



Article

Methanogenic Archaea in the Pediatric Inflammatory Bowel Disease in Relation to Disease Type and Activity

Agata Anna Cisek ¹, Edyta Szymańska ², Aldona Wierzbicka-Rucińska ³, Tamara Aleksandrak-Piekarczyk ⁴ and Bożena Cukrowska ^{1,*}

- ¹ Department of Pathomorphology, The Children's Memorial Health Institute, Av. Dzieci Polskich 20, 04-730 Warsaw, Poland; gutkac@op.pl
 - ² Department of Gastroenterology, Hepatology, Nutritional Disorders and Pediatrics, The Children's Memorial Health Institute, Av. Dzieci Polskich 20, 04-730 Warsaw, Poland; edyta.szymanska@ipczd.pl
 - ³ Department of Biochemistry, Radioimmunology and Experimental Medicine, The Children's Memorial Health Institute, Av. Dzieci Polskich 20, 04-730 Warsaw, Poland; a.wierzbicka-rucinska@ipczd.pl
 - ⁴ Institute of Biochemistry and Biophysics, Polish Academy of Sciences, Pawińskiego 5a, 02-106 Warsaw, Poland; tamara@ibb.waw.pl
- * Correspondence: b.cukrowska@ipczd.pl

Abstract: The inflammatory bowel disease (IBD) is associated with gut microbiota dysbiosis; however, studies on methanogens—especially those focused on children—are extremely limited. The aim of this study was to determine the abundance of total methanogenic archaea and their three subgroups: *Methanobrevibacter (Mb.) smithii*, *Methanosphaera (Ms.) stadtmanae*, and Methanomassiliococcales, in the feces of children with both active and inactive Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC). The results of a quantitative real-time PCR were cross-referenced with the disease type (CD vs. UC) and activity assessed with the use of Pediatric Crohn's Disease Activity Index (PCDAI) and Pediatric Ulcerative Colitis Activity Index (PUCAI) indices, and fecal calprotectin (FCP) concentration, and compared with controls. There was a significant decrease in the number of total methanogens in CD and UC compared to controls. The prevalence of total methanogens was also lower in UC compared to controls. Furthermore, patients from the inactive UC group were colonized by a lower number of *Mb. smithii*, and demonstrated the most pronounced positive correlation between the number of *Mb. stadtmanae* and the FCP concentration. Our results demonstrate that gut methanogens are related to the type and activity of pediatric IBD.

Keywords: Crohn's disease; ulcerative colitis; inflammatory bowel disease; children; fecal calprotectin; methanogens; archaea



Citation: Cisek, A.A.; Szymańska, E.; Wierzbicka-Rucińska, A.; Aleksandrak-Piekarczyk, T.; Cukrowska, B. Methanogenic Archaea in the Pediatric Inflammatory Bowel Disease in Relation to Disease Type and Activity. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25*, 673. <https://doi.org/10.3390/ijms25010673>

Academic Editor: Sunmin Park

Received: 30 November 2023

Revised: 25 December 2023

Accepted: 29 December 2023

Published: 4 January 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Inflammatory bowel disease (IBD) is a collective name for two disease conditions—Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC)—which manifest in chronic inflammation of the gastrointestinal tract and usually result in recurrent diarrhea, abdominal pain, loss of appetite, and weight loss [1]. In some cases, the consequences of IBD may be severe. Over time, IBD can lead to ulcers, fistulas, bowel obstruction, and sepsis [1]. It is estimated that IBD affects up to 0.3% of people living in developed countries [2], with a quarter of new cases diagnosed in children under 18 years of age [3]. The occurrence of IBD varies geographically. The highest incidence is observed in developed countries of Western Europe (40–50 cases in every 100,000 inhabitants per year) and North America (3.1–14.6 cases in every 100,000 inhabitants per year) [4]. IBD occurs at any age, but the peak incidence occurs in the 2nd–3rd decade of life, with 15% of IBD cases affecting children [5]. In Poland, the annual detection rate is 2.8 cases in every 100,000 children up to 15 years of age [3]. Etiopathology of CD and UC is still unknown and most probably multifactorial, including

genetic background, immunological dysfunction, dysbiosis, and socio-demographic factors such as diet, place of residence, etc. [6,7].

It has been proven that intestinal bacterial dysbiosis is one of the causes of the initiation and progression of IBD [8]. However, there are some indications that the changes include not only bacteria but also methanogenic archaea as well [9]. For a long time, archaea were known only as peculiar, single-celled colonizers of extreme environments [10]. That changed in 1968 when methanogens—a group of archaea—were isolated from the human intestines [11]. Since then, methanogenic archaea have been considered a normal part of the gut microbiota [12]. In healthy individuals, this group of archaea constitutes up to 10% of all anaerobes present in the intestines [13]. Among them, three taxa are of the greatest importance, namely *Methanobrevibacter (Mb.) smithii*, *Methanosphaera (Ms.) stadtmannae*, and methanogens from the order Methanomassiliicoccales [14]. The impact of these three taxa on human health is diverse: in adults, *Mb. smithii* appears to be a commensal species [15], while *Ms. stadtmannae* strongly induces an immune response both in healthy people and in patients with IBD [13,16,17].

In adults with IBD, there is a reduced number of total methanogenic archaea and a reduced number of *Mb. smithii* were observed [9]. Moreover, also in adults with IBD, an increase in the share of *Ms. stadtmannae* was reported [16]. In children, none of the relationships described above have been confirmed [18,19]. Since pediatric IBD is significantly different from the one observed in adults in terms of progression, anatomical location, and treatment results [20], it is extremely important to understand the mechanisms behind the development of this disease in both groups separately. Moreover, children seem to be the best model for research on the pathomechanisms of IBD because they are rarely affected by other diseases, making it possible to learn the real causes underlying the initiation and development of IBD [8]. For these reasons, the aim of this study was to determine the abundance of methanogenic archaea in the feces of children with Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC) and to estimate the relationship of the type of the disease (CD versus UC), and the activity of the IBD (active vs. inactive) compared to controls.

2. Results

2.1. Characteristics of the Subjects

The study comprised 97 children with IBD, including 45 with CD at a mean age of 14.2 years and 52 with UC at a mean age of 13.0 years (Table 1). Children were divided into groups based on the disease activity: the active and inactive ones. The disease activity was established based on the fecal calprotectin (FCP) concentration and diseases' activity indices, i.e., the Pediatric Crohn's Disease Activity Index (PCDAI) and the Pediatric Ulcerative Colitis Activity Index (PUCAI). No statistically significant differences were found when assessing the age and gender of children between the IBD groups. The mean PCDAI and PUCAI scores were 10.0 (± 13.5) and 15.2 (± 20.3), respectively, and were statistically significantly higher ($p = 0.0027$ and $p = 0.0017$) in the group with the active type of the disease compared to the inactive type. The mean FCP concentration in the CD and UC groups was 781.6 (± 1800.7) and 396.6 (± 810.3) $\mu\text{g/g}$, respectively, and was statistically significantly higher in both groups with the active type of the disease (i.e., active CD and active UC) compared to the inactive types ($p < 0.0001$ and $p = 0.0002$) and the control group ($p < 0.0001$), where the mean concentration of FCP was 19.3 (± 24.1) $\mu\text{g/g}$.

No statistically significant differences in age were found between children with the active UC form compared to controls ($p > 0.05$).

Table 1. The characteristics of the subjects.

Group	Mean Age [Years] ± SD (Mdn)	Female to Male Ratio	Mean PCDAI ± SD (Mdn)	Mean PUCAI ± SD (Mdn)	Mean FCP [µg/g] ± SD (Mdn)
CD (n = 45)	14.2 ± 3.1 (15.0) *	25:20	10.0 ± 13.5 (5.0)	n/a	781.6 ± 1800.7 (119.0) *
Active CD (n = 21)	13.9 ± 3.4 (15.0) *	15:6	17.5 ± 14.7 (15.0) #	n/a	1601.8 ± 2409.4 (699.0) *#
Inactive CD (n = 24)	14.6 ± 2.8 (15.0) *	10:14	3.4 ± 7.8 (0.0)	n/a	64.0 ± 61.0 (59.5)
UC (n = 52)	13.0 ± 4.7 (14.0) *	27:25	n/a	15.2 ± 20.3 (5.0)	396.9 ± 810.3 (100.5) *
Active UC (n = 25)	12.2 ± 5.0 (13.0)	12:13	n/a	27.6 ± 23.3 (25.0) #	758.5 ± 1062.9 (403.0) *#
Inactive UC (n = 27)	13.8 ± 4.3 (15.0) *	15:12	n/a	3.7 ± 4.9 (0.0)	62.0 ± 54.9 (38.0)
Controls (n = 27)	10.0 ± 4.0 (10.0)	14:13	n/a	n/a	19.3 ± 24.1 (10.0)

n/a—not applicable; SD—standard deviation; Mdn—medians presented in parentheses (); PCDAI—Pediatric Crohn's Disease Activity Index; PUCAI—Pediatric Ulcerative Colitis Activity Index; FCP—fecal calprotectin concentration; CD—Crohn's disease; UC—ulcerative colitis; * statistical significance ($p < 0.05$) compared to control; # statistical significance ($p < 0.05$) compared to the inactive group of the same disease type. The statistical analysis was performed using the Kruskal–Wallis H test.

2.2. The Prevalence and Abundance of Gut Methanogens

In the first step, a qualitative and quantitative analysis of methanogens was performed in the children's stool samples. In contrast to the control group, where methanogens were found in all tested children, the IBD group was characterized by a substantial percentage of children in whom the presence of methanogens was not found (Table 2). The prevalence of total methanogens was statistically significantly lower in the group of children with UC and active UC ($p < 0.05$). Moreover, the analysis of specific groups of methanogens showed that *Ms. stadtmanae* was significantly less frequently present in children with UC compared to controls ($p < 0.05$). Furthermore, the odds of detecting each subgroup of methanogens were smaller in most of the IBD groups (except for the active CD patients) compared to controls (Table 3).

Table 2. The prevalence of the methanogens [%] in the analyzed pediatric groups of the active and inactive types of IBD and controls.

Group	No. of Positive/Total No. of Tested Samples and Percentage Values [%]			
	Total Methanogens	<i>Mb. smithii</i>	<i>Ms. stadtmanae</i>	Methanomassiliicoccales
CD (n = 45)	40/45 [88.9%]	31/45 [68.9%]	12/45 [26.7%]	6/45 [13.3%]
Active CD (n = 21)	19/21 [90.5%]	16/21 [76.2%]	8/21 [38.1%]	3/21 [14.3%]
Inactive CD (n = 24)	21/24 [87.5%]	15/24 [62.5%]	4/24 [16.7%]	3/24 [12.5%]
UC (n = 52)	43/52 [82.7%] *	27/52 [51.9%]	8/52 [15.4%] *	8/52 [15.4%]
Active UC (n = 25)	20/25 [80.0%] *	15/25 [60.0%]	4/25 [16.0%]	2/25 [8.0%]
Inactive UC (n = 27)	23/27 [85.2%]	12/27 [44.4%]	4/27 [14.8%]	6/27 [22.2%]
Controls (n = 27)	27/27 [100%]	20/27 [74.1%]	10/27 [37.0%]	8/27 [29.6%]

The results of the percentage of children whose stool samples tested positive for total methanogens, *Mb. smithii*, *Ms. stadtmanae*, and Methanomassiliicoccales. The prevalence of methanogenic archaea was measured by real-time PCR [21]. * statistical significance ($p < 0.05$) compared to control; CD—Crohn's disease; UC—ulcerative colitis. Statistical analysis was performed using Fisher's exact test.

The average abundance of total methanogens was determined at 3.66, 2.87, and 5.04 \log_{10}/g of dry weight in patients with CD, UC, and controls, respectively, whereas the mean medians were 3.55, 3.07, and 4.30 \log_{10}/g of dry weight in CD, UC, and controls, respectively. There was a statistically significant difference in the number of total methanogenic archaea between both CD and UC patients and controls ($p < 0.05$) (Figure 1A). Interestingly, a significant difference was also observed between patients with CD and UC. In contrast, when the three subgroups of methanogens, i.e., *Mb. smithii*, *Ms. stadtmanae*, and Methanomassiliicoccales were tested individually, only the levels of *Mb. smithii* differed significantly between the UC and the control group ($p = 0.0015$) (Figure 1B). The differences

among the other two taxa, i.e., Methanomassiliococcales and *Ms. stadtmanae*, were not statistically proven (Figure 1C,D).

Table 3. The odds of detection of methanogens in the analyzed pediatric groups of the active and inactive types of IBD compared to controls.

Group	Odds Ratios [95% Confidence Intervals] Compared to Control Group			
	Total Methanogens *	<i>Mb. smithii</i>	<i>Ms. stadtmanae</i>	Methanomassiliococcales
CD (n = 45)	0	0.78 [0.27, 2.25]	0.62 [0.22, 1.72]	0.37 [0.11, 1.20]
Active CD (n = 21)	0	1.12 [0.30, 4.20]	1.05 [0.32, 3.40]	0.40 [0.09, 1.73]
Inactive CD (n = 24)	0	0.58 [0.18, 1.92]	0.34 [0.09, 1.28]	0.34 [0.08, 1.47]
UC (n = 52)	0	0.38 [0.14, 1.05]	0.31 [0.10, 0.91]	0.43 [0.14, 1.32]
Active UC (n = 25)	0	0.53 [0.16, 1.70]	0.32 [0.09, 1.22]	0.21 [0.04, 1.09]
Inactive UC (n = 27)	0	0.28 [0.09, 0.88]	0.30 [0.08, 1.11]	0.68 [0.20, 2.31]

* none of the control subjects tested negative for total methanogens; therefore, the results equal zero; CD—Crohn's disease; UC—ulcerative colitis. The odds ratio analysis was performed in the OpenEpi web tool [22].

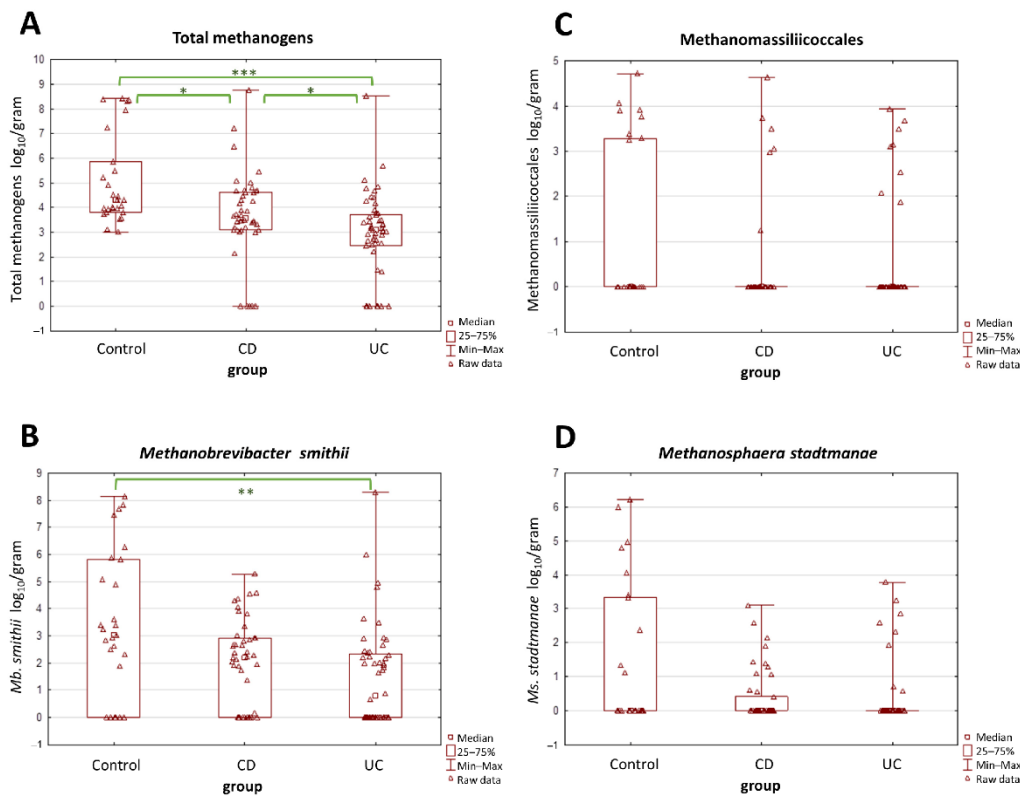


Figure 1. (A–D) The comparison of methanogen population quantities in stool samples (dry weight) among patients with Crohn's disease (CD), ulcerative colitis (UC), and the control group. The most pronounced differences were observed in the total population of methanogens (A). Values of * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ were regarded as significant. The non-significant results remained unmarked. The statistical analysis was performed using the Kruskal–Wallis H test.

A more detailed analysis was performed with respect to the activity of the disease in the IBD groups, and it yielded similar observations in terms of UC vs. control groups. Both forms of UC, i.e., the active and the inactive one, demonstrated far lower total methanogen quantities than the control group ($p = 0.0002$ and $p < 0.0001$) (Figure 2A). However, in CD patients, the results were quite different—neither the active nor the inactive CD groups demonstrated statistically significant differences in terms of total methanogen quantities when compared to the control group. As for *Mb. smithii*, the statistical importance was observed only between the inactive UC patients and the control groups ($p = 0.002$) (Figure 2B). The differences in numbers of Methanomassiliococcales and *Ms. stadtmanae* remained not statistically proven (Figure 2C,D).

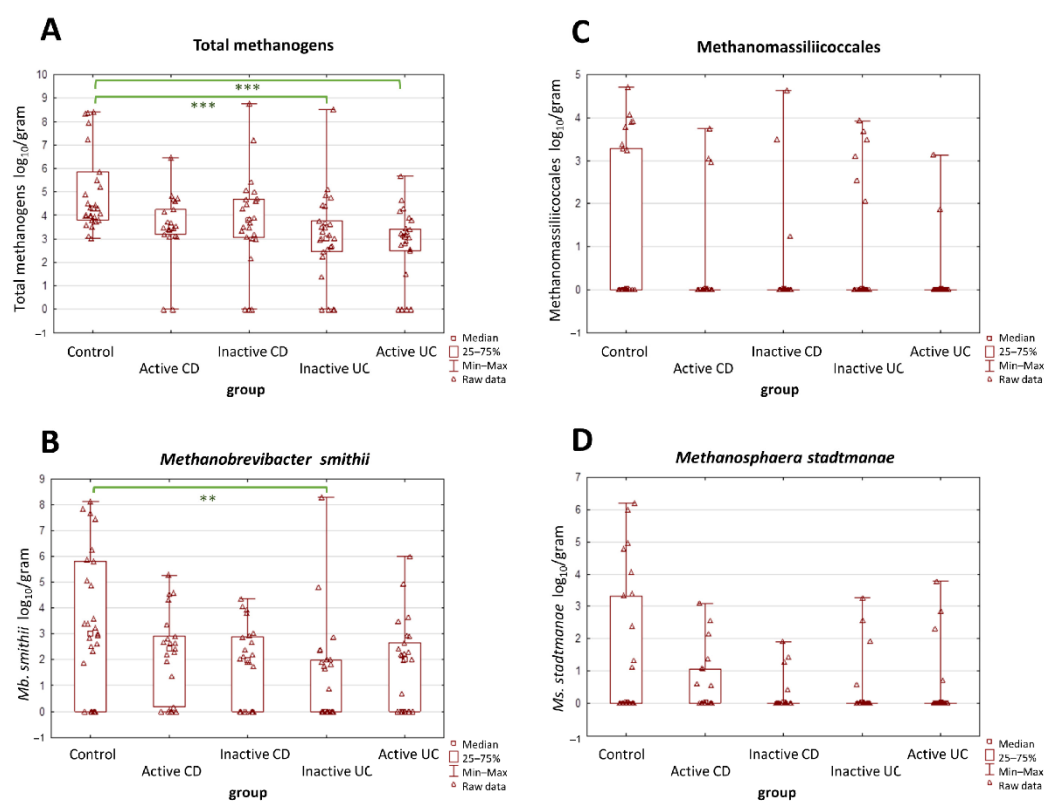


Figure 2. (A–D) The comparison of methanogen population quantities in the stool samples (dry weight) among patients with active and inactive Crohn’s disease (CD), among patients with active and inactive ulcerative colitis (UC), and the control group. The most pronounced differences were observed in the total population of methanogens (A). Values of ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ were regarded as significant. The non-significant results remained unmarked. The statistical analysis was performed using the Kruskal–Wallis H test.

2.3. Relationship between IBD Activity Indices and the Number of Methanogenic Archaea

The analysis of associations between CD and UC activity indices (PCDAI and PUCAI) and the abundance of methanogenic archaea revealed only one moderate positive correlation between the total methanogen counts and PCDAI values in the active form of CD (Rs

0.48, $p = 0.026$) (Figure 3). The remaining archaeal taxa proved not to be correlated with the disease activity indices.

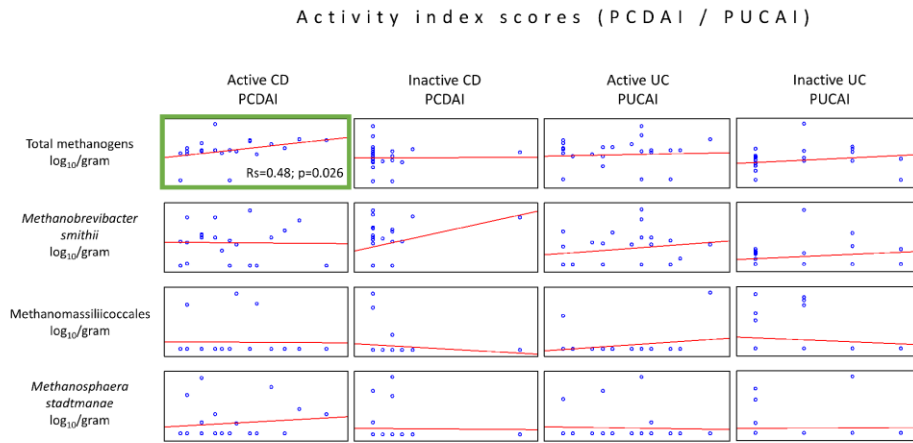


Figure 3. Correlations between the methanogen population quantities and patient disease activity indices (PCDAI or PUCAI) in the stool samples (dry weight) of patients from the IBD groups. The only statistically important correlations were observed in the quantity of the total population of methanogens, which increased with the rise in the PCDAI values (green box).

2.4. Relationship between FCP and the Number of Methanogenic Archaea

It is known that FCP level correlates with the severity of IBD; thus, we decided to analyze the relation between FCP concentration and the abundance of total methanogens, *Mb. smithii*, *Ms. stadmanae*, and Methanomassilicoccales. The analysis of the individual disease activity group revealed only one moderately positive correlation between the *Ms. stadmanae* load and the inactive UC group of patients ($R_s = 0.41$, $p = 0.034$) (Figure 4).

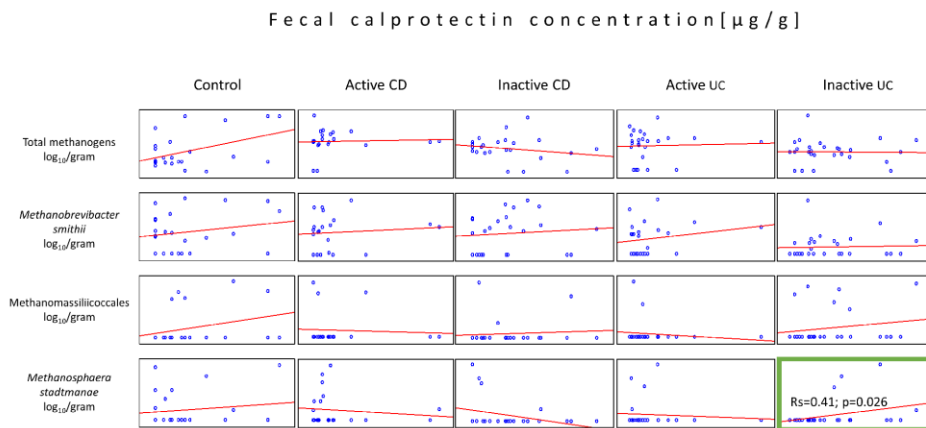


Figure 4. Correlations between the methanogen population quantities and the fecal calprotectin (FCP) levels in the stool samples (dry weight) of patients from all tested groups. The statistically important correlation with respect to FCP was observed in the population of *Ms. stadmanae* in the inactive UC group (green box).

2.5. Relationship between Age and the Number of Methanogenic Archaea

Due to significant age differences between the control group and children with IBD (Table 1), we decided to statistically analyze the presence of methanogens depending on age. The average age of the patients was 13.9 (± 3.4) in the active CD group, 14.6 (± 2.8) in the inactive CD group, 12.2 (± 5.0) in the active UC group, 13.8 (± 4.3) in the inactive UC group, and 10.0 (± 4.0) in controls. The Spearman's rank test showed that the only statistically significant association among the IBD groups was observed in the active CD patients, where, in contrast to controls, total methanogen counts and *Mb. smithii* quantities decreased with the patient's age ($R_s = -0.56$, $p = 0.009$ and $R_s = -0.53$, $p = 0.013$, respectively). On the other hand, there has been a significant increase ($R_s = 0.49$, $p = 0.009$) in the number of Methanomassiliicoccales in association with age in the control group (Figure 5).

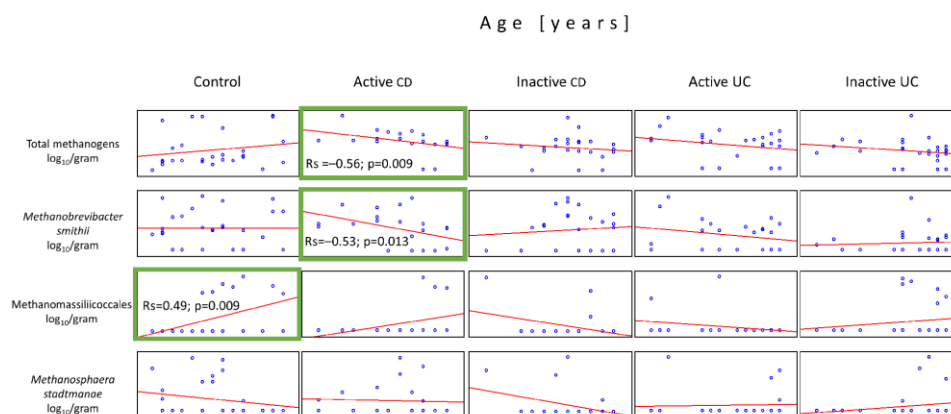


Figure 5. Correlations between the quantities of the methanogen populations and the patient's age in the stool samples (dry weight) of patients from all tested groups. The only statistically important correlations with respect to the patient's age were observed in populations of Methanomassiliicoccales in the controls and total methanogens and *Mb. smithii* in the active CD group (green boxes).

3. Discussion

Dysbiosis of the intestinal microbiome seems to play a significant role in the mechanisms leading to the development of IBD, but only a few studies devote their attention to the importance of methanogens in this process, the vast majority of which concern adult patients [9,16,23–25].

To date, only one team has analyzed in detail the intestinal methanogens in children with CD [19]. To the authors' knowledge, the current research is the first to evaluate the prevalence of methanogens in UC separately from CD and the first to analyze the association between the presence of as many as four groups of methanogens and the activity of both types of IBD.

Our results demonstrated a significant drop in the abundance of total methanogens in both IBD groups compared to controls, and this observation was the only common feature of CD and UC. This outcome is not surprising, given that both conditions demonstrate very different pathomechanisms and the course of disease [3].

Patients with UC were colonized by methanogens not only with a lower abundance but also less frequently compared to controls. Moreover, they were characterized by decreased quantities of lower methanogenic taxa, such as *Mb. smithii*. Based on the fact that reduced *Mb. smithii* population is a common signature of gut microbiota dysbiosis in IBD; our study provided yet another evidence supporting this phenomenon [23,26,27].

The literature data on another methanogenic species, *Ms. stadtmannae*, indicated that it can strongly induce some inflammatory responses not only in the IBD-affected gut but also in the healthy intestine, much more than any other methanogens tested [16,28]. Our data did not seem to support this, but we were able to provide another interesting fact compatible with this theory. We observed a statistically important, positive correlation (only in the inactive form of UC) between the levels of *Ms. stadtmannae* and FCP, a known indicator of the inflammatory processes hollowing the gut mucosa, and a biomarker of IBD severity [29]. Moreover, a similar correlation (albeit not statistically proven) was observed in all four methanogenic groups in control patients. Therefore, perhaps all intestinal methanogens contribute to the induction or persistence of inflammatory responses, some more than others.

In contrast to UC, patients with CD had similar prevalence indices of all four methanogenic groups tested as the control patients. Our results align with the study by Krawczyk et al., 2021 [19]. However, the authors reported that *Mb. smithii* was present in 44% of active CD cases, 27% of inactive CD cases, and in 36% of controls. In our study, these prevalence values were higher, as 76% of the active CD patients, 63% of the inactive CD patients, and 74% of the controls tested positive for *Mb. smithii*. The percentages for *Ms. stadtmannae* also differed: in our study, these were 38%, 17%, and 37% in the active CD, inactive CD, and controls, respectively, whereas in another study, they were all around 30% [19]. In adults, *Ms. stadtmannae* is three times more frequent in IBD patients [16], which was not confirmed in our study, as only 27% and 15% of children in the CD and UC group, respectively, were colonized by this archaeal species compared to 37% of the controls.

There are some reports in adult patients with IBD that are, to some extent, reflected in our results, and we recommend that any future observations and findings made on children be compared with those of the adults. In adults, decreased methane production has already been well-documented in IBD cases [30–33]. Based on the fact that there must be at least 8 log₁₀/g of dry weight of feces in order to detect methane in breath [34], in our study, all children in the active IBD groups would probably not be methane producers. On the other hand, some children in the control group would likely be methane producers—specifically, 2 of the 15 (13%) children aged 8 to 14 years and 2 out of the 5 (40%) children aged 14 to 18 years. It is consistent with a study by Peled et al., 1985 [35], who reported that approx. 14 to 18% and 9 to 46% of children aged 7 to 14, and 14 to 18, respectively, were methane producers.

Since the control group was age-matched only with the active UC patients, we decided to analyze the relationship between age and methanogen counts in all four IBD groups. Interestingly, we noticed a significant drop in the total number of methanogens and *Mb. smithii* with the age of active CD patients. A similar tendency (albeit not statistically proven) for decline was observed in all other groups of IBD. Moreover, a positive correlation was observed between the PCDAI indices and the number of total methanogens in active CD patients. It is not clear whether these results were a cause or a consequence of the CD, but we speculate that perhaps methanogens may somehow initiate the disease (judging by the correlation between the PCDAI vs. total methanogen counts). As the disease persists for years, especially in its active form, the methanogen population subsequently declines (based on age vs. total methanogen counts correlation). Surely, this hypothesis requires further investigation [19].

In terms of the age-related differences, one additional observation was made. The control group was characterized by a pronounced rise in Methanomassiliicoccales as the children's age increased. This tendency is well-documented in adults and children [36,37], and we have provided more evidence of this phenomenon here. Moreover, Vanderhaeghen et al. 2015 reported that in single cases, Methanomassiliicoccales could dominate over Methanobacteriales (most of them belong to *Mb. smithii*) [38], which held true in our study, and, importantly, was not restricted to a single group of patients.

Limitation and Strength of the Study

We realize that the results should be interpreted cautiously as the research encountered limitations. This study was performed on a small cohort of patients; not all cases could be statistically determined. The age of the control group was statistically lower than that of patients with active and inactive CD and inactive UC, which may have influenced some of the results. Moreover, the usage of therapeutics and their possible impact on the results cannot be ruled out. Patients were treated with various agents, which were divided into five groups such as 5-ASA agents (mesalazine), immunosuppressants (azathioprine), biological drugs (infliximab, adalimumab, vedolizumab, and ustekinumab), steroids (prednisone and budesonide), and nutritional therapy. There is some evidence in the literature suggesting that methanogens may be affected by therapeutics used in IBD. For instance, the use of mesalazine has been shown to increase or decrease the amount of some methanogens [16,23,27]. No such correlation was observed in our study. This was probably due to the small number of observations per therapy, and it is possible that some correlations may have been missed. Importantly, even though there were methanogen-negative samples, they were never grouped solely into a particular drug group. Therefore, none of the prescribed therapeutic agents could have been associated with a complete elimination of methanogens. On the other hand, low *Mb. smithii* quantities have been successfully used as an indicator to measure the probability of disease response to anti-TNF drugs (biological therapy of IBD) [39], which is yet another interesting topic that requires further investigation. Furthermore, it is possible that our pediatric patients might have been colonized by other unstudied taxa, which we did not study, and it cannot be ruled out that these taxa might have been somehow related to the incidence of IBD in these patients. This conclusion is due to the fact that the most pronounced differences between the patient groups were observed in quantities of total methanogens but not so much within the subgroups of methanogens. This issue will remain open until we learn more about the diversity of methanogenic archaea in the children's intestines.

On the other hand, to the best of our knowledge, this study is the only one that evaluates the prevalence and abundance of four groups of methanogens in pediatric UC and CD separately from each other. This study is also the first to cross-reference methanogens with FCP and PUCAI in UC.

4. Materials and Methods

4.1. Subjects

A total of 124 children, including the IBD patients (n = 97) and controls (n = 27), were recruited in this study. All of the patients were admitted into the Department of Gastroenterology, Hepatology, Nutritional Disorders and Pediatrics, the Children's Memorial Health Institute (Warsaw, Poland), and their disease activity was established according to European Crohn's and Colitis Organization (ECCO) [40]. All of them were between 3 and 18 years old. There were 45 patients with CD and 52 patients with UC. The control group consisted of 27 children reported for fecal examination due to non-IBD-related illnesses (Table S1). The group of IBD patients was further divided into children with active and inactive CD (21 and 24 patients, respectively) and children with active and inactive UC (25 and 27 patients, respectively).

The division into subgroups depending on disease activity was performed based on PCDAI or PUCAI and the FCP concentration in feces. A PCDAI under 12.5 points indicated an inactive form of CD, whereas a PCDAI above 20 is an active form of the disease. In addition, progression or remission of CD with time was taken into account, especially in three children with PCDAI between 12.5 and 20, who were finally subjected to the active CD group. Patients with UC whose PUCAI was under 10 were considered being in remission, those with PUCAI between 10 and 30 had a mild form of UC, and those above 30—suffered from exacerbation of UC. For that matter, the term inactive UC refers to both mild forms of UC and UC in remission. In addition, patients with low activity indices and

high calprotectin levels were assigned to the active groups of IBD. FCP above 200 µg/g was considered a high concentration.

4.2. FCP Measurement

The FCP concentration was measured using magnetic microparticle chemiluminescence technology in Liaison[®] XL (DiaSorin, Saluggia, Italy). The assay uses a mouse monoclonal antibody on particles to capture FCP from stool samples and a second conjugated mouse monoclonal antibody against a different region of FCP for detection. A total of 15 mg of freshly extracted feces was collected using a serrated stick in a standard volume of extraction buffer. The range of reported measurements was 5 to 800 µg FCP/g of stool. Samples with high FCP concentrations were appropriately diluted, and the results were then multiplied by the dilution factor.

4.3. DNA Isolation

A total of 100 mg of each stool sample was weighed out into 2 mL microtubes and subjected to DNA isolation. If the sample had a high water-to-fecal content ratio, the weight was increased up to 300 mg, which was taken into account in the final calculations. The following DNA isolation procedure was partially described elsewhere [41], with the main difference concerning a mechanical lysis step, which was here improved in terms of hands-on time by replacing sonication with bead-beating. In brief, feces were suspended in the BS buffer until becoming viscous (A&A Biotechnology, Gdynia, Poland). After adding 30 µL lysozyme (10 mg/mL) and 7 µL mutanolysin (10 U/µL), the samples were incubated at 37 °C for 15 min and then at 50 °C for 25 min. Approx. 700 µL LS lysis buffer (A&A Biotechnology, Gdynia, Poland) and 35 µL proteinase K (20 mg/µL) were added, and the samples were incubated at 50 °C for 1 h. The samples were then centrifuged at 14,000 rpm for 5 min. The supernatant was collected into a separate microtube, whilst the zirconia/silica beads (A&A Biotechnology, Gdynia, Poland) together with another 500 µL LS buffer were added to the remaining debris and subjected to bead-beating in TissueLyser LT (Qiagen, Hilden, Germany). The mechanical lysis was set at 50 oscillations/s for 3 min, according to Salonen et al., 2010 [42]. Samples were again centrifuged, and the bead-beating process was repeated. Then the last lysis mixture was incubated at 95 °C for 5 min to improve cellular degradation. After spinning, the three fractions of supernatants were collected in a single microtube and subjected to purification according to the abovementioned protocol [41] with the Genomic Mini AX Bacteria+ kit (A&A Biotechnology, Gdynia, Poland).

4.4. Quantitative Real-Time PCR

A quantitative real-time PCR was performed according to the author's protocol described earlier [21]. The following genes were used as targets in real-time PCR: the *mcrA* gene encoding methyl-coenzyme M reductase alpha subunit for total methanogenic archaea and the *nifH* gene, which does not encode a functional nitrogenase enzyme for the *Mb. smithii*, the 16S rRNA gene for Methanomassiliicoccales, and the *mtaB* gene encoding coenzyme M methyltransferase for *Ms. stadtmanae*. The specificity of the primers used in this study (Table 4) was checked experimentally by sequencing and using BLAST and modified accordingly. The number of generated amplicons per microorganism was also checked using BLAST and the Ribosomal RNA Database [43]. With the exception of *mtaB*, all target genes occur in a single copy per genome. For *Ms. stadtmanae*, the results of the real-time PCR were divided by four—which is the number of operons per genome in *Ms. stadtmanae* DSM 3091 (acc.: CP000102.1)—in order to achieve the number of cells per gram of feces. Standard curves were generated using decimal dilutions, from approx. 10⁰ to 10⁶ copies per reaction of genomic reference DNAs, which were a linearized plasmid containing an insert of the *mcrA* sequence fragment from GenBank acc. KF214818.1:976-1447, and purified amplicons of *nifH*, 16S rDNA, and *mtaB* generated in the initial screening experiments on the human fecal samples whose sequences most closely aligned to *Methanobrevibacter smithii* strain KB11 (GenBank acc. no.: CP017803.1), uncultured *Methanomassiliicoccus* sp.

(GenBank acc. no. LC473299.1), and *Methanosphaera stadtmanae* isolate MGYG-HGUT-02164 (GenBank acc. no. LR698975.1), respectively. The concentrations of the standards were measured with a Quantus fluorometer and the QuantiFluor dsDNA System (Promega Corporation, Madison, WI, USA), and they were further converted into the number of genome copies per μL by using the Science Primer web tool [44].

Table 4. Primers used for the determination of total methanogens and their three subgroups.

Microorganism	Target Gene	Forward/Reverse Primer 5'-3' Sequence *	Amplicon Length [bp]	Reference
Total methanogenic archaea	<i>mcrA</i>	CTGAARMTCACTTCGGTGGWTC/ CGTTCATBGCCTAGTTVGGRTAGT	Approx. 270	[21]
<i>Methanobrevibacter smithii</i>	<i>nifH</i>	AACAGAAAACCCAGTGAAGAGGATA/ ACGTAAAGGCACTGAAAAACCTCC	222	Modified [45]
Methanomassiliococcales	16S rDNA	GGGGTAGGGTAAAATCCTGTAATCC/ AACAACTTCTCTCCGGCACTGG	194	Modified [46]
<i>Methanosphaera stadtmanae</i>	<i>mtaB</i>	GTAGTTCCTAACATCAAAGTAGCTCC/ TCCTCTAAGACCGTTTTCTCTCTCTCA	300	Modified [16]

* original oligo sequence from the cited publication is underlined.

The real-time PCR mixture included 10 μL of RT HS-PCR Mix SYBR A (A&A Biotechnology, Gdynia, Poland), 0.5 μM primers, approx. 70–100 ng of sample DNA and water to reach a final volume of 20 μL . The thermal conditions—set experimentally in a gradient PCR—are presented in Table 5. In each reaction, the amplification comprised 47 cycles. The real-time PCR results were calculated into the number of cells per gram (dry weight) of the stool sample.

Table 5. Temperature settings used for the absolute quantification of each group of methanogenic archaea.

Real-Time PCR Step	Total Methanogens	<i>Mb. smithii</i>	Methanomassiliococcales	<i>Ms. stadtmanae</i>
Initial Denaturation	95 °C—5 min			
Denaturation	94 °C—20 s	94 °C—20 s	94 °C—20 s	94 °C—20 s
Annealing	60 °C—20 s	66 °C—20 s	70 °C—20 s	68 °C—20 s
Elongation	72 °C—20 s	72 °C—20 s	72 °C—20 s	72 °C—25 s
Signal acquisition *	81 °C—20 s + Acq	82 °C—20 s + Acq	87 °C—20 s + Acq	81 °C—20 s + Acq
Melt analysis *	95 °C—5 s, then 60 °C—1 min, and 95 °C—continuous Acq with ramp rate 0.11 °C/s			

* Acq—acquisition of fluorescence signal.

4.5. Statistical Analysis

The statistical analyses were performed in TIBCO Statistica 13.3 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, USA). A Shapiro–Wilk test was used to check whether the quantification results were normally distributed. The homogeneity of variance was checked using the Levene's test. After that, a non-parametric Kruskal–Wallis H test was applied to evaluate the statistical significance of variation among (1) the methanogen groups in relation to the disease type and its activity, (2) the IBD groups in relation to age, PCDAI or PUCAI scores, and FCP. The Spearman's rank correlation test was used to measure the strength and direction of the methanogenic associations grouped by the disease index activity, calprotectin levels, and age. According to the guidelines for interpretation of Spearman's rank correlation by Prion and Haerling, 2014 [47], the correlations were considered very strong when the values of Rs were between 0.81 and 1, strong—0.61 and 0.80, moderate—0.41 and 0.60, weak—0.21 and 0.40, and negligible—0 and 0.20. The prevalence of methanogens was analyzed using Fisher's exact test, whereas the odds ratio analysis was performed in a two-by-two table in the OpenEpi web tool [22].

5. Conclusions

Our results showed that methanogenic archaea present in the gut are related to the type of pediatric IBD. This was particularly evident in children with UC, in whom the decrease in methanogens was associated with the presence of the disease. To the best of our knowledge, this study is the first to indicate the possible involvement of *Ms. stadtmanae* in UC, whose increase (in the inactive UC group) was positively correlated with elevated levels of FCP, a known biomarker of mucosal inflammation. Despite the promising results obtained, further studies on a larger scale are needed to assess the involvement of methanogenic archaea in the pathogenesis of IBD in children.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms25010673/s1>.

Author Contributions: Conceptualization, A.A.C., E.S., A.W.-R., T.A.-P. and B.C.; methodology, A.A.C., E.S., A.W.-R. and B.C.; software, A.A.C. and A.W.-R.; validation, A.A.C.; formal analysis, A.A.C. and A.W.-R.; investigation, A.A.C.; resources, E.S. and A.W.-R.; data curation, A.A.C.; writing—original draft preparation, A.A.C.; writing—review and editing, E.S., A.W.-R., T.A.-P. and B.C.; visualization, A.A.C.; supervision, E.S. and B.C.; project administration, A.A.C.; funding acquisition, A.A.C., E.S. and T.A.-P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was funded by the National Science Centre, Poland, under grant no. 2017/25/N/NZ7/02905, and the Children’s Memorial Health Institute, under grant no. M34/2019.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Local Ethics Committee from the Children’s Memorial Health Institute (protocol code 49/KBE/2019, approval date 6 November 2019).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from participants over 16 years of age and/or their legal representative, as appropriate.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available upon request from the corresponding author. The data are not publicly available due to privacy protections.

Acknowledgments: The authors would like to express their gratitude to the participants and pediatric staff in the department for their valuable assistance.

Conflicts of Interest: The researchers acknowledged the lack of any conflicts of interest in the study, authorship, and/or publication.

References

1. Matsuoka, K.; Kobayashi, T.; Ueno, F.; Matsui, T.; Hirai, F.; Inoue, N.; Kato, J.; Kobayashi, K.; Kobayashi, K.; Koganei, K.; et al. Evidence-Based Clinical Practice Guidelines for Inflammatory Bowel Disease. *J. Gastroenterol.* **2018**, *53*, 305–353. [CrossRef] [PubMed]
2. Ng, S.C.; Shi, H.Y.; Hamidi, N.; Underwood, F.E.; Tang, W.; Benchimol, E.I.; Panaccione, R.; Ghosh, S.; Wu, J.C.Y.; Chan, F.K.L.; et al. Worldwide Incidence and Prevalence of Inflammatory Bowel Disease in the 21st Century: A Systematic Review of Population-Based Studies. *Lancet* **2017**, *390*, 2769–2778. [CrossRef] [PubMed]
3. Putowski, M.; Padala, O.; Krupa, A.; Konopelko, M.; Piasek, E.; Mazurek, M. Inflammatory Bowel Disease in Children. *J. Educ. Health Sport* **2019**, *9*, 406–411. [CrossRef]
4. Witanowska, A.; Rydzewska, G. Epidemiologia i Przebieg Kliniczny Choroby Leśniowskiego-Crohna. In *Choroba Leśniowskiego-Crohna—100 lat Diagnostyki i Terapii*; Rydzewska, G., Małeczka-Panas, E., Eds.; Termedia Wydawnictwa Medyczne: Poznań, Poland, 2008; pp. 23–36. ISBN 978-83-89825-53-7.
5. Socha, P.; Dańdalski, M.; Kierkuś, J.; Szymańska, S.; Ryzko, J. Genetyczne Uwarunkowania Nieswoistych Chorób Zapalnych Jelit. *Stand. Med.* **2010**, *7*, 100–105.
6. Cho, J.H. Inflammatory Bowel Disease: Genetic and Epidemiologic Considerations. *World J. Gastroenterol.* **2008**, *14*, 338. [CrossRef] [PubMed]
7. Guan, Q. A Comprehensive Review and Update on the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. *J. Immunol. Res.* **2019**, *2019*, 7247238. [CrossRef] [PubMed]
8. Mottawea, W.; Chiang, C.K.; Mühlbauer, M.; Starr, A.E.; Butcher, J.; Abujamel, T.; Deeke, S.A.; Brandel, A.; Zhou, H.; Shokralla, S.; et al. Altered Intestinal Microbiota–Host Mitochondria Crosstalk in New Onset Crohn’s Disease. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 13419. [CrossRef]

9. Scanlan, P.D.; Shanahan, F.; Marchesi, J.R. Human Methanogen Diversity and Incidence in Healthy and Diseased Colonic Groups Using McrA Gene Analysis. *BMC Microbiol.* **2008**, *8*, 79. [CrossRef]
10. Valentine, D.L. Adaptations to Energy Stress Dictate the Ecology and Evolution of the Archaea. *Nat. Rev. Microbiol.* **2007**, *5*, 316–323. [CrossRef]
11. Nottingham, P.M.; Hungate, R.E. Isolation of Methanogenic Bacteria from Feces of Man. *J. Bacteriol.* **1968**, *96*, 2178. [CrossRef]
12. Gaci, N.; Borrel, G.; Tottey, W.; O'Toole, P.W.; Brugère, J.F. Archaea and the Human Gut: New Beginning of an Old Story. *World J. Gastroenterol.* **2014**, *20*, 16062–16078. [CrossRef] [PubMed]
13. Moissl-Eichinger, C.; Pausan, M.; Taffner, J.; Berg, G.; Bang, C.; Schmitz, R.A. Archaea Are Interactive Components of Complex Microbiomes. *Trends Microbiol.* **2018**, *26*, 70–85. [CrossRef] [PubMed]
14. Mohammadzadeh, R.; Mahnert, A.; Duller, S.; Moissl-Eichinger, C. Archaeal Key-Residents within the Human Microbiome: Characteristics, Interactions and Involvement in Health and Disease. *Curr. Opin. Microbiol.* **2022**, *67*, 102146. [CrossRef] [PubMed]
15. Sereme, Y.; Mezouar, S.; Grine, G.; Mege, J.L.; Drancourt, M.; Corbeau, P.; Vitte, J. Methanogenic Archaea: Emerging Partners in the Field of Allergic Diseases. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **2019**, *57*, 456–466. [CrossRef]
16. Lecours, P.B.; Marsolais, D.; Cormier, Y.; Berberi, M.; Haché, C.; Bourdages, R.; Duchaine, C. Increased Prevalence of *Methanospiraerium stadtmanae* in Inflammatory Bowel Diseases. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e87734. [CrossRef]
17. Vierbuchen, T.; Bang, C.; Rosigkeit, H.; Schmitz, R.A.; Heine, H. The Human-Associated Archaeon *Methanospiraerium stadtmanae* Is Recognized through Its RNA and Induces TLR8-Dependent NLRP3 Inflammasome Activation. *Front. Immunol.* **2017**, *8*, 313829. [CrossRef]
18. Chehoud, C.; Albenberg, L.G.; Judge, C.; Hoffmann, C.; Grunberg, S.; Bittinger, K.; Baldassano, R.N.; Lewis, J.D.; Bushman, F.D.; Wu, G.D. A Fungal Signature in the Gut Microbiota of Pediatric Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm. Bowel Dis.* **2015**, *21*, 1948. [CrossRef]
19. Krawczyk, A.; Salamon, D.; Kowalska-Duplaga, K.; Bogiel, T.; Gosiewski, T. Association of Fungi and Archaea of the Gut Microbiota with Crohn's Disease in Pediatric Patients—Pilot Study. *Pathogens* **2021**, *10*, 1119. [CrossRef]
20. Ruel, J.; Ruane, D.; Mehandru, S.; Gower-Rousseau, C.; Colombel, J.F. IBD across the Age Spectrum: Is It the Same Disease? *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2014**, *11*, 88–98. [CrossRef]
21. Cisek, A.A.; Bak, L.; Cukrowska, B. Improved Quantitative Real-Time PCR Protocol for Detection and Quantification of Methanogenic Archaea in Stool Samples. *Microorganisms* **2023**, *11*, 660. [CrossRef]
22. OpenEpi—2 × 2 Table Statistics. Available online: <https://www.openepi.com/TwoByTwo/TwoByTwo.htm> (accessed on 25 December 2023).
23. Ghavami, S.B.; Rostami, E.; Sephay, A.A.; Shahrokh, S.; Balaii, H.; Aghdaei, H.A.; Zali, M.R. Alterations of the Human Gut *Methanobrevibacter smithii* as a Biomarker for Inflammatory Bowel Diseases. *Microb. Pathog.* **2018**, *117*, 285–289. [CrossRef] [PubMed]
24. Houshyar, Y.; Massimino, L.; Lamparelli, L.A.; Danese, S.; Ungaro, F. Going Beyond Bacteria: Uncovering the Role of Archaeome and Mycobiome in Inflammatory Bowel Disease. *Front. Physiol.* **2021**, *12*, 783295. [CrossRef] [PubMed]
25. Massimino, L.; Lamparelli, L.A.; Houshyar, Y.; D'Alessio, S.; Peyrin-Biroulet, L.; Vetrano, S.; Danese, S.; Ungaro, F. The Inflammatory Bowel Disease Transcriptome and Metatranscriptome Meta-Analysis (IBD TaMMA) Framework. *Nat. Comput. Sci.* **2021**, *1*, 511–515. [CrossRef]
26. Zhang, X.; Deeke, S.A.; Ning, Z.; Starr, A.E.; Butcher, J.; Li, J.; Mayne, J.; Cheng, K.; Liao, B.; Li, L.; et al. Metaproteomics Reveals Associations between Microbiome and Intestinal Extracellular Vesicle Proteins in Pediatric Inflammatory Bowel Disease. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 2873. [CrossRef] [PubMed]
27. Huang, Y.; Wu, M.; Xiao, H.; Liu, H.; Yang, G. Mesalamine-Mediated Amelioration of Experimental Colitis in Piglets Involves Gut Microbiota Modulation and Intestinal Immune Cell Infiltration. *Front. Immunol.* **2022**, *13*, 883682. [CrossRef]
28. Bang, C.; Weidenbach, K.; Gutschmann, T.; Heine, H.; Schmitz, R.A. The Intestinal Archaea *Methanospiraerium stadtmanae* and *Methanobrevibacter smithii* Activate Human Dendritic Cells. *PLoS ONE* **2014**, *9*, 99411. [CrossRef]
29. D'Amico, F.; Nancey, S.; Danese, S.; Peyrin-Biroulet, L. A Practical Guide for Faecal Calprotectin Measurement: Myths and Realities. *J. Crohn's Colitis* **2021**, *15*, 152–161. [CrossRef]
30. Pimentel, M.; Mayer, A.G.; Park, S.; Chow, E.J.; Hasan, A.; Kong, Y. Methane Production during Lactulose Breath Test Is Associated with Gastrointestinal Disease Presentation. *Dig. Dis. Sci.* **2003**, *48*, 86–92. [CrossRef]
31. Rana, S.V.; Sharma, S.; Malik, A.; Kaur, J.; Prasad, K.K.; Sinha, S.K.; Singh, K. Small Intestinal Bacterial Overgrowth and Orocecal Transit Time in Patients of Inflammatory Bowel Disease. *Dig. Dis. Sci.* **2013**, *58*, 2594–2598. [CrossRef]
32. Shah, A.; Morrison, M.; Burger, D.; Martin, N.; Rich, J.; Jones, M.; Koloski, N.; Walker, M.M.; Talley, N.J.; Holtmann, G.J.; et al. Systematic Review with Meta-Analysis: The Prevalence of Small Intestinal Bacterial Overgrowth in Inflammatory Bowel Disease Summary Background: Current Data on Small Intestinal Bacterial Overgrowth (SIBO) in Patients. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2019**, *49*, 624–635. [CrossRef]
33. Gandhi, A.; Shah, A.; Jones, M.P.; Koloski, N.; Talley, N.J.; Morrison, M.; Holtmann, G. Methane Positive Small Intestinal Bacterial Overgrowth in Inflammatory Bowel Disease and Irritable Bowel Syndrome: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Gut Microbes* **2021**, *13*, 1933313. [CrossRef]
34. Weaver, G.A.; Krause, J.A.; Miller, T.L.; Wolin, M.J. Incidence of Methanogenic Bacteria in a Sigmoidoscopy Population: An Association of Methanogenic Bacteria and Diverticulosis. *Gut* **1986**, *27*, 698–704. [CrossRef]

35. Peled, Y.; Gilat, T.; Liberman, E.; Bujanover, Y. The Development of Methane Production in Childhood and Adolescence. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **1985**, *4*, 575–579. [[CrossRef](#)]
36. Mihajlovski, A.; Doré, J.; Levenez, F.; Alric, M.; Brugère, J.F. Molecular Evaluation of the Human Gut Methanogenic Archaeal Microbiota Reveals an Age-Associated Increase of the Diversity. *Environ. Microbiol. Rep.* **2010**, *2*, 272–280. [[CrossRef](#)]
37. Dridi, B.; Henry, M.; Richet, H.; Raoult, D.; Drancourt, M. Age-Related Prevalence of *Methanomassiliicoccus luminyensis* in the Human Gut Microbiome. *APMIS* **2012**, *120*, 773–777. [[CrossRef](#)]
38. Vanderhaeghen, S.; Lacroix, C.; Schwab, C. Methanogen Communities in Stools of Humans of Different Age and Health Status and Co-Occurrence with Bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **2015**, *362*, frv092. [[CrossRef](#)]
39. Busquets, D.; Oliver, L.; Amoedo, J.; Ramió-Pujol, S.; Malagón, M.; Serrano, M.; Bahi, A.; Capdevila, M.; Lluansi, A.; Torrealba, L.; et al. RAID Prediction: Pilot Study of Fecal Microbial Signature With Capacity to Predict Response to Anti-TNF Treatment. *Inflamm. Bowel Dis.* **2021**, *27*, S63–S66. [[CrossRef](#)]
40. Kucharzik, T.; Ellul, P.; Greuter, T.; Rahier, J.F.; Verstockt, B.; Abreu, C.; Albuquerque, A.; Allocca, M.; Esteve, M.; Farraye, F.A.; et al. ECCO Guidelines on the Prevention, Diagnosis, and Management of Infections in Inflammatory Bowel Disease. *J. Crohn's Colitis* **2021**, *15*, 879–913. [[CrossRef](#)]
41. Cisek, A.A.; Bąk, I.; Stefańska, I.; Binek, M. Selection and Optimization of High-Yielding DNA Isolation Protocol for Quantitative Analyses of Methanogenic Archaea. *Microorganisms* **2022**, *10*, 523. [[CrossRef](#)]
42. Salonen, A.; Nikkilä, J.; Jalanka-Tuovinen, J.; Immonen, O.; Rajilić-Stojanović, M.; Kekkonen, R.A.; Palva, A.; de Vos, W.M. Comparative Analysis of Fecal DNA Extraction Methods with Phylogenetic Microarray: Effective Recovery of Bacterial and Archaeal DNA Using Mechanical Cell Lysis. *J. Microbiol. Methods* **2010**, *81*, 127–134. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. The Ribosomal RNA Database. Available online: <https://rrndb.umms.med.umich.edu/> (accessed on 24 October 2023).
44. Science Primer. Available online: <http://scienceprimer.com/copy-number-calculator-for-realtime-pcr> (accessed on 1 October 2023).
45. Ufnar, J.A.; Wang, S.Y.; Christiansen, J.M.; Yampara-Iquise, H.; Carson, C.A.; Ellender, R.D. Detection of the *NifH* Gene of *Methanobrevibacter smithii*: A Potential Tool to Identify Sewage Pollution in Recreational Waters. *J. Appl. Microbiol.* **2006**, *101*, 44–52. [[CrossRef](#)]
46. Cozannet, M.; Borrel, G.; Roussel, E.; Moalic, Y.; Allieux, M.; Sanvoisin, A.; Toffin, L.; Alain, K. New Insights into the Ecology and Physiology of Methanomassiliococcales from Terrestrial and Aquatic Environments. *Microorganisms* **2021**, *9*, 30. [[CrossRef](#)]
47. Prion, S.; Haerling, K.A. Making Sense of Methods and Measurement: Spearman-Rho Ranked-Order Correlation Coefficient. *Clin. Simul. Nurs.* **2014**, *10*, 535–536. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Materiały uzupełniające do pracy: **Cisek AA**, Bąk I, Cukrowska B. Improved Quantitative Real-Time PCR Protocol for Detection and Quantification of Methanogenic Archaea in Stool Samples. *Microorganisms*. **2023**, *11*(3):660.

Table S1: Multiple alignments of the *mcrA* sequence fragment of 47 methanogenic archaea.

Methanolobus oregonensis 1_490_U22242.1/1-474 -----GACCGGTACAGAT-----
Methanolobus zinderi 256_745_EU715818.1_RComp1/1-474 -----CAAGGGTAAGAC-----
Methanolobus taylorii 1_490_U22243.1/1-474 -----CAAGGGTACAGAC-----
Methanolobus profundus 687_1168_AB703629.1/1-466 -----AACAAGGTACAGAC-----
Methanolobus vulcani 1_490_U22245.1/1-474 -----CAAGGGTACAGAC-----
Methanocella comradii 1_465_JN081865.1/1-450 -----GAT--GC-C-GAC-----
Methanocella sp._279_692_KJ441441.1/1-398 -----GAT--GC-C-GAC-----
Methanocella paludicola 240_681_AB300467.1/1-426 -----GATCGGC-CAGAC-----
Methanomicrobium mobile 1_438_AF414044.1/1-438 -----TGTTGAC-TAGAA-----GAAACCATCCCCCGAAAGCTCG-----
Methanoculleus marisnigri_RComp1_1_436_MH004450.1/1-436 -----GFTCGAC-TGGGA-----AAAACC-----GAACGAGAAAG-----
Methanoculleus palmolei 259_743_AB300784.1/1-469 -----GFTCGAC-TGGAA-----GAAACC-----GAGCCGGAAG-----
Methanoculleus bourgensis 259_743_AB300787.1/1-469 -----GFTCGAC-TGGAA-----GAAACC-----GAGCCGGAAG-----
Methanoculleus chikugoensis 259_743_AB300779.1/1-469 -----GFTCGAC-TGGAA-----GAAACC-----GAGCCGGAAG-----
Methanogenium organophilum 1_501_DQ229160.1/1-487 -----CTTCGAC-TACTCTACTCCATCTGCAAC-----AGCAACC-----
Methanogenium boonei 15_520_DQ229161.1/1-490 -----CTTCGAC-TACTCT-----CAACC CGAAGCCCGAGCAACCA-----
Methanogenium cariaci 1_433_DQ229157.1/1-420 -----CTTCGAC-TACTCT-----C-ACC CGAAGCCCGAGCAACCA-----
Methanobacterium sp._1_452_QJ917190.1/1-452 -----TATCTGC-GGAAC-----
Methanobrevibacter smithii 1_423_GU385700.1/1-423 -TGG-----ATTAACT-GAAGC-----
Methanobrevibacter oralis 1_414_LK054628.1/1-414 -TGG-----ATTAACT-CAAGC-----
Methanobrevibacter ruminantium/1-470 -AGA-----CTTATGT-TCCGC-----
Methanobrevibacter sp._D5_mcrA_plasmid_365_874_KF214818.1/1-488 -AGA-----ATTATGT-CGAGC-----
Methanobrevibacter gottschalkii 1_471_EU919431.1/1-471 -TGA-----TTTATGT-GCTGC-----
Methanobrevibacter boviskoreani 1_424_KC865050.1/1-424 -CGG-----ATTAACC-GAAGC-----
Methanobrevibacter woesei 1_467_EU919432.1/1-467 -T-----TTAAC-AAAAGC-----
Methanobrevibacter wolini 1_395_KC865051.1/1-395 -T-----TTAAC-AAAAGC-----
Methanobrevibacter arboriphilus 1_414_AF414035.1/1-414 -----AATATGT-GAAGC-----
Methanobacterium movens 673_1133_HM802934.1/1-445 -----AATGTGT-GAAGC-----
Methanobacterium thermaggregans 1_440_XY289750.1/1-440 -----ACTCTGT-GAGGC-----
Methanothermobacter wolfeii 259_719_AB300780.1/1-445 -----ACTCTGT-GAGGC-----
Methanothermobacter tenebrarum 259_723_AB523786.1/1-449 G-----ACTTGA-CGAAGC-----
Methanothermobacter crinale 18_503_HQ283274.1/1-470 -----ACTTGA-CGAAGC-----
Methanobacterium aggregans 690_1116_KP006500.1/1-411 -----ACTATGT-GAAGC-----
Methanobacterium aarhusense 650_1124_AY386125.1/1-459 -----ATTATGT-GAAGC-----
Methanobacterium bryantii 259_719_AF313806.1/1-445 -----ACTTACC-GAAGC-----
Methanococcus voltae 5430_5930_X07793.1/1-485 -----AAGATGC-GGAAC-----
Methanothermococcus thermolithot 1_414_AF414048.1/1-414 -----AATAAAC-AGTAC-----
Methanococcus maripaludis 684_1144_AB703637.1/1-445 -----TAGAATG-GGAAC-----
Methanococcus vanniellii 4514_5014_M16893.1/1-485 -----TAGAATG-GGAAC-----
Methanococcus aeolicus 1_464_AY354034.1/1-464 -----TAGAATG-GGAAC-----
Methanosphaera sp._1_464_FJ982887.1/1-464 -----ATTATGT-CAAGC-----
Methanosphaera stadtmannae 1_414_AF414047.1/1-414 -TGG-----ATTATGT-CAAGC-----

Methanopyrus sp._18_510_KC618341.1/1-477 -----AAACCGATGACATGAA-----GNAAGTCNTGAAACTCG-----
Methanomassiliicoccus luminyensis 1_456_strain_B10_HQ896500.1/1-455 -----CA-----AGCCCT--CCATGGA-----CCTGTATGAGAGACTCG-----
Methanopyrus kandleri 1_414_AF414042.1/1-414 -----CG-----AGCCGA--GCATGGA-----CGTGTGAAGGACTCG-----
Methanosarcina mazei_MH004454.1_RComp1_1_433/1-433 -----AACAAGGTAAAGGCAG--CCCTCGA-----TGTAGTAAAGGACTCG-----
Methanosarcina horonobensis 256_737_AB288266.1/1-466 -----AACAAGTAAAGGCAG--CCCTCGA-----AGTCTGAAGGACTCG-----
Methanosarcina subterranea 259_740_AB288268.1/1-466 -----AACAAGTAAAGGCAG--CCCTCGA-----AGTCTGAAGGACTCG-----
Methanolobus oregonensis 1_490_U22242.1/1-474 -----AACAAGGTACAGGCAG--CACTTGA-----TGTGTAAAGGACTCG-----
Methanolobus zinderi 256_745_EU715818.1_RComp1/1-474 -----AACAAGTACAGGCAG--CACTTGA-----TGTGTAAAGGACTCG-----
Methanolobus taylorii 1_490_U22243.1/1-474 -----AACAAGTAAAGGCAG--CCCTCGA-----CGTGTAAAGGACTCG-----
Methanolobus profundus 687_1168_AB703629.1/1-466 -----AACAAGTAAAGGCAG--CCCTCGA-----AGTGTAAAGGACTCG-----
Methanolobus vulcani 1_490_U22245.1/1-474 -----AACAAGTAAAGGCAG--GCCTCGA-----TGTGTAAAGGACTCG-----
Methanocella comradii 1_465_JN081865.1/1-450 -----CA-----AGCCCA--CTATGGA-----CATAGTCAAGCACTGG-----
Methanocella sp._279_692_KJ441441.1/1-398 -----CA-----AGGCTG--ACATGGA-----CGTAGTCAAGCACTGG-----
Methanocella paludicola 240_681_AB300467.1/1-426 -----CA-----AGCCGA--CCATGGA-----CATAGTCAAGCACTGG-----
Methanomicrobium mobile 1_438_AF414044.1/1-438 -----TAA-----AACA--CCAGGA-----AGTTGTAAAGCACTGG-----
Methanoculleus marisnigri_RComp1_1_436_MH004450.1/1-436 -----GACAAAGTCA-----AGCCCA--CCAGGA-----CATCTCAAGCACTCG-----
Methanoculleus palmolei 259_743_AB300784.1/1-469 -----GACAAAGTCA-----AGCCGA--CCAGGA-----GATCTCAAGCACTGG-----
Methanoculleus bourgensis 259_743_AB300787.1/1-469 -----GACAAAGTCA-----AGCCGA--CCAGGA-----TSTGTCAAGCACTGG-----
Methanoculleus chikugoensis 259_743_AB300779.1/1-469 -----GACAAAGTCA-----AGCCGA--CCAGGA-----TATGTCAAGCACTGG-----
Methanogenium organophilum 1_501_DQ229160.1/1-487 -----TCG-----AGCCTA--DCCAGGA-----CCTCGTCAAGCACTTA-----
Methanogenium boonei 15_520_DQ229161.1/1-490 -----TCA-----CTCCTA--CCCAGGA-----GATCGTCAAGCACTTG-----
Methanogenium cariaci 1_433_DQ229157.1/1-420 -----TCA-----CTCCAA--CTCAGGA-----TGTCTCAAGCACTTG-----
Methanobacterium sp._1_452_QJ917190.1/1-452 -----CA-----AAGCCA--GCATGGA-----AGTAGTCAAGCACTAA-----
Methanobrevibacter smithii 1_423_GU385700.1/1-423 -----AC-----CTAATA--ACATGGAACCTGTTCTGATGTA-----G-----
Methanobrevibacter oralis 1_414_LK054628.1/1-414 -----AC-----CAAATA--ATATGGATCTGTTTATGATGT-----G-----
Methanobrevibacter ruminantium/1-470 -----AC-----CTAAG--ACATGGAACCTGTTCTGATGTA-----G-----
Methanobrevibacter sp._D5_mcrA_plasmid_365_874_KF214818.1/1-488 -----AC-----CTAATA--ACATGGAACCTGTTCTGATGTA-----G-----
Methanobrevibacter gottschalkii 1_471_EU919431.1/1-471 -----TC-----CTAACA--ACATGGATCTGTTTATGATGTA-----G-----
Methanobrevibacter boviskoreani 1_424_KC865050.1/1-424 -----AC-----CTAACA--ACATGGAACCTGTTCTGATGTA-----G-----
Methanobrevibacter wolini 1_395_KC865051.1/1-395 -----AC-----CTAACA--ACATGGATCTGTTTATGATGTA-----G-----
Methanobrevibacter arboriphilus 1_414_AF414035.1/1-414 -----TC-----CAAACA--ACATGGATCTGTTTATGATGTA-----G-----
Methanobacterium movens 673_1133_HM802934.1/1-445 -----AC-----CAAATA--CCATGGAACCTGTTCTGATGTA-----G-----
Methanobacterium thermaggregans 1_440_XY289750.1/1-440 -----AC-----CAAACA--CCATGGAACCTGTTCTGATGTA-----G-----
Methanothermobacter wolfeii 259_719_AB300780.1/1-445 -----AC-----CGAACA--CCATGGAACCTGTTCTGATGTA-----G-----
Methanothermobacter tenebrarum 259_723_AB523786.1/1-449 -----AC-----CTAACA--CCATGGAACCTGTTCTGATGTA-----G-----
Methanothermobacter crinale 18_503_HQ283274.1/1-470 -----GC-----CTAACA--CCATGGAACCTGTTCTGATGTA-----G-----
Methanobacterium aggregans 690_1116_KP006500.1/1-411 -----TC-----CAAACA--ACATGGATCTGTTTATGATGTA-----G-----
Methanobacterium aarhusense 650_1124_AY386125.1/1-459 -----AC-----CTAACA--ACATGGATCTGTTTATGATGTA-----G-----
Methanobacterium bryantii 259_719_AF313806.1/1-445 -----GC-----CAAATA--CTATGGAACCTGTTCTGATGTA-----G-----
Methanococcus voltae 5430_5930_X07793.1/1-485 -----TA-----AAGCTA--CAATGGA-----TGTAGTAAAGGACTGG-----
Methanothermococcus thermolithot 1_414_AF414048.1/1-414 -----AA-----AACCAG--CAATGGA-----TGTGTAAAGGACTGG-----
Methanococcus maripaludis 684_1144_AB703637.1/1-445 -----AA-----AAGCTA--CAATGGA-----TGTAGTAAAGGACTGG-----
Methanococcus vanniellii 4514_5014_M16893.1/1-485 -----TA-----AAGCTA--CAATGGA-----CGTAGTAAAGGACTGG-----
Methanococcus aeolicus 1_464_AY354034.1/1-464 -----AA-----AAGCTA--CAATGGA-----TGTGTAAAGGACTGG-----
Methanosphaera sp._1_464_FJ982887.1/1-464 -----TG-----AAGCTA--ATTCCGA-----TGTGTAAAGGACTGG-----
Methanosphaera stadtmannae 1_414_AF414047.1/1-414 -----TG-----AAGCAA--CTTCCGA-----AGTTGTAAAGGACTGG-----

Methanopyrus sp._18_510_KC618341.1/1-477 -----ACGATGAAGTCACTGGTACGCATCTGGATGTA CGAGAGATACCCCGCATCTGGAGA
Methanomassiliicoccus luminyensis 1_456_strain_B10_HQ896500.1/1-455 GCACCGAGATCAACTCTCTACGGTCTGGAGATGTA CGAGAGATACCCCGCATCTGGAAA
Methanopyrus kandleri 1_414_AF414042.1/1-414 CGACCGAGTCACTCTGTACGGTCTGGAGCAGTACGAGCGGTACCCCGCCATCTGGAAA
Methanosarcina mazei_MH004454.1_RComp1_1_433/1-433 CAACCGAATCCCACTCTATGGTATCGAGACTA CGAGAAATCCCAACACCCCTTGAAG
Methanosarcina horonobensis 256_737_AB288266.1/1-466 CAACCGAATCCCACTCTACGGTATCGAGACTA CGAGAAATCCCAACACCCCTTGAAG
Methanosarcina subterranea 259_740_AB288268.1/1-466 CAACCGAATCCCACTCTACGGTATCGAGACTA CGAGAAATCCCAACACCCCTTGAAG
Methanolobus oregonensis 1_490_U22242.1/1-474 CAACGAGTCCCACTATATGGTCTTGGAAATTA CGAGAAATCCCAACACCCCTTGAAG
Methanolobus zinderi 256_745_EU715818.1_RComp1/1-474 CAACGAGTCCCACTATATGGTCTTGGAAATTA CGAGAAATCCCAACACCCCTTGAAG
Methanolobus taylorii 1_490_U22243.1/1-474 CAACGAGTCCCACTATATGGTCTTGGAAATTA CGAGAAATCCCAACACCCCTTGAAG
Methanolobus profundus 687_1168_AB703629.1/1-466 CAACGAGTCCCACTATATGGTCTTGGAAATTA CGAGAAATCCCAACACCCCTTGAAG
Methanolobus vulcani 1_490_U22245.1/1-474 CAACGAGTCCCACTATATGGTCTTGGAAATTA CGAGAAATCCCAACACCCCTTGAAG
Methanocella comradii 1_465_JN081865.1/1-450 CAACGAGTCCCACTATATGGTCTTGGAAATTA CGAGAAATCCCAACACCCCTTGAAG
Methanocella sp._279_692_KJ441441.1/1-398 CAACGAGTCCCACTATATGGTCTTGGAAATTA CGAGAAATCCCAACACCCCTTGAAG
Methanocella paludicola 240_681_AB300467.1/1-426 CAACGAGTCCCACTATATGGTCTTGGAAATTA CGAGAAATCCCAACACCCCTTGAAG

Methanobrevibacter sp._1_452_QJ0917190.1/1-452
Methanobrevibacter_smlthii_1_423_GU385700.1/1-423
Methanobrevibacter_oralis_1_414_LK054628.1/1-414
Methanobrevibacter_ruminantium/1-470
Methanobrevibacter_sp._D5_mcrA_plasmid_365_874_KP214818.1/1-488
Methanobrevibacter_gottschalkii_1_471_EU919431.1/1-471
Methanobrevibacter_boviskoreani_1_424_KC865050.1/1-424
Methanobrevibacter_woessei_1_467_EU919432.1/1-467
Methanobrevibacter_wolinii_1_395_KC865051.1/1-395
Methanobrevibacter_arboriphilus_1_414_A414035.1/1-414
Methanobacterium_movens_673_1133_HM802934.1/1-445
Methanobacterium_thermaggregans_1_440_AY289750.1/1-440
Methanothermobacter_wolfelii_259_719_AB300780.1/1-445
Methanothermobacter_terebrarum_259_723_AB523786.1/1-449
Methanothermobacter_crinale_18_503_HQ283274.1/1-470
Methanobacterium_aggregans_690_1116_KP065000.1/1-411
Methanobacterium_aarhusense_650_1124_AY386125.1/1-459
Methanobacterium_bryantii_259_719_AY313806.1/1-445
Methanococcus_voltae_5430_5930_X07793.1/1-485
Methanococcus_voltae_5430_5930_X07793.1/1-485
Methanothermococcus_thermolithoth_1_414_A414048.1/1-414
Methanococcus_maripaludis_684_1144_AY3073637.1/1-445
Methanococcus_vannielii_4514_5014_M16893.1/1-485
Methanococcus_aeolicus_1_464_AY354034.1/1-464
Methanosphaera_sp._1_464_PJ982887.1/1-464
Methanosphaera_stadtmanae_1_414_A414047.1/1-414

Methanopyrus sp._18_510_KC618341.1/1-477
Methanococcilliococcus_luminyensis_1_456_strain_B10_HQ896500.1/1-455
Methanopyrus_kandlerii_1_414_A414042.1/1-414
Methanosarcina_mazei_MH004454.1_RCompl_1_433/1-433
Methanosarcina_horonobensis_256_737_AB288266.1/1-466
Methanosarcina_subterranea_259_740_AB288268.1/1-466
Methanolobus_oregonensis_1_490_U22242.1/1-474
Methanolobus_zinderii_256_745_EU715818.1_RCompl/1-474
Methanolobus_taylorii_1_490_U22243.1/1-474
Methanolobus_profundi_687_1168_AB703629.1/1-466
Methanolobus_vulcanii_1_490_U22245.1/1-474
Methanocella_comradii_1_465_JN081965.1/1-450
Methanocella_sp._279_692_KJ441441.1/1-398
Methanocella_paludicola_240_681_AB300467.1/1-426
Methanomicrobium_mobile_1_438_A414044.1/1-438
Methanococcus_marisnigri_RCompl_1_436_MH004450.1/1-436
Methanococcus_palmolei_259_743_AB300784.1/1-469
Methanococcus_bourgenensis_259_743_AB300787.1/1-469
Methanococcus_chikugoensis_259_743_AB300779.1/1-469
Methanogenium_organophilum_1_501_DQ229160.1/1-487
Methanogenium_boonei_15_520_DQ229161.1/1-490
Methanogenium_cariaci_1_433_DQ229157.1/1-420
Methanobacterium_sp._1_452_QJ0917190.1/1-452
Methanobrevibacter_smlthii_1_423_GU385700.1/1-423
Methanobrevibacter_oralis_1_414_LK054628.1/1-414
Methanobrevibacter_ruminantium/1-470
Methanobrevibacter_sp._D5_mcrA_plasmid_365_874_KP214818.1/1-488
Methanobrevibacter_gottschalkii_1_471_EU919431.1/1-471
Methanobrevibacter_boviskoreani_1_424_KC865050.1/1-424
Methanobrevibacter_woessei_1_467_EU919432.1/1-467
Methanobrevibacter_wolinii_1_395_KC865051.1/1-395
Methanobrevibacter_arboriphilus_1_414_A414035.1/1-414
Methanobacterium_movens_673_1133_HM802934.1/1-445
Methanobacterium_thermaggregans_1_440_AY289750.1/1-440
Methanothermobacter_wolfelii_259_719_AB300780.1/1-445
Methanothermobacter_terebrarum_259_723_AB523786.1/1-449
Methanothermobacter_crinale_18_503_HQ283274.1/1-470
Methanobacterium_aggregans_690_1116_KP065000.1/1-411
Methanobacterium_aarhusense_650_1124_AY386125.1/1-459
Methanobacterium_bryantii_259_719_AY313806.1/1-445
Methanococcus_voltae_5430_5930_X07793.1/1-485
Methanothermococcus_thermolithoth_1_414_A414048.1/1-414
Methanococcus_maripaludis_684_1144_AY3073637.1/1-445
Methanococcus_vannielii_4514_5014_M16893.1/1-485
Methanococcus_aeolicus_1_464_AY354034.1/1-464
Methanosphaera_sp._1_464_PJ982887.1/1-464
Methanosphaera_stadtmanae_1_414_A414047.1/1-414

Methanopyrus sp._18_510_KC618341.1/1-477
Methanococcilliococcus_luminyensis_1_456_strain_B10_HQ896500.1/1-455
Methanopyrus_kandlerii_1_414_A414042.1/1-414
Methanosarcina_mazei_MH004454.1_RCompl_1_433/1-433
Methanosarcina_horonobensis_256_737_AB288266.1/1-466
Methanosarcina_subterranea_259_740_AB288268.1/1-466
Methanolobus_oregonensis_1_490_U22242.1/1-474
Methanolobus_zinderii_256_745_EU715818.1_RCompl/1-474
Methanolobus_taylorii_1_490_U22243.1/1-474
Methanolobus_profundi_687_1168_AB703629.1/1-466
Methanolobus_vulcanii_1_490_U22245.1/1-474
Methanocella_comradii_1_465_JN081965.1/1-450
Methanocella_sp._279_692_KJ441441.1/1-398
Methanocella_paludicola_240_681_AB300467.1/1-426
Methanomicrobium_mobile_1_438_A414044.1/1-438
Methanococcus_marisnigri_RCompl_1_436_MH004450.1/1-436
Methanococcus_palmolei_259_743_AB300784.1/1-469
Methanococcus_bourgenensis_259_743_AB300787.1/1-469
Methanococcus_chikugoensis_259_743_AB300779.1/1-469
Methanogenium_organophilum_1_501_DQ229160.1/1-487
Methanogenium_boonei_15_520_DQ229161.1/1-490
Methanogenium_cariaci_1_433_DQ229157.1/1-420
Methanobacterium_sp._1_452_QJ0917190.1/1-452
Methanobrevibacter_smlthii_1_423_GU385700.1/1-423
Methanobrevibacter_oralis_1_414_LK054628.1/1-414
Methanobrevibacter_ruminantium/1-470
Methanobrevibacter_sp._D5_mcrA_plasmid_365_874_KP214818.1/1-488
Methanobrevibacter_gottschalkii_1_471_EU919431.1/1-471
Methanobrevibacter_boviskoreani_1_424_KC865050.1/1-424
Methanobrevibacter_woessei_1_467_EU919432.1/1-467

Methanobrevibacter wolini 1_395_KC865051.1/1-395 GTGCTGCTAAACACATTTCTCT-TCAGAAATGATGAAG-----TTT-----
Methanobrevibacter arboriphilus_1_414_AF414035.1/1-414 GTGCATCCAAACGATTTCTCTA-TAAGAAATGACGAAG-----ATT-----
Methanobacterium movens_673_1133_HM802934.1/1-445 GTGCATTAACGATTTCTCTA-TAAGAAATGACGAAG-----ATT-----
Methanobacterium thermaggregans_1_440_AY289750.1/1-440 GTGCATCCAAACGATTTCTCTA-TAAGAAATGACGAAG-----ATT-----
Methanothermobacter wolfeii_259_719_AB300780.1/1-445 GTGCATCCAAACGATTTCTCTA-TAAGAAATGACGAAG-----ATT-----
Methanothermobacter tenebrarum_259_723_AB523786.1/1-449 GTGCATCCAAACGATTTCTCTA-TAAGAAATGACGAAG-----ATT-----
Methanothermobacter crinale_18_503_HQ283274.1/1-470 GTGCATCCAAACGATTTCTCTA-TAAGAAATGACGAAG-----ATT-----
Methanobacterium aggregans_690_1116_KP006500.1/1-411 GTGCATCCAAACGATTTCTCTA-TAAGAAATGACGAAG-----ATT-----
Methanobacterium aarhusense_650_1124_AY386125.1/1-459 GTGCATCCAAACGATTTCTCTA-TAAGAAATGACGAAG-----ATT-----
Methanobacterium bryantii_259_719_AF313806.1/1-445 GTGCATCCAAACGATTTCTCTA-TAAGAAATGACGAAG-----ATT-----
Methanococcus voltae_5430_5930_X07793.1/1-485 GTGCATCCAAACGATTTCTCTA-TAAGAAATGACGAAG-----ATT-----
Methanothermococcus thermolithot_1_414_AF414048.1/1-414 GTGCATCCAAACGATTTCTCTA-TAAGAAATGACGAAG-----ATT-----
Methanococcus maripaludis_684_1144_AB703637.1/1-445 GTGCATCCAAACGATTTCTCTA-TAAGAAATGACGAAG-----ATT-----
Methanococcus yamii_4514_5014_M16893.1/1-485 GTGCATCCAAACGATTTCTCTA-TAAGAAATGACGAAG-----ATT-----
Methanococcus aeolicus_1_464_AY354034.1/1-464 GTGCATCCAAACGATTTCTCTA-TAAGAAATGACGAAG-----ATT-----
Methanosphaera_sp._1_464_FJ982887.1/1-464 GTGCATCCAAACGATTTCTCTA-TAAGAAATGACGAAG-----ATT-----
Methanosphaera_stadtmanae_1_414_AF414047.1/1-414 GTGCATCCAAACGATTTCTCTA-TAAGAAATGACGAAG-----ATT-----
Methanopyrus_sp._18_510_KC618341.1/1-477 -----GCCATGGAGCTCAGGGGACTAACCACCACTACGCAATGAACGTA-----
Methanomassiliococcus luminyensis_1_456_strain_B10_HQ896500.1/1-455 -----GCCTTCGGAGCTCAGGGGCCCCCACTACC-----
Methanopyrus kandleri_1_414_AF414042.1/1-414 -----CGCGTCGGAGCTCGGTGGTCGGAATC-----
Methanosarcina mazei_MH004454.1_RCompl_1_433/1-433 -----CCAGAGCAACTCCGTGG-----TCCA-----
Methanosarcina horonobensis_256_737_AB288266.1/1-466 -----CCAGAGCAACTCCGTGG-----TCCA-----
Methanosarcina subterranea_259_740_AB288268.1/1-466 -----CCAGAGCAACTCCGTGG-----TCCA-----
Methanobacterium oregonensis_1_490_U22242.1/1-474 -----GGCAGTTGAACTCCGGTGGACCAACTA-TCCA-----
Methanobacterium zinderi_256_745_EU15818.1_RCompl/1-474 -----GGCAGTTGAACTCCGGTGGACCAACTA-TCCA-----
Methanobacterium taylorii_1_490_U22243.1/1-474 -----GGCAGTTGAACTCCGGTGGACCAACTA-TCCA-----
Methanobacterium profundus_687_1168_AB703629.1/1-466 -----TGCTTTGAACTCCGGTGGACCAACTA-TCCA-----
Methanobacterium vulcani_1_490_U22245.1/1-474 -----TGCTTTGAACTCCGGTGGACCAACTA-TCCA-----
Methanocella comradii_1_465_JN081865.1/1-450 -----GCGAGTTGA-----GGGCCCCCAACTA-CCCG-----
Methanocella_sp._279_692_KJ441441.1/1-398 -----GATCGGAACTTCGCGGACCGAACTA-C-----
Methanocella paludicola_240_681_AB300467.1/1-426 -----AGTCGGAGCAACTCCGTGGACCC-----
Methanomicrobium mobile_1_438_AF414044.1/1-438 -----GATCGGAGCAACTTCGCGGACCGAACTA-C-----
Methanoculleus marisnigri_RCompl_1_436_MH004450.1/1-436 -----GATCGGAGCAACTTCGCGGACCGAACTA-C-----
Methanoculleus palmolei_259_743_AB300784.1/1-469 -----GTCTAATGGGAGCTCGGTGGTCGGA-----
Methanoculleus bourgenis_259_743_AB300787.1/1-469 -----GTCTAATGGGAGCTCGGTGGTCGGA-----
Methanoculleus chikugoensis_259_743_AB300779.1/1-469 -----GTCTAATGGGAGCTCGGTGGTCGGA-----
Methanogenium organophilum_1_501_DQ229160.1/1-487 -----CATGGGCGAATCGGTGGACCAACTA-TCCGACTACGCCATGA-----
Methanogenium boonei_15_520_DQ229161.1/1-490 -----GATGGGCGAATCGGTGGACCAACTA-TCCGACTACGCCATGA-----A-----
Methanogenium cariaci_1_433_DQ229157.1/1-420 -----GATGGGCGAATCGGTGGACCAACTA-TCCGACTACGCCATGA-----
Methanobacterium_sp._1_452_Q0917190.1/1-452 -----GATCCACGAACTACGGTGGTCCTAATACTCCCAACTACGCCATGA-----C-----
Methanobrevibacter_smithii_1_423_GU385700.1/1-423 -----ACCACTTGAATTAAGAGGCTCTACTACTACTATGCAATGAA-----
Methanobrevibacter_oralis_1_414_LK054628.1/1-414 -----ACCACTTGAATTAAGAGGCTCTACTACTACTATGCAATGAA-----CGTGGTAC-----
Methanobrevibacter_ruminantium/1-470 -----ACCACTTGAATTAAGAGGCTCTACTACTACTATGCAATGAA-----
Methanobrevibacter_sp._D5_mcrA_plasmid_365_874_KF214818.1/1-488 -----ACCACTTGAATTAAGAGGCTCTACTACTACTATGCAATGAA-----CGTGGTAC-----
Methanobrevibacter_gottschalkii_1_471_EU919431.1/1-471 -----ACCACTTGAATTAAGAGGCTCTACTACTACTATGCAATGAA-----
Methanobrevibacter_boviskoreani_1_424_KC865050.1/1-424 -----ACCACTTGAATTAAGAGGCTCTACTACTACTATGCAATGAA-----
Methanobrevibacter_woesei_1_467_EU919432.1/1-467 -----ACCTTGTGAATTAAGAGGCTCTACTACTACTATGCAATGAA-----
Methanobrevibacter_wolini_1_395_KC865051.1/1-395 -----ACCTTGTGAATTAAGAGGCTCTACTACTACTATGCAATGAA-----
Methanobrevibacter_arboriphilus_1_414_AF414035.1/1-414 -----ACCACTTGAATTAAGAGGCTCTACTACTACTATGCAATGAA-----
Methanobacterium_movens_673_1133_HM802934.1/1-445 -----ACCACTTGAATTAAGAGGCTCTACTACTACTATGCAATGAA-----
Methanobacterium_thermaggregans_1_440_AY289750.1/1-440 -----GCCATGGAGCTTCGTGG-----CCTA-----
Methanothermobacter_wolfeii_259_719_AB300780.1/1-445 -----GCCATGGAGCTTCGTGG-----CCTA-----
Methanothermobacter_tenebrarum_259_723_AB523786.1/1-449 -----ACCACTTGAATTAAGAGGCTCTACTACTACTATGCAATGAA-----CGT-----
Methanothermobacter_crinale_18_503_HQ283274.1/1-470 -----ACCACTTGAATTAAGAGGCTCTACTACTACTATGCAATGAA-----T-----
Methanobacterium_aggregans_690_1116_KP006500.1/1-411 -----ACCTTGTGAATTAAGAGGCTCTACTACTACTATGCAATGAA-----CGT-----
Methanobacterium_aarhusense_650_1124_AY386125.1/1-459 -----ACCACTTGAATTAAGAGGCTCTACTACTACTATGCAATGAA-----
Methanobacterium_bryantii_259_719_AF313806.1/1-445 -----ACCACTTGAATTAAGAGGCTCTACTACTACTATGCAATGAA-----CGT-----
Methanococcus_voltae_5430_5930_X07793.1/1-485 -----ACCACTTGAATTAAGAGGCTCTACTACTACTATGCAATGAA-----
Methanothermococcus_thermolithot_1_414_AF414048.1/1-414 -----ACCTTGTGAATTAAGAGGCTCTACTACTACTATGCAATGAA-----CGT-----
Methanococcus_maripaludis_684_1144_AB703637.1/1-445 -----ACCACTTGAATTAAGAGGCTCTACTACTACTATGCAATGAA-----
Methanococcus_yamii_4514_5014_M16893.1/1-485 -----ACCACTTGAATTAAGAGGCTCTACTACTACTATGCAATGAA-----CGT-----
Methanococcus_aeolicus_1_464_AY354034.1/1-464 -----ACCACTTGAATTAAGAGGCTCTACTACTACTATGCAATGAA-----
Methanosphaera_sp._1_464_FJ982887.1/1-464 -----AC-----GAATTAAGAGGCTCTACTACTACTATGCAATG-----
Methanosphaera_stadtmanae_1_414_AF414047.1/1-414 -----AC-----GAATTAAGAGGCTCTACTACTACTATGCAATG-----
Methanopyrus_sp._18_510_KC618341.1/1-477 -----
Methanomassiliococcus luminyensis_1_456_strain_B10_HQ896500.1/1-455 -----
Methanopyrus kandleri_1_414_AF414042.1/1-414 -----
Methanosarcina mazei_MH004454.1_RCompl_1_433/1-433 -----
Methanosarcina horonobensis_256_737_AB288266.1/1-466 -----
Methanosarcina subterranea_259_740_AB288268.1/1-466 -----
Methanobacterium oregonensis_1_490_U22242.1/1-474 -----
Methanobacterium zinderi_256_745_EU15818.1_RCompl/1-474 -----
Methanobacterium taylorii_1_490_U22243.1/1-474 -----
Methanobacterium profundus_687_1168_AB703629.1/1-466 -----
Methanobacterium vulcani_1_490_U22245.1/1-474 -----
Methanocella comradii_1_465_JN081865.1/1-450 -----
Methanocella_sp._279_692_KJ441441.1/1-398 -----
Methanocella paludicola_240_681_AB300467.1/1-426 -----
Methanomicrobium mobile_1_438_AF414044.1/1-438 -----
Methanoculleus marisnigri_RCompl_1_436_MH004450.1/1-436 -----
Methanoculleus palmolei_259_743_AB300784.1/1-469 -----
Methanoculleus bourgenis_259_743_AB300787.1/1-469 -----
Methanoculleus chikugoensis_259_743_AB300779.1/1-469 -----
Methanogenium organophilum_1_501_DQ229160.1/1-487 -----
Methanogenium boonei_15_520_DQ229161.1/1-490 -----
Methanogenium cariaci_1_433_DQ229157.1/1-420 -----
Methanobacterium_sp._1_452_Q0917190.1/1-452 -----
Methanobrevibacter_smithii_1_423_GU385700.1/1-423 -----
Methanobrevibacter_oralis_1_414_LK054628.1/1-414 -----
Methanobrevibacter_ruminantium/1-470 -----
Methanobrevibacter_sp._D5_mcrA_plasmid_365_874_KF214818.1/1-488 -----
Methanobrevibacter_gottschalkii_1_471_EU919431.1/1-471 -----
Methanobrevibacter_boviskoreani_1_424_KC865050.1/1-424 -----
Methanobrevibacter_woesei_1_467_EU919432.1/1-467 -----
Methanobrevibacter_wolini_1_395_KC865051.1/1-395 -----
Methanobrevibacter_arboriphilus_1_414_AF414035.1/1-414 -----
Methanobacterium_movens_673_1133_HM802934.1/1-445 -----
Methanobacterium_thermaggregans_1_440_AY289750.1/1-440 -----
Methanothermobacter_wolfeii_259_719_AB300780.1/1-445 -----
Methanothermobacter_tenebrarum_259_723_AB523786.1/1-449 -----
Methanothermobacter_crinale_18_503_HQ283274.1/1-470 -----
Methanobacterium_aggregans_690_1116_KP006500.1/1-411 -----

```

Methanobacterium aarhusense 650_1124_AY386125.1/1-459 -----
Methanobacterium bryantii 259_719_AF313806.1/1-445 -----
Methanococcus voltae 5430_5930_X07793.1/1-485 -----AGGTCACCAAGGTGA--
Methanothermococcus thermolithot 1_414_AF414048.1/1-414 -----
Methanococcus maripaludis 684_1144_AB703637.1/1-445 -----
Methanococcus vannielii 4514_5014_M16893.1/1-485 -----AGGTCACCAAGGTGA--
Methanococcus aeolicus 1_464_AY354034.1/1-464 -----
Methanosphaera sp. 1_464_FJ982887.1/1-464 -----AA
Methanosphaera stadtmanae 1_414_AF414047.1/1-414 -----

```

Table S2: Multiple alignments of the *mcrA* sequence fragment of 26 *Methanobrevibacter* and environmental species; nucleotides in bold represent the target of the *mcrA*_F3 primer.

```

CLUSTAL

gi309253887/1-472 GGTGGCGTCCGGATTCCACAAATGTATGCAACACCAGCATAACCCAATGATATCGTCGATGAC
gi930068978/1-469 GGTGGTGTCCGGTTCCACACAGTATGCAACCCGAGCATAACCCGACAACATCCTCGATGAC
gi930068946/1-466 GGTGGTGTCCGGTTCCACACAGTATGCAACCCGAGCATAACCCGACAACATCCTCGACGAC
gi954036668/1-468 GGTGGTGTCCGGATTCCACCCAGTATGCAACCCGCTGCATACACCCGACAACATCCTTGACGAC
gi930068996/1-469 GGTGGTGTCCGGATTCCACCAATATGCAACCCGCTGCATACACCCGACAACATCCTCGATGAC
gi428274410/1-489 GGTGGTGTCCGGATTCCACCCAGTATGCAACAGCCGCATACACCCGACAATATCCTCGATGAG
gi954036662/1-94 GGTGGTGTCCGGCTTTACCCAGTATGCAACAGCTGCATACACCCGACGATATCCTCGACAAC
gi954036666/1-486 GGTGGTGTCCGGCTTTACCCAGTATGCAACAGCTGCATACACCCGACGATATCCTCGACAAC
gi930068992/1-487 GGTGGTGTCCGGCTTTACCCAGTATGCAACAGCTGCATACACTGACGATATCCTCGACAAC
gi930068990/1-487 GGTGGTGTCCGGTTCACTCAGTATGCAACAGCTGCATACACTGATGATATCCTCGACAAC
gi950655841/1-488 GGTGGCGTCCGGTTCCACCCAGTATGCAACAGCTGCATACACCCGATGACATCCTCGACAAC
gi930068952/1-487 GGTGGTGTCCGGTTCACTCAGTATGCAACAGCTGCATACACTGATGACATCCTTGACAAC
gi58615486/1-470 GGTGGTGTCCGATTCCACGAGTACGCAACAGCAGCATAACCAACGATGTGCTGGATGAC
gi5616127/1-466 GGTGGTGTCCGATTCCACGAGTACGCAACAGCCGCATACACGAACGATGTCTGGATGAC
gi82492006/1-464 GGTGGTGTAGGATTCCACACAATATGCTACAGCAGCATATACTGATAATGTATTAGATGAC
gi262358095/1-470 GGTGGTGTAGGATTCCACACAGTATGCAACAGCAGCATATACTGATAATGTATTAGATGAC
gi629633272/1-472 GGTGGTGTAGGATTCCACACAATATGCTACTGCAGCATAACTGATAATGTATTAGACGAC
gi629633282/1-472 GGTGGTGTAGGATTCCACTCAATATGCTACTGCAGCATAACTGATAATGTATTAGACGAC
gi334085683/1-468 GGTGGTGTAGGATTCCACCAATACGCAACCCGAGCATAACTGACGACGATATTAGATGAC
gi217792440/1-467 GGTGGTGTAGGATTCCACACAGTATGCTACAGCAGCATATACTGATAATGTCTTGATGAC
gi498543114/1-395 -----
gi629633278/1-472 GGTGGTGTAGGATTTCCTCAATATGCTACCCGAGCATAACTGATAATGTATTAGATGAC
gi145370874/1-445 GGTGGTGTGGATTTCCTCAATACGCATCTGCAGCTTATACTGACAATATCTTGACGAT
gi311141403/1-440 GGTGGTGTGGATTTCCTCAATACGCATCTGCAGCTTATACTGACAATATCTTGACGAT
gi629633284/1-466 GGTGGTGTGGTTTACACAATATGCTAGTGCAGCTTATACTGATGATATCCTTGACGAT
gi629633280/1-466 GGTGGTGTAGGATTTCCTCAATATGCAAGTGCACATATACTGATGATATATTAGATGAT

gi309253887/1-472 TTCCTGTACTGGGGCAACGACTATGCAGCAAAGAA--ATA---CGGC----GG-----
gi930068978/1-469 TACTGCTACTACGGTATGGACTATATCAAGTCCAA--GTT---CGGT----GG-----
gi930068946/1-466 TACACCTACTACGGTATGGACTATGTCAAGTCCAA--GTA---CGGT----GG-----
gi954036668/1-468 TACTGCTACTATGGTCTTGACTATGTCAAGAAGAA--CCA---CGGT----GG-----
gi930068996/1-469 TACTGTTATTACGGTCTTGACTATGTCAAGAAGAA--ACA---CGGT----GG-----
gi428274410/1-489 TTCTGCTACTATGGTATGGACTACATCAAAGACAAGTACA--AGGTCGACTGG-----
gi954036662/1-94 AGCGTGTACTACAACATCGACTACATCAACGACA-----
gi954036666/1-486 AACGTGTACTACAACATCGACTACATCAACGACAA--GTA---CAAA----GGTGTCTGC
gi930068992/1-487 AACGTGTACTACAACGTGACTACATCAACGACAA--GTA---CAAA----GGTGTCTGC
gi930068990/1-487 AACGTGTACTACAACGTGACTACATCAACGACAA--GTA---CAAG----GGTGTCTGC
gi950655841/1-488 AACACCTACTACAACGTGACTACATCAACGACAA--GTA---CAAC----GGTGTCTGC
gi930068952/1-487 AACGTGTACTATGATGTAGACTACATCAACGACAA--GTA---CAAC----AATGTCTGC
gi58615486/1-470 TTCACGTTACTACGGATACGACTACGCACTGAACAA--GTA---CGGA----GA-----
gi5616127/1-466 TTCACGTTACTACGGATACGACTACGCACTGAAGAA--GTA---CGGA----GA-----
gi82492006/1-464 TTCACTTACTTCGGTAAAGATTATGTTGAAGATAA--ATACGG--T----GG-----
gi262358095/1-470 TTTACTTATTATGGTAAAGCTTATGTCGAAGCTAA--ATATGG--A----GA-----
gi629633272/1-472 TTCACCTACTACGGTAAAGACTACGTCGAAGACAA--ATACGG--A----GA-----
gi629633282/1-472 TTCACCTACTATGGTAAAGACTACGTCGAAGACAA--ATACGG--C----GA-----
gi334085683/1-468 TTCACCTACTACGGTAAAGACTACGTCGAAGACAA--ATACGG--T----GG-----
gi217792440/1-467 TTTGCTTACTATGGTAAAGATTATGTAGAAGATAA--ATATGG--T----GG-----
gi498543114/1-395 -----GTAAGATTATGTAGAAGATAA--ATATGG--T----GG-----
gi629633278/1-472 TTCTCTTACTTCGGTAAAGATTATGTAGAAGACAA--ATACGG--T----GG-----
gi145370874/1-445 TTCTTATACTATGGTAAAGAATATGTGCAAGACAA--ATT----T----GG-----
gi311141403/1-440 TTCTTATACTATGGTAAAGAATATGTGCAAGACAA--ATT----T----GG-----
gi629633284/1-466 TTCATTTATTATGGAATGGATTATGTCGAAGAAAGAA--TTA----T----GG-----
gi629633280/1-466 TTTATTTACTATGGAAGATTATGTAGAGAAAAA--TTA----T----GG-----

gi309253887/1-472 ---AA-----ATGG-----AAAGGCA-----AAAGCCAC-----
gi930068978/1-469 ---TC-----TCGG-----CAAAGTCCATGCAAG-----
gi930068946/1-466 ---AG-----CCGG-----CAAGGTCCATGCAAG-----
gi954036668/1-468 ---CA-----TCGG-----CAAGGCA-----AAGCACAC-----
gi930068996/1-469 ---CA-----TCGG-----AAAGGCA-----AAGTCAAC-----
gi428274410/1-489 ---CAGAACCCGAATCCAACGA-----CAAGGTC-----AAGCCAAC-----
gi954036662/1-94 -----
gi954036666/1-486 AAATG-----TCGGCAAGGACAACAAGGTA-----AAGGCAAC-----
gi930068992/1-487 AAATA-----TAGGCAAGGACAATAAGGTA-----AAGGCAAC-----
gi930068990/1-487 AAACA-----TCGGCAGGACAACAAGGTA-----AAGGCAAC-----
gi950655841/1-488 AAACG-----TCGGTAAGGACAACAAGGTA-----AAGGCAAC-----
gi930068952/1-487 AACAG-----TCGGCAAGGACAACAAGGTA-----AAGGCAAC-----

```


gi58615486/1-470 ---AG-----ACGG-----AACCGACCA
gi5616127/1-466 ---AG-----ACGG-----AACAGCACCA
gi82492006/1-464 ---AT-----TAAC-----TCAAGCA-----CCAAATAA-----
gi262358095/1-470 ---GT-----TATG-----TGCAGCA-----CCTAACAA-----
gi629633272/1-472 ---AT-----TATG-----CGCAGCA-----CCTAACAA-----
gi629633282/1-472 ---CT-----TATG-----TTCCGCA-----CCTAACAA-----
gi334085683/1-468 ---AT-----TAAC-----CGAAGCA-----CCTAACAA-----
gi217792440/1-467 ---T-----TAAC-----CAAAGCA-----CCTAACAA-----
gi498543114/1-395 ---T-----TAAC-----CAAAGCA-----CCTAACAA-----
gi629633278/1-472 ---AT-----TATG-----TGAAGCT-----CCTAACAA-----
gi145370874/1-445 ---AA-----TATG-----TGAAGCT-----CCTAACAA-----
gi311141403/1-440 ---AA-----TATG-----TGAAGCT-----CCTAACAA-----
gi629633284/1-466 ---GA-----TGTG-----TAATGCT-----GAATTAGA-----
gi629633280/1-466 ---AA-----TGTG-----TCAGGCA-----GAAGCTAA-----

gi309253887/1-472 ----CATTGACACTGTAAGGATATCGCTACAGAAACAACCTCTGTACGGTCTTGAAGCA
gi930068978/1-469 ----CAGGACGCAGTCAACGATGTTGCAACTGAAGTCAACCTCTACGGTATGGAACAG
gi930068946/1-466 ----CAGGACGCAGTCAACGATGTTGCAACTGAAGTCAACCTCTACGGTATGGAACAG
gi954036668/1-468 ----CCAGGAAGTTATCAACGACATTGCAACCGAAACCGCTCTACGGTATGGAACAG
gi930068996/1-469 ----CCAGGAAGTCTACTGACATTGCAACCGAGGTTAACCTCTACGGTATGGAACAG
gi428274410/1-489 ----CCAGGAAGTCTACTGACATTGCAACCGAGGTTAACCTCTACGGTATGGAACAG
gi954036662/1-94 -----
gi954036666/1-486 ----CCTCGAAGTCGTAAGGACATTGCAACCGAGTCCACACTCTACGGTATCGAGACC
gi930068992/1-487 ----CCTCGACGTCGTAAGGACATTGCAACCGAGTCCACACTCTACGGTATCGAGACC
gi930068990/1-487 ----TCTCGAAGTCGTAAGGACATTGCAACTGAGTCCACAACTCTACGGTATCGAGACC
gi950655841/1-488 ----CCTCGACGTCGTAAGGACATTGCAACCGAAATCCACAACTCTACGGTATCGAGACC
gi930068952/1-487 ----CCTCGAAGTCGTAAGGACATTGCAACCGAGTCCACAACTCTACGGTATCGAGACA
AACGACCTTGCAACCGCAACCGACCTTGCAACCGAGGTTACCTTAAACGCTATGGAGTGC
gi58615486/1-470 AACGACCTTGCAACCGCAACCGACCTTGCAACCGAGGTTACCTTGAACGGTATGGAGTGC
gi5616127/1-466 ----TATGGATACTGTTTTAGATGTTGGTACTGAAGTTGCATTCTATGCATTAGAACAA
gi82492006/1-464 ----TATGGATACTGTTTTAGATGTTGGTACTGAAGTTGCATTCTATGCATTAGAACAA
gi262358095/1-470 ----CATGGATACTGTACTGTAGTACTGAAGTAGCATTCTACGCATTAGAACAA
gi629633272/1-472 ----CATGGACACCGTCTTGTATGTTAGTACTGAAGTAGCATTCTACGCATTAGAACAA
gi629633282/1-472 ----CATGGACACTGTTTTAGATGTTGGTACTGAAGTAGCATTCTACGCATTAGAACAA
gi334085683/1-468 ----CATGGACACTGTTCTTGTATGTTAGTACTGAAGTTACTTTCTACTCTTAGAACAA
gi217792440/1-467 ----CATGGACACTGTTCTTGTATGTTGGTCTGAAGTTACTTTCTACGGATTAGAACAA
gi498543114/1-395 ----CATGGACACTGTTCTTGTATGTTGGTCTGAAGTTACTTTCTACGGATTAGAACAA
gi629633278/1-472 ----CATGGACACTGTTCTTGTATGTTAGTACTGAAGTTACTTTCTACTCTTAGAACAA
gi145370874/1-445 ----CATGGACACTGTTCTTGTATGTTAGTACTGAAGTTACTTTCTACTCTTAGAACAA
gi311141403/1-440 ----CATGGACACTGTTCTTGTATGTTAGTACTGAAGTTACTTTCTACTCTTAGAACAA
gi629633284/1-466 ----TATGGATACTGTACTGATATATCTACTGAAGTTAACCTTTATGGTTTAGAACAG
gi629633280/1-466 ----CTTTGATAATGTAAGGATATTGCTACTGAAGTTACAAATTTATGGTTTAGAACAG

gi309253887/1-472 TACGAGAAATACCCAACCACTGGAAGACCATTTCGGTGGTTCACAGAGAGCAACAGTC
gi930068978/1-469 TACGAGCAGTACCCGACTGCACTCGAGAGCCACTTCGGTGGTTCACAGCGTGCATCCGTC
gi930068946/1-466 TACGAGCAGTACCCGACTGCACTCGAGAGCCACTTCGGTGGTTCACAGCGTGCATCCGTC
gi954036668/1-468 TACGAACAGTACCCGACCACCTCGAGAGCCACTTCGGCGGTTCCAGCGTGCATCCGTC
gi930068996/1-469 TACGAACAGTACCCGACCACCTCGAGAGCCACTTCGGCGGTTCCAGCGTGCATCCGTC
gi428274410/1-489 TACGAACAGTACCCGACCATTGTTGAAGACCATTTCGGTGGTTCACAGCGTGCATCCGTC
gi954036662/1-94 -----
gi954036666/1-486 TACGAAAAGTTCCCAACTGCCCTTGAAGACCATTTCGGTGGTTCACAGAGCAACCGTG
gi930068992/1-487 TACGAAAAGTTCCCAACTGCCCTTGAAGACCATTTCGGTGGTTCACAGAGCAACCGTG
gi930068990/1-487 TACAAGAAGTTCCCGACTGCCCTTGAAGACCATTTCGGTGGTTCACAGAGCAACCGTG
gi950655841/1-488 TACGAGAAGTTCCCGACTGCCCTTGAAGACCATTTCGGGAGTTCACAGAGCAACCGTG
gi930068952/1-487 TACGAGAAGTTCCCAACAGCCCTTGAAGACCATTTCGGTGGTTCACAGAGCAACCGTG
gi58615486/1-470 TACGAGGACTACCCAACGCTTCTTGAGGACCATTTCGGTGGATCGCAGCGTGCAGGTGTC
gi5616127/1-466 TACGAGGACTACCCAACGCTTCTTGAGGACCATTTCGGTGGATCGCAGAGCGGGGAATC
gi82492006/1-464 TACGAAGAATACCCAGCATTACTCGAACTCACTTCGGTGGATCTCAAAGATCATCTGTT
gi262358095/1-470 TATGAAGAATATCCGGCATTACTCGAACTCACTTCGGGCGATCTCAAAGATCTTCAGTT
gi629633272/1-472 TACGAAGAATACCCAGCTTTACTTGAAACTCACTTCGGTGGATCTCAAAGAGCTTCCGTT
gi629633282/1-472 TACGAAGAATACCCAGCTTTACTTGAAACTCACTTCGGTGGATCTCAAAGAGCTTCCGTT
gi334085683/1-468 TACGAAGAATACCCAGCTTTACTCGAACTCACTTCGGTGGATCTCAAAGAGCTTCCGTT
gi217792440/1-467 TATGAAAAATCCCTGCATTACTTGAAACTCAATTCGGTGGATCCCAAAGGCTGCTGTT
gi498543114/1-395 TATGAAAAATCCCTGCATTACTTGAAACTCAATTCGGTGGATCCCAAAGGCTGCTGTT
gi629633278/1-472 TACGAAGAATACCCAGCTTTACTTGAAACTCACTTCGGTGGTTCCAAAGAGCTGCTGTT
gi145370874/1-445 TACGAAGAATATCCTGCATTACTTGAACCCAAATTCGGTGGTTCCAAAGAGCATCTGTT
gi311141403/1-440 TACGAAGAATATCCTGCATTACTTGAACCCAAATTCGGTGGTTCCAAAGAGCATCTGTT
gi629633284/1-466 TATGAG--ATACCTA-CTCTTTAGAACTCACTTCGGTGGTTCCAAAGAGCATCTGTT
gi629633280/1-466 TACGAA--ATCCAA-CATTACTTGAAGACCATTTCGGTGGTTCCAAAGAGCATCTGTT

gi309253887/1-472 ATATCAATTGCAGCAGGCG---GCGCAACAGCTCT-----G-----GCAACA
gi930068978/1-469 CTTGCC--GCAG-----CAGCAGGTCT-----GACCACCTCACTCGGTACC
gi930068946/1-466 CTTGCA--GCAG-----CATCAGGTCT-----GTCTGTTCACTCGGTACC
gi954036668/1-468 CTTGCA--GCAG-----CATCAGGTAT-----CTCTGTTCACTCGCAACC
gi930068996/1-469 CTTGCA--GCAG-----CATCAGGTAT-----CTCTGTTCACTGGCAACT
gi428274410/1-489 CTCGCA--GCAG-----CATCCGGTAT-----CTCCACCTCAATTGCAACC
gi954036662/1-94 -----
gi954036666/1-486 CTTGCA--GCAG-----CAGCCGGTGTCTGTACTGCA-----ATCGCAACC
gi930068992/1-487 CTCGCA--GCTG-----CAGCCGGTGT-----TGCATGTTCCCTGCAACC
gi930068990/1-487 CTCGCA--GCCG-----CAGCCGGTGT-----CGCATGTTCCCTGCAACC
gi950655841/1-488 CTCGCA--GCCG-----CAGCCGGTGT-----CGCAACTGCCCTCGCAACC
gi930068952/1-487 CTCGCA--GCCG-----CAGCCGGTGT-----TGCATGCGCCCTCGGAACC
gi58615486/1-470 ATGGCA--GCAGCAAGCGCATGCACAACCGGTAT-----T-----GCTACC
gi5616127/1-466 CTTGCA--GCAGCAAGCGCATGCACAACCGGTAT-----T-----GCTACC
gi82492006/1-464 ATTTCA--GCAGCAGCTGGTGTCTCAACTGCATT-----T-----GCTACT
gi262358095/1-470 ATTTCA--GCAGCAGCTGGTGTCTCAACTGCATT-----C-----GCTACT
gi629633272/1-472 GTTTCC--GCAGCTGCAGGTGTTCCACTGCATT-----C-----GCTACT
gi629633282/1-472 ATTTCC--GCAGCTGCAGGTGTTCCACTGCATT-----C-----GCTACT
gi334085683/1-468 GTTTCC--GCAGCTGCAGGTGTTCCACTGCATT-----C-----GCTACT
gi217792440/1-467 GTTGCA--GCTGCTGCAGGTATTTCAACTGCATT-----T-----GCTACT
gi498543114/1-395 GTTGCA--GCTGCTGCAGGTATTTCAACTGCATT-----T-----GCTACT
gi629633278/1-472 ATTTCC--GCAGCTTCGGTATTTCCACTGCATT-----T-----GCAACA
gi145370874/1-445 GTTTCA--GCCGCTGCTGGTGTGCAACAGCTTT-----C-----GCTACT
gi311141403/1-440 GTTTCA--GCCGCTGCTGGTGTGCAACAGCTTT-----C-----GCTACT
gi629633284/1-466 ATTTCC--GCCGCTGCAGGTGTTCCACTGCATT-----T-----GCAACA
gi629633280/1-466 ATTTCC--GCAGCTGCAGGTGTTCTGTAGCATT-----T-----GCAACA

gi309253887/1-472 GGCCACAGCCAGGCGGCTCTCTGTCATGGTACCTGTCCATGTATCCCCACAAGAGGCA
gi930068978/1-469 GGAAACTCCAATGCCGGTCTGAAATGGCTGGTACCTGTCCATGCTCTGCACAAGGAAGGC
gi930068946/1-466 TGAACTCGAATGCAGGTCTGCACGGATGGTACATGTCGATGCTCTGCACAAGGAAGGA
gi954036668/1-468 GGAAACTCGAACGCTGGCCTGAAACGGCTGGTACATGTCATGCTTGCACAAGGAAGGC
gi930068996/1-469 GCAAACTCAAATGCAGGCTGAAACGGCTGGTACTTGTGATGCTTATGCACAAGGAAGGC
gi428274410/1-489 GGAACTCAAATGCCGGTCTGAAACGGCTGGTACTCTCGATGCTATGCACAAGGAAGGC
gi954036662/1-94 -----
gi954036666/1-486 GCAAAACGCAAATGCCGGTCTCTCCGGCTGGTACCTCTCCATGTACTGCACAAGGAAGCA
gi930068992/1-487 GCAAAACGCAAATGCAGGTCTCTCCGGCTGGTACCTCTCCATGTACTGCACAAGGAAGCA
gi930068990/1-487 GCAAAACGCAAATGCTGGTCTCTCCGGCTGGTACCTCTCCATGTACTGCACAAGGAAGCA
gi950655841/1-488 TCAAACGCAAATGCCGGTCTCTCCGGCTGGTACCTCTCCATGTACTGCACAAGGAAGCA
gi930068952/1-487 GCAAAACGCAAACGCGGCTCTCCGGCTGGTACCTTCCATGTACTGCACAAGGAAGCA
gi58615486/1-470 GGTAAACGCAAGTCCGGCTCTCCGGATGGTACATGTCGATGCTCTGCACAAGGAAGGC
gi5616127/1-466 GGAAACGCAAGTCCGGTCTCTGTCATGGTGCATGTCGATGCTCTGCACAAGGAAGGC
gi82492006/1-464 GGTAATGCTCAAACCTGGTTAAGTGCATGGTACTTATCTATGATTTACACAAGGAACAA
gi262358095/1-470 GGTAATGCTCAAACCTGGTTAAGTGCATGGTACTTATCTCAATACTTACACAAGGAACAA
gi629633272/1-472 GGTAATGCAAAAACCTGGTTAAGTGCATGGTACTTATCTCAATACTTACACAAGGAACAA
gi334085683/1-468 GGTTATGCACAACCTGGTTAAGCGCATGGTACTTAGCTATGACTTACACAAGGAACAA
gi217792440/1-467 GGAAATGCTCAAACCTGGTTAAGTGCATGGTACTTATCTCAATACTTACACAAGGAACAA
gi498543114/1-395 GGAAATGCTCAAACCTGGTTAAGTGCATGGTACTTATCTCAATACTTACACAAGGAACAA
gi629633278/1-472 GGTAATGCAAAAACCTGGTTAATCTGCATGGTACTTAGCAAACTACTTACACAAGGAACAA
gi145370874/1-445 GGAAACTCCAAAACCTGGTTAAGCGCATGGTATTTATCTATGACTTACACAAGGAACAA
gi311141403/1-440 GGAAACTCCAAAACCTGGTTAAGCGCATGGTATTTATCTATGACTTACACAAGGAACAA
gi629633284/1-466 GGAAATCCAATGCTGGTGTAAATGGATGGTATTTAAGTATGATTTACATAAAGAGCT
gi629633280/1-466 GGAAACTCTAATGCAGGAGTAAATGGTTGGTATCTCAGTATGATTGAACATAAAGAGCT

gi309253887/1-472 CACGGCAGACTCGGATTCTACGGGTATGACCTGCAGGATCAGTCCGGTGCACAAGCAGTGT
gi930068978/1-469 TGGTCAAGTCTCGGCTTCTTCGGCTACRACCTGCAGGACCAGTGTGGTCCGCAAACTCG
gi930068946/1-466 TGGCCACGTCTCGGCTTCTTCGGCTACAACTGCAGGACCAGTGCAGGTTCCGCAAACTCG
gi954036668/1-468 TGGTCAAGTCTCGGCTTCTTCGGTACGACCTGCAGGACCAGTGCAGGTTCCGCAAACTCG
gi930068996/1-469 TGGTCAAGTCTCGGCTTCTTCGGCTACGACCTGCAGGACCAGTGCAGGTTCCGCAAACTCG
gi428274410/1-489 TGGTCAAGTCTCGGATTCTTCGGCTACGACCTGCAGGACCAGTGCAGGTTCCGCAAACTCG
gi954036662/1-94 -----
gi954036666/1-486 TGGGGCCGTCTCGGCTTCTTCGGATACGACCTGCAGGATCAGTCCGGTGCACAATAATGTT
gi930068992/1-487 TGGGGCCGTCTCGGCTTCTTCGGATACGACCTGCAGGATCAGTCCGGTGCACAATAATGTT
gi930068990/1-487 TGGGGCCGTCTCGGCTTCTTCGGATACGACCTGCAGGATCAGTCCGGTGCACAATAATGTT
gi950655841/1-488 TGGGGCAGACTGGATTCTTCGGATTGACCTGCAGGACCAGTGCAGGTTCCGCAAACTCG
gi930068952/1-487 TGGGGCCGTCTCGGCTTCTTCGGTTGACCTGCAGGACCAGTGCAGGTTCCGCAAACTCG
gi58615486/1-470 TGGGGCAGACTCGGATTCTTCGGTACGACCTGCAGGACCAGTGCAGGTTCCGCAAACTCG

gi5616127/1-466 TGGGGACGACTCGGATTCTTCGGATACGACTTGCAAGATCAGTGGTGCACCAACCAACGTC
gi82492006/1-464 CATTCCAGATTAGGTTTCTATGGTTTCGATTACAAGATCAATGTGGTGCCTAACGTA
gi262358095/1-470 CATTCCAGATTAGGATTCTATGGTTTCGATTACAAGATCAATGTGGTGCAGCTAACGTA
gi629633272/1-472 CACTCCAGATTAGGATTCTACGGTTTCGATTACAAGACCAATGTGGTGCAGCTAACGTA
gi629633282/1-472 CACTCCAGATTAGGATTCTACGGATACGATTACAAGATCAATGTGGTGCCTAACGTA
gi334085683/1-468 CACTCCAGATTAGGATTCTACGGTTTCGATTACAAGATCAATGTGGTGCAGCTAACACT
gi217792440/1-467 CATTCCAGATTAGGTTTCTATGGTTACGATTACAAGATCAATGTGGTGCCTAACACA
gi498543114/1-395 CATTCCAGATTAGGTTTCTATGGTTACGATTACAAGATCAATGTGGTGCCTAACACA
gi629633278/1-472 CATTCCAGATTAGGATTCTATGGTTACGATTACAAGACCAATGTGGTGCAGCTAACGTA
gi145370874/1-445 CACTCTAGATTAGGATTCTATGGTTACGATTACAAGATCAATGTGGTGCATCCAACGTA
gi311141403/1-440 CACTCTAGATTAGGATTCTATGGTTACGATTACAAGATCAATGTGGTGCATCCAACGTA
gi629633284/1-466 CATTCCAGACTTGGATTTATGGATATGATTACAAGACCAAGCAGGTGCTTCTAATTCA
gi629633280/1-466 CACAGCAGATTAGGATTCTATGGTTACGATTACAAGACCAATGTGGTGCAGCTAATTCA

gi309253887/1-472 TTCTCAATTGCATCA---GATGAAG----GC-----TGTGTAGGCGAATGCGGAG
gi930068978/1-469 ATGGC----CATCAAAGGCGACGAGG----GT-----TGTATCGGAGAATCCCGTG
gi930068946/1-466 ATGGC----CATCAAAGGCGACGAGG----GT-----TGTATCGGAGAATCCCGTG
gi954036668/1-468 ATGTC----CGTCCGGCCCGACGAGG----GC-----TGTATCGGCGAGCTCCCGTG
gi930068996/1-469 GAGTC----CTACAGGGCAGACGAAG----GC-----TGTGTAGGAGCTCCCGTG
gi428274410/1-489 CTCTC----TGTCCGGCCTGACGAAG----GC-----TGTATCGGCGAGTCCCGTG
gi954036662/1-94 -----
gi954036666/1-486 CTGTC----CTACCAGGGCGACGAAG----GT-----CTCCAGACGAACTCCCGTG
gi930068992/1-487 CTGTC----CTACCAGGGCGACGAAG----GT-----CTCCAGACGAACTCCCGTG
gi930068990/1-487 CTGTC----CTACCAGGGCGACGAG----GT-----CTCCAGACAACTCCCGTG
gi950655841/1-488 CTGTC----CTACCAGGGCGACGAAG----GT-----CTTCAAACGAACTCCCGTG
gi930068952/1-487 CTGTC----CTACCAGGGCGACGAAG----GT-----CTCCAGACGAACTCCCGTG
gi58615486/1-470 TGCTC----GTACCAGGGCGATCAGG----GCGAGTGCCT-----CGAATCCCGTG
gi5616127/1-466 TGCTC----GTACCAGGGTACCAGGATGCTGC-----TGAGCTTCGCTG
gi82492006/1-464 TTCTCTATCAGAAAC---GATGAAG----GT-----ATACCACTTGAATGAGAG
gi262358095/1-470 TTCTCCATCAGAAAC---GATGAAG----GA-----TTGCCACTTGAATGAGAG
gi629633272/1-472 TTCTCCATCAGAAAC---GATGAAG----GA-----TTACCACTCGAATGAGAG
gi629633282/1-472 TTCTCCATCAGAAAC---GATGAAG----GA-----TTACCACTCGAATGAGAG
gi334085683/1-468 TTCTCCATCAGAAAC---GATGAAG----GT-----TTACCACTCGAATGAGAG
gi217792440/1-467 TTCTCCTCAGAAAT---GATGAAG----GT-----TTACCTCTTGAATGAGAG
gi498543114/1-395 TTCTCCTCAGAAAT---GATGAAG----GT-----TTACCTCTTGAATGAGAG
gi629633278/1-472 TTCTCTATAGAAAC---GACGAAG----GT-----TTACCACTTGAATTAAGAG
gi145370874/1-445 TTCTCTATAAGAAAT---GACGAAG----GA-----TTACCACTTGAATGAGAG
gi311141403/1-440 TTCTCTATAAGAAAT---GACGAAG----GA-----TTACCACTTGAATGAGAG
gi629633284/1-466 TTATCAATTAGGAGT---GATGAAG----GT-----CTTATCAATGAATTAAGAG
gi629633280/1-466 TTATCTATTAGAAGT---GATGAAG----GA-----TTAATTCATGAATTAAGAG

gi309253887/1-472 GCGCAAACCTACCC-CAACTACGCCATGAA-CG
gi930068978/1-469 GACCAAACCTACCC-CAACTACGCAATGA---
gi930068946/1-466 GACCAAACCTACCC-CAACTATGCCA-----
gi954036668/1-468 GACCGAACTACCC-TAACTACGCAATG----
gi930068996/1-469 GAGCCAACTATCC-CAACTATGCAATGA---
gi428274410/1-489 GACCGAACTACCC-CAACTATGCCATA-----
gi954036662/1-94 -----
gi954036666/1-486 GTCCAAACTATCC-CAACTACGCCATG----
gi930068992/1-487 GTCCAAACTACCC-TAACTACGCCCTGA---
gi930068990/1-487 GTCCAAACTACCC-CAACTACGCCCTGA---
gi950655841/1-488 GTCCAAACTATCC-AAACTACGCCATGAA---
gi930068952/1-487 GTCCAAACTACCC-CAACTACGCCATGA---
gi58615486/1-470 GCGCAAACCTACCC-CAACTACGCAATGAA---
gi5616127/1-466 GCGCAAACCTACCC-TAACTACGCCATGAA---
gi82492006/1-464 GTCTTAACCTATCC-TAACTACGC-----
gi262358095/1-470 GGCCAAACTACCC-AAACTACGCAATGAA---
gi629633272/1-472 GACCAAACCTATCC-TAACTACGCAATGAA-CG
gi629633282/1-472 GACCAAACCTATCC-TAACTACGCAATGAA-TG
gi334085683/1-468 GTCTTAACCTATCC-CAACTACGCCATA-----
gi217792440/1-467 GACCTAACCTATCC-TAACTACGCAATGAA---
gi498543114/1-395 GACCTAACCTATCC-TAACTACGCAATGAAA--
gi629633278/1-472 GACCTAACCTATCC-TAACTATGCAATGAA-TG
gi145370874/1-445 GACCAA-----
gi311141403/1-440 G-----
gi629633284/1-466 GTCTTAATATCC-TAATTATGCAATGAA-TG
gi629633280/1-466 GGCCTAACCTATCC-TAACTATGCAATGAA-TG

Materiały uzupełniające do pracy: **Cisek AA**, Dolka B, Bąk I, Cukrowska B. Microorganisms Involved in Hydrogen Sink in the Gastrointestinal Tract of Chickens. *International Journal of Molecular Sciences*. **2023**, 24(7):6674.

Table S1—S4. The Spearman rho's rank correlation results between microbial groups divided according to the chicken breeding method.

Pair of variables	All chicken groups together The Spearman rho's rank correlation results; $p < 0.05000$		
	R_s Spearman	t(N-2)	p
Methanogenic archaea (log10) & Methanogenic archaea (log10)			
Methanogenic archaea (log10) & Acetogens (log10)	0.055560	0.69724	0.486686
Methanogenic archaea (log10) & Sulfate-reducing bacteria (log10)	0.551535	8.28472	0.000000
Methanogenic archaea (log10) & Hydrogenase utilizers (log10)	0.464421	6.57077	0.000000
Methanogenic archaea (log10) & <i>L. salivarius</i> (log10)	0.049604	0.62230	0.534646
Methanogenic archaea (log10) & <i>C. jejuni</i> (log10)	0.472977	6.72632	0.000000
Acetogens (log10) & Methanogenic archaea (log10)	0.055560	0.69724	0.486686
Acetogens (log10) & Acetogens (log10)			
Acetogens (log10) & Sulfate-reducing bacteria (log10)	-0.337500	-4.49245	0.000014
Acetogens (log10) & Hydrogenase utilizers (log10)	0.163816	2.08071	0.039084
Acetogens (log10) & <i>L. salivarius</i> (log10)	-0.143439	-1.81606	0.071268
Acetogens (log10) & <i>C. jejuni</i> (log10)	0.014771	0.18511	0.853386
Sulfate-reducing bacteria (log10) & Methanogenic archaea (log10)	0.551535	8.28472	0.000000
Sulfate-reducing bacteria (log10) & Acetogens (log10)	-0.337500	-4.49245	0.000014
Sulfate-reducing bacteria (log10) & Sulfate-reducing bacteria (log10)			
Sulfate-reducing bacteria (log10) & Hydrogenase utilizers (log10)	0.241187	3.11400	0.002194
Sulfate-reducing bacteria (log10) & <i>L. salivarius</i> (log10)	0.263881	3.42791	0.000777
Sulfate-reducing bacteria (log10) & <i>C. jejuni</i> (log10)	0.431407	5.99177	0.000000
Hydrogenase utilizers (log10) & Methanogenic archaea (log10)	0.464421	6.57077	0.000000
Hydrogenase utilizers (log10) & Acetogens (log10)	0.163816	2.08071	0.039084
Hydrogenase utilizers (log10) & Sulfate-reducing bacteria (log10)	0.241187	3.11400	0.002194
Hydrogenase utilizers (log10) & Hydrogenase utilizers (log10)			
Hydrogenase utilizers (log10) & <i>L. salivarius</i> (log10)	-0.183165	-2.33455	0.020833
Hydrogenase utilizers (log10) & <i>C. jejuni</i> (log10)	0.498503	7.20534	0.000000
<i>L. salivarius</i> (log10) & Methanogenic archaea (log10)	0.049604	0.62230	0.534646
<i>L. salivarius</i> (log10) & Acetogens (log10)	-0.143439	-1.81606	0.071268
<i>L. salivarius</i> (log10) & Sulfate-reducing bacteria (log10)	0.263881	3.42791	0.000777
<i>L. salivarius</i> (log10) & Hydrogenase utilizers (log10)	-0.183165	-2.33455	0.020833
<i>L. salivarius</i> (log10) & <i>L. salivarius</i> (log10)			
<i>L. salivarius</i> (log10) & <i>C. jejuni</i> (log10)	0.034213	0.42894	0.668552
<i>C. jejuni</i> (log10) & Methanogenic archaea (log10)	0.472977	6.72632	0.000000
<i>C. jejuni</i> (log10) & Acetogens (log10)	0.014771	0.18511	0.853386
<i>C. jejuni</i> (log10) & Sulfate-reducing bacteria (log10)	0.431407	5.99177	0.000000
<i>C. jejuni</i> (log10) & Hydrogenase utilizers (log10)	0.498503	7.20534	0.000000
<i>C. jejuni</i> (log10) & <i>L. salivarius</i> (log10)	0.034213	0.42894	0.668552
<i>C. jejuni</i> (log10) & <i>C. jejuni</i> (log10)			

Pair of variables	Source=free-range group The Spearman rho's rank correlation results; $p < 0.05000$		
	R_s Spearman	t(N-2)	p
Methanogenic archaea (log10) & Methanogenic archaea (log10)			
Methanogenic archaea (log10) & Acetogens (log10)	0.383513	2.906866	0.005469
Methanogenic archaea (log10) & Sulfate-reducing bacteria (log10)	0.252893	1.829727	0.073378
Methanogenic archaea (log10) & Hydrogenase utilizers (log10)	0.099262	0.698284	0.488300
Methanogenic archaea (log10) & <i>L. salivarius</i> (log10)	-0.042357	-0.296764	0.767901
Methanogenic archaea (log10) & <i>C. jejuni</i> (log10)	0.039408	0.276069	0.783656
Acetogens (log10) & Methanogenic archaea (log10)	0.383513	2.906866	0.005469
Acetogens (log10) & Acetogens (log10)			
Acetogens (log10) & Sulfate-reducing bacteria (log10)	0.449429	3.521714	0.000938
Acetogens (log10) & Hydrogenase utilizers (log10)	0.185395	1.320662	0.192749
Acetogens (log10) & <i>L. salivarius</i> (log10)	0.003980	0.027858	0.977889
Acetogens (log10) & <i>C. jejuni</i> (log10)	0.201828	1.442481	0.155529
Sulfate-reducing bacteria (log10) & Methanogenic archaea (log10)	0.252893	1.829727	0.073378
Sulfate-reducing bacteria (log10) & Acetogens (log10)	0.449429	3.521714	0.000938
Sulfate-reducing bacteria (log10) & Sulfate-reducing bacteria (log10)			
Sulfate-reducing bacteria (log10) & Hydrogenase utilizers (log10)	0.414109	3.184663	0.002520
Sulfate-reducing bacteria (log10) & <i>L. salivarius</i> (log10)	0.068154	0.478187	0.634644
Sulfate-reducing bacteria (log10) & <i>C. jejuni</i> (log10)	0.390982	2.973573	0.004556
Hydrogenase utilizers (log10) & Methanogenic archaea (log10)	0.099262	0.698284	0.488300
Hydrogenase utilizers (log10) & Acetogens (log10)	0.185395	1.320662	0.192749
Hydrogenase utilizers (log10) & Sulfate-reducing bacteria (log10)	0.414109	3.184663	0.002520
Hydrogenase utilizers (log10) & Hydrogenase utilizers (log10)			
Hydrogenase utilizers (log10) & <i>L. salivarius</i> (log10)	0.570129	4.857742	0.000013
Hydrogenase utilizers (log10) & <i>C. jejuni</i> (log10)	0.760057	8.187047	0.000000
<i>L. salivarius</i> (log10) & Methanogenic archaea (log10)	-0.042357	-0.296764	0.767901
<i>L. salivarius</i> (log10) & Acetogens (log10)	0.003980	0.027858	0.977889
<i>L. salivarius</i> (log10) & Sulfate-reducing bacteria (log10)	0.068154	0.478187	0.634644
<i>L. salivarius</i> (log10) & Hydrogenase utilizers (log10)	0.570129	4.857742	0.000013
<i>L. salivarius</i> (log10) & <i>L. salivarius</i> (log10)			
<i>L. salivarius</i> (log10) & <i>C. jejuni</i> (log10)	0.305739	2.247810	0.029122
<i>C. jejuni</i> (log10) & Methanogenic archaea (log10)	0.039408	0.276069	0.783656
<i>C. jejuni</i> (log10) & Acetogens (log10)	0.201828	1.442481	0.155529
<i>C. jejuni</i> (log10) & Sulfate-reducing bacteria (log10)	0.390982	2.973573	0.004556
<i>C. jejuni</i> (log10) & Hydrogenase utilizers (log10)	0.760057	8.187047	0.000000
<i>C. jejuni</i> (log10) & <i>L. salivarius</i> (log10)	0.305739	2.247810	0.029122
<i>C. jejuni</i> (log10) & <i>C. jejuni</i> (log10)			

Pair of variables	Source=commercial group The Spearman rho's rank correlation results; $p < 0.05000$		
	R_s Spearman	t(N-2)	p
Methanogenic archaea (log10) & Methanogenic archaea (log10)			
Methanogenic archaea (log10) & Acetogens (log10)	0.641109	6.02398	0.000000
Methanogenic archaea (log10) & Sulfate-reducing bacteria (log10)	0.225229	1.66698	0.101531
Methanogenic archaea (log10) & Hydrogenase utilizers (log10)	0.248798	1.85235	0.069655
Methanogenic archaea (log10) & <i>L. salivarius</i> (log10)	0.225620	1.67003	0.100924
Methanogenic archaea (log10) & <i>C. jejuni</i> (log10)	0.227463	1.68441	0.098096
Acetogens (log10) & Methanogenic archaea (log10)	0.641109	6.02398	0.000000
Acetogens (log10) & Acetogens (log10)			
Acetogens (log10) & Sulfate-reducing bacteria (log10)	0.357692	2.76210	0.007920
Acetogens (log10) & Hydrogenase utilizers (log10)	0.164740	1.20441	0.233885
Acetogens (log10) & <i>L. salivarius</i> (log10)	0.275188	2.06410	0.044014
Acetogens (log10) & <i>C. jejuni</i> (log10)	0.200609	1.47663	0.145806
Sulfate-reducing bacteria (log10) & Methanogenic archaea (log10)	0.225229	1.66698	0.101531
Sulfate-reducing bacteria (log10) & Acetogens (log10)	0.357692	2.76210	0.007920
Sulfate-reducing bacteria (log10) & Sulfate-reducing bacteria (log10)			
Sulfate-reducing bacteria (log10) & Hydrogenase utilizers (log10)	0.138590	1.00912	0.317588
Sulfate-reducing bacteria (log10) & <i>L. salivarius</i> (log10)	0.210560	1.55319	0.126443
Sulfate-reducing bacteria (log10) & <i>C. jejuni</i> (log10)	0.144732	1.05478	0.296401
Hydrogenase utilizers (log10) & Methanogenic archaea (log10)	0.248798	1.85235	0.069655
Hydrogenase utilizers (log10) & Acetogens (log10)	0.164740	1.20441	0.233885
Hydrogenase utilizers (log10) & Sulfate-reducing bacteria (log10)	0.138590	1.00912	0.317588
Hydrogenase utilizers (log10) & Hydrogenase utilizers (log10)			
Hydrogenase utilizers (log10) & <i>L. salivarius</i> (log10)	-0.123593	-0.89813	0.373257
Hydrogenase utilizers (log10) & <i>C. jejuni</i> (log10)	0.259824	1.94026	0.057780
<i>L. salivarius</i> (log10) & Methanogenic archaea (log10)	0.225620	1.67003	0.100924
<i>L. salivarius</i> (log10) & Acetogens (log10)	0.275188	2.06410	0.044014
<i>L. salivarius</i> (log10) & Sulfate-reducing bacteria (log10)	0.210560	1.55319	0.126443
<i>L. salivarius</i> (log10) & Hydrogenase utilizers (log10)	-0.123593	-0.89813	0.373257
<i>L. salivarius</i> (log10) & <i>L. salivarius</i> (log10)			
<i>L. salivarius</i> (log10) & <i>C. jejuni</i> (log10)	-0.336411	-2.57604	0.012874
<i>C. jejuni</i> (log10) & Methanogenic archaea (log10)	0.227463	1.68441	0.098096
<i>C. jejuni</i> (log10) & Acetogens (log10)	0.200609	1.47663	0.145806
<i>C. jejuni</i> (log10) & Sulfate-reducing bacteria (log10)	0.144732	1.05478	0.296401
<i>C. jejuni</i> (log10) & Hydrogenase utilizers (log10)	0.259824	1.94026	0.057780
<i>C. jejuni</i> (log10) & <i>L. salivarius</i> (log10)	-0.336411	-2.57604	0.012874
<i>C. jejuni</i> (log10) & <i>C. jejuni</i> (log10)			

Pair of variables	Source=experimental group The Spearman rho's rank correlation results; $p < 0.05000$		
	R_s Spearman	t(N-2)	p
Methanogenic archaea (log10) & Methanogenic archaea (log10)			
Methanogenic archaea (log10) & Acetogens (log10)			
Methanogenic archaea (log10) & Sulfate-reducing bacteria (log10)			
Methanogenic archaea (log10) & Hydrogenase utilizers (log10)			
Methanogenic archaea (log10) & <i>L. salivarius</i> (log10)			
Methanogenic archaea (log10) & <i>C. jejuni</i> (log10)			
Acetogens (log10) & Methanogenic archaea (log10)			
Acetogens (log10) & Acetogens (log10)			
Acetogens (log10) & Sulfate-reducing bacteria (log10)			
Acetogens (log10) & Hydrogenase utilizers (log10)	-0.032453	-0.23414	0.815794
Acetogens (log10) & <i>L. salivarius</i> (log10)	0.188607	1.38492	0.171991
Acetogens (log10) & <i>C. jejuni</i> (log10)	0.189484	1.39160	0.169969
Sulfate-reducing bacteria (log10) & Methanogenic archaea (log10)			
Sulfate-reducing bacteria (log10) & Acetogens (log10)			
Sulfate-reducing bacteria (log10) & Sulfate-reducing bacteria (log10)			
Sulfate-reducing bacteria (log10) & Hydrogenase utilizers (log10)			
Sulfate-reducing bacteria (log10) & <i>L. salivarius</i> (log10)			
Sulfate-reducing bacteria (log10) & <i>C. jejuni</i> (log10)			
Hydrogenase utilizers (log10) & Methanogenic archaea (log10)			
Hydrogenase utilizers (log10) & Acetogens (log10)	-0.032453	-0.23414	0.815794
Hydrogenase utilizers (log10) & Sulfate-reducing bacteria (log10)			
Hydrogenase utilizers (log10) & Hydrogenase utilizers (log10)			
Hydrogenase utilizers (log10) & <i>L. salivarius</i> (log10)	-0.531545	-4.52525	0.000035
Hydrogenase utilizers (log10) & <i>C. jejuni</i> (log10)	-0.080068	-0.57924	0.564930
<i>L. salivarius</i> (log10) & Methanogenic archaea (log10)			
<i>L. salivarius</i> (log10) & Acetogens (log10)	0.188607	1.38492	0.171991
<i>L. salivarius</i> (log10) & Sulfate-reducing bacteria (log10)			
<i>L. salivarius</i> (log10) & Hydrogenase utilizers (log10)	-0.531545	-4.52525	0.000035
<i>L. salivarius</i> (log10) & <i>L. salivarius</i> (log10)			
<i>L. salivarius</i> (log10) & <i>C. jejuni</i> (log10)	0.074914	0.54173	0.590317
<i>C. jejuni</i> (log10) & Methanogenic archaea (log10)			
<i>C. jejuni</i> (log10) & Acetogens (log10)	0.189484	1.39160	0.169969
<i>C. jejuni</i> (log10) & Sulfate-reducing bacteria (log10)			
<i>C. jejuni</i> (log10) & Hydrogenase utilizers (log10)	-0.080068	-0.57924	0.564930
<i>C. jejuni</i> (log10) & <i>L. salivarius</i> (log10)	0.074914	0.54173	0.590317
<i>C. jejuni</i> (log10) & <i>C. jejuni</i> (log10)			

Materiały uzupełniające do pracy: **Cisek AA**, Szymańska E, Wierzbicka-Rucińska A, Aleksandrak-Piekarczyk T, Cukrowska B. Methanogenic Archaea in the Pediatric Inflammatory Bowel Disease in Relation to Disease Type and Activity. *International Journal of Molecular Sciences*. **2024**, 25(1):673.

Table S1. Detailed diagnoses of the patients from the control group.

Diagnosis	No. of patients
Hirschsprung's disease	1
Functional intestinal disorders, unspecified	2
Feeding difficulties and incorrect feeding	1
Gastroesophageal reflux with esophagitis	1
Gastroesophageal reflux	2
Pain in the abdominal and pelvic area	1
Streptococcal pharyngitis	1
Unspecified arthritis	1
Pain located in the lower abdomen	1
Fructose metabolism disorders	2
Other laryngeal diseases	1
Different and unspecified abdominal pain	1
Paralytic syndrome, unspecified	1
Other specified metabolic disorders	1
Chronic mucous otitis media	1
Different and unspecified abdominal pain	1
Other signs and symptoms affecting the gastrointestinal tract and abdominal cavity	1
Other ear disorders in diseases classified elsewhere	1
Embolism and thrombosis of the arteries of the lower limbs	1
Esophageal varices without bleeding	1
Addisonian crisis	1
Other specific diseases of the digestive system	1
Dwarfism	1
Food allergies	1

6. Omówienie wyników i dyskusja

6.1 Opracowanie autorskiego protokołu detekcji archeonów metanogennych

Opracowanie protokołu oceny ilościowej całkowitej populacji archeonów metanogennych w próbkach kału było pierwszym etapem prac wchodzących w zakres rozprawy doktorskiej. Wyniki tego etapu zostały opisane w pracy oryginalnej pt. *Improved Quantitative Real-Time PCR Protocol for Detection and Quantification of Methanogenic Archaea in Stool Samples* (Cisek i wsp., *Microorganisms*, 2023). Z danych dostępnych w nukleotydowej bazie NCBI wytypowanych zostało 47 sekwencji DNA archeonów metanogennych w taki sposób, aby były one możliwie najbardziej zróżnicowane genetycznie i pochodziły od skrajnie różnych taksonomicznie gatunków metanogenów (materiały uzupełniające, tabele S1 i S2, str. 88-97). Takie postępowanie miało na celu wytypowanie najbardziej konserwatywnych regionów genu *mcrA*, co w rezultacie przyczyniło się do stworzenia uniwersalnych starterów do wykrywania szerokiej gamy archeonów metanogennych, także tych słabo poznanych i wcześniej niewykrywanych u ludzi

W obrębie rejonów konserwatywnych sekwencji genu *mcrA* zaprojektowano kilka par starterów, spośród których jedna para (tj. nowy, zaprojektowany starter *mcrA_F3* oraz zmodyfikowany, opisany w literaturze starter *mcrA-rev* [53]) dawała wstępnie najlepsze rezultaty ustalone doświadczalnie. Testując różne warunki termiczne i czasowe reakcji, ustalono optymalny protokół detekcji ilościowej archeonów metanogennych. Wykazano, że w porównaniu z opisanym w literaturze protokołem [53,54], nowopowstały protokół charakteryzuje się zwiększoną swoistością i czułością. Opracowany autorski protokół pozwolił bowiem na zredukowanie koniecznej do uzyskania pozytywnego wyniku liczby komórek (genomów) metanogenów w badanym materiale nawet o jeden rząd wielkości (np. z 571 do 57 kopii genu *mcrA* gatunku *Methanomicrobium mobile*) oraz obniżył ryzyko fałszywie dodatniego wyniku w próbkach niezawierających metanogenów. Było to szczególnie istotne, gdyż materiał genetyczny niektórych bakterii zasiedlających przewód pokarmowy, np. pałeczki *Escherichia coli* szczególnie łatwo amplifikował się przy użyciu dotychczas opisywanego w literaturze protokołu [53,54]. Zwiększona swoistość i czułość nowopowstałego protokołu wyrażała się także w ograniczeniu powstawania dimerów starterów, będących szczególnym problemem w przypadkach analiz prowadzonych z użyciem barwników interkalujących (np. użytym tutaj barwnikiem SYBR Green I). Opracowany protokół ograniczył generowanie odczytów z dimerów starterów, faworyzując amplifikację i detekcję produktów specyficznych.

Ponadto, pomimo iż nowy protokół cechował się niższą wydajnością, to wyniki osiągane dla próbek z niską liczbą sekwencji docelowych (w tym przypadku genu *mcrA*) były bardziej odtwarzalne i swoiste niż w protokole opisanym przez innych autorów [53,54]. Powyższe dane zostały potwierdzone na testowanych próbkach kałomoczu. Okazało się, że przy zastosowaniu nowego protokołu obecność metanogenów stwierdzona została we wszystkich 20 badanych próbkach, natomiast aż 7 wypadło ujemnie z użyciem poprzedniego protokołu. W skrócie, nowopowstały protokół zwiększył stopień wykrywalności oraz pozwolił na bardziej dokładną ocenę ilościową archeonów metanogennych w nawet tak trudnym materiale, jakim jest kałomocz kury. Wybór tego modelu zwierzęcego wynikał z potrzeby zwalidowania protokołu z użyciem trudnego materiału biologicznego, tj. kałomoczu. Materiał ten cechuje znaczny udział inhibitorów PCR, a także wysoka różnorodność mikroorganizmów go zasiedlających, przez co stanowił on idealny materiał do przeprowadzenia badań przedklinicznych. Szczegółową dyskusję dotyczącą powstawania protokołu detekcji archeonów przedstawiono w artykule pt. *Improved Quantitative Real-Time PCR Protocol for Detection and Quantification of Methanogenic Archaea in Stool Samples* (Cisek i wsp., *Microorganisms*, 2023) na str. 54-55 rozprawy doktorskiej.

Opisany powyżej, autorski protokół przetestowano w kolejnym etapie z wykorzystaniem większej liczby próbek pochodzących od kur (n=154), a wyniki tej analizy opisano w pracy oryginalnej pt. *Microorganisms Involved in Hydrogen Sink in the Gastrointestinal Tract of Chickens* (Cisek i wsp., *International Journal of Molecular Sciences*, 2023). W toku prac ustalono nie tylko, że opracowany autorski protokół oceny ilościowej archeonów metanogennych jest skuteczny w przypadku trudnych próbek, ale także wykazano, iż zasiedlanie jelit przez archeony metanogenne jest uwarunkowane wieloma czynnikami.

6.2 Czynniki wpływające na rozwój archeonów metanogennych w jelitach – badanie przedkliniczne

W pracy oryginalnej pt. *Microorganisms Involved in Hydrogen Sink in the Gastrointestinal Tract of Chickens* (Cisek i wsp., *International Journal of Molecular Sciences*, 2023) udowodniono, że aby organizm zwierzęcia został skolonizowany przez metanogeny, konieczny jest kontakt ze środowiskiem, w którym mikroorganizmy te naturalnie bytują, np. z odchodami innych zwierząt czy skażoną nimi glebą. Okazało się bowiem że żadna z kur eksperymentalnych – a były to zwierzęta pozbawione kontaktu ze środowiskiem naturalnym, utrzymywane w ściśle kontrolowanych warunkach – nie została zasiedlona przez archeony

metanogenne. Ponadto wykazano, że liczebność metanogenów jest różna w zależności od rodzaju próbki (kałomocz zawierał istotnie więcej metanogenów niż treść jelitowa; $p < 0.001$), co może świadczyć o preferencjach metanogenów względem określonej niszy przewodu pokarmowego. Liczebność metanogenów okazała się także do pewnego stopnia zależeć od wieku zwierzęcia – im było ono starsze tym liczniej zasiedlone przez metanogeny (w grupie 1-tygodniowych kur fermowych obserwowano istotnie mniej metanogenów niż u kur fermowych w wieku 3-4 oraz 5-6 tygodni; $p < 0,01$). Podsumowując, czynniki środowiskowe, wiek kury oraz rodzaj pobranej do badań próbki okazały się istotnymi czynnikami warunkującymi obecność archeonów metanogennych w badanym materiale.

Szczegółową dyskusję wyników opisanych w pracy pt. *Microorganisms Involved in Hydrogen Sink in the Gastrointestinal Tract of Chickens* (Cisek i wsp., *International Journal of Molecular Sciences*, 2023) przedstawiono na str. 65-67.

6.3 Archeony metanogenne u dzieci z IBD

W pracy oryginalnej pt. *Methanogenic Archaea in the Pediatric Inflammatory Bowel Disease in Relation to Disease Type and Activity* (Cisek i wsp., *International Journal of Molecular Sciences*, 2024) w kale pobranym od dzieci z IBD oceniono częstość występowania i liczebność całkowitej populacji metanogenów oraz trzech najważniejszych ich taksonów (tj. *Mb. smithii*, *Ms. stadmanae* oraz *Methanomassiliicoccales*). Do badań włączono dzieci z UC i CD, a grupy te podzielono według poziomu aktywności choroby ocenianej na podstawie indeksów aktywności (PCDAI i PUCAI) oraz stężenia FCP. W kale dzieci z grup IBD stwierdzono obniżoną częstość występowania archeonów metanogennych (zwłaszcza w grupie UC, która wynosiła 83%, $p < 0,05$) w stosunku do grupy kontrolnej, w której częstość występowania ogólnej populacji metanogenów wynosiła 100%. Iloraz szans detekcji badanych metanogenów był także wyższy w grupie kontrolnej w porównaniu z większością grup IBD, z wyjątkiem aktywnej postaci CD, i mieścił się on w przedziale między 0,21 a 0,78.

Liczebność ogólna metanogenów była obniżona w przypadku pacjentów chorujących na UC ($p < 0,001$) i CD ($p < 0,05$) w stosunku do dzieci kontrolnych. Co ciekawe, liczebność metanogenów pomiędzy grupami IBD także różniła się istotnie statystycznie: pacjenci chorujący na UC mieli obniżoną liczebność metanogenów w stosunku do dzieci z grupy CD ($p < 0,05$). Ponadto, spośród trzech badanych podgrup metanogenów, wyłącznie liczebność *Mb. smithii* wykazywała tendencję spadkową u pacjentów chorych na UC ($p < 0,01$) w stosunku do

kontroli, co może być związane z faktem, że gatunek ten dominuje w populacji archeonów metanogennych zasiedlających jelita ludzi i to głównie obniżenie jego liczebności odpowiada za obniżenie całkowitej liczby metanogenów.

Analiza korelacji aktywności procesu chorobowego w UC i CD nie wskazywała istotnych statystycznie powiązań wartości indeksów PCDAI i PUCAI z badanymi grupami metanogenów, poza dodatnią korelacją zachodzącą pomiędzy całkowitą populacją metanogenów a wartością PCDAI w aktywnej postaci CD ($R_s = -0,48$; $p < 0,05$). Ponadto pacjenci z nieaktywną postacią UC charakteryzowali się najbardziej wyraźną, istotną statystycznie dodatnią korelacją pomiędzy liczebnością *Ms. stadtmanae* a stężeniem FCP w kale ($R_s = 0,41$; $p < 0,05$), co pośrednio może potwierdzać negatywny wpływ tego gatunku na zaostrzenie procesów zapalnych w jelitach. *Ms. stadtmanae* to bowiem gatunek uważany za predysponujący do rozwoju procesów zapalnych (co jednak zostało dotychczas dowiedzione jedynie w badaniach *in vitro* [44]).

Interesująca jest z kolei zależność zaobserwowana pomiędzy wiekiem pacjentów a liczebnością metanogenów. W grupie kontrolnej jedynie liczebność metanogenów z rzędu *Methanomassiliicoccales* wykazywała wzrost wraz z wiekiem dzieci ($R_s = 0,49$; $p < 0,01$), co jest zgodne z danymi opisanymi przez innych badaczy [29,33]. Z drugiej strony, zaobserwowano statystycznie znaczący spadek liczebności zarówno całkowitej populacji metanogenów ($R_s = -0,56$; $p < 0,01$) oraz *Mb. smithii* ($R_s = -0,53$; $p < 0,05$) wraz z wiekiem w grupie pacjentów z aktywną postacią CD. Przypuszczalnie, zależność tę można by tłumaczyć faktem, że u starszych dzieci z CD może trwać dłużej niż u młodszych, stąd mikrobiota jelitowa przez dłuższy czas podlegałaby niszczącemu działaniu zapalnemu tej choroby. O ile powyższy stwierdzenie stanowi jedynie hipotezę, to istnieje badanie, które w sposób bardziej jednoznaczny wskazuje na to, że dysbioza archeonów jest następstwem procesu zapalnego (lub innego mechanizmu) towarzyszącego IBD, a nie czynnikiem odpowiedzialnym za wywołanie choroby. Zaobserwowano bowiem, że u dzieci z długotrwałą postacią CD zmienia się skład archeonów w stosunku to pacjentów nowo zdiagnozowanych, u których to skład procentowy archeonów przypomina jeszcze ten, jaki obserwowany jest u dzieci zdrowych [52].

Szczegółową dyskusję wyników przedstawiono w pracy pt. ***Methanogenic Archaea in the Pediatric Inflammatory Bowel Disease in Relation to Disease Type and Activity*** (Cisek i wsp., *International Journal of Molecular Sciences*, 2024) na str. 81-82.

7. Wnioski

Na podstawie analizy wyników stwierdzono że:

1. Autorski protokół oceny ilościowej archeonów metanogennych charakteryzuje się podwyższonymi parametrami walidacyjnymi w stosunku do protokołu dotychczas stosowanego w literaturze tematu, oraz jest skuteczny, co zostało dowiedzione w badaniach przedklinicznych z wykorzystaniem zwierząt.
2. Liczebność i częstość wykrywania archeonów metanogennych w kale może podlegać zmianom w zależności od czynników środowiskowych i wieku gospodarza, a u ludzi może być dodatkowo związana z wystąpieniem IBD, w tym szczególnie UC.
3. U dzieci częstość występowania, iloraz szans detekcji oraz liczebność archeonów metanogennych jest zależna od postaci IBD (UC vs CD) oraz od aktywności tej choroby.
4. Dysbioza metanogenów może być następstwem IBD, a nie czynnikiem wywołującym tę chorobę.
5. Znaczenie archeonów metanogennych w rozwoju IBD u dzieci jest nadal w dużej mierze nieznane. Przeprowadzone badania noszą znamiona nowości, a otrzymane wyniki przysłużą się lepszemu poznaniu mechanizmów rozwoju IBD.

Piśmiennictwo

1. Ng, S.C.; Shi, H.Y.; Hamidi, N.; Underwood, F.E.; Tang, W.; Benchimol, E.I.; Panaccione, R.; Ghosh, S.; Wu, J.C.Y.; Chan, F.K.L.; et al. Worldwide Incidence and Prevalence of Inflammatory Bowel Disease in the 21st Century: A Systematic Review of Population-Based Studies. *Lancet (London, England)* **2017**, *390*, 2769–2778, doi:10.1016/S0140-6736(17)32448-0.
2. Putowski, M.; Padala, O.; Krupa, A.; Konopelko, M.; Piasek, E.; Mazurek, M. Inflammatory Bowel Disease in Children. *J. Educ. Heal. Sport* **2019**, *9*, 406–411, doi:10.5281/zenodo.3379040.
3. Ruel, J.; Ruane, D.; Mehandru, S.; Gower-Rousseau, C.; Colombel, J.F. IBD across the Age Spectrum: Is It the Same Disease? *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2014**, *11*, 88–98, doi:10.1038/NRGASTRO.2013.240.
4. Mottawea, W.; Chiang, C.K.; Mühlbauer, M.; Starr, A.E.; Butcher, J.; Abujamel, T.; Deeke, S.A.; Brandel, A.; Zhou, H.; Shokralla, S.; et al. Altered Intestinal Microbiota–Host Mitochondria Crosstalk in New Onset Crohn’s Disease. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 1–14, doi:10.1038/ncomms13419.
5. Houshyar, Y.; Massimino, L.; Lamparelli, L.A.; Danese, S.; Ungaro, F. Going Beyond Bacteria: Uncovering the Role of Archaeome and Mycobiome in Inflammatory Bowel Disease. *Front. Physiol.* **2021**, *12*, 783295, doi:10.3389/fphys.2021.783295.
6. Geremia, A.; Biancheri, P.; Allan, P.; Corazza, G.R.; Di Sabatino, A. Innate and Adaptive Immunity in Inflammatory Bowel Disease. *Autoimmun. Rev.* **2014**, *13*, 3–10, doi:10.1016/J.AUTREV.2013.06.004.
7. Schirmer, M.; Garner, A.; Vlamakis, H.; Xavier, R.J. Microbial Genes and Pathways in Inflammatory Bowel Disease. *Nat. Rev. Microbiol.* **2019**, *17*, 497–511, doi:10.1038/s41579-019-0213-6.
8. Darfeuille-Michaud, A.; Boudeau, J.; Bulois, P.; Neut, C.; Glasser, A.L.; Barnich, N.; Bringer, M.A.; Swidsinski, A.; Beaugerie, L.; Colombel, J.F. High Prevalence of Adherent-Invasive Escherichia Coli Associated with Ileal Mucosa in Crohn’s Disease. *Gastroenterology* **2004**, *127*, 412–421, doi:10.1053/j.gastro.2004.04.061.
9. Ohkusa, T.; Yoshida, T.; Sato, N.; Watanabe, S.; Tajiri, H.; Okayasu, I. Commensal

- Bacteria Can Enter Colonic Epithelial Cells and Induce Proinflammatory Cytokine Secretion: A Possible Pathogenic Mechanism of Ulcerative Colitis. *J. Med. Microbiol.* **2009**, *58*, 535–545, doi:10.1099/JMM.0.005801-0.
10. Viladomiu, M.; Metz, M.L.; Lima, S.F.; Jin, W.B.; Chou, L.; Guo, C.J.; Diehl, G.E.; Simpson, K.W.; Scherl, E.J.; Longman, R.S. Adherent-Invasive E. Coli Metabolism of Propanediol in Crohn's Disease Regulates Phagocytes to Drive Intestinal Inflammation. *Cell Host Microbe* **2021**, *29*, 607-619.e8, doi:10.1016/J.CHOM.2021.01.002.
 11. Zhang, X.; Deeke, S.A.; Ning, Z.; Starr, A.E.; Butcher, J.; Li, J.; Mayne, J.; Cheng, K.; Liao, B.; Li, L.; et al. Metaproteomics Reveals Associations between Microbiome and Intestinal Extracellular Vesicle Proteins in Pediatric Inflammatory Bowel Disease. *Nat. Commun. 2018 91* **2018**, *9*, 1–14, doi:10.1038/s41467-018-05357-4.
 12. Oren, A. Prokaryote Diversity and Taxonomy: Current Status and Future Challenges. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **2004**, *359*, 623, doi:10.1098/RSTB.2003.1458.
 13. Valentine, D.L. Adaptations to Energy Stress Dictate the Ecology and Evolution of the Archaea. *Nat. Rev. Microbiol. 2007 54* **2007**, *5*, 316–323, doi:10.1038/nrmicro1619.
 14. Gugliandolo, C.; Maugeri, T.L. Phylogenetic Diversity of Archaea in Shallow Hydrothermal Vents of Eolian Islands, Italy. *Diversity* **2019**, *11*, doi:10.3390/D11090156.
 15. Nottingham, P.M.; Hungate, R.E. Isolation of Methanogenic Bacteria from Feces of Man. *J. Bacteriol.* **1968**, *96*, 2178, doi:10.1128/JB.96.6.2178-2179.1968.
 16. Cisek, A.A.; Bąk, I.; Stefańska, I.; Binek, M. Selection and Optimization of High-Yielding DNA Isolation Protocol for Quantitative Analyses of Methanogenic Archaea. *Microorganisms* **2022**, *10*, doi:10.3390/MICROORGANISMS10030523.
 17. Moissl-Eichinger, C.; Pausan, M.; Taffner, J.; Berg, G.; Bang, C.; Schmitz, R.A. Archaea Are Interactive Components of Complex Microbiomes. *Trends Microbiol.* **2018**, *26*, 70–85.
 18. Stewart, J.A.; Chadwick, V.S.; Murray, A. Carriage, Quantification, and Predominance of Methanogens and Sulfate-Reducing Bacteria in Faecal Samples. *Lett. Appl. Microbiol.* **2006**, *43*, 58–63, doi:10.1111/J.1472-765X.2006.01906.X.
 19. Rani, S.B.; Balamurugan, R.; Ramakrishna, B.S. Molecular Analysis of the Human

- Faecal Archaea in a Southern Indian Population. *J. Biosci.* **2017**, *42*, 113–119, doi:10.1007/S12038-017-9668-7/METRICS.
20. Dridi, B.; Raoult, D.; Drancourt, M. Archaea as Emerging Organisms in Complex Human Microbiomes. *Anaerobe* **2011**, *17*, 56–63, doi:10.1016/J.ANAEROBE.2011.03.001.
 21. Grine, G.; Boualam, M.A.; Drancourt, M. Methanobrevibacter Smithii, a Methanogen Consistently Colonising the Newborn Stomach. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2017**, *36*, 2449–2455, doi:10.1007/S10096-017-3084-7/METRICS.
 22. Sereme, Y.; Guindo, C.O.; Filleron, A.; Corbeau, P.; Tran, T.A.; Drancourt, M.; Vitte, J.; Grine, G. Meconial Methanobrevibacter Smithii Suggests Intrauterine Methanogen Colonization in Preterm Neonates. *Curr. Res. Microb. Sci.* **2021**, *2*, 100034, doi:10.1016/J.CRMICR.2021.100034.
 23. Palmer, C.; Bik, E.M.; DiGiulio, D.B.; Relman, D.A.; Brown, P.O. Development of the Human Infant Intestinal Microbiota. *PLoS Biol.* **2007**, *5*, 1556–1573, doi:10.1371/JOURNAL.PBIO.0050177.
 24. Yelverton, C.A.; Killeen, S.L.; Feehily, C.; Moore, R.L.; Callaghan, S.L.; Geraghty, A.A.; Byrne, D.F.; Walsh, C.J.; Lawton, E.M.; Murphy, E.F.; et al. Maternal Breastfeeding Is Associated with Offspring Microbiome Diversity; a Secondary Analysis of the MicrobeMom Randomized Control Trial. *Front. Microbiol.* **2023**, *14*, 1154114, doi:10.3389/FMICB.2023.1154114/FULL.
 25. Mohammadzadeh, R.; Mahnert, A.; Duller, S.; Moissl-Eichinger, C. Archaeal Key-Residents within the Human Microbiome: Characteristics, Interactions and Involvement in Health and Disease. *Curr. Opin. Microbiol.* **2022**, *67*, 102146, doi:10.1016/J.MIB.2022.102146.
 26. van de Pol, J.A.A.; Best, N. van; Mbakwa, C.A.; Thijs, C.; Savelkoul, P.H.; Ilja, I.C.; Hornef, M.W.; Mommers, M.; Penders, J. Gut Colonization by Methanogenic Archaea Is Associated with Organic Dairy Consumption in Children. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 355, doi:10.3389/FMICB.2017.00355/FULL.
 27. Barnett, D.J.M.; Mommers, M.; Penders, J.; Arts, I.C.W.; Thijs, C. Intestinal Archaea Inversely Associated with Childhood Asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2019**, *143*, 2305–2307, doi:10.1016/j.jaci.2019.02.009.

28. Gaci, N.; Borrel, G.; Tottey, W.; O'Toole, P.W.; Brugère, J.F. Archaea and the Human Gut: New Beginning of an Old Story. *World J. Gastroenterol.* **2014**, *20*, 16062–16078, doi:10.3748/WJG.V20.I43.16062.
29. Mihajlovski, A.; Doré, J.; Levenez, F.; Alric, M.; Brugère, J.F. Molecular Evaluation of the Human Gut Methanogenic Archaeal Microbiota Reveals an Age-Associated Increase of the Diversity. *Environ. Microbiol. Rep.* **2010**, *2*, 272–280, doi:10.1111/J.1758-2229.2009.00116.X.
30. Raymann, K.; Moeller, A.H.; Goodman, A.L.; Ochman, H. Unexplored Archaeal Diversity in the Great Ape Gut Microbiome. *mSphere* **2017**, *2*, doi:10.1128/MSPHERE.00026-17/ASSET/1A1C2823-B18B-4C4A-AB40-567221AB15EE/ASSETS/GRAPHIC/SPH0021722390004.JPEG.
31. Dridi, B.; Henry, M.; El Khéchine, A.; Raoult, D.; Drancourt, M. High Prevalence of Methanobrevibacter Smithii and Methanosphaera Stadtmanae Detected in the Human Gut Using an Improved DNA Detection Protocol. *PLoS One* **2009**, *4*, doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0007063.
32. Cuesta-Zuluaga, J. de la; Spector, T.D.; Youngblut, N.D.; Ley, R.E. Genomic Insights into Adaptations of TMA-Utilizing Methanogens to Diverse Habitats Including the Human Gut. *bioRxiv* **2020**, 2020.09.17.302828, doi:10.1101/2020.09.17.302828.
33. Dridi, B.; Henry, M.; Richet, H.; Raoult, D.; Drancourt, M. Age-Related Prevalence of Methanomassiliicoccus Luminyensis in the Human Gut Microbiome. *APMIS* **2012**, *120*, 773–777, doi:10.1111/J.1600-0463.2012.02899.X.
34. Baptiste, É.; Brochier, C.; Boucher, Y. Higher-Level Classification of the Archaea: Evolution of Methanogenesis and Methanogens. *Archaea* **2005**, *1*, 353, doi:10.1155/2005/859728.
35. Kumpitsch, C.; Fischmeister, F.P.S.; Mahnert, A.; Lackner, S.; Wilding, M.; Sturm, C.; Springer, A.; Madl, T.; Holasek, S.; Högenauer, C.; et al. Reduced B12 Uptake and Increased Gastrointestinal Formate Are Associated with Archaeome-Mediated Breath Methane Emission in Humans. *Microbiome* **2021**, *9*, 1–18, doi:10.1186/S40168-021-01130-W/FIGURES/7.
36. Saengkerdsub, S.; Ricke, S.C. Ecology and Characteristics of Methanogenic Archaea in Animals and Humans. *Crit. Rev. Microbiol.* **2014**, *40*, 97–116,

doi:10.3109/1040841X.2013.763220.

37. Brugère, J.F.; Borrel, G.; Gaci, N.; Tottey, W.; O'Toole, P.W.; Malpuech-Brugère, C. Archaeobiotics: Proposed Therapeutic Use of Archaea to Prevent Trimethylaminuria and Cardiovascular Disease. *Gut Microbes* **2014**, *5*, 5–10, doi:10.4161/GMIC.26749.
38. Primec, M.; Klemenak, M.; Di Gioia, D.; Aloisio, I.; Bozzi Cionci, N.; Quagliariello, A.; Gorenjak, M.; Mičetić-Turk, D.; Langerholc, T. Clinical Intervention Using Bifidobacterium Strains in Celiac Disease Children Reveals Novel Microbial Modulators of TNF- α and Short-Chain Fatty Acids. *Clin. Nutr.* **2019**, *38*, 1373–1381, doi:10.1016/J.CLNU.2018.06.931.
39. Conway de Macario, E.; Macario, A.J.L. Methanogenic Archaea in Humans and Other Vertebrates: An Update. **2018**, 103–119, doi:10.1007/978-3-319-98836-8_7.
40. Drancourt, M.; Nkamga, V.D.; Lakhe, N.A.; Régis, J.M.; Dufour, H.; Fournier, P.E.; Bechah, Y.; Michael Scheld, W.; Raoult, Di. Evidence of Archaeal Methanogens in Brain Abscess. *Clin. Infect. Dis.* **2017**, *65*, 1–5, doi:10.1093/CID/CIX286.
41. Sereme, Y.; Mezouar, S.; Grine, G.; Mege, J.L.; Drancourt, M.; Corbeau, P.; Vitte, J. Methanogenic Archaea: Emerging Partners in the Field of Allergic Diseases. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **2019**, *57*, 456–466, doi:10.1007/S12016-019-08766-5/METRICS.
42. White, J.F. Syntrophic Imbalance and the Etiology of Bacterial Endoparasitism Diseases. *Med. Hypotheses* **2017**, *107*, 14–15, doi:10.1016/J.MEHY.2017.07.015.
43. Matijašić, M.; Meštrović, T.; Paljetak, H.Č.; Perić, M.; Barešić, A.; Verbanac, D. Gut Microbiota beyond Bacteria—Mycobiome, Virome, Archaeome, and Eukaryotic Parasites in IBD. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, doi:10.3390/IJMS21082668.
44. Lecours, P.B.; Marsolais, D.; Cormier, Y.; Berberi, M.; Haché, C.; Bourdages, R.; Duchaine, C. Increased Prevalence of Methanosphaera Stadtmanae in Inflammatory Bowel Diseases. *PLoS One* **2014**, *9*, 1–7, doi:10.1371/journal.pone.0087734.
45. Vierbuchen, T.; Bang, C.; Rosigkeit, H.; Schmitz, R.A.; Heine, H. The Human-Associated Archaeon Methanosphaera Stadtmanae Is Recognized through Its RNA and Induces TLR8-Dependent NLRP3 Inflammasome Activation. *Front. Immunol.* **2017**, *8*, 313829, doi:10.3389/FIMMU.2017.01535/BIBTEX.
46. Peled, Y.; Gilat, T.; Liberman, E.; Bujanover, Y. The Development of Methane

- Production in Childhood and Adolescence. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **1985**, *4*, 575–579, doi:10.1097/00005176-198508000-00013.
47. McKay, L.F.; Eastwood, M.A.; Brydon, W.G. Methane Excretion in Man—a Study of Breath, Flatus, and Faeces. *Gut* **1985**, *26*, 69–74, doi:10.1136/GUT.26.1.69.
 48. Scanlan, P.D.; Shanahan, F.; Marchesi, J.R. Human Methanogen Diversity and Incidence in Healthy and Diseased Colonic Groups Using McrA Gene Analysis. *BMC Microbiol.* **2008**, *8*, doi:10.1186/1471-2180-8-79.
 49. Weaver, G.A.; Krause, J.A.; Miller, T.L.; Wolin, M.J. Incidence of Methanogenic Bacteria in a Sigmoidoscopy Population: An Association of Methanogenic Bacteria and Diverticulosis. *Gut* **1986**, *27*, 698–704.
 50. Ghavami, S.B.; Rostami, E.; Sephay, A.A.; Shahrokh, S.; Balaii, H.; Aghdaei, H.A.; Zali, M.R. Alterations of the Human Gut Methanobrevibacter Smithii as a Biomarker for Inflammatory Bowel Diseases. *Microb. Pathog.* **2018**, *117*, 285–289, doi:10.1016/J.MICPATH.2018.01.029.
 51. Krawczyk, A.; Salamon, D.; Kowalska-Duplaga, K.; Bogiel, T.; Gosiewski, T. Association of Fungi and Archaea of the Gut Microbiota with Crohn’s Disease in Pediatric Patients—Pilot Study. *Pathogens* **2021**, *10*, doi:10.3390/PATHOGENS10091119.
 52. Krawczyk, A.; Gosiewski, T.; Zapała, B.; Kowalska-Duplaga, K.; Salamon, D. Alterations in Intestinal Archaea Composition in Pediatric Patients with Crohn’s Disease Based on next-Generation Sequencing—a Pilot Study. *Gut Microbes* **2023**, *15*, doi:10.1080/19490976.2023.2276806.
 53. Steinberg, L.M.; Regan, J.M. Phylogenetic Comparison of the Methanogenic Communities from an Acidic, Oligotrophic Fen and an Anaerobic Digester Treating Municipal Wastewater Sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* **2008**, *74*, 6663–6671, doi:10.1128/AEM.00553-08.
 54. Steinberg, L.M.; Regan, J.M. McrA-Targeted Real-Time Quantitative PCR Method to Examine Methanogen Communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, *75*, 4435–4442, doi:10.1128/AEM.02858-08.

Spis tabel i rycin

Cisek AA, Szymańska E, Aleksandrak-Piekarczyk T, Cukrowska B. The Role of Methanogenic Archaea in Inflammatory Bowel Disease—A Review. *Journal of Personalized Medicine*. 2024, 14(2):196. DOI: 10.3390/jpm14020196

strona 35	Rycina 1. Porównanie składu jelitowego archeomu (mikrobiomu archeonów) pomiędzy pacjentami chorującymi na IBD a osobnikami zdrowymi. Rozmiar czcionki wskazuje na udział ilościowy danego taksonu w mikrobiocie jelitowej; kolor wskazuje na wzrost (czerwona czcionka) lub spadek (zielona czcionka) danego taksonu w przebiegu IBD w stosunku do zdrowych osobników. Mb. – Methanobrevibacter; Ms. – Methanosphaera.
strona 37	Rycina 2. Schemat prezentujący możliwe powiązania zachodzące pomiędzy dysbiozą archeonów metanogennych i patogenezą IBD. Zmiana w zakresie składu i/lub przerostu archeonów zapoczątkowana przez negatywne czynniki zewnętrzne (np. antybiotyki, dietę typu zachodniego) jest związana z intensyfikacją procesów zapalnych w jelitach, co zwrótnie wpływa na mikrobiotę jelitową. TNF- α – czynnik martwicy nowotworów.

Cisek AA, Bąk I, Cukrowska B. Improved Quantitative Real-Time PCR Protocol for Detection and Quantification of Methanogenic Archaea in Stool Samples. *Microorganisms*. 2023, 11(3):660.

strona 44	Tabela 1. Lista oligonukleotydów zastosowanych do detekcji genu <i>mcrA</i> .
strony 46-47	Tabela 2. Porównanie (ang. <i>alignment</i>) sekwencji genu <i>mcrA</i> 47 gatunków archeonów metanogennych w obrębie fragmentu sekwencji wiążącej zaprojektowany starter Forward
strona 48	Rycina 1. Porównanie krzywych amplifikacji dwóch protokołów: oryginalnego, opisanego w literaturze oraz nowo opracowanego.

	Porównania dokonano w tych samych warunkach termicznych, tj. z temperaturą przyłączania starterów (T_{an}) równą 55°C.
strona 48	Rycina 2. Wynik rozdziału elektroforetycznego po reakcji PCR w gradiencie temperatury przyłączania starterów (T_{an}). Optymalna T_{an} mieściła się w zakresie 59 do 60°C. Amplikon ma długość 270 pz. M – marker wielkości DNA.
strona 49	Tabela 3. Wskaźniki wykrywalności genu <i>mcrA</i> obu porównywanych protokołów stwierdzone doświadczalnie z wykorzystaniem czterech badanych kontroli pozytywnych.
strona 50	Rycina 3. Wykresy przedstawiające profile topnienia czterech kontroli pozytywnych uzyskane z zastosowaniem obu porównywanych protokołów.
strona 51	Tabela 4. Powtarzalność i wydajność reakcji amplifikacji z wykorzystaniem obu porównywanych protokołów uzyskana dla czterech kontroli pozytywnych.
strona 52	Tabela 5. Wyniki amplifikacji uzyskane dla bakteryjnych próbek DNA stanowiących kontrole niedocelowe (ang. <i>non-target controls</i>).
strona 53	Rycina 4. Wykresy przedstawiające krzywe amplifikacji oraz profile topnienia bakteryjnych próbek DNA stanowiących kontrole niedocelowe (ang. <i>non-target controls</i>) zestawione z czterema kontrolami pozytywnymi uzyskane z zastosowaniem obu porównywanych protokołów
strona 54	Table 6. Wyniki amplifikacji uzyskane dla 20 próbek kałomoczu z zastosowaniem obu porównywanych protokołów.

Cisek AA, Dolka B, Bąk I, Cukrowska B. Microorganisms Involved in Hydrogen Sink in the Gastrointestinal Tract of Chickens. *International Journal of Molecular Sciences*. **2023**, 24(7):6674.

strona 60	Rycina 1 (A-F). Wykresy pudełkowe ilustrujące liczebność badanych grup mikroorganizmów w próbkach kałomoczu i treści jelit ślepych. Istotność statystyczna badana testem Kruskala-Wallisa: ** p<0,01; *** p<0,001; ns – brak istotności statystycznej.
strona 61	Rycina 2 (A-F). Wykresy pudełkowe ilustrujące liczebność badanych grup mikroorganizmów w trzech systemach hodowlanych. Istotność statystyczna badana testem Kruskala-Wallisa: * p<0,05; *** p<0,001; ns – brak istotności statystycznej.
strona 62	Rycina 3 (A-F). Wykresy pudełkowe ilustrujące liczebność badanych grup mikroorganizmów w grupach wiekowych kur fermowych. Istotność statystyczna badana testem Kruskala-Wallisa: * p<0,05; ** p<0,01; brak symbolu oznacza brak istotności statystycznej.
strona 63	Rycina 4 (A-F). Wykresy pudełkowe ilustrujące liczebność badanych grup mikroorganizmów w grupach wiekowych kur eksperymentalnych. Istotność statystyczna badana testem Kruskala-Wallisa: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; brak symbolu oznacza brak istotności statystycznej.
strony 64-65	Tabela 1. Liczebność innych, wybranych mikroorganizmów utylizujących wodór z podziałem na systemy hodowlane.
strony 67-68	Tabela 2. Wybrane parametry hodowli.
strona 68	Tabela 3. Charakterystyka kur eksperymentalnych.
strona 69	Tabela 4. Charakterystyka kur fermowych.
strona 69	Tabela 5. Charakterystyka kur wiejskich, wolnożyjących.
strona 70	Tabela 6. Startery zastosowane w pracy.
strona 71	Tabela 7. Parametry termiczne zastosowane w celu analizy ilościowej każdej z badanych grup mikroorganizmów.

Cisek AA, Szymańska E, Wierzbicka-Rucińska A, Aleksandrak-Piekarczyk T, Cukrowska B. Methanogenic Archaea in the Pediatric Inflammatory Bowel Disease in Relation to Disease Type and Activity. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024, 25(1):673. DOI: 10.3390/ijms25010673.

strona 77	Tabela 1. Charakterystyka pacjentów. SD – odchylenie standardowe; Mdn – mediana; PCDAI – pediatryczny wskaźnik aktywności choroby Leśniowskiego-Crohna; PUCAI – pediatryczny wskaźnik aktywności wrzodziejącego zapalenia jelita grubego; FCP – kalprotektyna w kale; CD – choroba Leśniowskiego-Crohna; UC – wrzodziejące zapalenie jelita grubego. Istotność statystyczna badana testem Kruskala-Wallisa: * p<0,05 w porównaniu z kontrolą; # p<0,05 w porównaniu z nieaktywną formą tej samej jednostki chorobowej.
strona 77	Tabela 2. Występowanie archeonów metanogennych [%] w poszczególnych grupach pacjentów chorujących na IBD i kontrolnych. CD – choroba Leśniowskiego-Crohna; UC – wrzodziejące zapalenie jelita grubego. Istotność statystyczna badana testem dokładnym Fishera: * p<0,05 w porównaniu z kontrolą.
strona 78	Tabela 3. Iloraz szans detekcji archeonów metanogennych w poszczególnych grupach pacjentów chorujących na IBD i kontrolnych. CD – choroba Leśniowskiego-Crohna; UC – wrzodziejące zapalenie jelita grubego. Istotność statystyczna badana testem 2x2 (narzędzie OpenEpi web tool).
strona 78	Rycina 1 (A-D). Porównanie liczebności archeonów metanogennych w próbkach kału (suchej masy) u pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna (CD), wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (UC) oraz w grupie kontrolnej. Najbardziej wyraźne różnice obserwowano w totalnej liczbie metanogenów (A). Istotność statystyczna badana testem Kruskala-Wallisa: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; brak symbolu oznacza brak istotności statystycznej.
strona 79	Rycina 2 (A-D). Porównanie liczebności archeonów metanogennych w próbkach kału (suchej masy) u pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna (CD), wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (UC) w zależności od stopnia aktywności choroby oraz w grupie kontrolnej. Najbardziej wyraźne różnice obserwowano w totalnej liczbie metanogenów (A). Istotność statystyczna badana testem Kruskala-

	Wallisa: ** p<0,01; *** p<0,001; brak symbolu oznacza brak istotności statystycznej.
strona 80	Rycina 3. Korelacja pomiędzy liczebnością archeonów metanogennych w próbkach kału (suchej masy) a wskaźnikiem aktywności choroby (PCDAI lub PUCAI) u pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna (CD), wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (UC). Jedyna istotna statystycznie korelacja obserwowana była pomiędzy totalną liczbą metanogenów a indeksem PCDAI w aktywnej postaci CD (zielone obramowanie).
strona 80	Rycina 4. Korelacja pomiędzy liczebnością archeonów metanogennych w próbkach kału (suchej masy) a stężeniem kalprotektyny w kale (FCP) we wszystkich badanych grupach pacjentów. CD – choroba Leśniowskiego-Crohna; UC – wrzodziejące zapalenie jelita grubego. Jedyna istotna statystycznie korelacja obserwowana była pomiędzy liczbą <i>Ms. stadtmanae</i> a FCP w nieaktywnej postaci UC (zielone obramowanie).
strona 81	Rycina 5. Korelacja pomiędzy liczebnością archeonów metanogennych w próbkach kału (suchej masy) a wiekiem pacjentów we wszystkich badanych grupach. CD – choroba Leśniowskiego-Crohna; UC – wrzodziejące zapalenie jelita grubego. Istotne statystycznie korelacje obserwowane były pomiędzy wiekiem a totalną liczbą metanogenów i <i>Mb. smithii</i> w aktywnej formie CD, oraz pomiędzy wiekiem a liczbą Methanomassiliicoccales w grupie kontrolnej (zielone obramowania).
strona 85	Tabela 4. Startery zastosowane do detekcji archeonów metanogennych.
strona 85	Tabela 5. Parametry termiczne zastosowane w celu analizy ilościowej każdej z badanych grup metanogenów.

Zgody komisji etycznych

UCHWAŁA NR 58/2013

z dnia 23 października 2013 roku

III Lokalnej komisji etycznej do spraw doświadczeń na zwierzętach w Warszawie

§ 1

Na podstawie art. 30 ust. 1 pkt 1 ustawy z dnia 21 stycznia 2005r. o doświadczeniach na zwierzętach (Dz. U. Nr 33, poz. 289) i § 14 ust. 3 rozporządzenia Ministra Nauki i Informatyzacji z dnia 29 lipca 2005r. w sprawie Krajowej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach oraz lokalnych komisji etycznych do spraw doświadczeń na zwierzętach (Dz. U. Nr 153, poz. 1275), po rozpatrzeniu wniosku, pt.: „**ZNACZENIE PROBIOTYCZNYCH PAŁECZEK LACTOBACILLUS DLA ROZWOJU JELITOWEJ MIKROBIOTA KURCZĄT**” złożonego przez prof. dr hab. Mariana Binka z Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW w Warszawie, lokalna komisja etyczna:

WYRAŻA ZGODĘ

na przeprowadzenie doświadczeń na zwierzętach w zakresie wniosku.

§ 2

W wyniku rozpatrzenia wniosku, o którym mowa w § 1, lokalna komisja etyczna ustaliła, że:

1. Wniosek należy zaliczyć do kategorii:

Badania naukowe na zwierzętach

2. Najwyższy stopień inwazyjności proponowanych procedur nie przekracza wartości **2**

3. Doświadczenia będą przeprowadzone na zwierzętach (gatunek, liczba zwierząt):

Kura domowa	91
-------------	----

4. Doświadczenia będą przeprowadzone przez (nazwisko i imię, nazwa jednostki doświadczalnej):

Kizerwetter-Świda Magdalena	Wydział Medycyny Weterynaryjnej SGGW
Cisek Agata.	Wydział Medycyny Weterynaryjnej SGGW

5. Doświadczenia będą przeprowadzane na tkankach i narządach uzyskiwanych od zwierząt w ramach: -

§ 3


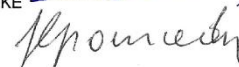
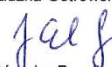
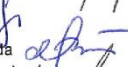





Integralną część niniejszej uchwały stanowi uzasadnienie i kopia wniosku, o którym mowa w § 1.

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie

III Lokalna Komisja Etyczna
ds. Doświadczeń na Zwierzętach
02-786 Warszawa, ul. Ciszewskiego 8
tel. 22 59-36622

[Pieczęć lokalnej komisji etycznej]

Podpisy członków lokalnej komisji etycznej biorących udział w głosowaniu:

1. Władysław Cabaj, Przewodniczący LKE 
2. Joanna Gromadzka-Ostrowska 
3. Julita El-Jai 
4. Aleksandra Górecka-Bruzda 
5. Anna Kowalczyk 
6. Tomasz Misztal 
7. Ewa Rejment 
8. Ada Schollenberger 
9. Robert Wrzesień 

UZASADNIENIE UCHWAŁY NR 58/2013

z dnia 23 października 2013 r.

III Lokalnej komisji etycznej do spraw doświadczeń na zwierzętach w Warszawie

Przedstawiony projekt spełnia warunki dopuszczenia doświadczeń na zwierzętach.

Wniosek dobrze przygotowany pod względem merytoryczno-formalnym. Zawiera wyczerpujący zestaw danych wymaganych do jego oceny. Celem doświadczenia będzie poznanie wpływu pałeczek *Lactobacillus* o znanych cechach na modulację jelitowych mikrobiontów. Celowość badań jest w pełni uzasadniona. Planowane procedury nie budzą zastrzeżeń etycznych i zostały prawidłowo uzasadnione co do stopnia inwazyjności. Liczba zwierząt doświadczalnych została zaplanowana stosownie do potrzeb.

Komisja ocenia wniosek pozytywnie i dopuszcza opisane doświadczenie do realizacji.

Zgoda obejmuje okres: 60 miesięcy.

Kierownik projektu jest odpowiedzialny za przeprowadzenie doświadczenia zgodnie z opisem we wniosku. Wg art. 30 ust. 1 pkt 2 oraz 34 ust. 1 ustawy z dnia 21 stycznia 2005 r. o doświadczeniach na zwierzętach (Dz. U. Nr 33, poz. 289), lokalna komisja etyczna jest upoważniona do kontroli przeprowadzanego doświadczenia. W przypadku stwierdzenia niezgodności przebiegu doświadczenia z zatwierdzonym projektem obowiązują przepisy wg art. 35 w/w ustawy.

Otrzymują:

1. Wnioskodawca,
2. Kierownik jednostki doświadczalnej,
3. a/a

Pouczenie

Strona niezadowolona z niniejszej uchwały może wnieść odwołanie do Krajowej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w terminie 14 dni od dnia otrzymania uchwały. Odwołanie składa się za pośrednictwem lokalnej komisji etycznej, która wydała uchwałę, zgodnie z § 20 rozporządzenia Ministra Nauki i Informatyzacji z dnia 29 lipca 2005r. w sprawie Krajowej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach oraz lokalnych komisji etycznych do spraw doświadczeń na zwierzętach (Dz. U. Nr 153 poz. 1275).



SZKOŁA GŁÓWNA GOSPODARSTWA WIEJSKIEGO W WARSZAWIE
III LOKALNA KOMISJA ETYCZNA DS. DOŚWIADCZEŃ NA ZWIERZĘTACH

ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa, tel. (48-22) 59-35-622, http://lke_sggw.sggw.pl

Ike 42/2016

Warszawa, 18 maja 2016

Mgr Agata Cisek
Dr Magdalena Kizerwetter-Świda
Katedra Nauk Przedklinicznych
Wydział Medycyny Weterynaryjnej SGGW

Dotyczy:

Wniosku o wydanie opinii w sprawie podtrzymania zgody III LKE na przeprowadzenie doświadczenia na zwierzętach „Znaczenie probiotycznych pałeczek *Lactobacillus* dla rozwoju jelitowej mikrobiota kurcząt”.

Informujemy, że II Lokalna Komisja Etyczna do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach przy SGGW w Warszawie, po zapoznaniu się z przedstawionym przebiegiem doświadczenia wg nowego schematu ustaliła, że proponowane modyfikacje nie wpływają w negatywny sposób na dobrostan zwierząt, a więc na ich wprowadzenie nie jest wymagane uzyskanie zgody Komisji Etycznej. Podstawa: planowane w projekcie dodatkowe czynności, zgodnie za sztuką lekarsko-weterynaryjną, nie powodują u zwierząt bólu, cierpienia, dystresu lub trwałego uszkodzenia organizmu w stopniu równym ukłuciu igłą lub intensywniejszym (art. 1.2. pkt. 5 ustawy z dnia 15 stycznia 2015 r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych, Dz. U. poz. 266).

Z poważaniem

SEKRETARZ
II Lokalnej Komisji Etycznej
ds. Doświadczeń na Zwierzętach przy SGGW

/ Dr Monika Mikulska /

KOMISJA BIOETYCZNA
przy Instytucie „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka”
Al. Dzieci Polskich 20
04-730 Warszawa-Międzylesie
T. (22) 815-16-03

UCHWAŁA nr 49/KBE/2019
OPINIA KOMISJI BIOETYCZNEJ
przy INSTYTUCIE „POMNIK-CENTRUM ZDROWIA DZIECKA”

Komisja Bioetyczna przy Instytucie Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka” na posiedzeniu w dniu **06.11.2019** rozpatrzyła badanie pt: **Stężenie zonuliny we krwi i w kale jako nieinwazyjny biomarker przepuszczalności jelit u pacjentów z nieswoistymi chorobami jelit : korelacja z lokalizacją i ciężkością choroby , porównanie z kalprotektyną w kale.**

Gł. Badacz: dr n med. Edyta Szymańska v

Do zaopiniowania złożono dokumenty dotyczące nowego eksperymentu medycznego w ramach Zadania Młodego Badacza. Badanie obejmuje ocenę zastosowania metody diagnostycznej u pacjentów z nieswoistymi zapaleniami jelit.

Zaplanowano włączyć do próby klinicznej 50 pacjentów ze świeżo rozpoznanym i/lub aktywnym nieswoistym zapaleniem jelit w wieku od 1 – 17 roku życia, z których połowę będą stanowili chorzy z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego, a drugą połowę z chorobą Leśniowskiego-Crohna. Grupę kontrolną będzie stanowić 25 dzieci w tym samym wieku z czynnościowymi zaburzeniami przewodu pokarmowego manifestującymi się bólami brzucha i/lub biegunką. Pacjenci będą się rekrutować z Kliniki Gastroenterologii, Hepatologii, Zaburzeń Odżywiania i Pediatrii IP-CZD.

Badanie będzie opierać się na:

1. Danych z wywiadu i dotychczas przeprowadzonych badaniach pozwalających rozpoznać:
 - a. rodzaj schorzenia (grupa badana i kontrolna),
 - b. aktywność i lokalizację zmian zapalnych jelit (grupa badana),
 - c. sposób dotychczasowego leczenia (grupa badana),
2. Jednorazowym pobraniu krwi na oznaczenie zonuliny oraz kału na oznaczenie zonuliny i kalprotektyny.

Celem badania jest porównanie skuteczności diagnostycznej oznaczania stężenia kalprotektyny w kale oraz zonuliny w kale i we krwi, biorąc pod uwagę inny charakter i działanie wymienionych biomarkerów.

W dostarczonych dokumentach dobrze opracowano cel i znaczenie projektu dla rozwoju nieinwazyjnych badań diagnostycznych. Dobrze określono pacjentów włączanych do grupy badawczej i kontrolnej.

Badanie będzie prowadzone w Pracowni Immunologii oraz Pracowni Onkopatologii i Biostruktury Medycznej Zakładu Patologii IP-CZD. Wymieniono Kliniki Gastroenterologii, Hepatologii, Zaburzeń Odżywiania i Pediatrii IP-CZD, z której to 2 współbadaczy włączono do zespołu badawczego oraz Pracowni Hormonów Steroidowych i Zaburzeń Metabolizmu Zakładu Biochemii, Radioimmunologii i Medycyny Doświadczalnej – 1 współbadacz.

W skład zespołu badawczego wchodzi pracownicy wyżej wymienionych pracowni i kliniki. Dołączono zgody kierowników: Kliniki Gastroenterologii, Hepatologii, Zaburzeń Odżywiania i Pediatrii, Zakładu Patologii oraz Zakładu Biochemii, Radioimmunologii i Medycyny Doświadczalnej IP-CZD.

Formularz informacji dla rodziców / opiekunów, jak i formularz zgody są prawidłowo skonstruowane. Dołączono formularz zgody i informacji o badaniu przeznaczony dla pacjentów od 16 roku życia.

Badanie uważam za bardzo wartościowe. Wprowadzi ono nowe dane dotyczące biomarkerów opisujących przewlekłe, nieswoiste zapalenia jelit. Uznanie diagnostycznej przydatności oznaczania zonuliny w kale i we krwi poszerza nieinwazyjne metody rozpoznawania i oceny przebiegu nieswoistych zapaleń jelit. Może też stwarzać dodatkowe możliwości dla chorych, dla których oznaczenie kalprotektyny nie jest miarodajne

Do zespołu badaczy należą:

Dr n med. Maciej Dądański
Prof. dr hab. n med. Jarosław Kierkuś
Dr n farm Aldona Wierzbicka –Rucińska
Dr n wet Joanna Bierła
Prof. dr hab. n med. Bożena Cukrowska

Przedłożone dokumenty:

1. Wniosek o wydanie opinii o projekcie
2. Streszczenie protokołu badania
3. Informacja dla rodziców /opiekunów dziecka
4. Deklaracja wyrażenia zgody
5. Deklaracja wyrażenia zgody dla pacjenta >16rz
6. Zgoda Kierownika Zakładu Patologii, Pracowni Immunologii, Zakładu Biochemii, Radioimmunologii i Medycyny Doświadczalnej, Pracowni Hormonów Steroidowych, Zaburzeń Metabolizmu, Kliniki Gastroenterologii, Hepatologii i Zaburzeń Odżywiania
7. Opinia Eksperta

Na podstawie przedłożonej dokumentacji, dodatkowych wyjaśnień przedstawionych przez dr n med. Edytę Szymańską oraz dyskusji i wyniku tajnego głosowania Komisja Bioetyczna przy IPCZD wyraziła zgodę na przeprowadzenie badania. Skład i działanie Komisji zgodne z GCP oraz wymogami lokalnymi. Tekst uchwały został sporządzony w 2 jednobrzmiących egz. po jednym dla wnioskodawcy i Komisji Bioetycznej. Lista członków Komisji biorących udział w posiedzeniu stanowi załącznik do niniejszego dokumentu.

PRZEWODNICZĄCY KOMISJI BIOETYCZNEJ
przy Instytucie „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka”
Prof. nadzw. dr hab. n. med. Sylwester Prokurat



Oświadczenia współautorów

OŚWIADCZENIE WSPÓLAUTORA
O INDYWIDUALNYM WKŁADZIE PRACY W POWSTAWANIE ARTYKUŁU

TUTUŁ: *The Role of Methanogenic Archaea in Inflammatory Bowel Disease—A Review*

AUTORZY: Cisek Agata Anna, Szymańska Edyta, Aleksandrak-Piekarczyk Tamara,
Cukrowska Bożena

czasopismo lub wydawca, rok wydania, tom, strony: **Journal of Personalized Medicine**,
2024, 14, 2, 196

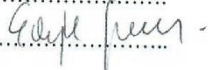
AUTOR: Szymańska Edyta

Oświadczam, że mój wkład w powstanie pracy polegał na merytorycznej recenzji artykułu.

Wkład Agaty Anny Cisek to: opracowanie koncepcji publikacji, gromadzenie zasobów,
pozyskanie finansowania, przygotowanie wersji wstępnej artykułu, odpowiedź na uwagi
recenzentów, ostateczne zredagowanie artykułu.

Wyrażam zgodę, żeby publikacja ta była częścią rozprawy doktorskiej mgr Agaty Anny
Cisek.

Data: 09/09/2024

Podpis: 

OŚWIADCZENIE WSPÓLAUTORA
O INDYWIDUALNYM WKŁADZIE PRACY W POWSTAWANIE ARTYKUŁU

TUTUŁ: *The Role of Methanogenic Archaea in Inflammatory Bowel Disease—A Review*

AUTORZY: Cisek Agata Anna, Szymańska Edyta, Aleksandrak-Piekarczyk Tamara,
Cukrowska Bożena

czasopismo lub wydawca, rok wydania, tom, strony: **Journal of Personalized Medicine.**
2024, 14, 2, 196

AUTOR: Aleksandrak-Piekarczyk Tamara

Oświadczam, że mój wkład w powstanie pracy polegał na merytorycznej recenzji artykułu oraz korekcie języka angielskiego.

Wkład Agaty Anny Cisek to: opracowanie koncepcji publikacji, gromadzenie zasobów, pozyskanie finansowania, przygotowanie wersji wstępnej artykułu, odpowiedź na uwagi recenzentów, ostateczne zredagowanie artykułu.

Wyrażam zgodę, żeby publikacja ta była częścią rozprawy doktorskiej mgr Agaty Anny Cisek.

Data:
Podpis: ..

Podpisano przez/ Signed by:
TAMARA
ALEKSANDRZAK-PIEKARCZYK
Data/ Date: 09.04.2024 10:17
mSzafir

OŚWIADCZENIE WSPÓLAUTORA
O INDYWIDUALNYM WKŁADZIE PRACY W POWSTAWANIE ARTYKUŁU

TUTUŁ: *The Role of Methanogenic Archaea in Inflammatory Bowel Disease—A Review*

AUTORZY: Cisek Agata Anna, Szymańska Edyta, Aleksandrak-Piekarczyk Tamara,
Cukrowska Bożena

czasopismo lub wydawca, rok wydania, tom, strony: **Journal of Personalized Medicine.**
2024, 14, 2, 196

AUTOR: Cukrowska Bożena

Oświadczam, że mój wkład w powstanie pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy oraz merytorycznej recenzji artykułu.

Wkład Agaty Anny Cisek to: opracowanie koncepcji publikacji, gromadzenie zasobów, pozyskanie finansowania, przygotowanie wersji wstępnej artykułu, odpowiedź na uwagi recenzentów, ostateczne zredagowanie artykułu.

Wyrażam zgodę, żeby publikacja ta była częścią rozprawy doktorskiej mgr Agaty Anny Cisek.

Data: 08.04.2024

Podpis: 

OŚWIADCZENIE WSPÓLAUTORA
O INDYWIDUALNYM WKŁADZIE PRACY W POWSTAWANIE ARTYKUŁU

TUTUŁ: *Improved Quantitative Real-Time PCR Protocol for Detection and Quantification of Methanogenic Archaea in Stool Samples*

AUTORZY: Cisek Agata Anna, Bąk Iwona, Cukrowska Bożena

czasopismo lub wydawca, rok wydania, tom, strony: **Microorganisms, 2023, 11, 3, 660**

AUTOR: **Bąk Iwona**

Oświadczam, że mój wkład w powstanie pracy polegał na pozyskaniu próbek do pracy oraz merytorycznej recenzji artykułu.

Wkład Agaty Anny Cisek to: opracowanie koncepcji i metodologii badań, pozyskanie środków finansowych na wykonanie badań, przeprowadzenie badań, analiza wyników badań, przygotowanie wersji wstępnej artykułu, odpowiedź na uwagi recenzentów, ostateczne zredagowanie artykułu.

Wyrażam zgodę, żeby publikacja ta była częścią rozprawy doktorskiej mgr Agaty Anny Cisek.

Data: ... 9.04.2024

Podpis: ... Bąk Iwona

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA
O INDYWIDUALNYM WKŁADZIE PRACY W POWSTAWANIE ARTYKUŁU

Tytuł: *Improved Quantitative Real-Time PCR Protocol for Detection and Quantification of Methanogenic Archaea in Stool Samples*

AUTORZY: Cisek Agata Anna, Bąk Iwona, Cukrowska Bożena

czasopismo lub wydawca, rok wydania, tom, strony: **Microorganisms, 2023, 11, 3, 660**

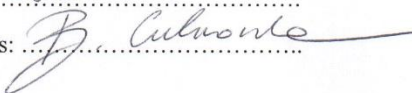
AUTOR: **Cukrowska Bożena**

Oświadczam, że mój wkład w powstanie pracy polegał na analizie formalnej treści, nadzorowaniu prac oraz merytorycznej recenzji artykułu.

Wkład Agaty Anny Cisek to: opracowanie koncepcji i metodologii badań, pozyskanie środków finansowych na wykonanie badań, przeprowadzenie badań, analiza wyników badań, przygotowanie wersji wstępnej artykułu, odpowiedź na uwagi recenzentów, ostateczne zredagowanie artykułu.

Wyrażam zgodę, żeby publikacja ta była częścią rozprawy doktorskiej mgr Agaty Anny Cisek.

Data: 08.09.2024

Podpis: 

OŚWIADCZENIE WSPÓLAUTORA
O INDYWIDUALNYM WKŁADZIE PRACY W POWSTAWANIE ARTYKUŁU

TUTUŁ: *Microorganisms Involved in Hydrogen Sink in the Gastrointestinal Tract of Chickens*

AUTORZY: Cisek Agata Anna, Dolka Beata, Bąk Iwona, Cukrowska Bożena

czasopismo lub wydawca, rok wydania, tom, strony: **International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24, 7, 6674**

AUTOR: Dolka Beata

Oświadczam, że mój wkład w powstanie pracy polegał na pozyskaniu próbek oraz danych do pracy, a także merytorycznej recenzji artykułu.

Wkład Agaty Anny Cisek to: opracowanie koncepcji i metodologii badań, pozyskanie środków finansowych na wykonanie badań, przeprowadzenie badań, analiza wyników badań, przygotowanie wersji wstępnej artykułu, odpowiedź na uwagi recenzentów, ostateczne zredagowanie artykułu.

Wyrażam zgodę, żeby publikacja ta była częścią rozprawy doktorskiej mgr Agaty Anny Cisek.

Data: ..09.04.2024r.....

Podpis: ..Beata Dolka.....

OŚWIADCZENIE WSPÓLAUTORA
O INDYWIDUALNYM WKŁADZIE PRACY W POWSTAWANIE ARTYKUŁU

TUTUŁ: *Microorganisms Involved in Hydrogen Sink in the Gastrointestinal Tract of Chickens*

AUTORZY: Cisek Agata Anna, Dolka Beata, Bąk Iwona, Cukrowska Bożena

czasopismo lub wydawca, rok wydania, tom, strony: **International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24, 7, 6674**

AUTOR: Bąk Iwona

Oświadczam, że mój wkład w powstanie pracy polegał na pozyskaniu próbek do pracy oraz merytorycznej recenzji artykułu.

Wkład Agaty Anny Cisek to: opracowanie koncepcji i metodologii badań, pozyskanie środków finansowych na wykonanie badań, przeprowadzenie badań, analiza wyników badań, przygotowanie wersji wstępnej artykułu, odpowiedź na uwagi recenzentów, ostateczne zredagowanie artykułu.

Wyrażam zgodę, żeby publikacja ta była częścią rozprawy doktorskiej mgr Agaty Anny Cisek.

Data: 9.04.2024

Podpis: ... Bąk Iwona

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA
O INDYWIDUALNYM WKŁADZIE PRACY W POWSTAWANIE ARTYKUŁU

TUTUŁ: *Microorganisms Involved in Hydrogen Sink in the Gastrointestinal Tract of Chickens*

AUTORZY: Cisek Agata Anna, Dolka Beata, Bąk Iwona, Cukrowska Bożena

czasopismo lub wydawca, rok wydania, tom, strony: **International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24, 7, 6674**

AUTOR: **Cukrowska Bożena**

Oświadczam, że mój wkład w powstanie pracy polegał na analizie formalnej treści oraz merytorycznej recenzji artykułu.

Wkład Agaty Anny Cisek to: opracowanie koncepcji i metodologii badań, pozyskanie środków finansowych na wykonanie badań, przeprowadzenie badań, analiza wyników badań, przygotowanie wersji wstępnej artykułu, odpowiedź na uwagi recenzentów, ostateczne zredagowanie artykułu.

Wyrażam zgodę, żeby publikacja ta była częścią rozprawy doktorskiej mgr Agaty Anny Cisek.

Data: *08.04.2024*

Podpis: *B. Cukrowska*

OŚWIADCZENIE WSPÓLAUTORA
O INDYWIDUALNYM WKŁADZIE PRACY W POWSTAWANIE ARTYKUŁU

TUTUŁ: *Methanogenic Archaea in the Pediatric Inflammatory Bowel Disease in Relation to Disease Type and Activity*

AUTORZY: Cisek Agata Anna, Szymańska Edyta, Wierzbicka-Rucińska Aldona, Aleksandrak-Piekarczyk Tamara, Cukrowska Bożena

czasopismo lub wydawca, rok wydania, tom, strony: **International Journal of Molecular Sciences, 2024, 25, 1, 673**

AUTOR: Szymańska Edyta

Oświadczam, że mój wkład w powstanie pracy polegał na opracowaniu metodologii, pozyskaniu finansowania, pozyskaniu pacjentów i próbek do pracy oraz merytorycznej recenzji artykułu.

Wkład Agaty Anny Cisek to: opracowanie koncepcji badań, pozyskanie środków finansowych na wykonanie badań, przeprowadzenie badań, analiza wyników badań, przygotowanie wersji wstępnej artykułu, odpowiedź na uwagi recenzentów, ostateczne zredagowanie artykułu.

Wyrażam zgodę, żeby publikacja ta była częścią rozprawy doktorskiej mgr Agaty Anny Cisek.

Data:08/04/2024.....

Podpis:Edyta.....

OŚWIADCZENIE WSPÓLAUTORA
O INDYWIDUALNYM WKŁADZIE PRACY W POWSTAWANIE ARTYKUŁU

TUTUŁ: *Methanogenic Archaea in the Pediatric Inflammatory Bowel Disease in Relation to Disease Type and Activity*

AUTORZY: Cisek Agata Anna, Szymańska Edyta, Wierzbicka-Rucińska Aldona, Aleksandrak-Piekarczyk Tamara, Cukrowska Bożena

czasopismo lub wydawca, rok wydania, tom, strony: **International Journal of Molecular Sciences, 2024, 25, 1, 673**

AUTOR: Wierzbicka-Rucińska Aldona

Oświadczam, że mój wkład w powstanie pracy polegał na wykonaniu części oznaczeń laboratoryjnych, analizie danych oraz merytorycznej recenzji artykułu.

Wkład Agaty Anny Cisek to: opracowanie koncepcji badań, pozyskanie środków finansowych na wykonanie badań, przeprowadzenie badań, analiza wyników badań, przygotowanie wersji wstępnej artykułu, odpowiedź na uwagi recenzentów, ostateczne zredagowanie artykułu.

Wyrażam zgodę, żeby publikacja ta była częścią rozprawy doktorskiej mgr Agaty Anny Cisek.

Data: ... 8.04. 2024

Podpis: ... Wierzbicka-Rucińska

OŚWIADCZENIE WSPÓLAUTORA
O INDYWIDUALNYM WKŁADZIE PRACY W POWSTAWANIE ARTYKUŁU

TUTUŁ: *Methanogenic Archaea in the Pediatric Inflammatory Bowel Disease in Relation to Disease Type and Activity*

AUTORZY: Cisek Agata Anna, Szymańska Edyta, Wierzbicka-Rucińska Aldona,
Aleksandrak-Piekarczyk Tamara, Cukrowska Bożena

czasopismo lub wydawca, rok wydania, tom, strony: **International Journal of Molecular Sciences, 2024, 25, 1, 673**

AUTOR: Aleksandrak-Piekarczyk Tamara

Oświadczam, że mój wkład w powstanie pracy polegał na pozyskaniu finansowania, merytorycznej recenzji artykułu i korekcie języka angielskiego.

Wkład Agaty Anny Cisek to: opracowanie koncepcji badań, pozyskanie środków finansowych na wykonanie badań, przeprowadzenie badań, analiza wyników badań, przygotowanie wersji wstępnej artykułu, odpowiedź na uwagi recenzentów, ostateczne zredagowanie artykułu.

Wyrażam zgodę, żeby publikacja ta była częścią rozprawy doktorskiej mgr Agaty Anny Cisek.

Data: ...
Podpis: .

Podpisano przez/ Signed by:
TAMARA
ALEKSANDRZAK-PIEKARCZYK
Data/ Date: 09.04.2024 10:18
mSzoFir

OŚWIADCZENIE WSPÓLAUTORA
O INDYWIDUALNYM WKŁADZIE PRACY W POWSTAWANIE ARTYKUŁU

TUTUŁ: *Methanogenic Archaea in the Pediatric Inflammatory Bowel Disease in Relation to Disease Type and Activity*

AUTORZY: Cisek Agata Anna, Szymańska Edyta, Wierzbicka-Rucińska Aldona,
Aleksandrak-Piekarczyk Tamara, Cukrowska Bożena

czasopismo lub wydawca, rok wydania, tom, strony: **International Journal of Molecular Sciences, 2024, 25, 1, 673**

AUTOR: **Cukrowska Bożena**

Oświadczam, że mój wkład w powstanie pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy, metodologii badań, analizie danych, analizie formalnej treści artykułu oraz jego merytorycznej recenzji.

Wkład Agaty Anny Cisek to: opracowanie koncepcji badań, pozyskanie środków finansowych na wykonanie badań, przeprowadzenie badań, analiza wyników badań, przygotowanie wersji wstępnej artykułu, odpowiedź na uwagi recenzentów, ostateczne zredagowanie artykułu.

Wyrażam zgodę, żeby publikacja ta była częścią rozprawy doktorskiej mgr Agaty Anny Cisek.

Data: *08.04.2024*

Podpis: *B. Cukrowska*