

**DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS
TÉZISEI**

HUU ANH DANG

KAPOSVÁRI EGYETEM

AGRÁR-ÉS KÖRNYEZETTUDOMÁNYI KAR

2017

KAPOSVÁRIEGYETEM
AGRÁR-ÉS KÖRNYEZETTUDOMÁNYI KAR
Élettani és Állathigiéniai Intézeti Tanszék

Doktori Iskola vezetője

Prof. Dr. KOVÁCSMELINDA

témavezető

Dr. ZSOLNAIATILA

**FUMONISIN MIKOTOXINOK ÉS A BÉLRENDSZER
MIKROBIÓTÁJÁNAK KÖLCSÖNHATÁSA JUHBAN
ÉS SERTÉSBEN**

Készítette

HUU ANH DANG

KAPOSVÁR
2017

DOI: 10.17166/KE2019.003

1. Tartalom

1. Tartalom	1
2. Kutatás előzményei, célkitűzések.....	2
2.1. Kutatás előzményei.....	2
2.2. Célok.....	5
3. Anyag és módszer.....	6
3.1. <i>In vitro</i> kölcsönhatás a fumonizin B ₁ és a sertések bél mikrobiótája között	6
3.2. <i>In vitro</i> kölcsönhatás a fumonizin B ₁ és a juhok bendő- mikrobiótája között.....	7
3.3. <i>In vivo</i> kísérlet: Fumonizin termelő <i>Fusarium verticillioides</i> hatása a sertések mikrobiótájára	7
3.4. Baktérium mennyiség mérésének a módszerei	7
3.4.1. Élő baktériumok összcsíraszámának meghatározása <i>in vitro</i> és <i>in vivo</i> sertés kísérletekben.....	7
3.4.2. Quantitatív polimeráz láncreakció (qPCR) alkalmazása a baktériumok DNS kópiaszámának mérésére.....	9
3.5. Mikotoxin kivonás és analízis.....	10
3.6. Statisztikai analízis	11
4. Eredmények	12
4.1. <i>In vitro</i> kölcsönhatás a fumonizin B ₁ és a sertések bél mikrobiótája között	12
4.2. <i>In vitro</i> kölcsönhatás a fumonizin B ₁ és a juhok bendő- mikrobiótája között.....	13
4.3. <i>In vivo</i> kísérlet: Fumonizint termelő <i>Fusarium verticillioides</i> hatása a sertések mikrobiótájára	14
5. Következtetések.....	17
5.1. <i>In vitro</i> kölcsönhatás a fumonizin B ₁ és a sertések bél mikrobiótája között.....	17
5.2. <i>In vitro</i> kölcsönhatás a fumonizin B ₁ és a juhok bendő- mikrobiótája között.....	17
5.3. <i>In vivo</i> kísérlet: Fumonizint termelő <i>Fusarium verticillioides</i> hatása a sertések mikrobiótájára	17
6. Új kutatási eredmények	18
A disszertáció témájához kapcsolódó cikkek, kiadványok	19
A disszertáció témájához nem kapcsolódó cikk.....	20

2. Kutatás előzményei, célkitűzések

2.1. Kutatás előzményei

A fumonizinek, melyeket először Gelderblom és munkatársai (1988) izoláltak, többségében a *Fusarium proliferatum* és *Fusarium verticillioides* (korábbi neve *Fusarium moniliforme*) által termelt mikotoxinok egy csoportja. A fumonizinek elsősorban a kukoricában találhatóak meg, szerte a világban. A fumonizin B₁ (FB₁) jelenléte a leggyakoribb, az összes fumonizin körülbelül 60% -át teszi ki (Voss és munkatársai, 2011).

A fumonizinek stabil szénlánccal rendelkeznek, a molekula kémiai szerkezete hasonló a szfinganinhoz (Sa) és a szfingozinhoz (So). Ezért a fumonizinek befolyásolják a komplex szfingolipidek szintetizálását. Ezek a molekulák kulcsfontosságú szerepet játszanak a sejtműködésben, mint membránalkotók és sejtszintű szabályozó molekulák. A fumonizinek viszonylag nagy dózisokban és hosszan tartó etetés után káros hatásokat váltottak ki, mint például a nyelőcsőrák emberben (IARC, 1993), a sertés pulmonalis oedema (PPE), ló-leukoencephalomalacia (ELEM) vagy májkárosodás több fajban, beleértve a sertéseket, lovakat, szarvasmarhákat, nyulakat és főemlősöket, illetve vesekárosodást patkányokban, nyulakban és juhokban (Smith, 2007). A fumonizin emésztésre gyakorolt hatásának megismerésére nagy hangsúlyt fektettek, azonban nem sok vizsgálat történt a fumonizin és a bél mikrobioták közötti kölcsönhatás meghatározására.

Legjobb tudomásunk szerint egyetlen közlemény jelent meg arról, hogy a fumonizinek közvetlen hatást gyakorolnak bizonyos baktériumtörzsekre. Az eredmények szerint az 50, 100, 500 és 1000 µM fumonisin B₁ koncentrációk, illetve 20 órás inkubálási idő után a vizsgált baktériumok mennyisége nem különbözött szignifikánsan a kontroll és a kísérleti csoportok között (Becker

és munkatársai, 1997). A fumonizinek hatással lehetnek a gazdaszervezet immunrendszerére közvetlen módon, illetve közvetetten a bélrendszerben élő patogén baktériumok mennyiségének megváltoztatásán keresztül. A fumonizinek pl. immuntoxicitást okoztak egérben (Abbès és munkatársai, 2015), illetve csökkentették a csirke makrofágok aktivitását (Chatterjee és Mukherjee, 1994). Amikor a japán fürjeket *Salmonella gallinarum*mal fertőzték meg, az FB₁-kezelt csoportban (150 mg/kg takarmány, 6 héten keresztül) megnövekedett mortalitást és csökkent lymphocyta-számot figyeltek meg (Deshmukh és munkatársai, 2005). A vékony és vastagbelet a fertőzéssel bevitt *E. coli* törzs kimutatható mértékben kolonizálta, amikor a sertéseket 7 napig kezelték 0,5 mg / testtömegkg FB₁-el (Oswald és munkatársai, 2003). A fumonizinek és egyéb mikotoxinok, különösen az aflatoxin együttes előfordulása erősítette a borjak fogékonyságát a vérzéses hasmenéssel társuló, shigatoxint vagy verotoxint, termelő *E. coli* (STEC) fertőzésre (Baines és munkatársai, 2013). Burel (2013) beszámolt arról, hogy fumonizint tartalmazó takarmányokban (11,8 mg/kg takarmány, 63 napig) a fumonizinek átlagos koncentrációja nem volt hatással a sertések egészségére, de elindította a *Salmonella typhimurium* baktériumok mennyiségének növekedését. Vannak olyan eredmények is, amelyek szerint egyes bél mikrobák megváltoztatják adott mikotoxin szerkezetét vagy toxicitását, vagy más módon képesek megvédeni a szervezetet a toxin káros hatásától. A baktériumok metabolizálhatják vagy megköthetik a fumonizineket, illetve gátolhatják a penészgombák fumonizin termelését. A fumonizinek gátlásával kapcsolatban a *Lactobacillus rhamnosus* 78,64% és 92,88% közötti hatékonysággal gátolhatja az FB₁ termelést, és jelentősen csökkenti az FB₁ káros hatásait a patkány májában és veséjében (Al-Masri és munkatársai, 2011). Ugyanez a baktérium törzs egy másik kísérletben 43,4%-kal csökkentette az FB₂ termelést (Stiles és Bullerman, 2002). A *Pseudomonas*

solanacearum és a *Bacillus subtilis* erősen, 70%-, illetve 100%-os hatékonysággal gátolta az FB₁ termelést (Cavaglieri és munkatársai, 2005; Formenti és munkatársai, 2012). Az FB₁ koncentrációját a *Lactobacillus sp. paracasie* 20 napos inkubálás után csökkentette (70,5 µl / ml összehasonlítva a kontroll csoportban lévő 300 µl / ml FB₁-vel) illetve a *Lactobacillus paracasie sp. paracasie* 10 napos inkubációban gátolta az FB₁ termelést (Gomah és Zohri, 2014). A kukorica FB₁ szintjét 3 napos fermentáció után a *Lactobacillus sp.* csökkentette (Mokoena és munkatársai, 2005). A *Fusarium verticillioides* növekedésének és FB₁ termelésének jelentős csökkenését írták le *Propionibacterium freudenreichii ssp. Shermanii* és *ssp. freudenreichii* jelenlétében (Gwiazdowska és munkatársai, 2008). Az FB₁ és FB₂ koncentrációját szintén jelentősen csökkentette a *Bacillus amyloliquefaciens*, *Microbacterium oleovorans* és *Enterobacter hormaechei* (Pereira és munkatársai, 2007; Pereira és munkatársai, 2010; Sartori és munkatársai, 2013).

Az FB₁-et sikerült hidrolizálni 3 órás inkubálással, talajból izolált bakteriális törzssel is (Benedetti és munkatársai, 2006). Kukoricából és szilázsból izolált *Bacillus sp.* 43%-tól 83%-os hatásfokkal bontotta a FB₁-et 6 napos inkubálás után. A *Sphingopyxis sp.* Az *MTA144* –ből izolált két enzim szintén képes volt degradálni a FB₁-et (Heinl és munkatársai, 2010). Egyes baktériumok kötődhetnek a fumonizinekhez; Niderkorn (2006) szerint a FB₁ 82%, illetve 100%-a eltávolítható *Leuconostoc mesenteroides*, illetve *Lactococcus lactis* segítségével. A *Streptococcus* és az *Enterococcus* szintén jelentős hatást gyakorol a FB₁ és a FB₂ szintre. Ezek a baktériumok a FB₁ és a FB₂ akár 24-62%-át is meg tudják kötni (Niderkorn és munkatársai, 2007).

Az itt bemutatott kutatás a fumonizin B₁ és a bélrendszer mikrobiótájának interakcióját vizsgálta juhban és sertésben, *in vitro* és *in vivo* kísérletekben.

2.2. Célok

A kutatás célja a fumonizin B₁ és a gasztrointesztinális mikrobioták közötti kölcsönhatás meghatározása a következő szempontok alapján:

- 1 - A fumonizin mikotoxin hatása a gasztrointesztinális traktus bakteriális közösségére juhban és sertésben.
- 2 - A juh és a sertés bél mikrobióta hatása a fumonizin metabolizmusára.

3. Anyag és módszer

Három kísérletet hajtottunk végre:

1. kísérlet: *In vitro* kölcsönhatás a fumonizin B₁ és a sertések bél mikrobiótája között
2. kísérlet: *In vitro* kölcsönhatás a fumonizin B₁ és a juhok bendő-mikrobiótája között
3. kísérlet: *In vivo* kísérlet: Fumonizin termelő *Fusarium verticillioides* hatása a sertések mikrobiótájára

3.1. *In vitro* kölcsönhatás a fumonizin B₁ és a sertések bél mikrobiótája között

Kifejlett sertésekből a vágóhídi vágást követően steril és anaerob körülmények között vakbél tartalmat vettünk. Az anaerob körülmények között előinkubált (24óra/37°C) McDougall pufferben (9,8 g NaHCO₃, 3,7 g Na₂HPO₄, 0,57 g KCl, 0,47 g NaCl, 0,12 g MgSO₄·7H₂O, 0,04 g CaCl₂ és 1000 ml desztillált víz; pH 8,3) homogenizáltuk a mintákat, illetve magát a puffert használtuk a kontroll csoportok létrehozásához (1.a. táblázat). A kísérletet 3 csoportra terveztük az 1.a. táblázat szerint. A FB₁ vakbél baktériumokra való hatásának meghatározása céljából klasszikus tenyésztéses és mennyiségi PCR eljárásokat használtunk amelyekkel a kísérleti és kontroll-1 csoport baktérium mennyiségeit mértük. A vakbél baktériumok FB₁ metabolizálásának becslésésére a kísérleti és a kontroll-2 csoportban LC-MS készülékkel mértük meg a FB₁ és a HFB₁ koncentrációját.

1.a. táblázat: Kísérleti elrendezés a fumonizin B₁ és a sertések bél mikrobiótája közötti kölcsönhatás *in vitro* vizsgálatához

inkubálás (óra)	Kísérleti csoport (puffer+bélsár+FB ₁)	Kontroll-1 csoport (puffer+bélsár)	Kontroll-2 csoport (puffer+FB ₁)
0	n=4	n=4	n=4
24	n=4	n=4	n=4
48	n=4	n=4	n=4
összetétel	12 x 3,33 g chymus 12 x 5,67 ml puffer 12 x 1 ml 50 µg/g FB ₁	12 x 3,33 g chymus 12 x 5,67 ml puffer 1 ml H ₂ O	12 x 9 ml puffer 12 x 1 ml 50 µg/g FB ₁

3.2. *In vitro* kölcsönhatás a fumonizin B₁ és a juhok bendő-mikrobiótája között

A kísérlet a korábban leírt elrendezésben történt (1.a. táblázat) azzal a különbséggel, hogy a az inkubálást 40 kg súlyú, 1 éves magyar racka x merinó fajtájú juh bendőjéből nyert bendőfolyadékkal végeztük. A FB₁ hatását a bendő baktériumaira qPCR módszerrel mértük.

3.3. *In vivo* kísérlet: Fumonizin termelő *Fusarium verticillioides* hatása a sertések mikrobiótájára

A malacokat két csoportba, egy kísérleti (n=6) és egy kontroll (n=6) csoportba osztottuk. Hét napos alkalmazkodási idő után, Tossenberger és munkatársai (2007) módszere szerint, speciális T kanült (PVTC; post valve T-cannula) illesztettünk a vakbélbe. A regenerációs időtartamot követően *Fusarium verticillioides* gombakultúrát kevertünk a kísérleti állatok takarmányába, állatonként napi 10 mg FB₁ bevitelt biztosítva.

A 9 napos *Fusarium verticillioides* etetés alatt a PVTC kanülon keresztül a 0., 2., 4., 6. és 8. napokon vakbélmintákat vettünk. A mintákat steril csövekben gyűjtöttük. A 0., 4. és 8. napok mintáit mikrobiális tenyésztéshez készítettük elő. Az inkubálás utáni mintának körülbelül 1 grammját 9 ml pepton sóoldattal homogenizáltuk. Ezután 10-szeres hígítási sorozatot készítettünk 10⁻¹ és 10⁻⁸ hígítási határok között. A mintavételi pontok összes mintáját -86°C -on tároltuk a qPCR vizsgálatig.

3.4. Baktérium mennyiség mérésének a módszerei

3.4.1. Élő baktériumok összcsíraszámának meghatározása *in vitro* és *in vivo* sertés kísérletekben

A kiválasztott táptalajon baktérium tenyésztéses eljárással határoztuk meg a baktériumszámot (1.b. táblázat). Inkubálás után a minta körülbelül 1 grammját 9 ml pepton sóoldattal homogenizáltuk, majd 10-szeres hígítási sorozatot készítettünk 10⁻¹ - 10⁻⁸ hígítási határok között. 100 µl oldatot adtunk az adott táptalajt tartalmazó agar felületre baktériumtenyésztés céljából. Baktériumok 5 csoportját vizsgáltuk *in vitro* sertéskísérletek esetében; aerob és anaerob baktériumok, coliform baktériumok, *Escherichia coli* (*E. coli*) és *Lactobacillus sp.*. Az *in vivo* kísérletekben a fentiekén kívül *Clostridium*

perfringens (*C. perfringens*) is tenyésztésre került. Az aerob és anaerob baktériumok kereskedelemben kapható "blood" agaron (BA; Bak-Teszt Ltd., Budapest, Hungary), a coliform és *Escherichia coli* populációk ChromoBio Coliform Agar (BioLab) táptalajon, a *Lactobacillus sp.* mennyiségét MRS agaron (BioLab) határoztuk meg. *C. perfringens* számlálásához lemezöntéses technikát alkalmaztunk Tryptose sulphite cycloserine (TSC) agar (ISO7937 – VWR Chemical) felhasználásával. 100 µl higított mintát kevertünk el 10 ml TSC agaron, majd újabb 10 ml TSC agarral fedtük be a korábban megszilárdult, előzőekben leírt, mintát tartalmazó táptalajt.

1.b. táblázat: Baktérium tenyésztéses eljárással meghatározott baktériumok, baktérium csoportok és az alkalmazott táptalaj és körülmények összefoglalása

baktérium	táptalaj	tenyésztés ideje és hőmérséklete	aerob / anaerób
aerob baktérium	Blood agar	1 nap, 37 °C	aerob
anaerob baktérium	Blood agar	1 nap, 37 °C	anaerob
Coliform	ChromoBio coliform agar	1 nap, 37 °C	aerob
<i>Escherichia coli</i>	ChromoBio Coliform agar	1 nap, 37 °C	aerob
<i>Lactobacillus sp.</i>	MRS agar	3 nap, 30 °C	anaerob
<i>Clostridium perfringens</i>	Tryptose sulphite cycloserine (TSC) agar	3 nap, 30 °C	anaerob

A telepkepző egységek száma (CFU/g) a következő képlettel lett meghatározva:

$$N = \Sigma C / V \times 1,1 \times d$$

ahol

ΣC a megszámlolt kolóniák száma két egymást követő higítási sorozat tagjának esetében. A higítási sorozat két tagjának egyikén legalább 10 kolóniának kell lennie.

V az a Petri-csészékre helyezett oltóanyag mennyisége milliliterben kifejezve.

d a megtartott két hígítási tag közül az első tag hígítási aránya.

3.4.2. *Quantitatív polimeráz láncreakció (qPCR) alkalmazása a baktériumok DNS kópiaszámának mérésére.*

Minden, e dolgozatban leírt kísérletben használtunk qPCR-t a baktériumok DNS kópiaszámának vizsgálatára (2. táblázat).

2. táblázat. A kutatásban vizsgált baktérium csoportok

baktérium	kísérletek száma			
	1.	2.	3.	4.
összes baktérium	X	X	X	
<i>E. coli</i>			X	
<i>Enterobacteria</i>			X	
<i>Bacteroides</i> és <i>Prevotella</i>	X	X	X	
<i>Clostridium sp.</i>			X	
<i>Lactobacillus sp.</i>	X		X	X
<i>Firmicutes</i>		X	X	
<i>Delta- és</i>		X		
<i>Gammaproteobacteria</i>				

DNS kivonása és qPCR

A DNS kivonása körülbelül 200 mg fagyasztott minta és QIAamp®DNA Stool Mini Kit felhasználásával történt a gyártó instrukciói alapján.

A kalibrációs egyenes létrehozásához tisztított PCR terméket hígítottunk *Lactobacillus sp.*, *Firmicutes*, *Delta-* and *Gammaproteobacteria* esetében. *E.coli*, *Enterobacteria*, *C. perfringens*, *Bacteroides* és *Prevotella* meghatározásakor plazmid hígítási sor szolgált a kalibrációs egyenes alapjául.

A bakteriális csoportok mennyiségét SYBR Green használatával, qPCR módszerrel határoztuk meg. A használt primerek szekvenciáit szakirodalmi

információk alapján válogattuk ki. A qPCR végtérfogata 25 µl/cső volt. A reakcióelegy 12,5 µl Brillant II SYBR qPCR Low Rox Master Mix-et (Agilent Technologies, CA, USA), 0,2 – 0,2 µM primert, 10,5 µl steril DEPC kezelt desztillált vizet és 1 µl DNS extraktumot tartalmazott. *Enterobacteria*, *E. coli*, *Bacteroides* és *Prevotella* esetében a PCR program a következő volt: 10 perc 95°C-on, 40 ciklus 30 mp 95°C-on, 1 perc 60 °C-on. *Firmicutes*, *Delta*- és *Gammaproteobacteria* esetében a PCR program: 10 perc 95°C-on, 40 ciklus 15 mp 95°C-on, 1 perc 60 °C-on. *Clostridium sp.*, esetében a PCR program: 3 perc 95°C-on, 40 ciklus 40 mp 95°C-on, 40 mp 54 °C-on, 80 mp 72 °C-on. Minden minta triplikátumban volt bemérve. A baktérium mennyiség a kalibrációs egyenesek felhasználásával lett meghatározva. A kapott kópiaszámokat egy gram mintára számoltuk át.

3.5. Mikotoxin kivonás és analízis

FB₁ kivonását a kísérleti és a kontroll-2-es csoportoknál kétszeres hígítással kezdtük (7 ml minta + 7 ml desztillált víz), majd 5 perces 3000 fordulat/perc (rpm) centrifugálással folytattuk. A felülúszóból a FB₁ kivonásához Sep-Pak C18 oszlopot használtunk (Waters Co., Milford, MA, USA) (Fodor és munkatársai, 2014). Az oszlop kondicionálása 2 ml metanollal, majd 2 ml desztillált vízzel történt. Ezután a hígított mintát (2 ml) feltöltöttük az oszlopra és azt 2 ml desztillált vízzel mostuk. Az FB₁ eluálását 2 ml víz/acetonitril keverékkel (1:1 v/v) hajtottuk végre.

A folyadék kromatográfiás és tömegspektrometriás analízis Shimadzu Prominence UFLC (Shimadzu, Kyoto, Japan) elválasztó rendszerrel történt (LC-MS-2020, ultra-gyors folyadék kromatográf, quadrupole tömeg spektrométer electrospray forrással ellátva). Az optimalizált tömegspektrumot 4,5 kV interfész feszültséggel, 1,05 kV negatív illetve 1,25 kV pozitív módban lévő detektor feszültséggel vettük fel. A mintákat Phenomenex Kinetex 2,5µ C18(2)-HST oszlopon (100 mm × 2,00 mm) analizáltuk. Az oszlop hőmérséklete 40°C, az áramlási sebesség 0,3 ml/perc volt. A grádiens elúció LC-MS minőségű desztillált vízzel (VWR Hungary, Debrecen) (eluens A) és acetonitrillel (eluens B) történt. Mindkét eluens 0,1% ecetsavat tartalmazott. 10 µl mintához a következő grádienset használtuk: (0 perc) 5% B, (3 perc) 60% B, (8 perc) 100% B, melyet 3 perces 100% B, majd 2,5 perces 5% B eluenssel végzett kezelés követett. Referenciaként FB₁ (1000 mg/l koncentrációból hígítva) és HFB₁ (25 mg/l

koncentrációból hígítva) standard oldatokat használtunk. MS körülmények: forrás blokk hőmérséklete 200 °C; szárítógáz sebessége 15,0 l/perc. A detektálás szelektált ion monitor (SIM) módban történt.

Az FB₁ kovertálásának a hatékonyságát aminopentollá (teljesen hidrolizált FB₁, HFB₁) azok molekulatömegei (FB₁: 721 g/mol; HFB₁: 405 g/mol) alapján határoztuk meg a következő képlettel:

$$\frac{\text{teljesen hidrolizált fumonizin B}_1 \text{ (mol/g)} \times 721 \text{ g/mol}}{405 \text{ g/mol} \times \text{fumonizin B}_1 \text{ (mol/g)}}$$

3.6. Statisztikai analízis

R i386 3.1.2 és az IBM SPSS 22 programokat használtuk a statisztikai értékelésekhez. Az átlagok összehasonlítását független t-próbával, egyutas ANOVA és Tukey post-hoc teszttel végeztük. Amennyiben az adatok eloszlása nem követte a normál eloszlást, nem-paraméteres Kruskal-Wallis tesztet alkalmaztunk. Ismétléses ANOVA eljárást használtunk a FB₁ és HFB₁ koncentrációk, kolóniaképző egységek és a DNS kópiaszám változásának vizsgálatához.

4. Eredmények

4.1. *In vitro* kölcsönhatás a fumonizin B₁ és a sertések bél mikrobiótája között

A kísérleti mintákban a FB₁ koncentráció csökkenése volt megfigyelhető 24 és 48 óra inkubációs idő után a kontroll-2 csoporthoz képest, míg a HFB₁ (FB₁ metabolizált terméke) koncentráció 0,33 %-ról 0,66 %-ra emelkedett (3. táblázat)

3. táblázat: Fumonizin B₁ és a hidrolizált fumonizin B₁ koncentráció (µg/ml) a kontroll és a kísérleti csoportokban az inkubációs idő alatt.

	inkubációs idő					
	0 óra		24 óra		48 óra	
	kontroll 2	kísérlet	kontroll 2	kísérlet	kontroll 2	kísérlet
FB ₁	6,433 ± 0,076	5,185 ± 0,175	6,338 ^b ± 0,108	4,080 ^a ± 0,065	4,587 ^b ± 0,085	2,747 ^a ± 0,548
HFB ₁	0	0	0	0,012 (0,33%)	0	0,024 ± 0,004 (0,66%)

^{a, b} szignifikáns különbség a kontroll és kísérleti csoportok között (P < 0,05)

%: átalakulási arány: FB₁ → HFB₁

4. táblázat: A sertések vakbél tartalmának baktérium tenyésztéses eljárással meghatározott baktériumszámai (log₁₀ CFU¹/g, átlag ± SD) a feltüntetett inkubációs idők után, fumonizin B₁ -gyel (kísérleti csoport; KCs) és anélkül (kontroll-1 csoport).

Baktérium	inkubációs idő					
	0 óra		24 óra		48 óra	
	kontroll-1	KCs	kontroll-1	KCs	kontroll-1	KCs
aerob	7,58 ± 0,07	7,49 ± 0,09	7,49 ± 0,25	7,55 ± 0,15	7,31 ± 0,19	7,26 ± 0,22
anaerob	9,05 ± 0,04 ^c	9,02 ± 0,05 ^c	8,76 ± 0,05 ^b	8,74 ± 0,19 ^b	8,39 ± 0,14 ^a	8,34 ± 0,08 ^a
<i>E. coli</i>	5,87 ± 0,07	5,89 ± 0,07	5,99 ± 0,33	5,58 ± 0,11	5,87 ± 0,66	6,16 ± 0,83
coliform	5,39 ± 0,12	5,33 ± 0,06	5,69 ± 0,29	5,44 ± 0,11	5,84 ± 0,55	5,99 ± 0,86
<i>Lactobacillus</i>	7,87 ± 0,09	7,76 ± 0,04 ^a	8,04 ± 0,09	7,99 ± 0,06 ^b	7,93 ± 0,12	8,01 ± 0,11 ^b

¹CFU: kolóniát alkotó egységek száma

^{a, b, c} szignifikáns eltérés a csoportok között (P < 0,01)

KCs: kísérleti csoport

5. táblázat: qPCR-el meghatározott baktériumszám (\log_{10} kópiaszám/g, átlag \pm SD) sertés vakbéltartalmában a feltűntetett inkubációs idők alkalmazásával fumonizin B₁ - gyel (kísérleti csoport; KCs) és anélkül (kontroll-1 csoport)

Baktérium	inkubációs idő					
	0 óra		24 óra		48 óra	
	kontroll-1	KCs	kontroll-1	KCs	kontroll-1	KCs
összes baktérium	11,33 \pm 0,38	11,52 \pm 0,16 ^a	11,68 \pm 0,21	11,91 \pm 0,03 ^b	11,66 \pm 0,13	11,79 \pm 0,05 ^b
<i>Bacteroides</i> és <i>Prevotella</i>	7,32 \pm 0,28 ^a	7,41 \pm 0,14 ^a	7,95 \pm 0,16 ^b	7,83 \pm 0,13 ^b	7,83 \pm 0,12 ^b	7,97 \pm 0,11 ^b
<i>Lactobacillus</i>	9,61 \pm 0,40 ^a	9,80 \pm 0,25 ^a	11,35 \pm 0,11 ^b	11,23 \pm 0,17 ^b	11,13 \pm 0,15 ^b	11,33 \pm 0,14 ^b

^{a, b} szignifikáns eltérés a csoportok között ($P < 0,05$),

KCs: kísérleti csoport

Baktériumtenyésztéses eljárás esetén nem észleltünk szignifikáns eltérést a kontroll-2-es és a kísérleti csoport között. 48 órás inkubálás után (4. táblázat) az aerob, anaerob, *E. coli*, coliforms és *Lactobacillus* baktériumszámaiban (\log_{10} CFU/g) qPCR technikával (5. táblázat) mindegyik csoporton belül észleltünk eltéréseket. Az összes baktérium, *Lactobacillus* és *Bacteroides-Prevotella* kópiaszámai (\log_{10} kópiaszám/g) a kísérleti csoportban magasabbak voltak a kontroll-2-es csoporthoz viszonyítva.

4.2. *In vitro* kölcsönhatás a fumonizin B₁ és a juhok bendő-mikrobiótája között

A *Bacteroides* és *Prevotella* csoportban (6. táblázat) szignifikáns különbséget észleltünk a kontroll-1-es és a kísérleti csoport között a 24-ik és 48-ik órában. A kópiaszámok (\log_{10} kópiaszám/g) a kontroll-1-es csoportban szignifikánsan alacsonyabbak voltak.

6. táblázat: qPCR-rel meghatározott baktériumszám (\log_{10} kópiaszám/g, átlag \pm SD) a feltűntetett inkubációs idők alkalmazásával fumonizin B₁ -gyel (kísérleti csoport; KCs) és anélkül (kontroll-1 csoport)

Baktérium	inkubációs idő					
	0 óra		24 óra		48 óra	
	kontroll-1	KCs	kontroll-1	KCs	kontroll-1	KCs
Összes baktérium	11,05 \pm 0,12	11,14 \pm 0,04	11,16 \pm 0,17	11,13 \pm 0,55	11,11 \pm 0,02	11,11 \pm 0,12
<i>Bacteroides</i> és <i>Prevotella</i>	8,19 \pm 0,03	8,22 \pm 0,03	8,36 \pm 0,07 ^a	8,48 \pm 0,05 ^b	7,73 \pm 0,04 ^a	8,04 \pm 0,16 ^b
<i>Firmicutes</i>	8,66 \pm 0,04	8,71 \pm 0,05	8,77 \pm 0,11	8,85 \pm 0,03	8,55 \pm 0,06	8,52 \pm 0,10
<i>Delta-és Gammaproteobacteria</i>	5,95 \pm 0,09	6,00 \pm 0,06	6,02 \pm 0,13	6,15 \pm 0,08	5,97 \pm 0,10	5,95 \pm 0,13

^{a, b} szignifikáns eltérés a csoportok között ($P < 0,05$)

4.3. *In vivo* kísérlet: Fumonisint termelő *Fusarium verticillioides* hatása a sertések mikrobiótájára

Eltérést találtunk a kontroll és a kísérleti csoport között az aerob baktérium mennyiségében (\log_{10} CFU/g) (7. táblázat); a FB₁-et fogyasztó állatokban átmenetileg, a 4. napon szignifikánsan csökkent az aerob baktériumok száma.

7. táblázat: Baktérium tenyésztéses eljárással meghatározott baktériumszám (\log_{10} CFU¹/g, átlag \pm SD) a sertések vakbélartalmában a feltüntetett etetési időtartamok alatt *Fusarium sp.*-vel (kísérleti csoport; KCs) és anélkül (kontroll csoport).

Baktérium csoportok	Etetési időtartam (nap)					
	0		4		8	
	kontroll	KCs	kontroll	KCs	kontroll	KCs
aerob baktérium	8,44 \pm 0,10	8,06 \pm 0,41	8,60 \pm 0,22 ^b	8,06 \pm 0,20 ^a	8,56 \pm 0,48	8,13 \pm 0,62
anaerob baktérium	8,65 \pm 0,07	8,68 \pm 0,35	9,36 \pm 0,33	9,26 \pm 0,17	9,42 \pm 0,22	9,35 \pm 0,05
<i>E. coli</i>	7,68 \pm 1,12	7,27 \pm 0,21	7,70 \pm 0,29	7,23 \pm 1,08	7,32 \pm 0,47	7,41 \pm 0,95
coliform	6,72 \pm 0,96	6,48 \pm 0,64	6,98 \pm 0,44	6,33 \pm 0,09	6,07 \pm 0,56	6,37 \pm 0,55
<i>Lactobacillus sp.</i>	7,86 \pm 0,14	8,16 \pm 0,56	8,44 \pm 0,34	8,17 \pm 0,38	8,35 \pm 0,55	8,16 \pm 0,67
<i>Clostridium perfringens</i>	4,63 \pm 0,06	4,21 \pm 0,62	3,55 \pm 0,68	3,42 \pm 0,91	3,15 \pm 0,61	3,38 \pm 0,89

¹CFU: kolóniát alkotó egységek száma

^{a, b, c} szignifikáns eltérés a csoportok között ($P < 0,05$)

KCs: kísérleti csoport

qPCR technikával (8. táblázat) az összes baktériumszámban a 2. napon kisebb, a 6. napon nagyobb, a *Firmicutes* csoport esetében a 2. napon kisebb, az *E. coli* és *Enterobacteria* esetében a 4. napon kisebb mennyiséget észleltünk a kontroll csoporthoz képest. Az egész etetési kísérlet idejére vonatkoztatva nem volt szignifikáns különbség a két csoport között.

8. táblázat: qPCR-rel meghatározott baktériumszám (\log_{10} copies number/g, means \pm SD) a feltüntetett inkubációs idők alkalmazásával *Fusarium*mal (kísérleti csoport; KCs) és anélkül (kontroll; Ctrl)

baktérium	Etetési időtartam (nap)									
	0		2		4		6		8	
	Ctrl	KCs	Ctrl	KCs	Ctrl	KCs	Ctrl	KCs	Ctrl	KCs
összes baktérium	12,37 $\pm 0,18$	12,46 $\pm 0,09$	12,48 $\pm 0,22^b$	12,11 $\pm 0,27^a$	11,99 $\pm 0,28$	11,95 $\pm 0,13$	12,12 $\pm 0,28^a$	12,43 $\pm 0,21^b$	12,48 $\pm 0,14$	12,48 $\pm 0,08$
<i>Bacteroides</i> és <i>Prevotella</i>	9,20 \pm 0,32	9,18 \pm 0,37	9,28 \pm 0,43	8,79 \pm 0,49	8,79 \pm 0,60	8,62 \pm 0,67	8,86 \pm 0,67	8,88 \pm 0,46	8,79 \pm 0,58	8,81 \pm 0,71
<i>Clostridium</i> <i>sp.</i>	8,34 \pm 0,58	8,26 \pm 0,41	8,31 \pm 0,39	8,74 \pm 0,50	9,35 \pm 0,47	8,98 \pm 0,49	9,28 \pm 0,32	8,93 \pm 0,31	9,19 \pm 0,42	9,08 \pm 0,31
<i>Escherichia</i> <i>coli</i>	9,49 \pm 0,84	9,64 \pm 0,46	9,38 \pm 0,51	8,87 \pm 0,83	9,65 \pm 0,35 ^b	8,79 \pm 0,50 ^a	9,68 \pm 0,58	9,14 \pm 1,14	9,51 \pm 0,59	9,34 \pm 0,84
<i>Enterobactr</i> <i>ia</i>	10,11 $\pm 0,86$	10,24 $\pm 0,43$	9,98 \pm 0,56	9,78 \pm 0,74	10,60 $\pm 0,39^b$	9,88 \pm 0,38 ^a	10,52 $\pm 0,55$	9,82 \pm 1,05	9,71 \pm 0,52	9,61 \pm 0,84
<i>Firmicutes</i>	10,55 $\pm 0,14$	10,52 $\pm 0,07$	10,52 $\pm 0,14^b$	10,36 $\pm 0,10^a$	10,36 $\pm 0,11$	10,30 $\pm 0,08$	10,26 $\pm 0,17$	10,27 $\pm 0,15$	10,24 $\pm 0,09$	10,26 $\pm 0,05$
<i>Lactobacill</i> <i>us sp.</i>	10,34 $\pm 1,07$	10,06 $\pm 0,91$	10,12 $\pm 0,87$	10,39 $\pm 0,47$	9,88 \pm 0,87	10,19 $\pm 0,57$	9,98 \pm 0,75	10,16 $\pm 0,50$	10,07 $\pm 0,98$	9,91 \pm 0,79

Ctrl és KCs: kontroll és kísérleti csoport

^{a, b} szignifikáns eltérés a csoportok között ($P < 0,05$)

5. Következtetések

5.1. *In vitro* kölcsönhatás a fumonizin B₁ és a sertések bél mikrobiótája között

A fumonizin B₁-et a sertés vakbelében található mikroorganizmusok metabolizálják, de a vizsgált baktériumok mennyisége nem változott FB₁ hatására. Vélhetően egyéb mikroorganizmusok is érintettek a fumonizinek és a bél mikrobioták közötti kölcsönhatásban, melyeket további *in vivo* kísérletekben lehet vizsgálni.

5.2. *In vitro* kölcsönhatás a fumonizin B₁ és a juhok bendő-mikrobiótája között.

A *Bacteroides* és a *Prevotella* mennyisége a kísérleti csoportban magasabb volt, mint a kontroll csoportban, miközben nem volt különbség a teljes baktérium mennyiségben. A vizsgálat eredménye alapján további kísérleteket kell végezni a FB₁ és a *Bacteroides* és *Prevotella* közötti kapcsolat tisztázására.

5.3. *In vivo* kísérlet: Fumonizint termelő *Fusarium verticillioides* hatása a sertések mikrobiótájára

A *Fusarium verticillioides* rövid időre megváltoztathatja a baktériumok növekedését, de ezen események csak rövid ideig álltak fenn. A *Fusarium verticillioides* által termelt mikotoxinoknak a bél mikroorganizmusokra való hatását hosszabb kísérleti időtartamban kellene vizsgálni.

6. Új kutatási eredmények

1. Elsőként lett vizsgálva tenyésztéses és qPCR technikával a sertés bélsár tartalmának (összes baktérium, anaerob és anaerob baktériumok, Coliform, *E. coli*, *Enterobacteria*, *Lactobacillus*, *Bacteroides* and *Prevotella* baktériumok) interakciója FB₁-gyel. Szignifikáns különbséget nem észleltünk a kontroll (bélsár tartalom FB₁ nélkül) és kísérleti csoport (bélsár tartalom FB₁-gyel) között.
2. Kimutattuk, hogy a FB₁ indukálja a *Bacteroides* és *Prevotella* baktériumok növekedését 48 órás inkubáció elteltével; $8,04 \pm 0.16$ vs. $7,73 \pm 0.04$ (log₁₀ kópiaszám/g, 6. táblázat)
2. Az *in vivo* kísérletben a takarmány *Fusarium verticillioides* gombatenyésztéssel történő kiegészítésével (10 mg FB₁/egyed/nap) néhány baktérium az egyes időpontokban változást mutatott. Klasszikus baktériumtenyésztéses eljárással vizsgálva a 4. napon átmenetileg csökkent az aerob baktériumok mennyisége. qPCR technikával kimutatható volt az összes baktériumszám csökkenése a 2. illetve annak emelkedése a 6. napon a kontroll csoporthoz képest. A *Firmicutes* baktériumszám a 2. napon, az *E. coli* és *Enterobacteria* baktériumszám a 4. napon kisebb volt a kontroll csoporthoz képest.

A disszertáció témájához kapcsolódó cikkek, kiadványok

1. Dang Huu Anh, Attila Zsolnai, Melinda Kovács, Nguyen Bá Hien (2016). Doc to nam moc fumonisin. Khoa hoc kythuat thu y / Veterinary sciences and techniques. Vol. 23, No. 7, 85-88.
2. Huu Anh Dang, Éva Varga-Visi, Attila Zsolnai (2016). Analysis of fumonisins: A review. Tap chi khoa hoc Nong nghiep Viet Nam / Journal of Agricultural Sciences Vietnam. Vol.14, No. 10, 1639-1649.
3. Huu Anh Dang, Attila Zsolnai , Melinda Kovács , István Bors , András Bónai , Bóta Brigitta , Judit Szabó-Fodor (2017). In vitro interaction between fumonisin B1 and the intestinal microflora of pigs
Polish Journal of Microbiology, Vol. 66, No. 2, 245-250. IF 0.746, Q3
4. Huu Anh Dang, Attila Zsolnai, Melinda Kovács, Brigitta Bóta, Gábor Mihucz, Roland Pósa, Kinga Marosi, Mariam Kachlek, Judit Szabó-Fodor (2019). Effect of fumonisins producing *Fusarium verticillioides* on the microbiota in pig caecum.
Acta Veterinaria Brno. In press: (2019) IF 0.422, Q3
5. Huu Anh Dang (2015). Microbiological Methods in Control of Fumonisin Mycotoxins. In: Dávid Ágota , Dávid Ádám , Kardon Béla (szerk.). Excellent Science in ASEAN: Best Selected Papers and Posters from Young ASEAN Scientists on Water, Food and Health . 126 p. Konferencia helye, ideje: Budapest , Magyarország , 2015.03.17 -2015.03.19. Budapest: Regional Centre for Information and Scientific Development (RCISD), 2015. p. 124. (ISBN:978-963-12-1839-8).
6. Huu Anh Dang, Attila Zsolnai , Melinda Kovács , István Bors , András Bónai , Bóta Brigitta , Judit Szabó-Fodor (2016). In vitro interaction between fumonisin B₁ and the caecal microbiota of pigs. In: Dušan Kovačević (szerk.). VII International Scientific Agriculture Symposium "Agrosym 2016": Book of abstracts . 1226 p. Konferencia helye, ideje: Jahorina, Bosznia-Hercegovina, 2016.10.06-2016.10.09. Sarajevo: University of East Sarajevo, Faculty of Agriculture, 2016. p. 516. (ISBN:978-99976-632-6-9).

A disszertáció témájához nem kapcsolódó cikk

1. Attila Zsolnai, Réka Szántó-Egész, Edit Ferencz-Elblinger, Anh Dang Huu, Anna Jánosi, Erika Koppányné Szabó, István Anton (2017). Loop-Mediated Isothermal Amplification based approach as an alternative to Recombinase Polymerase Amplification based detection of Mangalitzka component in food products. **Acta Alimentaria**, An International Journal of Food Science. Vol. 46, No. 3, 383-388. IF 0.357