

# Diplomamunka

Borbély Fanni

2020

Állatorvostudományi Egyetem  
Bioinformatikai Központ

Sertésbél­sár bakteriom vizsgálata egy hazai nagy  
létszámú állományban

**Készítette:** Borbély Fanni

**Témavezető:**

Dr. Solymosi Norbert

ÁTE, Bioinformatikai Központ, egyetemi docens

Dr. Papp Márton

ÁTE, Bioinformatikai Központ, PhD-hallgató

Budapest, 2020

# Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	4
1. Bevezetés.....	5
2. Szakirodalmi áttekintés .....	7
2.1. A DNS szerkezete .....	7
2.2. Történeti áttekintés.....	7
2.3. Legújabb módszerek .....	8
2.4. Rendszertani fogalmak.....	9
2.5. A bélmikrobiom szerepe .....	9
3. Anyag és módszer .....	10
3.1. Mintavétel és szekvenálás .....	10
3.2. Bioinformatikai adatfeldolgozás, statisztikai elemzés .....	12
4. Eredmények.....	15
5. Megbeszélés .....	20
5.1. Diverzitás .....	25
5.2. Baktériumfajok változásai csoportonként.....	27
5.3. Takarmány-összetevők hatása a sertések bakteriomjára.....	31
6. Összefoglalás.....	35
7. Summary .....	36
8. Köszönetnyilvánítás .....	37
Irodalomjegyzék.....	38

## **Rövidítések jegyzéke**

DNS = dezoxiribonukleinsav

ddNTP = dideoxinukleotid

NGS = újgenerációs szekvenálás

NMDS = Non-metric Multidimensional Scaling

LCA = Lowest Common Ancestor

OTU = Operational Taxonomic Unit

# 1. Bevezetés

Mikrobiótának nevezzük az élőlények szervezetében élő mikroorganizmusok összességét, amelyek a gazdaszervezettel szoros kapcsolatban állnak. Mind baktériumok, vírusok, gombák a részét képezik. A mikrobióták genomjának közössége pedig a mikrobiomot adja (Krikó et al., 2018). Diplomamunkámban sertések bélsarának baktérium összetevőivel (bakteriom) foglalkozom. A bakteriom tehát a mikrobiomba tartozó kisebb egység. Ezek a mikroorganizmusok a születés pillanatától népesítik be az élőlények külvilággal határos részeit, amelyek a környezetből és az anyától származnak. Többen is bizonyították humán vonalon, hogy a természetes úton, és a mesterségesen, császármetszéssel világra jött csecsemők mikrobiomjában jelentős eltérések vannak (Bäckhed et al., 2015). Chu és munkatársai (2017) szerint ezek a különbségek már 6 hetes kor után nem ismerhetők fel. Sokáig azt gondolták, hogy a csecsemők sterilén, minden mikroorganizmustól mentesen születnek meg, de számos genomikai és genetikai vizsgálat elvégzése után kétségbe vonták ennek igazságát (Piccolo et al., 2017). A mikrobiom az életkor előrehaladtával is folyamatos változáson megy keresztül. A bélmikrobiom összetétele és működése számos tényezőtől függ, amely fordítva is elmondható, befolyásolja az állatok egészségét, valamint termelési mutatóit. Ezek a főbb tényezők lehetnek sertéseknél a takarmányozás, tartási körülmények, különböző stresszorok. A táplálék hatása nagyon fontos, amelyet kísérletesen is bizonyítottak. Tej alapú tápszerrel, szója alapú tápszerrel táplált, valamint szoptatott malacok vékonybél mikrobiom-összetételét vizsgálták, amelyek számos különbséget mutattak (Prabhu et al., 2012).

A választás jelenti a legnagyobb stresszt a malac számára, mivel ez új környezetet, takarmányváltást, és az anyjától való elszakadást jelent. Ebben az időszakban különösen fontos a megfelelő tartási és takarmányozási technológiák betartása, alkalmazása (Summers et al., 2019). A sertés későbbi életében egy új takarmány bevezetésekor is jelentős mértékben fokozatosan megváltozik a bélmikrobiom összetétele az új környezethez alkalmazkodva (Tilocca et al., 2017). A sokrétű kapcsolat a mikrobiom és a gazdaszervezet között bizonyított, szerepe van többek között az immunrendszer normál működésében, a tápanyagok metabolizmusában. Közvetlenül befolyásolja a szénhidrátok lebontását, rövid szénláncú zsírsavakat biztosít, enyhíti és megváltoztatja a potenciálisan mérgező vegyületek hatását és esszenciális vitaminokat állít elő (Gill et al., 2006). Ezek mellett bizonyos betegségekkel is összefüggésbe hozható, például egyes baktériumok túlszaporodása, illetve csökkenése, vagy esetlegesen nem a bélflóra természetes tagjához tartozó mikroorganizmus jelenléte okozhat problémát.

Mindezek miatt fontos a sertés, valamint a többi gazdasági haszonállat egész élete során a bélcsatorna lakóinak pontos feltérképezése, azok változásainak megismerése, illetve a körülményekkel való összevetése. Ezek az ismeretek segíthetik a telepeket a szelekciós és termelési rendszerek optimalizálásában. A mikrobiom összetételének megismerését teszik lehetővé az újgenerációs szekvenálási módszerek (next generation sequencing – NGS). A hagyományos mikrobiológiai, tenyésztésen alapuló módszerekkel szemben ennek nagy előnye, hogy a mintában jelen lévő összes mikroorganizmus egyidejűleg kimutatható azok örökítőanyagán keresztül (Krikó et al., 2018). Munkánk során ezen módszereken belül is az ún. shotgun metagenom szekvenálást alkalmaztuk, ami a genomot véletlenszerűen darabolja fel, és az így kapott fragmentumokat szekvenálja.

Vizsgálatunk célja az volt, hogy betekintést nyerjünk különböző életkorú, ezáltal különböző takarmányozási csoportokba tartozó sertések bélmikrobiomjának változatosságába. Így ezeknek a sertéseknek teljes bélflóráját térképeztük fel, meghatároztuk a sertés bélsár teljes baktérium összetételét. Továbbá összefüggést kerestünk a takarmány bélbakteriomra gyakorolt hatása között, hogy láthassuk, mi javíthatná a haszonállatok termelékenységét, illetve segíthetne hozzá az egészségük megtartásához.

## 2. Szakirodalmi áttekintés

### 2.1. A DNS szerkezete

A baktériumok örökítőanyaga, mint az összes prokarióta sejté, dupla szálú dezoxiribonukleinsav (továbbiakban DNS). Egy DNS szál nukleotidok összekapcsolódásával épül fel, és minden egyes nukleotid egy foszfátcsoportot, egy dezoxiribózt és egy bázist tartalmaz. A bázisok nitrogéntartalmú heterociklikusos vegyületek, amelyeknek négy csoportját különböztetjük meg, a timint, citozint, guanint, és adenint. Ezek sorozata adja a bázissortrendet. Ezt nevezzük a DNS szekvenciájának, ami meghatározza a genetikai információt. A nukleotidokat a továbbiakban a bázisok kezdőbetűivel jelölöm (T, C, G, A). Végül az ezek alkotta polinukleotid láncok spirálszerű összekapcsolódásával kapjuk meg a kétszálú örökítőanyagot (Deák, 2014). James Watson, Rosalind Franklin és Francis Crick írta le 1953-ban a molekula kettős-hélix szerkezetét, valamint rájöttek, hogy a két polinukleotid szálát hidrogén-kötések kapcsolják össze. A DNS molekulák a sejtciklus egy fázisában összetekeredett állapotban találhatóak meg, ezeket az egységeket nevezzük kromoszómáknak. A baktériumok egyszeres kromoszóma állománnyal rendelkeznek, tehát haploidok (Deák, 2014).

### 2.2. Történeti áttekintés

A molekuláris biológia többek között a fehérjék és nukleinsavak szekvenciájának meghatározásával foglalkozik, fejlődése egybefonódik a DNS szerkezetének feltárásával, azonban az új felfedezések az 1950-es években kezdődtek, és intenzív mértékben tartanak mind a mai napig. Az 1970-es évek végén határozták meg legelőször a DNS bázissortrendjét. Ezekben az időkben két jelentős szekvenálási módszer volt ismert, a Maxam-Gilbert-féle módszer, és a Sanger-féle lánctermináción alapuló módszer, amelyért Nobel-díjat is kaptak (Szeberényi et al.,2014).

Maxam-Gilbert módszer lényege egy kémiai hasítás bázisspecifikus ágensekkel, majd gélelektroforézissel állapítják meg az így kapott láncok méretét. Ebből következtetnek a szekvenciára (Szeberényi et al.,2014).

A Sanger-féle lánctermináción alapuló DNS-szekvenálás egy dideoxinukleotid (ddNTP) láncterminációs módszer, amely alapja egy mesterséges körülmények között végzett DNS-szintetizáló rendszer, egy polimerizációs reakció. (A polimerizáció egy kémiai reakció, amely során több, azonos vegyület egy óriásmolekulává kapcsolódik melléktermék keletkezése

nélkül.) A szakaszhoz radioaktív vagy fluoreszcens primert illesztnek, majd egy polimeráz enzimmel átírják egy másik szálra. A vizsgálathoz ddNTP-k szükségesek, 4 külön csőbe más dideoxinukleotid kerül (ddCTP, ddGTP, ddATP, ddTTP). A dNTP helyett a ddNTP fog beépülni a láncba. Ezek dezoxiribózának harmadik szénatomja nem tartalmaz hidroxil-csoportot, így megszakad a lánc növekedése, különböző hosszúságú szálakat kapunk, mivel ezek kapcsolódása véletlenszerű esemény. Az így kapott 4 mintát gélelektroforézissel futtatják, amely nagyság szerint választja szét a fragmentumokat. Majd a DNS-szekvenciákat az alapján határozzák meg, hogy melyik csőben, melyik ddNTP volt, mert a lánctermináció mindig az adott bázisnál áll le (Wunderlich, 2014).

A piroszekvenálás is egy szintézisalapú szekvenálási módszer, amely a DNS-polimeráz enzim aktivitását luciferáz enzim segítségével érzékeli. Nukleotidokat adnak a rendszerhez, amik a polimeráz enzim segítségével beépülnek a szálba. Ilyenkor egy biokémiai reakciósor megy végbe, ahol a luciferáz által katalizált folyamat fénykibocsátással jár, amelynek intenzitása arányos a beépülő nukleotidok számával. Tehát a fényvillanások adják a DNS szekvenciáját (Antal et al., 2014).

## **2.3. Legújabb módszerek**

Ezek után fejlesztették ki az újgenerációs szekvenálási módszereket. A régebbi technikákkal szemben nagy előnyük, hogy rövid idő alatt nagy mennyiségű bázissorrend meghatározására képesek, jelentősen kedvezőbb áron. (Metzker, 2011) A technika során nincs szükség a láncok méret alapján történő elválasztására, de szintén enzimatis folyamatokról van szó.

Az NGS módszerek között elkülöníthetünk célzott (targeted) és nem célzott (untargeted) technikákat. A célzott mintafeldolgozás során csak adott régiókat vizsgálnak, ilyen például az ún. 16S rRNS-gén szekvenálás. Ez a 16S rRNS a riboszomális RNS egy legkevésbé változó, mondhatni állandó része, így filogenetikai vizsgálatokra alkalmas. Ezzel ellentétben a nem célzott, ún. shotgun szekvenálás a minta teljes nukleinsav tartalmát képes szekvenálni (Krikó et al., 2018). A szakdolgozatom alapját képező kísérletben is ezt a módszert alkalmaztuk.

Az NGS sikerét mutatja, hogy a humán gyógyászatban és kutatásban számos területen alkalmazzák, mint klinikai metagenomikai módszer. Használhatják például a fertőző betegségek diagnosztizálásában, valamint az onkológia területén is kiemelt a szerepe. Mikrobiális vizsgálatokat végeznek mind egészséges, mind pedig beteg emberekben, hogy ezáltal megismerjék a gazdaszervezet fertőzésekre adott válaszát a gének szintjén is. Nagy



előnyt jelenthet a hagyományos mikrobiológiai módszerekkel szemben, mivel a kórokozók széles skálája egyszerre, egyetlen vizsgálattal kimutatható (Charles et al., 2019).

## 2.4. Rendszertani fogalmak

A szöveg könnyebb értelmezése érdekében megnevezem az egyes taxonómiai csoportokat, amelyeket az élőlények rendszerezése során használnak. A kingdom egy rendszertani szint, amelyet magyarul országgént használunk. Az egész élővilágot öt ország alkotja, a prokarióták, az egysejtű eukarióták, a gombák, a növények és az állatok. A prokariótákat pedig az ősbaktériumok (*Archebacteria*) és a valódi baktériumok (*Eubacteria*) adják. Ezeken belül a további taxonómiai szintek a törzs (phylum), az osztály (classis), rend (ordo), család (familia), nemzetség (genus), valamint a faj (species).

## 2.5. A bélmikrobiom szerepe

A bélcsatornát benépesítő mikroorganizmusok egy összetett közösséget képeznek, és szoros kapcsolatban állnak a szervezettel, mivel hozzájárulnak annak egyensúlyához, egészségéhez. A bélmikrobiom a szénhidrátok fermentációja révén részt vesz az energia előállításában és tárolásában, a rövid szénláncú zsírsavak felszívódásában, esszenciális aminosavak és vitaminok előállításában (Gill et al., 2011). A rövid szénláncú zsírsavak elsősorban acetát, propionát és butirát, ez utóbbi az enterociták és a kolonociták fő energiaszubsztrátját jelenti, sőt emellett még gyulladáscsökkentő és daganatellenes hatással is bír. A propionát viszont a májban, az acetát pedig a perifériás szövetekben hasznosul (Guarner et al., 2003). Másik fontos tulajdonsága, hogy kölcsönhatásba lép az immunrendszerrel, így elősegíti az immunsejtek érését és a normál immunfolyamatok kialakulását (Chow et al., 2011).

A bél ökoszisztémája folyamatosan változik. Vannak állandó lakói, akik úgynevezett kommenzalisták és a gazda egész életében fennmaradnak. Nagy része viszont átmeneti mikroba, akikre nagy hatással bírnak a fentebb említett tényezők. Ha ezek aránya nagymértékben megváltozik, akkor beszélhetünk diszbiózisról. Tehát a szervezet számára hasznos baktériumok száma csökken, a káros baktériumok mennyisége pedig nő, vagy a bélben egészséges körülmények között nem található mikroorganizmusok jelennek meg.

### 3. Anyag és módszer

#### 3.1. Mintavétel és szekvenálás

Egy nagy létszámú sertésállomány öt takarmányozási csoportjából gyűjtöttük a mintákat. Az állomány a Duna-hyb Kft. tulajdonában álló faddi telepen található. Négy-négy kutrica padozatáról vettük csoportonként a frissen ürített bélsarat, ezeket életkoronként elegyítve (poolozva) dolgoztuk fel.

Az így kapott öt mintavételi csoportot a Koca, Malac I.-, Malac II.-, Hízó I.-, illetve Hízó II.- táppal takarmányozott sertések alkották, amelyeket legalább két hete így tartottak. A későbbiekben ezek alapján fogjuk jelölni az egyes csoportokat. A kocákhoz azok az anyaállatok tartoznak, amelyek a mintavételt megelőző öt napon belül fialtak. A Malac I. csoport tagjai nyolc hetesek, a Malac II. csoport tagjai tizenegy hetesek, a Hízó I. négy hónaposak, a Hízó II. csoport tagjai pedig öt és fél hónaposak voltak. Az állatok életkora az egyes csoportokban a könnyebb áttekinthetőség érdekében az 1. táblázatban van összefoglalva.

*1. táblázat A vizsgált állatok életkora takarmányozási csoportonként*

<b>A takarmányozási csoportokat alkotó állatok életkora</b>	
Koca	Mintavételt megelőző öt napon belül fialt
Malac I.	8 hetes
Malac II.	11 hetes
Hízó I.	4 hónapos
Hízó II.	5,5 hónapos

A mintavétel 2018.05.31-én történt meg. A sertésekről a további fontos adatokat a 2. táblázatban foglaltam össze.

*2. táblázat Az egyes csoportok születési dátumai, valamint a takarmányváltásuk időpontjai*

<b>Takarmányozási csoport</b>	<b>Születés dátuma</b>	<b>Utolsó takarmányváltás</b>
Hízó I.	2018.01.29.	H1-re átállás 2018.05.17.
Hízó II.	2017.12.18.	H2-re átállás 2018.05.11.
Malac I.	2018.04.06.	M1-re átállás 2018.05.17.
Malac II.	2018.03.15-24.	M2-re átállás 2018.05.18.

A kocák fialási dátuma 2018.05.26., 2018.05.28. és 2018.05.29. volt., így látható, hogy mindegyik anya ténylegesen öt napon belül ellett.

A takarmányozási hatások elemzése miatt szemléltetem az etett tápok jellemzőit. A 3. táblázatban azoknak a takarmány-összetevőknek a részarányát mutatom be, amelyek mindegyik vizsgált csoport takarmányában szerepeltek.

*3. táblázat A takarmányösszetevők százalékos lebontása a takarmányozási csoportok szerint*

<b>Takarmány</b>	<b>Árpa (%)</b>	<b>Tritikále (%)</b>	<b>Kukorica (%)</b>	<b>Szója (%)</b>
Hízó I.	20.0	17	38	10.0
Hízó II.	34.3	15	28	3.5
Malac I.	26.0	19	20	11.0
Malac II.	30.0	28	20	7.5
Koca	25.0	22	20	4.0

A sertésekkel etetett tápok a telep saját keverőüzemében készültek, az itt kiadott recept alapján rögzítettük a takarmányok összetételét.

A bélsárminták feldolgozása során első lépésként az össz-DNS kivonása szükséges, ez a Zymo Research ZR Fecal DNA Kit-jével valósult meg. Az össz-DNS tartalmazza a sertés saját, a takarmány-összetevők, illetve az állat bélflóráját alkotó mikroorganizmusok genomját. A

kivonás során a rendszer restriktív enzimekkel feldarabolja a hosszú DNS-szálakat, amely a szál véletlenszerű pontjain következnek be (Krikó et al., 2018).

Ebből az Ion Torrent PGM (Personal Genome Machine) szekvenátorral olvastuk le a leolvasási szekvenciákat, tehát a bázissorrendet ismertük meg. Ez a rendszer a kémiai információkat közvetlenül digitális adatokká alakítja át egy biokémiai folyamat révén. Amikor egy polimeráz nukleotidot épít be a növekvő DNS-szába, akkor hidrogén-ion (H<sup>+</sup>) szabadul fel melléktermékként. Ezt a töltést képes felismerni az Ion PGM chip, amely így pH-mérőként funkcionál, a feszültségváltozásokat rendeli hozzá a bázisokhoz (Liu et al., 2012).

### **3.2. Bioinformatikai adatfeldolgozás, statisztikai elemzés**

A leolvasási szekvenciák adták a bioinformatikai elemzés alapját, azok olyan readek, amelyek restriktív enzimekkel véletlenszerűen fragmentált (széttördelt) DNS-darabok bázissorrendjének digitalizálásával jöttek létre (Krikó et al., 2018). Ezzel a módszerrel több millió szekvenciát kaphatunk. Elvégeztük a nyers-readek minőség-ellenőrzését, így kiszűrtük a megbízhatatlan bázissorrendű szekvenciákat. A megtisztított DNS-szakaszok szekvenciáját FASTQ-fájlokban tároltuk. Ezután szükséges a sertés eredetű szakaszok kiszűrése, mert mi csak a nem sertés eredetű szekvenciákat vizsgáltuk. A FASTQ-fájlokat, Bowtie2 szoftverrel *very sensitive* beállítással a *Sus scrofa* (NCBI azonosító: Scrofa11.) referencia-genomra illesztettük, és az ezzel nem egyező readeket használtuk a későbbiekben az elemzéseinkhez. A referencia-genomokat a genomi könyvtárak tartalmazzák, amelyek az összes ismert szekvencia gyűjteménye, ezek különböző adatbázisokból szerezhetők meg. Mi az NCBI (National Center for Biotechnology Information) genom gyűjteményét használtuk.

Az adatállományt a readek redundanciájától a VSEARCH programmal tisztítottuk. A redundancia felesleges adatot jelent, ilyenek például az ismétlődő szekvenciák. Ha több tökéletesen megegyező hosszúságú és szekvenciájú szakaszunk van, akkor ezekből csak egyet tartunk meg. Erre a lépésre azért volt szükség, mert ez torzíthatja a taxonok részarányát (Torbjorn et al., 2016). Az így kapott readeket rendszertani kategóriákba soroltuk, ezt taxonklasszifikációnak nevezzük. Ehhez a Kraken2 nevű szoftvert és az NCBI NT adatbázist használtuk (Wood et al., 2019; Pruitt et al., 2005). Itt már csupán a nem sertés eredetű szekvenciákra illesztettük a referencia-adatbázist. A Kraken2 a legalacsonyabb közös őshöz rendeli a szekvenciákat (LCA= Lowest Common Ancestor), majd ez alapján hozza létre az OTU-táblát. Az OTU operatív taxonómiai egységet jelent (Operational Taxonomic Unit), az egyes minták taxonómiai szintek szerinti összetételét adja meg. Így megkaptuk, hogy az egyes taxonómiai egységekre hány darab rövid leolvasási szekvencia illett rá. A mátrixot ezután R-

programban és a phyloseq programcsomag segítségével elemeztük (McMurdie et al., 2014). Ezt követően a readok mintánként eltérő számát kiegyenlítettük, ezt a lépést rarefactionnek nevezzük. Erre a lépésre a mintákban található baktériumfajok relatív gyakoriságainak hasonlóságának kimutatásához volt szükség (Krikó et al., 2017). Mivel mi a bélsárban lévő mikroorganizmusok közül csak a baktériumokra vagyunk kíváncsiak, csak azokat a readokat használtuk fel, amelyek az osztályozás során a Bacteria királyságba tartoztak.

Munkánk során a taxondiverzitást írtuk le először. A diverzitás egy ökológiai mérték, ami a populációt alkotó fajok számát és részarányát együttesen méri, azok sokféleségéről ad információt. Megkülönböztetünk  $\alpha$ -,  $\beta$ - és  $\gamma$ -diverzitást. Az  $\alpha$ -diverzitás a minta vagy a közösség részarányát adja meg, a  $\beta$ -diverzitás a közösségek közötti sokféleséget mutatja meg, a  $\gamma$ -diverzitás pedig a kettő együtteséből alakul ki (Weiss et al., 2016). Az  $\alpha$ -diverzitás mértékét különböző indexekkel adják meg, amelyek bizonyos becslések alapján próbálnak információt adni az adott populációra vonatkozóan. Vagyis a valódi diverzitás becslésére szolgálnak (Ke et al., 2019). A szakirodalomban talált indexek közül a legtöbbször által használt Shannon-indexet, másnéven Shannon entrópiát használtuk. Az entrópia szó rendezetlenséget, bizonytalanságot jelent, tehát a populáció egy véletlenszerűen kiválasztott elemének besorolásában rejlő bizonytalanságot számszerűsíti (Shetty et al., 2013). A Shannon-indexet és a nyers taxonszámot is a ritkított OTU-tábla felhasználásával kaptuk meg.

A  $\beta$ -diverzitást, a két közösség közötti taxongazdagság-hasonlóságokat is különféle indexekkel jellemezi a szakirodalom. Mi az ún. Bay-Curtis indexet használtuk. Ez a minták közti különbségeket adja meg, amihez a fajok összesített számát és az azok között lévő részarányt használja fel. A Shannon-indexhez hasonlóan ezt is a ritkított OTU-mátrix felhasználásával számoltuk ki. Ha a két minta teljesen megegyezik egymással, akkor az index a minimum értéket adja, Bay-Curtis=0. Ugyanakkor, ha a két minta nem tartalmaz közös fajokat, akkor a maximum értéket fogjuk kapni, Bay-Curtis=1 (Rognes et al., 2016). Az így létrehozott távolságmátrixot, a taxongazdagság-hasonlóságokat ezután ábrázolnunk kellett a könnyű leolvashatóság érdekében, ehhez egy dimenzióredukciós módszert, a Non-metric Multidimensional Scalinget (NMDS) használtuk (Kruskal et al., 1964). A távolságokat egy kétdimenziós térben kaptuk meg, ahol a pontok ábrázolják a mintákat, azok vannak közelebb egymáshoz a koordináta rendszerben, amelyek jobban hasonlítanak, tehát azok távolsága a hasonlóságukkal fordítottan arányos. A módszer a pontokat annyira húzza szét a térben, hogy azok távolsága a távolságmátrixban lévő értékekkel a legpontosabban megfeleljenek. Ezáltal a koordináta rendszer tengelyei tetszőlegesen, önmagukban nem értelmezhető értékeket tartalmaznak, csak az ábrázolást segítik.

A további elemzésekbe csak azokat a nemzetségeket (genusokat) vontuk be, amelyek genomja mindegyik mintában legalább 0,5%-os részarányban jelen van a teljes bakteriomon belül. Az életkor, a takarmányösszetevők és a magbakteriom baktériumgenus-részarányainak összefüggésének számszerűsítésére lineáris regressziót alkalmaztunk. Azonban csak a becslést és annak standard hibáját mutatjuk be a kis mintaelemszám miatt. A kocák csoportját alkotó sertések életkora jóval heterogénebb a többi csoporthoz képest, ezért őket kihagytuk az életkorral való összefüggések elemzéséből. Fontos kiemelni továbbá, hogy a takarmányalkotók közül csak azok hatását vizsgáltuk, amelyek mindegyik takarmányban jelen voltak (tritikálé, takarmánykukorica, takarmányárpa, szója).

## 4. Eredmények

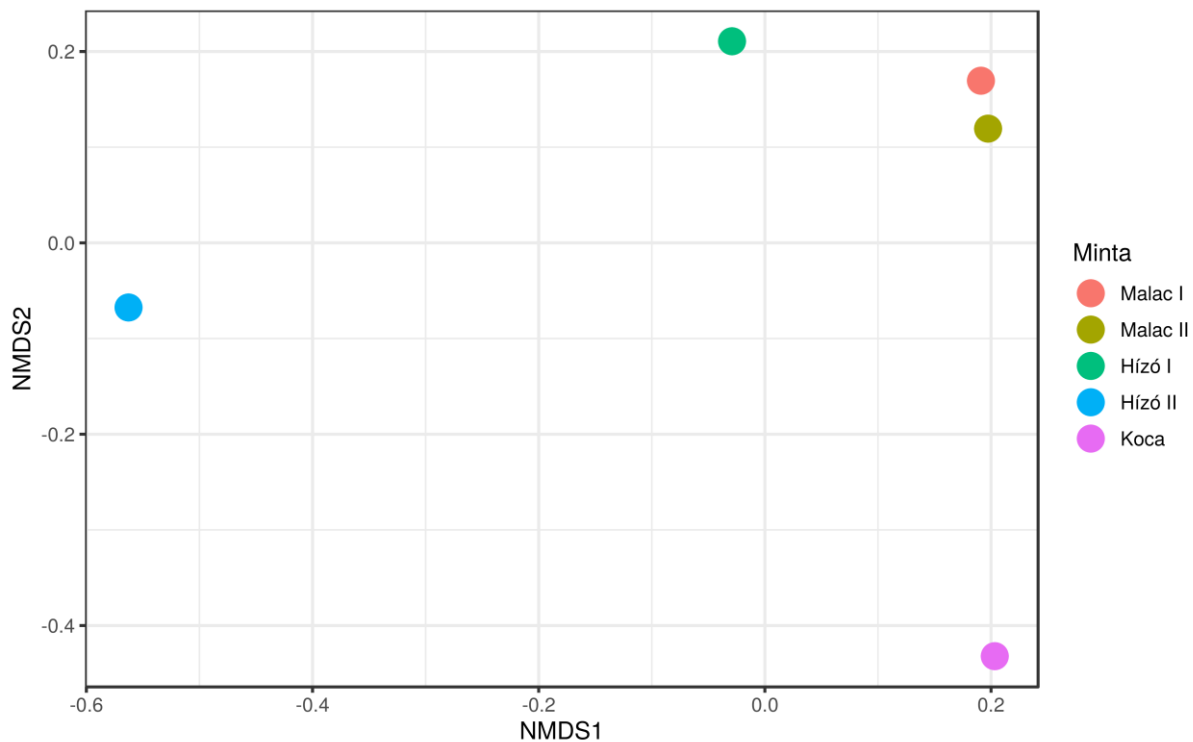
A fenti módon nyert readek átlagos hossza 250 bázis volt. Ezeket a 4. táblázatban takarmányozási csoportonként osztályoztuk, különböztöttük a mintánként leolvasott nyers és a taxonklasszifikált readek számát, valamint megadtuk a taxondiverzitás értékét és a Shannon-indexet.

4. táblázat A csoportonként leolvasott nyers és klasszifikált readek száma, a meghatározott taxonszám és Shannon-index (Papp et al., 2020)

Minta	Readok száma		$\alpha$ -diverzitás	
	nyers	klasszifikált	taxonszám	Shannon-index
Malac I.	565 803	53 720	374	3,67
Malac II.	256 397	23 374	385	3,82
Hízó I.	567 346	42 743	504	4,01
Hízó II.	659 530	48 298	663	4,22
Koca	214 014	20 975	414	3,49

A Hízó II. csoportban kaptuk a legtöbb nyers readet, és a legmagasabb taxonszámot. Ezzel szemben a klasszifikált read-ek száma a Malac I. csoportban mutatta a legmagasabb értéket. Folyamatos növekedést láthatunk a taxonszámokat és a Shannon-indexet tartalmazó oszlopban.

A taxondiverzitás szerinti távolságokat mutatja az 1. ábra, amelyet az NMDS által végzett dimenzióredukcióval készítettünk.

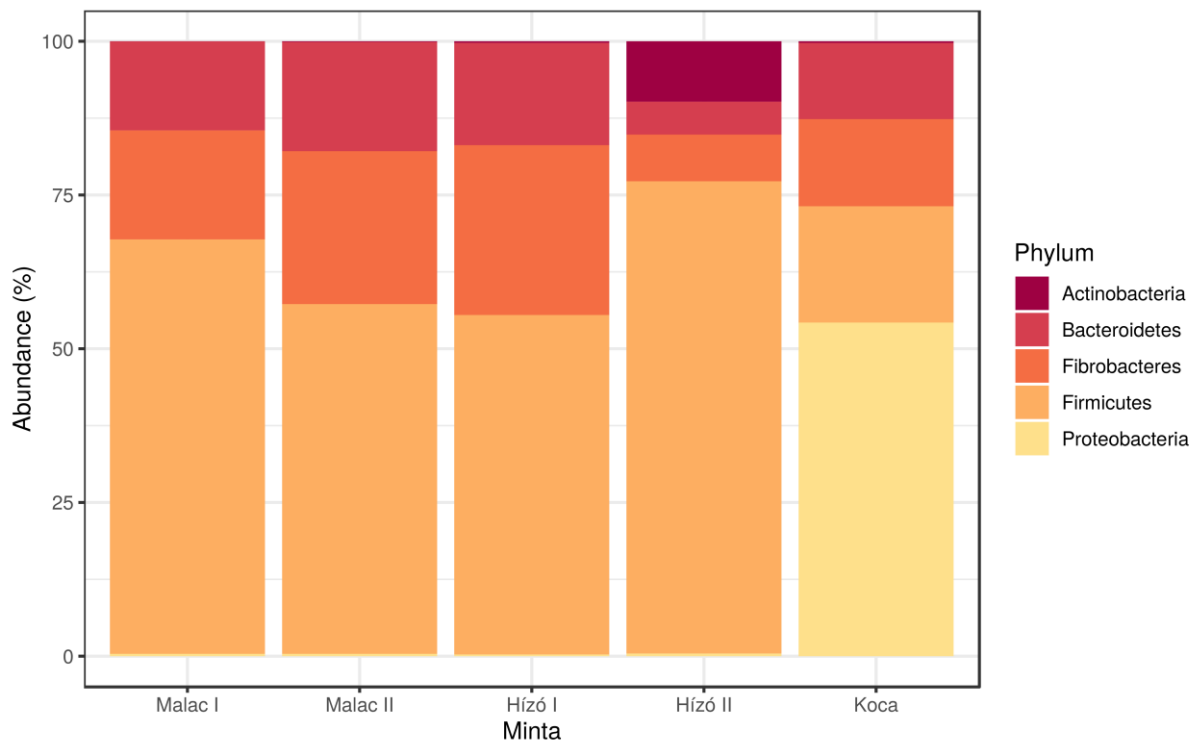


1. ábra Az egyes csoportokból kapott minták baktériumfaj-összetételének hasonlóságai NMDS módszerrel ábrázolva kétdimenziós koordináta rendszerben. A tengelyen lévő értékek önmagukban nem értelmezhetők, csak az ábrázolást segítik (Papp et al., 2020)

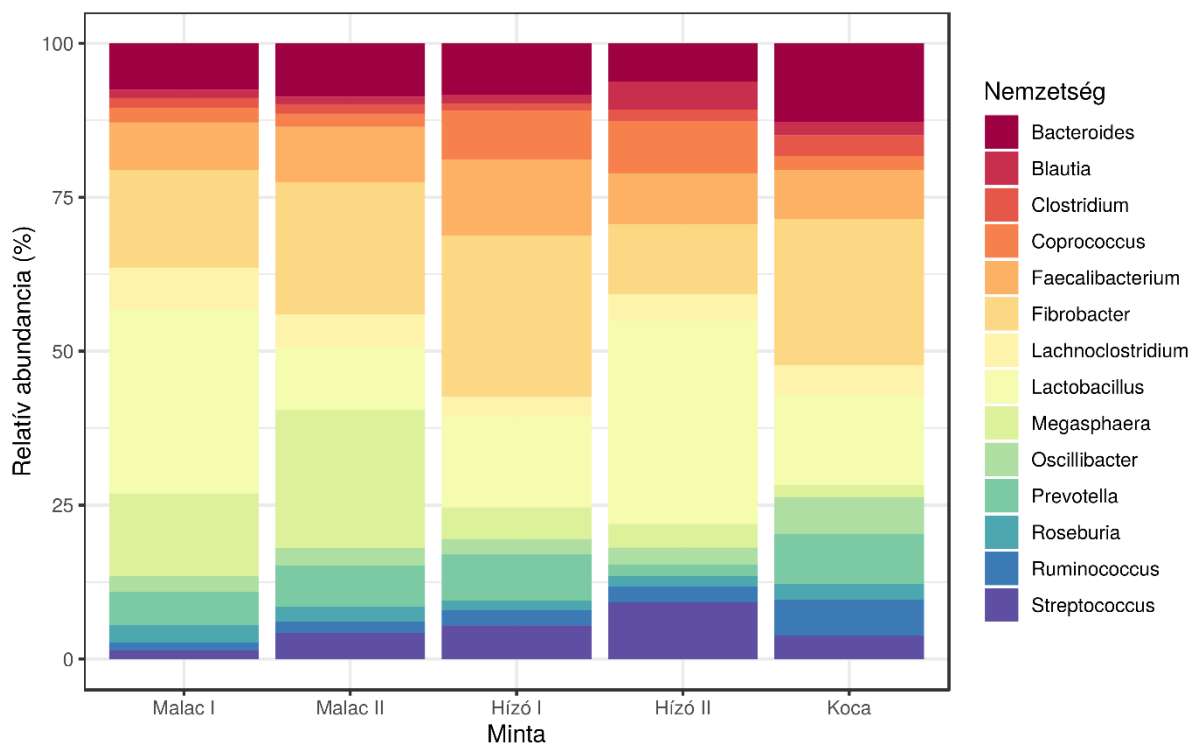
Az ábráról leolvashatjuk, hogy a Malac I. és Malac II. csoportok nagyon közel vannak egymáshoz, ez nagyon hasonló taxonösszetételre utal. Láthatjuk azonban, hogy ahogy a csoportok életkorban távolodnak, úgy egyre jobban szétszóródnak a rendszerben az azt jelölő pontok. A legnagyobb különbséget a Hízó II. csoport adja, mind a vízszintes, mind pedig a függőleges tengely alapján egyaránt. A kocák ennek ellenére a vízszintes tengelyen majdnem egy ponton helyezkednek el a Malac I. és II. csoportokkal, viszont a függőleges tengelyen itt a legnagyobb a távolság az összes többi mintához viszonyítva.

Öt baktériumtörzset, ezen belül pedig tizennégy baktérium nemzetséget sikerült beazonosítani, amelyek mind az öt takarmányozási csoportban jelen vannak. Azok egyes részarányai (abundanciái) eltérőek, aminek mértékét a 2. és 3. ábra szemlélteti.





2. ábra *A magbakteriom csoportonkénti törzsszintű relatív részarányai (Papp et al., 2020)*



3. ábra *A magbakteriom csoportonkénti nemzetségszintű relatív részarányai (Papp et al., 2020)*

Összevetettük a magbakteriom részét képező nemzetségeket a fő takarmányalkotókkal (az árpával, tritikálével, kukoricával és a szójával), amellyel azt vizsgáltuk, hogy az adott összetevők hogyan befolyásolják az egyes baktériumok mennyiségét. Az eredményeket az 5. táblázatban láthatjuk.

5. táblázat A nemzetségek részarányainak összefüggései az egyes takarmány-összetevőkkel és az állatok korával. A  $\beta$ - együtthatók az adott takarmányösszetevők és az életkor egy egységgel történő emelkedésekor tapasztalható változásokat fejezik ki az egyes nemzetségek abundanciájában, míg az SE azok standard hibáját jelöli. (Papp et al., 2020)

Nemzetség	Árpa	Tritikálé	Kukorica	Szója	Életkor
	$\beta$ SE	$\beta$ SE	$\beta$ SE	$\beta$ SE	$\beta$ SE
<i>Bacteroides</i>	-0,00197	0,00222	-0,00106	-0,00195	-0,00115
	0,00238	0,00249	0,00168	0,00402	0,00099
<i>Blautia</i>	0,00177	-0,00165	0,00029	-0,00315	0,00232
	0,00113	0,00131	0,00102	0,00159	0,00095
<i>Clostridium</i>	0,00016	0,00026	-0,00054	-0,00172	0,00016
	0,00089	0,00094	0,00052	0,00101	0,00035
<i>Coprococcus</i>	0,00033	-0,00499	0,00354	-0,00141	0,00506
	0,00345	0,00229	0,00115	0,00542	0,00164
<i>Faecalibacterium</i>	-0,00221	-0,00069	0,00209	0,00233	0,00069
	0,00159	0,00213	0,00068	0,00294	0,00235
<i>Fibrobacter</i>	-0,00905	0,00466	0,00199	0,00471	-0,00305
	0,00381	0,00633	0,00423	0,00988	0,00715
<i>Lachnoclostridium</i>	0,00063	0,00093	-0,00143	0,00111	-0,00189
	0,00141	0,00146	0,00055	0,00222	0,00123
<i>Lactobacillus</i>	0,00890	-0,01449	-0,00010	-0,00242	0,00553
	0,00967	0,00810	0,00743	0,01730	0,01228
<i>Megasphaera</i>	0,00334	0,01229	-0,00476	0,01108	-0,01046
	0,00890	0,00659	0,00553	0,01293	0,00662
<i>Oscillibacter</i>	-0,00038	0,00074	-0,00079	-0,00253	0,00002
	0,00159	0,00165	0,00099	0,00208	0,00018
<i>Prevotella</i>	-0,00359	0,00255	-0,00013	0,00231	-0,00244
	0,00160	0,00237	0,00178	0,00393	0,00226

---

<i>Roseburia</i>	-0,00002	0,00058	-0,00062	0,00035	-0,00087
	0,00060	0,00054	0,00019	0,00093	0,00033
<i>Ruminococcus</i>	-0,00060	0,00027	-0,00033	-0,00340	0,00086
	0,00187	0,00201	0,00127	0,00228	0,00028
<i>Streptococcus</i>	0,00269	-0,00267	0,00185	-0,00530	0,00521
	0,00266	0,00289	0,00179	0,00380	0,00072

---

## 5. Megbeszélés

Az összefüggések megértése érdekében ismertetem az egyes baktérium nemzetségek alapvető tulajdonságait.

A *Bacteroides* nemzetségbe Gram-negatív, obligát anaerob, pálcika alakú baktériumok tartoznak. Megtalálhatók az állatok nyálkahártyáin, többek között az emésztőcsatornában, amelynek természetes lakói. Fakultatív patogén mikroorganizmusok, valamilyen hajlamosító tényező, például a nyálkahártya sérülésének következtében okozhatnak megbetegedést, nyálkahártya elhalását, tályogosodását, esetleg méhgyulladást. Jellemző képviselője a *Bacteroides fragilis* (Varga et al., 1999).

A *Blautia* nemzetség fajai Gram-pozitívak, anaerob körülményeket szükségelnek. Acetátot és szukcinátot állítanak elő, amik fontos energiaforrások a vastagbél számára (Liu et al., 2008). Egy humán tanulmány érdekes megfigyelést tett ezzel a nemzetséggel kapcsolatban. Csonvelő transzplantáción átesett betegek székletmintáit vizsgálták 16S rRNS szekvenálással, és vetették össze a graft-versus host disease (röviden GVHD) okozta elhalálozás mértékével. A GVHD gyakori betegség az ilyen beavatkozásokon átesettek körében, lényegében a donor csontvelő sejtjei immunválaszt indítanak a recipiens sejtjei ellen, ami a szervezetet súlyosan károsítja. Ebben a tanulmányban azt tapasztalták, hogy amely betegek bélcsatornájában nagyobb mennyiségű *Blautia* volt található, ott kisebb volt az elhalálozás esélye. Ez a *Blautia* jótékony gyulladásgátló hatásával hozható összefüggésbe (Jenq et al., 2016).

A Clostridiumok Gram-pozitív, anaerob, spórával rendelkező baktériumok. Természetes lakói a talajnak, az emberek és állatok bélcsatornájának. Többségük szaprofita, de találunk közöttük fakultatív patogén kórokozókat is. Csak akkor okoznak betegséget, ha a bélcsatornából a szövetek közé jutnak, onnan a toxinjaik felszívódnak, ugyanis exotoxinokat és extracelluláris enzimeket termelnek. Számos faja különféle kórképeket képes előidézni, ezek három nagy csoportja a gázödémás, az enterotoxémiás és az intoxikációs megbetegedések. Sertésekben főleg a *Clostridium tetani* okozta tetanusz, a *Clostridium botulinum* okozta botulizmus, valamint az enterotoxémiák közül a *Clostridium perfringens* fordul elő, ami az újszülött malacok fertőző elhalásos bélgyulladását idézi elő. A gázödémák csoportjába tartozó kórképek közül továbbá a Köves betegség jellemző a sertésekre, amit a *Clostridium septicum* okoz, a gyomor nyálkahártya vérzésével és hirtelen elhullással jár (Medveczky et al., 1998, Varga et al., 2018).

A *Coprococcus* nemzetség azon Gram-pozitív, anaerob fajokat foglalja magába, amelyek aktívan fermentálják a szénhidrátokat. Főbb fermentációs termékei a vajsav, hangyasav, ecetsav és a propionsav (Holdeman et al., 1974).

A *Faecalibacterium* szintén Gram-pozitív, anaerob mikroorganizmusok csoportja. Egyetlen képviselője a *Faecalibacterium prausnitzii*. Számos állatfaj bélflórájának és ürülékének egyik leggyakoribb alkotója. A bélben ők is butirátot és rövid szénláncú zsírsavakat termelnek, amelyek energiát biztosítanak a vastagbél hámsejtjeinek. Gyulladásgátló és immunmoduláló hatással rendelkeznek (Wang et al., 2014). Ennek bizonyítására Wang és munkatársai (2014) ulceratív colitisben és Crohn betegségben szenvedő emberek székletmintáit és bélnyálkahártyából vett biopsziáit vizsgálták. Mindkettő a bélrendszert érintő gyulladásos kórkép, az ulceratív colitisben (fekélyes vastagbélgyulladás) a vastag- és végbél felületes rétege, míg a Crohn-betegségben a bélrendszer bármely szakasza és a mélyebb rétegek érintettek. Azt tapasztalták, hogy az aktív Crohn- és fekélyes vastagbélgyulladásban szenvedő betegek mintái kevesebb *Faecalibacterium prausnitzii* tartalmaztak a kontroll csoport mintáihoz képest.

A *Lactobacillus*ok Gram-pozitív, aerotoleráns anaerob vagy mikroaerofil, spóráképző baktériumok. A tejsavbaktériumok közé tartoznak, mivel a hexóz homofermentatív metabolizmusa révén tejsavat állítanak elő. Egy másik út során pedig ezt a cukormolekulát tejsavvá, szén-dioxidá, ecetsavvá, illetve hangyasavvá alakítják, ezt nevezzük heterofermentatív metabolizmusnak. A vékony- és vastagbél, illetve a hüvely nyálkahártyájának természetes lakói (Kandler, 1983). A nemzetség számos pozitív hatással rendelkezik, többek között felel a bélflóra stabilitásáért, bizonyos mértékben részt vesz a kórokozókkal szembeni védelemben, a koleszterinszint csökkentésében és immunstimuláló szereppel is bírhat (Elmer et al., 1996). Egyes *Lactobacillus* fajokat probiotikumok összetevőjeként alkalmaznak a bélflóra egyensúlyának helyreállítása céljából, főként a *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bifidus*, *Lactobacillus casei* és *Lactobacillus lactis*. A sertéságazatban széles körben használják a vemhes és szoptató kocák, valamint a fiatalabb sertések egészségének javítására is. Megakadályozzák a patogén baktériumok (például *Escherichia coli*, Clostridiumok, Salmonellák) elszaporodását, hozamfokozó hatásként növelik a súlygyarapodást és a takarmányértékesítést, és a hasmenéses megbetegedések előfordulása is csökkenhet. Egyes alkotói vitaminokat és növekedési faktorokat is termelnek (Andrásófszky et al., 2009).

A *Megasphaera* nemzetséghez Gram-negatív, anaerob, spórázásra képes baktériumok tartoznak. A *Firmicutes* törzsbe tartozó nemzetség a sertés bélflóra természetes tagja. A

*Megasphera eldenii* szintén rövid szénláncú zsírsavakat állít elő a bélben, így energiaforrást biztosít a szervezet számára és fontos szerepet játszik a bél egészségében (Yoshikawa et al., 2018).

Az *Oscillibacter* nemzetség tagjai Gram-negatív, anaerob mikroorganizmusok. Különböző állatok, illetve az ember bélsatornájának lakói. Az *Oscillibacter valericigenes* nevű fajtát például a japán *Corbicula* kagyló tápcsatornájából izolálták (Iino et al., 2007).

A *Prevotella* nemzetséget Gram-negatív, anaerob baktériumok alkotják. A *Bacteroidetes* törzs részét képezi. A száj, a hüvely, illetve a bél flórájának természetes tagja. Fermentáció révén biztosít energiát, fő termékei a szukcinát és a valerát. A több rostot fogyasztó állatok és emberek bélsatornájában nagyobb számban fordul elő. Filippo és munkatársai is vizsgálták 2010-ben, különböző étrendű gyermekeken végzett kutatásaik alapján. Afrikában nagyobb rosttartalmú ételeket fogyasztanak Európához képest, ezért az itt élők mikrobiótáját hasonlították össze a 16S rRNS gén szekvenálásával. Az afrikai gyermekek mintájában jóval nagyobb arányban mutatták ki a *Prevotella* baktériumokat, ugyanis a bakteriom 53%-át tette ki (Filippo et al., 2010). A *Prevotella* nemzetség tagjai fajtól függően különböző gyulladással megbetegedéseket okoznak, nem csak a bélben, hanem a légutakban, szájban, húgyutakban. De sertések esetében patogén hatásuk jelenleg nem ismert.

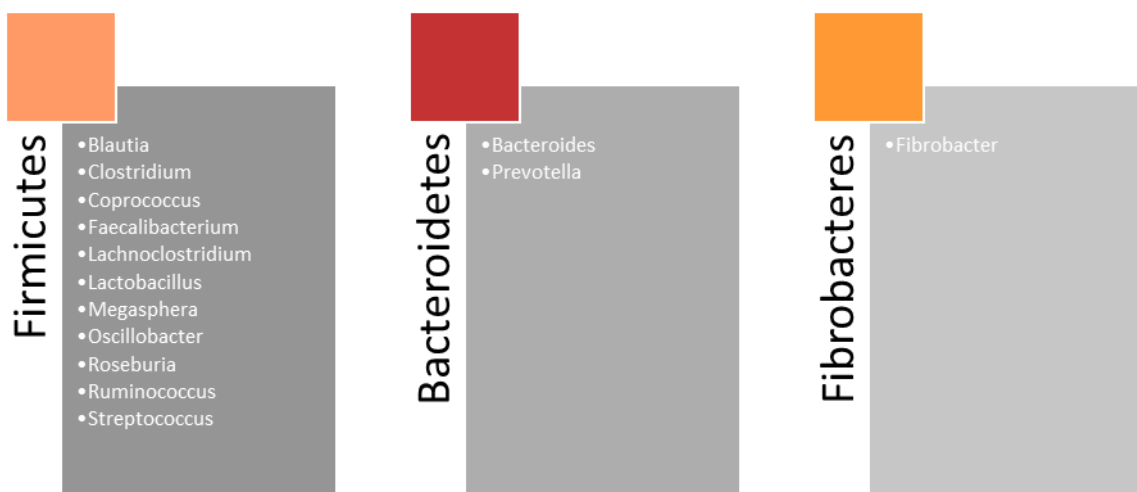
A *Roseburia* Gram-pozitív, anaerob baktériumok nemzetsége. Normál körülmények között jelen vannak a vastagbélben. Itt a szénhidrátok lebontásával butirátot termelnek, így energiát biztosítanak a bélhámsejtek számára (Scott et al., 2008).

A *Ruminococcus* nemzetség a *Clostridia* osztályba tartozik, tagjai Gram-pozitív, anaerob mikroorganizmusok. Az állatok bélrendszerének lakói. A sertések vak-, és vastagbélben képesek a cellulózt lebontani, így a rostemésztésben játszanak szerepet. A kérődzőkben a sertésekhez képest még a bendőben is megtalálhatók *Ruminococcus* és egyéb cellulózbontó baktériumok, ezért ők sokkal több nyersrostot tudnak hasznosítani (Bokori et al., 2003). A nemzetségből a *Ruminococcus albus* és a *Ruminococcus flavefaciens* a jellemző fajok.

A *Streptococcus*ok szintén Gram-pozitív, aerob, illetve fakultatív anaerob baktériumok. Széles körben elterjedtek, jelen vannak az állatok emésztőrendszerében, szájüregben, légutakban, húgy- és nemiutakban, valamint a bőrön is. Egyes fajai szaprofiták, nem okoznak megbetegedést, mások azonban fakultatív patogének, tehát hajlamosító tényezők hatására kóros elváltozásokat idézhetnek elő. Gennyesedéssel járó helyi és generalizált folyamatok alakulhatnak ki, főként méhgyulladás, ízületgyulladás, tüdőgyulladás, illetve a véráramba törve szepszisz (Medveczky et al., 1998). A bélrendszerben található fajok főleg a *Streptococcus hyointestinalis*, a *Streptococcus bovis*, és a *Streptococcus suis*. Viszont a *Streptococcus suis*

predilekciós helye a sertések tonsillája, ahol valamilyen hajlamosító tényező hatására elszaporodhat, szeptikémiát, pneumóniát, arthritist és meningoencephalopathiát okozhat. A *Streptococcus bovis* véráramba jutva pedig endocarditishez vezethet. A Streptococcusokat a sejtfalukban lévő poliszacharid antigénjeik alapján csoportokba sorolhatjuk. Először Lancefield vizsgálta ilyen szempontból ezeket a baktériumokat, így a csoportok is róla kapták a nevüket, Lancefield A-D. Az eddig megnevezett fajok a Lancefield D csoportba tartoznak, és az Enterococcusokat is korábban ide sorolták. Közülük az *Enterococcus faecalis* és az *Enterococcus faecium* az állatok bélcsatornájának természetes lakói. Szaprofiták, de alkalmanként szívbelhártyagyulladást és tályoglépződést idézhetnek elő a gyengébb szervezetekben (Medveczky et al., 1998).

A fent említett baktériumok törzsbeli hovatartozását a 4. ábrában foglaltam össze, ahonnan leolvashatjuk, hogy a legdominánsabb csoport a *Firmicutes*.



4. ábra A nemzetségek törzsek szerinti megoszlása (saját ábra)

Az előző ábrából kimaradt két törzset is fontos megemlíteni, mivel nemzetség szinten nem jellemeztük őket. Főként azon nemzetségeket és fajokat ismertetem röviden, amelyek a bélmikrobiom részét képezhetik. Az egyik ilyen phylum az *Actinobacteria*, gram-pozitív baktériumok alkotják. Kisebb részét teszik ki a bélflórának, de nagy szerepet játszanak a bél homeosztázisának felépítésében, megtartásában. Számos nemzetséget sorolnak az *Actinobacteria* törzsbé, például *Bifidobacterium*, *Corynebacterium*, *Actinomyces*, *Mycobacterium* (Barka et al., 2016).

A *Mycobacterium*ok a külvilágban, talajban, valamint az élőlények bélrendszerében élnek. Találunk közöttük szaprofita és fakultatív patogén fajokat, amelyek az állatok

gümőkórját idézik elő. Sertésekben (*Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis*) kezdetben ezek főleg bélben, nyirokcsomókban, bélfodorban okoznak helyi elváltozásokat, valamint jellemzőek szaprofita fajok is (*Mycobacterium phlei*, *Mycobacterium smegmatis*) (Varga et al., 1999).

A Bifidobacteriumok természetes alkotói a gyomor- és bélrendszernek, illetve a hüvelynek. Kis számban vannak jelen, ennek ellenére létfontosságúak az egészséges emésztőrendszer fenntartásában. A szénhidrátok lebontásában van szerepük. Emberekben leírták immunmoduláló, hasmenést megelőző, illetve laktóz intoleranciát enyhítő hatását (Schell et al., 2002). Probiotikumok összetevőjeként is használják, ugyanis fenntartja a bélrendszer egyensúlyát, gátolja a káros mikroorganizmusok megtelepedését, serkenti az immunválasz kialakulását, valamint vitaminok előállításához is hozzájárulhat (Mayo et al., 2010). Sertésekben jellemző *Bifidobacterium* fajok például a *Bifidobacterium suis*, *Bifidobacterium thermacidophilum*.

Az *Actinomyces* és a *Corynebacterium* főként nem a gastrointestinalis rendszerben találhatóak meg, hanem a szervezet más nyálkahártyáin. Az *Actinomyces* a száj, - és garatnyálkahártya flórájának tagja, míg a *Corynebacterium* különböző fajai inkább a húgyhólyagban, vesemedencében, nyirokcsomókban képesek megtelepedni és súlyos elváltozásokat okozni (Varga et al., 1999).

A másik phylum, amelynek nemzetségeit nem említettük, a *Proteobacteria*, a Gram-negatív baktériumok szintén számos nemzetséget alkotnak, amelyet sok ismert patogén kórokozó alkot. Ezek közül a sertéstenyésztésben jellemzőbb, valamint komolyabb problémákat okozó nemzetségek az *Escherichia*, *Salmonella*, *Bordetella*, *Brucella*, valamint a *Campylobacter*.

Az *Escherichia coli* természetes körülmények között megtalálható az állatok bélrendszerében, főként a vastagbélben. Fakultatív anaerob baktériumok, főleg fiatal, újszülött állatokat betegítenek meg, valamilyen hajlamosító tényező hatására, fejletlen immunrendszer esetén. Az enterotoxikus *Escherichia coli* (*E. coli*) törzsek exotoxinjaik révén okozhatnak sertésekben hasmenéssel járó kórképeket, mivel a bél lumenében jelentős folyadékbeáramlást idéznek elő. Az élet első tíz napjában alakulhat ki az újszülött malacok coli-hasmenése, főleg nagyüzemekben előhasi kocák malacainál jelentkezik sárgás hasmenés és kiszáradás formájában. Ugyanakkor a választással járó stressz is kiválthatja, ilyenkor a választott malacok coli-hasmenéséről beszélünk. A verotoxikus *E. coli* törzsek toxinja szintén a bélből szívódik fel, és sertésekben a vérerek károsítása révén testszerte ödémát okoz. Jellemzően a választás utáni fejlettebb egyedeket érinti (Medveczky et al., 1998).



A Salmonellák legtöbb alfaja szintén fakultatív patogén kórokozó. Lehet ez egy tünetekben nem megnyilvánuló fertőzöttség, vagyis az állat csak hordozó, viszont így az emberbe jutva bélgyulladást, esetleg szeptikémiát idéz elő. A klinikai tünetekkel járó fertőzés állatokban a paratífusz, amely sertésekben három kórkép formájában jelentkezhet. A növendék, illetve felnőtt egyedekben a *Salmonella typhisuis* okozza a bélnyálkahártya fekélyével és elhalásával járó sertéstífuszt. A pár hónapos malacok paratífuszának kialakulásában több alfaj is részt vehet, a *Salmonella choleraesuis*, a *Salmonella typhimurium*, a *Salmonella enteritidis*, valamint a *Salmonella derby*. Ez a sertéstífuszhoz képest egy akutabban jelentkező gyomor- és bélgyulladás, hasmenés és a bőr cianózisa a jellemző tünetek. A *Salmonella typhimurium* pedig a hízók typhlocolitisét váltja ki, ami viszont egy zoonotikus kórokozó is. Nekrotikus enterocolitist okoz, véres, nyálkás hasmenésként mutatkozik meg. Ez egy enyhébb, de gyakoribb formája a sertések salmonellosisának (Varga et al., 1999).

A *Campylobacter* nemzetség fajai között vannak fakultatív patogének, illetve szaprofiták is. A *Campylobacter coli* és a *Campylobacter jejuni* az állatok bélfloájának természetes alkotója. Az állatok bélsarával ürülve, vagy élelmiszerek által az emberbe jutva bennük megbetegedést okoznak. Ugyanakkor egyes állatokban kiválthatnak különböző kórképeket, például szarvasmarhákban vetélést, kutyákban, macskákban, juhokban pedig hasmenést. A sertések vékonybelében megtalálható még a *Campylobacter mucosalis*, *Campylobacter hyoilei* és a *Campylobacter hyointestinalis*, amelyek elszaporodva bélgyulladásokhoz társulhatnak (Varga et al., 1999).

## 5.1. Diverzitás

Az 5. táblázatban láthatjuk, hogy az életkor tekintetében is milyen jelentős változások vannak a bakteriom összetételében. Sokan foglalkoztak ennek feltérképezésével, azonban a szakirodalomban több eltérő eredmény is megtalálható. Japánban embereken végzett vizsgálatok is hasonló eredményt mutattak, amelyben szintén a Shannon-indexet használták, mint diverzitás-metrika. Ők is folyamatosan növekvő tendenciát kaptak, ez körülbelül 20 éves korban állandósult, majd idősebb korban újabb emelkedés volt megfigyelhető (Perez-Mun et al., 2017). Ugyanakkor egy másik kísérletben azt tapasztalták, hogy az életkor növekedésével a taxonok száma is emelkedett (Xiao et al., 2016). A rendszertani csoportok száma és a diverzitás közötti összefüggés viszont eltérhet egymástól, mivel a diverzitás nem csak a fajok számát, hanem azok relatív gyakoriságát is jellemzi (Kim et al., 2015).

A sertések tanulmányozása különösen számottevő irány, mindamellett, hogy az állattenyésztésben igen nagy a jelentősége, széles körben alkalmazzák humán vizsgálatok orvosbiológiai modell állataként. Ilyen terület például az atherosclerosis, a szívinfarktus, az elhízás, az asztma, a melanoma és még számos betegség vizsgálata. Ezért lényeges az embereken és a sertéseken elvégzett elemzések összehasonlítása (Lunney, 2007). Genom szinten is nagymértékű az egyezés, mind a szekvencia, mind pedig a kromoszóma felépítésében. Ezt egy humán tanulmánnyal igazolták, amelyben 96%-os hasonlóságot találtak a humán, illetve a sertések bélmikrobiomjának funkcionális útvonalai között (Wooley et al., 2010).

A sertéseken végzett vizsgálatok egy nagy különbsége az embereken végzettekhez képest, hogy azok általában a biológiailag lehetségesnél rövidebb ideig élnek. A termelésben részt vevő sertéseket 180 napos koruk körül vágják le, ugyanakkor akár tíz évig is képesek életben maradni. Ezért nehezebb a diverzitás-változások adatait a humán eredményekkel összevetni. Ennek érdekében törpemalacok mikrobiomját elemezték 0-10 éves korig. A diverzitás mértékének emelkedését tapasztalták 20 hetes korukig, majd enyhe ingadozással, de stabilizálódott. A vizsgálatokhoz a Shannon-indexet és a Chao1-et használták (Liu H. et al., 2019).

Az 1. táblázatban a csoportonkénti diverzitás mértékét láthatjuk, amelyből kiolvasható, hogy a kocáknál (vemhes állatok) a legalacsonyabb a Shannon-diverzitás-index, illetve a taxonszám is alacsonyabb a felnőtt sertésekhez képest.

Többen is vizsgálták, hogy a vemhesség és a laktáció alatt hogyan változik a bélmikrobiom összetétele, mely során különféle eredmények születtek. Liu és munkatársai két fajtából származó kocákat vizsgált, azt tapasztalták, hogy a bélmikrobiom közel stabil maradt a vemhesség során. Csupán a *Coriobacteriaceae* relatív gyakorisága növekedett mindkét fajtában, illetve az *Escherichia coli* csak az egyik fajtában (Liu et al., 2019). Viszont Ji és munkatársai (2006) arra az eredményre jutottak, hogy a vemhesség előrehaladtával a mikrobiom diverzitása is fokozatosan emelkedik. Ebből kifolyólag fontos megemlíteni, hogy a mikroorganizmusok diverzitását nagyon sok tényező befolyásolhatja, például a takarmányozás, a környezet, a stressz, különböző fertőzések, gyógyszerek. Ehhez kapcsolódóan vizsgálatokat végeztek enterotoxikus *Escherichia coli* törzsekkel fertőzött sertéken, ahol megállapították, hogy azok bélmikrobiomjának diverzitása alacsonyabb volt, mint az egészséges malacoké. Bin és munkatársai (2018) is Shannon-indexet használtak. Azért is fontos ezeknek a változásoknak a vizsgálata, mert a sertésenyésztésben a fő halálozási ok a hasmenés. Ez egy multifaktoriális

betegség ugyan, tehát számos kórokozó és környezeti, takarmányozási tényező vezethet hozzá, de az enterotoxikus *Escherichia colit* tekinthetjük a legfontosabb okozójának.

Egy másik tanulmányban antibiotikumok hatását vizsgálták a mikrobiom változására. Egereknek per os (szájon át) adtak vankomicint, majd azt az eredményt kapták, hogy ez a glükopeptid antibiotikum csökkentette a Shannon-index által kifejezett diverzitást (Tilman et al., 1997).

Ezen tényezők mellett az is befolyásolhatta a kocák diverzitásának ilyen nagymértékű eltérését a többi csoporttól, hogy az állatok életkora igen különböző volt (3,2 +/- 1 év), esetükben a pontos életkor hatását nem ismertük. Tehát a látott diverzitás-csökkenést számos más körülmény is eredményezhette, ami jelzi, hogy a bélmikrobiom összetételére rengeteg tényező hatással van, ezért a csökkenés okának meghatározására további vizsgálatok lennének szükségesek.

## 5.2. Baktériumfajok változásai csoportonként

A fajszintű változások tanulmányozása és megértése sokkal lényegesebb a diverzitásnál, különösen azoknak, amelyek az állat szervezetének és a bél mikrobiomjának kapcsolatára lehetnek hatással. A diverzitás csak a mikroorganizmusok közösségének komplexitásáról ad információt, viszont nem feltétlenül tájékoztat az apróbb részletekről. Az NMDS dimenzióredukció (1. ábra) eredménye is jól jól jelzi a fajszintű összetétel változását. Láthatjuk, hogy a Malac I. és Malac II. csoportok mind a vízszintes, mind pedig a függőleges tengelyen közel helyezkednek egymáshoz, ami a két minta mikrobiomjának faji összetételének hasonlóságára utal. Távolabb foglal helyet a Hízó I., és vízszintesen attól sokkal messzebb a Hízó II. A kocákat jelölő lila pontot a Malac I. és Malac II. csoportokkal a vízszintes tengelyt nézve közel azonos helyen találjuk, viszont a függőlegesen nagyon távolra került tőlük, sőt az összes többi ponttól. Ez adódhat a kocák életkorában történő nagy ugrás miatt is, ugyanis náluk nem tudunk pontos értéket. A kikötés a mintavétel során csupán annyi volt, hogy a fialás 5 napon belül történjen meg. A fenti eredményekből arra következtethetünk, hogy a vizsgálatunkban az életkor előrehaladtával folyamatosan változik a bakteriom összetétele.

A Malac I. csoport tagjai már jóval a választás után vannak, ugyanis ez az időszak általában a születést követő 28. napra esik. Sajnos elemzésünkben nem térünk ki a szopós és választás körüli malacok vizsgálatára, ugyanakkor nagyon fontosnak tartom, hogy erről a kritikus pontról is említést tegyünk. Már fentebb tárgyaltuk, hogy a választás több szempontból is stresszt jelent a malac számára. Először is át kell térniük az anyatejről a szilárd és önálló táplálkozásra, megszakad az anya és a malac közti fizikai kontaktus, új környezet és új társak

jelennek meg. Ez a stressz hatással van az állat szervezetére is, például a bélbolyhok megrövidülnek, az emésztőenzimek aktivitása csökken, a gyomor-és béltartalom pH növekszik. Ezáltal romlik a táplálék emésztése és felszívódása, majd ezek a hatások vezetnek a bélflóra összetételének megváltozásához, káros baktériumok elszaporodásához (Andrásosfzky et al., 2009). Mindezek miatt, ha a választási folyamatok a sertés életében nem megfelelően mennek végbe, az növelheti a hasmenéses malacok számát, a korai elhalálozást, csökkentheti a testtömeg-gyarapodást, ami a sertésstenyésztés számára komoly veszteségeket jelent.

Többek között Wang és munkatársai (2020) is vizsgálták a választás körüli időszakot. Azt tapasztalták, hogy a *Lactobacillus*ok jelentős növekedése a 27. nap körül következett, majd ezután indult csökkenésnek. Ez feltehetően a tejről a szilárd takarmányra való átállás következtében alakult így. Ezzel párhuzamosan az *Escherichia coli* is emelkedhet, ugyanis a *Lactobacillus*ok szerepet játszanak a patogén kórokozók elszaporodásának megakadályozásában.

Summers és munkatársai (2019) is a választás és az az előtti időszakot tanulmányozták. Az élet első napjától kezdve folyamatos és viszonylag egyenletes növekedést tapasztaltak a malacok bélsarában található mikrobiom diverzításában és gazdagságában. Wang és munkatársai (2020) például az *Escherichia coli* jelenlétét és nagy gyakoriságát már napos kortól megfigyelték, de vizsgálatukban 11 hetes korra majdnem teljes mértékben eltűntek. Írnak még a *Streptococcus luteciae* 6 hetes kor körüli felbukkanásáról, amely az egyes általuk vizsgált csoportokban végig hasonló gyakorisággal mutatkozott. A mi eredményeinkben ehhez képest a *Streptococcus* genus enyhe emelkedését láthatjuk egészen a Hízó II. csoportig, utána a kocákban visszaesett a relatív mennyiségük.

A 3. ábra Malac I. csoportja tehát jóval a választás utáni 8 hetes sertések adatait mutatja. A skálán láthatjuk, hogy a legnagyobb részt a *Lactobacillus*ok képviselik. Sőt egy másik tanulmányban leírták, hogy ennek a nemzetségnek a jelentős növekedése 27 napos kor körül következett be, majd innentől indult csökkenésnek, amit a Malac I. és a Malac II. csoportok között már láthatunk is (3. ábra) (Wang et al., 2020). Ezek az eredmények azt is sugallhatják, hogy a *Lactobacillus*ok számának csökkenése a tejről a szilárd takarmányra való átálláshoz, tehát akár a választáshoz köthető. (A 7-8 hetes malacok 13-15 kg körüli testtömeggel rendelkeznek ideálisan, ebben a korban térnek át a starter tápról a nevelőtáp etetésére. Ez a táp búzát, árpát, kukoricát és szóját tartalmaz legnagyobb részt, és már nagyobb nyersfehérje-, lizin- és metionin-tartalommal rendelkezik.)

A Malac II. csoport oszlopát vizsgálva azt tapasztaljuk, hogy a *Megasphaera* nemzetség emelkedett a 3 héttel fiatalabb sertésekhez képest, viszont a Hízó I. csoportban már lecsökkent.

Egy másik tanulmány is hasonlóképp tapasztalta, Wang és munkatársai (2014) 5 és fél hónapos kor körül látták ezt a visszaesést. Tehát ez alapján azt gondolhatjuk, hogy ennek az oka a malactápról a hízótápra való áttérés lehet. Ennek a nemzetségnek a jelenléte mindenképpen kedvező, hiszen a rövid szénláncú zsírsavak előállítására révén energiát biztosít a bélhámsejtek és a szervezet számára.

A Prevotellák esetében szintén egy 4 hónapos korig tartó emelkedést látunk, ezután csökkent a mennyiségük, majd a kocákban megint visszatért. A mi adatainkkal szemben más vizsgálatokban sokkal nagyobb arányban mutatták ki ezt a nemzetséget, amelynek csúcsa körülbelül 2 hónapos korban volt (Wang et al., 2014). Nálunk ez a tetőzés a Hízó I. és a Kocák csoportjában látható.

4 hónapos korban jelentős arányban megfigyelt nemzetségek voltak még a *Fibrobacter*, a *Faecalibacterium*, a *Coprococcus* és a *Lactobacillus*. Valamint még észrevehető egy folyamatos növekedés egészen 8 hetes kortól kezdve a *Ruminococcus* és a *Streptococcus* genusokban, amely párhuzamba hozható a hízótáppal való etetéssel. Wang és munkatársai (2014) vizsgálataiban a *Faecalibacterium* és a *Ruminococcus* nemzetségek 12 hetes korban viszont nem annyira voltak jellemzőek, hanem ebben az időszakban a *Clostridiaceae* család nagymértékű emelkedését észlelték.

Törzsszinten elmondhatjuk, hogy az első 4 csoportban a *Firmicutes* törzs hatalmas dominanciát mutatott. Ennek a helyét a Kocák mintáiban a *Proteobacteria* phylum vette át. Valószínűleg a vemhesség és a laktáció hatása érvényesülhet ebben a jelentős különbségben.

A mások és saját vizsgálati eredményeink között néha kisebb nagyobb eltéréseket figyelhetünk meg, például Li és munkatársai (2020), vagy Ke és munkatársai (2019) leírásait olvasva. Utóbbi kísérlet eredményeivel a törzsek dominanciája szempontjából is különbségbe ütköztünk. Ők az egész folyamat során, 240 napos korig vizsgálva a *Firmicutes* és a *Bacteroidetes* phylumot jelölte a fő alkotóknak, míg mi szintén a *Firmicutes*, viszont mellette a *Fibrobacteres* törzset láttuk a legnagyobb bakteriom-összetevőnek. Sőt a Kocák csoportjában a *Proteobacteria* váltotta fel mindkettőt. Ezek okai gyakran természetes biológiai változások, folyamatok lehetnek. Humán vizsgálatokkal is bemutatták, hogy milyen sok tényező hathat a bélmikrobiom összetételére. Malawiban (Délkelet-Afrikában található állam), Venezuelában és az Egyesült Államokban élő emberektől vett székletminak segítségével szemléltették például a földrajzi elhelyezkedés, ezáltal a különböző kulturális, és ebből kifolyólag a különböző táplálkozási szokások adta számottevő mikrobiom-eltéréseket (Yatsunenkov et al., 2012).

Sertésekben is sok kutatás történt ennek irányába. Például a takarmányok hatásával is kísérleteztek, különválasztották a búzával és az árpával táplált sertéseket, természetesen számos

különbséget fedeztek fel a két csoport mikrobiomjában, ugyanis az árpával takarmányozottak mintáiban a *Lactobacillus* nemzetség és az *Enterobacteriaceae* család nagyobb arányban volt jelen (Weiss et al., 2016).

Ugyanakkor az is előfordulhat, hogy a módszer technikai korlátaiból adódóan nem kapunk egyforma eredményeket. Először is fontos, hogy a mintavétel megfelelő módon történjen. Munk és munkatársai (2017) vizsgálták, hogy a rektumból vett, vagy a padozatról gyűjtött minta alkalmasabb-e metagenomikai vizsgálatokhoz. Azt tapasztalták, hogy a padozatról gyűjtött trágya ekvivalensnek mondható a sertések végbeléből vett mintával, teljesen jól reprezentálja a bélrendszerben uralkodó körülményeket. Mi is ezt az előbbi, egyszerűbb és kevésbé időigényes módszert választottuk a mintagyűjtésünk során.

Az egyik fő nehézség az, hogy viszonylag kis mennyiségű DNS vonható ki bizonyos fajoktól, valamint ezeknek az előkészítése, vagy akár a módszertanban helyet foglaló PCR amplifikáció (sokszorosítás) során is számos hibalehetőség adódhat. Továbbá a read-ek hosszúsága is befolyásolhatja a kapott eredményt, régebben például a 16S rRNS-gén szekvenálás során rövidebb géneket kaptak, mint a shotgun-szekvenálással, azonban ez ma már nem jellemző, mert a gének egy másik régióját használják (Wood et al., 2019).

Fentebb már röviden összefoglaltam a kapott nemzetségek fontosabb ismertetőit, de a három leglényegesebb genus szervezetre gyakorolt pozitív hatásait még itt is érdemes kifejtenem, hiszen ezek számos tanulmányban hasonlóan nagymértékben voltak jelen a sertések bélrendszerében.

A *Lactobacillus*ok a bél egyensúlyának megtartásában játszanak nagyon fontos szerepet, ugyanis rövid szénláncú zsírsavakat állítanak elő, acetátot, propionátot, és főleg butirátot. Például, ha kevés butirát termelődik a bélben, akkor könnyebben alakul ki fekélyes vastagbélgyulladás. Ezek a zsírsavak a vastagbél hámsejtjeinek energiát szolgáltatnak, segítik azok növekedését, proliferációját, csökkentik a pusztulásukat (apoptosisukat). A választás okozta káros hatásokat is mérsékli, valamint növeli az epidermális növekedési faktor (EGF=Epidermal Growth Factor) szignalizációját is. A bélben gyulladásgátló hatással bírnak, azáltal, hogy megakadályozzák a citokinek (gyulladásos mediátorok) túlzott felszabadulását (Liu et al., 2015).

A *Megasphaera* nemzetség szintén rövid szénláncú zsírsavakat, valamint vitaminokat és esszenciális aminosavakat állít elő. Érdekes, hogy ők is képesek a laktát lebontására, acetátot és propionátot képeznek belőle (Shetty et al., 2013). Azt tapasztalták, hogy a *Megasphaerák* egyes törzsei különböznek zsírsavtermelésükben, a J1-es és az L8-as törzsek mindegyike állít elő acetátot, propionátot és butirátot, viszont az L8-as törzs ezeken kívül valerátot is.

Kimutatták, hogy a *Megasphaera elsdenii* kedvező hatással bír bendőacidózis esetében, annak megelőzésében, mert a tejsav mennyiségét csökkenti a bendőben (Marounek et al., 1989). A Lactobacillusokhoz hasonló tulajdonsága miatt már kezdik bevonni a Megaspherákat is a probiotikumok gyártásába, amelyben az a szerepük, hogy a Lactobacillusok által kialakított köztes terméket bontják tovább rövid szénláncú zsírsavakká. Talán ez a folyamat magyarázhatja azt is, hogy a Lactobacillusok mennyiségének emelkedését a Megaspherák is követik (Tsukahara et al., 2017).

A *Prevotella* nemzetség is jelentős arányban volt jelen, főleg a választás után kezdett el növekedést mutatni. A genus nagyobb mennyisége összefüggésbe hozható a több rostot fogyasztó táplálkozással, ami a rostbontó tulajdonságával magyarázható. Ez is arra utal, hogy a táplálkozás, takarmányozás milyen szintű hatással bír a bélmikrobiom összetételére. Filippo és munkatársai (2019) tanulmányában olvasható, hogy a *Bacteroides* nemzetség dominanciája pedig a zsírosabb ételeket fogyasztók körében figyelhető meg. Az még nem tisztázott, hogy a szénhidrátbontás adta pozitív hatáson kívül rendelkeznek-e negatív hatásokkal is.

### **5.3. Takarmány-összetevők hatása a sertések bakteriomjára**

A magbakteriom részarányokat a takarmányalkotókkal, valamint a csoportokat alkotó egyedek életkorával vetettük össze. A kapcsolat elemzése céljából szükség van ennek számszerűsítésére, amire a lineáris regressziós együtthatót használtuk. Ezt a továbbiakban  $\beta$  – val jelölöm, annak standard hibáját pedig SE-vel. Az 5. táblázatban találhatóak a lineáris regresszió eredményei, az itt kapott értékek százalékpontban értendők. Ha egy értékre negatív előjelet kaptunk, az azt jelenti, hogy az adott takarmányalkotó részarányának növekedésével az adott nemzetség részarányának csökkenését tapasztaltuk. Ha pozitív értéket kapunk, akkor pedig a takarmányösszetevő részarányának növekedése együtt jár a nemzetség abundanciájának növekedésével, tehát egy pozitív kapcsolatot feltételez. Ugyanígy értelmezendő az életkorok értékei is, itt az egy héttel való növekedés hatását jelöli a lineáris regressziós együttható ( $\beta$ ).

Egy tanulmányban Niu és munkatársai (2016) is a miénkhez hasonló megfigyelést kaptak, itt is a sertéseket választáskor, 60, 90, és 150 napos korban vizsgálták. Ők a 16S rRNS-t kódoló gén szekvencia-analízisét végezték, szintén a taxonszám és diverzitás index folyamatos emelkedését tapasztalták a különböző életkorú csoportokban. Viszont ők a Chao1-indexet használták a Shannon-index helyett. A Chao1-index a valódi fajgazdagságot adja meg, úgy, hogy a kisebb részarányú taxonokat nagyobb mértékben számítja be, míg a Shannon-index a

diverzitás mértékét mutatja be. Ez a két mérőszám a populáció eltérő tulajdonságairól ad információt (Niu et al., 2016).

Mivel a takarmány ilyen számottevően befolyásolja a mikrobiom alakulását, ezért megpróbáltuk az egyes takarmányalkotók lehetséges hatásait vizsgálni, hiszen így az állatok megfelelő táplálásával viszonylag könnyen hozzájárulhatunk az egészségükhöz. Ezek az alkotók, amelyeket vizsgálunk az árpa, a tritikale, a kukorica és a szója. Számos tanulmány született ezek hatásának elemzésére is. Például az árpa hatását vizsgálták a sertés bélcsatornára nézve Weiss és munkatársai (2016), ők valós idejű PCR segítségével térképezték fel a bélsár és az ileum mikrobiomját. Eredményeik nagyrészt megegyeznek az általunk tapasztaltakkal, ami az 5. táblázatból olvasható le. A *Lactobacillus*ok részarányának növekedését írták le az ileumban, viszont ezt a változást a bélsárban nem figyelték meg. Ezzel ellentétben a *Roseburia* és a *Bacteroides* nemzetségek, illetve a *Clostridium* klaszter IV-be tartozó *Ruminococcus* család abundanciája csökkent. Ezek a változások viszont a mi vizsgálatunkban a lineáris regressziós együttható ( $\beta$  érték) és a standard hiba (SE) alapján nem volt eldönthető (2. táblázat). Szintén a sertések bélmikrobiomját vizsgálták az árpa és a búza etetésének tekintetében egy másik kísérletben, sőt itt kitértek az extrudált és a sima szemes takarmányok hatására is. Az eredményeket 16S rRNS gén szekvenálásával kapták. A zabbal táplált sertések mikrobiomjában a *Streptococcus* és az *Oscillobacter* genusok relatív gyakorisága növekedett, viszont az árpával takarmányozottaknál a *Blautia*, a *Clostridium* és a *Coprococcus* nemzetségek abundanciájának emelkedését tapasztalták, ezek mindenképpen pozitív hatásúak, hiszen szerepet játszanak a rövid szénláncú zsírsavak előállításában. Azt is megállapították, hogy a gabonafélék extrudálása kedvező hatással van a bélmikrobiom összetételére és sokféleségére (Moen et al., 2016).

Humán területen is foglalkoztak ilyen irányú vizsgálatokkal, teljes kiőrlésű árpából és durumbúzából készült tésztát két hónapon keresztül fogyasztott emberek székletét elemezték. Pozitív összefüggést találtak a *Ruminococcus*, a *Clostridium* genusokkal és a *Roseburia hominis* fajjal, viszont *Fusobacterium* és a *Faecalibacterium* nemzetségek visszaszorultak. Emellett megfigyelték az árpában lévő  $\beta$ -glükánok hipokoleszterinémias hatását is. Ezeket a változásokat nem tekinthetjük egyértelműen az árpa befolyásának, hiszen a durumbúza volt a másik alkotója a tésztának, amit a jelentkezők fogyasztottak (De Angelis et al., 2015). A *Fusobacterium*ok sokkal kisebb mértékben képesek elbontani a szénhidrátokat. A különböző nyálkahártyák lakói, de fakultatív patogén baktériumok révén elhalásokat idézhetnek elő, sebekből, tályogokból, szájüregi elváltozásokból gyakran kimutatják. Sőt állatokban, így sertésekben is necrobacillosist okozhat, ami a bőr, a nyálkahártya és a máj elhalásával járó



megbetegedés (Medveczky et al., 1998). Talán ez is a teljeskiörlésű árpa fogyasztása mellett szólhat.

Egereken végzett vizsgálatokban pedig a *Prevotella*, a *Lactobacillus*, valamint a *Bacteroides* nemzetségek abundanciájának növekedését látták az árpa etetésének hatására (Garcia-Mazcorro et al., 2018).

A tritikále a mi tanulmányunkban a *Bacteroides*, *Clostridium*, *Lachnospirillum*, *Fibrobacter*, *Megasphaera*, *Oscillospira*, *Prevotella*, *Roseburia*, *Ruminococcus* nemzetségekkel hozható pozitív összefüggésbe (5. táblázat). Mások is hasonló eredményeket kaptak, például Burbach és munkatársai (2017) nagyrészt tritikáleval takarmányozott sertések bélmikrobiomjában a Clostridiumok dominanciáját tapasztalta. A bélsár elemzését 16S rRNS gén szekvenálással végezték.

A kukorica hatására a *Blautia*, *Coprococcus*, *Faecalibacterium*, *Fibrobacter*, *Streptococcus* genusok, szója hatására pedig szintén a *Faecalibacterium*, *Fibrobacter*, és még a *Lachnospirillum*, *Megasphaera*, *Prevotella*, *Roseburia* nemzetségek emelkedése várható vizsgálataink szerint (5. táblázat). Verschuren és munkatársai (2018) a kukorica és szója alapú takarmányozást hasonlították össze az árpa és búza alapúval. Ők azt tapasztalták, hogy a kukorica és szója hatására a bélmikrobiomban a *Clostridium*, *Lactobacillus* és *Streptococcus* nemzetségek relatív gyakorisága növekedett, a *Prevotelláké* viszont csökkent.

Emberekben is kimutatták, hogy a szójaételek fogyasztása a *Bifidobacterium* és *Lactobacillus* nemzetségek arányának fokozódásához vezet, viszont ezzel ellentétesen hat a *Bacteroidetes* törzsre (Huang et al., 2016).

Mint láthatjuk, az egyes tanulmányok nem mindig adnak egyforma eredményeket és nem feltétlenül egyeznek meg az általunk tapasztaltakkal. Ahhoz, hogy alaposabban megértsük, hogy az egyes takarmányalkotók hogyan hatnak a bélmikrobiom alakulására, további nagyobb mintaelemszámú kísérletekre lenne szükség. A pontosabb összefüggések megismerése nagyban elősegítené az állategészségügyet és az állattudományt, ráadásul növelné a sertésnevelés gazdaságosságát, mivel a takarmányok összetételét, az egyes takarmányozási protokollokat ennek segítségével kedvezőbben lehetne kialakítani. Így létrehozható és megtartható az állat egészsége szempontjából ideális mikrobiom.

Ezen adatokat számítógépes szoftverek segítségével már fel is tudják használni bizonyos elemzésekhez, például az egyik tanulmányban sertések termelési eredményeit próbálták előrejelezni (McMurdie et al., 2013). Láthatjuk, hogy nagy ütemben fejlődő, igen fontos szerepet tölt be az újgenerációs szekvenálás által kapott mikrobiom a kutatásokban, a tudományban, sőt már a gyakorlatban is, ugyanis a környezet, a gazdaszervezet és a mikrobiom

közötti kapcsolat rámutathat az egyes betegségek hatékonyabb megelőzési és kezelési módszereire (Kim et al., 2015).

A hazai szakirodalomban kevés információt találtam a szakdolgozatomhoz használt újgenerációs szekvenálási módszerekről, ezért főleg külföldi tanulmányokból és cikkekből próbáltam körüljárni a témát. Ennek oka, hogy ez egy új és nagyon gyorsan fejlődő terület.

Tanulmányunkban egy hazai sertésállomány bélsarának bakteriom összetételét térképeztük fel, amit össze tudunk hasonlítani más országokban kapott elemzésekkel. Eredményeink hasonlóak voltak a mikrobiom diverzitásában, és annak összetételének dinamikájában, valamint a *Megasphera*, *Lactobacillus* és *Prevotella* genusok csoportonkénti részarányában. Azonban számos eltérést is tapasztaltunk, amely adódhat a takarmányozási, genetikai és földrajzi különbségekből, ugyanakkor módszertani szempontból sem mindig egyeznek meg az egyes kísérletek. Mint már említettük a kis mintaelemszámból is adódhatnak ezek a korlátok. A későbbiekben érdemes lenne a csoportonként vett sertések számának növelése, amely egyre inkább elérhetőnek tűnik, hiszen az újgenerációs szekvenálási módszerek hatalmas mértékben fejlődnek, és ezzel egyidejűleg a költségek is kedvezőbbé válnak. Ezáltal sokkal részletesebb képet kapnánk az állati szervezet és bennük élő mikroorganizmusok viszonyáról, kísérletünk továbbvitelével pedig különösen a takarmányozás és a bakteriom közötti kapcsolat konkrétabb megértését érhetnénk el. Lényegében választ kaphatnánk arra, hogy hogyan tudunk kialakítani a sertés bélcsatornájában egy olyan baktérium közösséget, amellyel a termelését optimalizálhatnánk, növelhetnénk annak hatékonyságát. Meg kell említeni, hogy a takarmány ugyan nagy részben hat a bakteriomra, de mellette érdemes gondolnunk számos más tényezőre is, például a környezeti hatások és az immunrendszer szerepére.

## 6. Összefoglalás

Az emberek és az állatok szervezetüket mikroorganizmusok közösségével osztják meg, amivel szoros kapcsolatban állnak. Ezek az élőlények a gazda számos életműködését, például az immunrendszerét befolyásolják. Ez az erős kapcsolat jelentős hatással bír az állatok egészségére és jólétére, ami így a mikrobiótát a haszonállattartás egyik jelentős tényezőjévé teszi. Az újgenerációs szekvenálási módszerek és a bioinformatika területén elért fejlődésnek köszönhetően a mikrobiom soha nem látott részletességgel vizsgálható. Az összetételét befolyásoló kulcsfontosságú tényezők megértése nagy előnyt jelenthet a takarmányozási protokollok kidolgozásában és az állatok termelésének optimalizálásában.

Tanulmányunk célja az volt, hogy betekintést nyerjünk a különböző takarmányozási csoportbeli sertések bélbakteriomjának változatosságába.

Egy nagy létszámú sertéstelep öt takarmányozási csoportjából gyűjtöttük a mintákat (Malac I., Malac II., Hízó I., Hízó II., Kocák). Csoportonként elegyítettük a padozatról szedett, frissen ürített bélsarat, majd elemeztük azok DNS-tartalmát újgenerációs szekvenálásra alapozott módszerekkel. A bioinformatikai elemzés során csak azokat a leolvasási szekvenciákat hagytuk meg, amelyek nem illeszkedtek a sertés referencia genomjához. A taxonklasszifikációt az NCBI nt adatbázis felhasználásával a Kraken2 szoftver segítségével végeztük. A további elemzés során csak a bakteriális taxonokat használtuk. A populációs jellemzőket vizsgálva az  $\alpha$ -diverzitást az egyes csoportok összes taxonszámával és a Shannon-indexszel számszerűsítettük. A minták baktériumfaj-összetételbeli hasonlóságát Bay-Curtis távolság metrikát használva, NMDS dimenzióredukció segítségével vizualizáltuk. A magbakteriom nemzetségeinek takarmányösszetételtől való függését regressziós modellel vizsgáltuk.

Azt találtuk, hogy az  $\alpha$ -diverzitás értéke az állatok életkorával párhuzamosan nőtt. Ez egyezett a korábbi ember, illetve sertés bélmikrobiomján végzett vizsgálatok eredményeivel, bár számos tanulmány ír a diverzitás állandósulásáról is. A minták a bakteriális összetétel tekintetében a vemhes kocák teljes elhatárolódást mutatnak a többi takarmányozási csoporttól. A takarmányalkotók magbakteriomra gyakorolt hatását vizsgálva nem tudtunk statisztikailag szignifikáns összefüggéseket feltárni.

A környezet és a bélben élő mikroorganizmusok közötti sokoldalú kapcsolat megismerése elősegítheti a tartási feltételek és a takarmányozási protokollok megfelelő kialakítását az állatok optimális termelése és jóléte érdekében.

## 7. Summary

Humans and animals share their bodies with a community of microorganisms with which they are closely associated. A lot of life functions are affected by these organisms, such as the immune system. This strong relationship brings a significant impact on animal health and welfare, which makes the microbiota an important factor in livestock farming. The microbiome can be examined in unprecedented detail thanks to the advances in next-generation sequencing methods and bioinformatics. Understanding the key factors that influence its composition can lead to develop feeding protocols and better optimization of animal production. This study of ours aims to gain insight into variability of intestinal bacteria in pigs of different feeding groups.

Samples were collected from five feeding groups of a large producing pig farm (Pig I, Pig II, Fat I, Fat II, Sows). In each group, freshly excreted faeces collected from the floor were mixed and then analyzed for DNA content using methods based on next-generation sequencing. Only those sequences were kept that did not match the porcine reference genome during the bioinformatics analysis. Taxon classification was done using the NCBI nt database with the help of Kraken2 software. Only bacterial taxa were used for further analysis.  $\alpha$ -diversity was quantified by the total number of taxa in each group and the Shannon-index while examining population characteristics. The similarity of the samples in bacterial species composition was visualized using NMDS dimension reduction based on Bray-Curtis distance metrics.

We found that the value of  $\alpha$ -diversity increased with age of the animals. This was consistent with previous studies in human and porcine intestinal microbiomes, although several studies also write on the persistence of diversity. The samples show complete separation of the pregnant sows from the other feeding groups in terms of bacterial composition. We were unable to reveal statistically significant correlations during the effect examination of feed ingredients on core bacteria.

Understanding the multifaceted relationship between the environment and intestinal microorganisms can help to design housing conditions and feeding protocols appropriately for optimal animal production and welfare.

## **8. Köszönetnyilvánítás**

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Solymosi Norbert egyetemi docensnek, aki szakmai tudásával és segítőkészségével nagymértékben hozzájárult diplomamunkám elkészítéséhez.

Köszönöm társtémavezetőmnek, Dr. Papp Márton PhD-hallgatónak dolgozatom átolvasását, észrevételeit és értékes tanácsait, amellyel nagyban segítette munkámat.

Továbbá köszönöm a szakmai segítséget Dr. Reibling Tamásnak.

Hálás vagyok családomnak a sok támogatásért és biztatásért, amit az egész egyetem alatt kaptam.

## Irodalomjegyzék

- Andásófszky, E., Bersényi, A., Cenkvári, É., Fekete, S. Gy., Fébel, H., Hullá, I., Szabó, J. Zs., 2009: Állatorvosi takarmányozástan és dietetika, Budapest, Szent István Egyetem Állatorvost-tudományi Kar Budapest. p 60-161; 218-222.
- Antal, P., Hullám, G., Millinghoffer, A., Hajós, G., Marx, P., Arany, Á., Bolgár, B., Gézsi, A., Poppe, L., Sárközy, P., 2014: Bioinformatika: molekuláris mérés technikától az orvosi döntéstámogatásig, Budapesti Műszaki Egyetem
- Bäckhed, F., Roswall, J., Peng, Y., Feng, Q., Jia, H., Kovatcheva-Datchary, P., Li, Y., Xia, Y., Xie, H., Zhong, H. et al., 2015: Dynamics and stabilization of the human gut microbiome during the first year of life. *Cell host & microbe*, 17.5. p. 690–703.
- Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H. P., Clement, C., Ouhdouch, Y., van Wezel, G. P., 2016: Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80.1. p. 1-43.
- Kruskal J. B., 1964: Nonmetric multidimensional scaling: A numerical method. *Psychometrika*, 29.2. p. 115–129.
- Bin, P., Tang, Z., Liu, S., Chen, S., Xia, Y., Liu, J., Wu, H., Zhu, G., 2018: Intestinal microbiota mediates enterotoxigenic escherichia coli-induced diarrhea in piglets. *BMC veterinary research*, 14.1. p. 1–13.
- Bokori, J., Gundel, J., Herold, I., Kakuk, T., Kovács, G., Mézes, M., Schmidt, J., Szigeti, G., Vincze, L., 2003: A takarmányozás alapjai, Mezőgazda Kiadó
- Burbach, K., Strang, E., Mosenthin, R., Camarinha-Silva, A. and Seifert, J., 2017: Porcine intestinal microbiota is shaped by diet composition based on rye or triticale. *Journal of applied microbiology*, 123.6. p. 1571–1583.
- Chiu, C. Y., Miller, S. A., 2019: Clinical Metagenomic Next-Generation Sequencing for Pathogen Detection. *Nature Reviews*, 343
- Chow, J., Lee, S. M., Shen, Y., Khosravi, A., Mazmanian, S. K., 2010: Host–bacterial symbiosis in health and disease. *Advances in immunology*, 107. p. 243-274.
- Chu, D. M., Ma, J., Prince, A. L., Antony, K. M., Seferovic, M. D., Aagaard, K. M., 2017: Maturation of the infant microbiome community structure and function across multiple body sites and in relation to mode of delivery. *Nature medicine*, 23.3. p. 314-326.
- De Angelis, M., Montemurno, E., Vannini, L., Cosola, C., Cavallo, N., Gozzi, G., Maranzano, V., Di Cagno, R., Gobbetti, M. and Gesualdo, L., 2015: Effect of whole-grain barley on the human fecal microbiota and metabolome. *Appl. Environ. Microbiol.*, 81.22. p. 7945–7956.
- Deák V., 2014: Általános genetika, Typotex Kiadó
- Elmer, G. W., Surawicz, C. M., McFarland, L. V., 1996: Bio-therapeutic agents : a neglected modality for the treatment and prevention of selected intestinal and vaginal infections. *JAMA (J Am Med Assoc)*, 275.11. p. 870-876.
- Filippo, C. D., Cavalieri D., Paolo, M. D. Ramazotti, M., Poulet, J. B., Massart, S., Collini, S., Pieraccini, G., Lionetti, P., 2010: Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 107, 14691–6.
- Garcia-Mazcorro, J. F., Mills, D. A., Murphy, K., Noratto, G., 2018: Effect of barley supplementation on the fecal microbiota, caecal biochemistry, and key biomarkers of obesity and inflammation in obese db/db mice. *European journal of nutrition*, 57.7. p. 2513–2528.
- Gelman, A., Hill, J., 2006: Data analysis using regression and multilevel/hierarchical models, Cambridge university press

- Gill, S. R., Pop, M., DeBoy, R. T., Eckburg, P. B., Turnbaugh P. J., Samuel, B. S., Gordon J. I., Relman, D. A., Fraser-Liggett, C. M., Nelson, K. E., 2006: Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science*, 312. 5778. p. 1355-1359.
- Guarner, F., Malagelada, J., 2003: Gut flora in health and disease. *Lancet*, 361.9356 p. 512-519.
- Holdeman, L. V., Moore, W. E. C., 1974: New genus, *Coprococcus*, twelve new species, and emended descriptions of four previously described species of bacteria from human feces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 24.2. p. 260-277.
- Huang, H., Krishnan, H. B., Pham, Q., Yu, L. L., Wang, T. T., 2016: Soy and gut microbiota: interaction and implication for human health. *Journal of agricultural and food chemistry*, 64.46. p. 8695–8709.
- Iino, T., Mori, K., Tanaka, K., Suzuki, K. I., Harayama, S., 2007: *Oscillibacter valericigenes* gen. nov., sp. nov., a valerate-producing anaerobic bacterium isolated from the alimentary canal of a Japanese corbicula clam. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 57.8. p. 1840-1845.
- Jenq, R. R., Taur, Y., Devlin, S. M., Ponce, D. M., Goldberg, J. D., Ahr, K F., Littmann, E. R., Ling, L., Gobourne, A. C., Miller, L. C., Docampo, M. D., Peled, J. U., Arpaia, N., Cross, J. R., Peets, T. K., Lumish, M. A., Shono, Y., Dudakov, J. A., Poeck H., Hanash, A. M., Barker, J. N., Perales, M., Giralt, S. A., Pamer, E. G., Van den Brink, M. R. M., 2015: Intestinal *Blautia* is associated with reduced death from graft-versus-host disease. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 21.8. p. 1373-1383.
- Ji, Y., Li, H., Xie, P., Li, Z., Li, H., Yin, Y., Blachier, F., Kong, X., 2019: Stages of pregnancy and weaning influence the gut microbiota diversity and function in sows. *Journal of applied microbiology*, 127.3. p. 867–879.
- Kandler, O., 1983: Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 49.3. p. 209-224.
- Ke, S., Fang, S., He, M., Huang, X., Yang, H., Yang, B., Chen, C. and Huang, L., 2019: Age-based dynamic changes of phylogenetic composition and interaction networks of health pig gut microbiome feeding in a uniformed condition. *BMC veterinary research* 15.1. p. 172.
- Kim, B.-R., Shin, J., Guevarra, R. B., Lee, J. H., Kim, D. W., Seol, K.-H., Lee, J.-H., Kim, H. B., Isaacson, R. E., 2017: Deciphering diversity indices for a better understanding of microbial communities. *J. Microbiol. Biotechnol.* 27.12. p. 2089–2093.
- Kim, H. B., Isaacson, R. E., 2015: The pig gut microbial diversity: understanding the pig gut microbial ecology through the next generation high throughput sequencing. *Veterinary microbiology*, 177.3-4. p. 242–251.
- Krikó, E., Farkas, R., Adorján, A., Makrai, L. and Solymosi, N., 2018: Metgaenomika- a velünk élő mikroorganizmusok megismerésének új megközelítése. *Magyar Allatorvosok Lapja*, 140.7. p. 423–429.
- Kruskal J. B., 1964: Nonmetric multidimensional scaling: A numerical method. *Psychometrika*, 29.2. p. 115– 129.
- Langmead, B., Salzberg, S. L., 2012: Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods* 9.4. p. 357–359.
- Li, Y., Wang, X., Wang, X. Q., Wang, J., & Zhao, J., 2020: Life-long dynamics of the swine gut microbiome and their implications in probiotics development and food safety. *Gut Microbes*, 11.6. p. 1824-1832.
- Liu, C., Finegold, S. M., Song, Y., Lawson, P. A., 2008: Reclassification of *Clostridium coccoides*, *Ruminococcus hansenii*, *Ruminococcus hydrogenotrophicus*, *Ruminococcus luti*, *Ruminococcus productus* and *Ruminococcus schinkii* as *Blautia coccoides* gen. nov., comb. nov., *Blautia hansenii* comb. nov., *Blautia hydrogenotrophica* comb. nov., *Blautia luti* comb. nov., *Blautia producta* comb. nov., *Blautia schinkii* comb. nov. and description of *Blautia*

- wexlerae* sp. nov., isolated from human faeces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58.8. p. 1896-1902.
- Liu, H., Hou, C., Li, N., Zhang, X., Zhang, G., Yang, F., Zeng, X., Liu, Z., Qiao, S., 2019: Microbial and metabolic alterations in gut microbiota of sows during pregnancy and lactation. *The FASEB Journal*, 33.3. p. 4490–4501.
- Liu, L., Li, Y., Li, S., Hu, n., He, Y., Pong, R., Lin, D., Lu, L., Lu, L., Law, M., 2012: Comparison of next-generation sequencing systems. *Biomed research international*, 2012.
- Lunney, J. K., 2007: Advances in Swine Biomedical Model Genomics. *International Journal of biological Sciences*, 3.3. p. 179-184.
- Mayo, B., van Sinderen, D., eds., 2010: *Bifidobacteria: Genomics and Molecular Aspects*, Caister Academic Press
- McMurdie, P. J., Holmes, S., 2013: phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS ONE*, 8.4. e61217.
- McMurdie, P. J., Holmes, S., 2014: Waste Not, Want Not: Why Rarefying Microbiome Data Is Inadmissible. *PLoS Computational Biology*, 10.4. e1003531.
- Medveczky, I., Rusvai, M., Tuboly, S., Varga, J., Rusvai, M., Medveczky, I., 1998: Állatorvosi járványtan I., Budapest, Mezőgazda Kiadó, p. 105-116; 121-126; 147-451; 159-160.1. (Varga J., Rusvai M., Fodor L. 2018: A háziállatok fertőző betegségei, Budapest, Magyar Állatorvosi Kamara Kft.)
- Metzker, M. L., 2009: Sequencing technologies – the next generation, *Nature Reviews Genetetics*, 11.1. p. 31–46.
- Moen, B., Berget, I., Rud, I., Hole, A. S., Kjos, N. P. and Sahlstrøm, S., 2016: Extrusion of barley and oat influence the fecal microbiota and scfa profile of growing pigs. *Food & function*, 7.2. p. 1024–1032.
- Niu, Q., Li, P., Hao, S., Zhang, Y., Kim, S. W., Li, H., Ma, X., Gao, S., He, L., Wu, W., 2015: Dynamic distribution of the gut microbiota and the relationship with apparent crude fiber digestibility and growth stages in pigs. *Scientific reports*, 5, 9938.
- Papp, M., Krikó, E., Borbély, F., Reibling, T., Makrai, L., Solymosi, N., 2020: Sertésbélár bakteriom vizsgálata egy hazai nagy létszámú éllományban, *Magyar Állatorvosok Lapja*
- Perez-Munõoz, M. E., Arrieta, M.-C., Ramer-Tait, A. E., Walter, J., 2017: A critical assessment of the “sterile womb” and “in utero colonization” hypotheses: implications for research on the pioneer infant microbiome. *Microbiome*, 5.1. p. 48.
- Piccolo, B. D., Mercer, K. E., Bhattacharyya, S., Bowlin, A. K., Saraf, M. K., Pack, L., Chintapalli, S. V., Shankar, K., Adams, S. H., Badger, T. M. et al., 2017: Early postnatal diets affect the bioregional small intestine microbiome and ileal metabolome in neonatal pigs. *The Journal of nutrition*, 147.8. p. 1499–1509.
- Prabhu, R., Altman, E. and Eiteman, M. A., 2012: Lactate and acrylate metabolism by *Megasphaera elsdenii* under batch and steady-state conditions, *Appl. Environ. Microbiol.* 78.24. p. 8564–8570.
- Pruitt, K. D., Tatusova, T. & Maglott, D. R., 2005: NCBI Reference Sequence (RefSeq): a curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins. *Nucl. Acids Res.* 33. p. 501–4.
- Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C., Mahe, F., 2016: VSEARCH: A versatile open source tool for metagenomics, *Peer J*, 4.2584.
- Schell, M. A., Karmirantzou, M., Snel, B., Vilanova, D., Berger, B., Pessi, G., Zwahlen, M. C., Desiere, F., Bork, P., Delley, M., Pridmore, R. D., 2002: The genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99.22. p. 14422-14427.



- Scott, K. P., Martin, J. C., Mrazek, J., Flint, H. J., 2008: Transfer of conjugative elements from rumen and human *Firmicutes* bacteria to *Roseburia inulinivorans*. *Applied and environmental microbiology*, 74.12. p. 3915-3917.
- Shetty, S. A., Marathe, N. P., Lanjekar, V., Ranade, D. and Shouche, Y. S., 2013: Comparative genome analysis of *Megasphaera* sp. reveals niche specialization and its potential role in the human gut. *PLoS one* 8.11. e79353
- Summers, K. L., Frey, J. F., Ramsay, T. G., Arfken, A. M., 2019: The piglet mycobiome during the weaning transition: a pilot study. *Journal of animal science*, 97.7. p. 2889-2900.
- Szeberényi J., 2014: Molekuláris sejtbiológia, Dialóg Campus Kiadó - Nordex Kft.
- Tilman, D., Knops, J., Wedin, D., Reich, P., Ritchie, M., Siemann, E., 1997: The influence of functional diversity and composition on ecosystem processes. *Science*, 277.5330. p. 1300–1302.
- Tilocca, B., Burbach, K., Heyer, C. M., Hoelzle, L. E., Mosenthin, R., Stefanski, V., Camarinha-Silva, A. and Seifert, J., 2017: Dietary changes in nutritional studies shape the structural and functional composition of the pigs fecal microbiome—from days to weeks. *Microbiome*, 5.1. p. 144.
- Varga, J., Tuboly, S., Mészáros, J., 1999: A háziállatok fertőző betegségei (Állatorvosi járványtan II.), Budapest, Mezőgazda Kiadó, p 47-66; 90-92; 93-104; 112; 140-143; 152; 218-222
- Verschuren, L. M., Calus, M. P., Jansman, A. J., Bergsma, R., Knol, E. F., Gilbert, H., Zemb, O., 2018: Fecal microbial composition associated with variation in feed efficiency in pigs depends on diet and sex. *Journal of animal science*, 96.4. p. 1405–1418.
- Wang, W., Chen, L., Zhou, R., Wang, X., Song, L., Huang, S., Wang, G., Xia, B., 2014: Increased proportions of *Bifidobacterium* and the *Lactobacillus* group and loss of butyrate-producing bacteria in inflammatory bowel disease. *Journal of clinical microbiology*, 52.2. p. 398-406.
- Weiss, E., Aumiller, T., Spindler, H. K., Rosenfelder, P., Eklund, M., Witzig, M., Jørgensen, H., Bach Knudsen, K. E. and Mosenthin, R., 2016: Wheat and barley differently affect porcine intestinal microbiota. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 96.6. p. 2230–2239.
- Whittaker, R. H. 1972: Evolution and measurement of species diversity. *Taxon* 21.2/3.
- Wood, D. E., Lu, J. & Langmead, B. 2019: Improved metagenomic analysis with Kraken 2. *Genome Biol.* 20. 257.
- Wooley, J. C., Ye, Y., 2010: Metagenomics: facts and artifacts, and computational challenges. *Journal of computer science and technology*, 25.1. p. 71–81.
- Wunderlich L., 2014: Molekuláris biológiai technikák, Typotex Kiadó
- Xiao, L., Estellé, J., Kiilerich, P., Ramayo-Caldas, Y., Xia, Z., Feng, Q., Liang, S., Pedersen, A. Ø., Kjeldsen, N. J., Liu, C., Maguin, E., Doré, J., Pons, N., Chatelier, E., Prifti, E., Li, J., Jia, H., Lia, X., Xu, X., Ehrlich, S. D., Madsen L., Kristiansen, K., Rogel-Gaillard, C., Wang, J., 2016: A reference gene catalogue of the pig gut microbiome. *Nature microbiology*, 1.12. p. 1–6.
- Yoshikawa, S., Araoka, R., Kajihara, Y., Ito, T., Miyamoto, H., Kodama, H., 2018: Valerate production by *Megasphaera elsdenii* isolated from pig feces. *Journal of bioscience and bioengineering*, 125.5. p. 519-524.

**HuVetA**  
**ELHELYEZÉSI MEGÁLLAPODÁS ÉS SZERZŐI JOGI NYILATKOZAT\***

**Név:** Borbély Fanni

**Elérhetőség (e-mail cím):** fanniborbely96@gmail.com

**A feltöltendő mű címe:** Sertésbélisár bakteriom vizsgálata egy nagy létszámú állományban

**A mű megjelenési adatai:** 2020

**Az átadott fájlok száma:** 1

---

Jelen megállapodás elfogadásával a szerző, illetve a szerzői jogok tulajdonosa nem kizárólagos jogot biztosít a HuVetA számára, hogy archiválja (a tartalom megváltoztatása nélkül, a megőrzés és a hozzáférhetőség biztosításának érdekében) és másolásvédett PDF formára konvertálja és szolgáltatssa a fenti dokumentumot (beleértve annak kivonatát is).

Beleegyeznek, hogy a HuVetA egynél több (csak a HuVetA adminisztrátorai számára hozzáférhető) másolatot tároljon az Ön által átadott dokumentumból kizárólag biztonsági, visszaállítási és megőrzési célból.

Kijelenti, hogy az átadott dokumentum az Ön műve, és/vagy jogosult biztosítani a megállapodásban foglalt rendelkezéseket arra vonatkozóan. Kijelenti továbbá, hogy a mű eredeti és legjobb tudomása szerint nem sérti vele senki más szerzői jogát. Amennyiben a mű tartalmaz olyan anyagot, melyre nézve nem Ön birtokolja a szerzői jogokat, fel kell tüntetnie, hogy korlátlan engedélyt kapott a szerzői jog tulajdonosától arra, hogy engedélyezhesse a jelen megállapodásban szereplő jogokat, és a harmadik személy által birtokolt anyagrész mellett egyértelműen fel van tüntetve az eredeti szerző neve a művön belül.

A szerzői jogok tulajdonosa a hozzáférés körét az alábbiakban határozza meg **(egyetlen, a megfelelő négyzetben elhelyezett x jellel)**:

- engedélyezi, hogy a HuVetA-ban -ban tárolt művek korlátlanul hozzáférhetővé váljanak a világhálón,
- az Állatorvostudományi Egyetem belső hálózatára (IP címekre) korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,
- a Könyvtárban található, dedikált elérést biztosító számítógépre korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,
- csak a dokumentum bibliográfiai adatainak és tartalmi kivonatának feltöltéséhez járul hozzá (korlátlan hozzáféréssel),

Kérjük, nyilatkozzon a négyzetben elhelyezett jellel a helyben használatról is:

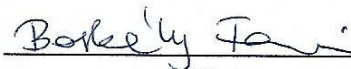


Engedélyezem a dokumentum(ok) nyomtatott változatának helyben olvasását a könyvtárban.

Amennyiben a feltöltés alapját olyan mű képezi, melyet valamely cég vagy szervezet támogatott illetve szponzorált, kijelenti, hogy jogosult egyetérteni jelen megállapodással a műre vonatkozóan.

A HuVetA üzemeltetői a szerző, illetve a jogokat gyakorló személyek és szervezetek irányában nem vállalnak semmilyen felelősséget annak jogi orvoslására, ha valamely felhasználó a HuVetA-ban engedéllyel elhelyezett anyaggal törvénysértő módon visszaélne.

Budapest, 2020. év 11. hó 16. nap



aláírás

szerző/a szerzői jog tulajdonosa

---

*A HuVetAMagyar Állatorvos-tudományi Archívum – Hungarian Veterinary Archive az Állatorvostudományi Egyetem Hutýra Ferenc Könyvtár, Levéltár és Múzeum által működtetett egyetemi és szakterületi online adattár, melynek célja, hogy a magyar állatorvos-tudomány és -történet dokumentumait, tudásvagyonát elektronikus formában összegyűjtse, rendszerezze, megőrizze, kereshetővé és hozzáférhetővé tegye, szolgáltassa, a hatályos jogi szabályozások figyelembe vételével.*

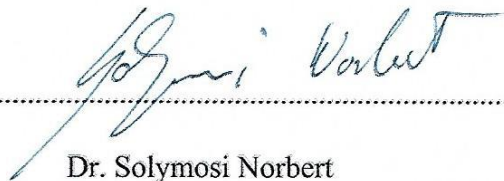
*A HuVetA a korszerű informatikai lehetőségek felhasználásával biztosítja a könnyű, (internetes keresőgépekkel is működő) kereshetőséget és lehetőség szerint a teljes szöveg azonnali elérését. Célja ezek révén*

- *a magyar állatorvos-tudomány hazai és nemzetközi ismertségének növelése;*
- *a magyar állatorvosok publikációira történő hivatkozások számának, és ezen keresztül a hazai állatorvosi folyóiratok impakt faktorának növelése;*
- *az Állatorvostudományi Egyetem és az együttműködő partnerek tudásvagyonának koncentrált megjelenítése révén az intézmények és a hazai állatorvos-tudomány tekintélyének és versenyképességének növelése;*
- *a szakmai kapcsolatok és együttműködés elősegítése,*
- *a nyílt hozzáférés támogatása.*

## Konzulensi ellenjegyzés

Alulírott Dr. Solymosi Norbert igazolom, hogy Borbély Fanni Sertésbelső bakteriom vizsgálata egy nagylétszámú állományban című diplomamunkáját ismerem, azt beadásra és védésre alkalmasnak tartom.

Budapest, 2020.11.16.



---

Dr. Solymosi Norbert

Bioinformatikai Központ