

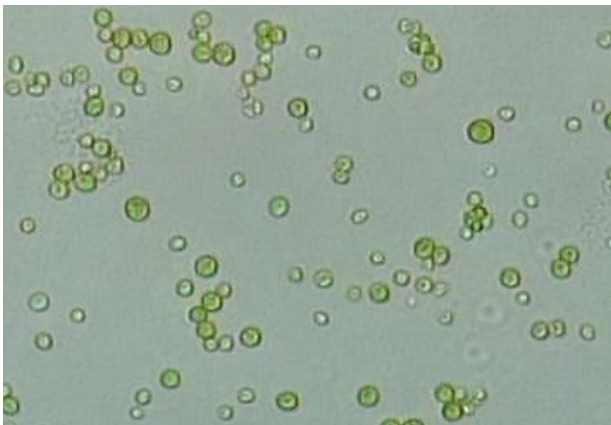
Mikroalgák immunstimuláló hatásának vizsgálata *in vitro* és *in vivo* módszerekkel gazdasági szempontból fontos halfajokon

Ardó László¹, Berecz Orsolya¹, Szűcs Anita¹, Dergez Ágnes², Ughy Bettina³, Kóbori Ottilia², Jeney Galina¹,
Jakabné Sándor Zsuzsanna¹

¹: Nemzeti Agrárkutatási és Innovációs Központ, Halászati Kutatóintézet (NAIK-HAKI), 5540 Szarvas, Anna-liget u. 35.

²: Bay Zoltán Alkalmazott Kutatási Nonprofit Kft. (BAY-BIO), 6726 Szeged, Derkovits fasor 2.

³: Magyar Tudományos Akadémia, Szegedi Biológiai Központ, Növénybiológiai Intézet (MTA-SZBK), 6726 Szeged, Temesvári krt. 62.



A fertőző halbetegségek elleni védekezés hagyományos módszerei

1. Antibiotikumok és kemoterápiás szerek:

- Felhalmozódhatnak a halhúsban és a vízi környezetben
- Alkalmazásuk magában hordozza a rezisztens baktériumok kialakulásának lehetőségét
- Használatukat az Európai Unió országaiban korlátozzák vagy tiltják

2. Oltóanyagok (vakcinák):

- A specifikus immunválaszt erősítik
- Egy vakcina általában csak egy adott kórokozó ellen hatásos
- Több olyan patogén baktérium is van, amelynek sok különböző törzse létezik, és nincs olyan vakcina, amely mindegyik ellen hatásos lenne.

Az immunstimulátorok tulajdonságai

- A természetes (nem-specifikus) immunválaszt javítják
- Önmagukban vagy vakcinálással együtt is alkalmazhatók
- Változatos szerkezetű vegyületek (pl. poliszacharidok, alkaloidok)
- Természetes eredetű, környezetbarát anyagok
- Alkalmazási módok a haltenyésztésben: injekció, fürdetés, etetés
- Rövid idejű hatás
- Alkalmazásukat követően immunológiai memória nem alakul ki
- Példák: élesztő sejtfal (glukánok)
gyógynövények kivonatai (glukánok és más poliszacharidok)
tengeri makroalgák kivonatai (Ergosan)
szintetikus anyagok (Levamisol)
mikroalgák (β -karotin, β -glukán, asztaxanthin, esszenciális zsírsavak)

Az IMMUNALGA projekt

GINOP-2.3.2.-15-2016-00058: „Immunistimuláló hatású és eddig nem alkalmazott mikroalga törzseken alapuló preventív célú takarmány kiegészítők termelése és intenzív halgazdaságokban történő hasznosítása”

Időtartam: 2017. 07.01. – 2021. 06. 12.

Célkitűzések:

- Magas hozzáadott értékű mikroalga biomassza előállítása, illetve annak haltakarmányban történő hasznosítása
- Alap kutatási eredményekre épülő haltakarmányok vizsgálata etetési kísérletekben: milyen hatással vannak a halak élettani viszonyaira, anyagcsere folyamataira, valamint a keletkező halhús minőségi paramétereire
- A projekt másodlagos célja egy K+F hálózat létrehozása a hazai és európai haltakarmányozási kísérletek alap kutatási bázisának megteremtésére

Az IMMUNALGA projekt

Konzorciumi tagok és feladataik:

Nemzeti Agrárkutatási és Innovációs Központ, Halászati Kutatóintézet:

- projektvezető, algák bioaktív komponensek vizsgálata, immunstimuláló hatásmechanizmus tanulmányozása (*in vitro*), a természetes immunválasz és ellenálló-képesség vizsgálata (*in vivo*), alगतartalmú speciális tápok tesztelése a halhúsminőség vizsgálatával, takarmányozási technológia kidolgozása

Magyar Tudományos Akadémia, Szegedi Biológiai Központ, Növénybiológiai Intézet:

- alapkutatások, fotoszintetikus apparátus működésének vizsgálata, alगतörzsek szelekciója, oktatási anyag

Bay Zoltán Alkalmazott Kutatási Nonprofit Kft.:

- alगतörzsek termesztési paramétereinek meghatározása, és nagyvolumenű termelése, mikrobiológiai minőségbiztosítási rendszer kidolgozása, alगतörzsek szelekciója

Miskolci Egyetem:

- alga bioinformatikai adatbázis létrehozása

***In vitro* kísérletek**

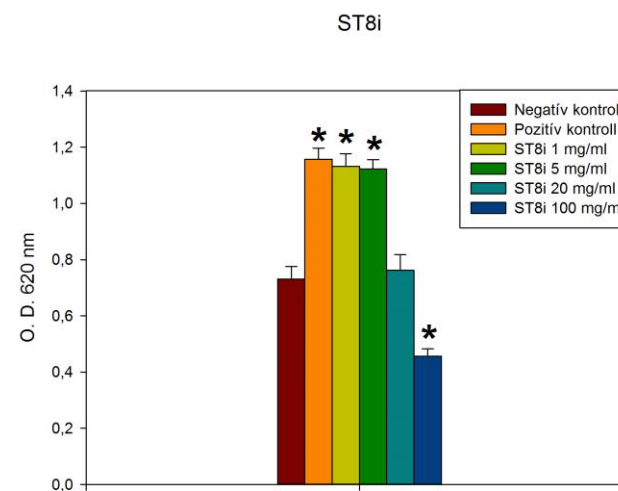
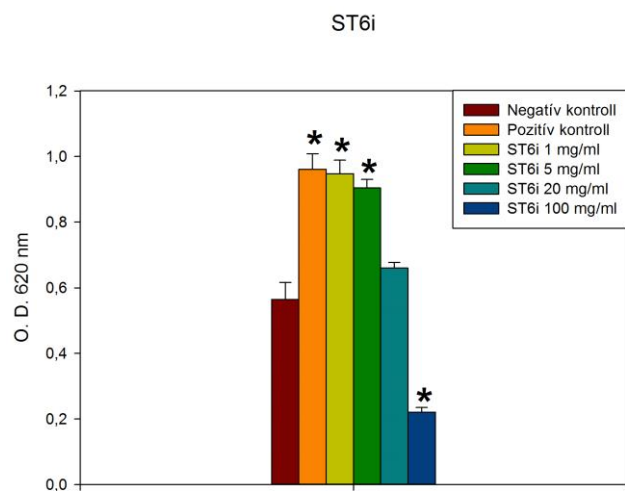
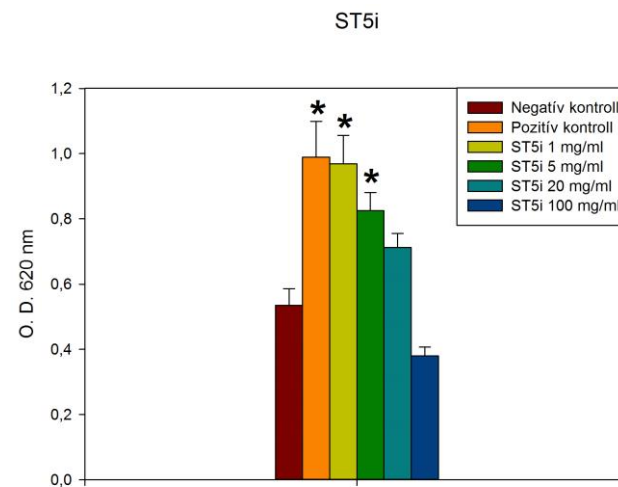
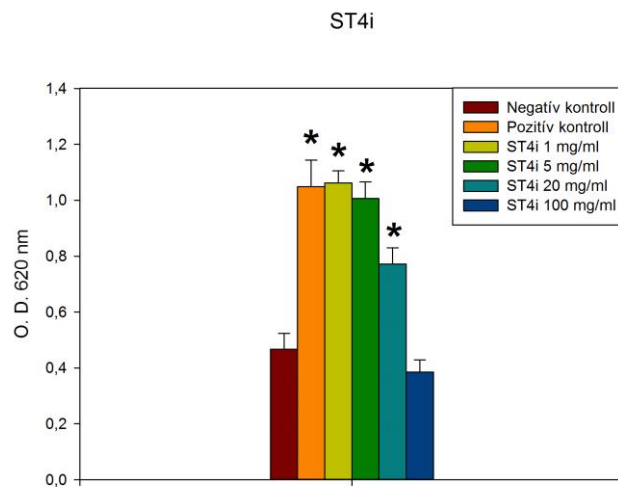
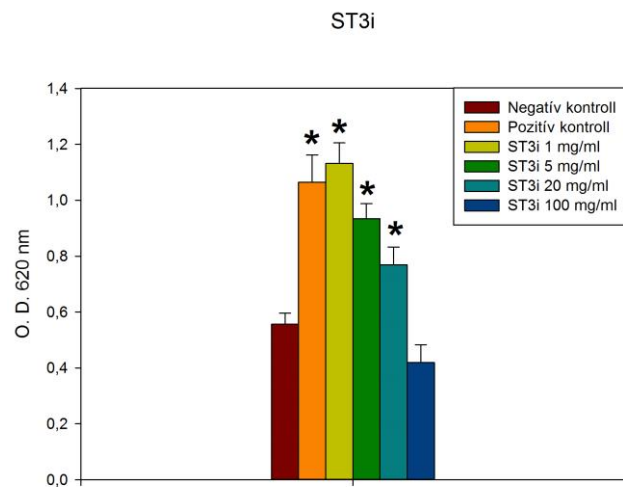
- Szivárványos pisztráng, süllő, ponty
- Tesztelésre kapott algatörzsek: ST3i, ST4i, ST5i, ST6i, ST8i. Magyarországon izolált zöld mikroalgák és cianobaktériumok
- Az algák különböző hígításainak elkészítése L-15 sejtenyésztő tápoldattal: 10x, 50x, 250x, 1000x (ponty); 100 mg/ml, 20 mg/ml, 5 mg/ml, 1 mg/ml (pisztráng, süllő)
- Fejvese boncolása 4 halból, fehérvérsejtek izolálása gradiens centrifugálással
- A sejtek koncentrációjának beállítása L-15 tápoldattal (5×10^6 sejt/ml (pisztráng), 1×10^7 sejt/ml (süllő, ponty))
- A sejtszuszpenziók szétosztása mikrotiter lemezekre
- Inkubáció az algák különböző hígításaival 48 (pisztráng, süllő) vagy 72 óráig (ponty)
- Mérés spektrofotométerrel: fehérvérsejtek respirációs aktivitása (pisztráng, süllő) vagy nitrogén-oxid (NO) termelése (ponty)

In vitro kísérletek

1. hal			2. hal			3. hal			4. hal			
												100 mg/ml vagy 10x
												20 mg/ml vagy 50x
												5 mg/ml vagy 250x
												1 mg/ml vagy 1000x
												Pozitív kontroll (20 v. 50 µg/ml LPS)
												Negatív kontroll (L-15)

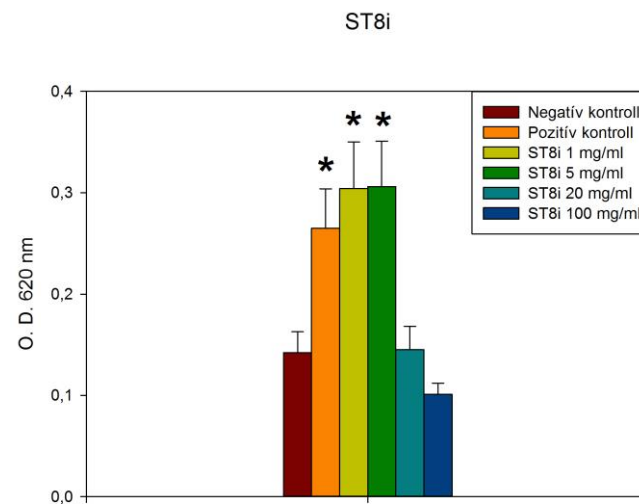
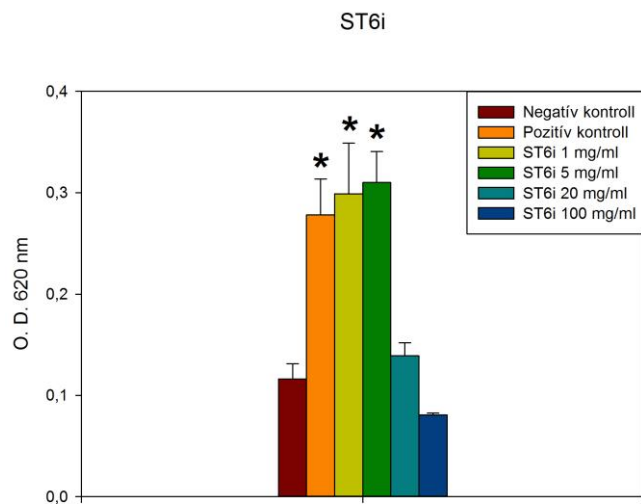
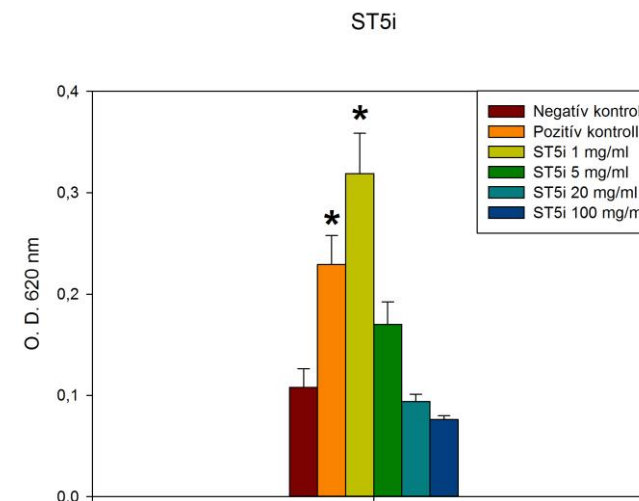
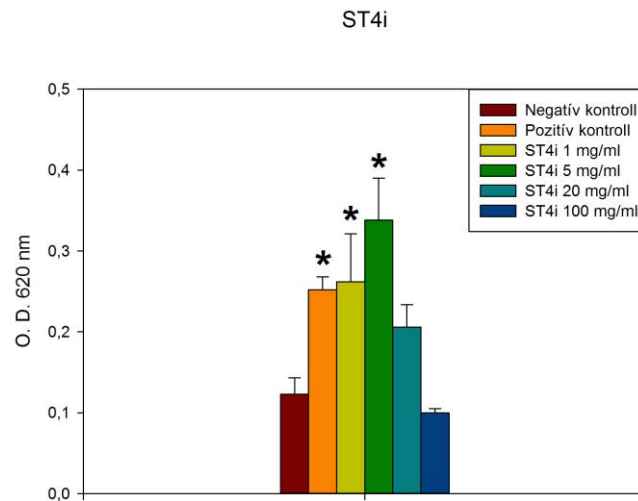
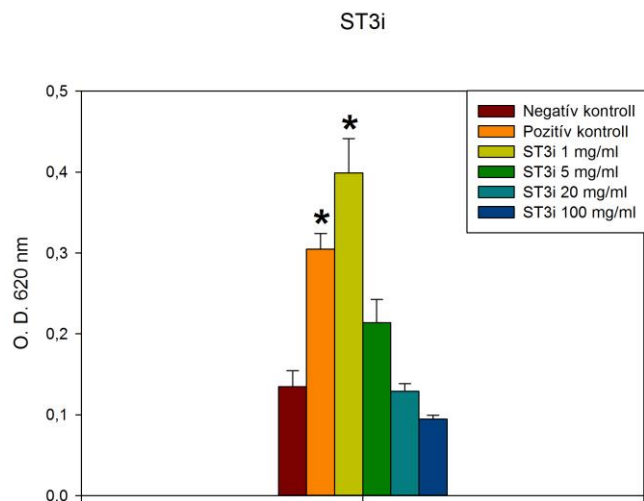
Statisztikai értékelés: a három párhuzamos átlaga, egytényezős varianciaanalízis ($p < 0,05$)

A mikroalgák hatása a szivárványos pisztráng fehérvérsejtjeire (respirációs aktivitás növekedése)



*: szignifikáns különbség a kontrollhoz képest ($p < 0,05$)

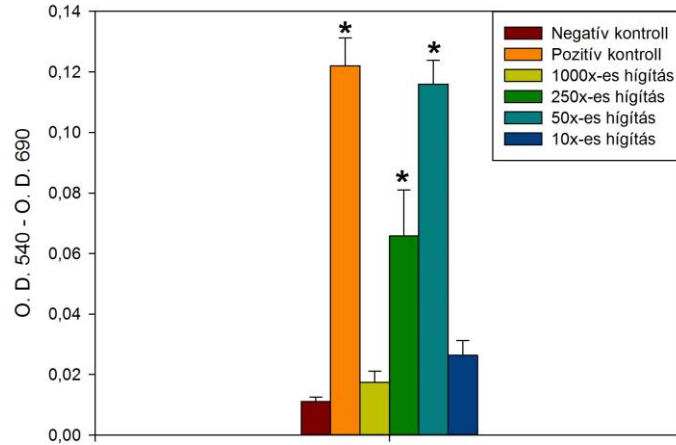
A mikroalgák hatása a süllő fehérvérsejtjeire (respirációs aktivitás növekedése)



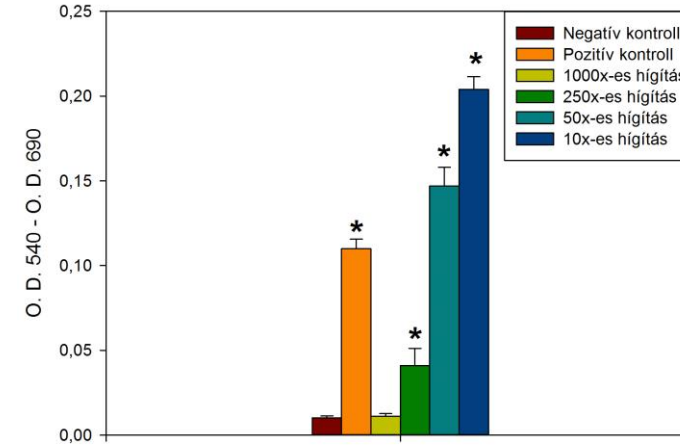
*: szignifikáns különbség a kontrollhoz képest ($p < 0,05$)

A mikroalgák hatása a ponty fehérvérsejtjeire (NO-termelés)

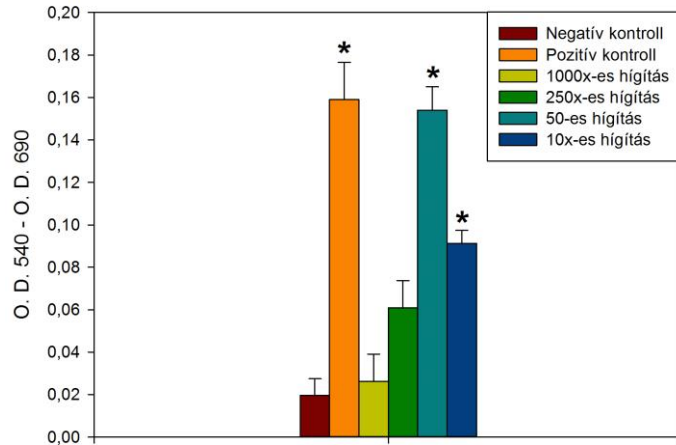
ST3i alga



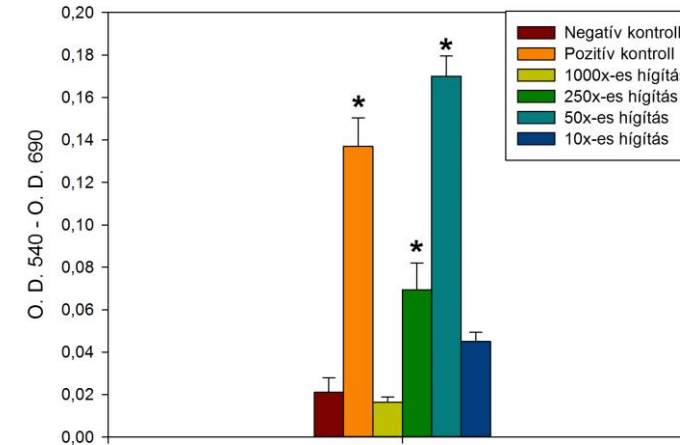
ST4i alga



ST5i alga



ST8i alga

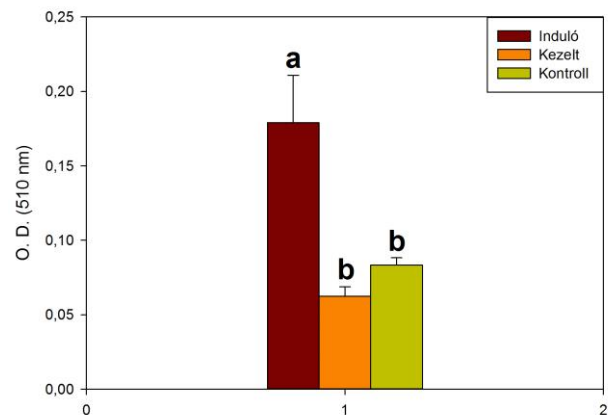


***In vivo* előkísérlet**

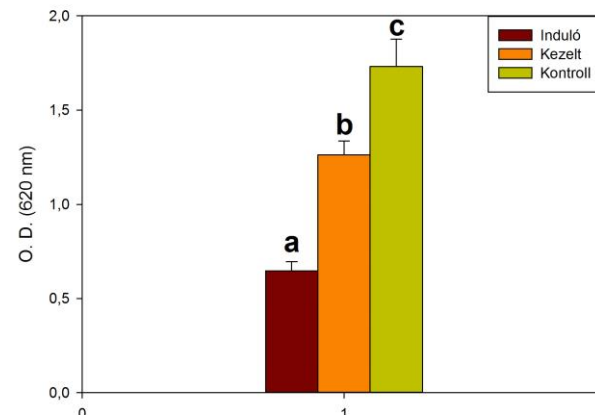
- Szivárványos pisztráng (449,5 ± 94,5 gramm)
- ST6i alga 5%-os dózisa
- Időtartam: 3 hét
- Két csoport: kontroll és kezelt (7 hal/csoport)
- Mintavételek az etetés megkezdése előtt (induló) és a kísérlet végén (kontroll és kezelt)
- Fejveseminták: fehérvérsejtek respirációs és fagocitáló aktivitása
- Vérminták: vérplazma lizozimaktivitása, összfehérje- és immunoglobulin-szintje

Az ST6i mikroalga (5%) hatása a szivárványos pisztráng természetes immunválaszára

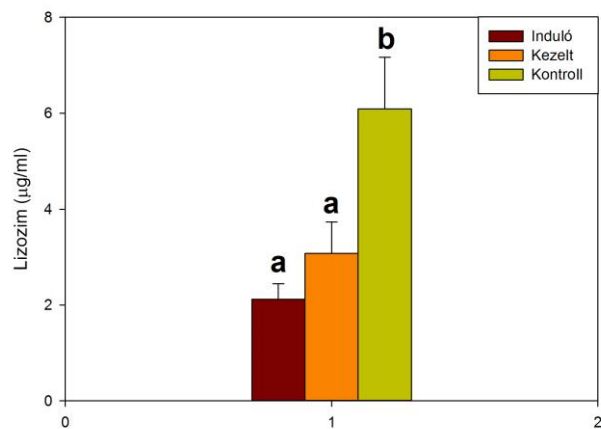
Fagocitáló aktivitás



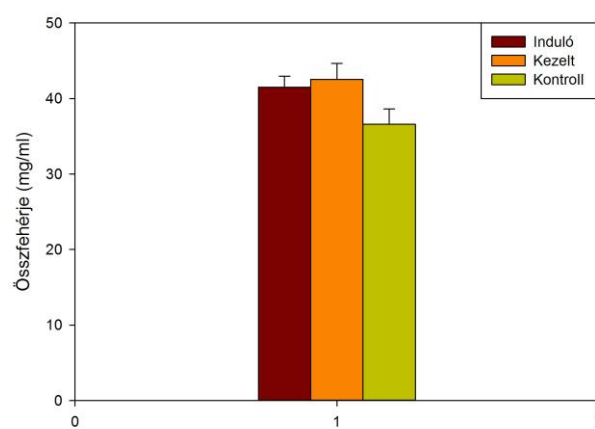
Respirációs aktivitás



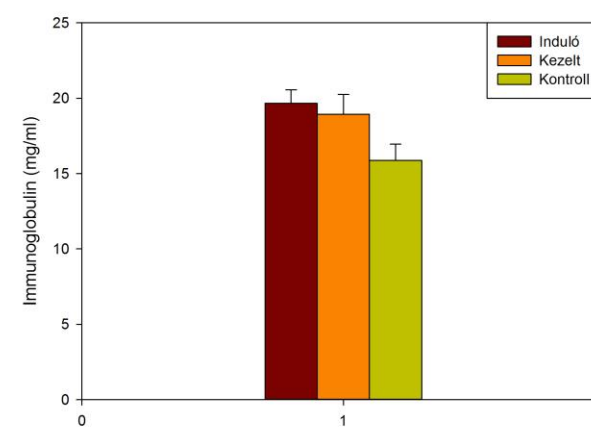
Lizozimaktivitás



Összfehérjeszint



Immunoglobulin-szint



a, b, c: szignifikáns különbség ($p < 0,05$) a csoportok között

Összefoglalás

In vitro kísérletek:

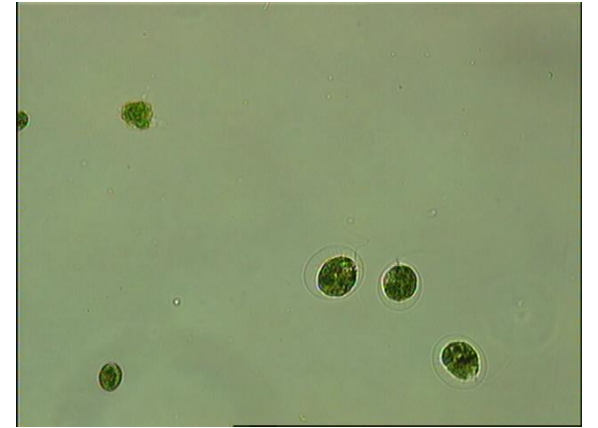
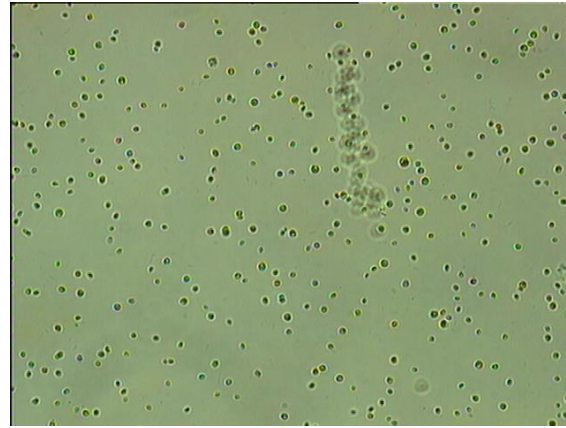
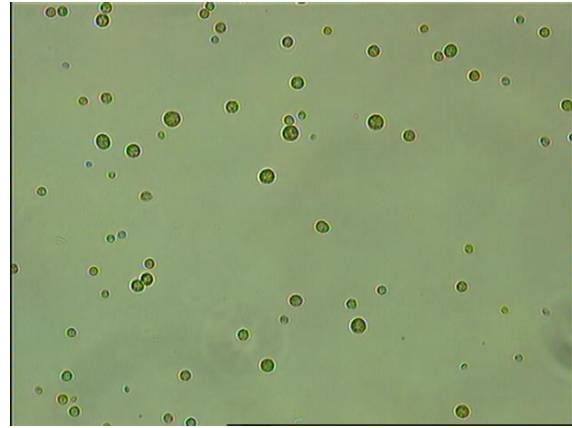
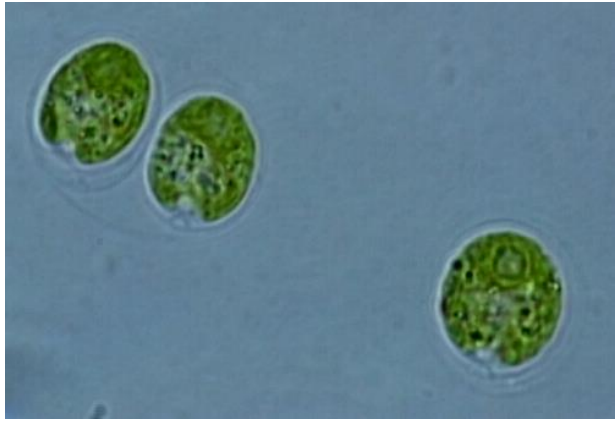
- Valamennyi vizsgált algának volt olyan hígítása, amely szignifikáns ($p < 0,05$) mértékben növelte a fehérvérsejtek aktivitását mindhárom halfaj esetében
- A süllő és a ponty esetében az algák alacsonyabb, a ponty esetében a magasabb koncentrációi voltak hatékonyak

In vivo előkísérlet:

- A fehérvérsejtek respirációs aktivitásának és a vérplazma lizozimaktivitásának alacsonyabb szintje a kezelt csoportban az alga túladagolásával magyarázható

További feladatok:

- *In vitro*: Az immunválasszal kapcsolatos gének kifejeződésének vizsgálata (qPCR, Western blot)
- *In vivo*: újabb etetési kísérletek (ponty, pisztráng), többféle algadózissal, heti egyszeri vérmintavétellel



KÖSZÖNÖM A FIGYELMET!

