányára.



Az a,b jelzések az átlagok közötti szignifikáns különbséget jelölik. (K) kontroll, (TB) tejsavtermelő probiotikum, (VB) vajsavtermelő probiotikum, (BK) búzakorpa,



A második kísérletünkben a búzaalapú és a búzakorpa-kiegészítést tartalmazó táp etetése javította a csirkék termelési eredményeit a kontroll, Broilact és szimbiotikum kezeléssel összehasonlítva. A takarmányfogyasztásban nem volt eltérés a kezelések között, a testtömeggyarapodásban és a fajlagos takarmányértékesítésben azonban a búza alapú kezelés eredményei kedvezőbbek voltak.

**2. táblázat:** A kezelések hatása a brojlercsirkék testtömegére és testtömeggyarapodására.

Kezelés	Testtömeg				Testtömeggyarapodás			
	0 nap	7. nap	21. nap	40. nap	Indító	Nevelő	Befejező	Teljes
g/madár								
K	43	260 <sup>b</sup>	1057 <sup>b</sup>	2397 <sup>b</sup>	217 <sup>b</sup>	797	1340 <sup>b</sup>	2354 <sup>b</sup>
B	43	283 <sup>a</sup>	1126 <sup>a</sup>	2553 <sup>a</sup>	239 <sup>a</sup>	843	1427 <sup>a</sup>	2509 <sup>a</sup>
Br	43	256 <sup>b</sup>	1065 <sup>b</sup>	2398 <sup>b</sup>	213 <sup>b</sup>	808	1333 <sup>b</sup>	2355 <sup>b</sup>
Sz	43	260 <sup>b</sup>	1073 <sup>b</sup>	2441 <sup>b</sup>	217 <sup>b</sup>	812	1369 <sup>b</sup>	2398 <sup>b</sup>
SEM	0,07	2,78	9,58	18,57	2,76	7,83	12,69	18,57
<i>p-érték</i>	0,711	<b>0,000</b>	<b>0,035</b>	<b>0,002</b>	<b>0,000</b>	0,196	<b>0,025</b>	<b>0,002</b>

(K) kontroll kezelés, (Br) Broilact kezelés, (B)-búzas kezelés, (Sz)-szimbiotikum kezelés <sup>a, b</sup> Az eltérő betűvel jelzett értékek szignifikáns különbséget jelölnek.

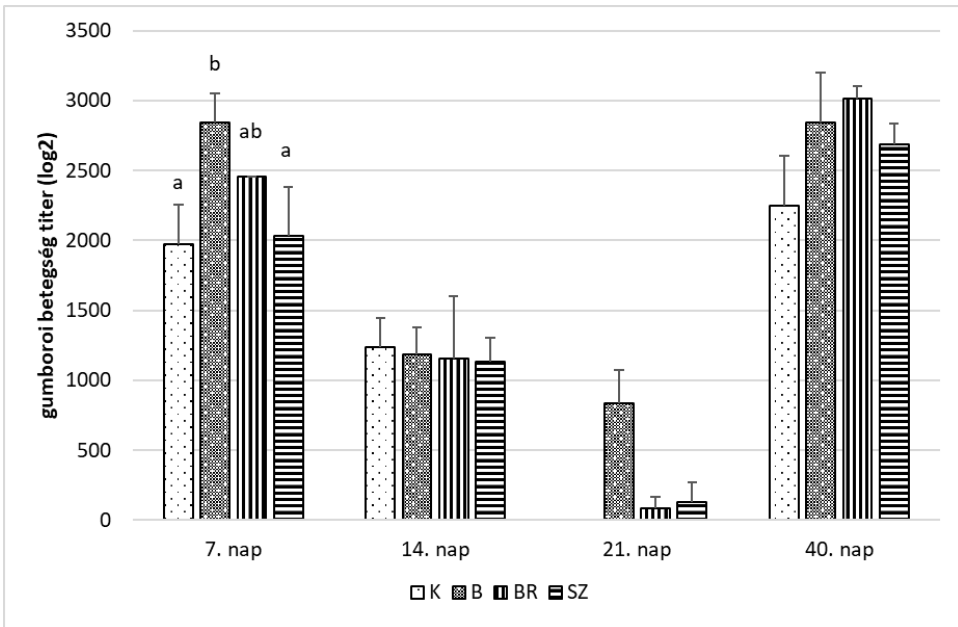
**3. táblázat.** A kezelések hatása a brojlercsirkék takarmány-fogyasztására és takarmányértékesítésére.

Kezelés	Takarmányfogyasztás				Takarmányértékesítés			
	Indító	Nevelő	Befejező	Teljes	Indító	Nevelő	Befejező	Teljes
g/madár					kg/kg			
K	302	1420	2299	4020	1,30 <sup>a</sup>	1,58	1,64 <sup>a</sup>	1,59 <sup>a</sup>
B	298	1452	2164	3913	1,18 <sup>b</sup>	1,52	1,42 <sup>b</sup>	1,43 <sup>b</sup>
Br	304	1451	2284	4038	1,34 <sup>a</sup>	1,59	1,61 <sup>a</sup>	1,58 <sup>a</sup>
Sz	290	1443	2293	4026	1,26 <sup>a</sup>	1,57	1,59 <sup>a</sup>	1,55 <sup>a</sup>
SEM	2,30	10,41	38,25	42,51	0,01	0,009	0,03	0,10
<i>p-érték</i>	0,16	0,702	0,574	0,734	<b>0,003</b>	0,090	<b>0,058</b>	<b>0,026</b>

(K) kontroll kezelés, (Br) Broilact kezelés, (B)-búzas kezelés, (Sz)-szimbiotikum kezelés a, b Az eltérő betűvel jelzett értékek szignifikáns különbséget jelölnek.

Mindegyik pre- és probiotikus kezelés javította a szerokonverziót és a vér Gumboro titereinek CV%-át a kontrollcsoporthoz képest. A búzaalapú takarmánykezelés esetén az anyai antitest-titer érték a 7. napon szignifikánsan magasabb volt, mint a kontrollcsoporté. A legmagasabb humorális antitest titer értékeket a 40. napon a Broilact csoportban mértük, bár ezek a különbségek nem voltak szignifikánsak.

**2. ábra.** A kezelések hatása a vérplazma Gumboro ellenanyag titerek alakulására (átlag  $\pm$  St.hiba).

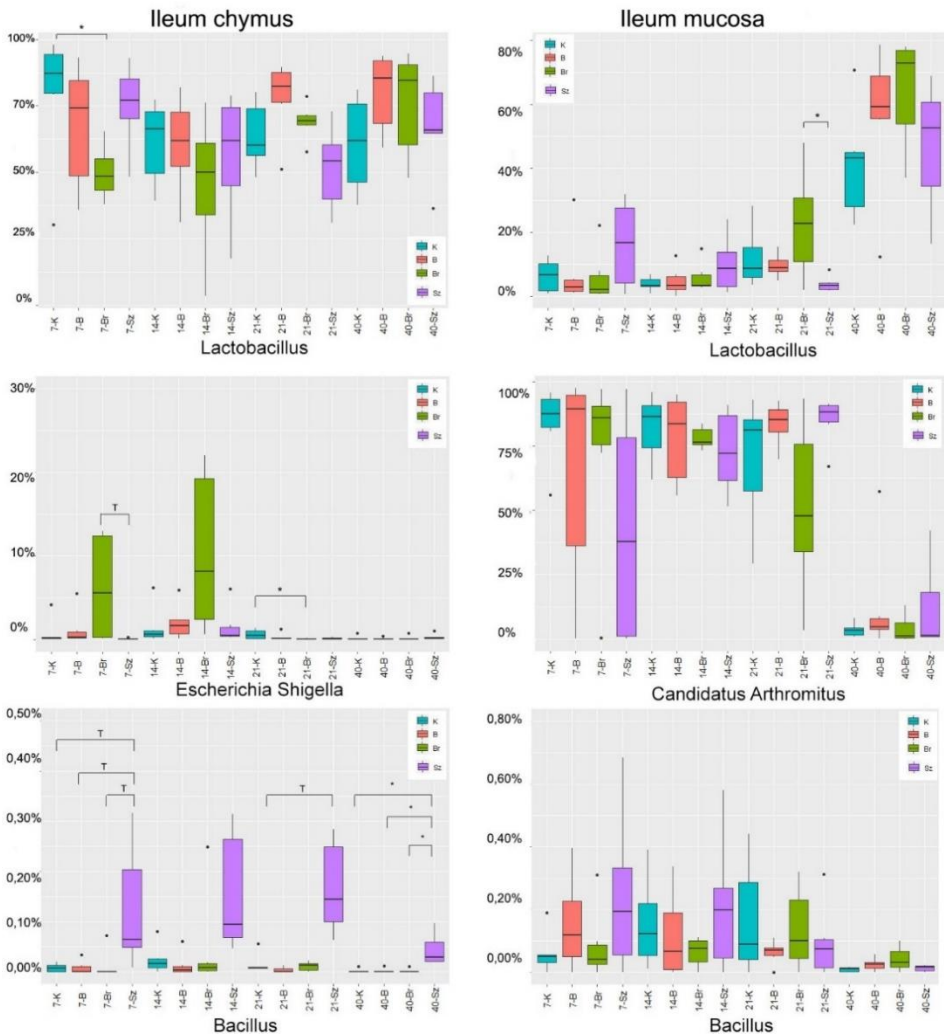


(K) kontroll kezelés, (Br) Broilact kezelés, (B)-búzas kezelés, (Sz)-szimbiotikum kezelés Az <sup>a,b</sup> jelzések az átlagok közötti szignifikáns különbséget jelölik..

Második kísérletünkben bizonyítottuk, hogy a mikrobióta összetételét leginkább befolyásoló tényezők a madarak életkora és a mintavételi hely. A takarmány kezelés hatások kisebbek voltak, és többnyire az első héten

voltak észlelhetők. A mikrobióta diverzitása a madarak életkorával folyamatosan nőtt, kivéve az csípőbél béltartalmát, ahol a harmadik hét végén érte el a maximumát. A másik két mintavételi helyhez képest a Simpson-index szerint a diverzitás variabilitása a csípőbél nyálkahártyában volt a legmagasabb. A három bélszakasz közül az ileum nyálkahártya mikrobiális diverzitása 40 napos kor előtt volt a legalacsonyabb. A vakbél mikrobióta diverzitása a madarak életkorával folyamatosan nőtt, szignifikáns különbség volt látható az egyes napok között. A meghatározó törzs minden bélszakaszban és életkorban a *Firmicutes* volt. Relatív gyakorisága a csípőbél nyálkahártyában volt a legmagasabb. A különböző mintavételi helyeken nem találtunk életkorral összefüggő tendenciát. A *Proteobacteria* törzset mindhárom bélszegmensben alacsonyabb relatív gyakoriság jellemezte, ami az idő múlásával tovább csökkent. Az csípőbél béltartalomban és nyálkahártyában relatív gyakorisága szignifikánsan nagyobb volt a 14. napon ( $p < 0,05$ ), majd később a béltartalomban 1% alá csökkent. Az életkor hatásai mellett csak a csípőbél nyálkahártyájában lévő *Cyanobacteria*-t és a vakbéltartalomban a *Lentisphaerae*-t érintették a takarmány kezelések. Az első esetben a szimbiotikum, a vakbélben pedig a búza alapú kezelés okozott szignifikánsan nagyobb gyakoriságot az említett törzsek esetén. Nemzetség szintjén három esetben, a csípőbél tartalomban az *Enterococcus* (Broilact és szimbiotikum) és a *Bacillus* (szimbiotikum), a vakbélben a *Ruminoclostridium\_5* (búza) nemzetség mutatott szignifikáns növekedést. Az életkor mindhárom mintavételi hely esetében erőteljesebb hatással volt a bakterióta összetételére.

**3. ábra.** A takarmánykezelések és az életkor hatása az csipőbél tartalom (IC) és nyálkahártya (IM) baktérium összetételére nemzetség szinten.



(K) kontroll kezelés, (Br) Broilact kezelés, (B) búzas kezelés, (Sz) szimbiotikum kezelés A pontok a kiugró értékeket jelzik.

Ebben a kísérletben az ürülék szárazanyag-tartalma szignifikánsan megnőtt a búza alapú búzakorpa kiegészítést fogyasztó takarmányozási csoport esetén. Annak ellenére, hogy a búzas kezelés növelte a vizelet N arányát az ürülékben, a szimbiotikum kezelés mintái esetén jegyezzük fel a

legintenzívebb  $\text{NH}_3$  felszabadulást a kezdeti időpontokban. A búzás kezelés esetén az ürülékből való  $\text{NH}_3$  felszabadulás dinamikája lassabb volt. Ennek oka vélhetően az ureolitikus baktériumok eltérő aránya lehet a két kezelés között.

## 4. Következtetések

A két kísérlet eredményeit összevetve megállapíthatjuk, hogy a pre- és probiotikummal kiegészített takarmány etetésének hatása nem elsősorban a termelési paraméterek javulásában nyilvánul meg. Eredményeink alapján a takarmánykiegészítők hatása a bél mikrobióta összetételére is csupán kis mértékű. A bél hisztomorfológiai paraméterek vizsgálata során kapott eredmények alapján a búzakarpa és a probiotikumok csupán kis mértékben ugyan, de befolyásolták a brojlercsirkék béltulajdonságait. A mikrobiótára gyakorolt hatás leginkább a csípőbélben követhető le. Az első kísérlet során kapott eredményekből megállapíthatjuk, hogy a búzakarpa prebiotikumként való alkalmazása nem minden esetben jelenti az illózsírsav termelésért felelős baktériumcsoportok felszaporodását. Második kísérletünk eredményei alapján a mikrobióta összetételét befolyásoló fő tényezők a madarak életkora és a mintavételi hely volt. Ez nem azt jelenti, hogy a pro- és prebiotikumok nem hatékonyak, hanem azt, hogy hatásuk ellenőrzött körülmények között és egészséges állatokban valószínűleg korlátozott. Az első kísérlet eredményeiben bemutattuk, hogy a *Verrucomicrobia* törzs tagja, az *Akkermansia* nemzetség búzakarpa kiegészítés hatására fel tudott szaporodni a vakbélben. Eredményeink azt sugallják, hogy az *Akkermansia* nemzetség kolonizációjának takarmányozással történő elősegítése nemcsak emlősökben, hanem a csirke utóbél szakaszaiban is fontos lehet. A Gumboro-betegség antitest-titer eredményei arra utalnak, hogy a csirkék adaptív immunkompetencia-fejlődését kis mértékben a takarmány összetétele és a takarmánykiegészítők is befolyásolják.

Az első kísérletünk során kapott eredményekből arra lehet következtetni, hogy a búzakorpával kiegészített táp megnövelte az ürülék ureáz aktivitását, és így módosította az ammónia felszabadulásának dinamikáját. A második kísérletünk eredményei ugyancsak megerősítik ezt. Az eredmények azt mutatják, hogy a mikrobiom takarmányozással történő befolyásolása hatékony megoldás lehet a vizelet-N csökkentésére. Vizsgálatunkban a szimbiotikum kezelés csökkentette a vizelet-N arányát az ürülékben, ami kisebb ammónia emissziót eredményez.

## 5. Új tudományos eredmények

1. A kukorica alapú tápok 3, 6 és 6%-os búzakorpa kiegészítése az indító nevelő és befejező takarmányozási fázisban mélyebb kriptákat eredményez a vakbélben.

2. A bél mikrobióta vizsgálat során megállapítottuk, hogy az indító, nevelő és befejező fázisban kukorica alapú tápon 3, 6 és 6% búzakorpa etetésekor a csirkék vakbelében megnövekszik az *Akkermansia* nemzetség aránya.

3. A *Lactobacillus farciminis* ( $5 \times 10^9$  CFU/kg) és *Clostridium butyricum* ( $2,5 \times 10^9$ ) probiotikum kiegészítések hatására szignifikánsan megnőtt az ürülék szárazanyag tartalma, és csökkent az ürülékben a vizelet-N aránya.

4. A 30% búza tartalmú és búzakorpával kiegészített (3, 6 és 6% az indító, nevelő, befejező fázisban) tápok etetése javítja a brojlercsirkék súlygyarapodását és takarmányértékesítését, valamint növelik ürülékben a vizelet eredetű N és az ureolitikus baktériumok arányát a kontrollként használt kukorica alapú tápokhoz képest.

5. A gumборо betegség elleni immunválasz kialakulására gyakorolt hatás vizsgálata során megállapítottuk, hogy a maternális ellenanyagszinteket a búza alapú táp búzakorpa kiegészítéssel magasabban tartja a 7. életnapon. Az ezt követően kialakuló immunválasz-reakciók egyöntetűségét a Broilact ( $1,25 \times 10^7$  CFU/0,5 ml), a szimbiotikum, (*Bacillus subtilis*, DSM17299;  $1,6 \times 10^6$  CFU/g, inulin, 5 g/kg; *Saccharomyces cerevisiae boulardii*,  $1 \times 10^9$  CFU/g) és a búza (30%) + búzakorpa (3, 6 és 6%) kiegészítés egyaránt pozitívan befolyásolják.



## Irodalomjegyzék

1. Apajalahti, J.; *et al.* (2004) Characteristics of the gastrointestinal microbial communities, with special reference to the chicken. *Worlds. Poult. Sci. J.*, 60, 223–232.
2. Thompson, C.L.; *et al.* (2013) Immune-modulating gut symbionts are not “*candidatus* Arthromitus”. *Mucos. Immunol.*, 6, 200–201.
3. Oakley, B.B.; *et al.* (2014) The chicken gastrointestinal microbiome. *FEMS Microbiol. Lett.*, 360, 100–112.
4. Popova, T. Effect of probiotics in poultry for improving meat quality. *Curr. Opin. Food Sci.* 2017, 14, 72–77.
5. Al-Khalaifah, H.S. Benefits of probiotics and/or prebiotics for antibiotic-reduced poultry. *Poult. Sci.* 2018, 97, 3807–3815.
6. Kers, J. G. *et al.* (2018) ‘Host and Environmental Factors Affecting the Intestinal Microbiota in Chickens.’, *Frontiers in microbiology*, 9, p. 235.
7. Quast, C. *et al.* (2013) ‘The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools’, *Nucleic Acids Research*. 41(D1), pp. D590–D596.
8. Peters, B. J. *et al.* (2003) Recommended Methods for Manure Analysis, ASA-CSSA-SSSA ANNUAL MEETING ABSTRACTS. Madison, Wisconsin
9. Santoso, U. *et al.* (1999) ‘Dried *Bacillus subtilis* Culture Reduced Ammonia Gas Release in Poultry House’, *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 12(5), pp. 806–809
10. Zakrzewski, M. *et al.* (2017) ‘Calypso: A user-friendly web-server for mining and visualizing microbiome-environment interactions’, *Bioinformatics*. 33(5), pp. 782–783.
11. Bolyen, E. *et al.* (2019) ‘Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2’, *Nature Biotechnology*. 37(8), pp. 852–857.

## **6. Az értekezés témaköréhez kapcsolódó publikációk**

### **I. Szakcikk idegen nyelvű, impakt faktoros folyóiratban:**

Molnár A.\*, N. **Such\***, V. Farkas, L. Pál, L. Menyhárt, L. Wágner, F. Husvéth, K. Dublec (2020): Effects of Wheat Bran and Clostridium butyricum Supplementation on Cecal Microbiota, Short-Chain Fatty Acid Concentration, pH and Histomorphometry in Broiler Chickens. *Animals*, 10, 2230.

**Such, N.;** Csitári, G.; Stankovics, P.; Wágner, L.; Koltay, I.A.; Farkas, V.; Pál, L.; Strifler, P.; Dublec, K. (2021): Effects of Probiotics and Wheat Bran Supplementation of Broiler Diets on the Ammonia Emission from Excreta. *Animals*, 11, 2703.

**Such, N.;** Farkas, V.; Csitári, G.; Pál, L.; Márton, A.; Menyhárt, L.; Dublec, K. (2021): Relative Effects of Dietary Administration of a Competitive Exclusion Culture and a Synbiotic Product, Age and Sampling Site on Intestinal Microbiota Maturation in Broiler Chickens. *Vet. Sci.* 8, 187.

### **II. Szakcikk idegen nyelvű, referált folyóiratban**

**Such N.,** F. Husvéth, A. Márton, I. A. Koltay, Z. Szokó, K. Dublec (2019): The effect and accumulation of antibiotics and their residues in horticultural plants: a review. *Journal of Central European Agriculture*. 20(1), 431-446

**Such N.,** A. Molnár, V. Farkas, L. Pál, F. Husvéth, I. A. Koltay, M. A. Rawash, Á. Mezőlaki, K. Dublec (2020): Feeding two single strain probiotic bacteria and wheat bran failed to modify the production traits but

altered some gut characteristics in broiler chickens. Journal of Central European Agriculture, 21(3), p.499-507

**Such N.**, V. Farkas, A. Molnár, G. Csitári, L. Pál, M. A. Rawash, I. A. Koltay, F. Husvéth, K. Dublec (2021): The effect of diet composition, a probiotic and a symbiotic treatment on the ileal microbiota composition of one-week-old broiler chickens. Acta Agraria Debreceniensis. 1. 207-213. ISSN: 1587-1282

### **III. Szakcikk anyanyelven referált folyóiratban:**

**Such N.**, Molnár A., Pál L., Farkas V., Menyhárt L., Husvéth F., Dublec K. (2021): Pre- és probiotikum-kezelések kedvező hatása a Gumborobetegség elleni vakcinázás egyes paramétereire brojlercsirkékben. Magyar Állatorvosok Lapja, 143. 119-127.

**Such N.**, Farkas V., Pál L., Koltay I. A., Mezőlaki Á., M. A. Rawash, Husvéth F., Dublec K., Molnár A. (2021): Pecsényecsirke tápok búzakorpa kiegészítésének hatása a vakbél mikrobiom összetételére új generációs szekvenálási módszer alkalmazásával. Állattenyésztés és Takarmányozás, 70. 1. 25-34. ISSN: 0230-1814

### **IV. Konferencia kiadványban teljes terjedelemben megjelent:**

**Such N.**, V. Farkas, I. A. Koltay, M. A. Rawash, K. Dublec, A. Molnár (2019): Wheat bran supplementation increases the abundance of *Akkermansia muciniphila* whereas single strain probiotic *C. butyricum* fails to influence caecal microflora composition of broiler chickens. 18. BOKU-Symp. Anim. Nutr., Wien, ápr. 30., konf. kötet 189-192

**Such N.**, Koltay I. A., M. A. Rawash, Mezőlaki Á., Csitári G., Wágner L., Péterné Farkas E., Molnár A., Dublec K. (2019): Búzakorpa etetésének

hatása a broiler csirke ürülékének ammónia kibocsájtására. XXV. Ifjúsági Tudományos Fórum, május 23. Keszthely

**Such, N.,** I. Koltay, L. Pál, L. Wágner, M. A. Rawash, Á. Mezőlaki, A. Márton, A. Molnár, K. Dublec (2019): Feeding two single strain probiotic bacteria and wheat bran failed to modify the production traits but altered some gut characteristics in broiler chickens. 22nd European Symposium in Poultry Nutrition, 10-13 June. ISBN: 978-83-942760-6-5

**Such, N** (2019): Wheat bran supplementation increase *Akkermansia muciniphila* in the chicken caecum. ConF.e of Agronomy Students, Cacak. Preceedings book. 11. 11.364-372. ISSN: 2334-99883

**Such N.,** V. Farkas, I. A. Koltay, M. A. Rawash, Á. Mezőlaki, L. Pál, F. Husvéth, K. Dublec, A. Molnár (2019): The effect of wheat bran supplementation on the microflora of broiler chickens, 61th. Georgikon Scientific ConF.e, 3-4. october, p 397- 406. ISBN 978-963-396-130-8

**Such N.,** Koltay I. A., Menyhárt L., M. A. Rawash, Molnár A., Mezőlaki Á., Pál L., Dublec K., Farkas V. (2020): Búza és a kukorica alapú tápok etetésének hatása 7 és 14 napos brojlercsirkék bélbakterióta összetételére. XXVI. Ifjúsági Tudományos Fórum, május 21. Keszthely. konferenciakiadvány 1-7. o. ISBN 978-963-396-143-8

#### **V. Konferencia kiadvány összefoglaló kötetében megjelent:**

**Such, N.,** I. Koltay, L. Pál, L. Wágner, M. A. Rawash, Á. Mezőlaki, A. Márton, A. Molnár, K. Dublec (2019): Feeding two single strain probiotic bacteria and wheat bran failed to modify the production traits but altered some gut characteristics in broiler chickens. 22nd European Symposium in Poultry Nutrition, 10-13 June.