

Bacillus spp. kivonatok hatásának vizsgálata csirke ileum explantátum tenyészetén

Tráj Patrik^{1,2*}, Dudás Réka¹, Márton Rege Anna^{1,3}, Sebők Csilla¹, Mackei Máté^{1,3}, Neogrády Zsuzsanna¹, Kemény Ágnes¹, Varga Krisztina², Bohár Gyula³, Mátis Gábor^{1,3}

¹Állatorvostudományi Egyetem, Élettani és Biokémiai Tanszék, Biokémiai Osztály, Budapest, Magyarország

²Biovéd 2005 Kft., Pinkamindszent, Magyarország

³Fertőző Állatbetegségek, Antimikrobiális Rezisztencia, Állatorvosi Közegészségügy és Élelmiszerlánc-biztonság Nemzeti Laboratóriuma, Állatorvostudományi Egyetem, Budapest, Magyarország

*Levelező szerző, e-mail: traj.patrik@univet.hu

Beérkezett: 2025. augusztus 14.; elfogadva: 2026. január 13.

Összefoglalás

A brojlercsirkék intenzív tartása hajlamossítja az állatokat a stresszre és a fertőző betegségekre. Az EU-ban tiltott profilaktikus antibiotikum-használat és hozamfokozás helyett, kompenzálva az előbbieket kártételét, előtérbe kerültek a természetes alternatívák, például a pre-, pro- és posztbiotikumok. Vizsgálatunkban *Bacillus licheniformis* és *Bacillus mojavensis* kivonatok hatását teszteltük egy újonnan alkalmazott, háromhetes csirkék ileumából származó explantátum modellen. A gyulladást poliinozin-policitidilsavval (poly I:C) váltottuk ki, így került összevetésre az LDH, IL-1 β , IFN- γ , RANTES, MDA és kaszpáz-3 paraméterek szintjében megmutatózó hatás a kivonatokkal is kezelt, kombinált csoportoknál. A 0,6 százalékos *B. licheniformis* kiegészítés csökkentette az IL-1 β - és az IFN- γ -koncentrációt, valamint 3 százalékos koncentrációban növelte a kaszpáz-3-szintet. Az utóbbi koncentrációban a *B. mojavensis* poly I:C-vel együtt emelte az MDA értékét. Eredményeink szerint a *B. licheniformis* törzs gyulladáscsökkentő és pro-apoptotikus hatással bírhat, illetve a felhasznált explantátummodell alkalmas lehet metabolitok és kivonatok hatásainak célzott *in vitro* vizsgálatára.

Kulcsszavak: *Bacillus* spp., explantátum, immunomoduláció, poly I:C, baromfi

The effect of *Bacillus* spp. extracts on a chicken ileal explant model

Patrik Tráj^{1,2}, Réka Dudás¹, Anna Márton Rege^{1,3}, Csilla Sebők¹, Máté Mackei^{1,3}, Zsuzsanna Neogrády¹, Ágnes Kemény¹, Krisztina Varga², Gyula Bohár³, Gábor Mátis^{1,3}

¹Division of Biochemistry, Department of Physiology and Biochemistry,

University of Veterinary Medicine, Budapest, Hungary

²Biovéd 2005 Ltd., Pinkamindszent, Hungary

³National Laboratory of Infectious Animal Diseases, Antimicrobial Resistance, Veterinary Public Health and Food Chain Safety, University of Veterinary Medicine, Budapest, Hungary

Summary

During broiler breeding, the main goal is to produce products that meet market demands in the shortest possible time. The extremely intensive farming practices can stress the animals, and predispose them to multifactorial diseases. Since the use of antibiotics for prophylactic and growth-promoting purposes in farm animals has been banned in the European Union, more attention has been given to alternative, natural growth promoters, including probiotics. These substances influence the composition of the microbiota and affect the response of the immune system to pathogens and inflammation. The exact mechanism of action of probiotics is not yet fully understood.

The aim of our study was to examine the effects of extracts originating from two strains of *Bacillus licheniformis* (NCAIM 334/2017 strain) and *Bacillus mojavensis* (NCAIM 497/2020 strain) on chicken ileal explants isolated

from 3-week-old broiler chicken. The explants were cultured for 12 hours in DMEM F12 medium supplemented with 0.6% and 3% *Bacillus licheniformis* and *Bacillus mojavensis* extracts formulated with dextrose and dextrose control groups, respectively. To induce an inflammatory response, the cultures were treated with 50 µg/ml of polyinosinic-polycytidylic acid (poly I:C, viral nucleic acid analogue) combined with the previous treatments. At the end of the experiment, the metabolic activity of the cells was examined by CCK-8 assay. In addition, lactate dehydrogenase (LDH) activity, interleukin-1β (IL-1β), interferon-γ (IFN-γ) and Regulated on Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted (RANTES) proinflammatory cytokine concentrations were measured from the medium. Concentrations of malondialdehyde (MDA) as redox parameter and that of cell death marker caspase-3 were determined from cell lysates. The poly I:C treatment significantly reduced the metabolic activity of the explants and the LDH activity in the medium. *Bacillus* treatments had no effect on these parameters. Compared to the poly I:C-treated inflammatory group, *Bacillus licheniformis* at a concentration of 0.6% significantly reduced the levels of IFN-γ and IL-1β cytokines and at a concentration of 3% significantly increased caspase-3 concentration of the cells. The combined treatment of poly I:C with *Bacillus mojavensis* at a concentration of 3% significantly increased the MDA level. Based on the results, the applied *Bacillus licheniformis* extract had anti-inflammatory effect and could promote apoptosis of the cells under inflammation related cell damage. In contrast, *Bacillus mojavensis* at a concentration of 3% showed a prooxidant effect. Further studies are needed to gain a more precise understanding of the effects of the investigated *Bacillus* species and strains.

Keywords: *Bacillus* spp., explant, immunomodulation, poly I:C, poultry

Irodalmi áttekintés

Az állati eredetű élelmiszerek iránti kereslet a Föld népességének növekedésével együtt világszerte rohamosan növekszik. A baromfihús a legnépszerűbb fehérjeforrás világszerte, köszönhetően annak, hogy viszonylag könnyen elérhető, olcsó, és jelenlegi ismereteink szerint egészséges hústípusnak számít (Magdelaine-Spiess-Valceschini 2008; Connolly et al. 2022). A baromfiiparnak egyre nagyobb mennyiségeket kell termelnie úgy, hogy mindeközben a minőség se szenvedjen kárt. Ugyanakkor a fogyasztók védelmében egyre szigorúbb élelmiszer-higiéniai elvárásokat támasztanak a termékkel szemben (Pope-Cherry 2000). A baromfitartás során a brojlercsirkék általában számottevő stressznek vannak kitéve, különösen, ha nagy állománysűrűséggel nevelik őket, ami megviseli a szervezetet, és az immunrendszer működési zavarát eredményezi (Kridtayopas et al. 2019). Ez csökkenti az állatok növekedési erélyét, és bélműködési zavarokat okoz, aminek következtében romlik a takarmányhasznosulás. Ezáltal jelentősen növekednek az állattartó telepi költségek (Zhang et al. 2022). Az Európai Unióban 2006. január 1-jén betiltották az antibiotikumok hozamfokozó szerként való használatát. Ennek eredményeként – a termelés növelése és az állatok egészségének megőrzése érdekében – a jó tartástechnológián és a higiéniai előírások betartásán kívül hangsúlyossá vált az alternatív, hozamfokozásra alkalmas készítmények alkalmazása. Gazdasági és élelmiszer-biztonsági jelentősége miatt széles körben kutatott témáról van szó (Truszczyński-Pejsak 2006; Biernasiak-Slizewska-Libudzisz 2010; ESVAC 2017; Mehdi et al. 2018; Roth et al. 2019).

Az emésztőkészülék elsődleges feladata a táplálék megemésztése és a tápanyagok felszívása. Mivel ezáltal állandó kapcsolatban van a külvilággal, fontos immunológiai feladat is hárul rá, jelentős szereppel bír a patogén kórokozók elleni küzdelemben. A kórokozó baktériu-

mok képesek helyben, a bél sejtjein keresztül, illetve a bélből a szisztémás keringésbe jutva károsítani az állat egészségét (Johansson et al. 2011).

A *Bacillus licheniformis* (*B. licheniformis*) egy savval és magas hőmérséklettel szemben ellenálló, spóráképző Gram pozitív baktérium. Ezek a tulajdonságai nagymértékben elősegítik állatgyógyászati célú felhasználását (Konieczka et al. 2018). A *B. licheniformis* számos biológiailag aktív anyagot, antimikrobiális peptidet termel. Bevitelét önmagában vagy más probiotikumokkal kombinálva összefüggésbe hozták a bélmikrobióta összetételének megváltoztatásával, antimikrobiális aktivitással, növekedésserkentő, gyulladáscsökkentő és immunstimuláló hatásokkal, valamint a stressztűrő képesség javításával (Wang et al. 2021). A *B. licheniformis* növeli a bélbarrier integritását azáltal, hogy fokozza a tight junction fehérjék génexpresszióját, illetve serkenti a mucintermelést (Zhou et al. 2016; Zuo et al. 2020; Haque et al. 2021). A mikrobióta összetételét is képes befolyásolni, serkenti a Lactobacillus és a Firmicutes fajok szaporodását (Chen-Yu 2020). A mikrobióta modulálása által képes mérsékelni fakultatív és obligát patogén mikroorganizmusok, mint a Clostridium, Salmonella, Streptococcus nemzetségekbe tartozó fajok megtelepedését és kártételét (Zhou et al. 2016; Zuo et al. 2020; Haque et al. 2021). Növekedésserkentő tulajdonsága az általa termelt enzimekből fakad (proteáz, lipáz és amiláz), amelyek segítik a tápanyagok lebomlását és felszívódását, ezáltal a takarmány hasznosulását (Rozs et al. 2001).

A *Bacillus mojavensis* (*B. mojavensis*) egy elsőként sivatagi talajmintából azonosított baktérium, amelyről később kiderült, hogy szoros rokonságban áll a *Bacillus subtilis*-szel. A két baktérium zsírsavösszetétele és DNS-szekvenciája csupán minimális különbséget mutat, metabolikus jellemzőik megegyeznek (Roberts-Nakamura-Cohan 1994). Mivel a két törzs rendkívül hasonló, feltételezhető, hogy a *B. mojavensis* is hasonló biológiai tulajdonságokkal rendelkezik, mint a *B. subtilis*, ezért az

által termelt, biológiailag aktív másodlagos metabolitok ígéretesnek tűnnek a mezőgazdaságban, az élelmiszeriparban, valamint az állattenyésztésben is. A jelenlegi kutatások a *B. mojavensis* által termelt másodlagos anyagcseretermékek megismerésére, ezek biokémiai tulajdonságaira irányulnak. Számos baktériumfajhoz hasonlóan a *B. mojavensis* is képes többféle lipopeptid tenzid termelésére, mint például a surfactin, az iturin és a fengycin. Ezek olyan felületaktív anyagok, amelyek képesek megbontani a foszfolipid membránok szerkezetét, ebből adódóan erős gomba-, baktérium- és vírusellenes hatással bírnak. Ezenfelül képesek megelőzni a biofilmek kialakulását, vagy a már meglévő biofilmeket bontani (Yousef-Ali et al. 2014).

Az *ex vivo* explantátumtenyészeteket az állatkísérletek és a sejttenyészet előnyeit egyaránt felmutató modellrendszerként fejlesztették ki az 1950-es években. Általuk lehetővé vált a célszerv és -szövet fiziológiás működésének és kóros állapotainak tanulmányozása (Randall-Turton-Foster 2011). Kezdetben a tápanyagok felszívódásának mechanizmusát tanulmányozták *in vitro* körülmények között embrionális eredetű bélszakaszokon, majd 1959-ben Trowell érett szöveteket kezdett el tenyésztetni szintetikus médiumban (Wilson-Wiseman 1954; Trowell 1959). Tíz évvel később Trowell módszere alapján Browning és Trier sikeresen hozott létre vékonybél-nyálkahártya *ex vivo* kultúrát (Browning-Trier 1969). Napjainkban mind a humán, mind az állatorvosi kutatásban alkalmaznak bélexplantátumokat. A modell lehetővé teszi különböző anyagok hatásainak közvetlen vizsgálatát. Így például explantátumtenyészeteken írták le a gliadin oktani szerepét az emberi cöliákia hátterében, illetve a modell jelentősen előmozdította a bélben zajló gyulladásos válasz megértését más betegségek, például az IBD esetében is (Randall-Turton-Foster 2011).

A modell komoly hátránya, hogy a szövet rendkívül gyorsan károsodik (Randall-Turton-Foster 2011). A tenyésztés legkritikusabb pontja az oxigéndús környezet, illetve a folyadék, a szövet és a levegő határfelületeinek viszonya, ugyanis a sejtnekrózist elsősorban az anoxia okozza (Costa-Harding-Hill 2016). Szintén hátrány, hogy explantátumokat alkalmazva nem alakítható ki nagyszámú kezelési csoport. A tenyésztés hátrányainak leküzdésére megoldás lehet a szövetminták méretének csökkentése (Bareiss et al. 2008; Neckel et al. 2016). Ezt igazolva a szerzők leírták, hogy 1,5 mm-es csirkeileum-eredetű explantátumok tizenkét óráig eltarthatók konvencionális sejttenyésztő termosztátban is légköri parciális oxigénnyomáson, és gyulladás váltható ki rajtuk patogén asszociált molekuláris mintázatokkal (PAMP) történő stimulációval (Mátis et al. 2025).

A nagyüzemi állattartásban a probiotikumok szakszerűen alkalmazva képesek javítani a baromfi növekedési erélyét, a takarmányfelvételt és a takarmány hasznosulását, valamint ezek által a vágóhídon a húskihozatal és -minőséget. A baromfihús termelése során a takarmányozás jelenti a legnagyobb költséget, így a takarmány

hasznosulásának javulása számottevően növelheti a termelés gazdaságosságát (Shim et al. 2012; Abdel-Rahman et al. 2013; Mookiah et al. 2014; Zhang-Kim 2014; Lei et al. 2015). Számos probiotikum bír ilyen jellegű hatással, de pontos hatásmechanizmusuk megismerése érdekében további vizsgálatok szükségesek.

Kutatásunk a Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteményében (NCAIM) nyilvántartott *Bacillus mojavensis* (NCAIM 497/2020 törzs) és *Bacillus licheniformis* (NCAIM 334/2017 törzs) hatásainak vizsgálatára szorított. Munkánk során csirkeileum-eredetű explantátum modelleket használtunk, amelyeket dextrózzal kiegészített DMEM F12 tápfolyadékban tenyésztettünk, valamint kombinált kezelési csoportokat kialakítva poliinozin-policitidilsavat (poly I:C), virális nukleinsav-analógot adtunk a tápfolyadékhoz a gyulladásos folyamatok kiváltására. A baktériumtörzsek potenciális gyulladáscsökkentő hatását proinflammatorikus citokinek, az IL-1 β -, IFN- γ - és RANTES-koncentráció mérésével követtük nyomon. Emellett a sejtek metabolikus aktivitását a termelt NADH+H⁺, a sejtmembrán épességét az extracelluláris LDH-aktivitás, a gyulladás által kiváltott oxidatív stressz mértékét az MDA, végül a gyulladás kiváltotta apoptózist (programozott sejthalált) a kaszpáz-3 koncentrációjának mérésével vizsgáltuk, hogy pontosabb képet kapjunk a kivonatok hatásairól.

Anyag és módszer

A kísérlethez használt állatok, a szövetminta izolálása, az explantátumok kimetszése

A kutatáshoz háromhetes, hímivarú Ross-308 brojler hibridet használtunk. Az állatok kezelése az Európai Unió állatjóléti jogszabályainak és intézményi szabályzatának megfelelően, a Budapesti Állatorvostudományi Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottságának jóváhagyásával történt. A madarakat a ROSS Technology útmutatásai szerint tartottuk és takarmányoztuk. A kísérletet a Zala megyei Kormányhivatal Élelmiszerlánc-biztonsági, Növényvédelmi és Talajvédelmi Igazgatósága engedélyezte (engedélyszám: GK-419/2020).

A madarakat CO₂-os kábítást követően dekaptáltuk, elvéreztettük, majd hátfekvésben rögzítettük. Ezt követően a testüreget aszeptikusan megnyitottuk, felkerestük a Meckel-divertikulumot, és attól körülbelül 10 cm-re disztálisan kimetszettünk egy 15 cm-es szakaszt a csípőbélből. A bélszakasz felületéről kézzel távolítottuk el a zsírszövetet, majd penicillin- és sztreptomycin-oldattal 1%-ban kiegészített foszfáttal pufferolt sóoldattal (PBS + Pen-Strep) (Gibco, Waltham, MA, USA) mostuk át az eltávolított bélszakaszt mindkét irányból. A bélszakaszt hosszirányban kettévágtuk a mesenterialis oldal mentén, majd háromszor átmostuk PBS + Pen-Strep oldattal, így a szemmel látható fizikai szennyeződések eltávolítottak. Ezt követően a kiterített béldarabot hosszanti irányban négy részre vágtuk. A bélszakaszokat friss, +4 °C-os

PBS + Pen-Strep oldatba helyeztük. Mielőtt kimetszetjük az explantátumokat, előkészítettünk egy 96 lyukú tenyésztőedényt (Greiner Bio-One Hungary Kft., Mosonmagyaróvár, Magyarország), amelyet előzetesen I. típusú kollagénnel (10 g/cm²) vontunk be. A lemezen a szükséges lyukakat 200 µl tápfolyadékkal töltöttük fel, szintén az explantátumok kimetszését megelőzően. A kísérlet során a Dulbecco's Minimal Essential Medium-F12 (DMEM F12) tápoldatát használtuk, amelyet 2,5% magzati borjúsavóval (FBS), 1% glutaminnal, 1% penicillin- és sztreptomycin-oldattal és egy HCM TM Single-Quots™ Kittel (Biocenter Laboratóriumi Szolgáltató Kft., Szeged, Magyarország) egészítettünk ki. A kit aszkorbinsavat, szarvasmarha szérumalbumint, transzferrint, humán epidermális növekedési faktort (hEGF), inzulint, gentamicint és amfotericin-B-t tartalmazott.

Az egyik bélszakaszt jéggel hűtött üveglapra helyeztük nyálkahártyával felfelé, majd ezt egyenletesen kiterítettük, és az adhéziós erőt kihasználva két tárgylemez segítségével a két rövidebbik oldalánál az üveglaphoz rögzítettük. A minták kimetszése közben a bélszakasz felületét is rendszeresen mostuk +4 °C-os PBS + Pen-Strep oldattal, hogy nedvesen tartsuk a szövetet. Az explantátumok kimetszését biopsziás körkésekkel végeztük (MDE GmbH, Heidelberg, Németország). A körkést merőlegesen a bélszakaszra nyomva, körkörös mozdulatokkal végeztük a kimetszést, majd a kinyert darabot az eszköz dugattyújával közvetlenül az előkészített, 200 µl tápoldattal feltöltött lyukakba tettük. A mintavevő körkést a 10. minta vétele után minden esetben lecseréltük. Az explantátumokat 37 °C-on tenyésztettük 5% CO₂ jelenlétében. Az explantátumok kimetszéséhez és tenyésztéséhez használt vegyszereket és eszközöket a Merck KGaA-tól szereztük be (Darmstadt, Németország), egyéb esetben azok forrását külön feltüntettük.

B. licheniformis és *B. mojavensis* kivonatok

A formulázott baktériumkivonatok a Biovéd 2005 Kft. pinkaminszenti laboratóriuma állítja elő. Az alapanyagként szolgáló, a vállalatnál használt *Bacillus* törzsek a Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteményében (NCAIM) a következő azonosítószámok alatt vannak nyilvántartva: 1. *Bacillus mojavensis* (NCAIM 497/2020 törzs); 2. *Bacillus licheniformis* (NCAIM 334/2017 törzs).

A folyamat a Biovéd 2005 Kft. formulázási eljárása szerint zajlik. Egy magas telepképző egység számú baktériumszuszpenzióból készített szárított porból végezzük a kivonat előállítását, amely por a felszaporított baktériumsejteket, egy szilikáttartalmú hordozóanyagot és a fermentlé szárazanyag-tartalmát is magában foglalja. A port 70%-os etanololdatban feloldva a nyert szuszpenziót keverésnek és ráztatásnak tesszük ki. A nyert kivonatot 2 µm-es pórusnagyságú szűrőn szűrjük át, majd a nyert oldatból centrifugálással ülepítjük ki a visszamaradt baktériumsejteket. A végső oldatot dextróz-monohidrát-

ra szárítjuk rá, majd a kapott anyagot finomra őröljük, így jutunk a formulázott, a baktériumkivonatot és a felülülő szárazanyag frakcióját tartalmazó végső termékhez. A cikkben az egyszerűség kedvéért erre „kivonat” néven hivatkozunk.

Az explantátumok tenyésztése és kezelése

Az 1,5 mm átmérőjű explantátumokat 96 lyukú lemezen 200 µl tápoldatba helyeztük. A kísérlet során egy 0,6 m/m % és 3 m/m % dextrózzal kezelt kontrollcsoportot (C2, C3) hoztunk létre, valamint kialakítottunk egy-egy 0,6 m/m % és 3 m/m % dextrózos *B. licheniformis* (LIC2, LIC3) kivonattal, illetve 0,6 m/m % és 3 m/m % dextrózos *B. mojavensis* (MOJ2, MOJ3) kivonattal kezelt csoportot. A többi csoportnál gyulladáskeltő kezelést is használtunk: 50 µg/ml poly I:C-vel kezeltük az explantátumokat. Így jöttek létre a 0,6 m/m % és 3 m/m % dextrózzal és poly I:C-vel kezelt gyulladáscsoportok (PC2, PC3), valamint a 0,6 m/m % és 3 m/m % dextrózos *B. licheniformis* kivonat és poly I:C kezelt (PLIC2, PLIC3), illetve 0,6 m/m % és 3 m/m % dextrózos *B. mojavensis* kivonat és poly I:C kezelt (PMOJ2, PMOJ3) kombinált csoportok. A tápfolyadékot tizenkét óra után eltávolítottuk, és -80 °C-on tároltuk a további mérések elvégzéséig.

Az egyes dextrózos kivonatokkal végzett kezeléseket kontrolljaként vegytiszta dextróz szolgál, hogy a dextróz kiváltotta biológiai hatást elkülönítsük a baktériumanyagcseretermékek és -alkotók kiváltotta hatástól. A LIC2, MOJ2, PLIC2, PMOJ2 kezeléseknél a tápfolyadék 0,6 m/m %-ban tartalmaz dextrózos kivonatot; kontrollként a C2 dextrózos csoport szolgál, amely 0,6 m/m % dextrózt tartalmaz. A LIC3, MOJ3, PLIC3, PMOJ3 kezeléseknél a tápfolyadék 3 m/m %-ban tartalmaz dextrózos kivonatot; kontrollként a C3 dextrózos csoport szolgál, amely 3 m/m % dextrózt tartalmaz. Az egyszerűség kedvéért az oldatok koncentrációját m/m % helyett a továbbiakban % jellel jelöljük.

Mérések

Metabolikus aktivitás mérése

Az explantátumok metabolikus aktivitását CCK-8 teszttel mértük (Cell counting Kit-8, Dojindo Molecular Technologies, Rockville, MD, Egyesült Államok). Az explantátumokra tíz rész friss, szintelen DMEM F12 tápoldatot pipettáztunk egy rész CCK-8 reagenssel kiegészítve. A reakció alapja, hogy a képződött NAD(P)H+H⁺ a CCK-8 reagensben található WST-8-at (Water Soluble Tetrasolium Salt) formazánná redukálja, amely egy narancsszínű termék. A mérés eredményéből a celluláris katabolikus folyamatok intenzitására, azaz metabolikus aktivitására tudunk következtetni, ugyanis a képződött formazán mennyisége egyenesen arányos a termelődő NAD(P)H+H⁺ mennyiségével, így a színin-

tenzitás is a sejtek metabolikus aktivitásával arányosan emelkedik. Egy óra normál tenyésztési körülmények között történő inkubálás után egy 96 lyukú üres lemezre 100 μ L-t mértünk ki a tápoldatból, majd a gyártó utasításainak megfelelően 450 nm-en megmértük az abszorbanciát minden egyes vizsgált lyuk esetében, Multiskan GO 3.2 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, Egyesült Államok) készüléket használva.

Extracelluláris laktát-dehidrogenáz (LDH) aktivitás mérése

Az LDH-mérés adataiból tudunk következtetni a sejtmembrán állapotára. Ha a membrán károsodik, akkor LDH és egyéb intracelluláris enzimek szabadulnak fel, és a tápoldatba kerülnek. Ennek vizsgálatára az extracelluláris LDH enzimaktivitás fotometriás mérését végeztük el a tápoldatból. A paraméter mérésére a Lactate Dehydrogenase Activity Assay Kitet használtuk (Merck KGaA, Darmstadt, Németország). Az enzim a NAD⁺-ot NADH+H⁺-ra redukálja, amely 450 nm-en detektálható fotometrius leolvasókészülék segítségével. 50 μ L LDH Assay Pufferrel hígított mintát mértünk 96 lyukú lemezekre, majd 50 μ L frissen készített Master Reaction Mix-szel elegyítettük. Két perc 37 °C-on történő inkubáció után az abszorbanciát először 450 nm-en mértük Multiskan GO 3.2 olvasóval (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, Egyesült Államok). Ötpercenként addig végeztük a leolvasást, amíg a legaktívabb minta abszorbanciája meg nem haladta a legmagasabb standard értékét.

Malondialdehid-koncentráció (MDA) meghatározása

A sejt-lizátum hígítását és centrifugálását követően végeztük el az intracelluláris MDA koncentráció mérését. Ez a módszer a lipidperoxidáció mértékének meghatározására szolgál, és kolometriás teszttel végezhető el. A mérést a gyártó (Merck KGaA, Darmstadt, Németország) utasításai szerint végeztük el. 300 μ L tiobarbitursavat kevertünk lizátummintáink felülúszójának 100 μ L-éhez, és a gyártó utasításának megfelelően 95 °C-on egy óráig inkubáltuk, majd tíz percig jégen hűtöttük. Ezt követően 532 nm-en mértük a kapott oldat abszorbanciáját Multiskan GO 3.2 készülékkel.

Interleukin-1 β (IL-1 β) koncentráció meghatározása

Az interleukin-1 β (IL-1 β) koncentrációját csirkespecifikus szendvics ELISA kit felhasználásával határoztuk meg (MyBioSource, San Diego, CA, Egyesült Államok), a gyártó előírásainak megfelelően. Az ELISA-próba elveinek megfelelően a vizsgált interleukin a lemez felszínéhez kötött ellenanyaghoz kötődött. A reakció specifi-

tása érdekében egy biotinnal konjugált másodlagos ellenanyagot vittünk fel a lemezre, majd ráértük az avidinnel kapcsolt konjugátumot. Ezt követően a hozzáadott színreagens színes terméket ad. A szín intenzitása 450 nm-en fotometriásan mérhető. A mérést Multiskan GO 3.2 készülékkel végeztük.

Interferon- γ (IFN- γ) és RANTES koncentráció meghatározása

Az interferon- γ (IFN- γ) és a RANTES koncentrációjának meghatározása Luminex xMAP módszerrel történt. Az egyes fehérjék koncentrációjának mérésére Milliplex Chicken Cytokine/Chemokine panel került felhasználásra (katalógusszám: GCYT1-16 K, Merck KGaA, Darmstadt, Németország), betartva a gyártó utasításait. A minták, a standardok és a kontrollok egy 96 lyukú lemezre kerültek felmérésre. Minden lyukba további 25 μ L, primer antitestekkel bevont gyöngyosorozatot adtunk. A mosási és overnight inkubációs lépések után biotinilált antitestkeveréket és fikoeritrin-konjugált streptavidint mértünk rá a lemezre. A gyöngyök adta fluoreszcenciát Luminex MAGPIX® műszerrel mértük (Luminex Corporation, Austin, TX, Egyesült Államok). A nyers adatok feldolgozása a Luminex xPonent 4.2 szoftver segítségével történt. A 0,6% és 3% dextrózos *B. mojavensis* (MOJ2, MOJ3) kivonattal kezelt csoport, valamint a 0,6% és 3% dextrózos *B. mojavensis* kivonat és poly I:C kezelt (PMOJ2, PMOJ3) kombinált csoport mintáinak vizsgálatát az IFN- γ és RANTES koncentráció meghatározása során nem ítéltük szükségesnek, mivel az általunk mért paraméterek esetében nem mutattak gyulladáscsökkentő, antioxidáns, illetve antiapoptotikus hatást.

A kaszpáz-3 koncentráció meghatározása

Az apoptózis mértékének vizsgálatához a sejt-lizátum-mintákból határoztuk meg az aktív kaszpáz-3 koncentrációját. Csirkespecifikus kaszpáz-3 ELISA kitet használtunk (MyBioSource, San Diego, CA, Egyesült Államok), a gyártó utasításai szerint. Az abszorbanciát 450 nm-en mértük, Multiskan GO 3.2 olvasóval.

Statisztika

A statisztikai elemzést az R core Team program 4.0.4-es verziójával (R Core Team, 2020) végeztük. Az eredményeket oszlopdiagramon ábráztuk a GraphPad Prism szoftver alkalmazásával, átlagértékként és az átlag standard hibájaként (SEM). A kapott adatok eloszlását Q-Q plottal vizsgáltuk. A *B. licheniformis* (LIC2, LIC3) és *B. mojavensis* (MOJ2, MOJ3) kivonattal kezelt csoportokat a csak dextrózzal kezelt csoportok (C2, C3) átlagához hasonlítottuk, míg a poly I:C kezelt csoportok (PC2, PC3) szolgáltak a poly I:C-vel és *B. licheniformis* kivo-

nattal (PLIC2, PLIC3), valamint a poly I:C-vel és *B. mojavensis* kivonattal (PMOJ2, PMOJ3) kezelt, kombinált kezelési csoportok kontrolljaként. A csoportok átlagainak összehasonlítására Wilcoxon-féle rangpróbát alkalmaztunk. A középértékek közötti eltérést szignifikánsnak tekintettük abban az esetben, ha a p-érték 0,05 vagy kisebb volt.

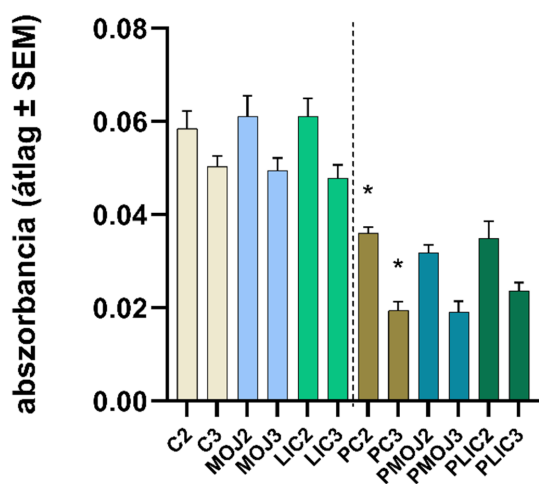
Eredmények

50 µg/ml koncentrációban a poly I:C-t a tápfolyadékhoz adva az explantátumok metabolikus aktivitása szignifikánsan csökkent (p=0,012) 0,6% és 3% dextrózkiegészítés esetén is. A *Bacillus*-kezelések egyik esetben sem befolyásolták szignifikánsan a metabolikus aktivitást (lásd 1. ábra).

A sejtmembrán károsodása során felszabaduló extracelluláris laktát-dehidrogenáz aktivitását az 50 µg/ml koncentrációban alkalmazott poly I:C kezelés 0,6% (p=0,016) és 3% (p=0,032) dextróz mellett egyaránt szignifikánsan csökkentette. A *Bacillus*-kezelések esetében nem figyeltünk meg szignifikáns változást (2. ábra).

Az IL-1β gyulladáscsökkentő citokin koncentrációját 0,6% dextrózkiegészítés mellett a *B. mojavensis* kivonat szignifikánsan emelte (p=0,032), míg 50 µg/ml koncentrációban a tápfolyadékhoz adott poly I:C is emelő hatású volt (p=0,029). A poly I:C-vel kezelt kontrollhoz képest a poly I:C-vel kombinált kezelésben alkalmazott 0,6%-os

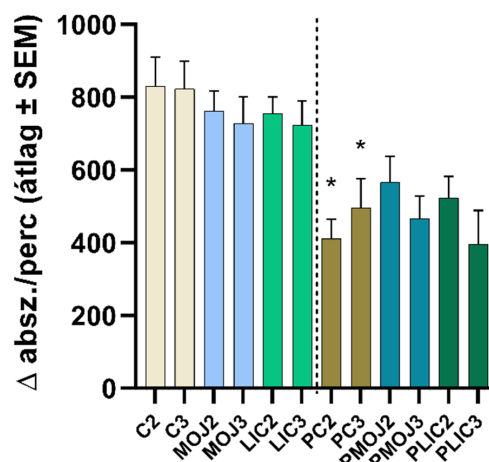
Metabolikus aktivitás



1. ábra

A metabolikus aktivitás vizsgálata CCK-8 teszttel. C2= kontroll 0,6% dextróz, C3= kontroll 3% dextróz, MOJ2= *B. mojavensis* kivonat 0,6%, MOJ3= *B. mojavensis* 3%, LIC2= *B. licheniformis* 0,6%, LIC3= *B. licheniformis* 3%, PC2= poly I:C (50 µg/ml) és dextróz 0,6%, PC3= poly I:C (50 µg/ml) és dextróz 3%, PMOJ2= poly I:C (50 µg/ml) és *B. mojavensis* 0,6%, PMOJ3= poly I:C (50 µg/ml) és *B. mojavensis* 3%, PLIC2= poly I:C (50 µg/ml) és *B. licheniformis* 0,6%, PLIC3= poly I:C (50 µg/ml) és *B. licheniformis* 3%. Átlag (n=5/csoport) ± standard hiba (SEM), *p<0,05.

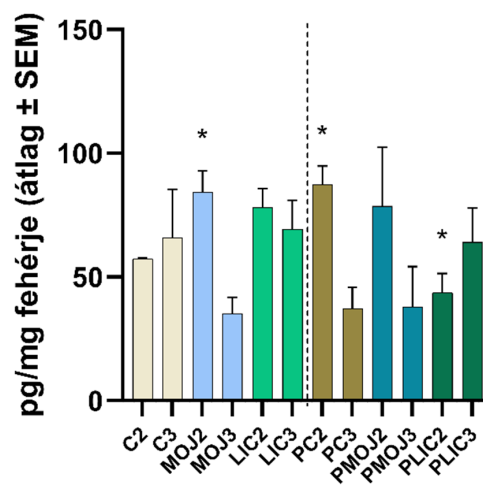
Laktát-dehidrogenáz aktivitás



2. ábra

Az extracelluláris laktát-dehidrogenáz aktivitásának vizsgálata kinetikus fotometriás teszttel. absz.= abszorbancia, C2= kontroll 0,6% dextróz, C3= kontroll 3% dextróz, MOJ2= *B. mojavensis* kivonat 0,6%, MOJ3= *B. mojavensis* 3%, LIC2= *B. licheniformis* 0,6%, LIC3= *B. licheniformis* 3%, PC2= poly I:C (50 µg/ml) és dextróz 0,6%, PC3= poly I:C (50 µg/ml) és dextróz 3%, PMOJ2= poly I:C (50 µg/ml) és *B. mojavensis* 0,6%, PMOJ3= poly I:C (50 µg/ml) és *B. mojavensis* 3%, PLIC2= poly I:C (50 µg/ml) és *B. licheniformis* 0,6%, PLIC3= poly I:C (50 µg/ml) és *B. licheniformis* 3%. Átlag (n=5/csoport) ± standard hiba (SEM), *p<0,05.

Interleukin-1β koncentráció



3. ábra

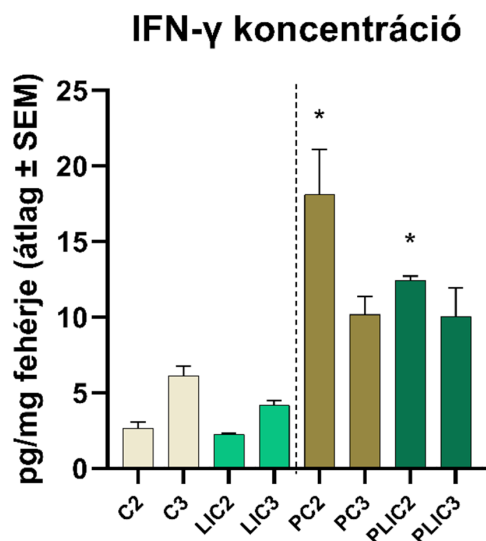
Az IL-1β koncentráció mérése szendvics ELISA módszerrel. C2= kontroll 0,6% dextróz, C3= kontroll 3% dextróz, MOJ2= *B. mojavensis* kivonat 0,6%, MOJ3= *B. mojavensis* 3%, LIC2= *B. licheniformis* 0,6%, LIC3= *B. licheniformis* 3%, PC2= poly I:C (50 µg/ml) és dextróz 0,6%, PC3= poly I:C (50 µg/ml) és dextróz 3%, PMOJ2= poly I:C (50 µg/ml) és *B. mojavensis* 0,6%, PMOJ3= poly I:C (50 µg/ml) és *B. mojavensis* 3%, PLIC2= poly I:C (50 µg/ml) és *B. licheniformis* 0,6%, PLIC3= poly I:C (50 µg/ml) és *B. licheniformis* 3%. Átlag (n=5/csoport) ± standard hiba (SEM), *p<0,05.

B. licheniformis kivonat szignifikánsan csökkentette az IL-1β koncentrációját (p=0,016) (3. ábra).

Az IFN-γ koncentrációjában szignifikáns növekedés (p=0,016) volt megfigyelhető 0,6% dextrózkiegészítés

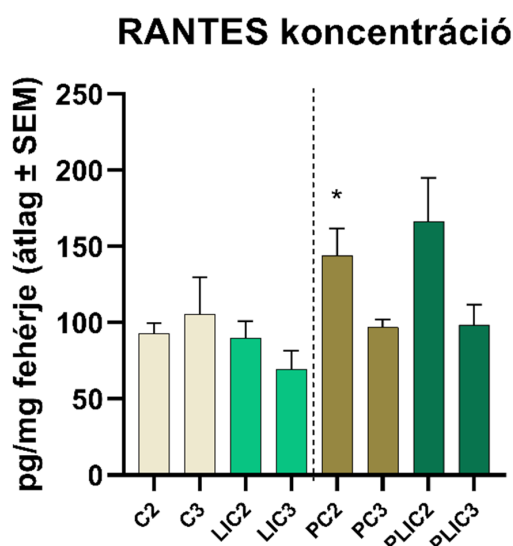
mellett alkalmazott poly I:C kezelés esetén. Ehhez a gyulladáshoz viszonyítva a 0,6%-ban alkalmazott *B. licheniformis* kivonat szignifikáns csökkenést okozott ($p=0,032$) a tápfolyadék IFN- γ koncentrációjában (4. ábra).

A tápfolyadék RANTES-koncentrációja szignifikáns növekedést mutatott ($p=0,029$) a poly I:C és 0,6% dextróz kiegészítés mellett tenyésztett explantátumok eseté-



4. ábra

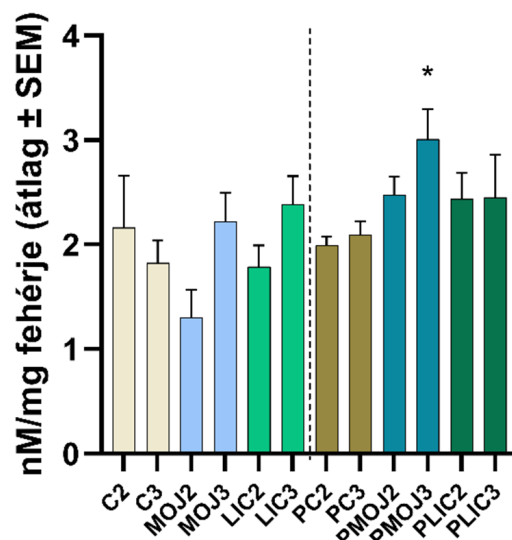
Az IFN- γ koncentráció vizsgálata Luminex módszerrel. C2= kontroll 0,6% dextróz, C3= kontroll 3% dextróz, LIC2= *B. licheniformis* 0,6%, LIC3= *B. licheniformis* 3%, PC2= poly I:C (50 μ g/ml) és dextróz 0,6%, PC3= poly I:C (50 μ g/ml) és dextróz 3%, PLIC2= poly I:C (50 μ g/ml) és *B. licheniformis* 0,6%, PLIC3= poly I:C (50 μ g/ml) és *B. licheniformis* 3%. Átlag ($n=5$ /csoport) \pm standard hiba (SEM), * $p<0,05$.



5. ábra

A RANTES-koncentráció vizsgálata Luminex módszerrel. C2= kontroll 0,6% dextróz, C3= kontroll 3% dextróz, LIC2= *B. licheniformis* 0,6%, LIC3= *B. licheniformis* 3%, PC2= poly I:C (50 μ g/ml) és dextróz 0,6%, PC3= poly I:C (50 μ g/ml) és dextróz 3%, PLIC2= poly I:C (50 μ g/ml) és *B. licheniformis* 0,6%, PLIC3= poly I:C (50 μ g/ml) és *B. licheniformis* 3%. Átlag ($n=5$ /csoport) \pm standard hiba (SEM), * $p<0,05$.

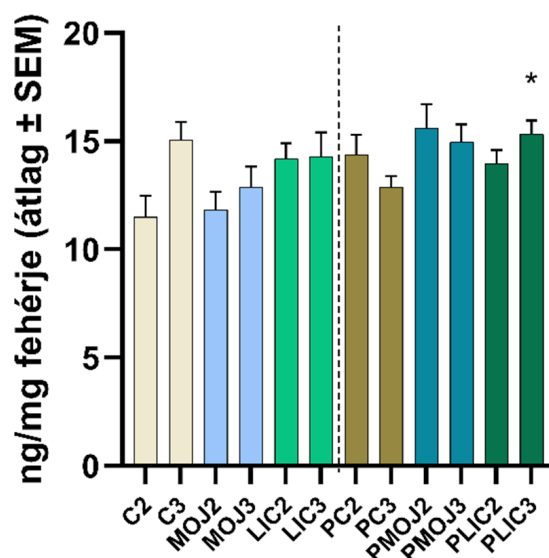
Malondialdehid koncentráció



6. ábra

A malondialdehid-koncentráció vizsgálata kolorimetriás teszttel. C2= kontroll 0,6% dextróz, C3= kontroll 3% dextróz, MOJ2= *B. mojavensis* kivonat 0,6%, MOJ3= *B. mojavensis* 3%, LIC2= *B. licheniformis* 0,6%, LIC3= *B. licheniformis* 3%, PC2= poly I:C (50 μ g/ml) és dextróz 0,6%, PC3= poly I:C (50 μ g/ml) és dextróz 3%, PMOJ2= poly I:C (50 μ g/ml) és *B. mojavensis* 0,6%, PMOJ3= poly I:C (50 μ g/ml) és *B. mojavensis* 3%, PLIC2= poly I:C (50 μ g/ml) és *B. licheniformis* 0,6%, PLIC3= poly I:C (50 μ g/ml) és *B. licheniformis* 3%. Átlag ($n=5$ /csoport) \pm standard hiba (SEM), * $p<0,05$.

Kaspáz-3 koncentráció



7. ábra

A kaspáz-3 intracelluláris enzim koncentrációjának vizsgálata ELISA-módszerrel. C2= kontroll 0,6% dextróz, C3= kontroll 3% dextróz, MOJ2= *B. mojavensis* kivonat 0,6%, MOJ3= *B. mojavensis* 3%, LIC2= *B. licheniformis* 0,6%, LIC3= *B. licheniformis* 3%, PC2= poly I:C (50 μ g/ml) és dextróz 0,6%, PC3= poly I:C (50 μ g/ml) és dextróz 3%, PMOJ2= poly I:C (50 μ g/ml) és *B. mojavensis* 0,6%, PMOJ3= poly I:C (50 μ g/ml) és *B. mojavensis* 3%, PLIC2= poly I:C (50 μ g/ml) és *B. licheniformis* 0,6%, PLIC3= poly I:C (50 μ g/ml) és *B. licheniformis* 3%. Átlag ($n=5$ /csoport) \pm standard hiba (SEM), * $p<0,05$.

ben. A többi kezelésnél nem volt kimutatható szignifikáns változás (5. ábra).

Az MDA koncentrációjában a 3% dextróz és poly I:C-vel kiegészített tápfolyadékkal kezelt kontrollcsoporthoz képest a poly I:C-vel kombinált kezelésben alkalmazott 3%-os *B. mojavensis* kivonat szignifikáns emelkedést idézett elő ($p=0,016$) (6. ábra).

A poly I:C-vel kezelt gyulladáscsökkentő kontrollcsoporthoz képest a *B. licheniformis* 3%-ban alkalmazva szignifikánsan ($p=0,032$) emelte az apoptotikus kaszpáz-3 koncentrációját a sejtekben (7. ábra).

Következtetések

Munkánk során a poly I:C alkalmazásával kiváltott gyulladáscsökkentő és oxidatív folyamatokat vizsgáltuk csirkeileumeredetű explantátumokon, illetve azt, hogy milyen hatása van a *B. licheniformis* és a *B. mojavensis* kivonatoknak ezekre a folyamatokra.

Az explantátummodellek lehetővé teszik a célszerv és -szövet fysiológiai és kóros állapotainak vizsgálatát. Előnyük abban rejlik, hogy míg a különféle sejtenyésztések csupán egyfajta sejtből állnak, addig az explantátumokban a bélben jelen lévő sejtek mind fellelhetők (Randall–Turton–Foster 2011). A szerzők korábbi vizsgálatukban nyomon követték az 1 és 2 mm átmérőjű bélhám-explantátumok tenyésztettségét és eltarthatóságát. Vizsgálataik során az explantátumok metabolikus aktivitását és laktát-dehidrogenáz aktivitását mérték, illetve hematoxin-eozin és pancitokeratin immunhisztokémiai festést alkalmazva szövettani módszerekkel láthatóvá is tették a szövetek épségét. Az eredmények alapján a kisebb méretű explantátumok tovább eltarthatók, a nagyobb méretűek kinyerése és kezelése viszont egyszerűbb. Így egy köztes méretű, 1,5 mm átmérőjű explantátumot alkalmazva vizsgálták a Toll-like receptor antagonisták hatását tizenkét óra tenyésztés mellett. 50 µg/ml koncentrációban a poly I:C megfelelően bizonyult a gyulladáscsökkentő válasz kiváltására, így jelen vizsgálatban is ezt használtuk a gyulladás kiváltására (Tráj et al. 2022a). A sejtek a virális nukleinsav-analógot a TLR receptorok segítségével PAMP molekulaként ismerik fel. A TLR receptor a felismert PAMP hatására jelátviteli utakat aktivál: a poly I:C esetében például a MyD88 fehérje független útvonalat, aminek következtében a nukleáris faktor κ B (NF- κ B) és a mitogén aktivált protein kináz (MAPK) jelátviteli út is működésbe lép. A fenti jelátviteli utak génjeinek expresszióját befolyásoló transzkripciósfaktorokon keresztül fejtik ki hatásukat, amelyek közül az egyik maga az NF- κ B. Ez vezet végül a várt citokin válaszhoz (Zachary 2016).

Számos kutatás foglalkozik a *Bacillus* törzsek mint probiotikumok gyulladáscsökkentő és antioxidáns hatásaival. Munkánk során a *B. licheniformis* és a *B. mojavensis* törzseinek hatását vizsgáltuk. Mivel a *B. mojavensis* a *B. subtilis* egy törzse, fenotípusos változata, biokémiai

tulajdonságaik megegyeznek. A két baktérium hasonló tulajdonságokkal rendelkezik, és mivel a *B. subtilis* probiotikus hatását már több kutatás alátámasztotta, megalapozott a feltételezés, hogy a *B. mojavensis* is jótékony hatással bírhat (Roberts–Nakamura–Cohan 1994).

Jelen eredményeink bizonyítják a *B. licheniformis* proinflammatorikus IL-1 β és IFN- γ koncentrációjának csökkentésében tetten érhető, gyulladáscsökkentő hatását, viszont nagyobb koncentrációban alkalmazva a sejteket károsító gyulladáscsökkentő folyamatok során a kaszpáz-3 intracelluláris enzim szintjének emelése révén képes elősegíteni a programozott sejthalált. Ez az eredmény felfogható protektív hatásként szövetszinten, ha figyelembe vesszük, hogy a sejtekben kevésbé szabályozott, destruktív sejthalál-folyamatok is elindulhatnak. Ilyen például a piroptózis, amelyet a poly I:C képes kiváltani. A piroptotikus sejthalál során transzcelluláris pórusképződés zajlik, majd a sejt a pórusokon jelentős mennyiségű gyulladáscsökkentő anyagot juttat a környezetébe (Tráj et al. 2022b).

Xu és munkatársai kimutatták, hogy a *B. licheniformis* és a *B. subtilis* mint táplálékkiegészítő brojlercsirkékénél *in vivo* kísérletekben csökkenti a szérumban IL-6 és IL-1 β proinflammatorikus citokinek koncentrációját, és növeli a gyulladáscsökkentő hatású IL-10 koncentrációját. Ugyanebben a kísérletben a redox állapot vizsgálata során az MDA-koncentráció jelentős csökkenését tapasztalták. A probiotikummal kezelt csoportok növekedési erélye szignifikánsan nagyobb volt a kezeletlen csoportokéhoz képest (Xu et al. 2021). Az oxidatív stressz az antioxidánsok és a szabadgyökök egyensúlyának zavarát jelenti, amely a reaktív oxigénvegyületek (ROS) felhalmozódásához, ezáltal a szövetek és a fehérjék károsodásához vezethet. A baromfiban számos ok kiválthatja az oxidatív stresszt, például egy bakteriális fertőzés, hőstressz vagy a rossz takarmányminőség. Zhao és munkatársai kimutatták, hogy a *B. licheniformis*-szal kiegészített takarmányt fogyasztó állatok esetében az ileumban alacsonyabb volt az MDA koncentrációja, illetve emelkedett az antioxidáns enzimek, például a szuperoxid-dizmutáz és a glutation-peroxidáz aktivitása (Zhao et al. 2020). A *B. licheniformis* probiotikumként alkalmazva pozitív hatással van az antioxidáns kapacitásra a madarak májában, vérében és bélcsatornájában, képes megkötni a szervezetben keletkezett ROS-t, így csökkentve az oxidatív stresszt. Előnyös a brojlerek számára, védelmet nyújt a hőstressz ellen, és megelőzi az elhalásos bélgyulladást (Knap et al. 2010; Zhao et al. 2020). Han és munkatársai *B. licheniformis* hatását vizsgálták mint potenciális hozamfokozót, az antibiotikumok helyett. *In vivo* kísérletükben brojlercsirkék takarmánykiegészítőként kapták a *B. licheniformis*-t, két különböző, $1,0 \times 10^8$ CFU/kg és $1,0 \times 10^9$ CFU/kg koncentrációban. Xu és munkatársai eredményeihez hasonlóan ők is az IL-1 β , IL-8, TNF- α citokinek koncentrációjának szignifikáns csökkenését, valamint az IL-10 citokin koncentrációjának emelkedését írták le. Ezenkívül a TLR-4 receptor és az NF-

κ B mediált transzkripció utak aktivitásának csökkenéséről is beszámoltak. A *B. licheniformis* hatását az alkalmazott koncentrációtól függetlennek találták (Han et al. 2023). Mindezek mellett a szakirodalom beszámol egy *B. licheniformis* és *subtilis* tartalmú takarmánykiegészítő hatásáról brojlercsirkéknél, amely nemcsak a takarmányhasznosítást volt képes fokozni egy vizsgálatban, de az állatok ammónia, szén-dioxid és hidrogén-szulfid környezeti termelését is csökkentette (Biswas et al. 2023). A jelen munkában vizsgált törzs zeolittal együtt alkalmazva bak hízópulykák esetében alomkezelőként képes volt mérsékelni az ammónia szintjét az alomban (Kovács et al. 2024). Szakirodalmi adatok alapján az ammónia irritálhatja a szem és a légutak nyálkahártyáját, növelheti a légúti betegségek kockázatát, továbbá ronthatja a táplálékhasznosítást és a növekedést brojlercsirkék esetében (Barbosa et al. 2024). Kijelenthető tehát, hogy a *B. licheniformis* hatása széles körű; az állatok jóllétét és egészségét indirekt módon, az alom állapotának befolyásolásán keresztül is javíthatja.

A szakirodalom a *B. mojavensis* esetében főként a növénytermesztési alkalmazás lehetőségeiről számol be. Büyükdeveci és munkatársai leírták továbbá a *B. mojavensis* hatásait nilusi tilápia (*Oreochromis niloticus*) halfajban. Kutatásuk során a probiotikum hatását vizsgálták a halak bélmorfológiájára és immunrendszerére. Eredményeik szerint a *B. mojavensis* tartalmú kiegészítő etetése a mikrobolyhok hosszának és sűrűségének növekedését, valamint az IL-10 gyulladáscsökkentő citokin expressziójának növekedését és az IL-1 β csökkenését eredményezte (Cengizler–Balcázar–Demirkale 2023). Ezenkívül a mikroba által termelt nattokináz enzim antioxidáns hatásáról számolnak be a szakirodalomban. Az enzim képes gátolni a TLR receptorok expresszióját makrofágokban, ezáltal szuppresszálja a MAPK és az NF- κ B jelpályát, csökkentve a sejtek ROS-termelését is (Wu et al. 2020). A szakirodalom szűkölködik a *B. mojavensis*szel kapcsolatos eredményekben, a meglévő tudományos ismeretek azonban alátámasztják a *Bacillus* faj vizsgálatának létjogosultságát.

A *B. mojavensis* nilusi tilápiában leírt gyulladáscsökkentő hatását nem tudtuk megerősíteni csirke *ex vivo* modellünkön. Az antioxidáns tulajdonságokra irányuló vizsgálataink során szintén nem kaptunk szignifikáns eredményt a *B. licheniformis* kivonatait alkalmazva. A *B. mojavensis* 3% koncentrációban prooxidáns hatásának bizonyult a malondialdehid-koncentráció tekintetében.

Eredményeink és a szakirodalmi adatok alapján a *B. licheniformis* takarmánykiegészítőként való alkalmazása megalapozott lehet a brojlertenyésztésben, így a béltre gyakorolt pozitív hatások révén hozzájárulhat az antibiotikum-felhasználás csökkentéséhez. Mindazonáltal a gyulladást szabályozó és antioxidáns mechanizmusok további tanulmányozásra szorulnak, hogy az alkalmazott törzs hatékonysága igazolást nyerjen. A vizsgálat felhívja rá a figyelmet, hogy egyes baktériumtörzsek, illetve az

általuk termelt anyagok képesek lehetnek mérsékelni a nagyüzemi állattenyésztéssel járó szuboptimális tartási körülmények – például a magas telepítési sűrűség – okozta, a termelésben megmutatkozó csökkenést.

Köszönetnyilvánítás

Tanulmányunk az Innovációs és Technológiai Minisztérium Kooperatív Doktori Program Doktori Hallgatói Ösztöndíj Programjának a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alapból finanszírozott szakmai támogatásával készült. A vizsgálat a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal egyéb forrásainak pénzügyi támogatásával valósult meg (OTKA FK 134940, TKP2020-NKA-01).



Irodalomjegyzék

- Abdel-Rahman, H. A. et al. (2013) Effect of Two Probiotics and Bioflavonoids Supplementation to the Broilers Diet and Drinking Water on the Growth Performance and Hepatic Antioxidant Parameters. *Global Veterinaria*, Vol. 10. No. 6. pp. 734–741.
- Barbosa, L. V. S. et al. (2024) Predicting Risk of Ammonia Exposure in Broiler Housing: Correlation with Incidence of Health Issues. *Animals – An Open Access Journal from MDPI*, Vol. 14. No. 4. Article No. 615. <https://doi.org/10.3390/ani14040615>
- Bareiss, P. M. et al. (2008) Organotypical tissue cultures from adult murine colon as an in vitro model of intestinal mucosa. *Histochemistry and Cell Biology*, Vol. 129. No. 6. pp. 795–804.
- Biernasiak, J., Sliżewska, K. & Libudzisz, Z. (2010) Negatywne skutki stosowania antybiotyków. *Postępy Nauk Rolniczych*, Vol. 62. No. 3. pp. 105–117.
- Biswas, S. et al. (2023) Probiotic mixture (*Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*) a potential in-feed additive to improve broiler production efficiency, nutrient digestibility, caecal microflora, meat quality and to diminish hazardous odour emission. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, Vol. 107. No. 4. pp. 1065–1072. <https://doi.org/10.1111/jpn.13784>
- Browning, T. H. & Trier, J. S. (1969) Organ culture of mucosal biopsies of human small intestine. *The Journal of Clinical Investigation*, Vol. 48. No. 8. pp. 1423–1432. <https://doi.org/10.1172/JCI106108>
- Cengizler, İ., Balcázar, J. L. & Demirkale, İ. (2023) Effects of two host-associated probiotics *Bacillus mojavensis* B191 and *Bacillus subtilis* MRS11 on growth performance, intestinal morphology, expression of immune-related genes and disease resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) against *Streptococcus iniae*. *Developmental & Comparative Immunology*, Vol. 138. Article No. 104553. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2022.104553>
- Chen, Y.-C. & Yu, Y.-H. (2020) *Bacillus licheniformis*-fermented products improve growth performance and the fecal microbiota

- community in broilers. *Poultry Science*, Vol. 99. No. 3. pp. 1432–1443. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2019.10.061>
- Connolly, G. et al. (2022) Poultry Consumption and Human Health: How Much Is Really Known? A Systematically Searched Scoping Review and Research Perspective. *Advances in Nutrition*, Vol. 13. No. 6. pp. 2115–2124. <https://doi.org/10.1093/advances/nmac074>
- Costa, M. O., Harding, J. C. S. & Hill, J. E. (2016) Development and evaluation of a porcine in vitro colon organ culture technique. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Animal*, Vol. 52. No. 9. pp. 942–952. <https://doi.org/10.1007/s11626-016-0060-y>
- ESVAC (2017) Sales of veterinary antimicrobial agents in 30 European countries in 2015. Trends from 2010 to 2015. European Medicines Agency, Seventh European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption report (EMA/184855/2017). https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/seventh-esvac-report-sales-veterinary-antimicrobial-agents-30-european-countries-2015_en.pdf
- Han, Y. et al. (2023) Dietary *Bacillus licheniformis* shapes the foregut microbiota, improving nutrient digestibility and intestinal health in broiler chickens. *Frontiers in Microbiology*, Vol. 14. Article No. 1113072. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1113072>
- Haque, M. A. et al. (2021) *Bacillus spp.* Contamination: A Novel Risk Originated from Animal Feed to Human Food Chains in South-Eastern Bangladesh. *Frontiers in Microbiology*, Vol. 12. Article No. 783103. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.783103>
- Johansson, M. E. V. et al. (2011) Composition and functional role of the mucus layers in the intestine. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*, Vol. 68. No. 22. pp. 3635–3641. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0822-3>
- Knap, I. et al. (2010) *Bacillus licheniformis* Prevents Necrotic Enteritis in Broiler Chickens. *Avian Diseases*, Vol. 54. No. 2. pp. 931–935. <https://doi.org/10.1637/9106-101509-ResNote.1>
- Koniczka, P. et al. (2018) Effects of pea extrusion and enzyme and probiotic supplementation on performance, microbiota activity and biofilm formation in the broiler gastrointestinal tract. *British Poultry Science*, Vol. 59. No. 6. pp. 654–662. <https://doi.org/10.1080/00071668.2018.1507017>
- Kovács L. et al. (2024) *Bacillus licheniformis* baktériumot és zeolitot tartalmazó alomkezelő készítmény hatásának vizsgálata bak hízópulyka-állományban (Study Report on the Effect of a Litter Treatment Product Containing *Bacillus licheniformis* and Zeolite in Male Fattening Turkey Flock). *Magyar Állatorvosok Lapja*, Vol. 146. No. 5. pp. 291–305.
- Kridtayopas, C. et al. (2019) Effect of prebiotic and synbiotic supplementation in diet on growth performance, small intestinal morphology, stress, and bacterial population under high stocking density condition of broiler chickens. *Poultry Science*, Vol. 98. No. 10. pp. 4595–4605. <https://doi.org/10.3382/ps/pez152>
- Lei, X. et al. (2015) Effect of *Bacillus amyloliquefaciens*-based Direct-fed Microbial on Performance, Nutrient Utilization, Intestinal Morphology and Cecal Microflora in Broiler Chickens. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, Vol. 28. No. 2. pp. 239–246. <https://doi.org/10.5713/ajas.14.0330>
- Magdelaine, P., Spiess, M. P. & Valceschini, E. (2008) Poultry meat consumption trends in Europe. *World's Poultry Science Journal*, Vol. 64. No. 1. pp. 53–64. <https://doi.org/10.1017/S0043933907001717>
- Mátis, G. et al. (2025) Miniature chicken ileal explant culture to investigate the inflammatory response induced by pathogen-associated molecular patterns. *Frontiers in Veterinary Science*, Vol. 12. Article No. 1484333. <https://doi.org/10.3389/fvets.2025.1484333>
- Mehdi, Y. et al. (2018) Use of antibiotics in broiler production: Global impacts and alternatives. *Animal Nutrition (Zhongguo Xu Mu Shou Yi Xue Hui)*, Vol. 4. No. 2. pp. 170–178. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2018.03.002>
- Mookiah, S. et al. (2014) Effects of dietary prebiotics, probiotic and synbiotics on performance, caecal bacterial populations and caecal fermentation concentrations of broiler chickens. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Vol. 94. No. 2. pp. 341–348. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6365>
- Neckel, P. H. et al. (2016) Large-scale tissue clearing (PACT): Technical evaluation and new perspectives in immunofluorescence, histology, and ultrastructure. *Scientific Reports*, Vol. 6. Article No. 34331. <https://doi.org/10.1038/srep34331>
- Pope, M. J. & Cherry, T. E. (2000) An evaluation of the presence of pathogens on broilers raised on poultry litter treatment-treated litter. *Poultry Science*, Vol. 79. No. 9. pp. 1351–1355. <https://doi.org/10.1093/ps/79.9.1351>
- Randall, K. J., Turton, J. & Foster, J. R. (2011) Explant culture of gastrointestinal tissue: A review of methods and applications. *Cell Biology and Toxicology*, Vol. 27. No. 4. pp. 267–284. <https://doi.org/10.1007/s10565-011-9187-5>
- Roberts, M. S., Nakamura, L. K. & Cohan, F. M. (1994) *Bacillus mojavensis sp. nov.*, distinguishable from *Bacillus subtilis* by sexual isolation, divergence in DNA sequence, and differences in fatty acid composition. *International Journal of Systematic Bacteriology*, Vol. 44. No. 2. pp. 256–264. <https://doi.org/10.1099/00207713-44-2-256>
- Roth, N. et al. (2019) The application of antibiotics in broiler production and the resulting antibiotic resistance in *Escherichia coli*: A global overview. *Poultry Science*, Vol. 98. No. 4. pp. 1791–1804. <https://doi.org/10.3382/ps/pey539>
- Rozs, M. et al. (2001) Secretion of a trypsin-like thiol protease by a new keratinolytic strain of *Bacillus licheniformis*. *FEMS Microbiology Letters*, Vol. 205. No. 2. pp. 221–224. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2001.tb10951.x>
- Shim, Y. H. et al. (2012) A multi-microbe probiotic formulation processed at low and high drying temperatures: Effects on growth performance, nutrient retention and caecal microbiology of broilers. *British Poultry Science*, Vol. 53. No. 4. pp. 482–490. <https://doi.org/10.1080/00071668.2012.690508>
- Tráj, P. et al. (2022a) Protective effects of chicoric acid on polyinosinic-polycytidylic acid exposed chicken hepatic cell culture mimicking viral damage and inflammation. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, Vol. 250. Article No. 110427. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2022.110427>
- Tráj P. et al. (2022b) Csirke vékonybél eredetű explant tenyészetek létrehozása a bél gyulladáshoz vezető válaszreakció vizsgálatára. *Akadémiai Beszámoló* (2023. január 30–31.).
- Trowell, O. A. (1959) The culture of mature organs in a synthetic medium. *Experimental Cell Research*, Vol. 16. No. 1. pp. 118–147. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(59\)90201-0](https://doi.org/10.1016/0014-4827(59)90201-0)
- Truszczyński, M. & Pejsak, Z. (2006) Wpływ stosowania u zwierząt antybiotyków na lekooporność bakterii chorobotwórczych dla człowieka. *Medycyna Weterynaryjna*, Vol. 62. No. 12. pp. 1339–1343.
- Wang, X. et al. (2021) Dietary supplementation with *Bacillus* mixture modifies the intestinal ecosystem of weaned piglets in an overall beneficial way. *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 130. No. 1. pp. 233–246. <https://doi.org/10.1111/jam.14782>
- Wilson, T. H. & Wiseman, G. (1954) The use of sacs of everted small intestine for the study of the transference of substances from the mucosal to the serosal surface. *The Journal of Physiology*, Vol. 123. No. 1. pp. 116–125. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1954.sp005036>
- Wu, H. et al. (2020) Breaking the vicious loop between inflammation, oxidative stress and coagulation, a novel anti-thrombus insight of nattokinase by inhibiting LPS-induced inflammation and oxidative stress. *Redox Biology*, Vol. 32. Article No. 101500. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101500>
- Xu, Y. et al. (2021) Effects of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* on growth performance, immunity, short chain fatty acid production, antioxidant capacity, and caecal microflora in broilers. *Poultry Science*, Vol. 100. No. 9. Article No. 101358. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101358>

- Youcef-Ali, M. et al. (2014) Antifungal activity and bioactive compounds produced by *Bacillus mojavensis* and *Bacillus subtilis*. African Journal of Microbiology Research, Vol. 8. No. 6. pp. 476–484. <https://doi.org/10.5897/AJMR2013.6327>
- Zachary, J. F. (2016) Pathologic Basis of Veterinary Disease. 6th edition. Mosby.
- Zhang, R. et al. (2022) Multi-Omics Revealed the Protective Effects of Rhamnolipids in Lipopolysaccharide Challenged Broilers. Frontiers in Immunology, Vol. 13. Article No. 824664. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.824664>
- Zhang, Z. F. & Kim, I. H. (2014) Effects of multistrain probiotics on growth performance, apparent ileal nutrient digestibility, blood characteristics, cecal microbial shedding, and excreta odor contents in broilers. Poultry Science, Vol. 93. No. 2. pp. 364–370. <https://doi.org/10.3382/ps.2013-03314>
- Zhao, Y. et al. (2020) Dietary Probiotic *Bacillus licheniformis* H2 Enhanced Growth Performance, Morphology of Small Intestine and Liver, and Antioxidant Capacity of Broiler Chickens Against *Clostridium perfringens*-Induced Subclinical Necrotic Enteritis. Probiotics and Antimicrobial Proteins, Vol. 12. No. 3. pp. 883–895. <https://doi.org/10.1007/s12602-019-09597-8>
- Zhou, M. et al. (2016) Effects of *Bacillus licheniformis* on the growth performance and expression of lipid metabolism-related genes in broiler chickens challenged with *Clostridium perfringens*-induced necrotic enteritis. Lipids in Health and Disease, Vol. 15. Article No. 48. <https://doi.org/10.1186/s12944-016-0219-2>
- Zuo, Z. et al. (2020) Feed-borne *Bacillus cereus* exacerbates respiratory distress in chickens infected with *Chlamydia psittaci* by inducing haemorrhagic pneumonia. Avian Pathology: Journal of the W.V.P.A., Vol. 49. No. 3. pp. 251–260. <https://doi.org/10.1080/03079457.2020.1716940>

A cikk a Creative Commons Attribution 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>) feltételei szerint publikált Open Access közlemény, melynek szellemében a cikk bármilyen médiumban szabadon felhasználható, megosztható és újraközölhető, feltéve, hogy az eredeti szerző és a közlés helye, illetve a CC License linkje és az esetlegesen végrehajtott módosítások feltüntetésre kerülnek. (SID_1)