

Szakdolgozat

Paál Gábor
Budapest, 2023

ÁLLATORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM

Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék



Antimikrobiális peptidok hatása patogén baktériumokra, illetve a szájflóra és a mikroflóra változásai szájköltő halakban és rákokban

Készítette:

Paál Gábor

VI. évf. ao. hallgató

Témavezető:

Dr. Lőrincz Márta

ÁTE, Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék, Egyetemi adjunktus

Budapest

2023

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

1. Bevezetés	5
2. Irodalmi áttekintés	6
2.1. A halak mikroflórája	6
2.2. Összetételére ható tényezők	7
2.3. A mikroflóra kimutatása	7
2.4. A vízi élőlények mikrobiótájának a környezeti flórától való elkülönítése	8
2.5. A szájmikroflóra összetétele Nílusi tilápiában	8
2.6. Szájköltő halak	9
2.7. Szexuális dimorfizmusból fakadó különbségek sügerekben	10
2.8. A halak immunrendszere	11
2.9. A mikroflóra változása a szájköltéssel összefüggésben	12
2.10. Rákokban megfigyelhető szülői gondoskodás	13
2.11. Antimikrobiális peptidek halakban	13
3. Célkitűzés	16
4. Anyag és módszer	17
4.1. Vizsgált állatok	17
4.2. Tartási körülmények	18
4.3. Mintavételi módszer	19
4.4. Minták feldolgozása	20
5. Eredmények	22
6. Megbeszélés	25
7. Összegzés	29
8. Felhasznált irodalom	33
9. Köszönetnyilvánítás	42

1. BEVEZETÉS

Minden miliő, melyben a halak és a rákok élnek – legyenek nyílt vízi vagy mélytengeri, édes- vagy sós vízi fajok – hemzsegnek a bennük élő mikroorganizmusoktól. Ezeknek a halak és rákok szervezetei egy stabil, tápanyagban gazdag élőhelyet jelentenek. A fajok többségében kommenzalisták és opportunisták. Anatómiai lokációjukat tekintve legnagyobb létszámban főleg a bőr felszínén, a belekben, urogenitális traktusban vagy a kopolytyúkban találhatóak. A gazdaszervezet számára előnyösek, nem céljuk betegség okozása, és a szervezetbe betörni sem akarnak. Míg mások, melyek között gyakoribb az obligát, fakultatív, vagy opportunistá patogének előfordulása, képesek betörni a véráramba és ezáltal belső szervekbe és szövetekbe is el tudnak jutni. Halak esetében ezt az is megkönnyíti, hogy bőrük nem tartalmaz keratint, mely képes volna egy bizonyos fokú védettséget biztosítani a bőrnek a kopással és a proteolitikus hatásokkal szemben. A nyálkahártyák bőséges nyálkaszekréciója segíti a mikroorganizmusok mechanikai távoltartását. Emellett az ezen nyálkarétegekben előforduló antimikrobiális peptidok (AMP) elengedhetetlenek a patogén mikrobák szaporodása elleni védekezésben.

Jelen dolgozat elsősorban a halak AMP-jeinek megismerésére fókuszáló kutatás elővizsgálata, mely egyrészt a szájköltő halak szájnyalkahártyájának mikroflóráját méri fel, másrészt a költés időszaka alatti szájmikroflóra esetleges megváltozására fókuszál. Emellett a rákok abdominális területén és ikráikat körülvevő mikroflórát, illetve ezen közeg esetleges AMP-tartalmát is vizsgáltuk.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A halak mikroflórája

A mikrobióta, vagy más néven mikroflóra mindazon kommenzalista, szimbionta és patogén mikroorganizmusok összessége, melyek az emberi és állati szervezetekben egyaránt előfordulnak, velük szoros kölcsönhatásban élnek, annak területén a szó szoros értelmében osztoznak és alkotnak velük egy közös rendszert (Peterson és munkatársai, 2009). A halak bakteriális mikroflórájáról több kutatást is végeztek, melyek kimutatták, hogy bőrükön, kopolyúikon, emésztőcsatornájukban belső szerveikben, vagy akár fénykibocsátó szervükben is található baktériumpopulációk. Ezek általában mind mennyiségi, mind minőségi tekintetben a körülöttük lévő víz mikroflóráját tükrözik (Austin, B; 2006). A szájüreg szintén egy komplex és változatos mikrobiótának ad otthont, ami esetében párhuzamot lehet vonni az ember szájüregi mikroflórája és bélflórája között (Maki és mtsai., 2021). A mikrobiótában számos patogén baktérium is található, sokszor betegségre utaló tünetek nélkül. Az, hogy ilyen esetben ezek a társulások a betegség tünetmentes állapotát, a patogenezist megelőző kolonizációs lépést jelentik, vagy kommenzalista-szinergista kapcsolatra utalnak sokszor kérdéses. Például, a *Flavobacterium psychrophilum*ot, a lazacok „coldwater disease” nevű betegségének kórokozóját és a „rainbow trout fry syndrome” (RTFS) kórokozóját is kimutatták egészséges balti lazac (*Salmo salar*) veséjéből, lépéből, agyából, petefészekfolyadékából, termékenyítetlen ikráiból és tejéből is (Ekman, E., Borjeson, H., and Johansson, N. 1999).

Funkcióját tekintve a mikroflóra feladata sokszínű. Habár a szájüregi mikrobiom összetétele egyénenként eltérő lehet, a mikrobiom fő funkciói mindig ugyanazok maradnak (Caselli és mtsai., 2020). Képes komplex molekulák lebontására, ezáltal részt vesz a táplálkozásban és toxikus vegyületek semlegesítésében. Egyebek mellett fontos szerepe van a kórokozók elleni védekezésben, valamint vitaminok és más polimerek termelésére is képes. A fejlődés korai szakaszában is jelentős szerepet tölt be, de egyes mélytengeri fajok fénykibocsátó szerveiben is ezek felelnek a fény termeléséért (Raquel S. Peixoto, Derek M. Harkins, and Karen E. Nelson 2021).

2.2. Összetételére ható tényezők

A halak folyamatosan ki vannak téve a körülöttük lévő vízben, ürülékben és üledékben található mikroorganizmusoknak. Ezek kétségtelenül befolyásolni fogják az állatok vízzel érintkező szerveinek mikroflóráját, tehát az állat külső felszínén, kopolytúin, de az emésztőcsatornájában előforduló mikrobiótát is beleértve (El-Shafai, S.A., Gijzen, H.J., Nasr, F.A., and El-Gohary, F.A. 2004). A kolonizáció már az ikrákban, vagy lárva stádiumban elkezdődik és a hal fejlődésével együtt folytatódik. Így a halakban megtalálható baktériumok számát és a mikroflóra összetételét az ikrákban, a vízben és a táplálékban található mikroorganizmusok egyaránt befolyásolják (Olafsen, J.A. 2001). Az is elismert tény, hogy a fejlődő halak mikroflórájára bizonyos mértékig a prebiotikumok – azaz a táplálékban található összetevők, melyek pozitívan hatnak a mikrobiótára – és a probiotikumok – azaz a táplálékban előforduló élő mikrobák – alkalmazásával egyaránt hatást lehet gyakorolni (Burr, G., Gatlin, S., and Ricke, S. 2005).

A szakirodalom alapján arra lehet következtetni, hogy a halakkal érintkezésbe kerülő baktériumok sorsának három lehetséges forgatókönyve van. Ezek az alábbiak:

1. Amikor a hal környezetében előforduló baktérium azzal szoros kapcsolatba kerül, külső felületét kolonizálhatja, benne felhalmozódhat (Austin, B. and Austin, D.A. (1987). Ez legtöbbször sérülések, például horzsolások, vagy hiányzó pikkelyek helyén fordul elő.

2. Amikor mikroorganizmusok vízzel vagy táplálékkal a hal szájába és emésztőcsatornájába kerülnek (Olafsen, J.A. (2001), azon áthaladnak, vagy ott megtelepednek (Austin, B. and Austin, D.A. (1987).

3. Amikor a halak kültakarójával kontaktusba kerülő mikroorganizmusok megtelepedését a rezidens flóra, vagy más természetes gátlómolekulák megakadályozzák (Austin, B. and Austin, D.A. (1987).

2.3. A mikroflóra kimutatása

Az utóbbi években számtalan kutatás irányult akár az ember vagy állatok mikrobiótájának feltérképezésére és ennek genetikai jellemzésére, a mikrobiom vizsgálatára. Ennek ellenére még mindig keveset tudunk a velünk élő flóráról. A nehézséget többek között az is okozza, hogy a mikroflórát alkotó mikroorganizmusok száma gyakran többszöröse a

gazdaszervezet sejtjeinek (bár Ron Sender és munkatársai szerint az arány 1:1-hez áll közelebb (Sender és mtsai., 2016)). Összetétele fajonként, egyedenként és anatómiai lokalizációt tekintve is eltérő, illetve rengeteg egyéb tényező is befolyásolja (pl. egészségi állapot), amiből kifolyólag vizsgálata nem egyszerű. Ezen mikroorganizmusok tanulmányozásához hagyományosan tenyésztést alkalmaztak, mely kizárólag baktériumok, de ezen belül is főleg az aerob baktériumok vizsgálatára volt alkalmas (Montes, M., Perez, M.J., and Nieto, T.P. 1999). Mivel a mikroflórát alkotó mikroorganizmusok egy része nem tenyésztethető, ezért annak teljes feltérképezése kizárólag csak az alkotó mikroorganizmusok genomjai alapján lehetséges molekuláris alapú, tenyésztéstől független módszerekkel (például szekvenálással). Az újabban elvégzett mikrobiális biodiverzitást kutató tanulmányok – melyek esetében a hangsúlyt ezen módszerekre fektették – kimutatták az egyéb, nem tenyésztethető mikroorganizmusok, köztük anaerob baktériumok jelenlétét is (Moran, D., Turner, S.J., and Clements, J.D. 2005).

2.4. A vízi élőlények mikrobiótájának a környezeti flórától való elkülönítése

Az elsődleges problémát halak és rákok esetében is a saját mikroflóra az azokat körülvevő vízben, üledékben vagy táplálékban előforduló egyéb baktériumoktól való elkülönítése jelenti. Sajnos a legtöbb publikáció nem foglalkozik ezzel a problémával, de hasonló jellegű megkülönböztetést tesznek egyéb élőközösségek esetében. Például hasonlóképpen lehet elkülöníteni a rhizoplane (gyökérfelszín) és a rhizosphere (gyökeret körülvevő tér), vagy a phylloplane (levélfelszín) és a phyllosphere (levél körüli tér) mikrobiális populációit (Austin, B; 2006). Ezen kívül elismert tény, hogy a halakban egyéb, idegen baktériumok is képesek túlélni. Az ürülékben előforduló *Escherichia coliról* megállapították, hogy képes megtelepedni és szaporodni szivárványos pisztráng (*Oncorhynchus mykiss*) emésztőrendszerében kontaminált táplálékkal való etetést követően (Del Rio Rodriguez, R.E., Inglis, V., and Millar, S.D. 1997).

2.5. A szájmikroflóra összetétele Nílusi tilápiában

Yousri Abdelhafiz és munkatársai 2021-ben végzett kutatásuk során egy maternális szájköltő halfaj, a Nílusi tilápia (*Oreochromis niloticus*) szájúregi mikroflóráját tanulmányozták. Kísérleteik során nőtény és hím egyedeket egyaránt megvizsgáltak, összesen

58 kifejlett állatot. A baktériumok azonosítására szekvenálást alkalmaztak. Az általuk végzett elemzések kimutatták, hogy a legtöbb baktérium hímek és nőstények esetében is a Gram-negatív *Proteobacteria* törzshe tartozott, de emellett a szintén Gram-negatív *Bacteroidetes*, és *Acidobacteria*, valamint a Gram-pozitív *Firmicutes*, *Deinococcus-Thermus*, és *Actinobacteria* törzsekbe tartozó baktériumok is jelen voltak. Ezek a *Deinococcus-Thermus* kivételével szintén domináns alkotói a nilusi tilápia és az atlanti lazac bélflórájának és bőrükben található mikroflórájának is (Kuebutornye és mtsai., 2020; Sakyi és mtsai., 2020). Nemzetségszinten az *Acinetobacter*, az *Enhydrobacter*, a *Novosphingobium*, a *Pseudomonas*, a *Haliscomenobacter*, a *Rheinheimera* és a *Vogesella* nemzetségekre tartozó baktériumok előfordulása volt a legnagyobb. A mikroflóra összetételében eltéréseket találtak a két nem között. Előbbiek közül egyes nemzetségek, például az *Acinetobacter* az *Enhydrobacter* és a *Nitrospira* előfordulása nagyobb volt a nőstényeknél, mint a hímeknél. A Gp6 és Gp4 alcsoportba tartozó acidobaktériumoknak és a szacharibaktériumoknak szintén magasabb volt az előfordulásuk nőstényekben. Emellett számos opportunista kórokozó, például a *Firmicutes*, az *Actinobacteria*, a *Streptococcus*, a *Gemella*, a *Veillonella* és a *Kocuria* nemzetségekre tartozók előfordulása nőstények esetében szignifikánsan alacsonyabb volt a hímekhez képest. Megállapították, hogy ez a nőstényeknél megfigyelhető szájmikroflóra, amely bizonyos az anyagcsere szempontjából előnyös baktériumokból többet, ellenben kevesebb opportunistá kórokozót tartalmaz, valószínűleg olyan környezetet teremt, amely segítheti az állatot az olyan invazív kórokozók elleni küzdelemben, mint például a biofilmképző, vagy a H₂O₂ termelő tulajdonságokkal rendelkező Streptococcusok. Ezáltal az ikrákat nevelő szülők sikeresebben képesek egy az ikrák inkubációja szempontjából is előnyös közeget teremteni (Yousri és mtsai., 2021).

2.6. Szájköltő halak

A különféle szaporodásbiológiai stratégiák között a szülői gondoskodást illetően az egyik legérdekesebb a szájköltés, mely a csontos halak több, mint 20%-ban előfordul (Gross MR, Sargent RC 1985). Köztük is kiemelendő a bölcsőszájú-hal félék családja, melynek számos tagjára jellemző ez a viselkedésforma (Keenleyside 1991). Ennek során a szülő az ikrákat vagy a lárvákat a szájnyalvákárával szoros kontaktusban a szájúregben belül őrzi, akár 4-6 héten keresztül is, egészen a szikhólyag felszívódásáig (Keenleyside 1991; Grone et al. 2012). Hasonlóan, mint az erszényes és az elevenszülő fajok esetében, ez is azt a célt szolgálja,

hogyan az embriók egy fejlettebb, a külső környezetre kevésbé érzékeny stádiumba fejlődjenek (Shaw ES, Aronson LR 1954; Schurch R, Taborsky B 2005). Ez a különös technika, mely a sügerek esetében már többször is kifejlődött az evolúció során (Goodwin et al. 1998). Történet akár csak az egyik szülő részvételével (maternális, vagy ritkán paternális szájköltés), de az is előfordulhat, hogy egymást váltva, mindkét szülőfél részt vesz benne (biparentális szájköltés) (Keenleyside 1991). Ez a fajta szülői gondoskodás a megtermékenyítést követő viselkedésformák közé sorolható (Smith C, Wootton RJ 1995). A legtöbb ilyen viselkedés az utódok védelmét és az embriók fejlődését szolgálja (Keenleyside 1991). A szájköltés közvetlen hasznai, mint az utódok fizikai védelme és azok szállítása ismertek, de az még mindig nem egyértelmű, hogy jár-e egyéb előnyökkel az ikrák és lárvák számára. Természetes módon – szájköltés útján – és mesterségesen felnevelt Tilápia utódokat összehasonlítva előbbieken jóval kevesebb volt a parazitás megbetegedés, amiből az anya felől passzív immunitás átadására lehet következtetni (Subasinghe RP 1993; Sin YM, Ling KH, Lam TJ 1994). Emellett pedig a vitellogenin nevű szikhológiai prekursor fehérje ezen halak szájköltésében való detektálása anya-embrió tápanyagátvitelre utal (Kishida M, Specker JL 2000). Mindenesetre tény, hogy amellett, hogy a szájköltés növeli az egyedek szaporodásbiológiai sikerét és az utódok túlélését, azok szájköltésben való hordozása számos költséggel jár a szülő számára. Amellett, hogy a hal számára ez fokozott energiafelhasználást jelent, korlátozza a táplálékfelvétel lehetőségeit, de a ragadozóknak és a fertőzéseknek való kitettséget is növeli, hiszen az immunrendszer védelme és a hal helyzetváltoztató képessége is mérséklődik (Ghalambor et al. 2004; Trumbo 2007; Knowles et al. 2009; Reardon and Chapman 2010; Keller et al. 2017). Amellett, hogy a szájköltés során a szülő bizonyos fiziológiai változásokon mennek keresztül, morfológiai változások is megfigyelhetők rajtuk. A szájköltés idején a korlátozott táplálékfelvétel és megnövekedett igénybevételből kifolyólag kondíciójuk leromlik, de emellett bélsatornájuk is megrövidül. Ahhoz, hogy a szájköltésben elegendő hely legyen az ikráknak, vagy lárváknak a kopoltyújuk formája és szerkezete is módosul (Abecia, J. E., Luiz, O. J., Crook, D. A., Banks, S. C., Wedd, D. J., & King, A. J. 2022).

2.7. Szexuális dimorfizusból fakadó különbségek sügerekben

Fontos megemlíteni, hogy abból kifolyólag, hogy ezekben a fajokban a szexuális dimorfizmus sokszor igen kifejezett, a nemek között számos vizsgált paraméter eltérhet (Trivers 1972; Lessells 1998). Ennek a változatosságnak az alapját az jelenti, hogy a szájköltést végző

állat egyéb életmóddal kapcsolatos befektetési helyett – beleértve az immunrendszert is (Stearns 1989; French et al. 2007; Bourgeon et al. 2009; Reavey et al. 2014; Keller et al. 2017) –, erőforrásait a szaporodásra összpontosítja. Érthető módon a nemi dimorfizmus a hagyományos, aszimmetrikus módon költő, tehát maternális, vagy paternális szájköltő fajokban a legkifejezettebb. Ezekben az esetekben a hímek (paternális szájköltés esetén a nőstények) stratégiája, hogy erőforrásait a szexuális szelekcióra fordítják, míg a nőstények (paternális szájköltés esetén a hímek) életidejüket – és így szaporodási idejüket – hosszabbítják meg (Bateman 1948; Trivers 1972; Clutton-Brock 1991). Ennek megfelelően általánosságban a nőstények immunrendszere ellenállóbb, mint a hímeké (Kurtz et al. 2000; Siva-Jothy 2000; Rolff 2002; Roth and Kurtz 2008) (maternális szájköltés esetén).

2.8. A halak immunrendszere

A halak immunrendszerében több védő akadály is megfigyelhető (Tort et al. 2003). Mivel a halak bőre nem tartalmaz keratint, így az a kopásnak és proteolitikus hatásoknak többszörösen kivan téve. Emiatt az első elsősorban fizikai gátat a hal szervezetébe behatolni próbáló patogének ellen a felszíneket borító mukózus réteg jelenti, mely a kopoltyúkon, a bőrön, a szájüregben, vagy a bélben is megfigyelhető (Salinas 2015). Ezeken a nyálkahártyákon mind az adaptív, mind a veleszületett immunrendszer bizonyos alkotóelemei is kifejeződnek, hogy meggátolják a patogének megtapadását (Gomez et al. 2013). Ezzel egyidőben a kommenzalista mikroorganizmusok kolonizációját is lehetővé teszik, sőt, sokszor elő is segítik (Maynard et al. 2012; Llewellyn et al. 2014). Ennek köszönhetően képes létrejönni a szervezet különböző pontjain is megfigyelhető rezidens flóra, amely az immunrendszerhez hasonlóan szintén részt vesz patogének kolonizációjának megakadályozásában. Az immunrendszer és a mikroflóra között egy dinamikus változó egyensúly figyelhető meg, hiszen a flóra az adaptív immunrendszer folyamatos fejlődéséhez, változásához is hozzájárul (Cebra és munkatársai, 1999). Egyes tanulmányok szerint szájköltő halak szülői gondoskodásba fektetett túlzott energiabefektetése miatt a mikroflóra és az immunrendszer között fennálló folyamatos változás dinamikája sérülhet. Esetenként előfordulhat, hogy egyéb testfelületeken az egészséges mikrobiális közösség megváltozik, felborulhat az egyensúly, egyes baktériumok kiszorulhatnak, míg mások – akár fakultatív patogének – feldúsulhatnak (Bailey et al. 2011; Levin et al. 2016).

Egy másik tanulmány alapján (Keller és munkatársai, 2018) az immunsejtek aktivitása maternális szájköltők esetén a nőtények esetében magasabb, mint hímeknél, míg biparentális szájköltők esetén ilyen különbség nem volt megfigyelhető (Keller et al., 2018). Ezen kívül szintén maternális szájköltők esetében azt is kimutatták, hogy nőtényekben nagyobb arányban vannak jelen az adaptív immunsejtek. Azt viszont nem sikerült bizonyítani, hogy ez a szájüreg mikroflórájára is kihatna. Maternális szájköltő sűgerek hím és nőtény egyedei között ennek különbözőségét nem sikerült kimutatni, a baktériumflóra egyedi eltérései és a hal neme egymástól függetlennek bizonyultak. Ellenben a mikroflóra összetételében sikerült különbséget kimutatniuk olyan halakat vizsgálva, melyek éppen forgattak. Szintén éppen ikrás halakat vizsgálva ehhez hasonló összetételben való eltérést ezelőtt már kimutattak halak bőr mikroflóráját vizsgálva (Larsen et al. 2013).

2.9. A mikroflóra változása a szájköltéssel összefüggésben

Josh J Faber-Hammond és munkatársai 2019-es *Astatotilapia burtoni* sűgerekben végzett kutatásukban a szájköltésnek a bélmikrobiótára gyakorolt hatását vizsgálták. Tekintettel a gazdamikrobiom fontos szimbiotikus szerepére (McFall-Ngai és mtsai. 2013), érdekes kérdés, hogy szájköltés közben a bélflórában bekövetkezett változás a táplálékhiányra adott egyszerű válasz, vagy a mikroflóra egy szimbiotikus adaptációja, mely arra irányul, hogy a szájköltés igényelte többletenergiát minimalizálja. Kimutatták, hogy a bélhámön keresztüli anyagcserefolyamatok csökkenésének mértéke nagyobb, mint amilyen az egyszerű éhezés során megfigyelhető, hasonlóan más, a természetben előforduló tápanyagmegvonási körülményekhez, (például a hibernáció). Ez azt sugallja, hogy a szájköltéshez való alkalmazkodás során a bél környezetében olyan változások következnek be, melyek hatással vannak a bél mikroflórájára. Vizsgálatok kimutatták, hogy az egyszerűen éhező halak mikroflórájában a *Bacteroides* családba tartozó baktériumok aránya növekszik. Ezzel szemben az éppen forgató szájköltő sűgerekben ezen baktériumok száma, és ezzel párhuzamosan a mikroflóra diverzitása is drámaian csökken. A Hammondék által gyűjtött adatok alapján arra lehet következtetni, hogy ezen fajokban a bél környezete mikroflórájának változását kifejezetten a szájban történő költéshez való fiziológias alkalmazkodás irányítja. Eredményeik összhangban vannak korábbi tanulmányokkal, melyek bizonyos antimikrobiális vegyületek termelődéséről számolnak be a szájüregben belül ezen sűgerek esetében (e.g. Chong et al. 2006; Iq and Shu-Chien 2011; Torati et al. 2017). Tehát több tanulmány eredményei alapján

feltételezhető, hogy a bél mikroflóra diverzitásának csökkenését ezen vegyületek termelődése okozza.

Koe Chun Iq és Alexander Chong Shu-Chien 2011-es tanulmányukban a szájköltés egyéb funkcionális aspektusai megértése végett összehasonlító proteomikai (fehérje alapú) vizsgálatokat végeztek forgató és nem forgató halak szájnyalakahártya mintáiból. Az általuk azonosított fehérjék többségét már korábban is kimutatták más biológiai folyadékokból, vagy más élőlények nyálkában gazdag szerveiből. Igazolták továbbá 22 fehérje up-regulációját forgató halak mintáiban, melyek főként antioxidáns enzimek voltak, mint például a peroxiredoxin, vagy olyan stresszfehérjék, mint a hő sokkfehérje. Emellett 3 fehérje (Anterior gradient protein, hemoglobin beta-A chain and alpha-2 globin) down-regulációját is megfigyelték. Az eredményeik egy valószínűleg a szájköltés ideje alatt megnövekedett nyálkatermelést elősegítő sejtes stresszválaszra utalnak.

2.10. Rákokban megfigyelhető szülői gondoskodás

A rákok altörzsében igen gyakori a szülői gondoskodás azon formája, melynek során a nőstény a petéit – egészen azok kikeléséig – az abdominális páncélrészben tartja. Az inkubáció trópusi fajokban pár hét, míg magasabb földrajzi szélességen található fajok esetében több hónap is lehet. Eközben a nőstény endo- és pleopodjai (a hasi végtagjainak) lüktető mozgásával a petéket folyamatosan keveri, azok körül a vizet áramoltatja. Ezzel oxigént és tápanyagokat juttat hozzájuk, míg az excretált anyagcseretermékeiket pedig eltávolítja. Emellett tisztító ollói segítségével felületükről a rájuk tapadó szennyeződések és esetlegesen megtelepedő patogéneket mechanikailag eltávolítja. Egyes fajok a petéket egy mucinózus, adhezív hatású váladék szekretálásával magukhoz és egymáshoz ragasztja (Fisher and Clark 1983). Ez egyben a külső rétegét is képzi egy komplex, az embriót annak fejlődése során körülvevő védőburoknak, mely burkon keresztül a különböző anyagcserefolyamatok is zajlanak (Glas et. al. 1997).

2.11. Antimikrobiális peptidok halakban

A víz, mint a halakat és rákokat körülvevő közeg magas számban tartalmaz mikroorganizmusokat, így patogéneket is, amik potenciálisan fertőzéseket indukálhatnak

bennük. Amellett, hogy a szárazföldi állatokhoz képest nagyobb mikrobiális terhelésnek vannak kitéve (Abdelhafiz 2021), a halak bőre nem tartalmaz keratint, így a kopással és proteolitikus hatásokkal szemben is kevésbé ellenálló. Emiatt a mikrobák számára a különböző sebek és sérülések nem az egyetlen bejutási, megtelepedési módot jelentik. Igaz, hogy a nyálkahártyák bőséges nyálkaszekréciója segíti a mikroorganizmusok mechanikai eltávolítását, de bizonyos baktériumok számára tápanyagként is szolgálhat, így elszaporodásukat akár elő is segítheti. Akárhol is szaporodjanak el a mikrobák, a gazdahal jólétére nézve veszélyt jelentenek azáltal, hogy tápanyag és energiaforrásaikat felhasználják, vagy akár megbetegedést okoznak. Ebből következik, hogy mind a belső testfolyadékoknak, és a szekretált nyálkának is tartalmaznia kell olyan mikrobicid hatású összetevőket, amelyek általános mikrobaellenes tulajdonságuknak köszönhetően védelmet nyújthatnak a szervezet számára. Az ilyen anyagok jól felismerhetőek más állatokban is, ahol kulcsfontosságú szerepet töltenek be mind a szisztémás és a nyálkahártyák védelmi rendszerében is. Az olyan élőlényekben különösen elengedhetetlen a jelenlétük, amelyek nem rendelkeznek specifikus, adaptív immunitással, vagy az olyan állatok esetében, melyek a halakhoz hasonlóan kor, (lárvakorban és kifejlett hal esetében ezek másfélék) vagy hőmérsékletfüggő, lassan reagáló vagy lassan kialakuló immunitással rendelkeznek. Korábban, a halak által termelt mikrobicid hatású anyagokkal Yano (1996) és Ellis (1999, 2001) már foglalkozott, habár ezek a kutatások inkább olyan tényezőket vizsgáltak, mint a lítikus enzimek (pl. lizozim), agglutináló faktorok, reaktív oxigénatomot tartalmazó anyagok és proteáz inhibitorok. Az enzimek egy másik csoportját, az antimikrobiális peptideket 41 éve fedezte fel Hans Boma csapata (Hultmark et al., 1982; Selsted et al., 1985; és Michael Zasloff 1987) ízeltlábúakban, emlősökben és kétlélűekben. Mostanra már több, mint 700 AMP-t találtak testüreg nélküli állatokban, kétlélűekben, emlősökben és növényekben, illetve ősszájú és újszájú gerinctelenekben. A csontshalakról szóló beszámolók csak 37 éve jelentek meg először (Lazarovici et al., 1986; Thompson et al., 1986), az utóbbi években pedig a halakban talált AMP-k száma egyre csak nő.

Az antimikrobiális peptidek kis molekulatömegű, kationos jellegű, hidrofób, amfipatikus fehérjék, melyeket általában kevesebb, mint 100 aminosav alkot. Funkciójuk az immunitásban, hogy csökkentsék a kórokozók számát az olyan fertőzéseknek különösen kitett felületeket, mint amilyen a szem, a bélcsatorna, az urogenitális traktus. Emellett képesek az olyan baktériumokat is elpusztítani vagy szaporodásukat gátolni, melyek sérüléseken keresztül juthatnának a szervezetbe. Ezzel is segítve a fagociták és a szisztémás immunrendszer egyéb alkotóit szekvesztrálni és semlegesíteni a kórokozókat. Ezeket a fehérjéket tipikusan az epitél sejtek, a

máj, limfoid szövetek vagy fagociták termelik. Hatásukat tekintve direkt hatású, széles spektrumú antibakteriális szerek. Általánosságban véve a legtöbb AMP mind a Gram-pozitív és negatív baktériumokkal szemben is aktív. Nagy előnyük, hogy csak kevés olyan mechanizmus van, amellyel a baktériumok rezisztenciát alakíthatnának ki ellenük (Devine és Hancock, 2002). Emellett néhány emlősökben található kationos jellegű AMP-ről bebizonyították, hogy részt vehetnek gyulladási reakciók modulálásában, de előfordul, hogy tumorelles, vagy víruselless hatást is tulajdoníthatnak néhányuknak (Hancock et al., 1995). Ennél fogva nemcsak, hogy segítik a gazdaszervezetet a mikroflóra szabályzásában, de meg is védik azt a káros anyagcsere-termékek hatásaitól. A legtöbb AMP célpontja a baktériumok sejtfa, ennek depolarizálásával átjárhatóvá teszik azt. Egyesek képesek gátolni a sejtek metabolikus folyamatait, vagy akadályozni annak DNS-szintézisét (Devine és Hancock, 2002; Zasloff, 2002), míg páran közülük egymással vagy lizozimmal is képesek szinergizálni. A bőr és nyálkahártyák által termelt antimikrobiális peptidek gyakran folyamatosan termelődnek, de sokszor csak bizonyos típusú antigének hatására kezd el termelődni a fehérje, különben nem expresszálódik, avagy koncentrációja olyan alacsony, hogy a jelenlegi vizsgálati módszerekkel nem detektálható.

3. CÉLKITÚZÉS

Vizsgálatunk egy előkísérlet volt a szájköltő halakban és rákokban előforduló antimikrobiális peptidok kimutatásához, izolálásához és felhasználásához. Korábban Adorján Gábor és Sellyei Boglárka vizsgálatai (személyes közlés) alapján a szájköltés során a halak normál szájlórája drasztikusan lecsökken a nem forgató halakéhoz képest, mely eredményt antimikrobiális peptidok hatásának tudták be. Ez a sterilhez közelítő állapot mélyen elgondolkodtató. Egyrészt felveti a kérdést, hogy vajon mikorra tehető például az emlősmagzatok mikroflórájának kialakulása, és ez milyen hatással lehet az újszülött életére (Martín-Peláez és munkatársai, 2022). Másrészt, ha az antimikrobiális peptidok a halak száját ténylegesen képesek közel sterilé tenni, akkor vajon van-e ezeknek a fehérjéknek más, akár humán vagy emlős patogénekkal szembeni hatása (pl. multirezisztens baktériumok esetében). Kutatásunk célja tehát megvizsgálni, hogy a halak szájúregének és rákok haspáncéljának mikroflórájában milyen mennyiségi és minőségi változás következik be költés során, illetve tesztelni, hogy a termelődött antimikrobiális peptidok képesek-e fakultatív emlőspatogének szaporodására gátló hatást gyakorolni.

4. ANYAG ÉS MÓDSZER

4.1. Vizsgált állatok

Az általunk végzett vizsgálatok tárgyát kizárólag Adorján Gábor biológus tulajdonában lévő, otthon tartott halai és rákjai képezték. A vizsgálatok során 2 afrikai halfajból is vettünk mintát: sárgafarkú lazacsügérből (*Cyprichromis leptosoma*) és narancsfoltos császársügérből (*Aulonocara OB*). A halakat az 1. ábra mutatja be, Az első a narancsfoltos császársügér, a <https://tropus-szeged.hu/narancsfoltos-csaszsuger-aulonocara-sp-ob> honlapról származik, a második a sárgafarkú lazacsügér, a tulajdonos fényképe. Előbbi egy a Tanganyika-tóban endemikus, viszonylag kis testű (7-9 cm testhosszú), nyíltvízi halfaj, melynek egyedei jellemzően nagyszámú rajokban szeretnek úszni. Testük színe nemenként eltérő. A nőstények ezüstös színűek, a hímek neonkékek. Fejük színe a fakó sárgától a világos sárgáig változhat, fark alatti úszójuk és a hátúszójuk lilás-kékes, míg a farkúszó általában sárga, de kék is lehet (Boulenger, 1898a). A narancsfoltos császársügérré jellemző, hogy a Malawi-tóból származó császársügér (*Aulonocara stuartgranti*) egy kitenyésztett színváltozata. Mérete nagyobb, 10 és 15cm között változik, színezetét tekintve teste és úszói narancssárgák, melyeket változatos formájú, fekete foltok tarkítanak. Ragadozóhal, táplálékát természetes körülmények között kisebb halak, lárvák és férgek képzik, akváriumban tartva száraztáppal is etethető (Jia Zhao és Jian Gao, 2015) . Mindkét fajra szaporodásbiológiai viselkedésüket tekintve a maternális szájköltés jellemző, tehát ivás után a nőstények ikráikat szájüregükben inkubálják.



1. ábra: Halfajok, melyektől mintát vettünk. Az első a *Aulonocara OB* (a kép a <https://tropus-szeged.hu/narancsfoltos-csaszsuger-aulonocara-sp-ob> tulajdona), a második a *Cyprichromis leptosoma* (tulajdonos felvétele).

A rákok törpe folyami rákok (*Cambarellus patzcuensis*), melyek narancs- és kék színváltozatban is megtalálhatóak az akvaristánál. Eredetileg az Egyesült Államok déli részéről, főleg Alabama és Mississippi államokból származik, a mi általunk is vizsgált színváltozatokat később tenyésztették ki. A *C. patzcuensis* méretét tekintve 4-5 cm-es testnagysággal rendelkezik, habár a nőstények és az idősebb egyedek ezt pár centiméterrel meghaladhatják (Kawai és munkatársai, 2015). Akváriumban tartásuk és szaporításuk egyszerűnek mondható, kis helyigénnyel rendelkező, hőmérsékletre és vízkeménységre kevésbé érzékeny faj. A rákot a 2. ábra mutatja be. Fénykép csak a narancs színváltozatról készült, mert a kék sokkal kevésbé volt látványos a szürkés köveken.



2. ábra: törpe folyami rák narancsszínű változata

4.2. Tartási körülmények

Az élőlények fajonként, egymástól elkülönítve voltak elhelyezve. A halakat kb. 200 l-es csapízzal töltött, 24 °C-os vízhőmérsékletű akváriumokban tartották, melyekben a víz pH-ja indikátorpapírral mérve (VWR International KFT, Debrecen, Magyarország) 7,5 volt. A tartási körülményekkel kapcsolatos paramétereket és az étrendet, melyekről ismert, hogy befolyásolják a szájüreg mikrobiótáját, a kísérleti időszak alatt állandó értéken tartották. Az állatok a mintavételek alkalmával kb. 1,5-2 évesek voltak. Az akváriumokban hímeket és nőstényeket vegyesen tartottak (nagyjából 1:2 ivararányban). A megvilágításért egy a

természetes napciklust imitáló neon lámpa volt felelős, a takarmányozást pedig Neptun spirulina lemezes díszhaltáppal végezték. Arákokból akváriumonként kb. 20-30 db-ot tartottak együtt, a halak akváriumához hasonló körülmények között. A kék színváltozat vegyesen voltak tartva az állatok korát és ivarát tekintve is. Közöttük egyaránt voltak fiatalabb és idősebb egyedek is, az ivararány pedig körülbelül 1:1 volt. A narancs színváltozatú törpe folyami rákok esetében egy hím mellett nagyjából 20 nőtény volt elhelyezve. A fiatal állatokat külön akváriumban nevelték.

4.3. Mintavételi módszer

Mintavételt összesen 5 alkalommal végeztünk (1,2,3,4,5).

(1,2) Az első két kísérletet 2022.09.29-én és 2022.10.20-án végeztük, melyek során összesen 18 db tamponmintát vettünk kék törpe folyami rákokból és 8 db tamponmintát sárgafarkú lazacsügérből. A halakat tekintve a mintavétel során a 2 db hím és 3-3 db nőtény egyed szájüregéből vettünk tamponmintát. Nőtények esetében üres és éppen forgató állatból egyaránt. Forgató nőtények esetében az ikrákat előzetesen el kellett távolítani, hogy a tamponnal ne tudjunk kárt okozni az utódokban. Ez az ikrák magukra hagyásával járhat, úgyhogy minden esetben biztosítottuk azt, hogy a mintavételezés a lehető leggyorsabban történjen, és azt követően az állat újból fel tudja venni azokat. Ugyanezen okból kifolyólag a kontrollokat mindig előbb fogtuk ki. Rákok esetében 12 db petés és 6 db pete nélküli állatot vizsgáltunk. Mivel a rákoknál a mintákat az állatok abdominális régiójáról, a haspáncél ikrák melletti részéről, illetve az ikrák felületéről vettük az ivadékok eltávolítását elkerülve, ezért esetükben nem volt jelentősége a mintavétel sorrendjének. A második mintavétel alkalmával a tamponokból kettőt vettünk állatonként, az egyiket száraz tamponnal, a másikat 20 µl steril, foszfáttal puffertolt fiziológiás sóoldatba (PBS) helyezve tároltuk a laboratóriumba érkezésig.

(3) A következő mintavétel során, melyre 2023.05.22-én került sor, szintén sárgafarkú lazacsüveg és kék törpe folyami rákokat használtunk. Az előzőekhez hasonlóan 4 db nőtény halból vettünk mintát, egy esetben ikrás, 1 esetben késői ikrás és 2 ikra nélküli állatból egyaránt. A korábbiakhoz hasonlóan 8 rákról is vettünk mintát. Ezen alkalommal minden egyedről 2 tamponmintát vettünk. Ezeket 20µl PBS-be helyeztünk, és így tároltuk egészen a felhasználásig.

(4) Következő alkalommal 2023.09.02-án vettünk mintát, az elsőhöz hasonlóan. Ebben az esetben narancsfoltos császársügereket is vizsgáltunk, ugyanis ezek között fordult elő ikrás állat. Közülük vettünk egy ikrás és egy nem ikrás állatból is mintát (2 minta/hal, PBS-ben tárolva). A narancsszínű törpe folyami rákokat, ikrás és nem ikrás egyedeket egyaránt (1db nem ikrás, 1db olyan állat, melyen még csak néhány ikra volt, 1db ikrás, 1db lárvás és 1db késői ikrás) vizsgáltunk. A különbség a korábbi mintavételekhez képest az volt, hogy a mintavételt megelőzően az állatokat 10 percre autoklávval csíráatlanított csapvízbe helyeztük. Ezzel azt próbáltuk elérni, hogy az állatok szájüregében, illetve rákok esetén a felszínükön lévő víz közel steril legyen, ezzel kiküszöbölve azt, hogy ne a mikrobákban gazdag akváriumvizet mintázzuk meg.

(5) A tulajdonos által beküldött akvárium és csapvíz mintákkal együtt 3 db Tilapia jelzésű tamponminta is érkezett, melyeket szintén a tulajdonos vett le 2023.10.19-én. Ezekről az állatokról sokat nem tudunk (az eredményeknél leírtak magyarázatul szolgálnak, hogy miért is nem érdeklődtünk), autoklávozott csapvízbe úsztak a mintavételt megelőzően.

4.4. Minták feldolgozása

A gyűjtött mintákat minden alkalommal a kiszállást követő 24 órán belül feldolgoztuk. A szállításuk hűtőtáskában történt, feldolgozásig pedig 4 °C-on tároltuk őket.

A kiszállások alkalmával gyűjtött, illetve a tulajdonos által beküldött tamponmintákat 5% mosott juh vörösvértestet tartalmazó columbia agarra (röviden véres agar) szélesítettük. A lemezeket a Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék Bakteriológiai Osztályának munkatársai készítették. A táptalajok inkubációját 24 °C és 37°C fokos termosztátba helyezve egyaránt elvégeztük. Első alkalommal mind aerob, mind anaerob körülmények között is. A táptalajokon kinövő baktériumok értékelését az inkubációs idő megkezdését követően 24 és 72 órát követően is elvégeztük (az anaerob tárolót 72 óra után értékeltük). Ezt követően a kinőtt baktériumokat újabb táptalajokra oltottuk át, majd tekintve, hogy a hőmérsékletek tekintetében nem voltak különbségek a baktériumpopulációk összetételében, ezért 24 °C-on 24 óra elteltével értékeltük őket. Az egyes baktériumokat a szintenyészetekből (Gram szerint megfestve, oxidáz, kataláz) bakteriológiai tesztek segítségével, illetve hemolízis és pigmenttermelés alapján meghatározásra kerültek az Állatorvostudományi Egyetem Járványtani és Mikrobiológiai Tanszékén. A vizsgálatokat dr. Tóth Gergely végezte.

(3) Az antimikrobiális peptidek jelenlétét és esetleges baktericid, vagy bakteriosztatikus hatását két féle képpen próbáltuk igazolni. A harmadik és negyedik mintavételt követően a tamponmintákat olyan véres agart tartalmazó táptalajokra is kikentük, melyekre ezzel egyidőben meghatározott baktériumokat oltottunk. Első esetben a szélesztett baktériumok mellé, majd másodszor közvetlenül rájuk. Ezen baktériumok között halakban előforduló mikrobák, (*Edwardsiella tarda*, *Aeromonas salmonicida*, *Aeromonas hydrophila* és *Vibrio parahaemolyticus*) is voltak, de nem halpatogén baktériumokra is teszteltünk: *Staphylococcus aureus* (ATCC29212), *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli* (ATCC25922). A táptalajokon kinőtt baktériumokat ezután az előzőekhez hasonló módszerekkel 24 és 72 óra elteltével is megvizsgáltuk.

5. EREDMÉNYEK

Az akváriumvízből vett minta nagyszámú vegyes flórát tartalmazott, a tenyésztéses vizsgálatot követően elsősorban *Aeromonas* telepeket lehetett kimutatni. A csapvíz és az autoklávval sterilizett víz is bakteriológiailag negatívnak bizonyult mind 37 °C-on, mind 24 °C-on, 72 órás inkubációs időt követően.

Az anaerob tenyésztés esetében a táptalajokon ugyan néhány *Clostridium*-szerű baktérium is kinőtt (Dr. Tenk Miklós véleménye alapján), de elenyésző számuk a kutatás korai fázisában nem adott elég okot arra, hogy az anaerob tenyésztést folytassuk.

A halak és a rákok nem állandó testhőmérsékletű állatok. Az akvárium vize állandó 24 °C, ezért feltételeztük, hogy a rajtuk lévő flóra hőoptimuma is 24 °C körül van. Ezért a szokásos 37 °C mellett szobahőmérsékleten (illetve 24 °C-os termosztátban) is növesztettük. Utóbbi esetben a baktériumok lassabb növekedést mutattak, de az összetételben változás nem volt. Ez látható a 3. ábrán.



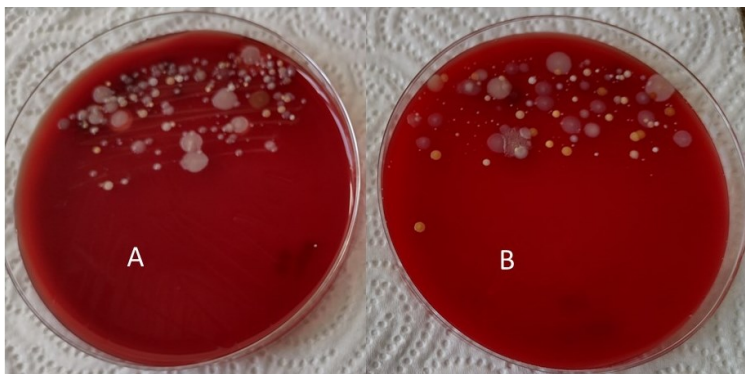
3. ábra: Az első Petri-csésze a 37 °C-on, a második a szobahőmérsékleten inkubált 72 óra alatt kinőtt baktériumtelepeket tartalmazza. A mintákat nem-ikrás rákok haspáncéljáról, steril csapvízes úsztatást követően vettük

A halakról és rákokról vett minták esetében is jól látszott a különbség azon minták között, amik esetében az állatokat a mintavételt megelőzően autoklávozott vízben úsztattunk és amelyek esetében ezt nem tettük meg. Mind a halak szájüregéből, mind az rákok abdominális haspáncéljáról vett minták jóval kevesebb baktériumot tartalmaztak, azokban az esetekben,

ahol az állatokat a mintavételt megelőzően steril csapvízben úsztattuk. A flóra összetételében jelentős változás nem következett be, bár tény, hogy az *Aeromonas*ok nagyobb számban voltak jelen a halak esetében.

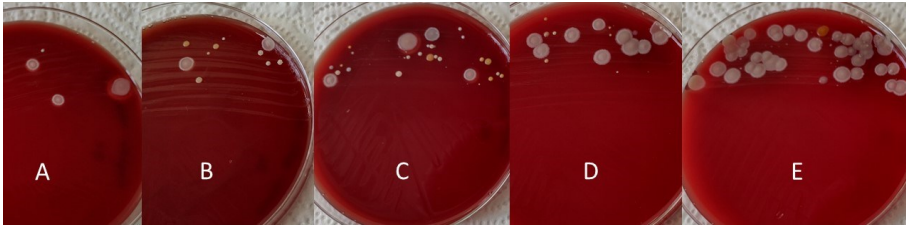
A mintákat három személy vette. Dr. Lőrincz Márta és az általam vett mintákból vegyes mikroflórát lehetett kimutatni. A halak tulajdonosa által vett és beküldött minták mind teljesen negatív eredménnyel zárultak, ezeket a kutatás szempontjából figyelmen kívül hagytuk. A halak szájmikroflóráját és a rákok haspáncélján lévő mikroflóráját mindkét mintavételi módszer esetében elsősorban Gram-pozitív baktériumok jellemzték. A telepmorfológia alapján elkülönítve az uralkodó populáció a *Bacillus*oké volt. Ezeken kívül érdekességként említem, hogy néhány *Clostridium*-szerű baktériumot is sikerült kimutatnunk. Gombákat egyik mintatípus sem tartalmazott.

Az általunk vizsgált módszerekkel a halak esetében nem tudtunk különbséget kimutatni forgató és üres halak (4. ábra), illetve hímek és nőstények szájfloáját összehasonlítva. A képen jól szembetűnik, hogy összetételét tekintve nem lehet különbséget látni a két mintában, viszont a forgató nőstény esetében a sárga pigmentet termelő baktériumok száma megnövekedett.



4. ábra: A) nem forgató nőstény narancsos császársügér szájmikroflórája; B) ugyanezen gaj forgató nőstényének szájmikroflórája. Jól láthatóak a sárga pigmentet termelő baktériumok megnövekedett száma

Ezzel szemben a rákok haspáncéljának flórájában viszont különbség volt a lárvas/ikrás és az üres állatok között (5. ábra). Esetükben ugyan a flóra összetételének beszűkülését nem figyeltük meg, de a kénített baktériumtelepek száma jelentősen csökkent lárvas/ikrás állatokról vett minták esetében.



5. ábra: folyami törperák abdominális páncéljáról vett minta 37 °C-os mintavétel után. A) ikrázás után B) ikrás C) késői ikrás D) lárvás E) ikra nélküli állapotban

A kinőtt baktériumok bakteriológiai vizsgálata alapján patogéneket nem lehetett kimutatni. Sajnos Tóth Gergely további meghatározást nem végzett a dolgozat elkészültéig, emiatt a kinőtt baktériumok fajtát tekintve pontosabb eredményeink nincsenek. Mivel a korábbi mintavételek nagyszámú telepet tartalmaztak, melyeket egyesével elkülöníteni nehézkes lett volna, így ezzel nem próbálkoztunk.

Az antimikrobiális peptidok esetleges baktericid, vagy bakteriosztatikus hatását kétféleképpen vizsgáltuk. Először a vett tamponmintákat a szélesztett baktériumok mellé tettük, de nem közvetlenül a telepekre. Másik esetben a baktériumok szélesztésével egyidőben közvetlenül rájuk kentük a tamponokat. Egyik esetben sem lehetett hatékonyságról beszélni. Bár a *Streptococcus* esetében a baktériumok kezdetben lassabban nőttek AMP-k jelenléte mellett, de 36 óra elteltével már nem látszott különbség a kizárólag *Streptococcus* tartalmazó táptalajhoz viszonyítva. A két nap elteltével tartott ellenőrzés során az AMP-ket tartalmazó minták helyén már apró baktériumtelepeket is meg lehetett figyelni az alap baktériumpopulációk mellett.

6. MEGBESZÉLÉS

A vizsgálataink eredményei alapján egyrészt elmondható, hogy a mintavevő személye, illetve a mintavételezés helyes kivitelezése rendkívül fontos. A hal tulajdonosa által levett és beküldött minták mind negatívak voltak. Az előzőekben Sellyei Boglárkákék által végzett kutatások során valószínűleg a helytelen mintavételezésből adódóan jutottak arra a következtetésre, hogy forgató halak esetében a szájmikroflórát alkotó baktériumok mennyisége lecsökken. A mintavételezés során halak esetében nagyon fontos, hogy a mintavételi pálca a hal szájüregébe kerüljön, a külső felületek érintése nélkül. Ezt követően a szájlóra mintavételezése úgy kell, hogy történjen, hogy a tampon szájüreg falához megfelelő mértékű erővel legyen hozzádörzsölve. Mivel az állatok elég kisméretűek, ezért a tampon mérete sem mindegy. Annak kellően kis fejűnek kell lennie, hogy az a halak száján sérülés okozása nélkül beférjen. Az általunk vizsgált halfajok esetében a COVID-tesztekhez is használt orrtamponok a megfelelő méretűnek bizonyultak, melyek esetében a megfelelő mintavételezést szintén elősegítette, hogy a pálca hajlékony és nem merev, vagy törékeny. Vizsgálatunk során azt tapasztaltuk, hogy a flóra levétele szempontjából a kissé benedvesített vattafej előnyösebb. Ehhez mi steril PBS-t használtunk. Ez fiziológiás sóoldat, pH-ja 7,5, a hőmérséklete pedig szobahőmérsékletű volt. Azt gondolom, hogy a mintavételezés mellett a minták szállításának és a felhasználásig történő tárolásuknak körülményei szintén kritikus pontok lehetnek. A szállítást termodobozban, jégakku mellett végeztük. A mintákat az Érd-Budapest közötti, 30-45 perces igénybevevő autóúton mozgattuk (a kritikus reggeli és délutáni időszakokat elkerültük). A mintákat a laboratóriumba érkezést követően hűtőszekrényben tároltuk, és a lehető legkorábban (az utolsó alkalommal 24 órán belül, a többi esetben egy órán belül) feldolgoztuk.

Kutatásunk során a halak esetében az egyik elsődleges célunk a szájlóra változásának és különbségeinek vizsgálata volt ikrás és ikra nélküli, illetve hím és nőstény állatokat összehasonlítva. Ezért a mintavételezések során nőstények esetén az éppen forgató halak mindegyikéből vettünk mintát. Az irodalmi adatok szerint (Yousri Abdelhafiz és munkatársai, 2021) mennyiségbeli különbségek bizonyosan vannak egyrészt a két nem között, illetve ikrás és ikra nélküli halakban is, de ez az általunk végzett direkt baktériumtenyésztéses módszerrel nem volt megfigyelhető. A továbbiakban a pontosabb mennyiségi eredményekhez, illetve a baktériumok pontosabb meghatározásához mindenképpen szükséges lehet újgenerációs módszerek alkalmazása. Mennyiségi adatokhoz áramlási citométer is igénybe vehető, míg a flóra pontos összetételének meghatározásához Maldi-Tof módszer (Mátrix segített lézer

deszorpció és ionizáció – repülési idő analizátor, azaz egy olyan vizsgálómódszer, mellyel a kinőtt baktériumtelepek közvetlenül fajsztig meghatározhatóak), illetve a pigmenttermelés és a rezisztenciák vizsgálatához pedig szekvenciaadatok szükségesek. Mivel a vizsgálatokra pályázatunk nem volt, ezért anyagilag sem tudtunk túl sokat ráfordítani. Remélhetőleg, ha a kutatás tovább folytatódik, ilyen jellegű vizsgálatokra is sor kerül. Ugyan a rákok esetében ezzel a témával kapcsolatban Sellyei Boglárkákék előzetes megfigyeléseket nem tettek, mi úgy gondoltuk indokolt lehet ezen állatok tanulmányozása is. Esetükben azt tapasztaltuk, hogy az ikrás/lárvás rákokról vett mintáknál kevesebb telepformáló egységet lehet látni a táptalajokon, mint az utódok nélküli egyedekről vett mintáknál.

A flóra összetételbeli változása egyik esetben sem volt megfigyelhető. Ugyanazon baktériumokat lehetett kitenyészteni a hordozó és nem hordozó rákokból, illetve forgató és nem forgató halakból is. Valószínűleg ezen az eredményen szintén változtatna, ha a mintákat új generációs módszerekkel vizsgálnánk ki. Arra gondoltunk, hogy később érdemes lenne megvizsgálni egy állaton a szájfóra összetételét közvetlenül az ikrázás előtt, szájköltés alkalmával, és a lárvák elengedése után is. Ebben a vizsgálatban talán többet tudhatnánk meg a flóra változékonyságáról. Ez a vizsgálat valószínűleg időigényesebb és nehezebben kivitelezhető lenne, mivel korábbi megfigyelések és a haltartó elmondása alapján azok az állatok, amelyekkel az ikrákat előzőleg kiköpettük, nem mindig veszik fel őket újra. Emiatt a vizsgálat elvégzése több halat igényelne, hogy minél több szaporodási ciklus megfigyelése és nyomonkövetése lehetséges legyen.

A flóra összetétele az összes állatfaj esetében és mindkét mintavételi módszer tekintetében vegyes volt, elsősorban Bacillusokat tartalmazott. Ezek a baktériumok nagyon jellegzetes telepmorfológiával rendelkeznek és különböző pigmenteket is termelnek. Irodalmi adatok bizonyítják, hogy esetükben a pigmenttermelés elsősorban különböző stresszhatások esetén történik, emellett pedig antibakteriális, daganatellenes és gombaellenes hatásuk is lehet, mely tulajdonságaikat már a gyógyszeriparban is elkezdték kihasználni (Agarwal és munkatársai 2023).

Tóth Gergely elmondása szerint halakra patogén baktériumok, melyek között előfordulnak Gram-pozitívok és Gram-negatívok is, nem voltak megfigyelhetőek az általunk kitenyészített baktériumok között. A legfontosabb Gram-pozitív patogén baktériumok az *Erysipelothrix rhusiopathae*, egyes Mycobacteriumok (ezek zoonótikus megbetegedéseket is okozhatnak, ezért nagy jelentőségűnek tekinthetők) és a *Renibacterium salmoninarum* (elsősorban lazacfélék vesebetegségét okozó, 2006 óta nem OIE listás betegség, mivel

elterjedését csökkenni látják, bár kétséges adatok vannak ezzel kapcsolatosan a szakirodalomban (Nance és munkatársai, 2010; Mahony és munkatársai 2017). Előbbiekhez képest a Gram-negatív, halakban megbetegedést okozó baktériumfajok közül sokkal több fordul elő a magyarországi természetes vizekben. Ezek között a leggyakrabban az egyes *Salmonella* fajok, az *Aeromonas (A.) salmonicida*, az *A. hydrophila*, a *Yersinia ruckeri*, a *Flavobacterium columnare* és a *Pseudomonas fluorescens*. Ugyan a flóra beszűkülését nem tudtuk bizonyítani, de az biztos, hogy ezekben az állatokban a mikroflóra jellemzően nem a Gram-negatív *Proteobacteria* törzsbe tartozott. Az irodalom alapján a nílusi tilápián *Proteobacteria* (Gram szerint festve negatív), *Bacteroidetes* (Gram negatív), *Firmicutes* (Gram pozitív), *Deinococcus* (Gram pozitív), *Actinobacteria* (Gram pozitív) és *Acidobacteria* (Gram negatív) törzsek találhatóak fiziológiai körülmények között (Kuebutornye és mtsai., 2020; Sakyi és mtsai., 2020). Eredményeink szerint a telepmorfológia alapján az uralkodó populáció a *Bacillusoké* volt, melyek Gram szerint festve pozitív baktériumok. Ezek a baktériumok nagyon jellegzetes telepmorfológiát és különböző pigmentet is termelnek. Irodalmi adatok bizonyítják, hogy a pigmentek (Agarwal és mtsai, 2023) ugyan elsősorban stresszre termelődnek, de antibakteriális, daganatellenes és gombaellenes hatásuk is lehet, melyet a gyógyszeripar is kezd használni. Elképzelhető, hogy ezek miatt a populációból a *Saprolegnia parasitica* gombák kiszorultak. Ezek a leggyakoribb édesvízi penészgombák, melyek az ikrapenész nevű megbetegedést okozzák (Erdei és mtsai, 2023). A tulajdonos elmondása alapján ikrapenésszel nem is találkozott a szájköltés során. Amikor Sellyei a halak szájflóráját vizsgálta a kimosott, nem élő ikrák esetében sem talált penészt, melyet tovább tartottak akváriumvízben. Ezután hamar megjelent az ikrapenész. Ezen eredményeket érdemes lehet tovább vizsgálni, ami miatt kutatócsoportunk fel is kereste az Állatorvostudományi Kutatóintézet Halparazitológia Témacsoportját, akik a vízpenészekkel foglalkoznak.

Az eddig is ismert volt, hogy számos halfaj rendelkezik lektinokkal (Wang és munkatársai 2021; Zhang és munkatársai, 2020). Ezek a fehérjék az immunrendszer mintázatfelismerő rendszerének részei, és olyan cukorszerű molekulákat ismernek fel, melyek aktivitása Gram-pozitív és negatív baktériumok felismerésében is hatásos (Capaldi et al., 2015). A nílusi sügér által termelt lektinról például megállapították, hogy mind az *A. hydrophila* és *Streptococcus agalactiae* ellen hatásosan aktiválja a veleszületett immunrendszert (Niu et al., 2021). Igaz, a nílusi sügér nem szájköltő hal, az ivadékok védelméről habfészek készítésével gondoskodik. Az *Oplegnathus punctatus* nevű hal egyik lektinjéről kiderült, hogy *Vibriok* ellen is hatékony antibakteriális anyag (Zhang et al., 2020). A halpenész és a rákpestisként is ismert

vízipénészek képesek hatalmas pusztítást végezni a fiatal állatok körében (Philips et al., 2008). Bizonyos lektinek ezekkel szemben is hatékonyak bizonyulnak (Wang et al., 2021). Szintén ismert tény, hogy a halak mellett a rákok is rendelkeznek ezen védekezőmolekulákkal. A *Metapenaeus dobsoni* garnéla rendelkezik egy lektinnel, amely antibakteriális hatással rendelkezik olyan halpatogének ellen, mint a *Aeromonas hydrophila*, *Enterococcus fecalis* és a *Streptococcus iniae* (*Rubeena*).

Összegezve elmondhatjuk, hogy a vizsgálataink során egy főleg *Bacillusokból* álló flórát tapasztaltunk a halak szájüregében. Ez eltér a szakirodalomban talált adatoktól. Véleményünk szerint tekintve, hogy szájköltő halak esetében a költés időszaka egy jelentős stresszfaktorként hat az állatra, ezen szájköltő életmód és a *Bacillusok* elszaporodása, illetve pigmenttermelő tulajdonsága között lehet, hogy párhuzam vonható. Ez akár hozzásegítheti a halat a patogének elleni hatékonyabb védekezésben és ezáltal egy mikrobiális védelem nyújtásához az utódok számára. Ugyanakkor a mikroflóra mennyiségi és minőségi paramétereit tekintve nem sikerült különbséget kimutatnunk ikrás és ikra nélküli állatokat összehasonlítva. Valószínűleg eredményesebb lenne a jövőbeni vizsgálatokat érzékenyebb, új generációs módszerekkel elvégezni.

Az antimikrobiális peptidek vizsgálatának esetében nem sikerült baktericid, vagy bakteriosztatikus hatásukat igazolni. Ebből arra következtetünk, hogy vagy a mintavétel nem volt megfelelő, vagy annyira kis mennyiségben termelődnek, hogy hatásukat az általunk végzett módszerekkel nem sikerült detektálni. Lehetséges, hogy a nyálkát az általunk okozott enyhe nyomással nem lehetett megfelelő mennyiségben eltávolítani, ezért a további vizsgálatok során erősebb dörzsölésre, vagy fokozott nyálkatermelés kiváltására van szükség, hogy pontosabb eredményekhez jussunk. Természetesen a vizsgálati módszerek érzékenyítése is egy jó megoldás lehet. Egy általunk javasolt lehetséges megoldás lenne, hogy a nyálka eltávolítása után, azt egy 22 mikronos szűrőn átszűrve, bekoncentrálva vizsgáljuk a benne lévő AMP-k esetleges hatásait.

[PG1] megjegyzést írt: Még hiányzik: Tartalomjegyzék, rövidítések, köszönetnyilvánítás, hivatkozások egységesítése, képek+feliratozásuk

7. ÖSSZEGZÉS

Az állatvilágban rengeteg faj esetében találkozunk az ivadék gondozás és a szülői gondoskodó magatartás különféle változataival. Ezen belül halaknál és rákoknál is megfigyelhetők olyan fajok, melyek az utódaik védelmének érdekében saját testüket veszik igénybe. A szájköltő halak csoportjába tartozók például a szájúregüket használják védelmi eszközként az ivadékaik számára, míg bizonyos rákfajok abdominális régiójuk alatt rejtik el és védik meg ikráikat mindaddig, amíg azok el nem érnek egy megfelelő fejlettségi szintet. Ez a szülői viselkedés feltételezhetően kettős előnyt biztosít az utódok számára. Egyrészt, a fizikai védelem révén az ivadékok hatékonyabban képesek elkerülni a ragadozók támadásait, ami növeli túlélési esélyeiket. Másrészt, valószínű, hogy ennek a védelmi mechanizmusnak kémiai vonatkozásai is vannak, ahol vélelmezhetőleg az antimikrobiális peptidok kulcsfontosságú szerepet játszhatnak.

Az antimikrobiális peptidok kis molekulatömegű, kevés aminosav alkotta, mikroba ellenes hatású peptidok. Az immunrendszer részeként feladatuk a szervezet fertőzéseknek különösen kitett területeinek fertőtlenítése, mint amilyen például a szem, a bélcsatorna vagy az urogenitális traktus. Patogén baktériumokra kifejtett antibiotikus hatásuk révén befolyásolhatják a mikroflóra mennyiségi jellemzőit és hatással lehetnek ezen mikrobiális közösségek strukturális tulajdonságaira is.

Kutatásunk során *Cyprichromis leptosoma* és *Aulonocara OB* szájköltő sügerek szájúregének, valamint *Cambarellus patzcuarensis* rákok abdominális régiójának felszínén található mikroflórát tanulmányoztuk ikrás és ikra nélküli állatokban egyaránt. Ezen kívül vizsgálatokat végeztünk az ezen területekről vett minták esetleges baktériumellenes hatásáról is. A kísérletek során tamponmintákat vettünk az állatokból, ezeket bakteriológiai táptalajokra szélesztettük, vagy a minta meghatározott baktériumokra kifejtett gátlóhatását vizsgáltuk. A táptalajokon kinőtt baktériumokat különféle bakteriológiai módszerekkel meghatároztuk.

Vizsgálataink elsősorban *Bacillus*okból álló flórát állapított meg a halak szájúregében és a rákok abdominális páncélján is. A kitenyészett baktériumok egy része élénk pigmenttermelést is mutatott. Az ikrázás és az azt követő költés időszaka stresszként hathat az állatra. Ezért gondoljuk, hogy a flóra az irodalmi adatoktól eltér, és pigmenttermelés jelentkezik. Irodalmi adatokra alapozva ez segíthet a hatékony védekezésben.

Az antimikrobiális peptidek vizsgálatának esetében nem sikerült baktericid, vagy bakteriosztatikus hatásukat igazolni. Feltételezhetően a kis mennyiség és a nem megfelelő mintavétel is hozzájárulhatott a sikertelenséghez.

SUMMARY

In the animal kingdom, various species exhibit diverse forms of parental care and nurturing behavior. Among these, certain fish and crustaceans employ unique strategies using their own bodies to protect their offspring. Mouthbrooding fish, for instance, utilize their oral cavities as a defensive mechanism for the protection of their offspring, while specific crab species conceal and safeguard their eggs beneath their abdominal region until they reach an appropriate developmental stage. This parental behavior is presumed to provide dual advantages for the offspring. Firstly, through physical protection, the offspring can more effectively avoid predation, enhancing their chances of survival. Secondly, it is likely that this defense mechanism has chemical implications, where we believe that antimicrobial peptides play a crucial role.

Antimicrobial peptides are relatively small molecules, with microbiodical properties, consisting only a few amino-acids. As components of the immune system, their function involves disinfecting areas of the body that are particularly exposed to infections, such as the eyes, gastrointestinal tract, or urogenital tract. Through their expressed antibiotic effects against pathogens, they can influence the quantitative characteristics of microbial flora and impact the structural properties of these microbial communities.

In our research, we studied the microbial flora present in the oral cavity of mouthbrooding perch species *Cyprichromis leptosoma* and *Aulonocara OB* as well as on the surface of the abdominal region of *Cambarellus patzcuarensis* crayfish, in both egg-carrying and nonegg-carrying individuals. Additionally, we conducted investigations on the potential antibacterial effects of samples collected from these areas. During the experiments, we took swab samples from the animals, placed them onto bacteriological media, and also assessed the inhibitory effects of the samples against specific bacteria. After this the bacteria grown on the media were identified using various bacteriological methods.

Our studies have identified a flora of mainly *Bacillus* in the oral cavity of fish and on the abdominal shell of crabs. Some of the cultured bacteria also showed a vibrant pigment production. The period of spawning and subsequent hatching can be stressful. Therefore, it is thought that the flora differs from the literature and pigment production occurs. Based on literature data, this may help in effective control.

The antimicrobial peptides have not been shown to have bactericidal or bacteriostatic activity. Presumably, the small amount and inadequate sampling may have contributed to the failure.

8. FELHASZNÁLT IRODALOM

Austin, B. (2006) The bacterial microflora of fish, revised. *TheScientificWorldJOURNAL* 6, 931–934. DOI 10.1100/tsw.2006.181.

Ekman, E., Borjeson, H., and Johansson, N. (1999) *Flavobacterium psychrophilum* in Baltic salmon *Salmo salar* brood fish and their offspring. *Dis. Aquat. Org.* 37, 159–163.

El-Shafai, S.A., Gijzen, H.J., Nasr, F.A., and El-Gohary, F.A. (2004) Microbial quality of tilapia reared in fecalcontaminated ponds. *Environ. Res.* 95, 231–238.

Olafsen, J.A. (2001) Interactions between fish larvae and bacteria in marine aquaculture. *Aquaculture* 200, 223–247.

Burr, G., Gatlin, S., and Ricke, S. (2005) Microbial ecology of the gastrointestinal tract of fish and the potential application of prebiotics and probiotics in finfish aquaculture. *J. World Aquacult. Soc.* 36, 425–436.

Austin, B. and Austin, D.A. (1987) *Bacterial Fish Pathogens, Disease of Farmed and Wild Fish*. Ellis Horwood, Chichester.

Raquel S. Peixoto, Derek M. Harkins, Karen E. Nelson *Annual Review of Animal Biosciences* 2021 9:1, 289-311

Montes, M., Perez, M.J., and Nieto, T.P. (1999) Numerical taxonomy of gram-negative, facultative anaerobic bacteria isolated from skin of turbot (*Scophthalmus maximus*) and surrounding water. *Syst. Appl. Microbiol.* 22, 604–618.

Moran, D., Turner, S.J., and Clements, J.D. (2005) Ontogenetic development of the gastrointestinal microbiota in the marine herbivorous fish *Kyphosus sydneyanus*. *Microb. Ecol.* 49, 590–597.

Del Rio Rodriguez, R.E., Inglis, V., and Millar, S.D. (1997) Survival of *Escherichia coli* in the intestine of fish. *Aquacult. Res.* 28, 257–264.

Keenleyside, M. H. A. 1991. Parental care. Pp. 191–208 in M. H. A. Keenleyside, ed. *Cichlid fishes: behaviour, ecology and evolution*. Chapman & Hall, Cambridge

Grone, B. P., R. E. Carpenter, M. Lee, K. P. Maruska, and R. D. Fernald. 2012. Food deprivation explains effects of mouthbrooding on ovaries and steroid hormones, but not brain neuropeptide and receptor mRNAs, in an African cichlid fish. *Horm. Behav.* 62:18–26.

Goodwin, N. B., S. Balshine-Earn, and J. D. Reynolds. 1998. Evolutionary transitions in parental care in cichlid fish. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 265:2265–2272.

Ghalambor, C. K., D. N. Reznick, and J. A. Walker. 2004. Constraints on adaptive evolution: the functional trade-off between reproduction and fast-start swimming performance in the Trinidadian guppy (*Poecilia reticulata*). *Am. Nat.* 164:38–50

Trumbo, S. T. 2007. Defending young biparentally: female risk-taking with and without a male in the burying beetle, *Nicrophorus pustulatus*. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 61:1717–1723. Springer, Berlin, Germany.

Knowles, S. C. L., S. Nakagawa, and B. C. Sheldon. 2009. Elevated reproductive effort increases blood parasitaemia and decreases immune function in birds: a meta-regression approach. *Funct. Ecol.* 23:405–415.

Reardon, E. E., and L. J. Chapman. 2010. Hypoxia and energetics of mouth brooding: is parental care a costly affair? *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 156:400–406.

Keller, I. S., W. Salzburger, and O. Roth. 2017. Parental investment matters for maternal and offspring immune defense in the mouthbrooding cichlid *Astatotilapia burtoni*. *BMC Evol. Biol.* 17:264.

Abecia, J. E., Luiz, O. J., Crook, D. A., Banks, S. C., Wedd, D. J., & King, A. J. (2022). Morphological changes and reproductive costs in brooders of two mouthbrooding freshwater fishes. *Ecology of Freshwater Fish*, 31, 369–378.

Trivers, R. L. 1972. Parental investment and sexual selection. Pp. 136–179 in B. Campbell, ed. *Sexual selection and the descent of man*. Aldine Publishing Company, Chicago, Illinois.

Lessells, C. M. 1998. A theoretical framework for sex-biased parental care. *Anim. Behav.* 56:395–407.

- Stearns, S. C. 1987. The selection-arena hypothesis. Pp. 337–355 in S. C. Stearns, ed. *The evolution of sex and its consequences*. Birkhauser Verlag, Basel and Boston.
- French, S. S., D. F. Denardo, and M. C. Moore. 2007. Trade-offs between the reproductive and immune systems: facultative responses to resources or obligate responses to reproduction? *Am. Nat.* 170:79–89.
- Bourgeon, S., Y. Le Maho, and T. Raclot. 2009. Proximate and ultimate mechanisms underlying immunosuppression during the incubation fast in female eiders: roles of triiodothyronine and corticosterone. *Gen. Comp. Endocrinol.* 163:77–82.
- Reavey, C. E., N. D. Warnock, H. Vogel, and S. C. Cotter. 2014. Tradeoffs between personal immunity and reproduction in the burying beetle, *Nicrophorus vespilloides*. *Behav. Ecol.* 25:415–423.
- Bateman, A. J. 1948. Intra-sexual selection in *Drosophila*. *Heredity* 2:349–368.
- Clutton-Brock, T. 1991. *The evolution of parental care*. Princeton Univ. Press, Princeton.
- Kurtz, J., A. Wiesner, P. Gotz, and K. P. Sauer. 2000. Gender differences and individual variation in the immune system of the scorpionfly *Panorpa vulgaris* (Insecta: Mecoptera). *Dev. Comp. Immunol.* 24:1–12.
- Siva-Jothy, M. T. 2000. A mechanistic link between parasite resistance and expression of a sexually selected trait in a damselfly. *Proc. Biol. Sci.* 267:2523–2527.
- Rolff, J. 2002. Bateman's principle and immunity. *Proc. R Soc. B Biol. Sci.* 269:867–872.
- Roth, O., and J. Kurtz. 2008. The stimulation of immune defence accelerates development in the red flour beetle (*Tribolium castaneum*). *J. Evol. Biol.* 21:1703–1710.
- Tort, L., J. C. Balasch, and S. Mackenzie. 2003. Fish immune system. A crossroads between innate and adaptive responses. *Trends Immunol.* 22:277–286.
- Salinas, I. 2015. The mucosal immune system of teleost fish. *Biology* 4:525–539.
- Gomez, D., J. O. Sunyer, and I. Salinas. 2013. The mucosal immune system of fish: the evolution of tolerating commensals while fighting pathogens. *Fish Shellfish Immunol.* 35:1729–1739.
- Maynard, C. L., C. O. Elson, R. D. Hatton, and C. T. Weaver. 2012. Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. *Nature* 489:231–241.

Llewellyn, M. S., S. Boutin, S. H. Hoseinifar, and N. Derome. 2014. Teleost microbiomes: the state of the art in their characterization, manipulation and importance in aquaculture and fisheries. *Front. Microbiol.* 5:1–1.

Bailey, M. T., S. E. Dowd, J. D. Galley, A. R. Hufnagle, R. G. Allen, and M. Lyte. 2011. Exposure to a social stressor alters the structure of the intestinal microbiota: implications for stressor-induced immunomodulation. *Brain. Behav. Immun.* 25:397–407.

Levin, I. I., D. M. Zonana, B. K. Fosdick, S. J. Song, R. Knight, R. J. Safran, and I. I. Levin. 2016. Stress response, gut microbial diversity and sexual signals correlate with social interactions. *Biol. Lett.* 12:pii: 20160352.

Keller, IS et al. (2018): Effects of parental care on resource allocation into immune defense and buccal microbiota in mouthbrooding cichlid fishes. *Evolution*, 72(5), 1109-1123,

Larsen, A., Z. Tao, S. A. Bullard, and C. R. Arias. 2013. Diversity of the skin microbiota of fishes: evidence for host species specificity. *FEMS Microbiol. Ecol.* 85:483–494.

Josh J Faber-Hammond, Kaitlin P Coyle, Shannon K Bacheller, Cameron G Roberts, Jay L Mellies, Reade B Roberts, Suzy C P Renn, The intestinal environment as an evolutionary adaptation to mouthbrooding in the *Astatotilapia burtoni* cichlid, *FEMS Microbiology Ecology*, Volume 95, Issue 3, March 2019, fiz016,

McFall-Ngai M, Hadfield MG, Bosch TCG et al. Animals in a bacterial world, a new imperative for the life sciences. *PNAS* 2013;110:3229–36.

Chong K, Joshi S, Jin LT et al. Proteomics profiling of epidermal mucus secretion of a cichlid (*Symphysodon aequifasciata*) demonstrating parental care behavior. *Proteomics* 2006;6:2251–8.

Iq KC, Shu-Chien AC. Proteomics of buccal cavity mucus in female tilapia fish (*Oreochromis* spp.): a comparison between parental and non-parental fish. *PLoS One* 2011;6:e18555.

Torati LS, Migaud H, Doherty MK et al. Comparative proteome and peptidome analysis of the cephalic fluid secreted by *Arapaima gigas* (Teleostei: Osteoglossidae) during and outside parental care. *PLoS One* 2017;12:e0186692.

Smith C, Wootton RJ (1995) The costs of parental care in teleost fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 5: 7–22.

Gross MR, Sargent RC (1985) The evolution of male and female parental care in fishes. *American Zoology* 25: 807–822.

Shaw ES, Aronson LR (1954) Oral incubation in *Tilapia macrocephala*. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 103: 375–416.

Schurch R, Taborsky B (2005) The functional significance of buccal feeding in the mouthbrooding cichlid *Tropheus moorii*. *Behaviour* 142: 265–281.

Subasinghe RP (1993) Effects of immunosuppression on protection of fry from *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet 1876 during mouthbrooding of *Oreochromis mossambicus* (Peters). *Fish & Shellfish Immunology* 3: 97–105.

Sin YM, Ling KH, Lam TJ (1994) Passive transfer of protective immunity against ichthyophthiriasis from vaccinated mother to fry in tilapias, *Oreochromis aureus*. *Aquaculture* 120: 229–237.

Kishida M, Specker JL (2000) Paternal mouthbrooding in the black-chinned tilapia, *Sarotherodon melanotheron* (Pisces: Cichlidae): changes in gonadal steroids and potential for vitellogenin transfer to larvae. *Hormones and Behavior* 37: 40–48.

Fisher WS, Clark WH (1983) Eggs of *Palaemon macrodactylus*. I. Attachment to the pleopods and formation of the outer investment coat. *Biological Bulletin* 164: 189–200

Sender, R., Fuchs, S., & Milo, R. (2016). Are We Really Vastly Outnumbered? Revisiting the Ratio of Bacterial to Host Cells in Humans. *Cell*, 164(3), 337–340. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.01.013>

Abdelhafiz Y, Fernandes JMO, Stefani E, Albanese D, Donati C, Kiron V. Power Play of Commensal Bacteria in the Buccal Cavity of Female Nile Tilapia. *Front Microbiol.* 2021 Nov 16;12:773351. doi: 10.3389/fmicb.2021.773351. PMID: 34867911; PMCID: PMC8636895.

Maki, K. A., Kazmi, N., Barb, J. J., and Ames, N. (2021). The oral and gut bacterial microbiomes: similarities, differences, and connections. *Biol. Res. Nurs.* 23, 7–20. doi: 10.1177/1099800420941606

Caselli, E., Fabbri, C., D'Accolti, M., Soffritti, I., Bassi, C., Mazzacane, S., et al. (2020). Defining the oral microbiome by whole-genome sequencing and resistome analysis: the complexity of the healthy picture. *BMC Microbiol.* 20:1801. doi: 10.1186/s12866-020-01801-y

- Kuebutornye, F. K. A., Wang, Z., Lu, Y., Abarike, E. D., Sakyi, M. E., Li, Y., et al. (2020). Effects of three host-associated *Bacillus* species on mucosal immunity and gut health of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* and its resistance against *Aeromonas hydrophila* infection. *Fish Shellfish Immunol.* 97, 83–95. doi: 10.1016/j.fsi.2019.12.046
- Sakyi, M. E., Cai, J., Tang, J., Abarike, E. D., Xia, L., Li, P., et al. (2020). Effects of starvation and subsequent re-feeding on intestinal microbiota, and metabolic responses in Nile tilapia. *Oreochromis niloticus Aquac. Rep.* 17:100370. doi: 10.1016/j.aqrep.2020.100370
- Giatsis, C., Sipkema, D., Smidt, H., Heilig, H., Benvenuti, G., Verreth, J., et al. (2015). The impact of rearing environment on the development of gut microbiota in tilapia larvae. *Sci. Rep.* 5:18206. doi: 10.1038/srep18206
- Souza, F. P. D., Lima, E. C. S., Urrea-Rojas, A. M., Suphoronski, S. A., Facimoto, C. T., Bezerra Junior, J. D. S., et al. (2020). Effects of dietary supplementation with a microalga (*Schizochytrium* sp.) on the hemato-immunological, and intestinal histological parameters and gut microbiota of Nile tilapia in net cages. *PLoS One* 15:e0226977. doi: 10.1371/journal.pone.0226977
- Yukgehnaish, K., Kumar, P., Sivachandran, P., Marimuthu, K., Arshad, A., Paray, B. A., et al. (2020). Gut microbiota metagenomics in aquaculture: factors influencing gut microbiome and its physiological role in fish. *Rev. Aquac.* 12, 1903–1927. doi: 10.1111/raq.12416
- Boulenger, G. A. (1898a). Report on the fishes recently obtained by Mr. J. E. S. Moore in Lake Tanganyika. *Proceedings of the Zoological Society of London*, 494–497.
- Jia Zhao & Jian Gao (2015): Complete mitochondrial genome of *Aulonocara stuartgranti* (Flavescent peacock cichlid), Mitochondrial DNA
- Hobbs, Horton H. "Two New Species of Crayfishes of the Genus *Cambarellus* from the Gulf Coastal States, With a Key to the Species of the Genus (Decapoda, Astacidae)." *The American Midland Naturalist*, vol. 34, no. 2, 1945, pp. 466–74. *JSTOR*,
- Kawai T, Faulkes Z, Scholtz G. 2015. *Freshwater Crayfish: A global overview*. Florida: CRC Press 679 p
- Cebra, J.J., Jinag, H.-Q., Sterzl, J., Tlaskalova-Hogenova, H. In *Mucosal Immunology*, Ogra, P.L., Mestecky, J., Lamm, M.E., Strober, W., Bienenstock, J., McGhee, J.R. Eds., Academic Press: New York, 1999, pp267-280.

- Yano, T. (1996) The Nonspecific Immune System: Humoral Defense. In: Iwama, G. and Nakanishi, T., Eds., *The Fish Immune System*, Academic Press, San Diego, 106-157.
- Ellis, A. E. (1999). *Immunity to bacteria in fish. Fish & Shellfish Immunology*, 9(4), 291–308.
- Ellis, A. . (2001). *Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. Developmental & Comparative Immunology*, 25(8-9), 827–839.
- Morishima, I., Suginaka, S., Ueno, T., & Hirano, H. (1990). *Isolation and structure of cecropins, inducible antibacterial peptides, from the silkworm, Bombyx mori. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 95(3), 551–554.
- Selsted, M.E., S.S Harwig, T. Ganz, J.W. Schilling and R.I. Lehrer. 1985. *Primary structures of three human neutrophil defensins. Journal of Clinical Investigation* 76:1436-1439.
- Zasloff, M. (1987). *Magainins, a class of antimicrobial peptides from Xenopus skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(15), 5449–5453.
- Lazarovici, P., Primor, N., & Loew, L. M. (1986). *Purification and pore-forming activity of two hydrophobic polypeptides from the secretion of the Red Sea Moses sole (Pardachirus marmoratus). Journal of Biological Chemistry*, 261(35), 16704–16713.
- THOMPSON, S. A., TACHIBANA, K., NAKANISHI, K., & KUBOTA, I. (1986). *Melittin-Like Peptides from the Shark-Repelling Defense Secretion of the Sole Pardachirus pavoninus. Science*, 233(4761), 341–343.
- Devine, D., & Hancock, R. (2002). *Cationic Peptides: Distribution and Mechanisms of Resistance. Current Pharmaceutical Design*, 8(9), 703–714.
- Hancock, R. E. W., Falla, T., & Brown, M. (1995). *Cationic Bactericidal Peptides. Advances in Microbial Physiology*, 135–175.
- Zasloff, M. (2002). *Antimicrobial peptides of multicellular organisms. Nature*, 415(6870), 389–395.
- Nance, S. L., Riederer, M., Zubkowski, T., Trudel, M., & Rhodes, L. D. (2010). Interpreting dual ELISA and qPCR data for bacterial kidney disease of salmonids. *Diseases of aquatic organisms*, 91(2), 113–119. <https://doi.org/10.3354/dao02252>

Mahony, A. M., Johnson, S. C., Neville, C. M., Thiess, M. E., & Jones, S. R. M. (2017). Myxobolus arcticus and Parvicapsula minibicornis infections in sockeye salmon Oncorhynchus nerka following downstream migration in British Columbia. *Diseases of aquatic organisms*, 126(2), 89–98.

Agarwal, H., Bajpai, S., Mishra, A., Kohli, I., Varma, A., Fouillaud, M., Dufossé, L., & Joshi, N. C. (2023). Bacterial Pigments and Their Multifaceted Roles in Contemporary Biotechnology and Pharmacological Applications. *Microorganisms*, 11(3), 614.

Wang, H., Li, D., Fan, M. *et al.* Identification and expression analysis of Ricin B-like lectin genes in the fish pathogen *Saprolegnia parasitica*. *Aquacult Int* 29, 1853–1868 (2021).

Zhang, K., Liu, X., Li, X., Liu, Y., Yu, H., Liu, J., & Zhang, Q. (2020). Antibacterial functions of a novel fish-egg lectin from spotted knifejaw (*Oplegnathus punctatus*) during host defense immune responses. *Developmental and comparative immunology*, 111, 103758.

Capaldi, S., Faggion, B., Carrizo, M. E., Destefanis, L., Gonzalez, M. C., Perduca, M., Bovi, M., Galliano, M., & Monaco, H. L. (2015). Three-dimensional structure and ligand-binding site of carp fishellectin (FEL). *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, 71(Pt 5), 1123–1135.

Niu J., Luo G., Liu X., Huang Y., Tang J., Wang B., Lu Y., Cai J., Jian J. Characterization and functional analysis of a galectin-related protein B from Nile tilapia involved in the immune response to bacterial infection. *J. Fish Dis.* 2021;44:171–180.

Phillips AJ, Anderson VL, Robertson EJ, Secombes CJ, van West P (2008) New insights into animal pathogenic oomycetes. *Trends in Microbiology* 16:13–19.

Peterson, J., Garges, S., Giovanni, M., McInnes, P., Wang, L., Schloss, J. A., Bonazzi, V., McEwen, J. E., Wetterstrand, K. A., Deal, C., Baker, C. C., Di Francesco, V., Howcroft, T. K., Karp, R. W., Lunsford, R. D., Wellington, C. R., Belachew, T., Wright, M., ... Guyer, M. (2009). *The NIH Human Microbiome Project. Genome Research*, 19(12), 2317–2323.

Glas, P. S., Courtney, L. A., Rayburn, J. R., & Fisher, W. S. (1997). Embryonic Coat of the Grass Shrimp *Palaemonetes pugio*. *The Biological bulletin*, 192(2), 231–242.

Martín-Peláez S, Cano-Ibáñez N, Pinto-Gallardo M, Amezcua-Prieto C. The Impact of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics during Pregnancy or Lactation on the Intestinal Microbiota of Children Born by Cesarean Section: A Systematic Review. *Nutrients*. 2022 Jan 14;14(2):341.

Erdei, N., Hardy, T., Verebélyi, V., Weiperth, A., Baska, F., & Eszterbauer, E. (2023). New Insights into the Morphological Diversity of *Saprolegnia parasitica* (Oomycota) Strains under In Vitro Culture Conditions. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*, 9(10), 982.

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném megköszönni mindenekelőtt témavezetőmnek, Dr. Lőrincz Mártának az általa nyújtott szakmai és emberi támogatást, illetve, hogy lehetővé tette számomra, hogy részt vegyek ebben a kutatásban. Köszönöm Dr. Tenk Miklósnak, hogy befogadta a témámat és engedélyezte a Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék laboratóriumainak használatát.

Szeretném megköszönni a Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék munkatársainak a kutatás során nyújtott segítséget, kiváltképp Tóth Gergelynek, aki a minták kiértékelésével járult hozzá a dolgozat elkészüléséhez.

Köszönettel tartozom Adorján Gábornak, amiért biztosította számunkra a kísérleti állatokat, illetve segítséget nyújtott a mintavételek során.